

戦略的創造研究推進事業
—さきがけ(個人型研究)—
追跡評価用資料

研究領域
「iPS 細胞と生命機能」
(2008 年度～2016 年度)

研究総括: 西川 伸一

2022 年 3 月

目次

要旨	1
第 1 章 研究領域概要	3
1.1 戦略目標	3
1.2 研究領域の目的	3
1.3 研究総括	3
1.4 領域アドバイザー	3
1.5 研究課題および研究者	4
第 2 章 追跡調査	8
2.1 追跡調査について	8
2.1.1 調査の目的	8
2.1.2 調査の対象	8
2.1.3 調査方法	10
2.2 追跡調査概要	11
2.2.1 研究助成金	11
2.2.2 論文	19
2.2.3 特許	23
2.2.4 受賞	25
2.2.5 招待講演	26
2.2.6 報道	26
2.2.7 共同研究や企業との連携	27
2.2.8 実用化・製品化	27
2.2.9 ベンチャー	27
2.3 研究成果から生み出された科学技術や社会・経済への波及効果	28
2.3.1 研究領域の展開状況(展開図)	28
2.3.2 研究成果の科学技術の進歩への貢献	32
2.3.3 研究成果の社会・経済への貢献	34
2.3.4 その他の特記すべき事項	35
2.4 JST-CIRM 共同研究プログラム	35
第 3 章 各研究課題の主な研究成果	39
3.1 2008 年度採択研究課題	39
3.1.1 iPS 法と核移植法の比較による初期化機構の解明 (荒木良子)	39
3.1.2 多発性嚢胞腎患者由来の iPS 細胞を用いた病態解析 (長船健二)	40
3.1.3 体細胞核移植におけるリプログラミング促進技術の開発 (岸上哲士)	41

3.1.4 肝細胞分化関連遺伝子の導入による皮膚細胞からの肝細胞作製技術 (鈴木淳史)	42
3.1.5 細胞リプログラミング技術を用いた免疫細胞再生医療の開発 (清野研一郎)	43
3.1.6 蛋白質導入法による iPS 細胞作製技術開発 (富澤一仁).....	44
3.1.7 任意細胞の樹立法開発 (升井伸治).....	45
3.1.8 非ウイルス的手段による iPS 誘導法の確立 (松田修).....	46
3.1.9 リプログラミングによるがん細胞エピジェネティック異常の起源解明とその臨床応用 (山田泰広).....	47
3.1.10 iPS 細胞を用いたヒト疾患モデルマウス作製法の確立 (佐々木えりか)	48
3.2 2009 年度採択研究課題	49
3.2.1 細胞周期操作による新規卵原幹細胞の樹立 (李知英).....	49
3.2.2 リプログラミングを制御するクロマチン因子の作用機序の解明 (栗崎晃) 50	
3.2.3 細胞リプログラミングの段階的制御 (佐藤伸).....	51
3.2.4 生殖細胞の特性に基づく新しいリプログラミング手法の開発 (永松剛)..	52
3.2.5 順遺伝学による iPS 細胞生成機構の解析 (堀江恭二).....	53
3.2.6 ウサギを用いた iPS 細胞総合(完結型)評価系の確立 (本多新).....	54
3.2.7 リプログラミング技術を用いた遺伝性血管疾患の新規治療標的の同定 (渡部徹郎)	55
3.2.8 Klf ファミリーによる幹細胞機能制御の分子機構 (依馬正次)	56
3.2.9 センダイウイルスベクターを用いた安全な iPS 細胞作製と分化誘導 (房木ノエミ)	57
3.2.10 始原生殖細胞形成機構と iPS 誘導機構の統一原理 (大日向康秀).....	58
3.3 2010 年度採択研究課題	59
3.3.1 染色体異常症候群における合併症の発症メカニズムの解明 (北畠康司)..	59
3.3.2 純然たるヒト iPS/ES 細胞の樹立、維持および増殖機構の解析 (高島康弘)	60
3.3.3 連鎖解析と iPS/ES 技術を用いた遺伝性疾患遺伝子同定法の開発 (伊達英俊)	61
3.3.4 人為的核内環境制御による高品質 iPS 細胞の誘導 (堀田秋津).....	62
3.3.5 リプログラミング技術で解く細胞分化と時計機構の関係 (八木田和弘)..	63
3.3.6 分化・発生を理解する多次元定量計測技術の基盤開発 (渡邊朋信).....	64
3.3.7 疾患 iPS 細胞を用いた大脳皮質構造形成メカニズムの解明 (下島圭子)..	65
3.3.8 心臓細胞未分化性とクロマチン結合因子群 (竹内純).....	66
3.4 JST-CIRM 共同研究プログラム	67

3.4.1 微小環境がヒト iPS 細胞及び胎児由来神経幹細胞の分化・腫瘍化に及ぼす影響 (中村雅也)	67
---	----

要旨

本報告書は、戦略的創造研究推進事業のさきがけ(個人型研究)の研究領域「iPS細胞と生命機能」(2008年度～2015年度)において、研究終了後一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展状況や活用状況等を明らかにし、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)事業及び事業運営の改善等に資するために、追跡調査を実施した結果をまとめたものである。以下のような目次に沿って、本報告書をまとめる。

第1章は、研究領域の戦略目標、研究領域の目的、研究総括、領域アドバイザー、研究課題と研究代表者を記載した。

第2章は、追跡調査の実施の概要と、調査結果の概要、そして領域内の特徴について記載した。具体的には、2.1では、追跡調査の目的、調査の対象、調査方法を記載した。2.2では、各研究代表者が獲得した研究助成金、発表した論文、出願・登録した特許等の成果概要を記載した。2.3では、2.2の成果や各研究課題の展開状況から見た科学技術的および社会・経済的アウトカムの概要を記載した。また、研究領域の展開状況を、展開図としてまとめた。

第3章は、さきがけの研究領域終了後の各研究課題の研究の継続と発展状況について、科学技術の進歩の貢献および社会・経済的な波及効果の観点から詳述した。具体的には、研究者によるさきがけ研究期間中の成果を端的に纏めるとともに、それを踏まえて研究終了後に発展した内容について、代表的な事例を個別に記載した。ベンチャー設立など、特筆した成果のあるものは、特記事項として整理した。

この領域では、「細胞リプログラミングに立脚した幹細胞作製・制御による革新的医療基盤技術の創出」が戦略目標として設定され、細胞のリプログラム過程における分子生物学的機構に基づく、リプログラミング技術の高度化・簡便化の研究が行われた。また、この研究を通じて、患者由来の体細胞などからモデル細胞を構築し、疾患発症機構の解明や新規治療戦略、薬剤副作用の検証法などの基盤技術を構築するという目的の達成を目指した。

この領域で行われた研究は、我が国の幹細胞研究のポテンシャルを活かし、細胞リプログラミングに立脚した基盤的研究の推進による、高齢化社会において求められる根治療法や予防医療への展開が、将来的に期待されている。また、幹細胞研究自体も、幹細胞という視座に立った、発生・再生現象から疾患発症や老化に伴う組織機能低下機構の解明までの総合研究分野として更なる発展が期待されている。

追跡調査の結果、本領域で得られた研究成果は終了後も発展、深化されているのみならず、ヒト iPS 細胞を安定化させる技術の開発、既存の iPS 細胞より未分化であり安定しているナイーブ型 iPS 細胞の開発、ヒト iPS 細胞から様々な臓器の誘導等、特に、創薬研究に活用される技術に展開されていることが分かった。

特に注目すべき研究成果としては、ヒト iPS 細胞から腎組織や胆管の作製に成功した長船健二の成果、ダイレクトリプログラミングの手法を用いたヒト血管内皮細胞から肝前駆

細胞の作製に成功した鈴木淳史の成果、脳科学研究のモデル動物に特に活用される遺伝子改変マウスを開発した佐々木えりかの成果、等が挙げられる。これらの研究者の一部には、インタビューを実施し、概要をまとめた。

なお、本研究領域と並行して 2009 年度から 2013 年度にかけて JST-CIRM 共同研究プログラムが実施され、iPS 細胞に関連する課題 1 件を支援した。この課題の追跡調査結果についても本研究領域と合わせて報告する。

第 1 章 研究領域概要

1.1 戦略目標

「細胞リプログラミングに立脚した幹細胞作製・制御による革新的医療基盤技術の創出」

<達成目標>

分化した細胞を再び多能性幹細胞に戻すリプログラミングは、これまでにない革新的な医療を可能とする技術として注目されている。2006 年続いて 2007 年に京都大学の山中伸弥教授らが本技術に大きなブレークスルーをもたらしたことをうけ、本戦略目標では、細胞のリプログラム過程における分子生物学的機構に基づき、リプログラミング技術の高度化・簡便化を目指す。また、本技術を用いて患者あるいは健常人由来の体細胞などから幹細胞を作製し、疾患の発症機構の解明を行いこれに基づく革新的治療戦略、薬剤副作用の検証技術などの基盤技術を確立する。(本研究領域事後評価用資料から転記)

1.2 研究領域の目的

本研究領域「iPS 細胞と生命機能」(2008 年度発足)は、日本発となる iPS 細胞を樹立する技術によって大きなブレークスルーがもたらされると考えられる分野、すなわち、細胞のリプログラミング、分化転換、幹細胞生物学などを対象とした。また、これまでにはない自由で創意に満ちた発想による基礎研究とともに、医療などに将来貢献できる基礎研究も対象とした。

具体的には、1) リプログラム機構の分子レベルでの解析に基づくリプログラミング技術の高度化・簡便化、2) 幹細胞分化転換過程の解析と人的調節、3) iPS 細胞を用いたエピジェネティック過程の分子機構解析、4) iPS 細胞を駆使する疾患発症機構の解析、5) ヒト疾患モデルの構築などの研究を対象とした。

これら研究の成果は疾患の原因の解明や新治療薬の開発に寄与するとともに、倫理的問題や拒絶反応のない細胞移植療法の実現に向けて貢献できるものと考えられる。

1.3 研究総括

西川伸一

(研究領域発足時) 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

(研究領域終了時) JT 生命誌研究館 顧問

(研究追跡調査時) NPO 法人オール・アバウト・サイエンス・ジャパン 代表理事

1.4 領域アドバイザー

本研究領域設定当初は研究試料として iPS 細胞を扱っている研究者がほとんどいないという状況にあった。このため本研究領域においては、エピジェネティクス、細胞分子生物

学、発生遺伝学等、多分野の専門家を結集し、iPS細胞を基軸とした研究に留まらず、その応用展開を目指す応募課題の審査に対応する必要があった。そこで、研究総括補佐及び領域アドバイザーは、表 1-1 に示すような、幅広い学問分野および基礎から前臨床研究にわたる研究フェーズを縦横に俯瞰することのできる有識者で構成されている。

表 1-1 領域アドバイザー

領域 アドバイザー	所属	役職	任期
山中 伸弥 ¹ (研究総括補佐)	京都大学 iPS 細胞研究所	所長・教授	2008 年 6 月～2010 年 3 月
石野 史敏	東京医科歯科大学難治疾患研究所	教授	2008 年 6 月～2016 年 3 月
岡野 栄之	慶応義塾大学医学部	教授	2008 年 6 月～2016 年 3 月
相賀 裕美子	情報・システム研究機構国立遺伝学 研究所	教授	2008 年 6 月～2016 年 3 月
中内 啓光	東京大学医科学研究所/スタンフォ ード大学	教授	2008 年 6 月～2016 年 3 月
丹羽 仁史	理化学研究所(～2016. 3) 熊本大学発生医学研究所(2015. 4～)	チームリーダー・ 教授	2008 年 6 月～2016 年 3 月
花園 豊	自治医科大学分子病態治療研究セン ター	教授	2008 年 6 月～2016 年 3 月
春山 英幸	第一三共 RD ノバーレ(株)	代表取締役社長	2008 年 6 月～2016 年 3 月

(注)所属と役職はさきがけ終了時点に記載

1.5 研究課題および研究者

研究者として、第 1 期 10 名、第 2 期 11 名、第 3 期 9 名の計 30 名を採択した。第 2 期の大日向康秀、第 3 期の武藤太郎は大挑戦型として採択された。

第 1 期の佐々木えりか、第 2 期の依馬正次、房木ノエミ、大日向、第 3 期の下島圭子、竹内純は研究期間が 5 年型であり、第 1 期の岡田由紀、第 3 期の下島圭子はライフイベントで研究期間を延長した。第 1 期の富澤一仁は内閣府の「最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)」に採択されたため、途中で研究を終了している。なお、第 3 期の武藤は、研究期間中に企業へ就職したため、本調査の対象外とした。

¹ 山中伸弥教授は、本研究領域に研究総括補佐として参加した。研究総括補佐は、当該分野の推進において、研究総括の任務全般について研究総括を補佐する者を指す。他方、領域アドバイザーは、課題の選定・研究の推進・評価について意見を述べる者を指す。

表 1-2 研究課題と研究者(第1期、第2期、第3期)

期 (研究期間)	研究課題	研究者	採択時の 所属・役職	終了時の 所属・役職	追跡調査時の 所属・役職
第1期 (2008年6月～ 2012年3月)	iPS法と核移植法の比較による初期化機構の解明	荒木 良子 (Araki Ryoko)	放射線医学総合研究所先端遺伝子発現研究グループ チームリーダー	放射線医学総合研究所研究基盤センター 室長	放射線医学総合研究所放射線障害治療研究部幹細胞研究グループ グループリーダー
第1期 (2008年6月～ 2012年3月)	多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞を用いた病態解析	長船 健二 (Osafune Kenji)	科学技術振興機構 ICORP 研究員	京都大学iPS細胞研究所 准教授	京都大学 iPS 細胞研究所 教授/リジェネフロ(株)創設者・取締役
第1期 (2008年6月～ 2012年3月)	体細胞核移植におけるリプログラミング促進技術の開発	岸上 哲士 (Kishigami Satoshi)	近畿大学生物理工学部 講師	近畿大学生物理工学部 准教授	山梨大学大学院総合研究部生命環境学域生命農学(生命工学) 教授
第1期 (2008年6月～ 2012年3月)	肝細胞分化関連遺伝子の導入による皮膚細胞からの肝細胞作製技術	鈴木 淳史 (Suzuki Atsushi)	九州大学生体防御医学研究所 特任准教授	九州大学生体防御医学研究所 准教授	九州大学生体防御医学研究所 教授
第1期 (2008年6月～ 2012年3月)	細胞リプログラミング技術を用いた免疫細胞再生医療の開発	清野 研一郎 (Seino Kenichiro)	聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 准教授	北海道大学遺伝子病制御研究所 教授	北海道大学遺伝子病制御研究所 教授
第1期 (2008年6月～ 2011年3月)	蛋白質導入法によるiPS細胞作製技術開発	富澤 一仁 ² (Tomizawa Kazuhito)	熊本大学大学院生命科学研究部 教授	熊本大学大学院生命科学研究部 教授	熊本大学大学院生命科学研究部 教授
第1期 (2008年6月～ 2012年3月)	任意細胞の樹立法開発	升井 伸治 (Masui Shinji)	国立国際医療センター 研究所 室長	京都大学iPS細胞研究所 特定講師	山梨大学大学院総合研究部発生工学研究センター生命環境学域生命工学科 特任准教授
第1期 (2008年6月～ 2012年3月)	非ウイルス的手段によるiPS誘導法の確立	松田 修 (Matsuda Osamu)	京都府立医科大学大学院医学研究科 准教授	京都府立医科大学大学院医学研究科 教授	京都府立医科大学大学院医学研究科 教授
第1期 (2008年6月～ 2012年3月)	リプログラミングによるがん細胞エビジェネティック異常の起源解明とその臨床応用	山田 泰広 (Yamada Yasuhiro)	岐阜大学大学院医学系研究科 講師	京都大学iPS細胞研究所 特定拠点教授	東京大学医科学研究所システム疾患モデル研究センター 教授
第1期 (2008年6月～ 2014年3月)	iPS細胞を用いたヒト疾患モデルマウス作製法の確立	佐々木 えりか (Sasaki Erika)	実験動物中央研究所マウス研究部 室長	実験動物中央研究所応用発生学研究部 部長	実験動物中央研究所マウス研究部 部長
第2期 (2009年10月～ 2013年3月)	細胞周期操作による新規卵原幹細胞の樹立	李 知英 (Li Jiyon)	東京医科歯科大学歯と骨のGCOE拠点 GCOE 特任講師	東京医科歯科大学歯と骨のGCOE拠点 GCOE 特任講師	東京医科歯科大学難治疾患研究所 准教授
第2期 (2009年10月～ 2013年3月)	iPS技術による血液、血管内皮細胞の誘導	片岡 宏 (Kataoka Hiroshi)	理化学研究所発生・再生科学総合研究センター 研究員	科学技術振興機構 さきがけ研究者	枚方公済病院総合診療科 部長

² 富澤研究者は研究期間中に最先端・次世代プロジェクトに採択されたため、2011.3で研究を中止した。

期 (研究期間)	研究課題	研究者	採択時の 所属・役職	終了時の 所属・役職	追跡調査時の 所属・役職
第2期 (2009年10月～ 2013年3月)	リプログラミングを制御するクロマチン因子の作用機序の解明	栗崎 晃 (Kurisaki Akira)	産業技術総合研究所器官発生工 学研究ラボ 主 任研究員	産業技術総合研 究所幹細胞工 学研究センター チーム長	奈良先端科学技術 大学院大学先端科 学技術研究科 教 授
第2期 (2009年10月～ 2013年3月)	細胞リプログラ ミングの段階的 制御	佐藤 伸 (Sato Akira)	岡山大学異分野 融合先端研究コ ア 助教	岡山大学異分野 融合先端研究コ ア 准教授	岡山大学異分野融 合先端研究コ ア 研究教授
第2期 (2009年10月～ 2013年3月)	生殖細胞の特性 に基づく新しい リプログラミング 手法の開発	永松 剛 (Nagamatsu Go)	慶應義塾大学医 学部 助教	慶應義塾大学医 学部 助教	九州大学大学院医 学研究院 准教授
第2期 (2009年10月～ 2013年3月)	順遺伝学による iPS 細胞生成機 構の解析	堀江 恭二 (Horie Kyoji)	大阪大学大学院 医学系研究科 准教授	奈良県立医科大 学医学部 教授	奈良県立医科大 学生理学第二講 座 教授
第2期 (2009年10月～ 2013年3月)	ウサギを用いた iPS 細胞総合 (完結型)評価系 の確立	本多 新 (Honda Arata)	理化学研究所遺 伝工学基盤技術 室 協力研究員	宮崎大学テニュ アトラック推進 機構 准教授	自治医科大学医学 部先端医療技術開 発センター 教授
第2期 (2009年10月～ 2013年3月)	リプログラミング 技術を用いた 遺伝性血管疾患 の新規治療標的 の同定	渡部 徹郎 (Watabe Tetsuro)	東京大学大学院 医学系研究科 准教授	東京大学大学院 医学系研究科 准教授	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合 研究科 教授
第2期 (2009年10月～ 2015年3月)	Klf ファミリー による幹細胞機 能制御の分子機 構	依馬 正次 (Ema Masatsugu)	筑波大学大学院 人間総合科学研 究科 講師	滋賀医科大学動 物生命科学研究 センター 教授	滋賀医科大学動物 生命科学研究セン ター 教授/京都 大学ヒト生物学高 等研究拠点 主任 研究員
第2期 (2009年10月～ 2015年3月)	センダイウイル スベクターを用 いた安全な iPS 細胞作製と分化 誘導	房木 ノエミ (Fusaki Noemi)	ディナベック (株)事業開発本 部 リーダー	科学技術振興機 構 さきがけ研 究者	東北大学研究推 進・支援機構URA センター 特任准教 授
第2期 (2009年10月～ 2015年3月)	始原生殖細胞形 成機構と iPS 誘 導機構の統一原 理	大日向 康秀 (Ohinata Yasuhide)	理化学研究所発 生・再生科学総 合研究センター 研究員	科学技術振興機 構 さきがけ研 究者	理化学研究所生命 医科学研究セン ター免疫器官形成 研究チーム 研究員 /千葉大学医学研 究院 講師
第3期 (2010年10月～ 2013年3月)	実験人類遺伝学 の確立	武藤 太郎 ³ (Muto Taro)	徳島大学大学院 ヘルスバイオサ イエンス研究部 助教	大塚製薬研究所 研究員	大塚製薬研究所 研究員
第3期 (2010年10月～ 2014年3月)	染色体異常症候 群における合併 症の発症メカニ ズムの解明	北畠 康司 (Kitabatake Yasuji)	大阪大学医学部 附属病院 特任 助教	大阪大学大学院 医学系研究科 助教	大阪大学医学部附 属病院 准教授
第3期 (2010年10月～ 2014年3月)	純然たるヒト iPS/ES 細胞の 樹立・維持およ び増殖機構の解 析	高島 康弘 (Takashima Yasuhiro)	ケンブリッジ大 学 研究員	科学技術振興機 構 さきがけ研 究者	京都大学 iPS 細胞 研究所 特定拠点 講師

³ 武藤研究者は研究期間中に企業へ就職したため、2013.3 で研究を中止した。

期 (研究期間)	研究課題	研究者	採択時の 所属・役職	終了時の 所属・役職	追跡調査時の 所属・役職
第3期 (2010年10月～ 2014年3月)	連鎖解析と iPS/ES 技術を用いた遺伝性疾患遺伝子同定法の開発	伊達 英俊 (Date Hidetoshi)	東京大学医学部 附属病院 特任 助教	東京大学医学部 附属病院 特任 助教	国立精神・神経医療研究センター脳 神経内科 研究員
第3期 (2010年10月～ 2014年3月)	人為的核内環境 制御による高品質 iPS 細胞の誘導	堀田 秋津 (Hotta Akitsu)	京都大学 iPS 細胞 研究所 特定 拠点助教	京都大学 iPS 細胞 研究所 特定拠 点助教	京都大学 iPS 細胞 研究所 講師
第3期 (2010年10月～ 2014年3月)	リプログラミング 技術で解く細胞 分化と時計機 構の関係	八木田 和弘 (Yagita Kazuhiro)	大阪大学大学院 医学系研究科 准教授	京都府立医科大学 大学院医学研究 科 教授	京都府立医科大学 大学院医学系研究 科 教授
第3期 (2010年10月～ 2014年3月)	分化・発生を理 解する多次元定 量計測技術の基 盤開発	渡邊 朋信 (Watanabe Tomonobu)	大阪大学免疫学 フロンティア研 究センター 特 任助教	理化学研究所生 命システム研究 センター チーム リーダー	理化学研究所生命 機能科学研究セン ター先端バイオイ メージング研究チ ーム チームリー ダー/広島大学原 爆放射線医科学研究 所 教授
第3期 (2010年10月～ 2017年3月)	疾患 iPS 細胞を用 いた大脳皮質 構造形成メカニ ズムの解明	山本(下島) 圭 子 (Yamamoto (Shimajima) Keito)	東京女子医科学 院統合医科学研究 所 研究生	科学技術振興機 構 さきがけ研 究者	東京女子医科大学 輸血・細胞プロセ シング科/ゲノム 診療科/統合医科学 研究所 助教
第3期 (2010年10月～ 2016年3月)	心臓細胞未分化 性とクロマチン 結合因子群	竹内 純 (Takeuchi Jun)	東京大学分子細胞 生物学研究所 准教授	東京大学分子細胞 生物学研究所 准教授	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 准教授

片岡とは連絡が取れなかったため、2.2以降の報告から省いている。また、JST-CIRM 共同研究プログラムの支援課題「微小環境がヒト iPS 細胞及び胎児由来神経幹細胞の分化・腫瘍化に及ぼす影響」が、慶応義塾大学 中村雅也を研究代表者として2010年度から2013年度にかけて実施されたが、本課題の調査結果については2.2以降の本さきがけ研究領域の調査結果データには含めず、2.4、および3.4に別項目を設けて報告する

第 2 章 追跡調査

2.1 追跡調査について

2.1.1 調査の目的

追跡調査は研究領域終了後、一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展状況や活用状況を明らかにし、JST の事業および事業運営の改善に資するために行うもので、研究終了後の研究者の研究課題の発展状況等を調査した。

2.1.2 調査の対象

本追跡調査は、さきがけ研究領域「iPS 細胞と生命機能(2008 年度～2015 年度)」を対象とする。採択研究者は、2008 年度採択 10 名、2009 年度採択 11 名、2010 年度採択 9 名である。表 2-1 に調査対象と調査対象期間を示す。

表 2-1 調査対象と調査対象期間

採択年	研究者	さきがけ研究期間	さきがけ終了後の調査対象期間
第 1 期 (2008 年)	荒木 良子	2008 年 10 月～2012 年 3 月	2013 年 1 月～調査終了月
	長船 健二		
	岸上 哲士		
	鈴木 淳史		
	清野 研一郎		
	升井 伸治		
	松田 修		
	山田 泰広		
	富澤 一仁	2008 年 10 月～2011 年 3 月	2012 年 1 月～調査終了月
	佐々木 えりか	2008 年 10 月～2014 年 3 月	2015 年 1 月～調査終了月
第 2 期 (2009 年)	片岡 宏	2009 年 10 月～2013 年 3 月	2014 年 1 月～調査終了月
	栗崎 晃		
	佐藤 伸		
	永松 剛		
	堀江 恭二		
	本多 新		
	李 知英		
	渡部 徹郎		
	依馬 正次	2009 年 10 月～2015 年 3 月	2016 年 1 月～調査終了月
	大日向 康秀		

	房木 ノエミ		
第3期 (2010年)	北島 康司	2010年11月～2014年3月	2015年1月～調査終了月
	高島 康弘	2010年11月～2014年3月	2015年1月～調査終了月
	伊達 英俊		
	堀田 秋津		
	八木田 和弘		
	渡邊 朋信		
	下島 圭子	2010年11月～2017年3月	2018年1月～調査終了月
	竹内 純	2009年10月～2016年3月	2017年1月～調査終了月

注1) 片岡宏は、連絡が取れなかったため、2.2以降の報告からは省略することとした。

注2) JST-CIRM 共同研究プログラムの支援課題「微小環境がヒト iPS 細胞及び胎児由来神経幹細胞の分化・腫瘍化に及ぼす影響」が、慶応義塾大学・中村雅也を研究代表者として2010年度から2013年度にかけて実施されたが、本課題の調査結果については2.2以降の本さきがけ研究領域の調査結果データには含めず、2.4に別項目を設けて報告する。

2.1.3 調査方法

調査は、2020年5月～7月にかけて実施した研究者アンケート、2020年8月～10月にかけて実施した研究総括及び一部の研究者とのインタビュー、領域事後評価用資料等の文献、エビデンス情報収集のための各種データベース、取りまとめ後の情報に関する研究者への事実確認を基に実施した。具体的な調査方法は以下の通りである。

(1) 研究助成金

調査対象期間は、本研究領域の期間中(2008年10月～2017年3月)を含めて調査対象月とし、本研究領域の研究者が研究の代表を務める研究助成金を調査した。その中から、原則、研究助成金の総額が1千万円/件以上のものを抽出した。

ただし、各研究課題の開始後に研究助成を受け、当該研究課題が終了する前に、その助成期間が終了してしまう事案および当該研究課題終了と同年度に助成期間が終了する事案に関しては対象外とした。

研究助成資金の獲得状況の調査については、主に以下のWEBサイトを用い、2020年6月に検索した。

- 競争的研究資金の機関データベース (科学研究費助成事業データベース、厚生労働科学研究成果データベース)
- 公益財団法人助成財団センター(http://www.jfc.or.jp/grant-search/ap_search.php5)
- 日本の研究.com(<https://research-er.jp/>)

(2) 論文

論文の抽出は、文献データベースとしてScopus(データソース:2021年1月時点)を用い、文献タイプはArticle, Review, Conference Paperを対象とし、2021年1月に抽出した。研究期間中および研究終了後について研究者が著者になっている論文を、Author IDに紐づけて出力し、研究終了後に発表された論文リストを作成した。リストの論文については、各論文における研究者の所属情報や謝辞等の情報、また、研究者アンケートへの記載の有無を基に、①さきがけの成果と認められるもの、②さきがけの発展と認められるもの、③さきがけと無関係と考えられるもの、に分類した。また、研究終了報告書に記載のある論文で、上記の検索方法で抽出されなかった論文については、さきがけの成果と認められるものとして、リストに加えた。各分類における論文リストは、研究者への事実確認を通じて、確定させた。

(3) 特許

研究者が発明者になっているもので、研究期間中の特許出願および登録の状況と、研究終了以降の特許出願および登録の状況について調査した。特許データベースULTRA Patent

を用いて 2020 年 10 月に検索した。当該データベースでは、研究者名(漢字名及びアルファベット名)で検索することにより、上記の必要な情報を一覧として得ることができる。また、研究終了報告書や研究者アンケートに記載のある特許で、上記の検索方法で抽出されなかった特許についても、さきがけの成果と認められるものとして、リストに加えた。

(4) 受賞、招待講演、報道、共同研究や企業との連携等

受賞については、研究終了以降から現在に至るまでの受賞について、2020 年 8 月にウェブ検索を実施し、各研究者の研究室ホームページ、科学研究費補助金(科研費)ホームページなどを参考にし、リストを作成した。また、主要な受賞については、受賞者リストから研究者が受賞者になっている賞を抜粋した。さらに、研究者アンケートに記載のある内容を追加した。

招待講演については、研究終了以降から現在に至るまでの受賞について、2020 年 8 月にウェブ検索を実施し、各研究者の研究室ホームページ、科研費ホームページなどを参考にし、国内外の主要な会議についてリストを作成した。さらに、研究者アンケートに記載のある内容を追加した。

報道については、日経テレコンを用いて、研究者名+所属機関(研究開始時点//研究終了時点//現時点)で 2020 年 6 月に検索を行った後、研究者のさきがけの成果を目視で確認することにより、絞り込みを行った。

共同研究や企業との連携等については、2020 年 5 月にウェブ検索を実施し、各研究者の研究室ホームページ、科研費ホームページなどを参考にし、情報収集を行った。さらに、研究者アンケートに記載のある内容を追加した。

なお、追跡調査にあたっては、各研究者に依頼して、これらすべてのリストと各研究者の主な研究成果の草稿の確認を可能な限りご協力頂いた。

2.2 追跡調査概要

2.2.1 研究助成金

研究発展状況を把握するために、研究終了後にどれだけ外部資金を獲得しているかを把握することは非常に重要である。当該研究領域の研究者の外部資金獲得状況を表 2-2 に示す。

多くの研究者が研究終了後も科研費を中心に競争的研究資金を獲得して、研究開発を継続的に行っている。その中でも、鈴木は、科研費の獲得件数が 8 件と多く、CREST に加え、AMED から複数の大型資金を獲得している。その他にも、長船は AMED から 5 件、山田は CREST が 1 件と AMED から 4 件、佐々木が AMED から 3 件を獲得している等、多くの研究者がなんらかの大型助成金の獲得に成功している。

表 2-2 研究助成金獲得状況



研究者	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	年度																					金額(百万円)
				2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024					
荒木 良子	2008～2011	さきがけ	iPS 法と核移植法の比較による初期化機構の解明	■	■	■																	40.0		
	2013～2013	武田科学振興財団 生命科学研究所助成	iPS 細胞ゲノムに蓄積する突然変異に関する研究						■														10.0		
	2013～2015	科研費 基盤研究 (B)	リプログラミングに伴うゲノム不安定性の解析						■	■	■												18.3		
	2017～2019	科研費 基盤研究 (B)	ゲノム初期化に伴う点突然変異と活性酸素										■	■	■								17.0		
長船 健二	2008～2011	さきがけ	多発性嚢胞腎患者由来の iPS 細胞を用いた病態解析	■	■	■																	40.0		
	2013～2017	AMED	慢性腎臓病に対する再生医療開発に向けたヒト iPS 細胞から機能的な腎細胞と腎組織の作製							■	■	■	■										202.5		
	2017～2019	AMED	iPS 細胞モデルを用いた多発性嚢胞腎に対する創薬スクリーニング系の構築										■	■	■								62.9		
	2018～2020	科研費 基盤研究 (B)	単一細胞解析を用いた成体腎細胞分化機構の解明とヒト iPS 細胞からの選択的分化誘導										■	■	■								17.0		
	2019～2021	AMED	ヒト iPS 細胞を用いた慢性腎臓病に対する細胞療法の開発												■	■	■						15～30		
	2020～2022	AMED	ヒト iPS 細胞と霊長類疾患モデルを用いた肝硬変に対する細胞療法の開発														■	■	■				45.0		
	2020～2022	AMED	iPS 細胞由来腎前駆細胞を用いた慢性腎臓病に対する細胞療法の製造法開発と非臨床試験実施															■	■	■			136.5		
岸上 哲士	2008～2011	さきがけ	体細胞核移植におけるリプログラミング促進技術の開発	■	■	■																	40.0		
鈴木 淳史	2008～2011	さきがけ	肝細胞分化関連遺伝子の導入による皮膚細胞からの肝細胞作製技術	■	■	■																	40.0		
	2010～2012	科研費 基盤研究 (B)	肝臓の幹細胞システムを制御する分子基盤の解明				■	■	■														18.5		
	2011～2015	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	組織幹細胞の維持と分化の制御機構				■	■	■	■	■												76.2		

研究者	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	金額(百万円)
	2011～2016	CREST (2015年4月にAMEDへ移管)	肝細胞誘導におけるダイレクトリプログラミング機構の解明とその応用				■	■	■	■	■	■									417.3
	2013～2016	科研費若手研究(A)	肝臓における細胞分化の破綻と疾患の発症をつなぐ分子機構の解明						■	■	■	■									23.7
	2015～2017	AMED	肝細胞直接誘導法による肝再生医療基盤の確立								■	■	■								85.6
	2016～2018	科研費基盤研究(A)	ダイレクトリプログラミングで作製された“iHep細胞”の機能的成熟誘導とその応用									■	■	■							44.3
	2017～2018	科研費新学術領域研究(研究領域提案型)	細胞競合による肝臓の腫瘍抑制機構の解明										■	■							11.7
	2017～2019	AMED	腸幹細胞直接誘導法を利用した難治性腸疾患病態モデルの構築										■	■	■						39.0
	2018～2019	科研費新学術領域研究(研究領域提案型)	エピゲノム変化による機能性肝細胞ダイバシティ形成原理の解明とその制御											■	■						13.0
	2019～2021	AMED	肝前駆細胞直接誘導法を用いた革新的肝再生療法の開発												■	■	■				75.0
	2019～2021	科研費基盤研究(A)	ダイレクトリプログラミングによるヒト肝前駆細胞直接誘導法の確立とその応用												■	■	■				45.5
	2020～2021	科研費新学術領域研究(研究領域提案型)	肝臓における幹細胞ダイバシティの同定と時空間動態解析													■	■				12.0
清野 研一郎	2008～2011	さきがけ	細胞リプログラミング技術を用いた免疫細胞再生医療の開発	■	■	■	■														40.0
	2015～2017	科研費基盤研究(B)	iPS細胞を用いた新規胸腺再生法の確立とアロ移植拒絶ならびに免疫学的病態への応用								■	■	■								16.6
	2017～2019	AMED	L-34を基軸としたがん微小環境分子基盤の理解とその臨床的特性に基づいた新しい治療法の開発										■	■	■						113.1
	2018～2020	AMED	他家iPS細胞由来組織・細胞移植における免疫寛容誘導に関する基盤的研究											■	■	■					66.0
富澤 一仁	2008～2010	さきがけ	蛋白質導入法によるiPS細胞作製技術開発	■	■	■															40.0
	2010～2013	内閣府NEXT	次世代オミックス研究分野の創造:ヒトtRNA修飾の解析と2型糖尿病発症リスク			■	■	■	■												159.9

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	金額 (百万円)		
	2014 ～ 2016	AMED	tRNA修飾異常に起因した2型糖尿病のコンパニオン診断薬開発を目指した臨床研究																		140.6		
	2014 ～ 2016	研究成果展開事業	Cdkal1 リスクアレル保有2型糖尿病患者に対する治療薬ならびにコンパニオン診断技術の開発																			90.0	
	2015 ～ 2017	科研費 基盤研究 (B)	糖尿病性神経障害発症機構の解明と治療法開発に向けた基礎研究																			17.4	
	2017 ～ 2017	武田科学振興財団 ビジョナリー リサーチ助成	新規オミックス研究分野の創造:tRNA修飾異常と疾患																			10.0	
	2017 ～ 2019	AMED	tRNA修飾異常を起因とする疾患の診断システム開発																			56.4	
	2017 ～ 2019	科研費 基盤研究 (B)	tRNAモドミクス研究分野の創造を可能とする解析技術の開発																				18.6
	2018 ～ 2020	科研費 基盤研究 (B)	新規内分泌因子の探索研究:tRNA修飾スクレオンドによる生体機能制御																				17.3
升井 伸治	2008 ～ 2011	さきがけ	任意細胞の樹立法開発																			40.0	
	2016 ～ 2016	武田科学振興財団 生命科学 研究助成	網羅的ゲノム機能解析法の開発																			10.0	
	2019 ～ 2021	AMED	ヒト多能性幹細胞株を均質にするための培地添加物																			30.0	
松田 修	2008 ～ 2011	さきがけ	非ウイルス的手段によるiPS誘導法の確立																			40.0	
	2014 ～ 2016	科研費 基盤研究 (B)	ゲノム改変技術を基盤とする骨粗鬆症の病態解明と再生医療																			16.0	
	2017 ～ 2019	科研費 基盤研究 (B)	AIを用いた骨芽細胞運命転換の機構解明と骨再生治療への応用																			17.0	
山田 泰広	2008 ～ 2011	さきがけ	リプログラミングによるがん細胞エピジェネティック異常の起源解明とその臨床応用																			40.0	
	2012 ～ 2014	科研費 基盤研究 (B)	細胞分化維持機構の破綻による発癌メカニズムの解明																			18.7	
	2013 ～ 2017	AMED	細胞移植治療の実現に向けた細胞アイデンティティ制御																			200.0	
	2014 ～ 2015	AMED	細胞初期化技術を応用した革新的治療戦略の確立																			90.0	
	2015 ～ 2017	科研費 基盤研究 (B)	細胞脱分化による発がん修飾作用の解明																			17.4	

研究者	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	金額(百万円)
	2016～2018	AMED	異分野先端技術融合による薬剤抵抗性を標的とした革新的複合治療戦略の開発																		436.9
	2017～2022	CREST	時空間老化制御マウスを用いた細胞老化が及ぼす個体生命機能の理解																		487.6
	2018～2018	AMED	リプログラミング関連タンパク質を標的とした小児がん治療薬の探索																		15.0
	2018～2020	科研費基盤研究(A)	リプログラミング技術を応用したがん研究																		44.6
佐々木えりか	2008～2013	さきがけ	iPS細胞を用いたヒト疾患モデルマーマーモセット作製法の確立																		50.0
	2010～2014	科研費基盤研究(A)	標的遺伝子ノックダウンによる霊長類ヒト疾患モデルの作出																		49.9
	2013～2017	AMED	遺伝子改変マーマーモセットの汎用性拡大および作出技術の高度化とその脳科学への応用																		500～1000
	2015～2019	科研費基盤研究(A)	小型霊長類コモンマーマーモセットを用いたカメラ個体作出技術の開発																		42.4
	2019～2023	科研費新学術領域研究(研究領域提案型)	非ヒト霊長類における全能性獲得と初期胚発生の理解																		103.1
	2019～2023	AMED	神経変性疾患モデルマーマーモセット開発と新規発生工学技術の開発研究																		500.0
	2019～2023	AMED	マーマーモセット研究の支援基盤の構築																		200.0
李知英	2009～2012	さきがけ	細胞周期操作による新規卵原幹細胞の樹立																		40.0
栗崎晃	2009～2012	さきがけ	リプログラミングを制御するクロマチン因子の作用機序の解明																		40.0
	2011～2013	科研費基盤研究(B)	特異的前駆細胞移植による肺再生法の構築																		20.9
	2014～2016	科研費基盤研究(B)	呼吸器再生基盤技術の構築																		17.4
	2015～2015	武田科学振興財団 生命科学助成	すい臓がん幹細胞の制御原理の究明																		10.0
	2016～2016	三菱財団 自然科学研究助成(一般助成)	肺組織再生治療技術の開発																		10.0

研究者	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	金額(百万円)
	2017～2019	科研費 基盤研究(A)	ヒトミニ胃組織を用いた胃がん病態の究明と創薬応用																		43.7
	2020～2022	科研費 基盤研究(B)	胃臓器工学基盤技術の開発																		
佐藤伸	2009～2012	さきがけ	細胞リプログラミングの段階的制御																		40.0
	2013～2014	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	両生類四肢再生開始メカニズムの確定とその応用への可能性の探索																		11.7
	2014～2017	科研費 若手研究(A)	四肢再生誘導因子の特定と遺伝子改変動物創出																		21.3
	2016～2018	AMED	発生フィールドの再起動による器官レベルの再生																		63.7
	2017～2020	科研費 基盤研究(B)	四肢再生全般を支配する神経因子の解明と再生不能(不全)動物への応用																		17.2
	2020～2023	科研費 基盤研究(B)	四肢再生における分化リプログラミング&発生プログラム再起動を司る遺伝子機能																		
永松剛	2009～2012	さきがけ	生殖細胞の特性に基づく新しいリプログラミング手法の開発																		40.0
堀江恭二	2009～2012	さきがけ	順遺伝学によるiPS細胞生成機構の解析																		40.0
	2010～2014	科研費 基盤研究(B)	迅速な遺伝子破壊法を用いたマウス・ノンコーディングRNAの機能解析																		19.6
	2013～2013	武田科学振興財団 生命科学助成	ホモ変異体ES細胞を用いた1細胞レベルでの多能性制御機構の解析																		10.0
	2014～2015	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	発現のオンとオフを繰り返す少数分子によるES細胞の多能性の制御																		12.1
	2016～2018	科研費 基盤研究(B)	マウスES細胞の超未分化状態の解明と他種ES/iPS細胞の初期化への応用																		18.1
	2020～2023	科研費 基盤研究(B)	全能性状態の誘導による人工的動物個体作製法の開発																		
本多新	2009～2012	さきがけ	ウサギを用いたiPS細胞総合(完結型)評価系の確立																		40.0
	2015～2017	科研費 基盤研究(B)	iPS細胞とゲノム編集技術による先天性難治性疾患モデルの構築																		16.8

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	金額 (百万円)	
	2018 ～ 2019	科研費 新学術領域 研究(研究 領域提案 型)	性染色体X0型の絶滅危 惧種アマミトゲネズミ 生殖細胞の性スペクト ラム																		11.6	
	2020 ～ 2024	科研費 基盤研究 (A)	雄性と妊孕性獲得を担 う遺伝子発現カスケー ドの解明																			42.9
渡部 徹郎	2009 ～ 2012	さきがけ	リプログラミング技術 を用いた遺伝性血管疾 患の新規治療標的の同 定																		40.0	
	2012 ～ 2015	さきがけ	血管の動的恒常性の破 綻による疾患進展機構 の解明																			40.0
	2013 ～ 2014	科研費 新学術領域 研究(研究 領域提案 型)	リンパ管-血管-神経ネ ットワークの形成にお ける相互作用の役割																			10.9
	2017 ～ 2019	AMED	口腔がんの悪性化機構 の解明とそのメカニズ ムに基づく新規治療標 的探索研究																			65.4
	2020 ～ 2022	科研費 基盤研究 (B)	シングルセル解析によ る口腔がんの増殖と運 動・転移を司るメカニ ズムの解明																			
依馬 正次	2009 ～ 2014	さきがけ	Ifファミリーによる幹 細胞機能制御の分子機 構																			50.0
	2014 ～ 2016	科研費 基盤研究 (B)	心血管系イメージング のためのモデルマウス リソース整備																			16.8
	2018 ～ 2020	科研費 基盤研究 (B)	血管の階層性構造を制 御する分子基盤とその 破綻による腫瘍血管新 生機構の解明																			17.6
房木 ノエミ	2009 ～ 2014	さきがけ	センダイウイルスベク ターを用いた安全な iPS細胞作製と分化誘 導																			50.0
大目 向康秀	2009 ～ 2014	さきがけ	始原生殖細胞形成機構 とiPS誘導機構の統一 原理																			50.0
	2013 ～ 2016	科研費 若手研究 (A)	試験管内における体細 胞からの全能性誘導																			25.4
	2018 ～ 2022	科研費 挑戦的研究 (開拓)	幹細胞による人工胚盤 胞の作製																			25.7
北島 康司	2010 ～ 2013	さきがけ	染色体異常症候群にお ける合併症の発症メカ ニズムの解明																			40.0
	2017 ～ 2019	AMED	疾患特異的iPS細胞を もちいた小児難治性疾 患の統合的理解と創薬 開発																			116.8
	2019 ～ 2021	科研費 基盤研究 (B)	治療薬開発へつながる ダウン症候群の神経病 態発症原理の解明																			14.8

研究者	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	金額(百万円)
高島康弘	2010～2013	さきがけ	純然たるヒト iPS/ES 細胞の樹立、維持および増殖機構の解析			■	■	■													75.0
	2015～2015	武田科学振興財団 生命科学研究所助成	安定したナীব型ヒト iPS 細胞の樹立と維持、そのメカニズムの解明								■										10.0
	2016～2020	科研費 基盤研究(A)	ナীব型多能性幹細胞と試験管内初期胚培養法の確立									■	■	■	■						45.1
	2019～2021	AMED	三次元ガストロイドを用いて、試験管内でヒト着床期の発生原理を解明する												■	■	■				75.0
伊達英俊	2010～2013	さきがけ	連鎖解析と iPS/ES 技術を用いた遺伝性疾患遺伝子同定法の開発			■	■	■													40.0
堀田秋津	2010～2013	さきがけ	人為的核内環境制御による高品質 iPS 細胞の誘導			■	■	■													40.0
	2015～2017	科研費 若手研究(A)	細胞内作用場の制御による遺伝子変異修復技術開発								■	■									15.7
	2017～2019	AMED	独自送達技術開発による先天性筋疾患に対するゲノム編集治療法の開発										■	■	■						70.2
	2019～2021	AMED	DMD に対するナノ DDS を用いたゲノム編集治療法の開発												■	■	■				150.0
八木田和弘	2010～2013	さきがけ	リプログラミング技術で解く細胞分化と時計機構の関係			■	■	■													40.0
	2011～2014	科研費 基盤研究(B)	概日時計の発生メカニズムの解明				■	■	■	■											19.9
	2015～2017	科研費 基盤研究(B)	発生過程における概日リズム成立原理の解明								■	■									17.4
	2018～2020	科研費 基盤研究(B)	概日リズム制御系の機能発生学											■	■	■					17.2
	2019～2021	未来社会創造	体内時計と生活時間の不適合による恒常性破綻													■	■	■			
渡邊朋信	2010～2013	さきがけ	分化・発生を理解する多次元定量計測技術の基盤開発			■	■	■													40.0
	2018～2022	新学術領域研究(研究領域提案型)	シンギュラリティ細胞を発見・追跡する光学基盤技術の開発と実証型)												■	■	■	■			130.9
下島圭子	2010～2016	さきがけ	疾患 iPS 細胞を用いた大脳皮質構造形成メカニズムの解明			■	■	■	■	■	■										50.0

研究者	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	金額(百万円)
竹内純	2010～2015	さきがけ	心臓細胞未分化性とクロマチン結合因子群																		50.0
	2019～2021	科研費 国際共同研究加速基金(国際共同研究強化(B))	ヒト先天性心疾患発症を惹起する非コード領域の制御機構の理解と基盤研究																		18.3

2020年7月16日調査

2.2.2 論文

論文発表件数は研究者の研究活動を示す重要な指標であるため、研究者について成果に該当する論文数と発展に該当する論文数とを調査した。検索はいずれも2021年1月28日に実施した。

成果論文数は全体で238報、発展論文数は全体で343報であった。また、それぞれの責任著者となっている論文は96報、125報であった。

論文数20報以上の研究者数は、成果論文では2名で、発展論文では6名である。研究者別では、各研究者間でばらつきはあるが、さきがけの研究成果の論文を多く発表したのは、成果論文数では、下島が23報、佐藤が21報の論文を発表している。発展論文数では、長船が41報、佐々木が33報、堀田が31報の論文を発表している。成果論文と比較をすると、長船、佐々木、堀田、渡部、山田の論文発表活動が大きく発展していることがわかる。

また、Percentileについても調査を実施したところ、Top10%以内の論文数は、成果論文では45報で、堀田が6報、高島が5報と多い。また、発展論文では46報で、堀田が14報、長船が9報と多い。

Top1%以上の論文数は、成果論文では11報、発展論文では5報であった。

なお、本研究領域内での共著論文数は、成果論文で10報、発展論文で14報あり、さきがけ研究を通じて、研究者間のネットワークが広がり共同研究が進んだものと考えられる。

表 2-3 さきがけの成果および発展の論文(原著論文)数

期 (採択年度)	研究者	①さきがけの成果								②さきがけの発展							
		論文数	責任著者 論文数	平均 FWCI 数	Top 論文数				論文数	責任著者 論文数	平均 FWCI 数	Top 論文数					
					10%	1%	0.1%	0.01%				10%	1%	0.1%	0.01%		
第1期 (2008年度)	荒木 良子	5	2	3.65	1	1	0	0	7	1	0.77	0	0	0	0		
	長船 健二	9(1)	5	3.78	4	2	0	0	41(1)	20	1.63	9	1	0	0		
	岸上 哲士	11	5	1.77	3	0	0	0	17(2)	3	0.88	1	0	0	0		

	鈴木 淳史	7(1)	5	5.73	3	2	0	0	19(1)	16	1.03	1	0	0	0
	清野 研一郎	4	2	1.16	0	0	0	0	5	3	0.75	0	0	0	0
	富澤 一仁	3	2	0.40	0	0	0	0	10	7	0.76	0	0	0	0
	升井 伸治	6(1)	2	0.66	0	0	0	0	7(3)	1	1.22	1	0	0	0
	松田 修	16	8	0.82	1	0	0	0	24(1)	13	1.08	2	0	0	0
	山田 泰広	6(1)	4	3.33	2	1	0	0	22(3)	10	0.76	1	0	0	0
	佐々木 えりか	12(1)	4	1.48	2	0	0	0	33(1)	6	1.25	4	0	0	0
第2期 (2009年度)	李 知英	5	1	0.56	0	0	0	0	3	1	0.67	0	0	0	0
	栗崎 晃	5	3	0.44	0	0	0	0	6	1	1.37	1	0	0	0
	佐藤 伸	21	18	0.91	0	0	0	0	1	1	0.44	0	0	0	0
	永松 剛	9(1)	8	0.84	0	0	0	0	9(1)	1	2.18	1	1	0	0
	堀江 恭二	3(1)	3	0.40	0	0	0	0	4	1	0.52	0	0	0	0
	本多 新	4	4	1.61	1	0	0	0	9(3)	5	1.51	1	0	0	0
	渡部 徹郎	6	4	2.55	4	0	0	0	25	7	1.28	3	0	0	0
	依馬 正次	9(1)	4	1.32	1	0	0	0	17(1)	6	1.20	2	0	0	0
	房木 ノエミ	17	0	2.58	4	2	0	0	3	0	0.21	0	0	0	0
	大日向 康秀	8(2)	0	1.51	1	0	0	0	2(2)	0	0.63	0	0	0	0
第3期 (2010年度)	北畠 康司	3	1	3.18	1	0	0	0	6	1	0.73	0	0	0	0
	高島 康弘	6	1	7.16	5	1	0	0	3(1)	0	1.96	2	0	0	0
	伊達 英俊	4	0	8.59	3	1	0	0	2	0	5.05	1	0	0	0
	堀田 秋津	13(4)	2	3.59	6	1	0	0	31(3)	7	3.32	14	3	0	0
	八木田 和弘	6(2)	3	0.91	0	0	0	0	15(1)	8	1.21	3	0	0	0
	渡邊 朋信	6(1)	2	1.03	1	0	0	0	18(1)	5	0.58	0	0	0	0
	下島 圭子	23	1	0.88	1	0	0	0	7	0	0.76	0	0	0	0
	竹内 純	19(1)	3	1.69	2	0	0	0	8	1	0.56	0	0	0	0
領域全体		238	96	2.03	45	11	0	0	343	125	1.35	46	5	0	0

- 1 各研究者の論文数の単純合計は、重複論文を含むため、領域全体の論文数の合計数は一致しない。()
中の数値は重複論文数。重複論文の概要(関係する研究者名)を表 2-4、表 2-5 に記す。
- 2 責任著者とは Corresponding Author と同義。
- 3 平均 FWCI 値は、調査最終年マイナス 1 年まで(今回の調査では 2019 年末まで)の論文を対象とし、FWCI 値が得られる論文(FWCI 値=0 含む)で平均した数値とする。
- 4 Top%値は FWCI 値ベースとする。また Top%論文は「論文数」でリストアップした論文を対象とする。
- 5 各 Top%論文数は“以内”を意味し、例えば Top10%の欄には 1%以下も含む件数がカウントされる。

2021 年 1 月 28 日調査

表 2-4 成果論文における共著関係

No	期生	研究者(報数)	共著の概要
1	第1期	長船健二(1)	山田泰広 ^A と1報
2	第1期	鈴木淳史(1)	升井伸治 ^A と1報
3	第1期	升井伸治(1)	鈴木淳史 ^A と1報
4	第1期	山田泰広(1)	長船健二 ^A と1報
5	第1期	佐々木えりか(1)	依馬正次 ^A と1報
6	第2期	永松剛(1)	堀田秋津 ^A と1報
7	第2期	堀江恭二(1)	八木田和弘 ^A と1報
8	第2期	依馬正次(1)	佐々木えりか ^A と1報
9	第2期	大日向康秀(2)	堀田秋津 ^A と1報、岸上哲士 ^B と1報
10	第3期	堀田秋津(4)	永松剛 ^A と1報、大日向康秀 ^A と1報、渡邊朋信 ^A と1報、竹内純 ^A と1報
11	第3期	八木田和弘(2)	堀江恭二 ^{A,C} と2報
12	第3期	渡邊朋信(1)	堀田秋津 ^A と1報
13	第3期	竹内純(1)	堀田秋津 ^A と1報

注) 共著論文に対して、各共著者が、Aは成果論文、Bは発展論文、Cはその他と位置付けていることを表す

表 2-5 発展論文における共著関係

No	期生	研究者(報数)	共著の概要
1	第1期	長船 健二(1)	山田 泰広 ^C と1報
2	第1期	岸上 哲士(2)	山田 泰広 ^B と1報、大日向 康秀 ^A と1報
3	第1期	鈴木 淳史(1)	永松 剛 ^B と1報
4	第1期	升井 伸治(3)	松田 修 ^B と1報、渡邊 朋信 ^B と1報、堀田 秋津 ^B 、山田 泰広 ^C と1報
5	第1期	松田 修(1)	升井 伸治 ^B と1報
6	第1期	山田 泰広(3)	岸上 哲士 ^B と1報、堀田 秋津 ^B と1報、八木田 和弘 ^B と1報
7	第1期	佐々木 えりか(1)	依馬 正次 ^B と1報
8	第2期	永松 剛(1)	鈴木 淳史 ^B と1報
9	第2期	本多 新(3)	大日向 康秀 ^{B,B} と2報、高島 康弘 ^B と1報
10	第2期	依馬 正次(1)	佐々木 えりか ^B と1報
11	第2期	大日向 康秀(2)	本多 新 ^{B,B} と2報
12	第3期	高島 康弘(1)	本多 新 ^B と1報
13	第3期	堀田 秋津(3)	山田 泰広 ^{B,C} と2報、升井 伸治 ^B 、山田 泰広 ^C と1報

14	第3期	八木田 和弘(1)	山田 泰広 ^B と1報
15	第3期	渡邊 朋信(1)	升井 伸治 ^B と1報

注) 共著論文に対して、各共著者が、Aは成果論文、Bは発展論文、Cはその他と位置付けていることを表す

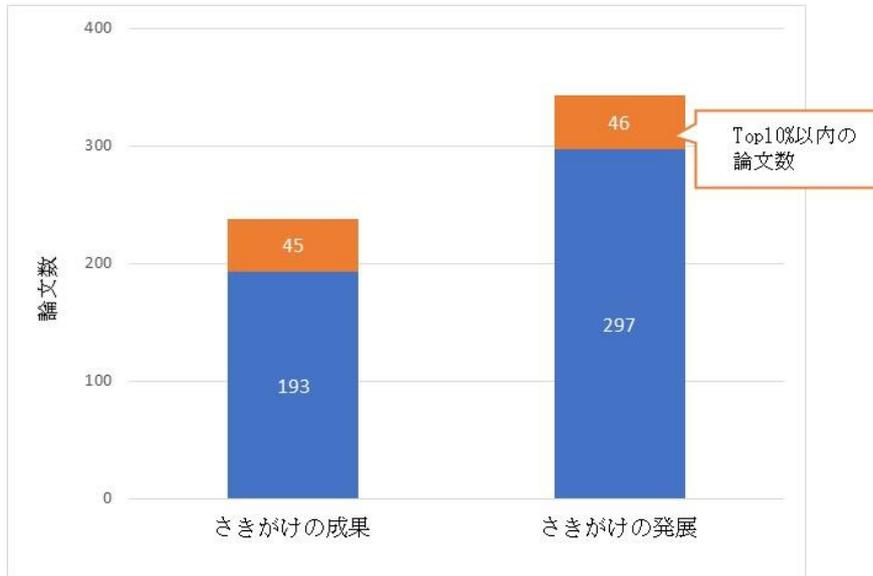


図 2-1 さきがけの成果および発展に関する論文数

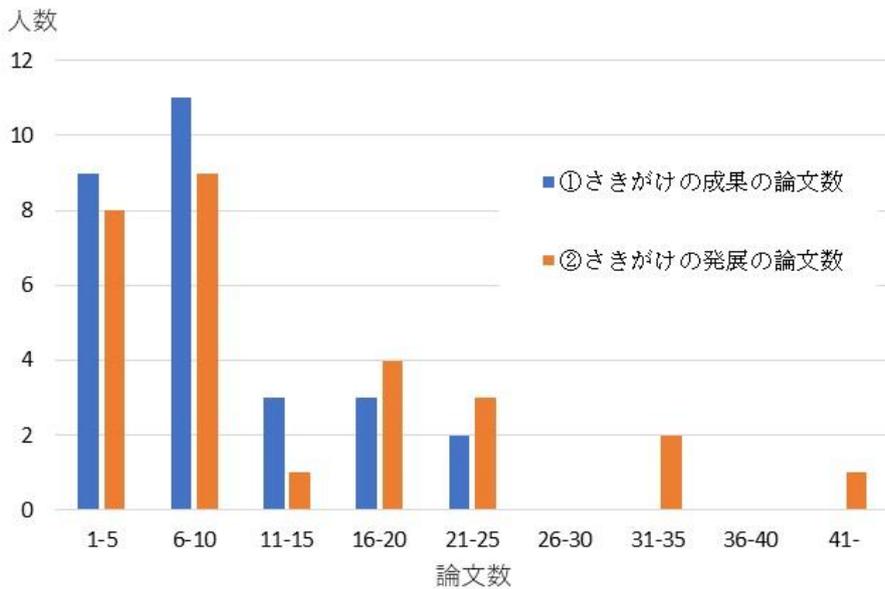


図 2-2 各研究者の論文数分布

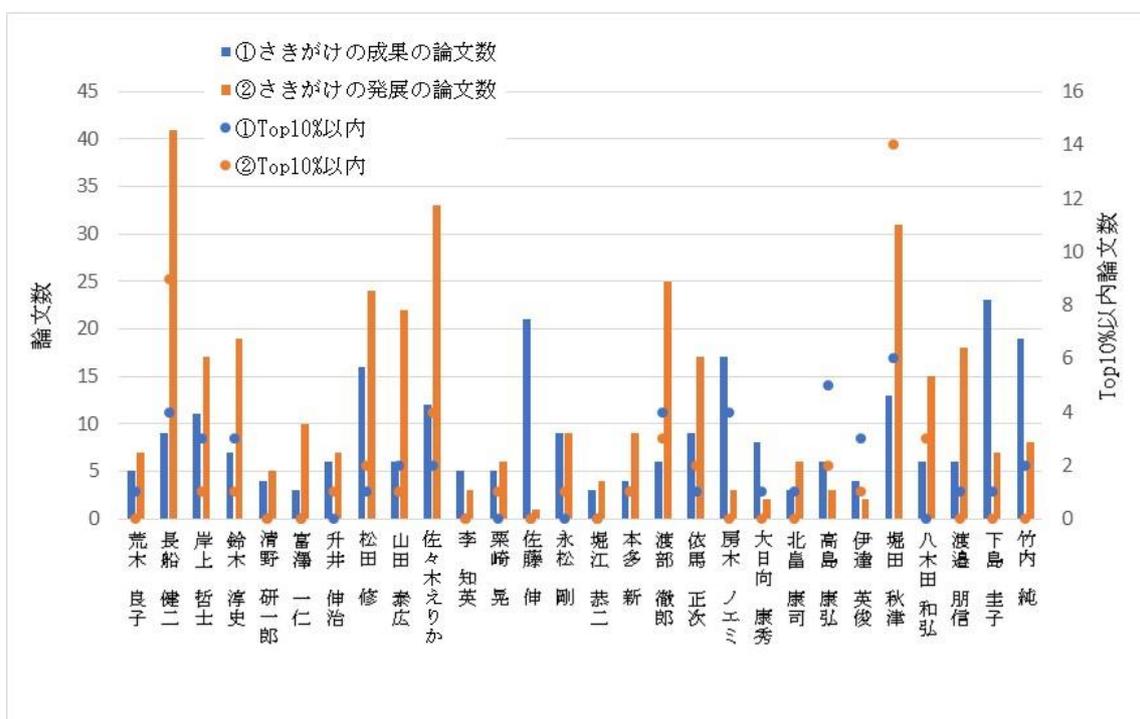


図 2-3 各研究者の研究領域期間中・終了後の論文数

2.2.3 特許

特許が基礎研究から産業への貢献を分析する指標となることや特許からの研究の発展に特許出願件数・登録件数は研究開発が応用に向けて進展していることを表す一つの指標であると考えられるため、研究期間中と研究終了後の状況について調査し、表 2-6 に示した。

研究期間中の研究者の特許出願は国内 20 件、海外 9 件であった。登録件数(期間中に出了願した特許のうち、現時点で特許登録されている件数)は、国内 10 件、海外 6 件であった。期間中の国内特許出願は、渡邊が 5 件と多く、次いで長船が 3 件である。なお、長船は海外にも 2 件出願しており、国内外で出願したこれらの 5 件は、すべて登録されている。

研究期間後の特許出願は、国内 55 件、海外 43 件であり、うち国内 11 件、海外 9 件が登録されている。研究期間後では、長船の特許出願数が国内 16 件、海外 15 件と多く、次いで松田が国内 10 件、海外 8 件である。このうち、長船は、国内 6 件、海外 6 件が登録されており、松田は、国内 4 件、海外 2 件が登録されている。

また、本研究領域の研究者が発明者として含まれ、企業が出願人となっている特許は、出願 16 件であり、8 件(国内 5 件、海外 3 件)が登録されている。

表 2-6 研究期間中・終了後の特許の出願と登録状況

採択 年度	研究 代表者	研究期間中				研究終了後			
		出願件数		登録件数		出願件数		登録件数	
		国内	海外	国内	海外	国内	海外	国内	海外
2008 年度	荒木 良子	1	0	0	0	1	0	0	0
	長 船健二	3	2	3	2	16	15	6	6
	岸上 哲士	0	0	0	0	1	0	0	0
	鈴木 淳史	1	1	0	0	1	1	0	0
	清野 研一郎	0	1	0	0	0	0	0	0
	富澤 一仁	0	0	0	0	1	0	0	0
	升井 伸治	2	0	0	0	1	1	0	0
	松田 修	0	0	0	0	10	8	4	2
	山田 泰広	0	0	0	0	1	0	0	0
	佐々木 えりか	2	1	2	1	1	0	0	0
2009 年度	李 知英	0	0	0	0	2	2	0	0
	栗崎 晃	0	0	0	0	0	0	0	0
	佐藤 伸	0	0	0	0	0	0	0	0
	永松 剛	1	0	1	0	1	1	0	0
	堀江 恭二	0	0	0	0	0	0	0	0
	本多 新	0	0	0	0	0	0	0	0
	渡部 徹郎	0	0	0	0	1	1	0	0
	依馬 正次	0	0	0	0	0	0	0	0
	房木 ノエミ	2	2	2	2	2	0	1	0
	大日向 康秀	0	0	0	0	3	1	0	0
2010 年度	北島 康司	0	0	0	0	0	0	0	0
	高島 康弘	0	0	0	0	2	4	0	0
	伊達 英俊	0	0	0	0	0	0	0	0
	堀田 秋津	0	0	0	0	8	8	0	1
	八木田 和弘	1	1	0	0	2	1	0	0
	渡邊 朋信	5	1	2	1	1	0	0	0
	山本(下島) 圭子	0	0	0	0	0	0	0	0
	竹内 純	2	0	0	0	0	0	0	0

領域全体	20	9	10	6	55	43	11	9
------	----	---	----	---	----	----	----	---

- 1) PCT 出願、海外国への個別特許申請のいずれかがあれば、海外としてカウント。
- 2) 国内特許出願し PCT 出願あるいは直接 PCT 出願された場合は国内出願件数に含めてカウント。

2020年10月28日調査

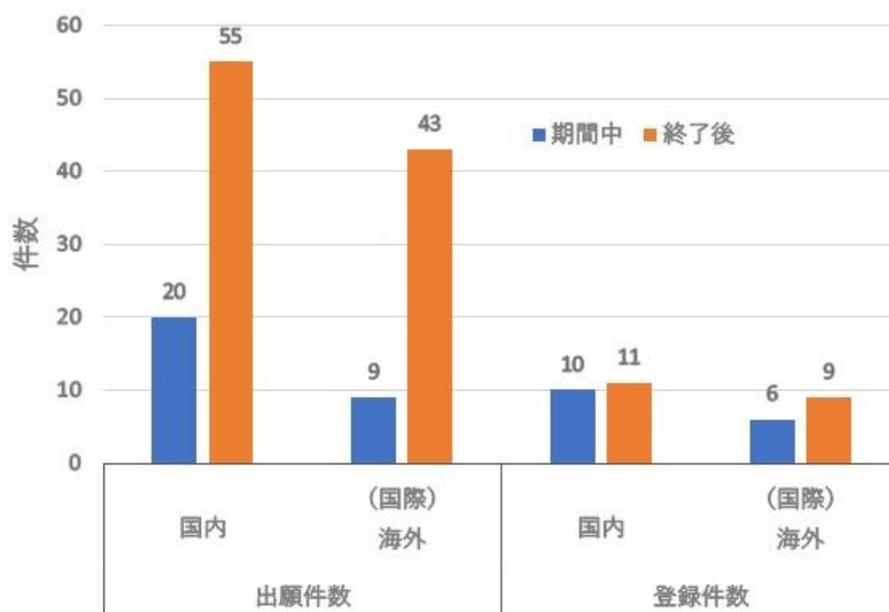


図 2-4 研究期間中・終了後の特許の出願と登録状況

2.2.4 受賞

科学技術の進歩への貢献や研究成果に関する評価を示す指標の一つとして、受賞歴が挙げられる。表 2-7 に、研究終了後の研究者の受賞歴を示す。

若手研究者に対する著名な賞である、文部科学大臣表彰若手科学者賞を、佐藤が 2015 年に、堀田が 2016 年に受賞した。また、鈴木は 2015 年に、山田は 2017 年に、日本学術振興会賞を受賞した。本研究領域の研究者は、その他、財団などの様々な賞や、学会賞などを受賞している。

表 2-7 研究終了後の受賞リスト

No.	受賞者	賞の名称	授与機関	受賞年
1.	長船 健二	大島賞	日本腎臓学会	2014
2.		井村臨床研究奨励賞	公益財団法人成人血管病研究振興財団	2015
3.		CiRA 賞	京都大学 iPS 細胞研究所	2015
4.	岸上 哲士	学術賞	日本繁殖生物学会	2014
5.	鈴木 淳史	日本分子生物学会三菱化学奨励賞	日本分子生物学会	2012
6.		日本学術振興会賞	日本学術振興会	2015

No.	受賞者	賞の名称	授与機関	受賞年
7.	山田 泰広	日本学士院学術奨励賞	日本学士院	2017
8.		日本学術振興会賞	日本学術振興会	2017
9.		JCA-Mauverney Award	日本癌学会	2017
10.	佐々木 えりか	科学技術分野の文部科学大臣表彰科学技術賞受賞	文部科学省	2015
11.		慶應医学会 野村達次賞受賞	慶應医学会	2015
12.		公益社団法人日本実験動物学会 安東・田嶋賞受賞	公益社団法人日本実験動物学会	2017
13.	佐藤 伸	科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞	文部科学省	2015
14.		日本動物学会奨励賞	日本動物学会	2015
15.		Interstellar initiative; Top presentation team award	New york academy of science	2017
16.	本多 新	JRD Outstanding Paper Award	日本繁殖生物学会	2016
17.		Experimental Animals The Best Paper Award	日本実験動物学会	2016
18.	堀田 秋津	科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞	文部科学省	2016
19.		日本再生医療学会賞(基礎研究部門)	日本再生医療学会	2020
20.	八木田 和弘	京都府公立大学法人表彰 研究部門賞	京都府公立大学法人	2017
21.	竹内 純	東京都文京区功労賞	東京都	2016
22.		第1回日本循環器学会基礎研究フォーラム Poster Award 2018	日本循環器学会	2018

2.2.5 招待講演

研究者の研究成果を、学会における招待講演として発表した件数が、研究終了後、合計376件に上った。特に、鈴木が83件、佐々木が74件、長船健58件と多い。

鈴木は、ダイレクトリプログラミングの手法を用いた肝細胞の誘導に関する講演が多く、アメリカ(2件)、中国(1件)、台湾(4件)等、海外でも多くの講演実績がある。

佐々木は、実験動物に関する講演や、脳神経科学に関する講演を行っており、研究終了後の74件中27件がアメリカ(11講演)、中国(4講演)、シンガポール(4講演)等の海外の講演である。

2.2.6 報道

研究終了後に報道機関から報じられた件数は、総数が788件に上った。研究者別では、長船が174件で最も多く、研究成果が社会的にも注目されていることを示している。次いで、山田が129件、堀田が103件となっている。

2.2.7 共同研究や企業との連携

本研究領域では、世界各国で進められている大型研究プロジェクトへの参画や製薬企業との共同研究も活発に行われている(2.3.2にも記載)。

佐々木は、国家プロジェクトである革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクトに参画している。さらに、アメリカの同様のプロジェクトである、様々な動物の脳のネットワークを明らかにすることを目的とする BRAIN initiative にもアメリカ国立衛生研究所との共同研究を通じて関与している。アメリカ国立衛生研究所は近年マーマセットに注目しており、国家プロジェクト間の協力も期待される。

また、複数の研究者において製薬企業との共同研究を確認できた。特に長船は、複数の国内製薬企業や医療機器メーカーとヒト iPS 細胞から臓器を作り薬剤スクリーニングや病態モデルに応用する共同研究を実施している。

2.2.8 実用化・製品化

本研究領域は、2006年に誕生した iPS 細胞であるため基礎研究が多く、創薬や細胞治療に結び付く実用化・製品化には至っていない。しかし、以下のような iPS 細胞を作成する際のツールが製品化されている。

高島康弘はナイーブ型ヒト iPS 細胞を維持するための培地を開発し、STEMCELL TECHNOLOGIES 社から NaïveCult™ Expansion Medium として販売している。

また、房木は遺伝子を傷つけず細胞初期化ができるセンダイウイルスベクターを用いた手法を開発し、ディナベック株式会社(現 株式会社 ID ファーマ)から iPS 作製キット CytoTune®-iPS として販売されている。

2.2.9 ベンチャー

長船は2019年9月に設立したリジェネフロ株式会社において、自身の研究成果の商品化を目指している。

(1) リジェネフロ株式会社設立の状況等について

① 起業の理由・動機・狙い等

さきがけ「多発性嚢胞腎患者由来の iPS 細胞を用いた病態解析」の成果を基に開発したヒト iPS 細胞から腎細胞の分化誘導法を使用し、腎疾患に対する細胞療法の実用化を目指している。

② 起業の原資となった技術(登録特許、論文等)

(i) Mae, Shin-Ichi, et al. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. Nature Commun vol. 4, no. 1367, 2013.

(ii) Toyohara, Takafumi, et .al. Cell therapy using human induced pluripotent stem cell-derived renal progenitors ameliorates acute kidney injury in mice. Stem Cells Transl Med, vol. 4, 2015, pp. 980-92

(2) 会社の概要

① 基本データ(売上高、資本金(主たる株主と出資額)、従業員数等)

資本金：1億9,000万円

従業員：11名

② 事業の概要

(i) 各種製品の概要(名称、種別、機能、価格、生産量等)

ネフロン前駆細胞の投与 400万円//回(想定)

(ii) 競合する会社と競合他社に対する強み

競合は、バイオス株式会社等。

強みは、バイオス株式会社はヒト iPS 細胞から作製した腎臓の移植を目指しているが、リジェネフロ株式会社はヒト iPS 細胞から作製したネフロン前駆細胞を用いた細胞治療を目指している。リジェネフロ株式会社の方が実用化までの期間が短いことが予想される。

(iii) 製造の状況、量産の可能性等

ネフロン前駆細胞の差別的な未分化状態を維持しつつ 100 倍以上に拡大させる培養法を開発。

③ 市場開拓戦略・製品戦略について

(i) 市場開拓、顧客開拓について

透析治療を受けるまで重症化していない腎臓病患者に実施し、腎臓機能を回復させることで透析治療に入る時期を遅らせるための治療法として保険適用を目指す。

(ii) 新製品開発の概要

2023 年に治験を開始し、さきがけ承認を受けることで早期の市場導入を目指す。

④ その他

関心を示す企業等、世の中からの反響:国内外の複数の製薬企業から販売権等のアプローチを受けている。

2.3 研究成果から生み出された科学技術や社会・経済への波及効果

2.3.1 研究領域の展開状況(展開図)

本研究領域では、2008 年から 2010 年にかけて合計 30 件の課題が選定され(1 課題は研究者の民間企業への転出により中止)、「細胞リプログラミングに立脚した幹細胞作成・制御による革新的医療基盤技術の創出」という戦略目標の下で研究を遂行した。展開と発展の展開図として図 2-5 に示した。発展研究の内容は 2.3.2 以降や第 3 章を参照されたい。

本研究領域の研究課題には、細胞のリプログラミング、分化転換、幹細胞生物学に関する研究が含まれており、その内容は、1) リプログラム機構の分子レベルでの解析に基づくリプログラミング技術の高度化・簡便化、2) 幹細胞分化転換過程の解析と人的調節、3) iPS 細胞を用いたエピジェネティック過程の分子機構の解析、4) iPS 細胞を駆使する疾患発症機構の解析、5) ヒト疾患モデル、試験系の構築に大別される。

1) リプログラム機構の分子レベルでの解析に基づくリプログラミング技術の高度化・簡便化では、鈴木がさきがけ研究においてマウスの皮膚から抽出した線維芽細胞に肝細胞分化に関連した2つの転写因子を導入することで、肝細胞の特徴を有する細胞(iHep 細胞)へと変化させることに成功した(ダイレクトリプログラミング)。今後、ダイレクトリプログラミング手法で作成された肝細胞は、生体への移植のみならず創薬スクリーニングに応用できる。また、荒木はさきがけ研究で iPS 細胞の出現の瞬間を解析するために、単一細胞を追跡可能な広視野、高解像度で短インターバルかつ長時間連続撮影が可能なアッセイ系を開発し、体細胞から iPS 細胞化への劇的な変化は遺伝子導入後3日以内に開始していることを示した。今後、リプログラム機構を解析することで、変異の少ない iPS 細胞の樹立効率が向上し、医療応用への促進が期待される。

2) 幹細胞分化転換過程の解析と人的調節において、高島がさきがけ研究においてヒト ES/iPS 細胞の抱える不均一性等の問題を解決する、完全にリプログラミングされた iPS 細胞(ナイーブ型ヒト iPS 細胞)を樹立させた。ナイーブ型ヒト iPS 細胞は iPS 細胞では分化しないと考えられている臓器への分化が可能であり、iPS 細胞と相補的な医療応用が今後期待される。また、依馬はさきがけ研究において幹細胞機能制御の分子機構の研究を行い、終了後はその成果をさらに発展させ、カニクイザルにおける遺伝子改変技術を確立するとともに、ヒト病態と酷似した腎嚢胞を形成させることに世界で初めて成功した。

3) iPS 細胞を用いたエピジェネティック過程の分子機構の解析では、山田がさきがけ研究においてリプログラミングの技術を用いてがん細胞のエピジェネティック状態を改変することにより、遺伝子の変異によらないがん化の仕組みを解明した。今後、エピゲノムを制御することによる、新しいがんの治療法の開発につながる可能性がある。

4) iPS 細胞を駆使する疾患発症機構の解析では、長船がさきがけ研究において常染色体郵政多発性嚢胞腎(ADPKD)患者の iPS 細胞を樹立させ、終了後にはヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞、尿管芽、胆管への誘導に成功し、腎臓の病態モデルの作成を目指している。また、下島は世界で初めて先天性大脳白質形成不全症患者由来の疾患 iPS 細胞を樹立し、遺伝子発現解析を行うことにより、遺伝子の変異・重複と発症との関連をさきがけ研究において明らかにした。今後、従来発症機構が不明であった疾患の原因を解明し、治療法を開発する上で重要になると考えられる。

5) ヒト疾患モデル、試験系の構築においては、佐々木がさきがけ研究においてマウスよりヒトに近いマーモセットにおいて iPS 細胞を樹立した。今後、マーモセットの iPS 細胞は、ヒト iPS 細胞を用いた治療の概念実証に用いられることが期待される。また、岸上哲

士はさきがけ研究においてヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤を用いてクローン動物の作出効率を向上させる手法を用いて、「体細胞核移植におけるリプログラミング促進技術の開発」を行い、さきがけ研究終了後には新しい糖尿病モデルマウスを開発した。このモデルマウスは、遺伝的変異によらず、生体において糖尿病を自然発症するマウスであり、生活習慣病の研究に役立つことが期待される。

戦略目標、達成目標	インプット	アクティビティ/アウトプット	アウトカム (short/mid-term)		インパクト													
			研究期間中の成果	終了後の継続・発展研究の成果														
<p>戦略目標： 細胞リプログラミングに立脚した肝細胞作製・制御による革新的医療基盤技術の創出</p> <p>達成目標： (1)リプログラム機構の解析に基づくリプログラミング技術の高度化・簡便化 (2)幹細胞分化転換過程の解析と人的調節 (3) iPS細胞を用いたエピジェネティック過程の分子機構の解析 (4) iPS細胞を駆使する疾患発症機構の解析 (5)ヒト疾患モデル、試験系等の構築</p>	<p>研究総括： 西川伸一</p> <p>研究者 荒木 良子 長船 健二 岸上 哲士 鈴木 淳史 清野 研一郎 富澤 一仁 升井 伸治 松田 修 山田 泰広 佐々木えりか※ 李 知英 片岡 宏 栗崎 晃 佐藤 伸 永松 剛 堀江 恭二 本多 新 渡部 徹郎 依馬 正次※ 房木 ノエミ※ 大日向 康秀※† 武藤 太郎† 北島 康司 高島 康弘 伊達 英俊 堀田 秋津 八木田 和弘 渡邊 朋信 下島 圭子※ 竹内 純※ ※：5年型 †：大挑戦型</p>	<p>研究成果</p> <p>論文</p> <table border="1"> <tr> <td>①さきがけ研究成果の論文数</td> <td>②さきがけ研究成果の継続発展の論文数</td> </tr> <tr> <td>238(45)</td> <td>343(46)</td> </tr> </table> <p>()の値はTop10%以内論文数</p> <p>特許申請・登録</p> <table border="1"> <tr> <td></td> <td>期間中</td> <td>終了後</td> </tr> <tr> <td>出願</td> <td>国内 20 国際 9</td> <td>55 43</td> </tr> <tr> <td>登録</td> <td>国内 10 国際 6</td> <td>11 9</td> </tr> </table> <p>アウトリーチ活動</p> <ul style="list-style-type: none"> ○プレスリリース多数 ○領域を超えた研究ネットワークの構築 ・iPS-CRESTとの合同公開シンポジウム ・さきがけ研究者交流会 ・エピジェネティック、他領域との交流 <p>マネジメント</p> <ul style="list-style-type: none"> ・研究者との対話、きめ細かいレポートを通じたタイムリーな研究の針路付け 	①さきがけ研究成果の論文数	②さきがけ研究成果の継続発展の論文数	238(45)	343(46)		期間中	終了後	出願	国内 20 国際 9	55 43	登録	国内 10 国際 6	11 9	<p>科学技術の進歩への貢献</p> <ul style="list-style-type: none"> ○基礎科学への貢献と共に革新的医療基盤技術になり得る成果 ・タイルリプログラミング手法を用いて、皮膚細胞（線維芽細胞）に転写因子を導入することにより肝細胞への分化を誘導（鈴木） ・iPS法と核移植法の比較による初期化機構の解明と突然変異の少ないiPS細胞の作製（荒木） ・胎原生殖細胞からiPS誘導を行う条件の確立と新たなリプログラミング手法の開発（永松） ・iPS干渉法による細胞の分化誘導因子の同定と同定された因子による任意細胞の樹立法の開発（升井） ・ヒト多能性幹細胞の解析とナイーブ型ヒトiPS細胞の樹立（高島） ・初期化因子Klfファミリーによる幹細胞機能制御機構の解析（依馬） ・細胞初期化過程とがん化の関係の解析により、一部のがんがエピゲノム制御機構の変化により発生することを解明（山田） ・エピジェネティックな遺伝子修飾を解析するためのベクターシステム（EBVエピソーム・ベクター）の開発（松田） ・常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）患者由来のiPS細胞を用いた病態解析（長船） ・染色体異常症候群における合併症発生メカニズムの解明（北島） ・患者由来のiPS細胞を用いた中枢神経障害の病態解析（下島） ・胚の環境を操作することにより、生体で糖尿病を発症する糖尿病モデルマウスを作製（岸上） ・マウスにおける遺伝子ノックアウトとiPS細胞作製技術を確認し、ヒト疾患モデル動物を作製（佐々木） ・iPS細胞を用いて絶滅危惧種（アマミマグロ）の生殖細胞を作製（本多） ・両生類の過剰肢誘導モデル系を用いた細胞リプログラミング機構の解析（佐藤） 	<p>○さきがけの成果を実用化につなげるための橋渡し研究の展開</p> <ul style="list-style-type: none"> ・肝細胞の機能を代替可能なオルガノイドの開発と医療・創薬への応用（鈴木） ・iPS細胞の免疫原性の解析とゲノムに変異の少ない再生医療用iPS細胞の作製（荒木） ・新たな薬剤探索プロトコル「薬剤リプログラミング」の提唱（松永） ・分化制御因子の精密制御手法の確立（升井） ・ナイーブ型iPS細胞研究のための培地・培養方法の開発（高島） ・非ヒト霊長類（カニクザル）におけるヒト病態モデルの開発（依馬） ・がん細胞のエピゲノムを標的とした細胞がん化過程の制御（山田） ・細胞の分化と初期化に伴う染色体エピジェネティック修飾の解析（松田） ・患者由来iPS細胞を用いた疾患発症機作の詳細解明とそれによる新たな診断法・治療法の開発、創薬研究への展開（長船・北島・下島） ・各種の疾患モデルマウスの確立（岸上） ・疾患モデル動物を用いた創薬研究、診断方法の研究推進（佐々木） ・絶滅危惧種の細胞/バンクの整備（本多） ・再生不能な高等脊椎動物（ニトリ、マウス等）における再生研究（佐藤） <p>展開</p> <ul style="list-style-type: none"> ・iPS細胞を用いた臓器再生医療のためのベンチャー企業設立等 受賞/人材育成・成長等 <p>文部科学大臣若手科学者賞（佐藤、堀田） 日本学術振興会賞（鈴木、山田） ドイツイノベーションアワード（竹内） 文部科学大臣科学技術賞（佐々木）等</p> <p>・さきがけ終了後の昇任（14名）</p>	<p>○健康長寿社会、新たな産業が生まれる社会、持続可能な社会の創出</p> <ul style="list-style-type: none"> ・肝臓疾患に対する新たな治療法の開発 ・拒絶反応のない臓器の作製 ・疾患を制御する新たな医薬品の開発 ・iPS細胞樹立メカニズムの解明と再生医療のツールとしてのiPS細胞の汎用化 ・新たな疾患モデル動物の作製 ・新たながん治療法の実用化 ・エピジェネティックの異常により生じる疾患の治療法開発 ・稀少疾患の治療方法の開発 ・臓器移植に伴う倫理面、安全面の問題の克服 ・新たな診断法・治療法の開発 ・創薬研究への展開 ・医療以外の分野への応用（バイオッセイ、野生生物保全） ・再生不能動物での臓器再生
①さきがけ研究成果の論文数	②さきがけ研究成果の継続発展の論文数																	
238(45)	343(46)																	
	期間中	終了後																
出願	国内 20 国際 9	55 43																
登録	国内 10 国際 6	11 9																

図 2-5 さきがけ研究領域の展開図

2.3.2 研究成果の科学技術の進歩への貢献

本節では、科学技術への進歩に貢献した発見や解明、共同研究、国内外の研究者に与えた影響および技術指導、さきがけ研究開始当時には目標とされていなかった新たな展開の観点から整理する。

科学の進歩に大きく貢献した発見や解明は、細胞や組織の開発、iPS 細胞/ES 細胞の作製技術の開発、遺伝子等の解析技術の開発、新たな発見に分類した。

細胞や組織の開発として3例紹介する。長船は、ヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞、腎組織、胆管等の作製に成功した。ヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞を作ることは困難と考えられ、他の臓器よりも研究が遅れていたが、熊本大学、ハーバード大学、メルボルン大学、長船研究室の4つの研究室を中心として手法が確立された。今後、確立された手法を用いて、多くの研究者が病態モデルの作製に挑戦すると長船は期待している。また、4つの研究室の中でも自らの手法が、効率性と生体内の発生過程の再現性において優れていると長船は考えている。二次元培養を用いる長船の方が、細胞塊を作る手法を用いる熊本大学より作製効率が良く、ヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞を作る工程数と用いる因子の数が長い長船の方が、工程数と因子の数が少ないハーバード大学とメルボルン大学よりも生体内の発生過程をより再現していると考えられている。

鈴木は、ダイレクトリプログラミングの手法を用いて、ヒトの血管内皮細胞から腸前駆細胞や腸幹細胞を作製することに成功した。同様の手法で作製されたマウスの腸前駆細胞と腸幹細胞は、マウスの実際の腸と比較して遺伝子発現において差異がないことが確認されており、今後は病態モデルの開発が進むと鈴木は期待している。

また、本多は、カニクイザルの iPS 細胞と ES 細胞を樹立させた。

iPS 細胞/ES 細胞の作製技術の向上として5例を報告する。荒木は点突然変異を従来の1/5から1/10ほどにする iPS 細胞の樹立法を開発した。山田は、2i 法の培地を改良することで高い発生能力を持つ ES 細胞を作製することに成功した。李は、ES 細胞の DNA メチル化維持が可能な FBS+2i 培地を開発した。高島は、培地の MEK 阻害剤の量を調整することによりナイーブ型ヒト ES 細胞の樹立と維持を容易にした。堀田は、CRISPR-Cas9 を用い HLA 遺伝子を欠損させ、T 細胞および NK 細胞から攻撃されにくい低抗原性 iPS 細胞の作製法を樹立した。

遺伝子等の解析技術の向上として3例を記載する。升井は、細胞リプログラミング過程における遺伝子の働きを評価する iPS 干渉法を開発した。依馬は、免疫染色法を改良し世界で初めてマウスの着床前胚のリン酸化を可視化する方法を確立した。渡邊は、機械学習を用いた、細胞が発するラマン発光スペクトルの形状から薬剤耐性大腸菌の遺伝子発現を推定する技術を開発した。

新たな発見として2例を記載する。永松は、テロメアテロメラーゼ逆転写酵素の欠損がiPS誘導効率を著しく減少させることを発見した。八木田は、マウスES細胞の分化誘導系を用いることで、世界で初めて細胞分化と体内時計の発生メカニズムの関係を解明した。

本研究領域は、共同研究が活発であり、多くの先生が本研究領域の先生や国内外の先生、あるいは製薬企業等との共同研究が実施されている。

本研究領域の研究者同士の共同研究として6件記載する。長船と堀田はゲノム編集技術を用いた疾患特異的iPS細胞樹立について共同研究を実施した。岸上と山田の細胞シグナルがエピジェネティクスに与える影響に関する共同研究を行った。永松と鈴木は始原生殖細胞におけるNanogの発現制御についての共同研究を実施した。佐々木と依馬の共同研究では我が国初のトランスジェニックカニクイザル産子の作出に成功した。升井と大日向は原始内胚葉幹細胞を用いた新規幹細胞維持方法の開発について共同研究を実施している。堀江と山田と八木田は体内時計と細胞分化との関連およびがんとの関連についての共同研究を実施した。

製薬企業等との共同研究としては、5件確認されている。長船は腎臓再生に関するアステラス製薬株式会社との共同研究、多発性嚢胞腎の創薬に関する製薬企業2社との共同研究を実施している。鈴木は肝細胞誘導技術の医療展開を目指して製薬企業2社と共同研究を行った。富澤はインスリン分泌促進作用のある化合物開発やミトコンドリア病診断法の開発に関する共同研究を民間企業2社と共同研究を行っている。升井はヒトiPS細胞培地についての共同研究や細胞代謝について共同研究を民間企業と実施している。堀田は、研究内容は非公開であるが、製薬企業3社と共同研究を実施している。

本研究領域の研究者が国内外の研究者に与えた影響および技術指導として、5件報告する。荒木は、医薬基盤研究所、愛知県がんセンター、生育医療センター、慶応大学、Roswell Park Cancer Instituteに対してマウスiPS細胞の提供を行っている。鈴木はiHep細胞誘導因子を搭載したベクター一式をaddgeneに提供し、世界中の研究者により活用されている。堀江は米国ハーバード大学、米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校、カナダ・ブリティッシュコロンビア大学からさきがけ研究において樹立したホモ変異体ES細胞株の譲渡のリクエストを受けた。依馬が発表した世界初の染色プロトコルは世界的に使用されている。高島は開発したナイーブ型ヒトiPS細胞を10か所以上の国内外の研究機関に提供した。

さきがけ研究開始当時には目標とされていなかった新たな展開として、特筆すべき2例を挙げる。佐々木は、標的遺伝子ノックアウトマーマーモセット作製技術が脳神経科学の国際プロジェクトのキーテクノロジーの一つとなっている(詳細は2.2.7)。本多は、絶滅危惧

種アマミトゲネズミの iPS 細胞の樹立、生殖細胞の作製に成功し、種の完全喪失への備えとしての iPS 細胞活用の道を開いた。

2.3.3 研究成果の社会・経済への貢献

本研究領域は、主に医療分野に関連する基礎研究を主対象としていることから、その成果が直ちに応用に結びつくものではないが、さきがけ研究から得られた成果を、医療に結び付く貢献、製品化された技術、新たな事業の立ち上げの観点から整理する。

医療に結び付く貢献は、疾患特異的な治療法や疾患モデル等の開発、創薬研究全般に活用可能な技術の開発、新たな発見に分類した。

疾患特異的な治療法や疾患モデル等の開発として代表的な 4 例を報告し、さらに他の例も簡単に示す。長船はヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞、腎組織、胆管等を作製する方法を活用して、腎嚢胞、アルポート症候群、肝嚢胞、2 型糖尿病、非アルコール性脂肪性肝炎、動脈瘤等の血管病変等の疾患モデル作製や細胞治療の開発を行っている。現段階の技術では、ヒト iPS 細胞から作製できる腎臓は数ミリ単位であり、移植が可能となる 10 センチ単位には及ばないため、疾患モデルの作製による薬剤探索の研究や、数ミリ単位でも可能な細胞治療の開発が活発化すると長船は考えている。

鈴木はダイレクトリプログラミングの手法により作製した肝細胞の特徴を有する細胞 (iHep 細胞) を、現段階では生体肝移植しか治療法が無く、約半数の患者が亡くなる急性肝不全の新たな治療法として細胞治療の活用を目指した研究を進めている。

高島は、さきがけ研究において開発したナイーブ型ヒト iPS 細胞を用い、従来のプライム型 iPS 細胞では分化できない胚体外細胞への分化の研究を進めており、ナイーブ型ヒト iPS 細胞由来の胚体外細胞から誘導される卵黄嚢や胎盤細胞を活用した、着床不全や妊娠高血圧症の発症原因の解明や治療法の開発が期待される。

佐々木は、従来から哺乳類の実験動物として使われるカンクイザルが階層社会を築くのに対し、家族単位で行動し、多彩なコミュニケーションを取るマーモセットの特徴を生かし、遺伝子改変マーモセットをアルツハイマー病、自閉症、統合失調症の病態モデルとして活用を目指している。特に、アルツハイマー病モデルのマーモセットの行動を 24 時間体制で長期間にわたり詳細に分析することで、発症前のシグナルの検出を目指す研究を進めている。

岸上は、遺伝変異ではなく胚時期の環境操作を行うことで成体において糖尿病を自然発生するモデルマウスを開発した。升井は角膜上皮細胞の特異的な遺伝子発現を維持する転写因子を発見し、iPS 細胞からの分化誘導の効率化が期待される。永松は幹細胞性を利用した合理的な薬剤探索プロトコルを開発し抗がん剤耐性を持つ前立腺がん細胞を抗がん剤感受性へリプログラムさせる薬剤を発見した。本研究成果を用いて 2016 年から慶応義塾大学にて臨床試験が実施された。依馬は自身が確立した遺伝子改変技術を用いて、カンクイザルの常染色体優性多発性嚢胞腎モデルを作製した。堀田は TALEN および CRISPR-Cas9 を用いてデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者由来 iPS 細胞の遺伝子変異修復に成功し

た。下島は患者由来 iPS 細胞を用いて、高度な発達障害を来す原因遺伝子の探索を行っている。

創薬研究全般に活用可能な技術の開発として 3 例を記載する。長船はヒト iPS 細胞から作製された腎組織、肝臓組織を用いた薬剤スクリーニングの研究開発を実施している。鈴木はダイレクトリプログラミングの手法により作製した肝細胞の特徴を有する細胞 (iHep 細胞) を、肝毒性と代謝のされやすさ等を調べる薬剤スクリーニングへの活用を目指している。李はマウス ES 細胞を用いて心臓オルガノイドを作製し、薬剤の心毒性試験への応用が期待される。

新規の発見として 2 例を記載する。鈴木はダイレクトリプログラミングの手法で細胞の分化状態を正常細胞に近づけることで肝がん細胞を正常化可能なことを示した。山田は遺伝子の変異ではなくエピゲノムの状態変化によるがん化の仕組みを解明した。

製品化された技術は 2 例あり、高島はナイーブ型ヒト iPS 細胞を維持するための培地を、房木は遺伝子を傷つけず細胞初期化ができる手法を活用した iPS 作製キットを販売している (2.2.8 にも記載あり)。

調査時に立ち上げられた新たな 3 例の事業を記載する。長船は 2019 年 9 月に RegeNephron 株式会社 (現リジェネフロ株式会社) を設立し、腎疾患患者に対する細胞療法を開発している (詳細は 2.2.9)。岸上は株式会社紀和実験動物研究所において糖尿 DOHaD モデルマウスの生産体制を確立し、販売される予定。佐々木は、所属する公益財団法人実験動物中央研究所にて遺伝子改変マーマーセットの受託製造事業を実施している。

2.3.4 その他の特記すべき事項

キャリア形成面においては、本研究領域に参加した研究者のうち 14 名がさきがけ採択後に教授に昇任した。また、採択時にはラボを持たずに単独で研究を行っていた研究者が、さきがけ終了時には 20 名ものグループを率いる准教授にキャリアアップした例 (長船) もあった。本研究領域は、研究者の人材育成面においても成果を上げたと考えられる。

2.4 JST-CIRM 共同研究プログラム

JST-CIRM 共同研究プログラムは、iPS 細胞等の研究を加速、臨床応用に結び付く結果を得ることを目的として、JST とカリフォルニア再生医療機構 (CIRM: California Institute for Regenerative Medicine) が協力し、日本とカリフォルニア州の研究者による共同研究を支援するプログラムである。本プログラムは 2009 年度から 2013 年度まで実施され、研究総括は永井良三自治医科大学学長 (プログラム終了時) が務め、アドバイザーは表 2-8 に示す有識者で構成された。

表 2-8 アドバイザー

アドバイザー	所属	役職
石野 史敏	東京医科歯科大学難治疾患研究所	教授
斉藤 寿仁	熊本大学大学院自然科学研究科	教授
須田 年生	慶應義塾大学医学部	教授
中畑 龍俊	京都大学 iPS 細胞研究所	副所長
西川 伸一	JT 生命誌研究館	顧問
	NPO オール・アバウト・サイエンス・ジャパン (AASJ)	代表
眞鍋 一郎	東京大学大学院医学系研究科	特任准教授
山中 伸弥	京都大学 PS 細胞研究所	所長・教授

(注)所属と役職はプログラム終了時点を記載

本プログラムは 2009 年度に 1 名を採択し、2010 年と 2011 年に採択はなく、新規課題の採択を終了した。

表 2-9 研究課題と研究者

研究期間	研究課題	研究者	採択時の所属・役職	終了時の所属・役職	追跡調査時の所属・役職
2010年10月～ 2013年9月	iPS 細胞及び胎児由来神経幹細胞の分化・腫瘍化に及ぼす影響	中村 雅也 (Nakamura Masaya)	慶應義塾大学医学部 専任講師	慶應義塾大学医学部 准教授	慶應義塾大学医学部 教授

本プログラムに採択された中村について研究助成金、論文、特許、受賞、報道、設立ベンチャー、研究成果の社会・経済への貢献の観点から報告する。

研究助成金の獲得状況を表 2-2 に示す。JST-CIRM の研究以降 AMED から複数の大型資金を獲得している。

表 2-10 研究助成金獲得状況

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題																		金額 (百万円)		
				2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024			
中村 雅也	2010 ～ 2013	JST-CIRM	iPS 細胞及び胎児由来神経幹細胞の分化・腫瘍化に及ぼす影響																			90.0	
	2011 ～ 2016	AMED	組換え HGF 蛋白質による脊髄損傷治療薬																				1,027.9
	2013 ～ 2015	AMED	ヒト iPS 由来神経前駆細胞の腫瘍形成能のメカニズムとその制御による安全性確保の検討																				102.8

研究者	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	金額(百万円)
	2015	AMED	スポーツによる筋挫傷(肉離れ)に対する G-CSF 局所投与の医師主導治験																		80
	2016～2018	AMED	亜急性期脊髄損傷に対する iPS 細胞由来神経前駆細胞を用いた再生医療																		167.3
	2018～2020	AMED	脊髄再生治療に付随するリハビリテーション治療の構築に関する研究																		104.0
	2020～2022	AMED	miRNA 網羅的解析による神経障害性疼痛バイオマーカー探索に関する研究開発																		21

論文発表件数は 2021 年 1 月 28 日時点で、成果論文が 41 報、発展論文が 37 報であり、責任著者となっている論文はそれぞれ 19 報、13 報であった。また、Pecentile についても調査を実施したところ、Top10%以内の論文数は、成果論文は 11 報、発展論文は 5 報、Top1%以上の成果論文も 1 報あった。

表 2-11 JST-CIRM の成果および発展の論文(原著論文)数

採択年度	研究者	①JST-CIRM の成果								②JST-CIRM の発展							
		論文数	責任著者論文数	平均 FWCI 数	Top 論文数				論文数	責任著者論文数	平均 FWCI 数	Top 論文数					
					10%	1%	0.1%	0.01%				10%	1%	0.1%	0.01%		
2010 年度	中村 雅也	41	19	1.23	11	1	0	0	37	13	1.83	5	0	0	0		

- 1 責任著者とは Corresponding Author と同義。
- 2 平均 FWCI 値は、調査最終年マイナス 1 年まで(今回の調査では 2019 年末まで)の論文を対象とし、FWCI 値が得られる論文(FWCI 値=0 含む)で平均した数値とする。
- 3 Top%値は FWCI 値ベースとする。また Top%論文は「論文数」でリストアップした論文を対象とする。
- 4 各 Top%論文数は“以内”を意味し、例えば Top10%の欄には 1%以下も含む件数がカウントされる。

2021 年 1 月 28 日調査

研究期間中の特許出願は国内 2 件、海外 2 件であり、全て特許登録がなされている。また、研究期間後の特許出願は、国内 1 件、海外 0 件であり、審査請求中である。

受賞歴としては、2014 年にベーリンガーインゲルハイム社よりベルツ賞、日本再生医療学会より日本再生医療学会賞を受賞している。

研究期間後に報道機関から報じられた件数は 184 件に上り、慶応義塾大学にて開始された iPS 細胞を用いた脊髄損傷治療の治験に関する報道が注目された。

2016 年 11 月に株式会社ケイファーマ(K-Pharma)を設立している。iPS 細胞を活用した脊髄損傷等の再生医療、および疾患特異的 iPS 細胞を活用した医薬品開発を行うことを目的としている。

JST-CIRM 終了後の研究成果として、マーモセットの損傷脊髄モデルを用いた細胞移植の至適時期の検討、移植治療用神経幹細胞の造腫瘍性評価系としての脳移植の検討、次世代シーケンサーを用いた脊髄損傷に対するヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植の安全性の検討、有効かつ安全なヒト iPS 細胞由来神経幹細胞の条件の解明の 4 つの研究が挙げられる。本章では、マーモセットの損傷脊髄モデルを用いた細胞移植の至適時期の検討を詳述し、他は第 3 章に記載する。

中村は霊長類であるマーモセットの脊髄損傷モデルを用いて損傷脊髄内の微小環境を網羅的に解析することで脊髄損傷を治療するための至適時期が種によって大きく異なることを示した。マーモセットの脊髄損傷モデルでは、損傷後急性期に起こる炎症反応は 2 週以降に沈静化する一方で、2 週以降はシナプス再形成等の自然修復機構が働いている可能性が示唆された。またコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) の集積やグリア瘢痕形成は 2 週ではほとんど認めず、6 週では顕著であった。以上より霊長類では損傷後 2-4 週の時期が神経幹細胞移植の至適時期である可能性が示唆された。本研究成果が脊髄損傷の病理を理解する上で貴重なリソースとして役立つことが期待される。

第3章 各研究課題の主な研究成果

3.1 2008年度採択研究課題

3.1.1 iPS法と核移植法の比較による初期化機構の解明 (荒木良子)

iPS法と核移植法の比較による初期化機構の解明

展開している事業:

荒木 良子(独)放射線医学総合研究所重粒子医科学センター先端遺伝子 基盤研究(B)(2件)

発現研究 グループチームリーダー)

研究期間 2008年6月~2014年3月

さきがけの成果:

本課題では、iPS細胞樹立の過程でいつどのような反応が生じ、どのような分子が関与するのか明らかにすることを目標として、体細胞からiPS細胞化への劇的な変化は遺伝子導入後3日以内に開始していることを明らかにした。また、免疫原性・腫瘍原性の解析を目的とした近交系C57BL/6マウスiPS細胞株、ES細胞株を樹立した。さらに外来性c-Mycの導入は、樹立効率の上昇だけでなく、幹細胞の多能性、即ち質の向上に寄与することを明らかにした。

発展:

1. iPS細胞の免疫原性の研究^{1,2}

iPS細胞はリプログラミングにより発現異常が生じ免疫原性が生じることが報告されていたが、マウスiPS細胞およびES細胞をin vivoにて分化させた皮膚および骨髄を、それぞれジェノタイプが一致した個体に移植すると拒絶反応は生じず、両者の免疫原性に差が無いことを明らかにした(図1)。これは「iPS細胞は自家移植でも拒絶反応を引き起こす」という米国研究チームの研究成果を覆す結果であり、重度の放射線障害による骨髄の機能不全に対する血液細胞の再生による治療等のiPS細胞を利用した治療への応用が期待される。

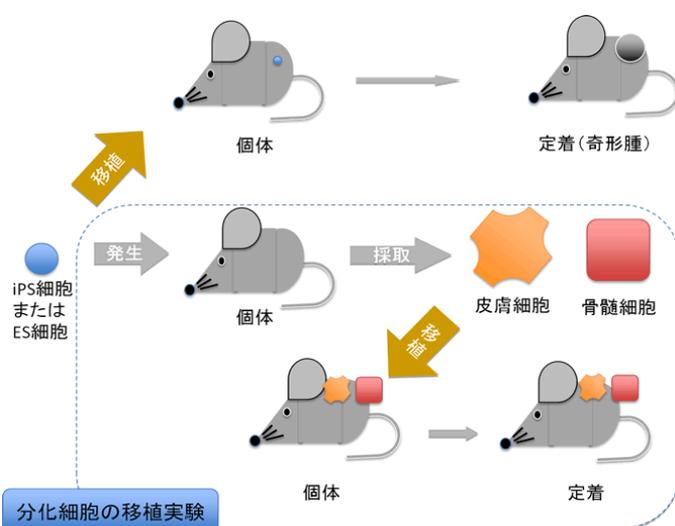


図1. 実験の概要²

2. iPS細胞の変異の解析およびその低減化^{3~9}

リプログラミング初期に変異が多数発生すること、それが、細胞周期チェックポイント異常が見られる時期と一致することを明らかにした。さらに、ヒト臍帯血から増殖させた赤芽球を親体細胞に用いることにより、変異の少ないiPS細胞が樹立できることを発見した(図2)。iPS細胞のゲノムには、全体で数百から1,000カ所もの点突然変異が見つかることが知られていたが、点突然変異を従来の1/5から1/10ほどにするiPS細胞の樹立法発見により、ゲノムに変異の少ない再生医療用iPS細胞の樹立効率が大幅に改善される可能性が示された。

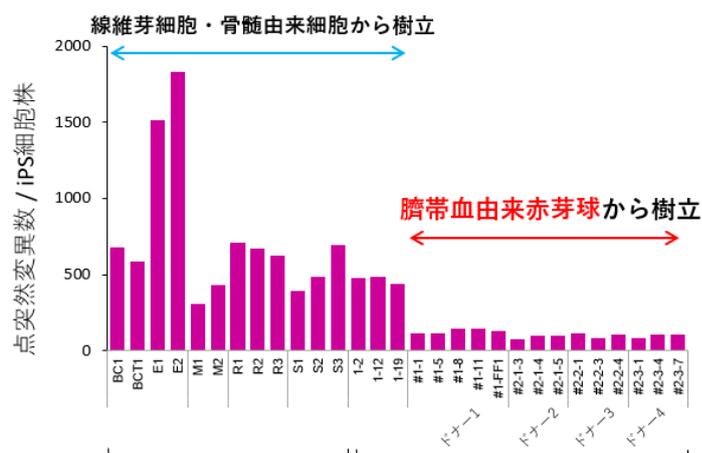


図2. ヒトiPS細胞における点突然変異の数の比較⁸

¹ Araki, Ryoko. et al., Nature vol. 494, 2013, pp100-4.² 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 プレスリリース(2013/1/10)³ Sugiura, MayumiStem. et al., Cell Reports vol.2, 2014, pp. 52-63.⁴ 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 プレスリリース(2014/1/3)⁵ Araki, Ryoko. et al., Stem Cells vol.35, 2017, pp. 1189-1196.⁶ Yoshihara, Masahito. Et al., Cell Reports. Vol.21, 2017, pp.308-315. ⁷ 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 プレスリリース(2017/10/11)⁸ Araki, Ryoko. et al., Nature Communication vol.11, 2020.⁹ 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 プレスリリース(2020/1/10)

3.1.2 多発性嚢胞腎患者由来の iPS 細胞を用いた病態解析 (長船健二)

多発性嚢胞腎患者由来の iPS 細胞を用いた病態解析

長船 健二(京都大学 iPS 細胞研究所 教授)

研究期間 2008 年 6 月～2012 年 3 月

展開している事業:

感染症実用化研究事業、再生医療実現拠点ネットワークプログラム(2 件)、基盤研究(B)、再生医療実用化研究事業

さきがけの成果:

重症度と合併症の異なる複数の常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD) 患者の皮膚線維芽細胞より iPS 細胞を樹立し、それらを試験管内で腎臓、肝臓、及び血管に分化させ、試験管内で嚢胞や動脈瘤形成を解析可能とするヒト疾患モデル系の確立を試みた。これにより、7 例の ADPKD 患者より樹立した iPS 細胞を血管細胞に分化誘導し病態を再現した。また、ヒト iPS 細胞から腎臓の元となる胎生初期組織である中間中胚葉への高効率分化誘導法を開発した。

発展:

1. ヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞の分化誘導法の開発^{1~3}

ヒト iPS 細胞から腎臓発生過程を再現する独自の二次元接着培養を開発し、後方中間中胚葉を経てネフロン前駆細胞を高効率に分化誘導することに成功し、誘導されたネフロン前駆細胞が糸球体と尿細管を含む腎組織を形成することを確認した(図 1)。本成果は、ネフロン前駆細胞の分化メカニズムを解明し、腎臓の再生医療の細胞供給源として期待できる。

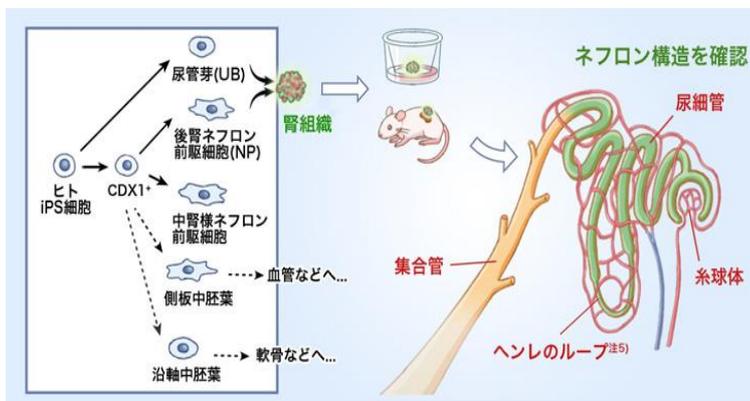


図 1. 研究内容の概要図³

2. ヒト iPS 細胞から尿管芽の分化誘導法及び腎組織の作製法の開発^{2,3,4~8}

ヒト iPS 細胞から腎臓発生過程を再現する独自の二次元接着培養と三次元培養を組み合わせた培養法を開発し、前方中間中胚葉、中腎管(ウォルフ管)細胞を経て、三次元の尿管芽様構造を作製することに成功した。さらに、in vitro で糸球体、尿細管、集合管が連結した腎組織の作製にも成功した(図 1)。本方法は、ヒト腎臓の発生生物学の新たな知見と腎臓疾患の仕組みの解明に繋がり、今後、ヒト胎生初期の段階で異常をきたす遺伝性腎尿路系疾患の病態の解析や、疾患モデルの作製等、腎臓の再生医療開発に向けた研究に大きく貢献することが期待される。

3. ヒト iPS 細胞から胆管の作製法の開発^{9,10}

ヒト iPS 細胞から肝臓発生過程を再現する独自の二次元接着培養と三次元培養を組み合わせた培養法を開発し、胚体内胚葉、肝芽細胞を経て、胆管上皮前駆細胞の分化誘導と三次元の胆管様構造を作製することに成功した。様々な肝胆道系疾患で生じる胎生期の異常のメカニズムを明らかにするには、当該発生時期の胆管細胞を同定して研究する必要があるため、この手法は今後、病態の解明に貢献することが期待される。

特記事項

腎臓再生医療を開発するベンチャー企業であるリジェネフロ社を設立した。さきがけの成果を基に開発した分化誘導法によってヒト iPS 細胞から作製した腎細胞を用いて腎疾患に対する細胞療法の実用化を予定している。

¹ Mae, Shin-Ichi, et al. Nature Commun vol. 4, no. 1367, 2013.; Toyohara, Takafumi, et al. Stem Cells Transl Med, vol. 4, 2015, pp. 980-92

² Tsujimoto, Hiraku, et al. Cell Reports vol. 31, no. 107476, 2020.

³ 京都大学 iPS 細胞研究所 ニュース(<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/200408-010000.html>)(2020/4/8)

⁴ Mae, Shin-Ichi, et al. Biochem Biophys Res Commun vol. 495, 2018, pp. 954-61.

⁵ Mae, Shin-Ichi, et al. Methods Mol Biol vol. 1926, 2019, pp117-23.

⁶ 京都大学 iPS 細胞研究所 ニュース(<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/171129-190000.html>)(2017/11/29)

⁷ Mae, Shin-Ichi, et al. Cell Reports vol. 32, no. 107963, 2020.

⁸ 京都大学 iPS 細胞研究所 ニュース(<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/200729-000000.html>)(2020/7/29)

⁹ Matsui, Satoshi, et al. Stem Cell Res vol. 35, no. 101400, 2019.

¹⁰ 京都大学 iPS 細胞研究所 ニュース(<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/190219-180000.html>)(2019/2/19)

3.1.3 体細胞核移植におけるリプログラミング促進技術の開発 (岸上哲士)

体細胞核移植におけるリプログラミング促進技術の開発

展開している事業:

岸上 哲士(山梨大学大学院総合研究部生命環境学域 生命農学系(生命工学) 教授)

研究期間 2008 年 6 月～2012 年 3 月

さきがけの成果:

iPS 細胞の作出過程における標的タンパク質やアセチル化の制御とリプログラミングの関係などの分子機構が解明されれば、より効率的なリプログラミング技術の開発や発生・分化におけるアセチル化の制御や役割の理解に貢献することが期待される。本研究では、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤を用いてクローン動物の作出効率を従来の 5 倍以上に改善した成果をもとに、体細胞核移植が卵子の低アセチル化を誘導し、体細胞核移植胚のトリコスタチン A 要求性を誘導すること、卵子の老化によりアセチル化制御が破綻しヒストンのアセチル化のみならず非ヒストンタンパク質の α チュープリンの増大も引き起こしており、タンパク質のアセチル化が正常な卵子維持に重要な役割をしていることが示唆された。

発展:

1. 胚環境操作による生活習慣病 DOHaD モデルマウスの開発^{1,2}

遺伝変異によらず胚時期の環境操作だけで、成体において糖尿病を自然発症するマウスを作出する新規胚環境操作技術を用いて、糖尿病研究に最適な新規モデルマウスを確立した。糖尿病を含む生活習慣病が大きな社会問題になっているなか、研究に最適な疾患モデル動物が確立されていなかったが、これによりヒトの生活習慣病の予防や治療法の研究への貢献が期待される。

2. 胚の発生率を高める機能性胚培養液の開発と細胞小器官の活性の非侵襲的な観察方法の開発^{3,4,5}

現在の胚の体外培養技術では、体内環境に比べ容易に発生が停止し、産子への発生率は限られる。そのため、発生能を低下させるリスク要因と考えられる細胞小器官の機能障害を克服する機能性胚培養液の開発が求められている。本研究では、以下の 4 点の示唆を得た。①小胞体ストレス抑制効果が知られている化学シャペロン TUDCA(タウロウルソデオキシコール酸)を発生能の低い体外成熟した胚の培養液に高濃度で添加することで産子率が向上する。②特にミトコンドリア障害を持つ胚において TUDCA の添加が発生能を回復する。③正常な核やクロマチン形成に重要な MEK シグナル等の 1 細胞期の細胞シグナルのかく乱は発生率の低下やエピジェネティック修飾に影響する。④細胞エネルギーの恒常性維持における主要な制御因子である AMPK シグナルの薬剤による活性調節により発生能や細胞分化を制御できる可能性がある。

また、胚の発生率を向上させる最適な培養条件を探索するための、細胞小器官の活性の非侵襲的な観察方法の開発を目指し、以下の 2 点の示唆を得た。①体内受精胚との比較から体外受精した胚の培養環境の評価として、オートファジー活性が指標になり得る。②卵子や受精卵の発生能の評価として、受精後の困卵腔および卵子表面のタンパク質が指標になり得る。以上の示唆は、ヒトの不妊治療や実験動物の発生工学技術に用いる体外培養技術に貢献する。

特記事項

平成 30 年度 A-STEP 機能検証フェーズ試験研究タイプ第 2 回採択「胚環境操作による糖尿病 DOHaD モデルマウスの確立と生産」を通じて、株式会社紀和実験動物研究所において生産体制を確立し、販売環境を整備¹

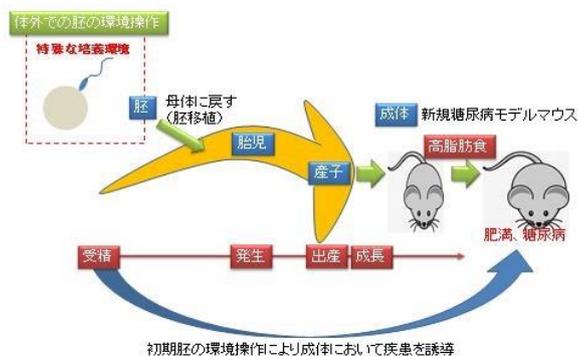


図 1. 研究課題のイメージ¹

¹ 山梨大学 トピックス(<https://www.yamanashi.ac.jp/20830>)(2019/1/23)

² 山梨大学. 糖尿病モデル動物の作出方法及び糖尿病モデル動物. 特願 2018-159174. 2018-08-28

³ 基盤研究(C) 細胞小器官の機能最適化による機能性培養液の開発

⁴ Mochizuki, Masato, Kodai Miyagi, and Satoshi Kishigami. PloS one 13.8 (2018): e0202962.

⁵ OKAJI, Hiroka, et al. Journal of Reproduction and Development (2020): 2019-114.

3.1.4 肝細胞分化関連遺伝子の導入による皮膚細胞からの肝細胞作製技術 (鈴木淳史)

肝細胞分化関連遺伝子の導入による皮膚細胞からの肝細胞作製技術

鈴木 淳史(九州大学生体防御医学研究所 教授)
研究期間 2008年6月～2012年3月

展開している事業:

新学術領域研究(研究領域提案型)(4件)、再生医療実現拠点ネットワークプログラム、基盤研究(A)(2件)、基盤研究(B)、難治性疾患実用化研究事業、感染症実用化研究事業、革新的先端研究開発支援事業、若手研究(A)、厚生労働省研究事業、他

さきがけの成果:

肝細胞の運命決定を担う特定因子を同定し、線維芽細胞から肝細胞を直接作り出すことを試みた。その結果、マウスの皮膚から抽出した線維芽細胞に Hnf4α と Foxa(Foxa1, Foxa2, Foxa3 のいずれかひとつ)という肝細胞分化に関連した2つの転写因子を導入することで、肝細胞の特徴を有する細胞(iHep 細胞)へと変化させることに成功した。

発展:

1. ダイレクトリプログラミングによる誘導腸幹/前駆細胞の作製^{1~3}

iHep 細胞誘導因子に Gata6 と Cdx2 を加えた4因子をマウスの線維芽細胞やヒトの血管内皮細胞に導入し、腸上皮オルガノイドを形成する腸前駆細胞や腸幹細胞の作製(ダイレクトリプログラミング)に成功した(図1)。今後、作製された誘導腸上皮オルガノイドを用いた腸疾患の病態解析や再生医療、創薬研究への応用が期待される。

2. iHep 細胞の機能的成熟誘導法の開発とメカニズムの解明⁴

細胞凝集塊形成による Hippo シグナルの活性化、並びに Hnf1α を筆頭とする肝細胞分化関連転写因子の活性化が iHep 細胞の成熟化を強く促進することを見出した(図2)。iHep 細胞の凝集塊形成によって機能的成熟化の迅速な誘導が可能になったことから、iHep 細胞凝集体を肝細胞の代替として医療用途に使用できる可能性が示唆された。

3. iHep 細胞へのダイレクトリプログラミングを誘導する分子機構の解明^{5~7}

iHep 細胞を誘導する転写因子の挙動を詳しく解析し、さらに線維芽細胞が肝細胞の運命を獲得する過程で生じる遺伝子発現変化やクロマチン状態変化、エピゲノム状態変化などを統合的に解析することで、転写因子の DNA への結合から始まる一連のダイナミックな細胞状態変化の全容を解明した。

4. ダイレクトリプログラミングによる誘導肝前駆細胞(iHepPC)の作製^{8~10}

3つの転写因子(FOXA3, HNF1A, HNF6)をヒトの血管内皮細胞に導入することで、長期培養による安定的な増殖が可能な iHepPC を作製することに成功した(図3)。ヒト iHepPC から機能的に成熟した肝細胞や胆管上皮細胞を大量に調達できることから、肝疾患に対する移植医療への応用や、個人レベルでの薬効・毒性評価システムの構築が期待される。

図1: 誘導腸幹/前駆細胞の作製

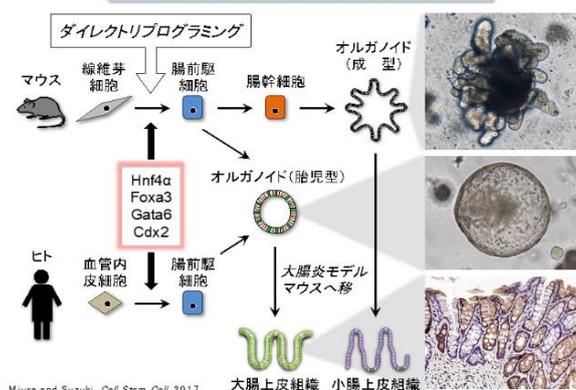


図2: iHep 細胞の機能的成熟化

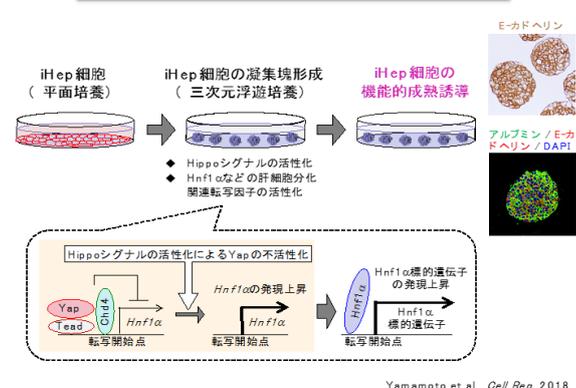
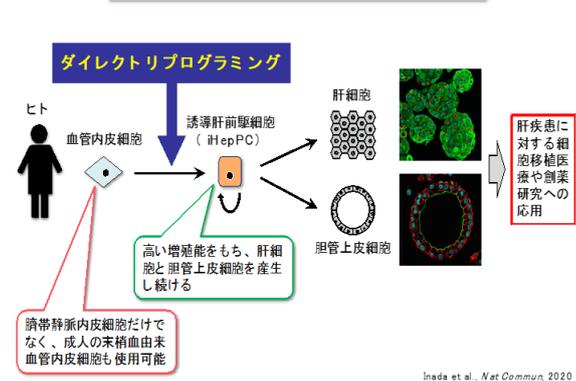


図3: ヒト 誘導肝前駆細胞の作製



¹ Miura, Shizuka, and Suzuki, Atsushi. Cell Stem Cell 21, 2017, pp. 456-471. ² 九州大学 プレスリリース(2017/9/22) ³ AMED ニュース 成果情報(2017/10/13) ⁴ Yamamoto, Junpei, et al., Cell Rep. 25, 2018, pp. 183-198. ⁵ Horisawa, Kenichi, et al., Mol. Cell 79, 2020, pp. 660-676. ⁶ 九州大学 プレスリリース(2020/8/5) ⁷ AMED プレスリリース(2020/8/5) ⁸ Inada, Hiroki, et al., Nat. Commun. 11, 2020, 5292. ⁹ 九州大学 プレスリリース(2020/10/21) ¹⁰ AMED プレスリリース(2020/10/21)

3.1.5 細胞リプログラミング技術を用いた免疫細胞再生医療の開発 (清野研一郎)

細胞リプログラミング技術を用いた免疫細胞再生医療の開発

清野 研一郎(北海道大学遺伝子病制御研究所 教授)

研究期間 2008年6月～2012年3月

展開している事業:

再生医療実現拠点ネットワークプログラム、革新的がん医療実用化研究事業、基盤研究(B)(2件)、若手研究(A)、戦略的創造研究推進事業、

さきがけの成果:

iPS細胞から特定の遺伝子再構成したリンパ球の分化誘導、あるいはリンパ球サブセットの分化制御の方法の開発を目標として、ES細胞、iPS細胞からT細胞を試験管内で誘導することに成功した。さらに、iPS細胞から誘導したT細胞を白血病再発モデルのマウスに移入することで、生存期間が延長することを見出し、iPS細胞由来リンパ球の治療目的応用の可能性を示した。



発展:

1. ES細胞、iPS細胞からの免疫抑制性マクロファージの誘導^{1,2}

ES細胞、iPS細胞からマクロファージ様免疫制御細胞を誘導し、それを用いてアロの拒絶反応を抑制した。本研究の手法は、ES細胞由来、iPS細胞由来の移植片を同種移植用として用いる際の免疫抑制として活用される。さらに、再生医療における長期的な移植片の生存を促進するための免疫抑制方法の開発に貢献する。

2. iPS細胞からの胸腺上皮細胞の誘導³

iPSCから分化した胸腺上皮細胞(iPSC-TEC)が免疫応答性マウスの同種移植生存に寄与することを初めて実証した。このことから iPSC-TEC はドナーからの供給が困難な胸腺移植片の代替供給源になる可能性がある。(図1)

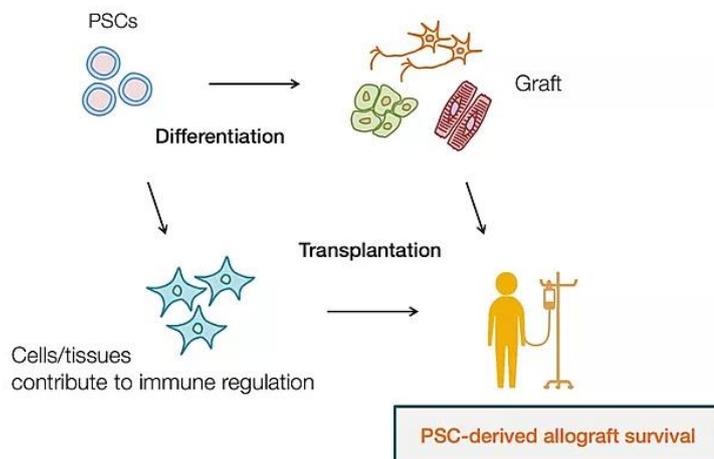


図1. ES細胞やiPS細胞を用いる新時代移植医療における免疫制御の研究コンセプト⁴

¹ KUDO, Hiroya, et al. PLOS one, 2014, 9.10: e111826.

² Sasaki, Hajime, et al., Transplantation 99, 2015, pp. 2301-2310.

³ Otsuka, Ryo, et al., Scientific Reports 10, no. 224, 2020.

⁴ 北海道大学 遺伝子病制御研究所 清野研究室 HP(<https://seinolab.wixsite.com/seinolab/our-research>)

3.1.6 蛋白質導入法による iPS 細胞作製技術開発 (富澤一仁)

蛋白質導入法による iPS 細胞作製技術開発
富澤 一仁(熊本大学大学院生命科学研究部 教授)
研究期間 2008 年 6 月～2011 年 3 月

展開している事業:
基盤研究(B)(4 件)、医療分野研究成果展開事業(先端計測
分析技術・機器開発プログラム)、創薬基盤推進研究事業、
大学発新産業創出プログラム(START Program)、最先端・
次世代研究開発支援プログラム(NEXT)、先導的産業技術
創出事業(若手研究 Grant)

さきがけの成果:

タンパク質導入法による iPS 細胞作製技術の開発を行い、ポリアルギニンを付加した Oct3/4、Sox2、Klf4 ならびに c-Myc の組換えタンパク質の作製と線維芽細胞内への導入に成功した。しかし、これらタンパク質を導入しても iPS 細胞は作製できなかった¹。また、タンパク質導入法による iPS 細胞から膵 β 細胞分化誘導技術を開発した。組換え Pdx1、組換え NeuroD および MafA にポリアルギニンを付加した組換えタンパク質をマウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞に導入し、インスリン分泌細胞への分化誘導に成功した。糖尿病再生医療の潜在的なアプリケーションとなりうる^{1,2,3}。



内閣府「最先端・次世代研究開発支援プログラム」に採択されたため、さきがけは終了(2011.3.31)。以下に、現在の研究内容を示す。

現在の研究:

1. tRNA 修飾の生理機能と同修飾以上による疾患発症機構の解明^{2,4,5}

Cdkal1 遺伝子は 2 型糖尿病と最も相関のある危険因子の一つであることが知られていたが、具体的な生理機能は明らかにされていなかった。本研究により、Cdkal1 がリジンに対応する tRNA の 37 番目のアデノシンをチオメチル化させる消化酵素であることを明らかにした。さらに、マウスの実験により、Cdkal1 が欠損することで、プロインスリンからリジンに正しく切断されない異常なインスリンが膵 β 細胞に蓄積し、小胞体ストレスが引き起こされ、最終的に 2 型糖尿病が発症することを示された。2 型糖尿病の薬として、Cdkal1 の酵素活性が低下していても、誤翻訳を引き起こさない薬剤を開発している。

¹ Kaitsuka, Taku., Tomizawa, Kazuhito., International Journal of Molecular Sciences 16, 2015, pp. 26667-26676.

² 熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学分野研究内容(<https://kumamoto-physiology.jp/research/contents001/>)

³ Kaitsuka, Taku, et al., STEM CELLS Translational Medicine 3, 2014, pp 114-127.

⁴ Zhou, B, et al. Hum. Mol. Genet. 23, 4639-4650, 2014.

⁵ Wei, F.Y., et al. J. Clin. Invest. 121, 3598-3608, 2011.

任意細胞の樹立法開発

升井 伸治(山梨大学大学院総合研究部生命環境学域生命農学系 准教授)
研究期間 2008年6月～2012年3月

展開している事業:

再生医療実用化研究事業、厚生労働科学研究費補助金(厚生科研費)(2件)

さきがけの成果:

誘導活性をもつ転写因子(誘導因子)を様々な細胞で同定できれば、試験管内での任意な細胞への分化誘導が可能になり、再生医療や疾患モデリングに大きく貢献する。そこで本研究では細胞らしさを決める分子を同定する手法を開発した。また、モデルとして用いた肝細胞などにおいて、iPS細胞の誘導に対する阻害的な働きを指標に、それぞれの細胞の特異的な遺伝子発現状態を誘導できる転写因子を同定できることを示した。

発展:

1. 初期化を阻害する転写因子が分化を誘導するメカニズムの一端を解明^{1,2}

体細胞において iPS 細胞誘導を阻害する転写因子は主に遺伝子の活性化を行うことを明らかにした。分化細胞を特徴付ける因子が初期化を促進する遺伝子の抑制を行うことが示唆された(図 1)。本研究で確立した iPS 干渉法を用いることで、様々な分化細胞を特徴づける因子を明らかにすることができ、それぞれの細胞についての理解が深まると共に、分化誘導方法の開発が進み、iPS 細胞を利用した新薬の創出や再生医療に貢献することが期待される。

2. 角膜上皮細胞の重要な転写因子を発見^{3,4}

角膜上皮細胞を用いて、iPS 細胞誘導を阻害する転写因子をスクリーニングすることで、角膜上皮細胞の特異的な遺伝子発現を維持している OVOL2 を同定した(図 2)。本研究は難治性の角膜疾患に対して、iPS 細胞からの分化誘導の高効率化につながる事が強く期待される。

3. 細胞らしさを失わせるメカニズムを発見^{5,6}

様々な細胞外シグナルにより活性化される転写因子 Srf を異常に活性化させると、細胞種特異的な遺伝子発現が抑制され、iPS 細胞誘導が促進されることを明らかとした(図 3)。

iPS 細胞の細胞らしさ(細胞同一性)に関するメカニズムは十分に分かっていなかったが、本研究によってそのメカニズムの一端が明らかとなった。また、今回の成果によって、いくつかの疾患の発症に Srf が関与している可能性も示された。さらに Srf の働きを利用して、外部からの刺激によって細胞らしさを変化させる細胞工学的な新技術の開発にも期待がかかる。

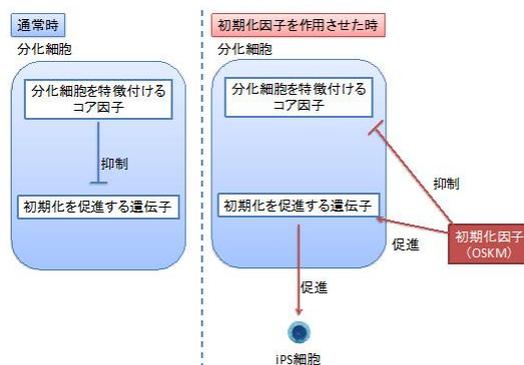


図 1. iPS 細胞誘導が抑制されるメカニズム

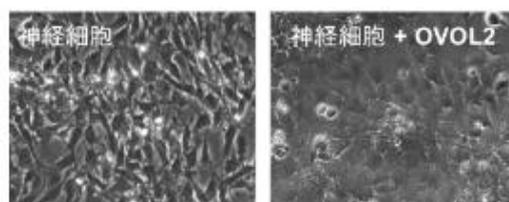


図 2. OVOL2 の導入により角膜上皮様細胞へ変化

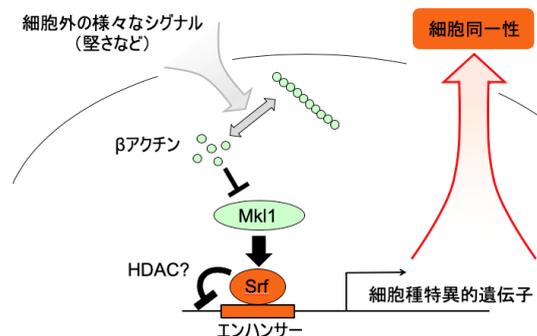


図 3. 細胞らしさが抑制されるメカニズム

¹ Hikichi, Takafusa, et al., PNAS 110, 2013, pp. 6412–6417.

² 京都大学 iPS 細胞研究所 CiRA ニュース(<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/130402-083117.html>)(2013/4/2)

³ Koji, Kitazawa, et al., Cell Rep 15, 2016, pp1359–1368.

⁴ 京都大学 iPS 細胞研究所 CiRA 研究成果(<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/finding/160429-010000.html>)(2016/4/29)

⁵ Takashi, Ikeda, et al., Nat Commun vol. 9, no. 1387, 2018.

⁶ 京都大学 iPS 細胞研究所 CiRA ニュース(<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/180413-120000.html>)(2018/4/13)

3.1.8 非ウイルス的手段による iPS 誘導法の確立 (松田修)

非ウイルス的手段による iPS 誘導法の確立

松田 修(京都府立医科大学大学院医学研究科 教授)

研究期間 2008 年 6 月～2012 年 3 月

展開している事業:

挑戦的研究(萌芽)、基盤研究(C)6
件、基盤研究(B)、基盤研究(A)等

さきがけの成果:

本課題では、EBV エピゾーマル・ベクターを用いて、ゲノムの完全性を保持したヒトおよびマウスの iPS 細胞の樹立を行った。さらに、EBV エピゾーマル・ベクターを用いたゲノム領域特異的エピジェネティック修飾の新しい解析方法を開発することを目指して、解析目的とするゲノム配列を有する BAC クローンに、insulator を隔てて EBNA1 発現ユニットと oriP を挿入するエピゲノソームを開発した。このエピゲノソームは、ヒト細胞のみならず、本来 EBV が non-permissive であるマウス細胞においても複製することが確認され、エピジェネティック修飾を解析するための新手法になり得ると考えられた。また、ダイレクト・リプログラミングにてヒト線維芽細胞から種々の機能性組織細胞系譜の誘導に成功し、それらのメカニズム解析と再生医療への応用を視野に入れた機能解析等を行った。

発展:

1. 各種細胞のダイレクト・リプログラミングに関する研究^{1,2,3}

遺伝子導入/遺伝子発現技術や iPS 細胞技術を他の先端技術と組み合わせることにより、各種細胞(筋芽細胞、シュワン細胞、褐色脂肪、骨芽細胞)のダイレクト・リプログラミングに関する研究を進めている(図 1)。

その一環として、ヒトとマウスの線維芽細胞を直接、機能的な褐色脂肪細胞にリプログラミングする技術を樹立した。リプログラミングの効率は 90%以上であり、得られた褐色脂肪細胞(dBAs)は UCP1 を高発現し、高い代謝活性を有する。糖尿病マウスに移植すると、食餌量は変えずに、インスリン抵抗性が低下し、耐糖能、脂質異常症が改善された。これは糖尿病に対する新しい再生医療をもたらすと考えられる。

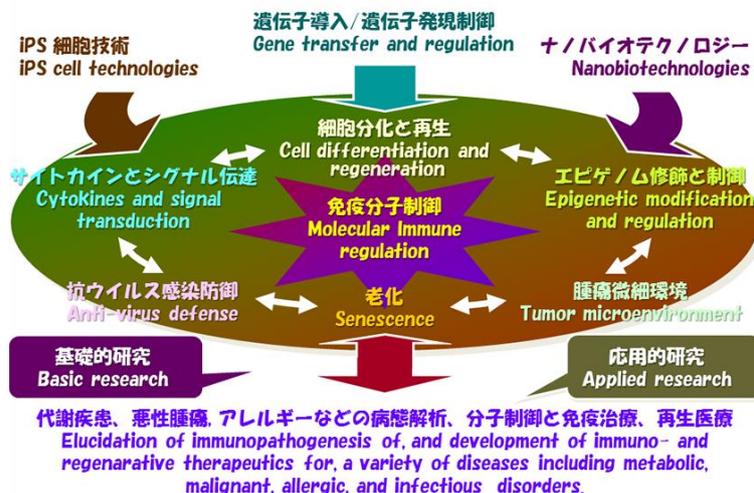


図 1. 研究の全体イメージ¹

2. EBV- エピゾーマル・ベクターによる外来遺伝子の高効率導入、高発現、長期間持続の機構解明¹

EBNA1/oriP の素機能の貢献をマルチスケール操作にて解析した結果を踏まえ、遺伝子の機能解析や、種々疾患に対する分子標的療法の候補遺伝子の解明等への応用を進めている。

¹ 京都府立医科大学大学院医学研究科 免疫学(松田研究室)ホームページ
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/microbiol/index.html>

² Kishida, Tsunao, et al. Stem Cell Reports vol.5, no.4, pp.569-81, 2015

³ Yamamoto, Kenta et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 112, no. 19, pp6152-6157, 2015

3.1.9 リプログラミングによるがん細胞エピジェネティック異常の起源解明とその臨床応用 (山田泰広)

リプログラミングによるがん細胞エピジェネティック異常の起源解明とその臨床応用

山田 泰広(東京大学医科学研究所システム疾患モデル研究センター先進病態モデル研究分野 教授)

研究期間 2008年6月～2012年3月

展開している事業:

基盤研究(A)、(B)(2件)、革新的先端研究開発支援事業、創薬支援推進事業、次世代がん医療創生研究事業、医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業、次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム、特定領域研究、若手研究(A)

さきがけの成果:

リプログラミングの技術を用いて、がん細胞のエピジェネティック状態を改変し、改変後のがん細胞の変化を解析することで、がんにおけるエピジェネティック異常の意義解明を目指した。本研究では、生体内体細胞初期化システムを構築し、生体内での不完全な細胞初期化が小児がんに類似したがんを誘導することを明らかにした。また、発生したがん細胞は完全初期化により iPS 細胞へと変換し、再分化によりがん細胞の性質を失うことを示した。エピゲノムの改変に依存した発がん過程の存在が示唆された。

発展:

1. 遺伝子の変異によらないがん化の仕組みを解明 ～iPS 細胞技術の応用～^{1,2}

マウスの体内で一時的に初期化因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を働かせ、不十分な初期化を起こしたところ、DNA のメチル化パターン(エピゲノム)が大きく変化し、様々な組織で腫瘍が生じた。腎臓でこのようにして生じた腫瘍は、小児腎臓がんとして一般的な腎芽腫と組織学的・分子生物学的特徴が類似しており、この腫瘍の細胞を調べたところ、遺伝子の変異は見つからず、エピゲノムの状態が変化し、多能性幹細胞と似たパターンに変わっていることが明らかとなった。また、腫瘍の細胞を初期化した iPS 細胞からは正常な腎細胞が作られることを示した。これらの結果から、エピゲノムの制御が、特定のタイプのがんで、腫瘍形成を促進する可能性が示された。エピゲノムの制御による、新しいがんの治療法につながる可能性がある。



図 1. 概要図²

2. 高品質な ES 細胞を高効率で作製する方法を同定^{3,4}

2i 法は高効率で、着床前段階と同等の高い多能性をもつ ES 細胞を作製できる一方、ゲノムインプリンティングという発生に重要な記憶が消去されてしまい、発生能力が低下することを示した。しかしながら、2i 法の培地に含まれる MEK 阻害剤の濃度を低くする、あるいは他の阻害剤で代替することで、インプリントの記憶が維持され、高い発生能力をもつ ES 細胞を作製することに成功した。本成果は高品質なマウス多能性幹細胞、さらにはヒト多能性幹細胞の作製・維持に応用できると考えられる。今後は、再生医療やほ乳類の初期発生に関する基礎研究に貢献できると期待される。

3. 細胞老化による発がん抑制作用を個体レベルで解明^{5,6}

明細胞肉腫(Clear Cell Sarcoma : CCS)の細胞株から iPS 細胞(CCS-iPSCs)を作製し、がん細胞である CCS と同じ遺伝子変異を全身に持つキメラマウスの作製に成功した。CCS-iPSCs から作製したキメラマウスでは皮下組織で腫瘍が発生したが、他の組織では遺伝子変異が存在するにもかかわらず細胞老化により腫瘍の形成が抑制されることを示した。がん細胞のエピゲノムを標的として人為的に細胞老化を誘導することで発がんを抑制するという、新たながん治療法開発の可能性を提示した。

¹ Ohnishi, Kotaro, et al., Cell 156, 2014, pp. 663-77.

² 京都大学 iPS 細胞研究所ニュース(<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/140214-095605.html>)(2014/2/14)

³ Yagi, Masaki, et al., Nature 548, 2017, pp. 224-227.

⁴ 京都大学 iPS 細胞研究所ニュース(<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/170727-083000.html>)(2017/7/27)

⁵ Komura, Shingo, et al., Nature Communication 10, no. :3999, 2019.

⁶ 京都大学 iPS 細胞研究所ニュース(<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/190906-100000.html>)(2019/9/6)

3.1.10 iPS細胞を用いたヒト疾患モデルマーマーモセット作製法の確立 (佐々木えりか)

iPS細胞を用いたヒト疾患モデルマーマーモセット作製法の確立

佐々木 えりか((財)実験動物中央研究所応用発生学研究部 部長)

研究期間 2008年6月～2014年3月

展開している事業:

新学術領域研究(研究領域提案型)、革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト(Brain/minds 革新脳)(2件)、基盤研究(A)(2件)、脳科学研究戦略推進プログラム(脳プロ)

さきがけの成果:

iPS細胞を用いて、よりヒトに近いサル類のヒト疾患モデル動物が作出されれば、再生医療技術の臨床開発において精度の高い有効性・安全性の評価が可能になると期待される。そこで本研究では、マーマーモセット iPS細胞の樹立と、マーマーモセット初期胚への移植によりキマーマーモセット作製を目指した。結果として、マーマーモセットの iPS細胞を樹立し、再生医療の有効性・安全性を検証するシステムを確立した。また、マーマーモセット ES細胞にリプログラム因子の遺伝子を導入することでマウス ES細胞の性質に似た細胞(iPES細胞)を樹立したが、胎盤のみがキメラとなりうることを確認した。

発展:

1. 標的遺伝子ノックアウトマーマーモセット作製技術の開発^{1~3}

ゲノム編集技術を用いたヒト疾患モデルマーマーモセットの作成技術を開発した(図1)。本研究は、今まで霊長類では成功していなかった特定の遺伝子を破壊して、機能できなくした標的遺伝子ノックアウトモデル動物の作製を試みたものであったが、ゲノム編集による免疫不全マーマーモセットの作製に成功し、霊長類でも個体レベルで遺伝子をノックアウトすることによって動物の生理的性質(表現型)が変化したモデル動物作製が可能であることを世界で初めて明らかにした。免疫不全マーマーモセットはヒト免疫不全症の病態解明ならびに治療法開発モデルとして、また、ヒト iPS細胞を用いた様々な臓器再生医療における新たな治療法の有効性・安全性の検証にも貢献すると期待される。

2. 効率的なマーマーモセット iPS細胞作製法の開発⁴

マーマーモセットでは、遺伝子導入されない iPS細胞の樹立が長年困難であり、胎児由来細胞からしか iPS細胞が樹立できないという問題点があったが、遺伝子導入されず、どのような細胞からでも iPS細胞を樹立できる方法を確認した。

開発された手法は遺伝子導入のない安全な霊長類の iPS細胞、特にリプログラミングが困難な細胞からの効率的な樹立に役立つ。

特記事項

発展1は、国家プロジェクトである革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクトのキーテクノロジーの一つとなっている。また、アメリカでも、昨年、本技術を利用した大型研究プロジェクトが開始された。

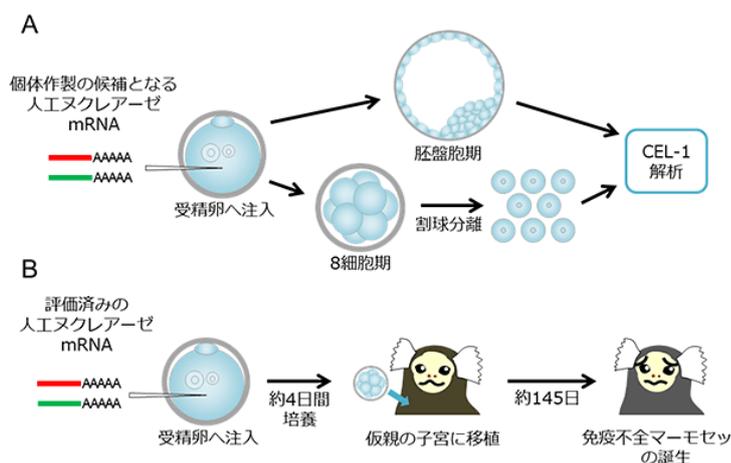


図1. 免疫不全マーマーモセット作成の概要図³

A: わずかな遺伝子の欠損や挿入を検出する CEL-1 解析を用い、目的とする免疫不全モデル個体の作製が可能かどうかを受精卵で検討する。

B: 仮親の子宮に受精卵を移植して、個体を作製する。

¹ Sato, Kenya, et al., Cell Stem Cell 19, 2016, pp. 127-38.

² Kumita, Wakako, et al., Scientific Report .9, no. 12719, 2019.

³ AMED プレスリリース(https://www.amed.go.jp/news/release_20160701.html)(2016/7/1)

⁴ Toshiaki, Watanabe, et al., Genes Cells 24, 2019, pp. 473-484.

3.2 2009 年度採択研究課題

3.2.1 細胞周期操作による新規卵原幹細胞の樹立 (李知英)

細胞周期操作による新規卵原幹細胞の樹立

李 知英(東京医科歯科大学難治疾患研究所 准教授)

研究期間 2009 年 10 月～2013 年 3 月

さきがけの成果:

不妊治療や再生医療に応用可能な試験管内での卵原幹細胞と卵子様細胞の培養技術の確立を目標として、雌性生殖細胞の生物学的性質究明、新規卵原幹細胞の長期培養と樹立の試みおよび卵子形成の試験管内再構築を目指した。胎児期雌の生殖細胞と生後卵巢の生殖細胞において CD9 と CD49f が発現することが明らかとなり、胎児期 13 日目以降の生殖細胞にも細胞周期の G1 と S 期の細胞が存在することを見出した。また、MVH-Venus Tg マウスを用いて新生児卵巢から MVH 陽性細胞の培養を行ない、これらの細胞は試験管内で feeder 細胞なしの条件で非対称分裂することが明らかとなり、新生児卵巢細胞の培養や器官培養により新生児の未分化卵細胞を試験管内で分化させることに成功した。

発展:

1. 器官発生を再現する体系的オルガノイド作製技術の開発^{1, 2, 3}

マウス ES 細胞を用いて高次構造を持つ心臓オルガノイド作製技術開発に成功した。これらの心臓オルガノイドは生体の心臓に対して形態的・機能的類似性を示すだけでなく、試験管内でマウス心臓発生の再現を可能にした。薬剤の心毒性試験などへの応用が期待される。(図 1)

2. エピジェネティックに安定な ES 細胞培養に適した条件決定⁴

ES 細胞においてインプリンティング領域の DNA メチル化状態を安定的に維持する条件を検討した所、FBS+2i 培地を使うことで、ES 細胞の DNA メチル化維持と正常な DNA メチル化を保つ ES 細胞を樹立した。FBS+2i 培地を用いることは、ES 細胞の樹立・維持に有害な影響を防ぐのに効果的であり、本研究の結果は再生医療に用いる ES 細胞や iPS 細胞のエピジェネティックな安定性の向上に寄与する。

3. 1 倍体 ES 細胞の半数性が維持できる培養条件決定^{5, 6}

1 倍体細胞の細胞周期の一時的破綻(G2 arrest、S・G2 重複)を1倍体 ES 細胞が2倍体化する理由と考え、G2 arrest 阻害剤である PD166285 (Wee1 阻害剤)が1倍体 ES 細胞の半数性維持に有効であることを明らかにした。本研究成果により、1 倍性を維持しつつ、ゲノムDNAにおいて欠失等を生じさせることなく、分化多能性及び高い増殖能を保持したまま、1 倍体 ES 細胞を長期に渡って安定的に培養することが可能となる。遺伝子スクリーニングの研究および多種多様な細胞、組織、臓器等の提供が強く求められている再生医療や創薬開発等への活用が期待される。

4. ゲノムインプリンティングの消去に伴う能動的脱メチル化の実証⁷

DNA 複製阻害剤と DNA 塩基除去修復に働く PARP 阻害剤の効果を生体の始原生殖細胞で検討した結果、DNA 複製非依存的な能動的脱メチル化が生体 PGC のインプリント消去に関与することを in vivo で初めて明らかにした。哺乳類の始原生殖細胞において、DNA の脱メチル化はインプリント消去に欠かせないため、その発生メカニズムを解明し、インプリント消去に関わるのは消極的//能動的脱メチル化のどちらの経路なのかを決定することは重要であった。本研究は、哺乳類の生殖に必要な雌性生殖細胞における能動的な DNA 脱メチル化に関する見識をもたらす。

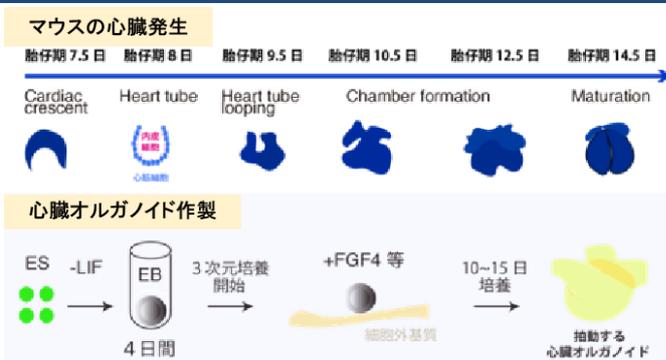


図 1. オルガノイド作製の概略図^{1,3}

¹ 国立大学法人東京医科歯科大学. WO2019066059A1. 2019-04-04.

² 国立大学法人東京医科歯科大学難治疾患研究所エピジェネティクス分野 HP(<http://www.tmd.ac.jp/dept/mri/epgn/index.html>)

³ Jiyoung, Lee, et al., NATURE COMMUNICATIONS 11, 2020, pp. 4283.

⁴ Jiyoung, Lee, et al., Genes to Cells 23, 2018, pp. 146-160.

⁵ Takahashi, Saori, et al., Development 141, 2014, pp. 3842-7.

⁶ 国立大学法人東京医科歯科大学. WO2015152146A1. 2015-10-08.

⁷ Kawasaki Y, et al., Scientific Reports 4, no. 3658, 2014.

3.2.2 リプログラミングを制御するクロマチン因子の作用機序の解明 (栗崎晃)

リプログラミングを制御するクロマチン因子の作用機序の解明

栗崎 晃(奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科バイオサイエンス研究領域幹細胞工学研究室 教授)

研究期間 2009年10月～2013年3月

展開している事業:

挑戦的研究(萌芽)、基盤研究(B)、基盤研究(A)、再生医療実用化研究事業等

さきがけの成果:

iPS 細胞の樹立効率の向上を目的として、ES 細胞核のプロテオミクス解析で同定したクロマチン因子である Transcriptional Intermediary Factor 1 β (TIF1 β)に着目した。TIF1 β がリン酸化依存的に ES 細胞の未分化状態を維持しており、Oct3/4 と結合することで Oct3/4 依存的な転写を促進させる因子であることが明らかになった。多能性と分化を調整する TIF1 β が、より安定した iPS 細胞の樹立を促進する因子であることが示唆された。



発展:

1. 胃オルガノイドを用いた疾患モデルの開発¹

マウス ES 細胞から試験管内で胃組織を丸ごと分化させる方法を報告した。胚様体法を用い、間葉で覆われた胃に分化する上皮細胞を誘導し、3次元の基底膜マトリックス内において胃に分化させることに成功した。胃体部特異的および幽門洞特異的な胃の組織細胞が含まれていた。胃オルガノイドは、胃の組織が形成されるしくみの研究、良い動物モデルが存在しない胃がんなどの疾患の発症機構の研究に有効と考えられる。(図1)。

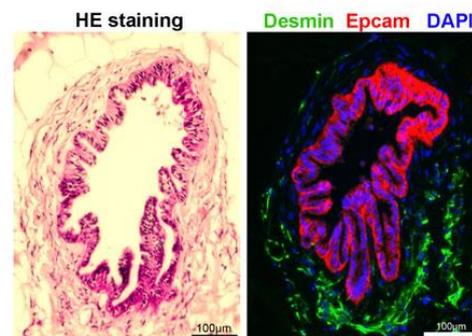


図1. マウス ES 細胞から作製した胃組織¹

2. 肺組織の分化と組織再生^{1,2}

肺細胞への分化に対する成長因子の影響を in vitro でマウス ES 細胞を用いて調査し、BMP シグナル伝達が肺上皮細胞への分化を制御していることが示唆された(図2)。慢性閉塞性肺疾患や肺線維症などの進行性肺疾患の治療に再生医療が期待されており、肺前駆細胞や気管支繊毛上皮細胞を分化させる方法の開発を進めている。

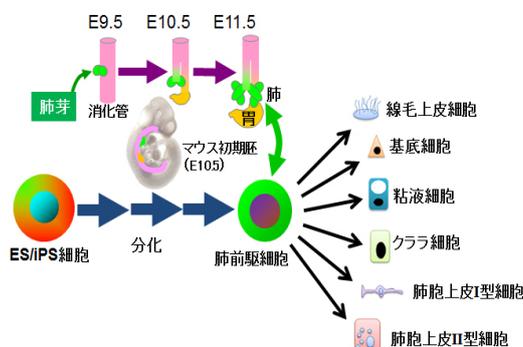


図2. 多能性幹細胞から肺組織細胞への分化¹

3. 脂肪組織に存在する幹細胞等の研究¹

脂肪組織や骨髄、胎盤など成体の様々な間葉組織には、間葉系幹細胞と呼ばれる線維芽細胞様の細胞が存在し、脂肪や骨、軟骨への分化能を示す。間葉系幹細胞は、生体に投与すると、免疫抑制作用や創傷治療作用を示して組織再生を促し、細胞移植による腫瘍形成の危険性が低いことから、臨床応用が期待されている。間葉系幹細胞の性質を分子レベルで解明することを目指した解析が進められている。

¹ 奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科バイオサイエンス研究領域幹細胞工学研究室(栗崎研究室)ホームページ <https://bsw3.naist.jp/kurasaki/>

² Ninomiya, Naoto, et al., In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal 49.3 (2013): 230-237.

3.2.3 細胞リプログラミングの段階的制御 (佐藤伸)

細胞リプログラミングの段階的制御

佐藤 伸(岡山大学異分野融合先端研究コア 研究教授)

研究期間 2009年10月～2013年3月

展開している事業:

基盤研究(B)2件、再生医療実現拠点ネットワークプログラム等

さきがけの成果:

有尾両生類の四肢再生プロセスにおいては、生体が持つ内在性のメカニズムにより、真皮を構成する皮膚繊維芽細胞が脱分化し、未分化な幹細胞様の細胞に変化すると考えられている。本研究では、内在的な分化リセット機構、再分化機構を明らかにすることを目的として、当該研究室で発展させてきた過剰肢付加モデル(Accessory Limb Model)を用いて、非再生系と再生系との間で比較解析を行った。比較解析の結果、重要と考えられる数個のシグナルカスケードを同定し、FGF-Signaling、MMPによるECMの分解、GDFの3つが再生反応の開始に重要な役割を果たすことを明らかにした。これにより、細胞レベルでの分化のリプログラミングにアプローチする可能性を見出した。



発展:

1. 過剰肢モデルによる組織再生機構の解明¹

さきがけにおける成果をベースに、器官レベルの再生を促す因子の同定を確定させた。有尾両生類の四肢再生では、これまで神経が重要な働きをすることまでは分っていたが、その実同因子を確定させるに至らなかった。さきがけの成果ではその一部を同定できたものの、いくつかの問題が残っており、確定させるに至っていなかった。その後の研究伸展で BMP7, FGF2, FGF8 の3種が有尾両生類の器官再生の排他的な誘導因子であることを確定させることに成功した。この成果は、世界独立の5個以上の研究室で再現されており、確定的な因子として受け入れられた。この再生の誘導因子の確定は、当該分野における200年に及ぶなぞとして君臨してきた事項であり、これを確定できたことは世界的に大きなインパクトを与えた。さらなる発展として、四肢以外の組織として鰓や歯の組織の再生にも普遍的に再生反応を誘導できることを示し、同定因子の器官普遍性を証明した。これらの研究は器官レベルの再生の理解に貢献する。



図1. 再生誘導因子 FGF2+FGF8+BMP7 によって異所的に誘導したウーパールーパーの過剰肢

2. 再生不能動物(ニワトリ)の発生研究への応用²

両生類だけでなくマウス、ニワトリ等の再生不能動物を対象に再生惹起を試みている。ニワトリ胚を対象にした実験では、ニワトリの肢芽を外来性の Fgf2 と Fgf8 で処理することにより、有尾両生類型の四肢再生メカニズムを誘導できることを明らかにした。これは、両生類型の再生メカニズムが羊膜類においても残存していることを示した初めての成果である。これらの一連の研究からヒトにおいても類似のメカニズムが存在している可能性が示唆され、将来的には新たなケガの治療法といった形で医療応用も期待される。

¹ 岡山大学異分野融合先端研究コア器官再構築研究室(佐藤研究室)ホームページ

<https://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/RCIS/index.php/akira-satoh/>

² Aki Makanae and Akira Satoh, Zoological Letters (2018) 4:8

生殖細胞の特性に基づく新しいリプログラミング手法の開発

永松 剛(九州大学大学院医学研究院 准教授)

研究期間 2009 年 10 月～2013 年 3 月

さきがけの成果:

生殖細胞におけるリプログラミングと iPS 細胞誘導技術の体細胞リプログラミングとの関係に着目し両者を比較検討することからリプログラミングのメカニズムの解明を目指した。この成果として、生殖細胞の機能因子にはリプログラミング活性をもつものがあること、始原生殖細胞はリプログラミング因子を内在性に発現しているにもかかわらず単能性であることを明らかにし、始原生殖細胞が特定の増殖因子の存在下で多能性幹細胞へと脱分化する培養系においての高効率化と純化の方法の確立という成果を得た。

発展:

1. 抗がん剤耐性の前立腺がん細胞を抗がん剤感受性にリプログラミングする薬剤の発見^{1,2}

抗がん剤ドセタキセルに耐性になった前立腺がんの細胞の遺伝子発現と遺伝子発現データベースとを比較することで、抗がん剤感受性へとリプログラミングさせる既存薬リバビリンを発見した。この発見に基づく、世界初の幹細胞性を利用した合理的な薬剤探索プロトコル、「薬剤リプログラミング」(図1)を提案する。本研究は、抗がん剤が効かないがんのみならず他の疾患に有効な新規薬剤の開発に加え、iPS 細胞のがん化やがん幹細胞の分子メカニズムなどの解明への貢献が期待される。



図 1. 薬剤リプログラミングの手順²

2. iPS 細胞誘導時におけるテロメラーゼ逆転写酵素(TERT)の重要性の解明^{3,4}

テロメラーゼ逆転写酵素(TERT)欠損の繊維芽細胞から iPS 細胞を誘導し、TERT 欠損はリプログラミングの効率を著しく減少させることを明らかにした。本研究により、iPS 細胞誘導時におけるテロメアテロメラーゼ逆転写酵素(TERT)の重要性が解明され、iPS 細胞誘導時のストレス応答の一端を明らかにしたことで、iPS 細胞の分化誘導やがん化抑制の分子機序解明にもつながると期待される。

3. 始原生殖細胞が多能性幹細胞へと脱分化する過程の分子機構の解明⁵

始原生殖細胞が多能性幹細胞へと脱分化する過程の遺伝子発現解析から、始原生殖細胞の特性を保つために Blimp-1 が関わっていること、多能性幹細胞への脱分化には AKT のシグナルが重要であることを明らかにした。本研究が明らかにした始原生殖細胞における多能性獲得時の遺伝子発現プロファイルは、始原生殖細胞と多能性幹細胞の違いについての見識をもたらし、体細胞リプログラミングのメカニズムを研究するために用いられる。

4. 原始卵細胞の維持機構に物理的圧力に関わることを解明^{6,7}

卵巣サイクルの起点となる原始卵細胞の維持には、卵巣基質の環境がうみ出す物理的圧力が関わり、その際に卵母細胞の核が回転していることを明らかにした(図 2)。本研究は、これまで不明な点が多くあった原始卵細胞の維持と活性化を制御するメカニズムを解明し、将来的には不妊治療への応用が期待できる。

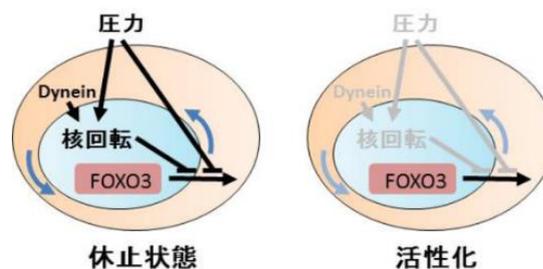


図 2. 維持機構の概略図⁷

特記事項

慶應義塾大学での臨床試験の実施。試験名:ドセタキセル療法抵抗性前

立腺癌に対するリバビリン併用ドセタキセル療法の有効性と安全性に関する第 I/IIa 相単施設オープンラベル試験⁸。

¹ Kosaka, Takeo, et al., Cancer Science 104, 2013, pp. 1017-26. ² 慶應義塾大学プレスリリース (2013/7/24) ³ Kinoshita, Taisuke, et al., Journal of Biological Chemistry 289, 2014, pp. 15776-87. ⁴ 九州大学 プレスリリース (2014/6/6) ⁵ Nagamatsu, Go, et al., Stem Cell Reports 5, 2015, pp. 111-24. ⁶ Nagamatsu, Go, et al., Science Advances 5, no. 6, 2019. ⁷ 九州大学 プレスリリース (2019/6/27) ⁸ UMIN <https://upload.umin.ac.jp/cgi-bin/open-bin/ctr/ctr.cgi?function=brows&action=brows&recptno=R000024352&type=summary&language=J>

3.2.5 順遺伝学による iPS 細胞生成機構の解析 (堀江恭二)

順遺伝学による iPS 細胞生成機構の解析

堀江 恭二(奈良県立医科大学医学部医学科 教授)

研究期間 2009 年 10 月～2013 年 3 月

展開している事業:

基盤研究(B)(4 件)、新学術領域研究(研究領域研究型)、若手研究(A)、先導的産業技術創出事業(若手研究 Grant)

さきがけの成果:

本研究では、ホモ変異体 ES 細胞バンクの構築と、その表現型解析を通じて、iPS 細胞生成に関する新たな知見を得ることを目指した。成果として、マウス ES 細胞において、遺伝子の両アレルに迅速に変異を導入する技術を開発し、多数のホモ変異体からなる ES 細胞バンクを構築した。さらに、本バンクに対して様々な表現型解析を行うことにより、多能性制御や細胞分化に関わる新規の遺伝子機能を同定した。

発展:

1. PiggyBac、Tol2、Sleeping Beauty の各種トランスポゾン、及び、マウス白血病レトロウイルスのゲノム挿入部位の分布を特徴づけるクロマチン状態を解明¹

トランスポゾンやレトロウイルスは、遺伝子導入やゲノム改変の道具として頻用されている。本研究では、PiggyBac、Tol2、Sleeping Beauty トランスポゾン、マウス白血病ウイルスのゲノムへの挿入部位の分布の違いを明らかにし、それがクロマチンのヒストン修飾や3次元構造により特徴づけられていることを見出した(図1)。本研究で得た知見は、トランスポゾンやレトロウイルスをゲノム改変や遺伝子導入へ応用するための基盤として有用である。

2. ハプロイド ES 細胞に対する遺伝子トラップとその後のディプロイド化によるホモ変異体マウス ES 細胞株の単離収集²

ハプロイド ES 細胞の遺伝子変異導入に際しては、自律的に出現するディプロイド細胞が、変異導入効率を低下させる原因となっている。本研究では、ハプロイド状態で遺伝子トラップしたのちにディプロイド化した細胞を効率的に選択する方法を開発し、200 個以上のホモ変異体を単離・収集した。これらの結果は、ES 細胞への変異の導入と哺乳類のゲノムの機能解析に用いる効率的な手法を提供する。

3. ハプロイドのマウス ES 細胞における飽和的変異導入による生物学的パスウェイに關与する遺伝子数の予測³

ハプロイド ES 細胞に対して化学変異原を用いて変異を導入し、ほぼ全ての遺伝子が破壊されると想定される細胞集団を作製した。特定のパスウェイに關与する遺伝子変異の出現頻度から、そのパスウェイに關与する遺伝子数を数的に予測することができた。本研究で示した手法は、小規模なパイロット実験とシミュレーションによる予想に基づき、薬物の標的経路等の生物学的プロセスに不可欠な遺伝子の数を推定するツールとして有用であり、薬物または毒物の作用機序解明へ向けた包括的解析への活用が期待される。

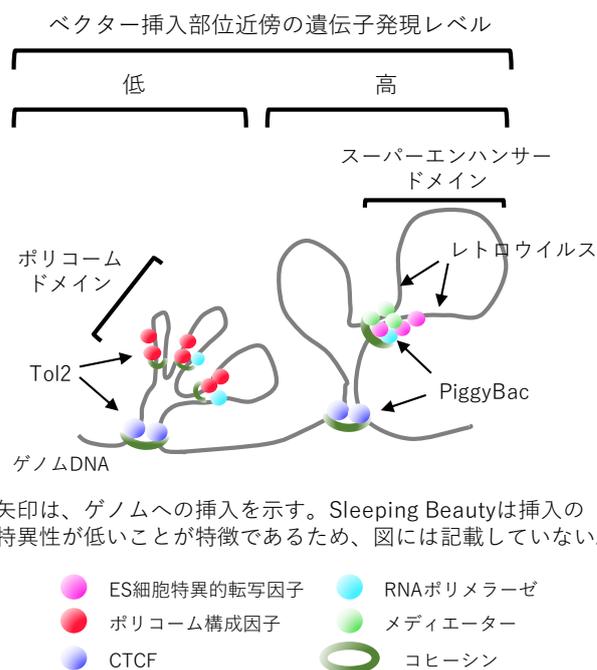


図1. 各種トランスポゾン、レトロウイルスのゲノムへの挿入部位の特徴

¹ Yoshida, Junko, et al., Scientific Report 7, no. 43613, 2017.

² Yamanishi, Ayako, et al., Nucleic Acids Res 46, 2018.

³ Tokunaga, Masahiro, et al., BMC Genomics 15, no. 1016, 2014.

3.2.6 ウサギを用いた iPS 細胞総合(完結型)評価系の確立 (本多新)

ウサギを用いた iPS 細胞総合(完結型)評価系の確立

本多 新(自治医科大学医学部先端医療技術開発センター動物資源ラボラトリー 教授)

研究期間 2009 年 10 月～2013 年 3 月

展開している事業:

基盤研究(A), (B)、新学術領域研究(研究領域提案型)(2 件)、

さきがけの成果:

本研究は、将来の多能性幹細胞を用いたヒト医療の開発のために、倫理・安全性などの観点からヒトでは不可能もしくは困難な研究を『ウサギ』を用いて行うことを目標とし、世界初となるウサギ iPS 細胞の樹立に成功した。またナীব化の研究にも成功し、iPS 細胞の質の低さを改善することにも成功している。

発展:

1. CRISPR/Cas9 によるウサギの遺伝子破壊¹

CRISPR/Cas9 を用い、ウサギの遺伝子を破壊することに成功。これにより、必要とされていたプロセスが簡略化され、迅速なターゲティングが可能となった。この遺伝子ターゲティングの方法は、げっ歯類ではない他の哺乳類を使用したトランスレーショナルリサーチの開発を加速させる。

2. ウサギ ES 細胞のナীব様返還とその特徴解析²

ウサギ ES 細胞は iPS 細胞と比べて、ナীব様に変換した際に、神経系への分化誘導効率に優れていることを発見。このようなナীব様に変換するような神経分化は、多能性幹細胞(PSC)の品質を決定するための有望なオプションであり、治療用途に最も適している PSC や治療法を評価することができる。

3. カニクイザル iPS 細胞の樹立とナীব様変換の特徴解析³

カニクイザルから ES 細胞と iPS 細胞を樹立し、そのナীব様変換後の特徴をトランスクリプトームや体外分化誘導などを指標に解明した。上記解明により、樹立した細胞は不完全なナীবな状態として分類せざるを得ないが、ナীব様の PSC は神経分化の能力が強化されていることが明らかとなった。そのため、ヒト以外の霊長類の PSC を用いた完全なるナীব様変換の達成は、再生医療の実用的なアプリケーションとなりうる。

4. 絶滅危惧種アマミトゲネズミから iPS 細胞の樹立と生殖細胞の作製に成功^{4,5}

絶滅危惧種アマミトゲネズミから iPS 細胞の樹立と生殖細胞の作製に成功した。また XO 型の哺乳動物には雌の細胞からでも精子細胞に分化可能な柔軟性があることを発見した。(図 1)これまで、マウスとラット以外の iPS 細胞がキメラとして成体に寄与し、精子および卵子(生殖細胞)にまで分化した例はなく、また絶滅危惧種の細胞を体を含む個体が世界で初めて作製された。研究チームは、絶滅危惧種一個体の iPS 細胞から卵子と精子を生じさせることに成功させたことで、種の完全喪失の備えとして iPS 細胞が非常に効果的であることも証明した。今後は他の絶滅危惧種への適用も期待される。

5. ラット体外受精技術開発と高効率ゲノム編集技術への展開⁶

ラットの体外受精は長年の間再現が困難とされてきたが、誰でも体外受精を再現できる技術へと発展させた。また、そのようにして得られたラット体外受精卵子は自然交配卵子よりも高効率にゲノム編集ができることを発見し、ラットを用いたモデル動物作製の効率化に寄与する成果となった。

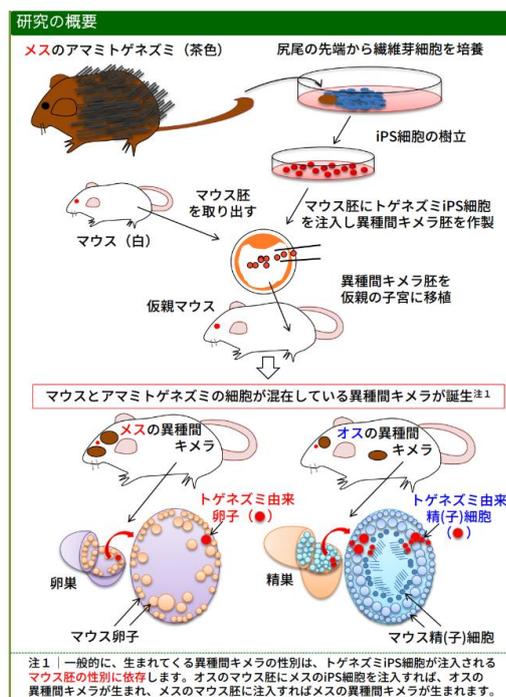


図 1. 絶滅危惧種からの iPS 細胞の樹立と生殖細胞の作製

¹ Honda, Arata, et al., Experimental Animals 64, 2015, pp. 31-37.² Honsho, Kimiko, et al., Journal of Reproduction and Development 61, 2015, pp. 13-19.³ Honda, Arata, et al., Scientific Reports 7, no. 45285, 2017.⁴ Honda, Arata, et al., Science Advances 3, no. 5, 2017.

⁵ 宮崎大学テニュアトラック推進機構 本多研究室 プレスリリース(2017/5/13) ⁶ Honda, Arata, et al. Scientific Reports 9, no.11571. 2019

3.2.7 リプログラミング技術を用いた遺伝性血管疾患の新規治療標的の同定 (渡部徹郎)

リプログラミング技術を用いた遺伝性血管疾患の新規治療標的の同定
 渡部 徹郎(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科硬組織病態生化学分野 教授)

研究期間 2009年10月～2013年3月

展開している事業:
 基盤研究(B)、次世代がん医療創生研究事業(P-CREATE)、基盤研究(C)3件等

さきがけの成果:

Loeys-Dietz 症候群(LDS)などの TGF-β シグナルに異常を持つ遺伝性血管疾患の発症要因を明らかにすることを目的として、LDS 患者から疾患 iPS 細胞を樹立し、in vitro 分化系により得られた血管細胞の細胞生物学的性質を検討した。TGF-β シグナルの伝達には正常 iPS 細胞と有意な変化は見られなかった。さらに、安全な iPS 細胞を効率よく樹立するために、iPS 細胞の樹立過程における間葉上皮移行(Mesenchymal-to-Epithelial Transition: MET)と MET を調節する TGF-β シグナルの役割を検討した。その結果、山中因子の中で Klf4 が単独でマウス線維芽細胞の MET を誘導することを明らかにした。さらに MET を阻害する TGF-β シグナルを TGF-β シグナル阻害剤(E-616452)により抑制することで、リプログラミングの初期段階においてリプログラミングが誘導され、Klf4 なしで iPS 細胞が効率的に作成できることが示された。



発展:

1. 血管内皮細胞からの因子によるがん発症機作の解明^{1,2}

内皮間葉移行由来のがん関連線維芽細胞(CAF)ががんの悪性を亢進することは明らかになってきたが、メカニズムは解明されていなかった。この研究では、TGF-β と TNF-α が協調することで、EndMT を誘導していることを明らかにし、さらに血管内皮細胞由来の CAF が TGF-β 2 を分泌し、がん細胞の上皮間葉移行(EMT)を誘導することにより、がんの悪性を亢進することを示した(図 1)。中和抗体を用いた TGF-β シグナル阻害によってがんの悪性を抑制することができたことから、腫瘍組織における TGF-β シグナルを抑制することで、がん微小環境ネットワークを標的とした新たながん治療法の開発へ応用されることが期待される。

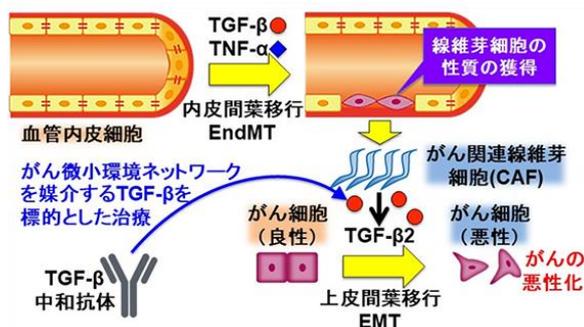


図 1. 血管内皮細胞からの因子によるがん進展メカニズムと治療の可能性¹

2. がん悪性化因子を阻害する新規タンパク質を開発^{3,4}

TGF-β が I 型受容体(TβRI)と II 型受容体(TβRII)に結合してシグナルを伝達する(図2A)のを阻害するため、II 型受容体を用いた Fc 融合タンパク質(TβRII-Fc、図 2B)が開発されていたが、TGF-β 2 に対する阻害作用が低いことが課題だった。本研究では TGF-β 2 を含む TGF-β の全てのアイソフォームを抑制する新規 Fc 融合タンパク質を開発した。本研究の成果により、口腔がんや神経膠芽腫におけるがん微小環境ネットワークシグナルを標的とした新たながん治療法への導出が期待される。

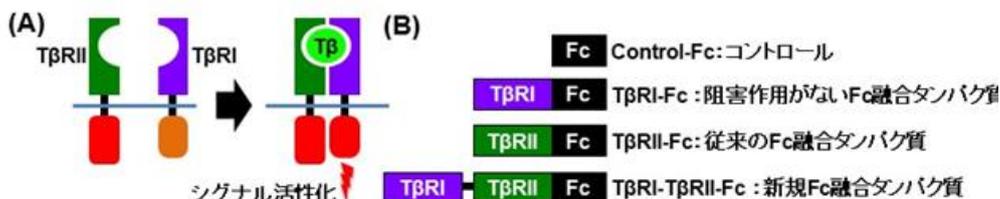


図 2 新規 Fc 融合タンパク質の構造³

¹AMED プレスリリース(https://www.amed.go.jp/news/release_20200711.html)(20/7/11)

²Yoshimatsu et al. Cancer science 111.7 (2020): 2385.

³AMED プレスリリース(<https://www.amed.go.jp/news/seika/kenkyu/20200803.html>) (20/8/3)

⁴Takahashi et al. Journal of Biological Chemistry 295.36 (2020)

3.2.8 Klfファミリーによる幹細胞機能制御の分子機構 (依馬正次)

Klfファミリーによる幹細胞機能制御の分子機構

依馬 正次(滋賀医科大学動物生命科学研究センター 教授)

研究期間 2009年10月～2015年3月

展開している事業:

基盤研究(B)(2件)、新学術領域研究(研究領域提案型)(2件)、科学技術戦略推進費

さきがけの成果:

本研究では、Klf5に着目することで初期胚発生過程における多能性獲得機構を解明することを目指した。その結果、山中因子 Klf4 に類似の Klf5 は、マウスの初期発生過程で Fgf-FgfR-MAPK シグナルを抑制することで Nanog 陽性の多能性幹細胞の出現を保証する役割を果たしていることを解明した。



発展:

1. マウスエピプラストにおける多能性幹細胞の出現機構を解明^{1,2}

体細胞初期化因子 Klf5 は、Fgf4 の発現を抑制することで原始内胚葉への分化を抑制しつつ、エピプラストへの分化を保証する役割を有することを解明した。(図 1)これまで解明されてこなかった初期段階における内部細胞サブセットにおける Fgf4 発現の誘導に関するメカニズムが明らかとなり、初期化因子による iPS 細胞樹立メカニズムの解明に繋がることと期待される。

2. 着床前胚のリン酸化 ERK 活性の可視化に世界で初めて成功³

ERK は様々な外的刺激によってリン酸化されるものの、マウスの着床前胚のリン酸化を可視化する方法はこれまで無かった。免疫染色法の改善により安定的に可視化する方法の開発に世界で初めて成功した(図 2)。本研究は、着床前胚における FGF/ERK 経路の制御の新しいモデルを提出する。

3. ヒトに近い実験動物である非ヒト霊長類での遺伝子改変技術の開発およびヒト病態の再現に成功^{4,5}

旧世界ザルに属するカニクイザルにおいて、トランスジェニックおよびゲノム編集を用いた遺伝子改変技術を確認した(図 3 左)。今回 GFP を発現するカニクイザルを生成した技術は、移植等に応用可能な技術になりうる。さらに常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)モデルを作製し、腎嚢胞の再現に世界で初めて成功した(図 3 右)。ADPKD モデルにより、ADPKD の発症と進行を解明し、薬を含む新しい治療法が確立されることが期待される。

特記事項

佐々木えりか先生(実験動物中央研究所)との共同研究。2015年に我が国初のトランスジェニックカニクイザル産子の作出に成功⁴

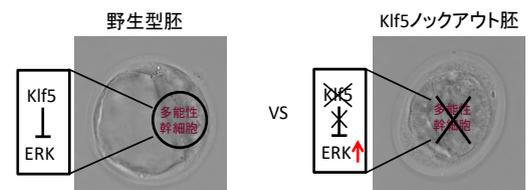


図 1. 体細胞初期化因子 Klf5 と発生段階における生理機能

Klf5 はマウスの初期胚発生では ERK と呼ばれるシグナル伝達を抑制することで、多能性幹細胞の出現を保証しているという過程が明らかとなった。

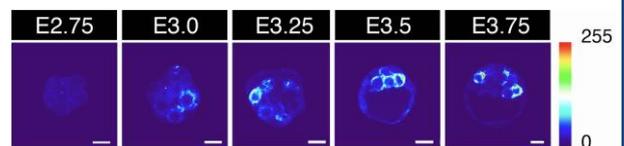


図 2 リン酸化 ERK の可視化技術の開発に成功

リン酸化 ERK は様々な増殖因子の細胞内シグナル伝達で中心的な役割を果たすものの、着床前胚のリン酸化 ERK の可視化はこれまで多くの研究者が取り組んだにも関わらず、不可能だった。我々は世界で初めて安定して可視化することに成功した。



図 3 非ヒト霊長類の遺伝子改変

非ヒト霊長類の1種であるカニクイザルにおいて、GFP を過剰発現するトランスジェニック動物(左図)の作製に成功するとともに、多発性嚢胞腎モデルの作製により、ヒト病態と酷似した腎嚢胞が形成することを報告した(右図)。

¹ Azami, Takuya, et al., Development. 144, 2017, pp. 3706-3718.

² 滋賀医科大学 プレスリリース

[https://www.shiga-med.ac.jp/sites/default/files/2017-09/%E4%BF%AE%E6%AD%A3%E5%BE%8C%E3%80%80H290905%E9%80%81%E4%BF%A1%E3%80%80%E3%83%97%E3%83%AC%E3%82%B9%E3%83%AA%E3%83%AA%E3%83%BC%E3%82%B9.pdf\(2017/9/5\)](https://www.shiga-med.ac.jp/sites/default/files/2017-09/%E4%BF%AE%E6%AD%A3%E5%BE%8C%E3%80%80H290905%E9%80%81%E4%BF%A1%E3%80%80%E3%83%97%E3%83%AC%E3%82%B9%E3%83%AA%E3%83%AA%E3%83%BC%E3%82%B9.pdf(2017/9/5))

³ Azami, Takuya, et al., Development 146, 2019.

⁴ Seita, Yasunari, et al., Scientific Report 6, no. 24868, 2016.

⁵ Tsukiyama, Tomoyuki, et al., Nature Communication 10, no. 5517, 2019.

センダイウイルスベクターを用いた安全な iPS 細胞作製と分化誘導

房木 ノエミ(東北大学研究推進・支援機構 URA センター 特任准教授)

研究期間 2009 年 10 月～2015 年 3 月

さきがけの成果:

センダイウイルスベクター(SeV)を用いたより効率のよい iPS 細胞の作製法の探索を目的として、(a) 温度感受性ベクターを利用した効率のよい外来因子フリーの iPS 細胞作製法と分化ベクターへの応用、(b) 当初皮膚線維芽細胞からが主であった iPS 細胞の作製を、汎用性の高い HLA ホモの細胞、あるいは大型実験動物も含めた種々の細胞から出来るようにする事、(c) より高い「万能性」を持つような naïve 様 iPS 細胞の作製、(d) 外来因子フリーであることを利点とした SeV を用いたヒト疾患 iPS 細胞への応用を検討した。それぞれで結果を出し、(b)では末梢血および臍帯血、歯髄細胞由来の iPS 細胞の樹立、マーマセットの iPS 細胞の樹立に成功し、(d)では1型及び2型糖尿病等の複数の疾患由来 iPS 細胞を樹立、疾患を再現させ、一部創薬及び遺伝子治療の試みを進めている。

発展:

1. GM1-ガングリオシドーシスの治療薬候補物質の探索¹

GM1-ガングリオシドーシスは、いわゆるライソゾーム病の一種であり、 β -ガラクトシダーゼの欠損により、脳をはじめとする全身の臓器に GM1-ガングリオシドが蓄積することにより発症する。治療方法として、骨髄移植、遺伝子治療などが検討されているが、決定的な方法はない。

SeV を用いて本疾患の患者由来の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を作製し、この iPS 細胞を神経幹細胞(NSC)に再分化させることにより、GM1-ガングリオシドーシスの治療薬スクリーニング系を構築した。この系を用いて化合物ライブラリーをスクリーニングした結果、2つの化合物が NSC への GM1-ガングリオシドの蓄積を減少させることが明らかになった(図1)。

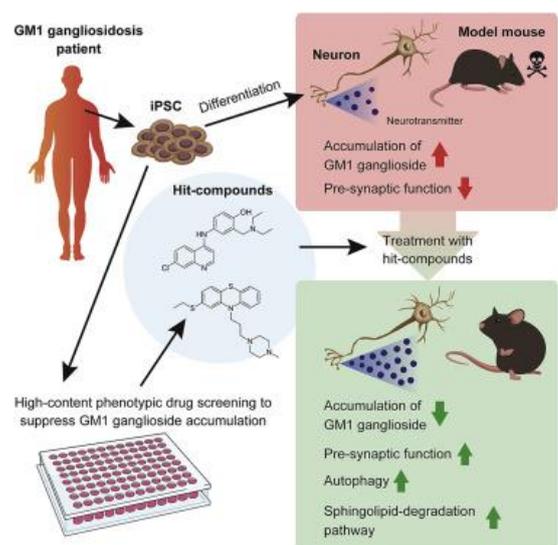


図1. スクリーニング方法¹

特記事項

さきがけの成果を用い、ディナベック株式会社(現株式会社 ID ファーマ)から iPS 作製キット CytoTune を発売

¹ Ryutaro Kitahara et al. Stem Cell Reports vol.14, pp.909-923, 2020

3.2.10 始原生殖細胞形成機構と iPS 誘導機構の統一原理 (大日向康秀)

始原生殖細胞形成機構と iPS 誘導機構の統一原理

大日向 康秀(理化学研究所生命医科学研究センター免疫器官形成研究チーム 研究員)
研究期間 2009 年 10 月～2015 年 3 月

展開している事業:
挑戦的研究(開拓)、若手研究(A)

さきがけの成果:

TS 細胞(栄養膜幹細胞)の樹立・維持・三次元培養法の条件を検討することによって新規 TS 細胞の樹立・培養法を確立し、ES 細胞との共培養法を用いることによって初期発生の概念を解明、試験管内再構成することを目指した。成果として、蛍光タンパク質の発現により非侵襲的にキメラ貢献能、生殖細胞系列寄与能を評価可能な iPS 細胞の誘導技術、無血清培養条件における TS 細胞(栄養膜幹細胞)培養法を開発した。



発展:

1. 原始内胚葉幹細胞の樹立¹

哺乳動物の初期胚である胚盤胞のエピブラストの性質を捕捉した物が ES 細胞/iPS 細胞、栄養膜の性質を捕捉した物が TS 細胞であるが、残る要素である原始内胚葉の幹細胞の樹立に成功した。

2. 栄養膜外胚葉様構造及び製造方法^{2,3}

精卵や初期胚を用いずに ES 細胞から個体を生み出すことができないのは、ES 細胞等の多能性幹細胞と TS 細胞の凝集により初期胚を再構成する技術はこれまで存在せず、ES 細胞から栄養膜系列を作り出すことができないためであった。本研究により、新規 TS 細胞を用い、無血清培養条件で培養することで、栄養外胚葉様の立体構造を誘導する技術を開発した。これにより幹細胞のみで初期胚様構造を作製するための基礎技術となる。

3. 絶滅危惧種の iPS 細胞の樹立と iPS 細胞から卵子と精子の作出^{4,5}

絶滅危惧種であるアマミトゲネズミの iPS 細胞の樹立とアマミトゲネズミの iPS 細胞とマウスとの異種間キメラの作製に成功した。(詳細は本多先生のページを参照)

¹ 独立行政法人理化学研究所. 大日向 康秀, 古関明彦. 原始内胚葉幹細胞誘導剤. 特願 2019-118733

² 独立行政法人理化学研究所. 大日向 康秀. 栄養膜外胚葉様構造体及びその製造方法. 特願 2015-102260. 2015-05-19

³ Ohinata, Yasuhide, Tsukiyama, Tomoyuki. PLOS ONE 9, 2014.

⁴ 宮崎大学本多研究室(<https://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/maruhon/endangered.html>)

⁵ Honda, Arata, et al. Science advances 3.5 (2017): e1602179.

3.3 2010 年度採択研究課題

3.3.1 染色体異常症候群における合併症の発症メカニズムの解明 (北畠康司)

染色体異常症候群における合併症の発症メカニズムの解明

北畠 康司(大阪大学医学部附属病院 講師)

研究期間 2010 年 10 月～2014 年 3 月

展開している事業:

基盤研究(B)、再生医療実現拠点ネットワークプログラム

さきがけの成果:

ダウン症新生児の約 10%は一過性骨髄異常増殖症(transient abnormal myelopoiesis,TAM)と呼ばれる前白血病状態を呈する。TAM の発症メカニズムを詳細に解析するため、GATA-1 変異型と 21 番染色体の核型の各組み合わせによる 6 種類の iPS 細胞モデルの確立を行った。これら全てでモデルは確立され、確立したモデルを造血分化誘導することによる影響を解析した結果、21 トリソミーには造血亢進作用があり、GATA-1 short form には血球分化を途中停止させる作用があることが確認された。

発展:

1. ダウン症候群における神経細胞死の 4-フェニル酪酸による改善¹

ダウン症候群(21 トリソミー)と 13 トリソミーの患者からセンダイウイルスベクター(SeV)を用いて iPS 細胞を作製し、神経前駆細胞(Neural Progenitor Cell, NPC)に誘導した(図 1)。

これらの NPC では、アポトーシスによる細胞死が増加するとともに、異常タンパク質の凝集といったタンパク質のホメオスタシスのかく乱と小胞体ストレス応答経路(ER 経路)のアプレギュレーションが生じていた。

ダウン症患者由来の細胞をケミカルシャペロンである 4-フェニル酪酸で処理すると、アポトーシスとタンパク質の凝集が抑制されることが明らかになった。

この結果は、21 番染色体のトリソミーによる遺伝子量効果と、トリソミーにより誘導されるストレスの 2 つの要因によりダウン症候群の病態が形成されるという仮説を支持するものであり、今後のさらなる病態解明と治療方法の開発につながる成果と期待される。

2. 母親由来の染色体ペアによる核の構造と遺伝子転写への影響解明²

21 トリソミーを有する患者から iPS 細胞を作製し、3 次元蛍光イメージング法(3D-FISH)を用いて、核内における染色体の構造を調べた。その結果、減数分裂時の染色体不分離に由来する母親由来の 2 つの染色体は、核の内部において核膜から離れた部位に隣接して存在し、そのために通常とは異なる核の構造を呈することが明らかになった。また、これに伴う遺伝子転写の変化も示された。この結果は、ダウン症候群の発症機構の解明につながると期待される。

特記事項

2019 年に日本小児科学会学術研究賞を受賞(受賞題目「ダウン症候群における病態メカニズムの解明と創薬開発」)。

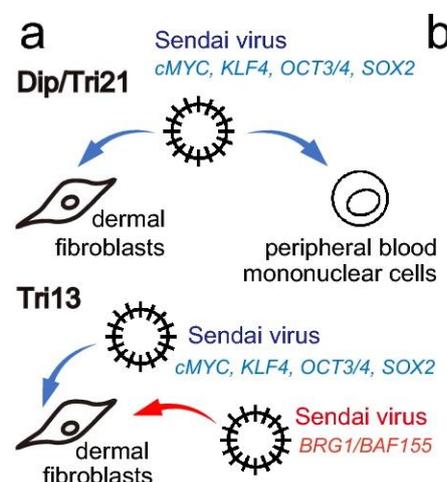


図 1. SeV を用いた iPS 細胞の作製¹

¹ Katsuya Hirata et al. Scientific Reports 2020 Aug 20;10(1):14047

² Sayaka Omori et al. Scientific Reports 2017 Apr 10;7(1):764

純然たるヒト iPS/ES 細胞の樹立、維持および増殖機構の解析

高島 康弘(京都大学 iPS 細胞研究所 特定拠点講師)

研究期間 2010 年 10 月～2014 年 3 月

展開している事業:

再生医療実現拠点ネットワークプログラム、基盤研究(A)

さきがけの成果:

ヒト ES/iPS 細胞の抱える多様性、不均一性、株間の差、さらに完全にリプログラミングされていない不完全 iPS 細胞ができるという問題を解決することを目的として、完全にリプログラミングされた iPS 細胞(ナイーブ型ヒト iPS 細胞)を樹立させた。またナイーブ型ヒト iPS 細胞がどのような遺伝子発現を示し、機能的に働くのか、またどのような分化能を示すのかを解析した。



発展:

1. ナイーブ型ヒト iPS 細胞の樹立^{1~3}

ヒトから iPS 細胞を作製した場合は「プライム型」になることが分かっており、基底状態で安定して維持することはできなかったが、プライム型と比較して受精卵により近いナイーブ型ヒト iPS 細胞の樹立に成功した。本研究で作製された細胞は、ヒトはどのように正常に発生していくのか、といったヒトの生命のごく始まりを知る手がかりになることや、再生医療研究の有用なツールとなることが期待される。(図 1)

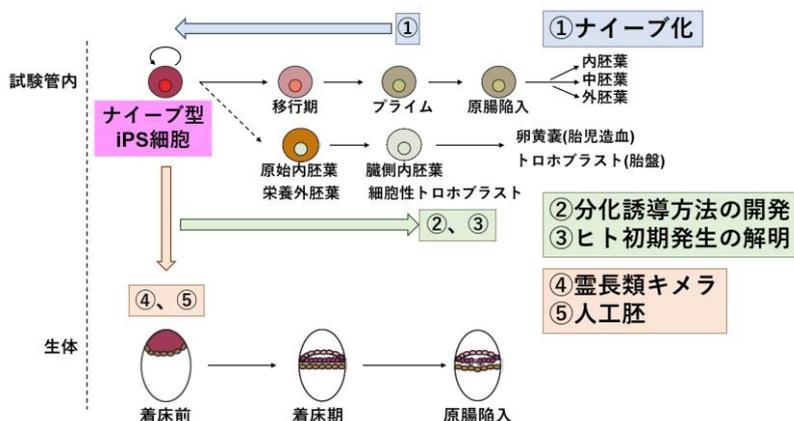


図 1. ナイーブ型ヒト iPS 細胞の樹立に関する研究イメージ

2. シノモルガスクのナイーブ型 iPS 細胞の樹立とその状態識別⁴

技術的倫理的な問題によりヒトの多能性幹細胞のキメラに寄与する能力を評価することが困難であるため、ヒト以外の霊長類の ES 細胞、iPS 細胞のナイーブ型の評価が求められている。ウサギの ES 細胞のナイーブ型への変換方法を用い、実験動物であるシノモルガスクの ES 細胞、iPS 細胞のナイーブ型への変換を試みた。シノモルガスクのナイーブ型多能性幹細胞は、不均一性等を示し、真のナイーブな特性を示さなかったものの、in vitro での神経分化の可能性を示した。

3. ヒトのナイーブ型 ES 細胞の安定化手法の確立⁵

ナイーブ型のヒト胚性幹細胞は染色体異常を引き起こし、研究および臨床応用への利用が困難になる可能性があることが知られている。そこで、ナイーブ状態の維持に必要な MEK 阻害剤の調整により、ナイーブ型ヒト胚性幹細胞の樹立と維持を容易にする方法を確立した。本手法は、ナイーブ型多能性幹細胞を用いた、着床前の発生段階の研究や臨床応用に貢献する。

特記事項

- タカラバイオ株式会社と新規ナイーブ型ヒト iPS 細胞培地を開発。
- ナイーブ型ヒト iPS 細胞の維持培地は NaïveCult™ Expansion Medium として STEMCELL TECHNOLOGIES 社から世界で販売。

¹ Takashima, Yasuhiro, et al., Cell 158, 2014, pp. 1254–692.
² Cambridge Enterprise. Resetting Pluripotent Stem Cells. GB1414992.6. 2014–08–22, GB1415368.8. 2014–08–29, WO2016027099A3. 2016–04–14.
³ JST プレス (https://www.jst.go.jp/pr/info/info1046/index.html)(2014/9/12)
⁴ Honda, Arata, et al. Scientific reports, 2017, 7: 45285.
⁵ Di Stefano, Bruno, et al. Nature methods, 2018, 15.9: 732–740.

連鎖解析と iPS/ES 技術を用いた遺伝性疾患遺伝子同定法の開発

伊達 英俊(国立精神・神経医療研究センター 脳神経内科 研究員)

研究期間 2010 年 10 月～2014 年 3 月

さきがけの成果:

患者由来の細胞から iPS 細胞を用いて、in vitro で病変部位細胞を再現し、患者特異的な表現形と、連鎖解析や次世代ゲノムなどのゲノムデータによる候補遺伝子から一家系のみで疾患の原因遺伝子を効率よく同定することを目的とした。長年類似疾患が確認されていない筋疾患である拡張性心筋症を伴うネマリニンミオパチーを対象として、患者及び非発症の家族から iPS 細胞を樹立し、本疾患の表現形が見られる心筋細胞及び骨格筋細胞への誘導・分化を確認した。さらに、分化誘導した細胞を生化学的解析等を行い、回収した細胞の RNA-seq を行い、シグナル異常の解析も行った。

発展:

1. 遺伝性・孤発性筋疾患の RNA-seq 解析

遺伝性筋疾患及び孤発性筋疾患の筋生検 87 例の RNA-seq を行い、各疾患群特異的なシグナル異常経路を発見し、治療対象となる遺伝子群を発見した。疾患特異的なシグナル以上の発見から治療法の開発へとつながることが期待される。(論文投稿中)

2. 神経核内封入体病、白質脳症を伴う眼咽頭型ミオパチー、眼咽頭遠位型ミオパチーに共通する原因の解明^{1,2}

数千塩基対から数万塩基対以上読み通せる 1 分子ロングリードシーケンサーを用いることで、臨床像や検査所見において重複するところがある、認知症を呈する疾患の一つである神経核内封入体病、白質脳症を伴う眼咽頭型ミオパチー、眼咽頭遠位型ミオパチーの 3 疾患は、遺伝子自体の機能の変化ではなく、共通して同じ 3 塩基(CGG)の繰り返し配列の異常伸長が原因であることを解明した。今後、異常伸長した CGG 繰り返し配列を含む RNA を減らす治療法の開発が期待される。

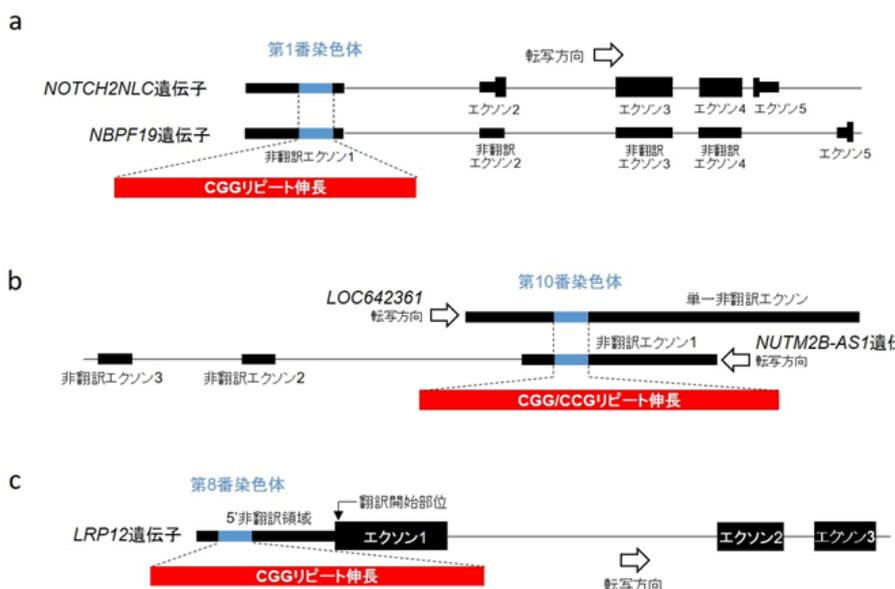


図 1. 3 疾患に見いだされた CGG 繰り返し配列異常伸長変異²

a) 神経核内封入体病、b) 白質脳症を伴う眼咽頭型ミオパチー、c) 眼咽頭遠位型ミオパチー

¹ Ishiura, Hiroyuki, et al., Nature genetics, 2019, 51.8: 1222-1232.

² AMED プレスリリース(https://www.amed.go.jp/news/release_20190723-01.html)(2019 /7/23)

3.3.4 人為的核内環境制御による高品質 iPS 細胞の誘導 (堀田秋津)

人為的核内環境制御による高品質 iPS 細胞の誘導

堀田 秋津(京都大学 iPS 細胞研究所 講師)

研究期間 2010 年 10 月～2014 年 3 月

展開している事業:

産学連携医療イノベーション創出プログラム、難治性疾患実用化研究事業、若手研究(A)

さきがけの成果:

iPS 細胞における遺伝子ネットワーク制御因子解析のために、*piggyBac* ベクターをベースとした shRNA ライブラリーを構築した。また、iPS 細胞における遺伝子導入技術およびゲノム編集技術を開発した。

発展:

1. TALEN および CRISPR-Cas9 を用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィーの遺伝子変異修復法開発^{1~3}

TALEN および CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いることで、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者由来 iPS 細胞においてジストロフィン遺伝子変異修復方法を開発した(図 1)。本研究成果は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者から作った iPS 細胞において、3 つの戦略でジストロフィン遺伝子の変異を修復したことを世界で初めて報告した。今回示した手法は、今後の遺伝子治療の枠組みとなることが期待される。

2. CRISPR-Cas9 を用いた HLA 編集による低抗原性 iPS 細胞の作成法開発^{2, 4, 5}

iPS 細胞において、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いることで HLA 遺伝子の個別欠失を誘導し、T 細胞および NK 細胞から攻撃されにくい低抗原性の iPS 細胞作成方法を開発した(図 2)。この研究成果により、他家移植の際の免疫拒絶反応を抑制することが可能であり、iPS 細胞を用いた再生医療の普及に大きく貢献できる可能性も示している。

3. ウイルス様粒子を用いた CRISPR-Cas9/gRNA 送達技術開発^{2, 6, 7}

CRISPR-Cas9 タンパク質および gRNA を iPS 細胞や生体筋組織へと送達するため、ウイルスの殻粒子に Cas9 タンパク質と gRNA を内封する技術を開発した(図 3)。本研究では、ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療を開発する上で鍵となる、一過性に発現しオフターゲット変異リスクの低い送達技術を開発した。この技術は比較的大きな分子を包含することができるため、今後は様々なより大きなゲノム編集ツールなどを細胞に送ることができ、ゲノム編集や遺伝子治療分野で汎用性のある技術となることが期待される。

特記事項

- 製薬企業3社との共同研究および技術供与を実施。
- ゲノム編集を用いた遺伝子変異修復技術特許を製薬企業に実施許諾。



図 1. 筋ジストロフィー-iPS 細胞でのゲノム編集治療法開発²

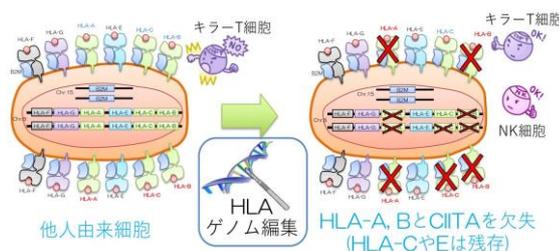


図 2. HLA ゲノム編集による細胞移植時の免疫拒絶回避²

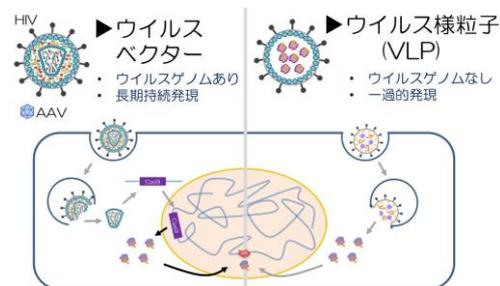


図 3. Cas9 と gRNA を空のウイルス様粒子に内封して送達する技術: NanoMEDIC²

¹ Hongmei Lisa, Li, et al., Stem Cell Reports 4, 2015, pp. 143-154. ² 京都大学 iPS 細胞研究所 CiRA 堀田研究室 HP 研究内容コンセプト
³ 京都大学 iPS 細胞研究所 CiRA プレスリリース(2014/11/27) ⁴ Xu, Huaigeng, et al. Cell Stem Cell 24, 2019, pp. 566-578. ⁵ 京都大学 iPS 細胞研究所 CiRA プレスリリース(2019/3/8) ⁶ Gee, Peter, et al., Nature Communications 11, no. 1334, 2020. ⁷ 京都大学 iPS 細胞研究所 CiRA プレスリリース(2020/3/13)

3.3.5 リプログラミング技術で解く細胞分化と時計機構の関係 (八木田和弘)

リプログラミング技術で解く細胞分化と時計機構の関係

八木田 和弘(京都府立医科大学大学院医学系研究科 教授)

研究期間 2010年10月～2014年3月

展開している事業:

未来社会創造事業, 基盤研究(A), (B)(3件)

さきがけの成果:

本研究では、リプログラミング技術を用いて、「細胞分化と概日時計の機能連関」を分子レベルで解き明かすことを目的として研究を行い、これまで全く知られていなかった概日時計と細胞分化機構との関連を世界で初めて報告した。さらに、ES細胞を用いた in vitro 概日リズム評価法を開発し、遺伝子変異による概日リズム異常を in vitro で再現することに成功した。

発展:

1. <体内時計と細胞分化の共役メカニズム> ES細胞の分化誘導系における体内時計の発生メカニズムを解明^{1~4}

マウスES細胞の分化誘導系を用い、様々な時計遺伝子の転写後制御によって、未分化細胞においては体内時計の抑制メカニズムが存在することを明らかにした(図1)。この研究により、細胞分化と密接に関連する体内時計の発生メカニズムが世界で初めて明らかになった。今回の研究成果は、細胞分化の視点から体内時計と「がん」の関係を体系的に理解できる可能性を示すものであり、がん研究などへの応用も期待できる。

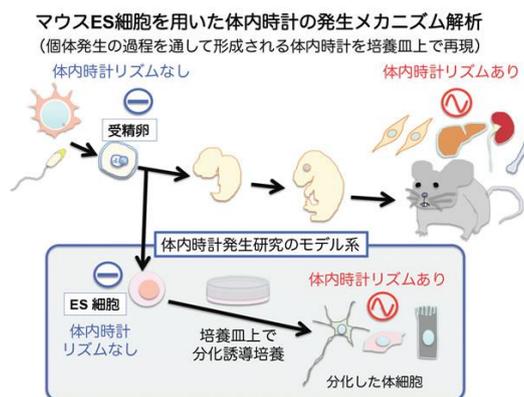


図1. 哺乳類における体内発生時計の概要³

2. <体内時計の発生原理> マウス発生過程における体内時計の形成メカニズムを解明^{4~7}

ES細胞の分化誘導過程と同様に、時計遺伝子の転写後制御機構がマウス個体発生過程でも厳密に体内時計の形成を制御していることを明らかにし、体内時計の発生原理を解明した(図2)。本研究により、これまで不明であった個体発生における胎児の体内時計形成メカニズムが明らかとなった。本研究成果をもとに胎児の機能発生に関する研究がより一層進むことが期待される。

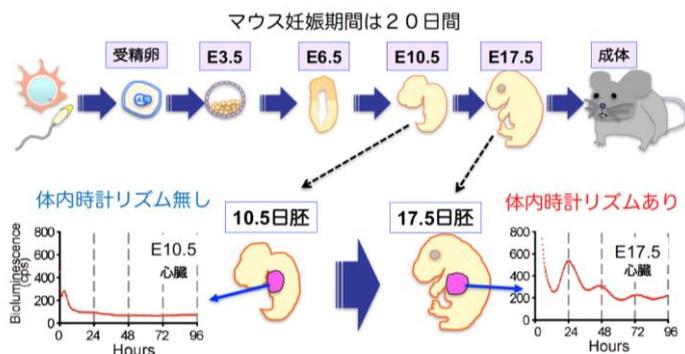


図2. 胎児期に生じる体内時計の生成⁷

3. <体内時計とがんとの関連> 細胞分化異常の観点から体内時計とがんの関連を解析^{4,8,9}

マウス体内でリプログラミングを誘導する in vivo reprogramming 法を活用し、Wilms Tumor など胎児性腫瘍における体内時計消失メカニズムを解明。この研究結果は、細胞分化と体内時計との相関関係を通じて、がんの病態生理学的性質を理解するための新しい観点を提供する可能性があり、分子標的薬を用いたパーソナル医療に将来役立つ可能性がある。

¹ Umemura, Yasuhiro, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111, 2014, pp. E5039-48.

² Inada Yutaka, et al., FEBS Letters 588, 2014, pp. 459-465.

³ JST プレスリリース(<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20141111/>)(2014/11/11)

⁴ 京都府立医科大学 生理学教室 統合生理学部門 研究テーマ(<http://www.fkpu-m.ac.jp/k/seiri2/research.html>)

⁵ Umemura, Yasuhiro, et al., J Biol Rhythm. 34, 2019, pp. 525-532

⁶ Umemura, Yasuhiro, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 114, 2017, pp. E7479-7488.

⁷ 京都府立医科大学 プレスリリース (<http://www.fkpu-m.ac.jp/k/seiri2/images/PNASプレスリリース最終版.pdf>)(2017/8/17)

⁸ Inoue, Maho, et al., Pediatr Surg Int 35, 2019, pp. 1403-1411.

⁹ Ohashi, Munehiro, et al., Genes Cells 23, 2018, pp. 60-69.

3.3.6 分化・発生を理解する多次元定量計測技術の基盤開発 (渡邊朋信)

分化・発生を理解する多次元定量計測技術の基盤開発

渡邊 朋信((国) 理化学研究所 生命機能科学研究センター先端バイオイメージング研究チーム チームリーダー/広島大学 原爆医科学放射線医科学研究所 教授)

研究期間 2010年10月～2014年3月

展開している事業:

新学術領域研究(研究領域提案型)、
戦略的創造研究推進事業

さきがけの成果:

本研究では生命現象の『動的』挙動を観察・計測するための様々な技術開発、特に iPS 研究に係る技術開発が行われ、細胞の分化状態をラマン散乱光のスペクトル形状で識別出来ることを実証し、技術として確立した。また、胚性幹細胞を長期間連続で蛍光観察するための蛍光プローブおよび顕微鏡システムも開発した。

発展:

1. ラマン散乱スペクトルから遺伝子発現を推定する技術の開発^{1,2}

機械学習手法を用いることにより、細胞が発するラマン散乱スペクトルの形状から薬剤耐性大腸菌の遺伝子発現を推定できることを実証した。本研究は、これまでの分析・分解型研究では別々に扱われていた「代謝ネットワークと遺伝子発現ネットワーク」との層の異なるネットワーク間の関連性を同時に扱っており、従来のサイエンスとは異なり、多層を交えた定義が定量的に可能になる。ラマン散乱光スペクトルと遺伝子発現パターンの異なる情報層が細胞の複雑なネットワークを介してどのように関連しているかを研究することで、基礎研究および応用研究に応用可能となる。

2. 胚性幹細胞が集団で分化する仕組みを物理学的に解明^{2,3}

およそ 27,000 個のマウス胚性幹細胞における転写因子 Nano, Oct4 の発現を単細胞精度で 8 日間定量的に計測し、胚性幹細胞が集団で分化する仕組みの物理学的背景を明らかにした(図 1)。本研究により、これまで生物物理学的側面から特定されていなかった集団状態のダイナミクスを導く一般的な原動力が明かされ、また、幹細胞やその他の振動している細胞集団における集団動的プロセスをよりよく理解するのに役立つ可能性がある。

3. 胚性幹細胞における新しい機械的な未分化維持機構を発見⁴

胚性幹細胞は細胞接着から受ける張力によって未分化状態が維持されるが、それはネスプリントタンパク質を介したアクチン繊維と核膜との物理的リンカーに依ることを発見した。本結果は、アクチンと核との機械的ひずみを解放することにより、胚性幹細胞が多能性の性質を獲得できるという考えを支持するものである。細胞接合部に結合したアクチン細胞骨格とネスプリンを介した核との間の物理的リンカーが、分化シグナルを生成するひずみを中継するために重要であると思われる。

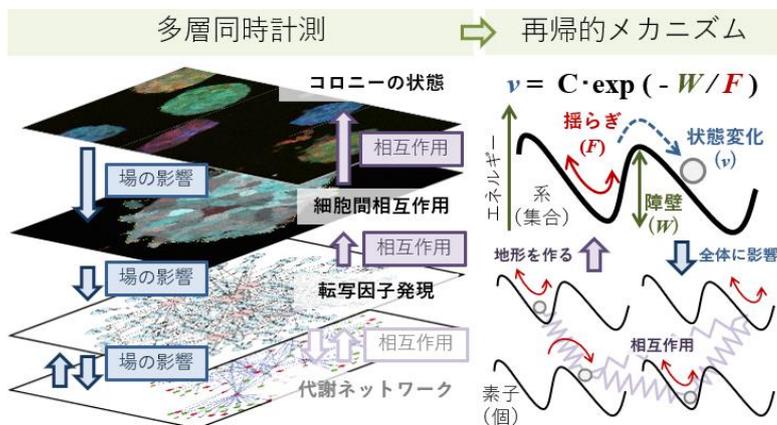


図 1. 研究メカニズムのイメージ図³

¹ Germond, Arno, et al., Communications Biology. 1, no. 85, 2018.

² 理化学研究所 生命システム研究センター 先端バイオイメージング研究チーム 研究内容
<http://www.qbic.riken.jp/lcb/site1/research.html>

³ Okamoto, Kazuko, et al., Scientific Report 8, no. 11965, 2018.

⁴ Brit, Gracy, David., Et al., Stem Cell Research 41, no. 101614, 2019.

疾患 iPS 細胞を用いた大脳皮質構造形成メカニズムの解明

下島 圭子(東京女子医科大学 輸血・細胞プロセッシング科 助教)

研究期間 2010 年 10 月～2017 年 3 月

さきがけの成果:

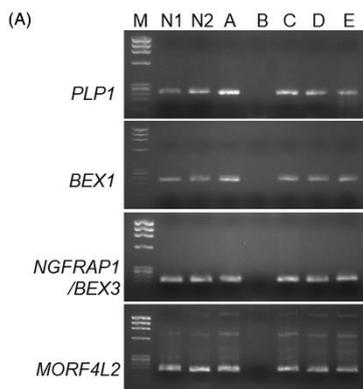
ヒト疾患患者由来 iPS 細胞を使った小児難治性神経疾患の病態解析系の確立を目指し、疾患 iPS 細胞の樹立、iPS 細胞の神経系細胞への分化誘導、病態解析を実施した。世界で初めて先天性大脳白質形成不全症患者由来疾患 iPS 細胞を樹立し遺伝子発現解析を行い、部分重複例では PLP1 の発現が null になっていることを明らかにした。また、LIS1 のハプロ不全によって脳形成障害を来した患者由来 iPS 細胞を用いて神経系細胞に分化誘導する過程における遺伝子発現の変化を網羅的に解析したところ、CHCHD2 遺伝子の発現が恒常的に低下していることも明らかにになり、この遺伝子が神経細胞における遊走に関連していることを明らかにした。



発展:

1. Xq22 領域の微細欠失によって高度な発達障害を来す女兒の疾患特異的 iPS 細胞を用いた原因遺伝子探索¹

患者由来 iPS 細胞を用いて欠失範囲内に位置する遺伝子のうち、X 不活化の影響を免れる遺伝子を探索した。具体的にはモノクローナル化した細胞クローン間で RNA の発現が異なる遺伝子を RT-PCR によってスクリーニングし、ある1つの遺伝子(*BEX2*)が両アリルで発現していることを突き止めた。当該遺伝子が Xq22 微細欠失によって引き起こされる発達障害に関わる可能性が示唆される。



(A). iPS 細胞を用いた RT-PCR

PLP1, BEX1, NGFRAP1/BEX3, MORF4L2 の発現を RT-PCR にて解析し、ゲル電気泳動を行った。患者由来 iPS 細胞クローン A~E の 5 種のうち、クローン B のみが PLP1 の発現を認めなかったため、B は患者と同様の病態を認めるクローンと判定できた。

(B). クローン B における BEX2 の発現確認

RT-PCR により GAPDH, BEX2, PLP1 の遺伝子発現を比較した。GAPDH は全てのクローンで発現している。PLP1 はクローン B のみで発現を確認できない。一方、BEX2 はクローン B でわずかに発現している。

(M; ϕ X174/HaeIII digests. N1; 201B7. N2; ChiPSC18.)

(図は文献1より引用)



2. iPS 細胞を用いた小児神経発達障害におけるシナプス解析法の確立

発達障害患者由来 iPS 細胞をアストロサイトと共培養しながら神経分化誘導させ、成熟ニューロンまで誘導することができた。正常コントロールと比較してシナプスの密度が低下していることを明らかにした。(論文投稿中)

¹ Yamamoto-Shimajima, Keiko, et al. Congenital Anomalies, 2020.

3.3.8 心臓細胞未分化性とクロマチン結合因子群 (竹内純)

心臓細胞未分化性とクロマチン結合因子群

竹内 純(東京医科歯科大学難治疾患研究所 准教授)

研究期間 2010年10月～2016年3月

展開している事業:

挑戦的研究(萌芽)、国際共同研究加速基金、基盤研究(B)等

さきがけの成果:

心臓幹・前駆細胞分化を制御する因子を同定し、直接心臓前駆細胞及び心筋誘導法の開発を目指した。先行研究において、心臓前駆細胞特異的に発現する遺伝子プロファイルから、クロマチンと結合する因子を5つ単離したが、本研究では、その中の1つである転写因子 Spalt-like(Sall1)が新規の心臓前駆細胞マーカーであることが明らかになった。Sall1由来の細胞は、既知の心臓前駆細胞因子 Islet1 や Mesp1 よりも広範囲の心臓を構成する細胞分化に関わっていることも細胞系譜解析により確認された。また、心臓再生においても Sall1 が早期マーカーとなることを見い出した。

発展:

1. 心臓細胞の分化に関連する long non-coding RNA の解析¹

心臓分化の制御機構の解析をさらに進め、マウスの心臓の分化に関与する転写因子(Tbx5)の調節機構を解析した。

その結果、Tbx5 遺伝子の近傍に位置する long non-coding RNA(lncRNA)が Tbx5 の発現を制御することにより、心臓の分化を調節していることを明らかにした。この lncRNA(Tbx5ua)をノックダウンすると、心臓の分化が正常に行われなかったことも確認された(図1)。

心臓の発達に関与する多くの遺伝子、特に転写因子の遺伝子が、近傍のゲノム領域に由来するスプライシングされた lncRNA に関連していることが示された。

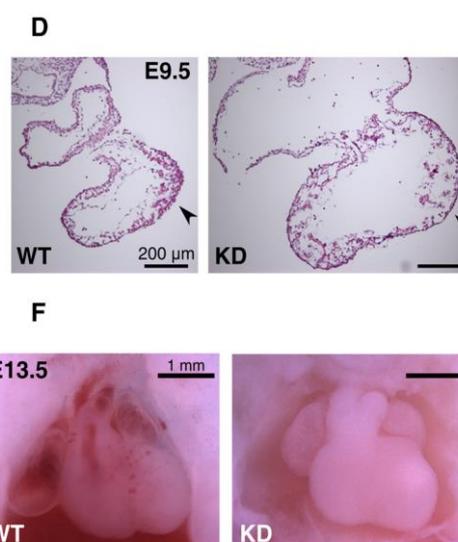


図1. Tbx5ua のノックダウンによる心臓形成異常¹
Tbx5ua をノックダウンしたマウス(KD)は正常型(WT)とは異なり、心臓の発達に異常が観察される。

¹Hori Y. et al. BMC Genomics. 2018 Dec 27;19(1):967

3.4 JST-CIRM 共同研究プログラム

3.4.1 微小環境がヒト iPS 細胞及び胎児由来神経幹細胞の分化・腫瘍化に及ぼす影響 (中村雅也)

微小環境がヒト iPS 細胞及び胎児由来神経幹細胞の分化・腫瘍化に及ぼす影響

中村雅也(慶應義塾大学医学部整形外科 教授)
研究期間 2010 年 10 月～2013 年 9 月

展開している事業:

慢性の痛み解明研究事業、再生医療実用化研究事業(3 件)、研究成果最適展開支援プログラム(A-STEP)、革新的医療技術創出拠点プロジェクト、戦略的創造研究推進事業、基盤研究(B)(3 件)

JST-CIRM の成果:

本研究は、幹細胞を利用した損傷脊髄の再生治療に向けてその課題点の研究が行われ、損傷脊髄に対するヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植後の生存、分化、造腫瘍性を損傷脊髄内の炎症性微小環境(外的因子)と移植細胞の特性(内的因子)に着目して検討した。iPS 細胞由来神経幹細胞に関する造腫瘍性は、外的因子よりもむしろ内的因子が大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。一方、ヒト ES 細胞及び iPS 細胞由来神経幹細胞の移植後の生存、移動、分化はむしろ外的因子(損傷脊髄内の微小環境)による影響が大きなことが明らかとなった。



発展:

1. マーモセット損傷脊髄内の微小環境解析と細胞移植の至適時期の検討^{1,2}(詳細は 2.4)

2. 移植治療用神経幹細胞の造腫瘍性評価系としての脳移植の検討^{1,3}

免疫不全動物の脳と脊髄への治療用神経幹細胞移植を行い、造腫瘍性評価系としての有用性を検討。移植直後の細胞生着率は低いが、移植細胞の髄外伸展は脳移植群のみで認めた。移植細胞の分化傾向は両群で同等。増殖度の高い細胞の特徴が脳移植群の組織において顕著であり、造腫瘍性の評価系として脳移植の有用性が示された。

3. 次世代シーケンサーを用いた脊髄損傷に対するヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植の安全性の検討^{1,4}

2 つのヒト iPS 細胞株を神経幹細胞に分化誘導し、免疫不全マウス損傷脊髄内に移植し、有効性と安全性を検討した。造腫瘍性を有する 253G1-NS 移植後には OCT4 の再活性化が顕著であり、腫瘍形成の一因と考えられた。また、Wnt/ β -catenin シグナルによって促進される上皮間葉転換が移植細胞の浸潤や細胞外基質の蓄積を促進している可能性が示唆された。これらの知見をもとに、臨床応用に向けて移植細胞の安全性をスクリーニングする手法を確立していくため、マーカー候補分子を探索中。

4. 有効かつ安全なヒト iPS 細胞由来神経幹細胞の条件の解明^{1,5}

ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞の腫瘍化のメカニズム解明のため、DNA メチル化と腫瘍/非腫瘍細胞の遺伝子発現プロファイリングを比較。細胞株による治療効果の相違と腫瘍化の原因を解明し、至適な iPSC-NSC 株の条件を明らかにした。腫瘍化の原因は、①iPS 細胞の不十分なリプログラミング②iPS 細胞樹立時に混入した SNV に起因した分化抵抗性による変異の易獲得性であった。さらに iPSC-NSC の Dll1-Notch 陽性細胞混入率が有効性に寄与していることが示唆された。この結果は、臨床現場での hiPSC-NS / PC の安全性を評価するための適切なプロトコルの設計の際に役立つ。

特記事項

- 大日本住友製薬との共同研究を行い、臨床応用に向けた iPS 細胞由来神経前駆細胞の分化誘導法を確立^{6,7}。
- iPS 細胞を用いた創薬と再生医療を目指すベンチャー企業 K-Pharma を設立。

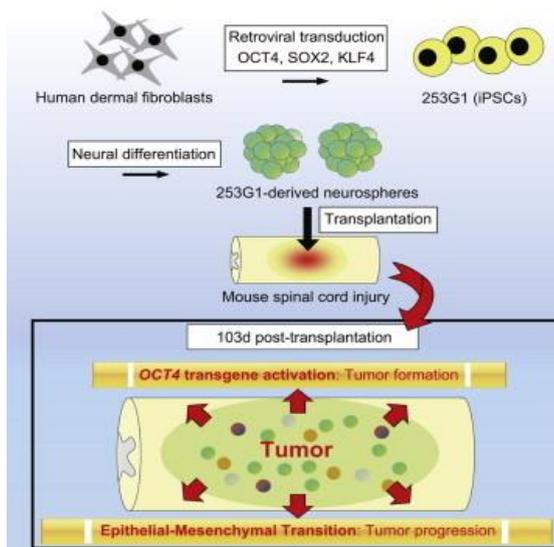


図 1. 発展 2 の研究イメージ図³

¹ 戦略的創造研究推進事業 JST-CIRM 共同研究プログラム 研究課題 研究終了報告書 ² Nishimura, Soraya, et al. Experimental Neurology 261, 2014, pp. 171-9. ³ Sugai, Keiko, et al., Molecular Brain 9, no. 85, 2016. ⁴ Nori, Satoshi, et al., Stem Cell Reports. 4, 2015, pp. 360-73. ⁵ Iida, Tsuyoshi, et al., Stem Cells 35, 2017, pp.1316-1327. ⁶ Isoda, Miho, et al., Neuroscience research, 2016, 110: 18-28. ⁷ Kamata, Yasuhiro et al., Stem Cells Translational Medicine, 2020.