

研究成果展開事業

－戦略的イノベーション創出推進プログラム－

(S-イノベ)

研究開発テーマ

「iPSを核とする細胞を用いた医療産業の構築」

研究開発テーマ中間評価用資料

平成24年10月12日

1. 研究開発テーマ

「iPSを核とする細胞を用いた医療産業の構築」(平成21年度採択)

iPS細胞研究は2006年に京都大学 山中教授によって示された「遺伝子を導入するだけで分化細胞を多能性の細胞へとリプログラムできる」という画期的な発見をきっかけに、さまざまな医学分野に急速に拡大している医学領域全体を指します。ただ、このような大きな変化が発見後わずか3年で世界中に広がっていることから、なかなか将来をしっかりと見据えて、この発見がもたらす可能性を社会に還元しようとする取り組みが進んでいません。本事業は幸い、最長10年の研究開発期間が計画されていることから、最新のiPS細胞研究に基づきながら、この技術に期待が集まる再生医療や医薬品開発を支える新しい医療産業基盤の構築を目標としています。

重要課題を段階的に実現していく中で、産業基盤を醸成することを目指します。具体的課題の最も重要なものは再生医療への応用です。わが国で開発されたiPS細胞技術を用いた世界初の臨床研究の実現が可能な競争力のある分野を選択し、この臨床研究から一般医療へと転換する中で、日本では不可能とされている再生医療を可能にする企業群を育成したいと考えます。安全なヒトiPS細胞由来移植細胞の作製、評価・検証、細胞移植手術などにかかわる技術・ツール・装置などの開発および細胞移植治療の臨床試験プロトコルの作成とそれに基づく臨床研究、そしてそれを支える産業の振興までを含みます。具体的な治療対象としては、iPS細胞の最大の課題である発がんの懸念を少しでも軽減し、早期の臨床研究を実現するために、移植細胞の数が10の4乗個程度以下で済み、かつ移植細胞の安全性について1細胞レベルで評価可能な疾患を対象とします。細胞治療の一般化を目指すプロジェクトと並行して、iPS利用分野として期待が集まる医薬品開発分野についてもプロジェクトを設定します。現在多くの製薬企業が使用している輸入ヒト細胞と同等以上の品質を有するiPS細胞由来ヒト細胞の作製、大量増殖、細胞機能の検証などにかかわる技術・ツール・装置などの開発およびiPS細胞由来ヒト細胞を用いたアッセイキットの開発やヒト化動物の開発までを含みます。なかでも、いかにして正常細胞の大量培養を実現するかは最重要課題と考えています。

本研究開発テーマが終了した時点で以下の事が実現する事を目指します。

- ・ iPS細胞を用いる細胞移植医療を普及するための再生医療支援企業群が、新たな産業の中核企業としてビジネス展開している。
- ・ 多くの製薬企業でヒトiPS細胞由来機能細胞を用いた医薬品開発が行われており、ヒトiPS細胞由来機能細胞の供給を可能とする医薬品開発支援企業群が、新たな産業の中核企業としてビジネス展開している。

2. プログラムオフィサー（PO）

西川伸一（理研発生再生科学総合研究センター 副センター長）

3. 採択課題

採択年度	プロジェクト マネージャー	中間評価時 所属・役職	研究課題
平成 21年度	高橋政代	先端医療振興財団 先端 医療センター研究所 視 覚再生研究グループ グ ループリーダー	「細胞移植による網膜機能再生」 世界初の i P S 細胞技術による再生医学を実現する
	斎藤 幸一	住友化学株式会社 生物 環境科学研究所 分子生 物グループ グループマ ネージャー	「遺伝子・細胞操作を駆使したヒトES/iPS細胞利用基盤技術の開発」 有用な多能性幹細胞の調整、培養法の開発などを通して高橋班の臨床 研究を支援する。
	谷口 英樹	横浜市立大学 大学院医 学研究科 教授	「i P S 細胞由来ヒト肝幹細胞ライブラリーの構築によるファーマコセ ロミクス基盤技術開発 」 将来の細胞バンクなどを展望して i P S 細胞技術のスケールアップ に道筋をつける
	紀ノ岡 正博	大阪大学 大学院工学研 究科生命先端工学専攻 教授	「網膜細胞移植医療に用いるヒト i P S 細胞から移植細胞への分化誘導 に係わる工程および品質管理技術の開発」 細胞調整のための様々な工学的技術の開発

4. 研究開発テーマのねらい（目標）

戦略的イノベーション創出推進事業の目的は、アカデミアのシーズを我が国の産業の発展へとシームレスに導くために、産学のチームを形成し戦略的なプランの下、それを実現することです。10年という長期にわたってプロジェクトの継続が計画されていることから、常にイノベーションを生み出しながら、もう一方で常に具体的な成果を市場へと提供していくことが要求される大変困難なプロジェクトです。しかも、再生医学というまだよちよち歩きの分野に飛び込んできた、磨く前から神々しい光を放つiPS細胞を、臨床や産業の場へ運ぶために磨きなおすという作業は途方もなく困難です。実際、この分野のこれまでの研究は、臨床への可能性を語りながらも、結局基礎研究段階からなかなか抜け出すことが出来ませんでした。iPS細胞というそれ自体の理解のためにまだまだ研究が必要な対象であることを考えると、それも仕方ないことと理解されました。しかし、iPS細胞は生命科学領野の専門用語を超えて、再生医学領域の象徴として、一般の方々の期待を集めています。むしろiPS細胞に寄せる一般の期待は、その意義を最も理解しやすい細胞治療への応用です。従ってiPS細胞の重要性を示すためには、iPS細胞を利用する治療を誰もが受けられる医療として完成させることに明確なゴールを置いたプロジェクトが求められています。この認識から、本プロジェクトは最も実現に近いiPS細胞利用を促進し、それを核に産業医療に必要な課題を探りながら裾野を広げる事を目標にしています。iPS細胞は再生医学にとどまらず、創薬や疾患メカニズムの解明など様々な医学医療分野にイノベーションをもたらすことが可能な技術です。しかし我が国では、その報告以来、拒絶反応のない細胞移植を実現する再生医学のブレークスルーとして期待が最も大きい事は明らかですから、このプロジェクトの最も重要な目標を、iPS細胞の再生医療利用を阻む問題を解決し、first in manを実現し、iPS細胞が確かに再生医療に利用できる事を証明する事におきました。実際、iPS細胞を利用する産業の裾野を広げるにも、その技術が実際に医療で利用できる事を示さない限り前進はありません。

計画時に想定したステージ第I期終了時の到達点としては、

- 1) iPS細胞を用いた細胞治療に必要な技術が開発され、臨床研究申請が可能になっている。
- 2) 選んだ細胞治療についてそれを普及するための産業化を可能にする材料、技術が生まれている。
- 3) 更に広い範囲で細胞治療を可能にするために克服すべき問題が明らかになり、その克服への開発着手の準備を行う。

5. 研究課題の選考について

i P S細胞の臨床応用が可能である事をまず示すという目的から、このプロジェクトの核には当然技術の開発だけではなく、臨床応用への明確な道筋を有する研究グループを選ぶという方針で臨みました。具体的には、国民・企業目線に立って何を科学者に望むかをリストし、困難であってもそれを可能にするためにチャレンジする参加者を求めることにしました。再生医療を受ける側の国民、また i P S細胞を利用する企業が何を最も望んでいるかを調べたうえで、それをもう一度科学者目線へとまとめなおし、プログラムオフィサー（P O）がどのような研究を望んでいるかを明確に示しました。すなわち、i P S細胞由来細胞を使った再生医療の企業主体の臨床治験の実現と（国民目線）、i P S細胞由来細胞の大量培養技術の完成とそれをを用いた毒性試験細胞パック（企業目線）の提供を実現すべき柱として明確に示し、そのためのプロジェクトを公募しました。

再生医療実現については困難も予想され、これほど要求の多いプロジェクトには応募がないのではないかと危惧しましたが、ふたを開けてみると再生医療へのチャレンジを提案しているプロジェクトが6題、i P S細胞の大量培養技術と毒性試験用細胞の提供にやはり6題、またこれらを側面からサポートするための技術開発プロジェクトに13題の応募がありました。

再生医学については、網膜細胞、心筋細胞、NK T細胞、軟骨細胞などをi P S細胞から誘導して臨床研究を行うという提案がありました。それぞれ我が国のトップ研究者からの提案で、研究レベルで見ると全て採択したいというのが正直な感想でした。しかし、助成額が限られていることから、あれもこれもというわけにはいかず、一件に絞らざるを得ませんでした。P Oを除く評価者全員（P Oは規定で最終投票に加わらない）が高橋・畠具グループの網膜細胞についてのプロジェクトを推しました。それぞれが世界レベルの提案の中から高橋・畠グループの提案が選ばれた背景には、1）高橋P Mが研究の傍ら臨床医として網膜色素変性症などの特殊外来を続けていること、2）臨床研究に至る基礎技術が完成していること、3）ステージI / IIから大規模治験まで対象疾患選択を含む詳細なプロトコルが示されていること、そして4）細胞の製品化に成功し、それを治療に提供してきた企業との共同提案であることが評価されたためといえます。実際、ステージ第I期を終わり振り返ってみると、

- 1) 計画されている臨床研究に必要な細胞シートは1 mmx2mm ぐらいの極めて小さなサイズで、細胞数にして1-10万個と通常の研究で普通に扱われている細胞数で治療ができる。
- 2) 移植する細胞は色素を発現しており、分化度や未熟細胞の混入を防ぐことが出来る。

- 3) 移植した細胞シートの異常を単一細胞レベルで検出できる検査方法が確立しており、異常がおこった場合でも早期診断が可能である。
- 4) 腫瘍発生に至ったとしても、早期発見し、治療する方法が確立している。

など予想通りfirst in manへの障害をほとんど解決するところまで至りました。この結果、計画通り第I期終了時に臨床研究申請が可能なところまで研究が進展したと言えます。

次に毒性などのスクリーニングを目的とした大量細胞の培養・調整技術の開発についての応募は、基本的には肝細胞を誘導してスクリーニング用に提供するという提案が全てでした。実際には、ヒトiPS細胞自体の大量培養、肝細胞の誘導などはまだ研究段階であるため、どうしても研究に軸足を置いた提案が中心になっていました。この分野のトップの研究者の多くにプロジェクトを提案していただいたため、レベルは大変高い印象でした。結局、やはりほとんどの評価者が一致して谷口・安達グループの提案に投票しましたが、研究レベルの優劣というより事業化のための構想の説得力でこの差がついたといえます。実際、谷口・安達グループの提案では、iPS細胞と胎児肝幹細胞を細胞のソースとして並行して利用することにより、最初から製品化と研究という矛盾する課題に回答を示した点で評価されたと考えます。

上記の2本柱に必要な技術や材料の開発についても今回応募を受け付けました。実際、多くの技術系のグループがこの分野に応募していただき、やはり評価者のほぼ全員が一致して紀ノ岡・阿部のプロジェクトを採択しました。技術系の研究者は実際にはiPS細胞の作製のような複雑な細胞培養過程についての経験がないため、どうしても自分の研究と技術の優位性を押し売りする傾向がありますが、紀ノ岡・阿部のプロジェクトはプロジェクトで必要とする技術についてしっかりとした構想を練り上げていた点が評価されました。特記すべきは、採択されなかったプロジェクトの中にも多くの技術が隠れていたことでした。そのため、新たなメンバーを紀ノ岡班へ編入させる事も行いました。採択された紀ノ岡・阿部班に限らず、実際に技術系提案には、機器開発に標準として使用する細胞などについての知識は乏しいように思えました。このため、この部分を補う意味で、末盛・斎藤のプロジェクトも今回採択しました。このプロジェクトで特記すべきは、ヒトES細胞、iPS細胞に遺伝子ノックアウトやノックインを行う高効率の技術を完成させている点で、これらの細胞はプロジェクト全体が利用する標準細胞として大きな価値を生むと思われました。また、同じ技術を高橋・畠グループや谷口・安達グループのプロジェクトに利用することで研究の大幅なスピードアップが期待されました。事実、斎藤PMのプロジェクトから高橋PMのプロジェクトが利用する新しい網膜色素上皮細胞作製法が生まれています。

以上、S-イノベ各課題の中でも最も多い25題という応募が当プロジェクトに寄せられました。これまで日本はともするとiPS細胞というブレークスルーを達成しながら、その後の戦いで劣勢に立っているのではないかと、という懸念がありました。それを払拭してくれたことは今回の最も大きな収穫でした。論文になっていなくても、まだまだ地道な研究が続けられ、また多くの有用な技術が集積していることを本当に実感しました。

6. アドバイザーの構成について

アドバイザー名	現在の所属	役職	任期
秋元 浩	知的財産戦略ネットワーク(株)	代表取締役社長	平成21年6月～平成23年3月
牛島 俊和	国立がん研究センター	上席副所長 エピゲノム解析分野長	平成21年6月～平成23年3月
片倉 健男	国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部スーパー特区対応部門	特任研究員	平成21年6月～平成23年3月
白橋 光臣	iPSアカデミアジャパン(株)	ライセンス部長	平成21年6月～平成23年3月
西原 達郎	元アスビオファーマ(株)	元顧問	平成21年6月～平成23年3月
大和 雅之	東京女子医科大学先端生命医科学研究所	教授	平成21年6月～平成23年3月
渡邊 すみ子	東京大学医科学研究所	特任教授	平成21年6月～平成23年3月

秋元氏はiPS細胞関連の知財の利用の専門家。牛島氏はエピジェネティクスについての日本の第一人者。片倉氏は再生医療に必要な材料の開発についての経験が豊富で、また細胞治療のレギュラトリーサイエンスについての造詣が深い。白橋氏は、iPSアカデミアジャパンにおける知財の責任者で、高橋PMと山中教授の橋渡しを期待している。西原氏は、ES細胞を用いた大量培養については、日本で最も豊富な経験を持ち、またES/iPS細胞を企業として長年利用して来た経験を持つ。大和氏は再生医療に必要な材

料開発では日本の若手第一人者であり、渡辺氏は、網膜細胞発生の日本の第一人者である。

7. 研究開発テーマのマネジメントについて

iPS細胞がマウスで報告されたのが2006年、ヒトでもiPS細胞の誘導が可能である事が示されたのが2007年である。それから3年で本プロジェクトはiPS細胞応用の促進を目指して発足したことになる。一般的な科学的発見とその応用の時間関係から考えると、iPS細胞がいかに前例のない発見であるとはいえ、あまりにも短期間で応用を目指したS-イノベがスタートした事になる。従って、iPS細胞を直接扱って来たメンバーと、従来の再生医療における経験を豊富に有しているメンバー同士の密接な協力関係を確立する事に注力した。例えば、高橋PMの課題グループ（以下「班」という）については実験室レベルでの技術は既に完成していると考え、日本初の再生医療製品を上市したJ-TECをパートナーとして招いて、iPS細胞樹立から網膜色素上皮細胞シートの作成に至る過程を、実際の応用過程に適用する手順書として仕上げるための支援をお願いした。これはイノベーションというにはほど遠いルーティン作業に見えるかも知れないが、このパートナーシップのおかげで、実際2012年 first in man の臨床研究を申請出来るところまで進展している。同じように、斎藤班、谷口班は、細胞の商品化や培地の開発などの応用を目指すメンバーと、ES/iPS細胞を直接利用するメンバーの両方が参加し協力し合う体制を最初から取る事が出来た。また、斎藤班は新しい網膜色素細胞誘導法の開発に成功し、期待した通り次世代の網膜再生医療技術を高橋班に提供することで、班を超えた連携を実現した。一方、紀ノ岡班は技術開発を目指すメンバーが大半で、間葉系の幹細胞の培養ぐらいは経験していても、iPS細胞や網膜細胞など複雑な処理が必要な細胞培養の経験のあるメンバーはほとんど皆無であった。そのため、ES細胞培養のスペシャリスト古江-楠田に参加してもらい、技術を専門とするメンバーのiPS細胞理解促進を図った。以上がプロジェクト発足時の運営方針である。

ステージI（以下「第I期」という）では、全体の進捗報告を1年に1回、アドバイザーも参加する全体会議で行った。アドバイザーとメンバーが全員集るためのスケジュール調整に苦勞して、実際には2回開催する事が精一杯であった。勿論、各班の連携をはかる目的のためには、この回数では極めて不十分であった事は間違いがない。この問題を解決する目的で、各班の進捗管理と評価についてはP0が出来る限り各班会議に参加し（平均年3回ぐらい）、アドバイスと評価を行った。評価にあたっては担当のJST技術参事と相談しながら、最後はP0の責任と判断で行い、さらに、必要に応じて開発計画の見直しを行った。順調に計画が進んだ高橋、斎藤班については3年間見直しの必要

は感じなかったが、例えば、谷口班では質量分析による細胞の品質評価法の開発部分の縮小など見直しをお願いした。

既に述べたように、最初のステージでは、iPS細胞が再生医療に利用できるという first in man を示す事が最も重要な課題で、これが達成しないと iPS細胞利用の裾野を広げる事は出来ないと考えた。従って、第I期は高橋班に資源やマネージメントを集中した。しかし、first in man が達成されると、網膜再生は一方で実際の臨床研究、臨床治験へと進み、他方では一般医療を目指しての技術開発へと進む。従って、first in man が実現したあともスムーズにプロジェクトが次の段階に進めるよう、第I期の間に iPS細胞の臨床応用や産業化にとって克服すべき課題をできるだけ明らかにし、第II期からは first in man から一般診療や更なる iPS細胞利用拡大を目指して第I期で明らかになった課題に集中して新しいイノベーションを目指した。第III期には、新しく生まれたイノベーションを核にして iPS細胞の医療分野を爆発的に広げるという全体計画を念頭に各課題の指導を行った。

第I期は高橋班の課題支援に特に注力したため、最終的には課題間、特に高橋班、谷口班などの細胞を開発する班と、紀ノ岡班のように機器開発を行う班と連携がうまく進まなかった。連携の不足を少しでも補う目的で、PO自身が各班の個別会議に出席して、当該分野の新しい研究成果などを、各班のメンバーに常にインプットした。さらに、トロントで開かれた国際幹細胞会議を利用して紀ノ岡班のメンバーと合宿を行い、学会で見聞きした情報について解説や議論を行うなど、技術分野の研究者が幹細胞研究のトレンドを熟知するよう尽力した。

繰り返しになるが、高橋班は技術開発より、実際の臨床に向けたプロトコル作成の準備など、この分野の経験豊富な J-TEC との連携がうまく進むように指導を行った。加えて進捗管理のために知財に詳しい人材を配し、計画通りにプロジェクトが進むとともに、将来一般診療へと拡大する際に予想される問題を整理した。

斎藤班については網膜再生のための新しい技術開発と網膜再生技術の産業利用を念頭に課題の指導を行った。幸いこの分野の基礎研究で世界をリードする笹井から技術移転が進み、予想以上の進捗が得られ、指導はほとんど必要なかった。

谷口班については、班内の課題間の連携という面で最初から問題を感じており、谷口という肝細胞培養のトップエキスパートを中心に各メンバーがその要望に応じつつ研究が進むよう体制を変革するよう指導した。特に、質量分析システムによる細胞品質テストにあまりにも重点を置いていたので、これを縮小するよう一貫して指導した。また、企業パートナーである積水メディカルとの関係についても、表面的な共同研究から、谷口の研究から生まれる肝細胞を、企業の目で評価をする深い連携に発展するよう

指導した。ヒト肝細胞移植ラットの作成などは本来の目的にそぐわないとこのプロジェクトから外すよう指導した。

紀ノ岡班では、先ず i P S 細胞培養に必要と考えられる、いわば裾野技術に関わる研究者を広く集めてスタートし、それを一つの技術の開発へと統合するという計画の下研究が行われた。ただ、3年では個別の技術が一つの大きな技術として統合されるというところまでは達しなかった。また、ヒト ES 細胞培養の第一人者楠田-古江の参加を仰ぎ、各グループが i P S 細胞そのものについて一定の経験を積めるよう指導した。最終段階で、ようやく高橋班との連携が進み、網膜色素上皮細胞自動培養装置のプロトタイプが完成した。さらに、この班で開発された培養網膜色素上皮細胞の評価技術も利用が始まり、臨床での評価が始まった。

以上、第 I 期では i P S 細胞による網膜再生医療の実現に集中的に取り組むことで、i P S 細胞という超弩級イノベーションが、更にイノベーションの連鎖を生むための準備を行った時期と言える。幸いこの目標は達成され、臨床研究自体は文科省の再生医療の実現化ハイウェイプロジェクトへと移行できた。従って、第 II 期からは第 I 期で明らかになった最も重要な課題についてそれぞれが連携というより完全に一体となって取り組む体制をとり、スタートしたところである。

8. 研究開発テーマとしての産業創出の核となる技術の確立に向けた状況

課題ごとの成果

(1) 高橋班

S-イノベスタート時点で、霊長類 ES 細胞から網膜色素上皮細胞を分化誘導し、純化して網膜色素上皮細胞障害モデルラットに移植して機能させること、さらにヒト i P S 細胞からも網膜色素上皮細胞を分化誘導することに成功していた。S-イノベでは人工膜を使わないで移植可能な細胞シートを開発し、すべての工程、試薬を臨床応用できるレベルのものに置き換え、SOP を作成して臨床研究準備が達成された。

網膜色素上皮細胞のシート化技術が計画より 1 年以上早期に実現したことから、計画よりも早いペースで順調に研究を遂行することができた。また計画を前倒しして移植用デバイスの開発に着手、その成果を参画機関の共同出願として保護し、試作用ハンドピースを用いた動物移植実験を実施することができた。

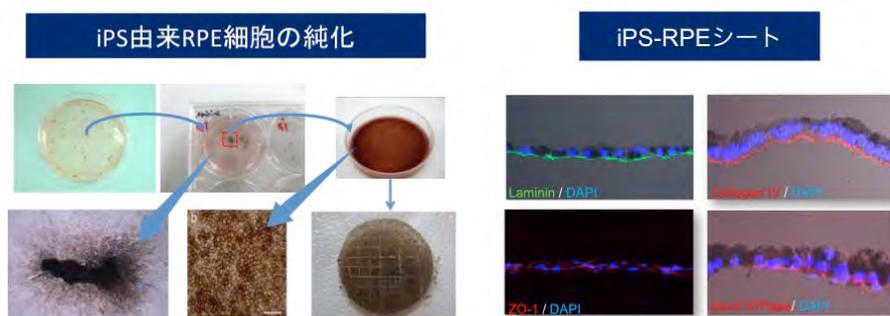


図1 完成した網膜シート作成 SOP: 右図に示す iPS 細胞から網膜色素上皮を誘導するための SOP は完成した。作成された色素細胞上皮シートは、免疫染色データから成熟した機能的な細胞と結論できる。

さらに、視細胞移植の材料となる視細胞の培養の大幅な進展 (S-イノベの笹井らによる 3D カルチャー、すなわち網膜全体の構造を試験管内で作成する技術の開発) に応じて、移植細胞機能検出の検討などを行うための研究準備に着手でき、当初計画していたよりも順調に研究が進み、概ね予定通りの研究成果を得ることができた。

以上のように、技術が早期に全て完成したので、班一丸となって実際の臨床研究へ向けた準備に入った。培養プロトコルのブラッシュアップ、CPC (細胞プロセッシングセンター) での細胞調整のための文書作成・施設運用等、アカデミアと企業の密接な連携により、J-TEC のノウハウをアカデミアの臨床研究現場の要請にすり合わせる作業が加速され成し遂げられた。

日本にとどまらず世界初の iPS 細胞を用いた網膜再生医療の準備が整い、この点では完全に計画は達成された。これについては、本プロジェクトの中間評価委員会でも高く評価されている。また、更に効率の良い次世代培養法が開発され知財も確保できているため、数例の臨床研究を経た後、治験へと進む事で一般的な治療法として普及を目指す。ただ、臨床研究実施後、その後の治験を直接支援することは、助成の性格上 S-イノベでは困難である。従って、高橋班は臨床研究と治験を直接支援するための再生医療の実現化ハイウェイ事業へと移行させた。このように高橋班は S-イノベから離れることとなったが、本年 10 月倫理委員会を経てヒト幹細胞移植委員会へ申請する予定を可能にしたのは、S-イノベの支援による事は間違いない。順調に進めば、first in man が来年早々には実現することとなり、iPS 細胞の再生医療利用はスタートラインに立つ。

では、first in man が成功することで、再生医療の大きな産業化の波は到来するのだろうか？ 現時点ではまだ iPS 細胞を用いた網膜再生医療は臨床研究の段階で、次のハードルは一般診療として発展できるかである。このためには企業主体の臨床治験へ

と進む必要がある。高橋班ではすでに治験も視野に入れて計画が進められており、臨床研究が成功すればそのまま治験へと拡大するよう準備が進んでいる。では再生医療自体はどれほど大きな産業へと発展できる可能性をもっているだろうか。長期的視野に立てば、変性疾患の根治は失われた細胞を置き換える以外に方法はない。事実、細胞が失われる慢性疾患は数が多く、現在の方法では治療が困難な病気が数多くある。例えば高橋班が対象として選んだ加齢黄斑変性症に限っても、久山町スタディによれば 0.7%が罹患率であり、もしこれら全ての患者が再生医学の対象になるとすると、当然かなりの経済効果が予想できる。

加えて、高橋班は加齢黄斑変性症治療に限らず、iPS細胞を用いる世界初の再生医療である点で、それに続く全てのiPS細胞の再生医療への応用にとっての first in manとしての使命を有している。iPS細胞の可能性は認めるものの、安全性などまだまだ臨床応用には早いという意見は今も多い。だからこそ、何重もの安全性が既に確保できている網膜治療をさきがけとしてiPS細胞が実際の臨床に安全に利用できることを示す事の意義は大きい。この意味で、iPS細胞を生んだ我が国の悲願とも言うべきiPS細胞の再生医学への利用を戦略的に支援したS-Iノベの貢献は非常に大きなものであると確信している。

(2) 斎藤班

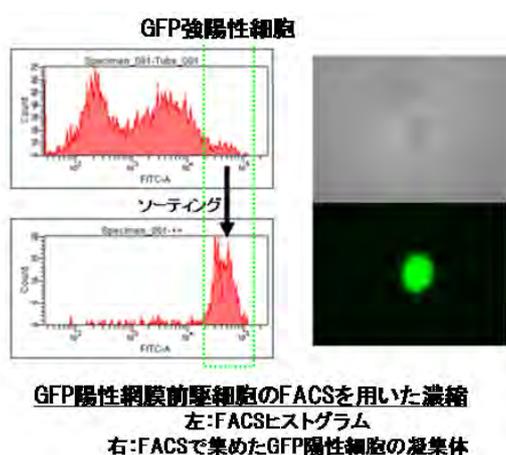


図2 : FACS を用いた GFP 陽性網膜前駆細胞の純化

斎藤班では次世代の網膜色素上皮細胞培養法開発とその事業化が主要な課題である。ヒトES細胞材料の開発、網膜色素上皮細胞(RPE)等の眼組織細胞を安定供給するためには、分化・分離条件等の高度な最適化が必要となるが、このためのツールとして網膜前駆細胞マーカーRxのRx::GFPノックインヒトES細胞を作製した。このマーカーを指標にセルソーターを用いた

網膜前駆細胞の純化を試み、実際に純化が可能であることを示した(図2)。

次に、笹井によって開発が進んでいた ES 細胞から立体網膜組織を高効率に分化誘導

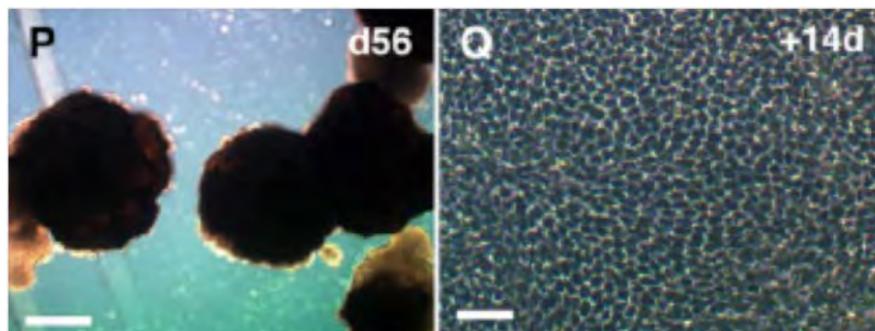


図3 右図は iPS 細胞から試験管内で作成した網膜立体組織。左図はこの立体組織から分離した網膜色素上皮細胞シート

する技術（先述の 3D カルチャー）を利用して、RPE を高効率に作製する方法を検討した。その結果、作製した立体網膜組織を Wnt や ActivinA などが存在する条件で培養することにより、RPE を効率よく作製できた（図 3）。これは次世代の網膜色素上皮細胞調整法として現在高橋班へ技術移転が進んでいる。効率から考えると、

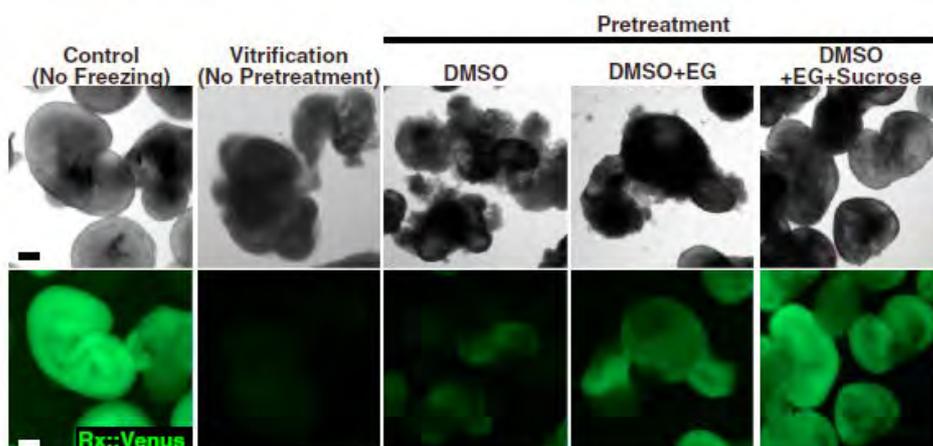


図4 iPS 細胞から誘導した立体網膜組織を構造を保ったまま凍結するための条件設定を行い、至適条件を決定した。

これまでの方法のコストを大きく下げる効果があり、再生医療の普及に貢献すると期待される。現在この方法は高橋班に技術移転されつつある。次に、独自に開発した網膜組織の利用を再生医療以外に拡大する目的で、薬剤の光毒性試験への利用の可能性を探った。RPE は再生医療のみならず、医薬品等の化学物質の安全性、薬効研究に利用可能である。そこで、RPE を用いた光毒性評価に着目した。光毒性とは生体内に取り込まれた化学物質に光が当たることで増強されて発現する毒性であり、主要標的組織は眼及び皮膚である。光毒性試験は医薬品・化粧品開発において必須な試験であり、近年、欧州の農薬登録においても試験が必要となっている。したがって、今後、光毒性の検出は様々

な化学物質の開発において重要になると思われる。同じロットの組織を商業的に提供するためには、組織を凍結して輸送する必要がある。そこで先ず立体網膜組織を凍結保存する技術を（図4）開発し、誘導した立体網膜組織を凍結保存し、必要に応じて解凍し、RPE を作製する一連の基本技術を確立した。

現在、培養細胞を用いた光毒性試験としてマウス線維芽細胞を用いた試験が OECD ガイドライン試験として登録されている。しかし、この試験は偽陽性が多いため、偽陽性の少ない試験の開発が世界的に望まれている。本プロジェクトで開発した RPE の産業利用の一つとして、独自に RPE を用いた光毒性試験について検討し、従来の方法と比べたときの優位性を確認しつつある。仏化粧品会社により開発された培養皮膚組織を用いた毒性検査システムは今や動物実験に代わる材料として世界中で使われるようになっており、今回開発した網膜組織も我が国発の全く新しい毒性試験ツールとして産業化を計っていく必要がある。

これらの経験から、ノックインヒト ES 細胞の重要性が培養法の開発に極めて有用であることが明らかになった。そのため、ES/iPS 細胞維持培養法を開発を目的に Nanog ノックイン ES 細胞を樹立し、多能性幹細胞の培地条件、大量培養条件の検討に使い始めた。同様に、網膜色素上皮細胞誘導に使った培養条件を少し変えるだけで角膜上皮細胞の大量調整が可能であることも示すことがわかって来たので、角膜上皮細胞のマーカーである Cx12 ノックインヒト ES 細胞についても作製を行い、本細胞を用いて、角膜上皮細胞の分化誘導技術開発、誘導された角膜細胞の品質確認、保存や大量調製法などを検討し、網膜細胞と角膜細胞がセットになった標準毒性試験確立を目指している。以上、1)再生医療として高橋班のプロジェクトのための次世代技術を提供出来たこと、2)同じプラットフォームを光毒性試験へと展開させ、我が国発の標準化テストへの扉を開いたこと、3)将来の iPS 細胞利用に向けたノックインツールの開発を行ったこと。これらは今後 iPS 細胞-イノベーションから 2 次、3 次のイノベーションの連鎖を引き起こすための鍵になると期待している。特に第Ⅱ期のプロジェクトにとってこの意味は大きい。

（3）谷口班

P0として谷口班に期待した事は、谷口が専門の肝臓をモデルにして肝細胞の大量培養系を確立し、パートナーの積水メディカルと共同で、創薬現場の薬効や毒性検査に提供できるようにする事であった。

まず、ヒト iPS 細胞の株間および由来する組織間における肝細胞系列への分化誘導条件の検討を行った。異なるヒト組織（皮膚・血液・肝細胞）から樹立した10種類以上の

iPS細胞株の肝細胞への分化誘導効率を比較検討し、肝細胞系列への高い分化能を有するヒトiPS細胞株TkDA3-4を選別した。この細胞株を用いてヒトiPS細胞から肝細胞系列への分化誘導法を、既存の方法を元に改変し、TkDA3-4の分化誘導に適したActivin処理日数、成熟肝細胞の誘導におけるサイトカインの組み合わせ（HGF+OSM）を検討した新たな分化誘導プロトコルを完成させた。その結果、誘導した成熟肝細胞様細胞(MH-like)においてアミノ酸代謝酵素、糖代謝酵素、アンモニア代謝酵素の発現上昇が確認された。次に成熟肝細胞に特徴的なトランスポーターによる取り込み能および排出能をindocyanine green (ICG)を用い検証した。未成熟肝臓系細胞(IH-like)、成熟肝細胞様細胞(MH-like)ともにICGの取り込み能を有する事が明らかとなった。一方、ICG排出能は成熟肝細胞様細胞(MH-like)のみが有していた。これらのことから、ヒトiPS細胞から成熟肝細胞が分化誘導されていることが明らかとなった。

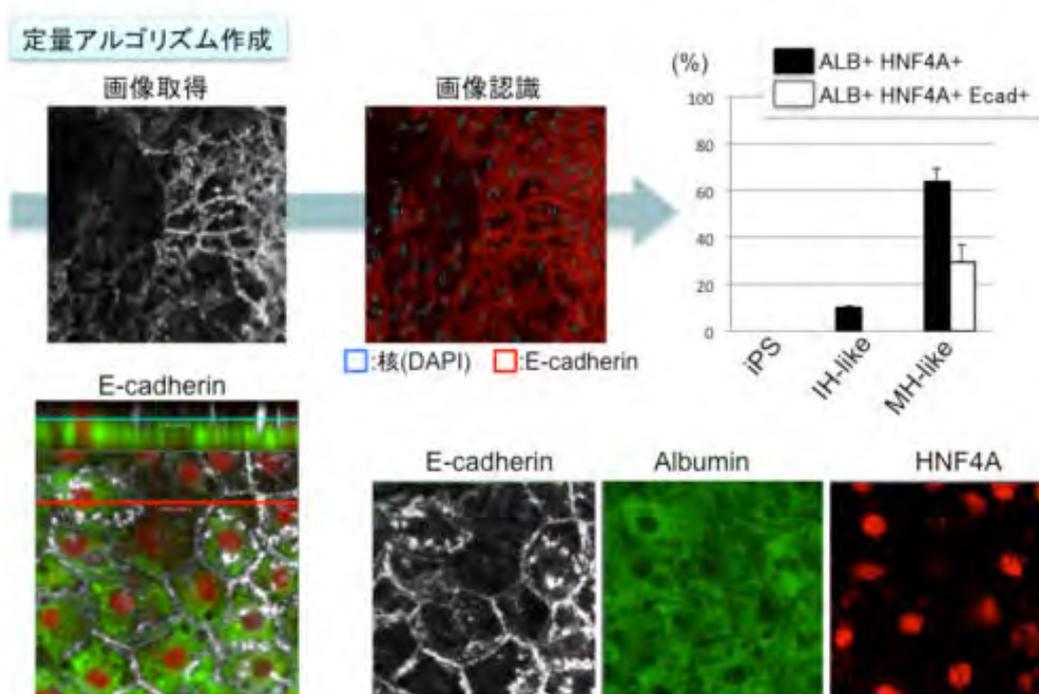


図5 Eカドヘリンを利用した細胞分化度の自動判定システムの開発: Eカドヘリン染色により細胞輪郭を明確化し、細胞の分化度を視覚的に判定するアルゴリズムを開発した。このシステムは、今後自動的に細胞のクオリティーを判別する方法へと発展できる。この方法で調べると、試験管内で分化させた肝細胞がまだ未熟である事が明らかになった。

しかしながら、より分化レベルが高いと考えられる立方上皮化した肝細胞の割合をEカドヘリンを指標に検討したところ成熟肝細胞の割合は低く、薬剤評価の利用に耐えられる細胞の大量創出は困難であった(図5)。また、新しい質量分析法を用いた肝臓特異的蛋白の発現や、DNAアレー等の検討からも、成熟肝臓の分子マーカーを発現しているとはいえ、発現量などを詳細に見ていくと、完全な成熟に至っていない事も明らかになっ

た。このようにして開発した方法については、ヒト化動物の作成へと発展させ、動物内でヒト肝細胞を用いた薬剤検定が出来ないか現在検討中である。いずれにせよ、さらに、我々が今回利用した方法も含めて、平面培養系によって、大量のヒト i P S 細胞由来肝細胞を得るには莫大なコストを要する事が明らかになった。

以上の反省から、第 I 期終盤に安価に大量の細胞を得ることのできる効率的な分化誘導法をこれまでとは異なる視点から検討した。第 I 期の研究で、クラレとの共同研究として 3 次元培養に適した培養ディッシュを検討してきたが、この結果 3 次元化した細胞集塊が肝細胞の成熟マーカーを発現している事を明らかにしていた。そこで、従来の平面培養系においては器官発生過程で生じる細胞間相互作用や立体的空間配置が欠如していることから、器官発生過程を精緻に再現することの可能な 3 次元培養系の開発が必須であると考えた。そこで、我々は器官発生で生じる複数の異なった未分化細胞による細胞間相互作用の再現というアプローチにより、i P S 細胞を用いた 3 次元的なヒト臓器の再構築技術の開発を実施した。また 3 次元システムは、増殖因子等を組織内で調達し合える可能性がある系で、増殖因子を用いない安価な大量培養を実現するための重要な方向性である事は間違いない。

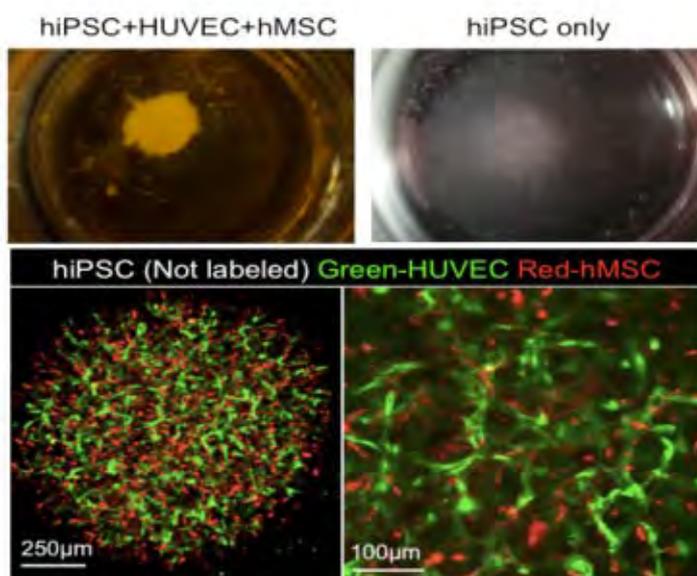


図 6 i P S 細胞を血管内皮細胞株、間葉系幹細胞株と混合培養する方法を開発し、成熟肝細胞が効率に誘導できる事を示した。この 3 次元培養法の開発により、第 II 期の増殖因子の必要がない培養方法の開発と言う大きなチャレンジが可能となった。

基本的には第 II 期で実施を計画していたプロジェクトであるが、一定の成果が出たので、第 I 期の成果としても報告する事にした。生体内における肝発生過程においては、運命決定を終えた肝臓内胚葉細胞に対し、未分化血管内皮細胞および間葉系細胞との相

相互作用が立体的な肝芽形成に必須である。そこで、これらの肝発生初期プロセスの再現を目的として、ヒト i P S 細胞由来肝臓細胞とヒト血管内皮細胞およびヒト間葉系幹細胞との共培養系の開発を実施した。

ヒト i P S 細胞から分化誘導したヒト肝臓細胞に対し、ヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell: HUVEC) ヒト間葉系幹細胞 (human Mesenchymal Stem Cells; hMSCs) を加え、特殊条件下で共培養を実施したところ、ダイナミックな細胞の空間的再配置が誘導され自律的な組織化が生じることが明らかとなった (図 6)。

構造体の分化段階を理解する目的で定量PCRおよびマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、未分化マーカーである NANOG や chemokine receptor cxcr4 の発現の減弱が確認されるとともに、アルブミンなど肝臓初期分化マーカーの発現が劇的に上昇することが示された。網羅的遺伝子発現解析の結果、28週齢のヒト胎児肝臓の前段階に相当する発生段階に相当する i P S 細胞由来のヒト肝原基が創出されていることが示唆された。

さらに、免疫不全マウスへの移植実験を実施し、ヒト i P S 細胞由来肝原基様構造体のさらなる分化誘導を試みた。移植片における細胞動態を生きのまま経時追跡するため、独自に確立してきたクラニアルウインドウ法による移植モデルを用いた。クラニアルウインドウ法とは、免疫不全マウスの頭蓋骨を取り除いて作製した観察窓(クラニアルウインドウ)下、脳表面上へ移植する方法で、ホストマウスの血流を有する長期間安定した血管ネットワークの再構築が可能な技術である (Nature: 428, 138-139, 2004)。移植60日目には、ホストマウスの血清中にヒトアルブミンタンパク質の分泌が確認された。さらに、ヒト型代謝を検出可能な薬物であるケトプロフェンの代謝試験を実施したところ、ヒト特異的な薬物代謝産物が検出された。移植したヒト i P S 細胞由来肝原基様構造体が成熟化したヒト肝組織において、メタボローム解析により肝臓特異的な多数の代謝物質が検出され、また、電子顕微鏡による解析により特徴的な微細構造を有することが明らかとなった。このようにヒト血管構造を有する機能的なヒト肝臓組織に分化・成熟することのできるヒト i P S 細胞由来肝原基様構造体を創出するための革新的な三次元培養系のプロトタイプを第 I 期で完成させる事が出来た。

多能性幹細胞の発見以降、様々な分化因子の組み合わせによって、様々な機能細胞の創出が試みられてきたが、十分な分化誘導は達成されていなかった。今回、新規三次元培養技術に必要な細胞校正を突き止める事が出来た事は、安価な大量培養系のための一つのハードルをクリアできたものと考えている。

(4) 紀ノ岡班



図7チップ型培養装置の開発:上図がチップ型培養装置の全体像。左上に実際の細胞培養を行うチップ。このチップにて、約4週間、細胞を成熟させる。その際、本装置にて、培地交換、細胞観察を自動的に実施する。特に、容器内の細胞のほぼすべてを観察(下図)、画像解析することで、細胞の成熟過程を評価する。将来自己細胞を用いる網膜色素上皮培養の自動化のプロトタイプになり、本培養器の開発を通じて、網膜色素上皮細胞の製造に関する多くのノウハウを獲得できた。

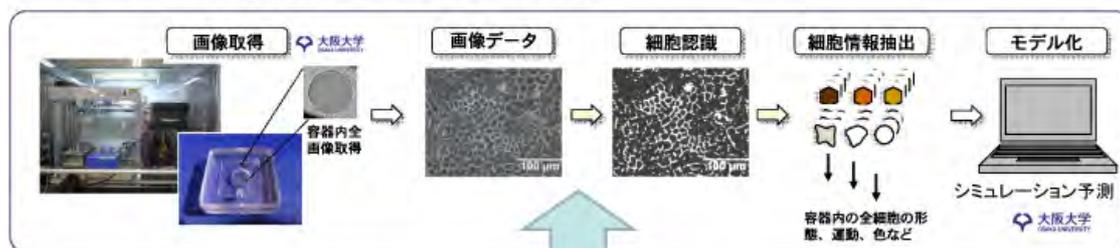
も併せて行った。

装置内での細胞観察は、既存の顕微鏡を使用することができないため、LED照明の光源の照射角度が重要となる。そこで、1点からの証明ではなく、4点からの逐次点灯により、より鮮明な細胞画像を取得することができた。本技術は、網膜色素上皮細胞にとどまらず、培養装置内の細胞観察における画質向上につながる汎用技術として期待される。

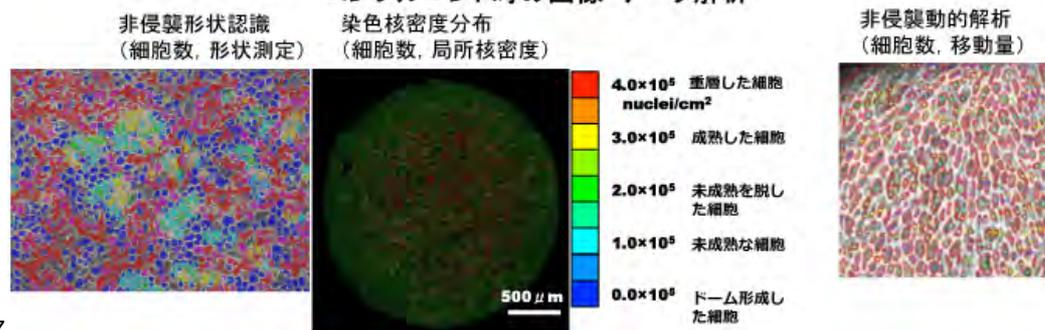
P0として紀ノ岡班には、網膜再生治療に必要な質の高い網膜色素上皮細胞安全性判別および培養の自動化のための技術開発をお願いした。以下に第I期の成果を要約する。実際の臨床に必要な網膜色素上皮細胞シートは数ミリ平方と極めて小さい。従って、個別化ミニ培養と品質バリデーションのモデルを目指して開発を行った。プライマリーな目標として、網膜色素上皮細胞の成熟過程に対するチップ型培養装置(図7)の開発を目指した。直径2.5mmの培養チップ内での長期(培養期間>35 day)かつ全細胞観察可能な培養システムを構築し、網膜色素上皮細胞の成熟工程(色素沈着)を実現した。本培養システムでは、培地の冷蔵・冷凍・解凍・混合機能を敷設することで、少量の培地交換(50 mL)を可能とし、長期培養を可能とした。また、チップ内に付着する全細胞の90%以上の視野を動的(20 min)かつ長期(35 day)に観察可能とした。現在は、チップの改善を行うことで、より視野を広げた観察(99%以上)にてほぼすべての細胞観察を目指している。チップ型培養装置の開発の過程で、チップ上の全細胞を観察するための至適照明法が未開発である事がわかり、培養チップ内の細胞観察に対する照明方法の確立

網膜色素上皮細胞培養では、培養中に細胞の質をバリデーションして、培養終了後即座に移植ができる事が理想である。そこで今回開発したチップ型培養装置の完全自動化を目指して細胞モニタリングの技術開発を行った。第一に、培養中の生きた細胞の動的挙動をモニターして細胞の質の評価を行う系の開発を進めた（培養チップ内の動的観察による細胞トラッキング手法）。動的画像を取得することで、コンフルエント培養時における細胞トラッキングを可能とし、各細胞の動的移動量ならびに細胞数を計測することができた。これにより、異常細胞の出現を早期に検出できる事が期待できる。現在、コンフルエント時に約80%の細胞をトラッキング、細胞数測定でき、今後、90%以上の精度を目指している。本技術はこれまで不可能であった混み合ったコロニー（たとえば、iPS細胞コロニーや角化細胞コロニー）へ展開することで汎用性の高い技術として期待される。第二の開発は、上述の培養チップ内で、非染色・非侵襲にてコンフルエント状態下での細胞数ならびに形状観察を行う技術の構築で、「コンフルエント時に細胞の状態を判定する広域成熟度判定システム」と呼んでいる機器である。本技術によ

ハード・ソフトの技術統合に自律システムの構築



コンフルエント時の画像・データ解析



Z

図8 自動培養装置と統合する画像、データ解析法の開発：iPS細胞、網膜色素上皮細胞をモデルとして、細胞の品質管理のための様々な画像解析システムを開発した。今回開発したものはチップ型培養装置と統合するためのものであるが、今後他の培養装置と組み合わせられる汎用性を有している。

り、容器全体での細胞密度、形状分布を定量的に評価できるだけでなく、位置的分布、容器内の空間的不均一性かつ質的不均一性を定量的評価でき、網膜色素上皮細胞の成熟

過程をモニターして最終的分化度を評価できる。最後にこうして得られる動的画像の解析方法の開発も併せて行った。

具体的には、種々の細胞の培養経過において、細胞特徴を表現する形状パラメータを無作為に取得した情報セットを用意し、パラメータの抽出、データ集計を行うことで、培養状況の推移を予測できるシステムを構築した。（動的画像パラメータを活用した細胞培養予測システムの構築）。本システムは、細胞製造における培養技師が日々細胞観察から感じるセンスを定量化しており、将来、自動培養、主導培養に関わらず工程管理ツールとして期待される。（図8に画像解析とチップ型培養装置の統合を示す）

以上のように、第I期において紀ノ岡班は要求される仕様が示されれば短期にそれに答える工学的技術を集めて機器開発へと進める実力を示した。完成したプロトタイプは、高橋班の手で開発された機器の有用性の検証が始まっている。

9. 最終目標の達成可能性

(1) プロジェクト全体としての達成度と目標

以上第一期の各班の成果を述べた。中間評価でも指摘されたように、各班の連携については問題があったが、P0から見た評価としては及第点以上の成果をあげたと思っている。特に、高橋班でiPS細胞を用いた再生医療のfirst in manがほぼ実現出来るところまで準備が進んだ事の意義は大きい。この技術が現実のものである事を一般に示し、一般医療へ利用が拡大するための扉を開いたと言える。また、斎藤班ではヒトES細胞より調整した網膜細胞を用いた世界初の光毒性テストを完成させ、創薬分野への我が国独自のツールを提供する準備が整った。これまで、国の支援で創薬分野に利用できるツール開発が行われ、心臓や肝臓細胞などそれぞれ成果として報告されている。しかし、我が国発の独自ツールは、結局、山中教授のiPS細胞そのもの以外には見あたらないという現状を考えると、網膜に焦点を絞った研究から、我が国独自の細胞誘導技術が開発され、更に我が国独自の創薬や化粧品開発ツールを開発できたという連鎖が生まれた点で大きな意味があると自負している。第I期の研究で技術として社会へ還元できたこれらの成果は、我々のプロジェクト独自のもので、競争力は極めて高い。

以上、パイオニアとしてiPS細胞の医療産業への利用をめざし第I期を終えたが、その間に我が国のiPS細胞研究への取り組みも大きく進展した。内閣が成長戦略として最近取りまとめられた医療イノベーションでは、iPS細胞の医療産業への利用の促進は重点施策となっている。また、昨年からは、文科省、厚労省、経産省の協力の下、再生医療の実現化ハイウェイがスタートして臨床研究を加速する支援が始まり、同じ協

力関係が再生医療のためのiPS細胞バンク構想や、薬剤の開発を目指した疾患iPS細胞プロジェクトへと拡大して来ている。これらの動きは、iPS細胞の利用を可能にする医療や産業の裾野を広げるべく、我が国も一段と力を入れたことを物語る。

むろん、国を挙げた取り組みが進み、多くのプロジェクトが始まることはこの分野の発展にとって大きな契機となるが、我々のプロジェクトが、S-イノベ開始後に新たに始まった、経産省ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発プロジェクト、文科省再生医療実現化のハイウェイプロジェクト、本年から始まる文科省疾患iPS細胞プロジェクトなど、iPS細胞の応用拡大を目指す多くのプロジェクトに混じって第Ⅱ、Ⅲ期とプロジェクトの最終目標を実現するためにはこれまで以上に明確な最終目標の設定が必要となった。

第Ⅰ期については、iPS細胞を用いた細胞治療のfirst in manの実現を最も重要な目的とし、網膜色素上皮細胞移植の準備を進めて来たが、臨床研究開始と言う課題については解決した。従って、第Ⅱ期からの研究を、これまで通り網膜色素上皮細胞移植に集中し、1000人に5人がかかるこの疾患の治療技術の開発を進め、比較的特殊な領域での医療や産業の裾野を拡大していくのか、本来iPS細胞が有しているポテンシャルをフルに発揮できるもっと広い再生医学全体に波及する裾野の構築を目指すかを選ぶ必要がある。むろん、加齢黄斑変性症でも患者数は多く、細胞を調整して提供するための多くの企業が生まれると考えるが、本プロジェクトでは網膜色素上皮細胞調整はあくまでも入り口として位置づけていたので、第Ⅱ期からはiPS細胞の利用全体の促進のために開発を行うという本来の目的に帰るべきではないかと考えた。従って、first in manを目指した高橋班の網膜再生プロジェクトは、再生医療実現化ハイウェイに完全に移行させ、S-イノベは疾患を問わずiPS細胞の利用拡大のためのイノベーションを目指すこととし、第Ⅱ期以降の目標を設定した。むろん、網膜細胞の分化誘導法とその作業手順書、立体培養、光毒性試験キット、チップ自動細胞培養装置などは第Ⅰ期の重要な成果であるため、それぞれが産業化のシーズとなるよう斎藤、紀ノ岡班の一部として継続する。特に、高橋班、斎藤班で第Ⅰ期に開発された網膜色素上皮細胞については、世界をリードする優位性の高い技術であり、高橋班の細胞治療が欧米を中心に全世界からの注目が集まっている。現段階では一人の総コストが1000万近くかかるが、早期に粒子線治療と同じレベルの300万円以下のコストを目指す。これが実現すると、保険収載も可能になる。病気自体は高齢化とともに増加し、全ての先進国で深刻な問題であり、疾患頻度も0.5%と比較的多いので、その10分の1が治療対象となったとしても大きな経済効果がある。また、繰り返すがES細胞由来網膜細胞を用いる光毒性テストは世界初であり、創薬のみならず化粧品開発で必須のテストとなると考えており、こ

の技術単体で10億円以上の経済効果を持つと考えている。以上のように、第Ⅰ期で開発した技術のみでも大きな経済効果を持つと予想されるので、第Ⅱ期でも特に産業化については一定の支援を続けたいと考えている。

その上で、網膜再生医療を第Ⅱ期の中心課題から外し、iPS細胞を用いた細胞治療が、慢性疾患の根治のための重要な手段として確立し、人の体の代わりになる細胞として利用が進む際に考えられる障害を除くことを主眼とする以下の3点を新たな最終ゴールとして設定し直した。

第Ⅱ期からのゴール

- 1) 自立性（増殖因子不要）細胞培養法の開発。（谷口班）
- 2) 化合物を用いた目的細胞純化法の開発（斎藤班）
- 3) 新陳代謝型培養機器の開発（紀ノ岡班）

「ティッシュエンジニアリング関連市場の最新動向と将来性2012」（富士経済）によれば本年度のiPS細胞関連の医療や産業への利用は、高々1-2億円ぐらいと試算されている。即ち、医療や産業への本格的な利用はまだまだという段階である。一方、iPS細胞研究のために開発された様々な試薬や機器類の産業規模は全世界でみて既に100億円は超しているのではと考えている（個人的試算）。これは、iPS細胞の将来におけるポテンシャルを買われていても、今産業化する事は困難である事を示している。この原因は様々あると思うが、安全性などの問題については高橋班のプロジェクトでfirst in manが進めば解決していこう。しかし、iPS細胞の持っているポテンシャルをフルに生かすためには、多くの解決すべき問題がある。特に培養にかかるコストは再生医療全体の進展を阻んでいる最も重要な課題と言える。

iPS細胞は極めて萌芽的段階ではあるが、前述の富士経済資料によれば2013年における国内のティッシュエンジニアリング関連市場全体は551.6億円と予測している。国民医療費全体を30兆円とすると、全体の1%にも満たない。しかし、再生医療の将来を慢性疾患の根治と考えれば、時間はかかっても、現在他の手段で行われている医療を置き換えていくポテンシャルを持っている。例えば我が国のペースメーカー埋め込み患者数は40万人を超える。もし、ペースメーカー細胞を再建できれば、機械式のペースメーカーの需要は全くなくなる事になる。実際、世界のペースメーカーの8割を抑えるメドトロニクスが最も力を入れる研究方向がバイオペースメーカーについての研究だ。このように見ていくと、原理的には全ての変性疾患は再生医学の対象になることは間違いがない。更に、iPS細胞は創薬や疾患メカニズムの研究にも大きなポテンシ

ルがあると期待されている。というのも、ヒトの細胞、特に病気の患者さんからの組織細胞の利用にはこれまで大きな困難が伴っていた。しかし、iPS細胞の登場でこの制限はほぼなくなり、今後試験管内であれば正常から疾患iPS細胞まで駆使して創薬や疾患研究が可能になり、その結果創薬が世に送り出される事も促進されると期待される。とすると、慢性疾患の根治を目指す再生医療に加えて、iPS細胞技術が医学のキーテクノロジーとして発展する事は明らかで、長期的視野で見たときiPS細胞が及ぼす経済効果は、簡単な試算の及ばない想像を絶する物になると考えられる。当然、高齢化を迎える我が国で開発や利用が他国にさきがけて進むよう支援をする必要がある。実際、中国・インドといったそれぞれ10億人を超す人口を抱える国も同じように経済発展し、高齢化する中で、慢性疾患の根治が重要な課題になる事を考えると、我が国でこの分野の独自技術が開発されると、その経済効果は将来大きく拡大すると考えている。

従って、これからの10年、iPS細胞研究にとって最も重要な事は、利用拡大を阻んでいる複雑な培養プロセスの問題点を解決する事に他ならない。なかでも第Ⅱ期から取り組む培養コストの画期的削減という目標は最も重要な課題と確信できる。

(2) 増殖因子の添加を必要としない自立性細胞培養法の開発の設定趣旨と実現可能性 (谷口班)

我が国では細胞培養のイノベーションはともすれば培養機器の自動化と同義語であり、国の助成事業にもしばしば取り上げられて来たが、残念ながら世界をリードする新しいアイデアの培養機器を生み出すには至っていない。一方、細胞培養に欠かす事が出来ない培地、器具の開発についてはさらに悲劇的狀態であり、iPS細胞維持のための特殊培地を提供する一部の企業を除いて、ほとんどの企業がこの分野から撤退しているというのが現状である。従って、中途半端なイノベーションをいくら積み重ねても世界をリードする技術が生まれるとは期待できない。出来る事をやるというのではなく、細胞培養の医療応用にとって本当に必要とされるイノベーションは何かを知り、困難であってもその解決を図ることこそ真のイノベーションに求められている。では細胞培養にとって克服すべき課題は何か？ 第Ⅰ期を経験した全てのS-イノベメンバーの意見が一致したのは細胞の調整にかかるコストの削減こそが最重要課題であると言う点であった。

第Ⅰ期で実現した網膜色素上皮細胞は必要な細胞数が10万個以下と極めて少数であり、分化細胞と未熟細胞の区別も容易であることから、一定の症例数さえ確保されれば、治療にかかるコストは数百万円程度と考えられる。また更なるコスト削減をすすめて保険収載も可能な一般治療へと発展させるにもそれほど大きなイノベーションは必

要ない。一方、例えば i P S 細胞から肝臓を誘導し利用することを考えると、ヒトの肝臓に相当する 10^{11} の肝細胞を調整するためには、約 4 ~ 6 億円のコストがかかると試算される。これは生体肝移植にかかる費用と比べるとほぼ 40 倍のコストであり、また我が国の創薬分野で購入利用されるヒト肝細胞の総額 5 億円とほぼ同等の額である事を考えると、極めて非現実的な額になる。加えて、治療用の i P S 細胞バンクを整備して組織適合性のある i P S 細胞を大量に調整するとなると、更にここでも途方もないコストが発生する。従って、このような細胞を利用する治療が成立するためには、培養にかかるコストを 1/100 どころか 1/1000 にまで削減できる技術の開発が必要である。

では、細胞培養のコストを劇的に削減するために何が必要か？ i P S 細胞維持から分化誘導の全課程で増殖因子や分化因子がコストの主要部分を占めることを考えると、増殖因子の使用を極力抑えた培養が必要になる。どの増殖因子を減らせるかなど勿論検討は可能であるが、この際思い切って増殖因子を必要としない究極の培養法は可能かを課題として設定することにした。この目標は一見非現実的に見えるが、様々な細胞成分を混在させる事で増殖因子の必要をなくした培養系は数多く開発されて来ている。ES 細胞の Embryoid body 培養法や、血液のストローマ細胞培養法などは、増殖因子の必要ない培養の好例と言える。実際、谷口班は第 I 期の研究の中で既に成熟肝細胞誘導に必要な細胞のセットを 3 次元細胞塊として維持する技術を開発して来た。この培養ではまだ増殖分化因子の添加が必要だが、我々の体を考えると目的細胞の増殖を支持するために必要な細胞セットが最初から存在すれば、外から増殖因子を加えることなく自立的に組織が形成出来ることが期待できる。実際、新たにメンバーに加えた慶応大学・佐藤は、腸管幹細胞とパネット細胞の 2 種類の細胞が一個ずつ存在すれば、腸の上皮組織を再構築できることを示し、自立型細胞培養の道を開いた世界の第一人者だ。以上の理由から、谷口、佐藤、そして薬剤スクリーニング用の細胞を日本で提供している積水メディカルが連携して、究極の培養ともいえるチャレンジを行う。これまで培養法の開発と言うとほとんど無血清培地の開発、様々な増殖分化因子の開発が中心になっていた。その意味では、今回のプロジェクトは増殖因子を全く用いない培養法と言う全く異なる方向からのチャレンジであり、成功すれば画期的な方法として他の技術を凌駕することは間違いない。もちろん、先に述べたように決して荒唐無稽ではなく、谷口の肝細胞の培養法は一定の可能性を示唆しており、様々な課題を克服して第 II 期の研究で基本技術を完成させたい。これが実現すると、培養コストは大幅に削減できることから、多くの企業がこの分野に参入することは間違いがない。実際、現在ほとんどの製薬企業が、これまで遠巻きに眺めていた抗体薬に続々参入していることからわかる。更に、自立性培養に必要な原理的側面について知財を確保して、今後、肝臓や i P S 細胞以外の培養にまで権

利が拡大できるよう努力する。谷口は既に新しい肝臓組織の立体培養のプロトタイプを完成させており、また佐藤は腸管上皮組織の試験管内再構成を世界にさきがけて可能にした研究者である事から、このチームは高い技術的優位を確保していると期待できる。また、積水メディカルは培養肝細胞を創薬企業に提供するパイオニアとして企業活動を行っており、生まれてくる技術の企業化への体制は完全であると考えている。

(3) 化合物を用いた目的細胞純化法の開発 (齋藤班)

谷口班では内胚葉系列の培養のトップ研究者が、これまで誰もチャレンジしたことのない方向の培養法開発に挑む。ただ、増殖因子の必要ない自立性培養は、細胞治療に必須の重要な要件である移植細胞の純度を犠牲にせざるを得ない。即ち、増殖因子を必要としない培養では必然的に細胞の増殖を支え合う構築が必要で、多様な細胞が混在してしまう。従って、谷口班の計画は、幾種類かの細胞の中から目的の細胞を純化する方法の開発とセットになって初めて意味を持つ。現在この目的にFACSやMACSなど様々な細胞純化技術が開発されているが、利用する抗体など大きなコストがかかり、また扱える細胞数にも限界が存在している。従って、いくら増殖因子を必要としない培養法が開発されても、結局、コスト削減につながらないと言う矛盾に陥る。この問題の解決として、遺伝子導入を使って目的の細胞のみが生き残る選択方法も開発されている。しかし、遺伝子導入を行った細胞を使う事には安全性の面で治療を受ける患者さんの抵抗が大きい。

この問題を解決するために考えられるもう一つの方法が、細胞系列特異的な細胞毒を用いる方法で、目的の細胞を維持したまま他の細胞を完全に殺せるような化合物を発見できれば、細胞の純化のコストを劇的に削減できるはずである。この考えに基づき、齋藤班では、第Ⅱ期以降の目標を細胞系列特異的な細胞毒の開発に絞った。幸い、齋藤PMの母体である住友化学は大日本住友製薬と連携しており膨大な化合物ライブラリーが使用可能である。通常化合物ライブラリーは、薬効がある分子を見つける目的でスクリーニングを行うために準備され、スクリーニング途中で毒性のあるものは排除される。即ち、これまでの様々な細胞を用いた化合物ライブラリーのスクリーニングで細胞毒性を示した全ての化合物が、今回は逆に有用な物質として利用できる。勿論、これまで蓄積して来たiPS細胞培養や分化培養の経験から現在すぐに利用できる様々な細胞を直接用いたスクリーニングも行い、目的にあった化合物を突き止めたい。最初は、未熟ES/iPS細胞、成熟肝細胞、網膜色素上皮細胞それぞれの純化を可能にする化学化合物をスクリーニングする予定である。

体内に投与する実際の薬剤と比べ、今回のスクリーニングで得られる化合物は、アドメット(体内動態)や複雑な副作用について懸念する必要がなく、特定の細胞を残して他の細胞のみを除去できる毒性を試験管内でのみ発揮できればよい。また、斎藤自身も既に網膜全構造をiPS細胞から誘導する経験を有しており、これを用いた化合物の毒性テストの経験もある。加えて、ヒトES/iPS細胞培養の我が国の第一人者である末盛がパートナーとして、全能細胞を増殖因子なしに培養する混合細胞開発を目指しつつ、細胞を斎藤のスクリーニングに提供し、未熟細胞のみを純化する化合物探索に協力する。最後に、肝臓については、既に谷口によって開発された混合培養細胞塊を斎藤に提供してスクリーニングを行う。

スクリーニングを進める上で最も問題になるのが、細胞の純化をモニターするためのマーカーである。この点でも、斎藤班の技術的優位性は高い。すなわち、第I期の研究で各細胞特異的に発現する遺伝子に標的遺伝子をノックインしたES細胞を準備しており、また今後も必要に応じてノックインを進めていける技術力を養って来ている。また、肝臓についても谷口らは特異的表面分子をモニターする方法を確立しており、目的の細胞を残して他の細胞を殺せるかどうかをスクリーニングできる体制は整っている。

このように、谷口・斎藤各班は全く別のプロジェクトを行うように見えるが、実際には谷口班と斎藤班の両方が成功して初めて大量培養のコスト削減が可能になる一体化した構造になっている。国内外を問わず、この方向で培養コストの削減を図るプロジェクトは皆無で、成功裏には画期的コスト削減をもたらす高い競争力を有する培養法になる。この結果、大量の細胞の調整が必要な様々な細胞治療を一般医療として提供が可能になる。同時に、細胞バンクや化合物スクリーニング用のiPS細胞の利用拡大を促す核になる技術として発展すると考えている。

最後に、第I期で斎藤班は全網膜組織および網膜色素上皮細胞を用いた光毒性テストを開発した。これは他に類を見ない我が国独自の技術であり、創薬、化粧品企業など世界的に広く利用される事が期待できる。従って、第II期でも引き続きこの技術の産業化に取り組むとともに、更に新しい網膜組織誘導法の開発も行う。

(4) 新陳代謝型培養装置の開発 (紀ノ岡班)

谷口、斎藤各班の課題は、細胞培養と純化の方法にこれまでなかった新しいイノベーションをもたらす事である。この2班と協力し、紀ノ岡班は開発された培養がさらに低コストで自動的に行われる培養器機の開発を目指す。第I期終了後、全班が集まって議論を重ねた結果、培養系全体が独立した新陳代謝系として、栄養と排泄が独立して自動的に行える培養機器の開発を課題として設定した。現在ほぼ全ての培養では、細胞の維

持に必要な全ての成分を有する培地を用意し、使用した培地と交換することで栄養補給と排泄を行っていた。即ち栄養補給と排泄が独立していない。一方、我々の体を考えると、栄養の補給と排泄が独立して行われることで、無駄がおこらない。従って、我々の体に近い、栄養と排泄が独立した自立培養システムを実現すれば必要成分のみ補充するだけでいい低コスト培養法が実現することになる。これまで、自動化培養器がこのような発想で開発されたことはほとんどなかった。これは、機器設計の専門家がどうしても最新の培養方法を熟知することが困難であり、本当のニーズが完全に伝わらなかったこと、また排泄の問題は培地や細胞についての精緻な成分分析が必要となり、敷居が高かったこと、そして最後に排泄物の除去を特異的かつ自動的に行う技術の開発が困難であることに起因する。幸い、紀ノ岡班は大阪大学と島津製作所の共同研究チームであり、島津製作所は質量分析を頂点としてその分析技術は極めて高いレベルにある。この優位性を活かし、ES細胞の大量培養系を可能にする新陳代謝型培養器機の開発を目指す。すべての点について解決のための目処がたっている状態ではないが、斎藤班に我が国ES細胞培養の第一人者末盛を擁し、第Ⅰ期の研究でES細胞の未熟度を検定するための分子マーカーを組み込んだ（NanogへのGFPノックイン）細胞が利用できるという優位性を活かし、1年目は細胞培養によりどのような変化が培地や培養全体に生じるか丹念に調べることから始めて行く。第Ⅱ期で全ての問題が解決するかどうかは保証できないが、全班挙げての協力があれば紀ノ岡班にはこの技術課題を解決する実力があり、最終的な実現可能性は高い。このような機器を世界初で開発できれば、iPS細胞培養にとどまらず、大量培養を必要とするすべ機器を置き換えると考えている。

計画が成功し画期的な新陳代謝型培養装置のプロトタイプが完成すれば、島津製作所はこの分野で長い経験を有しているので、企業化への体制は既に整っている。しかし、開発自体についての技術的優位性については現段階で明確な確信はない。様々なモジュールの設計についての紀ノ岡の経験と、多くの研究者との連携、また島津製作所のメタボロームなどの分析能力は優位性のあるポイントと考えている。また、既に世界レベルにある谷口班、斎藤班の協力が得られる事も優位性を与える要因と考えている。ただ、これまで試みられた事のないチャレンジである事を考えると、紀ノ岡班の優位性を正確に評価する事は、本当は困難であると感じている。

この全く新しい方向と平行して、第Ⅰ期で開発したチップ型自動培養装置については、網膜再生医療に更に使いやすいものへと改良を加え、上市するための準備を進める。

まとめ

第Ⅰ期の最重要目標はiPS細胞を用いた細胞治療が可能である事を示すための準備であったが、その過程で斎藤班からヒト網膜細胞や角膜細胞を大量に調整するためのノックインES細胞株という、この分野の産業化に弾みを付けるツール開発が行われた。また、紀ノ岡班による極めて少数の細胞をチップ上で自動培養する装置も開発できた。従って、3課題を中心に新たな研究方向へと舵を切るものの、斎藤班は光毒性テストをキット化して世界中に提供する方向での開発も平行して完成させる。これまでキット化された細胞製品として、仏化粧品会社開発した培養皮膚製品があるが、斎藤班の網膜細胞や角膜細胞も医薬や化粧品の光毒性を検出するための国際標準になる可能性がある。また、紀ノ岡班のチップ上自動培養装置は、高橋グループとの連携を進めて、利用価値のあるものか更に厳しく検証する作業も平行して行う。これら二つの成果は、ともに我が国独自の技術であるため、市場にでるまで支援を続けたいと考えている。

その上で、第Ⅱ期の課題としてiPS細胞自身、および誘導した分化細胞の大量培養にかかるコストを画期的に削減できる培養システムの開発を設定し、第Ⅰ期から第Ⅱ期へのスムーズな移行を計った。

10. 総合所見

2009年、政策的重点項目として選ばれてはいても、かけ声だけが勇ましく具体性に欠け、よちよち歩きの状態であったiPS細胞の研究を、実際に臨床や産業に利用可能な技術とするという使命をうけて、S-イノベ・プロジェクトがスタートした。勿論、山中IPS細胞は21世紀を代表するイノベーションである。しかし、ここから医療や産業での第2、第3のイノベーションが生まれるためには、我が国の準備はあまりにも遅れていた。当時、山中博士が「10対1の戦い」と日本の層の薄さを憂う声をあげたのもまさにこの認識による。iPS細胞産業化の研究は「ほとんどが助成金目当てだけのIPS細胞研究」と、マスメディアからの厳しい批判があがったのも同じ頃だ。このような状況を考慮して、萌芽的技術開発を目指すための第一段階として、IPS細胞の医療応用は確かに実現するというproof of conceptを果たす事を第一の目標として第Ⅰ期をマネージした。従って、proof of conceptに偏りすぎたと言う第Ⅰ期に対するあらゆる批判を受けるとすれば、P0の方針が原因であると反省している。しかし成果について言えば最初に期待したiPS細胞が医療や産業に必ず利用されるテクノロジーである事を証明するという目標は達成できた。その結果、網膜再生医療は新しくスタートした再生医療の実現化ハイウェイプロジェクトにiPS細胞臨床応用の嚆矢として位置づ

けられ、本年度に臨床研究の申請が行われるところまでに至っている。また、日本の唯一の再生医療製品を上市しているJ-TECが高橋班に参加する事により、iPS細胞から分化細胞までの複雑な過程をプロトコル化するためのノウハウが蓄積できた。実際この経験は、高橋班の網膜再生に続く他の再生医療プロジェクトにも活かされている。このように、J-TECの経験を通して再生医療の医療産業化のパスウェイが描かれるときも近いのではと期待できる。

ただ、網膜色素上皮細胞にとどまっていたのでは再生医療は拡大しない。網膜再生医療も、網膜色素上皮移植が有効な加齢黄斑変性症から、視細胞移植が必要な網膜色素変性症までiPS細胞による再生医療の拡大を心待ちにしている。このように、新しい技術が不断に臨床応用現場に供給されて初めて再生医療は拡大する。この期待に応えるべく、第I期で斎藤班は更に新しい網膜再生技術開発にチャレンジした。日本の多くの分化誘導プロジェクトでは、時間のかかるヒトES細胞のノックインといった本来積み重ねるべき努力を払わず、安易な戦略を選ぶ事が多い。しかし、独自の材料を開発し続けられない限り結果は競争力のない技術の開発で終わる。この反省から、斎藤班では網膜や角膜発生の重要な分子マーカーに標識遺伝子をノックインするという最もオーソドックスではあるが時間のかかるツール開発を行った上でこの課題に挑んだ。その結果、ES細胞から網膜全細胞を立体培養で分化させる画期的な方法を開発した。この方法は、既に高橋班の網膜再生の次世代技術として既に導入が始まっている。勿論ノックインなど遺伝子改変をした細胞を再生医療に応用するのはまだハードルが高い。しかし、医療の産業利用という面では極めて有用なツールである事が本プロジェクトで明らかにできた。すなわち、分子マーカーを指標として中間段階の細胞を純化する事で、高い純度の網膜細胞を大量調整できる。こうして出来た細胞を使うと、従来光毒性テストに使われていた細胞株よりも高い感度と特異性で薬剤の光毒性を検出できる事も明らかになって来ている。これらの結果は、第I期の研究から世界初の光毒性テストキットを提供する技術が完成した事を示し、同じ研究方向から再生医療と産業化の両方が同時に実現できる事を示す画期的な成果であると言える。現在化粧品業界では仏化粧品会社が開発した培養皮膚が世界中に提供され、皮膚毒性テストの国際標準となっている。同じように、斎藤班の光毒性テストキットをこのプロジェクトから生まれる国際標準にするべく更に努力を重ねたい。第I期では、高橋班、斎藤班と比べると、谷口班、紀ノ岡班は世界をリードする成果を上げるというところまでは到達できなかった。しかし、第I期で谷口班は肝細胞の誘導と品質評価に焦点を当てて研究を進める過程で、異なる細胞の混合立体培養が新しい培養の方向性になるのではと気づき成熟肝細胞を誘導できる立体培養プロトタイプを完成させた。紀ノ岡班は、ニーズさえ明確になれば、そのニーズを機器と

して開発できる事をチップ上培養装置の開発で示した。網膜上皮細胞小片の培養は極めて特殊な用途であるため、この装置が普及するかどうかは不明であるが、工学と生命科学の対話さえうまく進めれば、iPS細胞のような困難な分野でも産業化に道が開かれる事を示した。このように、S-イノベを設定した事の意義は大きいと考えている。その意味で、アドバイザーからは厳しい評価を受けたが、POとしては各班及第点以上の成果を上げたと考えている。

その結果、第I期の成果からスムーズに生まれて来た第II期の課題が培養コストの画期的削減を可能にする技術の開発であった。後は、この課題に全く新しい発想で取り組むだけである。既に、これまで進められて来た方向とは全く逆の、増殖因子の必要ない培養法、化合物による細胞の純化、新陳代謝システムを実現する培養という基礎技術を完成させ、最初の目標であるiPS細胞の医療・産業利用拡大を実現する。

今後は、第II期以降の課題として、培養コストの画期的削減を可能にする技術の開発を行う。すなわち、増殖因子を必要としない自立性細胞培養法、化合物を用いて目的細胞を純化する基礎技術を開発し、新陳代謝型の培養システムを完成することにより、当初の目標であるiPS細胞を用いた医療・産業への利用拡大を実現したい。

以上