

再生医療の実現化プロジェクト（第Ⅱ期） 成果報告票

（個別研究事業）＜中間評価＞

課題名	ヒト iPS ならびに ES 細胞を用いた安全かつ効率的な造血幹細胞分化法の開発
代表機関名	国立大学法人九州大学
代表研究者名	谷 憲三朗
分担機関・分担研究者名	該当なし

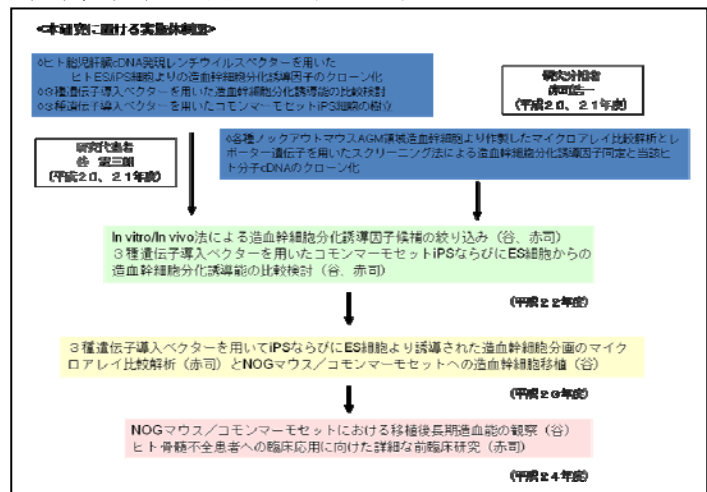
1. 課題開始時における達成目標

(1) ヒト iPS 細胞ならびに ES 細胞を造血幹・前駆細胞に分化誘導する候補遺伝子の同定：(a) これまでに我々が確立した遺伝子導入による非ヒト霊長類 ES 細胞よりの造血細胞高分化系を基本に、既に作成済みのヒト胎児肝臓 cDNA 発現レンチウイルスベクターライブラリーを用いて、ヒト iPS 細胞ならびにヒト ES 細胞から高い効率で造血幹細胞に分化誘導可能な遺伝子を *in vitro* スクリーニング法ならびにマウス *in vivo* 実験により同定する。(b) 正常ならびに成体造血再構築不全ノックアウトマウスの各 9.5dpc ならびに 10.5dpc の AGM 領域由来造血幹細胞より作製した cDNA マイクロアレイ解析情報を元に新規造血幹細胞分化誘導遺伝子を適切なレポーター遺伝子系を用いて同定し、*in vitro* ならびにマウス *in vivo* での造血誘導能を確認後、そのヒト cDNA をクローン化する。さらに当該遺伝子をヒト iPS 細胞ならびにヒト ES 細胞に導入することによりその造血誘導能の確認を行う。

2) ヒト iPS 細胞あるいは ES 細胞から遺伝子導入により誘導した造血幹・前駆細胞の *in vitro/in vivo* 解析：上記で得られた各遺伝子導入 iPS 細胞あるいは ES 細胞集団より造血幹細胞分画 (CD34(+), CD38(-), c-kit(+)) を採取し両者間での分子レベルでの差の有無を見るために cDNA マイクロアレイ解析を行い遺伝子発現プロファイルを比較検討する。さらに染色体非挿入 (遺伝子導入) ウイルスベクター (アデノウイルスベクターもしくはセンダイウイルスベクター) を用いて上記遺伝子を導入した場合にも同様の結果が得られるか否かを検討すると共に免疫不全マウスに骨髄移植を行い、その長期的造血能を検討する。

(3) コモンマーモセット (CM) iPS 細胞の樹立：(1)、(2) の研究と並行してウイルスベクターを用いて Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Lin28 等発現ウイルスベクターを作製し、小型霊長類コモンマーモセット (CM) 皮膚線維芽細胞を対象に iPS 細胞樹立の可能性を比較検討する。

(4) CM iPS 細胞あるいは ES 細胞から遺伝子導入により誘導した造血幹・前駆細胞の CM *in vivo* 前臨床研究：(3) において CM iPS 細胞が樹立された場合には既に樹立済みの CM ES 細胞を対象に (2) で用いた遺伝子に相当する CM 遺伝子をクローン化し、これら遺伝子発現染色体非挿入ウイルスベクターを作製し、CM ES 細胞ならびに CM iPS 細胞より造血幹細胞を分化誘導し、CM *in vivo* においてそれぞれの長期的造血再構築能ならびに安全性を比較検討し、ヒトに用いる上での問題点などがないかどうかについて詳細に検討する。



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) ヒト胎児肝臓cDNA発現レンチウイルスベクターライブラリーを用いたヒトES/iPS細胞よりの造血幹細胞分化誘導技術の開発： これまでに自他により報告のあったTal1/ScfもしくはHoxB4等遺伝子導入による霊長類ES細胞よりの造血細胞分化系を基に、レンチウイルスベクターを用いてTal1/Scf遺伝子を恒常的に発現するヒトES細胞株を4クローン樹立した。これらの細胞株の造血細胞への分化能を胚様体形成法にて検討したところ、Tal1/Scf遺伝子を恒常的に発現するヒトES細胞は造血・血球細胞への分化誘導能が上昇することが明らかとなった。また、ヒト胎児肝臓cDNA発現レンチウイルスベクターライブラリーを用いて赤芽球系細胞への分化誘導分子の探索を行ったところ、17個の候補遺伝子を得、さらなるスクリーニングの結果、赤芽球系細胞造血に重要な役割を果たしていることが示唆される遺伝子を得た。

2) 各種ノックアウトマウスAGM領域造血幹細胞より作製したマイクロアレイ比較解析とレポーター

遺伝子を用いたスクリーニング法によるヒトES/iPS細胞よりの造血幹細胞分化誘導技術の開発： 造血幹細胞の発生機構の解明を目的として、フローサイトメトリー法、qPCR法、免疫染色法を用いて造血幹細胞クラスターの性状解析を試みた。正常マウス造血発生の解析においては、成体へ移植可能な造血幹細胞クラスターは胎齢 10.5 日目マウス胎仔の大動脈-中腎-生殖隆起領域 (AGM領域) と 11.5 日目の胎盤に存在する。そこで、まず抗c-Kit抗体で免疫染色法を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、これら造血幹細胞クラスターを可視化する事に成功した。次に、造血転写因子遺伝子ノックアウトマウス (*Evi1*, *Runx-1*, *c-Myb*) において、胎齢 10.5 日目 AGM 領域の造血幹細胞クラスターを免疫染色法により解析したところ、*Evi-1*, *Runx-1* ノックアウトマウスにおいてクラスターは形成されず、*c-Myb* ノックアウトマウスにおいては、クラスターが観察されものの、サイズが大きく、その形成に障害がある事が示唆された。また、胎盤造血幹細胞クラスターを同様に可視化し、クラスターを取り囲むニッチ細胞をレーザーマイクロダイセクション法により直接採取し、このニッチ細胞におけるサイトカイン遺伝子の発現を検討したところ、*SCF*(*Stem Cell Factor*)遺伝子のみが優位に発現していた。PCR法及び免疫染色法においては、ニッチ細胞の中でも特に血管内皮細胞が *SCF* を発現している事が明らかになった。そこで、*SCF*/ *c-Kit* シグナルをブロックする、抗 *c-Kit* 中和抗体(ACK2)をマウス胎仔の心臓へ注射し、全胚胎仔培養を行う事で、胎盤造血幹細胞クラスターにおける *SCF*/ *c-Kit* シグナルの役割を検討した。その結果、ACK2 注射群においては、胎盤造血幹細胞における造血発生に必須の転写因子群 *Runx1*, *c-Myb*, *GATA-2* の遺伝子発現はコントロールと比較して低下しており、*SCF*/ *c-Kit* シグナルが胎盤造血幹細胞の発生を制御している事が明らかになった。更に、造血幹細胞クラスターの起源を検討したところ、胎齢 9.5 日目臍腸間膜動脈において同定出来た。そこで、この臍腸間膜動脈造血幹細胞クラスター、胎齢 10.5 日目の AGM 領域の造血幹細胞クラスター及び ES 細胞由来サンプルを採取し、マイクロアレイ解析を行うことにより、より効率良く ES/iPS 細胞から造血幹細胞を誘導する技術開発に向けた検討を進めている。

3) 各種遺伝子導入ベクターを用いたコモンマーモセット (CM) iPS細胞の樹立技術の開発： 外来遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) を挿入したレンチウイルスベクターを理化学研究所・三好浩之博士より供与いただき、CM胎児由来線維芽細胞に遺伝子導入を行い、CM ES細胞様のコロニーの樹立を試み、解析を行っている。また、染色体非挿入型ウイルスである麻疹ウイルスを用いてヒトiPS細胞の樹立を試みた。外来遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) を挿入した分節型麻疹ウイルスベクターを用いてヒト線維芽細胞株に遺伝子導入を行い、ヒトiPS細胞の樹立を試みた。

(2) 研究の進捗及び成果

1) ヒト胎児肝臓cDNA発現レンチウイルスベクターライブラリーを用いたヒトES/iPS細胞よりの造血幹細胞分化誘導技術の開発： これまでに自他により報告のあった *Tal1*/*Scl* もしくは *HoxB4* 等遺伝子導入による霊長類ES細胞よりの造血細胞分化系を基に、*Tal1*/*Scl* 遺伝子発現複製不能レンチウイルスベクター (*EF1a-tal1/scl-IRES-Venus*) を構築し、本ベクターを用いて *Tal1*/*Scl* 遺伝子を恒常的に発現するヒトES細胞株を4クローン樹立した (*ES-tal1/scl-IRES-Venus* #1~#4)。これらの細胞株の特性を検証後、血球系細胞分化能を胚様体形成法により検討した。その結果、*Tal1*/*Scl* 遺伝子を恒常的に発現するヒトES細胞では最適成長因子存在下で、造血・血球細胞への分化誘導能が上昇することが明らかとなった。また、ヒト胎児肝臓cDNA発現レンチウイルスベクターライブラリーを用いて赤芽球系細胞への分化誘導分子の探索を行ったところ、17個の候補遺伝子を得、さらなるスクリーニングの結果、赤芽球系細胞造血に重要な役割を果たしていることが示唆される遺伝子を得た。現在、これらの候補遺伝子の臨床病態への関与とともに、ヒトES/iPS細胞からの造血・赤血球分化系促進を念頭においた体外造血増幅系への応用を検討中である。また、マウス胎児肝細胞を用いて、*CD45*, *Sca-1*, *c-kit*, *CD71*, *Ter119* の発現を指標に造血幹細胞および各成熟段階の赤芽球および網状赤血球を分取し、1次、2次スクリーニングより得られた候補遺伝子の発現を検討した。その結果 *Apoa-1* 遺伝子は未分化の細胞に比べ *Ter119* 陽性細胞にて高発現であり、また、*Apoa-1* 遺伝子はヒト末梢血細胞でも発現が確認できた。これらの結果から、ヒトおよびマウスにおいて、ES/iPS細胞より赤芽球を分化誘導する際、*Apoa-1* は新規赤芽球成熟マーカーの一つとして利用できる可能性が示唆された。

2) 各種ノックアウトマウスAGM領域造血幹細胞より作製したマイクロアレイ比較解析とレポーター遺伝子を用いたスクリーニング法によるヒトES/iPS細胞よりの造血幹細胞分化誘導技術の開発： マウスにおいて、成体型造血幹細胞は胎齢 10.5 日目 AGM領域で検出される。AGM領域では造血幹細胞が集塊を形成し、大動脈基底部分管内皮に接着した造血幹細胞クラスターが認められる。造血幹細胞クラスターの発生メカニズムを解明し、試験管内でその現象を再構築する事が出来れば、より効率良くES細胞やiPS細胞から造血幹細胞を誘導する技術を開発出来る。造血幹細胞の発生機構の解明を目的として、我々はフローサイトメトリー法、qPCR法、免疫染色法を用いて造血幹細胞クラスターの性状解析を試みた。正常マウス造血発生の解析においては、胎齢 9.0-11.5 日目マウス胎仔において、造血幹細胞マーカーである *c-Kit* で免疫染色法を行ったところ、最初の造血幹細胞は胎齢 9.0-9.5 日目臍腸間膜動脈に集塊を

形成することが判明した。成体へ移植可能な造血幹細胞は胎齢 10.5 日目マウス胎仔のAGM領域に存在し、c-Kitを用いた免疫染色で可視化出来た。そこで、胎齢 9.0 日目と 10.5 日目において造血幹細胞をフローサイトメトリー法で採取し、DNA array用のサンプルをプールしている。また、Twist-1 遺伝子に一塩基置換を伴ったマウスの解析から、Twist-1 遺伝子が造血発生（特にリンパ球発生）に重要なことを解明した。そこで、Twist-1 ノックアウトマウスの解析も行った。Twist-1 はbasic helix-loop-helix群に属する転写因子であり、中胚葉発生に重要な役割を持っていると考えられている。造血幹細胞発生部位であるAGM領域の造血活性をコロニーアッセイ法で検討したところ、Wild Typeに比しコロニー形成が著明に減少していた。また、ホモ接合体変異胎仔ではリンパ球活性が欠損していた。更に、AGM領域の造血幹細胞分画をフローサイトメトリー法で解析したところ、造血幹細胞集団のc-Kit+/ CD31+/ CD34+細胞がTwist-1 ホモ接合体変異胎仔では検出出来ず、新生仔骨髄再構築能の検討から造血幹細胞が欠損している事が明らかとなった。更に、各種ノックアウトマウス (*Evi1*, *Runx-1*, *c-Myb*) 胎齢 10.5 日目のAGM領域の造血幹細胞クラスター解析を免疫染色法により行ったところ、転写因子*Evi-1*, *Runx-1* ノックアウトマウスにおいてはクラスター形成が観察されず、*c-Myb*ノックアウトマウスにおいては、クラスター形成が観察されものの、その成熟に障害がある事が示唆された。

また、我々はマウス胎盤造血幹細胞の免疫染色法による可視化技術を確立し、本手法により胎盤造血幹細胞が従来の造血幹細胞発生部位である AGM 領域の造血幹細胞と同様に、血管内皮細胞に接着してクラスターを形成する事を明らかにした。そこで、この制御機構を解明するため、胎盤造血幹細胞クラスター周囲のニッチ細胞をレーザーマイクロダイセクション法により直接採取し、このニッチ細胞におけるサイトカインの遺伝子発現を検討したところ、*SCF*(*Stem Cell Factor*)遺伝子が優位に発現していた。次に、フローサイトメトリー法により胎盤組織から血管内皮細胞と間葉系細胞を純化・採取し、同様にサイトカインの発現を検討したところ、両者において *SCF* 遺伝子の発現が認められたが、血管内皮細胞における発現は間葉系細胞と比較して 2.5 倍高く、胎盤造血幹細胞ニッチの本態は血管内皮細胞と考えられた。更に ELISA 法を用いて *SCF* タンパク質の発現を検討したところ、血管内皮細胞において高い発現が認められ、血管内皮細胞が発現する *SCF* が、そのレセプターである *c-Kit* を発現する胎盤造血幹細胞を制御している事が示唆された。そこで *SCF*/ *c-Kit* のシグナルをブロックする、抗 *c-Kit* 中和抗体 (*ACK2*)をマウス胎仔の心臓へ注射し、全胚胎仔培養を行う事で、胎盤造血幹細胞における *SCF*/ *c-Kit* シグナルの役割を検討した。その結果、*ACK2* 注射群においては、胎盤造血幹細胞における造血発生に必須の転写因子群 *Runx1*, *c-Myb*, *GATA-2* の遺伝子発現はコントロールと比較して低下しており、*SCF*/ *c-Kit* シグナルが胎盤造血幹細胞の発生を制御している事が明らかになった。胎盤造血幹細胞は本研究において AGM 領域造血幹細胞と同様にアレイ解析用サンプルとして利用可能と考えられた。当初予定していた、各種ノックアウトマウス AGM 領域の造血幹細胞によるマイクロアレイ解析では、造血幹細胞発生を制御する遺伝子を同定する目的には不十分であることが示唆された事から、胎齢 9.5 日目、胎齢 10.5 日目の AGM 領域の造血幹細胞サンプル及び ES 細胞由来サンプルを採取し、マイクロアレイ解析を行うこととした。

3) 各種遺伝子導入ベクターを用いたコモンマーモセット (CM) iPS細胞の樹立技術の開発: ①レンチウイルスベクターを用いた検討: 外来遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) を挿入したレンチウイルスベクターを理化学研究所・三好浩之博士より供与いただき、CM胎児由来線維芽細胞に遺伝子導入を行い、CM ES細胞様のコロニーの樹立を試み、解析を行っている。②麻疹ウイルスを用いた検討: 染色体非挿入型ウイルスである麻疹ウイルスゲノムを3分節化し、ヒトES細胞mRNAよりクローン化した外来遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) を挿入した麻疹ウイルスベクターを作製した。これらの外来遺伝子を持つ麻疹ウイルスを増幅させ、3 遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*) を持つウイルスクローンを 3 種、4 遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) を持つウイルスクローンを 2 種単離した。これら 5 種のウイルスベクターの外来遺伝子発現能をRT-PCR法ならびにDNA配列決定法にて確認後、ヒト線維芽細胞に感染させヒトiPS細胞の樹立を試みた。感染後 10 日程度でiPS細胞様のコロニーが観察されたが、それらのコロニーは増殖、拡大することなく1ヶ月以上の期間、形態を保ったままであった。用いたウイルス液力価の低さ、それに伴う遺伝子導入効率の低さ (10%以下) が原因であると考えられ、麻疹ウイルスゲノムを2分節化し同様に麻疹ウイルスベクターを作製した。これらの外来遺伝子を持つ麻疹ウイルスを増幅させ、3 遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*)、4 遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) を持つウイルスクローンを単離した。これらウイルスベクターの外来遺伝子発現能をRT-PCR法ならびにウエスタンブロット法にて確認後、麻疹ウイルスをPEG-it virus Precipitation Solution™にて濃縮し、濃縮ウイルスをヒト線維芽細胞等初代培養細胞に感染させヒトiPS細胞の樹立を試みた。

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	2 件 (うち国外 2 件)
5. 当初目標に対する達成度	
1) ヒト胎児肝臓cDNA発現レンチウイルスベクターライブラリーを用いたヒトES/iPS細胞よりの造血	

幹細胞分化誘導技術の開発： 課題開始時の目標はヒトiPS細胞ならびにES細胞を造血幹・前駆細胞に分化誘導する候補遺伝子の同定であり、予備的な結果ではあるが、Tall/Scf遺伝子と協調してCM ES細胞のコロニー形成能を増強させる分子を得ており、得られたコロニーには比較的未分化な血球系細胞塊が観察された。また、このレンチウイルスベクターライブラリーを用いて赤芽球系細胞への分化誘導分子の候補を同定することができた。これら候補遺伝子についてのマウスin vivo実験ならびにヒトES/iPS細胞からの造血・赤血球分化系促進を念頭においた体外造血増幅系への応用については現在検討中である。

2) 各種ノックアウトマウスAGM領域造血幹細胞より作製したマイクロアレイ比較解析とレポーター遺伝子を用いたスクリーニング法によるヒトES/iPS細胞よりの造血幹細胞分化誘導技術の開発： 課題開始時の目標は、正常ならびに成体造血再構築不全ノックアウトマウスのAGM領域由来造血幹細胞より作製したcDNAマイクロアレイ解析情報を元に新規造血幹細胞分化誘導遺伝子を適切なレポーター遺伝子系を用いて同定することであった。AGM領域由来造血幹細胞サンプル量は極めてわずかなため解析に供する細胞数を得るために時間を必要としたが、必要な細胞数がほぼプールできたためマイクロアレイ解析を進行中である。また、各種ノックアウトマウスAGM領域の造血幹細胞によるマイクロアレイ解析では、造血幹細胞発生を制御する遺伝子を同定する目的には不十分であることが示唆されたことから、胎齢 9.5 日目、胎齢 10.5 日目の正常AGM領域の造血幹細胞サンプル及びES細胞由来サンプルを採取し、解析を進行中である。

3) 各種遺伝子導入ベクターを用いたコモンマーモセット (CM) iPS 細胞の樹立技術の開発： 課題開始時の目標は、ウイルスベクターを用いて小型霊長類 CM 皮膚線維芽細胞を対象にiPS細胞樹立の可能性の比較検討であった。レンチウイルスベクターについてはCM ES細胞様のコロニーが得られている。これらのコロニーの血球系への分化能は現在検討中である。また、課題開始時の計画ではアデノウイルスまたはセンダイウイルスベクターを用いる予定であったが、他研究者らにより報告がなされるとの情報を得たため、同様の染色体非挿入型ウイルスであり、知財面を含め我々の独自性がより発揮できる麻疹ウイルスベクターを用いた。本課題で用いている分節型麻疹ウイルスベクターは、1) 九州大学において新たに開発された複数遺伝子(最大6種類)搭載可能新規ベクター系である点、2) 麻疹ウイルスベクター系は、クローニングされたウイルスゲノムcDNAから、再び感染性ウイルスを回収するリバースジェネティクスの手法が確立しており、比較的簡単に組換え遺伝子発現ウイルスを回収することができる点、3) 遺伝子発現はレンチウイルスおよびレトロウイルスベクターと異なり一過性であるが、染色体非挿入型ウイルスベクターであるため、導入した遺伝子発現が高い点、においてアデノウイルスおよびセンダイウイルスベクターより有用なツールであると考え麻疹ウイルスベクターを用いてヒトiPS細胞の樹立を試みた。麻疹ウイルスは受容体の性質上、CM細胞には感染しにくいことからヒト線維芽細胞を使用してiPS細胞樹立を行ったが、麻疹ウイルス受容体恒常発現CM初代培養細胞株の樹立を進めており、恒常発現株が得られれば今回検討したヒト細胞と同様の条件でCM iPS細胞の樹立が可能となるものと考えられる。

6. 課題内の情報共有・連携体制

分担研究者である九州大学大学院医学研究科病態修復内科学分野 赤司浩一教授らと合同で定期的にiPS共同研究会議を開催し、情報の共有を行っている。

7. 課題外の課題との情報共有・連携

理化学研究所・バイオリソースセンター細胞材料開発室との共同研究を行った。また、業務項目(3) CM iPS細胞樹立のために、外来遺伝子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を挿入したレンチウイルスベクターを理化学研究所・三好浩之博士より供与いただいた。さらに第510回生医研セミナー(中村幸夫先生、理化学研究所バイオリソースセンター)、第529回生医研セミナー(濱田洋文先生、本プロジェクト外の研究者)、第531回生医研セミナー(川上浩一先生、本プロジェクト外の研究者)、第545回生医研セミナー(二見宗孔先生、本プロジェクト外の研究者)を主催、ヒト多能性幹細胞培養法の実践レクチャーに参加することにより情報交換を行った。また、第510回生医研セミナー(中村幸夫先生、理化学研究所バイオリソースセンター)後、実施課題について情報交換を行った。

8. 人材育成

理化学研究所・バイオリソースセンター細胞材料開発室主催、ヒト多能性幹細胞培養法の実践レクチャー、東京大学拠点技術講習会に参加することにより、課題参加者のES/iPS細胞の培養技術向上を目指した。

9. 生命倫理に係る対応

マウスを用いた動物実験においては、実験計画を九州大学動物実験委員会に提出し、承認後に実験を開始した。文部科学省及び九州大学の定める『動物の愛護及び管理に関する法律』を遵守して動物愛護、生命倫理の観点に十分配慮しながら動物に苦痛を与えることなく実験を実施した。全ての遺伝子組み換え実験は、遺伝子組換え実験計画を九州大学遺伝子組換え実験安全委員会に提出し、承認後に実験を行

った。文部科学省の定める『遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律』及び九州大学の定める『九州大学遺伝子組換え実験指針』に従って実施し、安全性の確保に最大の注意を払い研究を実施した。実験室内の P2 レベルの培養室、SPF 実験動物管理部屋において厳重な管理のもと実験を行い、ウイルス汚染や人畜共通感染症の発生伝播を防止するよう努めた。さらにヒト ES 細胞を用いた研究は文部科学省の定める『ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針』に従って専用実験室内において行い倫理性、安全性の確保に最大限の注意を払い研究を実施した。なお既に九州大学生体防御医学研究所ゲノム病態学分野では本研究目的でのヒト ES 細胞の使用許可を平成 19 年 7 月 31 日に文部科学大臣より得ている。麻疹ウイルスを用いた実験は、第二種使用等（大臣確認）実験に該当するが、九州大学遺伝子組換え実験安全委員会の審査を受け、文部科学大臣の承認を受けた上で研究を実施した。

10. 今後の展望

1) ヒト胎児肝臓 cDNA 発現レンチウイルスベクターライブラリーを用いたヒト ES/iPS 細胞よりの造血幹細胞分化誘導技術の開発： これまでに選択したヒト造血・血球分化誘導分子を用いて、in vitro および免疫不全マウスを用いてヒト造血再構築能を詳細に検討し、造血幹細胞をヒト ES/iPS 細胞から高効率に分化誘導可能な条件を選択する。必要に応じ免疫不全マウス in vivo においてヒト ES/iPS 細胞からの造血再構築能を詳細に検討する。これに際し、市販の発現調節可能なベクター (tet-on / tet-off 系など)、あるいは東京大学医科学研究所・中内啓光教授らとの共同研究としてオールインワンベクター等を用いて研究を実施する。さらに、二次スクリーニングが終了していない候補遺伝子約 20 種については、二次スクリーニングを実施し、有望な遺伝子を絞りこむ。また疾患対象として造血不全を起こす、再生不良性貧血、発作性夜間血色素尿症症候群に焦点をあて、その病態解析および治療法開発を目的とした患者 iPS 細胞バンク作製に向けた準備を行う。

2) 各種ノックアウトマウス AGM 領域造血幹細胞より作製したマイクロアレイ比較解析とレポーター遺伝子を用いたスクリーニング法によるヒト ES/iPS 細胞よりの造血幹細胞分化誘導技術の開発： 胎盤造血幹細胞ならびに胎齢 9.5 日目、胎齢 10.5 日目の AGM 領域の造血幹細胞サンプル及び ES 細胞由来サンプルをフローサイトメトリーで採取し、ここで得られた mRNA を元に各 DNA array を作製する。これらの比較検討により得られる各候補 cDNA についてヒト cDNA をクローン化後、各発現レンチウイルスベクターを作製し、ヒト ES/iPS 細胞へ遺伝子導入を行い、in vitro ならびに免疫不全マウス in vivo でのヒト由来造血細胞誘導能の高い分子候補を絞り込み、より効率良く ES 細胞や iPS 細胞から造血幹細胞を誘導する技術開発に向けて検討を行う。

3) 各種遺伝子導入ベクターを用いたコモンスターモセット (CM) iPS 細胞の樹立技術の開発： 実験動物中央研究所・佐々木えりか博士がレトロウイルスベクターにて樹立した CM iPS 細胞ならびに我々がレンチウイルスベクターにて樹立した CM ES 細胞様コロニーについて発現プロファイル解析を引き続き行う。麻疹ウイルスは受容体の性質上、CM 細胞には感染しにくいことからまずヒト線維芽細胞を用いて iPS 細胞樹立を行ったが、現在麻疹ウイルス受容体恒常発現 CM 初代培養細胞株の樹立を進めており、染色体非挿入型ウイルスである麻疹ウイルスによる CM iPS 細胞の樹立は十分に可能であると考えている。さらに得られた iPS 細胞を用いて、Tal1/Scf 遺伝子ならびに Tal1/Scf 遺伝子と協調して作用する候補遺伝子をこれらのウイルスベクターを用いて導入し血球分化系の探索を行う。条件に応じて適宜ベクターの改良を行い安全面での検討も併せて行う。さらに、既に報告されている染色体内遺伝子非組み込み型センダイウイルスベクターにより樹立されたヒト iPS 細胞との発現プロファイルについて比較検討する。麻疹ウイルスベクターの安全性、有効性を検証後、各拠点と連携しながら、本ウイルスベクターの本事業における広汎な応用の可能性を検討する。また、CM iPS 細胞あるいは ES 細胞から遺伝子導入により誘導した造血幹・前駆細胞の CM in vivo 前臨床研究を目標に、CM ES 細胞ならびに CM iPS 細胞より造血幹細胞を分化誘導し、CM in vivo においてそれぞれの長期的造血再構築能ならびに安全性を比較検討し、ヒトに用いる上での問題点の有無について詳細に検討する。

11. 特記事項

なし

12. 委託研究費一覧

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費 (千円)	2,231	2,694	0	4,926
人件費 (千円)	5,722	8,339	10,989	25,050
業務実施費 (千円)	30,508	27,428	15,934	73,871
間接経費 (千円)	11,538	11,538	8,077	31,154
合計 (千円)	50,000	50,000	35,000	135,000

(別紙1)

1. 論文のリスト

- © Kurita R, Oikawa T, Okada M, Yokoo T, Kurihara Y, Honda M, Kageyama R, Suehiro Y, Okazaki T, Iga M, Miyoshi H, Tani K. Construction of a high-performance human fetal liver-derived lentiviral cDNA library. Mol. Cell Biochem. 319: 181-187 (2008)
- Canter AB, Iwasaki H, Arinobu Y, Moran TB, Shigematsu H, Sullivan MR, Akashi K, Oriken SH. Antagonism of FOG-1 and GATA factors in fate choice for the mast cell lineage. J. Exp. Med. 205 (3): 611-624 (2008)
- Mori Y, Iwasaki K, Kohno G, Yoshimoto Y, Kikushige A, Okeda N, Uike H, Niuro K, Takenaka K, Nakafuji T, Miyamoto M, Harada K, Akashi K. Identification of the human eosinophile lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. J. Exp. Med. 206 (1): 183-193 (2008)
- Kametani, Y., Suzuki, D., Kohu, K., Satake, M., Suemizu, H., Sasaki, E., Ito, T., Tamaoki, N., Mizushima, T., Ozawa, M., Tani, K., Kito, M., Arai, H., Koyanagi, A., Yagita, H., Habu, S. Development of monoclonal antibodies for analyzing immune and hematopoietic systems of common marmoset. Exp. Hematol. 37: 1318-1329 (2009)
- Kalaszczynska I, Geng Y, Iino T, Mizuno S, Choi Y, Kondratiuk I, Silver DP, Wolgemuth DJ, Akashi K, Sicinski P. Cyclin A is redundant in fibroblasts but essential in hematopoietic and embryonic stem cells. Cell 138 (2): 352-365 (2009)
- Yoshimoto G, Miyamoto T, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Iino T, Rocnik JL, Kikushige Y, Mori Y, Shima T, Iwasaki H, Takenaka K, Nagafuji K, Mizuno S, Niuro H, Gilliland GD, Akashi K. FLT3-ITD up-regulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD-specific STAT5 activation. Blood 114 (24): 5034-5043 (2009)
- © Inoue T, Sugiyama D, Kurita R, Oikawa T, Kuleaw K, Kawano H, Miura Y, Okada M, Suehiro Y, Takahashi A, Marumoto T, Inoue H, Komatsu N, Tani K. APOA-1 is a novel marker of erythroid cell maturation from hematopoietic stem cells in mice and humans. Stem Cell Rev. Rep in press (2010)
- Xin M, Nakamura T, Okazaki T, Inoue H, Takahashi A, Miyamoto S, Sakaguchi G, Eto M, Naito S, Takeda M, Yanagi Y, Tani, K. Enhanced Antitumor Effects of an Oncolytic Measles Virus Vaccine Strain Expressing the Wild-type N, P, L Genes on Human Renal Cell Carcinoma. Mol. Ther. 18(3): 544-551 (2010)

2. 特許出願リスト

表題	概要	出願年月日
Novel erythrocyte differentiation inducing method and novel erythrocyte differentiation marker 5 α -reductase inhibitor	新規赤血球分化誘導法ならびに新規赤血球分化マーカーの同定	平成 22 年 3 月 4 日
Therapeutic agent for malignant tumor using oncolytic measles virus and therapeutic method using the agent	麻疹ウイルスを用いた新規腫瘍治療法の開発	平成 22 年 2 月 26 日

(別紙2)

他制度等による助成

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	科学研究費補助金 特定領域研究		
	研究者氏名	谷 憲三朗	当該研究者の役割	代表
	研究テーマ	新規遺伝子治療ベクターの開発と悪性腫瘍モデルコモンマーモセットを用いた前臨床研究		
	研究期間	平成17年4月～平成22年3月		
	助成金合計 (見込み)	20年度 10,000千円 22年度 0千円	21年度 10,000千円	期間全体 50,000千円
	本プロジェクトとの違い	遺伝子治療用の新しいベクターの開発とその動物実験研究、コモンマーモセットでの悪性腫瘍モデル系の作出がこの研究テーマであるため、内容が異なる。		
2	助成制度	厚生労働科学研究費 創薬基盤推進事業		
	研究者氏名	谷 憲三朗	当該研究者の役割	代表
	研究テーマ	非ヒト霊長類造血器腫瘍モデル作出と悪性腫瘍モデル作出に向けた基盤技術の開発		
	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 8,551千円 22年度 0千円	21年度 6,388千円	期間全体 24,939千円
	本プロジェクトとの違い	カニクイザルにおいてヒト成人病T細胞性白血病/リンパ腫作出とコモンマーモセットES細胞にp53遺伝子変異を導入する研究テーマであるため、内容が異なる。		
3	助成制度	科学研究費補助金 基盤研究 (B)		
	研究者氏名	谷 憲三朗	当該研究者の役割	代表
	研究テーマ	ES細胞療法開発に向けたヒトES細胞からの造血細胞産生系の構築と分子機構の解明		
	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 8,970千円 22年度 4,550千円	21年度 5,330千円	期間全体 18,850千円
	本プロジェクトとの違い	ヒトES細胞を用いた新たな細胞移植療法開発の為の基礎研究であり、新規医療開発という観点では共通しているが、分子機構の解明に重点をおいているため目的が異なる。		

(補足説明資料)

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

ヒト胎児肝臓 cDNA 発現レンチウイルスベクターライブラリーを用いたヒト ES/iPS 細胞よりの造血幹細胞分化誘導技術の開発: これまでに自他により報告のあった Tal1/Scf もしくは HoxB4 等遺伝子導入による霊長類 ES 細胞よりの造血細胞分化系を基に、Tal1/Scf 遺伝子発現複製不能レンチウイルスベクター (EF1a-tal1/scf-IRES-Venus) を構築し、本ベクターを用いて Tal1/Scf 遺伝子を恒常的に発現するヒト ES 細胞株を4クローン樹立した (ES-tal1/scf-IRES-Venus #1~#4)。

また、ヒト胎児肝臓 cDNA 発現レンチウイルスベクターライブラリーを用いて赤芽球系細胞への分化誘導分子の探索を行った。

再生医療の実現化プロジェクト（第Ⅱ期） 成果報告票 （個別研究事業）＜中間評価＞

課 題 名	iPS 細胞から膵β細胞への分化制御と糖尿病再生医療の基盤開発
代 表 機 関 名	国立大学法人熊本大学
代 表 研 究 者 名	桑 昭苑
分担機関・分担研究者名	該当なし

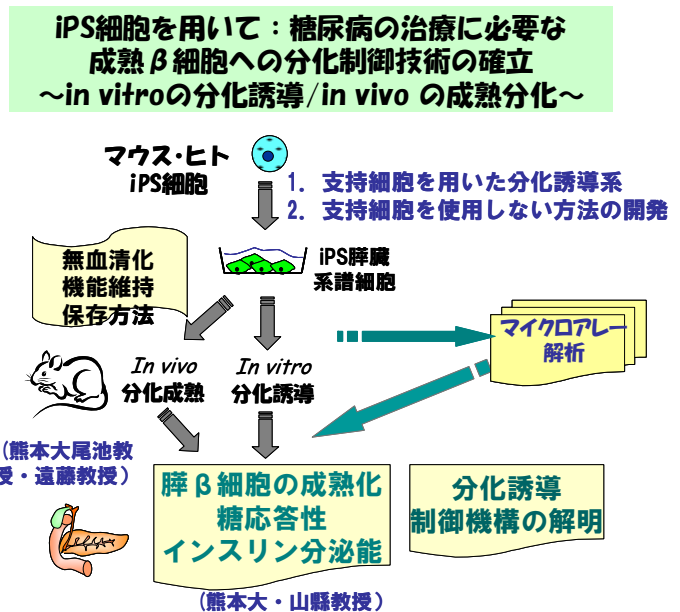
1. 課題開始時における達成目標

目的: 臨床応用に発展しうるヒト iPS 細胞由来の膵β細胞を分化誘導し、分化細胞を保存する技術の開発を行い、糖尿病モデル動物を用いて治療効果を検証し、再生医学の基盤を確立する。

達成目標: マウス及びヒト iPS 細胞を用いて、臨床使用に耐える膵β細胞を作成する。そのために、*in vitro* で分化誘導法を開発し、培養下における膵β細胞の維持、*in vivo* の動物モデル系の有用性を利用した移植によるβ細胞の成熟化を検討する。インスリン分泌量の促進、成熟膵β細胞の増幅技術を開発する。臨床応用に耐えるように、機能的に成熟した膵β細胞を質的、量的に十分に作成できる方法を開発する。そして最終年度には前臨床応用試験として糖尿病大型モデル動物についても着手する。

そのためには、*in vitro* 分化誘導系及び前駆細胞による *in vivo* での成熟分化モデルの併用により進める。マウス及びヒト iPS 細胞から分化誘導し、再生医療の臨床応用ができるように、次の項目について技術開発を行う：

- I) ES/iPS 細胞から膵β細胞への *in vitro* 分化制御の技術開発
- II) *in vivo* の微小環境を利用した機能的なβ細胞への成熟化
- III) 作成した膵β細胞による糖尿病治療効果の検討



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) ES/iPS細胞から膵β細胞への*in vitro*分化制御の技術開発

・分化、成熟度を向上させるために、下記の分化誘導条件の検討を行った。

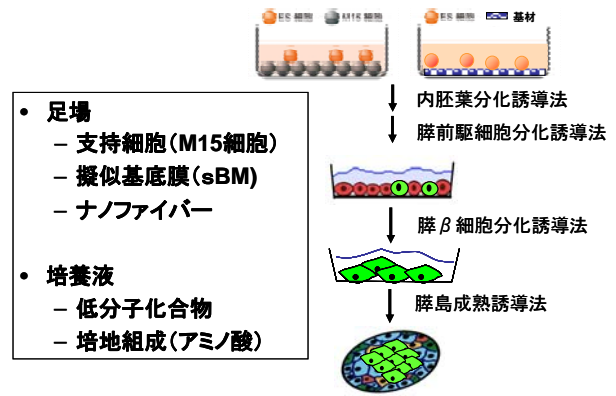
(1) **足場の検討**：①**支持細胞（M15細胞）**を用いた方法でヒト膵β細胞への分化誘導に成功した。

支持細胞を用いない方法として：②**擬似基底膜（sBM）**により、細胞基底膜を模倣する条件下でマウスおよびヒトES細胞から膵β細胞への分化誘導に成功した。細胞基底膜のβ細胞誘導における重要性が明らかとなった。③**ナノファイバー高分子基材**の方法により、さらに**マウスβ細胞の誘導が63倍**に上昇した。ヒトES/iPS細胞にも応用できることを確認した。

(2) **培養液の検討**：成長増殖因子、アミノ酸条件、低分子化合物による膵β細胞の成熟化促進条件を見出した。培地の至適化により**マウスβ細胞の誘導がさらに2200倍**上昇した。(1)と合わせて*in vitro* 分化誘導において**1 x 10⁵倍のβ細胞の増幅**である。

- 得られた iPS 細胞由来の Pdx1 要請膵前駆細胞を保存できる方法を検討した。凍結融解後の生存率は 12%であった。

(図2) In Vitro膵臓分化誘導方法の開発項目



II) iPS細胞由来膵細胞のin vivo移植による成熟化

- 免疫不全マウスの腎皮膜下への移植により膵前駆細胞が生着し膵β細胞に分化することを確認した。
- 未熟な膵β細胞を体内へ移植することにより、体内の微小環境により、膵β細胞が膵島を形成して、成熟化することが分かった。擬似基底膜上で誘導した膵β細胞については、移植によるマウスβ細胞の誘導が200-300倍上昇した。

III) 作成した膵β細胞による糖尿病治療効果の検討

- 分化膵β細胞のインスリン分泌能の機能評価を行ったが、現時点では糖応答性インスリン分泌が見られなかった。上記の(1), (2)で得られた方法下で培養したマウス分化膵β細胞について移植の検討を今年度行う。ヒト分化膵β細胞についても移植の効率化と病態改善効果を検討している。
- 糖尿病病態マウスモデルを用いて治療効果を解析した。定量的に評価するために、正常マウスより単利した膵島の移植を行った。病態改善には150-200個の正常マウス膵島の移植が必要である。

(2) 研究の進捗及び成果

I) ES/iPS細胞から膵β細胞へのin vitro分化制御の技術開発

分化、成熟度を向上させるために、培養に用いる足場の検討と培養液の検討の2点から進めた。

(1) 足場条件の検討

- M15細胞を用いた分化誘導系(国際出願 PCT/JP2006/310324)では、ヒト ES 細胞から Pdx1 陽性膵前駆細胞を 80%以上の効率で誘導し、インスリン陽性細胞も得られた。マウスβ細胞への分化を促進する培養液条件を発見したので((2)の項)、ヒト iPS 細胞に順次適用し、効率化を図る。
- 支持細胞を用いない方法を新規に開発した: これらの方法は細胞基底膜を模倣する条件下でヒト膵β細胞への分化誘導に成功した。

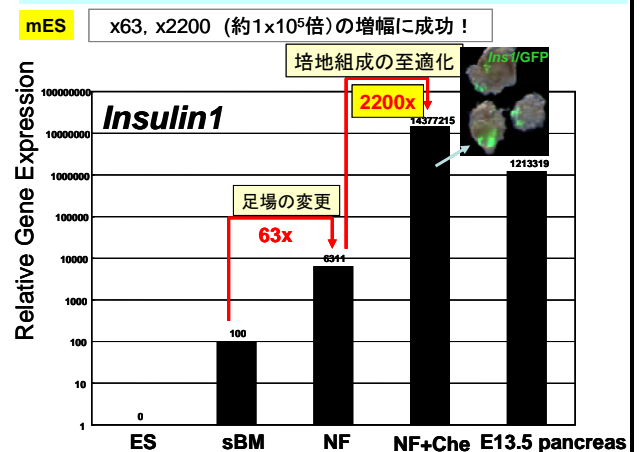
(i) ラミニン 10 より再構成された擬似基底膜 (sBM)を用いた方法(国際出願 PCT/JP2010/058284)において、マウス ES 細胞から Pdx1 陽性細胞、インスリン陽性細胞が in vitro で得られた。

(ii) ナノファイバー高分子基材を用いた方法を新規に開発した。ナノファイバー高分子基材を用いた分化誘導系において、マウスおよびヒト ES/iPS 細胞から Pdx1 陽性細胞、インスリン陽性細胞が in vitro で誘導できた。ナノファイバー高分子基材の使用によりマウスβ細胞の誘導が63倍上昇した。 ナノファイバー高分子基材培養法はヒト ES 細胞にも適用出来ることを確認している。

(2) 培養液の検討

- インスリン産生細胞を促進するための成長増殖因子を同定した。
- 培養液の組成、特にアミノ酸に焦点を絞って検討した結果、特定なアミノ酸除去培地を使用することで、内胚葉を選択的に濃縮することができることを見出した。ヒト iPS 細胞を 90%以上内胚葉へ分化させることに成功した。
- 低分子化合物ライブラリーをスクリーニングした結果、マウスβ細胞への分化・成熟化促進候補

(図3) 足場・化合物を用いた膵臓分化誘導条件の至適化



現在in vitroで膵島1個分インスリン含量 → 今後~200倍の増幅へ

低分子化合物を得た。

- ・ ナノファイバー高分子基材で分化誘導し、培養液の最適化と低分子化合物の併用により擬似基底膜の方法に比べ、マウス β 細胞の誘導が 2200 倍上昇した。(1)の足場の検討の結果を総合すると、 1×10^5 倍のインスリン細胞の増幅に成功した。
- ・ Pdx1 陽性膵前駆細胞を含む分化細胞を凍結保存し、全細胞生存率は A 社血清入り保存液が最も高く、凍結保存後の Pdx1 陽性膵前駆細胞の生存率 12% 得られた。今後保存した細胞の機能的評価も進める。

II) iPS細胞由来膵細胞のin vivo移植による成熟化

- ・ NOJ 免疫不全マウスを用いて、移植する部位として腎皮膜下および Fat Pad を検討した。両方とも生着を認めたが、マウス Pdx1 陽性膵前駆細胞を移植した場合、腎皮膜下への移植片にインスリン陽性細胞が認められ、分化成熟化に適していると判断した。
- ・ 作成された分化細胞を免疫不全マウスへ移植し、その成熟化を検討した。その結果 in vitro で作成したインスリン産生 β 細胞を移植したものが成熟膵島様構造を示し、より多くの成熟膵臓内分泌マーカーを発現した。成体への移植によりインスリン発現量が 200–300 倍増加した。

III) 作成した膵 β 細胞による糖尿病治療効果の検討

- ・ 正常マウス膵島あるいは β 細胞株の MIN6 細胞を用いて、基礎測定データを取得した。MIN6 のインスリン含量が正常膵島に比べ低いこと、正常マウス膵島 1 個からのインスリン含量および糖依存性インスリン分泌能を測定可能であること、インスリンおよび C-peptide の両方を測定できることを確認した。ES/iPS 細胞について in vitro 培養した分化細胞の測定には、培養液中にインスリンが微量存在しているため、C-peptide を測定する系で評価したほうがよい。
- ・ NOJ 免疫不全マウスを Streptozotocin (STZ) 処理による糖尿病化の条件を決めた。糖尿病化マウスに
- ・ 糖尿病病態モデルとしての AKITA マウスの基礎データを取得した。生後 4–6 週令で糖尿病化することを確認した。マウス ES 細胞を移植し、経過観察中である。
- ・ 正常マウス膵島の移植による定量的評価の結果、正常マウス膵島 150~200 個相当を移植した場合糖尿病病態改善効果が観察された。今後この目標値まで 200 倍の効率化を図る必要がある。

3. 課題全体の論文発表件数	25 件
4. 課題全体の特許出願件数	3 件 (うち国外 1 件)
5. 当初目標に対する達成度	
I) ES/iPS 細胞から膵 β 細胞への in vitro 分化制御の技術開発 (達成度 ◎) 支持細胞の系、支持細胞を用いない系により、インスリン産生細胞が誘導された。当初に比べて効率が 10 万倍上昇したことより、当初の目標が事業終了時に達成できる。	
II) in vivo の微小環境を利用した機能的な β 細胞への成熟化 (達成度 ○) in vivo への移植により β 細胞が 200-300 倍に増幅した。今後開発した条件をヒト細胞に適用することで当初の目標が達成できる。	
III) 作成した膵 β 細胞による糖尿病治療効果の検討 (達成度 ○) 移植系、インスリン含量測定系、インスリン分泌測定系の実験系の立ち上げに成功。今後糖尿病病態改善に必要な膵島数に到達するまで分化成熟化を図る。	
6. 課題内の情報共有・連携体制	
下記のように代表研究者と分担研究者間の共同研究によって進めている。 糸は分化誘導方法を開発し、分化誘導した細胞について、(1)遠藤教授らが凍結保存方法の検討を行う。(2)遠藤教授ら、尾池教授らがそれぞれ AKITA、NOJ 免疫不全マウス、のコロニーの拡大・糖尿病化マウスの準備・移植を行った。(3)山縣教授らが in vitro, in vivo で分化・成熟した膵 β 細胞のインスリン含量、糖感受性インスリン分泌測定系の確立、測定を行う。従って、代表研究者と分担研究者間の綿密な実験スケジュール打ち合わせ、連携、情報共有のもとで進めている。	
7. 課題外の課題との情報共有・連携	
1. 本プロジェクト内では、東大拠点には、本課題で開発した支持細胞を用いた系による内胚葉の増幅	

法を利用して頂くことで連携している。また個別研究事業にも M15 支持細胞を提供し、分化誘導に利用して頂いている。京都大学拠点の上杉志成教授から低分子化合物の提供を受けている。

2. 本プロジェクト以外では、(1)CREST プロジェクト慶応義塾大学佐谷秀行教授から低分子化合物の提供を受けている。(2)細胞移植の際の薬物送達に関して工学系の研究者と共同研究を進めている。

(3) 培養基材およびβ細胞分化促進薬剤の開発に関して企業と連携を進めている。

8. 人材育成

本課題では、これまでの事業期間中 (延べ人数) 修士課程大学院生 11 名、博士課程大学院生 6 名、ポスドク 5 名を育成した。さらに熊本大学 G-COE プログラムとの連携により、海外からの若手研究者を対象に、ヒト iPS 細胞の取り扱い、膵臓への分化誘導の技術研修指導を行った。

9. 生命倫理に係る対応

ヒトES使用計画課題：「ヒト胚性幹細胞を用いた肝胆膵の発生分化と再生医学の基礎研究」について平成 17 年 12 月から研究開始、指針改定後平成 19 年 12 月 11 日大臣確認を受けている。

ヒト iPS 細胞の使用に関する熊本大学の一般倫理委員会の審査を受けて通過した。

10. 今後の展望

達成目標

ヒト iPS 細胞から機能的な糖応答性インスリン分泌β細胞を作成し、糖尿病治療効果を検証し、再生医学の基盤を確立する。

研究計画

I) ヒト iPS 細胞から糖依存性膵β細胞を作成できるような分化誘導技術を開発する。

- ・ 現在得られた分化・成熟化を促進する低分子化合物の作用機序を解析する。同時に、新たに成熟化を促進する化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、新規な化合物を次々に同定していく。

II) in vivo の微小環境を利用した機能的なβ細胞への成熟化

- ・ in vitro で作成した膵β細胞をサポートする微小環境を形成するために、マウス骨髄細胞を同時に移植する。また、膵β細胞分化成熟を促進する作用を持つ成長増殖因子を粒子に浸潤させ、分化 iPS 細胞と同時に移植する。また、上記 1) で同定した化合物の投与についても検討する。

III) 作成した膵β細胞による糖尿病治療効果の検討

- ・ 免疫不全糖尿病病態マウスへの移植により治療効果の検証を引き続き検討する。

今後の展望

本事業で開発した膵β細胞の作成技術は、再生医療を実現させる目標以外にも、広くアカデミーおよび産業への活用が図られる。たとえば、β細胞の分化成熟化を促進する薬剤の開発、分化誘導を促進する細胞培養基材の開発、細胞培養液の開発について、現在共同研究を行っている、もしくは行う予定である。また、M15 細胞の内胚葉増幅作用がとりわけ目覚しく、多くの大学と企業の研究者に利用していただいている。

11. 特記事項

低分子化合物のスクリーニング系を活用することにより、今後よりβ細胞の分化成熟の促進作用を示す薬剤の発見が見込まれる。

12. 委託研究費一覧

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費 (千円)	3,111	2,887	1,418	7,416
人件費 (千円)	9,209	12,521	17,474	39,204
業務実施費 (千円)	26,142	23,054	12,108	61,304
間接経費 (千円)	11,538	11,538	9,300	32,376
合計 (千円)	50,000	50,000	40,300	140,300

(別紙1)

1. 論文のリスト

- ◎○Shiraki N*, Harada S*, Ogaki S, Kume K. and Kume S. Identification of DAF1/CD55, a novel definitive endoderm marker. Cell Struct. & Function in press
- ◎○Higuchi Y, Shiraki N, Yamane K, Qin Z, Mochitate K, Hara M, Kume K and Kume S*. The synthesized basement membrane substrata direct ES/iPS cells to differentiate into the pancreatic lineages. J.Cell Science, in press
- Matsuura, K*, Katsumoto, K*, Fukuda, K., Kume, K. and Kume, S. Origin of the ventral pancreatic precursors. Mech. Dev. 126, 817-827, 2009.
- Katsumoto, K., Fukuda, K., Kimura, W., Shimamura, K., Yasugi, S. and Kume, S. Origin of pancreatic precursors and the mechanism of endoderm regionalization in chick embryos. Mech. Dev. 126, 539-551, 2009.
- ◎○Shiraki,N*, Higuchi, Y*, Harada,S., Umeda, K., Isagawa, T., Aburatani, H., Kume,K. and Kume,S. Differentiation and characterization of embryonic stem cells into three germ layers. Biochem. Biophys. Res. Comm. 381, 694-9, 2009. (* equal contribution)
- ◎○Yoshida, T., Murata, K., Shiraki, N., Kume, K., Kume, S. Analysis of gene expressions of ES-derived Pdx1-expressing cells: Implications of genes involved in pancreas differentiation. Develop. Growth Differ. 51, 463-472, 2009.
- Saisho K, Fukuhara A, Yasuda T, Sato Y, Fukui K, Iwahashi H, Imagawa A, Hatta M, Shimomura I, Yamagata K: Glucose enhances collectrin protein expression in insulin-producing MIN6 \square cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 389: 133-137, 2009.
- Nakamura Y, Matsumoto S, Mochida T, Nakamura K, Takehana K, Endo F.: Glycine regulates proliferation and differentiation of salivary-gland-derived progenitor cells. Cell Tissue Res. 336 (2009) 203-212
- ◎○Shiraki, N., Yoshida, T., Araki, K., Umezawa A., Higuchi, Y., Goto H., Kume, K., and Kume, S. Guided differentiation of ES cells into Pdx1-expressing regional specific definitive endoderm. Stem Cells 26, 874-885, 2008.
- ◎○Yoshida T., Shiraki N., Baba, H., Goto, M., Fujiwara, S., Kume K. and Kume S. The expression patterns of Epiplakin1 in pancreas, pancreatic cancer and regenerating pancreas. Genes Cells 13, 667-678, 2008.

2. 特許出願リスト

表題	概要	出願年月日
細胞の分化誘導方法	新規な高分子培養基材を用いた膵 β 細胞への分化誘導方法の開発	平成21年11月5日
内胚葉細胞、腸管細胞、又は膵細胞の検出方法	ES由来膵前駆細胞の遺伝子解析により得られた新規細胞表面蛋白の同定とその利用	平成21年9月30日
細胞の分化誘導方法	擬似基底膜を用いた膵 β 細胞への分化誘導方法の開発	平成21年6月10日

(別紙2)

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	科学研究費補助金 基盤研究(B)		
	研究者氏名	桑 昭苑	当該研究者の役割	研究代表者（研究の総括）
	研究テーマ	膵臓の分化制御と体性幹細胞の維持機構の解明		
	研究期間	平成 21 年 4 月 ～ 平成 23 年 3 月		
	助成金合計 （見込み）	20 年度 0 千円	21 年度 5,100 千円	22 年度 4,300 千円 期間全体 9,400 千円
	本プロジェクトとの違い	膵臓の発生分化と膵組織幹細胞の制御機構の研究である。基礎的な発生分化機序の解明を目的とするもので、本研究とは異なる。		
2	助成制度	科学研究費補助金 基盤研究(B)		
	研究者氏名	桑 昭苑	当該研究者の役割	研究分担者
	研究テーマ	iPS 細胞と点変異修復技術を融合させたアミロイドニューロパチーの肝細胞置換療法		
	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 500 千円	22 年度 500 千円 期間全体 1,000 千円
	本プロジェクトとの違い	iPS 細胞から肝細胞への分化誘導研究で、本研究とは異なる。		
3	助成制度	iPS 細胞研究国際拠点人材養成事業		
	研究者氏名	桑 昭苑	当該研究者の役割	研究分担者
	研究テーマ	糖尿病学		
	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 3,631 千円	21 年度 4800 千円	22 年度 0 千円 期間全体 8431 千円
	本プロジェクトとの違い	iPS 細胞研究を携る若手研究者の人材育成事業で、本研究とは異なる。		
4	助成制度	新エネルギー・産業技術総合開発機構「研究用モデル細胞の創製技術開発」プロジェクト		
	研究者氏名	桑 昭苑	当該研究者の役割	再委託 研究分担者
	研究テーマ	ES 細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発		
	研究期間	平成 17 年 9 月 ～ 平成 22 年 3 月		
	助成金合計 （見込み）	20 年度 20,570 千円	21 年度 15,570 千円	22 年度 0 千円 期間全体 36,140 千円
	本プロジェクトとの違い	ES 細胞から肝細胞への分化誘導研究で、本研究とは異なる。		

5	助成制度	先端医療開発特区設備整備費補助金			
	研究者氏名	糸 昭苑	当該研究者の役割	研究分担者	
	研究テーマ	「ヒト iPS 細胞を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築」			
	研究期間	平成 17 年 9 月 ～ 平成 22 年 3 月			
	助成金合計 (見込み)	20 年度	20,570 千円	21 年度	15,570 千円
		22 年度	0 千円	期間全体	36,140 千円
本プロジェクトとの違い	iPS 細胞から肝細胞への分化誘導研究である。整備されたシステムは本事業にも役立てられる。				

再生医療の実現化プロジェクト（第Ⅱ期） 成果報告票 （個別研究事業）＜中間評価＞

課 題 名	再生医療対応ヒト ES 細胞樹立と長期安全性・品質保持システムの確立・戦略的ヒト iPS 細胞を先導する基盤研究-
代 表 機 関 名	独立行政法人国立成育医療研究センター
代 表 研 究 者 名	阿久津 英憲
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

①完全ヒト型ヒトES細胞培養システム開発：幹細胞は再生医療という治療戦略の重要な一翼を担っている。本研究ではヒト胚性幹（ES）細胞等の多能性幹細胞を研究対象細胞とし、細胞移植療法の実用化を推進するため、異種成分を排除した完全ヒト型樹立・培養システムを構築し、安全性と品質を確保するための技術革新を行う。ヒトES細胞樹立の段階から異種由来物の影響を排除するために（図1）、フィーダー細胞としてヒト組織由来フィーダー細胞の確立、異種由来成分を排除したヒトES細胞培養液の確立、異種成分を使用しない細胞継代法の開発により完全ヒト型の培養システムを構築する。

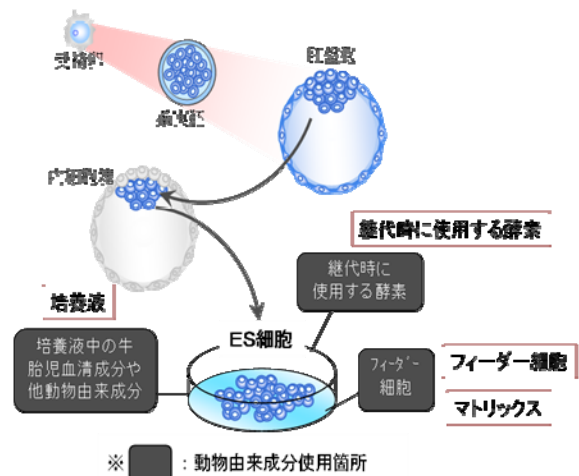


図1 ヒト ES 細胞樹立培養系に含む異種成分
異種成分を使用しないヒト ES 細胞樹立を目指し長期培養工程下でのゲノム安定性と細胞特性を保持した培養システムを構築する。

②幹細胞特性評価と評価基準の確立へ向けた研究開発：安全で高品質のヒト幹細胞再生医療を供給するため、異種を排除しつつ幹細胞の性質を保った培養環境を確立する。完全ヒト型培養システムが幹細胞性質やゲノム安定性に与える影響を評価し、安全性及び品質に関し科学的明確なエビデンスの獲得に寄与する。異種由来物を排除する培養環境がヒトES細胞に与える長期的な影響を評価するために、染色体核型やゲノム解析等によりゲノム安定性への影響を解析し評価基準の確立を目指す。細胞特性評価に関してはヒトES細胞未分化性維持と多分化能性の保持について行う。主要特性である未分化能性は、網羅的遺伝子発現等の発現解析や未分化特性を保持する分子による遺伝子発現解析を長期的に行い、未分化維持特性分子の発現動態の評価基準の確立に寄与する。多分化能性に関しては、体外・体内分化誘導系により分化組織を作成しその外胚葉・内胚葉・中胚葉への分化に関して特異的分子を策定し、遺伝子発現からタンパク質レベルにおいて解析し、分化能特性保持への影響を明確にしていき、異質なシアル酸などの細胞膜糖鎖検査・解析システムの開発を行い、安定性評価の確立に寄与する。完全ヒト型培養システムによるヒトES細胞及びiPS細胞の最も安全で品質を保つシステムを開発することを目的とし、安全で安心な再生医療を早く確実に達成することを目標とする。

本研究は、ヒトES細胞樹立・培養環境の中で異種由来物質使用している項目を抽出し代替させるヒト細胞あるいは低分子化合物等の選定と検定を行い、最終的に異種由来成分を排除した完全ヒト型培養システムを確立する。完全ヒト型培養システムは安全性に優れた再生医療の実現化には必要不可欠である。更に、完全ヒト型培養下でヒトES細胞が長期に安定して維持できるかについて明確にし、最終的には幹細胞の性質を保持したまま、ゲノム安定的に維持できるシステムを構築する。その際、ゲノムの安定性や幹細胞特性維持について有用な

検定方法を提示し、再生医療対応のヒトES細胞樹立・培養システムを構築する。

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完全ヒト型ヒトES細胞培養システム開発

フィーダーレイヤーとしてヒト組織由来の細胞株（Yub-フィーダー細胞）を選定でき、その細胞機能性質と幹細胞未分化維持因子候補の同定ができた。ヒトES細胞未分化維持に必須な因子に関し、Yub-フィーダー細胞株はbFGFが高発現していることを見だし、自律的に未分化維持因子を発現しているフィーダーレイヤーを作成できた。更に、Yub-フィーダー細胞を完全なゼノフリー条件で樹立し幹細胞を良好に未分化維持できる条件をほぼ同定できる成果を獲得した。これまでの成果によりヒト多能性幹細胞が異種成分を排除した完全ヒト型培養システムで安定的に生存できることの成果を得てきている（図2）。また、フィーダーレイヤーを含めたゼノフリー培養システムに関する知見を学会及び専門誌等に報告するとともに培養技術講習会にも講師として参加し、プロジェクト全体の技術基盤底上げにも貢献してきた。

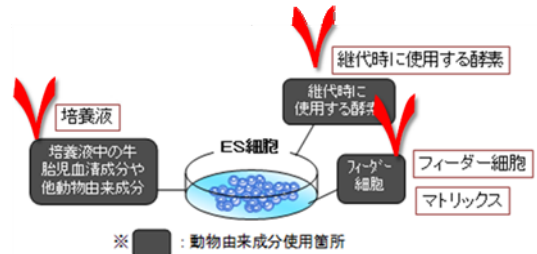


図2 異種成分を排除した培養系の確立

ヒトフィーダー細胞株樹立をはじめヒト多能性幹細胞の完全ヒト型培養維持が可能となった。

分を排除した完全ヒト型培養システムで安定的に生存できることの成果を得てきている（図2）。また、フィーダーレイヤーを含めたゼノフリー培養システムに関する知見を学会及び専門誌等に報告するとともに培養技術講習会にも講師として参加し、プロジェクト全体の技術基盤底上げにも貢献してきた。

②幹細胞特性評価と評価基準の確立へ向けた研究開発

安全で高品質のヒト幹細胞再生医療を供給するため、異種を排除しつつ幹細胞の性質を保った培養環境を確立することを目的に、ヒト細胞膜シアル酸高感度質量分析法を基盤に、免疫原性となる異質なNeu5Gc（N-グリコシルノイラミン酸）の細胞発現解析技術を確立した。更に、異質なシアル酸を発現させない方法（発現抑制剤）を見いだすことができた（特許申請）。安全性の高い再生医療の実現へむけ大きく貢献できる成果が得られてきた。本項目の幹細胞特性、とくに長期培養工程における幹細胞性質評価に関しては、長期培養行程で問題となる細胞のゲノム安定性評価について現在汎用されている染色体核型解析（Gバンド法）では不完全でゲノム全体を詳細に解析できるアレイCGH法が有用であると報告した。今後ゲノム解析法選定、評価基準そしてゲノム異常を引き起こさせない培養システムの構築に向け、ゼノフリーでのゲノム安定性研究という特徴性をいかし、本プロジェクトでゲノム安定性評価研究を展開している拠点機関である東京大学と共同研究を開始した。

(2) 研究の進捗及び成果

①完全ヒト型ヒトES細胞培養システム開発

ヒトES細胞の培養維持のみならず安定的な樹立を考慮する上でフィーダーレイヤーの役割は極めて重要である。ヒト組織より樹立した細胞（成育バイオリソース）の網羅的遺伝子発現解析を行い、フィーダー細胞が関与するヒトES細胞未分化維持因子によるバイオインフォマティクス解析によりフィーダーレイヤーとして余剰指（多指症）由来の線維芽細胞株（Yub-フィーダー細胞）を選定でき、Yub-フィーダー細胞の増殖能と幹細胞未分化維持因子候補の同定を行った（図3）。その結果、ヒトES細胞未分化維持に必須なbFGF発現に関し、MEFはbFGFの発現がほとんど認められないのに対し、Yub-フィーダー細胞株はbFGFが高発現し自律的に未分化維持因子を発現している細胞であることを見いだした。更に、Yub-フィーダー細胞樹立を完全なゼノフリー培養下でできるシステムを構築でき、良質

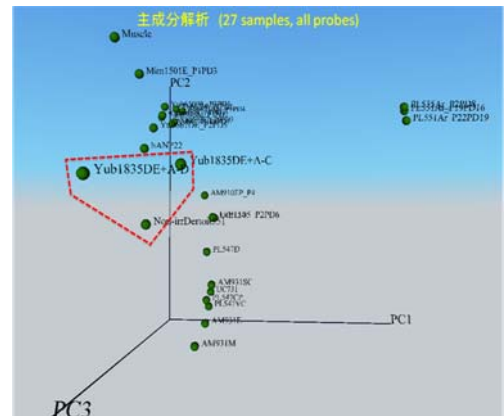


図3 ヒトフィーダー細胞特異的遺伝子発現 Yub-フィーダー細胞の特性解析と未分化維持関連分子の絞り込み

なヒトフィーダー細胞をゼノフリーで樹立できる培養システムの確立ができた。また、フィーダーレイヤーに関する知見を報告し（文献1,2,3）、培養技術講習会にも講師として参加した（於；神戸理化学研究所）。

②幹細胞特性評価と評価基準確立へ向けた研究開発

異種成分存在下の培養環境では細胞膜上に非ヒト型シアル酸N-グリコシルノイラミン酸（Neu5Gc）が発現し免疫原性になると報告されている。幹細胞の安全性を評価するために、Neu5Gc発現を的確に解析できるシステムとしてシアル酸のLC/MS法による高感度質量分析法を構築できた。これにより安定的に培養細胞膜非ヒト型シアル酸を同定することが可能となり、培養条件によりNeu5Gc発現が影響を受けることを確認した。更に、FBS存在下でもNeu5Gc発現を抑制するNeu5Gc発現抑制剤を開発することができた（特許申請）（図4）。これにより培養環境に起因する細胞の免疫原性を排除する画期的な成果を得た。

幹細胞特性評価と評価基準の確立に関して、幹細胞マーカーの選定とそれらの具体的な抗体を評価しプロジェクト内での有益性を目的としその有用性を公開してきた。更に、長期培養工程における幹細胞性質評価に関しては、細胞のゲノム安定性評価について現在汎用されている染色体核型解析（Gバンド法）では不完全でゲノム全体を詳細に解析できるアレイCGH法が有用であると報告してきた。ヒトES細胞ではゲノム変異を引き起こしやすいホットスポット領域（染色体20q11.21等）が存在することが報告されている。この領域は癌化との関連性も指摘されており長期培養を要するヒト多能性幹細胞のゲノム解析法選定、評価基準そしてゲノム異常を引き起こさせない培養システムの構築に向け、多施設プロジェクトとして行う。プロジェクト内連携としてゼノフリーでのゲノム安定性研究という特徴性をいかし、本プロジェクトでゲノム安定性評価研究を展開している拠点機関である東京大学と協力して行っていく。

文献

- 1)阿久津英憲：「フィーダーレイヤー」遺伝子医学MOOK別冊,メディカルドゥ社,2009.
- 2)阿久津英憲：「ヒト由来フィーダー細胞の確立」再生医療,8(2),2009.
- 3)Adachi T, Wang X, Murata T, Obara M, Akutsu H, Machida M, Umezawa A, Tomita M. Production of a non-triple helical collagen α chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. *Biotechnol Bioeng*. (Epub ahead of print).

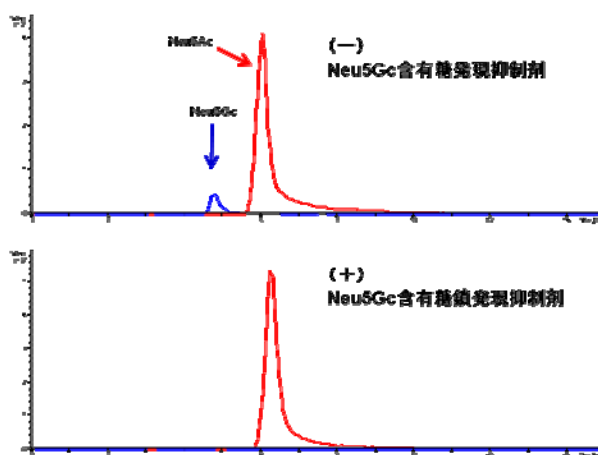


図4 ヒト細胞の Neu5Gc マスクロマトグラム
非ヒト型シアル酸の発現が Neu5Gc 発現抑制剤添加により
検出感度以下となった。

3. 課題全体の論文発表件数

7件

4. 課題全体の特許出願件数

1件（うち国外0件）

5. 当初目標に対する達成度

①完全ヒト型ヒト ES 細胞培養システム開発

ヒトES細胞の樹立段階から異種成分を完全に排除した培養システムの開発研究を行ってきた。これまで未分化維持に極めて有効なヒトフィーダー細胞株の樹立に成功し、その網羅的遺伝子発現解析等から未分化維持に有効な因子を抽出し最終的にゼノフリー培地も構築可能であった。実施計画通りにゼノフリー培養システムを構築できている。

②幹細胞特性評価と評価基準の確立へ向けた研究開発

細胞の安全性に関わる特性について重要な成果を得て、拠点機関との連携を構築した。まず免疫原性となりうる非ヒト型シアル酸に対する高感度質量分析法を確立し、更に幹細胞培地

に添加するだけでシアル酸（Neu5Gc）発現を抑制できるNeu5Gc発現抑制剤を開発できた。長期培養工程で問題となる幹細胞のゲノム安定性については、従来の染色体核型解析では不十分でありアレイCGH法などの新たなゲノム解析が有効であることを報告し、ヒトフィーダー細胞の成果を基盤としてヒト多能性幹細胞ゲノム安定性に関するプロスペクティブ解析を拠点機関（東京大学）とともに開始した。

6. 課題内の情報共有・連携体制

分担研究者とは同一機関内での連携の強みを生かし非ヒト型シアル酸解析等の幹細胞特性評価やヒトフィーダー細胞特性解析等に密に連携して開発研究を行っている。そのため、開発研究のあらゆるタイムポイントにおいてデータの共有と互いの実験系へのタイムロスの内反映が行われている。

7. 課題外の課題との情報共有・連携

各省事業連携を目的に開催されているiPS細胞等研究連絡会に参加しオールジャパン的な協力により行われるiPS細胞研究の推進に貢献している。山中伸弥教授の発意により京都大学iPS細胞研究センターが事務局となって立ち上がったiPS細胞技術の評価・検証会に参加し本邦のiPS細胞研究基盤を確固たるものにするための多施設研究プロジェクトを行っている。

8. 人材育成

ヒト多能性幹細胞の培養技術促進のため、特にゼノフリー培養法に関して培養技術講習会や講演等により積極的に技術移転を行っている。

9. 生命倫理に係る対応

1. ヒト細胞に対する倫理面への配慮-フィーダーレイヤーの樹立に用いるヒト細胞

本研究に使用したヒト細胞に関し、研究面において既に機関内倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療センター研究所、受付番号25、26及び27、平成15年1月承認、受付番号49、平成15年10月承認、受付番号55、平成15年11月承認、受付番号88、89、90、91平成16年7月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認）。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、関連指針に従い最新の社会的な影響を十分に考慮する。

国立成育医療センター倫理審査委員会：

<http://www.ncchd.go.jp/center/information/ethics/index.html>

2. 実験動物に対する倫理

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所において動物実験を行うにあたって規程と指針に準拠して研究を実施する（承認番号2005-003,2006-009）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

国立成育医療センター研究所動物実験規程

（平成17年7月27日より施行：<http://www.nch.go.jp/anim/animalkitei.htm>）

国立成育医療センターにおける動物実験に関する指針

（平成17年7月4日より施行：<http://www.nch.go.jp/anim/animalshishin.htm>）

3. ヒトES細胞の樹立研究

国立成育医療研究センターでは「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づきヒトES細胞に関する医学研究が適性に行われるよう、ヒトES細胞研究倫理審査委員会が組織されている。ヒトES細胞研究に関する各種規程（「ヒトES細胞研究倫理審査委員会規程」、「ヒトES細胞樹立に関する規程」、「ヒトES細胞分配に関する規程」、「ヒトES細胞使用に関する規程」）も整備され、機関全体として生命倫理及び医の倫理に基づき適切に行う（国立成育医療研究センターヒトES細胞研究倫理審査委員会：

<http://www.ncchd.go.jp/center/information/escells/index.html>）。当該センターが定期的（年2回以上）に開催している生命倫理に関する講演を受講し、適切な生命倫理観をみにつけ常に配慮し基礎研究を行う。本機関でのヒトES細胞樹立研究（「ヒトES細胞の樹立」）は「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき文部科学大臣の確認を受けている。

- ・ 18 諸文科振第 832 号
- ・ 19 国文科振第 31 号
- ・ 20 諸文科振第 1173 号

10. 今後の展望

① 完全ヒト型ヒトES細胞培養システム開発

これまでの成果でヒト多能性幹細胞の完全ゼノフリー培養システム開発研究が順調に行われてきた。今後はヒトES細胞を樹立段階からゼノフリーで行い再生医療に対応したヒトES細胞の長期培養工程での性質評価を効率よく行い社会へより早期に還元できるように拠点機関と連携して行っていく。これまでの成果に関し、各機関とより連携することで本プロジェクトの安全で高品質のヒト幹細胞再生医療を供給する目的に大きく貢献するものと確信している。

② 幹細胞特性評価と評価基準の確立へ向けた研究開発

これまで体外培養を必要とする幹細胞に付随してくる安全性及び品質を低下する項目を抽出し排除してきた。異質なシアル酸を発現させない方法を見いだすことができた。この開発したNeu5Gc含有糖鎖発現抑制剤の作用機序を明らかにする。長期培養工程でのゲノム解析法選定、評価基準そしてゲノム異常を引き起こさせない培養システムの構築に向け、有用な安全性検定法の選定し、ゼノフリーでのゲノム安定性研究という特徴性をいかし、拠点機関と協力し行っていく。

年度	具体的な実施内容	達成目標
22年度	<ul style="list-style-type: none"> ・完全ヒト型ヒトES細胞培養下でのゲノム安定性を経時的な検討する-体外培養下で影響を受けやすいゲノム領域の探索-(拠点連携研究) ・ゲノム安定を維持する完全ヒト型ES細胞培養システム確立 ・汎用されている異種成分含培養の免疫原性抑制開発 	長期的ゲノム安定性解析と評価
23年度	<ul style="list-style-type: none"> ・完全ヒト型によるES細胞の樹立から移植判定まで再生医療有効性の解析 ・完全ヒト型ES細胞培養システムのデバイス開発から先端デバイスの取り入れ 	ヒトES細胞の完全再生医療モデル構築と検
24年度	<ul style="list-style-type: none"> ・再生医療対応完全ヒト型培養システムを産業化する ・疾患を選定し再生医療即時対応システムを確立する 	医療システム基盤及び産業化へ向けた整備

11. 特記事項

本機関はヒトES細胞の樹立機関である。各関連機関の協力により今春よりヒトES細胞の樹立に成功した。本プロジェクトの成果であるヒトフィーダー細胞を含めた完全ヒト型培養システムがヒトES細胞でも十分に機能することを確認している。近い将来、京都大学に加え当機関からもヒトES細胞が研究者に提供できる。更にゼノフリーES細胞もそれに加わり本邦の再生医療研究が尚一層進展していくことになる。これは本研究及び本機関に関わる研究者を含めた全職員の再生医療実現に向けた強い思いによるものである。

12. 委託研究費一覧

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費 (千円)	6,622	4,822	504	11,948
人件費 (千円)	0	3,142	3,885	7,027
業務実施費 (千円)	31,840	30,498	26,380	88,718
間接経費 (千円)	11,538	11,538	9,231	32,307
合計 (千円)	50,000	50,000	40,000	140,000

(別紙 1)

1. 論文のリスト

- 1) ©Adachi T, Wang X, Murata T, Obara M, Akutsu H, Machida M, Umezawa A, Tomita M. Production of a non-triple helical collagen α chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. *Biotechnol Bioeng*. (in press).
- 2) Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, Kono T, Shioda T, Hochedlinger K. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 465(7295):175-181 (2010).
- 3) ©Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi J, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation* 78(2-3):137-142 (2009).
- 4) Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, Akutsu H, Liu DR, Rubin LL, Eggan K. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell* 5(5):491-503 (2009).
- 5) ©Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T. Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. *Genes Cells* 14(12):1395-404 (2009).
- 6) ©Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, Akutsu H, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A. Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS. *Exp Cell Res*. 315(16):2727-2740 (2009).
- 7) Chen AE, Egli D, Niakan K, Deng J, Akutsu H, Yamaki M, Cowan C, Fitz-Gerald C, Zhang K, Melton DA, Eggan K. Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell lines. *Cell Stem Cell*. 4(2):103-106 (2009).

2. 特許出願リスト

表題	概要	出願年月日
抗原性N-グリコリルノイラミン酸含有糖鎖を除去した培養細胞、該細胞の調製方法、および該細胞から製造される生物製剤 (特願 2009-46162)	本発明は、培養細胞から抗原性N-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc) 含有糖鎖を除去するための方法に関する。本発明はまた、培養細胞から抗原性Neu5Gc含有糖鎖を除去するために用いる培地に関する。本発明はさらに、本発明の方法によりNeu5Gc含有糖鎖が除去された細胞、あるいはそれらの細胞を含む組成物に関する。本発明は、該培養細胞により産生される物質を含むNeu5Gc含有糖鎖を含まない生物製剤に関する。	平成 22 年 2 月 27 日

(別紙2)

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	科学研究費補助金 基盤研究B		
	研究者氏名	阿久津 英憲	当該研究者の役割	主任研究者
	研究テーマ	卵子加齢にみる老化のメカニズムと発生能への影響を探る戦略的基盤研究		
	研究期間	平成21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 3,380 千円	
		22年度 3,380 千円	期間全体 16,900 千円	
本プロジェクトとの違い	卵細胞の機能に関する研究で本プロジェクトとは全く異なる。			
2	助成制度	科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究		
	研究者氏名	阿久津 英憲	当該研究者の役割	主任研究者
	研究テーマ	受精卵の全機能性を探り出す研究—リプログラミング因子を一網打尽に捉える—		
	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 600 千円	期間全体 2,800 千円	
本プロジェクトとの違い	初期化因子探索研究であり本プロジェクトとは全く異なる。			
3	助成制度	CREST		
	研究者氏名	阿久津 英憲	当該研究者の役割	分担研究者
	研究テーマ	マイクロ・ナノ方法アプローチによる細胞・組織 Show Case の構築		
	研究期間	平成21年11月 ～ 平成27年3月		
	助成金合計 (見込み)	20年度 0 千円	21年度 2,500 千円	
		22年度 13,000 千円	期間全体 62,000 千円	
本プロジェクトとの違い	工学との連携でマイクロデバイスを用いたマウス ES 細胞分化研究で本プロジェクトとは全く異なる。			
4	助成制度	NEDO 委託研究		
	研究者氏名	阿久津英憲	当該研究者の役割	分担研究者
	研究テーマ	iPS 細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発 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 4 月 ～ 平成26 年 2 月		
	助成金合計 (見込み)	20年度 0 千円	21年度 39,000 千円	
		22年度 39,000 千円	期間全体 150,000 (見込み) 千円	
本プロジェクトとの違い	産業応用を目指したヒト iPS 細胞の性質評価解析と大量培養・保存の自動化を目指した研究であり本プロジェクトとは全く異なる。			

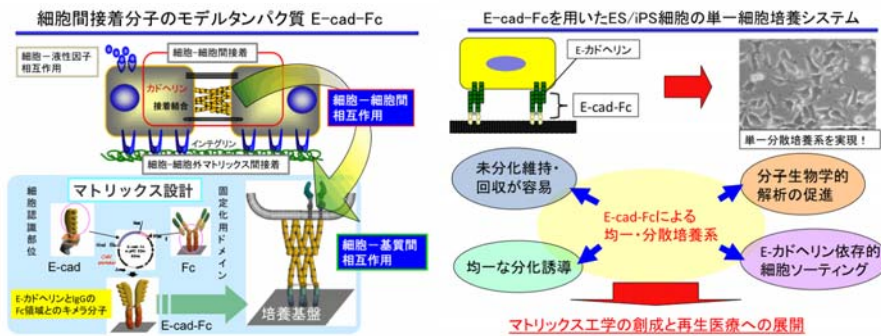
再生医療の実現化プロジェクト（第Ⅱ期） 成果報告票 （個別研究事業）＜中間評価＞

課 題 名	E-カドヘリンキメラタンパク質を接着マトリックスとした ES/iPS 細胞の新しい単細胞培養システムの開発
代 表 機 関 名	国立大学法人東京工業大学
代 表 研 究 者 名	赤池 敏宏
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 細胞の樹立に成功したが、ヒト ES 細胞を含め多くの幹細胞の培養法は未だに最適化されておらず、また分化誘導方法についても胚様体を経た手法が一般的である。ヒト ES 細胞の培養法は、近年多くの研究者によって無血清培地による培養法が研究されており、実際に商品化されている手法もあるが、いずれの場合も細胞の接着基質としてガン細胞由来の未知成分を含む複合材料であるマトリゲルを用いているため、完全には“defined condition”とは言い切れないのが現状である。また、iPS 細胞についても、フィーダー細胞上で樹立、フィーダー細胞上もしくはマトリゲル上で維持されており、より適した培養系の確立がこれから早急に検討すべき課題であると考えられる。そこで、本研究では、

- （1）ヒトES細胞およびヒトiPS細胞の単一細胞による新しい培養基質の開発、
 - （2）ヒトES細胞およびヒトiPS細胞の分化誘導が可能な培養基質の検索と最適化、
- を目的とする。



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

平成20年度の実施計画では、

- （1）Wnt、IGF、bFGFなどの固定型モデル分子の作製
- （2）サルES細胞の培養系の検討（マウスES細胞での知見より）

を行う予定であった。(1)の各因子の固定型モデル分子の作製であるが、IGF-Fcは成功した。他は現在も実施中である。ES細胞の心筋細胞への分化誘導を目的としたWntシグナルを抑制するIGFBP4キメラタンパク質も併せて設計合成に成功した。(2)のサルES細胞は、マウスiPS細胞やヒトiPS細胞の利用が予定より早く進みそうであったためサルES細胞は実施せず、マウスiPS細胞やヒトiPS細胞の導入を開始した。

平成21年度の実施計画では、

- （1）各種マトリックス上でのマウスiPS細胞の挙動解析
- （2）サルES細胞の未分化維持培養系の検討
- （3）各種モデル分子の機能解析

を行う予定であった。(1)では、ヒトiPS細胞のストレスフリー、Xenoフリーの培養系の確立に重要な知見を得るためにマウスiPS細胞のマウスE-cad-Fc上の接着挙動やカルシウムキレート剤を用いたマウスiPS細胞の脱着条件を検討した。(2)では、サルES細胞を実施する代わりにヒトiPS細胞の未分化維持培養とE-cad-Fc上の培養を開始した。

（2）研究の進捗及び成果

平成20年度の成果

(1)Wnt、IGF、bFGFなどの固定型モデル分子の作成

ヒト ES 細胞の分化制御に重要であることが報告されている、Wnt、IGF1、BMP、アクチビンのモデル分子の作成をおこなった。IGF-Fc および BMP-Fc の作成は完了した。IGF-Fc に関しては、活性があることが確認され、固定化状態における細胞挙動を検討している段階である。BMP-Fc については、活性の確認を現在行っている。Wnt については、タンパク質の合成を行っている。

さらにアクチビン-Fc の分子設計は、完了しておりタンパク質合成の条件を検討している。

(2)マウス iPS 細胞の培養系の検討

マウス ES 細胞研究の知見を元に、マウス iPS 細胞を E-cad-Fc を用いた培養系にて培養を行った。これによりマウス ES 細胞研究で得られた知見と同様の結果をマウス iPS 細胞においても得ることができ、フィーダーフリーの条件下で単一細胞の未分化培養状態が実現できた。

平成 21 年度の成果

(1) 各種培養基質上でのマウス/ヒト iPS 細胞の挙動解析

当該年度においては、マウス E-cad-Fc 上にマウス iPS 細胞を培養し、接着実験とキレート剤による脱着実験を行った。マウス iPS 細胞はマウス ES 細胞と同様に E-cad-Fc 上において単一細胞レベルで分散し、未分化を維持した状態で増殖することが確認された。さらに E-cad-Fc 培養系と従来のゼラチン上のコロニー形成型培養系における肝細胞への分化誘導の効率について比較検討を行った。その結果、E-cad-Fc 上の単一培養系においてコロニー形成型培養系と比して高い分化誘導効率が観察された。

(2) ヒト iPS/サル ES 細胞の未分化維持培養系の開発

当該年度においては、ヒト E-カドヘリンの細胞外ドメインを有するヒト E-cad-Fc の作製を試みた。これらの分子は、マウス E-cad-Fc と同様にポリスチレン上に安定に固定でき、ヒト E-cad-Fc コートディッシュにおいてヒト iPS 細胞を培養することが可能であった。さらにヒト E-cad-Fc 上では、MEF 等の E-カドヘリンを発現しない細胞は接着することができず E-カドヘリンを発現する未分化ヒト iPS 細胞のみを選択的に接着することができることがわかった。よってヒト iPS 細胞未分化維持培養系の可能性が示唆された。

(3) 各種モデル分子の機能解析

作成した IGF-Fc、アクチビン-Fc キメラタンパク質の機能解析を行っている。IGF-Fc に関しては、大腸菌による大量発現系を確立した。そして、IGF-Fc が培養皿に安定に固定化されることを見出した。現在、固定化した IGF-Fc の細胞へのシグナル伝達を確認している段階である。さらに、IGF-Fc と E-cad-Fc の共固定化を行いヒト iPS 細胞未分化維持培養系の確立と分化誘導培養器材の作製を試みている。

3. 課題全体の論文発表件数	29 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

Wnt、IGF、bFGFなどの固定型モデル分子の作成

IGF に関しては、活性のある状態で作製することができた。固定化型肝細胞増殖因子(HGF-Fc)の作製に成功した。マウス ES 細胞の未分化維持因子である LIF の固定型因子(LIF-Fc)の作製にも成功している。新たに心筋細胞への誘導を目的として Wnt シグナル阻害する IGFBP4 を固定型とする IGFBP4 キメラ分子の作製を行い、心筋細胞分化への有効な知見が得られつつある。当初予定の他の分子についてもその調製を開始しているが、実験用員、時間等の限界もあり、活性を有する分子の作製は困難を伴っている。優先順位をつけ少し分子を絞り込み作製を行っていく。従って総合的に見た達成度は、70%程度である。

マウス iPS 細胞の培養系の検討

E-cad-Fc 上のマウス iPS 細胞の培養は、マウス ES 細胞と同様に分散傾向や高い増殖が観察された。またカルシウムキレート剤による脱着も行えることから、大量培養システムの開発に有用な結果が得られた。達成度は、100%に近いが、さらに不織布への E-cad-Fc のコーティングと三次元モジュール化などを通じてノンストレス大量培養法としての応用拡大を行っている。

ヒト iPS/サル ES 細胞の未分化維持培養系の開発

ヒト iPS 細胞のためのレコンビナントヒト E-cad-Fc の作製には成功した。ヒト iPS 細胞のヒト E-cad-Fc 上の培養では、ヒト iPS 細胞を安定に培養できることが明らかになった。さらに MEF や E-カドヘリンを発現しない分化した細胞などを接着させずに E-カドヘリンを発現する高い未分化状態で培養を維持できることを見出された。現時点での達成度は、80%である。

6. 課題内の情報共有・連携体制

代表研究者である赤池敏宏は、主に対外的にE-cad-Fcの研究紹介を盛んに行っている。そして、多くの研究者のE-cad-Fcの評価は高く、国内のみならず国外からの共同研究の申し込みが多い。またE-cad-Fcは、赤池が関与する東工大発ベンチャー企業と連携をしながら作製しており、研究を進める上での十分な量が常に確保されており研究体制は順調である。赤池は、対外的な共同研究の推進やE-cad-Fcの供給体制の構築などマネジメントを適切に行っている。

拠点内においても E-cad-Fc に関する共同研究の申し込みは盛んである。

1. 単一細胞レベルでの分子生物学的実験ツール

東京大学 浅島研究室 大沼清講師

2. ヒトiPS細胞新規培養法や細胞保存方法の開発

京都大学 山中研究室 吉田善紀講師 高橋淳准教授、再生医学研究所 玄丞然准教授

3. 単一細胞レベルでのES/iPS細胞の研究

慶應義塾大学 福田恵一教授

埼玉医科大学 奥田晶彦教授

4. マーモセットサルES細胞の培養系の構築

慶應義塾大学 岡野栄之教授

5. マウス精子幹細胞の培養系の構築

京都大学医学部 篠原隆司教授

6. 導入の検討をさせていただいている先生

熊本大学 糸昭苑教授、鳥取大学 汐田剛史教授

これらの先生とは、電話や討論、Eメール等を通じてディスカッションを行い、E-cad-Fcの原理的解析、使用法、応用法を含め研究を推進している。

拠点や個人に関わらず、情報供給や連携体制は効果的に機能している。

7. 課題外の課題との情報共有・連携

炭酸アパタイトによる遺伝子・タンパク質の効率的な導入技術の開発を科学研究費補助金基盤研究Aで昨年まで行ってきた。この技術は、ヒトiPS細胞の安全かつ効果的な作製技術の開発に大変有用である。このプロジェクトの成果を応用することを視野に入れ、研究体制を組織している。

8. 人材育成

本プロジェクトの中心的担い手は総括責任者赤池敏宏の他、主としてヒトiPS培養と新たな培養基質(各種キメラタンパク質)の開発と評価を担う伊勢裕彦特任講師およびヒト/マウスiPS(ES)細胞のストレスフリー、Xenoフリー、大量規模の培養を担う賀喜白乙特任助教である。それぞれ着実に課題に挑戦しその目標を突破しうる人材に育ちつつある。本プロジェクト終了後は独立して再生医療分野で活躍できることが十分期待できる。また彼らの指導の下で一部の課題を担っている大学院生も情熱と意欲に燃え将来性の高い人材に育ちつつある。

9. 生命倫理に係る対応

現時点では、マウスES/iPS細胞及びヒトiPS細胞を用いて検討を行っている。従って、指針に定められている倫理審査委員会の審査が必要となるような研究計画ではない。

10. 今後の展望

ヒトE-cad-Fcを用いたヒトiPS細胞の未分化維持大量培養系の構築(平成22年度～平成24年度)

ヒトiPS細胞を用いた再生医療を実現するにあたり、未分化維持されたヒトiPS細胞を効率よく増殖させることが必須である。このためには、E-cad-Fcを利用した培養器材は、強力なツールとなりうる。

- E-cad-Fcは、E-カドヘリンを発現する細胞のみを接着させることができる。このため、E-カドヘリンを発現しないフィーダー細胞を接着させずに除去することが可能である。ヒトiPS細胞などを分化させヒトに移植する場合には、事前にフィーダー細胞を迅速に完全に除去する必要がある。このため、フィーダーフリーの培養系の構築が容易である。
- ヒトiPS細胞の培養をフィーダー細胞上で培養していくと全ての細胞を未分化状態で培養することは困難であり、分化した細胞のコロニーが出現してくる。この場合、未分化な細胞のコロニーのみを選択的にピックアップして再度培養していくリクローニングが必要になり、維持培養とその増殖が困難になってくる。分化する細胞はE-カドヘリンを喪失する可能性が高いので、E-cad-Fc上で培養することで分化した細胞を除き未分化な細胞のみを選択的に培養することができる。このようなことか

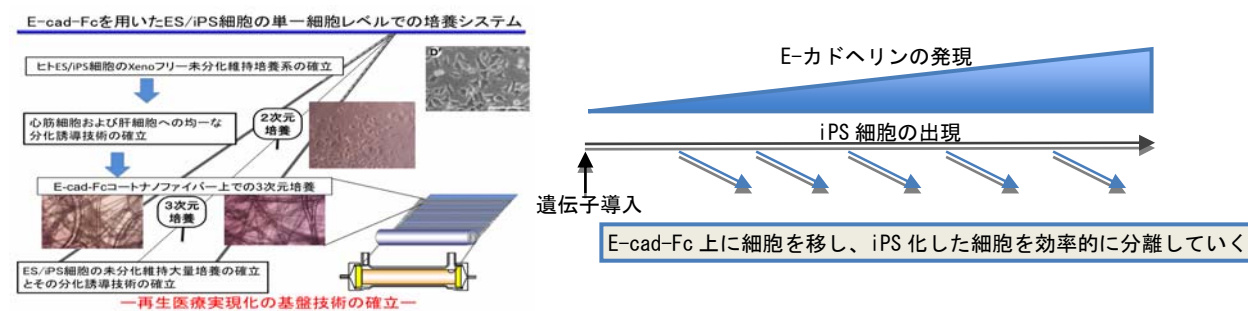
ら、未分化状態を保ったまま大量に細胞を増殖させることが可能である。

E-cad-Fcは、遺伝子工学的に多量に作製することができ、細菌の感染性や未知の成分を含んでおらず、均一で安全性の高いものとして作製できる。このため大量培養時においても十分量がいつでも作製可能であり、未分化維持大量培養ツールとしての実現可能性が高い。生体材料として脱落膜などが、ヒトiPS細胞の未分化維持培養に検討されているが、細菌感染やウイルス感染、未知成分の混入などの危険性が高く使用に耐えられないことが予想される。また、採取時には自然分娩だと清潔性が保てず細菌感染のない状態で採取することが困難であり、清潔性を保った状態での採取は帝王切開時の分娩に限られる。このようなことから、iPS細胞の大量培養に使用するには十分な量が確保できず、実現不可能である。

平成22年度から平成23年度にかけてヒトiPS細胞のヒトE-cad-Fc上の培養を行い、安定な未分化維持が可能な培養系の構築を行う。特に培地への添加物の検討を行う。そして、E-カドヘリンの発現する未分化細胞のみが接着しているかなどをフローサイトメトリーで検討していく。

平成23年度から平成24年度にかけては、E-cad-Fcコーティングファイバーを利用した大量培養系の構築を行っていく。大量培養されたヒトiPS細胞の未分化性や多能性を適宜検討していく。

ヒトiPS細胞作製の効率化ツールとしての利用（平成22年度～平成23年度）
ヒトiPS細胞を用いた再生医療の実現には、iPS細胞の安全性や様々な組織への分化制御も重要であるが、ヒトからの迅速なiPS細胞の樹立も課題の一つである。現在の樹立法では遺伝子導入後、ディッシュ上のiPS細胞の出現を観察して樹立している。このため、一つのディッシュのどこにどのくらい出現するかはわからないのが現状である。そこで、E-cad-Fcを利用したiPS細胞の効率的な樹立を実現する。線維芽細胞からiPS細胞を樹立する場合、線維芽細胞集団の中にiPS細胞が出現するようになる。線維芽細胞集団は、通常E-カドヘリンを発現していないがiPS化した線維芽細胞はE-カドヘリンを発現するようになる。そこで、遺伝子導入を行った線維芽細胞をE-cad-Fc上に培養して、E-カドヘリンを発現するiPS細胞のみをいち早く効率的に採取し、フィーダーフリーの培養系に移して増殖させていく。これによって迅速且つ効率的なiPS細胞の樹立を成功させる。



1.1. 特記事項

- ①マウスES/iPS細胞を均一に単細胞レベルで大規模・繰り返しで培養、増殖でき引き続き均一に分化誘導できる世界で唯一の系の開発成功をベースとしている。ヒトiPS/ES細胞系も条件検討することによってこの技術を応用できる可能性がある。
- ②E-cad-Fc培養系は、E-カドヘリンの発現を指標としてiPS細胞の作製からその未分化維持大量培養、そして分化誘導時のE-カドヘリンの発現依存的な細胞ソーティングが可能である。従って、iPS細胞の作製からその未分化維持培養、最終的な分化誘導までの一貫したテーラーメイドの再生医療を実現する培養系の構築が可能である。
- ③E-cad-Fc技術が初めて紹介された論文(PLoS one, 1(1), 2006)は、その論文のサイトで7000件に近いアクセスがあり、国内外からの共同研究の申し込みは20件、研究代表者の招待講演は50件を超えている。このことから大変反響が大きく、多能性幹細胞の新しい培養系として世界的に注目されている。

1.2. 委託研究費一覧

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費（千円）	20,800	9,375	0	30,175
人件費（千円）	7,472	9,784	7,513	24,769
業務実施費（千円）	6,728	12,842	7,872	27,441
間接経費（千円）	10,500	9,600	4,615	24,715
合計（千円）	45,500	41,600	20,000	107,100

(別紙1)

1. 論文のリスト

- ◎ Yue XS, Murakami Y., Tamai T., Nagaoka M., Cho CS., ItoY., Akaike T., A Fusion Protein N-Cadherin-Fc As An Artificial Extracellular Matrix Surface For Maintenance of Stem Cell Features. *Biomaterials* 31, 5287-5296, 2010,
- ◎ Md A. Haque, M. Nagaoka, B. Hexig, T. Akaike aArtificial extracellular matrix for embryonic stem cell cultures: a new frontier of nanobiomaterials. *2010 Sci. Technol. Adv. Mater.* 11 014106 (9pp)
- ◎ Nagaoka M., Jiang HL, Hoshiya T., Akaike T., Cho CS., Application of Recombinant Fusion Proteins for Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering* 38,683-93. (2010)
- ◎ Azuma K, Nagaoka M, Cho CS, Akaike T. An artificial extracellular matrix created by hepatocyte growth factor fused to IgG-Fc. *Biomaterials*, 31, 802-809, (2010)
- 長岡正人 村上裕太 赤池敏宏 フィーダーレス培養系による“defined condition”の実現 再生医療 8 (2), 216-222, (2009)
- 東宏治、長岡正人、萩原祐子、玉井俊行、竹村啓子、岳曉珊 細胞認識型キメラタンパク質の設計と新しい再生医療用マトリックスとしての応用 ますます重要になる細胞周辺環境（細胞ニッチ）の最新科学技術 ー細胞の生存、増殖、機能のコントロールから創薬研究、再生医療までー 遺伝子医学MOOK別冊、メディカルドゥ 301-307、(2009)
- ◎ Yue X., Nagaoka M., Akaike T. Design of Artificial Extracellular Matrices and Their Application for Regenerative Medicine. *Biomaterials in Asia*, PP143-158, World Scientific (2008)
- Kutsuzawa K, Akaike T., Chowdhury EH.; The influence of the cell-adhesive proteins E-cadherin and fibronectin embedded in carbonate-apatite DNA carrier on transgene delivery and expression in a mouse embryonic stem cell line. *Biomaterials*. 29(3), 370-6. (2008)
- ◎ Nagaoka M., Hagiwara Y, Takemura K, Murakami Y, Li J, Duncan SA, Akaike T.; Design of the artificial acellular feeder layer for the efficient propagation of mouse ES cells. *J Biol Chem*. 283, 26468-26476, (2008)
- Nagaoka M., Ise H., Harada I., Koshimizu U, Maruyama A, Akaike T.; Embryonic Undifferentiated Cells Show Scattering Activity on a Surface Coated With Immobilized E-Cadherin. *J.Cell Biochem* 103:296-310, (2008)

2. 特許出願リスト

表題	概要	出願年月日
なし	なし	平成 年 月 日

(別紙 2)

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	科学研究費補助金 基盤 A		
	研究者氏名	赤池敏宏	当該研究者の役割	代表者
	研究テーマ	細胞認識性キメラタンパク被覆型アパタイトナノキャリアを用いた幹細胞遺伝子発現制御		
	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 11,000 千円 21 年度 8,800 千円 22 年度 千円 期間全体 37,500 千円		
	本プロジェクトとの違い	この研究課題は、炭酸アパタイトを用いた遺伝子導入を実現するものである。従って本プロジェクトとは、目的が異なる。		

再生医療の実現化プロジェクト（第Ⅱ期） 成果報告票 （個別研究事業）＜中間評価＞

課 題 名	ヒト間葉系幹細胞を機能性肝細胞として、移植医療に使用するための低分子化合物・細胞シートによる分化誘導技術の開発
代 表 機 関 名	国立大学法人鳥取大学
代 表 研 究 者 名	汐田 剛史
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

肝不全患者への肝細胞移植治療による再生医療の実現のため、ヒト間葉系幹細胞を機能性肝細胞へ分化させる、真に臨床応用可能な効率的な分化誘導技術を開発することを達成目標とする。具体的には、Wnt/ β -catenin経路抑制性低分子化合物から有効性の高い化合物を選択し、細胞シートと組み合わせ、最大の分化効率を得る培養法を開発し、実施許諾による権利行使を交渉できるような複数の産業財産権を出願することである。平成20年度及び21年度の業務項目として、①ヒト間葉系幹細胞の肝細胞分化へ及ぼすWnt/ β -catenin経路抑制性低分子化合物の分化誘導能の評価、②Wnt/ β -catenin経路抑制性低分子化合物とその誘導体の合成を挙げている。

平成 20 年度、21 年度の達成目標

Wnt/ β -catenin 経路抑制性低分子化合物の分化誘導能の評価

Wnt/ β -catenin 経路抑制性低分子化合物とその誘導体の合成

平成 22 年度以降の達成目標

Wnt/ β -catenin 経路抑制性低分子化合物の誘導体の分化誘導能の評価

細胞シートを用いた培養技術

低分子化合物と細胞シートの併用による高効率の肝細胞分化誘導法の開発

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 ヒト間葉系幹細胞の肝細胞分化へのWnt/ β -catenin経路抑制性低分子化合物の分化誘導能の評価
大腸癌細胞に対して Wnt/ β -catenin 経路抑制能が報告されている 10 種類の低分子化合物について、2 種類のヒト間葉系幹細胞（骨髄由来 EU7T-13 細胞と臍帯血由来 UCBTERT-21 細胞）を用いて、①細胞増殖への影響、② β -catenin/TCF4 転写活性測定用安定導入細胞の作製により、Wnt/ β -catenin 経路抑制強度、③肝細胞への分化誘導能を検討した。その結果、EU7T-13 細胞では 3 種類の、UCBTERT-21 細胞では 4 種類の肝細胞誘導化合物を見出し、特許出願を行った（特願 2010-092948）。

② Wnt/beta-catenin経路抑制性低分子化合物の合成
Wnt/ β -catenin 経路抑制性低分子化合物を 4 種類合成し、スペクトル解析、NMR 解析にて正しく合成できていることを確認した。さらに、これらの誘導化合物 23 種類を有機合成し、スペクトル解析、NMR 解析にて正しく合成できていることを確認した。

10 種類の Wnt/ β -catenin 経路抑制性低分子化合物をスクリーニングし、2 種類のヒト間葉系幹細胞で、①細胞増殖能への影響、② β -catenin/TCF4 転写活性測定、③肝細胞分化誘導能を検討

3 種類の EU7T-13 細胞の肝細胞分化に有効な化合物、4 種類の UCBTERT-21 細胞の肝細胞分化に有用な化合物を同定

4種類のWnt/ β -catenin経路抑制性低分子化合物と23種類の誘導体を合成

23種類の誘導体で、2種類のヒト間葉系幹細胞で、①細胞増殖能への影響、② β -catenin/TCF4転写活性測定、③肝細胞分化誘導能を検討している。

(2) 研究の進捗及び成果

1. ヒト間葉系幹細胞の肝細胞分化へのWnt/ β -catenin経路抑制性低分子化合物の分化誘導能の評価

①ヒト骨髄由来間葉系幹細胞EU7T-13細胞を用いた検討(10化合物の細胞増殖能、 β -catenin/TCF4転写活性、肝細胞への分化誘導能の概要は別紙3-1に添付)

- A. 細胞増殖への影響：大腸癌細胞でWnt/ β -catenin経路抑制能が示された10種類の低分子化合物(PKF115-584、イマチニブ、ICG-001、ケルセチン、PKF118-310、ヘキサクロロフェン、CGP09090、NSC66803、PNU-74654、イオノマイシン)について、各種濃度で0、2、4、8日間培養し、細胞に毒性を与えない濃度を決定した。
- B. β -catenin/TCF4転写活性測定用安定導入細胞の作製；TCF4結合配列を3回繰り返し有するpTCF4-CMVpro-Lucが安定導入されたEU7T-13細胞を樹立し、 β -catenin/TCF4転写活性を安定に測定することが可能となった。
- C. β -catenin/TCF4転写活性の測定；EU7T-13細胞の β -catenin/TCF4転写活性への各化合物の影響の検討；1で検討した各濃度の化合物で処理後、0、2、4、8日後の β -catenin/TCF4転写活性を各種化合物で検討した。10種類の化合物すべてが、EU7T-13細胞の β -catenin/TCF4転写活性を抑制することを見出した。特にヘキサクロロフェンは0.8 μ Mで処理2日後、4日後、8日後にそれぞれ20%、80%、80%抑制した。1.2 μ Mでは処理2日後、4日後、8日後にそれぞれ40%、80%、85%抑制し、2.0 μ Mでは処理2日後、4日後、8日後にそれぞれ50%、80%、90%抑制した。
- D. Wnt/ β -catenin経路抑制性低分子化合物による肝細胞への分化誘導能の検討；10種類のWnt/ β -catenin経路抑制性低分子化合物で、EU7T-13細胞を0、8、16、24日間処理し、肝特異的遺伝子発現や蛋白発現の検討、グリコーゲン貯蔵能、尿素合成能などの肝機能の評価を行った。その結果、ケルセチン、ヘキサクロロフェン、イオノマイシンでは肝特異的遺伝子発現が得られ、肝特異的蛋白発現が得られた。特に、ヘキサクロロフェンは0.8 μ M、0.12 μ M、1.6 μ M、2.0 μ Mで、アルブミンmRNA、AFPmRNA、GSmRNA、CYP1A1、TDO2などの肝細胞特異的遺伝子発現を誘導した。免疫染色ではアルブミン陽性細胞は処理8日、16日後に0.8 μ M、1.2 μ Mのヘキサクロロフェンで共にそれぞれ約60%、80%が陽性化した。C/EBP α は、0.8 μ M、1.2 μ Mのヘキサクロロフェンで処理8日、16日後に共にそれぞれ75%、82%が陽性となった。CYP1A1は、0.8 μ M、1.2 μ Mのヘキサクロロフェンで処理8日、16日後に共にそれぞれ75%、82%が陽性となった。PAS染色によりグリコーゲン含有細胞を検討すると、処理8日、16日後に0.8 μ M、1.2 μ Mのヘキサクロロフェンで共にそれぞれ約40%、50%が陽性化した。尿素合成能は、処理8日後には、0.8 μ M、1.2 μ Mのヘキサクロロフェンで、対照のHepG2肝癌細胞の約4倍に増加し、処理16日後には、約3倍に増加した。したがって、ヘキサクロロフェンはヒト骨髄由来間葉系幹細胞EU7T-13細胞を機能性肝細胞へ分化誘導することが明らかとなった。これらの検討事実は、特許出願をおこなった(特願2010-092948)。

②ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞UCBTERT-21 細胞を用いた検討 (10 化合物の細胞増殖能、 β -catenin/TCF4 転写活性能、肝細胞への分化誘導能の概要は別紙 3-2 に添付)

- A. 細胞増殖への影響 : 10 種類の低分子化合物 (PKF115-584、イマチニブ、ICG-001、ケルセチン、PKF118-310、ヘキサクロロフェン、CGP09090、NSC66803、PNU-74654、イオノマイシン) について、各種濃度で 0、2、4、8 日間培養し、細胞に毒性を与えない濃度を決定した。
- B. β -catenin/TCF4 転写活性の測定 ; β -catenin/TCF4 モチーフを持つルシフェラーゼ発現プラスミド pTCF4-CMVpro-GL4.20 と、内因性TCFモチーフを除去したpGL-TK-hRlucによるデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。0、2、4、8 日後の β -catenin/TCF4 転写活性を 3 種化合物 (PKF115-584、ケルセチン、イオノマイシン) で検討した。
- C. Wnt/ β -catenin経路抑制性低分子化合物による肝細胞への分化誘導能の検討 ; 10 種類の化合物 (PKF115-584、イマチニブ、ICG-001、ケルセチン、PKF118-310、ヘキサクロロフェン、CGP09090、NSC66803、PNU-74654、イオノマイシン) で処理し、0、8、16、24 日で、肝特異的遺伝子発現や蛋白発現の検討を行った。その結果、4 個の化合物 (PKF115-584、ケルセチン、ヘキサクロロフェン、イオノマイシン) で肝特異的遺伝子発現が得られた。このうち、PKF115-584、ケルセチンは肝細胞誘導能が他の化合物より高く、アルブミンmRNA、HNF3 β mRNA、CYP1A1mRNA、TDO2mRNAなどの発現が増加した。アルブミン染色では、9nM PKF115-584 処理 16 日、24 日後にそれぞれ約 10%、17%が陽性となり、1 μ Mケルセチン処理 16 日、24 日後にそれぞれ約 25%、30%と増加し、両者の併用で処理 16 日、24 日後にそれぞれ約 40%、45%と増加した。CYP3A4 染色は、9nM PKF115-584 処理 24 日後に約 20%に増加したが、1 μ Mケルセチン処理 16 日、24 日後にそれぞれ約 38%、35%と増加した。CYP1A1 染色は、9nM PKF115-584 と 1 μ Mケルセチンの併用 24 日後に約 60%に増加した。PAS染色では 1 μ Mケルセチン、9nM PKF115-584 のそれぞれによる処理 16 日後に、約 10%、5%であった。尿素合成能は、9nM PKF115-584、1 μ Mケルセチンの単独、及び両者の併用処理で、24 日後には、HepG2 細胞の 1.29 倍、1.23 倍、1.17 倍に増加した。したがって、PKF115-584 とケルセチンは、ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞UCBTERT-21 細胞を機能性肝細胞へ分化誘導能を持つことが明らかとなった。これらの検討事実は、特許出願をおこなった (特願 2010-092948)。

2. Wnt/ β -catenin経路抑制性低分子化合物の合成(Wnt/ β -catenin経路抑制性低分子化合物及びその誘導体の概要は別紙3-3に添付している)

①Wnt/ β -catenin経路抑制作用が報告されている 4 種類の化合物 (ICG-001、PNU-74654、PKF118-310、NSC668036) の合成

②Wnt/ β -catenin経路抑制化合物の誘導体の合成

A. ICG-001 誘導体の合成

- (1) 側鎖を変換した、あるいは含フッ素誘導体とした 3 種類の誘導体を作製した。
- (2) ICG-001 誘導体のスペクトル解析、NMR 解析を行った。

B. PNU-74654 誘導体の作成:種々のhydrazide及びaldehyde化合物を縮合し、誘導体を作製

- (1) PN-3: 5-Methyl-furfural を furfural に変化、(2)PN-3-3: 5-Methyl-furfural を benzaldehyde に変化、(3)PN-3-4: 5-Methyl-furfural を 1-naphthaldehyde に変化、(4) PN-3-5: 5-Methyl-furfural を 4-trifluoromethyl benzaldehyde に変化 (5)PN-3-8: 5-Methyl-furfural を 5-hydroxy methyl-2-flurfural に変化、(6)PN-3-9: 5-Methyl-furfural を 5-acetoxyl methyl-2-furfural に変化、(7)PN-3-12: 5-Methyl-furfural を 5-phenyl-2-furaldehyde に変化、(8)PN-3-13: 5-Methyl-furfural

を pentafluorobenzaldehyde に変化、(9)PN-3-16: 5-Methyl-furfural を m-phenoxy benzaldehyde に変化、(10)PN-3-17: 5-Methyl-furfural を p-dimethylamino benzaldehyde に変化、(11) PN-3-19: 5-Methyl-furfural を 3-furaldehyde に変化、(12)PN-2:Phenoxy benzhydrazide を salicyl hydrazide に変化、(13)PN-1-2:Phenoxy benzhydrozide を 3-phenoxy benzhydrazide に変化、(14)PN-1-3: Phenoxy benzhydrozide を 4-phenoxy benzhydrazide に変化

C. PKF118-310 誘導体の作製

- (1)アルデヒド上の置換基を変化させ、2 種類の誘導体合成
- (2)スペクトル解析

D. NSC668036 の誘導体の作製

- (1)3 種類の誘導体の合成

3. 課題全体の論文発表件数	7 件
4. 課題全体の特許出願件数	1 件 (うち国外 0 件)
5. 当初目標に対する達成度	
平成 20年度及び21年度の業務項目として、①ヒト間葉系幹細胞の肝細胞分化へ及ぼす Wnt/ β -catenin 経路抑制性低分子化合物の分化誘導能の評価、②Wnt/ β -catenin 経路抑制性低分子化合物とその誘導体の合成を挙げている。①、②ともにほぼ 100%の達成度と考えている。	
6. 課題内の情報共有・連携体制	
代表研究者により、分担研究者との連携・連絡をよくとりながら、二つの研究グループをよくまとめており、代表研究者のマネジメントは適切であると考えている。	
7. 課題外の課題との情報共有・連携	
本プロジェクトの他の実施課題についての連携	
①慶応大学岡野博之博士と、ヒト骨髄から分離した新鮮な間葉系幹細胞を用いた肝細胞分化誘導法についての共同研究を開始している。	
②熊本大学糸昭苑博士より、内胚葉系臓器への分化誘導促進作用が報告されている M15 フィーダー細胞の供与をうけた。	
③東京工業大学の赤池敏宏博士と、細胞分化に適した細胞外マトリックスなどについて議論している。	
本プロジェクト以外の研究者・企業と連携	
①東京大学生物機能制御化合物ライブラリー機構より低分子化合物ライブラリーを購入し、ヒト間葉系幹細胞から肝細胞へ分化誘導する化合物のスクリーニングを行っている。	
②協和発酵キリン (株) より天然型低分子化合物ライブラリーの供与を受け、肝細胞特異的転写因子である HNF3 β 誘導作用のある化合物のスクリーニングを行っている。	
8. 人材育成	
本研究課題には、教授 2 名、准教授 2 名、助教 2 名、ポスドク 2 名の他、大学院生 3 名、学生 1 名が参画している。定期的な勉強会、研究の進捗状況の連絡事項を通じ、再生医療実現化に向けた取り組みについてしっかりとした、真剣な議論を行う中から、准教授、助教、ポスドク、大学院生、学生の学力とモチベーションは確実に向上しており、人材育成は進んでいる。事実、これらの若手の研究者が、本年度の学会では、ワークショップを含め、4 学会で約 10 演題を提出する予定にしている。	
9. 生命倫理に係る対応	
われわれの課題の業務項目では、倫理委員会へ提出が必要な項目は含まれていない。	

10. 今後の展望

1. Wnt/ β -catenin 経路抑制性低分子化合物の誘導体の分化誘導能の評価

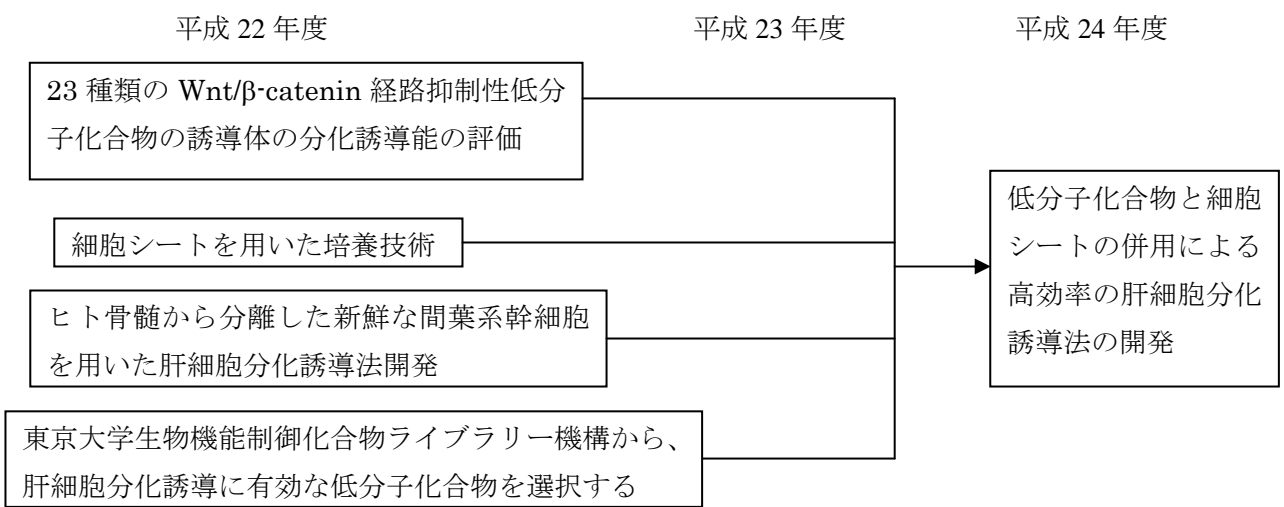
23 種類の誘導体で、2 種類のヒト間葉系幹細胞を用いて、①細胞増殖能への影響、② β -catenin/TCF4 転写活性の測定、③肝細胞分化誘導能を検討し、良好な肝細胞分化誘導能のある化合物を選択する。良好な化合物を選び出し、特許出願する。

2. Wnt/ β -catenin 経路抑制性低分子化合物と温度感受性細胞シートの併用により、高効率の肝細胞分化誘導できる技術を開発する。開発できた時点で、特許出願する。

3. 慶応大学岡野博之博士と進めている、ヒト骨髄から分離した新鮮な間葉系幹細胞を用いた肝細胞分化誘導法については、産業財産権のみならず、今後の臨床応用を視野に入れ開発を進める。

4. 東京大学生物機能制御化合物ライブラリー機構から化合物を購入し、スクリーニングを継続し、最終的には 10 万種類の低分子化合物のスクリーニングを目指す。

【平成 22 年～24 年度の研究計画】



11. 特記事項

われわれは、当初予定していた平成 20 年度、21 年度の業務項目をほぼ達成し、ほぼ 100%の達成度である。しかも、これらの成果は再生医療実現に重要であり、特許出願を行っている。これらの知見は将来の再生医療実現に向けて資することは間違いない。ただ、当初の業務項目に、ヒト骨髄から分離した新鮮な間葉系幹細胞を用いた肝細胞分化誘導法開発と、東京大学生物機能制御化合物ライブラリー機構から購入した肝細胞分化誘導に有効な低分子化合物のスクリーニングを新たに加えたことで、当初予定していた平成 20 年度～23 年度でこの研究事業を行うことは困難であるので、さらに平成 24 年度の 1 年間延長していただきたい。延長することにより、さらなる産業財産権の取得のみならず、臨床応用も可能となる再生医療技術の開発が可能となると確信している。

12. 委託研究費一覧

	20 年度	21 年度	22 年度	計
設備備品費 (千円)	26,048	0	0	26,048
人件費 (千円)	3,725	8,542	4,440	16,707
業務実施費 (千円)	7,027	8,458	5,560	21,045
間接経費 (千円)	11,040	5,100	3,000	19,140
合計 (千円)	47,840	22,100	13,000	82,940

(別紙1)

1. 論文のリスト

Ishii K, Yoshida Y, Akechi Y, Sakabe T, Nishio R, Ikeda R, Terabayashi K, Matsumi Y, Gonda K, Okamoto H, Takubo K, Tajima F, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Umezawa A, Shiota G. Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3 beta, *Hepatology* 48: 597-606 (2008)

汐田 剛史、再生医療実現化を目指したヒト間葉系幹細胞から肝細胞への分化誘導技術開発、*肝胆膵* 57:401-412 (2008)

汐田 剛史、遺伝子再生医療実現のストラテジー～克服すべき山と谷～、*鳥取医学雑誌* 36:46-52(2008)

星川 淑子、石井 恭子、松見 吉朗、寺林 慶、手塚 祐太、An Afida Ashla、土谷 博之、汐田 剛史、HNF3βの発現誘導によるヒト間葉系幹細胞から肝細胞への分化誘導:Wnt/β-catenin 経路の意義、*消化器疾患におけるエピジェネテックスとゲノミクス*、pp146-152、小俣 政雄編、2009

汐田 剛史、肝癌幹細胞の同定と特性、*Hepatoday* 22:10-11 (2010)

汐田 剛史、手塚祐太、骨髄及び臍帯血由来間葉系幹細胞から肝細胞への分化誘導、*肝疾患 Review* 2010-2011、p p 246-252、日本メディカルセンター、2010

Tajima J, Tsuchiya H, Nishikawa S, Hisatome I, Shiota G. Hepatocyte growth factor mobilizes and recruits hematopoietic progenitor cells into liver through stem cell factor-mediated mechanism (2010 in press)

◎ Matsumi Y, Matsumoto N, An Afida Ashla, Tezuka Y, Arakaki Y, Hoshikawa Y, Shiota G. Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by Wnt/β-catenin signal-suppressive small molecule compounds (投稿中)

◎ Matsumoto N, Matsumi Y, An Afida Ashla, Tezuka Y, Arakaki Y, Hoshikawa Y, Shiota G. Hepatic differentiation of human cord blood-derived mesenchymal stem cells by Wnt/β-catenin signal-suppressive small molecule compounds (投稿中)

2. 特許出願リスト

表題	概要	出願年月日
ヒト幹細胞を肝細胞へと分化誘導する化合物	本発明は、ヒト間葉系幹細胞を肝細胞への分化誘導剤、それを用いる肝細胞の生産方法、その生産方法による肝細胞、肝組織および肝臓に関する新技術に関する特許出願である。	平成 22 年 4 月 14 日

(別紙2)

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	なし			
	研究者氏名		当該研究者の役割		
	研究テーマ				
	研究期間	平成 年 月 ~ 平成 年 月			
	助成金合計 (見込み)	20年度	千円	21年度	千円
		22年度	千円	期間全体	千円
	本プロジェクトとの違い				

(補足説明資料)

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 EU7T-13 細胞を用いた検討のまとめ

compound	MTT assay	Wnt/b-catenin活性	differentiation
A	○	○	X
B	○	○	X
C	○	○	X
D	○	○	○
E	○	○	X
F	○	◎	◎
G	○	○	X
H	○	○	X
I	○	○	X
J	○	○	○

A, PKF115-584; B, イマチニブ; C, ICG-001; D, ケルセチン; E, PKF118-310; F, ヘキサクロロフェン;
G, CGP04090; H, NSC66803; I, PNU-74654; J, イオノマイシン

◎、大変良好；○、良好；X、不良

ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞 UCBTERT-21 細胞を用いた検討のまとめ

compound	MTT assay	Wnt/b-catenin活性	differentiation
A	○	○	○
B	○	ND	X
C	○	ND	X
D	○	○	○
E	○	ND	X
F	○	ND	○
G	○	○	X
H	X	X	X
I	X	X	X
J	○	ND	○

A, PKF115-584; B, イマチニブ; C, ICG-001; D, ケルセチン; E, PKF118-310; F, ヘキサクロロフェン;
G, CGP04090; H, NSC66803; I, PNU-74654; J, イオノマイシン

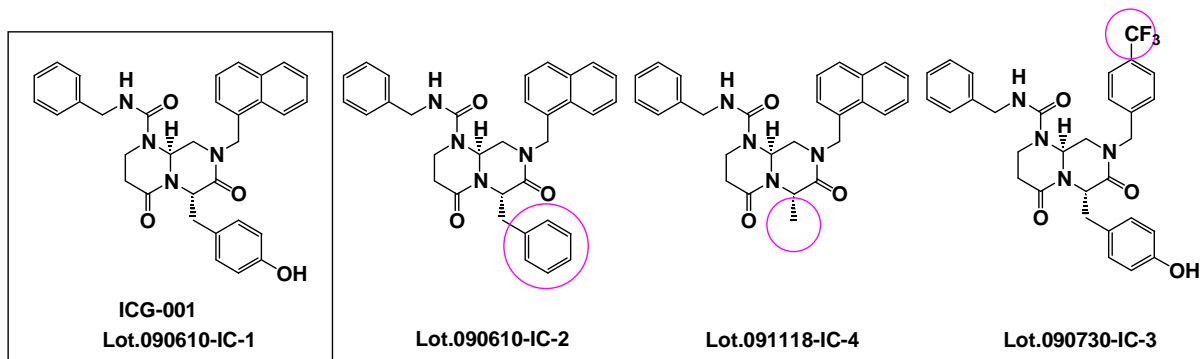
○、良好；X、不良　ND, 検討していない

Wnt/ β -catenin 経路抑制性低分子化合物の合成(Wnt/ β -catenin 経路抑制性低分子化合物及びその誘導体の概要)

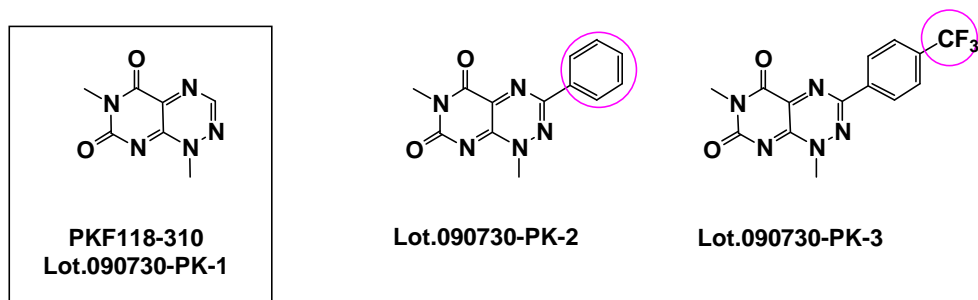
Wnt/ β -catenin 経路抑制性の低分子化合物の合成

Wnt/ β -catenin 経路抑制性の低分子化合物の候補化合物として ICG-001, PKF118-310, IDE-X, Hexachlorophene, PNU-74654, NSC668036 の合成とそれらの誘導体の合成を行った。

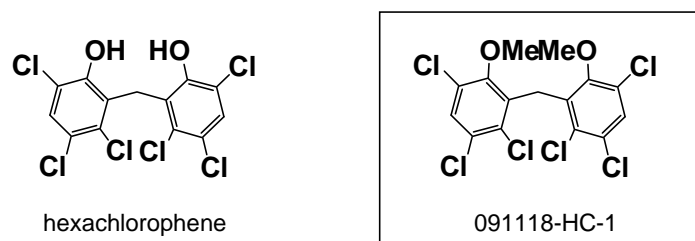
①ICG001 およびその誘導体 (3 種) の合成



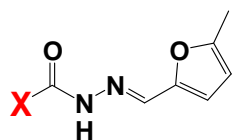
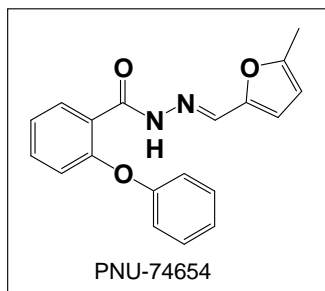
②PKF118-310 およびその誘導体 (2 種) の合成



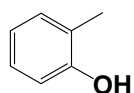
③Hexachlorophene 誘導体 (1 種) の合成



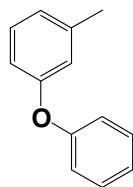
④PNU74654 およびその誘導体（14種）の合成



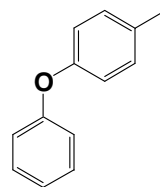
X:



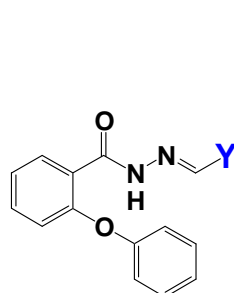
PN-2



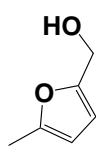
PN-1-2



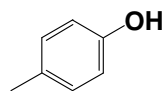
PN-1-3



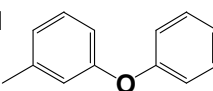
Y:



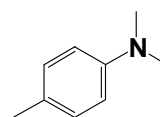
PN-3-8



PN-3-14



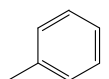
PN-3-16



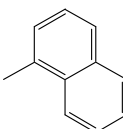
PN-3-17



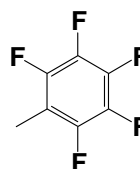
PN-3-19



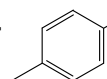
PN-3-3



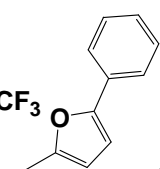
PN-3-4



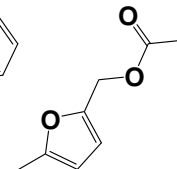
PN-3-13



PN-3-5

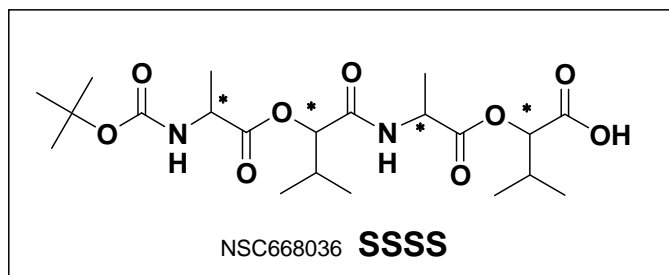


PN-3-12



PN-3-9

⑤NSC668036 とその誘導体（3種）の合成



SRSR

RSRS

RRRR