

# 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	ヒト iPS 細胞等を用いた次世代遺伝子・細胞治療法の開発
代表機関名	国立大学法人東京大学
代表研究者名	中内 啓光
分担機関・分担研究者名	該当なし

## 1. 課題開始時における達成目標

ヒト iPS 細胞の樹立成功は、ヒト ES 細胞の持つ倫理的問題や免疫拒絶の問題を克服する大きな進歩であり、同細胞を利用した再生医療の実現化が期待されている。

東京大学では、医科学研究所において平成 20 年度発足した幹細胞治療研究センターを中心に、医学系研究科・医学部属病院、分子細胞生物学研究所、総合文化研究科の 4 部局による研究協力体制を整え、特に医科学研究所付属病院、医学部附属病院という二つの病院を研究組織に組み込むことで、前臨床試験を前提とした研究を強力に推進する。安全面と倫理面に十分配慮しつつ、患者から高品質ヒト iPS 細胞を樹立するシステムを確立するとともに、血球（血小板・赤血球など）や骨・軟骨、膵臓、神経、平滑筋といった多臓器へと効率良く分化誘導する方法を確立し、疾患モデル動物に対する移植などを通じて幹細胞による組織（臓器）再生治療の有効性・安全性を示す。また、iPS 細胞の特性を生かし、血友病や先天性免疫不全症等に対する遺伝子修復療法の開発など、新たな治療法の構築を推進する。

これらの目的の遂行のために、以下を達成目標とする。

- ① ヒト iPS 細胞樹立のためのソースの選定ならびに安全で効率の良い樹立法を開発する。
- ② 患者検体より高品質ヒト iPS 細胞を作成する。
- ③ iPS 細胞をヒトの治療に用いるための安全性確保のシステムを開発する(図 1)。
- ④ ヒト iPS 細胞から種々の組織（血球、骨・軟骨、骨格筋、血管平滑筋、肝臓、膵臓、神経等）を構成する機能的細胞へ効率良く分化させる方法を確立する。
- ⑤ 疾患・損傷治療モデルを用いて iPS 細胞の有用性・安全性を明らかにする。

センター内に細胞プロセッシング室と幹細胞樹立ユニットを設け、研究者からの要請に応じて iPS 細胞を始めとする各種幹細胞の分離培養、臨床応用に向けた細胞プロセッシング法の開発、安全性の検討、遺伝子導入ベクターの準備などを行なう。

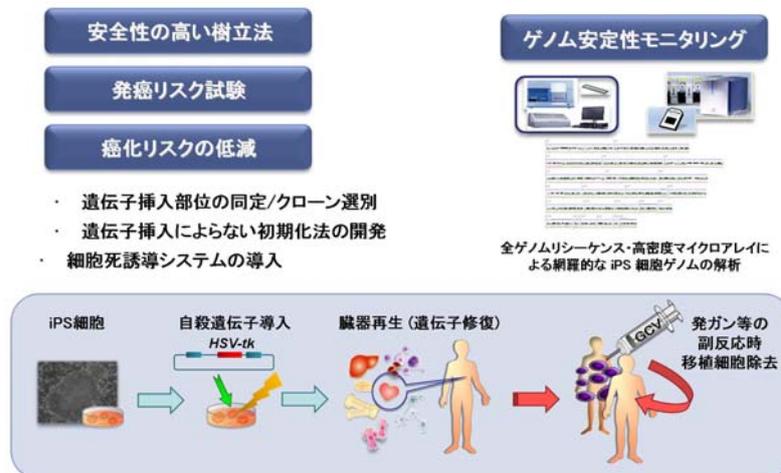


図 1：ヒト iPS 細胞を用いた治療における安全性の確保

## 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 ヒトiPS細胞樹立のためのソースの選定ならびに安全で効率の良い樹立法を開発する。

(i) 臨床応用に適した高力価レトロウイルスベクター産生システムであるウイルス産生安定株の樹立に成功したため、iPS細胞樹立工程の一層の効率化が図られた(図2)。マウスモデルでは、骨髓血液細胞から確実にiPS細胞が誘導可能であることを証明した(分担研究者、大津の報告参照)。さらに臍帯血、骨髓血液細胞、末梢血からのヒトiPS細胞の樹立方法が確立でき、皮膚から樹立したヒトiPS細胞との比較検証を行える体制に移行している(大津、江藤)。

(ii) ヒトES細胞で得られた無血清、無フィーダー、合成ハイドロゲル等による培養技術をヒトiPS細胞に適用し、樹立および未分化性の維持に成功した(大沼、菱川)。

(iii) iPS細胞樹立時、樹立後の評価法を検証し、

a) 樹立されたマウスiPS細胞の未分化性の指標、また樹立過程におけるマウスiPS細胞の選別に有用な細胞表面マーカーを決定した(中内)。更にはSignal sequence trap法によってヒトiPS細胞に特異的な新規の膜表面分子を同定した(北村)。

b) 血液細胞への分化能力を指標にヒトiPS細胞株を選別する評価系モデルを樹立した(江藤)。

c) ゲノム解析による樹立iPS細胞の評価を通じて、高密度SNPアレイによる複数のヒトiPS細胞のゲノム安定性の網羅的評価を行い、樹立・継代により一定の頻度でゲノムコピー数の異常な領域を生ずるクローンが出現することを確認できた(小川)。

(iv) c-Mycを除く初期化3因子の発現が薬剤添加により調節可能なレンチウイルスベクター由来ウイルスから樹立したマウスiPS細胞を用いてTgマウスを作出した(中内)。本マウスの作出により、細胞ソースによるiPS細胞樹立効率の比較やepigenomeの特性等の比較解析が可能となった。

#### ② 患者検体より高品質ヒトiPS細胞を作成する。

本計画の推進の中心をなす東京大学ステムセルバンクを医科学研究所内部に整備し、3疾患(ADA欠損症、無巨核球性血小板減少症、DiGeorge症候群)については、疾患特異的iPS細胞の樹立に成功した(江藤、大津)。

#### ③ iPS細胞をヒトの治療に用いるための安全性確保のシステムを開発する。

(i) 臨床応用に適した高力価レトロウイルスベクター産生システムであるウイルス産生安定株の樹立に成功した(大津、図2)。

(ii) 薬剤依存性の細胞自殺システムをiPS細胞に導入し、マウスモデルにおいて奇形腫の発生を予防できた(中内、図3)。本技術は、iPS細胞の臨床応用における安全面の確保において必須の技術である。

(iii) 複数のヒトiPS細胞株を用いた高密度SNPアレイによるゲノムの安定性の網羅的評価により、樹立・継代により一定の頻度でゲノムコピー数の異常な領域を生ずるクローンが出現することを確認した(小川、図4)。

#### ④ ヒトiPS細胞から種々の組織(血球、骨・軟骨、骨格筋、血管平滑筋、肝臓、膵臓、神経等)を構成する機能的細胞へ効率良く分化させる方法を確立する。

(i) ヒトiPS細胞から各種血液細胞(血小板、赤血球、肥満細胞)へ分化誘導することに成功した(江藤、辻)。

(ii) マウスiPS細胞からインスリン産生膵島( $\beta$ 細胞)への分化誘導を確認し、ヒトiPS細胞からの誘導も低頻度ながら確認した(宮島)。

(iii) 平滑筋についてインディケーターマウスからのiPS細胞の樹立に成功した。さらに平滑筋細胞の

分化誘導も確認した(真鍋)。

(iv) 骨・軟骨分化をモデルとした分化誘導系の開発に向けた検討を行った。物理的・化学的・機械的・電気的刺激、特に静水圧により軟骨細胞への分化が促進された。また軟骨分化誘導に有効なスフェロイドをコラーゲンゲル内で培養することにより長期培養が可能であることがヒト iPS 細胞で確認された(牛田)。

(v) 軟骨細胞のマーカー蛋白質遺伝子のプロモーターに GFP を組み込んだトランスジェニックマウス体細胞から iPS 細胞の樹立に成功した (中村)。

(vi) iPS 細胞由来神経幹細胞から効率よくニューロンに分化させることを目的とし、ニューロン分化能をマウス脳発生時期特異的に制御する分子機構の一端を解明した (後藤、図 4)。

⑤ 疾患・損傷治療モデルを用いて iPS 細胞の有用性・安全性を明らかにする。

(i) 1 個レベルの血小板の成体内部での挙動の観察を可能とする *in vivo* imaging システムを開発した。これを応用した新規の生体内血栓形成評価系を構築し、ヒト iPS 細胞由来の血小板の血小板減少症マウスモデル生体内での機能を評価することに成功した (江藤)。

(ii) 中型動物をモデル化し、骨・軟骨移植後の生体内機能評価系の検証を開始している (高戸)。

⑥ 細胞プロセッシング室と幹細胞樹立ユニットを設置

H20 年に発足した東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター内に、幹細胞プロセッシング部門 (責任者: 辻 浩一郎) と幹細胞樹立ユニットであるステムセルバンク (責任者: 江藤浩之) を設置した。

⑦ その他

(i) プロジェクトの総合的推進が研究代表者を中心に行われる体制整備に努め、「iPS 細胞技術プラットフォーム」の一層の完成を目指し H22 年度以降の業務体制として、臨床応用を目指すセクション (中内リーダー)、基盤技術推進セクション (大津リーダー) に大きくグループを編成した。さらに高戸、中村が抜け、牛田多加志の元に、高戸、中村グループの星 和人、齊藤 啄が参画して、骨・軟骨再生グループを統合する体制に集約した。

(ii) 知的財産戦略及び管理・活用体制強化を遂行した。

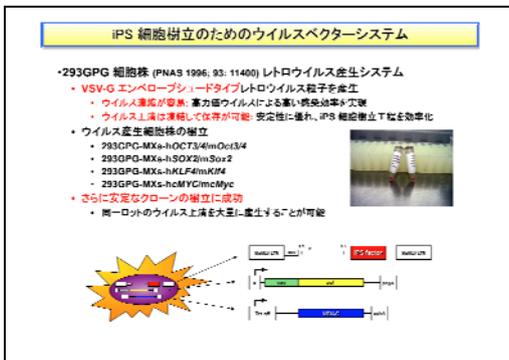


図 2

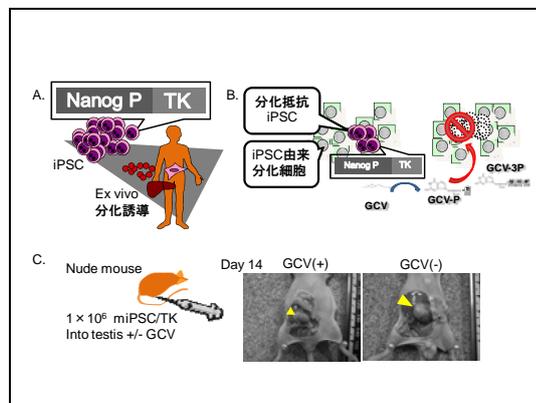


図 3

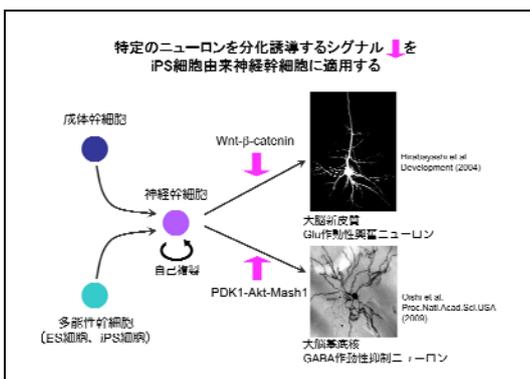


図 4

図 2：濃縮されたウイルス上清は、図中の写真に示すように少量 (30-50  $\mu$ l) ずつ凍結保存することが可能である。これらのウイルス上清を用いることで再現性良く、多種多様な細胞からの iPS 細胞の樹立が期待できる。

図 3：奇形腫の発生を事前に制御することが可能なシステムの開発

Nanog プロモーター制御下に Herpes simplex virus thymidine kinase (TK) を発現する細胞死誘導システムを組み込んだヒト iPS 細胞を再生医療に用いれば (A)、Nanog を発現する分化抵抗性 iPS 細胞のみを、ガンシクロビル (GCV) 依存性に排除することが可能となる (B)。TK 遺伝子導入未分化マウス iPS 細胞の精巣への移植実験において、GCV 投与が奇形腫形成 (矢頭) を予防した (C)。図 4：神経幹細胞からのニューロンへの分化経路を示す。ニューロン分化能の喪失を抑制するための機構の解明を現在継続しており、この知見を iPS 細胞からの効率の良いニューロン分化に応用する。

## (2) 研究の進捗及び成果

東京大学拠点では、H20年度の当初目標を修正しH21年度には、PO、PDとの協議を通じて、下記①～⑨の課題を目標として事業を推進したので報告する。

### ① iPS細胞に関する標準化

(i) 採取が容易な細胞ソースからの iPS 細胞樹立：臍帯血、骨髓血液細胞、末梢血からのヒト iPS 細胞の樹立方法の確立に成功した（大津、江藤；特許申請済み、論文準備中）。

(ii) ヒト ES 細胞で得られた無血清、無フィーダー、合成ハイドロゲル等による培養技術をヒト iPS 細胞にも適用し、細胞増殖に働く各種因子を同定した（大沼、菱川）。

(iii) 標準化プラットフォーム技術構築（H20年度補正予算執行時に開始した新課題、現在も継続中）

a) 表現型による評価；樹立されたマウス iPS 細胞の未分化性の指標、また樹立過程におけるマウス iPS 細胞の選別に有用な細胞表面マーカーを見出したが（中内）、エピプラスト幹細胞様であるヒト iPS 細胞への適応が可能かは確認できなかった（中内）。また **Signal sequence trap** 法によりヒト iPS 細胞に特異的な膜表面分子 3 種を新規に同定した。そのうちの 1 種は、初期化因子（山中因子）に追加することで iPS 細胞の樹立効率を上昇させた（北村）。

b) 分化能による評価；様々なヒト iPS 細胞株をソースとし、血小板産生を指標とした血球分化能による選別を行い、ヒト iPS 細胞株を選別する評価系モデルを樹立した（江藤、図 5）。

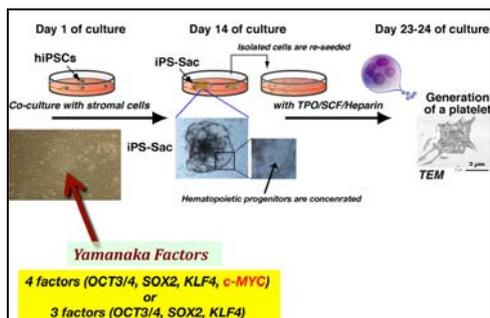


図 5

図 5：ヒト iPS 細胞からの iPS-Sac(造血前駆細胞が濃縮される構造体) およびその後の血小板産生培養系を示す。iPS 細胞は 4 因子あるいは 3 因子の初期化遺伝子を用いて皮膚線維芽細胞から樹立した。血小板前駆細胞である巨核球への分化段階において再活性化される初期化遺伝子の活性化レベルが血小板産生効率において重要な事になった。

c) ゲノム解析による細胞の評価；東大拠点内部および他拠点で樹立された複数のヒト iPS 細胞（42 クローン）を用い高密度 SNP アレイによるゲノムの安定性の網羅的評価を行い、樹立・継代（最長 63 継代までの観察）により一定の頻度でゲノムコピー数の異常な領域を生ずるクローンが出現することが確認された（小川、図 6）。

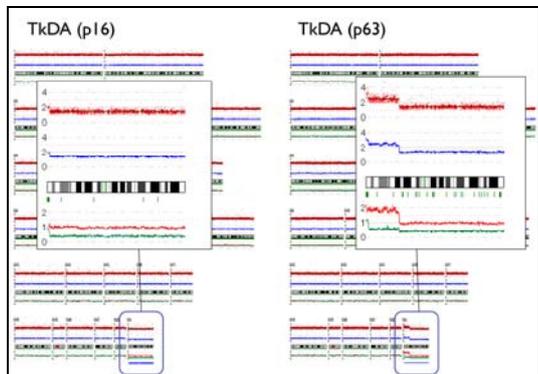


図 6

図 6：継代数の増加 (p16→p63) に伴い、ゲノムコピー数異常を確認ヒト iPS 細胞株 TkDA を常法に従い継代し、異なる継代数においてゲノム DNA を抽出して高密度 SNP アレイ解析を行った。その結果、63 継代のサンプル（図右、p63）において X 染色体短腕に約 28 Mb に渡るコピー数の異常を検出した。この変異は初期の継代（図左、p16）においては認めなかったことから、樹立後に変異を獲得した一部のクローンが、長期の培養中に徐々に拡大した結果と考えられた。

d) mRAP 法による iPS 細胞の microRNA の網羅的解析を行い、各種ヒト iPS 細胞株でのデータベースを構築した。今後 iPS 細胞のバリデーションに有効かどうかの検証を行うための重要な指標になる。

## ② 細胞誘導の技術講習会・培養トレーニングプログラムの実施

医科学研究所：平成 21 年 6 月 25-26 日、医科学研究所講堂での大規模講習会（125 名参加）およびステムセルバンク研究室での技術トレーニング講習会（24 名参加）を開催した（江藤）。講習会用テキストの新規作製と配布（160 冊）も併せて行った（江藤、大津）。その他にも適宜、技術トレーニングを行った（大沼；駒場地区、20 名）。

## ③ 疾患特異的 iPS 細胞の樹立・提供

東京大学ステムセルバンクを医科学研究所幹細胞治療研究センター内に整備し、運営を開始した。3 疾患（ADA 欠損症、無巨核球性血小板減少症、DiGeorge 症候群）については、疾患特異的 iPS 細胞の樹立に成功した。その他、6 疾患以上の iPS 細胞の樹立を開始した（江藤、大津、辻）。樹立された正常ヒト iPS 細胞数株、293GPG ウイルス産生株およびレトロウイルス上清（図 2）を分配するためのシステムを本部門に整備した（江藤、大津）。

## ④ iPS 細胞樹立のための新しい基盤技術と iPS 細胞の安全性強化技術の開発

(i) 高力価レトロウイルスベクター産生可能な 293GPG ウイルス産生株（図 2）を国内 10 施設以上の複数の研究者に配布し、配布先でも iPS 細胞の樹立に成功していることから、本システムの有用性が示されている。

(ii) 初期化 3 因子の発現が薬剤添加により調節可能なレンチウイルスベクターを構築し、本ウイルスから樹立したマウス iPS 細胞を用いて Tg マウスを作出（中内）。これを用いて複数の胎児組織および成体皮膚細胞由来の iPS 細胞クローンの樹立に成功したため、細胞ソースによる iPS 細胞樹立効率の比較や epigenome の特性等の比較解析が可能となった。

(iii) ES 細胞で得られた無血清、無フィーダー、合成ハイドロゲル等による培養技術を用いてヒト iPS 細胞の未分化性の維持に成功し、また無血清、無フィーダー条件下でのヒト iPS 細胞の樹立にも成功している（大沼）。合成ハイドロゲルを用いた培養系では、通常の培養法と比較して観察期間中（最長 70 継代）、継代数の増加による染色体数の変化が有意に少ないことが明らかとなった（菱川）。

(iv) 薬剤依存性の細胞自殺システムを iPS 細胞に導入し、マウスモデルにおいて奇形腫の発生を予防できた（中内、図 4）。

(v) 高密度 SNP アレイによるゲノムの安定性の網羅的評価により、樹立・継代により一定の頻度でヒト iPS 細胞株を用いたゲノムコピー数の異常な領域を生ずるクローンが出現することを確認した（小川）。

## ⑤ iPS 細胞を臨床応用するための各種細胞への分化誘導システムの確立

(i) ヒト iPS 細胞から各種血球細胞へ分化誘導することに成功し（江藤、辻）、血小板についてはマウス生体内部（*in vivo*）での止血機能も確認した（江藤）。

(ii) マウス iPS 細胞からインスリン産生膵島（β 細胞）への分化誘導を確認した（宮島）。ヒト iPS 細胞からの誘導にも成功したが頻度が低いため、今後改善が必要である。また、膵 β 細胞への分化誘導法の至適化に有用なツールとしてのインディケーターマウスの樹立を完了した（植木）。

(iii) 平滑筋についてもインディケーターマウスからの iPS 細胞の樹立に成功した。さらにここから平滑筋細胞の分化誘導を確認した（真鍋）。

(iv) 骨・軟骨分化をモデルとした分化誘導系の開発に向けた検討を行った。物理的刺激、特に静水圧により軟骨細胞への分化が促進された。また軟骨分化誘導に有効なスフェロイドをコラーゲンゲル内で培

養することにより長期培養が可能であることがヒト iPS 細胞で確認された (牛田)。

(v) 軟骨細胞のマーカー蛋白質、collagen type II 遺伝子のプロモーターに GFP を組み込んだトランスジェニックマウス体細胞から iPS 細胞の樹立に成功した(中村 [斉藤 琢])。

(vi) ニューロン分化能をマウス脳発生時期特異的に制御する分子機構の解析からポリコム遺伝子が関与することが明らかとなった。本成果は、iPS 細胞由来神経幹細胞から効率よくニューロンに分化させることに繋がると考えられる (後藤)。

#### ⑥ 患者由来iPS細胞等の保存・供給システムの整備・運営

iPS 細胞樹立に用いた細胞のソースおよび樹立した iPS 細胞を保存する東京大学ステムセルバンクを整備した (江藤)。業務の遂行に伴う種々の懸案事項、すなわち疾患特異的 iPS 細胞の樹立に伴う倫理的問題や学外協力機関との成果有体物の譲受に関わる知的財産の取り扱い等について適切に対処すべく、医科学研究所の倫理審査委員会、研究助成係を中心に拠点全体での協力体制を確立した (江藤、大津)。

#### ⑦ 知的財産戦略及び管理・活用体制強化

知的財産業務経験者 1 名の確保のもと当該専門職員が窓口となり、東京大学産学連携本部知的財産部、東京大学 TLO 等関連する部署との定期的な会議を設定し、iPS 細胞ネットワーク規約・運用ガイドラインに関する実務上の取り扱いについて協議するとともに、発明の速やかな知的財産化を可能とする協力体制を構築した (中内)。また、当該技術分野の関連特許や先行技術について、東京大学産学連携本部知的財産部の協力のもと、外部調査機関等を活用し効率的・効果的に実施できる体制を整備した (中内)。その活動の一環とし、本拠点事業のホームページ (再生医療実現化プロジェクト「ヒト iPS 細胞等研究拠点整備」東京大学 <http://www.ips-u-tokyo.org/index.html>) のメンバー専用ページに、文献・特許情報発信サービスのコーナーを設け、最新情報の提供を開始した。更に上記文献・特許情報をもとに iPS 細胞研究に関連する技術マップ、特許マップの作製に着手した (中内、小蒲)。

#### ⑧ 前臨床研究推進のための移行的研究の準備

(i) 多焦点 1 光子顕微鏡システムを改良し、1 個の血小板を成体内部で観察可能とする *in vivo* imaging システムの開発に成功した。さらにこれを応用し、レーザーにより血栓形成を誘発することで生体内血栓形成を評価する新規アッセイ系を構築し、免疫不全マウスをレシピエントとしてヒト iPS 細胞由来の血小板が、流動血内で正常な接着・止血機能を発揮する事を確認した (分担研究者、江藤の報告参照)。

(ii) 骨欠損ウサギモデル、軟骨欠損イヌモデルが骨・軟骨移植後の生体内機能評価系として適しているかの検証を開始した(高戸 [星 和人])。ビーグル犬を用いた軟骨欠損モデルでは自家組織由来細胞による軟骨再生が可能であることが示された (高戸 [星 和人]、図 7)。

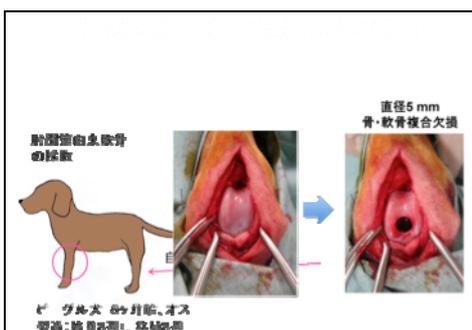


図 7：ビーグル犬を用いた軟骨欠損モデルの確立  
ビーグル犬を用いて軟骨欠損モデルを構築し、自家再生軟骨による組織修復を確認できた。

## ⑨ プロジェクトの総合的推進

(i) 上記の(1) 成果概要の ⑦その他 を参照。

(ii) H22 年度における拠点業務の効率化を目指した研究実施体制の整備を行った (追加資料 2 を参照)。

3. 課題全体の論文発表件数

146 件

4. 課題全体の特許出願件数

6 件 (うち国外 3 件)

5. 当初目標に対する達成度

個々の分担研究者の担当課題の達成度、拠点全体のプロジェクト推進の程度を総合的に判断し、およそ 90%の目標が達成されたと評価される。

6. 拠点内の情報共有・連携体制

iPS 細胞研究はその発展性や有用性が非常に広い領域であり、そのためにも研究が様々な方向に展開する可能性を秘めている。そこで東京大学においては、プロジェクト開始時においては、限られた領域に特化することなく広く研究参加者を招き入れ、幅広い研究を実施して頂き、その成果をプロジェクトの中間時点で適切に見直し、プロジェクト後半においては研究テーマの選択と集中を行う方針とした。この場合に懸念されるプロジェクト全体のまとまりの欠如への対策として、本プロジェクトではスタートと同時にリーダー会議ならびに拠点全体会議を定期的実施する方針を決め、時には合宿方式で議論を尽くすことで、東京大学の本プロジェクトにおける基本ポリシーの確認、目標の共有化、連携体制の維持に心がけてきた。またホームページ「ヒト iPS 細胞等研究拠点整備 東京大学」を立ち上げ、本プロジェクトの活動を外部に発信するとともに、当該ホームページを活用し、拠点内での緊密な連絡体制を整えると同時に、特許・文献の情報発信も行っている。これらの活動の成果として平成 22 年度より従来の研究体制を一新し、「再生医療の実現化推進」および「基盤技術」の二つの研究開発セクションに分けて組織化し、セクション内の各業務を各研究者が他の研究者との連携を強化しつつ遂行する体制に移行した (追加資料 2 を参照)。

7. 拠点外の課題との情報共有・連携

- ・ 疾患特異的 iPS 細胞の樹立および提供に関して、PO, PD の指導のもと、速やかな細胞の樹立と理化学研究所 BRC への細胞寄託を促進するための方策を協議すべく、他拠点研究者・実務者との合同会議が開催されている。本会議では各拠点の倫理担当研究者も参画し、プロジェクト内で統一的なシステムを構築する努力が継続されている。
- ・ 東京大学拠点では、九州大学・谷、成育医療センター・阿久津とそれぞれ共同研究を開始している。
- ・ 膝臓・膝島再生研究に関しても熊本大学・糸との間で既に情報共有・連携を開始している。

適宜各グループは、推進する事業計画において必要とする試薬およびデバイス等の新規の開発に関しては、民間企業と共同研究を推進中である。

8. 人材育成

iPS 細胞等関連研究は幹細胞研究のみにとどまらず、様々な科学技術分野のなかで活用される。この新しい融合領域を発展させるためには、研究の裾野を広げるとともに、将来当該分野で世界の第一線で活躍していただく人材を育てることが肝要である。そのような観点から東京大学拠点においては若手研究者の積極的参加をよびかけてきた。その結果プロジェクト参加研究者は、開始時とくらべ、現在 (2010 年 4 月末時点) で約 40 名増加しており、その大半は若手研究者が占めている。また iPS 細胞研究国際拠点人材養成制度を活用し、国内のみならず国外の若手研究者の養成にも取り組んできた。本制度を活

用して平成 20 年度は 2 名の日本人若手研究者の育成を行い、平成 21 年度は外国人 5 名を含む計 7 名の若手研究者育成を行っている。こういった若手人材育成の成果として、科学研究費「若手研究(A)」1 名、「若手研究(B)」3 名、日本学術振興会 優秀若手研究者海外派遣事業 1 名の輩出や、GCOE の特任助教から附属病院の特任助教に、また本学特任講師から他学の特任准教授にポストを得る若手研究者が出現している。また医科学研究所ならびに駒場地区において iPS 細胞培養技術講習会を開催し、ヒト iPS 細胞の培養技術普及と人材育成を行ってきた。

## 9. 生命倫理に係る対応

東京大学拠点では、ヒトを対象とした医学の研究および臨床応用についての医の倫理に関する事項をヘルシンキ宣言および行政指針の趣旨に添い審議することを目的とした倫理審査委員会が、医学部/大学院医学系研究科と医科学研究所に設置されている。本プロジェクトにかかわる以下の研究課題が、倫理審査委員会での承認を受けて実施されている。

### ● 平成 20 年度承認分

課題番号：主任研究者；研究課題（審査委員会での承認日、承認期間）

- ・ 20-5-0826：江藤 浩之 助教；先天性血小板異常症患者由来 iPS 細胞の樹立と患者由来 iPS 細胞を用いた根治療法の開発（H20. 8. 26、H20. 8. 26-H25. 3. 31）
- ・ 20-6-0826：金子 新 特任助教；抗原特異的 T 細胞由来 iPS 細胞による慢性 CMV 感染症治療法の開発（H20. 8. 26、H20. 8. 26-H25. 3. 31）
- ・ 20-7-0822：大津 真 助教；患者由来ヒト iPS 細胞を用いた先天性免疫不全症候群の根治療法の開発（H20. 8. 22、H20. 8. 22-H25. 3. 31）
- ・ 20-8-0111：紙谷 聡英 助教；iPS 細胞を用いた血友病治療法の開発（H21. 1. 11、H21. 1. 11-H25. 3. 31）

### ● 平成 21 年度承認分

課題番号：主任研究者；研究課題（審査委員会での承認日、承認期間）

- ・ 21-2-0609：辻 浩一郎 准教授；先天性骨髄不全症候群患者由来 iPS 細胞の樹立と患者由来 iPS 細胞を用いた病因・病態の解明と治療法の開発（H21. 6. 9、H21. 6. 9-H25. 3. 31）
- ・ 21-9-0618：江藤 浩之 特任准教授；難治性造血器疾患由来 iPS 細胞の樹立と iPS 細胞を用いた病態解析（H21. 6. 18、H21. 6. 18-H25. 3. 31）
- ・ 21-31-1013：辻 浩一郎 准教授；先天性好中球減少症患者由来 iPS 細胞の樹立と患者由来 iPS 細胞を用いた病因・病態の解明と治療法の開発（H21. 10. 13、H21. 10. 13-H25. 3. 31）
- ・ 21-49-0121：辻 浩一郎 准教授；ダウン症候群患者由来 iPS 細胞を用いたダウン症候群患者における造血障害の発症機序の解析と治療法の開発に関する研究（H22. 1. 21、H22. 1. 21-H25. 3. 31）

## 10. 今後の展望

新たな樹立法の確立、新たなソースの発見、培養法の至適化、iPS 細胞の性質に関するさらなる知見の蓄積、当拠点で推進するゲノム安定性評価系による異なるクローン間の比較等により総合的な判断が可能となり、人体への投与に適した iPS 細胞の樹立法、選別法等の決定、すなわち標準化の実現が期待される。それに見合う技術面、設備面の整備も同時に進め、臨床応用を可能にする高品質の iPS 細胞の樹立も実施可能となる。各標的細胞への分化誘導系に関しての技術的進歩に加え、自殺遺伝子導入等による安全性の付与を実現し、まずは血小板からの臨床応用を目指し、その後、各標的細胞ごとにリスク/ベネフィットアセスメントを慎重に行いながら順次、臨床応用を進めていくことが可能になると考えられる。

- ・ 技術移転を目的とした共同研究等の状況  
各研究分担者の報告票に記載のとおり。
- ・ 他分野の研究者に成果の活用を推進するための方策  
各研究分担者の報告票に記載のとおり。

## 1 1. 特記事項

- 1) 次世代遺伝子細胞治療法の開発に向けて、iPS 細胞由来の治療細胞の輸注時には腫瘍化のリスクを最小限に抑え安全性の担保を最優先すべきであるが、核を有さない血球細胞である血小板においては他の有核細胞に比較してそのリスクは格段に小さいと考えられる。そのため臨床応用に最も近い標的細胞であるとの認識のもと着実に成果を挙げており、業務課題の目標を確実に達成している。
- 2) 安全性の担保に関しては、実際の遺伝子治療臨床研究の経験者を複数有する利点から、自殺遺伝子システムの導入を積極的に考慮し、業務課題を遂行している。この技術は有核細胞を標的とする iPS 細胞の臨床応用にさらなる安全性を付与するために不可欠であり、他の拠点の臨床試験にも必ずや適用されうるシステムとして認識しており、重要課題と位置づけて業務の遂行を継続している。
- 3) 多チームによる研究協力体制に当初はまとまりの悪さを懸念する声も聞かれたが、拠点内での定期会議、リトリートを実施するなど、協調の強化に努めた結果、次年度以降により一層の成果が期待できる研究体制を構築するに至った。特に既に成果の出ているゲノム安定性の評価に関しては、当拠点特有の協力体制を十分に生かしたプロスペクティブスタディが既に立案・施行開始されており、このことも iPS 細胞の臨床応用に向けた安全性強化に大きく貢献すると考えられる。

## 1 2. 委託研究費一覧（東京大学全体）

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費（千円）	1,913	52,454	47,901	102,268
（補正予算分）	(131,940)	(189,067)	(0)	(321,007)
人件費（千円）	41,976	56,497	89,630	188,103
（補正予算分）	(0)	(0)	(0)	(0)
業務実施費（千円）	102,265	191,050	140,345	433,660
（補正予算分）	(21,907)	(31,104)	(0)	(53,011)
間接経費（千円）	43,846	90,000	83,363	217,209
（補正予算分）	(46,154)	(66,051)	(0)	(112,205)
合計（千円）	190,000	390,000	361,238	941,238
（補正予算分）	(200,000)	(286,222)	(0)	(486,222)

(別紙1) 各分担研究者の進捗状況

分 担 研 究 者 名	大津 真 (担当責任者)、中内 啓光、江藤 浩之、北村 俊雄、渡辺 すみ子、小川 誠司、菱川 慶一、道上 達男
業 務 項 目 名	iPS 細胞に関する標準化 (プラットフォーム事業の継続)
機 関 名	国立大学法人東京大学

1. 課題開始時における達成目標

- ① 末梢血液細胞など、非侵襲的に容易に採取できる細胞をソースにした iPS 細胞を樹立する技術を開発する。
- ② 無血清培地でのヒト iPS 細胞樹立法の開発をすすめる。
- ③ これら ①,② の技術をベースとし、iPS 細胞樹立時のソースの差異による iPS 細胞の特性を明らかにする。H21 年度に引き続き樹立法の選択肢を広げ、293GPG 細胞株に依存したレトロウィルスを用いた方法以外でもヒト末梢血から iPS 細胞の樹立が可能かを検証する。iPS 細胞の標準化を目的とし、染色体の核型や遺伝子の安定性、DNA メチル化状態 (Infinium 解析) などについて検証するための体制整備を行う。本 iPS 細胞標準化プラットフォーム技術構築において得られた成果については4拠点間で密接に連携・協議し、適切と判断されるクライテリアを選定することによって、標準化、品質管理の国内基準の制定を目指す。具体的には以下の業務 (i) ~ (iv) を行う。

(i) 表現型による評価:

- マウス ES 細胞およびマウスエピプラスト幹細胞を用いた細胞表面分子の探索および細胞の厳格な区別化・選別化にこれらが有効か否かの検証を継続する。ヒト iPS 細胞がマウスで言われている、所謂エピプラスト幹細胞であれば、ヒト iPS 細胞は厳密な意味での初期化が完全ではないといえるため、本研究をベースとしてマウス iPS 細胞と同等のより初期化が十分なヒト iPS 細胞の樹立を可能にするための技術基盤開発を開始する。
- iPS 細胞に発現する膜タンパク質や分泌タンパク質による表現型の評価について、H21 年度においてはヒト iPS 細胞のシグナルシーケンストラップ法により iPS 細胞とヒト ES 細胞に共通の3種類の分子を選定し、そのうちの一つを大量発現することで、iPS 細胞樹立効率の向上が認められる結果を得ており、そのメカニズムの詳細と当該因子を用いたさらなる iPS 細胞樹立効率の向上に向けて解析を行っていく。
- プラットフォーム構築における拠点間の共同作業として東大拠点 (医科研) と理研拠点 (神戸) が協力・分担して、未分化多能性幹細胞 (網膜、大脳細胞等の幹細胞を候補とする) の表現型における特性解析および分化細胞の特性解析を定量的に行うためのマーカー分子の探索とそれを利用した分離・同定法の開発を行う。同様に大阪大学及び東京女子医科大学が推進する角膜幹細胞の表現型における評価の一環として、純化および iPS 細胞からの角膜への分化を促進するための開発に協力する。表面マーカー分子の探索には、既知および新規の表面タンパクを認識する抗体の探索や作製を組み合わせる。それにより、特性解析の客観化に資する技術の標準化を目標とし、他拠点への貢献を目指す。

(ii) 分化能による評価:

- H22 年度では本拠点で遂行する各種の分化系において、目的細胞に効率よく分化できる iPS 細胞株を選別する指標・方法を開発する研究を開始する。機能性赤血球の分化に関しては、理研拠点・中村とも連携して評価を行う体制を目指す。ニューロン分化に関しては、理研拠点・笹井と連携する体制を整える。また、iPS 細胞樹立に用いる細胞ソースの差異に基づく“細胞記憶”の検証に関しては、遺伝子解析を京大拠点・山中と協力・分担して遂行する。

(iii) ゲノム (DNA) 解析による細胞の評価:

- 高密度 SNP アレイを用いて、iPS 細胞の多型プロファイルを決定するとともに、得られたアレイシグナルを詳細に解析する。これによりゲノムコピー数の変異、アレル不均衡、コピー数多型の変化を詳細に解析し、iPS 細胞のゲノムの経時的变化、iPS 細胞の樹立方法、樹立ソースの差異等に起因するゲノム安定性に及ぼす影響を評価する。以上の評価結果を基に各拠点で樹立・維持される iPS 細胞および iPS 細胞バンクに寄託される iPS 細胞の供与を受けて、可能な限りの iPS 細胞株におけるゲノム異常の解析を行うとともに、拠点間での情報の共有・共通化を目指す。さらに H22 年度は、新規の業務項目「②樹立された iPS 細胞の各種長期培養におけるプロスペクティブなゲノム安定性の総合的評価」として実施していく。

(iv) iPS 細胞の microRNA 解析:

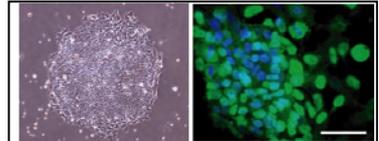
- H22 年度は、iPS 細胞株毎に発現している microRNA の特異性、動物種による比較などを in silico

で行なう。さらに焦点を絞って、特定の microRNA について iPS 細胞における発現を未分化、分化状態で確認した後、未分化性維持、分化能での役割を過剰発現系、発現抑制系に基づいた検証を開始する。さらに iPS 細胞作製過程においてその発現量を制御する事でより作製の効率化が可能かどうかを検討する。

## 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 末梢血液細胞など、非侵襲的に容易に採取できる細胞をソースにした iPS 細胞を樹立する技術の開発
  - マウス骨髄細胞への遺伝子導入により iPS 細胞を樹立し、学術誌に報告した (大津)。
  - 独自のウイルスシステムを用いてヒト皮膚細胞、骨髄ストローマ細胞、臍帯血、末梢血からの iPS 細胞樹立技術を確立した (大津、江藤、中内)。
- ② 無血清培地でのヒト iPS 細胞樹立法の開発
  - 成分が全て公開されている無血清・無フィーダー培養を用いてヒト iPS 細胞の樹立に成功した。また、無血清・無フィーダー培養で自己複製能と分化多能性を維持したまま長期培養できる事、更に異種抗原の混入がほぼ無くなることも確認した (道上、H22 年度より; 大沼、H20-21 年度まで担当)。
  - 合成ハイドロゲルを用いた3次元培養は、継代に際してトリプシンやコラゲナーゼを必要とせず、細胞に対する障害が少ないことが予想されたが、平成21年度における各種解析の結果、従来型の feeder 培養よりもゲノム安定性維持に優れている事が明らかとなった(菱川)。
- ③ 本 iPS 細胞標準化プラットフォーム技術構築において得られた成果について標準化、品質管理の国内基準の制定



無血清・無フィーダ培養による未分化性の維持(ヒト iPS 細胞、左)と、膵臓β細胞方向への分化誘導の最初期マーカー(Brachyury)の一致した発現(ヒト ES 細胞、右)。

#### (i) 表現型による評価

樹立されたマウス iPS 細胞の未分化性の指標、また樹立過程におけるマウス iPS 細胞の選別に有用な細胞表面マーカーを見出したが (中内)、エピプラスト幹細胞様であるヒト iPS 細胞への適応が可能かは確認できなかった (中内)。また Signal sequence trap 法によりヒト iPS 細胞に特異的な膜表面分子3種を新規に同定した。そのうちの1種は、初期化因子 (山中ファクター) に追加することで iPS 細胞の樹立効率を上昇させた (北村)。

#### (ii) 分化能による評価 :

様々なヒト iPS 細胞株をソースとし、血小板産生を指標とした血球分化能による選別を行い、ヒト iPS 細胞株を選別する評価系モデルを樹立した (江藤)。

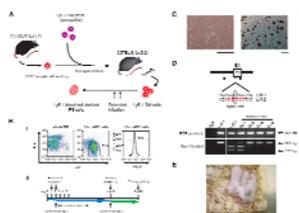
#### (iii) ゲノム (DNA) 解析による細胞の評価 :

詳細は “ゲノム安定性のプロスペクティブスタディ” に記載。

#### (iv) iPS 細胞の microRNA 解析 :

mRAP 法による iPS 細胞の microRNA の網羅的解析を行い、各種ヒト iPS 細胞株でのデータベースを構築した。今後 iPS 細胞のバリデーションに有効かどうかの検証を行うための重要な指標になる (渡辺)。

### (2) 研究の進捗及び成果



- マウス骨髄細胞に上述のウイルスシステムを用いて遺伝子導入を行い、世界に先駆けてマウス造血前駆細胞由来 iPS 細胞の樹立に成功した。さらに、ただ1個の造血幹細胞により造血を再構築したマウスを用いることで、樹立した iPS 細胞の由来が血球細胞によることもあわせて証明し、学術誌に成果を報告した (*Blood*, 114: 1764-1767, 2009) (大津)。
  - 独自のウイルスシステムを用いてヒト体細胞に関しての iPS 細胞樹立法を至適化し、初代培養皮膚細胞、骨髄ストローマ細胞、血液 CD34 陽性細胞 (投稿中)、T 細胞からの iPS 細胞の樹立 (投稿中)に成功した (大津、江藤、中内)。
  - 無血清培養によるヒト iPS 細胞の未分化性維持を可能にした (道上、大沼)。
- 本研究課題は、平成21年度の実施計画の「① iPS 細胞に関する標準化」「④ iPS 細胞樹立のための新しい基盤技術と iPS 細胞の安全性強化技術の開発」の一部として推進した。大沼らの無血清・無フィーダー培養法は、培地の組成、添加物の組成が全て公開されており、類似の培地に比べて使用している物質の種類が少なくほぼ最小培地であるため (Furue, PNAS, 2007)、様々な分化誘導因子への応答などを非常にダイレクトに観察することができる上、安全性も高いことが期待される。京大ヒト iPS 細胞株

3株(201B6、201B7、253G1)がこの無血清・無フィーダー培養法で短期的に(約10日、2継代)培養できることを確認後、DNAマイクロアレイにより未分化性を表す各種マーカーの発現がある事も確認した。

また東大独自の方法によるヒトiPS細胞の樹立も行い、無血清・無フィーダ培養を最初から用いてヒトiPS細胞の樹立に成功した。免疫染色や増殖アッセイによる自己複製能のテスト、胚葉体(EB)作製や奇形腫(テラトーマ)の形成などの分化多能性テストをした結果、自ら樹立したヒトiPS細胞は、無血清・無フィーダー培養の前後で同じ様に自己複製能と分化多能性を持つことが示された。マウスES細胞を用いた研究では、プロテオミクス解析に分化多能性を制御する因子として、TIF1 $\beta$ を同定し、その作用機構も解析した(論文発表済み)。更に、他拠点との交流の一つとして、個別研究課題である東工大の赤池教授と共同研究を行い、E-カドヘリンでコートした培養皿の上でマウスES細胞を無血清・無フィーダー培養でき、1細胞ずつ分散して培養できることも確かめた。

- 合成ハイドロゲルを用いた培養法の確立(菱川)

“iPS細胞の臨床応用における安全性強化技術の確立”に詳細を記載

- iPS細胞特異的な抗原の同定(北村)

SST-REXを行い、iPS細胞特異的な抗原を数十種同定した。その概要は以下の表のとおりである。

またこれらの抗原については、細胞カタログ化されて抗体作成などの応用が可能なりサーチツールとなっている。

### SST Clones from iPS cells

#### Secreted protein

- Osteopontin
- Granulin
- Collagen type I alpha1
- Collagen type XVIII alpha1
- Collagen type VI alpha 1,2
- ADAMTS4
- Serin peptidase inhibitor Kunitz type 1
- Follistatin like 1
- Plasticity-related gene 2
- carboxypeptidase X (M14 family), member 1

#### Golgi/ER protein

- Procollagen-proline, 2-oxyglutarate 4-dioxygenase
- Calreticulin
- Golgi apparatus protein 1
- PDIA4
- Contactin 1 variant2
- DDOS
- Protein disulfide isomerase A3

#### Transmembrane protein

- B7-H3(CD276)
- JAM-A(F11R)
- Amyloid beta precursor protein
- Podocalyxin-like 1
- AMP4
- SLC25A44
- ICAM3 variant2
- Nodal modulator 2 variant 2
- Protein tyrosine phosphatase, receptor type F
- FGF receptor 1
- immunoglobulin superfamily 3
- Syndecan-1
- Thy-1
- Tese ty homolog-3
- CD24
- E-cadherin

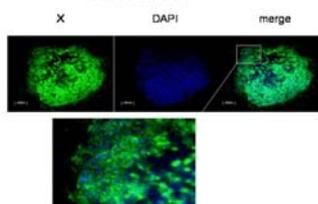
- iPS細胞特異的な抗体4種(抗原3種)の作成(北村)

上記で同定された抗原のうち、非常なiPS細胞特異的と考えられたX,Y,Zの3種の抗原につき、抗体を作製。iPS細胞特異的な免疫染色などに応用可能であることが証明された。

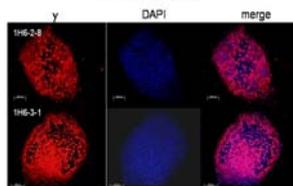
我々の開発した画期的な膜及び分泌蛋白同定法であるシグナルシーケンストラップ法SST-REXを用い、iPS細胞特異的な表面抗原を網羅的な検索を行った。現時点で600クローンをスクリーニングし、そのうち

- 1) 40種類のiPS細胞特異的な表面抗原を同定し、
- 2) そのうち特異性の高い3種について、モノクローナル抗体を作成した。この抗体は、iPS細胞を特異的に染色することが可能であるとともに、より未分化な部分をdimに、少し分化した部分の一部の細胞をhighに染色することが判明した。このような知見はこれらの抗体が、単にiPS細胞の同定や濃縮だけの機能に留まらず、iPS細胞の未分化性の解析などにも応用が可能であることを示している。さらにこれら3種について大量発現やshRNAなどの系を用いてiPS細胞特異的な表面抗原とリプログラミング機構に対する影響を検討しており、その中でも
- 3) 分子Xはリプログラミング効率を増強することが判明した。

#### Anti-X Ab



#### Anti-Y antibody



#### Anti-Z antibody



- iPS細胞の標準化、品質管理に必要な分化能による評価系の確立

様々なヒトiPS細胞株をソースとし、血小板産生を指標とした血球分化能による選別を行い、ヒトiPS

細胞株を選別する評価系モデルを樹立した（江藤、図5）。

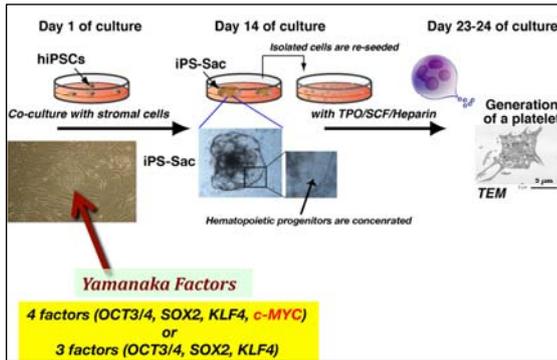


図5：ヒト iPS 細胞からの iPS-Sac(造血前駆細胞が濃縮される構造体) およびその後の血小板産生培養系を示す。iPS 細胞は4因子あるいは3因子の初期化遺伝子を用いて皮膚線維芽細胞から樹立した。血小板前駆細胞である巨核球への分化段階において再活性化される初期化遺伝子の活性化レベルが血小板産生効率において重要な事になった。

● iPS 細胞の microRNA 解析 (渡辺)

平成 21 年度以降の進捗状況および成果

microRNA の iPS 細胞での役割：microRNA の生合成過程において、必須の役割を果たす endoribonuclease である Dicer の flox-mouse の tail から fibroblast を培養系し、ここにレトロウイルスで4因子をいれ iPS 細胞を複数株樹立した。ここに Cre-IRES-EGFP 遺伝子をレトロウイルス、あるいは市販のトランスフェクション用試薬により導入し、ソーターで Cre の発現している細胞を精製して、そのコロニーについて検討を加えた。その結果、microRNA は iPS 細胞の増殖、未分化性維持に必須であることがあきらかになった。

mRAP 法を用いた iPS 細胞特異的 microRNA の検索：mRAP は自治医大間野らによって開発された microRNA の発現を網羅的に解析する新しい手法である。Total RNA から microRNA をサイズによって分離し、これにアダプター、リンカーなどをつけてライブラリー化し、次世代型シーケンサーによりすべてをシーケンスする。その後、配列をバイオインフォーマティクスにより解析し、全種類の microRNA についてその種類と頻度をあきらかにするという手法である。間野らはこの手法によりマウスのさまざまな臓器、さまざまな発生段階の embryo の全 microRNA を解析し、ボディマップとしてデータベース化した。我々はまずこの方法で予備的実験としてゼブラフィッシュ embryo から mRAP ライブラリーを作製し、シーケンズ解析し、この手法の有効性を確認した。次に、ヒト、マウスそれぞれから mRAP ライブラリーを作製しシーケンズ解析した。

iPS 細胞に発現する microRNA：数十万配列(リード)を解析した結果、マウスでは5種類の microRNA が99.9%以上のリード数をしめ、ヒトでは3種類の microRNA が99.9%のリード数をしめることがあきらかになった。ヒトで見いだされた3種類はマウスの5種類のなかに含まれていた。ES 細胞では過去の研究からやはりきわめて限られた種類の microRNA、mi290-295 のクラスター、mi302、が発現していることが知られている。しかし興味深い事にこれらの ES 特異的 miRNA のいずれも iPS 細胞では発現していなかった。

iPS 細胞特異的 microRNA の他の組織での発現：ヒト、マウスを通じて5種類の microRNA について、4種類についてはすでに作製した body map で発現が解析されていた。これによると、発生段階、成熟した組織中で Ovary のみに発現が観察されるものが2種、血液系の臓器でのみ発現がみとめられるものが1種、広く臓器に発現しているものが1種であった。

分化した iPS 細胞での microRNA の発現：ヒト、マウスの iPS 細胞を embryoid body を作製し、SSEA-1(4)陰性細胞をソーターで分画し、今回同定した microRNA の発現を qPCR で検討したところ、いずれもほとんど発現が消失しており、一種のみ数十%の減少が観察され、今回同定した miRNA はすべて未分化 iPS 細胞特異的である事があきらかになった。

同定した microRNA の iPS 細胞中での一般性：マウスの tail tip fibroblast, MEF から樹立した iPS 細胞について、今回同定した microRNA の発現を検討したところ、同様に高く発現している事があきらかになり、特定の iPS 細胞のみならず共通して発現している事があきらかになった。

機能解析：これらの microRNA の機能解析のために、過剰発現ベクター、機能抑制のための decoy ベクターをすべてについて作製した。

同定した iPS 細胞の標的についての検討：種々のソフトウェアを用いて標的の解析を行なっているが多数の候補があり、整理して考えていく必要がある。

3. 課題全体の論文発表件数	中内分を参照
4. 課題全体の特許出願件数	中内分を参照
5. 当初目標に対する達成度	
● 汎用性の高いレトロウイルスベクターを用いた iPS 細胞の樹立システムの構築に成功し、さらにそれを用いて従来法では困難であった種々の血液細胞からの iPS 細胞の樹立にも成功している。また	

いくつかの疾患特異的 iPS 細胞の樹立も達成している。遺伝子挿入を伴わない iPS 細胞樹立法の確立も次年度中には確実に達成される見通しであり当初の目標を達成していると判断される。それらを考慮に入れ総合達成度を 80%と評価する（大津）。

- 70%（疾患特異的 iPS 細胞の提供は未だであるが、それ以外の目標に関しては達成できている）（江藤）
- 無血清培養によるヒト iPS 細胞の未分化維持と、膵臓方向への分化誘導の研究はほぼ予定通りに進んでおり 2 年間で進める予定のほぼ 100% を達成できたと考えている（大沼、道上）。
- 本年度前半までに高密度 SNP アレイを用いた iPS 細胞におけるゲノム変異の解析の解析技術の確立とその性能評価を行うことができた。また、後方視的な検討であるものの、42 種類の iPS 細胞ゲノムについて同技術を用いたゲノムワイドな解析を通じて、継体培養にともなう iPS 細胞に一定の頻度でゲノムの変化が生ずることを明らかにすることが出来た。また、継体回数とゲノム異常の出現頻度の相関およびゲノム異常の標的遺伝子座についても重要な示唆がえられた。また、一連の解析試料の収集を通じて拠点内、および拠点間の協力体制が確立されたことは、今後の前方視的な解析を進める上で極めて大きな成果であった。以上より中間的な評価としては、これまでの研究によって事業の目標は十分達成されたと考えている（小川）。
- 着実に目標を達成しつつある（渡辺）。
- 当初目標のうち 1) iPS 細胞の表面抗原の同定と 2) その抗体作成については、達成できており、プロジェクトの進行としては順調といえる（北村）。

## 6. 今後の展望

### ● 大津分

平成 22 年度：遺伝子挿入を伴わない iPS 細胞の樹立法をさらに至適化し完成を目指す。遺伝子挿入を伴う iPS 細胞に関してもその安全性を担保する方法についての検討を継続する。

平成 23 年度：22 年度の課題から臨床応用に適すると判断される方法について、臨床グレードに準じた操作手技への移行を開始する。ゲノム安定性の検討を継続し、さらなる安全性の担保を図る。

平成 24 年度：臨床グレードに準じた方法での疾患特異的 iPS 細胞を樹立する。同様に臨床グレードの操作手技による自殺遺伝子導入を行い、**risk/benefit assessment** より人体への投与が可能と判断される iPS 細胞クローンの樹立を目指す。

他分野の研究者に成果の活用を推進するための方策

iPS 細胞研究の裾野の拡大は、我が国における iPS 細胞研究が世界との競争に打ち勝つために不可欠と考え、今後も当該研究者らの確立した、または今後さらに改良される iPS 細胞樹立法の工学系、農学系、薬学系など他分野の研究者への積極的な分与を継続する。

### ● 江藤分

1) ヒト iPS 細胞の臨床応用実現化に関しては、iPS 細胞から誘導する血小板が有望である。血小板、赤血球は細胞核が無く、輸血前放射線照射がルーチンとして行われていることから生体内への未分化 iPS 細胞の持ち込みを未然に防ぐことが可能であり、奇形腫（および悪性腫瘍）の発生を回避でき早期の臨床治験が期待される。今後は、「高効率での機能性血小板を産生させる技術開発」の更なる発展が必要であり、他大学工学系研究者らとの共同研究による新規の血小板産生デバイス開発を開始した。この技術は、将来的に企業への技術移転による商業化ベースに直結すると想定できる。

2) 37°C での培養条件下で産生される血小板の機能は維持できないことを既に明らかにした（Nishikii, Eto et al., *J Exp Med* 205:1917-27, 2008）。そこでヒト iPS 細胞から培養により産生する血小板の機能を維持するための血小板不活性化阻害薬剤（生体内で毒性を呈せず、かつ標的分子への特異性が高いもの）を開発し、早期の臨床治験に入るように準備を開始する。

平成 22 年度～平成 24 年度の研究計画

- 1) 血小板不活性化のための薬剤の開発（上記）とその効能・安全性の解析
- 2) 血小板産生デバイスを使用した大量培養システムの実現化
- 3) 臨床治験に向けた PMDA および米国 FDA との事前交渉の開始（pre-IND の開始）
- 4) iPS 細胞樹立のための細胞ソース（源）の差異に基づく分化細胞のポテンシャル解析とその分子機構解明
- 5) 現在樹立中、今後計画している複数の疾患特異的 iPS 細胞株の特性解析および理化学研究所への細胞寄託作業の推進

### ● 北村分

iPS 細胞の特異的抗原分子のスクリーニングの結果見出された 3 つの因子について、特異的抗体を作成し、またその染色性は、より未分化な部分を **dim** に、少し分化した部分の一部の細胞を **high** に染色することが判明した。今後はこうした抗体を使い、iPS 細胞の濃縮、iPS 細胞の標準化、より有用な iPS 細胞の同定のための技術として発展させていきたい。また抗体については、**characterization** や

iPS 細胞での機能評価が進み次第、特許申請を行い、技術移転やリサーチツールとしての利用が可能な状態とする予定である。また同定した特異抗原そのうちの一つを大量発現することで、iPS 細胞樹立効率の向上が認められる結果を得ており、そのメカニズムの詳細の解析と特異抗体を利用してさらなる樹立効率の向上に向けて解析を行っていく予定である。さらに既存の抗体を利用した iPS 細胞の樹立効率の改善についても我々は注目しており、JAK-STAT 系を研究してきた経験から、中でも STAT3 が関与する LIF 受容体である GP130 シグナルの抗体による制御に特に注目している。今後抗体を用いた GP130 シグナル制御のパイロットスタディとして STAT3 の恒常的活性化型変異体などを用いた解析を行うとともに、抗体による iPS 細胞樹立の効率化が図れるか検討したい。

また今回利用した SST-REX は iPS 細胞での抗原解析に非常に有用であることが判明したが、iPS 細胞以外でも、網膜前駆細胞など characterize の進んでいない細胞にも応用可能であり、再生医療に必要な細胞の解析に、共同研究などを通しぜひ利用していただきたい。

#### ● 渡辺分

今回同定した microRNA について、その過剰発現、機能抑制を単独にあるいは組み合わせて今後行なっていく。その際、Dicer-KO-iPS 細胞も使い、iPS 細胞の機能維持、作製過程、分化過程のすべてについて、ヒト、マウスを用いて行なっていく。これらの一連の検討により

- ヒト、マウスの iPS 細胞の性質の違いを明らかにする手段のひとつとなる
- iPS 細胞作製効率をこれらの microRNA を用いて向上することが出来る可能性が高い
- iPS 細胞からの分化効率、あるいは分化過程の速度の制御、特定の細胞系譜への分化

などが microRNA の制御を行なう事で可能になる可能性が高い。

さらに標的細胞の検討を詳細に行なっていく事で、iPS 細胞の biology についての基礎研究：初期化の問題、未分化性維持機構の問題など、についても手掛かりを与えていく事が期待される。

技術移転を目的とした共同研究：現在は mRAP の技術をこちらに移転するために自治医大間野グループと共同研究を展開している。未発表の microRNA ライブラリーデータを共有し、比較する事で組織特異性などの点からの検討を行なっている。

今後行なう予定の microarray については東大先端研との共同研究である。

また分化制御については我々自身は特に網膜に注目し、神戸理研の高橋政代先生グループと共同研究にて展開する予定である。また他の系列への分化系については適宜共同研究によって展開する。

今後、特許申請などの可能性を検討した上で、公表できる時期にはなるべく早く公表し、データベースとして関連研究者が利用できるような体制をとる事を検討している。

平成 22-24 年度の研究計画

microRNA の iPS 維持における役割の検討：Dicer-KO-iPS 細胞株は未分化性を維持する事ができず、また増殖能が非常に遅い。ここに同定した microRNA を強制発現させ、それにより回復するかどうかを検討する。またその際、発現前、後での遺伝子発現パターンを microarray によって解析する。同様に通常の iPS 細胞でこれらの microRNA の機能を抑制しその影響を検討する。

microRNA の iPS 樹立における役割の検討：これまで iPS を樹立しているさまざまな細胞ソースについて、今回同定した microRNA の発現を検討する。その上で、そこに今回の microRNA を強制発現させた時に iPS の誘導が可能か、効率があがるか、などの検討を行なう。必要に応じて 4 因子のいずれかとの組み合わせ実験を行なう。

microRNA の分化への影響：iPS からさまざまな細胞系への文化系、特に我々の手では神戸理研高橋政代グループとの共同にて網膜への分化系、における microRNA の役割を検討する。具体的には網膜分化途中での microRNA の発現を検討し、分化プロトコール中でこれらの microRNA の強制発現、機能抑制を行い、その分化効率、細胞系譜の制御への影響を検討する。この場合も必要に応じて microarray で遺伝子発現パターンを検討する。

microRNA の標的遺伝子の検討：さまざまなソフトウェアから標的となる遺伝子の検索を行い、この可能性について、iPS の遺伝子発現パターン、あるいはあらたにとる microarray のデータから検討を行い、microRNA の機能のメカニズムを遺伝子発現制御の点からあきらかにしていく。

microRNA の iPS の評価、品質管理としての利用：これまでのところ今回同定した microRNA の発現は複数の細胞株に共通して見いだされたため、iPS の指標として使えるものの、微細なレベルでの評価にもちいることが可能かどうかは現段階では疑問である。今後発現レベルを詳細に解析し、複数株間での発現レベルの差異、と性質の違いに関連があるのかどうか検討して、microRNA の iPS の品質管理の道具としての利用を検討していく。

#### ● 小川分

“ゲノム安定性のプロスペクティブスタディ”を参照。

#### ● 大沼・道上分

ヒト iPS 細胞の樹立・増殖から膵臓β細胞の作製、更には移植後の有効性・安全性の確認をすることにより、臨床応用が可能な効率が良くかつ安全な系の確立を目指す。

- (1) より安定かつ安全な培養法の確立。拠点メンバーや成育医療センターの阿久津らと共同し、ヒトフィーダーの利用や継代法の検討など培養法の改良を行うと同時に、プロスペクティブなゲ

ノム安定性の解析も推進する。複数のヒト iPS 細胞株を用い、一般に用いられる KSR とマウスフィーダを用いる培養と無血清培養とを比較し、染色体異常がどの程度変化するかなどについて中長期的にテストする。

(2) 膵臓β細胞への分化に関しては、ヒト ES 細胞の系も利用しながら、様々な培養法の比較検討を行うことにより、安全でかつ効率の良い分化誘導法の確率を目指す。具体的には、①複数のヒト iPS 細胞株について分化実験を行い、誘導効率の差が生じるかどうか、検討を行う。②分化方法の検討を行い、膵臓β細胞方向への分化マーカーの発現細胞の誘導効率の比較を行い、より良い分化条件を探す。

(3) 生体内での有効性・安全性のテスト。分化誘導した膵臓β細胞をモデル動物へ移植して機能性・安全性のテストを行う。具体的には、東大・分生研の宮島らと共同研究を継続し、ヒト ES・iPS 細胞より無血清を含む様々な条件で膵臓β細胞へ分化誘導して、免疫不全マウス等のモデル動物へと移植して細胞の生着や機能や腫瘍形成を確認し、臨床応用が可能な系の確率を目指す。

無血清培養技術は様々なアッセイ系や工学技術とも相性が良いため、現在マイクロ加工技術を持つ研究者などの理工系へ技術転移して新規のマイクロデバイスの開発へ向けた共同研究も開始している。

## 7. 特記事項

- 遺伝子挿入を伴わない iPS 細胞の樹立法に関しても実用化を目指して研究を継続しているが、現在のところ疾患特異的 iPS 細胞の樹立、特に血液細胞からの iPS 細胞の樹立にはレトロウイルスベクターによる方法が効率、再現性の面からも有利である。当該研究者らの確立したウイルスベクターシステムは、操作性、効率面でも優れており、現在までに国内の多数の研究者へ配布を行っており、iPS 細胞研究の普及、裾野の拡大への貢献度は高いと考えられる（大津）。
- ヒト ES 細胞からの造血培養システムの開発（Takayama, Eto, et al., *Blood* 111:5298-5306, 2008）はその後ヒト iPS 細胞への応用が可能となり、様々な血液細胞を誘導できることが証明されつつある。具体的には、上記の血小板以外にも、赤血球（江藤 G、高山ら）および T リンパ球（中内 G、金子ら）がヒト iPS 細胞から本培養システムによって高効率で誘導可能であり再生医療の実現化に向けたベースとなっている。2）H20 年末から分担研究者として参加し、東京大学拠点における疾患特異的 iPS 細胞の樹立および細胞提供、それらに関する倫理関連の事務、細胞培養技術講習会、トレーニングの提供の責任者、東京大学拠点の事務局としての業務（計画書作成、報告書作成）を大津真と共にを行った（江藤）。
- 1）我々のレトロウイルスシステムとその iPS 技術への応用について以下のレビューを発表した。  
「iPS 細胞作成におけるウイルスベクターの役割と問題点」臨床検査 53 (2) 231-35, 2009  
「iPS 細胞と発現ベクター」細胞工学 28(3) 209-13, 2009  
2）研究成果について以下の学会で発表した。  
第 8 回幹細胞シンポジウム、2010 年 5 月 13-15 日、淡路島、P25（北村）
- すでに ES 細胞では microRNA に関する論文がいくつか発表されており、極めて限られた microRNA が発現している事が明らかであったので、我々の研究もその知見を追従する可能性が高いと考えていたが、実際は ES 細胞とはまったく異なる種類の microRNA が同定され、またマウスとヒトとでは共通点があるものの異なる microRNA が同定されたため、ES 細胞と iPS 細胞の性質の違い、ヒトとマウスの iPS 細胞の性質の違いに示唆をあたえる興味深い結果となった。これらの microRNA の情報は iPS 細胞の biology の理解に大きな寄与するのみならず、iPS 細胞の作製、その利用にとっても重要な知見となり技術革新への重要な手がかりになると期待される（渡辺）。
- 無血清・無フィーダーによるヒト iPS 細胞の樹立は日本初であると思われる。無血清・無フィーダーでのヒト iPS 細胞の樹立、未分化性維持、安全性、分化誘導を一貫して研究している処は他にはない（大沼・道上）。

## 8. 委託研究費一覧

※別紙 1 の最後のページの各分担研究者委託研究費一覧を参照

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費（千円）				
人件費（千円）				
業務実施費（千円）				
間接経費（千円）				
合計（千円）				

(別紙1) 各分担研究者の進捗状況

分 担 研 究 者 名	大津 真 (担当責任者)、中内 啓光、小川 誠司、菱川 慶一、道上 達男
業 務 項 目 名	iPS 細胞の臨床応用における安全性強化技術の確立
機 関 名	国立大学法人東京大学

1. 課題開始時における達成目標

(H22 年度の業務計画書に記載の業務課題 “iPS 細胞の臨床応用における安全性強化技術の確立” に対応する形で記載)

臨床応用に向けた iPS 細胞樹立のための新しい基盤技術と iPS 細胞の安全性強化技術の開発を一層推進するため、以下の業務を推進する。

- (i) H22 年度は iPS 細胞用に確立したウイルス産生株を臨床応用に提供できることを目指したマスターセルバンク化を試み、GMP グレードに準拠したウイルスベクターを調製確保できる体制を立ち上げる。医科学研究所内の治療開発ベクター室と協力して、GMP グレードに準拠したヒト iPS 細胞を樹立する体制整備を開始する。
- (ii) H22 年度は、簡便な培養法の確立を目的として各種のヒト組織由来フィーダー培養を用いた培養法等を試み、ヒト iPS 細胞の未分化維持培養技術の確立および iPS 細胞をソースとした分化培養系への応用を目指す。また未分化維持培養に関する十分なデータが得られれば、ヒトフィーダー細胞に関してはウイルス産生株同様にマスターセルバンク化を目指す。
- (iii) 臨床応用に用いられる iPS 細胞の体外操作には、トレーサビリティを重視した GMP 基準に準拠した設備や手順、管理体制が求められる。具体的には、採取した iPS 細胞樹立用ソースへの遺伝子導入から iPS 細胞樹立、そして分化誘導と患者投与前調製までの各ステップを無菌の閉鎖系もしくは半閉鎖系で行える中規模培養システムを備えた設備の準備と大量培養への展開が現実的であるかを検証することが必要である。以上の検証のための体制整備を開始する。
- (iv) 体外および体内において分化抵抗性 iPS 細胞を排除する細胞死誘導システムの開発を引き続き継続する。また、iPS 細胞由来分化細胞の予期せぬ挙動 (腫瘍化など) にも対応するために、移植した分化細胞を in vivo で随意に排除することが可能なシステムを開発する。H21 年度に得られた非特異的プロモーターでの細胞死制御技術を基に H22 年度は、未分化細胞特異的プロモーターによる自殺遺伝子の発現制御技術の開発を継続し、また第 2 の薬剤を併用することで iPS 細胞由来の分化細胞にも細胞死を随意に誘導する技術の開発を行う。同 iPS 細胞を移植したモデル動物体内での自殺遺伝子発現による奇形腫発生防止システムの検証を行うとともに、上記の細胞死誘導システムを導入したヒト iPS 細胞を NOD/SCID および NOG マウスに移植し、動物モデル内での分化抵抗性ヒト iPS 細胞による奇形腫発生制御の可能性を検討する。

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

- (i) GMP グレードに準拠したヒト iPS 細胞を樹立する体制整備
  - ヒト iPS 細胞樹立に適した高力価レトロウイルスベクター生産システムの中核となるウイルス産生安定株を樹立した。本システムによりウイルスの凍結保存が容易になり、iPS 細胞樹立工程の効率化および疾患特異的 iPS 細胞の樹立促進が実現している (大津、中内)。
- (ii) 異種由来や組成の不明な培養媒体が混在しない iPS 細胞の樹立・維持方法の確立
  - H20~21 年度の業務において、無血清、無フィーダー、合成ハイドロゲル等によるヒト ES 細胞の未分化維持培養技術がヒト iPS 細胞において適用可能であることを確認した (菱川、大沼、道上、小川)。
- (iii) iPS 細胞樹立用ソースへの遺伝子導入から iPS 細胞樹立、そして分化誘導と患者投与前調製までの各ステップを無菌の閉鎖系もしくは半閉鎖系で行える中規模培養システム
  - iPS 細胞樹立・分化手技の GMP 準拠化は H22 年度以降の業務課題であり、「成果概要」に記載すべき事項に該当しない。

(iv) 体外および体内において分化抵抗性 iPS 細胞を排除する細胞死誘導システムの開発

- HSV-TK 遺伝子を iPS 細胞に導入し、マウスをモデルとして奇形腫の発生を予防するシステムの有効性を証明した (大津、中内)。

## (2) 研究の進捗及び成果

- 293GPG ウイルス産生細胞株を用いた iPS 細胞樹立法の確立 (大津、中内)



iPS 細胞を誘導する因子を標的細胞に導入するために用いるレトロウイルスベクターの産生は煩雑であり、得られる iPS 細胞の誘導効率は術者の技術差に影響されやすい。当該研究者らは、以前から造血幹細胞研究に用いてきた、培養操作だけで再現性よく安定してウイルス液の採取が可能になるウイルス産生株を用いたシステム (*J Gene Med.* 10: 965-971, 2008) を iPS 細胞樹立に応用することに成功した。これにより得られたウイルス液は濃縮による高効率の遺伝子導入と、長期にわたる凍結保存とを可能にする。これを用いることで、どの施設でも一律の遺伝子導入操作が可能となり、また皮膚細胞のみならず通常では樹立の困難な造血幹前駆細胞、T リンパ球などの血液細胞からの iPS 細胞樹立も可能となった。ウイルス産生株、ウイルス上清は国内他研究施設 10ヶ所以上へ供与を行った。

- 無血清・無フィーダーの培養技術の確立 (大沼、道上)

詳細は“iPS 細胞の標準化”に記載

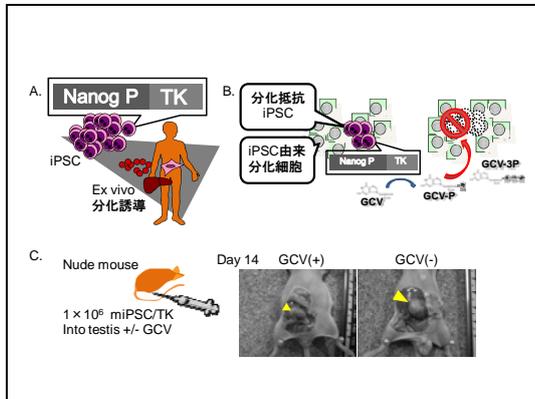
- 合成ハイドロゲルによる培養技術 (菱川)

平成 20 年度においては、これまでカニクイザルで成功した合成ハイドロゲルを用いた 3 次元培養条件がヒト ES 細胞に応用できるか検証し、確認を得た。平成 21 年度ではこの培養条件のヒト iPS 細胞への応用を試みた。業務開始時点では、ヒト iPS 細胞の未分化性維持、細胞増殖の効率化に主眼を置いていたが、東大拠点内で継代培養によるヒト iPS 細胞のゲノム不安定化が問題となった。そこで、業務計画を見直し、数種類のヒト iPS 細胞株を用い、カリオタイプの安定性、SNP アレイによるゲノムの安定性評価、包括的 DNA メチル化解析を行った。合成ハイドロゲルを用いた 3 次元培養は、継代に際してトリプシンやコラゲナーゼを必要とせず、細胞に対する障害が少ないことが予想されたが、平成 21 年度における各種解析の結果、従来型の feeder 培養よりもゲノム安定性維持に優れている事が明らかとなった。

本研究で用いる合成ハイドロゲル(TGP ゲル)は PEG と NIPPAM からなり、22 度を変異点とし、ゾルーゲル変異を起こす。ゲル化した際には、PEG と NIPPAM がクロスリンクを来し、ナノスケールのポアを形成する。さらに、クロスリンク部は疎水性を帯びることから、ゲル内には親水性ブロック、疎水性クロスリンク、ナノスケールポアが混在することになり、autocrine に分泌される増殖因子等の物質拡散が制御されることになる。我々は文部科学省産官学連携イノベーション事業において、TGP ゲルによる 3 次元培養により、カニクイザル ES 細胞の無血清培養に成功しており、平成 20 年後の業務では、ヒト ES 細胞への応用を試みた。培地としては京都大学により確立されたヒト ES 培地から動物由来物質を含む KSR を除いた培地 (Xeno-free 培地: XF 培地) を使用した。未分化マーカーの PCR 解析、Western 解析、FACS 解析の結果、ヒト ES 細胞の TGP-XF 培養は feeder 培養と同様の未分化性維持が可能であることが明らかとなった。一方、細胞増殖速度に関しては、feeder 培養に比較して遅く、21 年度以後の課題となった。21 年度は前年度の TGP-XF 培養をヒト iPS 細胞へ応用した。ヒト iPS 細胞 (253G1、201B6、R-iPS) を用いた検討では、ヒト ES 細胞同様の結果が得られたが、増殖力改善の為、既報に従い、XF 培地にヘパリンを添加した (TGP-FH)。ヘパリン添加により増殖力は feeder 培養に匹敵する培養条件を得られ、ほぼ培養条件が最適化された。しかし、feeder 培養でも、ヒト iPS 細胞は継代数に比例して、ゲノムの不安定性が見られることが東大拠点小川らによって報告され、21 年度の業務内容を見直し、TGP-FH 培養におけるゲノム安定性を評価した。SNP アレイによる解析では、ヒト腎臓上皮細胞由来 iPS (R-iPS) において、従来法である feeder 培養では、30 継代において、17 番染色体短腕に片親性ダイソミーを認めた。一方、TGP 培養では細胞の継代に際してトリプシンやコラゲナーゼを必要とせず、細胞に対する障害が少ないことが予想されたが、TGP-FH 培養では 30 継代において SNP ア

レイ異常を認めず、カリオタイプ解析でも70継代まで異常を認めなかった。次に TGP-FH 培養におけるゲノム安定性、カリオタイプ安定性のメカニズムを検討する為、Infinium による包括的 DNA メチル化解析を行った。Infinium 解析の結果、feeder 培養では継代数に比例して、低メチル化傾向がみられたが、TGP-FH 培養では変化を認めなかった。以上より、TGP-FH 培養ではヒト iPS 細胞における DNA メチル化レベルが維持され、これによりゲノムの安定性およびカリオタイプの安定性がもたらされると考えられた。

- 薬剤依存性の細胞自殺システムを iPS 細胞に導入し、マウスモデルにおいて奇形腫の発生を予防できた (中内、大津)



iPS 細胞の臨床応用に向けては、体内での腫瘍化という副反応への対策を講ずる必要がある。そこで、遺伝子治療臨床研究において実際に人体に使用され、有効性および安全性の確認された HSV-TK 遺伝子システムの iPS 細胞への応用を試みた。結果、HSV-TK 遺伝子を安定して発現する iPS 細胞からの、モデルマウスにおける奇形腫形成の制御が可能であることを実験的に証明した。

3. 課題全体の論文発表件数	中内分を参照
4. 課題全体の特許出願件数	中内分を参照
5. 当初目標に対する達成度	
<p>当初目標にはなかったゲノム安定性評価が加わっているが、培養条件は着実に絞り込まれており、当初目標の80%以上は達成されている (菱川)。</p> <p>無血清培養によるヒト iPS 細胞の未分化維持と、臍臓方向への分化誘導の研究はほぼ予定通りに進んでおり2年間で進める予定のほぼ100%を達成できたと考えている (大沼・道上)。</p> <p>安全性担保のための自殺遺伝子システムの検証、疾患治療のモデル化も予定どおり進行しておりこれらの課題に対する目標達成度は100%である。遺伝子挿入を伴わない iPS 細胞樹立法の確立も次年度中には確実に達成される見通しであり当初の目標を達成していると判断される (大津)。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 業務課題全体としてのまとめ</li> </ul> <p>当拠点では安全性強化技術の確立のために、1) iPS 細胞そのものを可及的に安全なものに作り上げる技術開発とその評価系の確立および 2) 移植後の細胞からの不慮の腫瘍発生を予防、または治療するシステムの樹立とを目標としている。この中で1) について評価法に関しては小川が担当 (ゲノム安定性のプロスペクティブスタディに詳細を記載)、樹立法は大津が担当し達成度は90%、培養法の至適化に関しては菱川が80%、大沼・道上が100%との自己評価である。2) については上記のとおり100%の目標達成度と評価している。</p>	
6. 今後の展望	
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 大津分</li> </ul> <p>平成22年度：疾患特異的 iPS 細胞の樹立を継続する。遺伝子挿入を伴わない iPS 細胞の樹立法をさらに至適化し完成を目指す。遺伝子挿入を伴う iPS 細胞についてもその安全性を担保する方法についての検討を継続する。特に培養に伴うゲノム安定性の変化をプロスペクティブに解析するスタディに重点を置き、iPS 細胞の腫瘍化のリスクを最小限に抑える方策について検討する。上記いずれの方策によっても iPS 細胞の腫瘍化のリスクを0%とすることは困難であるとの考えから、HSV-TK 遺伝子を用いた自殺遺伝子システムの安全性、有用性の検証を継続する。HSV-TK 遺伝子以外の自殺遺伝子システム (iCASP-9) に関する検討も開始する。</p> <p>平成23年度：22年度の課題から臨床応用に適すると判断される方法について、臨床グレードに準じた操作手技への移行を開始する。ゲノム安定性の検討を継続し、さらなる安全性の担保を図る。</p> <p>平成24年度：臨床グレードに準じた方法での疾患特異的 iPS 細胞を樹立する。同様に臨床グレードの</p>	

操作手技による自殺遺伝子導入を行い、risk/benefit assessment より人体への投与が可能と判断される iPS 細胞クローンの樹立を目指す。

- 菱川分

平成 21 年度までの業務により、合成ハイドロゲル (TGP) およびヒト ES 基本培地から KSR を除き、bFGF とヘパリンを加えた培地の組み合わせ (TGP-FH) により、ゲノム安定性、カリオタイプ安定性、DNA メチル化レベル維持を担保した iPS 細胞の維持培養が可能である可能性が示唆された。一方、2010 年 1 月に The International Stem Cell Consortium (ISCC) より複数施設における代表的な 9 種類の無血清培地、無フィーダー培養法の比較検討が行われ、mTeSR1 および STEMPO の 2 種類のみが再現性をもってヒト ES 細胞の安定した維持培養が可能と発表された。平成 22 年度以後は、培地に関してはこの 2 種類に固定し (TGP-TeSR1 および TGP-STEMPO)、ヒト ES 細胞をゲノム安定性評価のコントロールとし、樹立細胞、樹立方法のことなるヒト iPS 細胞を用い、平成 21 年度で行った解析を継続する。また、TGP ゲルを開発した早稲田大学理工学総合研究所との共同研究を継続し、TGP ゲル組成の最適化を図るとともに、一般の研究者に使いやすいゲルの開発をめざす。さらに、平成 22-23 年度で合成ハイドロゲルによるヒト iPS 細胞の大量培養法を最適化することにより、マニュアル化を図る。最終年度の 24 年度では、前年度までに確立したマニュアルを用い、技術講習会等を行い、他分野の研究者に技術を広める事を最終目標とする。平成 22 年度：TGP-TeSR1、TGP-STEMPO を用い、60 継代まで培養を行い、20、40、60 継代における SNP アレイによるゲノム安定性評価、カリオタイプ解析、Infinium による DNA メチル化解析を行う。コントロールとしてヒト ES 細胞 (KhES-1, 2, 3) を用い、ヒト iPS 細胞は山中研より供与された 253G1, 201B6, 207B7、東大医科学研究所より供与された TkDA3-2, 3-4, 4-M、首都大学で樹立されたヒト腎臓上皮細胞より樹立された R-iPS の 7 種類を用いる。さらに、平成 22 年度では、線維芽細胞以外から樹立された細胞での検討を行うため、新たにヒト腎臓尿管細胞、メサンギウム細胞から iPS 細胞の樹立を行う。さらに、樹立された iPS 細胞の長期培養におけるプロスペクティブなゲノム安定性の総合的評価を行う為、医科研究所で新たに樹立予定のヒト iPS 細胞を用い、樹立直後から 60 継代までプロスペクティブなゲノム安定性解析を行う。平成 23 年度：前年度にプロスペクティブなゲノム安定性解析を引き続き行うと共に、TGP ゲルの組成を変化させることにより (接着因子の付加、構成ブロック比率の変更) 最適化を図る。一方、平成 23 年度内のマニュアル化を目標としており、まずはプロトタイプである TGP を用いたマニュアル作成を行う。平成 24 年度：マニュアル化により、広く他分野の研究者にヒト iPS 細胞技術が普及するように、技術講習会を行う。さらに、維持培養に確立された培養条件を基に、腎臓構成細胞への分化誘導を試みる。

- 小川分

“ゲノム安定性のプロスペクティブスタディ” を参照。

## 7. 特記事項

- 大津分

安全性強化技術に関して、自殺遺伝子導入による iPS 細胞への安全性付加の研究に着手し継続しているのは国内で唯一、当拠点のみである。この背景には、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究を国内において実際に施行した経験を有する研究者を複数擁する当拠点の事情があり、この s x 試みの重要性に対する認知度の高さが研究継続の推進力となっている。iPS 細胞自体を安全に樹立・維持する技術と並行して行われるべき業務課題と認識し、今後も研究を継続する

- 菱川分

これまで様々な無血清、無フィーダー培養法、あるいはヒト血清・ヒトフィーダー細胞を用いた培養法が報告されているが、いずれも継代にコラゲナーゼ、トリプシン処置を必要とし、これが長期的にカリオタイプおよびゲノム不安定化を来すと考えられる。一方、コロニーをマニュアル操作でピックアップすることにより、カリオタイプの安定した培養方法も報告されているが、複雑かつ不安定な手技であり、臨床応用をめざした大量培養には適さない。これに対し、合成ハイドロゲルによる 3 次元培養では、22 度以下に冷却することにより容易に細胞回収が可能であり、継代には細胞をピペットでメカニカルに分散するだけで、一切の化学処理を必要としない特徴がある。しかも、合成ハイドロゲル 1ml あたり、 $10^5$ - $10^6$  個の iPS 細胞の培養が可能であり、均一化した方法での大量培養が可能である。21 年度の業務で、TGP-FH 培養は iPS 細胞のメチル化を維持することが明らかとなり、これは既報の無血清培養、無フィーダー培養では得られない特徴である。メチル化維持の機構としては、ゲル化した TGP 内におけるナノスケールポアによる iPS 細胞周囲の微小環境における物質拡散制御が寄与していると思われるが、業務内でこの機構を解明することにより、安全かつ効率の良いヒト iPS 細胞培養方法の確立に寄与すると期待される。

- 小川分

“ゲノム安定性のプロスペクティブスタディ” を参照。

● 大沼・道上分

無血清・無フィーダーによるヒト iPS 細胞の樹立は日本初であると思われる。無血清・無フィーダーでのヒト iPS 細胞の樹立、未分化性維持、安全性、分化誘導を一貫して研究している処は他にはない。

8. 委託研究費一覧

※別紙1の最後のページの各分担研究者委託研究費一覧を参照

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費（千円）				
人件費（千円）				
業務実施費（千円）				
間接経費（千円）				
合計（千円）				

(別紙1) 各分担研究者の進捗状況

分 担 研 究 者 名	小川 誠司 (担当責任者)、菱川 慶一、江藤 浩之、大津 真、道上 達男
業 務 項 目 名	樹立された iPS 細胞の各種長期培養におけるプロスペクティブなゲノム安定性の総合的評価
機 関 名	国立大学法人東京大学

1. 課題開始時における達成目標

(H22年度の業務計画書に記載の業務課題“樹立された iPS 細胞の各種長期培養におけるプロスペクティブなゲノム安定性の総合的評価”に対応する形で記載)

H22年度においては、iPS細胞に関する培養技術の標準化および臨床応用に向けた安全性強化技術の確立に供することを目的として、同一の iPS 細胞株 (クローン) について種々の条件下に培養を行い、プロスペクティブにゲノム安定性を比較検討する研究を開始する。すなわち特定の iPS 細胞株を選択し、

- i) メディウム組成
- ii) フィーダー細胞およびコーティングの有無または種類
- iii) 継代方法

等を比較条件として設定して、長期間の培養におけるゲノムコピー数異常の検出頻度を検討する。この研究は拠点内研究者間の協力体制のもとに実施するが、拠点外研究者との研究協力も積極的に推進する。特に成育医療センター拠点 (阿久津) において樹立された種々のヒト由来フィーダー細胞についての検討は重要課題と認識して、既に共同研究体制を確立している。さらに、他拠点等における技術革新に応じて、新たな培養媒体等に関して積極的に当業務に取り入れ、最良の iPS 細胞培養技術の選択、標準化を目指す。

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

- 本業務課題は H22 年度より東大拠点が新たに設定した項目であるので、ここでは小川が中心となり行ってきた iPS 細胞のゲノム安定性評価についての成果概要を記載する。

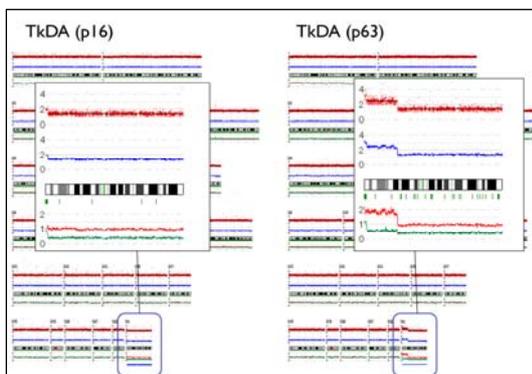


図6：継代数の増加 (p16->p63) に伴い、ゲノムコピー数異常を確認ヒト iPS 細胞株 TkDA を常法に従い継代し、異なる継代数においてゲノム DNA を抽出して高密度 SNP アレイ解析を行った。その結果、63 継代のサンプル (図右、p63) において X 染色体短腕に約 28 Mb に渡るコピー数の異常を検出した。この変異は初期の継代 (図左、p16) においては認めなかったことから、樹立後に変異を獲得した一部のクローンが、長期の培養中に徐々に拡大した結果と考えられた。

我々は、腫瘍細胞の共通の特性として認められるゲノムの不安定性、ないし、ゲノムの変異という観点から、ヒト iPS 細胞で生じているゲノムの変化について検討を行った。すなわち、11 人の異なる個人から樹立された 42 個の独立な iPS 細胞株に 8 由来する 53 個の iPS 細胞試料について、高密度 SNP アレイを用いたゲノムワイドなコピー数異常の検出を行ったところ、12 細胞株(28%)において、280kb から 91Mb に及ぶ計 16 個のゲノムの増加、欠失、アレルの不均衡が検出された。ゲノム異常の出現頻度は継体回数の増加にともなって上昇し、40 代までの継体で約 40%の細胞にゲノム異常の出現が認められた。これらのゲノム変異と癌化の関連についてはなお、生物学的な解析を含めた検討を必要とするものの、ゲノム変異を認める 2 つの領域については、がん細胞株および癌検体でしばしば異常が認められる領域と一致することから、これらのゲノム異常と発癌のリスクも示唆された。一方、これまでの解析は後方視的な検討であること、また、未だ少数の解析であることから、培養条件、継体回数、由来組織、iPS 樹立方法とゲノム異常との関連は不明である。本年度以降、多数の iPS 細胞について、前方視的な検討を行うことにより、これらの条件とゲノム変異との関連を明らかにすることにより、iPS 細胞の標準化のための基盤構築を進めることが重要と考えられた。

## (2) 研究の進捗及び成果

### <解析対象と方法>

解析対象は、11 個人より樹立された 42 個の独立な iPS 細胞株について、経時的に採取された 53 個の iPS 細胞を解析対象とし、これらの細胞から feeder 細胞を除去したのち常法に基づいてゲノム DNA を抽出し、Affymetrix NspI 250K アレイおよび我々が独自に構築した CNAG ソフトウェアによりゲノムコピー数の異常およびアレル不均衡の解析を行った。ヒトゲノムに多数存在することが明らかとなっている copy number variation(CNV)については、樹立ソースとなった正常試料を reference として解析することにより除外した。

### <結果>

高密度 SNP アレイを用いたゲノムワイドなコピー数解析の結果、12 細胞株(28%)において、計 16 個のゲノムの増加、欠失、アレルの不均衡が検出された。検出されたゲノム異常のサイズは、280kb から 91Mb に及び、染色体の長腕の大部分を占める大きな領域から従来の染色体分析では検出不能な微小な異常が高感度に同定された。Kaplan-Myer 法によるゲノム異常の出現頻度の予測からは、40 週までに約 40%の iPS 細胞に異常が生ずることが予測された。また、同一 iPS 細胞株の経時的な解析から、いくつかの異常については、これらのゲノム異常が継体培養の過程で新たに出現してくることが確認された。これらのゲノム異常の分布については、概ねランダムに生ずる傾向が観察されたが、20p12 および 20q11 については recurrent な異常が確認された。興味深いことに、これらの領域は、ヒトのがんにおいて繰り返し異常が報告されている領域と一致したことから、これらのゲノム異常と細胞の癌化の関連が示唆された。

### <考察および結論>

iPS 細胞は継体培養にともなって無視出来ない頻度でゲノムの異常を有するクローンが出現することが確認された。これらは発癌と関連のあるゲノム領域においてもみとめられ、今後生物学的な検証が必要であるものの、iPS 細胞におけるゲノム異常と癌化との関連も危惧された。一方、少数例での解析のため、ゲノム異常に影響を及ぼす培養条件、継体回数、由来組織、iPS 樹立方法とゲノム異常との関連に

については統計学的な検出力が小さく、十分な解析が出来なかった。また、今回の検体は後方視的な解析であることから、本年度以降については、前方視的に多数の異なる条件で樹立培養された様々な iPS 細胞のゲノム異常を解析することにより、iPS 細胞のゲノム不安定性とこれに影響を及ぼす因子の同定を進めることが重要であると考えられた。

3. 課題全体の論文発表件数

中内分を参照

4. 課題全体の特許出願件数

中内分を参照

5. 当初目標に対する達成度

本年度前半までに高密度 SNP アレイを用いた iPS 細胞におけるゲノム変異の解析の解析技術の確立とその性能評価を行うことができた。また、後方視的な検討であるものの、42 種類の iPS 細胞ゲノムについて同技術を用いたゲノムワイドな解析を通じて、継体培養にともなって iPS 細胞に一定の頻度でゲノムの変化が生ずることを明らかにすることが出来た。また、継体回数とゲノム異常の出現頻度の相関およびゲノム異常の標的遺伝子座についても重要な示唆がえられた。また、一連の解析試料の収集を通じて拠点内、および拠点間の協力体制が確立されたことは、今後の前方視的な解析を進める上で極めて大きな成果であった。以上より中間的な評価としては、これまでの研究によって事業の目標は十分達成されたと考えている。

6. 今後の展望

iPS 細胞におけるゲノムの不安定性は、その臨床応用にさいして安全性の観点からは是非とも考慮する必要のある評価項目であることは明らかである。一方、その正確な発生頻度やリスク因子、また具体的な癌化や分化能への影響は現時点では不明である。これらの点は、今後の iPS 細胞の臨床応用、標準化の観点から極めて重要な問題である。実際、本年度以降、拠点間および拠点内の多数の施設の協力体制のもとに、多数の iPS 試料についてこれらを前方視的に詳細に解析することが既に計画されており、今後の解析を通じて、上記の問題を明らかにすることにより、iPS 技術の実用化に貢献することができると期待される。

7. 特記事項

本研究成果は、平成 22 年 3 月 11 日付け読売新聞全国版の朝刊その他にて広く国民に紹介され、注目を集めた。

8. 委託研究費一覧

※別紙 1 の最後のページの各分担研究者委託研究費一覧を参照

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費 (千円)				
人件費 (千円)				
業務実施費 (千円)				
間接経費 (千円)				
合計 (千円)				

(別紙1) 各分担研究者の進捗状況

分 担 研 究 者 名	牛田 多加志 (担当責任者)、江藤 浩之、大津 真、宮島 篤
業 務 項 目 名	iPS 細胞から誘導した分化細胞による前臨床研究推進のためのモデル開発
機 関 名	国立大学法人東京大学

1. 課題開始時における達成目標
疾患・損傷治療モデルを用いて iPS 細胞の有用性・安全性を明らかにする。(H20) iPS 細胞から誘導した分化細胞による前臨床研究推進のためのモデル開発を行う。(H21-)
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) 中型動物をモデル化し、骨・軟骨移植後の生体内機能評価系の検証を開始している(牛田、【高戸】)。 2) 1個レベルの血小板の成体内部での挙動の観察を可能とする <i>in vivo imaging</i> システムを開発した。これを応用した新規の生体内血栓形成評価系を構築し、ヒト iPS 細胞由来の血小板の血小板減少症マウスモデル生体内での機能を評価することに成功した(江藤)。
(2) 研究の進捗及び成果
1) 欠損組織へのセル・デリバリー法の動物実験による検証(牛田、【高戸】) iPS 細胞の骨・軟骨再建への応用をめざし、動物実験モデルを作製した。マウスでは、大腿膝蓋関節の大腿骨側に直径 0.8 mm の欠損を作製し、iPS 細胞・アテロコラーゲン混和物を投与する方法を検討した。その結果、目的とした細胞をマウス微小関節欠損に十分投与できることが明らかとなった。今後は、同系マウスの iPS 細胞を用いて移植することにより、自己 iPS 細胞を投与する実験モデルとして使用できると考えられた。さらに、大きなサイズの動物としてビーグルを用いて検討した。ビーグルの大腿膝蓋関節の大腿骨側に直径 5 mm の欠損を作製し、同一個体から採取した細胞を移植するモデルを確立した(図1;左図は、ビーグル自家再生関節移植実験を示す)。さらに、ビーグルから採取した細胞をリプログラミングし、iPS 細胞を作製した。今後は、ビーグル自己 iPS 細胞移植実験モデルを使用し、iPS 細胞を用いた治療の可能性を探る。
<div data-bbox="146 1272 970 1850" data-label="Diagram"> <p style="text-align: center;"><b>図 ビーグル自家再生関節移植実験</b></p> <p>肘関節由来軟骨の採取</p> <p>軟骨細胞単離</p> <p>自己血清分離</p> <p>血液採取</p> <p>自家移植</p> <p>増殖培養</p> <p>直径5mm 骨・軟骨複合欠損</p> <p>iPS再生関節</p> <p>ビーグル犬 6ヶ月齢、オス 製造(培養8週)、移植8週</p> </div>
2) 多焦点1光子顕微鏡システムを改良し、1個の血小板を成体内部で観察可能とするまったく新規の <i>in vivo imaging</i> システムの開発に成功した。さらにこれを応用し、細胞障害の無い弱いレベルと波長のレーザー光による科学反応により活性酸素 (ROS) を産生させ、ROS 依存性の血栓形成を誘発する

ことで比較的短時間（20秒以内）での生体内血栓形成を評価する新規アッセイ系を構築した(図2) (Takizawa, Nishimura ら、*J Clin Invest.* 120(1):179-90, 2010) (江藤)。

本システムによる評価系を使用し、免疫不全マウスをレシピエントとしてヒト iPS 細胞由来の血小板が、流動血内で正常な接着・止血機能を発揮する事を確認した(論文投稿中、in revision) (江藤)。

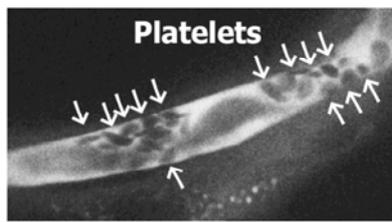


図2：生体内での血小板1個のレベルで解析可能な in vivo imaging システムを開発  
高速・高解像度で観察可能な1光子多焦点顕微鏡システムにより、マウス生体腹腔内部の血管を観察した。レーザー誘発の血栓が1つ1つの血小板(2-3μm直径)により形成されていることが観察可能。

3. 課題全体の論文発表件数	1 件			
4. 課題全体の特許出願件数				
5. 当初目標に対する達成度	100% (H21年度に開始した課題であり現在までに予想を超えて成果が出されて来ている)			
6. 今後の展望	<p>1) 欠損組織へのセル・デリバリー法の動物実験による検証を行う(牛田)  ラットあるいはウサギ、イヌなどの骨・軟骨欠損モデルにおける、移植したヒト iPS 細胞由来骨・軟骨組織の組織学的、生化学的、力学的な有効性評価が行えるシステムの開発を構築し、iPS 細胞を用いた軟骨・骨疾患に対する治療法の前臨床データを作成する。</p> <p>2) 免疫不全糖尿病モデルマウスによる in vivo でのヒト膵島の機能を評価する(宮島)  ヒト iPS 細胞からの膵島形成培養法を改善し、膵島形成効率を大幅に改善する。in vitro で形成したヒト膵島の in vitro での機能を評価するために、免疫不全糖尿病モデルマウスのバリデーションを行って行く。</p> <p>3) Two-photon 顕微鏡によるマウス、ラット深部組織での移植後の血液細胞の動態観察を可視化する技術を確立する(江藤、大津)。機能評価系の充実を優先し、中大型動物での安全評価は、H23 年度以降に開始できるように努める。</p>			
7. 特記事項	世界最先端レベルでの生体内での血小板可視化技術は、本邦だけでなく欧米からも高い評価を受けており、発表した論文(J Clin Invest, 2010)の筆頭著者の一人である西村は、imaging 分野の各種シンポジウム等への招聘も増加した。			
8. 委託研究費一覧	※別紙1の最後のページの各分担研究者委託研究費一覧を参照			
	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費(千円)				
人件費(千円)				
業務実施費(千円)				
間接経費(千円)				
合計(千円)				

(別紙1) 各分担研究者の進捗状況

分 担 研 究 者 名	江藤 浩之 (担当責任者)、辻 浩一郎、大津 真、植木 浩二郎
業 務 項 目 名	各種ソースから樹立される健常人および疾患特異的 iPS 細胞の樹立・保存・供給システムの整備・運営
機 関 名	国立大学法人東京大学

1. 課題開始時における達成目標	
疾患特異的 iPS 細胞の樹立・提供業務を推進する	
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 H20年に発足した東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター内に、幹細胞プロセッシング部門(責任者:辻 浩一郎)と幹細胞樹立ユニットであるステムセルバンク(責任者:江藤浩之)を設置した。	
(2) 研究の進捗及び成果 1) 東京大学ステムセルバンクを医科学研究所幹細胞治療研究センター内に整備した。3疾患(ADA欠損症、無巨核球性血小板減少症、DiGeorge症候群[江藤、大津])の疾患特異的iPS細胞の樹立に成功。その他、6疾患以上のiPS細胞の樹立を開始している。樹立された正常ヒトiPS細胞数株、樹立する際に用いる293GPGウイルス産生株およびレトロウイルス上清を分配するためのシステムを本部門に整備した。 2) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立に伴う倫理的問題や学外協力機関との成果有体物の譲受に関わる知的財産の取り扱い等について、医科学研究所の倫理審査委員会、研究助成係を中心に拠点全体での協力体制を確立した(江藤、大津)。	
3. 課題全体の論文発表件数	
4. 課題全体の特許出願件数	
5. 当初目標に対する達成度 細胞提供は、健常人 iPS 細胞に関しては随時行って来ているが、疾患特異的 iPS 細胞の寄託、供給は未であり、80%の達成度と考える。	
6. 今後の展望 江藤が、希少疾患、造血器悪性腫瘍疾患からの iPS 細胞の樹立を推進中。辻が、1型神経繊維腫症、Fanconi 症候群、Kostmann 症候群の患者体細胞から iPS 細胞を樹立中。辻が計画していたヘモグロビン合成障害などの赤血球造血障害疾患からの iPS 細胞の樹立については、日本人における発生頻度が低いため、中国科学院血液病研究所との共同研究を予定している。先天性骨・軟骨形成不全については、現在、当該疾患を専門とする適切な共同研究者を探している。植木は、糖尿病感受性遺伝子多型を持った患者ならびに単一遺伝子異常による糖尿病(ミトコンドリア遺伝子異常糖尿病、Maturity Onset Diabetes of Young; MODY 糖尿病)からの iPS 細胞を樹立し、バンク化するとともに、膵β細胞への効率的な分化誘導法を確立することを計画しており、東京大学附属病院倫理審査委員会での審査終了後、患者リクルートおよび iPS 細胞の樹立を開始する。	

7. 特記事項				
特になし				
8. 委託研究費一覧				
※別紙1の最後のページの各分担研究者委託研究費一覧を参照				
	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費 (千円)				
人件費 (千円)				
業務実施費 (千円)				
間接経費 (千円)				
合計 (千円)				

(別紙1) 各分担研究者の進捗状況

分 担 研 究 者 名	江藤 浩之 (担当責任者)、道上 達男 [大沼 清]
業 務 項 目 名	iPS 細胞の基本的な培養技術講習会・培養トレーニングプログラムの実施
機 関 名	国立大学法人東京大学

1. 課題開始時における達成目標				
ヒト iPS 細胞培養の技術講習会およびトレーニングプログラムの実施を行う。				
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				
H21年6月に医科学研究所において、講習会用テキストの新規作製と配布、大規模講習会および技術トレーニング講習会を行った。				
(2) 研究の進捗及び成果				
医科学研究所：平成21年6月25-26日、医科学研究所講堂での大規模講習会（125名参加）およびシステムセルバンク研究室での技術トレーニング講習会（24名参加）を開催した（江藤）。講習会用テキストの新規作製と配布（160冊）も併せて行った（江藤、大津）。その他にも適宜、技術トレーニングを行った（大沼；駒場地区、20名）。				
3. 課題全体の論文発表件数				
4. 課題全体の特許出願件数				
5. 当初目標に対する達成度				
100%達成した。				
6. 今後の展望				
H22年度も医科学研究所において、大規模講習会および技術トレーニングを6月23日、24日に開催予定。講習会用テキストも新規に作成しており、配布予定である。今後は、各種のソースからの iPS 細胞の樹立法にも技術指導の範囲を拡大するかを検討する。				
7. 特記事項				
東京大学拠点での講習会には、東京大学内の研究者だけでなく、慶応大学拠点を含む他研究機関、企業研究者が参加、あるいは参加予定であり、iPS 細胞研究の啓発活動として成功している。				
8. 委託研究費一覧				
※別紙1の最後のページの各分担研究者委託費一覧を参照				
	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費（千円）				
人件費（千円）				
業務実施費（千円）				
間接経費（千円）				
合計（千円）				

各分担研究者の委託研究費一覧

江藤 浩之

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費（千円）	0	9,342	0	9,342
（補正予算）	(0)	(-9,342※)	(0)	(-9,342※)
人件費（千円）	0	13,469	23,181	36,651
業務実施費（千円）	0	16,801	6,000	22,801
間接経費（千円）	0	11,884	8,754	20,638
（補正予算）	(0)	(-2,803※)	(0)	(-2,803※)
合計（千円）	0	51,496	37,936	89,432
（補正予算）	(0)	(-12,145※)	(0)	(-12,145※)

※平成21年度第一次補正予算の執行の見直しに伴う減額

大津 真

	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	2,471	3,754	6,226
業務実施費（千円）	0	5,767	8,000	13,767
間接経費（千円）	0	2,471	3,526	5,998
合計（千円）	0	10,710	15,281	25,991

北村 俊雄

	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	7,228	7,228
業務実施費（千円）	6,080	11,040	1,772	18,892
（補正予算）	(0)	(-5,000※)	(0)	(-5,000※)
間接経費（千円）	1,824	3,312	2,700	7,836
合計（千円）	7,904	14,352	11,700	33,956
（補正予算）	(0)	(-5,000※)	(0)	(-5,000※)

※平成21年度第一次補正予算の執行の見直しに伴う減額

辻 浩一郎

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費（千円）	0	0	0	0
（補正予算）	(0)	(6,286)	(0)	(6,286)
人件費（千円）	0	0	0	0
業務実施費（千円）	5,700	10,000	8,000	23,700
（補正予算）	(0)	(4,000)	(0)	(4,000)
間接経費（千円）	1,710	3,000	2,400	7,110
（補正予算）	(0)	(3,086)	(0)	(3,086)
合計（千円）	7,410	13,000	10,400	30,810
（補正予算）	(0)	(13,372)	(0)	(13,372)

渡辺 すみ子

	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)	4,560	10,000	8,000	22,560
間接経費 (千円)	1,368	3,000	2,400	6,768
合計 (千円)	5,928	13,000	10,400	29,328

牛田 多加志

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費 (千円)	0	1,901	0	1,901
(補正予算分)	(0)	(11,237)	(0)	(11,237)
人件費 (千円)	2,492	2,462	6,811	11,765
業務実施費 (千円)	3,564	6,286	11,189	21,039
間接経費 (千円)	1,817	3,195	5,400	10,411
(補正予算分)	(0)	(3,371)	(0)	(3,371)
合計 (千円)	7,873	13,844	23,400	45,116
(補正予算分)	(0)	(14,609)	(0)	(14,609)

小川 誠司

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費 (千円)	0	0	0	0
(補正予算)	(9,250)	(0)	(0)	(9,250)
人件費 (千円)	2,415	2,462	2,822	7,700
業務実施費 (千円)	2,025	12,115	11,178	25,318
(補正予算)	(3,000)	(0)	(0)	(3,000)
間接経費 (千円)	1,332	4,373	4,200	9,905
(補正予算)	(3,675)	(0)	(0)	(3,675)
合計 (千円)	5,772	18,951	18,200	42,923
(補正予算)	(15,925)	(0)	(0)	(15,925)

菱川 慶一

	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	1,987	1,987
業務実施費 (千円)	4,810	10,000	6,013	20,823
間接経費 (千円)	1,443	3,000	2,400	6,843
合計 (千円)	6,253	13,000	10,400	29,653

眞鍋 一郎

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費 (千円)	0	0	0	0
(補正予算分)	(0)	(58,000)	(0)	(58,000)
人件費 (千円)	0	2,462	0	2,462
業務実施費 (千円)	4,269	9,130	4,000	17,399
間接経費 (千円)	1,281	3,478	1,200	5,958
(補正予算分)	(0)	(17,400)	(0)	(17,400)
合計 (千円)	5,550	15,070	5,200	25,820
(補正予算分)	(0)	(75,400)	(0)	(75,400)

植木 浩二郎

	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	2,810	2,810
業務実施費 (千円)	4,270	12,000	4,190	20,460
間接経費 (千円)	1,281	3,600	2,100	6,981
合計 (千円)	5,551	15,600	9,100	30,251

宮島 篤

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費 (千円)	0	0	473	473
(補正予算分)	(0)	(30,030)	(0)	(30,030)
人件費 (千円)	3,602	4,035	3,748	11,385
業務実施費 (千円)	4,983	10,855	10,779	26,617
間接経費 (千円)	2,576	4,467	4,500	11,543
(補正予算分)	(0)	(9,009)	(0)	(9,009)
合計 (千円)	11,161	19,357	19,500	50,018
(補正予算分)	(0)	(39,039)	(0)	(39,039)

後藤 由季子

	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)	6,000	5,000	1,000	12,000
間接経費 (千円)	1,800	1,500	300	3,600
合計 (千円)	7,800	6,500	1,300	15,600

大沼 清

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費 (千円)	0	0	0	0
(補正予算)	(0)	(12,828)	(0)	(12,82)
人件費 (千円)	5,489	8,070	9,751	23,311
業務実施費 (千円)	11,611	14,465	3,249	29,324
(補正予算)	(3,000)	(0)	(0)	(3,000)
間接経費 (千円)	5,130	6,761	3,900	15,791
(補正予算)	(900)	(3,849)	(0)	(4,749)
合計 (千円)	22,230	29,296	16,900	68,426
(補正予算)	(3,900)	(16,677)	(0)	(20,577)

高戸 毅

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費 (千円)	0	0	0	0
(補正予算)	(0)	(3,150)	(0)	(3,150)
人件費 (千円)	0	2,462	0	2,462
業務実施費 (千円)	4,255	6,157	0	10,411
間接経費 (千円)	1,276	2,586	0	3,862
(補正予算)	(0)	(945)	(0)	(945)
合計 (千円)	5,531	11,205	0	16,736
(補正予算)	(0)	(4,095)	(0)	(4,095)

中村 耕三

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費（千円）	0	0	0	0
（補正予算分）	(0)	(656)	(0)	(656)
人件費（千円）	0	0	0	0
業務実施費（千円）	4,800	6,200	0	11,000
間接経費（千円）	1,440	1,860	0	3,300
（補正予算分）	(0)	(197)	(0)	(197)
合計（千円）	6,240	8,060	0	14,300
（補正予算分）	(0)	(853)	(0)	(853)

(別紙2)

1. 論文のリスト

1. ◎○Takayama N, Nishikii H, Usui J, Tsukui H, Sawaguchi A, Hiroyama T, Eto K, Nakauchi H. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood*. 111:5298-306, 2008
2. ◎Yokoyama Y, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Higashi K, Takato T, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells. *Blood*. 13:6584-6592, 2009.
3. ◎○Nishikii H, Eto K, Tamura N, Hattori K, Heissig B, Kanaji T, Sawaguchi A, Goto S, Ware J, Nakauchi H. Metalloproteinase regulation improves *in vitro* generation of efficacious platelets from mouse embryonic stem cells. *J Exp Med*. 205:1917-27, 2008.
4. ◎Ma F, Kambe N, Wang D, Shinoda G, Fujino H, Umeda K, Fujisawa A, Ma L, Suemori H, Nakatsuji N, Miyachi Y, Torii R, Tsuji K, Heike T, Nakahata T. Direct development of functionally mature tryptase/chymase double positive tissue-type mast cells from primate ES cells. *Stem Cells* 26: 706-714, 2008.
5. ◎Ma F, Ebihara Y, Umeda K, Sakai H, Hanada S, Zhang H, Zaike Y, Tsuchida E, Nakahata T, Nakauchi H, Tsuji K. Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 13087-13092, 2008.
6. ◎○Okabe M, Otsu M, Ahn DH, Kobayashi T, Wakiyama Y, Morita Y, Onodera M, Eto K, Ema H, Nakauchi H. Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. *Blood*. 114:1764-7, 2009.
7. Okabe M., Tsukahara Y., Tanaka M., Suzuki K., Saito S., Kamiya Y., Tsujimura T., Nakamura K., Miyajima A. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse livers. *Development*. 136, 1951-1960, 2009.
8. Hirabayashi, Y., Suzuki, N., Tsuboi, M., Endo, T.A., Toyoda, T., Shinga, J., Koseki, H., Vidal, M. and Gotoh, Y. Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition. *Neuron* 63 : 600-613, 2009.
9. ◎○ Sekia Y, Kurisakia A, Watanabe-Susakia K, Nakajimaa Y, Nakanishi M, Araie Y, Shiotae K, Sugino H, and Asashima M. TIF1 $\beta$  regulates the pluripotency of embryonic stem cells in a phosphorylation-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA*, in press.
10. ◎Hishikawa K, Yoshikawa M, Kamiura N, Idei M, Fujita T. Thermoreversible gelation polymer for defined three-dimensional culture of human embryonic stem cells, *Nature Method* (投稿中, 分担研究者 菱川の成果報告書に添付)

2. 特許出願リスト

補足説明資料に記載

(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

中内 啓光

1	助成制度	戦略的創造研究推進機構 (ERATO)		
	研究者氏名	中内啓光	当該研究者の役割	研究の統括
	研究テーマ	幹細胞制御		
	研究期間	平成19年12月～平成25年3月		
	助成金合計 (見込み)	20年度 201,150千円 21年度 199,199千円 22年度 286,800千円 期間全体 約1,662,000千円		
	本プロジェクトとの違い	ERATOにおける研究課題は、動物個体を用いて臓器を再生し、移植臓器として提供するための新しい基盤技術を開拓することであり、本プロジェクトの課題とは異なる。		
2	助成制度	基盤研究A		
	研究者氏名	中内啓光	当該研究者の役割	研究の統括
	研究テーマ	造血幹細胞の冬眠とそれを支える機構の解明		
	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 8,300千円 22年度 8,300千円 期間全体 24,900千円見込み		
	本プロジェクトとの違い	造血幹細胞の冬眠の機構について細胞個々のレベルでその分子機構を解明し幹細胞治療の有用性、有効性を改善することを目的として行う研究課題である、本プロジェクトの課題とは異なる。		
3	助成制度	厚生労働省科学研究費補助金医療技術実用化総合研究事業		
	研究者氏名	中内啓光	当該研究者の役割	分担研究者
	研究テーマ	HLAミスマッチ造血細胞移植後の新規キメラ解析法による臨床診断の有用性に関するエビデンス創出		
	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 57,000千円 22年度 56,674千円 期間全体 177,000千円 見込み		
	本プロジェクトとの違い	造血細胞移植後の生着、白血病の再発等のモニタリングのための臨床診断方法の開発を目的とするもので、本プロジェクトの課題とは異なる。		
4	助成制度	厚生労働省科学研究費補助金第3次対がん総合戦略研究事業		
	研究者氏名	中内啓光	当該研究者の役割	研究の統括
	研究テーマ	成人T細胞白血病のがん幹細胞の同定とそれを標的とした革新的予防・診断・治療法の確立		
	研究期間	平成22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 0千円 22年度 4,000千円 期間全体 12,000千円見込み		
	本プロジェクトとの違い	成人型T細胞白血病の発症前診断を細胞表面抗原や遺伝子発現から行う事を目的とした研究であり、本プロジェクトの課題とは異なる。		

1	助成制度	文部科学省科学研究費 基盤研究(B)		
	研究者氏名	江藤浩之(代表)	当該研究者の役割	総括と遂行
	研究テーマ	献血を必要としない血小板輸血療法の戦略		
	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 5000 千円 22 年度 4500 千円 期間全体 14300 千円		
	本プロジェクトとの違い	血小板前駆細胞である巨核球から効率よく血小板を放出させるデバイスの開発とその理論的背景の解明であり、業務内容とは異なる。		
2	助成制度	JST CREST		
	研究者氏名	岩間厚志(代表) 江藤浩之(分担)	当該研究者の役割	主に造血幹細胞への誘導
	研究テーマ	造血幹細胞のエピジェネティクスとその制御法の創出		
	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 2750 千円 21 年度 5800 千円 22 年度 3800 千円 期間全体 25000 千円		
	本プロジェクトとの違い	造血幹細胞に関する研究であり、業務内容とは異なる。		
3	助成制度	厚生労働省科学研究費 創薬基盤推進研究事業		
	研究者氏名	高木 智(代表) 江藤浩之(分担)	当該研究者の役割	主に血小板の機能評価
	研究テーマ	血小板の高効率試験管内産生に向けた基盤技術の確立		
	研究期間	平成 20 年 6 月 ～ 平成 23 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 5000 千円 21 年度 3500 千円 22 年度 4500 千円 期間全体 13000 千円		
	本プロジェクトとの違い	臍帯血 CD34 細胞および多能性幹細胞への Lnk アダプター遺伝子 mutant 導入による血小板の産生効率と機能評価を主体とする研究であり、業務内容とは異なる。		
4	助成制度	文部科学省科学研究費 基盤研究(C)		
	研究者氏名	江藤浩之(代表)	当該研究者の役割	総括と遂行
	研究テーマ	巨核球成熟、血小板産生分子制御機構の解明：ヒト胚性幹細胞研究への応用		
	研究期間	平成 19 年 4 月 ～ 平成 21 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 1500 千円 21 年度 0 千円 22 年度 0 千円 期間全体 3500 千円		
	本プロジェクトとの違い	血小板前駆細胞である巨核球の成熟過程の分子機構の解明に従事しており、業務内容とは異なる。		
	助成制度	文部科学省科学研究費 特定領域【細胞外環境】		
	研究者氏名	江藤浩之(代表)	当該研究者の役割	総括と遂行
	研究テーマ	造血幹細胞ニッチ、巨核球ニッチを支配するβ3インテグリン制御機構の解明		

5	研究期間	平成 19 年 4 月 ～ 平成 21 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 2100 千円	21 年度 0 千円	22 年度 0 千円 期間全体 4200 千円
	本プロジェクトとの違い	造血幹細胞の新しい未分化性維持機構の提唱とその分子機構の解明に従事しており、業務内容とは異なる。		
6	助成制度	文部科学省科学研究費 特定領域【バイオ操作】		
	研究者氏名	江藤浩之(代表)	当該研究者の役割	総括と遂行
	研究テーマ	胚性幹細胞から高効率で血小板産生させる 3 次元培養システムの開発		
	研究期間	平成 19 年 4 月 ～ 平成 21 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 1500 千円	21 年度 0 千円	22 年度 0 千円 期間全体 3100 千円
	本プロジェクトとの違い	全く新しい細胞培養機器の提案とその理論的根拠の証明を目指したもので、業務内容とは異なる。		

大津 真

1	助成制度	基盤研究 (C) (一般)		
	研究者氏名	大津 真	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	新規のタンパク質発現量調節システムを応用した造血幹細胞の生体内運命決定の制御		
	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 1,950 千円	22 年度 1,300 千円 期間全体 4,500 千円
本プロジェクトとの違い	iPS 細胞によらず、造血幹細胞の運命決定を自在に制御することで移植医療の向上を目指す研究であり本プロジェクト業務内容とは異なる。			
2	助成制度	厚生労働省科学研究費子ども家庭総合研究事業		
	研究者氏名	倉辻忠俊、小野寺雅史、大津 真	当該研究者の役割	分担
	研究テーマ	小児難治性先天性異常症に対する幹細胞遺伝子治療法の開発と臨床応用		
	研究期間	平成 19 年 4 月 ～ 平成 22 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 2,000 千円	21 年度 1,500 千円	22 年度 0 千円 期間全体 11,500 千円
本プロジェクトとの違い	造血幹細胞を標的とする遺伝子治療臨床研究の実施に向けた前臨床試験のプロジェクトであり、本プロジェクト業務内容とは異なる。			
3	助成制度	成育医療研究委託事業		
	研究者氏名	奥山虎之、大津 真	当該研究者の役割	分担
	研究テーマ	小児先天異常症に対する遺伝子・細胞治療法の開発と臨床応用		
	研究期間	平成 19 年 4 月 ～ 平成 21 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 2,000 千円	21 年度 0 千円	

		22年度 0千円	期間全体 4,000千円
	本プロジェクトとの違い	小児先天異常症の根治療法としての造血幹細胞を標的とした治療法開発のためのプロジェクトであり本プロジェクト業務内容とは異なる。	
4	助成制度	基盤研究 (A) (一般)	
	研究者氏名	中内啓光、大津 真	当該研究者の役割 分担
	研究テーマ	造血幹細胞の冬眠とそれを支える機構の解明	
	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 3,000千円	22年度 3,000千円 期間全体 9,000千円
	本プロジェクトとの違い	マウス造血幹細胞の性質・機能解析を主とした基礎研究であり、本プロジェクト業務内容とは異なる。	

北村 俊雄

1	助成制度	科学研究費補助金 基盤研究 (A)	
	研究者氏名	北村 俊雄	当該研究者の役割 代表
	研究テーマ	造血器腫瘍発症の分子メカニズムの統合的理解にむけて	
	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 15,800千円 21年度 10,800千円	22年度 10,800千円 期間全体 37,400千円
	本プロジェクトとの違い	全く異なるプロジェクトで共通点はない。	
2	助成制度	科学研究費補助金 基盤研究 (B)	
	研究者氏名	北浦 次郎	当該研究者の役割 分担
	研究テーマ	LMIR3/4/5の生体内における役割の解析	
	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 5,400千円 21年度 4,500千円	22年度 4,500千円 期間全体 14,400千円
	本プロジェクトとの違い	全く異なるプロジェクトで共通点はない。	
3	助成制度	科学研究費補助金 基盤研究 (C)	
	研究者氏名	川島 敏行	当該研究者の役割 分担
	研究テーマ	新規キネトコアタンパク CENP-50の転写制御と染色体分配における機能解析	
	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 1,700千円	期間全体 1,700千円
	本プロジェクトとの違い	全く異なるプロジェクトで共通点はない。	
	助成制度	科学研究費補助金 特定領域研究	

4	研究者氏名	北村 俊雄	当該研究者の役割	代表
	研究テーマ	シグナル伝達系阻害薬の同定と分子標的療法への応用		
	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 5,600 千円	21 年度 5,500 千円	期間全体 11,100 千円
	本プロジェクトとの違い	全く異なるプロジェクトで共通点はない。		

辻 浩一郎

1	助成制度	科学研究費補助金（基盤研究 B）		
	研究者氏名	辻浩一郎	当該研究者の役割	代表
	研究テーマ	ヒト胚性幹細胞から造血細胞移植治療のための造血幹細胞への分化誘導法の開発		
	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 4,700 千円	21 年度 4,000 千円	22 年度 3,000 千円 期間全体 11,700 千円
	本プロジェクトとの違い	本研究テーマはヒト ES 細胞の実用化を目指した研究であり、ヒト iPS 細胞を対象とする本プロジェクトとは異なる研究である。		
2	助成制度	科学研究費補助金（基盤研究 C）		
	研究者氏名	辻浩一郎	当該研究者の役割	分担
	研究テーマ	ヒト ES 細胞から免疫細胞への分化系を用いた乳児アレルギー疾患発症機構に関する研究		
	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 400 千円	21 年度 300 千円	22 年度 300 千円 期間全体 1,000 千円
	本プロジェクトとの違い	本研究テーマはヒト ES 細胞を用いた研究であり、ヒト iPS 細胞を対象とする本プロジェクトとは異なる研究である。		
3	助成制度	科学研究費補助金（基盤研究 B）		
	研究者氏名	辻浩一郎	当該研究者の役割	分担
	研究テーマ	ヒト iPS 細胞を用いた先天性骨髄不全症候群の病因・病態の解明と治療法の開発		
	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 400 千円	22 年度 500 千円 23 年度 500 千円 期間全体 1,400 千円
	本プロジェクトとの違い	本研究テーマは疾患特異的 iPS 細胞の解析研究である。一方、本プロジェクトにおける我々の業務は、先天性骨・軟骨形成不全症、ヘモグロビン合成障害以外の疾患特異的 iPS 細胞については、樹立と供給のみを目的としている。		

渡辺 すみ子

1	助成制度	挑戦的萌芽		
	研究者氏名	渡辺すみ子	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	がん細胞から iPS 細胞を介し樹状細胞を誘導しがん免疫療法に利用する試み		
	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 1500 千円	
		22 年度 1500 千円	期間全体 千円	
本プロジェクトとの違い	がん細胞からのがん抗原を維持したままでの iPS 誘導が主眼となった研究で、細胞・技術は共有できるが目的、内容はまったく異っている。			

牛田 多加志

1	助成制度	(独) 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 健康安心プログラム		
	研究者氏名	牛田多加志	当該研究者の役割	分担研究者
	研究テーマ	三次元複合臓器構造体開発研究		
	研究期間	平成 18 年 7 月 ～ 平成 22 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 29,500 千円	21 年度 37,000 千円	
		22 年度 0 千円	期間全体 126,000 千円	
本プロジェクトとの違い	三次元複合臓器構造体開発研究においては、成熟細胞である軟骨細胞から 3 次元組織である関節軟骨組織を創製するための技術開発を目的としており、ES 細胞および iPS 細胞から軟骨細胞への分化コントロール技術の開発をめざす本プロジェクトとは対象および方法ともに異なる。			
2	助成制度	科学研究費補助金 基盤 (A)		
	研究者氏名	牛田多加志	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	組織エレメントによる 3 次元組織再生のためのダイナミックカルチャー技術の開発		
	研究期間	平成 22 年 4 月 ～ 平成 25 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 9,900 千円	期間全体 36,900 千円	
本プロジェクトとの違い	組織エレメントによる 3 次元組織再生のためのダイナミックカルチャー技術の開発においては、3 次元組織のエレメントを創製するための技術開発であり、ES 細胞および iPS 細胞から軟骨細胞への分化コントロール技術の開発をめざす本プロジェクトとは対象および方法ともに異なる。			

1	助成制度	科学研究費補助金・基盤研究B		
	研究者氏名	小川誠司	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	先端ゲノミクスによる造血器腫瘍の治療・診断標的分子の同定		
	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 5,700千円 22年度 4,100千円	21年度 4,500千円 期間全体 14,300千円	
	本プロジェクトとの違い	当該研究は iPS 細胞と何ら関連を有さない。		
2	助成制度	文部科学省科学研究費・特定領域研究		
	研究者氏名	小川誠司	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	造血系の制御機構の解析とゲノム異常の網羅的探索による造血器腫瘍発症機解明		
	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 12,800千円 22年度 千円	21年度 12,800千円 期間全体 25,600千円	
	本プロジェクトとの違い	当該研究は iPS 細胞と何ら関連を有さない。		
3	助成制度	戦略的創造推進研究事業		
	研究者氏名	小川誠司	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	Whole Genome Association 解析による GVHD の原因遺伝子の探索		
	研究期間	平成16年 10月 ~ 平成22年 3月		
	助成金合計 (見込み)	20年度 65,501千円 22年度 千円	21年度 67,430千円 期間全体 132,931千円	
	本プロジェクトとの違い	当該研究は iPS 細胞と何ら関連を有さない。		
4	助成制度	厚生労働科学研究費補助金・免疫・アレルギー疾患等研究事業		
	研究者氏名	小川誠司	当該研究者の役割	分担研究者
	研究テーマ	組織適合性適合性の基づく非血縁同種造血幹細胞移植の成績向上に関する研究		
	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 2,000千円 22年度 1,000千円	21年度 1,500千円 期間全体 4,500千円	
	本プロジェクトとの違い	当該研究は iPS 細胞と何ら関連を有さない。		
5	助成制度	科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究		
	研究者氏名	小川誠司	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	ダウン症候群における TAM の遺伝学的病態解明		
	研究期間	平成21年 4月 ~ 平成22年 3月		

	助成金合計 (見込み)	20年度 千円	21年度 3,100千円	22年度 千円	期間全体 3,100千円
	本プロジェクトとの違い	当該研究は iPS 細胞と何ら関連を有さない。			
6	助成制度	厚生労働科学研究費補助金・創薬基盤推進研究事業			
	研究者氏名	小川誠司	当該研究者の役割	分担研究者	
	研究テーマ	マイクロアレイ技術を用いた ATL のゲノムワイドな解析による新規治療標的分子の探索			
	研究期間	平成 18年 4月 ~ 平成 21年 3月			
	助成金合計 (見込み)	20年度 10,000千円	21年度 10,000千円	22年度 千円	期間全体 30,000千円
	本プロジェクトとの違い	当該研究は iPS 細胞と何ら関連を有さない。			
7	助成制度	厚生労働科学研究費補助金・第3次対がん総合戦略研究事業			
	研究者氏名	小川誠司	当該研究者の役割	分担研究者	
	研究テーマ	網羅的なゲノム異常解析に基づく多段階発がん過程並びに臨床病態の分子基盤の解明とその臨床応用に関する研究			
	研究期間	平成 19年 4月 ~ 平成 22年 3月			
	助成金合計 (見込み)	20年度 4,000千円	21年度 5,000千円	22年度 千円	期間全体 13,000千円
	本プロジェクトとの違い	当該研究は iPS 細胞と何ら関連を有さない。			
8	助成制度	厚生労働省科学研究費・難治性疾患克服事業			
	研究者氏名	小川誠司	当該研究者の役割	分担研究者	
	研究テーマ	骨髄異形成症候群に対する病態解明・治療法の開発に関する研究			
	研究期間	平成 19年 4月 ~ 平成 22年 3月			
	助成金合計 (見込み)	20年度 3,000千円	21年度 5,050千円	22年度 千円	期間全体 11,650千円
	本プロジェクトとの違い	当該研究は iPS 細胞と何ら関連を有さない。			
9	助成制度	厚生労働科学研究費補助金・第3次対がん総合戦略研究事業			
	研究者氏名	小川誠司	当該研究者の役割	分担研究者	
	研究テーマ	難治性小児がんの臨床的特性に関する分子情報の体系的解析と、その知見に基づく診断治療法の開発に関する研究			
	研究期間	平成 19年 4月 ~ 平成 22年 3月			
	助成金合計 (見込み)	20年度 2,500千円	21年度 2,000千円	22年度 千円	期間全体 7,000千円

本プロジェクトとの違い	当該研究は iPS 細胞と何ら関連を有さない。
-------------	-------------------------

菱川 慶一

1	助成制度	科学研究費補助金（基盤研究 C）		
	研究者氏名	菱川慶一	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	ヒト胚性幹細胞を用いた腎臓再生の試み		
	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 2470 千円 21年度 1930 千円 22年度 600 千円 期間全体 5000 千円		
	本プロジェクトとの違い	ヒト ES 細胞を用い、腎臓再生をめざした研究であり、目的が異なる		
2	助成制度	科学研究費補助金（基盤研究 C）		
	研究者氏名	高瀬敦、菱川慶一	当該研究者の役割	分担研究者
	研究テーマ	ヒト腎臓由来 iPS 細胞を用いた NF-κB 制御による新規腎臓再生療法の検討		
	研究期間	平成22年4月 ～ 平成25年3月		
	助成金合計（見込み）	20年度 千円 21年度 千円 22年度 2500 千円 期間全体 5000 千円		
	本プロジェクトとの違い	NF-κB 制御による腎臓構成細胞への分化誘導を試みる研究であり、目的、方法が異なる		

植木 浩二郎

1	助成制度	文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 B		
	研究者名	植木浩二郎	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	インスリン抵抗性 PI3 キナーゼが膵β細胞において増殖・再生・分泌に果たす役割		
	研究期間	H19年 4月 ～ H21年 3月		
	助成金合計	(本人/課題全体) 20年度 6800 千円/6800 千円 期間全体 13800 千円/13800 千円		
	本申請との違い	既存のβ細胞の増殖を目指す研究で本研究の目的とは異なる		
2	助成制度	文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 B		
	研究者氏名	植木浩二郎	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	Class 1B PI3 キナーゼ活性抑制による肥満糖尿病の新規治療法の検討		
	研究期間	平成21年 4月 ～ 平成24年 3月		
	助成金合計（見込み）	21年度 7,400 千円 22年度 4,600 千円 23年度 3,000 千円 期間全体 15,000 千円		
	本プロジェクトとの違い	炎症細胞のメタボリックシンドロームへの関与とその介入を目指す研究で本研究の目的とは異なる。		

後藤 由季子

1	助成制度	科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 (CREST)		
	研究者氏名	後藤由季子	当該研究者の役割	代表
	研究テーマ	神経幹細胞の分化ポテンシャル制御による神経回路構成素子の形成メカニズム		
	研究期間	平成21年10月 ~ 平成27年 3月		
	助成金合計 (見込み)	20年度 千円 21年度 53,700 千円 22年度 38,300 千円 期間全体 225,000 千円		
	本プロジェクトとの違い	マウス胎生期神経幹細胞の運命制御機構の解明と成体神経幹細胞の胎生期起源細胞の同定を目的としたものであり、iPS細胞由来の神経幹細胞を効率的に目的のニューロンに分化させる方法の確立を目的とした本プロジェクトとは異なる。		
2	助成制度	日本学術振興会 グローバルCOE		
	研究者氏名	後藤由季子	当該研究者の役割	分担 (代表 宮下 保司)
	研究テーマ	生体シグナルを基盤とする統合生命学		
	研究期間	平成19年 4月 ~ 平成24年 3月		
	助成金合計 (見込み)	20年度 12,000 千円 21年度 13,319 千円 22年度 14,775 千円 期間全体 60,000 千円		
	本プロジェクトとの違い	大学院教育と国際交流を主目的とするものであり、本プロジェクトとは関連しない。		
3	助成制度	科学研究費補助金 基盤研究 (A)		
	研究者氏名	後藤由季子	当該研究者の役割	代表
	研究テーマ	神経幹細胞の運命転換における核クロマチンの「グローバルな」状態変化の意義		
	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 13,900 千円 21年度 12,600 千円 22年度 11,800 千円 期間全体 38,300 千円		
	本プロジェクトとの違い	ニューロン成熟に伴うゲノムワイドなクロマチン変化の解析を行うものであり、本プロジェクトとは関連しない。		

大沼 清

1	助成制度	科学研究機補助金 (特定領域研究) : マルチスケール操作によるシステム細胞工学		
	研究者氏名	大沼 清	当該研究者の役割	研究代表
	研究テーマ	鋸歯状の細胞可動領域を用いた細胞の長距離移動の制御		
	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 1600 千円 21年度 1500 千円 22年度 千円 期間全体 千円		
	本プロジェクトとの違い	微細加工による細胞移動の制御に関する組織工学の研究ではあるが、幹細胞を用いてはいない。		
	助成制度	科学研究機補助金 (基盤研究 C)		
	研究者氏名	大沼 清	当該研究者の役割	研究代表
	研究テーマ	1 細胞培養・刺激応答計測システムの開発による、ES細胞のゆらぎ緩和機構の解析		

2	研究期間	平成 21 年 4 月 ~ 平成 24 年 3 月								
	助成金合計 (見込み)	<table border="0"> <tr> <td data-bbox="400 208 480 241">20 年度</td> <td data-bbox="576 208 632 241">千円</td> <td data-bbox="671 208 751 241">21 年度</td> <td data-bbox="823 208 927 241">2080 千円</td> </tr> <tr> <td data-bbox="400 253 480 286">22 年度</td> <td data-bbox="528 253 632 286">1300 千円</td> <td data-bbox="671 253 775 286">期間全体</td> <td data-bbox="831 253 927 286">4580 千円</td> </tr> </table>	20 年度	千円	21 年度	2080 千円	22 年度	1300 千円	期間全体	4580 千円
20 年度	千円	21 年度	2080 千円							
22 年度	1300 千円	期間全体	4580 千円							
	本プロジェクトとの違い	1 細胞レベルでのマウス ES 細胞のゆらぎに関する基礎的研究であり、再生医療実現化を直接目指した研究ではない。								

(補足説明資料)

1. 特許出願リスト

表題	概要	出願年月日
iPS 細胞からの血小板の調製方法	iPS 細胞からインビトロの培養系により、成熟巨核球、血小板などの血球細胞を効率的に調製する方法に関する特許。 公開番号 WO/2009/122747	平成 20 年 4 月 1 日 日本出願 平成 22 年 4 月 1 日 PCT 出願

## 2. H22年度における拠点業務の効率化を目指した研究実施体制の整備

東京大学では H21 年度までの業務成果を鑑み、H22 年度以降の業務遂行のより一層の効率化を図る目的で、以下のごとく研究実施体制の整備を行うこととする。業務内容により、全体を大きく「再生医療の実現化推進」および「基盤技術」の二つの研究開発セクションに分けて組織化し、セクション内の各業務を各研究者が他の研究者との連携を強化しつつ遂行する体制を構築する。

研究代表者の中内啓光は、「再生医療臨床応用」を加速させるため、他の拠点や国外の研究成果等に応じて「基盤技術」の開発研究の方向性・妥当性等を総合的に判断し、適宜指導・調整を行うことで、二つのセクションが目標の達成に向けて効率的かつ有機的に機能するように研究を総括する。中内は、加えて知的財産戦略および管理・活用体制強化、プロジェクトの総合的推進を担当する。

### ➤ iPS 細胞を用いた再生医療の実現化推進セクション（責任者：中内啓光）

#### 1) 臨床応用の実現化の加速

##### ① 血液細胞を標的とする臨床応用

- (i) 血小板（江藤浩之【西村 智】）
- (ii) T細胞（中内啓光【金子 新】）
- (iii) 赤血球、肥満細胞（辻 浩一郎）
- (iv) 造血幹細胞（リーダー：中内啓光、大津 真、江藤浩之）

##### ② 膵臓再生を目指した臨床応用（リーダー：宮島 篤、道上達男、植木 浩二郎）

##### ③ 骨・軟骨再生を目指した臨床応用（リーダー：牛田 多加志、[星 和人]、[斉藤 琢]、辻 浩一郎）

#### 2) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立・バンキング（リーダー：江藤浩之、辻 浩一郎、植木 浩二郎）

### ➤ iPS 細胞の臨床応用を支える基盤技術研究セクション（責任者：大津 真）

#### 1) 樹立法の標準化（リーダー：大津 真、北村俊雄、中内啓光、江藤浩之、道上達男）

#### 2) 培養法の標準化（リーダー：道上達男、菱川慶一）

#### 3) 安全性評価法の標準化（リーダー：小川誠司、菱川慶一、道上達男、大津 真、江藤浩之、渡辺すみ子）

#### 4) 安全性強化技術の開発（リーダー：大津 真、中内啓光【金子 新】）

#### 5) 分化誘導制御法の開発に資する基盤研究（リーダー：後藤 由季子、真鍋一郎）

#### 6) iPS 細胞技術の啓発（リーダー：江藤浩之、道上達男）

## 研究業務遂行組織の変更

