

再生医療の実現化プロジェクト（第Ⅱ期） 成果報告票

（ヒト iPS 細胞等研究拠点）＜中間評価＞

課 題 名	再生医療の実現化を目指したヒト iPS 細胞・ES 細胞・体性幹細胞研究拠点
代 表 機 関 名	学校法人慶應義塾
代 表 研 究 者 名	岡野 栄之
分担機関・分担研究者名	独立行政法人国立病院機構大阪医療センター 金村 米博 財団法人実験動物中央研究所 伊藤 豊志雄

1. 課題開始時における達成目標

①脊髄損傷に対する幹細胞治療の開発：

(1) 免疫不全マウスに対する幹細胞治療の開発：マウス脊髄損傷に対するマウスiPS細胞由来神経幹細胞移植の有効性を確認し、免疫不全マウス損傷脊髄に対するヒトiPS細胞由来神経幹細胞移植の有効性を検討する。また、マウス脊髄損傷に対するヒトES細胞、ヒトiPS細胞および神経堤幹細胞に由来した神経前駆細胞の移植を、移植後の機能改善に関する検討、組織修復や移植細胞の分化等に関する解析を重点的に行う。(2) サル脊髄損傷に対するサル（もしくはヒト）iPS細胞由来神経前駆細胞移植：脊髄損傷に対するiPS細胞由来神経前駆細胞移植の確立のため、前臨床試験としてサル脊髄損傷に対するサル（もしくはヒト）iPS細胞由来神経前駆細胞移植を行い、その有効性を検討する。(3) マーモセット脊髄損傷に対する肝細胞増殖因子の検討：マーモセット脊髄損傷に対するrhHGF（ヒト組み換えHGF蛋白）の有効性と安全性を検討する。(4) マウス脊髄損傷に対する幹細胞移植方法の比較検討（投与方法と部位）：神経幹細胞移植の最適化をめざし、損傷脊髄に異なる投与方法で神経幹細胞移植を行い、移植された神経幹細胞がhost内でどのように分布・生着するのか、更に副作用や重篤な合併症の有無を検討する。

⑥ iPS細胞に関する標準化：慶大拠点では、培養ヒト神経幹細胞や予期的に分離したヒト間葉系幹細胞などをソースにして、高効率にiPS細胞を樹立する新規技術を開発し、高品質のiPS細胞の樹立方法の開発を努め、ここで得られた新規の知見を4拠点間でシェアする。また、iPSクローンに毎の未分化能の維持、多能性、*in vitro*での分化誘導法の検討を通じて得られた細胞特性に関する知見、および網羅的解析により得られたデータとの比較検討によって、iPS細胞の品質評価に関わる因子の探求を行う。その成果については他拠点（特に京都大学）と密接に連携し、適切と判断されるものを選定することによって、国内基準の制定を目指す。さらに、地理的な近隣性を活かし、導入予定の次世代シーケンサーは、必要に応じて東大拠点から得られるiPS細胞の解析にも用いるものとする。

⑦ iPS細胞培養の技術講習会・培養および樹立トレーニングプログラムの実施：細胞誘導の技術講習、培養トレーニングプログラムの実施による研究者の裾野の拡大に取り組む。

⑧ 疾患特異的 iPS 細胞の樹立・提供：患者から提供される体細胞から、最適誘導技術により i P S 細胞を樹立・活用し、疾患発症機構の解明、薬剤候補物質の探索、薬理試験系としての開発を実施し、i P S 細胞研究の成果を速やかに人々へ還元する。疾患特異的 iPS 細胞の樹立については、4 拠点が協調しながらも、特定の疾患についてのお互いの制約をかけずに行っていくものとする。たとえば、京大拠点においても ALS など一部重複した疾患に関する疾患モデル細胞の作成が計画されているが、疾患自身の複雑性と遺伝学的背景の多様性を鑑み、あえて重複を排除せず、2 拠点間で協調的に研究を進める。一方、慶應拠点の特長として、神経系の細胞や心筋への分化誘導法に関する技術開発が進んでいることを鑑みて、神経疾患・循環器疾患患者からの iPS 細胞樹立と疾患感受性細胞への分化誘導を主に進める。また、拠点外の研究者とも積極的に共同研究を行い、疾患モデル細胞の作成、解析、提供のための方法論の確立とインフラ整備を行う。特に神経疾患については、慶應義塾大学医学部倫理委員会で承

認が得られた下記の対象疾患等について、iPS 細胞樹立と疾患感受性細胞への分化誘導による疾患モデル細胞の作成と、解析を行う。

⑩プロジェクトの総合的推進：学外研究者にも共同利用研究施設として開放するべく同拠点を運営し、プロジェクト全体の連携を密としつつ円滑に運営していくため、運営委員会や技術検討会、公開シンポジウムや技術講習会の開催等、参画各機関の連携・調整にあたる。特に、プロジェクト全体の進捗状況を確認しつつ計画の合理化を検討し、必要に応じて調査或いは外部有識者を招聘して意見を聞くなど、プロジェクトの推進に資する。プロジェクトで得られた成果については、積極的に公表し、今後の展開に資する。

2. 平成22年4月末時点における課題全体の事業計画に対する研究成果

(1) 成果概要

①脊髄損傷に対する幹細胞治療の開発

(1)免疫不全マウスに対する幹細胞治療の開発：1) **In vitro**: 先ずはマウスES細胞(Naka et al., *Nature Neurosci*, 2008; Okada et al., *Stem Cells*, 2008)、マウスiPS細胞 (Miura et al., *Nature Biotech*, 2009)の神経幹・前駆細胞への分化誘導法の確立を行った。さらに、京都大学山中研において樹立されたヒトiPS細胞(201B7:cMyc+, 253G1:cMyc-)を神経幹/前駆細胞 (NS/PC) に分化誘導した。なお、ヒトiPS細胞と比較するために京都大学再生研より供与されたヒトES細胞もNS/PCに分化誘導した(ES-NS/PC) (Okada et al., in preparation)。また、神経堤幹細胞については、マウスの様々な末梢組織(皮膚、骨髄、後根神経節)から分離できることを確認し(Nagoshi et al. *Cell Stem Cell*, 2008)、その分化能や遺伝子発現パターンが由来組織によって大きく異なることが明らかとなった。2) **In vivo**: ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞の脊髄損傷モデルへの移植を行う前段階として、マウスES細胞 (Kumagai et al. *PLoS ONE*, 2009) あるいはマウスiPS細胞由来のNS/PCをマウス脊髄損傷モデルへと移植し、その治療効果を確認し、多能性幹細胞由来のグリア細胞がミエリン形成、あるいは軸索再生や血管形成の誘導などの栄養効果を介して運動機能の回復に結び付くことを明らかにした (Tsuji et al., *PNAS*, 2010)。

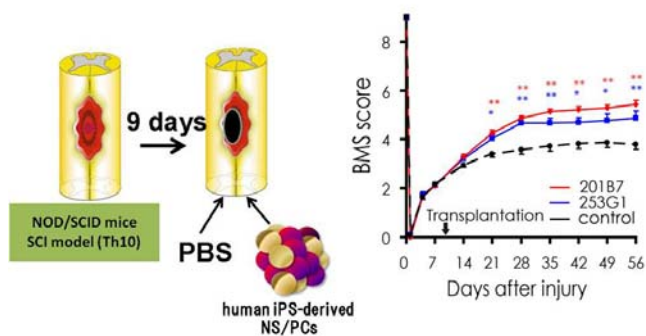
次に、免疫不全 (NOD/SCID) マウスにIH impactorを用いて第10胸髄高位に圧挫損傷モデルを作製し、損傷後9日目にヒトiPS-NS/PC およびヒトES-NS/PCを損傷部に移植し、ヒトiPS-NS/PC移植群(201B7株 (cMyc+) 及び253G1株 (cMyc-) 由来NS/PC移植群)とヒトES-NS/PC移植群 (KhES1株由来はいずれも対照群より有意な下肢運動機能の改善がみられた (Takahashi et al., *Society of Neurosci Abstract*, 2009; Nori et al., *Society of Neurosci Abstract*, 2009) (左図)。組織学的な解析の結果、この運動機能改善

のメカニズムは、マウス脊髄損傷モデルへのマウスES/iPS細胞由来NS/PCを移植した場合とほぼ同等と考えられた。また、これまでの解析では、マウス脊髄損傷モデルへの神経堤幹細胞移植は、多能性幹細胞由来NS/PC移植にくらべるとその治療効果は低いものであった。

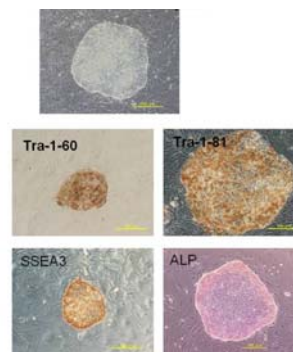
(2)サル脊髄損傷に対するサル(もしくはヒト)iPS細胞由来神経前駆細胞移植:

1)マーモセット iPS 細胞の樹立と神経分化誘導：先ずは、マーモセットの各種体細胞を用い iPS 細胞の樹立条件を検討し、Oct-3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Lin28 の6因子を導入した場合にのみ、遺伝子発現パターン、形態、テラトマ形成、in vitro 分化いずれの項目をも満たすマーモセット iPS 細胞を樹立することができた (Tomioka et al., *Genes to Cells*, 2010) (下図)。次に、以前樹立を行ったマーモセット ES 細胞、 β -actin 遺伝子座に GFP 遺伝子をノックインしたマーモセット ES 細胞 (Shiozawa et al., in preparation)、マーモセット iPS 細胞 (Tomioka et al., *Genes to Cells*, 2010)、これらマーモセット多能性幹細胞から、胚様体を介して神経幹/前駆細胞へと分化誘導する方法の開発を行った。まず神経幹細胞を多く含む胚様体形成の条件について検討した。異なる基本培地、および、血清存在下または非存

ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞移植によるマウス脊髄損傷の運動機能回復



在下で浮遊培養し、さらに、神経分化を誘導することが知られる種々の因子 (Noggin、Dkk1、レチノイン酸等) をさまざまな濃度で加えることで、神経系細胞の誘導効率につき検討した。今後、さらに培養法を改善し、移植に最適な神経幹/前駆細胞の分化誘導法を確立する。



2) サル (もしくはヒト) iPS 細胞由来神経前駆細胞の安全性と造腫瘍性の検討: 先ず前段階として、京都大学山中研究室との共同研究にて、マウス iPS 細胞由来の神経幹/前駆細胞 (マウス iPS- NS/PCs) の腫瘍原性を検討し、腫瘍原性はマウス iPS- NS/PCs 中に含まれる未分化な多能性幹細胞マーカー陽性細胞の含有率と正の相関があり、さらにマウス iPS 細胞を樹立するための起源細胞が何であるかに強く依存することを明らかにした (Miura et al., *Nature Biotech.*, 2009). さらに京都大学山中研究室において樹立されたヒト iPS 細胞、および、独自に樹立したヒト iPS 細胞から神経幹/前駆細胞 (NS/PC) を分化誘導し、これらの神経幹/前駆細胞を、免疫不全マウス脳に移植し観察し、腫瘍の形成の有無を検討した。3 株のヒト iPS 細胞のうち、1 株から誘導したヒト iPS 細胞由来神経幹/前駆細胞は、脳の片側の約 30% を占める巨大な腫瘍を形成した。さらに、3 株中 2 株のヒト iPS 細胞由来神経幹/前駆細胞を移植した脳において、腫瘍として矛盾しない組織像を示した。一方で、6 か月経過後も全く腫瘍を形成しない iPS 細胞株由来神経幹/前駆細胞もあり、ヒト iPS 細胞から誘導した神経幹細胞に残存する腫瘍形成能は細胞株によって異なることが明らかになった。また、マーモセット脊髄損傷モデルへの幹細胞移植実験の一環としてガレクチン-1 遺伝子導入ヒト神経幹細胞移植を行い、ガレクチン-1 の遺伝子の導入がさらに機能改善効果を増大させることを確認した (Yamane et al., *J. Neurosci Res.*, 2010).

(3) マーモセット脊髄損傷に対する肝細胞増殖因子の検討: コモンマーモセット第 5 頸椎高位に圧挫損傷を作製し、rhHGF の髄腔内投与により著明な治療効果が得られた。

(4) マウス脊髄損傷に対する幹細胞移植方法の比較検討 (投与方法と部位): 成体 C57BL/6 マウスに胸髄圧挫損傷モデルを作製後、損傷脊髄内への直接投与 (IL 群)、クモ膜下腔内への投与 (IT 群)、経静脈的投与 (IV 群) の 3 通りの方法で 5×10^5 個の移植細胞を投与し、イメージング技術 (BLI 法) により神経幹細胞の移植方法は細胞の生着の観点からは損傷部への直接注入が最も優れていた。安全性の観点からはクモ膜下投与は優れているが移植細胞はほとんど生着せず、静脈投与では肺胞内に移植細胞による塞栓をきたす可能性があり重篤な合併症をきたす可能性が示唆された (Takahashi et al. in revision).

⑥ iPS 細胞に関する標準化

(1) 樹立方法の標準化に関する試み: ヒト iPS 細胞樹立に最も適した材料を明らかにするためにヒト組織より分離した体性幹細胞を材料としてヒト iPS 細胞の誘導を行った。その結果、骨髄由来間葉系幹細胞および胎児脳由来神経幹細胞に対してヒト iPS 細胞を樹立した場合、ヒト皮膚繊維芽細胞に比較し、より高頻度 (約 5 倍の誘導効率) でヒト iPS 細胞を樹立可能であることが明らかになった。

(2) 品質評価の標準化に関する試み: 新規に樹立したヒト iPS 細胞の品質を樹立に用いた外来遺伝子の発現抑制の程度と目的とする細胞 (例えば神経系細胞) への分化誘導効率を指標に統合的に評価するシステムを開発した。

⑦ iPS 細胞培養の技術講習会・培養および樹立トレーニングプログラムの実施

本年度の慶應拠点のヒト iPS 細胞培養および樹立トレーニングプログラムは、東大・理研で行われた講習会の応用編という位置づけで行われた。トレーニングに必要な期間は樹立のみで最低 3 ヶ月程度必要であり、集中的な講習会での技術指導は効果的でない判断し、実際には共同研究として iPS 細胞の樹立および維持培養、さらには神経分化誘導までを一貫して訪問研究員にトレーニングし、技術移転を目指すという形で行われた。

⑧ 疾患特異的 iPS 細胞の樹立・提供: 神経疾患患者由来の iPS 細胞の樹立: 計 22 症例で iPS 細胞の樹立および解析が進行中である。慶應義塾大学病院で皮膚生検が行われた症例は、網膜色素変性症、孤発性パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、Prader-Willi 症候群、自閉症、ミエリン形

成不全症、家族性パーキンソン病各 1 例、レット症候群 2 例である。その他、共同研究施設での検体を慶應に搬送した例が 10 例（家族性パーキンソン病、統合失調症、ミエリン形成不全症、CHARGE 症候群）米国セルバンクから購入した細胞が 2 例（先天性ミエリン形成不全症 1 例、Prader-Willi 症候群 1 例）である。家族性パーキンソン病由来 iPS 細胞については、国内製薬企業からの依頼に対応し、MTA を結び提供を行った。

⑩プロジェクトの総合的推進：慶應義塾大学の共同研究チーム（生理学教室・発生分化学教室・再生医学教室・眼科学教室・整形外科教室・知的資産センター）は、多岐にわたるプロジェクトが同時進行している状況を鑑み、定期的に各々のプロジェクトの進捗状況の報告と確認作業を行った。

また本プロジェクトに参画する他機関に関しては、報告書の確認や種々の事務連絡及び公開シンポジウムの開催により、全体の進捗状況を確認及び調整しながらプロジェクトの推進にあたった。

（２） 研究の進捗及び成果

①脊髄損傷に対する幹細胞治療の開発 (1)免疫不全マウスに対する幹細胞治療の開発：，移植後 7 週でiPS-NSC移植群（253G1 株由来NS/PC移植群）23 例中 3 例で腫瘍形成と思われる異常な細胞増殖が認められた。これらの細胞はほとんどがGFAP, Nestin, Vimentin陽性のmitoticな細胞集団であり病理組織学的に奇形腫とは異なっていた。一方 201B7 株由来NS/PC移植群では、これまでの解析では腫瘍形成は観察されなかった。(2)サル脊髄損傷に対するサル（もしくはヒト）iPS細胞由来神経前駆細胞移植: 1) マーモセットiPS細胞の神経分化：マーモセットiPS細胞の神経分化の基礎実験として、マーモセットES細胞を用いて神経分化誘導を行った。マウスES/iPS細胞で神経誘導活性のある、種々の誘導因子、あるいはヒトES/iPS細胞の神経分化誘導方法と同様の培地組成で、コモンマーモセットES細胞からの神経分化誘導を行った。その結果、RT-PCRにより神経幹/前駆細胞に特異的に発現するSox1 の発現がみられ、免疫染色にて未分化神経系前駆細胞で発現するNestin陽性の細胞が見られたものの、βIII tubulin陽性ニューロンは観察されなかった。今後、さらなる分化誘導法の検討が必要である。2) サル（もしくはヒト）iPS細胞由来神経前駆細胞の安全性と造腫瘍性の検討：すでに分化培養法を確立しているヒトiPS細胞由来神経幹細胞を用いて造腫瘍性について解析を行った。京都大学より分与を受けた、レトロウイルスを用いて樹立されたヒトiPS細胞株(201B6, 201B7, 253G1, 253G4)から誘導した神経幹細胞を、免疫不全マウスであるNOD/SCIDマウスの脳、または精巣に移植し、1, 3, 6 ヶ月後に組織学的解析、および、RT-PCRによる、遺伝子の発現解析を行った。その結果、一部のヒトiPS-NS/PCは、脳においても精巣においても腫瘍化を示したが、一方で、一部のヒトiPS-NS/PC(たとえば 201B7 株由来NS/PC)は、脳においても精巣においても腫瘍化像を示さなかった。これらの結果から、今後の再生医療に使用するヒトiPS細胞株の安全性を考慮する上で、使用する細胞株の選択を慎重に行う必要があると考えられた。(3) マーモセット脊髄損傷に対する肝細胞増殖因子の検討: rhHGFの髄腔内投与により霊長類脊髄損傷に対して著明な治療効果が見られたのみならず、異痛症や腫瘍形成を認めず、安全性についても確認できた。

⑥iPS 細胞に関する標準化

(1) 樹立方法の標準化に関する試み：高純度なマウス体性幹細胞をソースとした新規のヒト iPS 細胞樹立の開発は、ヒト iPS 細胞の樹立効率の著しい増大と（遺伝子発現プロファイルから考えて）樹立されたヒト iPS 細胞の均一な高品質をもたらすことが明らかになった。そこでヒト iPS 細胞樹立に最も適した材料を明らかにするためにヒト組織（本年度は骨髄・胎児脳）より分離した体性幹細胞を材料としてヒト iPS 細胞の誘導を行った。その結果、骨髄由来間葉系幹細胞および胎児脳由来神経幹細胞に対してヒト iPS 細胞を樹立した場合、ヒト皮膚繊維芽細胞に比較しより高頻度（約 5 倍の誘導効率）でヒト iPS 細胞を樹立可能であることが明らかになった。また、ヒト iPS 細胞においてはセンダイウイルスベクターによる樹立を試み、現在センダイウイルスベクターによって樹立された iPS 細胞の分化誘導能と未分

化維持能力を従来型の iPS 細胞と比較しながら解析している。

(2) 品質評価の標準化に関する試み：樹立したヒト iPS 細胞は、その安全性、応用性を考慮し、(1) 樹立したヒト iPS 細胞の未分化性と多能性、(2) 樹立に用いた外来遺伝子の発現抑制の程度、(3) 目的とする細胞（例えば神経系細胞）への分化誘導効率、を指標に効率的に、また、統合的に評価するシステムを開発した。これにより、異なる個人由来の体細胞、あるいは異なる種類の体細胞から樹立したヒト iPS 細胞であっても、その品質について横並びで比較、評価することが可能になった。また、樹立したヒト iPS 細胞の品質評価基準制定のために、次世代シーケンサーを用いてゲノム解析を行なった。

⑦ iPS 細胞培養の技術講習会・培養および樹立トレーニングプログラムの実施

昨年度、実際にトレーニングを終了もしくは進行中の研究機関は以下の通りである。1.奈良県立医大精神科（樹立及び神経分化誘導；H21.7-10）2.山梨大学（樹立及び神経分化誘導；H21.8-）3.慶應義塾大学小児科（樹立および神経分化誘導；H21.4-）4.北里大学神経内科（樹立及び神経分化誘導；H21.9-）

⑧ 疾患特異的 iPS 細胞の樹立・提供

(1) 神経疾患患者由来の iPS 細胞の樹立

本年度は計 22 症例で iPS 細胞の樹立および解析が進行中である。慶應義塾大学病院で皮膚生検が行われた症例は、網膜色素変性症、孤発性パーキンソン病、筋委縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、Prader-Willi 症候群、自閉症、ミエリン形成不全症、家族性パーキンソン病各 1 例、レット症候群 2 例である。その他、共同研究施設での検体を慶應に搬送した例が 10 例（家族性パーキンソン病、統合失調症、ミエリン形成不全症、CHARGE 症候群）米国セルバンクから購入した細胞が 2 例（先天性ミエリン形成不全症 1 例、Prader-Willi 症候群 1 例）である。

疾患特異的 iPS 細胞の樹立および解析は品質評価の標準化に関する試みの結果に基づき、1.形態による iPS 細胞コロニー（サブクローン）の単離；2. 細胞の増幅およびストック作成；3. 各サブクローンの導入遺伝子のサイレンシングの確認；4. iPS 細胞マーカーなどの遺伝子発現プロファイルの確認；5. （可能であれば）疾患責任遺伝子の genotype の確認；6. 疾患感受性細胞への分化誘導効率解析に用いるサブクローンの決定という手順で行うという拠点内での標準化を行った。これを国内、世界標準とすることを提唱していく予定である。提供については、来るべき疾患特異的 iPS 細胞バンクの設立に向けて、技術的・倫理的な検討を行うため京都大学・東京大学・理化学研究所の技術および倫理問題担当者との間で連絡体制を確立し、ネットワークを構築し、バンクへの細胞の deposit の方法・規準について検討を行っている。また、国内製薬企業からの依頼に基づき、MTA を結び、家族性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞株（3 株）の提供を行った。

3. 課題全体の論文発表件数	103 件
4. 課題全体の特許出願件数	16 件（うち国外 14 件）登録特許 6 件 登録査定 4 件
5. 当初目標に対する達成度	

①脊髄損傷に対する幹細胞治療の開発：1) 免疫不全マウスに対する幹細胞治療の開発：マウスおよびヒト iPS 細胞由来神経前駆・幹細胞移植により、マウス脊髄損傷モデルの運動機能の改善を確認したので当初目標は、達成したものと考えられる。引き続き、運動機能の回復のメカニズムの解明の問題について検討を行う 2) サル脊髄損傷に対するサル（もしくはヒト）iPS 細胞由来神経前駆細胞移植：本年度（H22 年度）4 月 30 日にヒト iPS 細胞由来神経幹細胞を行うことができた。従って、サル H22 年度までにサル脊髄損傷に対するサル（もしくはヒト）iPS 細胞由来神経前駆細胞移植の研究を開始するという当初目標を達成しているものと考えられる。また、マーマセット iPS 細胞の樹立にも成功した。一方、マーマセット ES・iPS 細胞からの神経分化誘導については、マウスおよびヒト ES 細胞の神経分化誘導法をそのまま適用することができず、まだ改善の余地が多い。サル（もしくはヒト）iPS 細胞由来神経前駆細胞の造腫瘍性の確認については、前段階として マウス iPS 細胞由来神経前駆細胞の造腫瘍性について検討を行い、iPS 細胞の起源細胞と腫瘍化の関係を明らかにする予想外の成果を得ることができた(Miura et al. *Nature Biotech*, 2009) 及びヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞の造腫瘍性

の解析方法を確立した。これまでに、京都大学より分与を受けたヒトiPS細胞株から誘導した神経幹細胞の造腫瘍性については解析をほぼ終了し、造腫瘍性のある株と、造腫瘍性のない安全なiPS細胞株をよりわけることに成功し、腫瘍化がない安全なiPS細胞株由来神経前駆細胞をサル脊髄損傷モデルへの移植を行うことができ、当初の目標は達成したものと考える。3) マウスマウス脊髄損傷に対する肝細胞増殖因子の検討: これまでの研究成果によりHGFの霊長類脊髄損傷モデルへの安全性と有効性が確認でき、この再生PJでの目標は達成し、ミッションは完了し、クリングルファーマ社と共同して、医薬品医療機器総合機構に治験の申請を行っている。以降は、内閣府先端医療開発プログラムおよび厚生科研費により開発研究を進める。(4) マウス脊髄損傷に対する幹細胞移植方法の比較検討: 様々な神経幹細胞投与方法の内、細胞の生着と安全面から損傷部への直接注入が最も優れていると結論でき、当初の目標は達成した。

⑥iPS細胞に関する標準化

(1) 樹立方法の標準化に関する試み: 骨髄由来間葉系幹細胞および胎児脳由来神経幹細胞を用いると、ヒト皮膚繊維芽細胞を用いた時と比較して、より高頻度(約5倍の誘導効率)でヒトiPS細胞を樹立可能であった。ヒトiPS細胞樹立のソースとして、幹細胞のポテンシャルが高い細胞の方が望ましいことが示唆されるため、さらに侵襲が少なく良質な細胞ソースの模索が必要であると考えられた。また、センダイウイルスによるiPS細胞の樹立法はほぼ確立したが、従来型との更なる比較検討が必要である。

(2) 品質評価の標準化に関する試み: レトロウイルスを用いて樹立したヒトiPS細胞の品質評価の方法はある程度確立できた。今後、新規の手法で樹立したintegration free iPS細胞においても、エピゲノム解析や、安全性評価を含めた品質評価法開発が重要である。また、次世代シーケンサーによる疾患特異的iPS細胞のゲノム解析を行い、ウイルス挿入位置や疾患と遺伝子異常の関連を明らかにした。

⑦ iPS細胞培養の技術講習会・培養および樹立トレーニングプログラムの実施

昨年度は学内外4研究室へ技術指導を行い、拠点内外の研究者にiPS細胞樹立技術を普及させるという目標は達成できたと考えられる。

⑧疾患特異的iPS細胞の樹立・提供

(1) 神経疾患患者由来のiPS細胞の樹立

1)疾患特異的iPS細胞細胞の樹立、分化誘導法の確立が完了し、対照との比較研究に進んだ疾患

・遺伝性パーキンソン病は樹立された多数のクローンの中で、前述した品質評価基準を基に用いるクローンを選定しTH陽性のドーパミン作動性ニューロンを高効率に誘導することに成功した。また分化細胞においてマイクロレイ解析を行い、患者群において2倍以上増加あるいは減少した遺伝子として、ユビキチン・プロテアソーム系及びミトコンドリア動態に関わる遺伝子を同定した。これにより、これまで未知であったPARK2の発症に至る生化学的機序を解明できると期待される。本疾患の解析では疾患特異的iPS細胞の解析の方法論を確立することに成功している。以降の疾患特異的iPS細胞研究は先行する本研究の結果を参考することによって大いに加速した。また、網膜色素変性症に関しては、樹立されたiPS細胞、およびコントロールとして用いる山中研由来iPS細胞株(201B7)を網膜細胞に分化誘導することに成功し、誘導された網膜色素変性症患者iPS細胞由来の網膜細胞の特徴を、特に細胞死に着目して比較解析中である。孤発性ALS患者由来iPS細胞に関してはニューロンへの分化誘導を行った。更に、TDP-43蛋白について細胞生物学的、生化学的に解析した。TDP-43蛋白の蓄積とC末端断片についてALS由来iPS細胞から分化誘導した神経細胞において解析を行っている。

2)疾患特異的iPS細胞細胞の樹立は完了したが、分化誘導法が開発途中である疾患

Prader-Willi 症候群 (PWS) は2症例からiPS細胞を樹立し神経細胞への分化誘導に適する5クローンを選定し、 β tubulin III陽性ニューロンを誘導した。現在は病変部位である視床下部ニューロンへの誘導系を開発している。ミエリン形成不全症に関しては通常の神経分化誘導法による神経分化誘導を行うと同時に、オリゴデンドロサイトへの効率的分化誘導法の開発も含めて解析中である。

その他の疾患に関しては現在iPS細胞樹立を終え、品質評価の途中段階にある。

上記の結果から、疾患特異的iPS細胞に関しては、患者からのiPS細胞の樹立、評価、分化誘導システムが確立され、安定した疾患特異的iPS細胞の樹立と方法論の確立およびインフラ整備を達成することが出来た。今後は比較研究から疾患メカニズムに関して得られた新規知見を発信していく方向である

と同時に、疾患特異的な表現系を用いた薬剤スクリーニングに展開していけると思われる。

6. 拠点内の情報共有・連携体制

・代表研究者・岡野 栄之がイニチアシブを取って、岡野栄之、福田恵一、須田年生、松崎有未からなる運営委員会を構築し、拠点内の情報の共有・連携体制の構築と拠点の円滑な運営に腐心してきた。この運営委員会は、拠点内（代表機関のみならず及び分担機関を含むメンバーによる）の研究進捗状況報告会の開催による情報交換と共同体制の推進、ヒトiPS細胞樹立と分化誘導に関する技術講習、ヒトiPS細胞関連研究の倫理委員会への申請へのアドバイス、文部科学省(PO/PD、文部科学大臣あるいは政務官)によるサイトビジットへの対応、公開シンポジウム(2008.2.4)の開催や拠点でのiPS細胞研究紹介のDVDの作製などのアウトリーチ活動、知的資産センター・iPS細胞知財戦略チームと共同した知財戦略（シーズの探索・出願・技術移転・企業との共同研究の推進・グローバルな特許情報調査）、他の拠点との共同研究や協力体制構築のサポートなどの活動を積極的に行い、実績を上げてきた。

・また、代表研究者・岡野 栄之は、生理学教室・眼科学教室・整形外科教室（分担機関の実験動物中央研究所のメンバーも参画）が行う月例研究報告会にすべて参加し、こまめに進捗状況の確認をし、的確なアドバイスを行っている。さらに、この月例報告会には、知的資産センター・iPS細胞知財戦略チームのメンバー複数名が出席しており、特許として出願の可能性のある研究成果が出た際に、外部発表する前に、迅速に特許出願準備をする体制を取っている。

・慶應義塾大学のメンバーが作製したヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞を分担機関の国立病院大阪医療センターの金村らがマスターバンク化を行い実験動物中央研究所の伊藤らと共同し免疫不全動物を用いて腫瘍化を検討したり、国立病院大阪医療センターの金村らが、胎盤組織あるいは臍帯血由来付着性細胞などから新たに樹立したヒト iPS 細胞のテラトーマ形成による多能性の確認を実験動物中央研究所の伊藤らが行うなどの密な共同体制で研究が進行している。

7. 拠点外の課題との情報共有・連携

-疾患特異的 iPS 細胞に関しては拠点外との共同研究が多いため、各課題に関して共同研究先と積極的に会議形式による情報交換を数ヶ月に一度行っている。円滑な研究遂行が拠点内外両方で行えるように iPS 細胞の標準化・分化誘導法など拠点内で新規に確立された研究結果も積極的に共同研究先に開示して、情報交換と連携を効率的に行っている。また、来るべき疾患特異的 iPS 細胞バンクの設立に向けて、技術的・倫理的な検討を行うため京都大学・東京大学・理化学研究所の技術及び倫理問題担当者との間で連絡体制を確立し、ネットワーク（生命倫理検討委員会）を構築した。また、健常人 iPS 細胞を含む包括的な社会的問題に対応するための拠点横断的組織の必要性について、担当者間で検討を開始した。

-京大拠点・山中研と共同し、マウス iPS 細胞 (Miura et al., **Nature Biotech**, 2009)、ヒト iPS 細胞の神経分化誘導技術の開発と、これらを用いた脊髄損傷モデルへの移植実験を行った (Tsuji et al., **PNAS**, 2010)。また、腫瘍化傾向が低く、安全性の高いヒト iPS 細胞の開発と、これを用いた前臨床研究について緊密な共同研究が継続中である。

-当研究室の岡田らが開発したヒト ES 細胞の脂肪細胞への分化誘導法を、京大拠点・中尾 一和・教授のグループに技術移転し、ヒト多能性幹細胞 (ES 細胞および iPS 細胞) の脂肪細胞分化誘導に関する論文発表を行った(Taura et al., **FEBS Lett**, 2009)。

-東大拠点・中内研と共同し、ヒト血液細胞あるいはヒト神経幹細胞から誘導した iPS 細胞の各種体性細胞 (例えば、血液細胞、神経幹細胞) への分化誘導効率の比較に関する共同研究を開始した。

-名古屋市立大学の個別研究課題「脳室周囲白質軟化症の幹細胞治療の実現化」の実施に必要な移植用細胞の作成のため、本拠点が開発した ES 細胞および iPS 細胞からの神経幹細胞誘導方法の技術を提供した。名古屋市立大学実験動物研究教育センターにおける マーモセット実験のため、飼育施設整備に必要な情報および飼育技術の提供を行った。さらに、マーモセットを用いた脳虚血モデルを本拠点と分担研究機関 (実験動物中央研究所) 及び名古屋市立大学との共同で作成し、解析を行った。

-個別研究課題でヒト間葉系幹細胞の肝細胞への分化誘導に取り組んでいる鳥取大学のグループ (汐田剛史・教授ら) に、我々の開発した高度純化ヒト間葉系幹細胞(本拠点・分担研究者の松崎らとの共同開発)を供与し、共同研究を行っている。

-個別研究課題の東京工業大学のグループ (赤池 敏宏・教授ら) が開発していた E-カドヘリン・シー

ト技術を導入して、マーマセト多能性幹細胞(ES 細胞、iPS 細胞)を naïve ES 細胞に近い状態に誘導・維持する事を検討している。

8. 人材育成

慶應拠点における拠点内外の研究者に対するヒト iPS 細胞培養および樹立トレーニングプログラムは、ほとんどの場合、最低3カ月以上かけて、iPS 細胞の樹立方法、維持培養方法、品質の検討方法および本拠点で確立された神経分化誘導法までを一貫して技術移転を目指す形で行われ、慶大拠点で行われるスタンダードな方法を積極的に提供する応用編のプログラムという位置づけで行われている。また、モチベーションの高い若手研究者は、一定の技術習得により、拠点内で行われている様々な研究プロジェクトに参画し、頭角を現している。

(1)iPS 細胞プロジェクトに関わる大学院生：三浦恭子大学院生（京都大学大学院医学系研究博士課程・山中研）は、本拠点において、マウス iPS 細胞の神経分化、フローサイトメトリーによる解析、免疫不全マウス脳内への移植による腫瘍原性の確認実験などの技術を習得し、Nature Biotechnology 誌へ論文発表し、本年3月、京都大学より医学博士を取得した。また、三浦は、iPS 細胞を用いた脊髄再生プロジェクトにも積極的に参画し、共筆頭著者として論文発表する(Tsuji, Miura et al., PNAS, 2010)に至っている（現在・慶應義塾大学医学部・特別研究助教）。今泉大学院生は、遺伝性パーキンソン病(PARK2)患者から、石井聖二大学院生は統合失調症患者から、黒岩祐子大学院生（慶應義塾大学医学部小児科学）が先天性ミエリン形成不全症患者から、奥野博庸大学院生（慶應義塾大学医学部小児科学）が Prader-Willi 症候群、遺伝子変異を有する自閉症例から、安藤友子大学院生（山梨大学工学部）はレット症候群双子例から iPS 細胞の樹立を行いながら、多能性幹細胞の樹立、品質評価法、維持培養、神経分化誘導技術を習得した。尚、石井誠二は、本年3月、多能性幹細胞の神経分化に関する研究により、慶應義塾大学より医学博士を取得した。

(2)学外の共同研究者：鳥塚通弘研究員（奈良県立医大精神科）が正常対照線維芽細胞から、仁平友子研究員（北里大学医学部）が、遺伝性パーキンソン病患者(PARK9)、および正常ヒト線維芽細胞から iPS 細胞の樹立を行い、維持培養法、品質評価、神経分化誘導法を習得した。さらに、高村直樹大学院生（北海道大学大学院医学系研究科）、関野祐子部長（国立医薬品食品衛生研究所）、中村恒史研究員（武田薬品工業株式会社）、太田真一研究員（大日本住友製薬株式会社）、中西美聡研究員（ライオン株式会社）、日暮憲道（福岡大学医学部小児科）が、共同研究員として、多能性幹細胞の維持培養、凍結保存、融解、神経分化誘導法、誘導した神経系細胞の各種解析法の習得を行っている。

9. 生命倫理に係る対応

本研究拠点においてヒト iPS 細胞を樹立・使用する際には、慶應義塾大学医学部内に設置された医学部倫理委員会において倫理審査を受け、その承認のもとに計画を遂行している。現在承認を受けている研究課題は以下のとおりである。

受付番号：20-16

課題名：神経疾患患者からの iPS 細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究

承認日：平成20年7月18日

本計画は、研究がヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守して行われることを規定している。また文部科学省研究振興局長通知（19 文科振第 852 号、平成20年2月21日）に従っており、現行の ES 指針第45条における禁止行為の規定を準用している。すなわち、1）ヒト iPS 細胞を使用して作成した胚の人又は動物の胎内への移植その他の方法によりヒト iPS 細胞から個体を作成すること、2）ヒト胚へヒト iPS 細胞を導入すること、3）ヒト胎児へヒト iPS 細胞を導入すること、4）ヒト iPS 細胞から生殖細胞を作成すること、の4点を行わないことを明記している。また、すでに疾患原因遺伝子の変異が同定されている患者からは、同意を得た上で、樹立された iPS 細胞が当該変異を有していることを確認しているが、この確認作業によって新たな遺伝学的情報が患者/代諾者にもたらされる可能性は考えられず、確認作業は文部科学・厚生労働・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の対象とならないと判断している。

また、前項7に記したように、生命倫理検討委員会を組織し、各拠点と連携して iPS 細胞研究における倫理面での議論を行っている。本委員会の議論では、各拠点ごとに異なっていた患者への同意文書

(IC) の記載内容についての検討を行い、標準的説明同意文書の作成を作成し、これに準拠した形で各拠点が IC を整備すること、また疾患特異的 iPS 細胞バンク寄託時においては「連結不可能匿名化」で統一すること、などを決定した。このほか、国内で数例しか確認されておらず、匿名化後も個人の特定可能性が高い希少疾患患者に対する疾患特異的 iPS 細胞研究における留意事項の検討もすすめている。

10. 今後の展望

(展望) iPS 細胞を用いた脊髄再生研究については、これまでの検討で、ヒト iPS-NS/PC 移植群では運動機能の回復は認められたものの、用いた iPS 細胞のライン (細胞株) によっては腫瘍形成と思われる異常な細胞増殖が認められた。今後、形成された腫瘍のさらなる解析により、腫瘍形成を未然に防ぐ方法の解明が急務である。一方、201B7 のような腫瘍原性がヒト ES 細胞よりも低いヒト iPS 細胞株由来 NS/PC を用いた霊長類脊髄損傷モデルを前臨床研究により安全性と有効性を確認し、ヒトへの臨床応用への道を開く。また、神経疾患特異的な iPS 細胞の標準化と樹立・提供を推進し、疾患感受性細胞への誘導と解析を進め、製薬企業を含む他機関へこれらの技術の移転を加速する。すでに国内企業 (武田薬品工業、エーザイ、大日本住友製薬、ライオン) への技術移転は進んでいるが、今後は国内のみならず、海外の大手企業 (すでに Roche とはコンタクト中) や研究機関 (すでに Johns Hopkins、UCLA、シドニー大学とは共同研究進行中) との連携を深め、世界に冠たる iPS 細胞拠点として発展し、オールジャパン体制で得られた iPS 細胞・幹細胞研究の叡智に基づいた世界戦略を図りたい。

(研究計画)

平成 22 年度

- ①脊髄損傷に対する幹細胞治療の開発: 研究分担者中村雅也と共同し、201B7 株由来 NS/PC のサル脊髄損傷モデルへの移植と解析とセンダイウイルスを用いて樹立した iPS 細胞の安全性の検討を行う。
- ⑥iPS 細胞に関する標準化: レトロウイルスを用いて樹立したヒト iPS 細胞の標準化システムを確立する。マイクロアレイ解析や、エピゲノムの網羅的解析も含め、iPS 細胞の評価システムの確立を行う。
- ⑦iPS 細胞培養の技術講習会・培養および樹立トレーニングプログラムの実施: 従来通りのヒト iPS 細胞樹立、培養、品質評価方法、神経分化誘導法、および誘導した神経系細胞を用いた各種解析方法 (免疫染色や遺伝子発現解析など) のトレーニングプログラムを実施する。さらに、integration-free iPS 細胞の樹立についても、最適な樹立方法を確立し、トレーニングプログラムに組み込むことを目指す。
- ⑧疾患特異的 iPS 細胞の樹立・提供: 樹立された iPS 細胞の解析を進める一方で、症例数が少ない研究に関してはより多くの症例の iPS 樹立を目指す。品質基準をクリアした iPS 細胞株に関しては速やかに理研 BRC に設置されるバンクに細胞を供与し、国内の疾患 iPS 細胞研究のインフラ整備の一環とする。

平成 23 年度

- ①脊髄損傷に対する幹細胞治療の開発: 研究分担者中村雅也と共同し、センダイウイルスを用いて樹立した iPS 細胞のマウスおよびサル脊髄損傷モデルへの移植を行う。
- ⑥iPS 細胞に関する標準化: センダイウイルスを用いて樹立したヒト iPS 細胞などの integration-free ヒト iPS 細胞の標準化システムを確立する。樹立に用いたウイルス粒子の除去効率、マイクロアレイ解析や、エピゲノムの網羅的解析なども含めた、iPS 細胞の評価システムの確立を行う。
- ⑦iPS 細胞培養の技術講習会・培養および樹立トレーニングプログラムの実施: センダイウイルスなどの integration-free iPS 細胞についても、最適な樹立方法を確立し、トレーニングプログラムに組み込む。
- ⑧疾患特異的 iPS 細胞の樹立・提供: 樹立された iPS 細胞の解析を進める一方で、iPS 細胞バンクへの細胞供与を加速し、製薬企業との共同によりこれらの細胞を用いた創薬研究を進める。

平成 24 年度

- ①脊髄損傷に対する幹細胞治療の開発: 前臨床試験としてやはり同種移植を行うべきであり、研究分担者中村雅也と共同し、サル iPS 細胞樹立と分化誘導法を確立し、サル脊髄損傷に対するサル iPS 細胞由来神経前駆細胞移植を行う。
- ⑥iPS 細胞に関する標準化: 前年度までの結果を拠点間で十分に情報交換、協議の上、拠点間および国内での標準化基準を制定し、それに従った iPS の評価、蓄積システムを確立する。
- ⑦iPS 細胞培養の技術講習会・培養および樹立トレーニングプログラムの実施: 年度時点での最新の標準的な樹立・評価方法をトレーニングプログラムとして技術指導を行う。

⑧疾患特異的iPS細胞の樹立・提供：樹立されたiPS細胞の解析を進める一方で、iPS細胞バンクへの細胞供与を加速し、製薬企業との共同によりこれらの細胞を用いた創薬研究を進める。

1 1. 特記事項

我々の活動につき、①報道、②アウトリーチ活動、③受賞・受章の実績からアピールさせていただく。

①[報道] 2008年4月以降の岡野 栄之のiPS細胞、幹細胞研究に関する多数の報道(計75件)あり、その内訳は、**国内(71件)**：新聞報道(日経新聞、朝日新聞、毎日新聞、読売新聞等)・計49件、業界紙(日経産業新聞、日刊工業新聞、Medical Tribuneなど)・計19件、テレビ報道(NHKニュース)計3件/ **国外(4件)** 新聞報道(メキシコ・スペイン・ペルー・アルゼンチンなど)

(具体的・報道例)

「脊髄損傷に新治療法」 日本経済新聞 2008/7/21

「運動神経細胞の量産法」 朝日新聞 2008/8/29

「神経細胞作り分け 慶大グループが培養法」 日本経済新聞 2008/8/31

「万能細胞 臨床応用へ指針 / ES細胞を用いてマウス歩行回復」 日本経済新聞 2008/10/6

「神経難病 iPS細胞で治療成功」 毎日新聞 2008/11/2

「慶大、パーキンソン病患者からiPS細胞作製」 朝日・日経・読売新聞 2009/1/10

「マウスの脊髄治療成功/慶大チーム」 毎日・日経・朝日・読売・産経・朝日 2009/2/4

「再生医療の研究 慶大と拠点新設 実験動物研究所」 朝日・日本経済新聞 2009/4/24

「由来細胞の違いがiPS細胞の性質に差」 2009/7/10 NHKニュース・日経・読売・朝日・産経

「パーキンソン病治療に道 原因遺伝子持つサル誕生」 毎日新聞 2010/1/28

「Científicos japoneses devuelven la movilidad de las extremidades a ratones con células madre humanas.(日本の科学者たちはヒト幹細胞を用いて、(脊髄損傷)のネズミの運動機能を回復)」 La Vanguardia(スペイン全国紙) 2009/2/5

②[アウトリーチ活動]

1. 第5回慶應義塾先端科学技術シンポジウムを開催2009年2月4日(慶應義塾大学三田キャンパス)

「iPS細胞が切り拓く今後の医学研究」 約900名参加(50名)

山中伸弥(京都大学) 中内啓光(東京大学) 高橋政代(理化学研究所) 中西淳(武田薬品) 大濱真(NPO日本せきずい基金理事長) 他・ 本拠点講演者：岡野・福田・坪田

多くの外部研究者と、一般参加者があり、予定時間を超過するほどの熱い質疑応答がくりひろげられ、夕刊・翌日朝刊各誌にも取り上げられた。再生医療とiPS細胞への関心の高さがうかがわれた。

2. 社会貢献として、拠点リーダーの岡野栄之は、脊髄損傷の患者団体である日本せきずい基金設立10周年記念<Walk Again 2009>国際シンポジウム「中枢神経系の再生医学」のオーガナイザーとシンポジストを務めた(2009年9月19日・秋葉原コンベンションホール)。また、本シンポジウムには、京大拠点の山中 伸弥教授が講演し、さらにヒトES細胞の臨床応用で脚光を浴びるHans Keirstead博士(University of California Irvine, USA)は、このシンポジウムのためだけに来日し、講演を行い、多くの脊髄損傷の患者さんや家族の方と意見交換を行い、共感を呼んだ。

③ [受賞・受章]

2008年2月 井上學術賞・受賞(山中伸弥教授と同時受賞)

2009年11月 秋の紫綬褒章・受章

1 2. 委託研究費一覧(※千円以下四捨五入のため、合計額は必ずしも一致しません。)

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費(千円)	19,498	19,253	962	364,158
(補正予算)	(209,557)	(114,889)	(0)	(324,446)
人件費(千円)	35,650	64,279	80,498	180,427
業務実施費(千円)	125,237	185,699	185,995	537,725
(補正予算)	(21,213)	(19,582)	(0)	(40,794)
間接経費(千円)	54,115	80,769	80,236	324,693
(補正予算)	(69,231)	(40,341)	(0)	(109,572)
合計(千円)	234,500	350,000	347,691	1,407,003
(補正予算)	(300,000)	(174,812)	(0)	(474,811)

(別紙1) 各分担研究者の進捗状況

分 担 研 究 者 名	中村 雅也
業 務 項 目 名	脊髄損傷に対する幹細胞治療の開発
機 関 名	学校法人慶應義塾

1. 課題開始時における達成目標
①脊髄損傷に対する幹細胞治療の開発 免疫不全マウス・サル脊髄損傷に対するヒト（もしくはサル）iPS細胞由来神経前駆細胞移植を行い、移植後の機能改善に関する検討、組織修復や移植細胞の分化等に関する解析を重点的に行う。サル損傷脊髄に対する肝細胞増殖因子の有効性を検証する。マウス脊髄損傷に対する細胞移植方法の検討を行う。
2. 平成22年4月末時点における課題全体の事業計画に対する研究成果
(1) 成果概要 ①脊髄損傷に対する幹細胞治療の開発 (1) 免疫不全マウス脊髄損傷に対するヒト iPS細胞由来神経前駆細胞移植 京都大学山中研において樹立されたヒト iPS細胞(201B7:cMyc+, 253G1:cMyc-)を神経幹/前駆細胞(NS/PC)に分化誘導し、免疫不全マウス損傷脊髄へと移植した。その結果、運動機能の有意な改善を確認し、多能性幹細胞由来のグリア細胞がミエリン形成、あるいは軸索再生や血管形成の誘導などの栄養効果を介して運動機能の回復に結び付くことを明らかにした。しかし、腫瘍形成と思われる異常な細胞増殖が253G1(cMyc-)由来NS/PC移植群で認められた。今後、形成された腫瘍のさらなる解析により、腫瘍形成を未然に防ぐ方法の解明が急務である。 (2) マーモセット脊髄損傷に対するマーモセット（もしくはヒト）iPS細胞由来神経前駆細胞移植 霊長類 iPS細胞の樹立・NS/PCへの分化誘導を試みているが、いまだ成功していない。そこで、ヒト iPS細胞由来NS/PCのマーモセット脊髄損傷モデルへの移植の条件を最適化するために、ヒト iPS細胞由来NS/PCの免疫不全マウスへの移植実験を行った。免疫不全マウスの線条体への移植を行い、長期経過観察を行った。クローンにより腫瘍形成の有無に違いが見られた。これらの株由来のNS/PCも適切にニューロンやグリア細胞に分化していた。次に、腫瘍化しなかった安全な iPS細胞株由来NS/PCを用いてNOD/SCIDマウスの脊髄損傷モデルへ移植したところ、やはり <i>in vivo</i> において適切にニューロンやグリア細胞に分化し、さらに、有意な機能改善を示した。 (3) マーモセット脊髄損傷に対する肝細胞増殖因子の検討 コモンマーモセット損傷脊髄に対するヒト肝細胞増殖因子(HGF)の髄腔内持続投与を行いその有効性を検討した。rhHGF 髄腔内投与によりマーモセット四肢運動機能は有意に改善した。また異痛症や腫瘍形成を認めず、安全性についても確認できた。本研究結果は rhHGF を用いた脊髄損傷治療法が臨床応用へ結びつく可能性を示すものと考えている。 (4) マウス脊髄損傷に対する幹細胞移植方法の比較検討（投与方法と部位） マウス損傷脊髄内への神経幹細胞移植を、直接投与(IL群)、クモ膜下腔内への投与(IT群)、経静脈的投与(IV群)の3通りの方法で行い、bio-imagingを用いて移植細胞の生存を経時的に測定した。IL群で約20%の移植細胞が生存し続けた。IT群では移植直後にクモ膜下腔全体へ細胞が分布し、その後損傷部への集積が認められたが、徐々に減少し1ヵ月後には確認できなくなった。IV群では経過中に損傷部への細胞の生着は認めなかった。3群とも腫瘍形成はなかった。IV群の10例中5例に肺梗塞による突然死を認めた。以上の結果より、神経幹細胞移植方法は細胞の生着の観点からは損傷部への直接注入が最も優れていた。安全性の観点からはクモ膜下投与は優れているが移植細胞はほとん

ど生着せず、静脈投与では肺胞内に移植細胞による塞栓をきたす可能性があり重篤な合併症をきたす可能性が示唆された。

(2) 研究の進捗及び成果

① 脊髄損傷に対する幹細胞治療の開発

(1) 免疫不全マウス脊髄損傷に対するヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞移植

【方法】1) *In vitro*: 京都大学山中研において樹立されたヒト iPS 細胞(201B7:cMyc+, 253G1:cMyc-)を神経幹/前駆細胞(NS/PC)に分化誘導した。なお、ヒト iPS 細胞と比較するために京都大学再生研より供与されたヒト ES 細胞も NS/PC に分化誘導した(ES-NS/PC)。2) *In vivo*: ヒト多能性幹細胞由来神経前駆細胞の脊髄損傷モデルへの移植を行う前段階として、マウス ES 細胞(Kumagai et al. PLoS ONE, 2009)あるいはマウス iPS 細胞(現在論文 revise 中)由来の NS/PC をマウス脊髄損傷モデルへと移植し、その治療効果を確認し、多能性幹細胞由来のグリア細胞がミエリン形成、あるいは軸索再生や血管形成の誘導などの栄養効果を介して運動機能の回復に結び付くことを明らかにした。次に、免疫不全(NOD/SCID)マウスに IH impactor を用いて第 10 胸髄高位に圧挫損傷モデルを作製し、損傷後 9 日目にヒト iPS-NS/PC およびヒト ES-NS/PC を損傷部に移植した。対照群では PBS を損傷部に注入した。下肢運動機能は BBB/BMS スコアで評価した。移植後 7 週に組織学的評価を行った。【結果と考察】ヒト iPS-NS/PC 群とヒト ES-NS/PC 群はいずれも対照群より有意な下肢運動機能の改善がみられた。しかし、移植後 7 週で iPS-NSC 移植群 23 例中 3 例で腫瘍形成と思われる異常な細胞増殖が認められた。これらの細胞はほとんどが GFAP, Nestin, Vimentin 陽性の mitotic な細胞集団であり病理組織学的に奇形腫とは異なっていた。今回の検討で、ヒト iPS-NS/PC 移植群では運動機能の回復は認めたものの、腫瘍形成と思われる異常な細胞増殖が認められた。今後、形成された腫瘍のさらなる解析により、腫瘍形成を未然に防ぐ方法の解明が急務である。

(2) サル脊髄損傷に対するサル(もしくはヒト) iPS 細胞由来神経前駆細胞移植

霊長類 iPS 細胞由来 NS/PC のマーマセット脊髄損傷モデルへの移植の条件を最適化するために、ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞の免疫不全(NOD/SCID)マウスへの移植実験を行った。まず、免疫不全マウスの線条体への移植を行い、約 6 ヶ月間観察したところ、腫瘍化を示す iPS 細胞株と、腫瘍化しない iPS 細胞株が見られた。また、これらの株由来の神経前駆細胞も適切にニューロンやグリア細胞に分化していた。次に、腫瘍化しなかった iPS 細胞株由来 NS/PC を用いて NOD/SCID マウスの脊髄損傷モデルへ移植したところ、やはり *in vivo* において適切にニューロンやグリア細胞に分化し、さらに、有意な機能改善を示した。

臨床応用にむけた前段階として、ヒト iPS 細胞クローンで最も安全と評価された 201B7 を NS/PC へと分化誘導し、コモンマーマセット頸髄圧挫損傷モデルに対して、亜急性期である損傷 9 日目にヒト iPS 由来 NS/PC 移植を 9 匹に行い、対照群(PBS を注入)を同時に 3 匹作製した。損傷後 3~6 ヶ月にわたって下肢運動機能評価を経時的に行い、ES/iPS 細胞由来 NS/PC 移植の有効性を評価する。また、移植細胞の生着や生体内での分化傾向、腫瘍化について、免疫組織染色等を用いて十分な検証を行う。

(3) マーマセット脊髄損傷に対する肝細胞増殖因子の検討

コモンマーマセット第 5 頸椎高位に圧挫損傷を作製し、直後より組み換えヒト肝細胞増殖因子(HGF), rhHGF 400mg を髄腔内に 4 週間持続投与し(対照群 PBS), 術後 12 週間の運動機能評価を行った。損傷後 1・3・12 週に頸髄 MRI を撮像した後に組織学的評価を行った。結果: rhHGF 投与群で有意な運動機能回復が認められた。異常行動は認めなかった。損傷後 12 週目の MRI 像では異常信号(T1 low, T2 high)領域が rhHGF 投与群で著明に縮小しており、組織像を反映していた。皮質脊髄路を示す CaMK2a 陽性線維が損傷尾側においても有意に保たれていた。また、灰白質第 3 層における CGRP 陽性線維の分布に両群間で有意な差を認めなかった。腫瘍形成は認めなかった。以上の結果より、rhHGF の髄腔内投与により霊長類脊髄損傷に対して著明な治療効果が得られ、異痛症や腫瘍形成を認めず、安全性

についても確認できた。本研究結果は rhHGF を用いた脊髄損傷治療法が臨床応用へ結びつく可能性を示すものと考えている。

(4) マウス脊髄損傷に対する幹細胞移植方法の比較検討 (投与方法と部位)

【方法】移植細胞として、マウス胎児線状体由来神経幹細胞に従来型より発光強度の強い新規発光タンパク質 dVenus-Luc2 を遺伝子導入した。成体 C57BL/6 マウスに胸髄圧挫損傷モデルを作製後、損傷脊髄内への直接投与 (IL 群)、クモ膜下腔内への投与 (IT 群)、経静脈的投与 (IV 群) の 3 通りの方法で 5×10^5 個の移植細胞を投与した。bio-imaging を用いて移植細胞の集積を photon count で経時的に測定した。移植後 6 週間で移植細胞の分布を免疫組織化学的に検討した。【結果と考察】 bio-imaging による評価で、IL 群で移植細胞は移植時の約 20% まで減少したがその後は生存し続けた。IT 群では移植直後にクモ膜下腔全体へ細胞が分布した。その後損傷部への集積が認められたが、徐々に損傷部での信号強度は低下し 1 ヶ月後には確認できなくなった。IV 群では経過中に損傷部への信号集積を認めなかった。3 群とも腫瘍形成を疑わせる信号集積はなかった。IV 群の 10 例中 8 例に移植後に胸部での発光を認め、肺梗塞による突然死を 5 例に認めた。免疫組織染色で損傷部へ最も移植細胞が生着していたのは IL 群であった。IT 群では損傷部への移植細胞の生着は僅かで、脊髄軟膜健常部にも移植細胞の生着を認めた。IV 群の脊髄への移植細胞の生着は認めなかったが、肺胞内に移植細胞を認めた。以上の結果より、神経幹細胞の移植方法は細胞の生着の観点からは損傷部への直接注入が最も優れていた。安全性の観点からはクモ膜下投与は優れているが移植細胞はほとんど生着せず、静脈投与では肺胞内に移植細胞による塞栓をきたす可能性があり重篤な合併症をきたす可能性が示唆された。

3. 課題全体の論文発表件数	32 件
----------------	------

4. 課題全体の特許出願件数	6 件 (うち国外 5 件)
----------------	----------------

5. 当初目標に対する達成度

免疫不全マウス損傷脊髄に対するヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞移植に関しては有効性の検証はできたが、安全性においては腫瘍化の問題が解決できていない。サル iPS 細胞の樹立・神経前駆細胞への分化誘導が確立できていないため当初目標より遅れている。代替案として最も安全と考えられるヒト iPS 細胞クローンを用いて神経前駆細胞へと分化誘導しサル損傷脊髄への移植実験を現在行っている。サル損傷脊髄に対する肝細胞増殖因子の有効性・安全性に関してはほぼ目標を達成できた。神経前駆細胞移植方法の検討も当初の目標は達成できた。

6. 今後の展望

今後最も重要な問題は iPS 細胞に関しては移植後の腫瘍形成であり、その原因を解明することが急務である。またより安全な iPS 細胞としてセンダイウィルスを用いて樹立した iPS 細胞の安全性の検討を行う予定である。

今後、前臨床試験としてやはり同種移植を行うべきであり、サル iPS 細胞樹立と分化誘導法を確立し、サル脊髄損傷に対するサル iPS 細胞由来神経前駆細胞移植を行う予定である。

7. 特記事項

マウス iPS 細胞を用いた脊髄再生研究の論文は、H22 年 6 月 3 日に accept された。

8. 委託研究費一覧

	20 年度	21 年度	22 年度	計
設備備品費 (千円)	0	0	0	0
人件費 (千円)	0	0	4,986	4,986
業務実施費 (千円)	0	0	10,399	10,399
間接経費 (千円)	0	0	4,615	4,615
合計 (千円)	0	0	20,000	20,000

(別紙1) 各分担研究者の進捗状況

分 担 研 究 者 名	須田 年生
業 務 項 目 名	②ヒト iPS 由来造血幹細胞を制御する技術基盤の開発
機 関 名	学校法人慶應義塾

1. 課題開始時における達成目標

ヒト造血幹細胞研究およびES細胞分化誘導研究を基盤にして、ヒトiPS細胞から造血を生体内で再構築しうる造血幹細胞の誘導法を確立する。また、ヒト造血幹細胞の試験管内増幅を可能にする人工ニッチの構築を行う。さらに、生体内のニッチを再現するための培養基質もしくはデバイスの開発、細胞外基質タンパクを含めたbiomimeticな骨髄構造を作製する。また、人工ニッチを用いることにより、ヒトiPS細胞から造血幹細胞への分化誘導の促進が可能か検討する。一方で、iPS細胞を制御していく際にはどのようにしてiPS細胞が誘導されたのか、すなわち体細胞リプログラミングのメカニズムを理解することが非常に有用であると考えられる。そこで、多能性獲得の分子基盤の解明を試みる。

2. 平成22年4月末時点における課題全体の事業計画に対する研究成果

(1) 成果概要

(1) iPS細胞から造血幹細胞の分化誘導

造血幹細胞の誘導や維持に重要だと考えられている HoxB4 と Bmi-1 については多能性幹細胞間で発現度合に差異があることが明らかになった。おそらく造血幹細胞へと分化する程度にも差異があると考えられる。

造血幹細胞の特性に基づいた培養条件が整っていないことから幹細胞維持の培養開発に戻って研究を行った。その結果、造血幹細胞は、低酸素性のニッチにあり、解糖系代謝によりエネルギーを得ていること、そして PDK(pyruvate dehydrogenase kinase)を過剰発現することにより、造血幹細胞の未分化性が維持できることを明らかにした。

(2) 体細胞リプログラミングのメカニズムの解析

多能性の獲得に焦点を絞り生殖細胞から高頻度で多能性幹細胞を誘導する培養系を確立した。この培養系を用いて多能性獲得の際には元々の細胞の性質が失われること、その後に多能性の誘導と維持といった少なくとも三つの現象がおこることを明らかにした。そしてこれらの知見を踏まえて体細胞のリプログラミングの際に導入因子の最適比が存在することを明らかにした。

(2) 研究の進捗及び成果

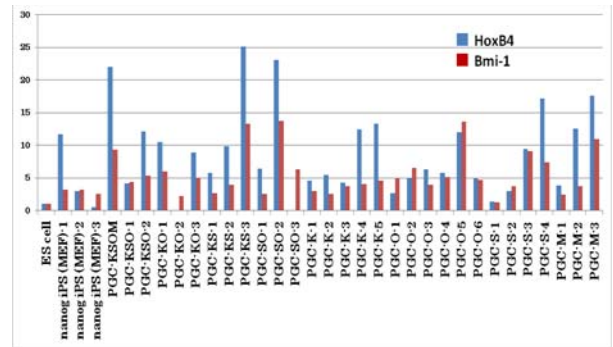
(1) iPS細胞から造血幹細胞の分化誘導

これまでに我々は生体外で造血幹細胞を誘導、制御するためには生体内で造血幹細胞が存在している微小環境(ニッチ)を再現することが重要であると考え、ニッチに着目した研究を行っている。その成果として、造血幹細胞の維持に重要な働きをするサイトカインや接着分子を明らかにしており現在は、それらの分子のシグナルがどのように造血幹細胞に働いているのかの解析に着手している。また、ヒトの造血幹細胞の幹細胞機能を評価するために免疫不全マウスに移植する評価系の確立も行った。これらの技術と iPS 細胞の特性の理解を合わせることで、ヒト iPS 細胞由来の造血幹細胞を制御する基盤技術の開発へとつながると考えられる。

また、iPS細胞の特性として、iPS細胞は元となる由来細胞、作成法により多様性があることが分かってきた。この多様性は、リプログラミングの程度や由来細胞の特性に基づくのではないかと予想され

ている。多様性を造血幹細胞の誘導という観点からとらえてみると、由来細胞や作成方法により造血幹細胞への分化効率にも多様性があるということが考えられる。そこで、我々はもっとも造血幹細胞を誘導しやすい iPS 細胞を作成するため、多様な細胞、方法によって iPS 細胞を作成することを試みている。

iPS細胞様の多能性幹細胞間で造血幹細胞へと分化する程度に差異があるのかを検討するために、これまでに造血幹細胞の誘導や維持に重要だと考えられているHoxB4とBmi-1について遺伝子発現の検討を行った。その結果各細胞間で発現度合に差異があることが明らかになった(図1)。このように造血幹細胞の誘導や維持に重要だと考えられているHoxB4とBmi-1については発現度合に差異があることから、おそらく造血幹細胞へと分化する程度にも差異があるのではないかと推測される。今後これらの細胞に分化の程度に差異があるのか明らかにしていく。



一方で、iPS細胞からの造血幹細胞誘導に関しては、すでに多くの研究室でその試みがなされているにもかかわらずいまだに成功していない。この原因のひとつとして、造血幹細胞の特性に基づいた培養条件が整っていないことが挙げられる。すなわち、既知の条件では造血幹細胞は仮にiPS細胞 から誘導されても分化して失われる。そこで、我々は造血幹細胞の代謝特性解析から幹細胞維持の培養開発に戻って研究を行った。その結果、造血幹細胞は、低酸素性のニッチにあり、解糖系代謝によりエネルギーを得ていること、およびミトコンドリアによる酸化的リン酸化を抑制し、活性酸素種の発生を抑えていることが明らかとなった。さらに、PDK(pyruvate dehydrogenase kinase)を過剰発現することにより、造血幹細胞の未分化性が維持できることを明らかにした。

(2) 体細胞リプログラミングのメカニズムの解析

iPS細胞の精度管理や分化制御技術の開発を目指しリプログラミングのメカニズムを明らかにすることを試みている。そのために多能性の獲得に焦点を絞り、単能性の生殖系列の細胞から多能性幹細胞の誘導過程について検討した。

始原生殖細胞を用いて MAPK, GSK3β の inhibitor のほかに TGFβ 受容体の Inhibitor を作用させ、誘導効率の高い培養系を確立するのに成功した(図2)。この系を用いて多能性獲得の分子基盤の解析を行った。

その結果として以下のような事柄が明らかとなった。多能性の誘導に伴い速やかに元々の細胞の性質が失われること、その後多能性の誘導と維持の少なくとも二つの現象がおこること(図3)。そしてこれらの知見を踏まえて体細胞のリプログラミングの際に導入因子の最適比が存在することを明らかにした(図4)。

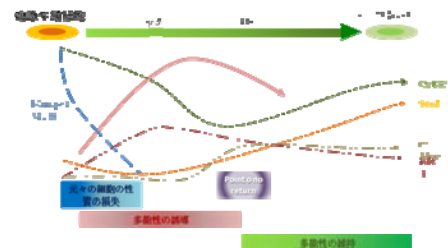
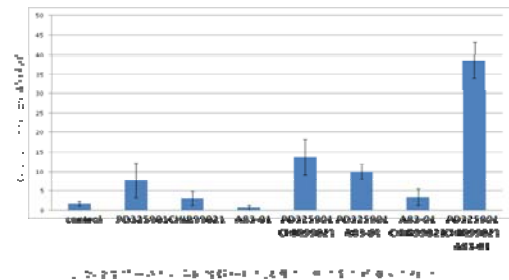
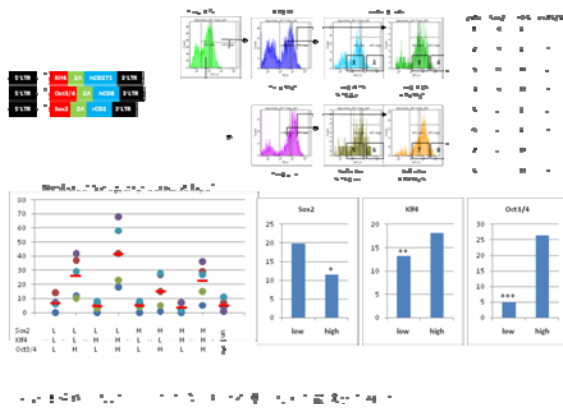


図3 多能性の獲得過程



3. 課題全体の論文発表件数	6 件			
4. 課題全体の特許出願件数	0 件			
5. 当初目標に対する達成度	当初の予測以上に進展している。			
6. 今後の展望	<p>・技術移転を目的とした共同研究等の状況 リプログラミングのメカニズムの解析に関してマウスで得られた知見をヒトで応用するために慶應大学岡野栄之教授の研究室と共同研究を行っている。</p> <p>・他分野の研究者に成果の活用を推進するための方策等 他分野の研究者に成果の活用を推進するために得られた情報はできる限り最新のものをプロジェクト会議の際に open に発表している。</p> <p>【平成 22 年度～平成 24 年度の研究計画】 iPS 細胞を始めとする多能性幹細胞から造血幹細胞を生体外で誘導し維持する培養系の確立を行う。 多能性獲得の分子機構の解析から体細胞リプログラミングのメカニズムを明らかにすることを目指す。</p>			
7. 特記事項	<p>生殖幹細胞の多分化能獲得という観点から iPS の成立機転をめざす本テーマが極めてユニークなアプローチと考えている。米英の研究者も始原生殖細胞に注目し始めており、今後、新規リプログラミング因子の発見など大展開する可能性を秘めている。</p>			
8. 委託研究費一覧(※千円以下四捨五入のため、合計額は必ずしも一致しません。)				
	20 年度	21 年度	22 年度	計
設備備品費 (千円)	0	0	0	0
人件費 (千円)	0	0	0	0
業務実施費 (千円)	20,000	25,769	25,769	71,538
間接経費 (千円)	6,000	7,731	7,731	21,493
合計 (千円)	26,000	33,500	33,500	93,000

(別紙1) 各分担研究者の進捗状況

分 担 研 究 者 名	福田 恵一
業 務 項 目 名	③ヒト iPS 細胞を用いた心筋細胞の再生と臨床応用へ向けた基盤の開発 ⑧疾患特異的 iPS 細胞の樹立・提供 (2)疾患特異的 iPS 細胞由来心筋細胞を用いた創薬・病態解明に資する基盤構築
機 関 名	学校法人慶應義塾

1. 課題開始時における達成目標

③ヒト iPS細胞を用いた心筋細胞の再生と臨床応用へ向けた基盤の開発

ヒト iPS細胞に対するNogginおよび関連因子による心筋分化誘導を確立する。iPS細胞は細胞形態、分化能、遺伝子発現から考えてES細胞とほぼ同様の多分化能を有すると考えられることから、Nogginを利用してiPS細胞を心筋分化誘導する方法を開発する。

⑧疾患特異的iPS細胞の樹立・提供

患者から提供される体細胞から、最適誘導技術により i P S 細胞を樹立・活用し、疾患発症機構の解明、薬剤候補物質の探索、薬理試験系としての開発を実施し、i P S 細胞研究の成果を速やかに人々へ還元する。疾患特異的 iPS 細胞の樹立については、4 拠点で協調しながらも、特定の疾患についてのお互いの制約をかけずに行っていくものとする。たとえば、京大拠点においても ALS など一部重複した疾患に関する疾患モデル細胞の作成が計画されているが、疾患自身の複雑性と遺伝学的背景の多様性を鑑み、あえて重複を排除せず、2 拠点間で協調的に研究を進める。一方、慶應拠点の特長として、神経系の細胞や心筋への分化誘導法に関する技術開発が進んでいることを鑑みて、神経疾患・循環器疾患患者からの iPS 細胞樹立と疾患感受性細胞への分化誘導を主に進める。また、拠点外の研究者とも積極的に共同研究を行い、疾患モデル細胞の作成、解析、提供にための方法論の確立とインフラ整備を行う。

2. 平成22年4月末時点における課題全体の事業計画に対する研究成果

(1) 成果概要

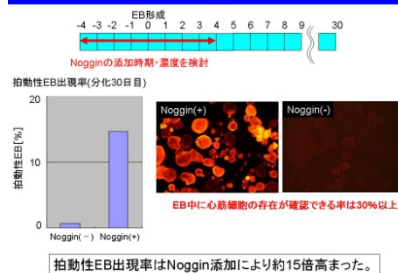
我々はヒト iPS 細胞から再生心筋細胞を誘導する方法として Noggin 法が有用であることを明らかにした。また、再生早期のヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を細胞分裂させる因子として G-CSF が有用であることを世界で初めて明らかにした。また、1 型および 3 型遺伝性 Q T 延長症候群の家系から疾患特異的 iPS 細胞の樹立に成功した。さらに、これらの iPS 細胞から心筋細胞の誘導に成功した。健常例 iPS 細胞由来の心筋細胞の活動電位を記録することに世界で初めて成功した。

(2) 研究の進捗及び成果

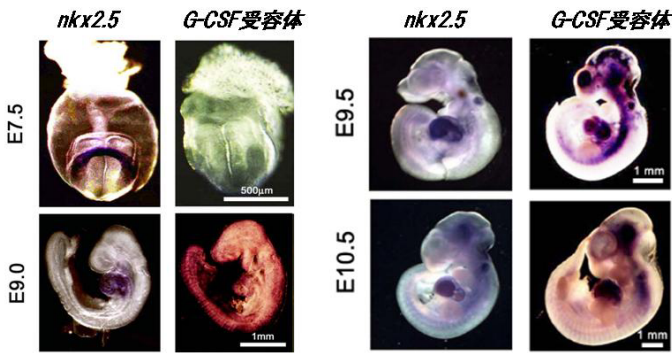
③ヒトiPS細胞を用いた心筋細胞の再生と臨床応用へ向けた基盤の開発

ヒト iPS 細胞を効率的に心筋分化誘導する方法を開発した。2005 年我々は BMP 2, BMP 4 の内因性阻害因子の Noggin を用いることにより、マウスの ES 細胞を効率的に心筋細胞に分化誘導できることを報告した。本年度の研究ではこの Noggin がヒト iPS 細胞に対し、心筋分化誘導を促進することを明らかにした。マウス ES 細胞における条件とヒト iPS 細胞における条件を比較検討することにより、最終的に拍動性胚様体の出現率はコントロールに比較

ヒトiPS細胞におけるNoggin法の至適条件の検討



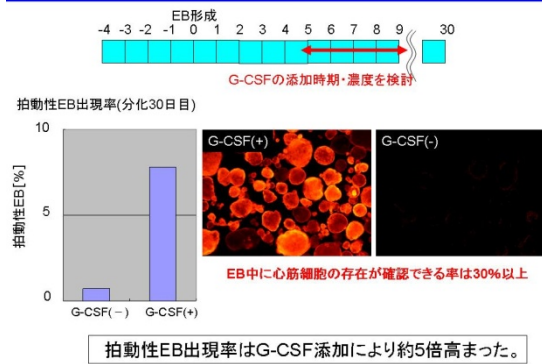
Whole mount in situ hybridization



のではないかと考え解析したところ、心筋細胞自身が G-CSF を分泌していることが明らかとなった (右図)。これより、発生段階にある心筋細胞はオートクリンに作用する因子であることが明らかとなった。さらに、この G-CSF が心筋細胞に如何なる作用を持つかを解析した。

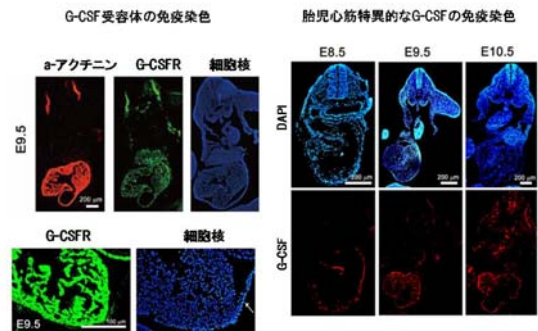
妊娠しているマウスの子宮内に直接 G-CSF を投与すると妊娠マウスの心臓における心筋細胞は増殖を起こした。すなわち、G-CSF は発生過程にある心筋細胞を細胞分裂させる作用が有ることが明らかとなった。これを再生医学に応用し、再生心筋細胞の細胞分裂を誘導するか否かを解析した。

ヒトiPS細胞におけるG-CSF法の至適条件の検討



して 15 倍の効率が得られるようになった。次に我々は E S 細胞、iPS 細胞から誘導した再生心筋細胞を細胞分裂を誘導することが出来る液性因子の単離を試みた。その結果、下図の a に示したようにサイトカイン G-CSF の受容体が胎児期の心臓に強発現していることを見出した。マウスの心臓には G-CSF 受容体が発現することより、G-CSF 出自体も発現する

胎児心臓におけるG-CSF/G-CSFRの発現



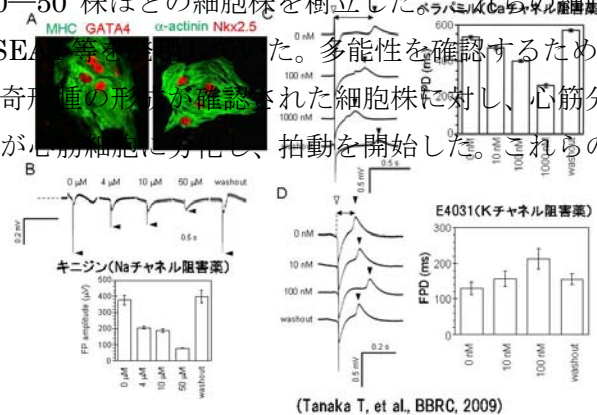
その結果、マウス E S 細胞、サル E S 細胞、ヒト E S 細胞由来の再生心筋細胞のみならず、左図のようにヒト iPS 細胞由来の再生心筋細胞も細胞分裂を誘導できることが明らかとなった。

これらの成果は 2010 年 3 月に Cell Stem Cell 誌に報告すると共に、読売新聞、日経新聞等の多くの一般誌に報道された。

⑧疾患特異的iPS細胞の樹立・提供

我々は遺伝性 Q T 延長症候群の 1 型の症例 2 例、3 型の症例 1 例より皮膚生検を行い、線維芽細胞を樹立した。これらの線維芽細胞に対し、山中 4 因子を遺伝子導入し、iPS 細胞を樹立した。各細胞に対し、30—50 株ほどの細胞株を樹立した。これらの細胞株はすべて Oct3/4、Klf4、Sox2、Nanog、SSEA3、SSEA4 を発現し、多能性を確認するため、免疫不全マウスに移植し、奇形腫の形成を観察した。奇形腫の形成が確認された細胞株に対し、心筋分化誘導を試みた。心筋分化誘導の結果、一部の細胞株が心筋細胞に分化し、拍動を開始した。これらの

ヒトiPS心筋細胞の電気生理学的解析

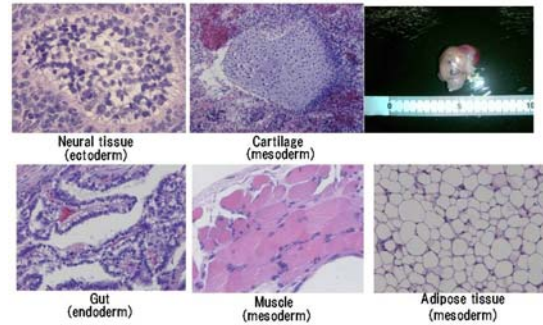


の症例は心電図上のQTが延長しているだけでなく、失神発作、突然死の家族歴等を有する家系であった。

(2)疾患特異的iPS細胞由来心筋細胞を用いた創薬・病態解明に資する基盤構築

疾患特異的 iPS 細胞由来心筋細胞の活動電位を計測する前の段階には、健常例での活動電位を記録することが必須となる。そこで我々はMEA法により健常例の再生心筋細胞の活動電位を field potential という方法で記録した。左図に示すように再生心筋細胞は Na 電流、K 電流、Ca 電流が明確に記録され、各イオンチャネル特異的遮断薬によりそれぞれの電流の波形が変化することが観察された。これよりヒト再生心筋細胞において活動電位の記録が可能となった。

奇形腫形成による多分化能の確認



3. 課題全体の論文発表件数	24件
----------------	-----

4. 課題全体の特許出願件数	4件（うち国外2件）
----------------	------------

5. 当初目標に対する達成度	当初目標はヒト iPS 細胞から心筋細胞の分化誘導にNogginが有効であることを確認する事であったが、さらにG-CSFが細胞分裂の誘導に有用であることを示すことが出来、当初目標の200%以上を達成することが出来た。疾患 iPS 細胞の樹立に関しても1型のみならず3型も樹立でき、当初目標の200%の達成率ということが出来る。
----------------	---

6. 今後の展望	我々はアスピオファーマ株式会社と共同研究により再生心筋細胞の臨床応用を目指しており、技術移転を円滑に行い、産業化を目指している観点から、極めて技術移転が進んでいると言うことが出来る。また、疾患 iPS 細胞の樹立に関しては名古屋大学、佐賀大学、東京医科歯科大学から大学院生を受け入れ、研究を進めており、我々の研究成果を十分に全国の研究期間に伝搬していると言える。 平成22年度～平成24年度には我々は1型から3型の遺伝性QT延長症候群のみならず、Brugada症候群、Andersen1症候群、カテコラミン誘発型心室頻拍等の症例の iPS 細胞を樹立し、これらの病態解明、治療法解明に役立つ再生心筋細胞を樹立し、全国の教育研究機関に提供すことを目標としている。
----------	---

7. 特記事項	ヒト iPS 細胞由来の再生心筋細胞を選択的に誘導し、さらに心筋細胞の細胞増殖を誘導する方法が確立できたことは読売新聞、日経新聞、産経新聞等の全国紙すべてに報道され、再生心筋細胞を臨床応用する上で重要なステップを確立できたものと思われる。
---------	---

8. 委託研究費一覧				
	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費（千円）	0	0	0	0
人件費（千円）	0	0	3,816	3,816
業務実施費（千円）	20,000	25,769	30,031	75,800
間接経費（千円）	6,000	7,731	10,154	23,885
合計（千円）	26,000	33,500	44,001	10,3501

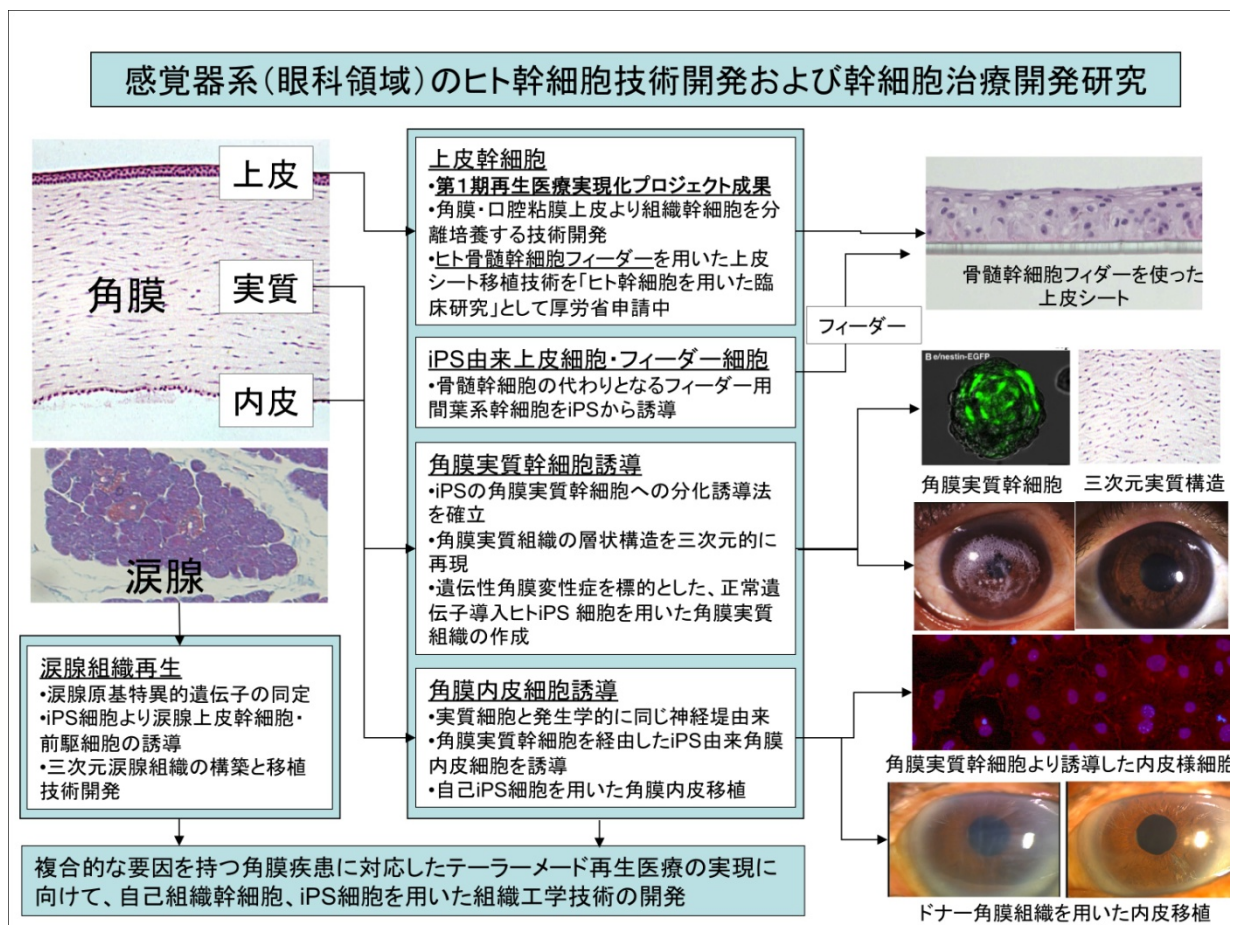
(別紙1) 各分担研究者の進捗状況

分担研究者名	榛村 重人
業務項目名	④感覚器系のヒト幹細胞技術開発および幹細胞治療の開発
機関名	学校法人慶應義塾

1. 課題開始時における達成目標

④感覚器系のヒト幹細胞技術開発および幹細胞治療の開発

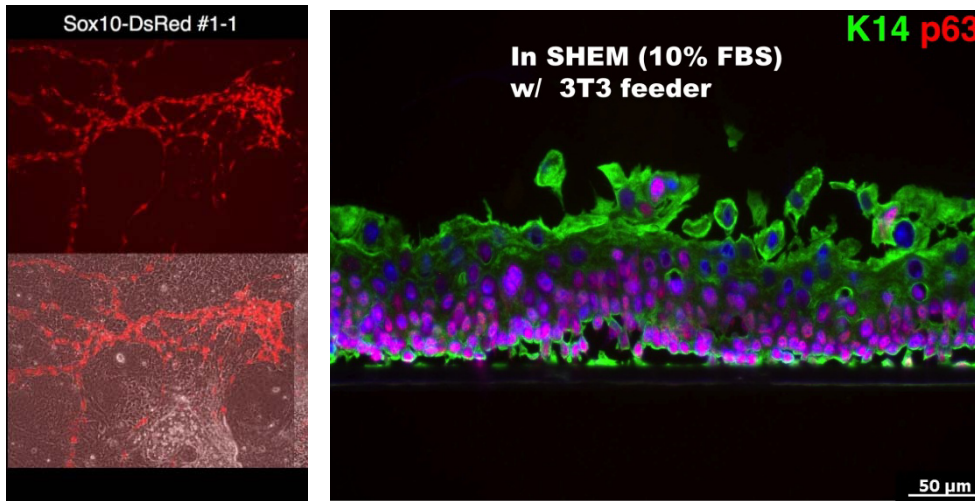
すでに分離に成功したマウス、ヒト組織幹細胞をコントロールとして、さらにマウスES細胞研究で検討を重ねた分化誘導法を基盤にマウス及びヒトiPS細胞を角膜上皮幹細胞、角膜実質幹細胞、角膜内皮細胞、涙腺上皮細胞へ分化誘導する研究を実施する。また、マウス、ヒト組織幹細胞を用いて、角膜上皮幹細胞、角膜実質幹細胞のニッチ形成要因を検証する。



2. 平成22年4月末時点における課題全体の事業計画に対する研究成果

(1) 成果概要

iPS細胞から角膜上皮幹細胞と類似した細胞を分化誘導することに成功し、単一クローンからK14, p63陽性の重層化上皮シートを作成することに成功した(下図右)。一方で、角膜実質、内皮細胞へ誘導するSox-10陽性の神経堤細胞の誘導にも成功し、今後は純化と分化誘導条件を検討する(下図左)。



(2) 研究の進捗及び成果

④感覚器系のヒト幹細胞技術開発および幹細胞治療の開発

1. iPS 細胞からの角膜上皮細胞誘導に関しては、マウス由来の PA6 細胞をフィーダー細胞として用いる SDIA 法に BMP 刺激を加えた分化誘導法によって、マウス iPS 細胞(38C2 株)からサイトケラチン 14 (K14) および p63 陽性の重層上皮細胞を誘導した。
2. この分化誘導法によって角膜上皮細胞の分化マーカーであるサイトケラチン 12 (K12) 陽性細胞も誘導出来ることを確認した。
3. クローニングした細胞を用いて重層上皮シートを作成することに成功した。
4. 角膜上皮幹細胞はニッチにおいて N-Cadherin を発現することを報告した。iPS 細胞から角膜上皮幹細胞を誘導する際のマーカーになることを示した。
5. 角膜実質細胞および内皮細胞誘導に関しては、これらの細胞が神経堤由来であるためまず神経堤細胞の誘導を行った。Sox10-DsRed レポーターを作成し、これを iPS 細胞(38C2 株)に導入して分化誘導を行った。分化誘導培養開始後、1 週間で DsRed 陽性細胞が出現し始めることを確認した。
6. 涙腺上皮細胞の選択的培養にコレラトキシンが有効なことを確認した。
7. マウス涙腺上皮細胞の中で、CD46f+Ter119-の分画が CD46f-Ter119-と比較し、増殖能が高い細胞群を含んでいることを確認した。
8. 涙腺細胞移植のモデルとして、マウス栄養血管障害モデルを評価し、CD46f+Ter119-の分画が正常と比較し増加していることを確認した。

3. 課題全体の論文発表件数	8 件
4. 課題全体の特許出願件数	2 件 (うち国外 2 件)
5. 当初目標に対する達成度	
1. 角膜上皮細胞分化誘導：マウス iPS から角膜上皮前駆細胞と類似した細胞の誘導・培養に成功。ヒト iPS から上皮細胞の誘導はできたが、純化が未だ不完全。	
2. 角膜実質・内皮細胞分化誘導：マウス iPS 細胞から神経堤細胞の分化誘導に成功。また、角膜実質幹細胞から内皮様細胞の分化に成功し、現在 characterization を実施中	
3. 幹細胞ニッチ解析：角膜上皮幹細胞ニッチに NCadherin が重要であることを報告。iPS 由来上皮幹細胞も一部間葉系細胞の性質を維持する必要性が示唆された。	

4. 涙腺上皮の誘導：iPS から上皮に誘導をかけた1の培養細胞を Sphere 培養した。まだ涙腺特異的なマーカーの発現には至らず、ニッチ側からのアプローチが必要である。

6. 今後の展望

平成22年度～平成24年度の研究計画

マウス角膜上皮細胞株を用いて、マウス角膜上への培養上皮シート移植術を確立する。BMP 刺激により iPS 細胞から誘導、増殖させた上皮細胞を用い、培養上皮シートを作製する。培養上皮シートの作製には、三次元培養用のカルチャーインサートのシステムを用いる。作製した上皮シートの薄切切片を作製し、角膜上皮マーカーやタイトジャンクションマーカーの発現を調べるとともに、バリア機能の評価をおこなう。また、K12-DsRed レポーターを導入した iPS 細胞から誘導した上皮細胞で作製した培養上皮シートをマウス角膜上に移植し、各種分化マーカーの発現変化を調べるとともに、K12-DsRed の発現を指標に、in vivo での角膜上皮 (K12 陽性) への分化を検証する。さらに、K12-DsRed レポーターを導入した細胞株を用いて、in vitro でも角膜上皮細胞への分化誘導条件を検討する。一方で、Sox10-DsRed レポーターを導入した iPS 細胞株を用い、Sox10-DsRed の発現と表面抗原マーカーの発現とを組み合わせ、FACS により純化を行う。次いで、純化した細胞の sphere 形成能を検証するとともに、自己複製能と多分化能をの評価を行い、神経堤幹細胞としての性質を確認する。現在作製中の疾患モデルマウスへの移植を行い、角膜実質細胞への分化能を検証する。角膜内皮細胞への分化に関しては、まず、microarray 解析に基づいてマーカーの検索を行うとともに、COPs (Corneal stroma-derived precursor cells) を用いて分化誘導条件の検討を行う。涙腺再生への応用に関しては、同定したマーカーの発現を指標に、iPS 細胞から分化誘導した上皮細胞をさらに涙腺上皮細胞へと分化誘導する条件を探索する。また、引き続き in vitro での3次元構築系の開発および移植技術の開発を行う。

拠点内グループとは随時共同研究を進めており、技術・マテリアルなどの共有化を図っている。また、本年度より慶應義塾大学、理化学研究所および東北大学を含む iPS 感覚器分科会を立ち上げ、情報交換を進める。今年度の目標として、角膜内皮細胞のバリデーション作業を共同で進める。

7. 特記事項

第I期の成果であった角膜上皮幹細胞とヒト間葉系幹細胞由来フィーダー細胞を用いた培養上皮シートの臨床研究をヒト幹細胞指針に則って実施した。

8. 委託研究費一覧(※千円以下四捨五入のため、合計額は必ずしも一致しません。)

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費 (千円)	0	4,494	0	4,494
人件費 (千円)	0	0	3,188	3,188
業務実施費 (千円)	11,538	10,891	12,196	34,625
間接経費 (千円)	3462	4,615	4,615	12,692
合計 (千円)	15,000	20,000	20,000	55,000

(別紙1) 各分担研究者の進捗状況

分 担 研 究 者 名	松崎 有未
業 務 項 目 名	⑤フローサイトメトリーを用いたヒト体性幹細胞の分離と iPS 細胞樹立と基礎的研究 ⑥iPS 細胞に関する標準化 ⑦iPS 細胞培養の技術講習会・培養および樹立トレーニングプログラムの実施
機 関 名	学校法人慶應義塾

1. 課題開始時における達成目標
<p>⑤ フローサイトメトリーを用いたヒト体性幹細胞の分離と iPS 細胞樹立と基礎的研究</p> <p>(1) 高純度体性幹細胞の分離 体性幹細胞の中でも低侵襲かつ簡便な操作で採取することのできる組織(口腔粘膜・歯根膜・皮膚等)よりフローサイトメトリー (FCM) によって高純度体性幹細胞を直接分離する方法を確立する。</p> <p>(2) 体性幹細胞を用いた iPS 細胞の樹立 マウスおよびヒト線維芽細胞からの iPS 細胞の誘導率は約 0.05%という低頻度であるが、高純度間葉系幹細胞を用いた予備的な検討では、高純度なマウス体性幹細胞をソースとした場合、樹立効率の著しい増大と樹立された iPS 細胞の品質向上をもたらしている。そこで(1)で確立した新たな組織幹細胞を材料とし iPS 細胞の樹立効率を比較することにより、iPS 細胞樹立のための細胞ソースとしてどの組織より採取したどのような細胞を用いることが最適か等の検討を行う。</p> <p>(3) 樹立した幹細胞の品質評価 (1)および(2)の手法を用いて確立した iPS 細胞について、遺伝子発現プロファイリング、神経をはじめとする組織細胞への分化アッセイ等を行い、その品質を評価する。</p> <p>⑥ iPS 細胞に関する標準化 iPS 細胞の将来的な臨床応用を目指し、1) 樹立方法の標準化として、様々な組織由来細胞および体性幹細胞を用い、樹立効率および細胞品質向上を目的とした iPS 細胞樹立方法の最適化に関する試験的研究を行う。2) 品質評価の標準化を目指し、iPS 細胞の品質を評価するための方法および基準の検討を行う。得られた成果については他拠点と密接に連繋し、国内基準の制定を目指す。</p> <p>⑦ iPS 細胞培養の技術講習会・培養および樹立トレーニングプログラムの実施 細胞誘導の技術講習、培養トレーニングプログラムの実施による研究者の裾野の拡大に取り組む。</p>
2. 平成22年4月末時点における課題全体の事業計画に対する研究成果
(1) 成果概要
<p>⑤フローサイトメトリーを用いたヒト体性幹細胞の分離と iPS 細胞樹立と基礎的研究 マウス骨髄 MSC に特異的な抗原の組み合わせを見つけ出すことに成功した(PDGFRα⁺Sca-1⁺CD45⁻TER119⁻: PaS 細胞)(Morikawa et al, <i>JEM</i>, 2009)。PaS 細胞は脂肪・骨・軟骨への分化能を持ち、接着培養法に比べて MSC が約 120,000 倍に濃縮されている。また、共陰性分画には骨のみへの分化能しか持たない骨前駆細胞が多く含まれていることが明らかになった。これらの結果をふまえ、Nanog-GFP マウス骨髄より間葉系幹細胞集団(MSC)と骨前駆細胞集団(OB)をそれぞれフローサイトメトリーにより分離し、山中法にて遺伝子導入を行った。遺伝子導入後、1\times10⁴個の細胞をフィーダー細胞上で培養したところ、各細胞集団から約 200 個の iPS コロニーを得た。得られた iPS コロニー中 GFP 陽性コロニーは MSC:約 50 個、OB:約 15 個、TTF:約 10 個であった。各細胞群あたり 5 クローンを選択し RT-PCR にて解析を行ったところ、MSC 由来の iPS クローンは全クローンにて、ES 細胞特異的遺伝子の発現と導入遺伝子のサイレンシングが確認できたが、OB および TTF 由来の iPS 細胞クローンは ES 細胞特異的遺伝子の発現にばらつきがあり、導入遺伝子のサイレンシングも不完全であった。また、MSC 由来 iPS の全クローンが 3 胚葉性のテラトーマを形成したが、OB および TTF 由来の iPS クローンはテラトーマ形成が認められないものや2胚葉への分化能しか持たないクローンが存在していた。以上の結果から、高純度体性幹細胞を材料として iPS 細胞を誘導すると、高品質な iPS クローンが高頻度に形成されることが示された。</p> <p>⑥iPS 細胞に関する標準化</p> <p>(1)樹立方法の標準化に関する試み 項目5の試みを通じ、高純度なマウス体性幹細胞をソースとした場合、iPS 細胞樹立効率の著しい向上と樹立された iPS 細胞の均一な高品質化をもたらすことが明らかになった。そこでヒト iPS 細胞樹立に最も適した材料を明らかにするためにヒト組織(本年度は骨髄・胎児脳)より分離した体性幹細胞を材料としてヒト iPS 細胞の誘導を行った。その結果、骨髄由来間葉系幹細胞および胎児脳由来神経幹細胞に対してヒト iPS 細胞を樹立した場合、ヒト皮膚繊維芽細胞に比較し、より高頻度(約5倍の誘導効率)でヒト iPS 細胞を樹立可能であることが明らかになった。</p>

(2) 品質評価の標準化に関する試み

下記 1)–5)の解析を通じて、iPS 細胞の標準化に関する考え方とその根拠を設定する試みを行った。

- 1) 樹立した iPS 細胞株の多能性・分化能の検討のため、各クローン間での遺伝子発現、細胞内部のエピジェネティックな変化等に関し、DNA マイクロアレイおよびバイサルファイト法による評価を行った。
- 2) 次世代シーケンサーを用いてヒト iPS 細胞の全ゲノム解析を行ない、網膜色素変性疾患の原因となったロドプシン遺伝子座の突然変異を確認するとともに、樹立の際新たな突然変異が入っていないことを確認した。また、断片化したゲノムについて両端から配列を決定する方法(ペアードエンド法)を用いたが、片端がヒトゲノム、もう片端が iPS 細胞の樹立に用いたレトロウイルスの配列になっているサンプルをピックアップすることにより、レトロウイルス挿入部位の特定を行ない、遺伝子のコーディング領域にウイルスの挿入が無いことを確認した。
- 3) 初期胚への細胞移入によるキメラマウスの作製を行うことで、各クローンの品質比較を行った。
- 4) 細胞表面抗原解析を行い、品質評価の基準となりうるマーカーの発現比較を行った。
- 5) 免疫不全マウスの皮下あるいは精巣へと移植し、テラトーマ形成を観察することにより、多能性を確認した。

その結果、ES 細胞特異的遺伝子の発現量、エピジェネティックな変化の度合い、キメラマウスの産生、テラトーマ形成による三胚葉系への分化能等については各クローン間でばらつきがあり、明確なリンクが認められなかった。従って、品質評価に当たっては最終的に生殖系への動員が可能であるかが最終判断となることが示唆された。この知見よりヒト iPS 細胞の品質評価のための明確な指標を打ち立てるためには新たな基準を模索する必要があると考えられる。

⑦ iPS 細胞培養の技術講習会・培養および樹立トレーニングプログラムの実施

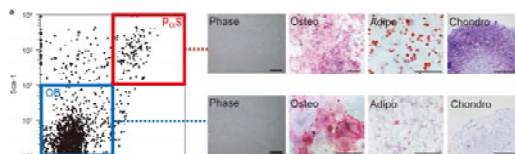
岡野と協同して拠点内外の研究者に対するトレーニング業務内容を遂行し、iPS 細胞研究者の裾野の拡大を図った。また、理化学研究所・京都大学が開催する培養トレーニングに対する協力の一環として、iPS 細胞の樹立方法、品質の検討方法などについての慶大拠点で行われるスタンダードな方法を積極的に提供した。

(2) 研究の進捗及び成果 (抜粋)

⑤ フローサイトメトリーを用いたヒト体性幹細胞の分離と iPS 細胞樹立と基礎的研究

(1) 高純度体性幹細胞の分離

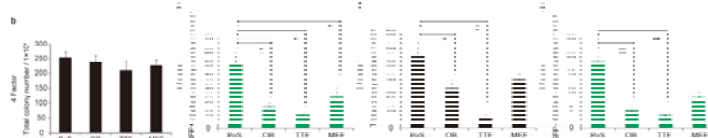
マウス骨髄からフローサイトメーターにて直接分離した PDGFRαSca-1 共陽性細胞は、脂肪・骨・軟骨へ分化するが、共陰性細胞は骨分化能のみを示す (Figure 1)。



(2) 体性幹細胞を用いた iPS 細胞の樹立

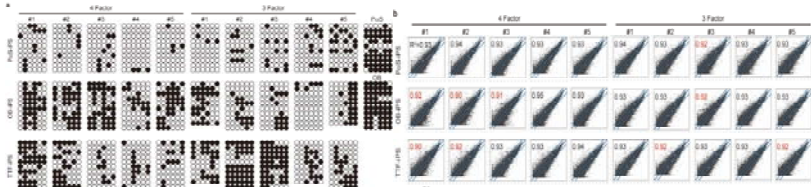
Nanog-GFP-IRES-Puro^r マウス骨髄中に存在する MSCs(PαS)および、骨への分化能しか保持しない Osteoblast (OB) を同時に分離し山中 4 因子もしくは 3 因子をレトロウイルスにて導入。同時に DsRed を導入し、transgenes の Silencing の指標とした。また形成コロニー数により誘導効率の比較を行った。

Nanog-GFP-IRES-Puro^r マウスを使用し 4 因子及び癌遺伝子である c-Myc を除いた 3 因子を導入した結果、MSC(PαS)-iPS は OB-iPS・TTF-iPS に比較し、約 5 倍の GFP⁺/DsRed コロニーを得た。(Figure 2)

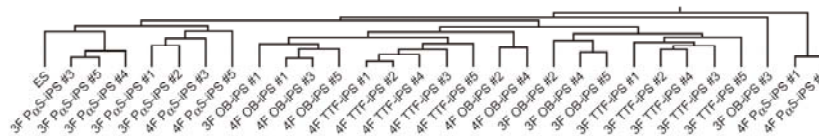


(3) 樹立した幹細胞の品質評価

RT-PCR の結果 PαS を用いた場合、ランダムにピックアップし解析したそれぞれ 5 クローンの ES 特異的遺伝子の発現は均一であり、DNA Microarray 解析の結果、解析した全ての PαS-iPS クローンは ES 細胞に非常に近似した遺伝子発現を示した。また、バイサルファイト法による Nanog-プロモーターの解析でも、PαS 由来 iPS はほぼ均一に脱メチル化が見られた。



面白いことに PαS は c-Myc を除いた 3 因子の方が 4 因子導入よりも ES 細胞に近い遺伝子発現を示し、4 因子導入及び 3 因子導入の OB・TTF よりも ES 細胞に近似していることが明らかになった (Figure 3)



4 因子及び 3 因子導入 PαS 由来 iPS の分化能を解析した結果、Teratoma 形成においては 4 因子及び 3 因子の PαS 由来 iPS は 全クローンが 3 胚葉系への分化能を示した (Figure 4a)。また、3 因子導入 iPS クローンにおいて高い効率で Gem-line transition が確認された (Figure 4b)。

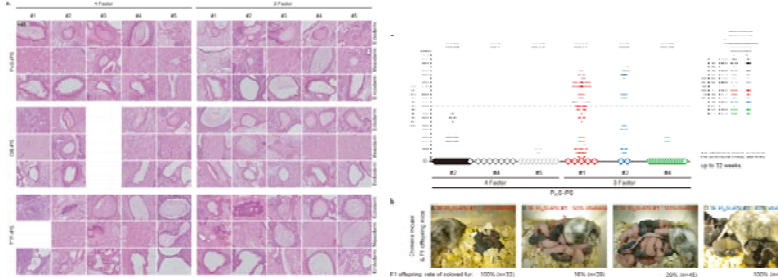


Figure 4a

Figure 4b

以上の結果から、高純度体性幹細胞からの iPS 細胞誘導により、ほぼ均一に高品質 iPS 細胞が得られること、マウス高純度 MSC 由来 iPS 細胞は c-Myc を除外した 3 因子導入により生殖系列に寄与できる高品質 iPS 細胞が高頻度で得られることが示された。

3. 課題全体の論文発表件数	18 件			
4. 課題全体の特許出願件数	2 件 (うち国外 1 件)			
5. 当初目標に対する達成度	マウス iPS 研究についてはほぼ目的としていた成果を達成し、現在論文投稿準備中である。ヒト iPS についてはマウスと比較すれば若干遅れているが、基礎データはほぼ出そろっており、残りの年度で充分達成可能と考えている。			
6. 今後の展望	平成 22 年度～平成 24 年度については、マウス体性幹細胞からの iPS 細胞樹立で得られた知見がヒトでも応用可能か否かを中心に検討を進める。特に、ヒト胎児由来神経幹細胞から樹立した iPS 細胞はヒト ES 細胞に極めて類似した特性を示す基礎データが出つつあり、それと平行してヒト骨髄間葉系幹細胞より樹立した iPS 細胞について、その品質評価を詳細に行うと共に、iPS 細胞の品質に直結するアッセイ法を明らかにしたい。また、ヒト骨髄中の間葉系幹細胞を高純度で分離する方法についてはすでに確立しており、鳥取大学汐田らのグループとの共同研究がすでに開始している。純度の高い間葉系幹細胞を用いた高品質 iPS 細胞の樹立のみならず、肝細胞への誘導についても検討する予定である。			
7. 特記事項	特になし			
8. 委託研究費一覧				
	20 年度	21 年度	22 年度	計
設備備品費 (千円)	737	0	0	737
人件費 (千円)	8,444	8,254	8,256	24,954
業務実施費 (千円)	20,818	22,514	22,512	65,844
間接経費 (千円)	9,000	9,230	9,230	27,460
合計 (千円)	38,999	40,008	39,998	118,995

(別紙1) 各分担研究者の進捗状況

分 担 研 究 者 名	羽鳥 賢一
業 務 項 目 名	⑨ 知的財産戦略および管理・活用体制強化
機 関 名	学校法人慶應義塾

1. 課題開始時における達成目標（本業務項目は H21 年度が初年度）

⑨ 知的財産戦略および管理・活用体制強化

国際競争力のある知的財産戦略の強化及びその知的財産の発掘・管理・活用体制の強化等のため、以下の (a) ~ (c) に取り組む。

(a) 知的財産戦略の強化と知的財産の視点による研究者への情報提供

米国等の国際的に競争関係にある研究者の研究成果に係る再生医療関連の特許文献等を、特に慶應義塾の研究テーマに関するものを中心に収集し、その開示技術内容や傾向、慶應義塾の研究成果との関係等を調査・分析することにより、国際競争力のある知的財産戦略の強化を図る。また、その開示技術内容や分析結果を、知的財産の視点で研究者にわかり易く発信することにより、研究遂行上有益な情報提供となるようにする。この際、iPS 細胞等研究ネットワークの枠組を有効に活用し、他の拠点に公開可能な調査結果については、積極的に情報発信することで、本ネットワークに属する各機関との情報の共有化等による連携を図る。

(b) 国際競争力のある知的財産権の確保に繋げた活動の強化

研究者ミーティング等の研究進捗報告会議に、Ph.D を有する知財担当者や弁理士有資格者等の知財専門家が参加し、知的財産の視点で研究遂行上、有益な情報発信を行う一方、質が高く、有益な特許出願に繋がる研究成果を早期に発見・発掘することにより、国際競争力のある知財権確保を見据えた研究開発体制を強化する。

(c) 知的財産の管理・活用体制の強化

米国や欧州等における再生医療関連の先進的な知的財産の管理・活用の実態調査や、必要な情報の収集により、再生医療実現化を目指した、細胞株など研究マテリアルの提供・受理に関する MTA 契約、ライセンス契約、共同研究契約など、研究開発業務遂行上必要な法務の遂行体制の強化及び国際競争を見据えた知的財産の管理・活用体制の強化を図る。その知的財産の管理・活用においては、iPS 細胞等研究ネットワークの枠組を有効に活用し、他の研究拠点と十分な連携を取って進める。

2. 平成22年4月末時点における課題全体の事業計画に対する研究成果

(1) 成果概要（本業務項目は H21 年度が初年度）

本拠点の研究に係る米国等の特許情報を調査分析し、研究者に提供した。学内で知財説明会を開催し、特に若手研究者の知財意識の高揚を図った。他プログラムと連携し、海外専門家招聘により学内で開催した国際シンポジウム「先端医療分野における知財戦略と活用」では、iPS 細胞等研究ネットワーク参加機関に広く参加を募り、各機関との情報の共有化を図った。研究者ミーティングに定常的に参加することで、国内3件、海外7件の特許出願を戦略的に進めることができた。共同研究契約や MTA 締結作業(昨年度 29 件)では、手続きの初めから知財担当者が関与し、リスク最小化に繋がる調整交渉を遅滞無く行なうことで、研究開始を遅らせず、研究者負担の最小化を目指した支援を遂行できた。

(2) 研究の進捗及び成果（本業務項目は H21 年度が初年度）

(a) 知的財産戦略の強化と知的財産の視点による研究者への情報提供

神経・脊髄、心筋・血管、感覚器等、慶應義塾の拠点の研究分野に係る国内外特許情報を調査分析し、知財戦略の策定に役立てるとともに、研究遂行上有益と思われる情報を研究者にわかりやすい形で提供した。資料分析にあたっては、適宜 iPS 細胞研究ネットワークのウェブサイト掲載情報を有効に活用した。

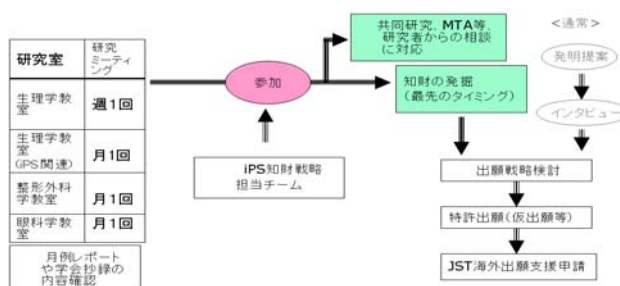
また、「先端医療分野の特許保護のあり方」等をテーマに内閣府等から講師を招聘し、慶應義塾大学医学部内で、研究者に対する特許説明会を開催し、研究者の知財意識高揚を図った。

更に、文科省産学官連携戦略展開事業（国際的な産学官連携活動の推進）と連携し、当該事業の一環で実施した国際産学連携シンポジウム（先端医療分野における知財戦略と活用）の開催をサポートした。

iPS 細胞等研究ネットワークに参加する大学や企業の関係者等に広く参加を呼びかけ、100 人を超える観客を得た。再生医療分野の知財に関する米国の動向を踏まえた上で、今後の日本の研究成果の取扱いなどがパネル討論され、関連知識の深化と共有化を進めることができた。



<研究者ミーティングへの参加から国内外特許出願まで>



(b) 国際競争力のある知的財産権の確保に繋げた活動の強化

週例及び月例の研究者ミーティングに Ph.D.等の知財担当者が常に参加し、研究者からの知財関連の要望や質問に対しその場で対応するとともに、研究成果に基づく発明を早期に発掘して特許出願に繋がった。

その結果昨年度は、本研究業務に係る特許出願は、国内 3 件、海外 7 件の合計 10 件の出願を行なうことができた。特許出願は、最初に米国へ仮出願し、その後 1 年以内に英語で日本特許庁に PCT 出願することを基本とすることで、米国の特許制度に戦略的に対応できるようにし、国際的な競争力のある知的財産権の確保に努めた。

国内出願（3件）			
No.	発明の名称	出願	出願人
(1)	移植用器具	特願2009-100267	慶應義塾
(2)	シュワン前駆細胞の製造方法及び増殖方法	特願2009-178340	慶應義塾
(3)	分化細胞由来多能性幹細胞の樹立方法	特願2009-181009	慶應義塾
海外・国際出願（7件）			
No.	発明の名称	出願	出願人
(1)	移植用器具	米国仮出願 61/264,326	慶應義塾
(2)	人工多能性幹細胞の選択方法	米国仮出願 61/217,362	慶應義塾 京都大学
(3)	分化細胞由来誘導多能性幹細胞由来の二次ニューロスフェアの選択方法、その選択方法によって選択されたクローン、及びそのクローンの使用方法	PCT英語出願 PCT/JP2009/003755	慶應義塾 京都大学
(4)	神経分化促進剤	PCT英語出願 PCT/JP2009/003195	慶應義塾
(5)	神経幹細胞製造方法	PCT英語出願 PCT/JP2009/005856	慶應義塾
(6)	分化細胞由来多能性幹細胞の樹立方法	PCT英語出願 PCT/JP2010/051435	慶應義塾
(7)	ヒト分化細胞由来多能性幹細胞の培養方法	PCT英語出願 PCT/JP2010/000640	慶應義塾

(c) 知的財産の管理・活用体制の強化

文科省産学官連携戦略展開事業（国際的な産学官連携活動の推進）の一環で国際産学連携シンポジウム（先端医療分野における知財戦略と活用）が開催された際に、招聘された演者であるカリフォルニア大学の技術移転専門家や特許弁護士と面談した。その際、米国等における再生医療関連の先進的な知的財産の管理・活用の状況を聴取すると共に意見交換を行い、今後の知的財産の管理・活用体制の強化に資することができた。

また、慶應義塾の拠点で研究を進める上で、国内外の大学や企業との共同研究契約や MTA 等契約は、昨年度 29 件発生した。iPS 知財戦略チームは、本件に最大の優先付けをするとともに適宜相手先と交渉することで、研究者へのリスクを最小化すると共に迅速な契約締結を行った。

また、他の拠点である京都大学や東京大学及び理化学研究所の知財担当者と意見交換する機会を持ち、また iPS 細胞等ネットワーク拡大知的財産等検討部会の会合に参加する中で、知財や細胞株などの管理活用に関する課題や対応策について認識の共有化を図り連携を深めた。

3. 課題全体の論文発表件数	0 件			
4. 課題全体の特許出願件数	0 件			
5. 当初目標に対する達成度				
目標どおり達成できたと考える。				
6. 今後の展望				
<p>H22 年度：知財情報の収集と活用については、関連特許の調査分析を進め、研究者への提供（特に論文より先に公開になる特許がある場合、これを優先して提供）と共に拠点間の連携・情報交換と共有化を図る。知財権の確保では、研究ミーティングに定常的に参加し、早期の発明発掘及び迅速的確な出願を推進する。知財の管理活用では、研究ミーティングへの定常参加で形成された研究者との密な連携により、リスクを最小化した迅速的確な契約（共同研究、MTA）締結を進めるとともに、契約条項に係る注意事項の喚起を図る。</p> <p>H23 年度：前年度業務を継続するほか、関連特許の調査分析結果についてiPS細胞研究ネットワーク全体への発信を検討する。また、出願手続き調整、契約締結に関する先方との調整、及び契約履行上の注意事項の喚起などについて研究者を積極的に支援し、研究者の負担軽減のための環境づくりを目指す。</p> <p>H24 年度：前年度業務を継続するほか、米国等の関連知財情報のアップ分を順次収集し、調査分析結果を研究者に提供するとともに、iPS細胞研究ネットワーク全体で共有できるようにする。研究ミーティングへ定常的に参加することで、研究者への負担を最小化した戦略的な特許出願に繋げると共に、技術移転や共同研究など、確保した知財に基いた研究の深化拡大を支援する。共同研究やMTAでは、リスクを最小化した迅速的確な契約締結を進めるとともに、手続きの上流から知財担当者が積極的に関与することを更に進め、研究者が研究に専念できる環境づくりを目指す。</p>				
7. 特記事項				
<p>平成 21 年度（本事業開始年度）は、国内 3 件、海外 7 件の特許出願を行なった。海外出願では、米国の特許制度に戦略的に対応するため、仮出願や PCT 英語出願を活用した。また、多数の共同研究契約や MTA が発生したが、その契約手続きの初めから Ph.D3 名等による知財担当が関与することで、研究者の負担軽減を目指した支援を展開できた。</p>				
8. 委託研究費一覧				
	20 年度	21 年度	22 年度	計
設備備品費（千円）	0	0	0	0
人件費（千円）	0	19,870	14,786	34,656
業務実施費（千円）	0	1,669	3,899	5,568
間接経費（千円）	0	6,462	5,606	12,067
合計（千円）	0	28,000	24,291	52,291

(別紙1) 各分担研究者の進捗状況

分 担 研 究 者 名	金村 米博
業 務 項 目 名	GMP レベルのヒト iPS 細胞プロセッシング技術開発と HLA バリエーションを有する同種他家ヒト iPS 細胞マスターセル・ライブラリーの構築
機 関 名	独立行政法人国立病院機構大阪医療センター

1. 課題開始時における達成目標

【達成目標】

ヒト iPS 細胞を用いた再生医療を実現するため、自家および同種他家臨床用ヒト iPS 細胞の樹立に最適なヒト細胞ソースを探索し、それらを用いた GMP レベルのヒト iPS 細胞プロセッシング技術、並びにヒト iPS 細胞からの各種ヒト体性幹細胞プロセッシング技術の開発を行い、樹立細胞の安全性を検証する。さらに、ヒト iPS 細胞を用いた安全性の高い急性期治療を実現するため、HLA バリエーションを有する同種他家ヒト iPS 細胞マスターセル・ライブラリーを構築し、その有用性を検証する。

また、iPS 細胞に関する標準化に関して、「iPS 細胞技術プラットフォーム」の総合目標で掲げた項目①細胞の標準化、E) 項目達成の一環として、ヒト多能性幹細胞 (iPS 細胞、ES 細胞) から再増殖可能な神経幹細胞を標準的な手法で分化させ、バンキング化のフィージビリティを検討する。

【年次計画】

- ①臨床応用に現実性があるヒト iPS 細胞作製用細胞ソースの探索 (H20~21 年)
- ②CPC を用いたヒト iPS 細胞およびその分化細胞 (神経幹細胞) 作製技術開発 (H21~22 年)
- ③GMP レベルでの同種ヒト iPS 細胞マスターセル・ライブラリー構築 (H21~24 年)
- ④GMP レベルでの同種ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞マスターセル・ライブラリー構築 (H22~24 年)
- ⑤ヒト多能性幹細胞 (iPS 細胞、ES 細胞) から標準的な手法により、神経幹細胞を分化させバンキングのフィージビリティを検討する (平成 21~24 年度)

2. 平成 22 年 4 月末時点における課題全体の事業計画に対する研究成果

(1) 成果概要

1. 臨床応用に現実性があるヒト iPS 細胞作製用細胞ソースの探索

Amphotropic 型レトロウイルスを用いた単回遺伝子導入法とマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を使用した改良ヒト iPS 細胞樹立プロトコルを作成した。合計 3 種類の由来の異なる初代ヒト培養細胞 (AMC,DMC,DFB) からヒト iPS 細胞の作製に成功し、これら細胞がヒト iPS 細胞作製用細胞ソースに成り得ることを明らかにした。

2. CPC (セルプロセッシングセンター) を用いたヒト iPS 細胞作製技術開発

GMP レベルのヒト iPS 細胞プロセッシング技術確立に応用可能な効率的ヒト iPS 細胞品質管理プロトコルを考案した。ヒト胎盤組織由来細胞から作成したヒト iPS 細胞は、長期継代後もその特性が安定であり、in vitro および in vivo における多分化能を保持するが、その細胞特性にはクローン間で差異が存在することを明らかにした。また、無フィーダー法でのヒト iPS 細胞樹立の実現性を明らかにした。

3. GMP レベルでの同種ヒト iPS 細胞マスターセル・ライブラリー構築

HLA バリエーションを有する合計 10 ラインのヒト iPS 細胞ライブラリーを作製した。細胞樹立効率およびその品質安定性の面で、DMC は安定して高品質のヒト iPS 細胞を作製するのに最も適したヒト細胞種の 1 つであることを明らかにした。

4. ヒト多能性幹細胞 (iPS 細胞、ES 細胞) から標準的な手法により、神経幹細胞を分化させバンキングのフィージビリティを検討する

胚様体形成で分化誘導したヒト ES 細胞由来神経幹細胞 (EB-NSC) と、神経組織由来ヒト神経幹細胞 (NSC) では、細胞表面抗原発現様式および分化誘導時の細胞接着性に大きな相違があり、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果、両細胞間で大きな遺伝子発現差が存在することを明らかにした。

(2) 研究の進捗及び成果

1. 臨床応用に現実性があるヒト iPS 細胞作製用細胞ソースの探索

1.1. ヒト iPS 細胞樹立方法の改良

Amphotropic 型 pMXs レトロウイルスを用いた単回の遺伝子導入法で iPS 細胞作製が可能となるプロトコルを確立した。マウス胎児線維芽細胞 (MEF) を使用した細胞クローニング法が 1 次マスタープレートにおけるヒト iPS 細胞様コロニー出現率を 10 倍程度向上させることを明らかにした。

1.2. ヒト胎盤組織由来接着性細胞からのヒト iPS 細胞樹立

前項の改良樹立法を用いて、ヒト胎盤由来細胞 (羊膜間葉系細胞 : AMC、脱落膜間葉系細胞 : DMC) およびヒト真皮線維芽細胞 (DFB) の合計 3 種類の由来の異なる初代ヒト培養細胞からアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を有するヒト iPS 細胞の作製に成功した (図 1)。

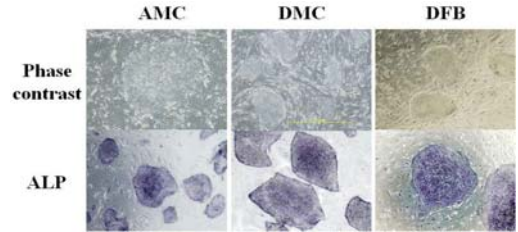


図 1 : 初代ヒト培養細胞から作製したヒト iPS 細胞

2. CPC (セルプロセッシングセンター) を用いたヒト iPS 細胞作製技術開発

2.1. 樹立されたヒト iPS 細胞の in vitro および in vivo における特性解析

GMP レベルのヒト iPS 細胞プロセッシング技術確立を目指し、各種細胞品質評価試験を iPS 細胞樹立の各工程で経時的かつ体系的に実施する効率的なヒト iPS 細胞品質管理プロトコルを考案した (図 2)。

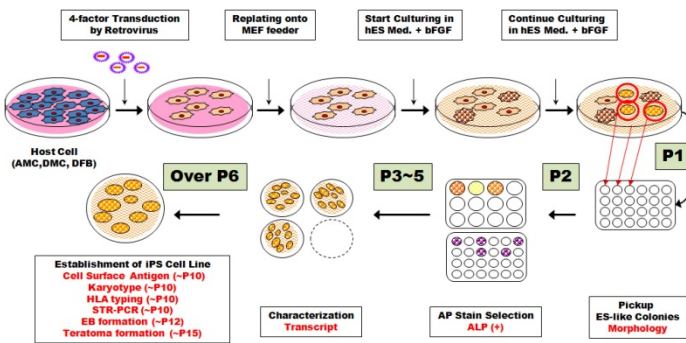


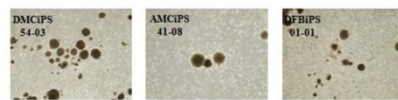
図 2 : ヒト iPS 細胞の樹立工程と細胞品質評価工程

- ① Morphology : 連続継代におけるコロニー形態と増殖安定性
- ② ALP 活性 : NBT/BCIP 試薬を用いたアルカリホスファターゼ活性検出
- ③ Transcript : 定量的 RT-PCR 法を用いた 8 つのヒト ES 細胞マーカー遺伝子 (NANOG, TERT, CYP26A1, FOXD3, GDF3, ZFP42/REX1, DNMT3B, TDGF1) の発現解析および外来性山中 4 因子遺伝子発現量定量
- ④ Cell Surface Antigen : FACS を用いた SSEA3, SSEA4, TRA1-60, TRA1-8 発現解析
- ⑤ Karyotype : G バンド分染法
- ⑥ HLA typing : HLA 遺伝子型 (A,B,DR)
- ⑦ STR-PCR : マイクロサテライト解析評価を用いたゲノム不安定性解析
- ⑧ EB formation : 胚様体 (EB) を形成後、8 日間目の遺伝子発現解析、その後、1 週間の単層培養実施後の細胞を用いた免疫細胞染色解析
- ⑨ Teratoma formation : NOG マウスを用いた奇形腫形成とその組織型解析

2.2. ヒト胎盤組織由来細胞から作成したヒト iPS 細胞のクローン間における細胞特性比較

2.2.1. 長期培養におけるヒト iPS 細胞品質の安定性

長期継代 (20 継代) 後ヒト iPS 細胞クローン (DMC、AMC、DFB 由来) の ES 細胞マーカー遺伝子および細胞表面抗原の発現はいずれも安定的であり、マイクロサテライトの不安定性も見られないことを明らかにし、長期継代におけるヒト iPS 細胞の品質の安定性を明らかにした。



ΔCt 値	KM51	DMCiPS 54-03	AMCiPS 41-08	DFBiPS 01-01	Relative to undifferentiated status	DMC EB 54-03	AMC EB 41-08	DFB EB 01-01
ES marker					ES marker			
hOct3/4	1.11	1.06	1.07	1.66	hOct3/4	0.64	0.71	0.93
NANOG	5.26	4.52	5.12	5.38	NANOG	0.54	0.95	0.90
TERT	11.56	11.34	9.96	10.40	TERT	0.52	0.98	0.76
Endoderm					Endoderm			
FOXA2	ND	16.29	15.90	12.30	FOXA2	1.74	14.03	0.53
SOX17	15.93	15.05	11.83	10.28	SOX17	1.62	1.62	0.51
AFP	ND	ND	ND	12.78	AFP	1.33	1.33	14.17
ALB	14.83	14.61	15.75	17.00	ALB	1.33	13.61	14.17
Mesoderm					Mesoderm			
GATA4	17.37	15.01	13.01	11.13	GATA4	1.85	0.80	0.06
Brachyury	18.93	17.41	16.97	15.93	Brachyury	1.86	1.77	0.83
MSX1	ND	ND	ND	11.70	MSX1	1.33	1.33	0.59
NKX2.5	15.77	13.84	13.36	12.83	NKX2.5	0.74	0.91	2.96
Neural					Neural			
NEUROG2	16.97	16.15	15.28	16.43	NEUROG2	0.77	1.54	11.38
SOX1	17.28	15.17	14.91	16.72	SOX1	1.97	1.16	14.08
PAX6	15.81	15.82	14.75	14.91	PAX6	1.23	1.00	0.24
Epidermis					Epidermis			
KRT17	13.61	11.81	12.85	9.42	KRT17	1.96	3.04	0.92

図 3 : 胚様体形成を用いたヒト iPS 細胞の分化能評価

上段 : 胚様体位相差像 下段左 : 胚様体形成前の遺伝子発現量を対照とした ΔCt 値

下段右 : 胚様体形成後の遺伝子発現量変動値 (比較 Ct 法)

2.2.2. In vitro におけるヒト iPS 細胞分化能評価

ヒト iPS 細胞クローン (DMC、AMC、DFB 由来) はいずれも胚様体を形成し、3 胚葉への分化能を有するが、クローン間で特性差が存在することを明らかにした (図 3)。

2.2.3. In vivo におけるヒト iPS 細胞分化能評価

NOG マウスに移植後に形成された DMC 由来ヒト iPS 細胞由来奇形腫は、クローン間でその組織像に差異を認めるが、いずれも 3 胚葉への良好な分化能を有することを明らかにした。

2.3. 無フィーダー法でのヒト iPS 細胞様細胞樹立

ヒト型細胞外マトリクスを用いた無フィーダー法にて、DFB からヒト iPS 細胞様細胞の樹立が可能であることを明らかにした。

3. GMP レベルでの同種ヒト iPS 細胞マスターセル・ライブラリー構築

HLA バリエーションを有する合計 10 ラインの初代ヒト培養細胞 (DMC : 6 ライン、AMC : 2 ライン、DFB : 2 ライン) からヒト iPS 細胞を作製し、各細胞種間の iPS 細胞作製効率を算出した (表 1)。その結果、DMC は、iPS 細胞作製効率は必ずしも高くないが、安定して高品質のヒト iPS 細胞を作製することができる細胞種であることを明らかにした。

表 1 : HLA バリエーションを有するヒト iPS 細胞ライブラリー

種類	ライン番号	HLA typing			iPS細胞作製効率
		A-locus	B-locus	DRB1-locus	
AMC	41	A24, A26	B7, B62	DR1, DR9	0.035%
	49	A24	B7, B*5145	DR1, DE15	0.006%
DMC	41	A2, A24	B7, B15	DR1, DR15	0.005%
	54	A2, A11	B62, B62	DR9	0.0065%
	70	A2	B15, B35	DR15, DR52	0.003%
	76	A2, A11	B56	DR11, DR52	0.004%
	77	A2, A11	B15, B48	DR4, DR9	0.017%
	83	A24, A25	B7, B51	DR1, DR14	0.003%
DFB	01	A24	B52, B54	DR15, DR4	0.008%
	18	A11, A26	B61, B55	DR4, DR9	0.008%

4. ヒト多能性幹細胞 (iPS 細胞、ES 細胞) から標準的な手法により、神経幹細胞を分化させバンキングのフィージビリティを検討する

胚様体形成で分化誘導した EB-NSC と NSC は、細胞表面抗原発現様式および分化誘導時の細胞接着性に大きな相違があり、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果、両細胞間で大きな遺伝子発現差が存在することを明らかにした。

3. 課題全体の論文発表件数 4 件

4. 課題全体の特許出願件数 0 件

5. 当初目標に対する達成度

1. 細胞ソース探索に関しては、ヒト胎盤組織由来細胞 (AMC、DMC) がヒト iPS 細胞作製に使用可能であることを証明し、中でも DMC が最も使用に適したヒト細胞であることを明らかにした。臨床応用に現実性がある同種ヒト細胞に目途を立てることができ、当初の第一目標は達成できたと考える。
2. GMP レベルのヒト iPS 細胞プロセッシング技術開発に関しては、大きな障害となるフィーダー細胞 (MEF) の問題の解決法を見出し、また iPS 細胞樹立工程の品質評価プロセスの構築を達成した。レトロウイルスベクターを用いたヒト iPS 細胞作製法に関しては、その GMP 化への道筋が見える状況になり、当初目標は概ね達成できつつあると考える。
3. GMP レベルでの同種ヒト iPS 細胞マスターセル・ライブラリー構築に関しては、10 ラインのスマールライブラリーの構築に成功し、今後のラージライブラリー構築の実現性を明らかにすることができたと考え、概ね順調な進捗であると考え。

6. 今後の展望

- ・胎盤の母体由来細胞である DMC は、臍帯血などと異なりドナー本人の同意と十分なドナー情報 (病歴等) の取得が可能であり、臨床使用の点で大きな優位性を持つ細胞ソースである。本細胞を使用して HLA バリエーションを有する同種他家ヒト iPS 細胞マスターセル・ライブラリーを構築することは実現可能なスキームであると考えられ、今後、更に研究を加速していきたいと考える。
- ・GMP レベルのヒト iPS 細胞プロセッシング技術開発に関しては、国のガイドライン策定の動きを考慮しつつ、まずはリプログラミング手法以外の、現時点で実施可能な部分から段階的に GMP 化へ向けての細部の調整に入りたいと考える。
- ・22 年度以降は、細胞品質評価に関して、特にゲノム安定性と iPS 細胞品質との関連性について詳細な解析を実施していく予定である。

7. 特記事項

胎盤の母体由来細胞である DMC がヒト iPS 細胞樹立に利用可能であることを明らかにした点

8. 委託研究費一覧

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費 (千円)	5,793	0	0	5,793
人件費 (千円)	12,461	18,222	17,395	48,078
業務実施費 (千円)	6,746	4,855	5,682	17,283
間接経費 (千円)	7,500	6,923	6,923	21,346
合計 (千円)	32,500	30,000	30,000	92,500

(別紙1) 各分担研究者の進捗状況

分 担 研 究 者 名	伊藤 豊志雄
業 務 項 目 名	疾患モデル動物を用いた幹細胞治療の安全性と有効性の検討
機 関 名	財団法人実験動物中央研究所

1. 課題開始時における達成目標

ヒト iPS 細胞による細胞治療開発を進めるにあたって、マーモセットと重症度免疫不全マウスを用いた安全性と有効性の確認のため、二つの目標が設定された。一つはヒトのモデルとしてマーモセット iPS 細胞樹立法を確立し、iPS 細胞から誘導された分化細胞の自家移植による治療の開発で、二つ目は重症度免疫不全マウスによるヒト幹細胞由来の安全性確認試験の確立である。

2. 平成22年4月末時点における課題全体の事業計画に対する研究成果

(1) 成果概要

マーモセット iPS 細胞は樹立された。安全性確認の一つである細胞増殖能力評価では、重症度免疫不全マウスとしては、NOD/scid マウスより、NOG マウスが有効と判断された。

(2) 研究の進捗及び成果

マーモセット iPS 細胞樹立：マーモセット胎仔の皮膚、骨髄細胞、胃および肝臓由来細胞へ、レトロウイルスを用いて遺伝子導入し、iPS 細胞の樹立をおこなった。遺伝子導入後7日で細胞をマウス胎子線維芽細胞上へ播種し、3~4週間培養後、出現してきたコロニーをピックアップし、細胞株を樹立した。当初、ヒトの山中4因子 (Oct-3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を用いたが iPS 細胞は樹立できず、山中4因子に加え Lin28 および Nanog の2因子を用いることで、肝臓由来細胞からマーモセット ES 細胞に酷似した iPS 細胞株が得られた。得られた iPS 細胞は①アルカリフォスファターゼ活性を持ち、SSEA-3、SSEA-4、Tra-1-60 および Tra-1-81 を発現していた。一方で SSEA-1 の発現は認められなかった。②内因性の Oct-3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28 および Nanog 遺伝子を発現し、導入した外来遺伝子はすべてサイレンシングされていた。③検査した8株中7株は正常な核型を有していたが、残りの1株は遺伝子の転座が起こっていた。④iPS 細胞とマーモセット ES 細胞の間で高い類似性を持っていた。⑤体外分化培養の結果、三胚葉全ての遺伝子マーカーが検出された。⑥テラトーマ形成能を持ち、三胚葉全ての細胞・組織が認められた。以上より、マーモセット胎仔肝臓由来細胞よりマーモセット iPS 細胞の樹立に成功した。今後は、複数の成体細胞から iPS 細胞の樹立を目指す。

自家移植による細胞の有効性検討：疾患モデルマーモセットの作出についてはすでにノウハウがあり、自家移植による分化細胞の有効性検討に取り組む準備が整った。

重症度免疫不全マウスを用いた安全性評価：ヒト幹細胞あるいは iPS 細胞由来細胞の腫瘍形成能試験法開発に当たり、現在最強の免疫不全マウスである NOG マウスと、従前より使用されている免疫不全マウス NOD/SCID を使用した。本年度は幹細胞としてヒト胎盤由来 iPS 細胞8株、マーモセット由来 iPS 細胞19株、ES 細胞1株を対象として皮下、精巣内、腎皮膜下移植により造腫瘍性のみならず多分化能検証のため、総計103移植実験を実施した。免疫不全度の違いによる生着性の差を明らかにするため、異なる3株のマーモセット由来 iPS 細胞を用いて検討を行った。3株の iPS 細胞それぞれを NOG マウス、NOD/SCID マウスの腎被膜下に移植し、エンドポイント(人道的)までの時間を比較した。マーモセット由来 iPS 細胞が移植された NOG マウスは、統計学的有意差を持って NOD/SCID マウスよりもエンドポイントを早く迎えた。同じ細胞数を同様に移

植しても、免疫不全度の違いにより細胞増殖速度が異なることが明らかになった。すなわち、NOG マウスを用いることにより、高い検出感度で増殖性細胞を検出できることが可能となった。

移植部位の違いによる生着性を明らかにするため、大阪医療センター拠点、金村がヒト胎盤組織由来細胞から樹立した2株のヒト iPS 様細胞を用いて検討を行った。2 株の iPS 様細胞それぞれを NOG マウスの皮下、腎被膜下、および精巣内に移植し、エンドポイント(人道的)までの時間を比較した。iA49-2A6 細胞(ヒト羊膜間葉系細胞由来)の増殖速度は皮下、腎被膜下、精巣内移植のいずれにおいても大きな差は認められず、52-58 日にエンドポイントを迎えた。一方、iD-54-03 細胞(ヒト脱落膜間葉系細胞由来)の増殖速度は皮下移植と腎被膜下・精巣内移植では差が認められ、腎被膜下、精巣内移植では 70 日に、皮下移植では 86 日目にエンドポイントを迎えた。この過程で、iA49-2A6 細胞はいずれも充実性の固形腫瘍であったが、iD-54-03 細胞の腫瘍塊は、腎被膜下・精巣内で形成されたものは、皮下移植の充実性固形腫瘍塊とは全く異なり、大きな水疱を形成した。このように、移植部位の違いにより形成される腫瘍が異なることを明らかにした。

3. 課題全体の論文発表件数	6 件			
4. 課題全体の特許出願件数	0 件			
5. 当初目標に対する達成度	90%			
6. 今後の展望	<p>今後の展望</p> <p>遺伝子操作動物の作出が唯一可能で小型のサル類であるマーモセットを用いた iPS 細胞あるいは iPS 細胞から分化させた細胞の有効性確認のための研究を続けるとともに、我々のマーモセットの飼育や動物実験技術を広めるため、研修生の受け入れや共同研究を継続する。重症度免疫不全マウスについての使用は普及してきたが、低感染抵抗性に起因する動物の死亡事故発生を低下させるための飼育方法の啓蒙を継続するとともに、iPS 細胞の安全性確認方法の確立を図る。</p> <p>平成 22 年度～平成 24 年度の研究計画</p> <p>マーモセット iPS 細胞樹立法を確立させるとともに、iPS 細胞から分化誘導させた神経系や心筋を予め作製した疾患モデルマーモセットに自家移植することによる有効性の前臨床研究を行う。ヒト iPS 細胞の安全性については、重度免疫不全マウスを用いた三胚葉分化能や分化細胞の腫瘍原性試験法の確立を目指す。</p>			
7. 特記事項	マーモセット iPS 細胞樹立に関しては、5 月 24 日付けで Genes to Cells 誌に論文が受理されている(補足資料 1)。			
8. 委託研究費一覧				
	20 年度	21 年度	22 年度	計
設備備品費 (千円)	2,423	0	0	2,423
人件費 (千円)	0	0	0	0
業務実施費 (千円)	7,577	10,769	10,769	10,769
間接経費 (千円)	3,000	3,231	3,231	3,231
合計 (千円)	13,000	14,000	14,000	41,000

(別紙 2)

1. 論文のリスト

◎○Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, Suda T, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H: Ontogeny and Multipotency of Neural Crest-Derived Stem Cells in Bone Marrow, Dorsal Root Ganglia and Whisker Pad of Adult Rodents. *Cell Stem Cell*. 2: 392-403, 2008.

◎○Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Enoki R, Koizumi A, Ishii S, Itoyama Y, Sobue G, Okano H. Spatio-temporal recapitulation of central nervous system development by ES cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells*. 26; 3086-3098, 2008.

◎○Naka H, Nakamura S, Shimazaki T, Okano H: Requirement for COUP-TFI and II in the temporal specification of neural stem cells in central nervous system development. *Nature Neurosci* 11 (9): 1014-1023, 2008

○Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, Okano H, Nomura T. : Generation of transgenic non-human primates with germ line transmission. *Nature*, 459(7246):523-527, 2009. (*H. Okano is the corresponding author in this paper)

◎○Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, Suzuki S, Miyauchi-Hara C, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Miyawaki A, Nakagawa T, Suda T, Okano H, and Matsuzaki Y: Prospective identification, isolation and self-renewal of multipotent mesenchymal stem cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* 206(11):2483-2496, 2009.

◎○Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, Okano H, Yamanaka S.: Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines *Nature Biotechnol.* 27(8):743-745, 2009. (*H. Okano is the corresponding author in this paper)

◎○Kumagai G, Okada Y, Yamane J, Kitamura K, Nagoshi N, Mukaino M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Okada S, Shibata S, Toh S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. *PLOS ONE* 4(11):e7706, 2009.

Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, Iwasaki H, Hembree M, Yin T, Nakamura N, Gomei Y, Takubo K, Shiama H, Matsuoka S, Li L, Suda T: Cadherin-based adhesion is a potential target for niche manipulation to protect hematopoietic stem cells in adult bone marrow. *Cell Stem Cell*. 6: 194-198, 2010

◎Fumiyuki Hattori, Hao Chen, Hiromi Yamashita, Shugo Tohyama, Yu-suke Satoh, Shinsuke Yuasa, Weizhen Li, Motoaki Sano, Shinji Makino, Shinzo Oikawa, Keiichi Fukuda, et al. Novel methods for purifying and

transplanting ES cell-derived cardiomyocytes with high cell survival rates and without inducing teratoma formation. *Nature Methods* 7: 61-6, 2010.

©Kenichiro Shimoji, Shinsuke Yuasa, Takeshi Onizuka, Fumiyuki Hattori, Tomofumi Tanaka, Mie Hara, Yohei Ohno, Hao Chen, Uichi Koshimizu, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ES and iPS cells. *Cell Stem Cell* 6:227-237, 2010.

2. 特許出願リスト

表題	概要	出願年月日
分化細胞由来誘導多能性幹細胞由来の二次ニューロスフェアの選択方法、その選択方法によって選択されたクローン、及びそのクローンの使用方法	安全性の高い誘導多能性幹細胞株由来、また、安全性の低い誘導多能性幹細胞株由来二次ニューロスフェアを区別する方法の開発。	平成 20 年 8 月 5 日 (米国)
神経分化促進剤	COUP-TFI および COUP-TFII タンパク質の機能阻害剤による神経幹・前駆細胞の神経分化促進。	平成 20 年 8 月 13 日 (米国)
神経幹細胞製造方法	マウスおよびヒト繊維芽細胞に遺伝子導入を行うことにより短期に大量に神経幹細胞を得る方法を確立した。	平成 20 年 11 月 5 日 (米国)
神経損傷治療方法	肝細胞増殖因子のくも膜下腔持続投与による脊髄損傷の新たな治療法の開発	平成 20 年 6 月 30 日 (米国) (基礎出願) 平成 21 年 2 月 18 日 (米国)
神経損傷治療方法	肝細胞増殖因子のくも膜下腔持続投与による脊髄損傷の新たな治療法の開発	平成 20 年 6 月 30 日 (PCT) (基礎出願) 平成 20 年 3 月 7 日 (特願)
ヒト間葉系幹細胞濃縮方法	本発明の目的は、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、ヒト間葉系幹細胞を高度に濃縮する方法を提供することである。	平成 20 年 9 月 8 日 (PCT) (基礎出願) 平成 19 年 9 月 6 日 (特願)
霊長類動物の初期胚への外来遺伝子導入法及び該導入法を含むトランスジェニック霊長類動物を作出する方法	スクロース液によって囲卵腔を広げた霊長類初期胚にレンチウイルスベクターを注入し高率に遺伝子改変霊長類動物を作出する。	平成 20 年 12 月 9 日 (PCT) (基礎出願) 平成 20 年 1 月 29 日

		(特願)
シュワン前駆細胞の製造方法及び増殖方法	末梢神経を損傷後特定に時期に採取し、浮遊培養を行うことにより効率的かつ選択的なシュワン前駆細胞の増殖法を確立した。	平成 21 年 7 月 30 日 (国内)
分化細胞由来多能性幹細胞の樹立方法	本発明は、分化細胞由来多能性幹細胞の高効率樹立方法、及びその方法によって樹立された分化細胞由来多能性幹細胞に関するものである。	平成 21 年 8 月 3 日 (国内)
人工多能性幹細胞の選択方法	マウス人工多能性幹細胞から神経幹細胞をニューロスフェアとして誘導し、ニューロスフェア中の未分化細胞の割合、さらに免疫不全マウスの脳に移植することでその腫瘍化能を評価するシステムを開発した。	平成 21 年 5 月 29 日 (米国)
分化細胞由来誘導多能性幹細胞由来の二次ニューロスフェアの選択方法、その選択方法によって選択されたクローン、及びそのクローンの使用方法	安全性の高い誘導多能性幹細胞株由来、また、安全性の低い誘導多能性幹細胞株由来二次ニューロスフェアを区別する方法の開発。	平成 21 年 8 月 5 日 (PCT) (基礎出願) 平成 20 年 8 月 5 日 (米国)
神経分化促進剤	COUP-TFI および COUP-TFII タンパク質の機能阻害剤による神経幹・前駆細胞の神経分化促進。	平成 21 年 7 月 8 日 (PCT) (基礎出願) 平成 20 年 8 月 13 日 (米国)
神経幹細胞製造方法	マウスおよびヒト繊維芽細胞に遺伝子導入を行うことにより短期に大量に神経幹細胞を得る方法を確立した。	平成 21 年 11 月 4 日 (PCT) (基礎出願) 平成 20 年 11 月 5 日 (米国)
分化細胞由来多能性幹細胞の樹立方法	本発明は、分化細胞由来多能性幹細胞の高効率樹立方法、及びその方法によって樹立された分化細胞由来多能性幹細胞に関するものである。	平成 22 年 2 月 2 日 (PCT) (基礎出願) 平成 21 年 8 月 3 日 (特願)
ヒト分化細胞由来多能性幹細胞由来の胚様態及び神経幹細胞培養方法	ヒト多能性幹細胞から神経幹細胞を誘導する培養法を開発した。さらに、分泌因子による、神経幹細胞の特異性制御方法を開発した。	平成 22 年 2 月 3 日 (PCT) (基礎出願) 平成 21 年 8 月 3 日

		(特願)
脊髄損傷サルモデルの作成法及びその利用	小型霊長類マーマセットを用いて脊髄損傷の前臨床研究モデルを開発した。	平成 15 年 11 月 26 日 (特願) 登録日:平成 21 年 7 月 3 日 (特許第 4332650 号)
脊髄損傷サルモデルの作成法及びその利用	小型霊長類マーマセットを用いて脊髄損傷の前臨床研究モデルを開発した。	平成 14 年 11 月 26 (米国) 登録査定
記憶障害治療剤	E S 細胞由来神経幹細胞移植によりマウス記憶障害モデルの治療を行った。	平成 15 年 11 月 26 日 (特願) 登録日:平成 21 年 9 月 18 日 (特許第 4374469 号)
神経幹細胞の増殖抑制剤	糖鎖結合蛋白質がレクチン-1 とその結合蛋白質 β 1 インテグリンの相互作用のブロックにより、神経幹細胞の増殖を抑制した。	平成 19 年 2 月 9 (米国) 登録日:平成 22 年 2 月 16 日 (7662385)
インターロイキン-6 アンタゴニストを含有する脊髄損傷治療剤	マウス脊髄損傷モデル急性期にインターロイキン-6 の受容体抗体を投与し、機能改善を誘導した。	平成 16 年 2 月 24 (ロシア) 登録日:平成 21 年 6 月 20 日 (2358761)
インターロイキン-6 アンタゴニストを含有する脊髄損傷治療剤	マウス脊髄損傷モデル急性期にインターロイキン-6 の受容体抗体を投与し、機能改善を誘導した。	平成 16 年 2 月 24 (オーストラリア) 登録日:平成 21 年 10 月 8 日 (2004212843)
インターロイキン-6 アンタゴニストを含有する脊髄損傷治療剤	マウス脊髄損傷モデル急性期にインターロイキン-6 の受容体抗体を投与し、機能改善を誘導した。	平成 16 年 2 月 24 (ニュージーランド) 登録日:平成 21 年 10 月 8 日 (541928)
インターロイキン-6 アンタゴニストを含有する脊髄損傷治療剤	マウス脊髄損傷モデル急性期にインターロイキン-6 の受容体抗体を投与し、機能改善を誘導した。	平成 16 年 2 月 24 日 (特願) 登録査定
インターロイキン-6 アンタゴニストを含有する脊髄損傷治療剤	マウス脊髄損傷モデル急性期にインターロイキン-6 の受容体抗体を投与し、機能改善を誘導した。	平成 16 年 2 月 24 (メキシコ) 登録査定
神経幹細胞の生存及び/又は増殖及び神経突起伸張を促進する方法並びに促進剤、神経幹細胞を含む医薬組成物、検定方法、スクリーニング方法	培養地の神経幹細胞の生存、増殖、またはそれら両方を促進する方法、さらには神経幹細胞の生存/増殖を誘導因子のスクリーニング手法に関する発明	平成 16 年 9 月 8 日 (米国) 登録査定

<p>細胞シート移植用器具 ※分担者の出願となります</p>	<p>幹細胞より作成した細胞シートを眼球を 含む、体腔内に移植する装置</p>	<p>平成 21 年 11 月 25 日 (PCT) 平成 21 年 4 月 16 日 (特願)</p>
------------------------------------	---	--

(別紙3)

他制度等による助成

他制度（公的資金）による助成を受けているものがある場合には、以下に必要事項を記載してください。該当がない場合には、「助成制度」の欄に「なし」と記入してください。

1. 実施中又は平成20年度以降に実施した研究テーマ

1	助成制度	戦略的創造研究推進事業 発展研究(SORST)		
	研究者氏名	岡野 栄之	当該研究者の役割	研究代表
	研究テーマ	内在性神経幹細胞活性化による神経再生戦略 -モデル生物系を用いた解析-		
	研究期間	平成17年11月 ～ 平成22年10月		
	助成金合計 (見込み)	20年度 108,871千円 21年度 179,675千円 22年度 61,050千円 期間全体 463,918千円		
	本プロジェクトとの違い	内在性幹細胞活性化による神経再生を目指した研究であり、ヒトiPS細胞等を用いた細胞治療開発を目指した本研究とは異なる。		
2	助成制度	文部科学省・科学研究費補助金・学術創成研究費		
	研究者氏名	岡野 栄之	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	成体脳神経幹細胞の活性化とニューロン新生：その制御機構の解明と可視化技術の開発		
	研究期間	平成17年04月 ～ 平成22年03月		
	助成金合計 (見込み)	20年度 97,890千円 21年度 99,190千円 22年度 0千円 期間全体 197,080千円		
	本プロジェクトとの違い	成体脳の内在性神経幹細胞の活性化に特化した研究費であり、iPS細胞などのヒト幹細胞を用いた移植医療開発を目指す本研究とは異なる。		
3	助成制度	内閣府・最先端研究開発支援プログラム		
	研究者氏名	岡野 栄之	当該研究者の役割	中心研究者
	研究テーマ	心を生み出す神経基盤の遺伝学的解析の戦略的展開		
	研究期間	平成22年03月 ～ 平成26年03月		
	助成金合計 (見込み)	20年度 0千円 21年度 *千円 22年度 *千円 期間全体 2,557,000千円 *年度の区切りなし、分担については現在検討中		
	本プロジェクトとの違い	このプロジェクトでは、異なる動物種の研究の間で、1) 遺伝子操作法の知見を共有し、2) 脳部位の相同性に基づいて仮説、および実験結果から新たな仮説作成の道を共有する。これらにより、種を越えた機構の普遍性および霊長類において特異的に進化した脳の機能を明らかにするものであり、iPS細胞などのヒト幹細胞を用いた移植医療開発を目指す本再生PJ研究とは全く異なる。		
	助成制度	脳科学研究戦略推進プログラム		
	研究者氏名	岡野 栄之	当該研究者の役割	分担研究
	研究テーマ	遺伝子改変コモンマーマウスによるヒト神経疾患モデルの開発		

4	研究期間	平成 20 年 7 月 ~ 平成 25 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 30,000 千円	21 年度 30,000 千円	22 年度 30,000 千円 期間全体 150,000 千円
	本プロジェクトとの違い	先端的遺伝子導入・改変技術による脳科学研究のための独創的霊長類モデルの開発と応用プロジェクトであり、iPS 細胞などのヒト幹細胞を用いた移植医療開発を目指す本研究とは全く異なる。		
5	助成制度	厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 青木班		
	研究者氏名	岡野 栄之	当該研究者の役割	分担研究
	研究テーマ	肝細胞増殖因子による筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療法の開発		
	研究期間	平成 21 年 10 月 ~ 平成 24 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 千円	21 年度 0 千円	22 年度 60,000 千円 期間全体 (未定) 千円
	本プロジェクトとの違い	肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた筋萎縮性側索硬化症さらには脊髄損傷治療法の確立を目指した前臨床・臨床研究プロジェクトであり、本再生 PJ でミッションが完了した HGF に関する研究開発を引き継ぐものである。		
6	助成制度	先端医療開発特区 (スーパー特区) 研究		
	研究者氏名	岡野 栄之	当該研究者の役割	研究代表
	研究テーマ	中枢神経の再生医療のための先端医療開発プロジェクト-脊髄損傷を中心に-		
	研究期間	平成 20 年 10 月 ~ 平成 25 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 千円	21 年度 291,853 千円(補正予算)	22 年度 (未定) 千円 期間全体 (未定) 千円
	本プロジェクトとの違い	本再生 PJ で得られた成果の臨床応用への展開を加速する内閣府主導のプログラムであり、再生 PJ と整合性を持って進めることが承認されている。		
7	助成制度	グローバルCOEプログラム		
	研究者氏名	岡野 栄之	当該研究者の役割	拠点リーダー
	研究テーマ	幹細胞医学のための教育研究拠点		
	研究期間	平成 20 年 4 月 ~ 平成 25 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 345,930 千円	21 年度 321,711 千円	22 年度 247,470 千円 期間全体「未定」千円
	本プロジェクトとの違い	この研究は、幹細胞研究全般を対象とした大学院博士課程の教育・研究の向上を目指し、大学院生の経済的支援を含めたプログラムであり、ヒト iPS 細胞等を中心として、再生医療実現化にフォーカスしたプロジェクト研究である本研究とは異なった趣旨のプログラムである。		
8	助成制度	文部省科学研究費 基盤 C (H20 年度)		
	研究者氏名	中村 雅也	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	嗅粘膜由来幹細胞とその嗅神経グリア分化誘導および脊髄損傷治療モデルの確立		
	研究期間	平成 20 年 4 月 ~ 平成 21 年 3 月		
	助成金合計	20 年度 2,600 千円	21 年度 千円	

	(見込み)	22年度	千円	期間全体	2,600千円
	本プロジェクトとの違い	嗅粘膜由来幹細胞の性状を明らかにし、脊髄損傷モデル動物へ移入することによりその有効性を明らかにすることを目的とした研究テーマであり、本プロジェクトとは重複しない。			
9	助成制度	文部省科学研究費 基盤B (H21・22年度)			
	研究者氏名	松崎 有未	当該研究者の役割	研究代表者	
	研究テーマ	レポーター遺伝子導入による間葉系幹細胞の未分化性維持と分化様式の解明			
	研究期間	平成 21年 4月 ～ 平成 23年 3月			
	助成金合計 (見込み)	21年度 6,500千円	22年度 6,110千円	23年度 6,110千円 期間全体 18,720千円(予定)	
	本プロジェクトとの違い	間葉系幹細胞の性質を分子生物学的手法および網羅的手法により明らかにすることを目的とした研究テーマであり、本プロジェクトとは重複しない。			
10	助成制度	文部科学省研究費 (萌芽研究)			
	研究者氏名	坪田 一男	当該研究者の役割	研究代表者	
	研究テーマ	IP3 受容体およびムスカリニック受容体欠損マウスを用いた涙液分泌機構			
	研究期間	平成 21年 4月 ～ 平成 23年 3月			
	助成金合計 (見込み)	20年度 千円	21年度 1,600千円	22年度 1,600千円 期間全体 3,200千円	
	本プロジェクトとの違い	ドライアイモデルマウス作成の研究であり、関係ない。			
11	助成制度	厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業			
	研究者氏名	坪田 一男	当該研究者の役割	研究代表者	
	研究テーマ	Fuchs 角膜内皮変性症および関連疾患に関する調査研究			
	研究期間	平成 21年 4月 ～ 平成 23年 3月			
	助成金合計 (見込み)	20年度 千円	21年度 20,000千円	22年度 15,000千円 期間全体 35,000千円	
	本プロジェクトとの違い	フックス角膜変性症の本邦における有病率調査。本プロジェクトと関係ない。			
12	助成制度	科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業			
	研究者氏名	須田 年生	当該研究者の役割	研究分担者	
	研究テーマ	代謝解析による幹細胞制御機構の解明			
	研究期間	平成 17年 10月 ～ 平成 22年 9月			
	助成金合計 (見込み)	20年度 13,000千円	21年度 13,000千円	22年度 0千円 期間全体 65,000千円	
	本プロジェクトとの違い	CREST 研究では、「静止期幹細胞の代謝学的研究」を分担しており、今までの幹細胞のニッチの研究から、幹細胞は、低酸素のニッチにあって、他の細胞に比して特異な代謝にあるのではないかと考えられる。幹細胞の代謝の特性についての解析を進めている。			
	助成制度	NEDO iPS 細胞の産業応用プロジェクト			

13	研究者氏名	須田 年生	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	iPS 細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発		
	研究期間	平成 21 年 10 月 ～ 平成 26 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 千円	21 年度 31,000 千円	
		22 年度 31,000 千円	期間全体 155,000 千円	
本プロジェクトとの違い	iPS 細胞形成過程の解析と標準化への指標開発で、東レの感度の高い Microarray 技術と共同して行なう。			
14	助成制度	医薬基盤研究所研究費		
	研究者氏名	福田 恵一	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	サルおよびヒト胚性幹細胞を用いた心筋細胞の再生と移植法の開発		
	研究期間	平成 20 年 4 月 ～ 平成 22 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 74,500 千円	21 年度 79,500 千円	
		22 年度 0 千円	期間全体 154,000 千円	
本プロジェクトとの違い	この研究はサルとヒトの ES 細胞を用いて心筋細胞を分化誘導し、再生医療に応用するための基盤技術を開発する研究であり、本研究の内容とは全く異なる。			
15	助成制度	新エネルギー・産業技術総合研究開発機構(NEDO)研究費		
	研究者氏名	福田 恵一	当該研究者の役割	研究分担者
	研究テーマ	iPS 細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発プロジェクト iPS 細胞の心筋分化制御方法の構築		
	研究期間	平成 20 年 4 月 ～ 平成 23 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 81,094 千円	21 年度 71,999 千円	
		22 年度 71,043 千円	期間全体 224,136 千円	
本プロジェクトとの違い	この研究はヒト健常者から得た iPS 細胞を利用してヒト再生心筋細胞を樹立し、これを用いてヒト心室筋のポアンカレプロットティングを行い、不整脈源性の薬剤のスクリーニング技術・装置を開発するものである。ヒト iPS 細胞由来再生心筋を用いる点だけが共通であるが、本研究とは研究内容は大きく異なり、機械の装置開発である。本研究とは全く異なるものである。			
16	助成制度	文部科学省科学研究費補助金(萌芽研究)		
	研究者氏名	福田 恵一	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	心臓形成に関わる新規転写因子の機能解析		
	研究期間	平成 20 年 4 月 ～ 平成 21 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 3,200 千円	21 年度 0 千円	
		22 年度 0 千円	期間全体 3,200 千円	
本プロジェクトとの違い	この研究は心筋分化に関わる転写因子として Zac-1 を遺伝子クローニングしたものであり、転写因子の機能解析の研究である。全く内容が異なる。			
17	助成制度	文部科学省科学研究費補助金(基盤研究 A)		
	研究者氏名	福田 恵一	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	心不全における交感神経機能の可塑性に関する研究		
	研究期間	平成 21 年 4 月 ～ 平成 23 年 3 月		

	助成金合計 (見込み)	20年度 0千円 21年度 19,630千円 22年度 13,260千円 期間全体 32,890千円
	本プロジェクトとの違い	この研究は心不全の際に心臓交感神経が副交感神経に分化転換すること、その原因にサイトカインL I Fが関与していることを明らかにしてものであり、本研究の内容とは全く異なる。
18	助成制度	文部科学省科学研究費(挑戦的萌芽研究)
	研究者氏名	福田 恵一 当該研究者の役割 研究代表者
	研究テーマ	抗アポトーシス作用を持つ新規転写因子の機能解析
	研究期間	平成 22年 4月 ~ 平成 23年 3月
	助成金合計 (見込み)	20年度 0千円 21年度 0千円 22年度 3,000千円 期間全体 3,000千円
	本プロジェクトとの違い	この研究は心筋転写因子 Zac-1 が心筋細胞に対し抗アポトーシス作用を持つことを明らかにしたものであり、本研究とは内容が全く異なる。
19	助成制度	厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業
	研究者氏名	福田 恵一 当該研究者の役割 研究代表者
	研究テーマ	プロスタグランジン-I 2 合成酵素遺伝子を用いた肺動脈性肺高血圧症に対する新規治療法の開発
	研究期間	平成 20年 4月 ~ 平成 23年 3月
	助成金合計 (見込み)	20年度 39,000千円 21年度 65,000千円 22年度 65,000千円 期間全体 169,000千円
	本プロジェクトとの違い	この研究はプロスタグランジン-I 2 合成酵素遺伝子をアデノ関連ウイルスに搭載し、肺高血圧症の遺伝子治療に利用しようとする展開研究であり、本研究とは内容が全く異なる。
20	助成制度	厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 青木班
	研究者氏名	中村 雅也 当該研究者の役割 研究分担
	研究テーマ	肝細胞増殖因子による筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療法の開発
	研究期間	平成 21年 10月 ~ 平成 24年 3月
	助成金合計 (見込み)	20年度 0千円 21年度 100,000千円 22年度 20,000千円 期間全体「未定」千円
	本プロジェクトとの違い	筋萎縮性側索硬化症及び脊髄損傷に対する再生医療における評価方法を確立するために、MRI の最新の撮像方法である Q-space imaging を用いた脊髄の描出を行っており、本プロジェクトの脊髄再生治療開発とは全く異なるアプローチである。
21	助成制度	戦略的創造研究推進事業チーム型研究
	研究者氏名	伊藤豊志雄 当該研究者の役割 分担
	研究テーマ	コモンマーモセットの発生工学的技術および疾患モデルの開発
	研究期間	平成 17年 11月 ~ 平成 22年 10月
	助成金合計 (見込み)	20年度 79,677千円 21年度 26,000千円 22年度 8,970千円 期間全体 125,307千円

	本プロジェクトとの違い	当該プロジェクトは、Tgマーカーモセット作出や作出技術の開発改良であり、研究テーマは重複することない。		
22	助成制度	保健医療分野における基礎研究推進事業		
	研究者氏名	伊藤豊志雄	当該研究者の役割	分担
	研究テーマ	コモンマーカーモセットサル心筋梗塞モデルの開発		
	研究期間	平成17年4月～平成21年4月		
	助成金合計(見込み)	20年度 5,000千円 21年度 5,000千円 22年度 0千円 期間全体 25,000千円		
	本プロジェクトとの違い	マーカーモセットで心筋梗塞モデルを作出し、治療目的としてのマーカーモセットES細胞由来再生心筋細胞移植の基礎データを得ることがその内容である。本研究の基盤の一つとなるテーマであった。		
23	助成制度	文部科学省科学研究費補助金 特定領域研究		
	研究者氏名	伊藤豊志雄	当該研究者の役割	分担
	研究テーマ	個体レベルでのがんの統合的研究		
	研究期間	平成17年4月～平成21年3月		
	助成金合計(見込み)	20年度 5,500千円 21年度 5,500千円 22年度 0千円 期間全体 27,500千円		
	本プロジェクトとの違い	当該プロジェクトはマウス・ラットの微生物学的品質検査サービスの実施であって、テーマが全く異なる。		
24	助成制度	知的クラスター創成事業(第II期)		
	研究者氏名	金村米博	当該研究者の役割	研究分担者
	研究テーマ	「関西広域バイオメディカルクラスター構想(神戸地域)」の一部(臨床応用に対応した幹細胞培養条件の確立)		
	研究期間	平成19年4月～平成24年3月(予定)		
	助成金合計(見込み)	20年度 5,500千円 21年度 5,500千円 22年度 5,500千円 期間全体 16,500千円		
	本プロジェクトとの違い	ヒトES細胞培養を支援する技術の開発が目標であり、本研究と類似の方向性ではあるが、研究対象にヒトiPS細胞は含まれず、担当業務の直接的目標は異なる。		
25	助成制度	科学研究費補助金(基盤研究C)		
	研究者氏名	金村米博	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	ヒト神経幹細胞をモデル細胞として応用したグリオーマ幹細胞標的薬の開発		
	研究期間	平成21年4月～平成24年3月		
	助成金合計(見込み)	20年度 0千円 21年度 23,400千円 22年度 1,300千円 期間全体 24,700千円		
	本プロジェクトとの違い	新規グリオーマ幹細胞標的薬(抗腫瘍薬)の開発が目的であり、本研究とはその目的と実施内容が異なる。		
	助成制度	厚生労働省科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)		
	研究者氏名	金村米博	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	難治性てんかん患者由来iPS細胞を用いた新規創薬基盤の構築		

26	研究期間	平成 21 年 11 月 ～ 平成 24 年 3 月 (予定)		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 0 千円 21 年度 13,000 千円 22 年度 9,500 千円 期間全体 22,500 千円		
	本プロジェクトとの違い	難治性てんかん患者由来細胞から iPS 細胞を作成し、抗てんかん薬開発のための創薬基盤を構築することを目的とする研究であり、本研究とはその目的と実施内容が異なる。		
27	助成制度	保健医療分野における基礎研究推進事業委託費		
	研究者氏名	金村米博	当該研究者の役割	研究分担者
	研究テーマ	ヒト iPS 細胞由来モデル細胞 (肝・神経・心筋) の作製及びモデル細胞を用いた薬剤毒性評価技術の構築 (ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞を応用した薬物安全性評価システムの開発)		
	研究期間	平成 22 年 4 月 ～ 平成 27 年 3 月 (予定)		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 0 千円 21 年度 0 千円 22 年度 14,000 千円 期間全体 14,000 千円		
	本プロジェクトとの違い	ヒト iPS 細胞を用いた神経毒性評価系の構築を目的とする研究であり、本研究とはその目的と実施内容が異なる。		

(補足説明資料)

1. 慶應義塾大学 岡野栄之

マーモセットiPS細胞の樹立に関する論文 【*Gene to cells* (2010年5月24日 accept)】

Generating Induced Pluripotent Stem Cells from Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Fetal Liver Cells using Defined Factors, including Lin28

Ikuo Tomioka^{1,2}, Takuji Maeda^{1,2}, Hiroko Shimada², Kenji Kawai¹, Yohei Okada², Hiroshi Igarashi¹, Ryo Oiwa^{1,3}, Tsuyoshi Iwasaki⁴, Mikio Aoki⁴, Toru Kimura⁴, Seiji Shiozawa², Haruka Shinohara¹, Hiroshi Suemizu¹, Erika Sasaki^{1,2,*}, Hideyuki Okano^{2,*}

(¹Central Institute for Experimental Animals, Kanagawa, Japan, ² Keio University, School of Medicine Tokyo, Japan, ³JAC Inc., Tokyo, Japan, ⁴ Genomic Science Laboratories, Dainippon Sumitomo Pharma Co. Ltd)

*Correspondence: esasaki@ciea.or.jp and hidokano@sc.itc.keio.ac.jp

Abstract

Although embryonic stem (ES) cell-like induced pluripotent stem (iPS) cells have potential therapeutic applications in humans, they are also useful for creating genetically modified human disease models in non-human primates. In this study, we generated common marmoset iPS cells from fetal liver cells via the retrovirus-mediated introduction of six human transcription factors: Oct-3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, and Lin28. Three to five weeks after introduction, several colonies resembling marmoset ES cells were observed and picked for further expansion in ES cell medium. Eight cell lines were established, and validation analyses of the marmoset iPS cells followed. We detected the expression of ES cell-specific surface markers. Reverse transcription-PCR revealed that these iPS cells expressed endogenous *Oct-3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*, *Nanog* and *Lin28* genes, whereas all of the transgenes were silenced. Karyotype analysis revealed that two out of three iPS cell lines retained a normal karyotype after a 2-month culture. Both embryoid body and teratoma formation demonstrated that marmoset iPS cells had the developmental potential to give rise to differentiated derivatives of all three primary germ layers. In summary, we generated marmoset iPS cells via the transduction of six transcription factors; this provides a powerful preclinical model for studies in regenerative medicine.

※accept が5月のため、論文発表件数としては count しておりませんが、成果報告票中では本論文を引用しています。

2. 慶應義塾大学 福田恵一

GCSFが再生心筋細胞を細胞増殖させることを解明

【[Cell Stem Cell](#), 2010;6:227-37. (2010年3月5日掲載)】

G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs.

Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T, Hattori F, Tanaka T, Hara M, Ohno Y, Chen H, Egasgira T, Seki T, Yae K, Koshimizu U, Ogawa S, Fukuda K. (Department of Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University School of Medicine)

* Correspondence: kfukuda@sc.itc.keio.ac.jp

Abstract

During a screen for humoral factors that promote cardiomyocyte differentiation from embryonic stem cells (ESCs), we found marked elevation of granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSFR) mRNA in developing cardiomyocytes. We confirmed that both G-CSFR and G-CSF were specifically expressed in embryonic mouse heart at the midgestational stage, and expression levels were maintained throughout embryogenesis. Intrauterine G-CSF administration induced embryonic cardiomyocyte proliferation and caused hyperplasia. In contrast, approximately 50% of *csf3r*^{-/-} mice died during late embryogenesis because of the thinning of atrioventricular walls. ESC-derived developing cardiomyocytes also strongly expressed G-CSFR. When extrinsic G-CSF was administered to the ESC- and human iPSC-derived cardiomyocytes, it markedly augmented their proliferation. Moreover, G-CSF-neutralizing antibody inhibited their proliferation. These findings indicated that G-CSF is critically involved in cardiomyocyte proliferation during development, and may be used to boost the yield of cardiomyocytes from ESCs for their potential application to regenerative medicine.