

## 研究課題別中間評価結果

1. 研究課題名：遺伝子・細胞操作を駆使したヒトES/iPS細胞利用基礎基盤技術の開発

2. プロジェクトマネージャー：斎藤 幸一（住友化学株式会社生物環境科学研究所  
細胞科学グループマネージャー）

### 3. 研究概要

理研等の日本の研究者により先鞭をつけられ、国際的にも圧倒的な優位性を持つ網膜色素上皮等の眼組織細胞の分化誘導技術に注目し、理研と住友化学で実用化したヒトES/iPS細胞の高効率 knock-in/knock-out 技術等のシーズ技術を活用して、レポーター遺伝子を組み込んだヒトES/iPS細胞を作製し、ヒトES/iPS細胞の維持培養技術やヒトES/iPS細胞由来の眼組織細胞の供給技術を実用化させるとともに未分化維持用の完全合成培地および高度な細胞品質管理技術（マスターセルバンク化や品質管理、運搬など細胞供給・管理技術）を開発する。これらの技術は医薬品等の開発における薬効・毒性評価に必須な技術であるとともに再生医療にも応用可能である。本提案では網膜等を用いた再生医療の臨床応用への技術提供をするとともに、医薬品等の開発のための眼組織細胞の販売や細胞分化誘導キット等の開発を目指す。

### 4. 評価結果

#### （1）研究の進捗状況及び成果の現状

網膜色素上皮細胞等の眼組織細胞を安定供給するためには、分化・分離条件等を高度に最適化しなければならない。分化誘導の最適化や効率上昇に関しては、細胞外マトリクスを利用することが重要である。また、これらに関する条件検討を効率的に進めるためには、簡便に条件検討を行うための評価用組換え細胞が必須である。評価用組換え細胞としては、内在性遺伝子の発現状態を反映してマーカー遺伝子を発現させることが可能な Knock-in 細胞が最適であるが、従来、ヒト多能性幹細胞の Knock-in 細胞作製は非常に困難であった。しかしながら、Rock 阻害剤を用いた細胞操作技術や Zn finger nuclease を用いて確立した高効率 Knock-in 細胞作製技術を用いることで、評価対象となる分化細胞で特異的にレポーター遺伝子が発現する Knock-in ES/iPS 細胞を作製することが可能である。この細胞を利用し、分化条件や分離に適した分化段階などについて検討し、各条件の最適化を目指すとともに、上記の分化誘導最適化・効率化を行うために細胞外マトリクスの分析を行った。

その結果、蛍光強度が改善された Rx ノックイン細胞を取得し、蛍光を指標として、分化誘導の効率的な条件検討が可能となった。さらに、実際に網膜前駆細胞を高純度で単離することが簡便に行うことができるようになった。また、GFP 陽性細胞から網膜色素上皮細胞が出現することを見出し、品質管理においても活用が可能である。その他、網膜色素上皮細胞の足場となる基底膜の主要構成分子がラミニン-521 であることを特定するなど眼組織細胞の分化・分離条件検討に関してほぼ計画通り研究を遂行している。

網膜色素上皮研究では、単一細胞へ分散後 FACS により濃縮された細胞は Rx の遺伝子発現が維持されず、その後の成熟した網膜細胞への分化効率が大きく低下することがわかり、細胞の分散は網膜前駆細胞の成熟に悪影響を与えることを示唆しており、上皮構造を保持したまま網膜前駆細胞を効率よく成熟させる方法などの検討を進めており、それらの結果が待たれる。

分化した網膜色素上皮細胞の凍結法及び、凍結解凍後の細胞の品質管理に関しては、予定通り進捗しているが、分化培養を行うための合成培地化が未だ不十分である。そこで解決策として、現状のレベルで分化誘導可能な少量の RPE 細胞やその前駆細胞等を用いて、保存時期や保存条件、保存液などの検討を進めている。

ヒト多能性幹細胞を安全・均一・高品質に大量培養を可能とする技術開発を行うためには、不明成分を含まない培地が必要となる。また、様々な培養条件の検討においては、結果が簡便・高

感度・定量的に得られる試験系開発が望まれる。未分化状態のモニタリングに使用出来るようマーカー遺伝子を NANOG プロモーター下に挿入したヒト ES 細胞株を用いた系は確立されていないが、新たに作製した Knock-in 細胞はヒト ES 細胞の未分化状態のモニタリングに非常に有益であると期待される。培地の完全合成化をすすめ、試作した培養液を用いて培養試験を行い、未分化性維持に優れた性能を示すものを選定、さらなる改良につなげる必要があるが、これらの成果は最終目標とする培養システム開発の基盤となるものであり、ステージⅡにおいての製品開発につながるものと期待され、本年度末までにステージⅠの目標をおおむね達成できると考えられる。

培養液の性能検定のために数回の継代を要するため、これに多くの時間・労力を要するという問題がある。このため効率良く性能の検定を行う上でも、精度の良いモニタリングシステムの構築が重要になる。また、合成系培養液を用いると多くの場合、細胞が継代操作などでダメージを受けやすくなるため、継代方法も培養液の組成に応じて最適化が必要である。そこで、継代時に用いる解離溶液や解離方法についても並行して検討が必要であると考えている。

このように本研究課題では、さまざまな研究開発の芽や優れた知見が得られている。

しかしながら、せっかく開発した貴重な材料等を S-イノベの他のプロジェクトへ提供していくという積極的な姿勢が希薄である。個人研究の延長として研究が行われているように思われる。これについては審査に関わった全員が共通して持つ懸念である。次期があるとすれば、この点の改善が最も必要である。

## (2) 今後の研究に向けて

再生医療など臨床応用を見据えた網膜色素上皮細胞に関する研究開発は、高橋チームを始め、世界的に複数の機関・企業で進められている。ヒト ES/iPS 細胞の培養技術の進展は目覚ましいものがある（米国の ACT 社が、ES 由来の RPE 細胞治療について臨床研究や英国の Intercytex 社の RPE 製造法など）。本研究グループにおける開発展開は、眼組織を中心とした iPS/ES 細胞関連技術の開発であり、高橋らの臨床応用、特に臨床応用の一般化（薬事法治験など）に際して、これに資する細胞供給・管理技術インフラをも提供できる可能性がある。また、高橋らが進める臨床応用グレードの管理技術（iPS 樹立法を含む）だけでなく、今後、医薬品等の開発における薬効・毒性試験への有効活用は市場の拡大も見込まれ価値の高いものと考えている。

## (3) 総合評価

ノックイン細胞作製、眼組織細胞の分化、保存、未分化維持関連技術開発に関しては、ほぼ当初の計画通り研究成果が創出されている。しかし、この成果を少なくとも S-イノベプロジェクト内の他の研究グループへ供与するという積極性に欠けるように思う。以上の結果から、総合評価を B とする。