

公開

複製禁止

「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発PJ」
第1回中間評価分科会説明資料
資料6-2(公開)

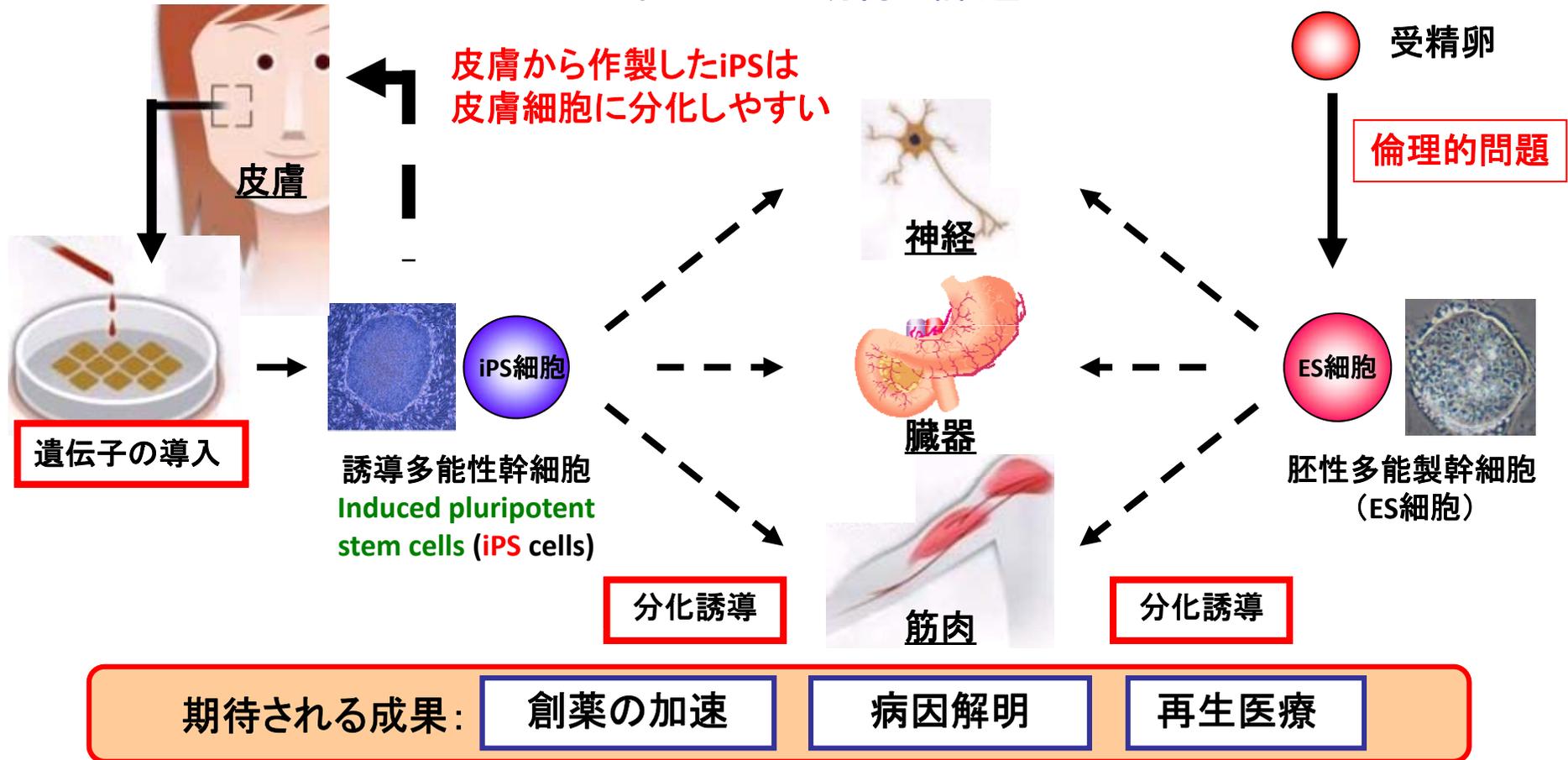
「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発」
(旧名称:iPS細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発)
第1回 中間評価分科会説明資料

議題5.2 プロジェクトの概要説明 (公開)
「研究開発成果」及び「実用化の見通し」

平成23年7月20日(水)

■ iPS細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発

iPS細胞への期待と課題



解決すべき課題

誘導効率が低く、得られたiPS細胞の特性がばらばらで不安定
細胞の特性(自己複製能、多分化能)・安全性(腫瘍化の危険性)を評価する基準がない
誘導の分子機構が不明

iPS細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発

21年度

22年度

23年度

24年度

25年度

(1)安全・効率的な
iPS細胞作製技術

新規誘導因子の同定

↑↓ (五島、山中)

安定な誘導法の確立

(中西、新家) (村田)

↑↓

(2)iPS等幹細胞の
選別・評価・製造
技術等の開発

選別・評価技術、自動
化、幹細胞の比較

(須田、須藤) (塩田)

(浅島、平林、アルブラスト)

(阿久津、川重、大陽日酸、セルシード)

Muse細胞 (出沢、藤吉、中畑、鍋島)

疾患特異的iPS (中畑、福田)

心筋細胞の誘導 (福田)

心毒性スクリーニング (安田)

第1世代

第2世代

(3)創薬スクリーニ
ングシステム開発

コンソーシアム設置 (関島) 創薬スクリーニング

最適化

データベース化
公開、供給

製造・保存技術

供給システム

再生医学

推奨iPS細胞の選定

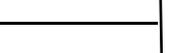
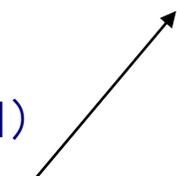
iPS・幹細胞
制御機構

安全性

分化細胞誘導技術

第3世代
(実用化)

産業応用



安全かつ効率的なiPS細胞作製のための基盤技術の開発

新規iPS細胞誘導遺伝子の探索

五島(AIST)、山中(京大)

世界最多高品質のヒト遺伝子ライブラリー

山中4因子のうちの一つ(Klf4)の機能を代替する遺伝子を探索

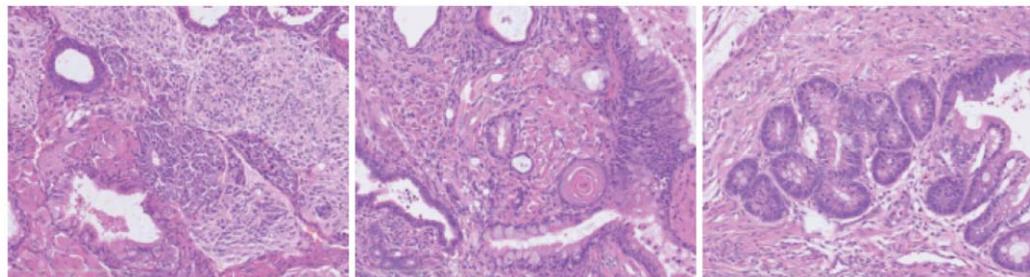
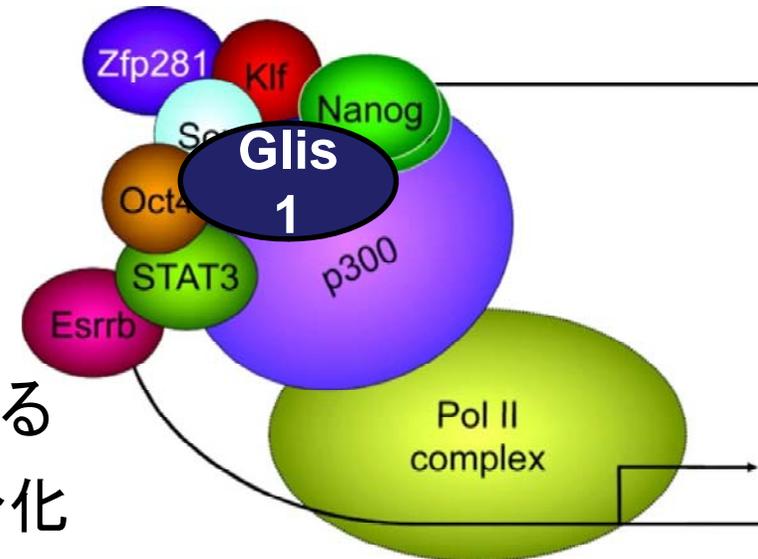


新規誘導遺伝子、**Glis1**を発見

GlisはOct3/4、Sox2、Klf4と結合

Mycがなくとも一定数のiPSを誘導できる

Glis1で誘導したiPS細胞は三胚葉に分化



neuron

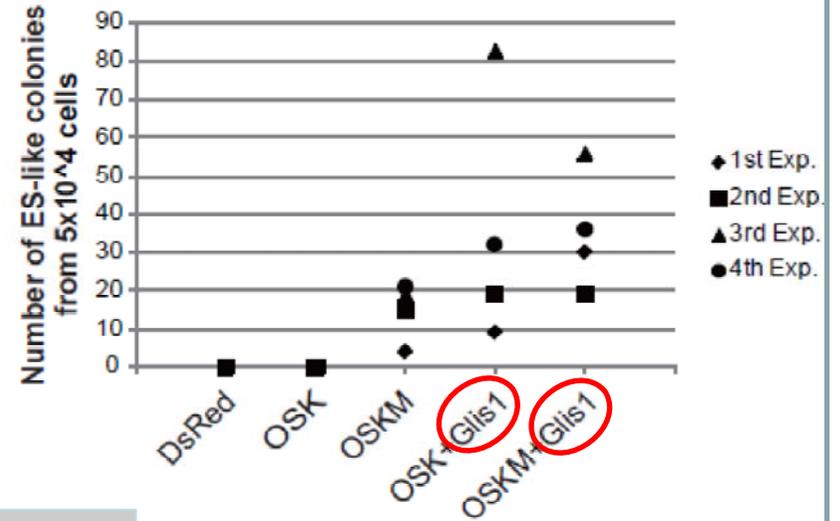
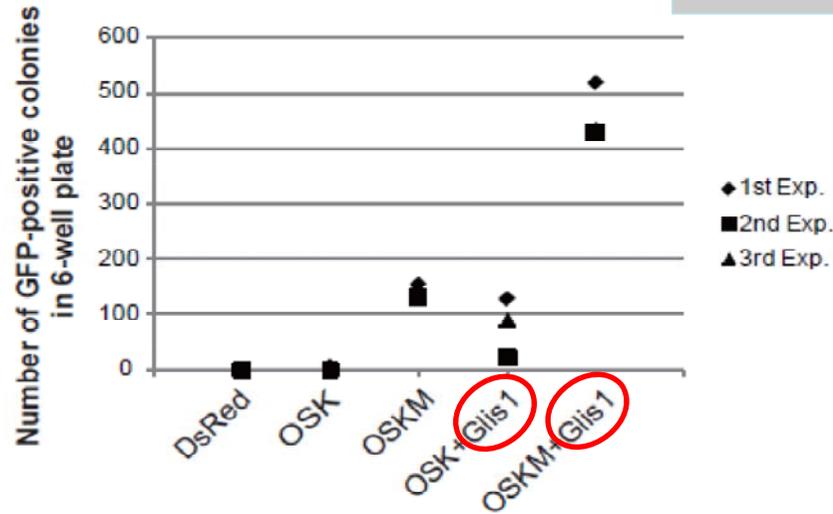
smooth muscle

columnar cell

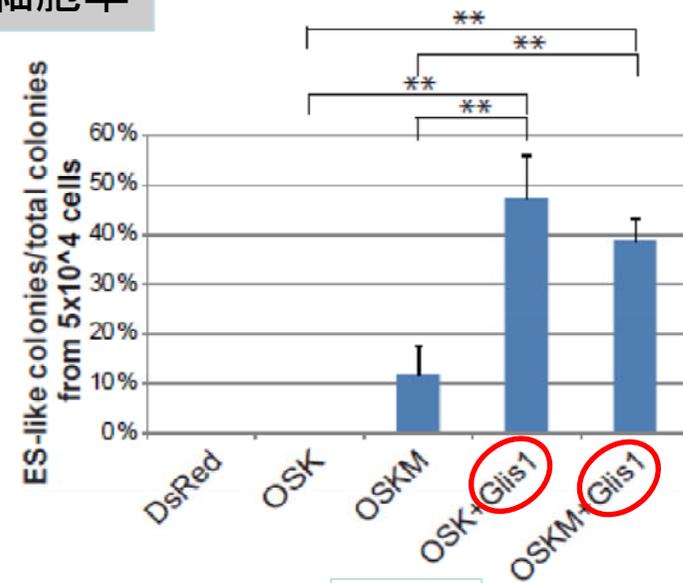
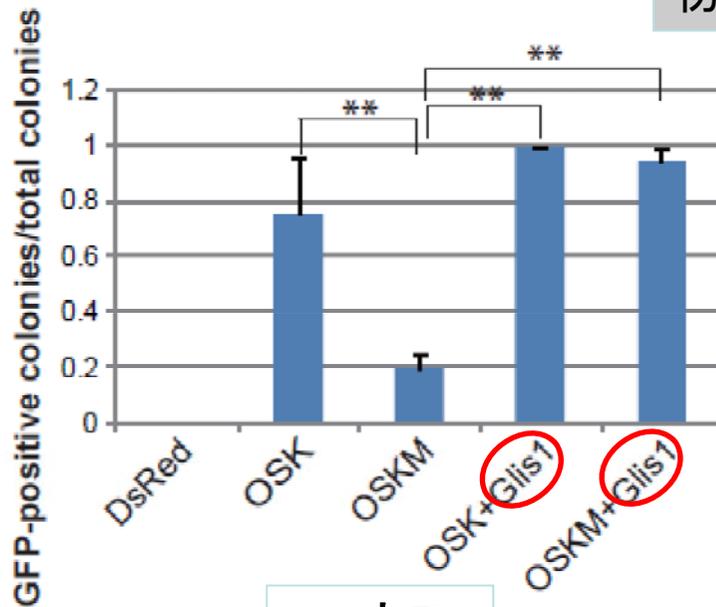
Glis1と山中因子によるiPS細胞誘導

五島(AIST)、山中(京大)

iPS細胞作製効率



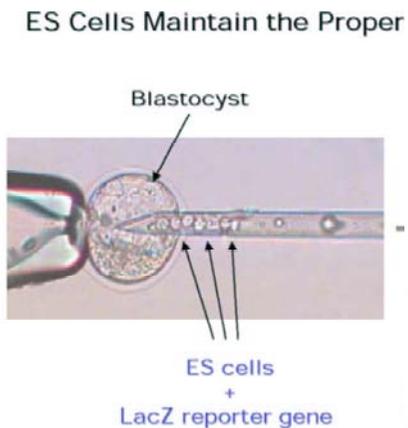
初期化完全細胞率



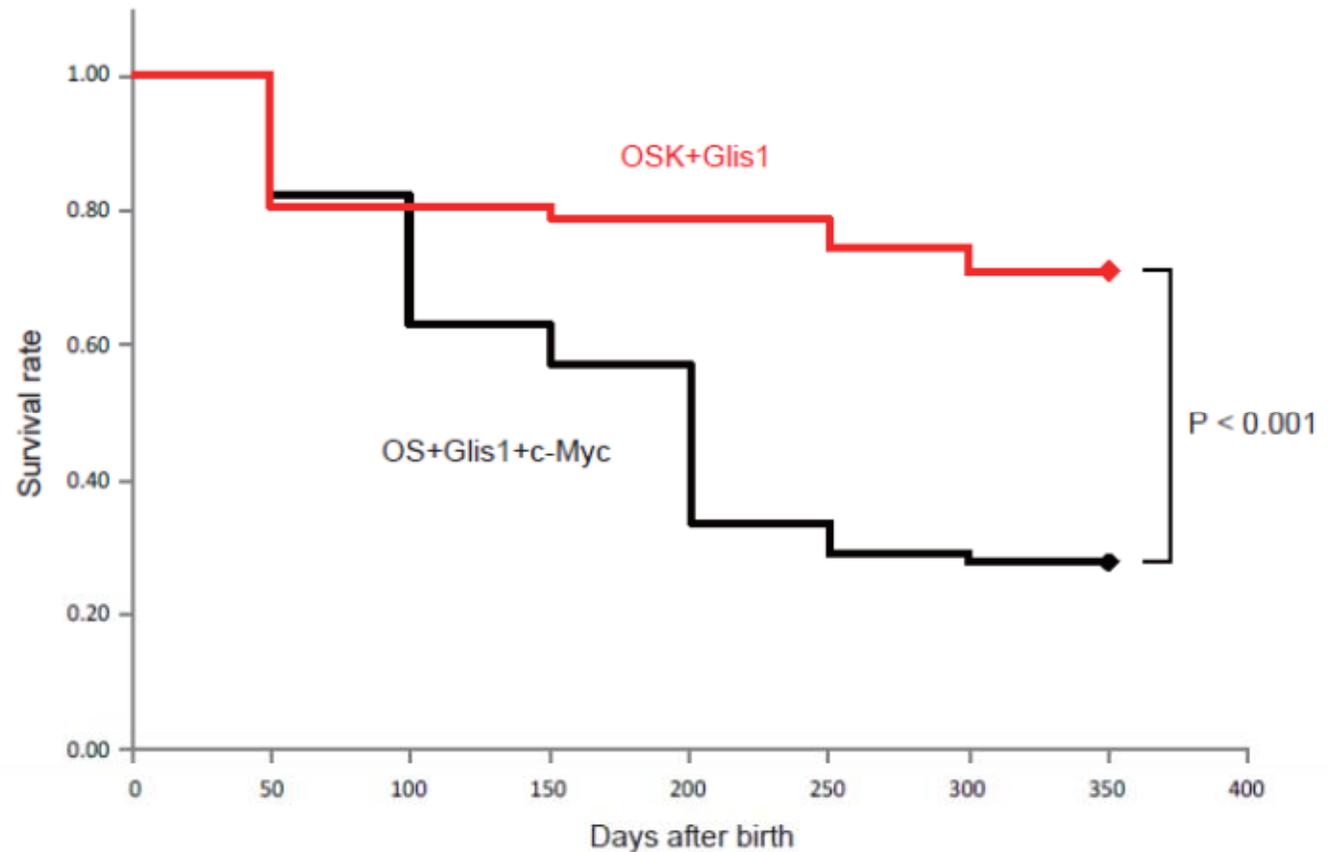
マウス

ヒト

Glis1を用いて作製されたiPS細胞由来キメラマウスの長期生育の長期生育



ES cells can give rise to any tissues in the body including germ cells



五島(AIST)、山中(京大)

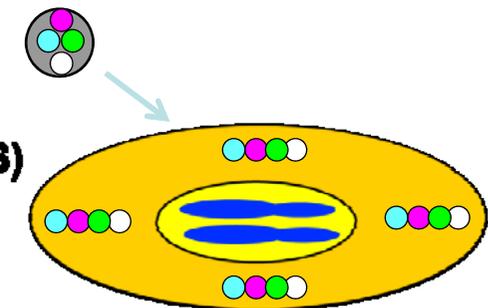
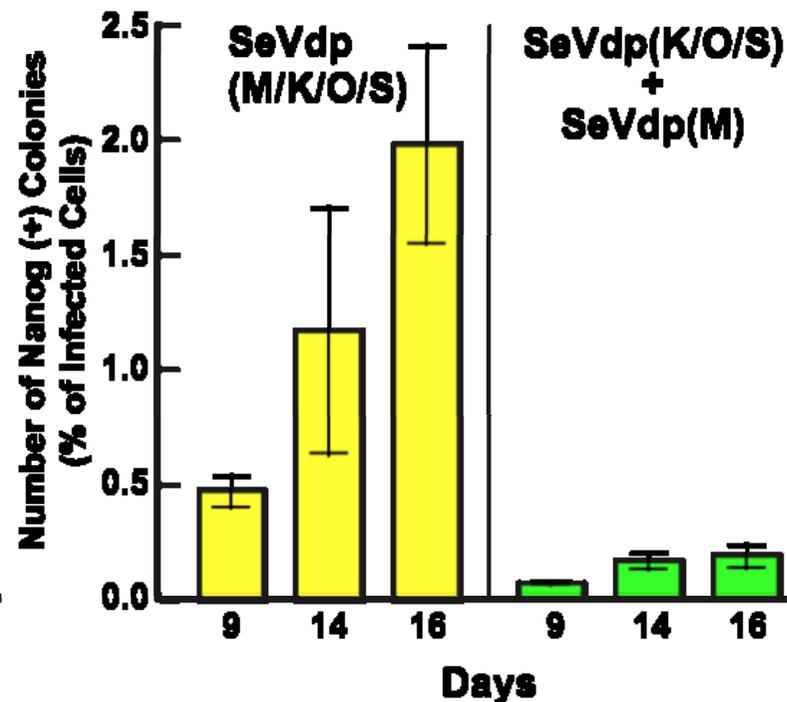
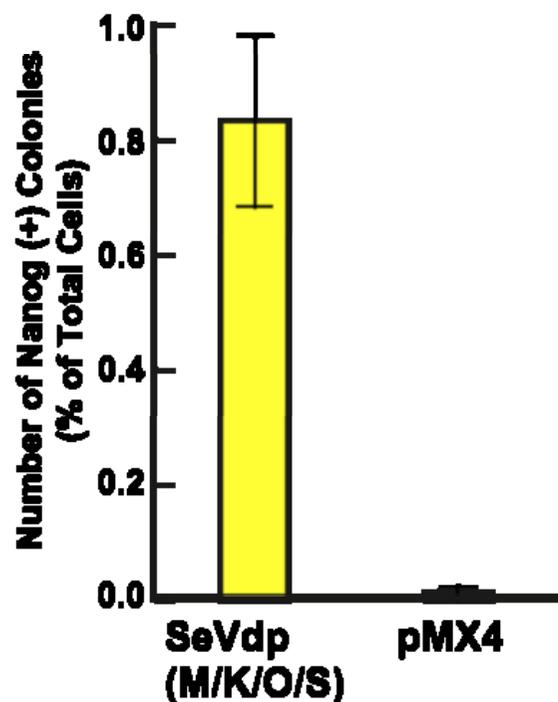
iPS細胞等幹細胞産業応用促進基板技術開発 研究開発項目①：

安全かつ効率的なiPS細胞作製のための基盤技術の開発

安全な遺伝子導入技術によるiPS細胞の作成 中西、新家(AIST)

SeVdp (M/K/O/S): 4因子を同時に搭載したベクターを開発

4因子を染色体に挿入せずに持続的に発現させ、均質なiPS細胞を効率よく作出する

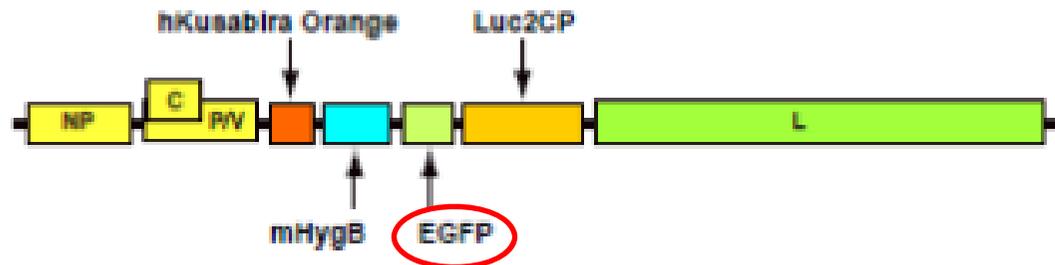


センダイウイルス除去化合物のスクリーニング

細胞: SeV-BHK

化合物処理時間: 48 hr

検出対象: GFP



選択効率

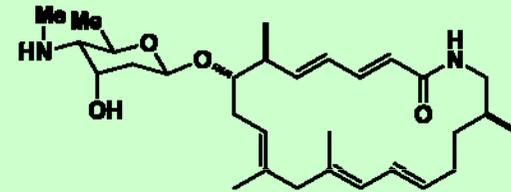
Total (化合物)
124,483

↓
1st Hit (GFP<30%)
6,497 (5%)

↓
2nd Hit
5

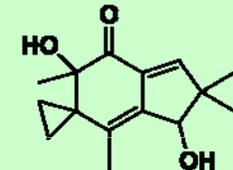
AK-BV71・・・再現培養サンプルに活性が認められず。

AK-BU73・・・vicenistatin

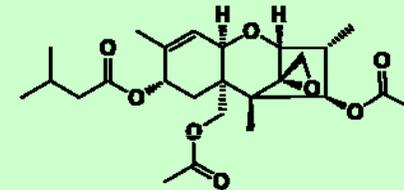


NBRC008533・・・illudin M, S

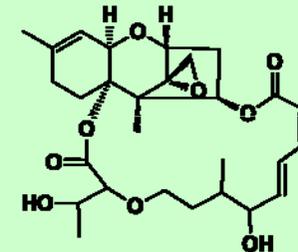
ツキヨタケの生産する抗腫瘍物質



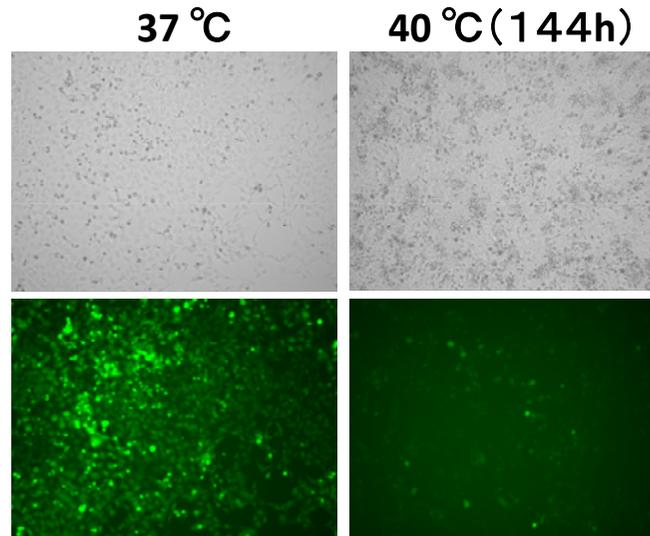
NBRC009955・・・T-2-toxin



NBRC009005・・・roridin E



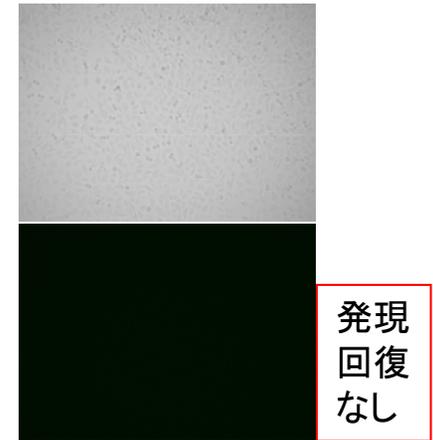
高温処理(40°C培養)によるセンダイウィルスの除去



<Protocol>

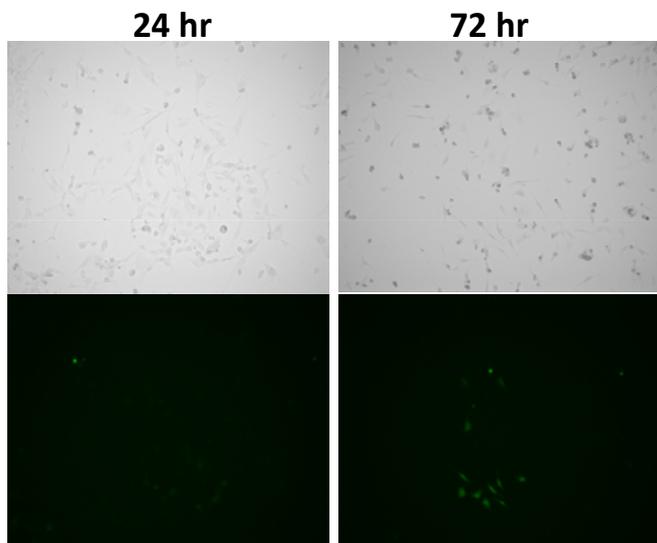
- ↓SeV(+)-HeLaを 5×10^4 cells/mlの濃度で播種。
- ↓7 hr incubation
- ↓40°Cで144 hr incubation
- ↓37°Cで1 week incubation
- ↓40°Cで144 hr incubation
- ↓37°Cで1 month incubation

37°C 1 month



発現回復なし

37°C
、GFPの発現が著しく減少

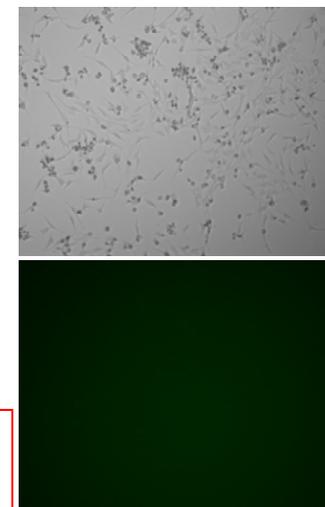


37°Cで培養すると、GFPの発現は回復しないが、一部、GFP発現が減少しなかった細胞が増殖する



全ての細胞でGFP(-)

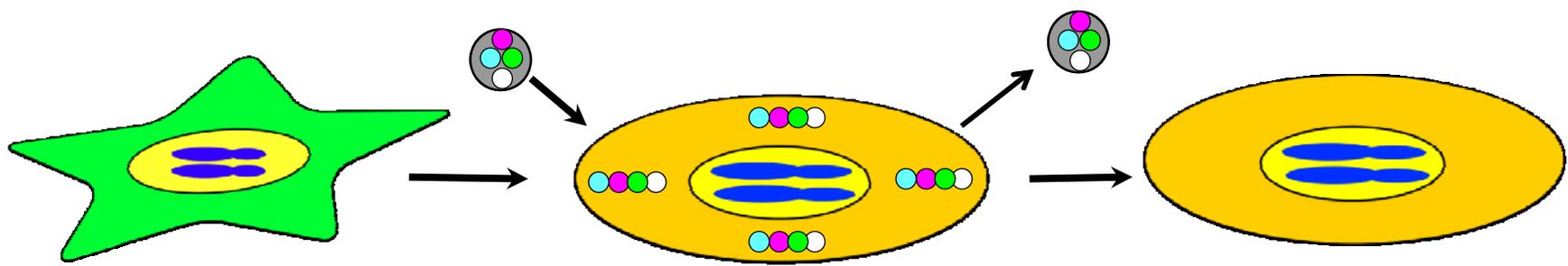
40°C(144h)



持続発現型センダイウイルスベクターを使った ヒトiPS細胞の作製 (産業技術総合研究所)

iPS細胞作製用SeVdp-iPSベクターの大量生産技術を確立

(Nishimura, et al., JBC, 286, 4760-4771 (2011))



ヒトやマウスの
組織細胞

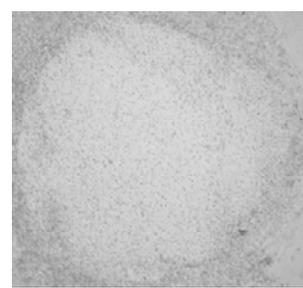
4個の遺伝子を一度に導入して染色体に挿入せずに持続的に発現させ、均質なiPS細胞を効率よく作出する

遺伝子を除いてから移植することで安全性と再現性を確保

ヒト線維芽細胞・
ヒト歯髄細胞・
ヒト臍帯血細胞・
ヒト末梢血細胞からの
iPS細胞の樹立を確認

山中4因子の発現バランスを変えiPS細胞の樹立を最適化

siRNAを使った効率の良いベクター除去技術を確立

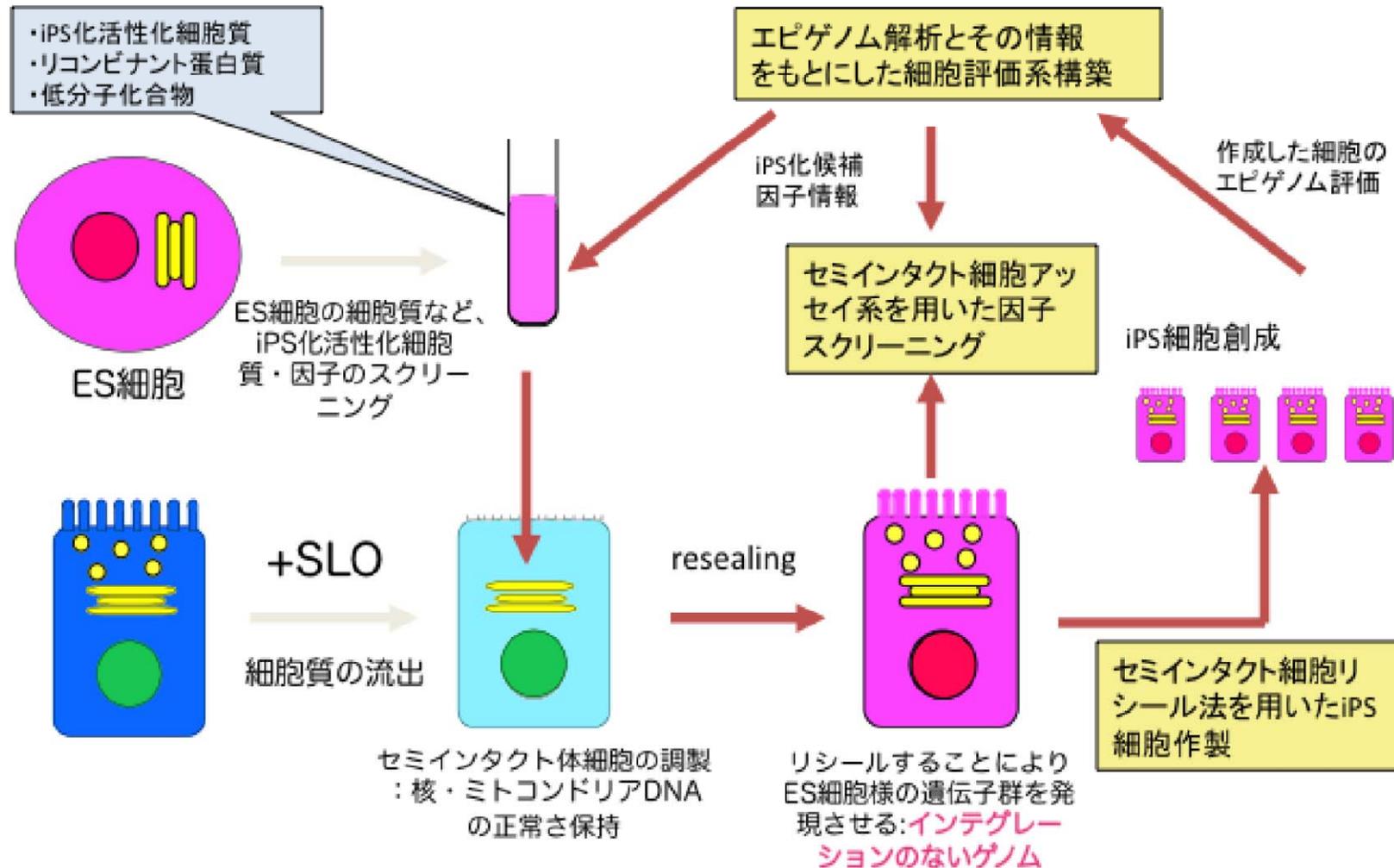


SeV(+)-iPSをMEF上で40°C培養
正常ヒトiPS細胞と区別できない

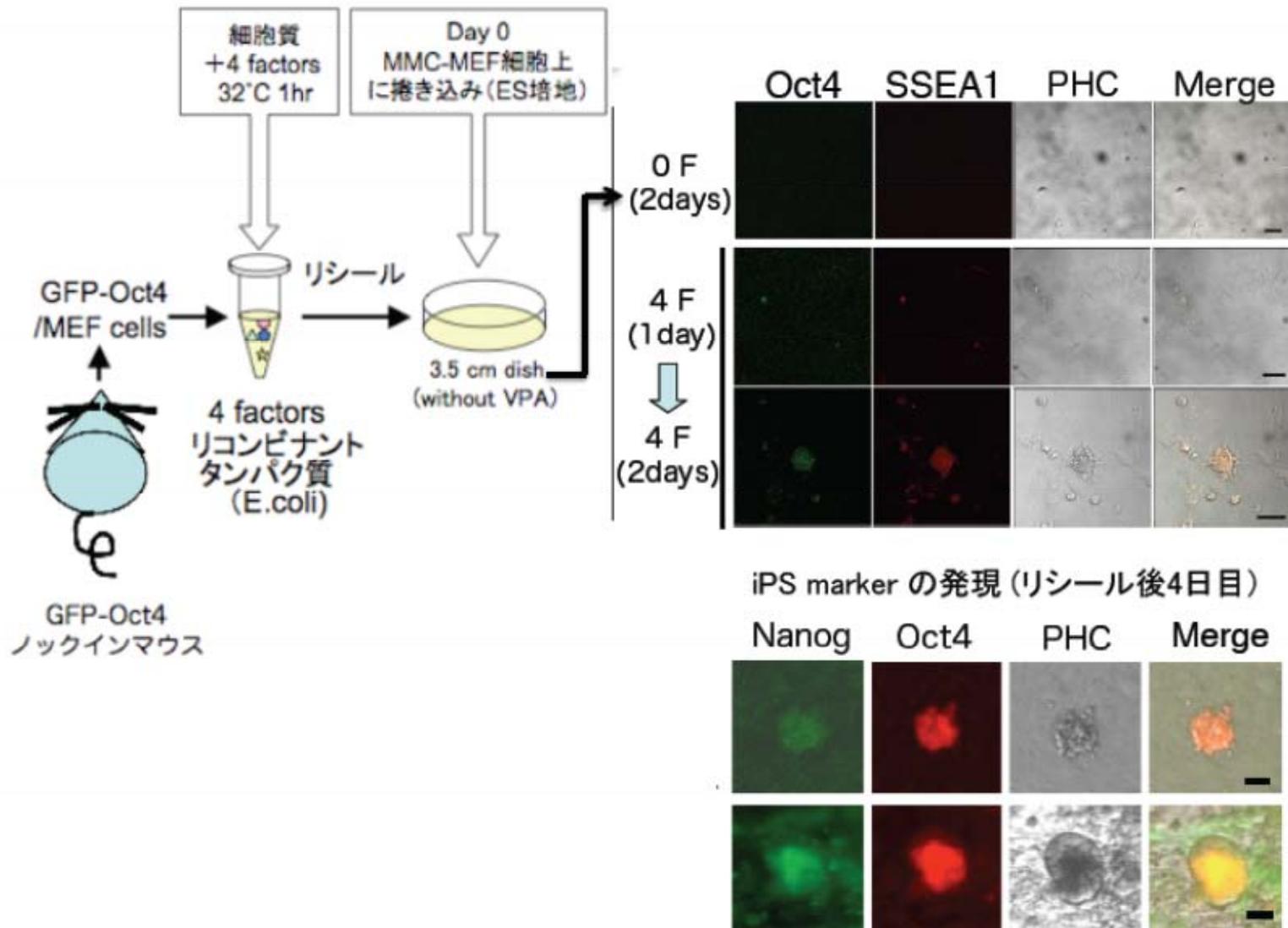
安全な遺伝子導入技術によるiPS細胞の作成

村田、塩田(東大)

セミインタクト細胞リシール法を駆使したタンパク質導入法によるiPS細胞の作成



タンパク質導入法により導入後4日でマーカータンパク質の発現とiPS様コロニー形成が観察された



iPS細胞等幹細胞産業応用促進基板技術開発 研究開発項目 ①:

安全かつ効率的なiPS細胞作製のための基盤技術の開発

新規iPS細胞誘導遺伝子の探索

五島(AIST)、山中(京大)

特許、Nature発表、他に19個の候補因子、誘導因子の作用機構解明に糸口

達成率: 100%

安全な遺伝子導入技術によるiPS細胞の作成

中西、新家(AIST)、村田、塩田(東大)

特許、論文発表、革新的iPS誘導法、ウイルス除去にも成功、タンパク導入法は改善必要

達成率: 100%



iPS標準化の基盤

誘導因子の作用機構、誘導機構解明への一歩

iPS細胞等幹細胞産業応用促進基板技術開発

研究開発項目②:

iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発

iPS細胞等幹細胞の比較・評価技術等の開発

①生体由来の多様な多能性細胞の比較

須田(慶応)、東レ)

出澤(東北)、中畑・藤吉(京大)

中畑(京大)

始原生殖細胞からiPSを誘導

多能性幹細胞Museの発見

MuseからiPS細胞を誘導

疾患特異的iPS細胞の樹立

②iPS細胞間の比較

浅島(AIST)、平林(AIST)、アルブラスト

分化指向性、核型解析

エピジェネティクス、

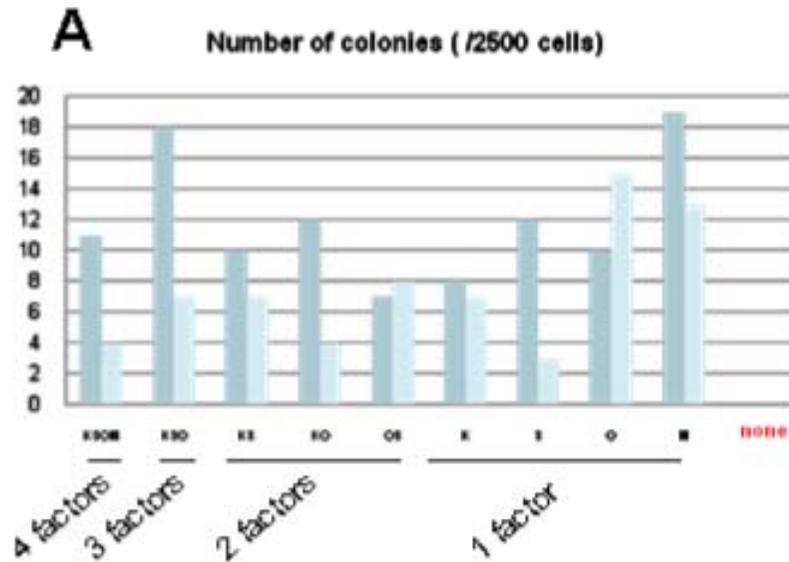
遺伝子発現、糖鎖解析

iPS細胞等幹細胞の品質管理、安定供給法の開発

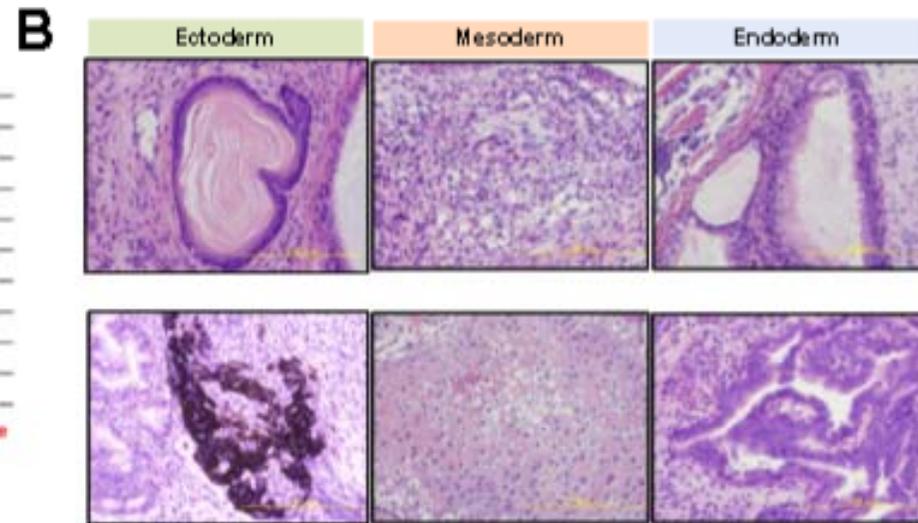
阿久津(成育)、川崎重工、大陽日酸、セルシード

培養の自動化、凍結保存の効率化

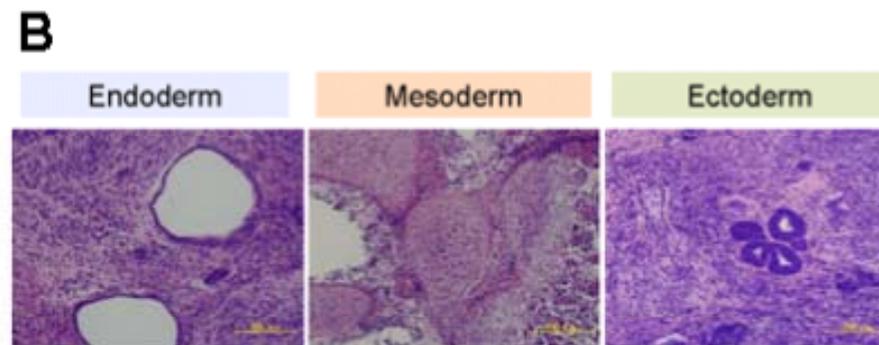
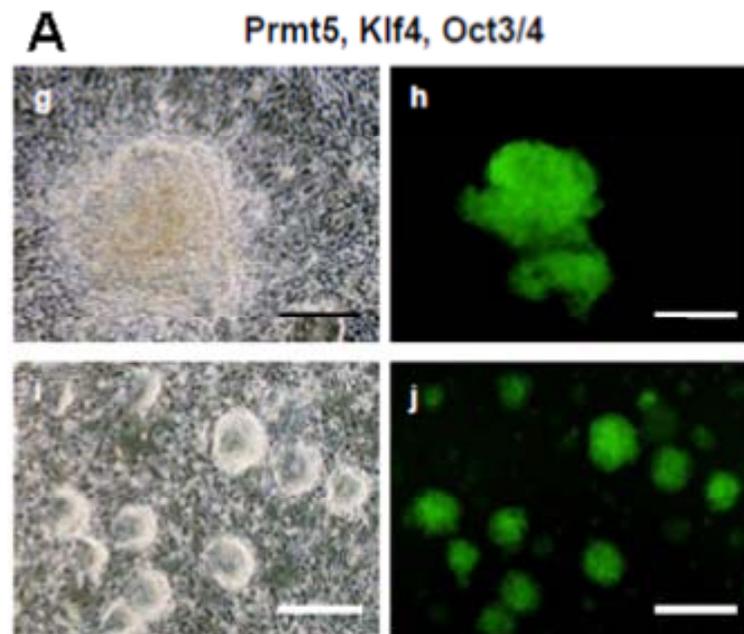
始生殖細胞の多分化能獲得に必要な因子の解析と同定



(A) 1因子の導入でiPS化が可能

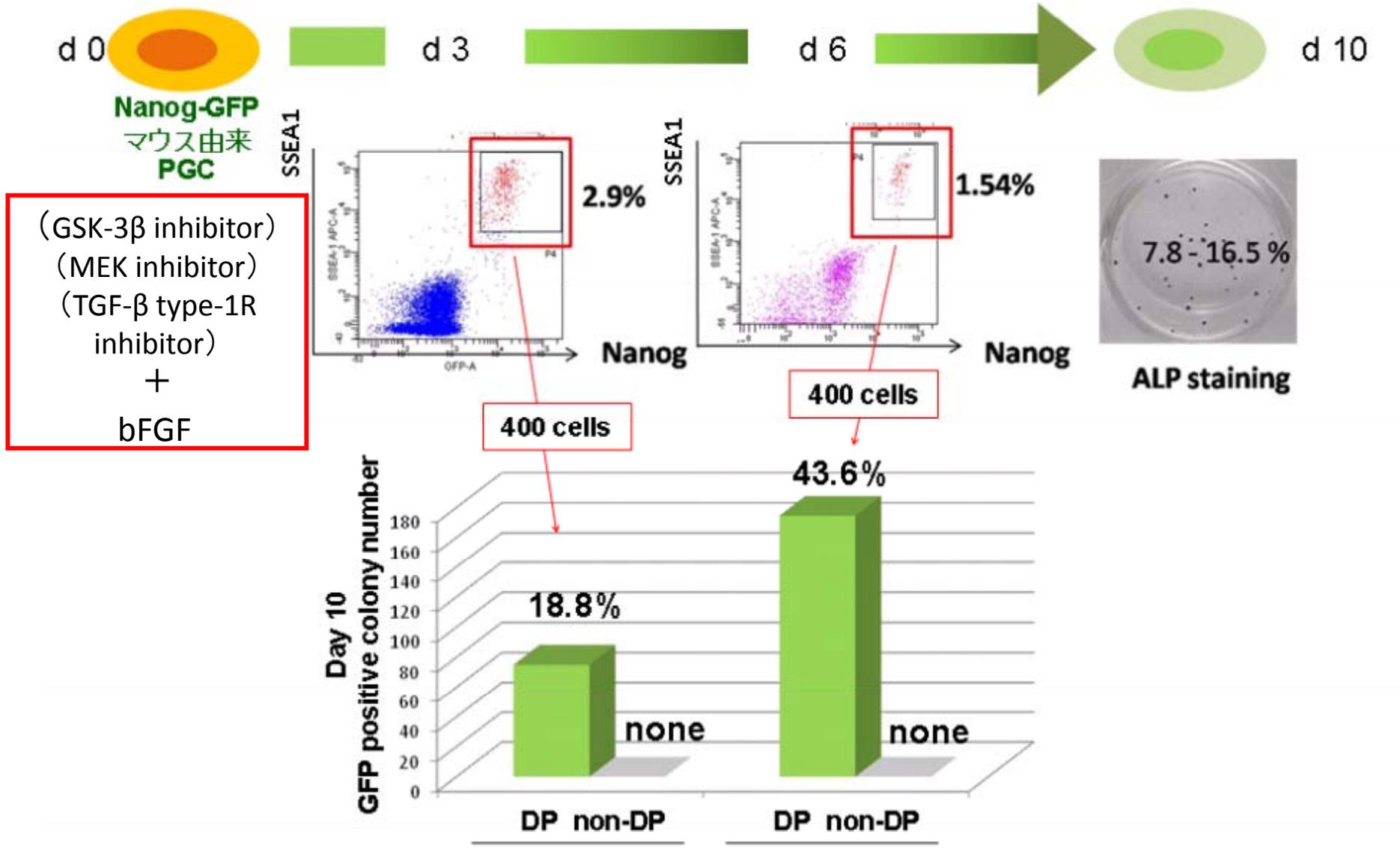


(B) 作製したiPS細胞はテラトーマを形成



(A) MEFからPrmt5、Klf4、Oct3/4によって誘導されたiPS様細胞、
(B) 誘導された細胞によるテラトーマの形成

遺伝子導入なしで多能性細胞を誘導する

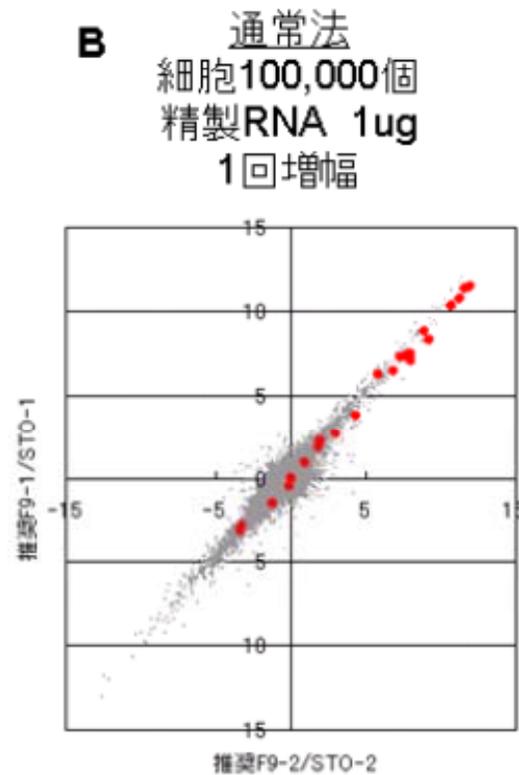
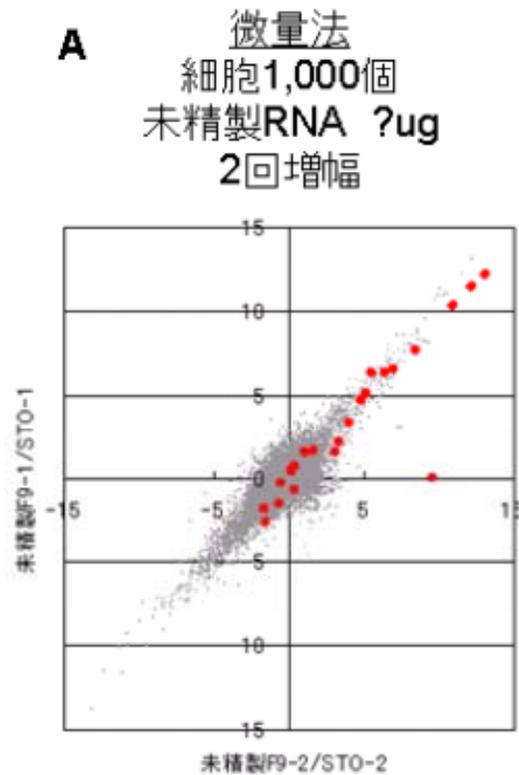


(GSK-3β inhibitor)
(MEK inhibitor)
(TGF-β type-1R inhibitor)
+
bFGF

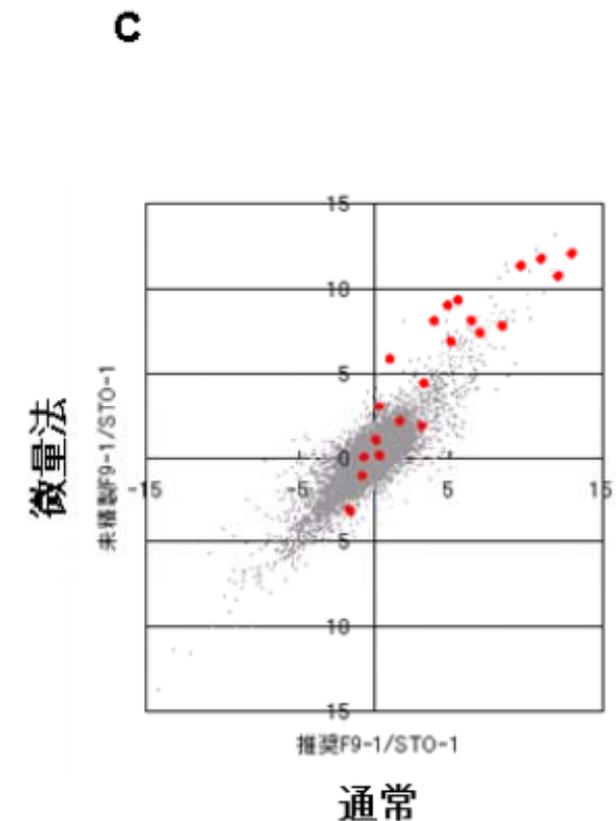
始原生殖細胞の3種類の阻害剤による初期化過程の解析

微量細胞からの網羅的遺伝子発現解析

同手法間の比較



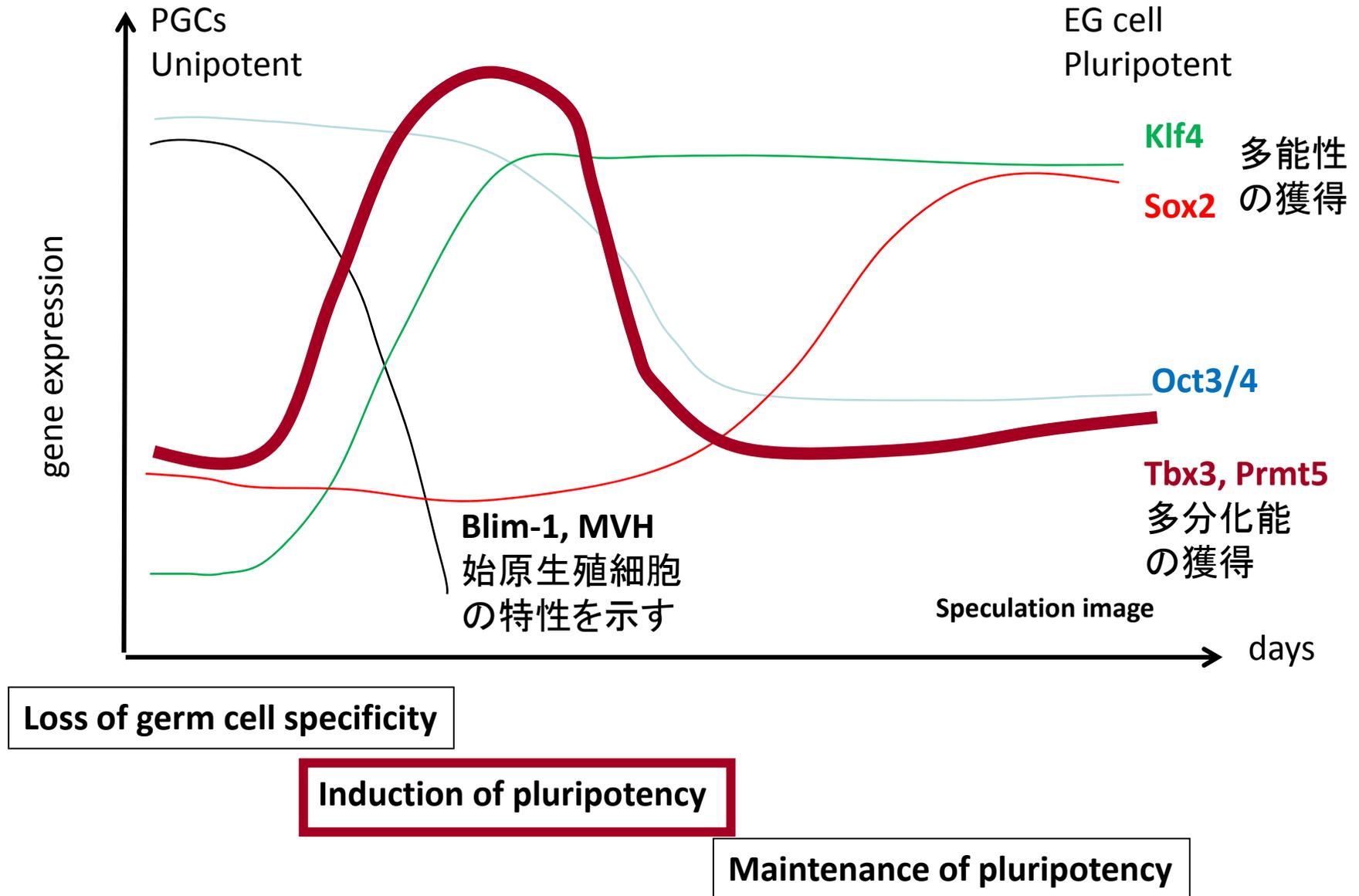
2つの手法間の比較



微量法と通常法の比較

変動比のスクアッタとES細胞特異的24遺伝子(赤スポット)の分布を示す。同手法比較では $y=x$ 上に分布し、2手法間比較では、ほぼ $y=x$ 上に分布する。

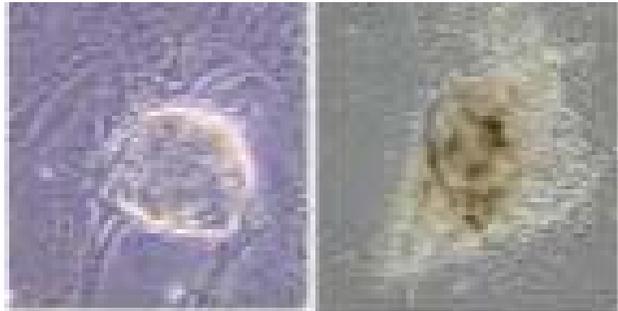
始原生殖細胞の多能性獲得過程で変動する遺伝子



Muse細胞の同定、分離、性質の解析

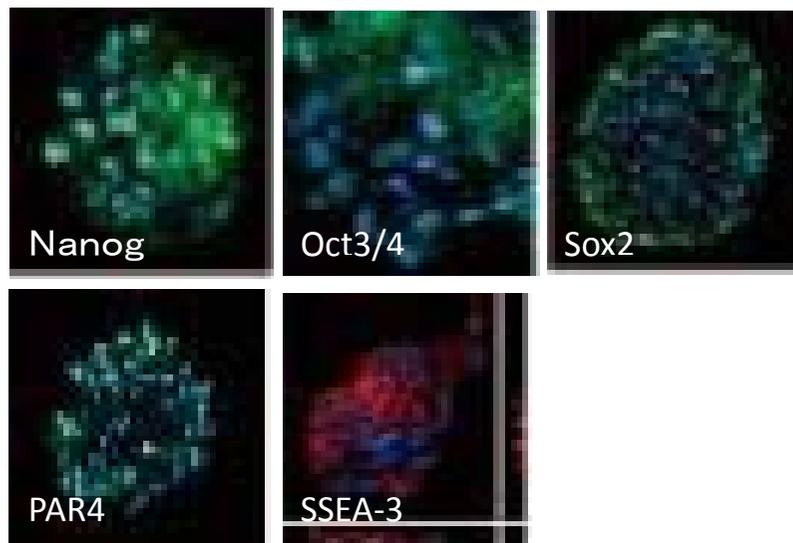
Muse細胞を特定、分離する方法の確立

骨髓間葉系培養細胞から自然発生的に形成された胚葉体に類似の細胞塊

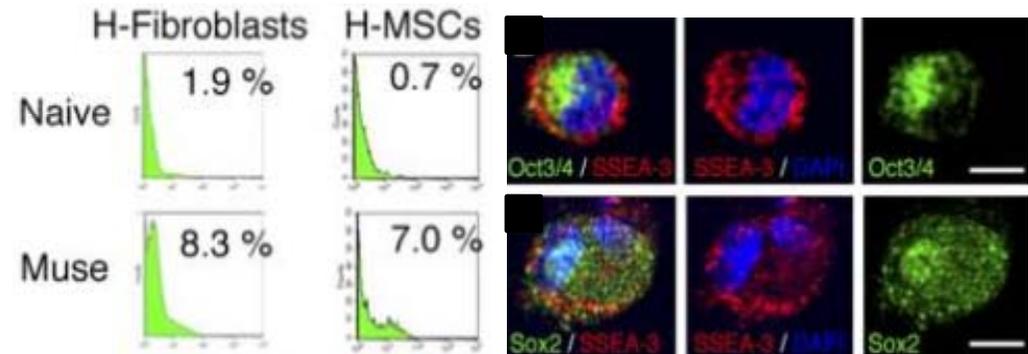


- 幹細胞一般のストレス耐性
- 長時間ストレス刺激後で増えるマーカーを探索
- SSEA-3陽性、CD105陽性のMuse細胞を精製
- 浮遊培養でMuse細胞から形成される細胞塊はES細胞の胚葉体と類似
- Alkaline phosphatase反応陽性である。

Muse細胞から形成されたクラスターは多能性マーカーを発現する。



SSEA-3陽性率



クラスター

クラスター (ALP)

ES細胞 (ALP)

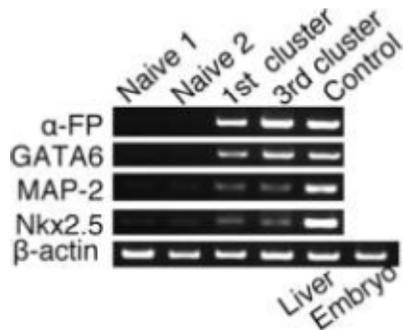
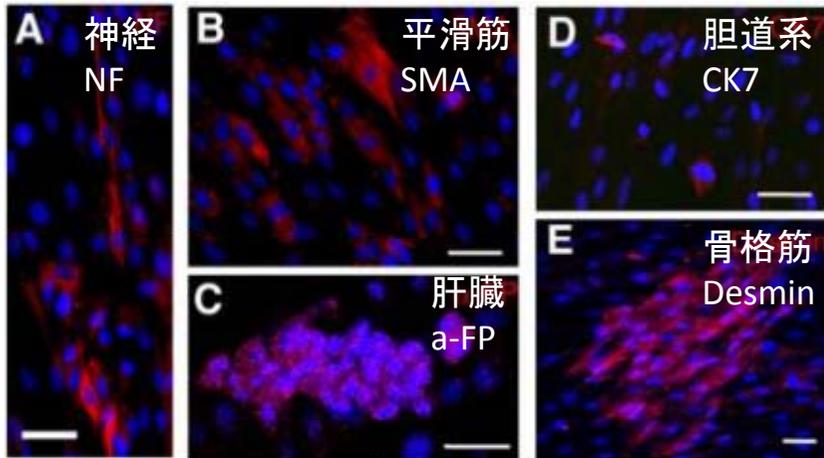


Muse細胞から形成された細胞塊(クラスター)はアルカリフォスファターゼ反応陽性

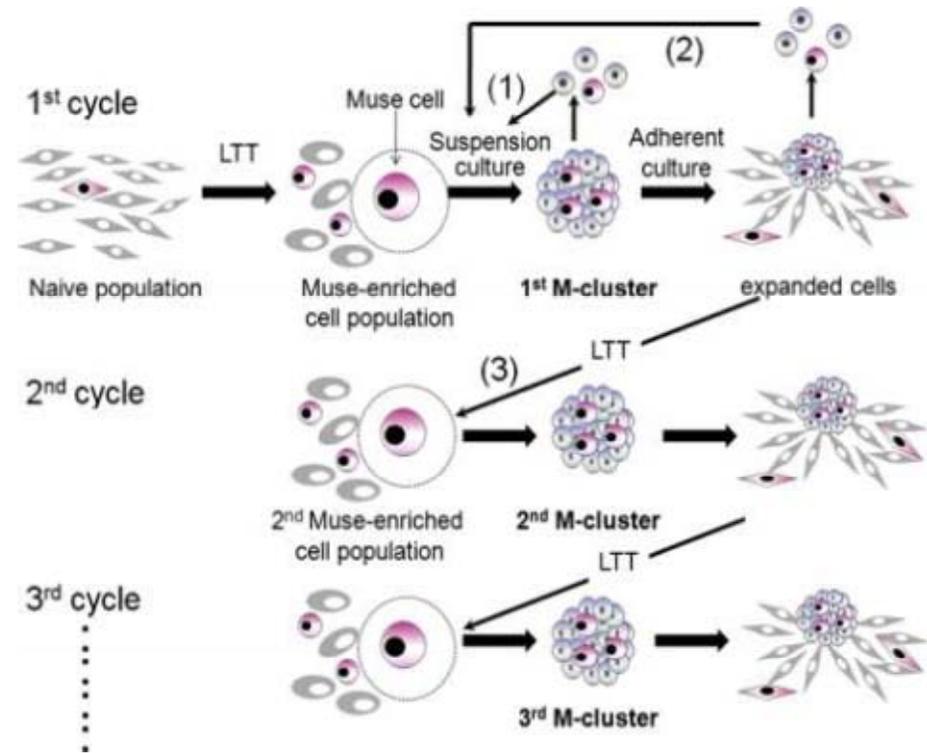
Muse細胞の幹細胞としての特性解析

3胚葉性細胞への分化と自己複製

一細胞から形成されたMuse細胞のクラスターはゲラチン培養上で3胚葉性の細胞に分化する(胚葉体自由分化系)。



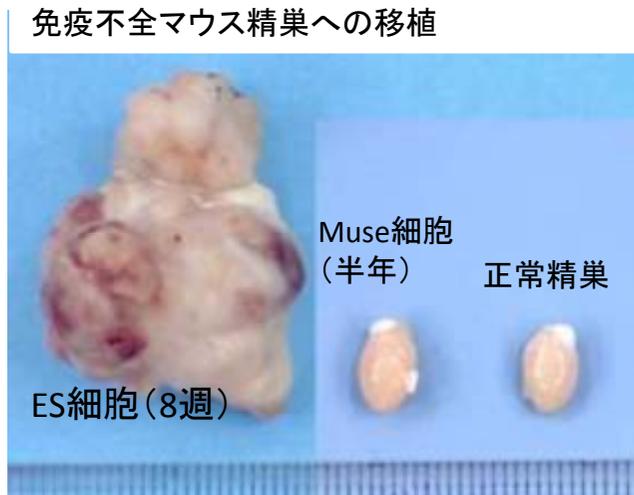
Muse細胞は自己複製能があることが示された。



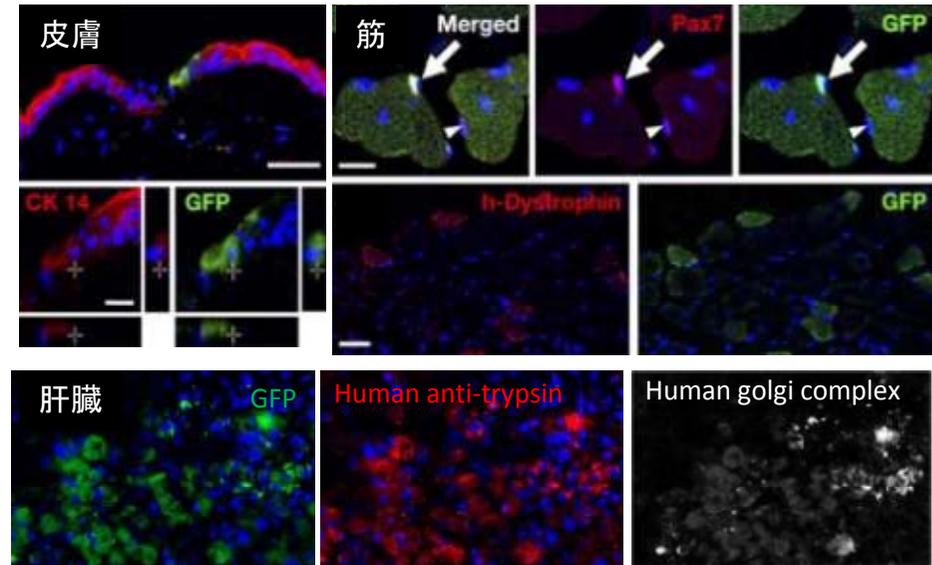
Muse細胞の幹細胞としての特性解析

腫瘍形成能、個体に投与したMuse細胞の分化方向獲得、組織からの分離

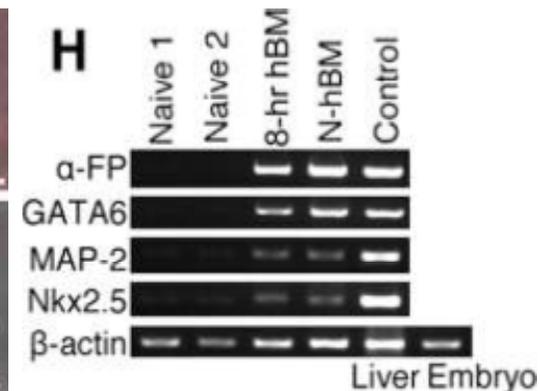
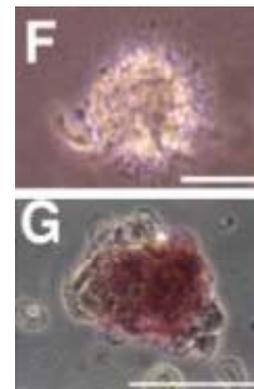
Muse細胞は腫瘍形成能を示さない
(免疫不全マウスの精巣に移植)



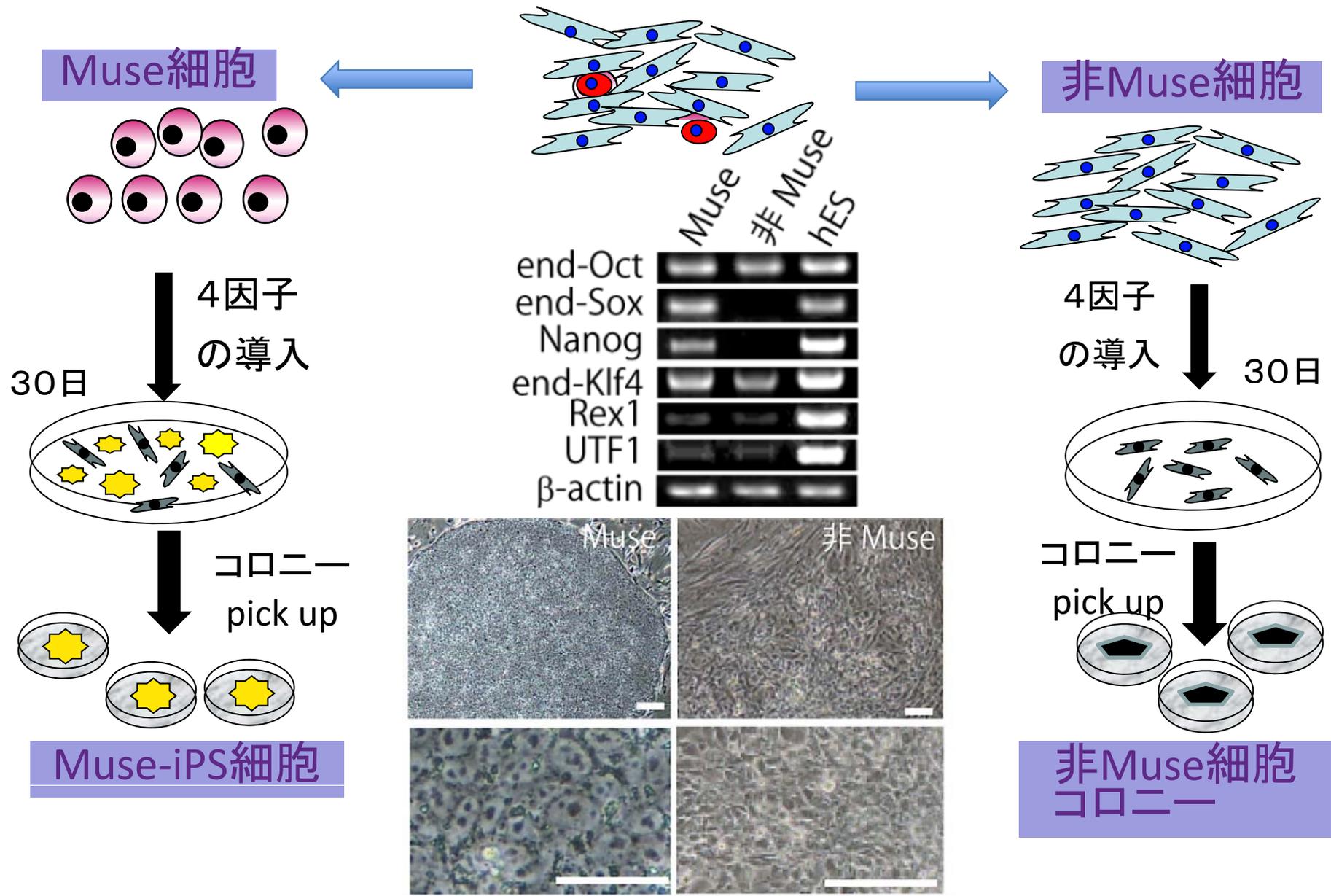
傷害を受けた皮膚、筋、肝臓にMuse細胞は
生着し、組織特異的な細胞に分化する。



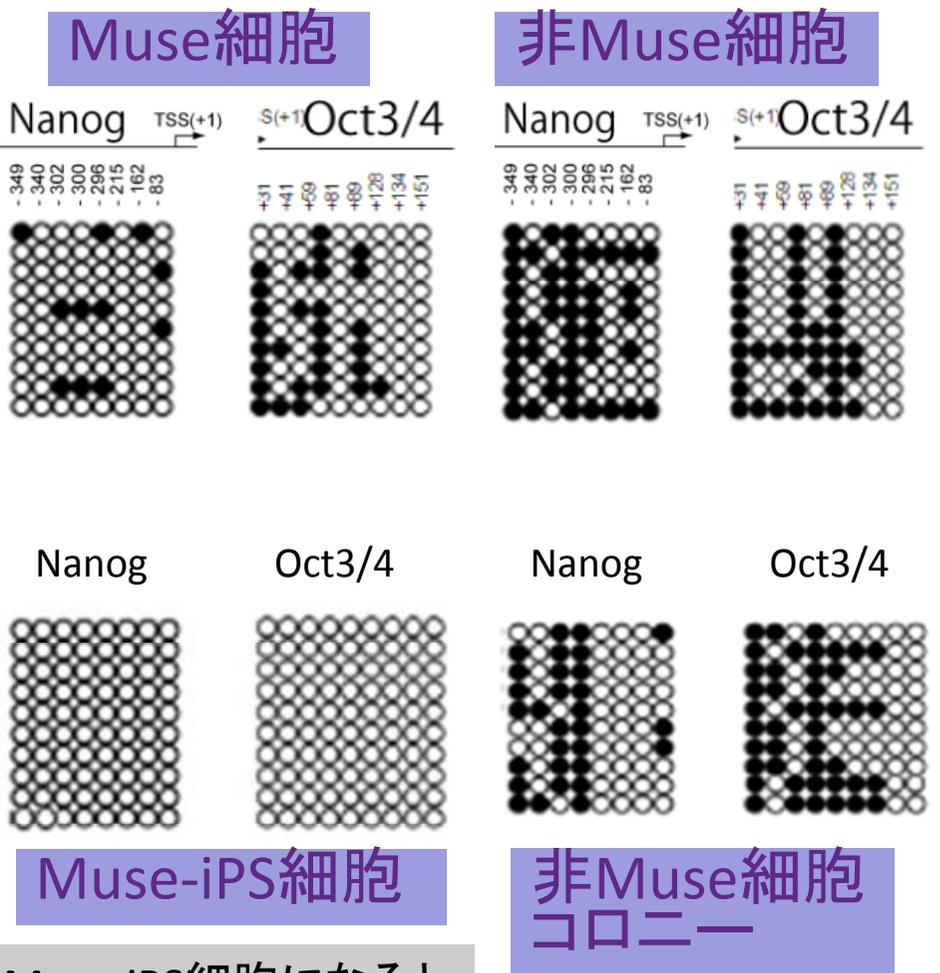
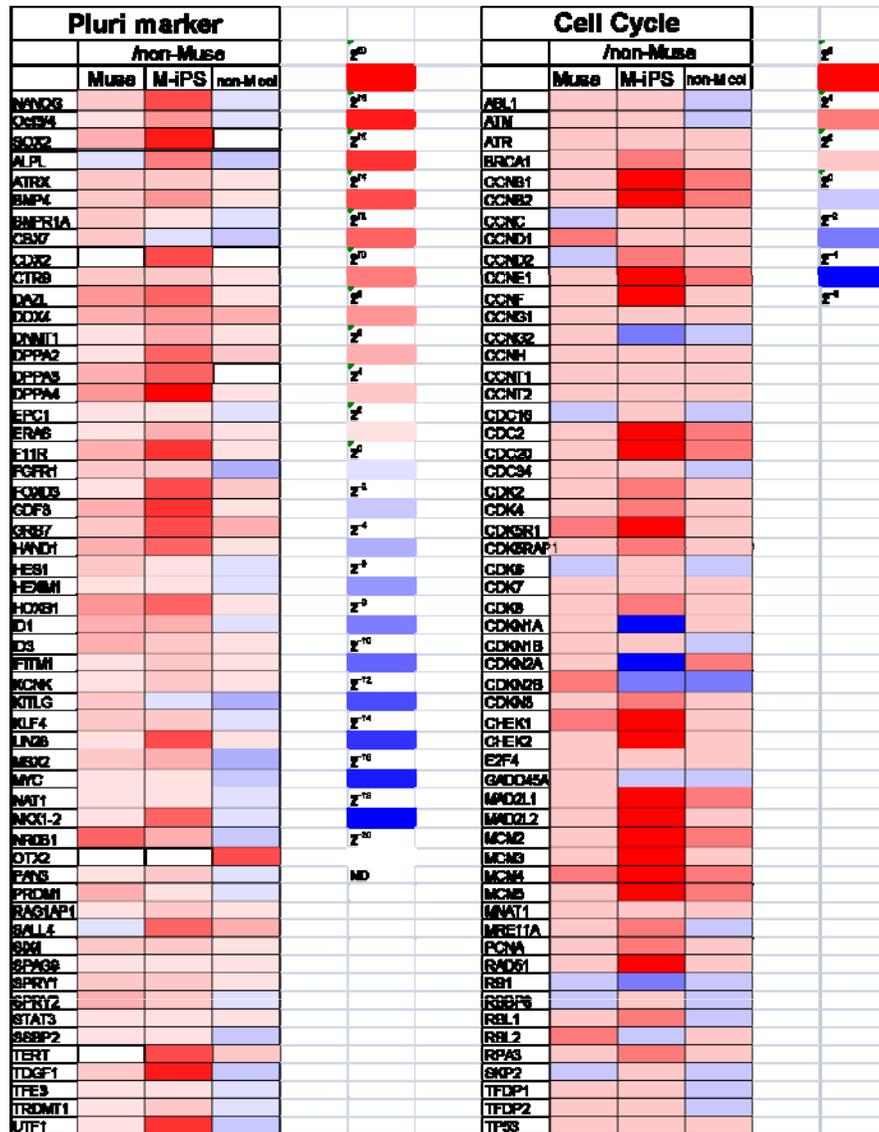
- ヒト骨髄液から直接CD105/SSEA-3
ダブル陽性細胞として精製可能
- 採れたMuse細胞はクラスターを形成し、
3胚葉性の細胞に分化する



Muse細胞及び非Muse細胞からのiPS細胞の誘導、 遺伝子発現とエピゲノム解析



iPS誘導に伴う遺伝子発現の変化、4因子導入による Muse細胞と非Muse細胞におけるエピゲノムの変化

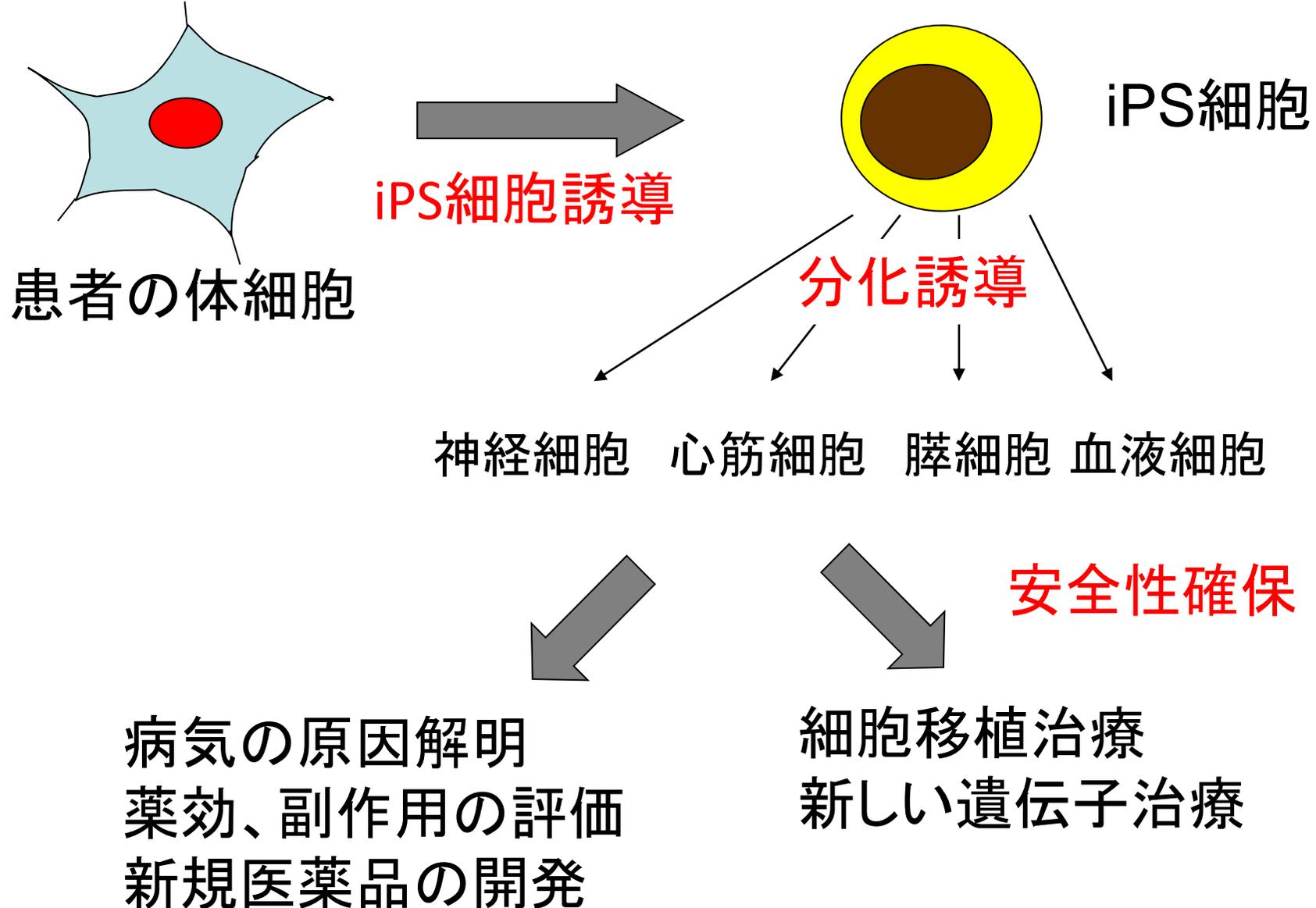


Muse-iPS細胞になると
なお一層脱メチル化
が促進される。

非Muse細胞
コロニー

疾患特異的iPS細胞を用いた新しい医療の開発

iPS細胞研究の裾野を広げ、成果を速やかに世の人々へ



疾患特異的iPS細胞の樹立

難治性血液疾患、先天性免疫不全症、自己炎症症候群の病態解析

対象疾患(原因遺伝子):症状

1. Fanconi貧血(FANCA,B--) :造血障害、奇形
2. Shwachman症候群(SBDS) :造血障害、膵外分泌異常
3. Kostmann症候群(HAX1) :先天性好中球減少症、中枢神経障害
4. Reticular dysgenesis (Ak2) :免疫不全、難聴(内耳障害)
5. Chediak-Higashi syndrome :巨大顆粒、免疫不全、中枢神経障
6. Ataxia-Telangiectasia(ATM) :免疫不全、神経症状
7. Dyskeratosis congenita (DKC1, hTERC):免疫不全、早老症
8. Wiskott Aldrich syndrome (WASP):免疫不全、血小板減少
9. Chronic Granulomatous Disease (CGD):免疫不全
10. Transient abnormal myelopoiesis(TAM: Down Syndrome)
11. Leukemiaなどの疾患

その他:自己炎症症候群; CINCA syndrome (CIAS1)、中条一西村症候群
先天性免疫不全症

疾患特異的iPS細胞の意義

全く新しい切り口での疾患の病因・病態解明
新規治療法・医薬品の開発
疾患特異的なiPS細胞を用いた毒性試験
遺伝子治療を組み合わせた再生医療の開発
個別化医療への応用、治療法の選択

iPS細胞等幹細胞産業応用促進基板技術開発

研究開発項目②:

iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発

iPS細胞等幹細胞の比較・評価技術等の開発

①生体由来の多様な多能性細胞の比較

須田(慶応)、東レ)

出澤(東北)、中畑・藤吉(京大)

中畑(京大)

始原生殖細胞からiPSを誘導

多能性幹細胞Museの同定

MuseからiPS細胞を誘導

疾患特異的iPS細胞の樹立

②iPS細胞間の比較

浅島(AIST)、平林(AIST)、アルブラスト

分化指向性、核型解析

エピジェネティクス、

遺伝子発現、糖鎖解析

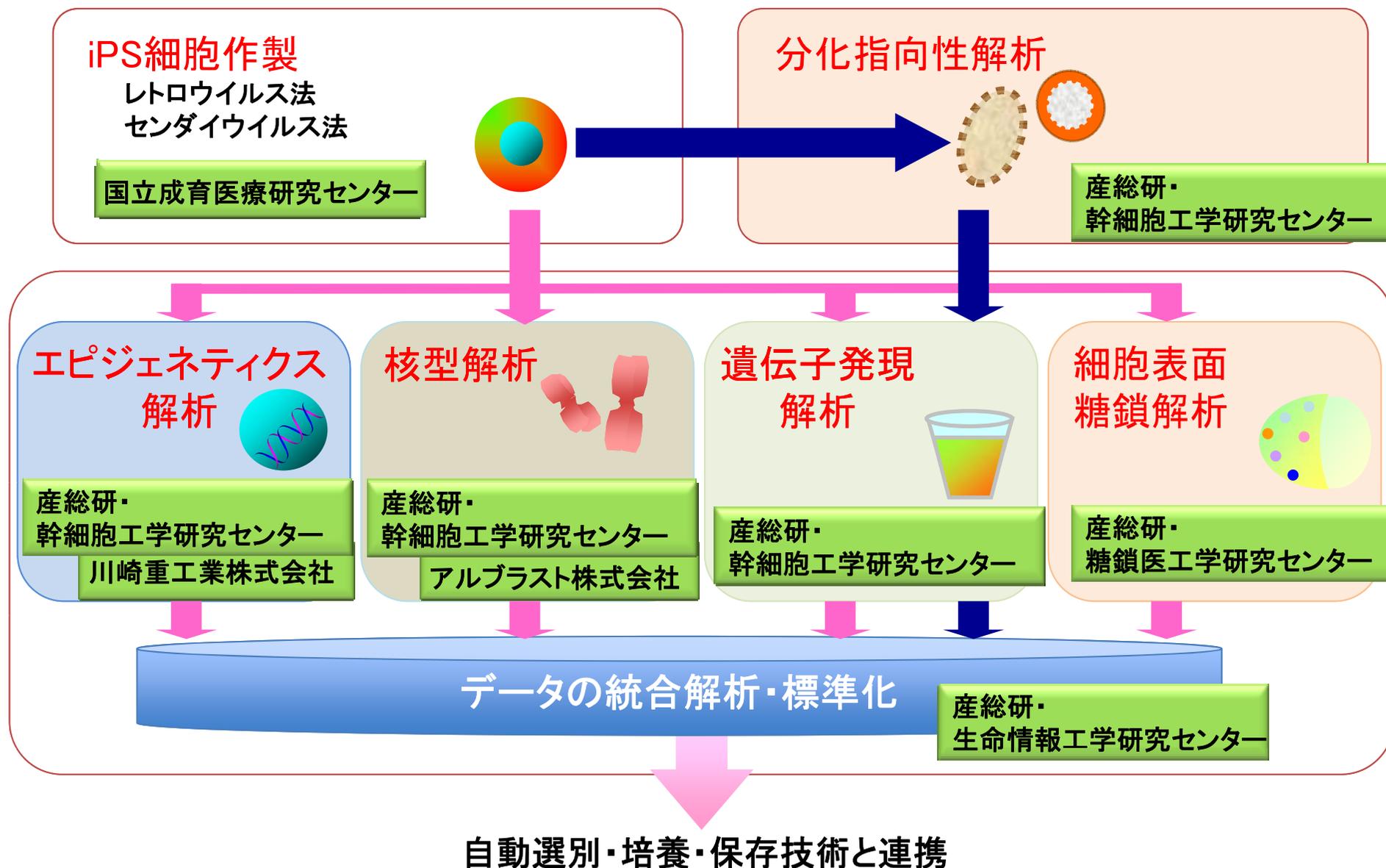
iPS細胞等幹細胞の品質管理、安定供給法の開発

阿久津(成育)、川崎重工、大陽日酸、セルシード

培養の自動化、凍結保存の効率化

iPS細胞の各種性状解析技術の開発

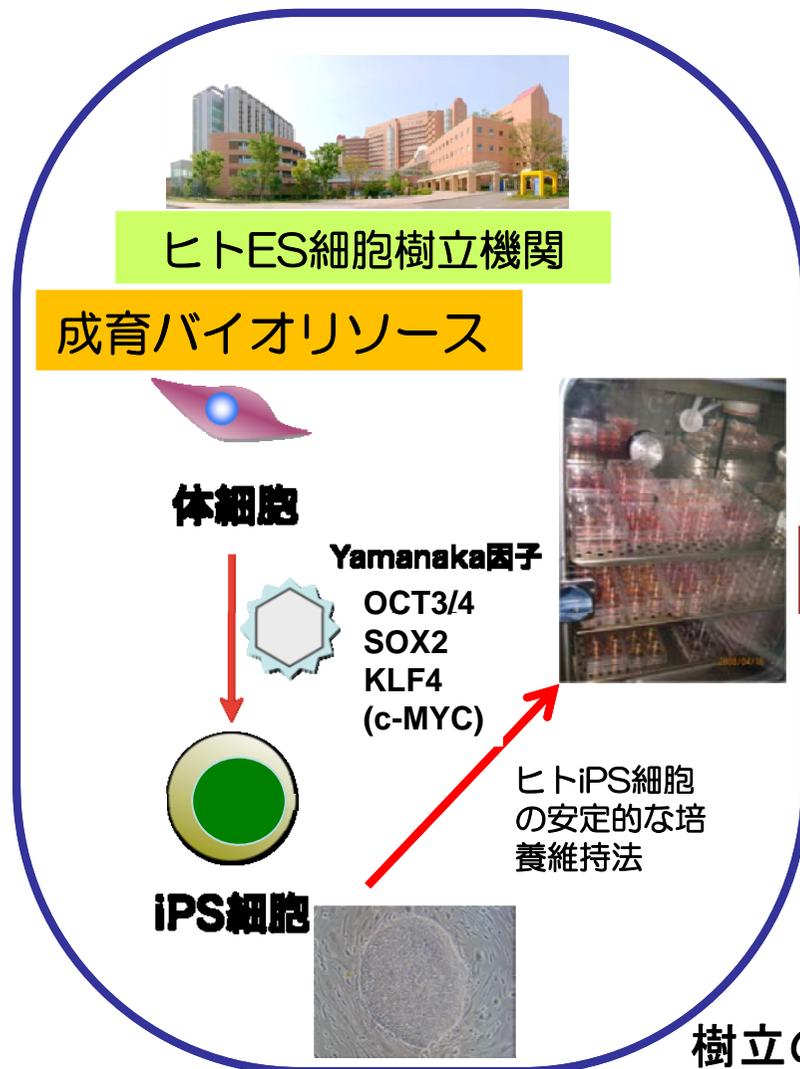
成育医療研究C、産総研、川崎重工業、アルブラスト(H21迄)



「iPS細胞の各種性状解析」 由来の異なるiPS細胞の樹立

成育医療研究C

由来の異なるヒトiPS細胞株を多数樹立し、プロジェクトの根幹を担う



平成21年度

- ◆MRC-5(ヒト胎児肺組織由来繊維芽細胞) 3株
- ◆AM (ヒト羊膜由来細胞) 8株
- ◆UtE (ヒト子宮内膜由来細胞) 4株
- ◆PAE (ヒト胎盤動脈由来細胞) 4株

平成22年度～

- ◆Yub:ヒト余剰指由来細胞
- ◆EY:ヒト眼組織由来細胞
- ◆Mim:ヒト耳介軟骨由来細胞

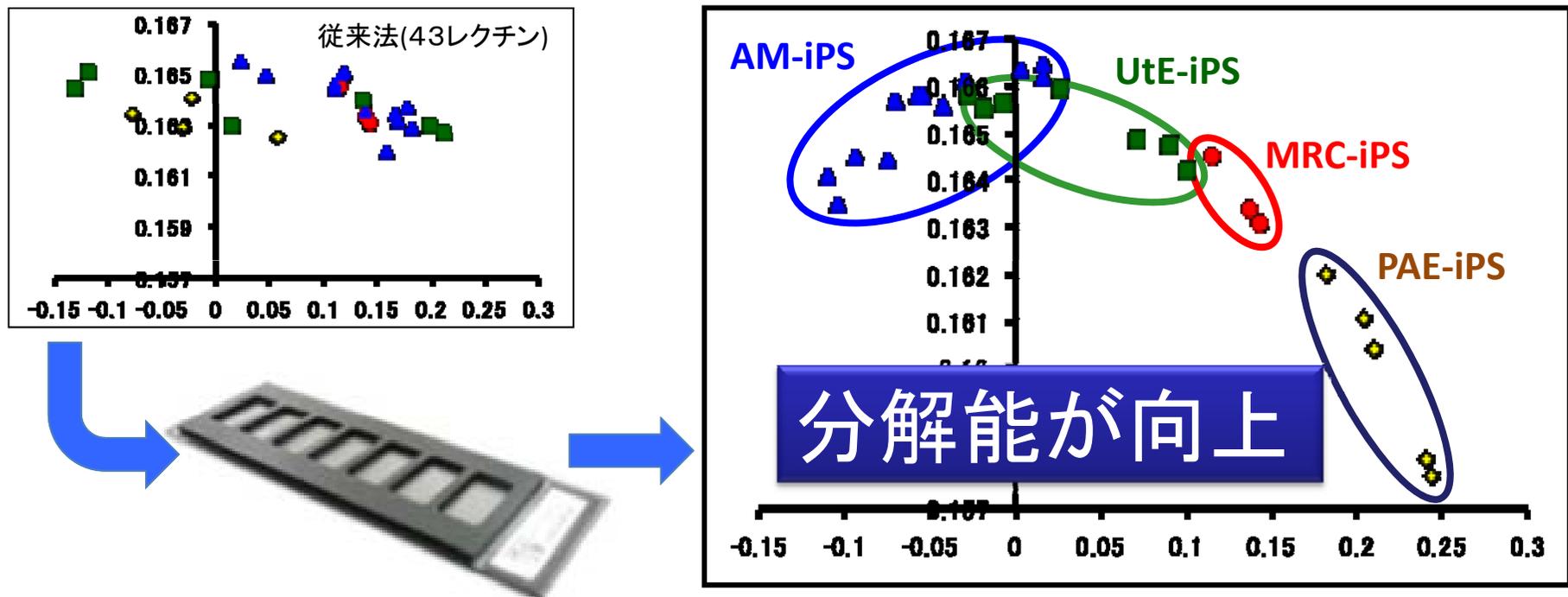
倫理委員会の承認後
各種性状解析へ

樹立のみならず、各種iPS細胞の培養方法を開発&技術移転することでPJ内の技術を規格化し、研究開発を加速

iPS細胞グリコーム解析並びに細胞評価技術の開発

産総研・糖鎖医工学RC

『レクチンプローブを96種類に増やした高密度アレイ』を開発し、
iPS細胞のグリコーム解析能を飛躍的に向上



高密度96レクチンアレイ(本PJで開発)

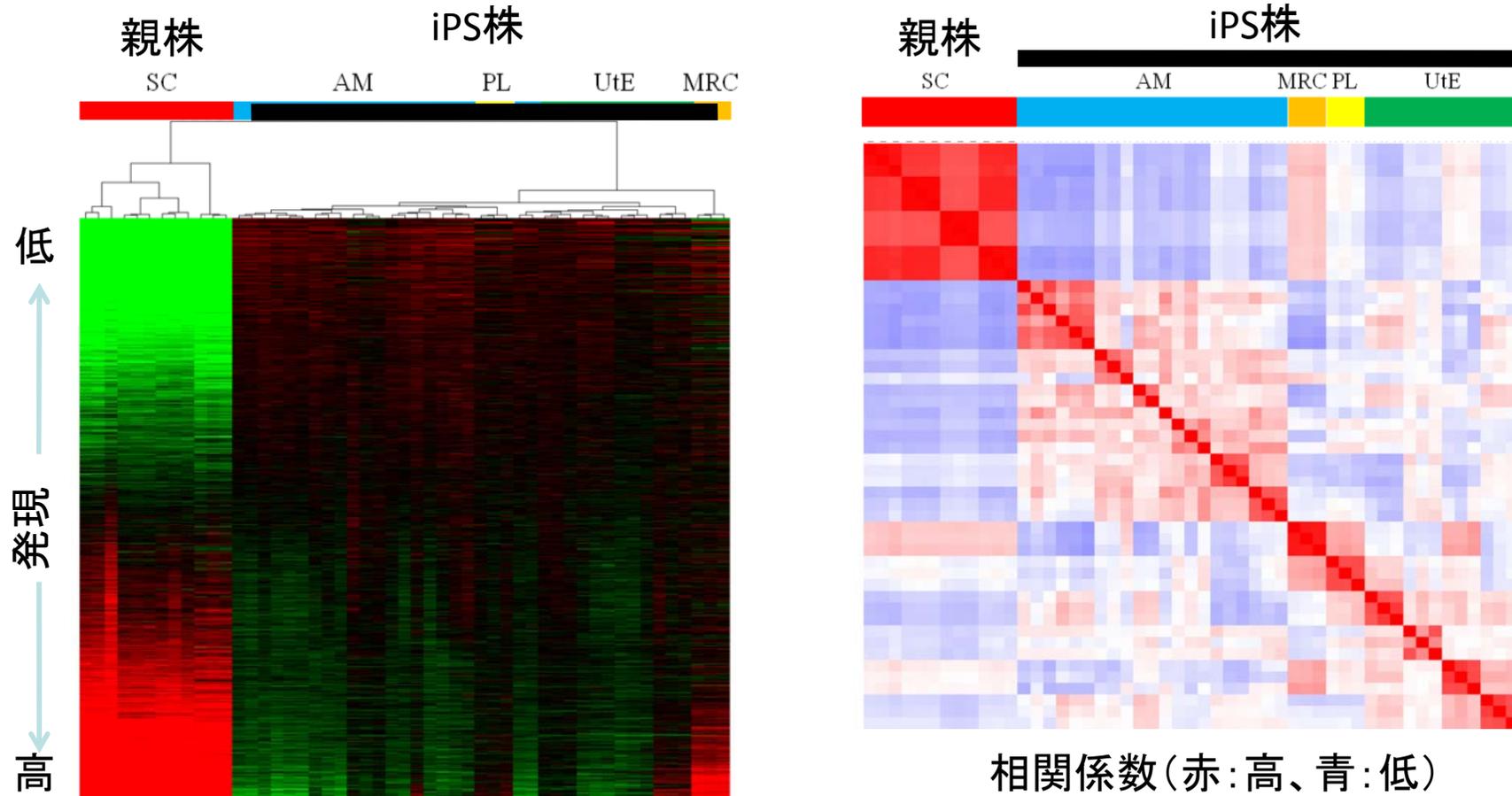
- ・幹細胞特異的に反応する9種類のレクチンを同定し、幹細胞評価技術としての基盤を整備。
- ・他生物由来の糖鎖を認識するレクチンを搭載することにより、コンタミチェックも可能に。

iPS細胞における遺伝子発現プロファイルの解析と特異的遺伝子マーカーの探索

産総研・幹細胞工学RC、生命情報工学RC

iPS細胞をその『遺伝子発現パターンから由来細胞ごとに分類』することに成功

17620遺伝子の発現解析

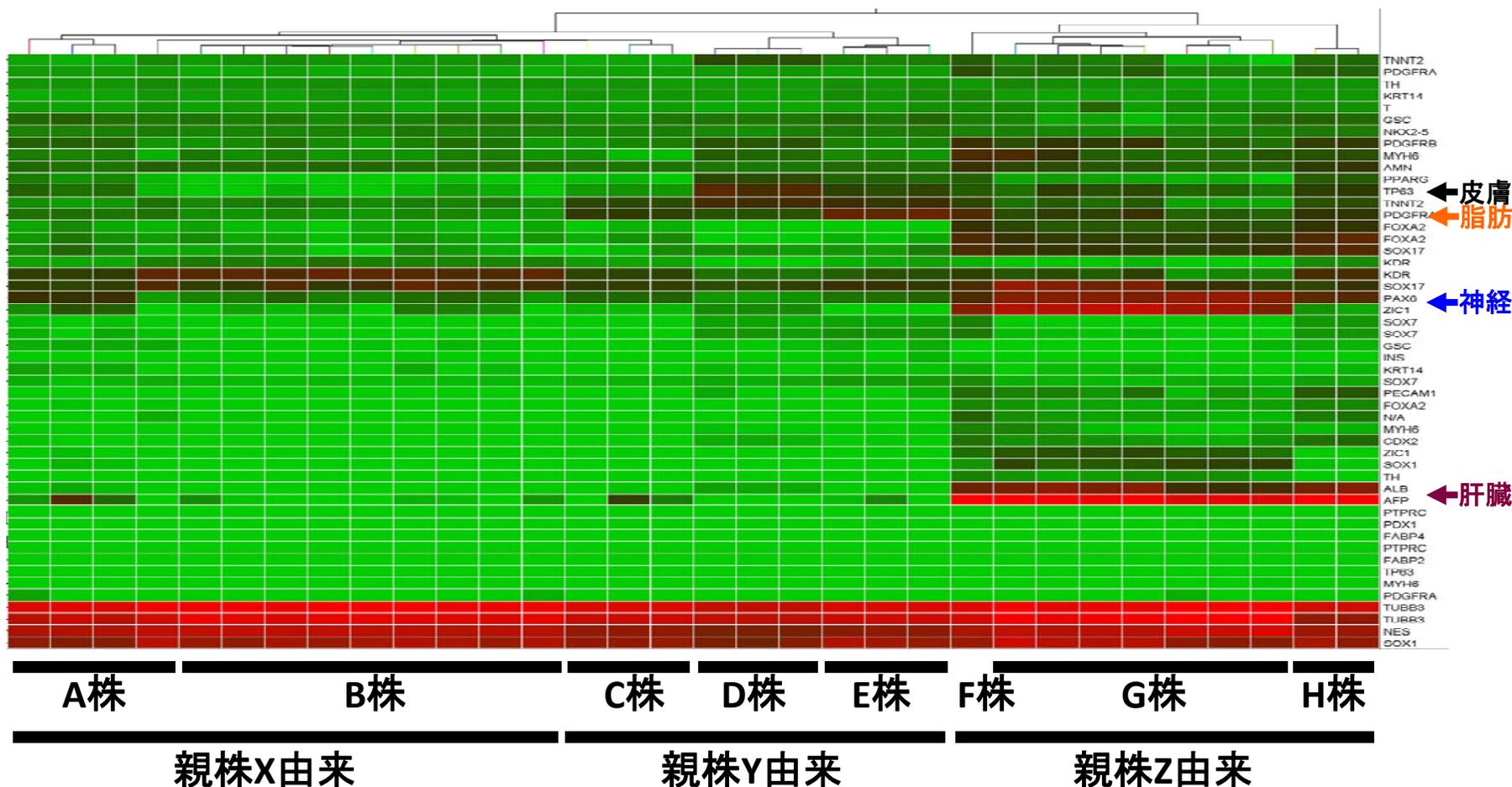


58種類のiPS細胞、ES細胞、親株細胞に関して解析を行い、遺伝子発現パターンを用いた幹細胞の分類法を開発し、さらに2520種の特異的なマーカーを発見した。

iPS細胞における遺伝子発現プロファイルの解析と特異的遺伝子マーカーの探索、分化指向性の解析

産総研
幹細胞工学RC

胚葉体自由分化系を利用した汎用性の高い解析系を確立し、
『8種類の幹細胞株に関して分化指向性』を確定



同一親株から作製されたiPS細胞(C, D, E株)も分化指向性が異なる場合があり、分化指向性予測は、iPS細胞特異的のマーカー以外も用いる必要があることが示された。

システム生物学的アプローチによるiPS細胞における特異的パスウェイ及びマーカーの探索

産総研・生命情報工学RC

独自技術であるNetwork Screening により、『28のヒトiPS細胞特異的制御ネットワークを同定』し、安定したiPS細胞標準化指標の特定に成功

Pathway
HSA04115_P53_SIGNALING_PATHWAY
HSA04310_WNT_SIGNALING_PATHWAY
HSA04330_NOTCH_SIGNALING_PATHWAY
HSA04340_HEDGEHOG_SIGNALING_PATHWAY
HSA04350_TGF_BETA_SIGNALING_PATHWAY
HSA04520_ADHERENS_JUNCTION
HSA04810_REGULATION_OF_ACTIN_CYTOSKELETON
SMOOTH_MUSCLE_CONTRACTION
HSA01090_GLYCAN_STRUCTURES_BIOSYNTHESIS_1
HSA01091_GLYCAN_STRUCTURES_BIOSYNTHESIS_2
HSA04916_MELANOGENESIS
HSA05210_OCULOBLASTAL_CANCER
HSA05211_RENAL_CELL_CARCINOMA
HSA05213_ENDOMETRIAL_CANCER
HSA05215_PROSTATE_CANCER
HSA05216_THYROID_CANCER
HSA05217_BASAL_CELL_CARCINOMA
HSA05218_MELANOMA
HSA05220_CHRONIC_MYELOID_LEUKEMIA
APOPTOSIS
APOPTOSIS_GENMAPP
CALCIUM_REGULATION_IN_CARDIAC_CELLS
CARM_HEPATHWAY
CELL_CYCLE_KBGG
G1_TO_S_CELL_CYCLE_REACTOME
GPCRDB_CLASS_A_RHODOPSIN_LIKE
HSA00230_PURINE_METABOLISM
HSA00562_INOSITOL_PHOSPHATE_METABOLISM
HSA04080_NEUROACTIVE_LIGAND_RECEPTOR_INTERACTION
HSA04110_CELL_CYCLE
HSA04512_ECM_RECEPTOR_INTERACTION
HSA05120_EPITHELIAL_CELL_SIGNALING_IN_HELICOBACTER_PYLORI_INFECTION
MORNA_PROCESSING_REACTOME
PPARAPATHWAY
PURINE_METABOLISM

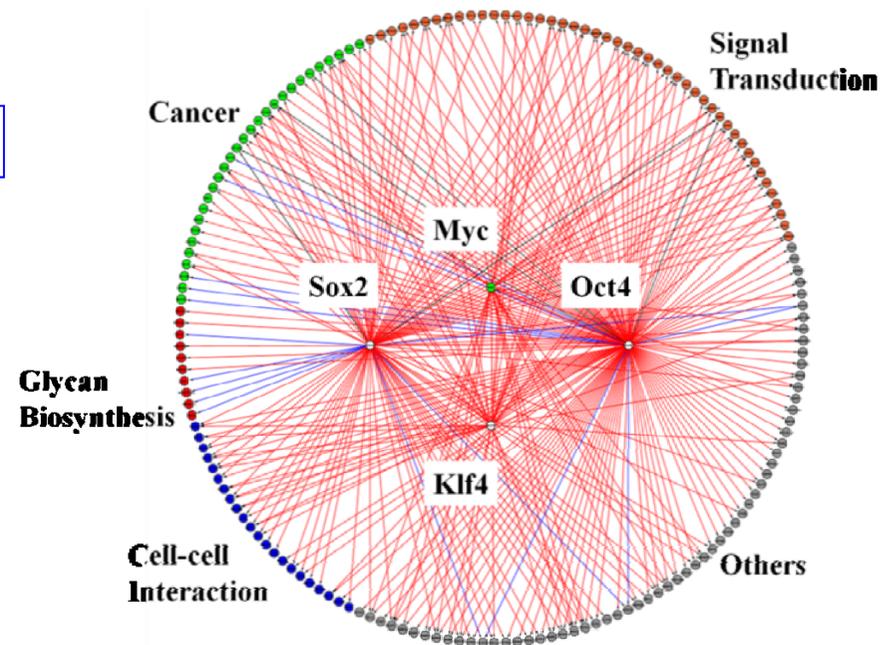
Signal transduction

Cell-cell interaction

Glycan biosynthesis

Cancer

Others

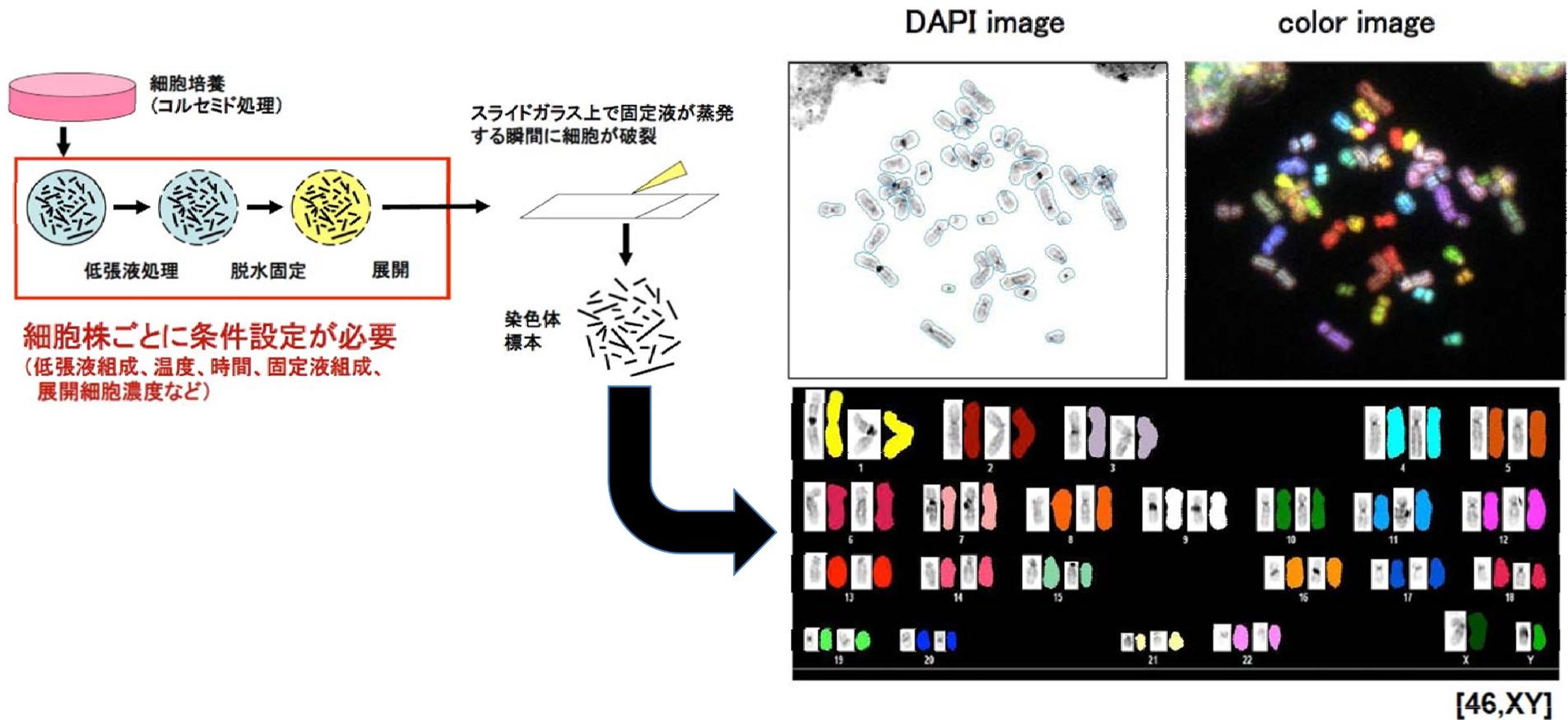


レクチンマイクロアレイ計測データの標準的統計解析の結果と併せ、ヒトiPS細胞特異的な13 糖転移酵素を同定した。

iPS細胞の染色体安定性の検証

アルブラスト(H21迄)、産総研・幹細胞工学RC

『細胞調製方法の最適条件をシステマティックに決定する方法を確立』し、
PJで使用したiPS細胞株の核型解析を遂行

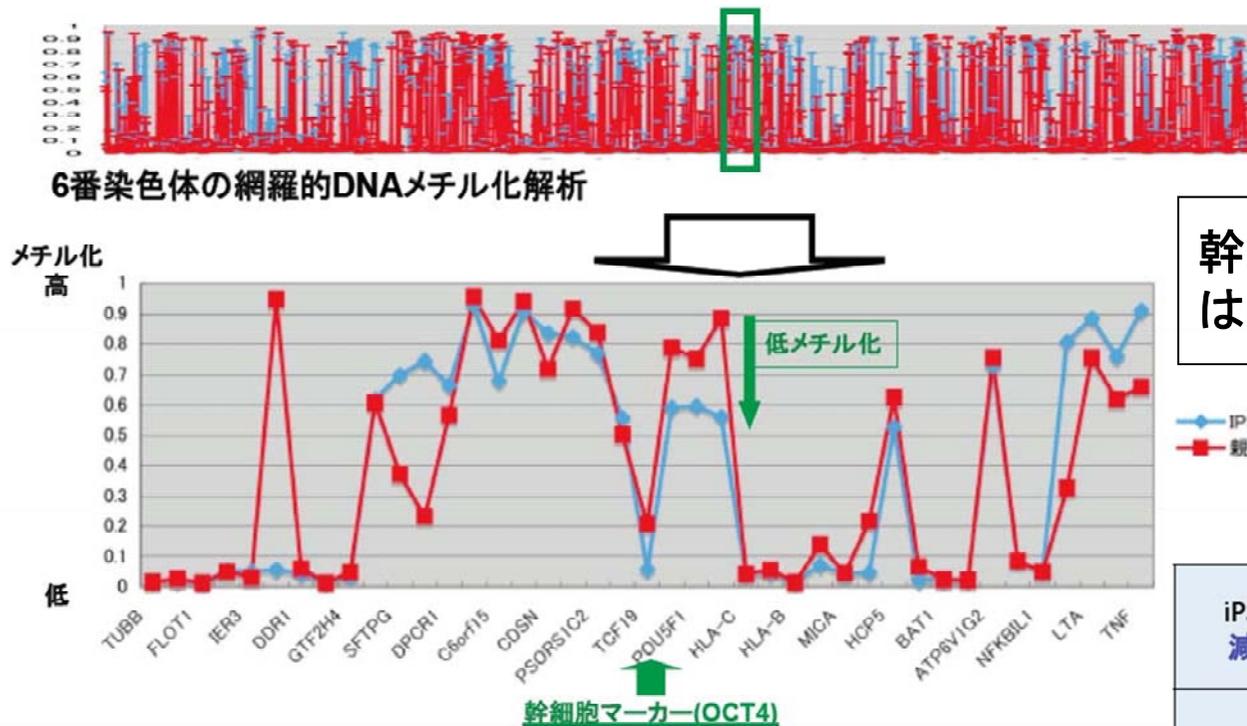


1株あたり20核版以上のスライドを作製し、19/20以上正常であれば、その株を正常と判定 (ISCN(2005)基準)。

iPS細胞のエピゲノム情報の解析

川崎重工業、産総研・幹細胞工学RC

インフィニウム法を用いることにより、
『ヒトゲノム上の27,000箇所メチル化状態』を網羅的に解析



幹細胞マーカーOct4のゲノム領域はiPS化により、低メチル状態に

iPS細胞でメチル化が減少している遺伝子

TDGF
POU5F1
FOXD3
GRB7
CD9
GAL
IFITM1
NODAL

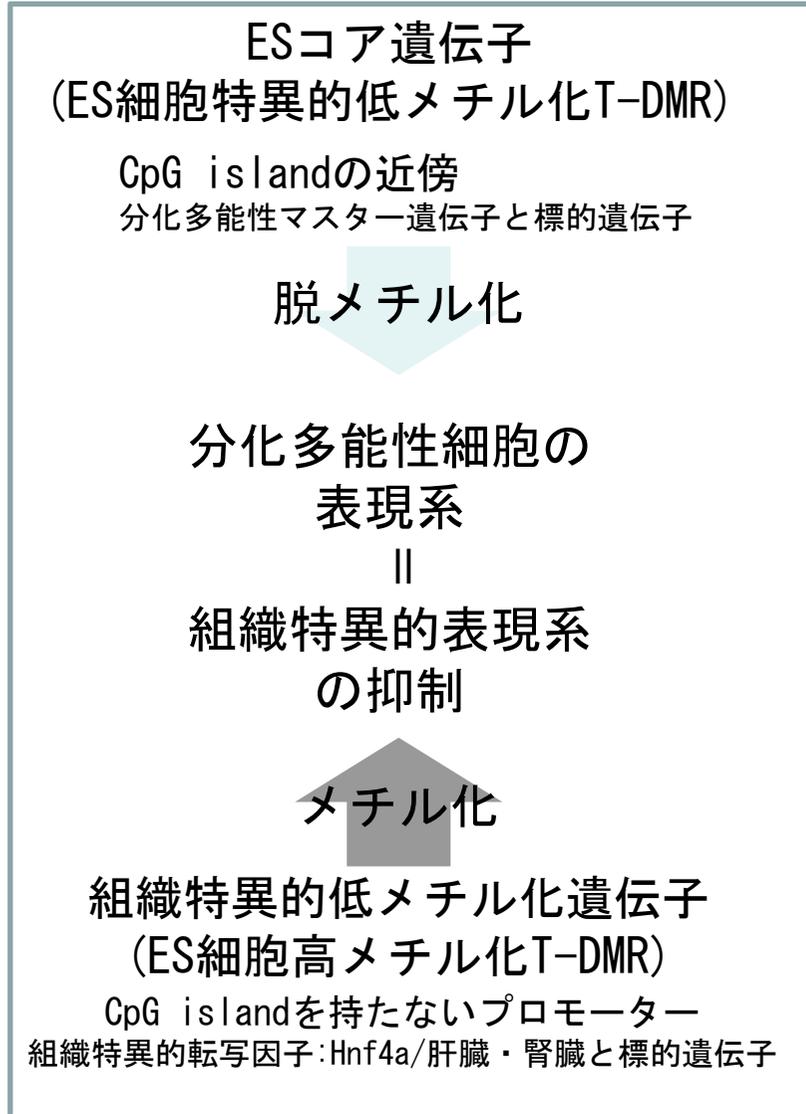
iPS細胞でメチル化が増加している遺伝子

GABRB3
GDF3
EBAF
TERT

遺伝子発現量とゲノムDNAのメチル化は必ずしも一致した挙動を示さず、それ故両方の観点からiPS細胞等幹細胞の標準化を進めることが必要。

DNAメチル化プロファイルに基づく iPS細胞の評価

東大(塩田、村田)



正常な分化多能性細胞のDNAメチル化
プロファイル

マーカー＝
見える遺伝子

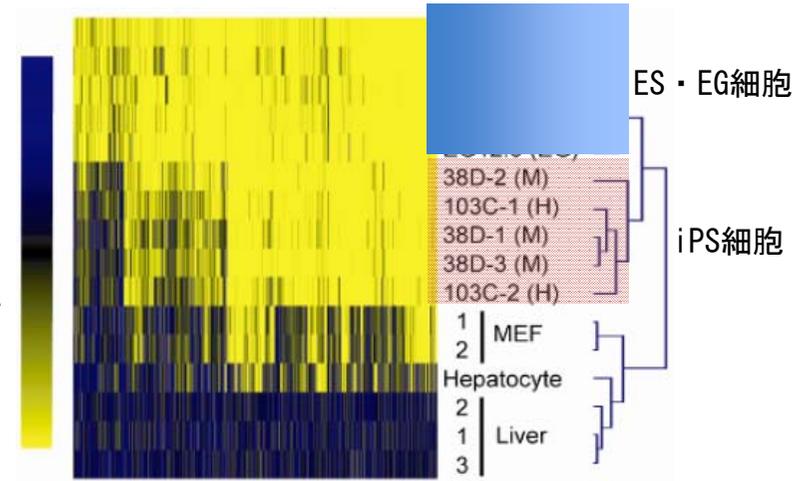


ほぼ正常なDNA
メチル化プロ
ファイルの獲得

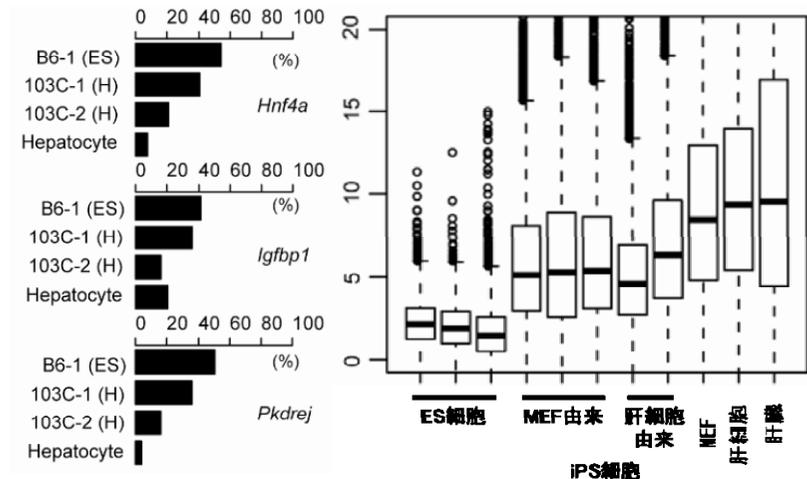
発現では見え
ない遺伝子



親細胞のDNAメ
チル化プロ
ファイルを反映



分化多能性関連転写因子のメチル化と
その標的領域のメチル化



iPS細胞のDNAメチル化プロファイル

iPS細胞等幹細胞産業応用促進基板技術開発

研究開発項目②: iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発

iPS細胞等幹細胞の比較・評価技術等の開発

■①生体由来の多様な多能性細胞の比較

- 始原生殖細胞からiPSを誘導し、新規誘導因子を同定、
- 3種のシグナル伝達阻害剤、bFGF投与によりiPS細胞を効率的に誘導
- 微量サンプル遺伝子発現解析チップを開発し、iPS誘導の初期過程を解析
- 多能性幹細胞Muse同定、細胞移植の安全なソース、個体の修復システムに関与
- MuseからiPS細胞が誘導される、iPS誘導機構の理解に一石を投ずる
- 疾患特異的iPS細胞を多数樹立

■②iPS細胞間の比較

- 多種類の細胞ソースからiPSを誘導し、その性質を解析
- 分化指向性、核型解析、エピジェネティクス、遺伝子発現、糖鎖解析技術を確立
- iPS細胞の分別、特異マーカーの同定、iPS細胞のグループ化・特徴付けに成功
- 多面的、網羅的データを統合するシステムを立ち上げる



iPS細胞等幹細胞の比較・評価技術が開発され、標準化の技術基盤が確立
新規多能性幹細胞を同定し、幹細胞生物学、幹細胞の医療応用に新展開

達成率: 100%

iPS細胞等幹細胞産業応用促進基板技術開発

研究開発項目②: **iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発**

iPS細胞等幹細胞の比較・評価技術等の開発

①生体由来の多様な多能性細胞の比較

須田(慶応)、東レ)

始原生殖細胞からiPSを誘導

出澤(東北)、中畑・藤吉(京大)

多能性幹細胞Museの同定

MuseからiPS細胞を誘導

中畑(京大)

疾患特異的iPS細胞の樹立

②iPS細胞間の比較

分化指向性、核型解析

浅島(AIST)、平林(AIST)、アルブラスト

エピジェネティクス、

遺伝子発現、糖鎖解析

iPS細胞等幹細胞の品質管理、安定供給法の開発

阿久津(成育)、川崎重工、大陽日酸、セルシード

培養の自動化、凍結保存の効率化

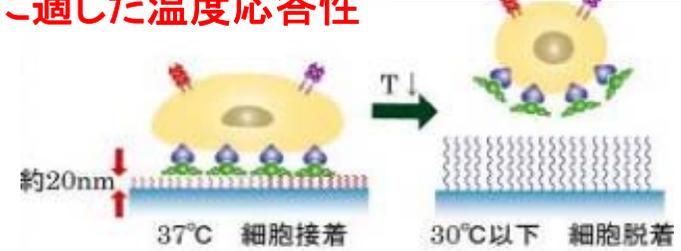
iPS細胞大量調製の自動化技術の開発 概念図



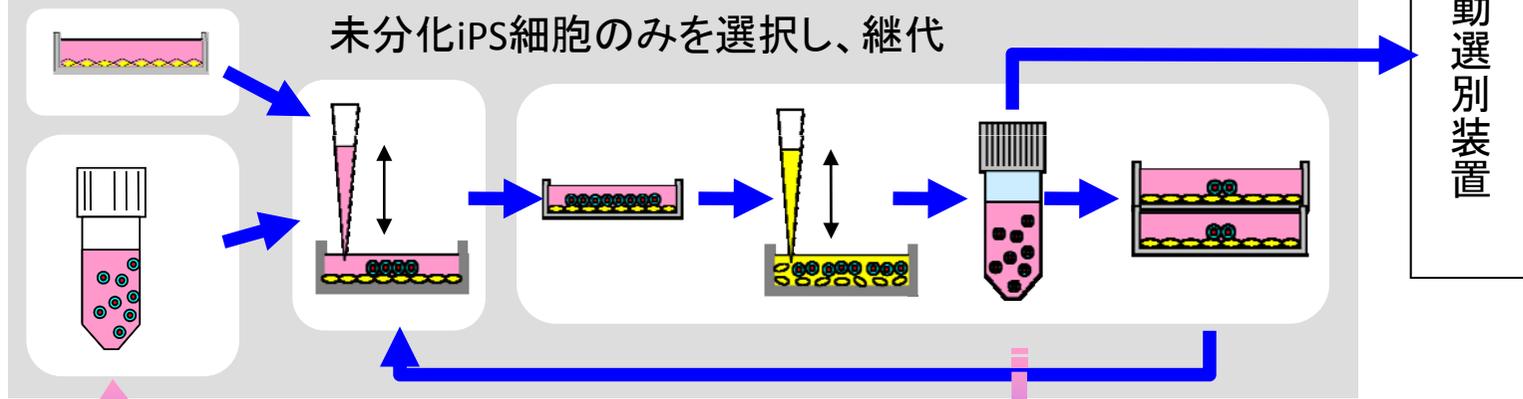
安定供給・大量調製に適した温度応答性培養器材の開発

川崎重工業株式会社

株式会社セルシード



大量調製の自動化技術の開発



解凍処理の自動化



前処理凍結処理の自動化

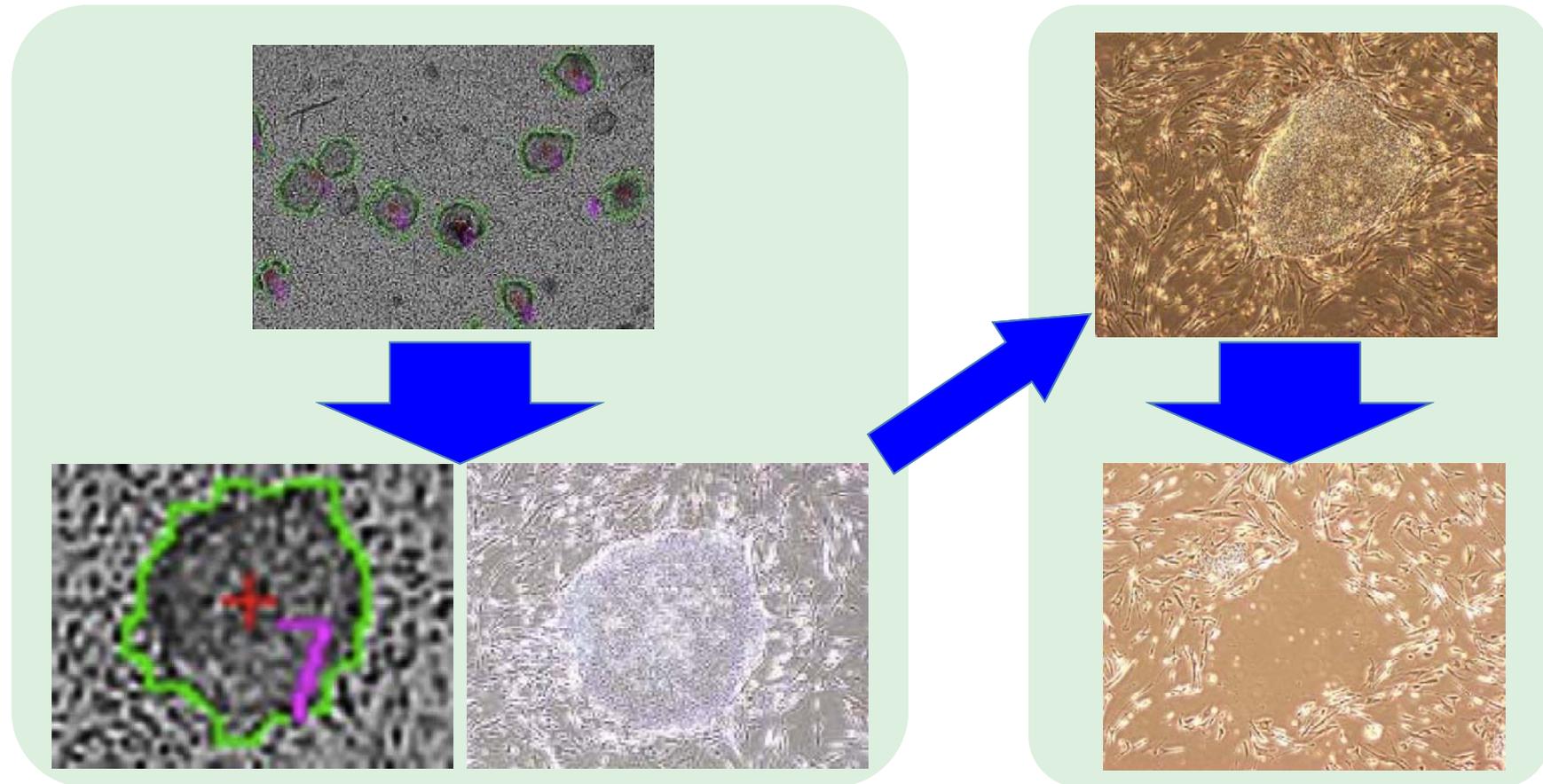
大陽日酸株式会社

ガラス化法等を用いたiPS細胞の凍結保存技術の開発

iPS細胞大量調製の自動化技術の開発

川崎重工業、成育医療研究C

- ・iPS細胞コロニーの『分化/未分化を識別する画像処理技術』の開発に成功
- ・iPS細胞コロニーを『選択的に剥離する技術』の開発に成功



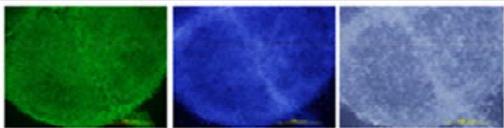
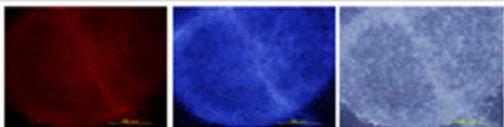
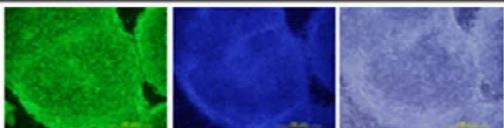
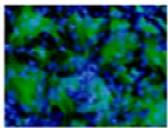
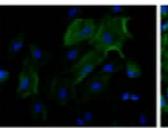
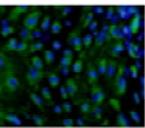
広視野画像と画像処理技術により、
良質なコロニーの輪郭を検出

選択的ピペッティングにより、
良質なコロニーを剥離

安定供給・大量調製に適した温度応答性培養器材の開発

セルシード、川崎重工業

開発した温度応答性培養器材を用いてのヒトiPS細胞連続培養試験を行い、
10継代以上の『酵素処理を用いない継代培養』に成功

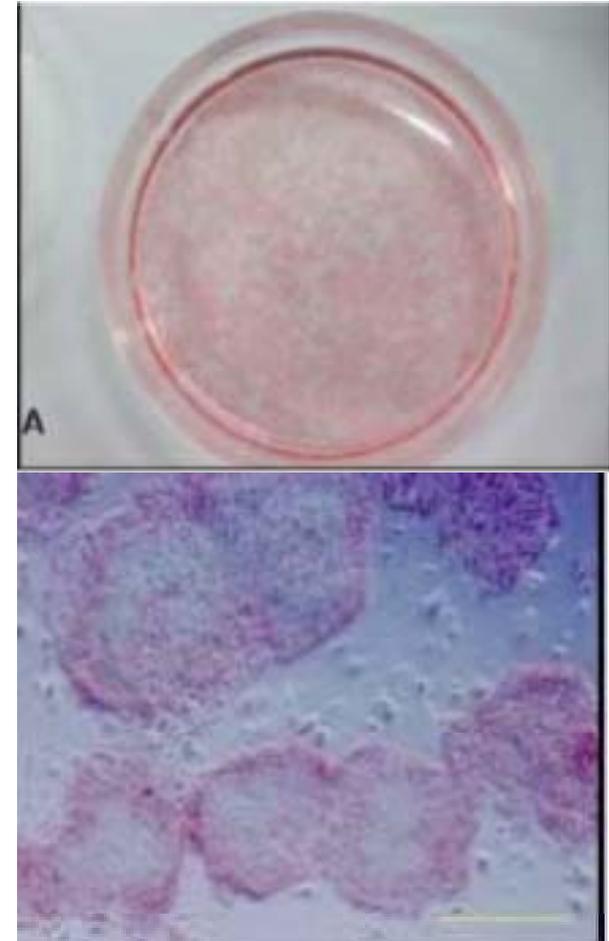
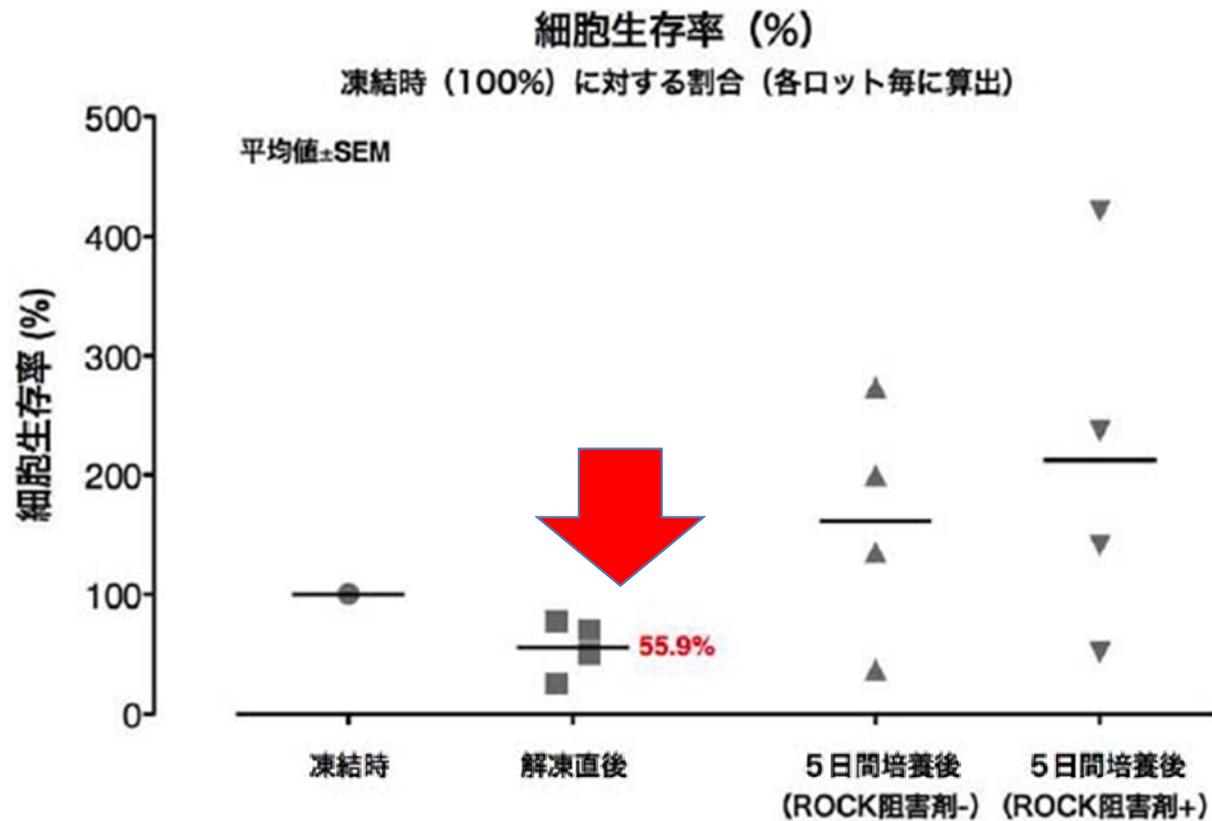
評価内容	方法	温度応答性培養皿試作品
免疫染色 (10継代目)	Oct3/4	
	Nanog	
	Tra-1-60	
	SSEA4	
多分化能確認 (17継代目)	EB形成	   <p>β-Tubulin (外胚葉) α-SMA (中胚葉) AFP (内胚葉)</p>
核型解析 (12継代目)	Gバンド法	46, XY (異常なし)

継代時は酵素処理は行わず、室温静置後のピペッティングのみでコロニーを剥離

iPS細胞の自動凍結保存技術の開発

大陽日酸、成育医療研究C

“クライオライブラリー”による自動凍結・解凍試験を行った結果、ヒトiPS細胞の『凍結保存後の平均生存率50%以上』を達成



更に解凍後5日間培養しROCK阻害剤の有無による細胞数の増加状況を比較したところ、ROCK阻害剤有りの優位性を確認

iPS細胞等幹細胞産業応用促進基板技術開発

研究開発項目②: **iPS細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発**

iPS細胞等幹細胞の品質管理、安定供給法の開発

iPS細胞コロニーの『分化/未分化を識別する画像処理技術』の開発に成功

開発した温度応答性培養器材を用いて酵素処理を行わずに(ピペッティングで)iPS細胞コロニーを選択的に剥離する技術の開発に成功

凍結保存装置“クライオライブラリー”を開発

自動凍結・解凍試験を行い、ヒトiPS細胞の凍結保存後の平均生存率50%以上を達成

達成率 100%



iPS細胞を大量調製する自動化技術の開発に成功

幹細胞培養の自動化、凍結保存の効率化に成功

iPS細胞等幹細胞産業応用促進基板技術開発

研究開発項目③:

iPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発

iPS細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な
分化誘導技術の開発

福田(慶応)、アスピオファーマ

iPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニング
システムの開発・評価

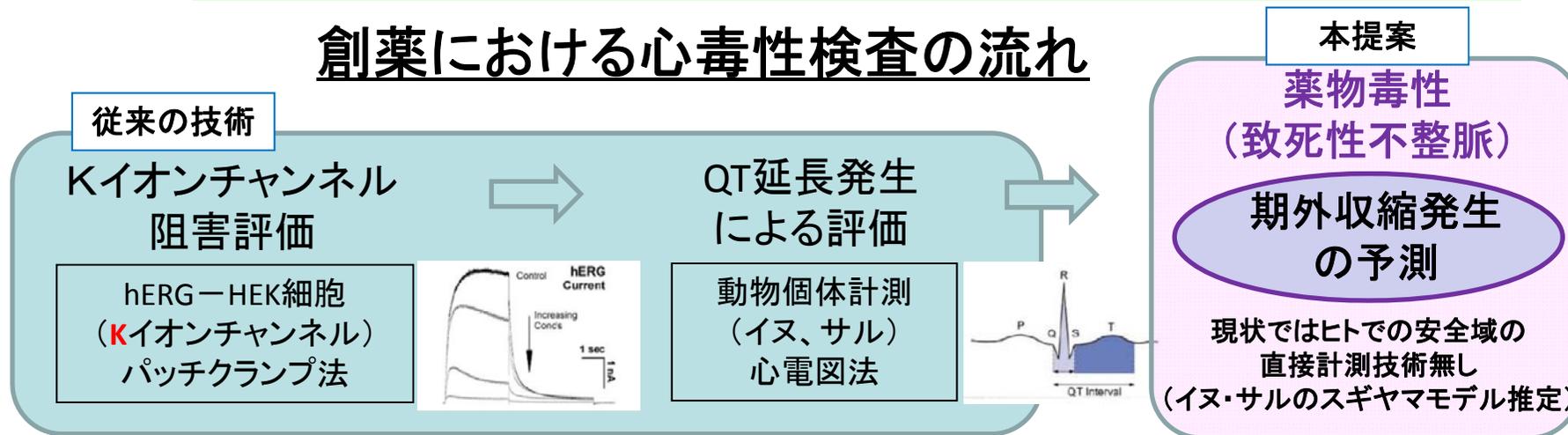
安田(医科歯科)、三菱化学メディエンス

杉山(医科歯科)、ユーザーフォーラム
(製薬企業及びCRO18社※で構成)

研究開発項目③「iPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」

目的・目標 ヒトにおける**安全域の程度が許容範囲**となるかどうかを的確に推測する創薬スクリーニングシステム（心毒性検査技術）の開発

創薬における心毒性検査の流れ



問題点

- ① ヒト心臓の応答 ≠ 動物(細胞、個体)の応答
- ② 期外収縮発生 ≠ QT延長発生 ≠ Kイオンチャンネル阻害

解決策

- ① ヒトiPS細胞由来心筋細胞の利用 → ヒト個体の応答を予測
- ② オンチップ・細胞ネットワーク計測 → 期外収縮発生の直接計測

本PJでの開発技術

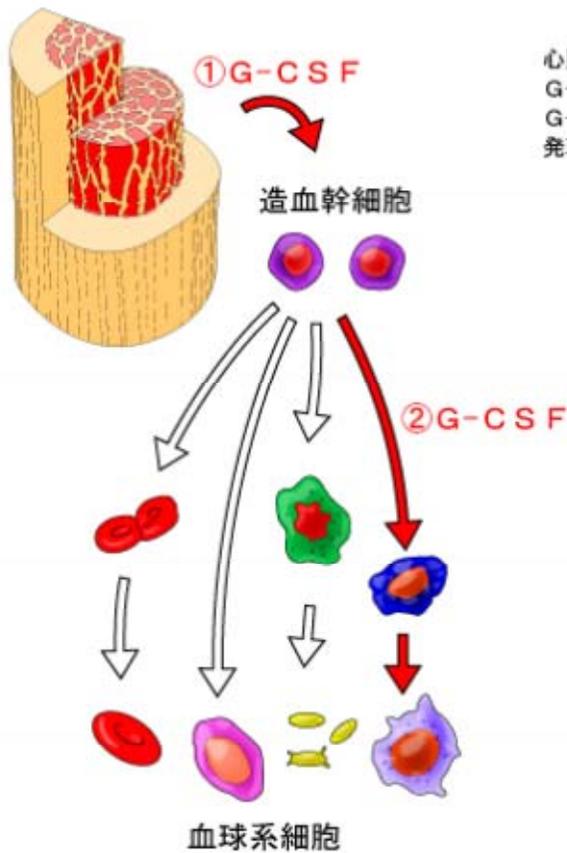
① iPS細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

② iPS細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

G-CSFの幼若期心筋の細胞増殖作用の発見 心筋大量培養法の確立

慶応(福田)

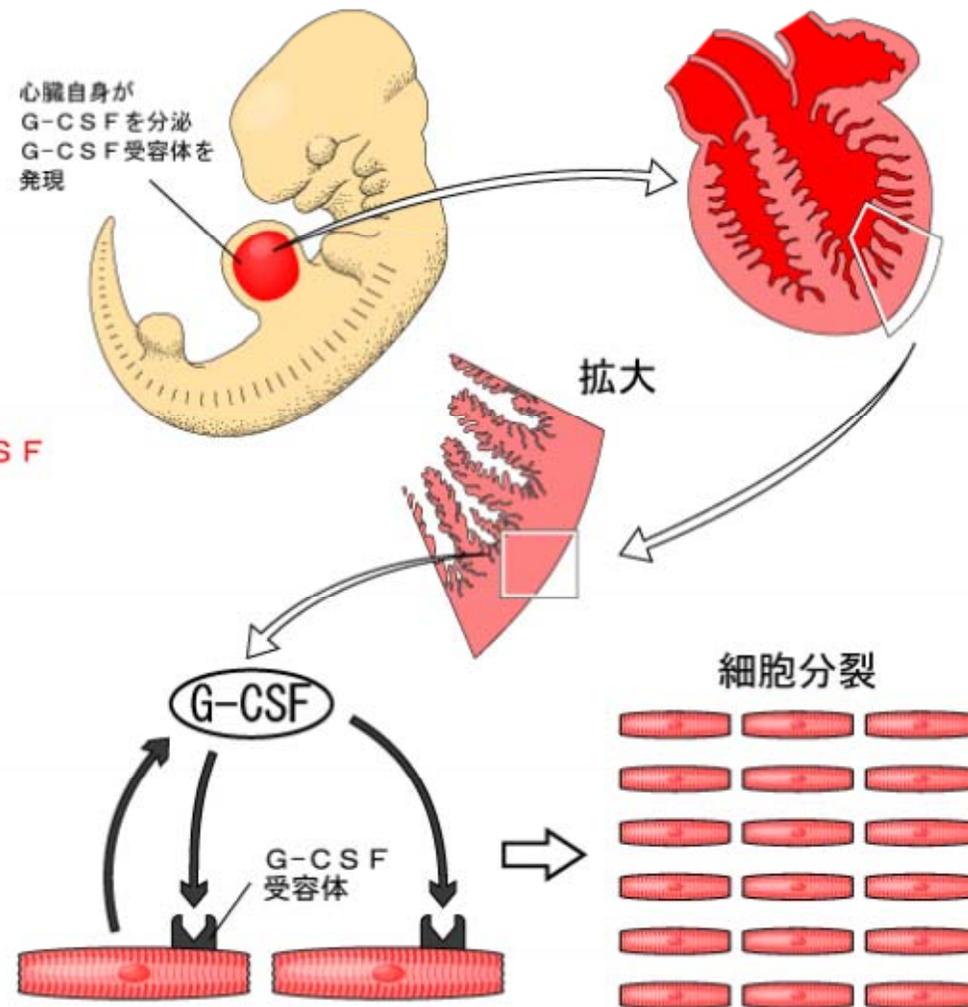
従来のG-CSFの役割



①造血幹細胞を血中に誘導

②造血幹細胞を顆粒球（白血球の一種）に分化

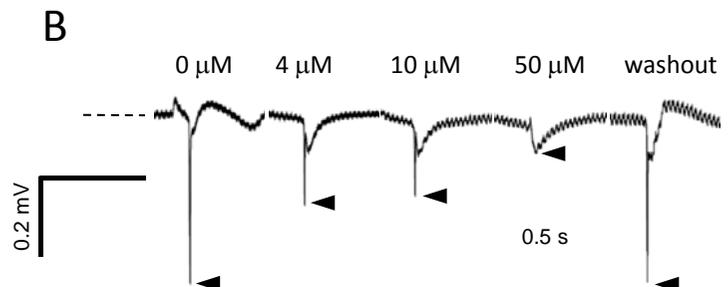
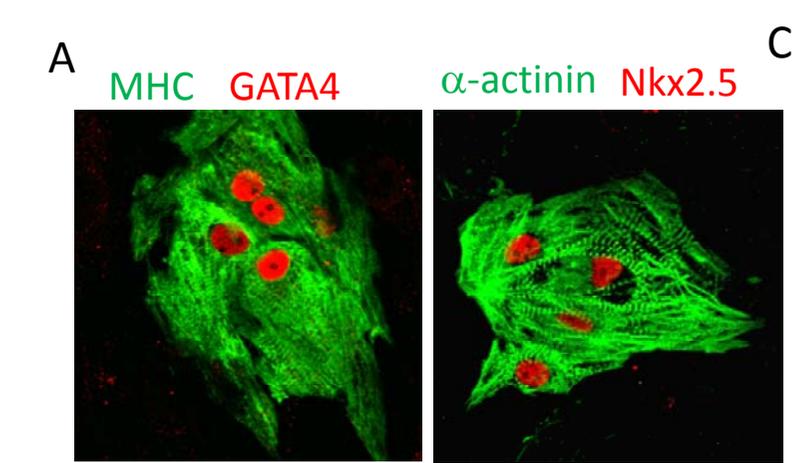
今回発見された役割



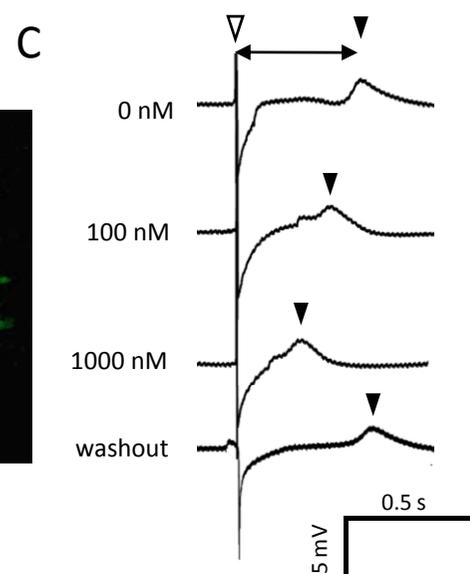
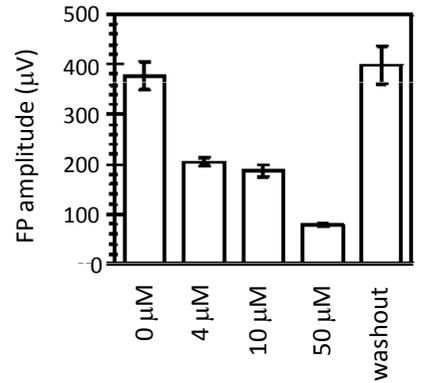
①心筋細胞が自分で分泌したG-CSFに刺激され細胞分裂を行う。

(Shimoji, et al. Cell Stem Cell, 2010)

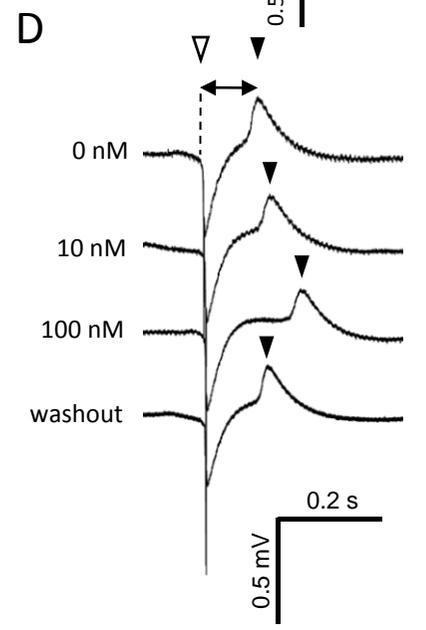
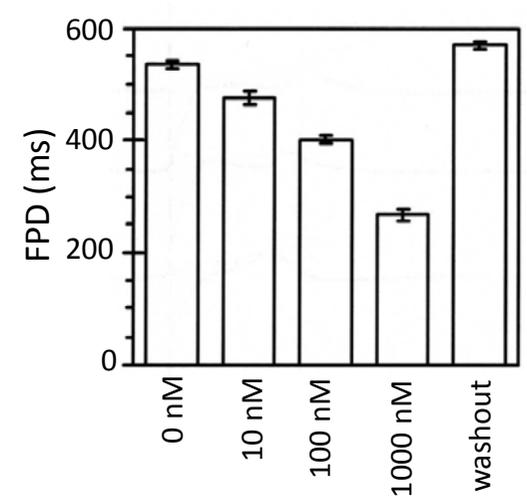
ヒトiPS心筋細胞の電気生理学的解析



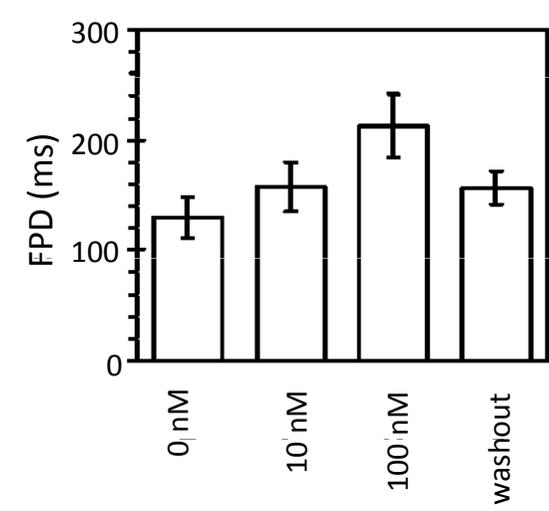
キニジン(Naチャンネル阻害薬)



ベラパミル(Caチャンネル阻害薬)

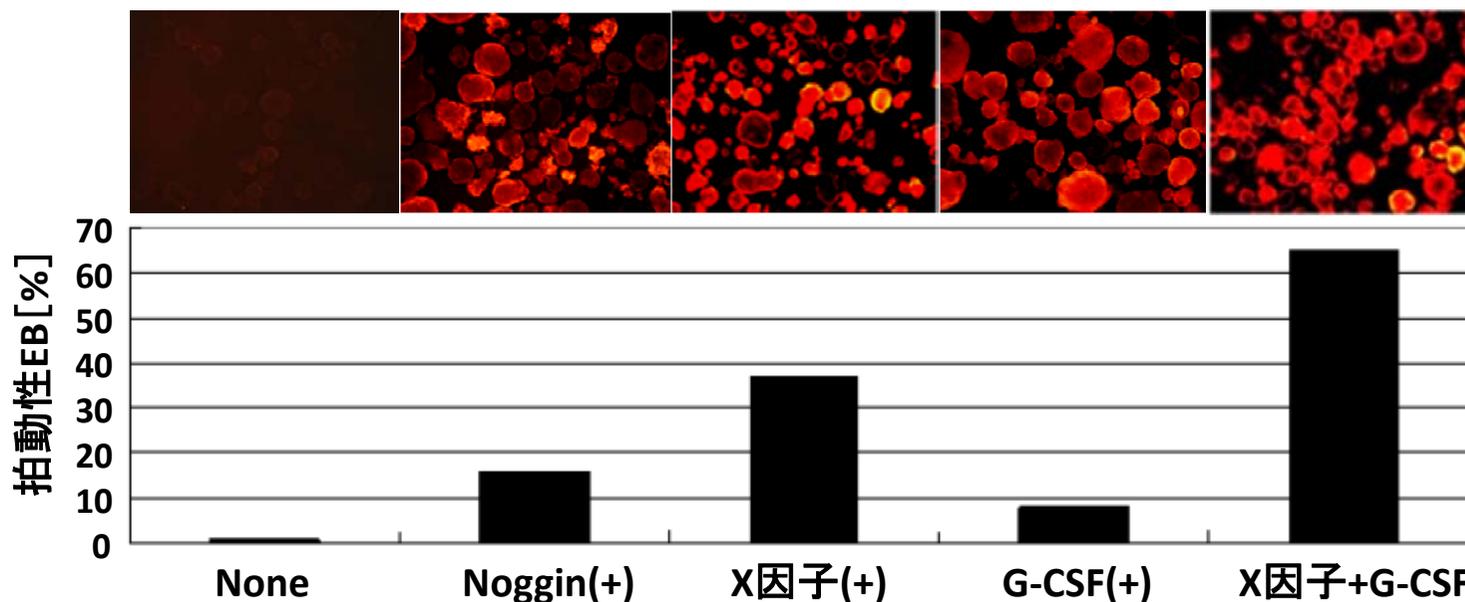


E4031(Kチャンネル阻害薬)

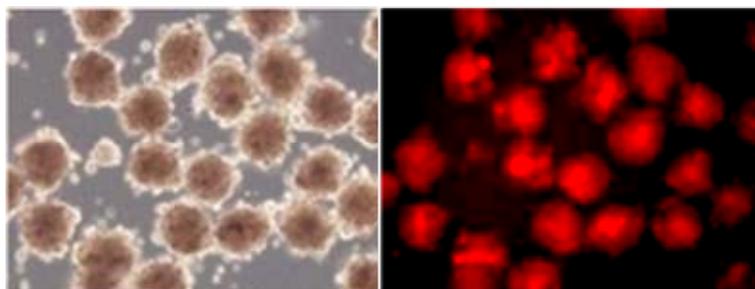


(Tanaka T, et al., BBRC, 2009)

最適なヒトiPS由来心筋細胞塊の製造法の確立



Noggin法、X因子法、G-CSF法の至適条件の決定と組み合わせ効果の確認
(上: TMRM染色、下: 拍動性EB出現率)



拍動性高純度心筋細胞塊
(左: 明視野、右: TMRM染色)

- ・X因子 + G-CSF法の組み合わせにより全体の60%以上を心筋細胞に分化誘導する方法を確立。
- ・100%拍動性を維持したまま任意の大きさかつ心筋含有量90%以上の高純度心筋細胞塊の作製法を確立。

遺伝性QT延長症候群1型、2型、3型患者iPSの樹立
心筋細胞の誘導、遺伝子変異の同定

ヒトES/iPS細胞由来心筋細胞の利用技術開発の流れ

EU project

InVibroHeart

Full project title: Reducing Animal Experimentation in Drug Testing by Human Cardiomyocyte in Vitro Models Derived from Embryonic Stem Cells
Duration of Project: 2007-2009
(EU-Project No 037636 Specific Targeted Research Project)

細胞
Cellartis AB
ヒトES細胞由来心筋細胞開発

計測システム
Multi Channel Systems GmbH
細胞電位計測技術開発



本プロジェクト

世界初の *in vitro* TdP計測
技術開発を目指すPJとして開始

細胞
慶応大学・アスビオファーマ
ヒトiPS細胞由来心筋細胞

細胞(比較用)
Cellartis AB
ヒトES細胞由来心筋細胞

計測システム
東京医科歯科大学
オンチップ
細胞ネットワーク計測システム

計測システムを商社等に販売・ライセンス

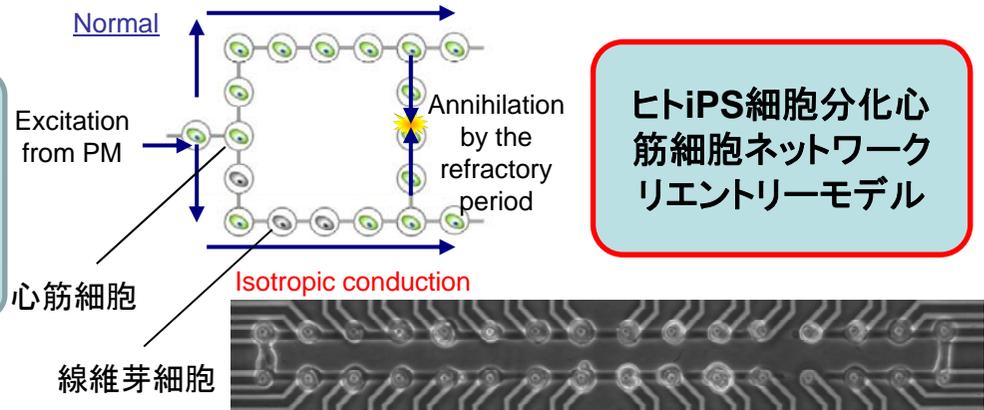
ヒト細胞を用いたイオンチャンネル計測技術
の開発(既存パッチクランプ技術の改良)

ヒト細胞を用いたTdP発生予測
計測技術の開発(新しい概念)

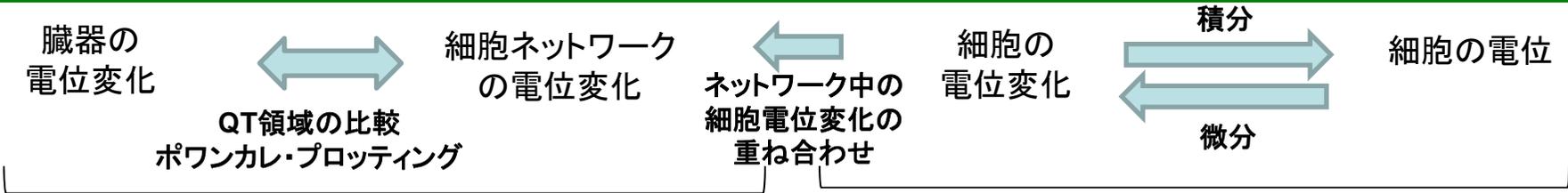
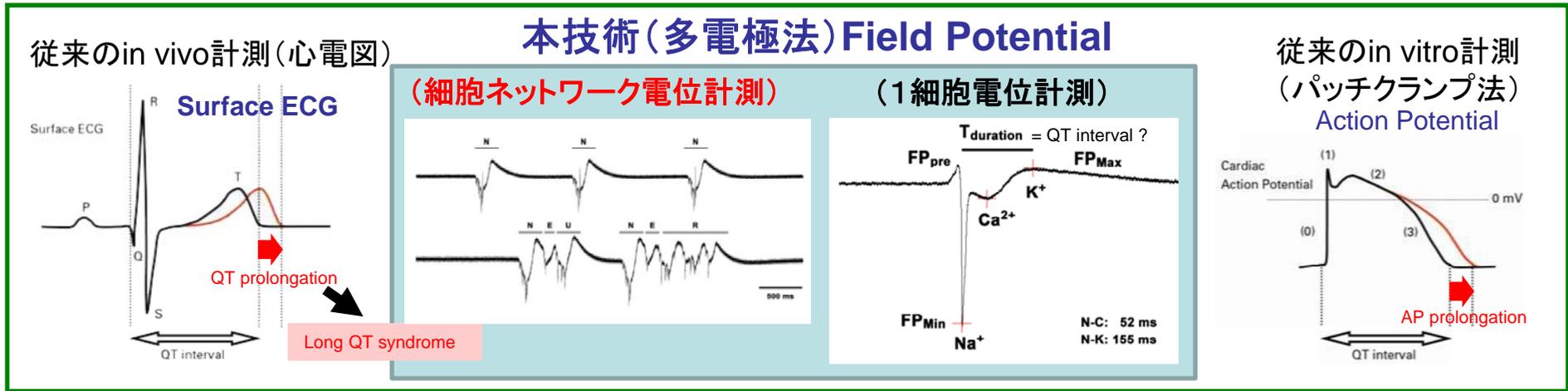
既存の計測技術は、従来の *in vitro* パッチクランプ計測の改良であり、
ヒトTdPを計測する技術とはなっていない(普及せず)

ヒトES/iPS細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

組織中の細胞配置を反映した細胞ネットワークとしての応答計測



ヒトiPS細胞分化心筋細胞ネットワークリエントリーモデル



細胞間伝導シグナルの計測

1細胞シグナルの計測

本技術の特徴: ①1細胞シグナル計測(時間ゆらぎ) + ②細胞間伝導シグナル計測(空間ゆらぎ)

研究開発項目③「iPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」

既存モデルと本モデルの比較(開始前)

	In vitro IKr: HERG, APD	In vivo QT: Dogs, Monkeys	カールソン モデル: Rabbits	慢性房室ブ ロック:Dogs, Monkeys	オンチップ Q-in vivoモ デル
HERG (IKr)	△ (偽陽性/偽陰性)	△	×	△	○
Na, Ca, IKs	× (HERG) △ (APD)	△	×	△	○
QT	△	○	×	○	○
TdP (VT/VF)	×	×	○	○	○
パネル試験 対応	×	×	×	×	○
薬物量 (微量対応)	○ (~ μg)	×	×	×	○

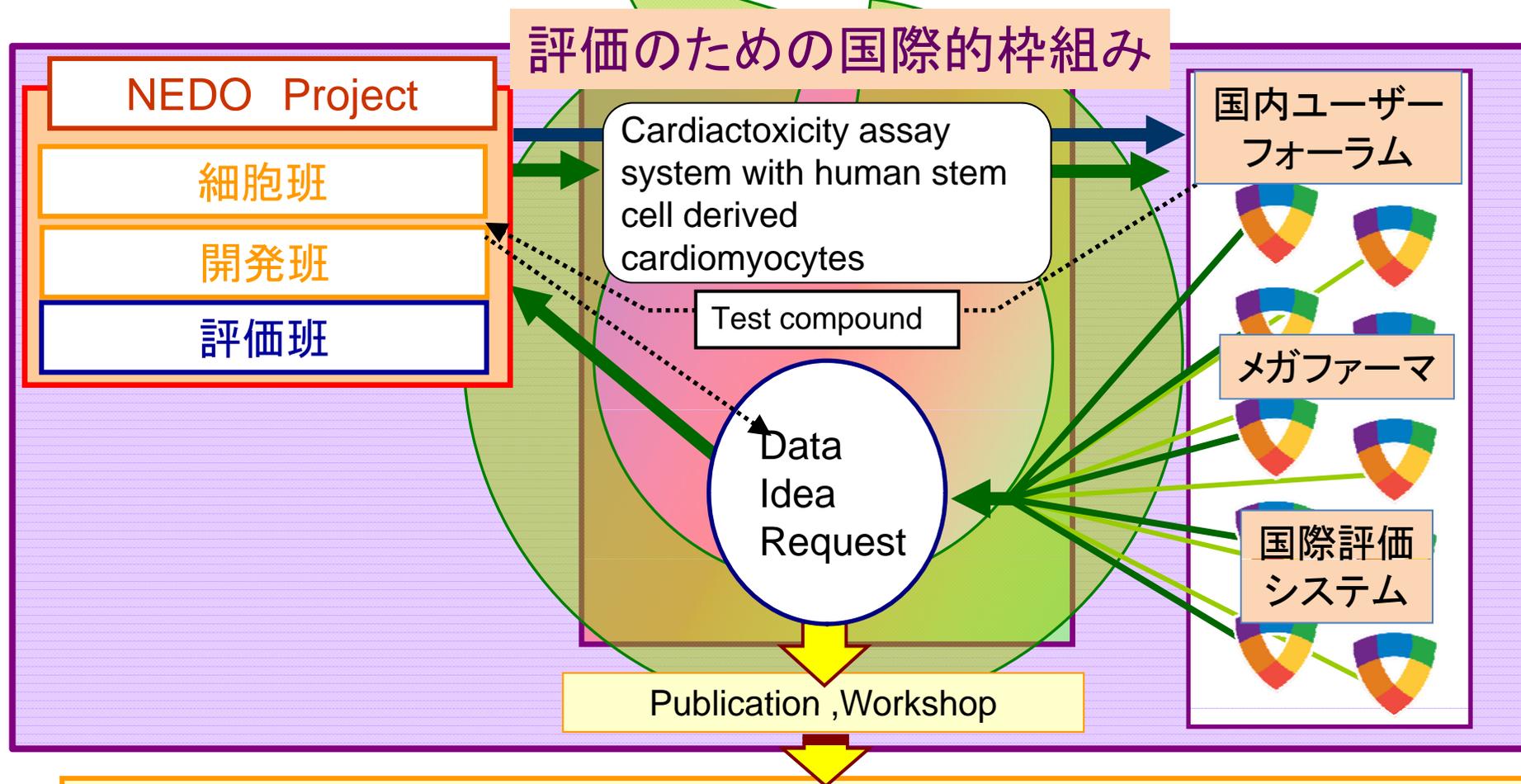
研究開発項目③「iPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」
 既存モデルと本モデルの比較（現在：中間報告時）

	In vitro IKr: HERG, APD	In vivo QT: Dogs, Monkeys	カールソン モデル: Rabbits	慢性房室ブ ロック:Dogs, Monkeys	オンチップ Q-in vivoモ デル
HERG (IKr)	△ (偽陽性/偽陰性)	△	×	△	○
Na, Ca, IKs	× (HERG) △ (APD)	△	×	△	○
QT	△	○	×	○	○
TdP (VT/VF)	×	×	○	○	○
パネル試験 対応	×	×	×	×	○
薬物量 (微量対応)	○ (~ μg)	×	×	×	○ (~ μg)

研究開発項目③「iPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」 既存モデルと本モデルの比較（現在・中間報告時）

	In vitro IKr: HERG, APD	時間ゆらぎの観点: FPD延長とFPDゆらぎの 2次元マッピング			室ブ Dogs, keys	オンチップ Q-in vivoモ デル
HERG (IKr)	△ (偽陽性/偽陰性)	△	×	△	○	○
Na, Ca, IKs	× (HI) △ (A)	○	○	○	○	○
QT	△	○	×	○	○	○
TdP (VT/VF)		多様なヒトiPS細胞からの心筋細胞の供給(慶応大)			○	○
パネル試験 対応	×	×	×	×	○	○
薬物量 (微量対応)	○ (~ μg)	×	×	×	○ (~ μg)	○ (~ μg)

研究開発項目③「iPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」 原理検討の段階から実用化に向けた総合的な評価へ



Final goal: Establishment of the global standard “proarrhythmic risk evaluation system” for the all chemicals

iPS細胞等幹細胞産業応用促進基板技術開発 研究開発項目③:
iPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発

iPSから心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

G-CSFの幼若期心筋の細胞増殖作用の発見、心筋大量培養法の確立
培養心筋はヒト心筋Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺チャンネルの機能を再現

達成率: 100%

iPSを用いた創薬スクリーニングシステムの開発・評価

ヒト心筋細胞におけるイオンチャンネル応答の揺らぎを計測する技術の開発
ヒト心筋細胞ネットワークの構築による伝導の揺らぎを解析する技術の開発
ヒト心筋細胞は既存システムと同等の薬物応答性を示す事を確認
催不整脈性既知薬剤の評価を行い、システムが機能する事を確認

達成率: 100%

心筋分化誘導技術の確立

ヒトに近似する心筋毒性スクリーニングシステムの開発

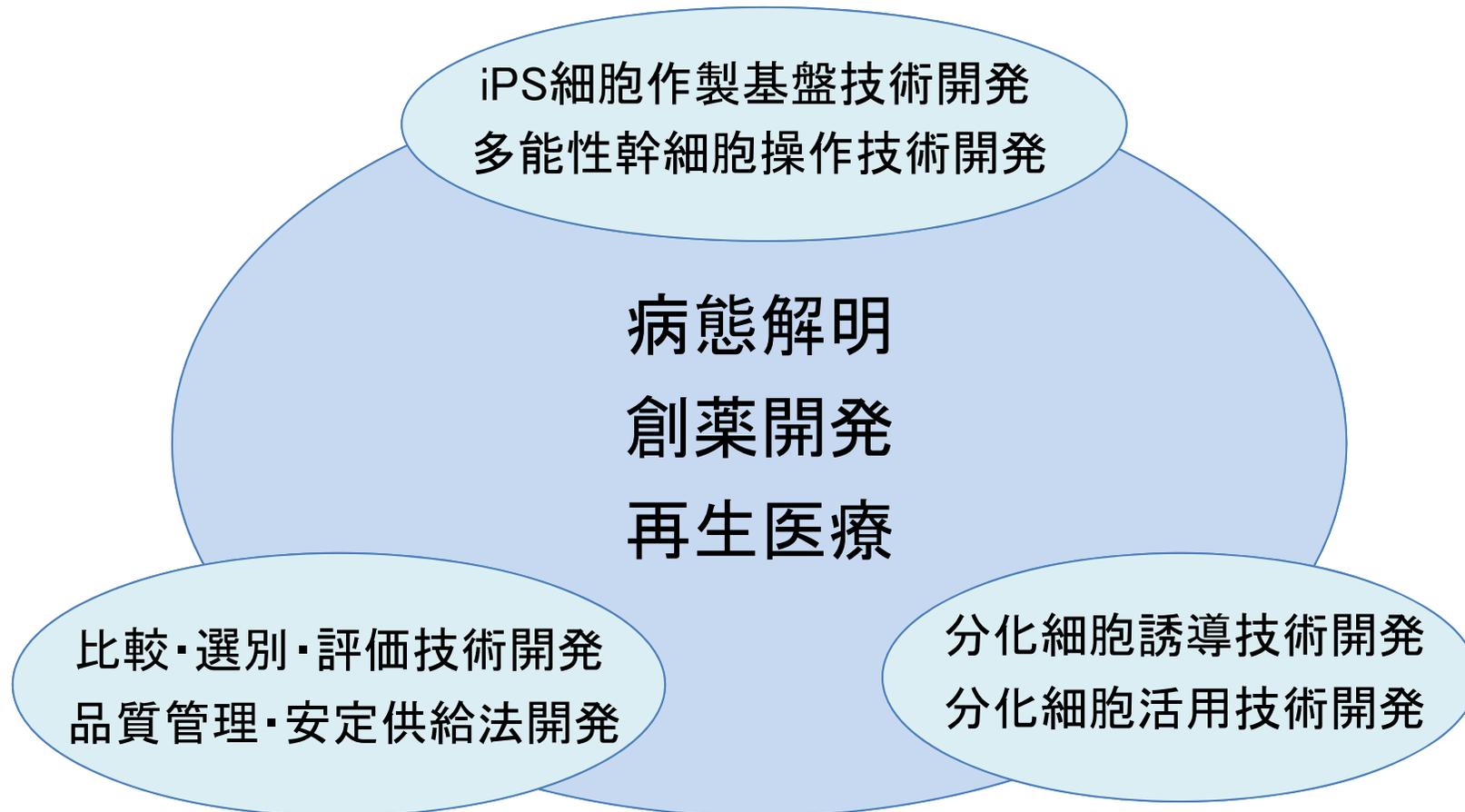
コンソーシアムの設立

論文、学会発表、特許、報道

論文	学会発表	特許	報道
121	119	14	43

■ iPS細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発

3領域の科学的／技術的相互作用、統合



共同研究、共同開発体制の構築

■ iPS細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発

誘導効率が低く、得られたiPS細胞の特性がばらばらで不安定
大きく改善、目標を達成

細胞の特性(自己複製能、多分化能)・安全性(腫瘍化の危険性)を評価する基準がない
必要な解析技術を開発、重要な解析結果を得た

誘導の分子機構が不明
機構解明の手がかりを蓄積

将来どのような成果に結びつくか

創薬の加速

心筋毒性スクリーニングシステムの開発 3年以内
分化細胞誘導法の開発が鍵

病因解明

遺伝性・単因子疾患から、多因子疾患の解析はどこまでできるか

再生医療

間葉系:多くの事例を積み上げつつある(250ケース以上)
ES細胞:2例のトライアル開始
iPS細胞:安全性、再現性、対象疾患、誘導機構等、
解決すべき課題の克服過程にある