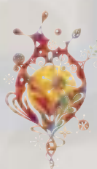


iPS 細胞研究が 切り拓く未来

国際シンポジウム

May 11th and May 12th, 2008 Main Hall, Kyoto International Conference Center



iPS

International Symposium on Induced Pluripotent
Stem [iPS] Cell Research -Frontier and Future-



独立行政法人
科学技術振興機構
Japan Science and Technology Agency

Organized by

Japan Science and Technology Agency (JST)

In association with

Cabinet Office, Government of Japan

Ministry of Foreign Affairs(MOFA)

Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT)

Ministry of Economy, Trade and Industry (METI)

Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW)

Kyoto University

Cell Press

主催

独立行政法人科学技術振興機構

共催

内閣府

外務省

文部科学省

厚生労働省

経済産業省

京都大学

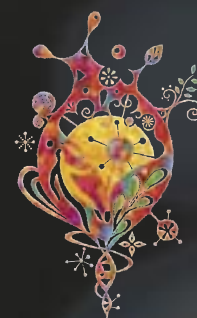
Cell Press



International Symposium on Induced Pluripotent Stem
[iPS] Cell Research - Frontier and Future -

iPS 細胞研究が切り拓く未来

Contents	1	目次
Program	2	プログラム
<hr/>		
Address		挨拶
Opening Address	4	開会挨拶
Guest Address	6	来賓挨拶
<hr/>		
Research Presentation 1		研究発表 1
Shinya Yamanaka	8	山中 伸弥
Rudolf Jaenisch	12	ルドルフ・イエーニッシュ
Peter W Andrews	16	ピーター・W・アンドリュース
Sheng Ding	20	シェン・ディン
Ying Jin	24	イン・ジン
Joseph Itskovitz-Eldor	28	ヨーゼフ・イツコヴィッツ
Hideyuki Okano	32	岡野 栄之
Masayo Takahashi	36	高橋 政代
Henrik Semb	40	ヘンリック・セム
Summary of Day 1	44	1日目まとめ
<hr/>		
Special Session		基調講演
Sir Martin Evans	46	マーティン・エヴァンス 卿
Introductory Talk		イントロダクトリー・トーク
Tasuku Honjo	50	本庶 佑
<hr/>		
Research Presentation 2		研究発表 2
Irving L. Weissman	52	アーヴィン・ワイスマン
Hans Robert Schöler	56	ハンス・シェラー
Alan Colman	60	アラン・コールマン
Kwang-Soo Kim	64	カンスー・キム
Norio Nakatsuji	68	中辻 憲夫
Stephen Livesey	72	ステファン・リヴゼイ
<hr/>		
Panel Discussion	76	パネルディスカッション
Closing Address	84	閉会挨拶



International
Symposium on
Induced Pluripotent
Stem [iPS] Cell
Research -Frontier
and Future-

iPS

International Symposium on Induced Pluripotent Stem [iPS] Cell Research -Frontier and Future-

Day 1: May 11th, 2008 (Sun.) 10:00-18:00

Opening Address

Guest Address

【Agenda of Day 1】 Latest findings in iPS Cell-Related Research and Their Future Perspectives in Science and Technology

【session1】 Frontier Research on iPS Cell

Shinya Yamanaka (Japan) Center for iPS Cell Research and Application (CIRA), Kyoto University /
Institute of Frontier Medical Sciences, Kyoto University Director / Professor

Rudolf Jaenisch (USA) Whitehead Institute, Massachusetts Institute of Technology Professor

【session2】 Identification and Induction of Pluripotency

Peter W. Andrews (UK) Department of Biomedical Science, University of Sheffield Professor

Sheng Ding (USA) Department of Chemistry, The Scripps Research Institute Associate Professor

Ying Jin (China) Institute of Health Science, Shanghai Institutes for Biological Sciences, CAS / Shanghai JiaoTong University of Medicine Professor

【session3】 Tissue Commitments of Pluripotent Stem Cell

Joseph Itskovitz-Eldor (Israel) Stem Cell Research Center, Israel Institute of Technology Professor

Hideyuki Okano (Japan) School of Medicine, Keio University Professor

Masayo Takahashi (Japan) Center for Developmental Biology (CDB), RIKEN Team-leader

Henrik Semb (Sweden) Lund Stem Cell Center, Lund University Director

Day 2: May 12th, 2008 (Mon.) 9:00-17:10

Special Session

Sir Martin Evans (UK) School of Biosciences, Cardiff University Director / Nobel Prize Laureate in Physiology or Medicine 2007

Introductory Talk

Tasuku Honjo Executive Member of Council of Science and Technology Policy of Japan / Member of the Organizing Committee

【Agenda of Day 2】 Strategies for the Acceleration of Pluripotent Stem Cell-Related Research

【session4】 Pluripotent Stem Cell-Related Research Activities

Irving Weissman (USA) Stanford Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine/
Stanford Comprehensive Cancer Center Director/Director

Hans Schöler (Germany) Max Planck Institute for Molecular Biomedicine Director

Alan Colman (Singapore) Singapore Stem Cell Consortium, Institute of Medical Biology Executive Director

Kwang Soo Kim (Korea) CHA Stem Cell Institute, Pochon CHA University Director

Norio Nakatsuji (Japan) Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University / Institute of Frontier Medical Sciences,
Kyoto University Director / Professor

Stephen Livesey (Australia) Australian Stem Cell Centre CEO

【session5】 Panel Discussion on the International Cooperation in the Pluripotent Stem Cell-Related Research

Panel Discussion on the International Cooperation in the Pluripotent Stem Cell-Related Research

Chair Shin-ichi Nishikawa Center for Developmental Biology (CDB), RIKEN Vice-Director

Closing Address

国際シンポジウム「iPS 細胞研究が切り拓く未来」プログラム

1 日目：2008 年 5 月 11 日 日曜日 10:00 ～ 18:00

開会挨拶

来賓挨拶

【副題】iPS 細胞関連研究の現状と今後への展望～今後の幹細胞研究にどのような発展性をもたらすか～

【session1】iPS 細胞研究の最前線

山中 伸弥 京都大学 iPS 細胞研究センター / 京都大学 再生医科学研究所 (日本) センター長 / 教授
ルドルフ・イエーニッシュ マサチューセッツ工科大学 ホワイトヘッド研究所 (アメリカ) 教授

【session2】多能性の本態と誘導

ピーター・アンドリュース シェフィールド大学 生物科学部 (イギリス) 教授
シェン・ディン スクリプス研究所化学科 (アメリカ) 准教授
イン・ジン 中国科学院上海生命科学研究院及び上海交通大学医学院 健康科学研究所 (中国) 教授

【session3】多能性幹細胞の組織コミットメント

ヨーゼフ・イツコヴィッツ イスラエル工科大学 幹細胞研究センター (イスラエル) 教授
岡野 栄之 慶應義塾大学 医学部 (日本) 教授
高橋 政代 独立行政法人 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター (日本) チーム・リーダー
ヘンリック・セム ルント大学 幹細胞センター (スウェーデン) 所長

2 日目：2008 年 5 月 12 日 月曜日 9:00 ～ 17:10

基調講演

マーティン・エヴァンス卿 2007 年ノーベル医学・生理学賞受賞者 / カーディフ大学 生物科学部 (イギリス) 学部長

イントロダクトリー・トーク

本庶 佑 内閣府総合科学技術会議 議員 / シンポジウム実行委員

【副題】多能性幹細胞関連研究を加速させるために～研究推進や国際協調のあり方とは何か～

【session4】多能性幹細胞関連研究の取り組み

アーヴィン・ワイスマン スタンフォード再生医療研究所 / スタンフォード総合がんセンター (アメリカ) 所長 / 所長
ハンス・シェラー マックスプランク分子医薬研究所 (ドイツ) 所長
アラン・コールマン シンガポール幹細胞コンソーシアム (シンガポール) 専務理事
カンサー・キム 浦項 CHA 大学 CHA 幹細胞研究所 (韓国) 所長
中辻 憲夫 京都大学 物質-細胞統合システム拠点 / 京都大学再生医科学研究所 (日本) 拠点長 / 教授
ステファン・リヴゼイ オーストラリア幹細胞センター (オーストラリア) CEO

【session5】パネルディスカッション

多能性幹細胞関連研究における国際協調のあり方について

【コーディネータ】西川 伸一 独立行政法人 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター (日本) 副センター長

閉会挨拶



International Symposium on Induced Pluripot



開会挨拶 / Opening Address

実行委員会委員長 / JST 研究開発戦略センター首席フェロー

Chair of the Organizing Committee / Principal Fellow of the Center for Research and Development Strategies (CRDS), Japan Science and Technology Agency

井 村 裕 夫 H i r o o I m u r a

Good morning everyone. As the representative of the organizing committee, I will give the opening address of the international symposium on "Induced Pluripotent Stem (iPS) Cell Research - Frontier and Future". Today we are honored by the attendance of Kisaburo Tokai, Minister of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) as well as many researchers from Japan and overseas. As one of the organizers, I'm very gratified that this international symposium has got off to such a lively start. I'd also like to extend a welcome to all the leading researchers who have joined us today from far and wide, and especially Sir Martin Evans who was awarded the Nobel Prize last year for establishing mouse ES cells.

Professor Yamanaka's achievement in developing iPS cells is worthy of being called groundbreaking, and it has had an immense impact around the world. Although it became apparent from the cloned sheep Dolly that differentiated cells are sometimes reprogrammed even in mammals, it was an extremely complex process and it was thought to be something that could not easily be reproduced by researchers.

Professor Yamanaka and his group worked resolutely on this difficult problem for about four years, producing many research findings. In 2006 using mouse cells, and in 2007 using human cells, they successfully proved that it was possible to reprogram fibroblasts to stem cells that have the same pluripotency as ES cells. Furthermore, the approach

is highly versatile requiring the introduction of only three or four transcription factors into the cells.

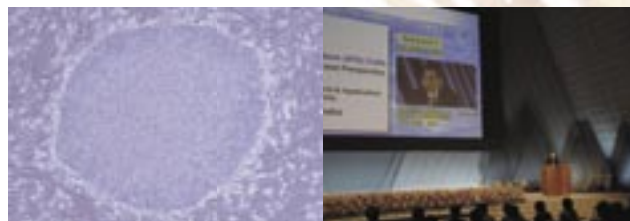
The fact that these pluripotent stem cells, known as iPS cells, could be produced comparatively easily was greeted with surprise. But since they can be prepared easily with normal research, hopes have been raised that in future they can be applied clinically, and the discovery has caused reverberations around the world. The reasons behind this are that it gets around the ethical issues that beset ES cells and nuclear transplantation-derived stem cells, and making original pluripotent stem cells with no concern about immunologic rejection will significantly advance regenerative medicine. Furthermore, it presents a very useful means of researching many illnesses for which the etiology and pathology are currently unknown. In other words, it is hoped that it will be possible to make iPS cells from patients with various illnesses, differentiate them into the relevant cells and discover the mechanisms that cause the illnesses, thereby enabling the discovery of new drugs.

Although iPS cells have raised considerable expectations, there are still many issues that must be clarified before they can be used. Are there new methods with less potential for oncogenesis to replace the current gene transfer method? Why is reprogramming caused in only a few cells? What is the mechanism behind it? What kind of epigenetic alterations cause reprogramming? What is the

nature of the cell's pluripotency? Is there any difference or not between iPS cells and ES cells? If there is, what is it? Is there a more effective method of differentiating iPS cells into the desired cells? Just a moment's thought suggests many problems that must be solved. However, these are expected to be steadily resolved in the future.

One of the significant characteristics of iPS cells is that, unlike ES cells, they can be prepared relatively easily. This is probably why it is currently the subject of very intensive research around the world. One of the purposes of this symposium is to discuss the state of iPS cells or related stem cell research, in other words, to make a roundup of the state of the art, and to consider the future prospects. One issue I hope that you will discuss is international cooperation that will enable these newly discovered cells to start contributing to improvements in human health as quickly as possible. One such example would be establishing international banking of iPS cells taken from patients. Another issue for consideration is how to develop and exploit the Center for iPS Cell Research and Application (CiRA) established at Kyoto University on the initiative of MEXT.

This symposium has been made possible through the participation of the world's leading researchers at a time when pluripotent stem cell research stands on a new springboard. So from that point of view, I expect this to be a historic gathering. I hope that this two-day symposium will be very fruitful. Thank you very much.



皆様おはようございます。国際シンポジウム「iPS 細胞研究が切り拓く未来」の開会にあたりまして、実行委員会を代表して、ご挨拶申し上げます。本日は渡海紀三朗文部科学大臣のご臨席を得て、内外から多くの研究者のご参加のもと、この国際シンポジウムを盛大に開催できましたことは主催者としてまことに喜ばしいことでございます。特にマウス ES 細胞の樹立により、昨年ノーベル賞を受賞されたマーティン・エヴァンス卿をはじめ、遠路、ご参加をいただいた世界の第一線の研究者の皆様にご心から感謝と歓迎の意を表します。

山中教授による iPS 細胞の作成は、まさにグラウンドブレイキングとでも表現すべき大きな発見で全世界に多大な影響を及ぼしました。いったん分化した細胞が哺乳類においてもリプログラムされる場合があることは、クローン羊ドリーによって明らかにされていたわけですが、それはきわめて複雑なプロセスであり、一般には研究者の手によって簡単に作りうるものとは考えられていませんでした。

山中教授らは、この困難な課題に果敢に取り組み 4 年ほどの数多くの研究業績を経て、2006 年にマウスで、2007 年にはヒトで、線維芽細胞を ES 細胞と同様の多能性を有する幹細胞にリプログラムすることが可能であることを見事に証明されました。しかもその手法はわずか 4 個ないしは 3 個の転写因子を細胞に導入するのみという汎用性の高いものでありました。

この iPS 細胞は比較的簡単に多能性幹細胞を作り得たことに対する驚きもありましたが、通常の研究で容易に作成できることから、将来、臨床に応用できるとの期待を抱かせ、全世界に大きな反響を引き起こしました。その 1 つは ES 細胞あるいは核移植による幹細胞につきまとう倫理的な問題を避けること、免疫学的に拒絶されるおそれのない、自己の多能性幹細胞を作りうるにより再生医療を大きく前進させると考えられたからです。また現在、病因も発生病理も明らかでない多くの病気の研究に大変有用な研究手段を提供するとも考えられました。すなわち様々な病気の患者さんから iPS 細胞を作り、それを、目的とする細胞に分化させれば病気の起こるメカニズムの解明や、新しい薬物の発見に役立てることができると期待されるからであります。

このように多大な期待を持って迎えられた iPS 細胞も、その活用までに解明されねばならない多くの問題を抱えております。現在の遺伝子導入方法に変わる新しい、より腫瘍形成の可能性の少ない方法はないのか。リプログラミングはなぜ少数の細胞のみで起こるのか。そのメカニズムは何か。どのようなエピジェネティックな変化によりリプログラミングが起こるのか。細胞の多能性の本体とは何か。iPS 細胞と ES 細胞の間に相違があるのか、ないのか。あるとすればどのような違いか。iPS 細胞を希望する細胞に分化させ

る、より確実な方法は何か。少し考えただけでも解決されねばならない多くの問題があります。しかしこれらも今後、着実に解決されていくものと期待されます。

iPS 細胞の 1 つの大きな特徴は ES 細胞と異なり、比較的簡単に作成することが可能なことであります。それ故に、現在世界の各地で非常な勢いで活発な研究が進められているものと考えられます。このシンポジウムの 1 つの目的は iPS 細胞あるいは関連した幹細胞研究の現状、いわばステートオブザアート (state of the art) を総括して議論し、その将来を展望することにあります。今ひとつはこの新しく見いだされた細胞を 1 日も早く人類の健康に貢献できるようにするためにどのような国際協力ができるのかを議論していただきたいと考えています。例えば患者由来の iPS 細胞の国際バンキングの創設などが、その一例であります。文部科学省のご配慮で京都大学につくられた iPS 細胞研究センターを、どう発展させ、活用していくかも検討課題になりましょう。

このシンポジウムは多能性幹細胞の研究が新たなスプリングボードに立った時期に全世界の優れた研究者を迎えて開催できました。その意味で、歴史的な会合になるものと期待しております。これから 2 日間にわたるこのシンポジウムが実り多いものになることを祈念して私の開会のご挨拶とさせていただきます。どうもありがとうございました。



International Symposium on Induced Pluripot



来賓挨拶 / Guest Address

文部科学大臣 Minister of Education, Culture, Sports,
Science and Technology (MEXT)

渡海紀三朗 Kisaburo Tokai

I am very pleased that so many people are here today for the international symposium on “Induced Pluripotent Stem (iPS) Cell Research - Frontier and Future”.

The achievement of Professor Yamanaka in reprogramming of mouse somatic cells and producing iPS cells that have the capacity to differentiate into various cells is a great achievement in the history of life sciences. He has succeeded in realizing what scientists around the world have dreamed of.

MEXT has long taken an interest in Professor Yamanaka's research, and the Ministry has provided support through the Japan Science and Technology Agency's Basic Research Programs and Grants-in-Aid for Scientific Research. In response to the announcement in November last year concerning the establishment of human iPS cells, a General Strategy was established the following month towards the creation of an all-Japan research organization tasked with accelerating research related to iPS cells. The aim of this research is to identify the reprogramming mechanism, pursue regenerative medicine, and improve the efficiency of the drug discovery process.

As part of the General Strategy, a research network has been established based at four institutions, Kyoto University, Keio University, The University

of Tokyo, and RIKEN as centers for research into projects for establishing regenerative medicine using iPS cells. Researchers in this field are now carrying out integrated research. To set up this network, the cooperation and the assistance of Professors Yamanaka, Nishikawa, Okano, and Nakauchi that participate in this symposium and other internationally renowned researchers was indispensable.

On the other hand there are many aspects of iPS cells that have yet to be clarified and we are still at the stage of basic research. There are many issues that have yet to be resolved before the results of the research can benefit the public in the form of medical treatments. MEXT will continue to provide research funds and intellectual property-related support while working to ensure cooperation between the related institutions.

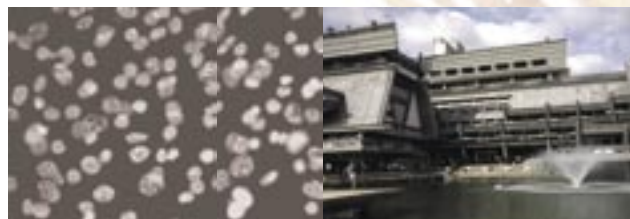
At the same time, securing and applying the intellectual property rights arising from this research is extremely important for the related industries. MEXT is providing support to Kyoto University and the other universities and research institutions with the expectation that industry, which will make use of the intellectual property rights, will play a leading role.

Since the announcement by Professor Yamanaka in August the year before last of his groundbreaking findings on

the establishment of mouse iPS cells, international competition in this field of research has intensified. However, these findings are also the common knowledge of humanity. Thanks to Professor Yamanaka's research, we have obtained new knowledge about a mysterious aspect of life, but it is important to use this knowledge in medicine to benefit the health of populations everywhere. To this end, it is crucial that researchers around the world work together through international cooperation in tackling new challenges, while maintaining their competitive spirit.

I hope that through this symposium, the participants will share their awareness of the initiatives of researchers and research institutions in other parts of the world. I regard this as a significant opportunity to deepen international engagement and to explore appropriate approaches to cooperation.

In closing my remarks, I hope that iPS cell research and research into stem cells and regenerative medicine will continue to make advances, and the day is not far off when the outcome of the research finds applications in medical practice.



本日は、国際シンポジウム「iPS細胞研究が切り拓く未来」が、数多くの方々の御出席を得て、盛大に開催されますことを心からお祝い申し上げます。

山中教授が、マウスの体細胞を初期化し、様々な細胞に分化する能力を持つiPS細胞の作成に成功されたことは、生命科学の歴史に残る素晴らしい成果です。世界中の科学者が夢みていたことを成し遂げられたのです。

文部科学省では、従来から山中教授の研究に注目し、科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業や科学研究費補助金などで支援を行って参りました。また、ヒトのiPS細胞を樹立することに成功したという昨年11月の発表を受け、初期化のメカニズムの解明や再生医療の実現、創薬プロセスの効率化等につながるiPS細胞に関する研究を加速させるため、昨年12月に「総合戦略」を策定し、オールジャパンの研究体制の構築に向けて、研究を加速させてまいりました。

この総合戦略に於いては、再生医療の実現化プロジェクトによるiPS細胞等の研究拠点として、京都大学、慶應義塾大学、東京大学、理化学研究所の4機関を中心に、関連研究者が参加する「研究ネットワーク」を構築し、一体的に研究を推進して

いくこととしております。ネットワークの構築に当たっては、本シンポジウムに参加されている山中教授、西川教授、岡野教授、中内教授をはじめとして、国際的に御活躍されている多くの研究者の方々に多大な御協力をいただいております。

一方iPS細胞については、解明されていない点も多く、まだ基礎研究の段階であり、こうした成果を国民の皆様の医療の現場に届けるためには数々の解決すべき課題があると考えております。文部科学省といたしましても、関係機関と十分な連携を図りながら、研究費の支援や知的財産権の確保等に向けて、引き続き尽力して参りたいと考えております。

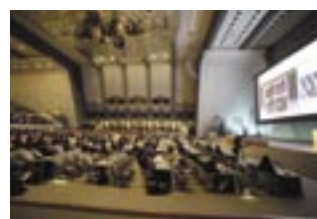
同時に当研究にあたって、知的財産権の確保と活用が、産業利用のために大変重要であると考えております。文部科学省としては、京都大学をはじめ大学や研究機関への支援を行って参りますが、知的財産権を活用される産業界が主導的役割を果たされることを期待しています。

山中教授によるマウスのiPS細胞樹立という画期的な成果が一昨年8月に発表されて以来、この分野の研究は国際競争が激化しています。一方で、この成果は、私たち人類の共有の知識でもあります。山中教授の研究により、私たちは生物の不思議な一面について、新しい知識を得ま

したが、これを医療に活かして多くの人々の健康に貢献することが重要です。そのためには、世界中の研究者が、競争すると同時に、協力して新たな課題に挑戦するといった国際協調も非常に大切です。

本シンポジウムを通じ、世界における研究者や研究機関などの取り組みについて、参加者の方々が認識を共有し、交流を深め、望ましい国際協調のあり方を見出すなど、意義深い機会となることを期待しています。

今後も、iPS細胞研究をはじめ、幹細胞・再生医学研究が発展し、その成果が一日も早くの医療の現場へ届けられることを祈念して、私の挨拶といたします。





iPS Cells - Perspective and Challenge

Shinya Yamana

Japan

Director, Center for iPS cell Research and Application (CiRA), Kyoto University /
Professor, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University



The path to establishing iPS cells

Our research builds on the works of Dr. Martin Evans et al, who in 1981 prepared the first embryonic stem (ES) cells from mouse blastocysts. In 1998 human ES cell lines were successfully established by Dr. James A. Thomson et al of the University of Wisconsin, 17 years for this technology to move from mouse to human cells. Human ES cells can be proliferated indefinitely, and can be differentiated into a variety of cell types. We expected to see the development of cell lines for use in new drug screening and for the evaluation of adverse drug reactions and drug toxicity. Other anticipated application has been the transplantation therapy using the cells differentiated specifically for diseases or injuries.

However, even ten years later, clinical applications using human ES cells have still not been implemented. This is in part due to the considerable and deliberate operations required when working with fertilized human ova, which has slowed the speed of research. In addition, it is practically impossible to prepare ES cells that are genetically identical to the patient's cells. To circumvent these issues, my colleagues and I began research in 1999 on the direct generation of pluripotent stem cells using somatic cells from animals or patients. Our

objective was to induce the same pluripotency in the somatic cells as ES cells.

At first, we hypothesized the existence of pluripotency inducing factors (PIFs), and explored the feasibility of generating stem cells in which cell differentiation could be induced, and that would provide the same pluripotency as ES cells. From Sir John Gurdon's researches showing that pluripotency can be reacquired by transferring somatic cell nuclear into eggs, we knew that PIFs are present in frog eggs, and the somatic cell clone sheep, Dolly clearly demonstrated that PIFs are also present in mammalian ova. At that point it remained unclear whether PIFs could induce pluripotency in fully differentiated cells. However, more recently Dr. Rudolf Jaenisch succeeded in using nuclear transplantation to reprogram lymphocytes to a pluripotent state. In addition, Dr. Takashi Tada of the Kyoto University Institute of Frontier Medical Sciences has successfully induced lymphocyte pluripotency by fusing mouse lymphocytes and ES cells.

Building on these developments, we began a search for PIFs using ES cells. Initiated in 2000, this work was based on the hypothesis that the factors inducing pluripotency would be identical to those factors that sustain pluripotency in ES cells, and on the

further hypothesis that these factors would be specifically expressed in the ES cells or would play an important role. At about that same time, in 1999 and 2000, there were a number of researchers investigating the mechanism of pluripotency in mouse ES cells, so considerable elucidation was achieved regarding the roles of important transcription factors such as LIF, STAT3, c-MYC, SOX2, and OCT3/4.

We also used databases from the Genome Project for screening. Searching the RIKEN mouse EST database for factors expressed in ES cells that disappeared after differentiation, we discovered a new gene group that we designated as ECAT (ES cell associated transcript) genes. During 2003 and 2004, we compiled a list of 24 candidate factors for inducing pluripotency. However, when we introduced these factors individually into mouse somatic cells, the results did not generate ES-like cells. We then explored the potential use of multiple factors, specifically the four factors OCT3/4, SOX2, c-MYC, and KIF4. Through the retrovirus-mediated introduction of these four factors into mouse somatic cells, we obtained ES-like cells. We termed these "iPS cells" in our 2006 report of this research. The following year three research groups, including Dr. Jaenisch and colleagues, succeeded in

Profile

Education	1981-1987	Kobe University, Kobe, Japan School of Medicine (M.D. awarded in March, 1987)	
	1989-1993	Osaka City University Graduate School, Osaka, Japan Division of Medicine (Ph.D. awarded in March, 1993)	
Research Appointment	1987-1989	Resident, National Osaka Hospital, Osaka, Japan	
	1993-1995	Postdoctoral Fellow Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, San Francisco, USA	
	1995-1996	Staff Research Investigator, Gladstone Institute of Cardiovascular Disease	
	1996-1999	Assistant Professor, Osaka City University, Medical School, Osaka, Japan	
	1999-2003	Associate Professor, Nara Institute of Science and Technology, Nara, Japan	
	2003-2005	Professor, Nara Institute of Science and Technology	
	2004-	Professor, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan	
	2007-	Professor, Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University Kyoto, Japan	
	2008-	Director, Center for iPS cell Research and Application (CiRA), iCeMS, Kyoto University, Kyoto, Japan	
Awards and Honors (Selected)	2003	NAIST Academic Award, Nara Institute of Science and Technology	
	2004	Gold Medal Award, Tokyo Techno Forum 21	
	2006	Selected as the NiceStep Researcher 2006 by National Institute of Science and Technology Policy (NISTEP)	
	2007	Third JSPS Prize, Japan Society for the Promotion of Science	
	2007	Nikkei BP Technology Award, Nikkei Business Publications, Inc.	
	2007	Twenty-Fifth Osaka Science Prize	
	2007	German Cancer Research Center (DKFZ)	
	2007	Meyenburg Foundation Award 2007 Asahi Prize 2007	
	2007	Inoue Prize for Science 2007	
	2008	Robert-Koch-Preis 2008	

creating mice derived solely from iPS cells. These findings confirmed that iPS cells could potentially rival the performance of ES cells.

The experiments also demonstrated that the *in vitro* differentiation of iPS cells was identical to that seen in ES cells. At Keio University, Professor Hideyuki Okano had already confirmed the differentiation of neural stem cells into neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. Meanwhile, Associate Professor Jun Yamashita of Kyoto University showed that common precursor cells derived from mouse iPS cells were capable of differentiating into cardiovascular cells including blood cells, vascular endothelial cells, vascular wall cells, and myocardial cells. The use of a 3-dimensional culture made it possible to reconstruct blood vessels from these precursor cells.

We used the ChIP-on-chip method for further in-depth analysis of mouse iPS cells. This technology enables a thorough microarray analysis of DNA-bound transcription factors. Applying that technology, we were able to clarify the binding of OCT3/4 and SUZ12 to genes in ES cells and iPS cells respectively, and to elucidate the role of those transcription factors. Our results showed that the binding of these four factors was associated with changes in the activity of polycomb genes and of genes related

to epigenetics, thus regulating protein expression and inhibition, and resulting in the formation of iPS cells.

Towards clinical applications of human iPS cells

But could the four factors discovered in mice also be used to induce human iPS cells, given the considerable difference between ES cells in mice and humans? Interestingly, within a year of our publication regarding iPS cells in mice, several research groups had succeeded in producing human iPS cells. These rapid results were made possible by the wealth of data already available in the area of human ES cell research, with the reports indicating that iPS cells derived from adult human skin cells had been successfully differentiated into a variety of cell types including neural cells, dopamine-producing cells, myocardial cells, gut-like cells, skeletal muscle-like cells, and cartilage cells.

Based on these results, the Kyoto University Center for iPS Cell Research & Application is pressing forward with research designed to create iPS cells for patients from their own skin cells. In the future we hope to generate neural cells, myocardial cells, liver cells, and cells from autologous iPS cells. At present it remains difficult to induce differentiation into endodermal cells of the latter types.

However, with so many researchers making progress on iPS cell activation, it seems probable that those cells will also be successfully generated in the near future.

Since iPS cells are originally differentiated cells that have been forcibly reprogrammed as pluripotent cells, there is some risk that they may express other characteristics in addition to pluripotency. Safety must thus be evaluated and confirmed even more carefully and thoroughly for these cells than for ES cells. However, once these issues are resolved, it should be feasible to use iPS cells in regenerative medicine and in applications involving cell transplantation.

Since the generation of iPS cells for individual patients will by time-consuming and expensive, we anticipate the creation of cell banks where somatic cells from a wide range of volunteers will be collected and stored by HLA type, both in the form of iPS cells and as differentiated cells. This would offer many advantages. For example, patients of spinal cord injury require cell transplantation soon after the injury occurs. A cell bank could make such rapid treatment possible. In addition, we are confident that iPS cells will prove highly useful in the developments of drug screening, evaluation systems of adverse drug reactions and drug toxicity.





iPS 細胞 - 展望と課題

山中 伸 弥

Shinya Yamanaka / Japan

京都大学 iPS 細胞研究センター センター長 / 再生医科学研究所 教授



iPS 細胞を作製するまで

1981 年、M. エバンズ卿によってはじめてマウスの胚盤胞から ES 細胞が作製されました。私たちの研究の原点はここにあります。98 年にはウィスコンシン大学の J. トムソン教授がヒト ES 細胞株を樹立しました。マウスからヒトまで 17 年かかったことになります。ヒト ES 細胞は未分化のまま無限に増やすことができ、その後さまざまな細胞に分化させることが可能です。したがって、創薬におけるスクリーニング系、副作用や毒性の評価系のほか、病気や外傷に対して分化させた細胞を移植する細胞移植療法が期待されております。

しかし、10 年たった今日もヒト ES 細胞の臨床応用は実現していません。その理由は、ヒト ES 細胞の作製にはヒト受精卵を使用するので慎重な運用が求められ、結果として研究のスピードが上がらないこと、患者さん自身の ES 細胞を作製できないことにあるとされております。私たちはこれを解決するために、動物や患者さんの体細胞から ES 細胞と同じ多能性をもつ幹細胞を作ること为目标として、99 年に研究を始めました。

研究を進めるにあたり、多能性誘

導因子 (PIF) の存在を想定し、これを分化した細胞に導入して ES 細胞と同様の多能性をもつ幹細胞を作れないかと考えました。PIF がカエル卵子にあることは、卵子に体細胞を移植して多能性の再獲得を示したガードン博士の研究から知られていました。またクローン羊ドリーの誕生から哺乳類の卵子にも PIF があることが明らかになりました。PIF により完全に分化した細胞においても多能性を誘導できるかどうかはなお不明でしたが、R・イエーニッシュ教授が核移植によってリンパ球で、多能性を誘導することに成功しました。また、京都大学再生医科学研究所の多田高準教授は、マウスのリンパ球と ES 細胞を融合させてリンパ球の多能性誘導に成功しています。

私たちは ES 細胞に存在する PIF を探すことにしました。多能性を誘導する因子は ES 細胞で多能性を維持している因子と同じものであるという仮説を立て、またこの因子は ES 細胞で特異的に発現しているか重要な役割を果たしていることを想定して 2000 年から研究を始めました。一方で、99 年から 00 年にかけて、多くの研究者がマウス ES 細胞の多能性維持機構を調べ、LIF、STAT3、

c-MYC、SOX2、OCT3/4 など重要な転写因子を次々に明らかにしました。

私たちは、これに加えてゲノムプロジェクトの成果であるデータベースを活用して探索することにしました。理研のマウス EST データベースで、ES 細胞で発現して分化後消失するものを探した結果、新たな遺伝子群を見つけ ES Cell Associated Transcripts (ECAT) と名付けました。以上の研究から、03 ~ 04 年には多能性を誘導する候補として 24 因子をリストアップするに至りました。しかし、これらを個別にマウス体細胞に導入しても ES 細胞と同じものはできません。そこで、複数で作用している可能性を調べた結果、4 つの因子 OCT3/4、SOX2、c-MYC、KLF4 を特定しました。これらをレトロウイルスによってマウス体細胞に導入すると、ES 細胞とよく似た細胞ができることがわかり、これを iPS 細胞と名付けて 06 年に報告したのです。翌年にはイエーニッシュ教授ら 3 グループが、マウス iPS 細胞を未分化胎細胞に注入すると全身がこの細胞に由来するマウスを作製できること、つまり iPS 細胞は ES 細胞に匹敵する能力を持つことを確認しま

プロフィール Profile

学歴	1981-1987	神戸大学医学部 (1987.3. M.D.)	2003	奈良先端科学技術大学院大学 NAIST 学術賞
	1989-1993	大阪市立大学大学院医学研究科 (1993.3. Ph.D.)	2004	東京テクノ・フォーラム 21 ゴールド・メダル
研究歴	1987-1989	国立大阪病院 臨床研修医	2006	科学技術政策研究所「ナイス・ステップな研究者」に選定
	1993-1995	グラッドストーン心血管疾患研究所博士研究員 (アメリカ・サンフランシスコ)	2007	第3回日本学術振興会賞
	1995-1996	グラッドストーン心血管疾患研究所スタッフ研究員	2007	日経 BP 技術賞
	1996-1999	大阪市立大学医学部 助手	2007	第21回大阪科学賞
	1999-2003	奈良先端科学技術大学院大学 助教授	2007	ドイツがん研究センター (DKFZ) マイエンブルク財団賞
	2003-2005	奈良先端科学技術大学院大学 教授	2007	朝日賞
	2004-	京都大学再生医科学研究所 教授	2007	井上学術賞
	2007-	京都大学物質・細胞統合システム拠点 教授	2008	ロベルト・コッホ賞
	2008-	京都大学 iPS 細胞研究センター センター長		

した。

さらに、iPS 細胞は ES 細胞同様に *in vitro* でもさまざまな細胞に分化することが証明されています。慶應義塾大学の岡野栄之教授は、神経系細胞でニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化することを確認しました。また京都大学の山下潤准教授は、マウス iPS 細胞に由来する共通の前駆細胞が、血球細胞、血管内皮細胞、壁細胞、心筋細胞などの心血管系細胞に分化することを示しました。この前駆細胞を3次元培養すると血管が再構築されたのです。

マウス iPS 細胞をさらに詳しく調べるために、私たちは ChIP-on-chip 法で解析を進めました。転写因子に結合する DNA をマイクロアレイで網羅的に解析する技術です。これによって、OCT3/4 や SUZ12 が ES 細胞と iPS 細胞でそれぞれの遺伝子に結合し、どんな役割を果たしているか判明します。その結果、4 因子が結合したあとで多数のポリコム遺伝子群やエピジェネティクスに關与する遺伝子の働きが変化してタンパク質発現制御を調節し、これによって iPS 細胞が成立していることがわかってきました。

ヒト iPS 細胞の臨床応用に向けて

それではマウスで発見した4因子がヒトでも iPS 細胞を誘導するのでしょうか？ マウスとヒトの ES 細胞は相当に違います。ところが、マウス iPS 細胞を報告してわずか1年余りで複数のグループがヒト iPS 細胞の樹立を報告しました。こんなに早く成功したのは、ヒト ES 細胞の研究で得られたさまざまな知見が生かされたからです。大人の皮膚に由来するヒト iPS 細胞からも神経細胞、ドーパミン産生細胞、心筋細胞、腸管様細胞、骨格筋様細胞、軟骨細胞などさまざまな細胞ができました。

こうした成果に基づいて、京都大学 iPS 細胞研究センターでは患者さん自身の皮膚細胞などから iPS 細胞をつくる研究計画を進めています。将来は、自身由来の iPS 細胞から神経細胞や心筋細胞、さらに肝細胞や膵臓のβ細胞も作りたいと考えています。今はまだ後者のような内胚葉系細胞への分化誘導は困難ですが、多くの研究者が iPS 細胞を活用して研究を進めているので、早期に実現する可能性もあります。

iPS 細胞は分化細胞に強制的に多

能性を与えた細胞なので、多能性獲得以外の現象が生じている心配があります。そのため、安全性の評価や確認を ES 細胞以上に慎重に進める必要があります。この問題が解決すれば再生医療、すなわち細胞移植治療に活用できるようになるでしょう。

一方、患者さん1人1人の iPS 細胞を作るには多くの時間と費用がかかるので、多数の有志から体細胞を集め、HLA 型ごとに iPS 細胞や分化させた細胞のバンクを作っておくことが重要となります。脊髄損傷の患者さんは受傷後早期に細胞を移植しなければなりません、バンクがあれば対応可能です。iPS 細胞は創薬や副作用・毒性試験にも非常に有用であると確信しています。





Stem cells, pluripotency and nuclear reprogramming

Rudolf Jaenisch

USA

Member, Whitehead Institute for Biomedical Research /
Professor of Biology, Massachusetts Institute of Technology



Getting close to the mechanism of reprogramming

The induced pluripotent stem (iPS) cells generated by Professor Yamanaka may prompt significant change in future research and the world of medicine. Here I will talk about the fundamentals of iPS cells in terms of the cell reprogramming mechanism.

One of the objectives of research into stem cells is to develop techniques for regenerative medicine. However, there are limits with embryonic stem cells (ES cells) because of the immune response that occurs. Somatic cell nuclear transfer (SCNT) was developed as a way to solve this problem and research has already demonstrated that this technique can be used to treat diseases in the mouse. There are, however, various problems with applying this technique to treat diseases in humans, including efficiency, costs, and ethical issues.

With SCNT, the DNA must be reprogrammed through a purely physiological reaction, rather than the egg performing a miracle. As the ideal situation would be to achieve reprogramming without using a human egg, there are two possible strategies. One involves

researching the molecular circuitry for reprogramming found in ES cells and using this mechanism. The other involves the forced expression within somatic cells of the factors necessary for reprogramming.

Looking at the molecular circuitry strategy first, in ES cells, the transcription factors Oct4, Sox2, and Nanog activate the pluripotency mechanism. These three factors promote cell self-renewal through the formation of a mutually autoregulatory loop and suppress factors involved in differentiation in the genes. This is thought to be the process of reprogramming that occurs in ES cells.

The groundbreaking paper on mouse iPS cells authored by Professor Yamanaka describes a method to forcibly initiate this reprogramming process. Since then, various improved iPS cells have been generated. Our laboratory has also developed a method to create iPS cells more efficiently than before, using B cells from the immune system. Today, the properties of iPS cells are quite similar to those of ES cells and we are now able to produce chimera mice or even embryos.

So, how is reprogramming

possible? We already know that endogenous genes are actually responsible for controlling reprogramming and that factors introduced from outside using viral vectors are no more than triggers. However, the reprogramming mechanism is still a black box. So many questions come to mind, such as what is the kinetics of reprogramming, how long does it take, or is it a stochastic event?

Looking at the kinetics first, we introduced iPS cell inducing factors into a group of fibroblasts and then created sub-clones from those cells that had still not become iPS cells by day 6. Of the sub-clones, some rapidly became iPS cells and others took time. Based on these results, we see that reprogramming is a change dependent on a stochastic epigenetic mechanism.

This led us to ask whether reprogramming involves a defined pathway and how long it takes for an inducing factor to start the reprogramming process. Our experience suggests that pluripotent markers such as SSEA1 are expressed 3–6 days after the inducing factor is introduced, while endogenous genes including a drug-resistance marker do not start to be expressed until around 2 weeks have passed. In other

Profile

Education	1967	M.D., University of Munich, Germany	Awards and Honors (Selected)	Member, National Academy of Sciences Fellow, American Academy of Arts and Sciences Member, International Society for Stem Cell Research Member, American Association for the Advancement of Science
	1968-1970	Postdoctoral Fellow, Max-Planck Institute for Biochemistry, Munich, Germany		Member, German Academy of Natural Sciences Leopoldina Associate Member, European Molecular Biology Organization Editorial Board, Developmental Dynamics, 1992-2000 Editorial Board, Development, 1989-1998 Editorial Board, Molecular Reproduction and Development, 1988-1996
Research Appointment	1972	Postdoctoral Fellow, Princeton University, Princeton, NJ		1996 Boehringer Mannheim Molecular Bioanalytics Prize
	1972-1976	Visiting Fellow, Institute for Cancer Research, Fox Chase, PA		2001 First Peter Gruber Foundation Award in Genetics
	1976-1977	Assistant Research Professor, The Salk Institute, La Jolla, CA		2002 Robert Koch Prize for Excellence in Scientific Achievement
	1977-1984	Associate Research Professor, The Salk Institute, La Jolla, CA		2003 Charles Rodolphe Brupacher Foundation Cancer Award
		Head, Department of Tumor Virology, Heinrich Pette Institute For Experimental Virology and Immunology,		2006 Max Delbrück Medal for Molecular Medicine
	1984-	University of Hamburg, Germany		2007 Vilcek Foundation Prize for Achievements of Prominent Immigrants
		Member, Whitehead Institute for Biomedical Research, and Professor of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA		

words, the application of an inducing factor initiates a cell reprogramming process after around 3 days, but at this stage it only represents partial gene activation. From 3 days through to around 12 days, the inducing factor is present and continues to function, resetting the epigenetic state. Once an autoregulatory loop is formed, the cells become drug resistant and are stable pluripotent cells (iPS cells).

Developing applications for iPS cells

There are two main uses for iPS cells. The first is for *in vitro* research on human diseases. For example, we could sample somatic cells from individuals with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and from healthy individuals, create iPS cells from these samples, and compare their properties to gain a better understanding of the disease. These cells can also be used for drug discovery purposes. With this type of research, there are no issues with the use of cancer genes such as c-myc when creating iPS cells.

The other use is in therapeutic applications. We are working on sickle cell anemia and Parkinson's

disease. Sickle cell anemia is caused by abnormal hemoglobin. We sampled fibroblasts from mice with sickle cell anemia and created iPS cells. Then, having repaired the mutated gene, we differentiated the cells into bone marrow cells, returned them *in vitro* into a mouse disease model, and produced a marked therapeutic effect. Bone marrow transplantation is already an established treatment method, so this research could possibly be developed further into the first example of the application of iPS cells in the treatment of a human disease.

We are also working on Parkinson's disease. We generated neural precursor cells from iPS cells and introduced them into the brains of Parkinson's disease model mice. The production efficiency of dopaminergic neurons was not particularly high, but we confirmed that the cells had been taken up within the brain and were functioning. We also observed a recovery in physiological function.

The advent of iPS cells has meant that cell therapy, once considered a dream, is now closer to becoming a reality. Progress is also being made on elucidating the principles behind the production

of iPS cells. There are still technical challenges to overcome, such as confirming safety, but iPS cells have opened up many more possibilities today.





幹細胞、多能性、そして核の初期化

ルドルフ・イエーニッシュ

Rudolf Jaenisch / USA

ホワイトヘッド生物医学研究所 研究員 / マサチューセッツ工科大学 生物学教授



初期化のメカニズムに迫る

山中教授のiPS細胞は、これから研究と医療の世界を大きく変えていくでしょう。そこで私は、その基礎となる、細胞の初期化(reprogramming)メカニズムの話をします。

幹細胞を研究する目的のひとつは、再生医療の実現にあります。しかし、ES細胞では免疫拒絶反応が起こるという限界があります。この問題に対する解決策として、体細胞核移植法(SCNT)があり、これでマウスの疾患治療が可能なことは、以前から示されていました。ただし、これをヒト疾患治療に用いるにあたっては、効率やコスト、倫理の面で問題があります。

SCNTでは、卵子が奇跡を起こしているわけではなく、あくまで生理的反応によってDNAが初期化されているはずです。つまり、ヒトの卵子を使わずに初期化ができれば良いわけですから、二つの戦略が考えられます。ひとつはES細胞が持っている初期化の分子回路を調べ、これを利用すること。もうひとつは体細胞のなかで初期化に必要な因子を強制発現するということです。

まず分子回路に関して、ES細胞ではOct4、Sox2、Nanogという三つの転写因子が多能性機構を活性化しています。この三者は、互いに自己調節ループを構成することによって細胞に自己複製を促し、遺伝子のなかで分化に関係するものを抑制しています。これがES細胞で起こっている初期化の仕組みだと考えられます。

山中教授が最初に発表したマウスiPS細胞の画期的な論文は、この初期化の仕組みを強制的に起こす方法を示しました。その後も、様々な改良iPS細胞が生まれています。私たちの研究室でも、免疫系のB細胞から従来よりも高い効率でiPS細胞を作り出す手法を開発しました。現在ではiPS細胞の性質はES細胞と極めて類似していますし、キメラマウスを作り出すことも、さらには胚を形成することも可能になっています。

それでは、なぜ初期化が可能なのでしょうか。すでに、外部からウイルスを用いて入れた因子はあくまできっかけに過ぎず、実際の初期化を司っているのは内在性遺伝子であることがわかっています。しかし、まだ初期化の仕組みはブラックボッ

クスです。初期化のキネティクスはどうなっているのか、どれくらいの時間がかかるのか、これは確率論的な変化なのか、といった疑問が次々に生まれています。

まずキネティクスに関して、私たちは線維芽細胞群にiPS細胞誘導因子を導入して6日目、まだiPS細胞になっていない状態でこの細胞群からサブクローンを作ってみました。すると、このサブクローンの中では、迅速にiPS細胞化するものもあれば、時間がかかるものもあったのです。この結果から、初期化とは、確率論的なエピジェネティック機構に依存した変化であることがわかります。

それでは、初期化には決まった道筋があるのか、また誘導因子が初期化を開始するにはどれくらいの時間がかかるのか、ということが次の問題です。私たちが実験してみたところ、多能性マーカーであるSSEA1などは、因子導入後3~6日で発現するのに対し、薬剤耐性マーカーを含む内在性遺伝子の発現は、2週間ほど経たないと始まりませんでした。つまり、誘導因子が与えられて3日ほどで細胞の初期化が始まりますが、この時点では部分

プロフィール Profile

学歴	1967	ミュンヘン大学 医学博士 (ドイツ)
研究歴	1968-1970	マックス・プランク生化学研究所 博士研究員 (ドイツ・ミュンヘン)
	1970-1972	プリンストン大学 博士研究員 (アメリカ・ニュージャージー州)
	1972	癌研究センター 客員研究員 (アメリカ・ペンシルベニア州フォックス・チェイス)
	1972-1976	ソーック研究所 研究助手 (アメリカ・カリフォルニア州ラホヤ)
	1976-1977	ソーック研究所 研究准教授 (アメリカ・カリフォルニア州ラホヤ)
	1977-1984	ハンブルグ大学 ハインリッヒ・ベッテ実験ウイルス学免疫学研究所 腫瘍ウイルス学科長 (ドイツ)
	1984-	ホワイテッド生物医学研究所 研究員、マサチューセッツ工科大学 生物学教授 (マサチューセッツ州・ケンブリッジ)

受賞等 (抜粋)	全米科学アカデミー会員
	アメリカ芸術科学アカデミー会員
	国際幹細胞研究学会会員
	米国科学推進協会会員、ドイツ自然科学アカデミー Leopoldina 会員
	欧州分子生物学機構 (EMBO) 準会員
	1992-2000 Developmental Dynamics 編集委員
	1989-1998 Development 編集委員
	1988-1996 Molecular Reproduction and Development 編集委員
	1996 ベーリンガー・マンハイム Molecular Bioanalytics 賞
	2001 First Peter Gruber 財団遺伝学賞
	2002 科学上の功績の優秀さに対するロベルト・コッホ賞
	2003 ロドルフ・ラドー財団 癌賞
	2006 マックス デルブリュック勲章 分子医学部門
	2007 優れた移民の功績に対する Vilcek 財団賞

的な遺伝子が活性化されているだけです。その後12日くらいまでの間に誘導因子が存在し続けることでエピジェネティックな状態がリセットされ、自己調節ループが形成されると、薬剤耐性を持つ安定した多能性細胞—iPS細胞となると考えられます。

iPS細胞の利用に向けて

iPS細胞には、二つの重要な利用法があります。一つはヒトの疾患研究を試験管内でおこなえることです。たとえば、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の患者さんと健康な人から体細胞を採取して、それぞれからiPS細胞を作って性質を比較することで、疾患に対する理解が進みます。さらに、創薬のためにこれらの細胞を利用することもできます。こうした研究の場合には、iPS細胞を作る際にc-mycなどのがん遺伝子を使っても問題ありません。

そしてもう一つの利用法、「治療への応用」という点で、私たちは鎌状赤血球貧血症とパーキンソン病に取り組んでいます。

鎌状赤血球貧血症はヘモグロビンの異常によって起こります。私た

ちは鎌状赤血球貧血症マウスから線維芽細胞を採取して、iPS細胞を作成しました。そして変異遺伝子を修復してから、骨髄細胞に分化させて疾患モデル・マウスの体内に戻したところ、顕著な治療効果がありました。骨髄移植はすでに確立した治療手法ですので、この研究結果はヒト疾患に対するiPS細胞の最初の応用例になっていくかもしれません。

次にパーキンソン病です。iPS細胞から神経前駆体細胞を作り、パーキンソン病モデル・マウスの脳に入れてみたところ、ドーパミン作動性ニューロンの産生効率は高くなかったものの、脳内に取り込まれて機能していることが確認され、さらには生理的機能も回復しました。

iPS細胞の登場によって、かつて夢だったと思われていた細胞治療が、現実に近いようになってきました。iPS細胞の作製原理の解明も進んでいます。この後も安全性確認などの技術的課題は残っていますが、可能性は大きく広がっているでしょう。



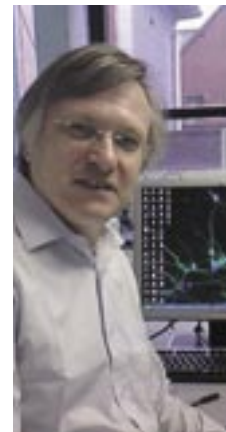


Culture adaptation of human ES cells, self renewal and cancer

Peter W. Andrews

UK

Arthur Jackson Professor of Biomedical Science / Centre for Stem Cell Biology /
Department of Biomedical Science, The University of Sheffield



ES cells 'evolve' in cultures

I would like to talk about ES cells evolving in cultures. When pluripotent stem cells are kept in cultures, we have to take care that they do not differentiate. However, a certain amount of change is unavoidable. For example, in populations of human ES cell lines, there are some that should in theory be stained by antibodies, but which in fact are not. This is due to the characteristics of the culture environment itself. Cultured cells are heterogeneous as a population.

The three types of change characteristic of ES cells in cultures are self renewal, cell death, and differentiation. When ES cells are cultured, they are passaged every five to six days, and this operation means that there is a fairly strong selective pressure on the cells favoring self-renewal. We are using the H7 line made by James Thomson, and while the growth rate and cloning efficiency of ES cells cultured for about a year increases as they adapt to their environment, they still maintain their pluripotency.

So how do ES cells adapt? When we studied the karyotype of the cells, we found that differential

amplification was occurring in the specific chromosomes 12, 17 and X. Surprisingly, the karyotype of teratocarcinoma-derived embryonic carcinoma cells (EC cells) also includes differential amplification of the specific chromosomes 12 and 17. The domain of these amplified chromosomes may include genes that affect the balance between self renewal, differentiation and cell death. These results may be due to the same sort of selective pressure on ES cells.

Another very interesting point is that in culture populations of ES cells, there are also cells which differentiate into other types. Certain factors arising from these differentiated cells may be encouraging differentiation of other ES cells, or conversely, it may be hindering it.

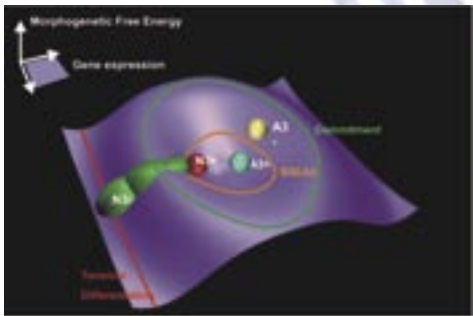
In order to study this possibility, we focused on a gene called *DLK-1*. This gene is on chromosome 14, and it is a gene that appears to stimulate cell growth. In fresh ES cells, the representation of *DLK-1* is low, but after several generations, its expression may become stronger. The occurrence of cell populations with high representation of this gene may be one reason why growth is active in adapted ES cells.

And there is another very interesting point. The surface antigen marker known as SSEA3 appears at the onset of differentiation in human ES cells, and it is the first to disappear. When we compared cell populations using this marker as an indicator, a strange thing occurred. In normal ES cells, the positive and negative cells of SSEA3 are sorted into different cell groups, but in adapted ES cells, they are sorted into the same sort of cell groups. This can be considered to reflect changes in the adaptation process.

When we studied this further, we found that in unadapted ES cultures, colony forming cells were predominantly found in only the SSEA3 positive population, whereas such colony forming cells were found in both the SSEA3 positive and negative populations in adapted cultures. This leads to the hypothesis that there are SSEA positive and negative cells in ES cell populations, that the cells fluctuate between these two states, and that the dynamics of this fluctuation as affected by adaptation.

Profile

Education	1971	B.Sc., The University of Leeds, UK
	1975	D.Phil., Oxford University, UK
	1989	MBA, The Wharton School, University of Pennsylvania, USA
Research Appointment	1974-1975	Research Fellow, Institut Pasteur, France
	1976-1978	Research Fellow, Sloan Kettering Institute, USA
	1978-1992	Faculty, The Wistar Institute of Anatomy and Biology, USA
	1992-present	Arthur Jackson Professor of Biomedical Science, University of Sheffield, UK



with thanks to Dr Paul Gokhale, CSCB, Sheffield University

The free energy that regulates the status of stem cells

This has been a rather abstract discussion, so let's try explaining it by including the concept of free energy. If we represent the status of the cell as a ball, pluripotent stem cells are initially in a state where the ball is stuck in a depression. In other words, it is stable with low energy. If the ball that represents this state overcomes the energy barrier surrounding this depression and starts to roll down a hill away from this depression, it differentiates. To put it another way, differentiation is a probabilistic matter. And in the adapted cells, as the energy barrier gets higher, it is supposed that the pluripotent state becomes more stable as the energy barrier rises.

When I measured the status of human ES cells using the surface antigen marker, I found that the status of the cells divides into a number of stages. These markers can be conceptualized as the contours of a free energy map. Where it is found on the contours produces the status of the cell. For example, we know that when both the SSEA-3 and TRA-1-60 markers are negative, colony

forming activity is high.

So do cells located on this contour come to have different potential patterns of differentiation? The NTERA 2 EC cell line differentiates when retinoic acid is supplied, with about 5% becoming nerve cells. So why is this? When I investigated whether all of them could be made into nerve cells, I found that before NTERA2 EC cells are stimulated with retinoic acid, they already have two tendencies. In other words, they are cells that tend towards becoming nerve cells, or are cells with other tendencies. As expected, pluripotent stem cells can be considered to pass through various stages in the preparatory stage of differentiation while maintaining pluripotency.

As I have shown up to this point, the state of gene expression in ES cells changes while they are being cultured, and they adapt to the culture environment. Through detailed study of this adaptive mechanism, we can expect that the self renewal and differentiation mechanisms of pluripotent stem cells, as well as the mechanism of tumorigenesis will be revealed.



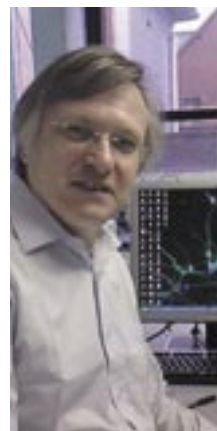


ヒト ES 細胞の培養適応、 自己複製、そして腫瘍

ピーター・W・アンドリュース

Peter W. Andrews / UK

シェフィールド大学 / 生物医科学科・細胞生物学研究センター /
生物医科学アーサー・ジャクソン教授



ES 細胞は培養中に 「進化」する

私は、「ES 細胞の培養中に進化が起こっている」ということをお話ししたいと思います。

多能性幹細胞を培養維持する際には、分化してしまわないように注意する必要があります。しかし、ある程度の変化が起こってしまうことは避けられません。たとえば、ヒトの ES 細胞株の集団のなかには、染まるはずの抗体で染めても染まらないものもあります。それは、培養という環境自体が特殊なためです。培養細胞とは集団として不均質なもののなのです。

ES 細胞はその特性として、培養中に自己複製、細胞死、分化という3種類の変化を起こします。ES 細胞を培養する際には5～6日ごとに継代していくわけですが、この操作は ES 細胞に対して、自己複製を要求する強い選択圧をかけていくことを意味しています。私たちはジェームズ・トムソンの作った H7 株を使っていますが、1年くらい培養した ES 細胞は環境に適応して成長率もクローニング効率も高くなるいっぽうで多能性は維持されています。

それでは、ES 細胞はどのように適

応しているのでしょうか。細胞の核型を調べてみると、特定の染色体—12番、17番、そしてX染色体—で特異的に増幅が起こっていることがわかりました。驚いたことに、胚性腫瘍（テラトカルシノーマ）由来の胚性がん細胞（EC 細胞）の核型もこれと良く似ており、12番、17番の染色体に特異的な増幅が起こっているのです。これらの増幅されている染色体の領域には、自己複製、細胞死、分化という能力のバランスを司る遺伝子が含まれていると考えられます。こうした結果は、ES 細胞と EC 細胞で同じ様な選択圧がかかっているためかもしれません。

もうひとつ興味深いのは、ES 細胞の培養集団中には、ES 細胞から他のタイプの細胞に分化した細胞も存在していることです。この分化細胞から出ている何らかの因子が、他の ES 細胞の分化を促進している、あるいは逆に阻害している可能性があります。

私たちがこの可能性を調べるために注目したのは、*DLK-1* という遺伝子です。この遺伝子は14番染色体上にある、増殖に関わる細胞の仕組みを刺激している遺伝子であることがわかりました。新鮮な ES 細胞では、

DLK-1 の発現量は低いのですが、経代を重ねていくと発現が強まっていきます。この遺伝子の発現量が高い細胞集団が出現することが、適応した ES 細胞で増殖が活発になっている理由のひとつかも知れません。

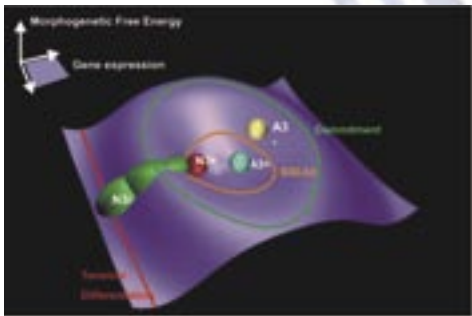
さらにこの点を詳しく調べてみたところ、未適応の ES 細胞集団においては、コロニーを形成している細胞は SSEA3 と呼ばれる表面抗原マーカーを発現している細胞に限られていましたが、適応を起こした細胞集団では SSEA3 を発現していないものも含まれていたのです。このことは、適応の過程における変化を反映していると考えられます。最初から ES 細胞は SSEA3 陽性 / 陰性の状態の間で揺らいでおり、適応が起こるとこの揺らぎも影響を受けるのではないかと、ということです。

幹細胞の状態を規定する 自由エネルギー

少し抽象的な話になりましたので、自由エネルギーの発想を取り入れて説明してみましょう。細胞の状態をボールで表すと、多能性幹細胞は、最初はボールがくぼみにはまっている状態、つまり低エネルギーで安定化し

プロフィール Profile

学 歴	1971	リーズ大学 B.S. (イギリス)
	1975	オックスフォード大学 Ph.D. (イギリス)
	1989	ペンシルベニア大学ウォートン校 MBA (アメリカ)
研 究 歴	1974-1975	パスツール研究所研究員 (フランス)
	1976-1978	スローン・ケタリング研究所研究員 (アメリカ)
	1978-1992	ウィスター解剖学・生物学研究所教員 (アメリカ)
	1992- 現在	シェフィールド大学生物医科学科・細胞生物学研究センター 生物医科学アーサー・ジャクソン教授 (イギリス)



with thanks to Dr Paul Gokhale, CSCB, Sheffield University

ています。もしもこの状態を表すボールがくぼみを取り巻くエネルギーの障壁を越えて転がっていくと、分化してしまいます。つまり分化とは確率論的なものなのです。そして適応状態にある細胞では、このエネルギー障壁の高さが高くなり、多能性細胞としてより安定した状態になっていると仮定されます。

私がヒトのES細胞の状態を表面抗原マーカーで測定してみたところ、果たして細胞の状態はいくつかのステージに分けられることがわかりました。これらのマーカーは、自由エネルギー図の等高線として概念化することができます。この等高線上のどこにあるかが、細胞の状態を生み出すわけです。例えば、SSEA-3とTRA-1-60というマーカーが両方とも陰性の状態では、コロニー形成率が高いことがわかっています。

それでは、この等高線上に位置した細胞は、ある種の異なる潜在的な分化パターンを持つようになるのでしょうか。EC細胞のNTERA2細胞ラインは、レチノイン酸を与えると分化しますが、そのうち5%ほどが神経細胞です。それではなぜ、全てが神経細胞にならないのかと調べてみたところ、NTERA2のEC細胞には、レ

チノイン酸で刺激される前から、もともと二つの傾向があることがわかりました。つまり、神経細胞に向かう傾向を持った細胞と、それ以外の細胞です。やはり、多能性幹細胞は、多能性を保持しながら、分化の準備段階の様々なステージを移ろっていると考えられます。

ここまで示してきたように、ES細胞は培養している間に遺伝子発現状態が変化し、培養環境に適応します。この適応という仕組みを詳しく研究することで、多能性幹細胞の自己複製や分化の仕組み、さらには腫瘍発生の仕組みが解き明かされていくことでしょう。





A Chemical Approach to Pluripotency and Reprogramming

Sheng Ding

USA

Associate Professor, Department of Chemistry / The Scripps Research Institute



Successive subcultivation of embryonic stem cells using only synthetic compounds

Over the past few years, I have used a chemical approach to the study of stem cell biology and have identified various compounds and genes involved in stem cell fate regulation. Today, I will talk about the small molecule approach.

We have developed a combinatorial scaffold approach and have synthesized many small molecules. Using scaffolds with motifs already known to be physiologically active, such as pyrimidines and indoles, we have generated a collection of various compounds of biological significance. We used high-throughput screening to search this small molecule library and determine whether any of the molecules could maintain pluripotency in mouse embryonic stem cells (ES cells). Thus far, we have needed feeder cells, fetal bovine serum, and a differentiation-inhibitory factor (leukemia inhibitory factor; LIF) to culture mouse ES cells, but the use of these factors can result in contamination by multiple unknown factors such that it has

proved difficult to collect data under strictly defined conditions. As a result of our library search, we identified a promising small molecule compound that we called Pluripotin. Using this substance, we were able to subculture mouse ES cells over long periods in a stable fashion without using feeder cells, serum, a differentiation-inhibitory factor or a growth factor. The mechanism of action of Pluripotin appears not to interact with the existing signaling system necessary for mouse ES cell self renewal. Having identified two Pluripotin target proteins, RasGAP and Erk1, and performed biological and genetic analyses, we determined that Pluripotin binds independently to these two differentiation proteins and inhibits their activity.

Based on these findings, we concluded that the mouse ES cell self-renewal function does not involve activation of a specific signaling system by exogenous factors, but instead involves the inhibition of endogenously expressed differentiation genes.

The culture of human ES cells under specific chemical conditions is of great significance. As well as enabling more robust and safe cell culture, a defined

culture environment and signaling mean researchers are able to understand the detailed mechanisms at a molecular level. A few years ago, we cultured various human ES cells using 20ng basic fibroblast growth factor (bFGF) and either the N2 supplement or the N2/B27 supplement, which are of a defined chemical composition. We discovered we were able to maintain the self-renewal function over long periods. We could also induce differentiation under these conditions. By adding growth factors and compounds at each step of mouse embryonic stem cell differentiation, we were able to ultimately culture beating cardiomyocytes. We also successfully generated specific nerve cells, pancreatic cells, and cardiomyocytes using the same approach with human ES cells.

In 2004, we published research on Reversine, a factor that controls reprogramming. Myoblasts and fibroblasts reprogrammed using Reversine redifferentiated *in vitro* into bone cells, fat cells, and muscle cells. We have identified a target protein and confirmed genetically that this is involved in Reversine activity.



Profile

Education

- 1999 B.S., California Institute of Technology
- 2003 Ph.D., The Scripps Research Institute

Research Appointment

- 2003 Assistant Professor, Department of Chemistry, The Scripps Research Institute
- 2007 Associate Professor, Department of Chemistry, The Scripps Research Institute

Awards and Honors (Selected)

- 1997 National Merit Scholar, Phi Tau Phi Honor Association.
- 1997 Member of Tau Beta Psi, the Engineering Honor Society.
- 1997 Rosalind W. Alott Merit Award.
- 1998 Carnation Merit Award.
- 1999 Richard P. Schuster Memorial Prize.
- 2000 Fellowship in Biological Science, Howard Hughes Medical Institute.
- 2008 CIRM Faculty Award

iPS cell induction by substituting transcription factors

Today, there are three main challenges in the production of iPS cells. First, the viral intervention of oncogenes is a barrier to the clinical application of these cells. Second, reprogramming efficiency is extremely low. Third, the reaction takes a long time.

In order to overcome these issues, we decided to search for cells that required little genetic manipulation and to identify small molecule substances that could be used instead of a transcription factor and would improve reprogramming efficiency. For example, using tissue-specific neural progenitor cells, we applied only two of the four factors conventionally used (Oct4 and Klf4) and induced iPS cells 10-14 days after transfection. We identified a previously unreported compound — Compound I — that improved reprogramming efficiency under these conditions and achieved the same efficiency when we used the four factors. By replacing Sox2/c-Myc with this compound, we established an iPS cell line. This

is possible even without feeder cells.

We are also working with adult stem cells. Over the past few decades, cell-based therapies such as bone marrow transplantation have been used clinically, but they are not simple procedures. A cell drug that could spur stem cells into action could be administered like a normal drug and could promote regeneration and injury recovery *in vivo*. Neuropathiazol, a small molecule that we previously identified, potently induces adult neural precursor cells to differentiate into neurons and inhibits differentiation into astroglial cells. Infusing this compound into rats promotes neurogenesis in the dentate gyrus. We confirmed, after 40 days, an improvement in spatial memory in a water maze behavior assay. We are continuing our research with the aim of discovering small molecules that regulate adult stem cell fate.



多能性およびリプログラミングへの 化学的アプローチ

シェン・デイン

Shen Ding/ USA

スクリプス研究所化学科准教授



ES 細胞を合成化合物 だけで継代培養

私はこの数年、幹細胞生物学に対する化学的なアプローチを行い、様々な幹細胞の運命の調節に関わる化合物や遺伝子を同定してきました。本日は小分子化合物によるアプローチについてお話しします。

私たちはコンビナトリアル・スカフォールド・アプローチと呼ぶ方法を開発し、多数の小分子化合物を合成しています。ピリミジンやインドールなど既知の生理活性モチーフをもつスカフォールドを用いて、生物学的意義のある多様な化合物のコレクションを作りました。こうして確立した小分子化合物ライブラリのなかにマウス ES 細胞の多能性を維持するものがないか、ハイスループットスクリーニングで探索しました。これまでマウス ES 細胞培養には、支持細胞、ウシ胎仔血清、分化抑制因子(白血病阻害因子;LIF)が必要でしたが、これらを使用すると複数の未知因子が混入するおそれがあり、厳密に定義された条件下でのデータ採取が困難でした。探索の結果、可能性のある小分子化合物を同定し、これをプルリポチン

と名付けました。この物質を用いると、支持細胞、血清、分化抑制因子や成長因子なしに、マウス ES 細胞を安定的に長期間継代できます。プルリポチンの作用機序は、マウス ES 細胞の自己複製に必要な既知のシグナル伝達系とは相互作用がないようです。プルリポチンの 2 つの標的タンパク質 RasGAP と Erk1 を同定して、生化学的・遺伝学的解析を行った結果、プルリポチンはこれら 2 つの分化誘導タンパク質と独立に結合し、活性を阻害することが明らかになりました。

この知見から、マウス ES 細胞の自己複製能維持の本質は、外部因子によって特定のシグナル伝達系を活性化することではなく、むしろ内部に発現する分化誘導遺伝子の抑制であることが明らかになりました。

ヒト ES 細胞についても化学組成の明らかな条件で培養することは大きな意義があります。よりロバストで安全性の高い培養ができるばかりでなく、培養環境やシグナリングが明らかなので、分子レベルでの詳細な機構解明が可能になります。数年前、私たちは、支持細胞や血清なしに、化学的組成の明らかな

N2 サプリメントまたは N2/B27 サプリメントと bFGF20ng によって種々のヒト ES 細胞を培養し、自己複製能が長期間維持されることを見出しました。この条件による分化誘導も可能でした。マウス ES 細胞に分化のステップごとに成長因子や化合物を加えて培養し、最終的に拍動する心筋細胞を得ました。ヒト ES 細胞についても同様のアプローチで特定の神経細胞や膵細胞、そして心筋細胞を作ることに成功しています。

また、リプログラミングを制御する分子として、私たちは 2004 年にリバーシンという合成小分子化合物を報告しました。この化合物によってリプログラミングされた筋細胞や線維芽細胞は、*in vitro* で骨細胞、脂肪細胞、筋細胞に再分化しました。標的タンパク質を同定し、これがリバーシンの活性に関わっていることを遺伝学的に確認しています。

転写因子を化合物で代替 して iPS 細胞誘導

現在、iPS 細胞の作製は 3 つの課題を抱えています。第 1 は、ウイルスベクターによるがん遺伝子への



プロフィール Profile

学 歴	1999 カリフォルニア工科大学 B.S.	1997 斐陶斐榮譽學會米国メリット奨学生
	2003 スクリプス研究所 Ph.D.	1997 米優秀技術者会メンバー
研 究 歴	2003 スクリプス研究所化学科助教授	1997 ロザリンド W. アロット メリット賞
	2007 スクリプス研究所化学科准教授	1998 カーネーションメリット賞
		1999 リチャード P. シュスター メモリアル賞
		2000 ハワード・ヒューズ医学研究所 生命科学フェローシップ
		2008 カリフォルニア再生医療機構 (CIRM) Faculty 賞

組み込みが臨床応用の障壁になること、第2はリプログラミングの効率が極めて低いこと、第3は反応が遅いことです。

これらを克服するために、私たちは遺伝子操作が少なくすむ細胞を探し、転写に代わる小分子化合物でリプログラミング効率を改善する物質を探索する方針を立てました。例えば、組織特異的な神経前駆細胞を用いると、従来の4因子のうち、Oct4/Klf4の2因子だけで遺伝子導入から10～14日後にiPS細胞が誘導されました。また、この条件におけるリプログラミング効率を向上させる未発表の化合物Iを同定し、4因子を導入した場合と同程度の効率を達成しました。Sox2/c-Mycをこの化合物に置き換えることによって、iPS細胞が樹立されます。これは支持細胞がなくても可能です。

私たちは成体幹細胞にも取り組んでいます。細胞療法はこの数十年、骨髄移植などに臨床応用されていますが、簡便な治療法ではありません。幹細胞に働きかける細胞薬ならば、通常の薬のように投与して、*in vivo*で再生や損傷の回復を促すことができます。私たちが同

定した小分子であるニューロパチアゾールは、成体神経前駆細胞を強力に神経細胞に分化誘導し、アストログリア細胞への分化を抑制します。この化合物をラットに注入すると海馬歯状回における神経新生が促進され、40日後の水迷路学習試験で空間記憶能の向上を認めました。今後も成体幹細胞の運命を調節するような小分子が見つかることを期待して研究を進めています。



L4, a Novel Target Gene of Oct4

Y i n g J i n

China

Professor of Developmental Biology / Director of Key Laboratory of Stem Cell Biology /
Institute of Health Science / Shanghai Institutes for Biological Sciences /
Chinese Academy of Sciences/Shanghai JiaoTong University School of Medicine



What is molecular mechanisms for transcription factor Oct4 to maintain pluripotency ?

In order to bridge the gap between basic research and applied research, we have worked mainly on research into human and mouse ES cells. Recently, we have also started iPS cell research. Today my talk will focus on our research findings to date.

We know that transcription factor Oct4 plays an important role in maintaining the pluripotency of stem cells. However, we lacked a clear understanding of the mechanism by which Oct4 is actually involved in, and which molecules are its target. Therefore, we have worked to discover the factors related to the pluripotency function that works in relation to Oct4.

As one of the substances that interact with Oct4, firstly the protein Wwp2 has been the subject of considerable attention. Wwp2 is a ubiquitin ligase and

besides Oct4, it has interaction with the Rpb1 protein. Oct4 can be ubiquitinated by Wwp2. Furthermore, we found that Oct4 interacts with Ubc9 and is modified by sumoylation. We have come to understand that ubiquitination and sumoylation jointly control Oct4 protein level in ES cells. These studies first point out that posttranslational modification has an important role in control of Oct4 protein level in ES cells.

In addition, when we carried out assay using ChIP, many molecules emerged as candidate targets for Oct4. Among these, the one that we particularly focused on was *L4*. We found that when ES cells are induced to differentiate, the expression of *L4* increases markedly. Importantly, Oct4 can bind to regulatory sequence of *L4* genes and regulate *L4* expression in ES cells, and we have continued with these experiments. Our work demonstrates that *L4* overexpression can induce mouse ES cells to differentiate

into extraembryonic endoderm cells through activation of MARK/ERK1/2 signaling pathway. Therefore, this study identifies a novel target gene of Oct4 and inhibiting expression of *L4* gene might be one of mechanisms for Oct4 to maintain ES cells in an undifferentiated state.

ent Stem [iPS] Cell Research – Frontier and Future –



Profile

Education

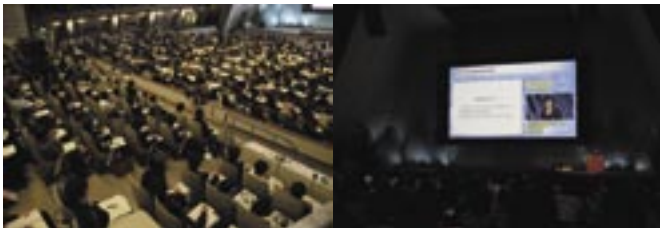
- 1983 M.D., China Medical University, Shenyang, China
- 1988 Ph.D., Peking Union Medical College (PUMC) and Chinese Academy of Medical Science (CAMS), Beijing, China

Research Appointment

- 1988 Postdoctoral fellow, Department of Pharmacology, University of North Texas Health Science Center at Fort Worth, Texas, USA
- 1994 Research fellow, Molecular Immunology Center, Department of Microbiology University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Texas, USA
- 1999 Professor and Head of Molecular Developmental Biology Laboratory, Shanghai JiaoTong University School of Medicine, Shanghai, China
- 2001 Principle Investigator of Stem Cell Research Laboratory, Institute of Health Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences and Shanghai JiaoTong University School of Medicine, Shanghai, China
- 2006 Director of Key Laboratory of Stem Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China
- 2007 Director of Shanghai Stem Cell Institute, Shanghai JiaoTong University School of Medicine, Shanghai, China

Awards and Honors (Selected)

- 1994 Achievement award in ocular Pharmacology, University of North Texas Health Science Center, Texas, USA
- 2007 Outstanding Scientist of year, Institute of Health Sciences, Shanghai, China





L4 — Oct4 の有力な標的遺伝子

イン・ジン

Ying Jin / China

中国科学院上海生命科学研究院 / 上海交通大学医学院 健康科学研究所
幹細胞生物学中央研究室室長 / 発生生物学教授



多能性を維持する転写因子 Oct4 の分子メカニズムとは？

私たちは基礎研究と応用研究の橋渡しをするため、主にヒトとマウスのES細胞の研究に取り組んできました。そして最近では、iPS細胞の研究も始めています。今日は、私たちのこれまでの研究成果を中心にお話します。

転写因子 Oct4 は、Sox2 や Nanog などとともに、幹細胞の多能性維持に重要な役割を果たしていることがわかっています。しかし Oct4 が実際にどのような機構で多能性に関わっているか、またその標的となる分子の数々については良くわかっていませんでした。そこで私たちは、Oct4 と関係して働いている、多能性機能に関連した因子を見つけようと努力を重ねてきました。

Oct4 が相互作用をしている物質のひとつとして、まず大きくクローズアップされてきたのが Wwp2 というタンパク質です。Wwp2 はユビキチンのリガーゼであり、Oct4 の他に Rpb1 というタンパクとも相互作用を持っていました。Oct4 は Wwp2 によってユビキチン化されます。さらに私たちは、Oct4 が Ubc9 と相互作用

用して、SUMO 化修飾されることを見いだしました。現在、私たちは、ES細胞のなかではユビキチン化とSUMO化が協働して、Oct4の発現量を制御していると考えています。これらの研究結果によって、タンパク質の転写後修飾が、ES細胞内のOct4発現量を制御するうえで、重要な役割を果たしていることが、はじめて示されました。

さらに、ChIPによる探索をおこなったところ、多くの分子がOct4の標的候補として浮かび上がってきました。そのなかでも、私たちが特に注目したのが **L4** です。**L4** は胚盤胞の細胞が誘導される際に、顕著に発現上昇することがわかりました。さらに重要なことに、Oct4 はES細胞内において、**L4** 遺伝子の制御配列に結合することで **L4** 発現量を制御していることがわかりました。私たちが研究を続けたところ、**L4** をマウスES細胞内で過剰発現させると、ES細胞は MARK/ERK 1/2 シグナル伝達系を介して、卵黄囊前駆細胞へと分化していくことがわかりました。

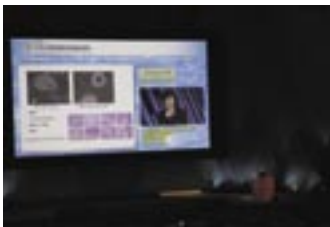
これらの研究によって、Oct4 の有力な標的遺伝子としての **L4** が見いだされました。この **L4** 遺伝子の

発現量制御のような仕組みが働くことにより、ES細胞は未分化な状態に維持されているのだと考えられます。

ent Stem [iPS] Cell Research — Frontier and Future —

プロフィール Profile

学 歴	1983	中国医科大学 M.D. (中国・瀋陽)	受 賞 等 (抜 粋)	1994	ノース・テキサス大学 健康科学センター 眼薬理学アチーブメント賞 (アメリカ・テキサス州)
	1988	北京協和医科大学 (PUMC) および中国医学科学院 (CAMS) Ph.D.(中国・北京)		2007	健康科学研究所 優秀科学者賞 (中国・上海)
研 究 歴	1988	ノース・テキサス大学健康科学センター薬理学科 博士研究員 (アメリカ・テキサス州フォートワース)			
	1994	テキサス大学サウスウェスタン医療センター 微生物学科 分子免疫学センター研究員 (アメリカ・テキサス州ダラス)			
	1999	上海交通大学医学院 分子発生生物学研究室教授・室長 (中国・上海)			
	2001	中国科学院上海生命科学研究院および上海交通大学医学院 健康科学研究所 幹細胞研究室プリンシプル調査員 (中国・上海)			
	2006	中国科学院 幹細胞生物学中央研究室室長 (中国・上海)			
歴	2007	上海交通大学医学院 上海幹細胞研究所所長 (中国・上海)			





Optimization and Large-scale Culture of Human Embryonic Stem Cells

Joseph Itskovitz-Eldor

Israel

Professor, Stem Cell Research Center / Technion - Israel Institute of Technology



Human embryonic stem cell cultivation without the use of animal or feeder cells

Our Stem Cell Research Center was established 5 years ago in the city of Haifa in Northern Israel. The Center employs four senior researchers and a total of 60 employees, and functions as a core facility for stem cell research in Israel. I was involved in the work done by Professor James A. Thomson and other colleagues to establish the first-ever human embryonic stem cell (ES cell) line in 1998. This development has already been consigned to the history books in the 10 years that have passed since then.

Thus far, ES cells have been cultured in fetal bovine serum (FBS) using mouse embryonic fibroblasts (MEF) as a feeder layer. However, if human ES cells are to be applied clinically in the future, we need to establish culture conditions that do not involve exposure to mouse retroviruses and methods that do not use animal cells, as they pose an infection risk from animal pathogens. Another problem if we are targeting clinical application is variation between batches of MEF and FBS and the

lack of strictly defined culture conditions.

We therefore developed a method that uses human foreskin fibroblasts instead of MEF and serum replacement instead of FBS. We successfully cultured human ES cells in a stable manner and at high efficiencies without the use of feeder layers or serum. Human ES cells could only be subcultured for a few generations with MEF, but our method allowed successive subcultivation for 43 generations on foreskin fibroblasts. We used a three-dimensional culture of differentiating cells (embryoid bodies) to generate spontaneously beating cardiomyocytes from human ES cells and confirmed cell functions. Pharmaceutical companies are already using such cardiomyocytes for drug screening by observing QT prolongation.

We also successfully induced mesenchymal stem cells from human ES cells. We successively subcultured these cells for 20 generations such that they became capable of prolonged proliferation. We observed osteogenesis when we differentiated these cells *in vivo* without using a matrix or scaffold. We cultured these cells to high density over the following

few weeks and obtained long columnar tendon-like structures. We transplanted these structures into nude mice with severed Achilles tendons and saw a complete recovery in the Achilles tendon function in 8 weeks.

Using suspension culture methods to achieve large-scale culture of human ES cells and iPS cells

Next, I will talk about suspension culture of undifferentiated human ES cells. We need to be able to replicate and differentiate cells in three dimensions for future application in regenerative medicine. Researchers have therefore investigated culturing cells in suspension rather than adhering cells to the culture dish. Leukemia inhibitory factor (LIF) is used to keep mouse ES cells in an undifferentiated state. Downstream transcription factors such as STAT3 are also known to play an important role in maintaining cells in an undifferentiated state. A number of reports have suggested that self-renewal in human ES cells cannot be maintained with LIF/STAT3 signaling. The chimera of IL6 and the soluble IL6 receptor is



Profile

Education	1972	M.D., The Hebrew University, Jerusalem
	1982	Ph.D., Technion-Israel Institute of Technology, Haifa
Research Appointment	1983-1985	Founder, In-Vitro Fertilization and Embryo Transfer Program, Department of Obstetrics and Gynecology, Rambam Medical Center, Haifa
	1986-	Director, IVF Program, Department of Obstetrics and Gynecology, Rambam Medical Center, Haifa
	1990-	Associate Professor, Faculty of Medicine, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa
	1991	Director, Department of Obstetrics and Gynecology, Rambam Medical Center, Haifa
	2000-	Professor, Faculty of Medicine, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa
	2004	Chairman, Stanley and Sylvia Shirvan Chair in Tissue and Cell Regeneration Research, Technion, Haifa
	2004	Director, Stem Cell Center, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa

a potent stimulating factor for the gp130 subunit of the LIF receptor. We cultured undifferentiated human ES cells in suspension with the addition of the chimera and basic fibroblast growth factor (bFGF). With this method, we were able to successively culture the cells through 43 generations and confirmed the continued expression of undifferentiated and pluripotency markers. The apoptosis rate during the culture period was around 5% after 1 week and around 30% after 2 weeks. Of particular interest was that cells cultured in suspension over a long period could then be transferred without any problems to two-dimensional monolayer culture.

We also began researching iPS cells. We investigated suspension cultures of iPS cells in static cultur, in a dynamic culture using a spinner flask. In our view, it should be not that difficult to achieve the large-scale culture of the cells using bioreactors and defined culture conditions. Cells cultured in suspension are robust and can be transferred to two-dimensional culture, so we should be able to send them overseas by Fedex.

Provisional data show that pluripotent stem cells may be

more stable in three-dimensional than two-dimensional culture. Three-dimensional suspension culture of human iPS cells results in beautiful spheroid formations that self renew, form the three embryonic germ layers, and differentiate into various cell lineages. Of increasing interest as a key theme in basic biology is how cells adapt to three-dimensional culture. Research has also begun on genetic profiling for two-dimensional and three-dimensional culture. For example, there have been reports that cadherins are upregulated by three-dimensional culture, while the integrin family is upregulated by two-dimensional culture and downregulated by three-dimensional culture.

In the near future, I am confident that the large-scale culture of pluripotent stem cells will be possible and that the convenient and inexpensive supply of cells will enable their use for clinical and high-throughput screening purposes.





ヒト胚性幹細胞の活用と大量培養

ジョーセフ・イツコヴィッツ-エルダー

Joseph Itskovitz-Eldor / Israel

テクニオン - イスラエル工科大学幹細胞研究センター教授



動物細胞・支持細胞なしの hES 細胞培養法

私たちの幹細胞センターは、イスラエル北部の都市ハイファに5年前に設立されました。主任研究員4名、総勢60名の規模で、イスラエルにおける幹細胞研究の中心機関として機能しています。1998年、私はJ.A.トムソン教授らとはじめてヒトES細胞株を樹立しました。それから10年たち、これはすでに歴史の一部になっています。

これまでヒトES細胞は、支持細胞としてマウス胚性線維芽細胞(MEF)を使用し、ウシ胎仔血清(FBS)で培養されてきました。しかし、将来ヒトES細胞を臨床に適用するには、動物の病原体に感染するおそれのある動物細胞を使用せず、またマウスレトロウイルスに暴露しない培養条件を確立する必要があります。MEFおよびFBSのバッチ間の差違や培養条件が厳密に定義されていないことも、臨床応用をめざす場合の問題点として指摘されてきました。

そこで、私たちはMEFの代わりにヒト包皮線維芽細胞を、FBS

の代わりに血清代替品を使用する方法を開発し、支持細胞や血清なしに安定性が高く効率的なヒトES細胞の培養に成功しました。MEFでは数代の継代しかできなかったヒトES細胞を、この方法で包皮線維芽細胞上で43代にわたり継代することが可能になっています。私たちは分化中の細胞(胚様体)の3次元培養を用いて、ヒトES細胞から自発的に拍動する心筋細胞を作製し、細胞の機能を確認しました。すでに製薬会社が、この心筋細胞を使用してQT延長を見ることにより、薬物スクリーニングを行っています。

また、ヒトES細胞から間葉系幹細胞の誘導にも成功しました。20代にわたって継代し、長期に増殖させることができるようになっています。*in vivo*でこれをマトリックスやスカフォールドなしに分化させたところ、骨の新生を認めました。さらに数週間にわたり高密度で培養すると、長い円柱状の腱様構造物を得ました。アキレス腱を切除したヌードマウスにこれを移植すると、8週間でアキレス腱機能が完全に回復しました。

浮遊培養でhES細胞・ iPS細胞の大量培養へ

次に未分化ヒトES細胞の浮遊培養についてお話しします。将来の再生医療の展開には、細胞を3次元で増殖・分化させることが必要であり、そのために細胞を培養皿に接着させず、浮遊させて培養する方法が検討されてきました。マウスES細胞の未分化状態の維持には、白血病阻害因子(LIF)が使われます。また、その下流にある転写因子STAT3なども未分化状態の維持に重要な役割を果たしていることが知られています。しかし、これまで複数の文献が、LIF/STAT3系のシグナリングではヒトES細胞の自己複製能を維持できないと報告しています。IL6と可溶性IL6受容体のキメラはLIF受容体サブユニットgp130の強力な刺激因子です。私たちは、このキメラと線維芽細胞増殖因子(bFGF)を加えて未分化ヒトES細胞の浮遊培養を行いました。この方法で、43代にわたり連続して培養することに成功し、未分化マーカーや多能性マーカーが発現し続けることを確認しています。



プロフィール Profile

学歴	1972	ヘブライ大学 M.D. (エルサレム)
	1982	テクニオン工科大学 Ph.D. (ハイファ)
研究歴	1983-1985	ラムバムヘルスケアセンター産婦人科 体外受精・胚移植プログラム創立者 (ハイファ)
	1986-	ラムバムヘルスケアセンター産婦人科 体外受精プログラムディレクター (ハイファ)
	1990-	テクニオン - イスラエル工科大学医学部 准教授 (ハイファ)
	1991	ラムバムヘルスケアセンター産婦人科ディレクター (ハイファ)
	2000-	テクニオン - イスラエル工科大学医学部 教授 (ハイファ)
	2004	テクニオン組織 & 細胞再生研究スタンリー & シルビア・シルヴァン チェア チェアマン (ハイファ)
	2004	テクニオン - イスラエル工科大学幹細胞研究センター所長 (ハイファ)

培養期間によるアポトーシス率は1週間後で約5%、2週間後で約30%でした。興味深いことに、長期間浮遊培養した細胞は、その後2次元の単層培養に問題なく移行することができます。

私たちはiPS細胞についても研究を始めました。静的培養のほか、攪拌フラスコを用いて動的培養を行い、iPS細胞の浮遊培養を試みています。培養条件が明確なバイオリアクターによる必要な細胞の大量培養は、本質的にそう困難ではないと考えています。浮遊培養した細胞はロバストであり、2次元培養への移行も可能なので、海を越えて送付できるようになるでしょう。

暫定的なデータによると、多能性幹細胞は3次元培養のほうが2次元培養より安定していると思われます。ヒトiPS細胞を3次元浮遊培養すると美しい球状体となり、自己複製し、3つの胚性胚葉を形成し、様々の細胞系列に分化していきます。基礎生物学の重要なテーマとして、細胞がどのように3次元培養に適応するかについて関心が寄せられています。2次元・3次元培養に関連する遺伝子

プロファイリングの研究も始まりました。例えば、カドヘリンは3次元培養でアップレギュレートされ、インテグリンファミリーは、2次元でアップレギュレート、3次元でダウンレギュレートされるという報告があります。

遠くない将来、多能性幹細胞の大量培養が実現し、臨床スクリーニング、ハイスループットスクリーニングなどの用途に、簡便かつ安価に提供されるようになると確信しています。



Cell therapy for spinal cord injury using neural stem/progenitor cells derived from pluripotent stem cells



Hideyuki Okano

JAPAN

Dean, Keio University Graduate School of Medicine /

Professor and Chairman, Department of Physiology / Keio University School of Medicine

Understanding the mechanism of in regeneration of the central nervous system

The great scientist Santiago Ramon y Cajal who laid the foundations of neurology said that once the mammalian central nervous system (CNS) is injured, it cannot recover. However, I wondered if that were really true, and have investigated the issue using stem cell technology.

In regeneration of CNS, nerves can be said to be regenerated with the completion of (1) regeneration of the disrupted neuronal axon, (2) replenishment of neural cells, and (3) recovery of lost neural function. Therefore, it is necessary to understand the complicated phenomenon of neural development from the embryo stage.

Very early on, neural stem cells (NSCs) proliferate in a symmetric fashion (expansion phase). Thereafter NSCs undergoes asymmetric cell division to produce neuronal lineages (neurogenic phase). At this phase, NSCs are resistant to gliogenic cytokines. Subsequently, after the neurogenic phase is over, they differentiate into glial cells, including oligodendrocytes

and astrocytes (gliogenic phase). The process by which these various neural cells arise follows a particular time schedule, and the question is how to control this process. Recently neural cell culture systems using ES cells have been established that are useful in this research, mimicking the temporal changes of the differentiation potential of NSCs. With this method, the growth factors to apply to the cells are determined — embryoid body cell clusters are made from ES cells, and these are then modified to form neural cell clusters (neurospheres) (Okada et al. Stem Cells, 2008). These are differentiated sequentially into the primary neurosphere (PNS), the secondary neurosphere (SNS) and the tertiary neurosphere (TNS), to induce neural cells. In the PNS, most of the main types of neurons are present, and in the SNS the three cell lineages are all present. In the process where the ES cells change to PNS in the petri dish and then to SNS, the expression level of various genes changed significantly. When we performed DNA microarray analysis and functional screening using this *in vitro* culture condition to reveal factors associated with temporal changes in NSCs' potency,

we identified a transcriptional repressor, COUP-TF as a candidate for such a factor (Naka et al., Nat. Neurosci, 2008). We found that when COUP-TF is present, NSCs are able to acquire the competency for the gliogenic cytokines, i.e. glial cells (astrocytes) arise from NSCs in a temporarily regulated fashion. Namely, in the presence of the expression of endogenous COUP-TF, we found that 0% of PNS, 50% of SNS and 100% of TNS differentiated into astroglia by the treatment of gliogenic cytokines (LIF+BMP). Conversely, if this gene is knocked down, almost no or very small number of glial cells arise even from TNS. When this factor is heavily present, initially the cells become neurons, and as it decreases, glial cells arise. By combining these factors that control neural development, in future we should be able to produce the types of neural cells that we are aiming for.

Efforts towards realizing regeneration of the CNS

It is one thing to clarify the mechanism by which neural cells arise, but the question is whether

Profile

Education

- 1983 M.D., Keio University School of Medicine, Japan
- 1988 Ph.D., Graduate School of Medicine, Keio University, Japan

Research Appointment

- 1989 Postdoctoral fellow, Department of Biological Chemistry, Johns Hopkins University School of Medicine, USA
- 1992 Instructor, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Japan
- 1994 Professor, Department of Molecular Neurobiology, Tsukuba University, Japan
- 1997 Professor, Department of Neuroscience, Osaka University Graduate School of Medicine, Japan
- 2001 Professor, Department of Physiology, Keio University School of Medicine, Japan
- 2007 Dean, Graduate School of Medicine, Keio University, Japan

Awards and Honors (Selected)

- 1988 Sanshikai Award (from Sanshi-Kai, Keio University School of Medicine)
- 1995 Yoshihiro Kato Memorial Award (from Yoshihiro Kato Memorial Foundation)
- 1998 Kitasato Award (from Sanshi-Kai, Keio University School of Medicine)
- 2001 Naka-akira Tsukahara Award (from Brain Science Foundation)
- 2004 Gold Medal, Tokyo Techno-Forum 21 Award (from Tokyo Techno Forum 21)
- 2004 Distinguished Scientific Award (from University of Catania School of Pharmacy)
- 2004 Medical Award of The Japan Medical Association (from The Japan Medical Association)
- 2006 Minister Award of Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology
- 2008 Inoue Prize for Science

PNS and SNS have a therapeutic use. For this research we made a spinal cord injury (SCI) model using mice, and nine days after the injury, in the subacute phase when the therapeutic effect is highest, we transplanted ES cell-derived neurospheres. Thereafter we measured the rate of recovery using a range of histological, cell biological, and behavioral methods. With PNS, mostly neurons arose, but when SNS were transplanted, a lot of glial cells appeared in addition to neurons. Furthermore, when SNS were transplanted, remyelination and induction of angiogenesis occurred in the damaged nervous system, indicating that the transplanted cells worked to assist the functional recovery of the organism. This was also reflected in recovery of hind limb function, and while PNS had no therapeutic effect, we found that SNS was effective.

On the other hand, humans and rodents are quite different in terms of neuroanatomy and function of the spinal cord. So with a view to future clinical trials, we conducted tests using non-human primate (common marmosets) SCI models. As with the mice, we made injury models of varying severity for

treatment. This resulted in clear therapeutic effects, and we also observed recovery of spontaneous movement. Through these tests, we are at the stage where we can prepare for clinical trials that meet the safety standards, but from an ethical and regulatory viewpoint, we cannot yet start clinical trials using fetal CNS-derived NSCs.

On these grounds, we changed our strategy using stem cells prepared from adult tissues, there is a possibility that we can use this method in clinical trials. We are now examining the possibility of treatment using marrow-derived stem cells and iPS cells. Up to now, we have conducted the neural differentiation of the first generation iPS cells selected by the expression of Fbx15 locus (Fbx15-iPS cells) and second generation iPS cells selected by the expression of nanog locus (Nanog-iPS cells). In the results so far, when SNS made from first generation iPS cells, were transplanted, brain tumors arose making them unsuitable for treatment purposes. However, with second generation iPS cells (Nanog-iPS cells), as with ES cells, differentiation into the three major cell lineages is possible, and we are currently investigating

whether the functional recovery is obtained by the transplantation of SNS derived from Nanog-iPS cells.

In future, it may be possible to make a cell pool for autologous transplantation using iPS cells. In that case, it will probably be a matter of testing safety and effectiveness with non-human primate models, and then applying it to humans.





多能性幹細胞由来の神経前駆細胞を用いた脊髄損傷の細胞治療

岡野 栄之

Hideyuki Okano / Japan

慶應義塾大学大学院医学研究科 委員長 / 慶應義塾大学医学部生理学教室教授・代表



再生医療に向けた神経発生機構の理解

神経学の礎を築いた偉大な科学者、カハールは、「ほ乳類の中枢神経系は、一度損傷したら回復しない」と述べました。しかし私は「本当にそうだろうか」、ということを幹細胞の技術を使って考えてきました。

中枢神経系の再生では、(1) 9 経軸索の再生、(2) 神経系細胞の補充、そして (3) 神経系の機能再生の 3 つが成立してはじめて、神経系が再生したと言えます。このためには、胚からの神経発生という複雑な現象を理解する必要があります。

神経幹細胞は、まず均質な状態で分裂を繰り返して増殖していき、そのあと神経幹細胞からオリゴデンドロサイト、アストロサイト、ニューロンという 3 つの異なった細胞系統(三大細胞系譜)に分化していきます。

こうした様々な神経細胞が生まれてくる過程は、時間的なスケジュールに沿っています。それでは、この過程はどのように制御されているのか、ということが問題になります。最近、この研究のために有効な ES 細胞からの神経幹細胞へ誘導する培養系が確立されました(Okada et al. Stem

Cells, 2008)。この手法では、細胞に与える増殖因子を工夫して、まず ES 細胞から胚葉体という細胞のかたまりを作り、これを神経細胞のかたまり(ニューロスフィア)へと変化させていきます。1 段階目のニューロスフィア(Primary Neurosphere, PNS)、さらに 2 段階目(Secundary Neurosphere, SNS)、3 段階目(Tertiary Neurosphere, TNS)へと継代し、細胞分化を誘導するのです。PNS では主として各種ニューロンが、SNS では三大細胞系譜のすべてができてきます。

この実験系を詳しく調べた結果から、私たちは培養系において神経幹細胞を分化させる遺伝子スイッチは、時間変化に沿った細胞の状態に応じて、適切なタイミングでオンになっていると考えました。

そこで、シャーレの上で ES 細胞から PNS、さらに SNS へと変化して神経細胞ができていく過程で、発現量が大きく変化している、つまり分化のスイッチになっている遺伝子を探したところ、まず転写抑制因子である COUP-TF が神経幹細胞の分化能の時系列的变化を誘導していくことがわかりました(Naka et al. Nature Neurosci, 2008)。この

COUP-TF があると、グリア細胞になりにくい PNS からグリア細胞(アストロサイト)ができてくること、さらに SNS では 50% くらいが、TNS では 100% がグリア細胞になることがわかりました。逆にこの遺伝子をノックダウンしてみると、グリア細胞がほとんど生まれなくなりました。この因子が多いときには初期にニューロンになり、減少してくるとグリア細胞が生まれるということです。

このように神経発生を制御する因子の組み合わせによって、将来的には狙った種類の神経細胞を作り出すことが可能になると期待されます。

神経再生医療の実現に向けた取り組み

神経細胞の生まれる仕組みを解明するいっぽうで、この PNS、SNS に治療効果はあるのかということが問題になります。私たちはこの研究のため、マウスの脊髄損傷モデルを作って、損傷後 9 日の、もっとも治療効果が高い亜急性期に ES 細胞由来のニューロスフィアを移植し、その後の回復の度合いを組織学的・細胞生物学的・生理学的な様々な手法で測定しました。

プロフィール Profile

学 歴	1983 慶應義塾大学医学部 M.D.	1988 慶應義塾大学医学部三四会 三四会賞
	1988 慶應義塾大学大学院医学研究科 Ph.D.	1995 加藤淑裕記念事業団 加藤淑裕賞
研 究 歴	1989 ジョーンズ・ホプキンス大学医学部生物化学教室 研究員 (アメリカ)	1998 慶應義塾大学医学部三四会 北里賞
	1992 東京大学医科学研究所 助手	2001 ブレインサイエンス振興財団 塚原伸晃賞
	1994 筑波大学基礎医学系分子神経生物学教授	2004 東京テクノフォーラム 21 ゴールドメダル賞
	1997 大阪大学医学部神経機能解剖学研究部 教授	2004 カタニア薬科大学 (イタリア) 卓越した科学賞
	2001 慶應義塾大学医学部生理学教室 教授	2004 日本医師会医学賞
	2007 慶應義塾大学大学院医学研究科 委員長	2006 文部科学大臣表彰 (科学技術賞)
		2008 井上学術賞

PNS では、主にニューロンだけが生まれましたが、SNS を移植した場合には、ニューロンだけではなくグリア細胞も多く生まれました。さらに SNS を移植した場合には、損傷神経の再髄鞘化や、血管新生の誘導などが起こり、移植した細胞が、生体のもつ回復機能を助けて働いているということがわかりました。このことは、後肢の機能回復にも反映され、PNS では治療効果はありませんでしたが、SNS では治療効果があることがわかりました。

しかし、ヒトと齧歯類はかなり違います。そこで将来の臨床試験に向けて、霊長類であるコモンマーモセットを使って、マウスと同様に重傷度の異なる損傷モデルを作って治療を促す実験をしました。すると、確かに治療効果が確認され、自発運動においても回復が見られました。これらの実験によって、安全基準を満たすかたちで臨床試験の準備ができる段階になっていますが、まだ倫理や規制の面で、臨床試験に入ることができない状況にあります。

そこで私たちは戦略を変え、成人組織から調整可能な、骨髄由来の幹細胞や iPS 細胞を使った治療可能性を検討しています。

これまでに、Fbx15 を使った第一世代の iPS 細胞、Nanog を使った第二世代の iPS 細胞を使って治療試験を行っています。これまでの結果では、第一世代の iPS 細胞から作った PNS、SNS では、ニューロンはできるのですがグリア細胞が作られない、移植すると脳腫瘍ができてしまうなど、治療目的には不十分でした。

しかし、第二世代の iPS 細胞では ES 細胞と同様に、三大細胞系譜に分化することが可能で、有意な機能回復の効果が確認されました。腫瘍形成も確認されていません。

将来的には、iPS 細胞を使って自家移植の細胞プールを作るということも可能になるかもしれません。そのときには、霊長類のモデルで安全性、有効性の試験を行った後、ヒトに適用することになるでしょう。





Retinal Cell Transplantation using stem cells.

Masayo Takahashi

JAPAN

Team Leader, Laboratory for Retinal Regeneration /
Center for Developmental Biology, RIKEN, Japan



Retinal diseases and regenerative medicine

I am researching regenerative medicine for retinas. Here, I will talk about iPS cells from the perspective of regenerative medicine, including the relationship with disease.

The retina is the site where light strikes after passing through the eyeball. Light passes across the retina and stimulates photoreceptors to transmit information through neurons to the brain. Current medical techniques are already capable of repairing the opacity of cornea or lens, but not the damaged retina. The most of the cases of vision loss in developed countries are caused by retinal diseases.

The two main target retinal diseases are retinitis pigmentosa, where the photoreceptor neurons die in the periphery of the visual field, and age-related macular degeneration, where the retinal pigment epithelial (RPE) cells needed to maintain photoreceptor cells degenerates or dies out in the central portion of the visual field. Therefore, patients with retinitis pigmentosa experience a narrowing of the visual field, while patients with age-related macular degeneration experience

a reduction in visual acuity only in the central portion as the cells die out in the center. Both conditions may result in blindness.

The term blindness is often misunderstood. The medical definition of blindness is no light perception, but blindness is more commonly (legally) defined as corrected visual acuity of 6/60 or less (the WHO definition is corrected visual acuity of 6/120 or less or a narrowing of the visual field to 10 degrees or less). Although we talk about blindness, it is extremely rare for an individual to have absolutely no vision light perception and the majority of individuals with vision loss are actually regarded as "blind" by society in general.

Of course, being "blind" is a major problem for the individuals suffering from this condition. I am working to generate photoreceptor cells and RPE cells from embryonic stem cells (ES cells) and to link these developments to therapeutic applications. Photoreceptor cells, which are the therapeutic target in retinitis pigmentosa, are part of the nervous system and so immune rejection is not likely to occur. Treatment with allografts using ES cells may therefore be possible. However,

as well as the photoreceptor cells transplantation, we also need to repair the precise neural structures in the retina. Significant technological advances are therefore still necessary.

In contrast, treatment for the RPE cells only involves RPE, but unlike photoreceptor cells there is a risk of immune rejection. Therefore, we may not be able to use this technique clinically until the advent of cloned ES cells or ES cell banks. The development of iPS cells is a leap forward in the treatment of age-related macular degeneration caused by RPE degeneration.

Developing techniques for regenerative medicine

With severe age-related macular degeneration, abnormal blood vessel growth (neovascularization) occurs such that RPE cells are displaced and dies. If the condition progresses until the photoreceptor cells that work in tandem with RPE cells also die, the patient's eyesight cannot be restored. New treatment methods have recently been developed, including highly effective therapeutic antibodies and a method that involves laser irradiation while injecting a photosensitive substance (photodynamic therapy; PDT),



Profile

Education

- 1986 M.D. Faculty of Medicine, Kyoto University, Japan
- 1992 Ph.D. Graduate School of Medicine, Kyoto University, Japan

Research Appointment

- 1992 Graduate School of Medicine, Kyoto University
- 1992-1994 Assistant professor of Ophthalmology, Kyoto University Hospital
- 1995-1995 Post-doc in Department of Neuroscience, UCSD (Prof. Gage)
- 1995-1996 Post-doc in Laboratory of Genetics, the Salk Institute, (Prof. Gage)
- 1997-2001 Assistant professor of Ophthalmology, Kyoto University Hospital
- 2001-2006 Associate professor, Team Leader of retinal regeneration project, Translational Research Center, Kyoto University Hospital
- 2006-present Team Leader, Laboratory for Retinal Regeneration, Center for Developmental Biology, RIKEN

Awards and Honors (Selected)

- 2007 Pfizer Ophthalmics Award Japan

but these methods only eliminate the neovascularization and do not treat the damaged RPE cells. There is also a trial of autograft method where healthy portions of the RPE are transplanted to the diseased site, but around 40% of patients undergoing this procedure experience serious side effects so an alternative treatment method still needs to be developed.

Regenerative medicine could play a role here. The diseased site in age-related macular degeneration is an area around 2mm in diameter in the central part of the retina, so the ideal treatment method would be to transplant RPE cells from an external source into this small region.

Through our repeated research efforts, 4 years ago we, with collaboration with Dr. Sasai's group, managed to generate a sheet of RPE cells in a dish from monkey ES cells. In terms of quality the sheet was no different to RPE cells *in vivo*, while in terms of quantity we developed enough of the cell sheet for its therapeutic use. We transplanted this RPE derived from monkey ES cell into rats with RPE disorders and observed a marked therapeutic effect. It has already confirmed that iPS cells, like ES cells, can generate RPE cells. Moving forward, we will continue our research using human

iPS cells for therapeutic purposes.

Numerous problems remain before we can use iPS cells for clinical applications. Undoubtedly, iPS cells are a fantastic development of great interest to scientists. However, in terms of cell transplatation iPS cells do not provide patients with any advantages over ES cells, beyond the fact that immunosuppressant drugs are not necessary and that another individual does not have to be sacrificed. The use of iPS cells does not mean that the patient's eyesight will improve more or that techniques for regenerative medicine will be developed earlier. If treatment cannot be achieved with ES cells, it cannot be achieved with iPS cells either.

As already discussed, iPS cells will enable the development of effective treatment methods for specific diseases such as age-related macular degeneration and will play a major role in elucidating the cause of diseases. Moreover, iPS cells will probably become useful tools for investigating which drugs are effective in which individuals.

That said, I would like patients to be treated in outpatient clinics using treatment strategies possible today without raising excessive expectations for regenerative medicine. For example, research

on photoreceptor regeneration is currently at the stage where the goal is for patients to be able to perceive light in 10 years' time. Today, the most effective action for retinitis pigmentosa is to use residual function maximally through low vision care. If we are blinded by our expectations for regenerative medicine, it will only lead to patients and healthcare professionals abandoning such rehabilitative practices.

We are making every effort to develop methods using iPS cells to make regenerative medicine a reality. As well as encouraging these efforts, I would like patients and healthcare professionals alike to identify what current methods really do work.





幹細胞を用いた網膜細胞移植治療

高橋 政代

Masayo Takahashi / Japan

理化学研究所発生・再生科学総合研究センター /
網膜再生医療研究チーム チームリーダー



網膜疾患と再生医療

私は、網膜の再生医療に取り組んでいます。今日は、「再生医療から見た iPS 細胞」ということについて、疾患との関わりを含めてお話しします。

網膜は眼球の光が入ってくところ。光は網膜を横切り、視細胞が光の刺激を受けて情報を伝達し、2 番目、3 番目の網膜神経細胞を介して脳まで伝わっていきます。角膜や水晶体の混濁による視力低下は、現在の医療技術で回復できるようになっています。ところが網膜はまだうまく回復させることができず、先進国の失明原因のほとんどは網膜疾患です。

網膜再生の対象となる網膜疾患の代表的な二つとして、神経細胞である視細胞が視野の周縁部で死んでしまう「網膜色素変性」と、視細胞を維持するのに必要な網膜色素上皮細胞 (RPE) が視野の中心部で障害され、2 時的に視細胞が変性していく「加齢黄斑変性」があります。このため、網膜色素変性の患者さんは視界が狭くなり、逆に中心部から細胞が無くなる加齢黄斑変性の患者さんは中心部分の視力だ

けが低下しますが、両者とも失明の大きな原因です。

ただ、この「失明」という表現は誤解されています。医学的な意味での失明は、「光を感じない」ということですが、社会的に言われている失明は、矯正視力が 0.1 以下 (WHO の定義では矯正視力 0.05 以下あるいは 10 度以下の視野狭窄) になることです。実は、失明と言っても全く見えなくなるケースはまれで、実際には「社会的な意味で」失明している人が大半です。

もちろん、まったく見えないわけではないといっても実際に病に苦しむ患者さんにとっては大きな問題です。そこで、私は ES 細胞から視細胞や RPE を作り出し、治療につなげることに取り組んできました。

網膜色素変性で治療対象となる視細胞は、免疫拒絶反応が起こりにくい神経系に属しています。したがって ES 細胞を用いた他家移植で治療可能だと考えられます。しかし視細胞を移植するだけでなく、次の細胞と繋げて精密な神経回路も修復する必要があり、まだまだ技術的な発展が必要です。

いっぽう、RPE に対する治療は神経回路に組み込まれる必要がな

く、移植細胞が生着するだけで解決できる問題ですが、視細胞とは逆に免疫拒絶反応があります。したがって、クローン ES 細胞や ES 細胞バンクができるまでは、臨床応用はできないだろうと思っていました。そこに iPS 細胞が登場し、RPE が原因になる加齢黄斑変性などの疾患を治療できる可能性が、にわかに高まっています。

再生医療の実現に向けて

重篤な加齢黄斑変性では、網膜の裏側に新しく血管が生まれて網膜が浮き上がってしまいます。視細胞は正常な RPE と接していないと死んでしまうので、新生血管で RPE が悪くなったり網膜が浮き上がって 2 次的に視細胞まで死んでしまうと、もう視力が戻りません。最近では、光感受性物質を注射しながらレーザーをあてる治療法や、良く効く抗体薬も出てきていますが、これらは新生血管を除去する治療で、痛んだ RPE を治療するものではありません。欧米では RPE の健康な部分を患部に移植する自家移植法も試されていますが、この治療を受けた患者さんのうち 40% くらいに重篤な合

プロフィール Profile

学歴
1986 京都大学医学部 M.D.
1992 京都大学大学院医学研究科 Ph.D.

研究歴
1992 京都大学大学院医学研究科
1992-1994 京都大学病院眼科 助手
1995-1995 カリフォルニア大学サンディエゴ校 (UCSD)
神経科学科 (ゲイジ教授) 研究員 (アメリカ)
1995-1996 ソーク研究所遺伝学研究室 (ゲイジ教授) 研究員 (アメリカ)
1997-2001 京都大学病院眼科 助手
2001-2006 京都大学病院探索医療センター 助教授、網膜再生プロジェクトチームリーダー
2006-現在 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター
網膜再生医療研究チーム チームリーダー

受賞等 (抜粋)
2007 Pfizer Ophthalmics
Award Japan

併症が起こる危険な手法であり、代替治療法の開発が待たれています。

ここで、再生医療が役に立ちます。加齢黄斑変性の患部は網膜の中心、直径 2mm くらいの部分ですから、この小さな領域に外部から RPE を移植できれば、理想的な治療法になるはずですよ。

私たちは理化学研究所の笹井先生と研究を重ねてきて、4 年前にサルの ES 細胞からシャーレのうえで RPE のシートを作り出すことに成功しました。これらは質的にも生体のものと変わりなく、また量的にも治療に十分な細胞シートが得られるようになっています。このサル ES 細胞由来の RPE を RPE に障害があるラットに移植してみたところ、顕著な治療効果があったのです。すでに、iPS 細胞でも ES 細胞と同様に、RPE を作れることは確認しています。このあとは、ヒト iPS 細胞を使って治療を目指した研究を行っていく予定です。

ところが、iPS 細胞の臨床応用までには、まだ多くの問題があります。iPS 細胞は素晴らしく、科学者にとって興味深いものです。しかし、細胞移植治療において iPS 細胞を ES 細胞と比較した場合の、患者さんに

とってのメリットは、免疫抑制剤が不要になることと、他人の犠牲を必要としないこと以上のものではありません。iPS 細胞を使うことで、より視力が良くなるわけではありませんし、科学的には再生医療の実現までの道のりが短くなるわけでもありません。ES 細胞でできないことは、iPS 細胞でもできないのです。

もちろん iPS 細胞は、これまでお話ししたように、加齢黄斑変性など特定の病気に対する有効な治療法を生み出しますし、疾患の原因解明には非常に大きく役立ちます。さらに、どの薬がどの人に効くか、ということ調べるためにも有効なツールになっていくでしょう。

ただ、私は外来診療をしていて、患者さんには再生医療に過度な期待を持たず、「今できる対策」をしていただきたいと感じています。たとえば視細胞に対する再生医療は、10 年後に「光が見えるようになる」ことを目標に研究しているところです。今現在、網膜色素変性に対してもっとも有効な対策は、リハビリ訓練によって残っている機能を最大限活用することなのです。闇雲に再生医療を期待してしまうと、こうしたリハビリ訓練を放棄してしまうことに

つながりかねません。

iPS 細胞を使った再生医療の実現に向けて私たちは努力を重ねていきます。患者の皆さんにも、私たちが叱咤激励すると同時に、現在の自分にとって何が本当に有効なのかを、見極めていただきたいと思います。





Endoderm and pancreas developmental biology: key to future stem cell-based cell therapy in diabetes

H e n r i k S e m b

Sweden

Professor of Functional Genetics
Director, Lund Stem Cell Center, Lund University,



Differentiation of β cells from stem cells

Within the pancreas are groups of cells called the islets of Langerhans, most of which are β cells that detect the amount of glucose in the blood and release the correct amount of insulin in response. Type I diabetes mellitus is an autoimmune disease in which islet β cells are destroyed by the immune system. Transplantation therapy is now used to restore β cells in patients with type I diabetes, through islet cell transplantation and pancreas transplantation, but posttransplant rejection and a chronic lack of donors pose major hurdles. There are also problems with maintaining β cell function. Undoubtedly the most practical way to overcome these difficulties would be to differentiate pluripotent stem cells into β cells *in vitro*, encourage the cells to proliferate, and then use them in transplantation therapy.

Much research is now being conducted in the areas of pancreatic morphology, regeneration, and differentiation, using mouse models of diabetes to reach a basic understanding of the causes of diabetes, and to

provide regenerative therapy. In order to generate new β cells from ES cells and iPS cells, it is necessary to proceed through multi-step differentiation: endoderm to pancreas progenitor cells to endocrine progenitor cells to β cells. There are many reports on the transcription factors related to each step, but little is currently known about the regulation of transcription factor expression, and our lack of knowledge is particularly pronounced in the area regarding the differentiation of pancreas progenitor cells into β cells.

Thus, in order to reconstruct β cells, it is necessary to reproduce the signals that mediate 3D cellular interactions. We are currently focusing on pancreatic tubulogenesis, because the endocrine progenitors differentiate within tubules. Epithelial cell polarization is a deciding factor in tubule formation, and members of the Rho GTPase family play crucial roles in inducing and maintaining this polarization. We plan to further investigate the role of Rho GTPases in tubulogenesis and β cell differentiation.

Applications of iPS cells in studies of diabetes

Our lab is conducting two research projects using ES cells. One involves working with industry to provide clinical-grade and clinical-scale up cell systems, and the other focuses on elucidating the mechanism of β cell differentiation. In order to induce ES cells to become β cells, further understanding of the underlying mechanisms of β cell differentiation is required. Such knowledge can then be translated to the ES/iPS cell systems.

For example, retinoic acid (RA) and FGF4 reciprocally instruct anterior-posterior patterning of the primitive gut endoderm. In addition, RA is required for formation of multipotent posterior foregut pancreatic endoderm. We plan to study the role of FGF4 and RA in directing differentiation of hES/iPS cells into pancreatic β cell progenitors.

Applications of iPS cells are apparent in studies of both the etiology and treatment of diabetes. Derivation of iPS cells from patients carrying

ent Stem [iPS] Cell Research – Frontier and Future –



Profile

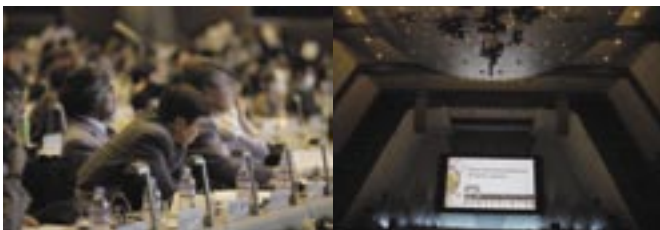
Education

- 1988 Ph.D. (Dr. Med. Sci.) , Umeå University, Sweden
- 1989-1990 Post-Doctoral Fellow, EMBO fellowship, Department of Biochemistry

Research Appointment

- 1982-1988 Predoctoral student, Department of Physiological and Medical Chemistry, Umeå University, Sweden
- 1991-1997 Assistant Professor, Department of Microbiology, Umeå University, Sweden
- 1997-1998 Associate Professor, Department of Microbiology, Umeå University, Sweden
- 1998-2003 Associate Professor in developmental biology, Institute of Medical Biochemistry, Göteborg University, Sweden
- 2003-2004 Professor in developmental biology, Institute of Medical Biochemistry, Göteborg, Sweden
- 2004-present Professor in functional genetics, Stem Cell Center, Lund University, Sweden
- 2006-2008 Assistant Director of the Stem Cell Center, Lund University, Sweden
- 2008- Director of the Stem Cell Center, Lund University, Sweden

genetic forms of diabetes will allow mechanistic studies of β cell destruction and dysfunction. Moreover, correction of disease-causing mutations may provide new avenues for the use of iPS cells in gene therapy of diabetic patients.





糖尿病細胞治療の鍵 — 内胚葉と膵臓の発生生物学

ヘンリック・セム

Henrik Semb / Sweden

スウェーデンルント大学機能遺伝学教授、ルント幹細胞センター所長、
幹細胞・膵臓発生生物学 チーフ



幹細胞から β 細胞への分化

膵臓にはランゲルハンス島とよぶ細胞集団が点在しており、その大半を構成するのが β 細胞です。 β 細胞は血中のブドウ糖量を検知し、量に応じてインスリンを分泌する機能をもっています。 β 細胞が免疫系によって破壊される自己免疫疾患がI型糖尿病です。I型糖尿病患者に対しては、島細胞や膵臓の移植によって β 細胞を補う移植治療が行われていますが、移植後の拒絶反応と慢性的なドナー不足が移植治療のハードルとなっており、 β 細胞の機能の温存にもなお問題があります。これらを克服する最も現実的な方法が、ヒト多能性幹細胞から*in vitro*で β 細胞を分化増殖させ、これを移植する治療法であることは疑う余地がありません。

糖尿病の原因についての本質的な理解や再生医療のために、膵臓の形態形成や発生・分化について、マウスをモデルにした研究がさかんに行われています。ES細胞やiPS細胞から β 細胞を再生させるには、内胚葉から膵前駆細胞、内分泌前駆細胞、 β 細胞

と複数の段階があり、各段階に関与する転写因子について多数の報告がなされています。しかし、転写因子の発現制御についての知見はまだ少なく、特に膵前駆細胞から β 細胞への分化の全体像は未知の部分が多いのが現状です。

従って、 β 細胞の再構築のためには細胞間の3次元の相互作用を仲介するシグナルの再現が重要です。私たちは、膵臓における導管の形成過程に関心をもっています。内分泌前駆細胞は導管内で分化するからです。導管形成の決め手は上皮細胞の極性であり、極性の誘導と維持に重要な役割を果たすのがRho GTPaseファミリーのメンバーです。今後、導管形成と β 細胞の分化に対するRho GTPase群の役割をさらに検討するつもりです。

糖尿病研究におけるiPS細胞の利用

私たちの研究室にはES細胞を用いたプロジェクトが2つあります。1つは企業と共同で臨床グレードのスケールアップされた細胞系を樹立するプロジェクト、もう1つは β 細胞の分化のしくみを解明するプロジェクトです。ES細胞から β 細胞を誘導するには、 β 細胞分化に潜むメカニズムのさらなる解明が必要です。そのような知識はES/iPS細胞系の理解にも役立つでしょう。

例えば、レチノイン酸(RA)とFGF4は、原腸内胚葉の前後軸のパターニングを相互に指示しています。さらに、RAは多分化能をもった後部前腸膵臓内胚葉の形成に必要です。私たちも、ヒトES/iPS細胞の膵 β 前駆細胞への分化の指示におけるFGF4とRAの役割を調べる予定です。iPS細胞の応用の可能性は、糖尿病の病因と治療法の研究によく現れています。糖尿病の遺伝子型をもつ患者さんからiPS細胞を誘導すれば、 β 細胞の破壊や機能不全のメカニズムを研究すること

プロフィール Profile

学 歴	1988	ウーメオ大学 Ph.D. (Dr. Med. Sci.) (スウェーデン)
	1989-1990	カリフォルニア大学サンフランシスコ校 (UCSF)
		生化学・生物物理学 博士研究員、エンボフェロー (アメリカ・カリフォルニア州)
研 究 歴	1982-1988	ウーメオ大学生理学・医化学科 博士号取得前研究者 (スウェーデン)
	1991-1997	ウーメオ大学微生物学科 助手 (スウェーデン)
	1997-1998	ウーメオ大学微生物学科 准教授 (スウェーデン)
	1998-2003	イエーテボリ大学医学生化学研究所 発生生物学准教授 (スウェーデン)
	2003-2004	イエーテボリ大学医学生化学研究所 発生生物学教授 (スウェーデン)
	2004・現在	ルント大学幹細胞センター 機能遺伝学教授 (スウェーデン)
	2006-2008	ルント大学幹細胞センター 副所長 (スウェーデン)
	2008・	ルント大学幹細胞センター 所長 (スウェーデン)

ができるでしょう。さらに、病気を引き起こす遺伝子変異を修正すれば、糖尿病患者の遺伝子治療における iPS 細胞の利用に新たな道が開かれるでしょう。



International Symposium on Induced Pluripot



1 日目まとめ / Summary of Day 1

ドイツ マックス・プランク研究所分子医薬研究所 所長

Director of the Max Planck Institute for Molecular Biomedicine

ハンス・シェラー Hans R. Schöler

Today was a very exciting day. What I would particularly like to stress is that the preparation and management of this symposium was superb. I am very grateful to everybody involved. Now I would like to mention the content that I found especially interesting.

Professor Shinya Yamanaka talked about his own pioneering work in the context of the history of stem cell research. After Sir Martin Evans established mouse ES cells in 1981, it was 17 years before Professor James Thomson (the University of Wisconsin, US) established a human cell line. However, it only took a year to make the transition from mice to humans with iPS cells. Professor Yamanaka's statement that the 17 years of ES cell research from mice to humans was the platform for iPS cell research is very important.

There were several superb examples of research demonstrating the possibility of regenerative medicine using human ES cells. These include team-leader Masayo Takahashi's research into regeneration of retinal pigment epithelium cells and Professor Henrik Semb's research into differentiation resulting in the β cells that produce insulin. What particularly impressed me was how Prof. Hideyuki Okano regenerated the central nervous system in

primates, demonstrating that it is possible to treat spinal cord damage. Looking at these findings made me think that in future, human ES cells can be used for regenerative medicine.

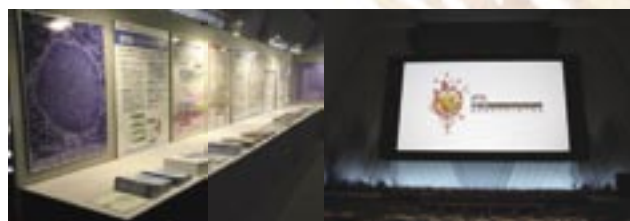
Human iPS cells offer the possibility of remarkable capabilities similar to human ES cells. However, ES cells are natural products from embryos whereas iPS cells are artificially produced in culture dishes. So we must have a proper understanding of ES cells and develop iPS cell technologies while constantly comparing the two.

Professor Rudolf Jaenisch showed what can be achieved with iPS cells now. Using Parkinson's disease and sickle cell anemia as examples, he explained how understanding the reprogramming mechanism of differentiation will lead to cures.

There are several problems with iPS cells, but the technical issues can probably be solved in the near future. Associate Professor Sheng Ding presented methods of gene transfer using chemicals instead of retroviruses. On the other hand, as Professor Peter Andrews said, there is no end to the issues in understanding the capabilities of iPS cells, including the differentiation mechanism and the stability of epigenetic functions. I believe that we will improve our understanding by focusing like

Professor Ying Jin on one gene like that known as Oct4, and by using 3-dimensional cultures like Prof. Joseph Itskovitz-Eldor.

I am sure that we will see many more fascinating results in future. I think it may be a while before they actually start benefiting patients, but I hope that we get to that point as soon as possible.



非常にエキサイティングな1日でした。まず強調したいのは、このシンポジウムの準備と進行がとてもすばらしかったことです。関係者のみなさんに感謝します。ではさっそく、興味深かった内容をピックアップしていきます。

山中伸弥教授は、自身の先駆的な仕事を、幹細胞研究の歴史に沿って話しました。ES細胞は、1981年にマーティン・エヴァンス卿がマウスで樹立してから、ジェームズ・トムソン教授（アメリカ・ウィスコンシン大学）がヒトで樹立するまで17年かかりました。しかし、iPS細胞ではマウスからヒトまで1年しか経っていません。山中教授の「ES細胞研究におけるマウスからヒトへの17年間が、iPS細胞研究のプラットフォームになった」という発言は、非常に重要だと思います。

ヒトES細胞による再生医療の可能性を示す、すばらしい研究例がいくつかありました。高橋政代チームリーダーの網膜色素上皮細胞の再生、ヘンリック・セム教授のインスリンを産生する β 細胞への分化などです。とくに感銘を受けたのは、霊長類の中枢神経を回復させ、脊髄損傷の治療ができることを示した岡野栄之教授です。これらの成果をみて、私は、ヒトES細胞は将来きっと再生医療に使えるようになると思います。

た。

ヒトiPS細胞は、ヒトES細胞と同じくらい優れた能力をもつ可能性があります。ただ、ES細胞は胚をもとにした自然の産物ですが、iPS細胞は培養皿で作った人工物です。だから、私たちはES細胞を十分理解し、たえず比較しながらiPS細胞の技術を開発していく必要があります。

ルドルフ・イエーニツシュ教授は、iPS細胞によっていま何ができるかを示しました。パーキンソン病や鎌形赤血球貧血症を例に、分化の再プログラミングのメカニズムを解明することが治療につながると述べました。

iPS細胞にはいくつか課題がありますが、技術的なものは近い将来解決できるでしょう。遺伝子導入について、シェン・デイン准教授がレトロウイルスの代わりに化学物質を使う方法を提示しました。一方、iPS細胞がもつ能力の理解については、ピーター・アンドリュース教授が話したように、分化のメカニズムや、エピジェネティックな機能の安定性など課題は山積みです。イン・ジン教授のようにOct4という1つの遺伝子に注目したり、ヨーゼフ・イツコヴィッツ教授の3次元培養を用いたりすることで、理解が深まると思います。

今後、興味深い結果がどんどん出てくることでしょう。実際に患者に使えるようになるのはまだ先の話だと

と思いますが、一刻も早い実現を願っています。





Transcriptional profiling of mouse ES cells in comparison with pluripotential cell populations of the early embryo

Sir Martin Evans

UK (Wales)

Director of the School of Biosciences and Professor of Mammalian Genetics Cardiff University /
2007 Nobel Prize Laureates in Physiology or Medicine



The history of pluripotent stem cell research

Life arises from a single fertilized egg, and through many small changes, it differentiates into the cells of a range of tissues. If we go backwards in this process of differentiation, we should end up at a cell with pluripotency from which all cells originate.

When I started my research in this field, I was preceded by Leroy Stevens and Barry Pierce. In a mouse line, Stevens discovered special cells called embryonic carcinoma cells (EC cells) that cause teratomas in the testis which include a range of tissues such as skin, bone and nerves. Pierce noticed that the cells that formed this 'malignancy' were not themselves malignant, and he discovered that normally differentiated cells arose from the EC cells. These EC cells were endowed with pluripotency and they had the characteristic of unlimited growth.

I took over the mice from Stevens, and tried implanting these EC cells into other early mouse embryos. The result was a 'chimera mouse' that had both

the EC cell-derived tissue and the embryonic tissue.

Then when I grew EC cells in a culture dish, an 'embryoid body' resulted, an agglomeration of cells that reproduced the state of the teratoma. When I observed this structure, I found that the various differentiated cells did not arise randomly, and they went through a normal embryonic development process. Believing that similar cells no doubt existed in normal organisms, I worked with Matt Kaufman to devise various culture conditions, and we succeeded in propagating cells taken from the inner cell mass (ICM) of the embryo (blastocyst) 5 days after fertilization.

These cells, similarly to EC cells, formed teratomas when injected into mice. Furthermore, they differentiated into various cells even in the culture dish. This is the way that naturally occurring embryonic stem cell (ES cells) with pluripotency were discovered. Our recent research suggests that ES cells reflect the natural state of ICM cells.

A chimera mouse can also be made from ES cells. If the genes of the ES cells are altered first, it is possible to study the effects on the mouse of the altered genes.

This method was established by Oliver Smithies and Mario Capecchi. By these means, it has become possible to make a range of mouse models for human disease, and by providing the appropriate stimulus in the culture dish, we can now differentiate ES cells for use in experiments.

The significance of iPS cells

In the past it was thought to be impossible for cells that have differentiated from early embryos to regain their pluripotency (to be reprogrammed). However, Professor Yamanaka worked out a method of reprogramming differentiation using the culture conditions for pluripotent cells and detection methods fostered through the past ES cell research of many scientists. The result was iPS cells.

Up to now, it was known that by using the capabilities of the early embryo, it was possible to reprogram cells that have undergone differentiation. However, Professor Yamanaka produced iPS cells using only transcription factors. These transcription factors were the trigger for extremely complex

ent Stem [iPS] Cell Research – Frontier and Future –

Profile

Education

- 1963 B.A., Christ College, University of Cambridge
- 1969 Ph.D., University College, London.

Research Appointment

- 1963 Research Assistant, University College, London
- 1966 Assistant Lecturer, University College, London
- 1978 University Lecturer, Department of Genetics, University of Cambridge
- 1991 Leader in Mammalian Genetics, University of Cambridge
- 1993 Senior Research Associate, Peterhouse College, Cambridge
- 1994 Professor of Mammalian Genetics, University of Cambridge
- 1999 Professor of Mammalian Genetics at Cardiff University and Head and Director of Cardiff School of Biosciences
- 2004 Vice Provost of Cardiff University School of Medicine, Biology, Health and Life Sciences

Awards and Honors (Selected)

- 1989 British Technology Group Academic Enterprise Award
- 1990 Member of EMBO
- 1993 Fellow of Royal Society
- 1993 Walter Cottman Fellowship
- 1993 William Bate Hardy Prize
- 1998 Founder Fellow of The Academy of Medical Sciences
- 1999 March of Dimes Prize in Developmental Biology
- 2001 Albert Lasker Award for Basic Medical Research
- 2004 Knight Bachelor for Services to Medical Science, New Year Honours
- 2007 Nobel Prize in Physiology or Medicine

reprogramming processes. And so iPS cells brought revolutionary change to the methods of obtaining pluripotent stem cells.

iPS cells offer a range of possibilities. For example, we have not so far succeeded in producing rat ES cells which have great significance in disease research. However, we will be able to make pluripotent cells in these animals using the iPS cell approach.

iPS cells also offer tremendous possibilities in the treatment of disease itself. Research into cell therapy using pluripotent cells is proceeding steadily, but how to obtain the cells for treating individual patients has been a fundamental question. iPS cells present a fresh possible answer to this problem.

But problems still remain. There is the issue of time and cost in using patients' own cells to make iPS cells for treatments. For example, starting to make the cells to treat a patient with myocardial infarction once the infarction has occurred will be too late, while making iPS cells for each individual patient will cost too much.

However, iPS cells also present the direction for an answer to this problem. It is not

necessary to reprogram them to the pluripotent cell stage, and if they can be returned to the progenitor cell stage for making the required tissue, they can be applied in treatment. This is one means of overcoming the problems of time and cost.

Another is keeping a stock of cells compatible with the patient's immunological type in a 'cell bank'. If iPS cells are used in the cell banks that have been considered for ES cells, they can be established more efficiently.

In order to realize regenerative medicine using these approaches, much basic biological research is still required. In the process of differentiating cells from embryos, the environment surrounding the cell – its niche – controls the fate of the cell. We must further improve our approach in creating these niches artificially to produce the cells that we aim for. Medical applications await us at the end of this steady research.





マウス ES 細胞の初期胚内細胞群との転写プロファイル比較

マーティン・エヴァンス 卿

Sir Martin Evans / UK (Wales)

カーディフ大学 生命科学部学部長 / 哺乳類遺伝学教授

2007 年 ノーベル生理学・医学賞受賞者



多能性幹細胞研究の歴史

生命は単一の受精卵から発生し、小さな変化を積み重ねて、さまざまな組織の細胞に分化していきます。この分化の流れを遡っていけば、全ての細胞の由来となっている「多能性を持った細胞」に行き着くはずですが、

私がこの分野の研究を始めたとき、リロイ・スティーブンスとバリー・ピアスの研究が先行していました。まずスティーブンスは、睾丸のなかに皮膚、骨や神経といった様々な組織を含む「奇形種」を発症するマウス系統から、この病気の原因になっている特殊な細胞「胚性がん細胞 (EC 細胞)」を発見しました。もう一人のピアスは、こうした「悪性腫瘍」を構成している細胞そのものは、悪性ではないことに注目し、EC 細胞から「正常に分化した細胞」が生じていることを見いだしました。この EC 細胞は多能性を持っており、しかも無限に増殖できる特性を持っていたのです。

私はスティーブンスからマウスを譲り受け、この EC 細胞を別のマウスの初期胚に入れてみました。すると、EC 細胞由来の組織と、胚由来の組織を併せ持つ「キメラマウス」を作ることができたのです。

さらに私が、培養皿のなかで EC 細胞を増殖させてみたところ、奇形種の状態を再現するような細胞のかたまり「胚様体」が出来たのです。この構造を観察したところ、分化した各種の細胞はランダムに生まれているのではなく、正常な胚発生のプロセスを経ていることがわかりました。正常な生体内にも同種の細胞があるに違いはない、と考えた私は、マット・カウフマンの協力のもと、培養条件を様々な工夫して、受精後 5 日目の胚 (胚盤胞) の内部細胞塊 (ICM) から取り出した細胞を、培養皿の上で増やすことに成功したのです。

この細胞は、EC 細胞と同様に、マウスに注射した場合に奇形種を形成しました。さらに培養皿のうえでも様々な細胞に分化していったのです。多能性を持つ自然由来の細胞「胚性幹細胞 (ES 細胞)」は、こうして見いだされたのです。最近の私たちの研究からは、ES 細胞は ICM の細胞が持っている自然の状態を反映していると考えられます。

ES 細胞からもキメラマウスを作ることができます。このとき、予め ES 細胞の遺伝子を改変しておけば、その遺伝子の変化がマウスに及ぼす影響を調べることができます。この方法

は、オリバー・スミーズとマリオ・カベッキによって確立されました。こうして、さまざまなヒト疾患のマウスモデルを作ることができるようになり、また培養皿の上で適切な刺激を与えることで、ES 細胞を分化させて実験に用いることができるようになったのです。

iPS 細胞の意義

かつては、「初期胚から分化した細胞が元の多能性を取り戻す (初期化する) ことはない」と考えられていました。しかし山中教授は、これまで多くの科学者が ES 細胞の研究で培ってきた多能性細胞の培養条件や検出方法を生かし、分化を初期化する方法を編み出しました。こうして生まれたのが iPS 細胞です。

これまでに、初期胚の能力を利用すれば、分化が進んだ細胞を初期化できるということはわかっていました。しかし山中教授は転写因子だけを使って iPS 細胞を作製しました。これらの転写因子は、非常に複雑な初期化プロセスの引き金だったので、iPS 細胞は、多能性幹細胞の獲得方法を革命的に変えたのです。

iPS 細胞は、さまざまな可能性を

プロフィール Profile

学 歴	1963	ケンブリッジ大学クライストカレッジ B.A.	1989	英国技術グループ (BTG) アカデミックエンタープライズ賞	
	1969	ロンドン大学ユニバーシティカレッジ Ph.D.	1990	EMBO メンバー	
研 究 歴	1963	ロンドン大学ユニバーシティカレッジ 研究助手	1993	英国王立協会会員	
	1966	ロンドン大学ユニバーシティカレッジ アシスタント講師	1993	ウォルター・コットマン フェローシップ	
	1978	ケンブリッジ大学 遺伝学科 大学講師	1993	ウィリアム・ベイト・ハーディ賞	
	1991	ケンブリッジ大学 哺乳類遺伝学リーダー	1998	英国医科学アカデミー創立会員	
	1993	ケンブリッジ大学ピーターハウス・カレッジ 上級研究員	1999	発生生物学マーチ・オブ・ダイヤモンド賞	
	1994	ケンブリッジ大学 哺乳類遺伝学教授	2001	アルバート・ラスカー基礎医学賞	
	1999	カーディフ大学 哺乳類遺伝学教授およびカーディフ大学 生命科学部学部長	2004	医科学への貢献に対しナイトの爵位、 ニューイヤーオナーズ	
	2004	カーディフ大学医学・生物学・健康・生命科学学校副学長	受 賞 等 (抜 粋)	2007	ノーベル生理学・医学賞受賞

秘めています。たとえば疾患研究のうえで大きな意義のある「ラットのES細胞」の作製は、いまだに成功していません。こうした動物でも、iPS細胞の手法を使って多能性細胞を作り出せるでしょう。

疾患の治療そのものに対しても、iPS細胞は大きな可能性をもたらしました。多能性細胞を使った細胞治療の研究は着々と進んできましたが、個々の患者さんを治療するための細胞を、どのようにして得るかという根本的な問題がありました。iPS細胞は、この問題に対して鮮やかな回答例を与えたのです。

しかし、まだ問題が残っています。患者さん自身の細胞を使ってiPS細胞を作って治療する場合には、時間とコストの問題があります。たとえば心筋梗塞を起こした患者さんを治療するための細胞を、心筋梗塞を起こしてから作り始めたのでは間に合いませんし、患者さん個々にiPS細胞を作っていたのではコストがかかりすぎます。

ただ、こうした問題に対する回答の方向性も、iPS細胞が与えてくれます。なにも多能性細胞の段階まで初期化をおこなう必要はなく、必要な組織を作る前駆細胞の段階まで戻

すことができれば、治療に応用可能でしょう。これは時間とコストの問題に対する一つの対策になります。

もうひとつは患者さんの免疫型に適合する細胞を予め備蓄しておく「細胞バンク」です。ES細胞で検討されてきた細胞バンクを、iPS細胞を利用すれば、より効率的に構築することが可能です。

こうした手法を用いて再生医療を実現するためには、基礎的な生物学の研究がまだまだ必要です。胚から細胞が分化していく過程では、細胞をとりまく環境 — 「ニッチ」が、細胞の運命を制御しています。私たちは、人工的にニッチを作り上げ、目的の細胞を作り出す手法を、もっと深めていかねばなりません。そうした地道な研究の先に、医学的な応用が待っているのです。

International Symposium on Induced Pluripot



イントロダクトリー・トーク / Introductory Talk

内閣府総合科学技術会議 議員 / シンポジウム実行委員

Executive Member of Council of Science and Technology Policy of Japan / Member of the Organizing Committee

本 庶 佐 Tasuku Honjo

The Government's Policy in Support of iPS Cells

By producing iPS cells, Professor Shinya Yamanaka has given hope to many people. In Japan there are 200,000 people with visual disabilities, 100,000 with spinal cord damage, 2,280,000 with diabetes, and 260,000 with chronic renal failure, and so many people are looking forward to the development of cures. The annual medical costs resulting from diabetes amount to ¥1.15 trillion, while costs relating to renal failure, for artificial dialysis for example, amount to ¥1.3 trillion. Therefore, the Japanese Government intends to focus particularly on supporting iPS cell research. Japan's budget for life science is ¥330 billion. The issue here is how to invigorate research into iPS cells.

Immediately following the announcement concerning fabrication of human iPS cells on November 21, 2007, Prime Minister Yasuo Fukuda ordered the Council for Science and Technology Policy (CSTP) to prepare prompt support measures. In response, CSTP held the 1st meeting of the iPS Working Group (iPSWG) on January 10, 2008, announcing near-term guidelines on February 26. The 1st Summary Report is scheduled in June.

The matters considered by the iPSWG consisted principally of the direction of

iPS cell research, establishing a nationwide cooperative structure, roles of governmental assistance, strategies concerning intellectual property, establishing clinical research guidelines, initiatives towards promoting industrialization, and international cooperation. Here I will explain some of these matters.

Concerning the direction of research, since reinforcing basic research is the shortest route to applications, we intend to apply the knowledge gained from ES cells to the maximum in further basic research. In applied research, we aim to realize regenerative medicine. We will create safer iPS cells and consider which diseases will respond best. We will also conduct drug discovery research and develop a range of research-related equipment. However, there are several issues in the way of achieving practical applications, including preparing a roadmap towards clinical application, securing human iPS cell resources, managing personal data when distributing cells, confirming the variations in each cell line, and ensuring safety.

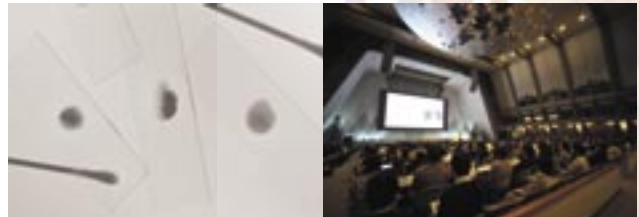
In developing a nationwide cooperative structure, we have already established the Center for iPS Cell Research and Application at Kyoto University

as part of an initiative to set up four centers. We are also considering establishing a cooperative structure involving universities, corporations, and research institutions.

National assistance for iPS cells totals ¥4 billion for fiscal 2008. Three billion yen is from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, two hundred million yen is from the Ministry of Health, Labor and Welfare, and eight hundred million yen is from the Ministry of Economy, Trade and Industry. There is additional strategic research funding from JST, the Japan Society for the Promotion of Science and other organizations.

Strategic management of intellectual property is also important. With a comprehensive research organization, we aim to manage licensing of core intellectual property centrally, to achieve strategic implementation. Looking to the future, we will consolidate our system for supporting international applications for excellent patents such as iPS cells.

We will consider how the structure of international cooperation should be, in reference to the panel discussion that closes today's session.



日本政府の iPS 細胞関連支援策

山中伸弥教授が iPS 細胞を作製したことは、多くの人に希望を与えています。日本には視覚障害 20 万人、脊髄損傷 10 万人、糖尿病 228 万人、慢性腎不全 26 万人の患者さんがおり、多くの方々が治療法の開発を待ち望んでいます。年間医療費は、糖尿病が 1 兆 1500 億円、人工透析などの腎不全関連が 1 兆 3000 億円にのぼります。このため、日本政府は、iPS 細胞研究をとりわけ重視して推進したいと考えています。わが国の生命科学関係予算は 3300 億円。このなかで、iPS 細胞研究をいかに活性化させていくかが課題です。

2007 年 11 月 21 日にヒト iPS 細胞作製が発表された直後、福田康夫内閣総理大臣は、総合科学技術会議に早急な支援策の作成を指示しました。これを受けて総合科学技術会議は、2008 年 1 月 10 日に第 1 回 iPS ワーキンググループ (iPSWG) 会合を開き、2 月 26 日に当面のガイドラインを発表しました。6 月には第 1 次とりまとめを報告する予定です。

iPSWG で検討している内容はおもに、iPS 細胞研究の方向性、全国的な協力体制の構築、国の支援のあり方、知財戦略、臨床研究ガイドラインの整備、産業化促進に向けた取組み、国際協力といったことです。その内容を一部ご紹介します。

研究の方向性については、基礎研

究の強化が応用への近道であることから、これまで ES 細胞で得られた知識を最大限活用して基礎研究を進めていきます。応用研究では、再生医療の実現を目指します。より安全な iPS 細胞を生み出し、どのような疾患に用いると効果的かを検討します。創薬につながる研究、さまざまな研究関連機器の開発も行います。しかし、実用化に至るまでには、臨床応用へのロードマップ作成、ヒト iPS 細胞資源の確保、細胞配布の際の個人情報管理、細胞株ごとの差異の確認、安全性の確保といった課題があります。

全国的な協力体制としては、すでに京都大学に iPS 細胞研究センターを設置し、これを含めた 4 拠点の整備を進めています。大学、企業、研究機関などの協力体制の構築についても検討しています。

平成 20 年度の iPS 細胞に関する国の支援は、総額 40 億円です。文部科学省から 30 億円、厚生労働省から 2 億円、経済産業省から 8 億円です。このほか、JST や日本学術振興会などの競争的研究資金があります。

戦略的な知財管理も重要です。包括的な研究組織で、核となる知財のライセンスを一括管理し、戦略的な運用を目指します。また今後、iPS 細胞のような優れた特許に関し、国際

的な出願支援制度を拡充していきます。

国際協力の仕組みについては、本日最後に行われるパネルディスカッションの議論を参考にして、検討を進めていきたいと考えています。





Hematopoietic Stem Cells and Leukemia

Irving L. Weissman

USA

Director, Stanford Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine



Expanding clinical applications for purified hematopoietic stem cells

I will start by discussing hematopoietic stem cells (HSCs), an area where I have considerable experience.

We used a quantitative clonal assay and sorting method to purify and isolate mouse HSCs in the 1980s and human HSCs in 1992. Purified HSCs are extremely valuable for clinical applications. When transplanting donor HSCs into patients with genetic blood disorders such as thalassemia, there is no risk of graft-versus-host disease (GVHD) if purified HSCs are used, as they do not include T cells. Moreover, no immune rejection occurs if donor HSCs are transplanted first and then tissues or organs from the same donor are subsequently transplanted. This was demonstrated in mice and the technique was first applied clinically at Stanford University. HSC transplantation to treat autoimmune disorders is an even more important application with the potential for wide-ranging use. Type I diabetes is an autoimmune disease caused by self-reactive T cells recognizing pancreatic cell antigens as foreign. We transplanted purified donor HSCs into mice and demonstrated a sustained cure for the autoimmune phase. It is possible to cure a mouse with type I diabetes by first transplanting HSCs to treat the immune phase and then to transplant islet cells from the same donor to treat the diabetes. We also experimented with lupus erythematosus and multiple sclerosis and confirmed

that HSC transplantation curbs disease progression. At SyStemix Inc., of which I am one of the cofounders, we used self-HSCs from which cancerous cells had been eliminated to treat 70 patients with stage 4 breast cancer and patients with difficult-to-treat lymphoma or multiple myeloma. The breast cancer patients in particular showed a marked improvement. If we can generate HSCs of iPS cell origin, they should prove as useful as HSCs from the actual patient. Generating HSCs by culturing from embryonic stem cells is a relatively simple procedure these days, but to achieve good graft homing into the adult tissues requires transplantation from a more mature stage than the embryo. I am confident that scientific research will uncover sooner or later why this is the case and how we can overcome it.

Molecular factors causing leukemia

Next I will talk about the overall hematopoietic system and leukemia, which is cancer of the hematopoietic system. Long-term (LT) HSCs are capable of both pluripotency and self-renewal and, although multipotent progenitors (MPPs) generated from LT-HSCs are capable of pluripotency, they only have a limited self-renewal function. Furthermore, differentiated cells from myelocytic or lymphocytic lines are not capable of self-renewal. Therefore, the hematopoietic system depends on the number of LT-HSCs that can maintain their self-renewal function throughout the life of the host. HSCs

are equipped with a robust self-renewal capability, but they are also dangerous cells as the loss of regulatory controls over the self-renewal function results in cancer. HSCs are formed at the late stages of embryogenesis and then exist throughout life as groups of HSC clones; each clone can undergo programmed epigenetic changes, random genetic or epigenetic changes, and as a result can be selected to increase or decrease their clone size by the microenvironment.

In man and in mouse, HSCs make large volumes of diverse myelocytic cells and lymphocytic cells in the young, but as the body ages the lymphocytic lines become more difficult to make, although there is no change in the production of myelocytic lines. We co-transplanted aging HSCs and young HSCs into young mice, the aging HSCs produced 10 times as many HSCs, but the number of young HSCs were regulated. In these mice the old HSCs made few lymphocytes, while the young HSCs made many. This phenomenon is thought to be programmed at the HSC developmental stage. Research into transcription factors using microarrays showed that old HSCs overexpressed genes that are associated with fate commitments in the myelocyte lineage, but compared to young HSCs, underexpressed genes active in fate decisions to produce lymphocytes. The genes most commonly overexpressed in old HSCs in the myeloid fate pathways include 17 (of the top 32) where a translocation or a mutation can participate in the cause of myelogenous leukemia in man. We



造血幹細胞と白血病

アーヴィング・ワイスマン

Irving L. Weissman / USA

スタンフォード幹細胞生物学・再生医療研究所所長



純粋造血幹細胞で広がる臨床応用

最初に、私が親しんできた造血幹細胞 (HSC) についてお話します。私たちは定量的なクローナルアッセイと分画法によって、80年代にマウス HSC を、92年にヒト HSC を純化して単離することに成功しました。純粋な HSC は臨床応用の面から大きな価値があります。サラセミアなど遺伝性血液疾患の患者にドナー HSC を移植する場合、純粋な HSC であれば T 細胞を含まないので、移植片対宿主病 (GVHD) の心配がありません。また、ドナー HSC をあらかじめ移植しておく、その後同じドナーから組織や臓器を移植すれば、拒絶反応が起こりません。マウスでこれを確認し、その後スタンフォード大学で最初に臨床応用されました。さらに重要で幅広く適用できるのは、HSC 移植による自己免疫疾患の治療です。I 型糖尿病は、膵細胞抗原を特異的に認識する自己反応性 T 細胞によって生じる自己免疫疾患ですが、私たちは、マウスに純粋なドナー HSC を移植して、自己免疫フェーズが永続的に治癒することを確認しました。I 型糖尿病罹患マウスに対して、まず HSC を移植して自己免疫フェーズを、さらに同じドナーの島細胞を移植して糖尿病を治すことができます。ループス・エリテマトーデスや多発性硬化症でも試験が行われ、HSC 移植によって疾患の進行が抑制されることが確認されました。私も創業者に

名を連ねるシステミック社では、4 期の乳がん患者 70 例や治療困難なリンパ腫、多発性骨髄腫の患者に対し、がん細胞を除去した自己 HSC で治療を行っています。乳がん患者では特に著しい改善効果を上げることができました。iPS 細胞由来の HSC ができれば、もちろん患者自身の HSC 同様役に立つはずです。ES 細胞から培養で HSC を得ることは誰にもたやすくできますが、注意すべきは、移植片が成体組織にうまくホーミングするには胚より成熟度の高い段階からの移植が必要なこと。これはなぜなのか、どうすればこの壁を越えられるかは、早晚科学が解明するものと確信しています。

白血病を起こす分子的背景とは

次に、造血系全体、および造血系のがんである白血病についてお話します。LT(long term)-HSC は多分化能と自己複製能をもちますが、そこから生まれる多能性前駆細胞 (MPP) には多分化能はありますが、自己複製能は限定的です。さらに分化した骨髄球系列やリンパ球系列の細胞には自己複製能はありません。したがって、造血系はホストの一生にわたり自己複製能を維持する LT-HSC の数に依存することになります。HSC は旺盛な自己複製能を備えた細胞ですが、同時に危険な細胞でもあります。自己複製能の調節がきかない状態が、がん細胞にほかならないからです。HSC は最終的に胚形成の後期に

生じ、一生、HSC クローン群として存在します。個々のクローンは、プログラムされたエピジェネティック変化を受ける場合もあるし、ランダムなジェネティックあるいはエピジェネティック変化を受ける場合もあり、その結果として、マイクロ環境によるクローンサイズの増減が起こるのです。ヒトでもマウスでも、若い個体では HSC が大量の多様な骨髄球系細胞とリンパ球系細胞を造りますが、加齢と共に骨髄球系は相変わらず造れてもリンパ球系は造りにくくなっていきます。加齢 HSC と若い HSC を若いマウスに同時移植すると、加齢 HSC は 10 倍の数の HSC を造るようになりますが、若い HSC は特に増えません。これらのマウスでは、加齢 HSC がリンパ球をあまり造らないのに対し、若い HSC はたくさん造ります。この現象は HSC の発達段階でプログラムされていると考えられます。マイクロアレイで転写因子を調べたところ、加齢 HSC では、骨髄球分化系列の運命予託に関係する遺伝子群が過剰発現しているが、リンパ球生産の運命決定に関わる遺伝子群は若い HSC に比べて発現が低いことがわかりました。加齢 HSC において骨髄球の運命経路で過剰発現頻度が高い遺伝子は (上位 32 個のうち) 17 個で、これらの転座または変異はヒトの骨髄性白血病の原因に関係すると考えられます。私たちは、転座はおもに高頻度転写座位で起こり、従って加齢 HSC におけるこれらのがん原遺伝子の過剰発現は白血病の進展のリスク因子であると推測しています。HSC の

プロフィール Profile

学歴	1959	ダートマス大学 (ニューハンプシャー州ハーノバー)	2004	ローテンバーグ一般および腫瘍免疫学センター 免疫学とがん研究における Rabbi Shai Shacknai 記念賞	
	1961	モンタナ州立大学 B.S. (モンタナ州ボズマン)	2004	全米科学アカデミーカOUNシル ジェシー・スティーブソン・コバレンコ メダル	
	1965	スタンフォード大学 M.D. (カリフォルニア州スタンフォード)	2004	老化研究連合 アラン・クランストン賞受賞者	
研究歴	1967-1968	スタンフォード大学 放射線医学部 研究員	2004	生物医学研究への優れた貢献に対し ニューヨーク医学アカデミーメダル	
	1969-1974	スタンフォード大学 放射線医学部 助手	2005	スタンフォード大学 科学への顕著な貢献に対し ライナス・ポーリングメダル	
	1974-1981	スタンフォード大学 放射線医学部 准教授	2005	ジェフリー・モデル財団 ジェフリー・モデル “夢への挑戦” 賞	
	1981- 現在	スタンフォード大学 放射線医学部 教授	2006	カリフォルニア連邦クラブ 第 18 回栄誉市民	
	1989- 現在	スタンフォード大学 発生生物学科 教授	受賞等 (抜粋)	2006	コロンビア大学 名誉博士号 (ニューヨーク州ニューヨークシティ)
	1990- 現在	スタンフォード大学 生物学科 教授	2006	医学における科学的卓越性に対し米伊がん財団賞 (ニューヨーク州ニューヨークシティ)	
	1990-1992	スタンフォード大学 ハワード・ヒューズ医学研究所 調査員	2006	フィラデルフィア市 ジョーン・スコット賞 (ペンシルベニア州フィラデルフィア)	
	1986-2001	スタンフォード大学免疫学プログラム (学位授与) 議長	2007	マウント・サイナイ医科大学 名誉博士号 (ニューヨーク州ニューヨークシティ)	
	2003- 現在	がん / 幹細胞生物学・医学研究所所長	2008	ロベルト・コッホ賞	
	2004- 現在	スタンフォード大学医学センター医学科 神経外科学教授			
	2005- 現在	総合がんセンター センター長			
	2007- 現在	スタンフォード ルードヴィッヒ幹細胞研究センター センター長			

分裂頻度は1日1.5%と極めて低く、分裂の間はG0期で長く過ごします。加齢の一般的仮説は、細胞にDNAの損傷が蓄積されるといものです。骨髄造血ではHSCクローンだけが生涯存在し続けるので、HSCの老化に伴いDNA損傷が蓄積されているかどうかを調べることは妥当だと考えました。実際、新たに単離した加齢HSCは細胞あたり平均数個の損傷点があるのに対し、若いHSCは1個あるかないかでした。DNA損傷の蓄積とがん原遺伝子の共発現が同時に起こることとがん原遺伝子の転座のチャンスが増すことは十分考えられます。急性骨髄性白血病(AML)では8番染色体と21番染色体の転座が起き、融合遺伝子AML1/ETOが生じます。宮本敏浩、赤司浩一と私はAMLで白血病幹細胞(LSC)がHSCやMPPを含む細胞集団中にあることを見出しました。さらに、LSCがHSCプールとMPPプールのどちらに存在するか調べたところ、すべてのLSCがMPPの段階にあることが判明しました。しかし、私たちの最も重要な発見は、同一の患者で、AML1/ETO転座がHSCのサブセットに存在するにもかかわらず、これらのHSCは白血病性ではなく、自己複製する前白血病性細胞(この細胞からMPPの段階でLSCができる)のプールを代表するように見えたことです。この観点から、AML1/ETO+は白血病を起こす必要条件ですが、十分条件ではないと考えられます。そこで私たちは、AMLマウスモデルを作製して研究

を進め、次のような知見を得ました。顆粒球マクロファージ前駆細胞におけるBCL2の発現が慢性骨髄単球性白血病をもたらすが、骨髄系前駆細胞は依然としてFas受容体の媒介する細胞死を起こしやすいこと。Fas変異をもつマウスにbcl2遺伝子を導入するとAMLが進展すること。これらのマウスではLSCはHSCや芽球の段階には認められず、顆粒球マクロファージの段階に認められること。そして、LSCはβカテニン経路を活性化していることです。マウスAML骨髄細胞では白血病マーカーであるCD47が過剰発現しています。白血病細胞におけるCD47の発現はSirpα受容体マクロファージに向けて送る“Don't eat me”のシグナルです。ヒトマクロファージ正常核型のAMLでは、CD47発現が高いと予後が悪く、少ないと予後がよいことがわかっています。

一方、慢性骨髄性白血病(CML)では9番染色体と22番染色体に転座が起こり、その結果、融合遺伝子BCR/ABLからキメラタンパク質が生じます。これは白血病に必須の遺伝子です。CMLの急性転化期への移行にはLSCの自己複製が役割を演じています。私たちは急性転化期のCMLでもLSCを見出しました。これらのLSCは顆粒球マクロファージ前駆細胞(GMP)の段階にあります。正常なマウスのHSCでは、自己複製の過程にβカテニンシグナル伝達経路が関与しています。正常なヒトHSCを染色すると核には活性化されたβカテニンが含まれていますが、

正常なGMPには含まれていません。急性転化期のCMLではβカテニンの活性化によってGMPの自己複製活性が高まること、これらの白血病性GMPは*in vitro*で自己複製し、*in vivo*で免疫不全マウスに白血病を引き起こすことがわかりました。急性転化期のGMPにアキシシ(wnt経路阻害剤)をコードする遺伝子を形質導入すると、*in vitro*でGMPの増加をブロックします。BCR/ABLタンパク質のチロシンキナーゼ活性を阻害する分子標的薬イマチニブに抵抗性の患者のLSCでは、βカテニンが特に多く見られます。あるタイプのLSC(AMLまたは急性転化期のCML)におけるすべてのDNAシークエンス、RNAのスプライスフォーム、突然変異、転座が明らかになることを期待したいものです。それらのジェネティック及びエピジェネティックな変化は、それだけでは白血病の発症に不十分だが不可欠であり、患者のHSCクローンに存在するはずだからです。ひとり一人の患者のHSCクローンとLSCを詳しく研究すれば、がん原遺伝子事象のタイプが明らかになり、それらがクローンの中で起こる順番に決まりがあるかどうかともわかるかもしれません。現在のがん治療薬はがん細胞を標的にしたものです。これによってがんは一時的に退縮しますが、がん幹細胞を除去しなければ再び成長を始めます。がん幹細胞を標的にした治療が行えれば、がんの治癒につながることでしょう。





Induction of pluripotency in somatic and germline cells

Hans Robert Schöler

Germany

Director of the Max Planck Insititute for Molecular Biomedicine



Producing iPS cells from neural stem cells

I will discuss two types of pluripotent stem cells: those originating from somatic cells (iPS cells) and those originating from germline cells (gPS cells).

Cells in the inner cell mass (ICM) of the embryo are pluripotent, having the capability to differentiate into any cell form. The cells later lose that capability for differentiation as they form the various types of cells that make up the body. We have been successful in creating pluripotent cells out of cells obtained from the ICM.

I will start my discussion by describing our work with iPS cells. There are a number of test methods available for determining whether cells have acquired pluripotency. Of those, the most thorough is termed "tetraploid aggregation". With this method, multiple embryos are fused into a tetraploid, and are then aggregated with candidate pluripotent cells. After these aggregated embryos have grown to the blastocyst stage and are returned to a mouse womb, if the candidate cells are pluripotent, a mouse can be born

that was formed just from those cells.

As you know, animals are born from germline cells, and those animals in turn give rise to more germline cells. This method of continued genetic transmission is characteristic of living things. Tetraploid aggregation introduces pluripotent cells into this sequence.

Professor Yamanaka has made it possible for cells to deviate from this sequence, by introducing a transcription factor cocktail that causes somatic cells, which would be expected to move toward differentiation, to instead acrobatically return to the germline. This is the significance of iPS cells. However, not all of the somatic cells injected with this cocktail become iPS cells, and the method is also quite time-consuming. My colleagues and I thought that there must be a simpler way to produce iPS cells.

First we removed neural stem cells from the brains of mice. When we compared the amount of expression of the four factors in the "Yamanaka cocktail" in these cells to that for ES cells, we found that the levels of Sox2 and c-Myc expression were higher

in the murine neural stem cells, and the levels of Oct4 and Klf4 were much lower.

We introduced a variety of genes into these neural stem cells. Our findings showed that iPS cells were obtained on day 14 after the introduction of Oct4 and Klf4. When we investigated such factors as the genetic profile of the iPS cells that were derived from neural stem cells through the introduction of these two factors, and compared those findings to iPS cells derived from neural stem cells introduced to the Yamanaka cocktail, we found the characteristics of these two cell groups to be nearly identical. When we used tetraploid aggregation and tested iPS cells with these two factors, fetuses resulted. This proved that the iPS cells achieved germline

Producing gPS cells from germline cells

Next I would like to discuss germline pluripotent stem cells. Four years ago, Professor Takashi Shinohara of Kyoto University made an important announcement. Up to that point, there had been reports that pluripotent stem cells (EG

Profile

Education	1982	Diploma Biology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany	Awards and Honors (Selected)	Robert Koch Award, Koch Foundation, Berlin, Germany, 2008
	1985	Ph.D. Molecular Biology, University of Heidelberg, Germany		Member of "The German Academy of Natural Scientists Leopoldina (Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina)
	1994	Habilitation, Ruprecht-Karls-University Heidelberg, Germany, venia legendi in Molecular Biology		Head of the Managing Board of the Stem Cell Network North Rhine Westphalia
Research Appointment	1984-1986	Staff Scientist, Center for Molecular Biology Heidelberg (ZMBH) University of Heidelberg, Germany		Member of The Academy of Science in North Rhine Westphalia
	1986-1988	Head Research Group, Boehringer Mannheim Research Center, Tuting, Germany		Since July 2005 Representative Member in the "Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung (ZES)" (central ethics committee for stem cell research)
	1988-1991	Staff Scientist, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany		
	1991-1999	Head Research Group, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg, Germany		
	1999-2004	Professor of Reproductive Physiology, School of Veterinary Medicine and Director of the Center for Animal Transgenesis and Germ Cell Research at the University of Pennsylvania, Philadelphia, USA		
	2000-2004	The Marion Dilley and David George Jones Chair in Reproduction Medicine		

cells) could be produced from primordial germ cells (PGC), which are in the early stage of differentiation. However, Professor Shinohara succeeded in obtaining germline stem cells (GS cells) from cells obtained from the testes (spermatogonial stem cells), which would be expected to have progressed considerably in differentiation. However, these cells could only be derived from the testes of newborn mice (transient). We decided to pursue this line of research further, to see if we could produce culturable gPS cells — “germline-derived pluripotent stem cells” — from the testes of adult mice.

Under the technology developed by Professor Shinohara, a very small quantity of cells is removed from the testes, and Oct46FP was introduced to visualize gPS cells for induction. The GS cells were quite different in appearance from the ES cells, and proliferated much like a bunch of grapes. In contrast, the gPS cells appeared to have properties more similar to ES cells than to the iPS cells that were created by introducing either 4 factors or 2 factors as described above.

We performed cloning from these GS cells, and created

gPS cell lines that could be passaged. These gPS cells have characteristics that are closer to ES cells than to GS cells. Functionally, these gPS cells use germline transmission to transfer genetic material to the next generation, confirming that they have the capability to differentiate. The advantage of applying this method to humans is that pluripotent cells can be obtained using extremely small biopsy specimens from the testes.

However, there are some points of difficulty at present. There was strong epigenetic imprinting from the paternal cell source, and the fetuses derived from those gPS cells were unable to form organs and died during development.

At present we are using gPS cells to create myocardial cells and glial precursor cells that have good functionality. The myocardial cells have been confirmed to pulsate in synchronization. The glial precursor cells form oligodendrocytes and astrocytes, and have been confirmed to provide therapeutic effects in rats.

Finally, I would like to introduce our efforts regarding the question of what kind of

workflow might be used to produce iPS cells and gPS cells. A comparison of genetic profiles shows that, when GS cells change into gPS cells, their properties change to become more like those of ES cells. A comparison of epigenetic status shows that GS cells have a strong tendency toward methylation, but as the number of passages increases and the cells become pGS cells, this methylation weakens. We thus hypothesize that, similar to yesterday's presentation by Professor Jaenisch, epigenetic reprogramming of GS cells to gPS cells will follow in the wake of stochastic changes.

In the same way that tumors develop, a number of steps are required before a cell acquires pluripotency. It is possible that some of those steps can be achieved by implementing very small changes, such as changing the culturing conditions or forcing the expression of Oct4. Cell differentiation is clearly not such a unidirectional process as we had thought.





体細胞と生殖細胞への多能性誘導

ハンス・シェラー

Han Robert Schölers / Germany

マックス・プランク分子生物医学研究所所長



神経幹細胞から iPS 細胞を 作り出す

私は、体細胞由来 (iPS 細胞) と生殖細胞由来 (gPS 細胞) の、2 種類の多能性幹細胞についてお話ししようと思います。

胚の内部細胞塊 (ICM) にある細胞は、どんな細胞にもなれる万能性を持っていますが、その後は分化能力を次第に失いながら、体を構成する各種の細胞を形成していきます。しかし、私たちは ICM から取り出した多能性細胞の運命を操作することができるようになりました。

まずは、iPS 細胞の実験からお話ししましょう。細胞が多能性を獲得したことをテストする方法には幾つかありますが、そのなかでも決定的とも言えるのが「四倍体胚凝集法」です。この手法では、複数の胚を四倍体に融合させたのち、多能性細胞の候補と凝集させます。この凝集胚を胚盤胞まで育ててからマウスの母胎に戻すと、候補の細胞が多能性を持っていれば、その細胞だけで作られた個体が生まれてきます。

皆さんご存じの通り、生殖細胞から個体が生まれ、その個体から

また生殖細胞が生まれる、という遺伝子を継承する連続性こそが生物の特性であり、そして四倍体凝集法とは、この連続性の中に多能性細胞を入れることです。

しかし山中教授は、この連続性から外れて分化という方向に向かったはずの体細胞を、転写因子のカクテルを導入するだけで、再びこの生殖系列に引き戻すという離れ業を成し遂げました。これが iPS 細胞の意味です。しかし、このカクテルを入れた体細胞の全てが iPS 細胞になるわけではなく、時間もかかるという難点があります。そこで私たちは、より簡便な方法で iPS 細胞を作れないか、と考えました。

私たちはまず、マウスの脳から神経幹細胞を取り出しました。この細胞における「山中カクテル」4 因子の発現量を ES 細胞と比較した場合、Sox2 と c-Myc の発現量は高く、Oct4 と Klf4 はずっと低くなっています。

この神経幹細胞に対して様々な遺伝子を導入してみました。すると Oct4 と Klf4 を導入した場合、14 日目には iPS 細胞が得られたのです。この 2 因子導入による神経幹細胞由来の iPS 細胞を、山中カク

テルを導入した神経幹細胞由来の iPS 細胞と比較してみると、遺伝子プロファイルなども、ほぼ同等の特性を持っていることがわかりました。そして四倍体凝集法を用いて、この 2 因子 iPS 細胞をテストしたところ、胎仔を作り出すことができました。つまり、iPS 細胞は生殖系列に乗って次世代に継承されることが証明されたのです。

生殖系細胞から作る 「gPS 細胞」

次に、生殖細胞系列の多能性幹細胞に関して述べましょう。京都大学の篠原隆司教授は、4 年前に重要な発表をしました。それまでにも、分化がそれほど進んでいない存在である始原生殖細胞 (Primordial Germ Cell、PGC) の段階から多能性幹細胞 (EG 細胞) を作成できることは報告されていたのですが、篠原教授は生殖系列でさらに分化が進んでいるはずの、睾丸の精巣から取り出した細胞から、生殖系列由来の多能性を持つ幹細胞 (GS 細胞) を作り出すことに成功したのです。ただ、これは新生仔の睾丸から作り出した一過性のもの

プロフィール Profile

学歴	1982	ハイデルベルグ大学生物学科卒 (ドイツ・ハイデルベルグ)	受賞等 (抜粋)	2008	コッホ財団 ロベルト・コッホ賞 (ドイツ・ベルリン)
	1985	ハイデルベルグ大学分子生物学 Ph.D. (ドイツ)			ドイツ自然科学者アカデミー (レオボルジナ) メンバー
	1994	ルブレヒト - カールス大学にて分子生物学 <i>venia legendi</i> (講師資格) 取得 (ドイツ・ハイデルベルグ)			ノルトライン・ヴェストファーレン (NRW) 州幹細胞ネットワーク 運営委員会ヘッド
研究歴	1984-1986	ハイデルベルグ大学 ハイデルベルグ分子生物学センター (ZMBH) スタッフ科学者 (ドイツ・ハイデルベルグ)			NRW 州科学アカデミー メンバー
	1986-1988	ペーリンガー・マンハイム研究センター 研究グループヘッド (ドイツ・トゥツィング)			2005 年 7 月から幹細胞研究中央倫理委員会 (ZES) 代表メンバー
	1988-1991	マックス・プランク生物物理化学研究所スタッフ科学者 (ドイツ・ゲッティンゲン)			
	1991-1999	欧州分子生物学研究所 (EMBL) 研究グループヘッド (ドイツ・ハイデルベルグ)			
	1999-2004	ペンシルベニア大学獣医学部生殖生理学教授、動物の遺伝子組換え・生殖細胞研究センター所長 (アメリカ・フィラデルフィア)			
	2000-2004	再生医学におけるマリオン・ディリー & デイビッド・ジョージ・ジョーンズ チェア			

でした。そこで、私たちはこの研究をさらに推し進め、成体マウスの辜丸から培養可能な多能性細胞、「gPS 細胞 (germline-derived pluripotent stem cell)」を作成することに取り組みました。

篠原教授の開発した技術は、ごく少量の細胞を辜丸からとってきて、Oct4-GFP を導入して指標にすることにより、gPS 細胞を誘導作成するというものです。GS 細胞は、ES 細胞とはかなり違う外観を持っていて、ブドウのふさのように増殖します。ところが外観とは異なり、gPS 細胞株群は、先ほど述べた 4 因子・2 因子のいずれの iPS 細胞よりも、さらに ES 細胞に近い性質を持っていました。

私たちは、この GS 細胞からクローニングをおこない、培養継代可能な gPS 細胞株を作成しました。この gPS 細胞は、GS 細胞よりもさらに ES 細胞に近い性質を持っています。機能的にも、この gPS 細胞は生殖系列に乗って次世代に継承される、つまり分化能力を持っていることが確認されました。この手法をヒトに適用した場合の利点は、ほんの少しの精巣からのバイオプシーで多能性細胞を得ることができるこ

とです。

ただ、現時点では難点もあります。由来となった父親からのエピジェネティックな刷り込みが強く、gPS 細胞由来の胎児は臓器を作ることができず、発生途中で死んでしまったのです。

現在、私たちは、gPS 細胞から十分な機能を持つ心筋細胞やグリア前駆細胞を作成しています。心筋細胞は同調して拍動することが確認されていますし、グリア前駆細胞はオリゴデンドロサイトやアストロサイトを作りだし、ラットに対する治療効果も確認できています。

最後に、iPS 細胞や gPS 細胞はどのような仕組みで生まれてくるか、という問題に対しての、私たちの取り組みを紹介します。遺伝子プロファイルを比較すると、GS 細胞から gPS 細胞へと変化するに従い、ES 細胞に近い性質に変化していくことがわかります。エピジェネティックな状態を比較すると、GS 細胞では強いメチル化傾向を持っているものが、継代を重ねて pGS 細胞になっていくとメチル化が薄まっていきます。したがって、仮説としては昨日のイエーニッシュ教授の発表と同様、確率論的な変化にそって、GS

細胞から gPS 細胞へとエピジェネティックな初期化が起こっていくのだと考えられます。

腫瘍が出来るのと同様、細胞が多能性を獲得するには幾つかの段階が必要です。しかしそれは、培養条件を変化させたり、Oct4 を強制発現させるなど、わずかな変化で引き起こすことが可能なのかも知れません。細胞の分化とは、かつて考えられていたほど方向性のものではないことが明らかになりつつあるのです。





iPS Cells and the Epigenetic Landscape

Alan Colman

Singapore

Executive Director, Singapore Stem Cell Consortium



Stem cell research in Singapore

I will talk about the state of stem cell research in Singapore. I began research into reprogramming of cells in 1971 under Professor J. Gurdon of Cambridge University, a pioneer in nuclear transplantation. From 2002, I have continued my research at the headquarters of ES Cell International in Singapore. The mission of the company is to develop the means of treating diabetes and ischemic heart disease using ES cells. Although Singapore is a small country, it boasts one the highest levels of GDP in the world, and medicine and life sciences are expected to become sources of national wealth. In particular, the clinical application of stem cells is a major goal, and there is abundant funding for research.

Singapore first succeeded in establishing hES lines in 1994. Of the 21 hES cells currently registered at NIH, six were established in Singapore. Recently a huge research complex, Biopolis, was constructed in the center of Singapore. It comprises seven research laboratories, and it is the focus of major investment.

From last year, I have worked as the Executive Director of the Singapore Stem Cell Consortium (SSCC) located there, and I have been conducting stem cell research at the Institute of Medical Biology under the auspices of the Agency for Science, Technology and Research (A*STAR). SSCC was established by A*STAR in 2005 to coordinate stem cell research by allocating funds for competitive research. Clinical facilities are scheduled to be established in 2009 and an international PhD course named SINGA is also planned, hoping to attract high level personnel from around the world, including Japan.

Now I would like to talk about two or three research projects that are underway in Singapore. One is the research by S.-K. Lim et al to produce mesenchymal stem cells (MSCs) from hES cells, then using an hMSC conditioned medium to improve myocardial infarction in pigs. After inducing ischemia of the pig heart for 75 minutes, an MSC medium was injected into the site of infarction. The size of myocardial infarct decreased by 60%, with regeneration of the cells and recovery of the heart function. This mechanism suppresses oxidation stress, and as a result of the reduced apoptosis,

a significant antiinfarction effect appears to have been obtained. The researchers plan to examine the longer-term effects.

Next, research into the epigenetic memory. The pluripotency of ES cells is mediated by genetic factors and their chromatin structure, and we know that exit from the self-renewing state occurs due to epigenetic changes resulting from chromatin modifications such as dimethylation or trimethylation of histone. H.-H. Ng et al demonstrated that the H3K9Me2/Me3 demethylase gene is mediated by Oct4.

The research findings concerning the role of Klf have also been the focus of attention. Of the four types of reprogramming transcription factors, Klf4 is dispensable for maintaining the self-regeneration and pluripotency of ES cells, and if Klf2, Klf4, and Klf5 are simultaneously depleted, differentiation of the ES cells is induced. As a result of chromatin immunoprecipitation and microarray assay, it was determined that these Klf proteins have a functional relationship with Nanog. Klf is thought to have the ability to regulate genes, which is the key to inducing pluripotency as Nanog does.

ent Stem [iPS] Cell Research – Frontier and Future –



Profile

Education

1971 B.A., Biochemistry in Oxford University
1974 Ph.D., Laboratory of Molecular Biology in Cambridge

Research Appointment

Academic appointments in Oxford University and Warwick University
Professor, Biochemistry in the University of Birmingham
1987-2002 Research Director, PPL Therapeutics in Edinburgh, UK
2002-2005 Chief Scientific Officer, ES Cell International (the Singapore-based company)
2005-2007 Chief Executive Officer, ES Cell International

iPS cells overturn the Waddington Model

Reprogramming research began in 1962 when Professor Gurdon obtained 19 clones by transferring the somatic nuclei of frogs to enucleated eggs. Tadpoles were produced in these experiments but they did not mature into frogs. Cloning of mammals can be said to have reached its apex with the birth of Dolly the sheep in 1996. The researchers succeeded in obtaining an adult animal capable of reproduction using a mammary cell nucleus. The motivation for cloning a sheep was to produce milk and protein from a transgenic sheep and this is why mammary cells were used. Several subsequent studies suggested that it was possible to change the destiny of somatic cells under certain conditions.

The Waddington Model announced in 1957, which explains differentiation through hills and slopes, is known to many. It shows that differentiation is like a ball, the ES cell, rolling downhill, and the kind of cell it differentiates into depends on the path it follows. Although it is an irreversible phenomenon, whichever route it takes it is the same. However,

Professor Yamanaka's research has reversed the force of gravity. In that sense, it is a groundbreaking achievement that even Newton could not attain. It seems that we must consider a new topology.

Professor Jaenisch suggests that we may be able to realize reprogramming by reducing rather than adding transcription factors. In addition, T. Graf has shown that it is possible to move from one differentiation state to another with the overexpression of specific transcription factors. Although it has not been published, D. Melton reports that mouse cells can be converted to β -like cells with three new transcription factors. In other words, there are possibilities for transition to all sorts of differentiation states depending on the transcription factors. We may even find the controlling factors for differentiation.

In Singapore, research into iPS cells can be expected to pick up speed in future, and already two research groups have been established. There is particularly strong interest in applications in clinical practice and drug discovery. Forcible reprogramming by transcription factors is a really simple mechanism, so it may occur naturally in the body.

There is a great deal of interest in this. This may contribute to regeneration, and it may also be related to disease. We must therefore develop an even deeper understanding of the plasticity of living things.





iPS 細胞と

「エピジェネティックな景観」

アラン・コールマン

Alan Colman / Singapore

シンガポール幹細胞コンソーシアム 専務理事



シンガポールにおける 幹細胞研究

シンガポールにおける幹細胞研究をめぐる動きについて紹介します。私は1971年に核移植のパイオニアであるケンブリッジ大学のJ. ガードン教授のもとで細胞のリプログラミングの研究を始めました。2002年からはシンガポールのESセルインターナショナル社(ESI)を本拠に、研究を続けてきました。この会社の目的はES細胞を使って糖尿病や虚血性心疾患の治療手段を開発することです。シンガポールは小国ながら世界有数のGDPを誇り、医療や生命科学は国富を生み出す源として期待されています。特に幹細胞の臨床応用は大きな目標で、研究予算も潤沢です。

シンガポールでは1994年にはじめてヒトES細胞の作製に成功しました。現在、NIHに登録されているヒトES細胞21個のうち6個は当地で作製されたものです。最近、シンガポール中心部に巨大な研究都市「バイオポリス」が建設されました。7研究所があり、大規模な投資が行われています。私は昨年からその中にあるシンガポール

幹細胞コンソーシアム(SSCC)の専務理事を務め、また科学技術庁(A*STAR)傘下の医学生物学研究所(IMB)において幹細胞研究を行っています。SSCCは2005年にシンガポール科学技術庁によって設立された機関で、競争的研究資金の配分など幹細胞研究の調整を行います。2009年には臨床施設を開設する予定で、国際大学院SINGAも計画されており、日本を含め世界からレベルの高い人材を求めています。

シンガポールで進行中の研究を2~3紹介しましょう。ひとつはS.-K. リムらの研究で、ヒトES細胞から間葉系幹細胞(MCS)を作り、これで調整した培養液でブタ心筋梗塞を改善した研究です。ブタ心筋を75分間虚血にしてMCS培養液を梗塞部位に注入したところ、心筋の損傷部位が60%減り、細胞が再生して心機能が回復しました。このメカニズムは酸化ストレスの抑制にあり、アポトーシスが減った結果、有意な抗梗塞作用が得られたものと思われます。さらに長時間の効果を検討する予定です。

次はエピジェネティックな変化についての研究です。ES細胞の多

能性は遺伝子的な要因とクロマチンの構造によって調節されており、自己再生状態からの脱却はヒストンのジメチル化やトリメチル化のようなクロマチンの修飾によるエピジェネティックな変化によって生じることがわかっています。H.-H. ングらは、H3K9Me2/Me3の脱メチル化酵素遺伝子がOct4によって調節されていることを示しました。

さらに、Klfの役割についての研究成果も注目されます。リプログラミングする転写因子4種のうち、Klf4はES細胞の自己再生と多能性の維持に必須ではなく、Klf2、Klf4、Klf5が同時に消滅するとES細胞の分化が誘導されます。クロマチンの免疫沈降とマイクロアレイで調べた結果、これらのKlfタンパクとNanogは機能的に関連があることが判明しました。KlfはNanogのような多能性誘導の鍵になる遺伝子を調節する働きをもっていると考えられます。

ワディントンモデルを 変えたiPS細胞

リプログラミング研究は、1962

プロフィール Profile

学 歴	1971	オックスフォード大学生化学 B.A.
	1974	ケンブリッジ大学分子生物学研究室 Ph.D.
研 究 歴		オックスフォード大学およびワーウィック大学アカデミック職 パーミンガム大学生化学 教授
	1987-2002	PPL セラピューティクス社 調査担当重役 (英国・エディンバラ)
	2002-2005	ES セルインターナショナル社 (シンガポール企業) 最高科学責任者
	2005-2007	ES セルインターナショナル社 最高経営責任者

年にガードン教授がカエルの体細胞核を除核した卵に移植して19のクローンを得たのを嚆矢とします。この実験ではオタマジャクシはできましたが、成熟したカエルになるには至りませんでした。哺乳類におけるクローン作製は1996年、羊のドリーの誕生で頂点に達したと言えるでしょう。乳腺細胞核を使って生殖可能な成獣を得ることに成功しました。作製した動機はトランスジェニック羊にミルクやタンパク質を作らせることで、乳腺細胞を使用したのはこのためです。その後もいくつかの研究で、一定の条件下で体細胞の運命を変えうることが示唆されています。

1957年に発表された、丘陵と斜面で分化を説明するワディントンモデルは多くの人に知られています。分化とはES細胞というボールが斜面を転げ落ちるようなもので、落下する道によってどの細胞に分化するかは異なるものの、不可逆的な現象であることはいずれの道をたどっても同じであることを表したものです。ところが、このたびの山中教授の研究は重力を逆転させてしまったことになります。その意味で、ニュートンさえできなかった画

期的な成果と言えるでしょう。私たちは新しい地形学を考える必要があります。

イエーニッシュ教授は、転写因子を加えるのではなく減らすことで再プログラム化を実現できるかもしれないと示唆しています。また、T. グラフは、特定の転写因子の過剰発現によって、ある分化状態から別の分化状態に移行しうることを示しました。未発表ですが、D. メルトンは、マウスの細胞を新たな3つの転写因子によってβ様細胞に変えることができると報告しています。つまりどんな分化状態への移行も転写因子次第で可能性があるのです。分化に対して抑制的な因子も発見されるかもしれません。

シンガポールでは今後iPS細胞の研究が加速化すると思われ、現在すでに2つの研究グループが立ち上がりました。特に臨床や創薬への応用に強い関心が寄せられています。転写因子による強制的なリプログラミングは、しくみとしてはまことに単純なので、体内で自然に起こっている可能性もあります。大いに関心のあるところですが、これが再生に寄与するのではないかと、さらに疾患にも関係するので

はないかと考えています。私たちは生体の可塑性をさらに深く理解する必要があります。





Generation and characterization of iPS cell lines from rat neural precursors and fibroblast cells.

Kwang-Soo Kim

Korea

Director and Professor, CHA Stem Cell Institute / The Pochon CHA University
Associate Professor, Harvard Medical School



Developing regenerative medicine techniques for Parkinson's disease

Development proceeds from the early embryo and, once the midbrain forms, dopaminergic neurons are generated in the area called the substantia nigra. Parkinson's disease is caused by degeneration of the A9 dopaminergic neurons. A number of drugs are currently under development for Parkinson's disease. However, these drugs produce strong side effects and only provide symptomatic treatment and no drugs can delay disease progression.

If we are to research Parkinson's disease further and identify new drugs and treatment methods, we must generate dopaminergic neurons and gain an understanding of the mechanism behind their degeneration. We already know that Parkinson's disease is caused by the loss of dopaminergic neurons, so if we can generate functional dopaminergic neurons from iPS cells and use these to supplement the diseased area, we may open up a new avenue for treatment.

We are using a method to generate neurons from embryonic

stem cells (ES cells) that was developed by Dr. Ron D. McKay and his colleagues at NIH. With this method, ES cells are made to produce embryoid bodies and the neural precursor cells generated by the embryoids are induced to become dopaminergic neurons. At this point, stem cells genetically modified to overexpress key transcription factors are able to generate more dopaminergic neurons. Dopaminergic neurons produced in this way have been shown to produce a therapeutic effect in mouse and rat disease models.

However, cell therapy experiments have shown that such dopaminergic neurons can sometimes form tumors. We therefore compared neural stem cells originating from ES cells and neural stem cells sampled from the developing midbrain. Compared with the cells of brain origin, the neural stem cells of ES cell origin multiply dramatically. Moreover, the neural stem cells of brain origin lose their ability to differentiate after around 4 weeks, while the cells of ES cell origin maintain their ability to differentiate for a fairly long period. In addition, we and others have shown that tumor formation can be avoided if the cell therapy

uses only neural stem cells that have been purified by removing any undifferentiated cells using fluorescence-activated cell sorting (FACS).

Developing cell therapies using autografts

As shown by these experiments, when ES cells are used in cell therapy, there is a trade-off between the upside of having a limitless supply of cells versus the downsides of immune rejection and the risk of tumorigenesis. Somatic stem cells are not associated with tumorigenesis or immune rejection, but only have a limited differentiation potential. Researchers have therefore started to consider whether there are other more appropriate cell sources. Possible sources for use in Parkinson's disease include nuclear transfer embryonic stem cells (ntES cells) and tissue-specific or midbrain stem cells from embryos.

We think, however, that the ideal approach would be to use autografts. We wondered whether we could generate pluripotent cells by transplanting nuclear extracts from ES cells. We use the rat in our experiments as



Profile

Education	1977	BS, Dept of Microbiology, Seoul National University, Korea
	1983	Ph.D., Dept of Biological Science and Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Korea
Research Appointment	1983-1988	Postdoctoral Associate, Department of Biology, M.I.T.
	1989-1994	Assistant Professor, Dept. of Neurology and Neuroscience, Cornell Univ. Medical College
	1994-1998	Associate Professor, Dept. of Neurology University of Tennessee, College of Medicine
	1998-present	Associate Professor, Molecular Neurobiology Laboratory, McLean Hospital/Harvard Medical School
	2006-present	Professor and Director, Cha Stem Cell Institute, The Pochon CHA University

Awards and Honors (Selected)	1992-1997	First Award Grant from NIMH
	2000-2002	NARSAD Independent Award
	2003-2005	NARSAD Independent Award II
	2006	Lead Reviewer Award, Stem Cells

it provides an ideal model for disease research. However, rat ES cells are not readily available. We sampled cells from the rat cortex, reprogrammed the cells with extracts from mouse ES cells, and attempted to generate pluripotency. We successfully generated pluripotent cells that expressed Nanog, albeit at low efficiencies, and were able to use these cells to create cell clumps that generated nerve cells. We were then able to create neurons and glial cells from these cell clumps. However, these cells showed limited differentiaion potential. While we were trying to further optimize this method, Dr. Yamanaka announced the development of the mouse iPS cells.

We then attempted to generate iPS cells from rat neural stem cells. We introduced Nanog as well as the four factors used by Dr. Yamanaka and successfully generated pluripotent cells. We were also able to improve the efficiency of pluripotent cell generation through the combined use of various ES cell extracts, as suggested by the previous experiments. We then used this method to successfully generate iPS cells from rat fibroblasts as well.

Today, we have developed five iPS cell lines from rat neural stem cells. These cells express ES cell marker genes. When confirming the cells' differentiation potential, we saw that they are capable of differentiating into all three germ layer cells. In addition, we were able to induce differentiation into nerve cell lines, as well as astrocytes and neurons. We have recently managed to generate teratomas and are in the process of confirming their differentiation profiles.

For some reason, it had not previously been possible to develop ES cell technology for the rat despite it being a useful laboratory animal. However, the advent of iPS cells showed us the way to generate pluripotent cells even from the rat.

When the scandal over the work by Dr. Hwang Woo-Suk broke in South Korea, many South Korean stem cell researchers sank to the depths of despair. However, a number of talented individuals, including Dr. Shin-Ichi Nishikawa, gave us the courage to carry on. At that time, I agreed to take on the role of Director of the CHA Stem Cell Institute with a personal objective of rebuilding stem cell research in South Korea.

Today, much research is being

carried out on ES cells and iPS cells and South Korea's stem cell researchers have a new lease of life. It is vital that iPS cell research is carried out in a collaborative, not competitive, manner. My goal is to work together with everyone to build up research in this area for ultimate clinical application of this new biotechnology.





ラット神経前駆体と線維芽細胞からの iPS 細胞株の樹立とその特性

カン スー・キム

Kwang-Soo Kim / Korea

CHA 幹細胞研究所所長 / ハーバード大学医学部准教授



パーキンソン病の 再生医療に向けて

初期胚から発生が進み、中脳が形成されると、黒質と呼ばれる部分にドーパミン (DA) ニューロンが生まれます。この DA ニューロンのうち A9 と言われるものが変性することが、パーキンソン病の原因です。パーキンソン病には現在、幾つかの薬が開発されています。しかしこれらの薬は副作用が強いうえに、対処療法であり、病状の進行を食い止めることはできません。

パーキンソン病を詳しく調べ、新しい薬剤や治療法を見出すためには、DA ニューロンを作り出し、その変性の仕組みを解き明かすことが重要です。また DA ニューロンが失われることが原因とわかっているわけですから、iPS 細胞から機能する DA ニューロンを作り上げ、患部に補うことができれば、治療への道が開ける可能性があります。

私たちは、NIH のマツケイらが開発した、ES 細胞からニューロンを生み出す方法を使っています。この手法では ES 細胞に胚様体を作らせ、そこに生まれる神経前駆

細胞を DA ニューロンへと誘導していきます。この際、主要な転写因子を過剰発現するように遺伝子操作した幹細胞は、より多くの DA ニューロンを生み出すことができます。こうして作り出した DA ニューロンは、疾患モデル・マウスとラットへの治療効果があることも確認されています。

しかし、こうした DA ニューロンを用いた細胞治療実験は、時に腫瘍形成をもたらすこともわかってきました。そこで私たちは、ES 細胞由来の神経幹細胞と発生途中の中脳から取り出した神経幹細胞を比較してみました。すると、脳由来のものに比べて、ES 細胞由来の神経幹細胞は劇的に増殖すること、さらに脳由来の神経幹細胞が 4 週間ほどで分化能力を失うのに対し、ES 細胞由来のものはかなり長い間、分化能力を保持し続けることがわかりました。

さらに私たちと研究協力者は、FACS を使って未分化の細胞を取り除き、神経幹細胞だけに精製してから細胞治療に用いると、腫瘍形成を回避できることを示しました。

自家移植による 細胞治療への取り組み

これらの実験からわかるように、細胞治療に ES 細胞を用いる場合には、無限の細胞資源という長所があるいっぽう、腫瘍形成の危険性や免疫拒絶の問題があります。体性幹細胞を用いた場合には腫瘍形成や免疫拒絶はありませんが、分化能力が限定されているという問題があります。このため、より理想的な細胞資源として、パーキンソン病の場合は胎児の中脳組織や組織特異的な幹細胞、クローン ES 細胞 (ntES 細胞) などが検討されてきました。

しかし私たちは、あくまで自家移植の細胞が理想的だと考えました。そこで、ES 細胞の核抽出物を移植することによって、多能性細胞を作り出せるのではないかと考えたのです。私たちは、疾患研究モデルとして非常に理想的なラットを用いて実験しています。ところが、ラットにはまだ利用可能な ES 細胞がありません。そこで私たちは、イーニッシュ教授らの方法に習い、ラットの皮質から細胞をとってきて、マウス ES 細胞からの抽

プロフィール Profile

学 歴	1977	ソウル国立大学微生物学科 B. S. (韓国)	受 賞 等 (抜 粋)	1992-1997	NIMH ファーストアワードグラント
	1983	韓国科学技術院生命科学・工学科 Ph. .D. (韓国)		2000-2002	統合失調症およびうつ病研究のための 全国連合インディペンデント賞
研 究 歴	1983-1988	M.I.T. 生物学科 博士研究員		2003-2005	統合失調症およびうつ病研究のための 全国連合インディペンデント賞 II
	1989-1994	コーネル大学医学部神経学・神経科学科 助手		2006	Stem Cells 誌 Lead Reviewer 賞
	1994-1998	テネシー大学医学部神経学科 准教授			
	1998- 現在	マクレーン病院 / ハーバード大学医学部分子神経生物学研究室 准教授			
	2006- 現在	浦項 CHA 大学 CHA 幹細胞研究所 所長、教授			

出物で初期化し、多能性を持たせようと試みました。すると、効率は低いものの、Nanog を発現して多能性を持った細胞を作ることに成功し、さらにはこの細胞から、神経細胞を生み出す細胞のかたまりを得ることができたのです。この細胞のかたまりからは、ニューロンやグリア細胞を作成することができました。しかしながら、これらの細胞は限定した分化能力しか持ち合わせておりませんでした。この方法の改良に取り組んでいたところ、山中教授がマウス iPS 細胞を発表されたのです。

そこで、私たちはラットの神経幹細胞から iPS 細胞を作成することを試みました。果たして、山中教授の使った 4 因子に加え、Nanog を導入したところ、多能性を持った細胞を生み出すことに成功したのです。さらに、先ほどの実験で示したように ES 細胞の各抽出物を併用することによって、多能性細胞を生み出す効率を改善することができたのです。私たちは、続いてこの手法を用いてラットの線維芽細胞から iPS 細胞を作ることに成功しました。

現在では 5 つの iPS 細胞系を

ラットの神経幹細胞から得ています。この細胞は ES 細胞のマーカー遺伝子を発現しています。そして分化能力を確認したところ、三胚葉系に分化する能力を持っていることがわかりました。神経細胞系への分化誘導も成功し、アストロサイトやニューロンへの誘導にも成功したのです。現在では奇形腫の形成にも成功し、分化プロファイルを確認しているところです。

実験動物として有用なラットは、これまでは何らかの理由で ES 細胞が得られない動物でした。しかし iPS 細胞は、ラットからも多能性細胞を得る道を私たちの前に示したのです。

韓国で黄教授のスキャンダルが起こったとき、多くの韓国人幹細胞研究者は失意のどん底にありました。しかし、西川伸一先生をはじめ、良識ある人々が私たちを勇気づけてくださいました。そのとき、私は CHA 幹細胞研究所の所長という役を引き受け、韓国の幹細胞研究を再び立ち直らせようと思ったのです。

現在では、活発な ES 細胞、そして iPS 細胞の研究が行われるようになり、韓国の幹細胞研究は息

を吹き返しつつあります。iPS 細胞研究は競争ではなく協調して行うことが大切です。今後も皆さんとも協調して、この新しいバイオテクノロジー技術の、究極の臨床応用に向けて、研究を重ねていきたいと思っています。





Pluripotent Stem Cell Lines for Biomedical Research, Drug Discovery and Regenerative Medicine

N o r i o N a k a t s u j i

Japan

Director, Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University /
Professor, Institute of Frontier Medical Sciences, Kyoto University



Disease model systems and drug development research based on human ES cells

We have been conducting research in ES cells for some time now. I want to take this opportunity to describe the generation of ES cells for potential clinical applications, discuss applications in drug development research, and outline some ideas for a cell bank collecting HLA types.

Five years ago we established the first strains of human ES cells in Japan, provided these 3 lines (KhES-1, KhES-2, KhES-3) to more than 30 institutions in Japan, and began to provide support for research. We are still the only facility succeeded in derivation of ES cell lines in Japan.

What conditions are required to generate ES cell lines for clinical applications within the next few years? One need is a cell culturing system using defined culture media, with no animal-derived components. An international cooperative project run by Professor Peter Andrews is now making progress in that area. The project is now comparing 10 types of defined media, and our group participates in this research. In

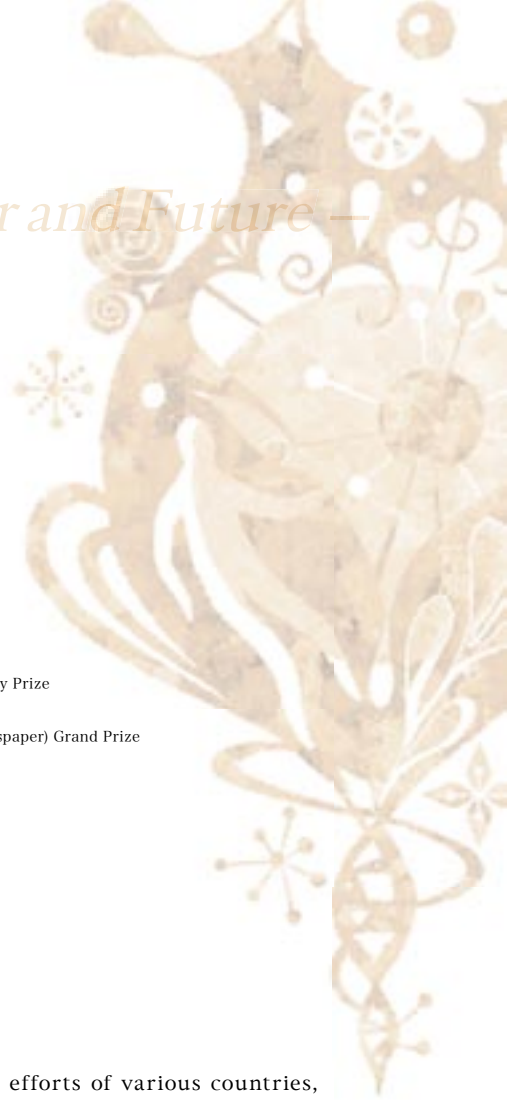
terms of research facilities, we have established a cell processing center for human ES cells at the Kyoto University Institute of Frontier Medical Sciences, and set up a clean room in the center. Cooperative measures are also being pursued internationally to prepare standard operating procedures (SOPs), and we conduct our research in line with those standard procedures.

Why are human pluripotent stem cells so effective in drug development research? It is because genetically modified stem cells have virtually endless replication capacity and the potential to differentiate into a wide variety of human cell types. In particular, liver cells and cardiomyocytes are vital in drug safety studies. In Japan, a major project has been underway for the last 4 years to create cell models for human diseases and cell systems that can be used in safety studies.

Here we would like to introduce a study of adverse drug effects and safety tests using cardiomyocytes derived from ES cells. Drug companies are currently conducting myocardial toxicity testing with human ion channel gene expression in animal cells to see if new drug candidates inhibit ion channel activity. We

have succeeded in encouraging human ES cells to differentiate into cardiomyocytes, and been able to use those cells to detect drug-induced QT prolongation. We are conducting this research with the start-up company ReproCELL Inc., and are very close to practical applications. Our cardiomyocyte assay has detected QT prolongation even for drugs that show no prolongation under current testing methods, and there have been cases in which the converse has also been true. Results from our cardiomyocyte assay have proven to be in good agreement with findings from *in vivo* tests in humans and dogs. This assay will quickly contribute to greater efficiency in safety studies for new drug candidates.

ES cells will also play a vital role in creating models of disease and analyzing the mechanism of diseases resulting from genetic changes. We are progressing with projects aimed at clarifying genetic factors in the familial types of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Alzheimer's disease, and Huntington's disease. The causative genes for these conditions (normal or spontaneous mutation) can be expressed in ES cells, and screening systems and methods for analyzing the disease mechanism



Profile

Education

- 1972 Bachelor of Science, Faculty of Science, Kyoto University
- 1977 Doctor of Science, Faculty of Science, Kyoto University

Research Appointment

- 1978 Research Assistant, Umeå University, Sweden
- 1978 Postdoctoral Associate, Massachusetts Institute of Technology, USA
- 1980 Research Associate, George Washington University Medical School, USA
- 1983 Visiting Scientist, MRC Mammalian Development Unit, UK
- 1984 Division Head, Meiji Institute of Health Science, Japan
- 1991 Professor, National Institute of Genetics, Japan
- 1999 Professor, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Japan
- 2003 Director, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University (-2007)
- 2007 Founding Director and Professor, Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University

Awards and Honors (Selected)

- 2004 Nikkei BP Technology Prize
- 2004 Kyoto Shinbun (Newspaper) Grand Prize

can be constructed. For example, when a mutated presenilin 1 gene, which can cause Alzheimer's disease, is introduced into ES cells and those cells are encouraged to differentiate into nerve cells, the nerve cells show a 2-fold increase in the ratio of amyloid β 42/ β 40. This phenomenon, similar to findings observed in Alzheimer's patients, suggests that these cells can be used to construct a useful model of the disease.

Contributing to clinical practice with cell banks

This brings us to HLA-haplotype cell banking, which may be the feasible option for avoiding immunological rejection. An obvious way to deal with the immunological rejection is production of patient-specific iPS cells that have been reprogrammed to ES-like cells. It is likely, however, that this method will need too much time and costs for each patient. We have estimated that an HLA cell bank containing 200 ES cell lines would cover 80% of the Japanese population providing beneficial HLA-type matching. Furthermore, a smaller bank of only 50 iPS cell lines derived from well selected HLA-homozygous

donors could cover 90% of the population with full matching of the HLA-A, B and DR loci.

We are hopeful that in the future clinical applications using pluripotent stem cells will be developed along these steady steps. We have several successful treatment examples of animal models of disease. Establishing systems based on the animal component free and completely defined media will enable us to begin using the cells produced in those systems, in conjunction with immunosuppressants, to treat spinal cord injuries and conditions such as diabetes. Next, because of the need to reduce immunosuppressant use, there will be a shift toward HLA cell banks and new methods of immunotolerance induction. For iPS cells, it would be best to produce with small molecules due to safety and stability concerns.

However, the generation of iPS cells for individual patients, and the testing of those cells for stability and safety, will be time-consuming and costly. We think that a very practical approach for medical treatment is to ask HLA-homozygous volunteers to donate somatic cells for the creation of HLA-haplotype iPS cell banks. If such banks could be created by the

joint efforts of various countries, the results would be extremely useful worldwide.





医科学研究、創薬、再生医療の ための多能性幹細胞株

中 辻 憲 夫

Norio Nakatsuji / Japan

京都大学 物質・細胞統合システム拠点 拠点長 / 京都大学 再生医科学研究所 教授



ヒト ES 細胞から疾患 モデル系作製や創薬研究

私たちは長く ES 細胞について研究してきました。ここでは、臨床応用可能なヒト ES 細胞作製、創薬研究への応用、HLA タイプを集めた細胞バンクについてお話ししたいと思います。

私たちは 5 年前に日本ではじめてヒト ES 細胞株を樹立し、3 株 (KhES-1、KhES-2、KhES-3) を 30 カ所以上の国内施設に提供して、研究を支援してきました。今日もなお私たちが日本で唯一の ES 細胞株樹立に成功している施設です。

これから数年内に臨床応用可能な ES 細胞株を作製する条件にはどんなものがあるのでしょうか。それには動物成分を含まない合成培地による培養システムが必要であり、このために現在、P. アンドリュース教授が組織する国際共同研究プロジェクトが進行中です。共同研究では 10 種類程度の合成培地を比較検討中で、私たちも参画しています。研究設備としては、京都大学再生医科学研究所内にヒト ES 細胞用の細胞プロセッシング

センターを整備しました。ソフト面では、標準作業手順 (SOP) の作製について国際的な共同作業が進んでおり、これに沿って準備を進めるつもりです。

創薬研究になぜヒト多能性幹細胞が有効なのでしょう。それはヒトのさまざまな細胞や目的に応じて遺伝子改変した細胞を無限に供給できるからであり、特に肝細胞や心筋細胞は薬の安全性試験にきわめて重要です。日本では 4 年前から疾患モデル細胞の作製や安全性試験の系をヒト ES 細胞から作製する大きなプロジェクトが進行中です。

ここで紹介するのは、心筋細胞による副作用・安全性の試験です。現在実施されている心毒性試験では、動物の細胞株にヒトのイオンチャネル遺伝子を発現させ、新薬候補がイオンチャネルを阻害するかどうかを調べています。私たちはヒト ES 細胞から心筋細胞を分化誘導し、これを使ってある薬剤が QT 延長を示すかどうかを検出することに成功しました。この研究はバイオベンチャーのリプロセル社 (ReproCELL) と共同で実施しており、ほぼ実用化レベル

に到達しています。現在の試験法で副作用がないとされている薬剤でも、私たちの開発した心筋細胞アッセイでは QT 延長が検出されるものがあり、また逆の例もありました。心筋細胞アッセイの結果は、ヒトやイヌなどの *in vivo* 試験の結果と一致するものでした。このアッセイは、新薬候補の安全性試験をより効率よく進めるのにすぐにでも貢献すると思われます。

さらに ES 細胞は、疾患モデルの作製や遺伝子改変による疾患メカニズムの解析にも役に立ちます。現在進めているプロジェクトでは、原因遺伝子が解明されている家族性筋萎縮側索硬化症 (ALS)、アルツハイマー病、ハンチントン病を対象としています。これらの疾患の正常型と突然変異型の原因遺伝子を ES 細胞に発現させて、疾患メカニズムの解析とスクリーニング系の構築を試みています。例をあげると、アルツハイマー病の原因遺伝子であるプレセニリン 1 の突然変異型遺伝子を導入した ES 細胞から神経細胞を分化誘導すると、この細胞ではアミロイド β 42 の比率が β 40 に比べて 2 倍ほど増加していることが判明しました。

プロフィール Profile

1972 京都大学理学部 B. S.
1977 京都大学大学院理学研究科 理学博士

1978 ウーメオ大学助手 (スウェーデン)
1978 マサチューセッツ工科大学研究員 (アメリカ)
1980 ジョージワシントン大学医学部研究員 (アメリカ)
1983 MRC 哺乳類発生学部門客員科学者 (英国)
1984 明治乳業ヘルスサイエンス研究所研究室長
1991 国立遺伝学研究所教授
1999 京都大学再生医科学研究所教授
2003 京都大学再生医学研究所所長 (-2007)
2007- 京都大学物質・細胞統合システム拠点 創立拠点長、教授

2004 日経 BP 技術賞
2004 京都新聞文化学術賞大賞

受賞等
(抜粋)

これはアルツハイマー病患者で観察されているのと同じ現象であり、この事実から、疾患モデルとして立派に構築されていることがわかりました。

細胞バンクで臨床に貢献

次に HLA ハプロタイプ細胞バンクについてお話しします。HLA タイプ細胞バンクは現実的に実行可能な拒絶反応回避法であると考えます。拒絶反応解決策としては、リプログラミングによる患者特異的 iPS 細胞作製がありますが、これを実際に臨床応用する場合に必要な日数と費用は個別患者にとって限度を超えるでしょう。私たちの解析結果では、日本人においては 200 株の ES 細胞バンクを作れば 80% をカバーして拒絶反応を低減できるはずで、さらに 50 株という少数の iPS 細胞株をうまく選んだ HLA ハプロタイプがホモ型の体細胞ドナーから樹立すれば、90% の日本人が HLA-A, B, DR の 3 座すべて適合させることが可能であり、きわめて有益であるという結論に達しています。

将来、多能性幹細胞を利用した

臨床応用がどのようなスケジュールで進んでいくかを私なりに考えてみたいと思います。いくつかの疾患については動物疾患モデルによる成功例があります。完全合成培地や動物成分フリーの培養系を確立すれば、臨床試験が脊髄損傷や糖尿病などを対象に、免疫抑制剤を投与しながら始まっていくと考えられます。次には免疫抑制剤を軽減することが求められるので、HLA タイプ細胞バンクや新しい免疫寛容誘導方法を利用することになるでしょう。iPS 細胞については安全性と安定性の点から、低分子化合物による作製が理想です。

患者さん個人の iPS 細胞を作製し、安定性や安全性を調べるには長期間と多大な費用が必要です。臨床応用のためには HLA タイプがホモ型のドナーに体細胞を提供してもらい、細胞株バンクを作ることが現実的な方策だと言えるでしょう。もし各国の共同作業でバンクができれば、世界中で利用できて非常に有益です。





The Australian Stem Cell Centre

Stephen Livesey

Australia

Chief Executive Officer, Australian Stem Cell Centre



Status of stem cell research in Australia

After I have introduced you to the status of stem cell research in Australia, I will discuss the contents of research that we are currently conducting, and also give you an idea of how we can contribute within the context of the international system for cooperation in iPS cell research.

The Australian Stem Cell Centre (ASCC) was established in 2002, with support from the Australian federal government and the state of Victoria, to serve as an Australian Centre of Excellence for stem cell research. The goal of the ASCC is to deliver therapeutic and commercial benefits from stem cells and related technologies. The ASCC thus plays a role in the regulation, funding, and scientific strength (through strengthening research activity) of stem cell research. Our job includes promoting interdisciplinary and international cooperation, and building systems for cooperation between industry and academia. Numerous universities and research laboratories have become stakeholders in this process, and have been joined recently by pharmaceutical companies and

venture capitalists.

ES cells and somatic (adult) stem cells constitute the core focus of research at ASCC. We are putting particular emphasis on haematology-related research for future use in blood transfusion.

Australian legislation regarding stem cell research has been revised twice to date. In 2002, legislation was passed permitting new ES cell lines to be established from embryos frozen prior to that time. In 2006, the Lockhart Review permitted therapeutic cloning and allowed new cell lines to be established from new ES cells and somatic cells.

ASCC stem cell research

After I have introduced you to the status of stem cell research in Australia, I will discuss the contents of research that we are currently conducting, and also give you an idea of how we can contribute within the context of the international system for cooperation in iPS cell research.

The Australian Stem Cell Centre (ASCC) was established in 2002, with support from the Australian federal government and the state of Victoria, to serve as an Australian Centre of Excellence for stem cell research. The goal of the ASCC is to

deliver therapeutic and commercial benefits from stem cells and related technologies. The ASCC thus plays a role in the regulation, funding, and scientific strength (through strengthening research activity) of stem cell research. Our job includes promoting interdisciplinary and international cooperation, and building systems for cooperation between industry and academia. Numerous universities and research laboratories have become stakeholders in this process, and have been joined recently by pharmaceutical companies and venture capitalists.

At present the ASCC is reviewing the characteristics of stem cells, including iPS cells, from a variety of directions with regard to the elucidation of mechanisms in the areas of genetic stability, heterogeneity, transcriptome sequencing, and directed differentiation.

CD30 is considered to be a surface antigen marker that can be used to indicate the genetic stability of pluripotent cells. Human ES cells are highly heterogeneous, so when considering future clinical applications of such cells it will be necessary to have access to technology that can use this type of marker to measure the status of cells within a cell culture.

Profile

Education

- 1974 B. Med. Sci., The University of Melbourne, Department of Medicine, Repatriation General Hospital, Heidelberg West, Victoria, Australia
- 1977 M.B. B.S. (Medicine) The University of Melbourne Victoria, Australia
- 1985 Ph.D., Thesis title "Phosphorylation in the action of peptide hormones" The University of Melbourne, Department of Medicine, Repatriation General Hospital, Heidelberg West, Australia

Awards and Honors

- 2004 George W Hyatt Memorial Award, American Association of Tissue Banks.

Research Appointment

- 1984-1985 Senior Research Officer, Department of Medicine, Repatriation General Hospital, Heidelberg West, Victoria, Australia
- 1985-1988 CJ Martin Fellowship - Research Assistant Professor & Assoc. Director, Cryobiology Research Centre, Grad School Biomed Sci, University of Texas Health Science Centre at Houston, Texas.
- 1988-1990 Wellcome Senior Research Fellow, St. Vincent's Institute for Medical Research, Victoria.
- 1991-1993 Executive Vice President, Scientific Development LifeCell Corp., The Woodlands Texas USA.
- 1993-2003 Executive Vice President & Chief Science Officer, LifeCell Corporation, Branchburg, NJ USA.
- 2003-2006 Chief Scientific Officer & Director of Tissue Repair, Australian Stem Cell Centre, Australia.
- 2006-present Chief Executive Officer, Australian Stem Cell Centre, Australia

We have used the GCTM-2 and CD9 markers as indicators to successfully separate and classify an ES cell population into multiple subpopulations. By using microarrays to measure each of these populations, we are able to divide the populations into cell populations showing advanced differentiation and undifferentiated cell populations that still retain pluripotency. We have also discovered new markers. By using such markers as a "genetic signature", we can assess and differentiate stem cell status.

Feeder cells are also needed to support the proliferation of stem cells in the culture medium. We are applying cytobiologic and bioinformatic methodologies to study feeder cell secretory factor and cell surface molecules, in order to analyze the mechanisms by which the feeder cells provide support for the stem cells. Our results are gradually making it clear that stem cells and feeder cells are linked either via secretory factor or by direct binding.

We are also involved in transcriptome analysis. By thoroughly analyzing the occasional intracellular expression of mRNA, we can define cell status. This is promising for applications in a variety of research methods

such as RNA interference. At present we are working toward the implementation of transcriptomics, and progress is being made in the analysis of cell status for a variety of cell types including ES cells, embryoid bodies, and substances such as hemoglobin, which are even further differentiated.

Also, in order to use stem cells it is necessary to be able to control directed differentiation. In order for ES cells to produce blood, it is necessary to repeat within the cell culture the developmental process that starts with the embryo and progresses through mesoderm formation to create the hematopoietic system. In the process of differentiation, the genetic expression of sequential changes is manifested as differential changes. Quantitative analysis will show, for example, that as the ES cells differentiate by way of the embryoid body, the Oct4 level decreases, and that along with directed differentiation into the hematopoietic system, the level of γ -globulin increases.

In order to understand and use this directed differentiation, we are developing reporter genes. We are working on a method to induce ES cells to form hematopoietic precursor cells, using these reporter genes as indicators, and

are making our results public.

Toward international cooperation

In conclusion, I would like to say a few words about international cooperation. In 2004, in conjunction with a Canadian group, we established the Consortium of Stem Cell Networks (ICSCN). This organization serves as a "network of networks" to connect stem cell research to regenerative therapy. Today the ICSCN includes 18 organizations from around the world. Stem cell research is being advanced by sharing information within this network, and by exchanging human resources through workshops and visiting researcher programs.

The Stem Cell Network Asia Pacific (SNAP) provides an additional platform for international cooperation. Participating in this organization are Australia, Japan, China, Korea, Taiwan, Thailand, India, and Singapore. We hope that this network will build cooperative systems that accelerate stem cell research.





オーストラリア幹細胞センターについて

ステファン・リヴゼイ

Stephen Livesey / Australia

オーストラリア幹細胞センター CEO



オーストラリアにおける 幹細胞研究の状況

私は、まずオーストラリアの幹細胞研究の状況についてご紹介したあと、私たちが取り組んでいる研究内容について述べ、これからの国際的なiPS細胞研究協力体制のなかで、私たちがどのように貢献できるかを、お示ししたいと思います。

オーストラリア幹細胞センター(ASCC)は、オーストラリアの幹細胞研究の中心組織となるべく、連邦政府、そしてビクトリア州政府の援助のもと、2002年に設立されました。ASCCの目的は「幹細胞と関連技術から、治療応用と経済的効果をもたらす」ことにあります。このため、ASCCは幹細胞研究に対する規制、研究資金提供、そして研究振興という役割を担っており、その活動のなかでは学際的・国際的な協力関係や産学連携体制を構築していくことが求められています。このため、多くの大学や研究所、さらに最近では製薬会社やベンチャー企業が、関与者として参画しています。

ASCCにおける研究の柱となっ

ているのはES細胞、そして体性幹細胞の研究です。特に将来の輸血利用を考えた血液学関連の研究に力を入れています。

オーストラリアでは、これまで2回、幹細胞研究に関する法律の改正がありました。まず2002年には、これ以前に凍結保存された胚からES細胞株を樹立することが許されました。そして2006年のロックハート報告では、治療目的でのクローニングを行うこと、また新しいES細胞と体細胞から新しい細胞株を樹立することが許されました。

ASCCでおこなわれている 幹細胞研究

現在、ASCCではiPS細胞を含む幹細胞の特性を、遺伝的安定性、不均質性、遺伝子発現傾向や定方向の分化をもたらす機構の解明など様々な方向から調査しています。

まず、CD30は多能性細胞の遺伝的安定性を示す表面抗原マーカーとみなされています。ヒトES細胞というのは極めて不均質な存在ですから、こうしたマーカーを

利用して、培養中の細胞の状態を測定する技術は、将来の治療応用を考えても重要です。

私たちがES細胞の集団をGCTM-2とCD9マーカーを指標に分別してみたところ、幾つかの細胞集団に分類することができました。このそれぞれの集団をマイクロアレイで測定してみると、分化が進んだ細胞集団や、未分化で多能性を維持している細胞集団を区別できていることがわかりました。さらに私たちは、新しいマーカーも発見しています。こうしたマーカー、すなわち細胞の「遺伝子的な署名」を利用することによって、幹細胞の状態を判定し、区別することができるのです。

また、幹細胞を培養するためには、同時に幹細胞の増殖を助けるフィーダー細胞が必要です。私たちは、細胞生物学やバイオインフォマティクスの手法でフィーダー細胞の分泌因子や細胞表面分子を研究することにより、このフィーダー細胞が幹細胞を補助する機構を解析しています。この結果、幹細胞とフィーダー細胞が分泌因子や直接の結合を介して関連している様子が、次第に明らかになっていま

プロフィール Profile

学歴	1974	メルボルン大学医学部復員総合病院 B. Med. Sci. (オーストラリア・ビクトリア州ハイデルベルグウェスト)
	1977	メルボルン大学 M.B. B.S. (医学) (オーストラリア・ビクトリア州)
	1985	博士論文題名「ペプチドホルモンの作用におけるリン酸化反応」 メルボルン大学医学部復員総合病院 (オーストラリアハイデルベルグウェスト)
研究歴	1984-1985	復員総合病院医学部 シニア研究員 (オーストラリア・ビクトリア州ハイデルベルグウェスト)
	1985-1988	テキサス大学ヒューストン校健康科学センター生物医科学大学院 低温生物学研究 センター CJ マーティンフェローシップ 研究助教授、副所長 (テキサス)
	1988-1990	セントヴィンセント医学研究所 ウェルカムシニア研究員 (ビクトリア)
	1991-1993	サイエンティフィックデベロップメントライフセル社 取締役副社長 (アメリカ・テキサス州ウッドランド)
	1993-2003	ライフセル社 取締役副社長、チーフ研究役員 (アメリカ・ニュージャージー州ブランチブルグ)
	2003-2006	オーストラリア幹細胞センター チーフ研究役員、組織修復部長 (オーストラリア)
歴	2006- 現在	オーストラリア幹細胞センター CEO

2004
米国組織バンク協会
George W Hyatt 記念賞
受賞等
(抜粋)

す。
さらに、トランスクリプトーム解析もおこなっています。この手法では、そのときどきに細胞内で発現している mRNA を網羅的に解析することで、細胞の状態を定義づけることができ、RNA 干渉など様々な研究手法への展開が期待されます。現在はトランスクリプトミクスの実現に向けて、ES 細胞や胚様体、さらには分化したヘモグロビンなど、様々な細胞状態の解析を進めているところです。
そして、幹細胞を利用するためには、定方向の分化を制御することが必要です。ES 細胞が血液を作り出すには、胚から始まり、中胚葉を経て造血系を作り上げていくという発生過程を、培養中に反復することが重要になります。分化の過程では、遺伝子の発現が時系列的に変化していくことが、形質上の変化となって現れます。定量的に測定すると、たとえば、ES 細胞が胚様体を経て分化するにつれて Oct4 が減っていく一方、造血系への定方向分化につれて γ-グロブリンが増加していきます。
こうした定方向分化を理解し、利用するために、私たちはレポー

ター遺伝子を開発しています。このレポーター遺伝子を指標にして、ES 細胞を造血細胞前駆体に誘導していく方法を開発し、これらの成果を発表しています。

国際協調に向けて

最後に、国際協調の観点でお話ししておきましょう。幹細胞研究を再生医療に繋げるため、私たちがカナダのグループとともに 2004 年に設立した「幹細胞ネットワーク国際コンソーシアム (ICSCN)」は、「ネットワークのためのネットワーク」です。現在では世界中から 18 の組織が参加している、このネットワークのなかでは、情報の共有や、ワークショップや研究者の派遣などを通じた人的交流をおこなうことで、幹細胞研究を推進しています。
国際協調のためのもう一つのプラットフォームは、アジア太平洋幹細胞ネットワーク (SNAP) です。この組織には、オーストラリア、日本、中国、韓国、台湾、タイ、インド、シンガポールが参加しています。こうしたネットワークを通じた協力体制のなかで、私たちは幹

細胞の研究を加速化したいと願っています。



International Symposium on Induced Pluripot

Panel Discussion
on International Cooperation
in Pluripotent Stem Cell-Related Research

Shin-Ichi Nishikawa Japan

Deputy Director of RIKEN Center for Developmental Biology /
Group Director of the laboratory for Stem Cell Biology



Education	1967 - 1973	Graduate School of Medicine, Kyoto University
	1973	Obtained a medical license (License# 220365)
	1987	Philosophy Doctor (PhD) at the School of Medicine, Kyoto University
Research Appointment and Honors	1973 - 1980	Intern, resident, and principal physician Hospital of Chest Disease Research Institute, Kyoto University
	1980 - 1983	Postdoctoral Fellow, Institute for Genetics, Cologne University
	1983 - 1987	Associate Professor, Dept. Microbiology, Chest Disease Research Institute, Kyoto University
	1987 - 1993	Professor, Dept. Morphogenesis, Institute of Embryology and Molecular Genetics, Kumamoto University Medical School
	1993 - 2003	Professor, Dept Molecular Genetics, Graduate School of Medicine, Kyoto University
	2000 - present	Deputy Director of RIKEN Center for Developmental Biology and Group Director of the laboratory for Stem Cell Biology

Fritz von Siebold Prize (Germany)
Mochida Medical Foundation Prize (Japan)
Kiyodera Makoto Prize (Japan)

Robert A. Goldstein USA

Chief Scientific Officer , Juvenile Diabetes Research Foundation



Education	1962	Brandeis University—A.B.
	1966	Jefferson Medical College—M.D.
	1976	George Washington University— Ph.D. Microbiology/Immunology
	1992	New York University, Stern School of Business—M.B.A.
Research Appointment and Honors		National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health,
	1978 - 1984	Chief, Allergy and Clinical Immunology Branch
	1984 - 1988	Chief, Clinical Immunology and Immunopathology Branch
	1988 - 1997	Senior Medical Staff, Laboratory of Clinical Investigation
	1988 - 1997	Director, Division of Allergy, Immunology and Transplantation
	1997 - present	Chief Scientific Officer, Juvenile Diabetes Research Foundation

Member, Board of Directors, International Society for Stem Cell Research
JDRF Representative, International Stem Cell Forum
Participant, National Academy of Sciences Workshop on Embryonic Stem Cell Research
Participant, California Institute of Regenerative Medicine Advisory Committee
Chairman, Genomics Subcommittee, US Food and Drug Administration Science Board
Member, UK National Institute for Health Research Advisory Board
Member, National Executive Committee, Immune Tolerance Network
JDRF Representative, Diabetes Mellitus Interagency Coordinating Committee (DMICC) Strategic Plan Executive Committee, National Institutes of Health
JDRF Representative, Autoimmune Diseases Coordinating Committee, National Institutes of Health
Member, Board of Directors, Australia Diabetes Vaccine Development Centre

Jyotsna Dhawan India

Group Leader, Centre for Cellular and Molecular Biology, Hyderabad, India. Member,
Government of India Department of Biotechnology Task Force on Stem Cells and Regenerative Medicine



Education	1991	Ph.D. Boston University School of Medicine, Boston, USA
	1991	Postdoctoral Research Fellow Dept. of Molecular Pharmacology, Stanford University, USA
	1995	Research Associate, Dept of Neurology and Neurological Sciences, Stanford University, USA
	1996 - present	Scientist (Principal Investigator) Center for Cellular and Molecular Biology Hyderabad India
Research Appointment and Honors	1992-1994	Postdoctoral Fellowship from the Muscular Dystrophy Association of America
	1998	Visiting Professor, Cold Spring Harbor Laboratory
	2001	Visiting Professor, Institute for Molecular Agro-biology, Singapore
	2003	Member, Govt. of India Dept. of Biotechnology Task Force on Stem Cells and Regenerative Medicine
	2004-2009	International Senior Research Fellowship, Wellcome Trust, UK

ent Stem [iPS] Cell Research – Frontier and Future –



panelist

Peter W. Andrews

Department of Biomedical Science, University of Sheffield, UK

Joseph Itskovitz-Eldor

Stem Cell Research Center, Israel Institute of Technology, Israel

Rudolf Jaenisch

Whitehead Institute, Massachusetts Institute of Technology, USA

Irving L. Weissman

Stanford Institute for Regenerative Medicine, USA

Hans R. Schöler

Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Germany

Research assistance activities by patient groups in the U.S. and the state of research in India

Nishikawa In this session, I'd like to have a frank discussion about iPS cell research. First, I'd like to hear from our two panelists. Professor Goldstein.

Goldstein The Juvenile Diabetes Research Foundation was established in 1970 by the parents of children with Type 1 diabetes. Our mission is to find a cure for diabetes and its complications through the support of research. In 2007, JDRF provided research funding assistance of more than \$138 million. The organization also conducts political activities, such as testifying before the United States Congress about the state of Type 1 diabetes care.

In 2000, when JDRF first began to support stem cell research, there was no national policy or unified set of regulations in the United States. So we established our own Stem Cell Research Oversight committee, including leading researchers and ethicists. JDRF cooperates with the National Institutes of Health to help make this research possible.

At JDRF, we have always recognized that stem cell research in the U.S. alone is not enough, that genuine international cooperation

is required. That's why we fund research internationally, and we support the International Society for Stem Cell Research.

JDRF is deeply involved in supporting stem cell research, and we have also been active in the political and ethical discussions of this science. In the US, for example, we have established cooperative relationships with other patient groups. We have participated in various international forums. In new research domains where contention arises, as with stem cell research, support activities like ours are necessary.

After the emergence of iPS cells, JDRF has heard the opinion, "ES cells aren't necessary anymore." However, our knowledge is still very limited. We hope to see a range of stem cell research, including ES cells, iPS cells and so on, in the future.

Finally, I would like to remind everyone that we must all be honest. When ES cells emerged 10 years ago, many people suggested that cures would start right away. We mustn't give priority to making headlines in newspapers. When we look ahead 10 or 15 years, I really hope to see a steady march of research towards treatment of disease using cell-derived tissues.

Nishikawa Thank you. Next Group Leader Dhawan.

Dhawan I will report on the situation in India.

In India a task force has been created under the Department of Biotechnology (DBT) of the Ministry of Science and Technology, and the government is supporting research. The public perception of stem cell research is good and there appears to be a wide acceptance of stem cell research.

Last year, research Guidelines were announced following public debate. In line with this research policy, a wide range of stem cell research is being pursued in several research centers in different parts of India, with about 20 research groups working on ES cells, somatic stem cells and so on.

Private companies, universities and government institutes are being funded to research hES cells under the DBT-led projects. Stem cell research programs are also underway at reproductive medicine research institutions.

These research programs are producing new human feeder cell lines which are important for the culture of human stem cells, as well as attempts being made to create feeder-free lines. There are also research programs using marmosets which are small primates, and for corneal and retinal regeneration treatments using cell therapies. iPS cell research is also being planned at present.

Of course, we're also participating in the new networks in the Asia-Pacific area, and we're also



International Symposium on Induced Pluripot

Panel Discussion on International Cooperation in Pluripotent Stem Cell-Related Research

strengthening our systems of cooperation with other countries. We're also actively holding international meetings, and I hope you will all come and take part.

Nishikawa Thank you. When I first heard Professor Yamanaka's presentation about mouse iPS cells, Dr. Giulio Cossu, a famous Italian researcher who was next to me muttered, "This research will change politics". Just hearing what people have said up to this point makes me think that what he said has come true.

The situation surrounding research in each country

Jaenisch As Professor Goldstein said, when iPS cells appeared, the U.S. government immediately said, "Look, we didn't need ES cells". With mice, there's enough research data for comparison and it's understood that ES cells and iPS cells have the same capabilities. With humans, however, this point is still unknown. So of course we still have to research ES cells. hES cells may eventually become unnecessary, but for the time being at least, they're an important subject of research.

Nishikawa How about at the California Institute for Regenerative Medicine?

Weissman After the possibility of new models for the study of normal and abnormal development from human ES cells held the possibility of deriving new ES cells by nuclear transfer of cells from patients with genetic diseases, I wondered if such cells could recapitulate the disease process *in vitro* or in SCID-hu mice. In 2001 I was a chair of a panel of the National Academies (NAS, NAE, IOM, NRC) to look at reproductive cloning by nuclear transfer (NT) and derivation of pluripotent stem cells by NT. We unanimously called

for a halt in human experiments for reproductive cloning for medical ethical reasons, but advocated NT to produce human disease specific cell lines; however, President Bush by executive order forbade NT research with federal dollars for ideological reasons.

I think this is the first time in the United States that the direction of research has been constrained by religion and ideology.

That's when I was consulted by the parents of patients in California who wanted the scientific community to pursue the research. Rather than following religious or political purposes, the noblest aim of scientific research should be to save people's lives. So I decided to advocate this type of research, mainly with the people of the Juvenile Diabetes Research Foundation. Through these activities, the methods of research and approaches to evaluation began to change. As a result of these efforts, there is beginning to be a change in the direction of the research that's permitted in California.

I'd like you to understand that it was at this time that iPS cells appeared. The iPS cell research was carried out in a wonderfully judicious manner. But at the moment, it's important not to make the dangerous gamble of saying "this is good and this is bad".

We must keep an open mind, and put more effort into basic research, both NT and iPS to produce human disease pluripotent stem cell lines.

Two large religious organizations have launched lawsuits against California's approach to research. At present the court has issued an injunction against them, and research is also getting started. But this resolution has taken three years. If we had pursued research during this time, many people might have been saved.

Goldstein In the restrictions imposed in 2001, NIH investment in research using embryonic stem cells was limited. The current US presidential candidates, and the Congress, are tending towards approving future research. So in future NIH may well increase its research funding in this topic.

Nishikawa But in Israel religious doctrine allowed the use of surplus embryos, didn't it?

Itskovitz I think we were lucky. In Jewish doctrine, life begins after the egg is implanted, so there's no problem with using preimplantation embryonic ES cells in research. We first started our ES cell research in 1998 outside America. The Israeli government and society in general supported the research.

From an early stage, we established an industry-government-academia joint project for stem cell research. We obtained cooperation from NIH in the US and also from Europe, and have been conducting fruit-bearing research. Since we have this foundation of allowing stem cell research, there is no controversy in Israel over working with iPS cells.

Nishikawa Conversely, there have been a number of ongoing problems in Germany, but at last things are beginning to change.

Schöler In Germany we have the "Embryo Protection Law". So taking ES cells from surplus embryos is prohibited, and importing stem cells and research cooperation outside the country has also been prohibited.

However, with the emergence of iPS cells, the situation has changed greatly in the last six months. The current matters under discussion are the same as in America, with the opposition faction saying, "We don't need ES cells", and supporters insisting that we need them more than ever. A majority of politicians seem to think that human ES

cell research is necessary. Only one month ago, there was a new proposal for relaxing the restrictions on research.

Issues with clinical applications of iPS cells

Nishikawa Now I have a question for Professor Andrews, Director of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR). What do you think is the key to using iPS cells safely in clinical applications?

Andrews I think the key will be the stability of gene expression of the iPS cells. To understand the changes occurring in iPS cells, we must compare as many cell lines as possible. At the moment, the phenotype of iPS cells made separately can be thought to be similar, but it is necessary to investigate that thoroughly.

Also, finding out whether iPS cells have the same characteristics as ES cells, and whether reprogramming is complete, is important, in addition to safety evaluation. Furthermore, epigenetic change will probably also be key. This can be said for all stem cell research, not only iPS cells.

International cooperation is essential for this kind of research. The ISCI (The International Stem Cell Initiative) holds a workshop every year. In the first year, researchers from each country brought their data for discussion in order to compare standard indices. That created a good atmosphere which resulted in the cooperative structure we have now. It will be good if we can continue this. By working together, we can obtain more valuable results than by competition.

Nishikawa As Sir Martin Evans said, another important point is that while ES cells and iPS cells have a regenerative capacity, they

are also subject to tumorigenic transformation. This is surely going to be an issue for applications in treatments, but what is the key to resolving it?

Schöler One important thing is to understand the intermediate step in cell differentiation. When you make a substance in chemistry, what's important is producing an intermediate. By gaining a detailed understanding of this intermediate state, I think it will be possible to avoid the cells differentiating in the wrong direction and turning cancerous.

Weissman What's needed for treatment is not pluripotent stem cells but tissue stem cells. From that viewpoint, what Professor Schöler says is correct.

Also, for checking the safety of clinical applications, experiments with animal models are effective. Research is also underway to remove undifferentiated cells from within the population that contains tissue stem cells, but to check their safety properly, it won't be possible to tell until they actually go into a living body.

However, this is where politics and ethics show their faces again. In order to check the safety of human stem cells, there's a method of putting them in mice and making a chimera, but this is controversial from the point of view of the religious opinions of some.

Nishikawa How to verify safety is an important issue. It's unknown whether immunodeficient mice that are currently used to check safety are an appropriate evaluation system.

As Professor Andrews says, I think it's necessary to accumulate data on a worldwide basis. At some stage, even if one country doesn't have some data, if we can rely on the data from another country, we'll be able to speed up research.

The future of iPS cell research

Nishikawa If iPS cells are used for drug discovery experiments or are used in basic research combined with the findings of the human genome project, they hold an enormous range of possibilities. Finally, I'd like to ask everybody to say a few words about the prospects for international research cooperation employing iPS cells.

Andrews In the field of cancer research, there are many joint projects that are conducting tests of treatment methods for cancer across national borders. I think it's important to devise technological rules for pursuing this international coordination, and also to keep in step with the research regulation of each country.

Itskovitz But finally I think the problem of intellectual property and technology transfer still remains. How to handle these questions within an international network is an issue that requires solving.

Weissman The problem here is the difficulty of rules. Administrations want a consensus of the whole society, and they want rules that don't involve any risk. They even have rules that forbid clinical trials with child patients who may die of genetic conditions before the age of fifteen. Since it's difficult to pursue a consensus of society as a whole concerning rules, we must think of ways of dealing with these problems.

Dhawan That's right. Consensus must not lead to regulations. First, engagement is important.



International Symposium on Induced Pluripot

パネルディスカッション
「多能性幹細胞関連研究における
国際協調のあり方について」

西川 伸一

Japan

理化学研究所発生・再生科学総合研究センター 副センター長 幹細胞研究グループ・ディレクター

1967-1973 京都大学医学部

1973 医師免許取得 (免許番号 220365)

1987 京都大学医学部 Ph.D.

1973-1980 京都大学結核胸部疾患研究所 研修医、医員、助手

1980-1983 ケルン大学遺伝学研究所博士研究員

1983-1987 京都大学結核胸部疾患研究所付属感染免疫動物実験施設 助教授

1987-1993 熊本大学医学部免疫医学研究施設病理学部門 教授

1993-2003 京都大学大学院医学研究科分子医学系遺伝医学講座 教授

2000-現在 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 副センター長 / 幹細胞研究グループ・ディレクター

1997 財団法人日本リディアオリリー協会 清寺 真記念賞

1999 フィリップ・フランツ・フォン・ジーボルト賞 (ドイツ)

2002 財団法人 持田記念医学薬学振興財団 持田記念学術賞

ロバート・A・ゴールドシュタイン

USA

若年性糖尿病研究財団科学部長

1962 ブランダイス大学—学士

1966 ジェファソン医学大学—医学博士

1976 ジョージ・ワシントン大学—微生物学 / 免疫学 Ph.D

1992 ニューヨーク大学スターン経営学部—M.B.A.

国立衛生研究所国立アレルギー・感染症研究所

1978-1984 アレルギー・臨床免疫学部門チーフ

1984-1988 臨床免疫学・免疫病理学部門チーフ

1988-1997 臨床試験研究所・高齢医学スタッフ

1988-1997 アレルギー・免疫学・移植部門ディレクター

1997-現在 国際青少年糖尿病研究財団CSO

国際幹細胞学会会長

国際幹細胞研究評議会若年性糖尿病研究財団代表

全米科学アカデミー ES 細胞研究ワークショップ委員

カリフォルニア再生医療研究所諮問委員会委員

米国食品医薬品局科学委員会ゲノミクス分科委員会委員長

英国立衛生研究所 (NIHR) 諮問委員会委員

国立執行委員会免疫寛容ネットワークメンバー

国立衛生研究所戦略計画実行委員会糖尿病諸機関間協調委員会 (DMICC) 若年性糖尿病研究財団代表

国立衛生研究所自己免疫疾患調整委員会若年性糖尿病研究財団代表

オーストラリア糖尿病ワクチン開発センター理事

ジョウツナ・ダーワン

India

細胞・分子生物学研究センターグループリーダー (インド・ハイデラーバード), インド政府バイオテクノロジー局幹細胞・再生医療委員会メンバー

1991 ボストン大学医学部 Ph.D. (アメリカ・ボストン)

1991 スタンフォード大学分子薬理学科博士研究員 (アメリカ)

1995 スタンフォード大学神経学・神経科学科研究員 (アメリカ)

1996-現在 細胞・分子生物学センター (インド・ハイデラーバード) 科学者 (主任研究員)

1992-1994 米国筋ジストロフィー協会博士研究員

1998 コールド・スプリング・ハーバー研究所客員教授

2001 シンガポール分子農業生物学研究所客員教授

2003 インド政府バイオテクノロジー局幹細胞・再生医療委員会メンバー

2004-2009 英国ウェルカムトラスト国際主任研究員

80 Report

ent Stem [iPS] Cell Research — Frontier and Future —



panelist

ピーター・アンドリュース

シェフィールド大学 生物科学部 教授 (イギリス)

ヨーゼフ・イツコヴィッツ

イスラエル工科大学 幹細胞研究センター 教授 (イスラエル)

ルドルフ・イエーニッシュ

マサチューセッツ工科大学 ホワイトヘッド研究所 教授 (アメリカ)

アーヴィン・ワイスマン

スタンフォード再生医療研究所 所長 (アメリカ)

ハンス・シェラー

マックスプランク分子医薬研究所 所長 (ドイツ)

アメリカの患者団体による 研究支援活動と インドの研究状況

西川 このセッションでは iPS 細胞研究に関して、率直に意見交換をしていただきたいと思います。まずは二人のパネリストの方にお話を伺います。ゴールドスタイン先生、お願いします。

ゴールドスタイン 私が所属しているアメリカ合衆国の若年性糖尿病研究財団 (JDRF) は、I 型糖尿病の子供を持つ親たちによって 1970 年に誕生しました。JDRF は研究を手助けしていくことで、糖尿病とその合併症に対する治療法を開発することを使命と考え、2007 年度には 1 億 3800 万ドル以上の研究資金援助をおこないました。この他にも、I 型糖尿病医療の現状について議会の場で証言するなど、政治的な働きかけも行っています。

JDRF が 2000 年に本格的な幹細胞研究の支援を始めたときには、政策も規制委員会はありませんでした。そこで私たちは、最先端の研究者や倫理学者たちを交えた研究倫理委員会を設立しました。また研究活動を手助けするため、国立衛生研究所 (NIH) とも協力しています。

しかし、幹細胞研究は合衆国内だけではなく、本当の意味での国際協力が

必要です。そこで JDRF は国際的に活動し、さらに国際幹細胞学会の支援も行っています。

このように、私たち JDRF は研究そのものだけでなく、科学研究をとりまく政治的・倫理的な議論の場においても、積極的に活動してきました。たとえば合衆国内では、他の疾患の患者団体との協力関係を築き上げていますし、様々な国際フォーラムに参加しています。幹細胞研究のように論争をともなう新しい研究領域においては、私たちのような支援活動が必要なのです。

iPS 細胞が登場した後、JDRF は「もはや ES 細胞は不要である」といった意見を耳にしました。しかし、まだまだ私たちの知識は少ないのです。今後も iPS 細胞や ES 細胞など、多様な幹細胞研究が行われることを期待しています。

最後にお伝えしたいのは、私たち皆が正直でなければならない、ということです。ES 細胞が登場した 10 年前には多くの人が、すぐにも治療が始まるようなことを言いました。このように新聞誌上に大見出しを作ることを優先してはいけません。これから 10 年、15 年先を見すえたとき、本当に細胞由来の組織で疾患治療ができるように、地道な基礎研究が重ねられていくことを期待しています。

西川 ありがとうございます。次にダー

ワン先生、お願いします。

ダーワン 私はインドの状況に関して報告します。

インドでは科学技術省のバイオテクノロジー局 (DBT) の下にタスクフォースが作られ、政府が研究支援をおこなっています。国民も幹細胞研究を広く受け入れています。

昨年、公開討論の後で研究指針が発表されました。この研究指針に従い、インドの各地にある研究拠点で 20 ほどの研究グループが、ES 細胞や体性幹細胞などを対象に、幅広い幹細胞研究を行っています。

ヒト ES 細胞については、DBT 主導のプロジェクトのもとで、民間企業と大学や政府研究機関に資金供与を行っています。さらに、生殖医療研究所でも幹細胞研究のプログラムが動いています。

これらの研究プログラムからは、ヒト幹細胞を培養する際に重要な「フィーダー細胞」の新しい細胞株の開発や、さらにはフィーダー細胞が不要な幹細胞株の開発が行われています。さらに小型霊長類のマーモセットを用いた研究や、細胞治療を用いた角膜・網膜再生治療の研究プログラムなども動いています。iPS 細胞の研究も、現在計画されています。

もちろん、新しくできたアジア太平洋



International Symposium on Induced Pluripot

パネルディスカッション「多能性幹細胞関連研究
における国際協調のあり方について」

地域のネットワークにも参加するなどして、他の国々との協力体制も強化しています。国際会議も積極的に開催しておりますので、皆さんにもぜひお越し頂きたいと思います。

西川 ありがとうございます。私が最初に山中教授のマウス iPS 細胞の発表を聞いたとき、隣にいた（イタリアの著名な研究者）ジュリオ・コッシュ先生は「この研究は政治を変える」とつぶやきました。今までのお話を伺っただけでも、それが現実のものになったと感じますね。

研究をとりまく各国の状況

イエーニツシュ ゴールドスタイン先生も述べられたように、iPS 細胞が登場したとき合衆国政府はすぐに「それみたことか、ES 細胞などいらなかった」と言いました。しかし、マウスの場合には比較できるだけの研究データがあり、ES 細胞と iPS 細胞が同じ能力があるということがわかっていますが、ヒトではまだよくわかっていないのです。そのために、やはり ES 細胞を研究する必要があります。ヒト ES 細胞はいずれ不要になるかもしれませんが、少なくとも当面は重要な研究課題です。

西川 カリフォルニア再生医療研究所（CIRM）ではいかがでしょうか。

ワイスマン ヒト ES 細胞の正常と異常な発生に関する研究が進んだことによって、遺伝病の患者さんの細胞から核移植によって新たな ES 細胞を作り出すことができるようになりました。この細胞は、試験管内や重症複合型免疫不全マウス・ヒト（SCID-hu）キメラを用いた実験によって、疾患を再現できると思われました。この2001年当時、国立アカデミー（NAS, NAE, IOM, NRC）の委員会では、核移植による生殖医療目的のクロー

ニングと核移植による多能性幹細胞の誘導について検討しており、私はその委員長を務めていました。私たちは医療倫理の見地に基づき、生殖医療目的のヒトクローン実験の停止を全会一致で求めましたが、核移植によってヒト疾患特異的な細胞株を作ることは推進すべきと考えました。ところが、ブッシュ大統領はこの計画にイデオロギーの面から反対し、大統領権限を行使して、連邦政府の資金による研究を禁止しました。

わたしはこれを、宗教とイデオロギーが合衆国において研究の方向を強制した初めての例と考えています。

そのとき、研究を推進して欲しいというカリフォルニア州の患者の親たちから相談を受けたのです。宗教や政治の目的を高めるためではなく、人々の命を救うことこそが、科学研究の一番崇高な目的のはずです。そこで私は JDRF を中心とした患者団体の人々と研究を進めることにしました。この活動によって、研究の方法や評価の仕方が変わり始めました。こうした努力のすえ、カリフォルニア州では研究許容の方向に動き始めていました。

このタイミングで iPS 細胞が登場した、ということを理解していただきたいと思います。iPS 細胞の研究は、素晴らしく賢明な人たちでなされました。しかし現時点では「これは良くてこれは悪い」という危険な賭けをしないことが大切です。考え方をオープンにして、もっと基礎研究に力を入れ、核移植や iPS 細胞研究によってヒト疾患を治療可能な多能性幹細胞株を作りださなければなりません。

カリフォルニア州の研究姿勢に対しては、二つの宗教団体から大きな訴訟を

受けました。現在は裁判所からかれらに対する差し止め命令が出て、研究も動き始めています。しかし、この解決には3年かかりました。この間に研究を進められていれば、多くの人々が救われていたかもしれません。

ゴールドスタイン 2001年に施行された規制のもとでは、NIH が胚由来の幹細胞研究に提供する資金は限られていました。しかし現在の大統領候補、そして議会は将来の研究を承認する方向です。これからは NIH も研究資金を出すようになるでしょう。

西川 一方、イスラエルは宗教的な教義においても余剰胚を使って良いのでしたね。

イツコヴィッツ 私たちは幸運だったと思います。ユダヤ教の教義のうえでは、卵が着床したあとから生命が始まりますから、着床前の胚由来の ES 細胞を研究に利用することは問題がないのです。私たちは98年に米国外で初めて、ES 細胞研究を開始しました。イスラエル政府も社会も、基本的にこの研究を支持しています。

私たちは早い段階で、幹細胞研究に関する産官学の共同事業体を作りました。これはアメリカの NIH やヨーロッパからも協力を得て、多くの成果を生み出しています。このように幹細胞研究を許容してきた下地がありますから、イスラエル国内では iPS 細胞も騒動になっていません。

西川 逆にドイツではこれまで色々問題が続きだったのが、やっと変わり始めたということですが。

シェラー ドイツには「胚保護法」があります。そのため、余剰胚から ES 細胞

を取り出すことは禁止され、幹細胞を輸入することも、国外との研究協力も禁止されてきました。

しかし、iPS細胞が登場したことにより、この6カ月のあいだに状況は大きく変化しました。現在の議論の内容はアメリカと同じで、反対派は「ES細胞はもういない」と、賛成派は「今こそ必要になっている」と主張しています。過半数の政治家は、ヒトES細胞研究は必要だと考えているようです。つい1カ月前にも、研究規制緩和に関する新提案がなされたところです。

iPS細胞の臨床応用上の課題

西川 国際幹細胞学会の会長を務めておられるアンドリュース先生におきします。iPS細胞を安全に臨床応用するうえでは、どんな点がカギになるでしょうか。
アンドリュース カギとなるのは、iPS細胞の遺伝子発現状態の安定性だと思います。iPS細胞に起こっている変化を理解するためには、できるだけ多くの細胞株を比較する必要があります。今のところ別個に作られたiPS細胞の表現型には、類似性があると考えられますが、それをきちんと調べる必要があります。

またiPS細胞はES細胞と同じ性質を持っているのか、初期化が完全かどうか、安全性評価の上で重要です。さらにエピジェネティックな変化もカギとなるでしょう。これはiPS細胞だけでなく、幹細胞研究全体について言えることです。

こうした研究には、国際協力が不可欠です。国際幹細胞イニシアチブ (ISCI) では毎年ワークショップを開催しています。最初の年は標準指標の比較をするために、各国の研究者がデータを持ち寄って議論しました。それ以降、良い雰囲気

のなかで協力体制ができています。これを継続していくことが望ましいでしょう。協調することによって、競争するよりも価値ある成果が得られるのです。

西川 エヴァンス卿の話にもありましたが、もう一つ重要な点として、ES細胞やiPS細胞には再生能力をもつと同時に腫瘍化するという側面があります。これが治療応用上の問題と考えられますが、この問題を解決するためのカギはなんでしょうか。

シェラー 一つ重要なのは、細胞が分化していく中間のステップを理解することです。化学で物質を作り出す際に重要なのは、中間体を生成することです。こういった中間状態を詳しく知ること、細胞が誤った方向に分化して腫瘍化することを避けられると思います。

ワイスマン 治療のために必要なのは多能性幹細胞そのものではなく、組織幹細胞です。その点で、シェラー先生の指摘は正しいでしょう。

また、臨床応用のための安全性確認には、モデル動物の実験が有効です。組織幹細胞の中から未分化の細胞を取り除く研究もおこなわれていますが、本当の安全性確認のためには、実際に生体内に入れてみないと判定できません。

ところが、ここにまた政治や倫理の問題が顔を出します。ヒト幹細胞の安全性を確かめるためには、マウスの中に入れてキメラを作らせるという手法がありますが、これは、ある種の宗教的な観点から批判を浴びています。

西川 どのように安全性を立証するのかということは大切です。現在、安全性確認に使われている免疫不全マウスが適切な評価系かどうか未明数です。

アンドリュース先生が言われたように、国際的なデータの蓄積が必要だと思います。ある段階で、個々の国がデータをもっていなかったとしても、他国のデー

タに頼ることができれば、研究を加速していくことができます。

iPS細胞研究の未来

西川 iPS細胞は創薬試験への利用や、ヒトゲノムプロジェクトの成果と組み合わせるなど、様々な可能性を秘めています。iPS細胞を用いた国際的な研究協調という見地で、最後に皆さんの展望を伺いたいと思います。

アンドリュース がん研究の分野では、たくさんの共同事業体が、国境を越えてがんの治療方法をテストするということがあります。こうした国際的な協調を進めるための技術的なルールを作り、さらに各国の研究規制の足並みを揃えることが大切でしょう。

イツコヴィッツ ただ、最後には知財の問題、技術移転の問題が残ると思います。こうした問題に対して、国際的ネットワークのなかでどのように取り組み、解決していくかが今後の課題になるでしょう。

ワイスマン そこで問題になるのは、原則ということの難しさです。当局は社会全体の合意を求めて、リスクをとらない原則に流れようとしています。遺伝子疾患で15歳までに死んでしまうかもしれない、という患者さんに対して、小児に臨床試験を行ってはいけない、という原則が適用されています。原則について社会全体で合意を求めていくのは難しいのですから、こうした問題に対処する方法も考える必要があるでしょう。

ダーワン おっしゃるとおりです。合意が規制につながってはいけません。まずは交流するということが大切でしょう。



International Symposium on Induced Pluripot



閉会挨拶 / Closing Address

独立行政法人 科学技術振興機構 理事長

President
Japan Science and Technology Agency

北 澤 宏 一 Koichi Kitazawa

First of all, I'd like to congratulate everybody on making this two-day international symposium such a great success.

I'm a physics and chemistry researcher so I'm a layman in this field, but by participating in the meetings over these two days, I've learned that the field of stem cell research is very broad and it's continuously deepening as an area of scholarship. Professor Yamanaka's establishment of iPS cells has brought a new degree of freedom to the development of research, and I'm very impressed by the significance of its impact.

However, I've learned over these two days that we must give more thought to the ethical issues of these iPS cells. The various difficulties facing researchers and the issues that weigh on your consciences, the way that you think about how to pursue your research and the thought that you give to helping your patients made a very strong impression.

By demonstrating the importance of international cooperation in promoting the development of research and thinking about its direction, I believe this symposium has been extremely significant as a first step.

In addition to these ethical questions, the issue of how the public in Japan regards science in recent years is also fraught with difficulty. This February the

Cabinet Office conducted a public survey with a questionnaire that asked general respondents, "Do you think that science will solve the problems that we face in our future?" Four years ago with the same questionnaire, 65% of respondents answered "No", but it was reported that in February's questionnaire, the results were reversed with 63% answering "Yes". The Asahi Newspaper suggested that iPS cells and other developments had contributed significantly to this change.

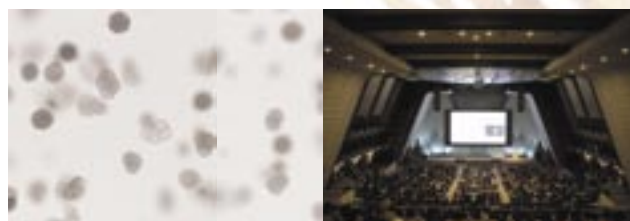
Yesterday in fact, NHK, Japan's nationwide TV network, reported on this symposium on iPS cell research in a news program. Apparently the reports said that this symposium raised a lot of public expectations and dreams, and also that it encouraged young people to face the challenge of difficult issues in our future. I'd like to tell everybody here that this is the message which this international symposium is sending out to the public in general.

The organizing committee was chaired by Professor Hiroo Imura, with committee members of Professor Tasuku Honjo, Professor Ichiro Kanazawa, Professor Tadamitsu Kishimoto, Professor Kiyoshi Kurokawa, and Masatoshi Takeichi. As the representative of JST, the organizer of this symposium, I'm very grateful for the cooperation of these highly esteemed scientists and leaders in Japan's life science

field. Also, Professor Shin-ichi Nishikawa kindly worked as the producer of this symposium. As symbolized by the panel discussion at the end, the symposium has been an extraordinarily unique and significant event, and I'd like to thank Professor Nishikawa for his efforts. The symposium was held in association with the Cabinet Office, the Ministry of Foreign Affairs, the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, the Ministry of Health, Labor and Welfare, the Ministry of Economy, Trade and Industry, Kyoto University and Cell Press, the publication in which Professor Yamanaka originally published his article on iPS research.

Professor Yamanaka took time out of his very busy schedule to help set up the symposium, and the staff of the JST Department of Research Project, Office of Basic Research showed great ingenuity in making it possible in a very short time. I'd like to close this event with words of gratitude to all of these people.

Thank you very much.



まず最初に、この2日間の国際シンポジウムが大きな成功であったことをお祝い申し上げたいと思います。

私自身は物理学あるいは化学の研究者でこの分野には門外漢ですが、この2日間の会議に参加させていただいて、幹細胞研究の分野が非常に大きな広がりを持ち、学問として非常に深まりつつあることを知りました。その中で、山中先生のiPS細胞の樹立が、研究の発展に自由度を与え、大きなインパクトを与えているということに非常に感銘を受けました。

しかし、そのiPS細胞といえども、倫理的な問題についてさらに考えていかなければならないということも、この2日間で学ばせていただきました。研究者の皆さんがいろいろな悩みを抱え、研究者の良心に関わる問題を感じながらも、どのようにして研究を深めていけばいいのか、患者さんたちをどのようにして救えばいいのかを考えておられることにたいへん感銘を受けました。

研究の発展を促すにも、研究の方向を考える上でも、国際協力が非常に重要であることを示せたという点で、このシンポジウムは第1回目として非常に大きな意義を持っていたのではないかと思います。

このような倫理的な問題だけではなく、最近の日本では科学が国民の

間でどのように理解されているかについて、問題を抱えておりました。この2月に内閣府の国民調査が行われ、その中で、一般の人たちに「私たちが抱えている未来の課題を科学が解決してくれると思いますか」という質問をしてアンケートをとりました。4年前のアンケートでは「期待していない」と答えた人が65%だったそうですが、2月に行った同じアンケートではそれが逆転して「期待している」と答えた人が63%になったと報道されました。朝日新聞では、その変化の中には、iPS細胞なども大きく寄与しているのではないかという解析がなされていました。

昨日、このiPS細胞研究のシンポジウムの状況が、NHK（日本のネーションワイドなTVネットワーク）のニュースとして日本国中に放映されたそうですが、このシンポジウムが国民の多くに期待や夢を与えるとともに、多くの若者たちが未来に向けて困難な課題にチャレンジしていくことを促すような雰囲気の記事だったそうです。この国際シンポジウムから、一般の人たちに向けて、科学への希望を与えるメッセージが発信されたということを皆さんにお伝えしておきたいと思います。

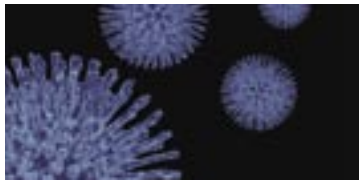
このシンポジウムの実行委員会は、井村裕夫先生が委員長を、本庶佑先生、金澤一郎先生、岸本忠三先生、

黒川清先生、竹市雅俊先生が委員を務めて下さいました。日本のライフサイエンス分野の重鎮であり皆から尊敬を集めておられる先生方のご協力をいただきましたことに、主催者であるJSTの代表として厚くお礼申し上げます。また、西川伸一先生には、このシンポジウムのプロデューサー役を務めていただきました。最後のパネルディスカッションに象徴されるように、シンポジウムがたいへんユニークで有意義なものとなったのも西川先生のご尽力のおかげと感謝しております。なお、このシンポジウムは内閣府、外務省、文部科学省、厚生労働省、経済産業省、京都大学、並びに、山中先生が最初にiPS研究の論文を投稿されたCell Pressの後援を受けることができました。

また、このシンポジウムは、非常にお忙しい中、山中先生にもご協力いただき、JST戦略的創造事業本部研究プロジェクト推進部の職員が非常に短期間で、皆さんの交流の実が上がるように工夫いたしました。その方々にも、御礼を申し上げさせていただき閉会の辞といたします。

どうもありがとうございました。





独立行政法人 科学技術振興機構

戦略的創造事業本部 研究プロジェクト推進部

Tel. 03-3512-3528 Fax. 03-3222-2068

〒102-0075 東京都千代田区三番町5番地 三番町ビル

<http://www.jst.go.jp>

