

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

課 題 名	重度先天性骨代謝疾患に対する遺伝子改変間葉系幹細胞移植治療法の開発
代 表 機 関 名	独立行政法人産業技術総合研究所
代 表 研 究 者 名	大串 始
分担機関・分担研究者名	国立大学法人島根大学 竹谷 健

1. 課題開始時における達成目標

- ① 間葉系幹細胞へのALP 遺伝子導入による培養骨作製の高効率化
[達成目標] 1) 賦活化間葉系細胞の作製法の再検討 2) 間葉系細胞からの iPS 細胞作製法の検討 3) 賦活化間葉系細胞ならびに iPS に対する ALP 遺伝子導入骨芽細胞作製法の検討 4) ALP 導入間葉系細胞の動物移植実験における移植細胞の安全性検討 5) 動物モデルでの ALP 導入間葉系細胞由来骨芽細胞移植の有効性安全性検討
- ② 遺伝子導入細胞の保存施設ならびに遺伝子導入施設整備
[達成目標] 1) 遺伝子導入細胞の保存施設ならびに遺伝子導入施設整備 2) CPC における臨床応用レベルでの遺伝子導入法および細胞調製法の開発
- ③ 次世代シーケンサを用いた遺伝子導入部位の検索
[達成目標] 1) BAC アレーの利用技術開発および次世代シーケンサー利用解析システムの確立 2) BAC アレーの利用技術開発および次世代シーケンサを用いたポジショナルクローニング法の開発
- ④ プロジェクトの総合的推進
[達成目標] 1) 外部有識者を含めた委員会での討議による総合的研究推進 2) 成果の積極的な公開
- ⑤ 登録体制の検討
[達成目標] 1) 本疾患の登録体制の確立
- ⑥ 診断法の検討
[達成目標] 1) 本疾患の汎用的診断法の確立と登録体制の検討
- ⑦ 細胞移植治療の実施に向けた基盤整備
[達成目標] 1) 臨床レベル遺伝子導入施設の確立 2) 治療の実施に向けた基盤整備

2. 平成22年4月末時点における課題全体の事業計画に対する研究成果

（1）成果概要

- ① 間葉系幹細胞への ALP 遺伝子導入による培養骨作製の高効率化 （産総研）
脂肪組織由来間葉系幹細胞3株を親株とし、レトロウイルスベクターを用いて OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC の4因子または OCT3/4, SOX2, KLF4 の3因子を導入し、iPS 細胞の樹立を試みた。4因子の導入時には3株すべてから、3因子導入では2株からヒト ES 細胞様の形態をもつコロニーが得られた。各親株から得られたヒト ES 細胞様コロニーから1株を選んで増殖させ、ALP 染色及び未分化マーカーの発現を染色及び RT-PCR で検出し、未分化性を保持していることを証明した（図1）。

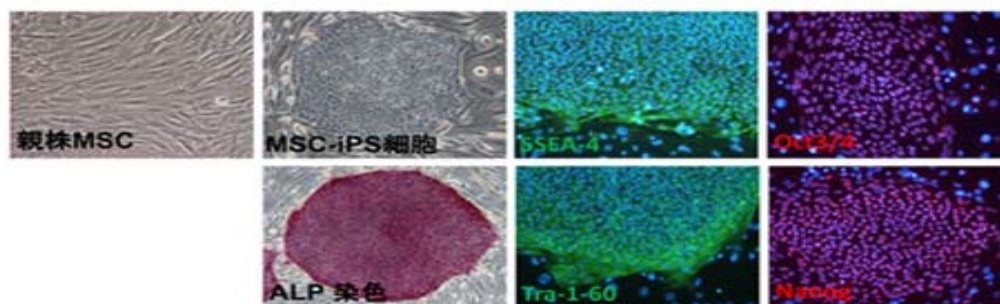


図1親株MSCと、MSCから樹立されたMSC-iPS細胞の未分化能検証 (in vitro)

さらに、これらの細胞株について、胚様体を介した in vitro での三胚葉分化（図2）と、免疫不全マウス精巣への移植による in vivo での三胚葉分化（図3）を確認し、多分化能を保持していることを証明した。

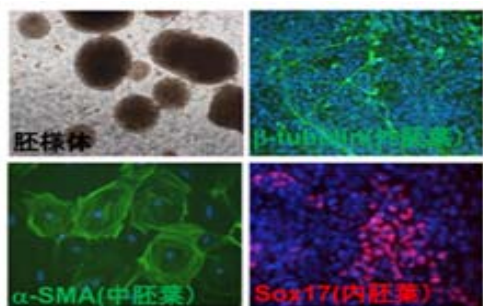


図2: MSC-iPS細胞の三胚葉分化能検証 (in vitro)

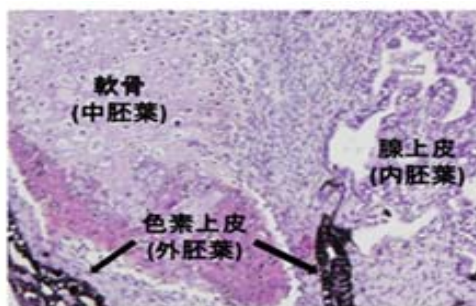
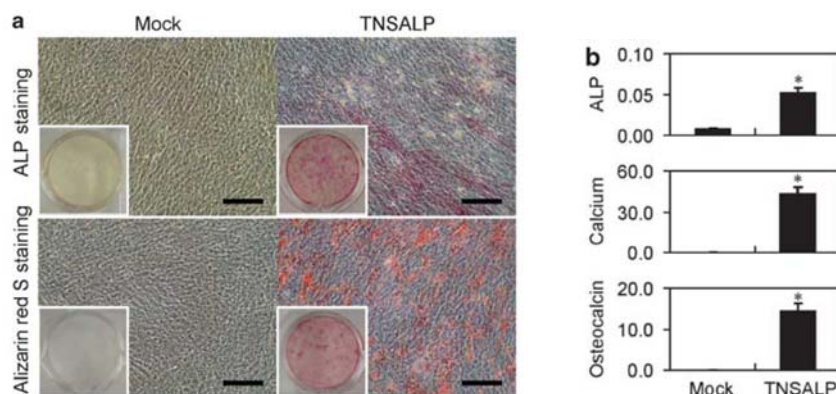


図3: MSC-iPS細胞の三胚葉分化能検証 (in vivo)

以上、iPS 細胞を樹立するための基本技術を確立し、市販間葉系幹細胞から複数株の iPS 細胞を樹立に成功した。

また、患者由来間葉系幹細胞へ正常 ALP 遺伝子を導入する方法を検討したところ Plasmid vector での遺伝子導入では、in vivo での新生骨形成能を持つ細胞が得られなかった。そこで、導入効率の良いレトロウイルスベクターに変更し、検討をおこなった。プロモーターは Plasmid vector での検討を踏まえ、ALP 遺伝子のプロモーターを用いた。このレトロウイルスベクターで患者由来間葉系幹細胞へ正常 ALP 遺伝子を導入し、骨分化培養に供したところ、ALP 染色で赤く染色され、正常 ALP 遺伝子が機能していることがわかった。さらに Arizarin red S 染色で石灰化を伴う骨基質が産生されていることがわかった (図 a 参照)。さらに生化学的解析により ALP 活性の亢進が確認でき、石灰化基質からカルシウムおよび骨特異的タンパクであるオステオカルシンが検出された (図 b 参照)。また他の骨分化マーカーの発現も RT-PCR により確認された。これにより遺伝子導入細胞は in vitro での骨化能を回復していることが確認された。



② 遺伝子導入細胞の保存施設ならびに遺伝子導入施設整備 (産総研)

遺伝子導入細胞の保存施設ならびに遺伝子導入施設整備のため、産総研尼崎施設 C 棟内のヒト細胞専用セルプロセッシングセンターにおいて施設を発展させ、遺伝子導入ヒト細胞用セルプロセッシング専用スペースを設置し、設備内の環境整備を行った。

遺伝子導入細胞の周囲環境への汚染や細胞コンタミネーションを防ぐために、周囲環境よりも室内の圧力を低く設定できるセルプロセッシング専用スペースを構築し、バイオリジカルな封じ込めが可能な環境整備に成功した。更に、我々の施設で保存されていたヒト骨髄間葉系幹細胞の試験培養を行った。骨分化能検査、感染症検査、環境モニタリング等を行い、異常を認めることなく培養出来ることを確認した。

③ 次世代シーケンサを用いた遺伝子導入部位の検索 (産総研)

本実施項目の推進のために、沖縄県うるま市に設置された次世代シーケンサー (SOLiD™ システム) セットアップを行い、本実施項目を行うためのウェット実験環境およびドライ解析系 PC クラスターの構築を行った。

次世代シーケンサーによりゲノム配列を効率的・高精度に解析するために必要な基盤技術開発を行った。また、患者由来幹細胞を用いた実験を行う前に、まず低ホスファターゼ症のモデル細胞として上記①で分離した低アルカリフォスファターゼ活性 HOS 細胞 (ALL) 株に pALP-ALPL カセットをレトロウイルスベクターにより導入し、



clone isolation を行い、stable line を樹立した(ALL-ALP)。この細胞株を用いて、ゲノムに挿入された遺伝子導入部位を SOLiD システムにより決定するために、LTR-Inverse PCR 法によりゲノム DNA よりレトロウイルス挿入部位近傍ゲノム DNA のキャプチャーを行い、SOLiD フラグメントライブラリ調製、プロトコルの妥当性について検討を行った。さらに、全ヒトゲノムに亘って挿入部位の検索のための解析プログラムの作成、および解析方法の検討を行った。

治療用の細胞として安全性を担保するため、次世代シーケンサを用いたゲノムワイドに遺伝子導入部位を同定する方法を検討した。まず、モデル細胞として Human Osteoblastoma (低アルカリフォスファターゼ株)に phALP-ALPL 遺伝子発現カセットを構成したレトロウイルスベクターpQCXIN 内をトランスフェクションした安定株 2 株 (#2 および #5) からゲノム DNA を調製した。これを用いて、次世代シーケンサ SOLiD システムで解析するためのプロトコルの検討を行った。さらに、実際に SOLiD システムを用いてシーケンスランを行い、得られたデータから挿入部位を決定するインフォマティクス解析パイプラインを構築した。その結果、2 箇所挿入されていることを確定することができた。また、クローニング・サンガー法で解析した結果と一致した。

④ プロジェクトの総合的推進 (産総研)

プロジェクトの総合的推進を図るため、幹細胞移植促進委員会を発足した。内部委員として、大串始 (産業技術総合研究所)、服部耕治 (産業技術総合研究所)、藤森一浩 (産業技術総合研究所)、平野隆 (産業技術総合研究所)、竹谷健 (島根大学)、金井理恵 (島根大学)、山口清二 (島根大学)、内藤真裕美 (島根大学)、永瀬真弓 (島根大学) の 9 名 および、外部委員として有識者 3 名 吉岡章 (奈良県立医科大学学長)、大藺恵一 (大阪大学教授)、田中康春 (琉球大学教授) を招聘し、7 月 24 日に第一回委員会を産総研尼崎サイトで開催した。平成 21 年 7 月 16 日に外部有識者を含む第二回幹細胞移植治療推進委員会を開催した。低ホスファターゼ症に対して、幹細胞移植治療をどのように進めていくかに関して検討した。

⑤ 登録体制の検討 (島根大学)

登録体制の検討のため、各関連学会 (小児内分泌学会、未熟児新生児学会) で我々が以前行った周産期型低ホスファターゼ症における細胞治療を報告して、本研究を説明した。さらに、全国 520 施設の小児専門機関にアンケート調査を行い、本疾患の疫学調査を行ったところ、30 施設に本疾患が存在するか、以前、診察したことがあることが判明した。平成 20 年度は、その 30 施設の患者の詳細な臨床経過を検討したところ、44 例の本疾患の患者について、検討することができた。平成 21 年度は、さらに症例を追加することができ、現在、約 50 例について臨床像をまとめているが、今回のプロジェクトの対象である生命予後不良な周産期型の中に、予後良好な集団が存在することが明らかとなった。

⑥ 診断法の検討 (島根大学)

ALP 遺伝子解析について、患者末梢血 2~5ml を採取して、DNA を抽出して、ALP 遺伝子解析を行った。1 週間以内には ALP 遺伝子変異を同定する体制を整えた ALP 活性について、さまざまな方法で検討しており、本疾患により有効な測定法を検討している。これまでの報告では、遺伝子型と表現型に強い相関があることが報告されているが、日本でみられることの多い遺伝子変異について、ALP 遺伝子の 1559delT を有する症例が予後不良であることが判明した。また、日本人にみられるその他の遺伝子異常についても明らかとなった。この遺伝子変異体の ALP 活性が予後につながる可能性があるため、ALP 遺伝子全長をクローニングして、ALP 変異体を作成している。現在、この変異体の ALP 活性の測定を行っている。また、重症例の ALP 遺伝子変異体を作製し、その酵素活性および正常遺伝子との相互作用を検討している。

⑦ 細胞移植治療の実施に向けた基盤整備 (島根大学)

院内スタッフの確保について、小児科を中心に、細胞移植治療チーム、骨代謝チーム、新生児医療チームを作った。それぞれのチームにおいて、患者の管理、治療などを検討している。保険診療体制についてこのプロジェクトで行われる治療は保険診療外であるため、他大学などとも相談して、島根大学医学部附属病院と協議を行っている。まずは、本疾患に対する同種間葉系幹細胞移植が遂行できる基盤整備 (適切な細胞治療プロトコルの検討、倫理委員会での検討、患者の受け入れ態勢など) を行い、来年度からの治療が行えるように整備できつつある。

(2) 研究の進捗及び成果

① 間葉系幹細胞への ALP 遺伝子導入による培養骨作製の高効率化

[進捗及び成果] 間葉系幹細胞から iPS 細胞を樹立するための基本技術を確認し、複数株の iPS 細胞を樹立した。また、低 ALP 患者細胞に ALP 遺伝子を導入することで、骨化能を回復させた。

② 遺伝子導入細胞の保存施設ならびに遺伝子導入施設整備

[進捗及び成果] 遺伝子導入細胞の保存施設ならびに遺伝子導入施設整備のため、産総研尼崎施設 C 棟内のヒト細胞専用セルプロセッシングセンターでの設備内の環境整備を行った。また、ヒト骨髄間葉系幹細胞の試験培養を問題なく行うことができた。

③ 次世代シーケンサを用いた遺伝子導入部位の検索 [進捗及び成果] 治療用の細胞として安全性を担保するため、BAC アレーの利用技術開発および次世代シーケンサを用いたゲノムワイドに遺伝子導入部位を同定する方法を確立した。 ④ プロジェクトの総合的推進 [進捗及び成果] 外部有識者を含めた幹細胞移植促進委員会を設け、プロジェクトを総合的に推進した。 ⑤ 登録体制の検討 [進捗及び成果] 本疾患の疫学調査によって、本邦における詳細な臨床経過が明らかとなった。現在、約 50 症例の登録があり、さらなる追跡調査を進めている。 ⑥ 診断法の検討 [進捗及び成果] 日本でみられることの多い遺伝子変異について、ALP 遺伝子の 1559delT を有する症例が予後不良であることが判明した。 ⑦ 細胞移植治療の実施に向けた基盤整備 [進捗及び成果] 小児科を中心に、細胞移植治療チーム、骨代謝チーム、新生児医療チームを作った。それぞれのチームにおいて、患者の管理、治療などを検討し、本疾患に対する同種間葉系幹細胞移植が遂行できる基盤整備ができつつある。	
3. 課題全体の論文発表件数	16 件
4. 課題全体の特許出願件数	0 件
5. 当初目標に対する達成度	
① 間葉系幹細胞へのALP 遺伝子導入による培養骨作製の高効率化 ヒト細胞をもちいての遺伝子導入による培養骨の作製が確認でき満足すべき達成度である。 ② 遺伝子導入細胞の保存施設ならびに遺伝子導入施設整備 整備された CPC 施設においてヒト間葉系幹細胞の骨分化を確認でき満足すべき達成度である。 ③ 次世代シーケンサを用いた遺伝子導入部位の検索 解析方法をほぼ確立し、ヒトモデル細胞への遺伝子導入部位が決定でき満足すべき達成度である。 ④ プロジェクトの総合的推進 外部有識者を含む委員会を立ち上げ、本治療方法に関する有意義な討論ができた。しかし、本委員会の重要性について文科省の方々の理解を得るのは困難で達成度は未定である。 ⑤ 登録体制の検討 十分な数の疫学調査を開始することができ満足すべき達成度である。 ⑥ 診断法の検討 遺伝子変異と疾患の予後が類推することが判明し満足すべき達成度である。 ⑦ 胞移植治療の実施に向けた基盤整備 プロトコルや倫理委員会での検討をおこない、将来の体制整備ができ満足すべき達成度である。	
6. 課題内の情報共有・連携体制	
平成 20 年 7 月に本プロジェクトに係わる幹細胞移植促進委員会を発足した。内部委員として、大串始、服部耕治、藤森一浩、平野隆（産業技術総合研究所）、竹谷健、金井理恵、山口清二、内藤真裕美、永瀬真弓（島根大学）の 9 名 および、外部委員として有識者 3 名 吉岡章（奈良県立医科大学学長）、大藁恵一（大阪大学教授）、田中康春（琉球大学教授）を招聘し、定期的に委員会を開催した。委員会では参画各機関の連携・調整にあたりとともに、適切にプロジェクトが遂行されているかどうか、外部有識者からの諮問に基づき総合的に推進した。	
7. 課題外の課題との情報共有・連携	
2009 年産総研と京都大学との間で医工連携分野やエネルギー環境分野を中心とした包括連携協定の話があり、京都大学 iPS 細胞研究統合推進拠点との研究連携を模索した。2010 年 1 月 19 日京都大学と産総研との連携協定が正式に締結された。低ホスファターゼ症治療に用いる遺伝子改変細胞並びに iPS 細胞の生体内での分布や生着状況、安全性を調査するための in vivo imaging を用いた実験に関する共同研究や、ヒト臨床応用を遂行するための CPC の運用等に関して連携を検討している。	
8. 人材育成	
産総研セルエンジニアリング（現 健康工学）研究部門はCPCを有し、約10年間にわたって、様々な大学・研究機関と共同で骨関連疾患を中心とした間葉系細胞を利用した移植治療の経験を有している。日本国内外の医学部歯学部を初めとする大学院生を受け入れ、骨軟骨再生医療技術に関して研究教育指導を行う（平成20—21年で8名）とともに、遺伝子改変幹細胞を用いた治療技術の開発を行うにあたって、ポストドクやテ	

クニカルスタッフの人材育成にも力を注いでいる。更に、島根大学とも連携して、本疾患に対する同種間葉系幹細胞移植のための人材育成も進めている。

9. 生命倫理に係る対応

本研究課題における生命倫理に係わる対応について、産業技術総合研究所では、ライフサイエンス実験に関して、「ライフサイエンス実験に関する倫理及び安全管理規程」が定められ、実験計画書を提出し、その実験計画に関して理事長から承認を受けている。また、医工学応用実験計画書も提出し、医工学応用実験倫理委員会の審査を受けて、承認が得られている。また、島根大学では、人間を対象とする医学の研究及び臨床応用申請書を島根大学医学部倫理委員会へ提出し、倫理委員会の承認が得られている。

10. 今後の展望

低ホスファターゼ症という重度先天性骨代謝疾患の根治治療技術を開発するために、間葉系細胞等の患者体細胞からの iPS 細胞作製技術を確認する。また、作製された iPS 細胞あるいはその元細胞に正常の ALP 遺伝子を導入させるとともに ALP 遺伝子導入細胞が骨形成能を有することを確認する。なお、我々はこれまでに骨再生技術の臨床応用をおこない臨床レベルでの培養技術のノウハウを持つ。このノウハウを他施設と共有して共同研究をおこなうことにより、多くの施設での臨床応用を目指した培養環境構築が可能となる。また、iPS 細胞の臨床応用に関しては、iPS 細胞からの分化細胞（例えば骨芽細胞）等を用いる必要があるが、混在する未分化細胞を除去する必要がある。我々はこの除去技術についても本プロジェクト期間内に確立し、その技術を他分野の研究者にも供与することを計画している。以上より、iPS 細胞を用いた再生医療の早期実用化を他施設との共同により推進する。

別紙3に見られるように、平成22年度内に患者 iPS 細胞の樹立と検証をおこなう。また、次世代シーケンサーを用いて患者細胞への遺伝子導入部位の探索もおこなう。さらに、iPS 細胞から間葉系細胞を経て骨芽細胞への分化カスケードを検証する。23年度は患者由来 iPS 細胞から骨芽細胞への誘導技術を確認する。24年度には、計画している新規未分化細胞除去技術の検証を動物移植実験によりおこない根治治療技術へと展開する。以上の技術開発に平行して登録や診断法の確立にむけて別紙3に記載の time table に従って研究開発をおこない、ヒト幹細胞指針への対応を目指す。

11. 特記事項

現在患者細胞からの iPS 細胞作製については倫理委員会の承認が得られている。さらに、上記には記載していないが、つい最近この作製についての確証がえられる実験データが出つつあり、重度先天性骨代謝疾患の根治治療技術開発へ大きく前進している。さらに、短時間におこなえる新規未分化細胞の除去技術についてもちかぢか特許申請をする段階にある。以上より、本計画は順調に進展しつつある。

12. 委託研究費一覧

	20年度	21年度	22年度	計
設備備品費（千円）	5,712	4,332	0	10,044
人件費（千円）	10,711	11,675	20,054	42,440
業務実施費（千円）	22,038	22,454	6,869	51,361
間接経費（千円）	11,539	11,539	8,077	31,155
合計（千円）	50,000	50,000	35,000	135,000

(別紙 1)

1. 論文のリスト

- Ishimoto Y, Hattori K, Ohgushi H, Uematsu K, Tanikake Y, Tanaka Y, Takakura Y. Spectrocolorimetric evaluation of human articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage. 17(9) 204-8 (2009).
- Hattori K, Uematsu K, Matsumoto T, Ohgushi H. Mechanical effects of surgical procedures on osteochondral grafts elucidated by osmotic loading and real-time ultrasound. Arthritis Res Ther. 11(5) R134. (2009).
- Matsumoto H, Hattori K, Ohgushi H, Dohi Y, Ueda Y, Shigematsu H, Satoh N, Yajima H, Takakura Y. Raloxifene: its ossification-promoting effect on female mesenchymal stem cells. J Orthop Sci. 14(5) 640-5 (2009).
- Tanaka T, Hirose M, Kotobuki N, Tadokoro M, Ohgushi H, Fukuchi T, Sato J, Seto K. Bone augmentation by bone marrow mesenchymal stem cells cultured in three-dimensional biodegradable polymer scaffolds. J Biomed Mater Res A. 91(2) 428-35 (2009).
- Oliveira JM, Sousa RA, Kotobuki N, Tadokoro M, Hirose M, Mano JF, Reis RL, Ohgushi H. The osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells cultured with dexamethasone-loaded carboxymethylchitosan /poly(amidoamine)dendrimer nanoparticles Biomaterials 30:804-813(2009)
- Kashiwa K, Kotobuki N, Tadokoro M, Matsumura K, Hyon SH, Yoshiya S, Ohgushi H. Effects of epigallocatechin gallate on osteogenic capability of human mesenchymal stem cells after suspension in phosphate-buffered saline. Tissue Eng Part A. 2010 Jan;16(1):91-100
- Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, Tadokoro M, Morita Y, Ohgushi H, Dohi Y, Imamura T, Tanaka Y. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. Bone. 46(2) 418-24, (2010).
- ◎○ Katsube Y, Kotobuki N, Tadokoro M, Kanai R, Taketani T, Yamaguchi S, Ohgushi H. Restoration of cellular function of mesenchymal stem cells from a hypophosphatasia patient. Gene Ther. 2010 Apr;17(4):494-502.
- ◎○ Aoki T, Ohnishi H, Oda Y, Tadokoro M, Sasao M, Kato H, Hattori K, Ohgushi H. Generation of induced pluripotent stem cells from human adipose-derived stem cells without c-MYC. Tissue Eng Part A 2010 Feb 10. Epub ahead of print
- Oliveira JM, Kotobuki N, Tadokoro M, Hirose M, Mano JF, Reis RL, Ohgushi H. Ex vivo culturing of stromal cells with dexamethasone-loaded carboxymethylchitosan/poly(amidoamine) dendrimer nanoparticles promotes ectopic bone formation. Bone. 2010 May;46(5):1424-35

2. 特許出願リスト

表題	概要	出願年月日
なし	なし	平成 年 月 日

(別紙 2)

他制度等による助成

他制度（公的資金）による助成を受けているものがある場合には、以下に必要事項を記載してください。該当がない場合には、「助成制度」の欄に「なし」と記入してください。

1. 実施中又は平成 20 年度以降に実施した研究テーマ

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

平成22年度～平成24年度の研究計画

	H22年度	H23年度	H24年度	根治治療技術開発へ ヒト幹指针对応
①iPS細胞へのALP遺伝子導入による培養骨作製の高効率化	(A) 患者由来iPS細胞の樹立と検証 健康人由来iPS細胞からのMSC・骨芽細胞誘導	患者由来iPS細胞への種々ALP導入方法の検証 患者由来iPS細胞への種々ALP導入後の骨誘導技術開発 健康人由来iPS細胞からのMSC・骨芽細胞誘導後の骨形成を目指しての動物移植 健康人由来iPS細胞からのMSC・骨芽細胞誘導後の未分化細胞除去技術開発	患者由来iPS細胞からのMSC・骨芽細胞誘導後の骨形成を目指しての動物移植 患者由来iPS細胞からのMSC・骨芽細胞誘導後の未分化細胞除去技術開発 動物移植による非腫瘍化検証・未分化細胞除去後の動物移植	
②次世代シーケンサを用いた遺伝子導入部位の検索	(B) 複数例患者間葉系幹細胞にALP導入と骨形成能の確認 Hypophosphatasia患者由来間葉系幹細胞へALP遺伝子をレトロウィルスを用いて導入し、樹立された株より調製したゲノムを用いて、レトロウィルス挿入部位を網羅的に検索	ALP導入細胞の骨障害モデル動物への移植 治療対象となるHypophosphatasia患者数例由来間葉系幹細胞へALP遺伝子をレトロウィルスを用いて導入し、樹立された株より調製したゲノムを用いて、レトロウィルス挿入部位を網羅的に検索	ALP導入細胞の動物への移植による生着と安全性確認	
③プロジェクトの総合的推進	プロジェクトで得られた成果を、積極的に公表し、今後の展開に資する。			
④登録体制の検討	各関連学会および患者の会と連携して登録体制の整備 学会報告や講演、論文発表による本疾患の啓発 疫学調査による詳細な臨床像の把握	各関連学会および患者の会と連携して登録体制の整備 学会報告や講演、論文発表による本疾患の啓発 疫学調査による詳細な臨床像の把握	各関連学会および患者の会と連携して登録体制の整備 学会報告や講演、論文発表による本疾患の啓発 疫学調査による詳細な臨床像の把握	
⑤診断法の検討	本疾患の生化学検査、遺伝子解析、機能解析による、迅速かつ正確な診断の確立と病態の解明	本疾患の生化学検査、遺伝子解析、機能解析による、迅速かつ正確な診断の確立、更なるデータ蓄積	本疾患の生化学検査、遺伝子解析、機能解析による、迅速かつ正確な診断の確立、更なるデータ蓄積	
⑥遺伝子改変細胞移植治療の実施に向けた基盤整備	遺伝子治療および細胞治療を臨床応用するための問題点を明らかにして、その解決策を検討	厚生労働省ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針へ申請を目指して、現有施設の不備を詳細に検討 遺伝子改変細胞移植治療の実施基盤整備の充実	平成20年度から23年度までの研究成果に基づいて、厚生労働省ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針へ申請するための、準備を整える。	

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

課 題 名	筋ジストロフィーに対する幹細胞移植治療の開発
代 表 機 関 名	独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
代 表 研 究 者 名	武田 伸一
分担機関・分担研究者名	該当なし

1. 課題開始時における達成目標

達成目標（2008年4月時点）

我々は、筋ジストロフィーに対する幹細胞移植治療を開発するために、骨格筋組織幹細胞である筋衛星細胞のセルソーターを用いた純化・網羅的遺伝子発現・ジストロフィン遺伝子導入・モデルマウスへの移植実験を行ってきた。また骨格筋由来間葉系幹細胞の筋再生における役割を研究してきた。これらの研究を更に発展させるべく、以下の目標を掲げて本プロジェクトに参加した。

- 1) ヒト骨格筋組織から幹細胞を分離し、分化能力を維持した状態で増殖させる培養技術を確認する。
- 2) デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）患者骨格筋由来幹細胞に欠損したジストロフィン遺伝子を効率よく導入する方法を確認する。
- 3) ジストロフィン遺伝子を導入した骨格筋由来幹細胞を患者に移植するプロトコルを確認する。

2. 平成22年4月末時点における課題全体の事業計画に対する研究成果

（1）成果概要

- ・患者由来幹細胞の細胞源として、メソアンギオブラストを外して、DMD患者由来iPS細胞の樹立と治療応用を新たに計画に盛り込み、国立精神・神経センター（現（独）国立精神・神経医療研究センター）の筋バンク由来の線維芽細胞から様々な遺伝子変異を持つDMD患者由来iPS細胞を樹立した。

- ・筋ジストロフィーモデル動物である mdx マウスの異なる週・月齢の個体の骨格筋由来線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、週・月齢による誘導効率と iPS 細胞の性質（網羅的遺伝子発現、ゲノムワイドな DNA メチレーション解析、in vitro での分化誘導実験、奇形腫形成による多分化能の検定、マウス胚盤胞へのインジェクションによるキメラ形成能等）に対する影響を解析した。

- ・マウス iPS 細胞 (Pax3-EGFP iPS)、マウス ES 細胞 (Myf5-EGFP ES)を材料として骨格筋系譜へ分化誘導する低分子化合物のスクリーニングと培養条件の検討を行い、数種類の候補化合物を得た。現在これらの化合物を用いて誘導した筋前駆細胞を疾患モデルマウスへ移植し、移植細胞源としての有効性を検証している。

- ・DMD 患者及び疾患対照（診断の結果、筋疾患が除外されたもの）の生検筋から、トリプシン等を用いて筋芽細胞及び線維芽細胞を分離・培養し、増殖させた後、（独）国立精神・神経医療研究センターの細胞バンクへデポジットした。

（2）研究の進捗及び成果

H20 年度 (2008 年度)

iPS 細胞の研究の進展により、ヒト iPS 細胞が次世代の筋ジストロフィーに対する細胞移植治療の中心となる可能性を考え、PD、PO の了承のもと、幹細胞の候補から、多能性幹細胞の一つであるが、実験上、再現性の得られにくいメソアンギオブラストを削除して iPS 細胞を中心に、計画を修正した。

①DMD患者骨格筋からの筋・幹細胞の調整（変更後）（二重下線部は変更箇所）

DMD 患者及びコントロールの生検筋から、トリプシン等を用いて単核細胞を分離、培養する。また、ミニ・ジストロフィン遺伝子を導入したマウスおよびDMD 患者の線維芽細胞から iPS 細胞を樹立する。

- ・ DMD 患者及び診断の結果、筋疾患が除外された疾患対照の生検筋から、トリプシン等を用いて筋芽細胞及び線維芽細胞を分離、培養後、バンクヘデポジットした。線維芽細胞から山中 4 因子（hOCT3/4, hKLF4, hSOX2, hc-MYC）を発現するレトロウイルスベクターを用いてヒト iPS 細胞を樹立した。
- ・ DMD の原因遺伝子産物であるジストロフィンを欠損した mdx マウス由来の線維芽細胞にミニ・ジストロフィン遺伝子を導入した後、iPS 細胞を樹立する方法を確立した。
- ・ 各週・月齢のジストロフィン欠損の mdx マウスから iPS 細胞を樹立し、その評価を行った。

②骨格筋からの幹細胞分離、培養技術の開発

- ・ ヒト骨格筋から純度の高い筋芽細胞を分離する方法を確立した。一方従来の方法に比して格段に増殖能・分化能維持に優れる培養条件を検討中であるが、十分な培養方法は見出し切れず、今後の課題として残った。同時に、骨格筋組織中の多能性幹細胞とされる Side Population（SP）細胞の研究を進め、CD31(-)CD45(-)SP 細胞が、骨格筋の組織幹細胞である筋衛星細胞の増殖や遊走能等を制御し、筋再生の制御に重要な働きをすることを明らかにした（*Am J Pathol* 173:781-91, 2008）。

③マウスへの移植実験

幹細胞および iPS 細胞から誘導した筋前駆細胞をモデルマウスに移植し、分化能、増殖能を検討する。

- ・ 免疫不全マウス NOD/Scid マウス、疾患モデルマウス である mdx マウス、及び両方の性質を持つ Scid/mdx マウスへの移植を行って、iPS 細胞の分化能の検定（奇形腫の形成の有無）、筋・幹細胞の生着率、筋線維の再生を評価している。

H21 年度(2009 年度)

①Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）患者の線維芽細胞からのiPS細胞の樹立

- ・ 4 種類のレトロウイルスベクター（pMXs-hOCT3/4, pMXs-hKLF4, pMXs-hSOX2, pMXs-hc-MYC）を用いて DMD 患者由来 iPS 細胞を誘導した。2010 年 4 月までに 10 ライン前後を得ている。
- ・ 2008 年度に引き続き、各週・月齢の mdx マウスから iPS 細胞を樹立し、その誘導効率とリプログラミングの程度との関連を検討した。Mdx マウス骨格筋由来の線維芽細胞を、12 カ月齢を超える個体から調製すると、リプログラミングの効率が著しく低下していた。Mdx マウスでは繰り返す筋変性・再生を反映して、線維芽細胞の分裂能力が低下するためと考えられた。
- ・ 各週・月齢の mdx マウスから得られた iPS 細胞に関してゲノムワイドな DNA メチレーション解析を行った結果、ES 細胞に比較して、各週・月齢の mdx マウスから得られた iPS 細胞に共通の hypermethylation 及び hypomethylation loci が少数ではあるが存在することを明らかにした。またマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析から iPS 細胞で高い発現傾向を示す遺伝子群を同定できた。

②低分子化合物を用いたiPS細胞からの筋前駆細胞誘導法の確立

- ・ パリ第 6 大学の Frederic Relaix 博士から入手した Pax3-EGFP knock in マウスから立ち上げた、マウス iPS 細胞 (Pax3-EGFP iPS)、パリ・パストゥール研究所 S. Tajbakhsh 博士から譲渡を受けたマウス ES 細胞(Myf5-EGFP ES)を用いて骨格筋分化誘導の効率を上げる低分子化合物を化合物ライブラリー(BIOMOL 社 ICCB Known Bioactives Library)のスクリーニングによって得ることができた。即ち、中胚葉分化を誘導する低分子化合物を 3 種類、Myf-5 陽性の筋前駆細胞に誘導する化合物を 1 種類同定した（特許準備中）。現在、それらの化合物を用いて誘導した筋前駆細胞の疾患モデルマウスへの移植を行ってその細胞移植治療への有効性を検証している。

③ヒト筋芽細胞の分離方法と培養条件の検討と移植実験

・ヒト筋芽細胞の分離方法は確立したが、DMD の移植治療には十分な数の筋前駆細胞が必要である。
in vitro で分化能・増殖能を保ったまま、数を増やす必要があるが、その培養方法は、今後も継続した検討が必要である。一方、骨格筋組織の中で、間葉系幹細胞の一つであると考えられる PDGFRalpha 陽性の間葉系前駆細胞が、筋肉内異所性脂肪形成に関わることを見出し、報告した (*Nat Cell Biol* 12: 143-52, 2010)。筋ジストロフィーが進行すると、筋線維は減少し、結合組織、脂肪組織によって置き換わることが知られている。従って、骨格筋内異所性脂肪のオリジンが同定できたことは幹細胞を用いた移植治療の上でも大きな進歩であり、同時に脂肪化のプロセスを抑制することが重要である。

3. 課題全体の論文発表件数

8 件

4. 課題全体の特許出願件数

0 件

5. 当初目標に対する達成度

①DMD患者骨格筋からの筋・幹細胞の調整 (到達度 100%)

現在までに 100 検体近くの貴重な DMD 患者由来の筋・幹細胞が (独) 国立精神・神経医療研究センターの細胞バンクにストックされた。今後の基礎・臨床研究の重要なリソースとなると期待される。

②骨格筋・幹細胞の培養技術の開発 (到達度 60%)

分離方法は確立できたが、効率良い筋細胞移植を実現するには、培養条件には改良の余地がある。よって到達度は 60%程度と判断している。

③Duchenne型筋ジストロフィー (DMD) 患者の線維芽細胞からのiPS細胞の樹立 (到達度 70%)

現在約 10 ラインのDMD由来iPS細胞を樹立できた。しかし、誘導効率が低く、マウスiPS細胞に比べて不安定であることから、1) 細胞ソースや誘導方法に改善の余地があり、2) 得られたiPS細胞クローンの品質や安全性を厳しく評価することが必要である。また、我々はレトロウイルス及びレンチウイルスを用いてiPS細胞を誘導したが、移植後の移植細胞の癌化等を回避するためには、3) レトロウイルスベクター以外の手段で安定してヒトiPS細胞を誘導する方法を確立することが望ましいと考えられる。よって到達度は 70%と判断する。

④低分子化合物を用いたiPS細胞からの筋前駆細胞誘導法の確立 (到達度 60%)

マウスiPS細胞の筋分化を促進する化合物は、いくつか有力な候補を同定でき、それらの化合物を用いて誘導した筋前駆細胞を、モデルマウスであるmdxマウスへ移植しその有効性と安全性を徹底的に検証している。マウスで確立された筋前駆細胞の誘導法がヒトiPS細胞に応用できるかは、現在検討中である。ヒトiPS細胞での検討が残っているので、到達度は 60%と判断する。

6. 課題内の情報共有・連携体制

代表及び分担研究者は定期的にミーティングを行っており、情報共有を行い、問題点の解決・研究の方向性に関して協議している。

7. 課題外の課題との情報共有・連携

【本プロジェクトの他の実施課題との情報交換・連携に関して】

1. 拠点による技術講習会に複数回研究員を派遣し、最新のプロトコルや技術の取得に努めている。
2. 京都大小児科と、DMD患者のiPS細胞からの筋前駆細胞の誘導法に関して、共同研究を進めている (*FASEB J.* 23(6):1907-19, 2009)。
3. 慶応大循環器内科福田恵一研究室と、筋ジストロフィー患者 iPS 細胞からの心筋細胞誘導及びジスト

ロフィン遺伝子導入に関して共同研究を行っており、更に G-CSF の筋再生促進効果に注目し、筋ジストロフィーへの治療応用に関して共同研究を行っている。

4. 理研 CDB の笹井芳樹博士からの要請を受け、DMD 患者由来 iPS 細胞のうち、品質に優れているものについてバイオリソースセンターに寄託の予定である。

【本プロジェクト以外の研究者、企業及び他府省等との連携】

1. 研究代表者は、厚生労働省によってサポートされている筋ジストロフィー治療開発研究班の班長を 4 期に渡って務め、筋ジストロフィー患者の iPS 細胞樹立や骨格筋・幹細胞移植治療研究を行っている他大学や研究機関の研究者の研究の支援と、相互の情報交流を図っている。
2. 研究代表者は、(独) 国立精神・神経医療研究センターのトランスレーショナル・メディカルセンター長を務めており、本プロジェクトを通じて取得したヒト iPS 細胞樹立の技術を他の精神・神経疾患やミトコンドリア病患者からの iPS 細胞の樹立とバンク化、細胞移植治療・病態研究への応用へ発展させるための体制をセンター内に整えつつある。
3. 研究の鍵になる ES 細胞・iPS 細胞についてはパリ・パストゥール研究所 S. Tajbakhsh 博士やパリ第 6 大学の Frederic Relaix 博士から入手し、節度のある共同研究を続けている。

8. 人材育成

大学院生や博士号を持つ若い研究員に対して、関連する国内外の学会参加と成果発表を奨励している。また 2008 年度において本プロジェクトに参加していた 2 人の若手研究者については現在、米国ハーバード大学及びフランス Institut de Myologie に留学し、研鑽を積んでいる。

9. 生命倫理に係る対応

DMD 患者の線維芽細胞からの iPS 細胞樹立とマウスへの移植実験に関しては、国立精神・神経センターの倫理委員会にて承認を得ている（平成 20 年 9 月 19 日、承認番号 20-4-7）。また、動物実験に関しては、神経研究所で定めている『小型実験動物研究施設の運営に関する規則』に従って実験計画書を提出し、動物実験倫理問題検討委員会の承認を得ている。

10. 今後の展望

平成 22 年度～平成 24 年度の研究計画

1. DMD 患者からの iPS 細胞の安全かつ効率的な樹立方法の確立

- ・マウス iPS 作成で得た知見を生かし、DMD 患者由来 iPS 細胞の効率のよい樹立方法を確立する。具体的には Nanog-EGFP レポーターをレンチウイルスで線維芽細胞に導入し、リプログラミングが完全な質の高い iPS 細胞を選択・樹立する系を確立する。
- ・樹立された DMD 患者由来 iPS 細胞に完全長のジストロフィン遺伝子の発現カセットを導入する
- ・マウス iPS 細胞誘導効率に比べてヒト iPS 細胞誘導効率は低いことがわかったので、その効率を上げる誘導条件を検索する。

2. ヒト DMD 由来 iPS 細胞とヒト ES 細胞の遺伝子発現解析及びゲノムワイドな DNA メチレーションの状態を解析し、安全性や分化能との関連を探る

DMD 患者から得られた iPS 細胞は、ES 細胞に比べ、不安定で、分化能力に劣るという傾向があることが分かった。この原因を明らかにするため、

- ・マウス iPS 細胞と ES 細胞の epigenome を解析し、網羅的遺伝子発現解析を行い、安定性・分化能力との関係を明らかにする。
- ・ヒト iPS 細胞と ES 細胞の epigenome を解析し、更に網羅的遺伝子発現解析を行い、安定性・分化能

力との関係を明らかにし、得られた知見を良質なヒト iPS 細胞樹立法へと応用する。

3. ヒトiPS細胞からの骨格筋・幹細胞誘導のプロトコールの作成

骨格筋系譜へ分化した細胞でGFP蛍光蛋白質を発現するMyoD-EGFP レポーターをレンチウイルスベクターで導入したヒト iPS 細胞を作出し、アッセイに用いる。すでにマウスの系で同定した低分子化合物を用いてヒト iPS 細胞の筋分化誘導を行い、筋分化誘導プロトコールの完成を目指す。筋分化誘導後、免疫不全疾患モデルマウス（NOD/Scid/mdx）へ移植し、その有効性（生着率・再生促進効果・筋張力、筋病理像等の表現型の改善）を検証する。

4. ヒト筋芽細胞の培養条件の最適化

今まで研究が十分でなかった、ヒト筋芽細胞の培養条件の最適化を図るために、高速イメージ取得が可能な全自動細胞イメージ解析装置（Thermo Scientific Cellomics 等）を用いて、筋前駆細胞の分化能と増殖能を維持するサイトカイン・薬剤・低分子化合物・細胞培養条件に関するハイスループットスクリーニングを行う。

【共同研究等】

本プロジェクト研究で得た知見を活用して、独立行政法人国立精神・神経医療研究センターにおける精神・神経・筋疾患患者の iPS 細胞バンクの樹立を推進し、先進医療研究のためのリソースとして活用していく。更に貴重な DMD 患者由来 iPS 細胞を筋ジストロフィーの画期的な治療法の開発へと発展させるべく、理研への iPS 細胞寄託を推進する。京大小児科、慶大福田研究室との共同研究を推進する。

1 1. 特記事項

- ・ES 細胞・iPS 細胞から骨格筋系前駆細胞を低分子化合物で誘導するプロトコールは十分には確立されておらず、我々が開発している方法は世界的な視野から見ても重要かつ貴重なものである。
- ・本プロジェクト研究の一環として、骨格筋の再生と深く関係する、骨格筋内の異所性脂肪の起源となる細胞(PDGFR-alpha 陽性間葉系前駆細胞)を同定し、論文として発表した (*Nat Cell Biol* 12: 143-52, 2010)。これらの研究成果は骨格筋の再生と幹細胞の研究分野で国際的に高い評価を得て、研究代表者は、骨格筋幹細胞・筋再生に関する学会（FASEB Summer Conference 2010）で講演を依頼され、第 8 回 ISSCR では muscle stem cells の領域のプログラム委員を務めている。

1 2. 委託研究費一覧

	2 0 年度	2 1 年度	2 2 年度	計
設備備品費（千円）	23,948	16,858	13,349	51,977
人件費（千円）	4,743	7,743	6,840	20,152
業務実施費（千円）	9,309	13,399	17,811	27,120
間接経費（千円）	11,400	11,400	11,400	34,200
合計（千円）	49,400	49,400	49,400	148,200

(別紙 1)

1. 論文のリスト

- ◎○Yada E, Motohashi N, Harano C, Segawa M, Bo W, Wada MR, Yoshida M, Nakagawa R, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult mdx mice (投稿中)
- Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S (2010) Gene therapy for muscle disease. Exp. Cell Res. (in press)
- ◎Uezumi A, Fukada SI, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K (2010) Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. Nat Cell Biol. 12: 143-52.
- ◎Fukada SI, Morikawa D, Yamamoto Y, Yoshida T, Sumie N, Yamaguchi M, Ito T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H (2010) Genetic background affects properties of satellite cells and mdx phenotypes. Am J Pathol. 176(5):2414-24.
- ◎○Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada SI, Yamamoto H, Motohashi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Heike T, Nakahata T. (2009) Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. FASEB J. 23(6):1907-19.
- Miyagoe-Suzuki Y, Masubuchi N, Miamoto K, Wada MR, Yuasa S, Saito F, Matsumura KI, Kanesaki H, Kudo A, Many H, Endo T, Takeda S. (2009) Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts in vitro. Mech Dev. 126(3-4):107-16.
- ◎○Motohashi N, Uezumi S, Yada E, Fukada SI, Fukushima K, Imaizumi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S (2008) Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. Am J Pathol.173:781-91.
- Segawa M, Yamamoto Y, Yahagi H, Kanematsu M, Sato M, Ito T, Uezumi A, Hayashi S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H (2008) Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. Exp. Cell Res. 314(17):3232-44.
- Yuasa K, Hagiwara Y, Ando M, Nakamura A, Takeda S, Hijikata T. (2008) MicroRNA-206 is highly expressed in newly formed muscle fibers: implications regarding potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy. Cell Struct Funct. 33(2):163-9.
- Fukada SI, Yamamoto Y, Segawa M, Sakamoto K, Nakajima M, Sato M, Morikawa D, Uezumi A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H. (2008) CD90-positive cells, an additional cell population, produce laminin $\alpha 2$ upon transplantation to dy3k/dy3k mice. Exp. Cell Res. 314:193-203.

2. 特許出願リスト

表題	概要	出願年月日
マウス iPS 細胞を骨格筋へ分化させる低分子化合物	マウス iPS 細胞を骨格筋へ分化させる低分子化合物 (4 種) に対する特許申請	準備中

(別紙2)

他制度等による助成

1. 実施中又は平成20年度以降に実施した研究テーマ

1	助成制度	厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業:基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）		
	研究者氏名	武田 伸一	当該研究者の役割	代表研究者
	研究テーマ	アデノ随伴ウイルスを用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する遺伝子変異集積領域のエクソン・スキップ治療		
	研究期間	平成22年 2月 ～ 平成24年 3月		
	助成金合計（見込み）	20年度 千円 21年度 50,000千円 22年度 47,056千円 期間全体 未定 千円		
	本プロジェクトとの違い	ウイルスベクターを用いた DMD に対するエクソン・スキップに関する治療研究であり、本プロジェクトの細胞を用いた研究とはアプローチが異なる		
2	助成制度	厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業:臨床研究・予防・治療技術開発研究事業）		
	研究者氏名	武田 伸一	当該研究者の役割	代表研究者
	研究テーマ	モルフォリノを用いた Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエクソン51スキップ治療の臨床応用		
	研究期間	平成22年 2月 ～ 平成24年 3月		
	助成金合計（見込み）	20年度 千円 21年度 60,000千円 22年度 56,486千円 期間全体 未定 千円		
	本プロジェクトとの違い	アンチセンスを用いた DMD に対する治療研究であり、本プロジェクトの細胞を用いた研究とはアプローチが異なる		
3	助成制度	厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業:基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）		
	研究者氏名	武田 伸一	当該研究者の役割	代表研究者
	研究テーマ	アンチセンス・モルフォリノによる Duchenne 型筋ジストロフィーのエクソン・スキップ治療に向けた臨床応用研究		
	研究期間	平成19年 6月 ～ 平成22年 3月		
	助成金合計（見込み）	20年度 104,000千円 21年度 97,548千円 22年度 千円 期間全体 305,548千円		
	本プロジェクトとの違い	アンチセンスを用いた DMD に対する治療研究であり、本プロジェクトの細胞を用いた研究とはアプローチが異なる		
4	助成制度	厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）		
	研究者氏名	武田 伸一	当該研究者の役割	分担研究者
	研究テーマ	筋疾患に対するマイオスタチン阻害療法の臨床応用基盤の確立		
	研究期間	平成21年 4月 ～ 平成24年 3月		

	助成金合計 (見込み)	20 年度 千円 21 年度 1,500 千円 22 年度 2,000 千円 期間全体 未定 千円		
	本プロジェクトとの違い	マイオスタチン阻害剤を用いた DMD に対する治療研究であり、幹細胞を用いた本プロジェクトとはアプローチが異なる		
5	助成制度	科学研究費補助金（基盤研究（B））		
	研究者氏名	武田 伸一	当該研究者の役割	主任研究者
	研究テーマ	NO を介した不動態による筋萎縮の分子機構の解明と新たな治療法の開発		
	研究期間	平成 21 年 4 月 ～ 平成 24 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 千円 21 年度 6,200 千円 22 年度 4,200 千円 期間全体 未定 千円		
	本プロジェクトとの違い	筋肥大の分子メカニズムを NO/nNOS に着目して明らかにしようとする研究であり、再生プロジェクトとは全く異なる研究テーマである		
6	助成制度	精神・神経疾患研究開発費（独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター）		
	研究者氏名	武田 伸一	当該研究者の役割	代表研究者
	研究テーマ	筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ		
	研究期間	平成 22 年 4 月 ～ 平成 25 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 千円 21 年度 千円 22 年度 16,000 千円 期間全体 未定 千円		
	本プロジェクトとの違い	DMD を中心とした筋ジストロフィーに対し、モデル動物の開発を基盤として、遺伝子治療を中心とした治療研究を進め、臨床への応用を目指す全国規模の研究グループであり、本プロジェクトとの重複はない		
7	助成制度	医薬基盤研究所業務委託研究事業		
	研究者氏名	武田 伸一	当該研究者の役割	分担研究者
	研究テーマ	組織損傷の分子機構の解明とそれに基づく新たな治療法の開発		
	研究期間	平成 18 年 4 月 ～ 平成 23 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 5,000 千円 21 年度 3,000 千円 22 年度 2,000 千円 期間全体 20,000 千円		
	本プロジェクトとの違い	プロスタグランジン合成酵素阻害剤の筋ジストロフィー犬への投与実験を中心とした DMD に対する治療研究であり、本プロジェクトとの重複はない		
8	助成制度	科学研究費補助金（基盤研究（B））		
	研究者氏名	武田 伸一	当該研究者の役割	分担研究者
	研究テーマ	筋ジストロフィー犬新生仔劇症型の病因解明と胎仔治療の検討		
	研究期間	平成 21 年 4 月 ～ 平成 24 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 千円 21 年度 0 千円 22 年度 800 千円 期間全体 未定 千円		
	本プロジェクトとの違い	筋ジストロフィーのモデル動物である筋ジストロフィー犬の病態解明研究であり、本プロジェクトとの重複はない		

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

課 題 名	iPS 細胞を用いた自家角膜再生治療法の開発
代 表 機 関 名	国立大学法人大阪大学
代 表 研 究 者 名	西田 幸二
分担機関・分担研究者名	学校法人東京女子医科大学 大和 雅之

1. 課題開始時における達成目標

良好な視機能を保つ事はQOLの維持にきわめて重要であり、難治性の眼疾患に対する根治的治療の開発は社会的ニーズが極めて高い。角膜上皮疾患や角膜内皮疾患に対しては従来から同種の角膜移植術が行われてきたが、拒絶反応のため予後は不良であり、自家細胞の移植が待望されている。そこで本事業ではヒトiPS細胞を用いた角膜上皮および角膜内皮の自家細胞による再生治療法の開発を目指す。本事業の 5 年間における達成目標は、臨床研究について機関内倫理審査委員会での議論が可能な状態への到達である。年次計画を右表に示す。

iPS細胞を用いた自家角膜再生治療法の開発 年次計画表					
研究項目 (担当研究者)	H20	H21	H22	H23	H24
① 角膜上皮再生					
a) iPS細胞を用いた上皮前駆細胞への分化誘導 (西田)	←→				
b) iPS細胞由来上皮前駆細胞の純化 (西田・大和)		←→			
c) iPS細胞を用いた上皮錯乱偶発と上皮機能測定 (西田・大和)			←→		
d) iPS細胞の上皮前駆細胞マーカー発現検出のための遺伝子変異の導入 (西田)	←→				
e) 角膜上皮分化誘導法の最適化 (西田)		←→			
f) 動物モデルへの角膜上皮細胞シート移植実験 (西田)				←→	
g) バリエーション法の確立 (西田・大和)					←→
② 角膜内皮再生					
a) iPS細胞を用いた神経堤細胞への分化誘導 (西田)	←→				
b) iPS細胞由来神経堤細胞の純化 (西田)		←→			
c) iPS細胞由来神経堤細胞の機能解析 (西田)			←→		
d) iPS細胞の神経堤細胞、角膜内皮細胞への分化マーカー発現検出のための遺伝子変異の導入 (西田)	←→				
e) 角膜内皮マーカー探索 (大和)				←→	
f) 角膜内皮分化誘導法の最適化と角膜内皮組織の構築 (西田・大和)				←→	
g) 動物モデルへの角膜内皮細胞シート移植実験 (西田)					←→
h) バリエーション法の確立 (西田・大和)					←→

2. 平成22年4月末時点における課題全体の事業計画に対する研究成果

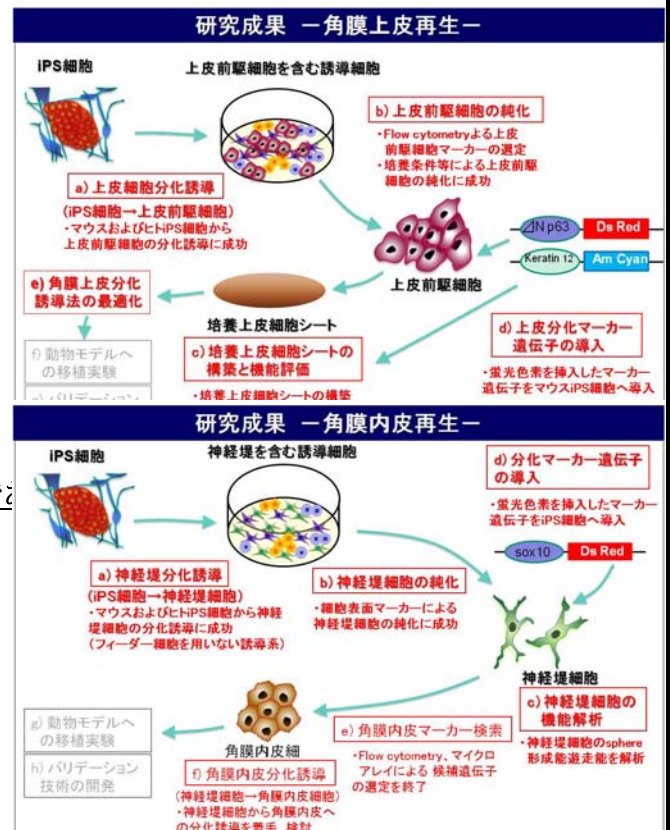
(1) 成果概要

①角膜上皮再生

iPS細胞から角膜上皮を誘導するため、まず上皮前駆細胞 (p63/K14 陽性) を誘導し、得られた前駆細胞より機能を有する培養上皮細胞シートを得る。次に、角膜上皮への分化誘導を行うことで、培養角膜上皮細胞シートの作製を目指している(右図参照)。これまでにiPS細胞に対してフィーダー細胞を用いない方法あるいはSDIA改法によって、K14 およびp63 陽性の重層化上皮幹細胞・前駆細胞の誘導に成功し、細胞表面マーカーならびに培養条件の最適化により 上皮前駆細胞の純化が可能で、的な培養上皮細胞シートを作製することに成功した。

②角膜内皮再生

iPS細胞から角膜内皮を誘導するために、まず角膜内皮の発生由来である神経堤細胞 (p75/sox10 陽性) をiPS細胞から誘導し、得られた神経堤細胞



の純化を行う。次に、得られた神経堤細胞より角膜内皮細胞への分化誘導を行うことにより培養角膜内皮細胞シートを作製することを目指している（右図参照）。これまでに、マウスiPS細胞およびヒトiPS細胞を用いて、神経堤細胞への分化誘導を行い、p75、sox10 陽性の神経堤細胞を誘導、純化することに成功した。さらに、iPS細胞より誘導した細胞は移植実験の結果より神経堤の性質を有していた。現在、iPS細胞由来神経堤細胞を用いて、角膜内皮細胞への分化誘導を試みている。また、角膜内皮細胞マーカー探索のための表面抗原の探索を行い、4 種類の細胞表面抗原をマーカー候補として得た。成果の詳細は（2）に示す。

（2）研究の進捗及び成果

①角膜上皮再生

a) iPS 細胞を用いた上皮前駆細胞への分化誘導

マウスiPS細胞に関しては、フィーダー細胞を使用しない方法およびSDIA改法によって、pax6、p63を共発現する重層化上皮幹細胞・前駆細胞を誘導することに成功した。次に、マウスの誘導実験結果に基づいて、ヒトiPS（253G1）細胞を用いた分化誘導を行った。その結果、誘導 3 週目以降に、K14 およびp63 を共発現する重層化上皮前駆細胞が認められた。さらに、複数の分化誘導条件を検討し、効率的に重層上皮細胞を誘導する方法を開発した（特許出願済み）。また現在、ヒトiPS細胞株の 201B6 および 201B7 株を用いた誘導実験を開始しており、誘導方法の最適化および株間での分化効率についても検討中である。

b) iPS 細胞由来上皮前駆細胞の純化

重層化上皮細胞の純度を向上するため、flow cytometryによる細胞表面マーカーの探索を行った。その結果、2-4 種類の上皮前駆細胞に選択的と考えられる細胞表面マーカーを絞り込むことに成功し、これらのマーカーを用いた上皮前駆細胞の純化を試みている。また、培養条件を調整することにより上皮前駆細胞を純化する方法を見出しており、細胞表面マーカーと組み合わせることで、上皮前駆細胞を純化することが可能である。

c) iPS 細胞を用いた上皮組織構築と上皮機能測定

ヒトiPS細胞より誘導した上皮前駆細胞をフィーダー上に再播種することで、10 日以降にコンフルエントに達した。免疫染色の結果、表層細胞にはZO-1 発現が確認され、さらにバリア機能をTER（経上皮電気抵抗）測定により定量したところ、ヒト正常培養角膜上皮細胞シートと同程度であった。また、温度応答性培養皿上に播種することで、低温処理によりシート状に回収可能であった。以上のことから、ヒトiPS細胞から機能的な培養上皮細胞シートが作製可能であることが示された。

d) iPS 細胞の上皮前駆細胞マーカー発現検出のための遺伝子変異の導入

p63(上皮前駆細胞マーカー)の BAC clone を入手し、マーカー遺伝子の下流にレポーターを入れたコンストラクトを作製しマウス iPS 細胞への導入を行った。現在、レポーター遺伝子の導入がされたマウス iPS 細胞を分化誘導の実験に使用し、FACS にて p63 の陽性細胞のソーティングを試みている。

e) 角膜上皮分化誘導法の最適化

マウス iPS 細胞に関しては、フィーダー細胞を用いる方法および SDIA 改法によって、K12 陽性の分化角膜上皮細胞を誘導することに成功している。現在、ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来の上皮前駆細胞を用いて、分化誘導を実施し、分化誘導条件の最適化を行っている。

②角膜内皮再生

a) iPS 細胞を用いた神経堤細胞への分化誘導

我々はこれまでにマウスおよびヒトiPS細胞（253G1）を用いて、神経堤細胞への分化誘導を行い、p75、sox10 陽性の神経堤細胞を誘導することに成功した。さらに、分化誘導条件の最適化を行うことによって、誘導効率を上昇させる条件を見出した。現在、ヒトiPS細胞株の 201B6 および 201B7 株についても

神経堤細胞への分化誘導を試みており、株間での分化効率についても検討を行っている。

b) iPS 細胞由来神経堤細胞の純化

マウスおよびヒトiPS細胞から神経堤細胞へ誘導した細胞集団から、**FACSによってp75 陽性の神経堤細胞を単離することにも成功した**。単離した細胞について、RT-PCRによりslug、sox9、sox10、AP-2などの神経堤細胞マーカーの発現を検討した結果、全て陽性であった。

c) iPS 細胞由来神経堤細胞の機能解析

マウスiPS細胞から誘導した神経堤細胞にsphere形成能があることを確認した。また、**iPS細胞から誘導した神経堤細胞をchick embryoへ移植し、この細胞に遊走能があることが示された**。すなわちiPS細胞より誘導した細胞は、神経堤細胞の性質を有していると考えられた。

d) iPS 細胞の神経堤細胞、角膜内皮細胞への分化マーカー発現検出のための遺伝子変異の導入

sox10(神経堤マーカー)、collagen typeVIII (角膜内皮マーカー) の BAC clone を入手し、マーカー遺伝子の下流に DsRed 遺伝子を入れたコンストラクトを作製し、マウス iPS 細胞へ導入した。現在このマウス iPS 細胞を分化誘導の実験を行い、RT-PCR にて DsRed の発現していたマウス iPS 細胞を確認した。

e) 角膜内皮マーカーの探索

培養角膜内皮細胞を用いて、flow cytometryにて表面抗原の探索を行った。培養角膜内皮細胞を現在市販されている 151 の細胞表面抗原に対する抗体で染色した後、flow cytometryで網羅的に解析したところ、11 の細胞表面抗原において、培養角膜内皮細胞中に陽性細胞が存在した。この内、8 抗原において、培養角膜内皮細胞の性質と発現強度との関係を検討するため、蛍光強度に応じてFACSした後、培養を行った。その結果、8 抗原中の 4 つの抗原の強陽性細胞が高い増殖能を示した。得られた各強陽性細胞集団の遺伝子発現を検討したところ、組織内角膜内皮細胞と同程度のアクアポリン 1、ZO-1、Na⁺/K⁺ ATPaseの発現を示した。これらの結果から、**4 抗原の強陽性細胞中に角膜内皮細胞の前駆細胞様の細胞が濃縮されている可能性が示唆された**。

f) 角膜内皮分化誘導法の最適化と角膜内皮組織の構築

マウスおよびヒト iPS 細胞から分化誘導した神経堤細胞について、現在角膜内皮細胞への分化誘導を試みている。これまでに我々が発見した神経堤細胞から角膜内皮細胞へ分化誘導する方法を用いて、角膜内皮細胞への分化誘導条件の最適化を実施中である。

3. 課題全体の論文発表件数	7 件
----------------	-----

4. 課題全体の特許出願件数	2 件 (うち国外 2 件)
----------------	----------------

当初目標に対する達成度

①角膜上皮再生

進捗状況について右図に示した。

これまでに、当初計画より早い段階で、マウスおよびヒト iPS 細胞から上皮前駆細胞および上皮細胞の分化誘導することに成功した (特許出願済)。さらに培養条件を最適化することで、ヒト iPS 細胞から分化誘導した上皮前駆細胞をコロニー状に純化し、培養上皮細胞シートを作製することに成功した。iPS 細胞より得られた細胞シートは正常培養角膜上皮細胞シートと同程度のバリア機能を有していることを示した。以上のことから、当初の計画通りもしくは早い段階において、iPS 細胞の上皮前駆細胞誘導、純化、培養上皮

研究項目 (担当研究者)	研究開発期間(上段: 予定、下段: 現状)				
	H20	H21	H22	H23	H24
①角膜上皮再生	←21年度末				
a) iPS細胞を用いた上皮前駆細胞への分化誘導 (西田)	前倒しで達成				
b) iPS細胞由来上皮前駆細胞の純化 (西田・大和)	計画通り進行中				
c) iPS細胞を用いた上皮組織構築と上皮機能測定 (西田・大和)	前倒しで達成				
d) iPS細胞の上皮細胞マーカー発現検出のための遺伝子変異の導入 (西田)	計画通り進行中				
e) 角膜上皮分化誘導法の最適化 (西田)	計画通り進行中				
f) 動物モデルへの角膜上皮細胞シート移植実験 (西田)					
g) バリデーション法の確立 (西田・大和)					

れた細胞シートは正常培養角膜上皮細胞シートと同程度のバリア機能を有していることを示した。以上のことから、当初の計画通りもしくは早い段階において、iPS 細胞の上皮前駆細胞誘導、純化、培養上皮

細胞シートの作製、回収、機能解析を終了することに成功しており、研究事業は順調に進捗している。

②角膜内皮再生

進捗状況について右図に示した。これまでに、当初の計画通りに、マウスおよびヒト iPS 細胞から神経堤細胞への分化誘導法の確立に成功している（特許出願済）。さらに得られた iPS 細胞由来細胞の細胞表面マーカーを用いた FACS による純化ならびに純化細胞の機能評価を終了した。以上のことから、当初の計画通り、iPS 細胞からの神経堤細胞誘導、純化、機能解析を終了することに成功しており、研究事業は順調に進捗している。現在進行中の角膜内皮細胞マーカー探索についても、既に候補となる 4 種類の細胞表面抗原の同定に成功している。同時に、マウスおよびヒト iPS 細胞の神経堤、角膜内皮細胞への分化マーカー標識のために iPS 細胞に遺伝子変異を実施中である。

研究項目 (担当研究者)	研究開発期間(上段:予定、下段:現状)				
	H20	H21	H22	H23	H24
②角膜内皮再生	←21年度末				
a) iPS細胞を用いた神経堤細胞への分化誘導 (西田)	→	→	→	→	→
b) iPS細胞由来神経堤細胞の純化(西田)	→	→	→	→	→
c) iPS細胞由来神経堤細胞の機能解析(西田)	→	→	→	→	→
d) iPS細胞への分化マーカー発現検出のための遺伝子変異の導入(西田)	→	→	→	→	→
e) 角膜内皮マーカー探索(大和)	→	→	→	→	→
f) 角膜内皮分化誘導法の最適化と角膜内皮組織の構築(西田・大和)	→	→	→	→	→
g) 動物モデルへの角膜内皮細胞シート移植実験(西田)	→	→	→	→	→
h) バリデーション法の確立(西田・大和)	→	→	→	→	→

6. 課題内の情報共有・連携体制

大阪大学および東京女子医大のグループは、課題内の情報共有のために定期的（月に 1 回）に研究ミーティングを行っている。これらの研究ミーティングを通して活発な議論が交わされ研究推進のために極めて有用な情報交換の場となっている。

7. 課題外の課題との情報共有・連携

本プロジェクト以外の他の実施課題と連携し、情報交換を行うために大阪大学・西田（代表）、理化学研究所・高橋、慶応大学・榛村、東京女子医大・大和をメンバーとする iPS 感覚器分科会を立ち上げ、第一回分科会を平成 22 年 4 月 17 日に開催した。分科会においては、活発な情報交換及び議論が行われ、今後の業務遂行のために極めて有用な会となった。本分科会は年 2 回の開催とし、今後も本プロジェクト以外のグループとの情報交換および連携を推進していく予定である。

角膜内皮マーカー探索においては、東京女子医大および東京大学拠点・中内らとの共同研究を行っており、細胞表面抗原の抗体の分与および iPS 細胞や幹細胞に関しての継続的な議論を行っている。

iPS 細胞の基本的な操作技術並びに樹立方法に関して理化学研究所バイオリソースセンター・中村らとの共同研究を行っており、技術指導、ベクター供与、意見交換を継続的に行っている。

8. 人材育成

本業務においては、再生医療の実現化に向けて研究を推進すると同時に、iPS 細胞に関する知識や実験手技のみならず、iPS 細胞の臨床応用を考えた場合における重要性や課題点、生命倫理について深い理解を得た研究者の育成を行っている。この人材育成は今後の iPS 細胞を用いた新規再生治療法の発展に極めて重要な点であると考えており、この成果は今後社会へ還元されるものと考えられる。

9. 生命倫理に係る対応

現在これらに該当する研究は行っていない。今後、疾患動物モデルへの移植実験を予定しており、これらの実験に関しては、審査書類の準備を行っている。

10. 今後の展望

①角膜上皮再生

今後の具体的な年次計画としては、平成 22 年度には遺伝子標識 iPS 細胞の作製を行い、平成 22-23 年度において角膜上皮前駆細胞への分化誘導法の確立ならびに最適化を行う。さらに平成 23-24 年度においては、得られた角膜上皮前駆細胞による培養角膜上皮細胞シートの作製および疾患動物モデルへの移植実験を実施し、その有効性および安全性を検証する。最終年度においては、臨床使用可能な iPS 細胞由来培養角膜上皮細胞シートのバリデーション法の確立を行う。また、本事業成果として出願した特許（特願 2009 - 120053）は多能性幹細胞から上皮系細胞への新規分化誘導法についての特許であり、多くの上皮系の再生医療分野ならびに研究分野での活用が期待される。この技術移転についても今後活発に行い、他分野の研究者にも本業務の成果の活用を推進していく予定である。

②角膜内皮再生

今後の具体的な年次計画としては、平成 23 年度までに、角膜内皮マーカーの探索および選択を終了し、その成果をもって、神経堤もしくは角膜内皮マーカー標識した iPS 細胞の作製を行う。同時に、iPS 由来神経堤細胞からの角膜内皮細胞への分化誘導法を確立し、平成 24 年度まで iPS 細胞由来培養角膜内皮細胞シートの疾患動物モデルへの移植を行い、その有効性および安全性を検証する。最終年度においては、臨床使用可能な iPS 細胞由来培養角膜内皮細胞シートのバリデーション法の確立を行う。また、本事業成果として出願した特許（特願 2009 - 134182）は、従来フィーダー細胞を使用して誘導していた神経堤細胞の無フィーダー誘導系による技術である。この技術は多能性幹細胞を臨床応用する際に有用なものであると考えられ、他分野での活用が期待されるものである。技術移転を目的とした共同研究について今後展開していく予定である。

1 1. 特記事項

本事業においてこれまでに、マウスおよびヒト iPS 細胞から効率的に上皮細胞を誘導する方法の開発に成功した（特許出願済）。さらには iPS 細胞より誘導した上皮前駆細胞を温度応答性培養皿上で培養することで、培養口腔粘膜上皮細胞シートと同様に低温処理により、上皮機能を有した培養上皮細胞シートとして回収することが可能であった。iPS 細胞からの培養上皮細胞シート作製は初めての試みである。また、従来フィーダー細胞を用いて誘導していた神経堤細胞を、臨床応用が容易なフィーダー細胞を用いない系で誘導できることを示した（特許出願済）。さらに、iPS 細胞の分化誘導より得られた細胞の解析を行い、マーカー発現および機能的にも神経堤細胞の性質を示すことを明らかとした。

1 2. 委託研究費一覧

	2 0 年度	2 1 年度	2 2 年度	計
設備備品費（千円）	12,707	0	0	12,707
人件費（千円）	7,703	6,480	9,920	24,103
業務実施費（千円）	17,590	31,520	28,080	77,190
間接経費（千円）	11,400	11,400	11,400	34,200
合計（千円）	49,400	49,400	49,400	148,200

(別紙 1)

1. 論文のリスト

1. Oie Y, Hayashi R, Takagi R, Yamato M, Takayanagi H, Tano Y, Nishida K. A novel method of culturing human oral mucosal epithelial cell sheet using post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified keratinocyte culture medium for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol*. 2010, *in press*.
2. Hayashi R, Yamato M, Takayanagi H, Oie Y, Kubota A, Hori Y, Okano T, Nishida K, Validation system of tissue engineered epithelial cell sheets for corneal regenerative medicine, *Tissue Engineering Part C*, 2009, *in press*.
3. Soma T, Nishida K, Yamato M, Kosaka S, Yang J, Hayashi R, Sugiyama H, Maeda N, Okano T and Tano Y. Histological evaluation of mechanical epithelial separation in epithelial laser in situ keratomileusis. *Journal of cataract and refractive surgery*. 2009 35(7):1251-9
4. Kusanagi R, Umemoto T, Yamato M, Matsuzaki Y, Nishida K, Kobayashi Y, Fukai F, Okano T. Nectin-3 expression is elevated in limbal epithelial side population cells with strongly expressed stem cell markers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Nov 13;389(2):274-8.
5. Kanayama S, Nishida K, Yamato M, Hayashi R, Maeda N, Okano T, Tano Y. Analysis of Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Secreted from Cultured Corneal and Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets in Vitro, *Br J Ophthalmol*. 2009 Feb;93(2):263-7.
6. Sugiyama H, Maeda K, Yamato M, Hayashi R, Soma T, Hayashida Y, Yang J, Shirakabe M, Matsuyama A, Kikuchi A, Sawa Y, Okano T, Tano Y and Nishida K, Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a novel feeder layer for epithelial cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2008 Oct;2(7):445-9.
7. Obokata H, Yamato M, Yang J, Nishida K, Tsuneda S, Okano T. Subcutaneous transplantation of autologous oral mucosal epithelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes.. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Sep 15;86(4):1088-96.

2. 特許出願リスト

表題	概要	出願年月日
人工多能性幹細胞からの上皮系前駆細胞・前駆細胞群及び角膜上皮細胞群の分化誘導方法	多能性幹細胞から上皮前駆細胞及び角膜上皮細胞への分化誘導方法に関する特許	平成 21 年 5 月 18 日
多能性幹細胞からの神経堤細胞群の分化誘導方法	多能性幹細胞からの神経堤細胞への分化誘導方法に関する特許	平成 21 年 6 月 3 日

(別紙2)

他制度等による助成

他制度（公的資金）による助成を受けているものがある場合には、以下に必要事項を記載してください。該当がない場合には、「助成制度」の欄に「なし」と記入してください。

1.実施中又は平成20年度以降に実施した研究テーマ

1	助成制度	厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）		
	研究者氏名	西田 幸二	当該研究者の役割	研究分担者
	研究テーマ	円錐角膜の疫学と治療実態に関する研究		
	研究期間	平成21年10月～平成22年3月		
	助成金合計 （見込み）	20年度 千円 21年度 2,000千円 22年度 千円 期間全体 2,000千円		
	本プロジェクトとの違い	円錐角膜を対象とした疫学および治療に関連した研究であり、iPS細胞を用いた角膜再生を目指す本プロジェクトとは全く内容が異なる。		
2	助成制度	厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）		
	研究者氏名	西田 幸二	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	自家培養口腔粘膜上皮シート移植による角膜上皮再生治療法の多施設共同臨床試験		
	研究期間	平成21年11月～平成24年3月		
	助成金合計 （見込み）	20年度 千円 21年度 78,000千円 22年度 73,460千円 期間全体 千円		
	本プロジェクトとの違い	自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植の多施設臨床研究を行う研究であり、iPS細胞を用いた角膜再生を目指す本プロジェクトとは全く内容が異なる。		
3	助成制度	医薬基盤研究所（保健医療分野における基礎研究推進事業）		
	研究者氏名	西田 幸二	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	角膜内皮疾患に対する多能性幹細胞を用いた新規の再生治療法の開発		
	研究期間	平成20年10月～平成24年3月		
	助成金合計 （見込み）	20年度 64,000千円 21年度 64,000千円 22年度 72,000千円 期間全体 千円		
	本プロジェクトとの違い	角膜内皮細胞および角膜内皮幹細胞を用いた角膜再生治療に関する研究であり、本プロジェクトとは内容が異なる。		
4	助成制度	NEDO技術開発機構（橋渡し促進技術開発委託事業）		
	研究者氏名	西田 幸二	当該研究者の役割	研究代表者
	研究テーマ	細胞シート再生治療の多施設臨床研究を目指した基盤システムの構築		
	研究期間	平成21年9月～平成23年3月		

	助成金合計 (見込み)	20 年度 千円 21 年度 55,500 千円 22 年度 49,950 千円 期間全体 千円		
	本プロジェクトとの違い	多施設臨床研究に必要な細胞輸送、保存などの周辺支援技術開発に関連するものであり、本プロジェクトとは内容が異なる。		
5	助成制度	厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）		
	研究者氏名	西田 幸二	当該研究者の役割	研究分担者
	研究テーマ	特発性角膜内皮炎の実態把握と診断法確立のための研究		
	研究期間	平成 22 年 4 月 ～ 平成 23 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 千円 21 年度 千円 22 年度 2,000 千円 期間全体 2,000 千円		
	本プロジェクトとの違い	特発性角膜内皮炎を対象とした研究であり、iPS 細胞を用いた角膜再生を目指す本プロジェクトとは全く内容が異なる。		

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

課 題 名	iPS 細胞由来血管前駆細胞を用いた新規血管再生医療の展開研究
代 表 機 関 名	国立大学法人名古屋大学
代 表 研 究 者 名	室原 豊明
分担機関・分担研究者名	該当なし

1. 課題開始時における達成目標

目的

高齢化社会の到来により、虚血性心疾患・閉塞性動脈硬化症などの患者数は顕著に増加している。通常はバイパス手術やカテーテルによる血管内治療を行うが、このような治療が不可能な重症例も増加している。このような症例に対して、虚血部周辺の組織から血管再生や側副血行路の発達を促し、虚血領域とその周辺組織の血流を改善し、組織障害や壊死を軽減させる新しい治療に「血管新生療法」がある。本研究ではマウスiPS細胞から血管前駆細胞（Vascular progenitor cell: VPC）を分化誘導し、さらにこれらの細胞から内皮前駆細胞（Endothelial progenitor cell: EPC）および血管平滑筋前駆細胞（Vascular smooth muscle progenitor cell: SMPC）の分化誘導を行う。これらの細胞群を用いた新規の血管再生療法、我々が開発してきた磁気ビーズと磁場を利用した細胞シートの作成とシートによる虚血心筋の血管新生療法、ならびに小口径動脈グラフトの開発（Tissue engineering）を行う。

① iPS由来血管前駆細胞(VPC)の分化誘導技術の確立

マウスiPS 細胞より内皮前駆細胞、血管平滑筋細胞などの血管前駆細胞(Vascular progenitor cell: VPC)の分化誘導技術を確立する。

② iPS由来血管前駆細胞(VPC)の安全性と血管新生能の検討

マウスiPS細胞を、ヌードマウスの皮下などに移植し、奇形種の形成が見られないか安全性を検討する。各分化段階にある細胞(Flk-1 陽性細胞など)を移植することで、血管再生が誘導できるか否かを検討する。細胞培養系では、細胞の増殖能・遊走能・ネットワーク形成能など血管再生に関連した機能を評価する。

③ iPS細胞由来血管前駆細胞・心筋細胞のシート化技術の確立

マウスiPS細胞由来血管前駆細胞・心筋細胞の誘導が可能になった場合、これらの細胞を磁気シート工学技術により、細胞シート作成を試みる。マウス生体実験（in vivo）において血管再生能、心機能改善能があるか否かにつき検討を加える。

2. 平成22年4月末時点における課題全体の事業計画に対する研究成果

（1）成果概要

(1) iPS細胞由来血管前駆細胞(iPS VPC)の分化誘導方法の検討

a) マウスiPS細胞を分化誘導培地にて培養したところ、培養4.5日目で最大35%、平均17%のFlk-1陽性細胞を認め、再現性をもって発現することが確認。b) iPS細胞由来Flk-1陽性細胞の血管内皮管腔形成網への取り込みが確認。c) 月齢20ヶ月のC57/BL6マウスの骨髓樹状細胞(agingマウス)からiPS細胞の作成、Flk-1陽性細胞への分化誘導に成功。マウス由来 iPS細胞からの血管前駆細胞(iPS VPC)の分化誘導に成功した。

(2) iPS細胞由来血管前駆細胞(iPS VPC)の安全性と血管新生能の検討

ヌードマウスに下肢虚血モデルを作成し、マウスiPS細胞由来Flk-1陽性細胞を虚血側に移植し、下肢虚血後の虚血改善効果について評価。Flk-1陽性細胞移植群では、コントロール群と比して有意に下肢虚血側の血流の改善を認めた。血管新生促進作用は、移植細胞の細胞数用量依存性に認められた。Flk-1陽性細胞移植群では、下肢虚血側骨格筋で有意にVEGFの発現が増加していた。移植後60日間には、奇形種(teratoma)の形成は認められなかった。

(3) iPS細胞由来VPCの細胞シート作成

上記(1)(2)で示したごとく、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞による血管新生効果が確認。そこで、より効率的、効果的な細胞移植法の作成に着手。磁気シート工学技術を利用し、マウスiPS細胞由来Flk-1陽性細胞を用いた移植用細胞シートの作製を開始した。マウスiPS細胞に磁性ナノ微粒子(MCL)を取り込み、低接着性培養皿上にリングを配置、リング内にiPS細胞を播種、培養皿底部に磁石を設置し、incubateさせることによりシートの作成に成功した。現在、細胞シートの強度等の問題もあり、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞単独シートとiPS細胞と脂肪細胞由来幹細胞とのコンビネーションシートの2種のシートの作成に着手している。

(2) 研究の進捗及び成果

(1) iPS細胞由来血管前駆細胞(iPS VPC)の分化誘導方法の検討

平成20年度に、京都大学再生医科学研究所 附属幹細胞医学研究センター 幹細胞分化制御研究領域 山下潤博士のチームとの共同研究により、マウスiPS細胞由来の血管前駆細胞(iPS VPC)の分化誘導方法および培養方法を習得。これらの方法を用いて、以下の分化誘導にて検討を行った。コラーゲン・タイプIV コート培養皿に、マウスiPS細胞を播種($1.7 \times 10^3 / \text{cm}^2$: 10 cm dish, および60 mm dish)し、血清入り分化誘導培地にて培養。フローサイトメトリーにて、Flk-1陽性細胞出現率を評価した。これまでの研究から、iPS細胞やES細胞由来のFlk-1陽性細胞は、培養条件によって血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、あるいは心筋細胞にも分化できるため、いわゆる血管前駆細胞(Vascular progenitor cell: VPC)と呼ばれている。これらのFlk-1陽性細胞をフローサイトメトリーにて定量すると、培養4.5日目のFlk-1陽性率が最も高かったため、4.5日目を目安としてMACS(磁気細胞分離装置)、もしくはFACS Vantage sortingにてFlk-1陽性細胞を分離。最大35%、平均17%のFlk-1陽性細胞を認め、再現性をもって発現することが確認された(図1)。これらのiPS細胞より得られたFlk-1陽性細胞を蛍光標識した後、ヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cell: HUVEC)とともに共培養し、マトリゲル上での内皮管腔形成網(血管新生構築)への細胞組み込み能を検討した。iPS細胞由来Flk-1陽性細胞の血管内皮管腔形成網への取り込みが確認された(図2: 赤色がFlk-1陽性細胞で無色がHUVEC)。また、これまで胎児繊維芽細胞(MEF)由来iPS細胞を使用した結果であったことを考慮し、高齢マウスから作製したiPS細胞においても同様に血管前駆細胞への分化誘導をしようかどうかを検討することとした。我々は、月齢20ヶ月の高齢C57/BL6マウスの骨髓樹状細胞からiPS細胞の作成に新たに成功した。またこの高齢マウスのiPS細胞からも、Flk-1陽性細胞への分化が起きることが確認された(論文準備中)。現在、この高齢マウス iPS細胞からの分化誘導効率等を、若齢マウス由来iPS細胞と比較する等してさらに検討中である。

図1

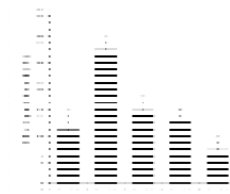


図2

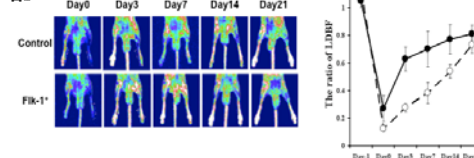


(2) iPS細胞由来血管前駆細胞(iPS VPC)の安全性と血管新生能の検討

ヌードマウスにおいて、片側大腿動脈を結紮削除することにより、下肢虚血モデルを作成し、上記(1)のごとく単離したマウスiPS細胞由来Flk-1陽性細胞

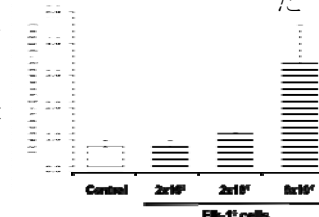
(6×10^4 cell/mice)を虚血側の骨格筋内に移植して、下肢虚血後の虚血改善効果について評価した。図3に示すようにFlk-1陽性細胞移植群では、コントロール群と比して術後3, 7, 14日で有意に下肢虚血側の血流の改善を認めた(●: 細胞移植群, ○: コントロール群)。これらの血流改善促進

図3



作用は、血管新生促進作用によると思われる、組織内の毛細血管密度の増加も伴った。さらに、移植細胞の細胞数によって、用量依存性(dose dependency)も確認された(図4)。次に、細胞移植にともなう血管新生作用の機序として、血管新生因子の一つ、VEGFの発現を検討した。図5に示すようにFlk-1陽性細胞移植群では、コントロール群と比較して、術後3, 7日目の下肢虚血側骨格筋内でVEGFの発現が増加していた。bFGF, HGF, IGF等は細胞移植後に有為な変化は見られなかつ

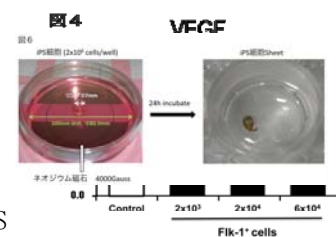
図5



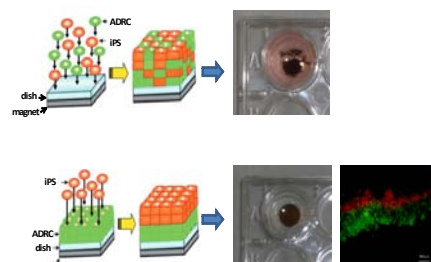
(データ非表示)。なお、移植後の安全性に関する検討では、比較的短期(移植後60日間)での奇形腫(teratoma)の形成は肉眼的に認められなかった。長期的な奇形腫形成の有無に関しては、下肢筋やその他の臓器での腫瘍の形成に関し、現在経過観察を行っているところである。

(3) iPS細胞由来VPCの細胞シート作成

上記(1) (2)で示したごとく、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞による血管新生効果が、in vitro およびin vivoで確認できた。そこで次のステップである、より効率的・効果的な細胞移植法の作成に着手した。我々は、名古屋大学が有する磁気シート工学技術を利用し、マウスiPS細胞由来Flk-1陽性細胞を用いた移植用細胞シートの作製を開始した。図6に示すように、マウスiPS細胞を用いた、磁気細胞シートの作成を試みた。培養4.5日目のiPS細胞に磁性ナノ微粒子（MCL）を取り込んだ。低接着性培養皿上に直径7mmのリングを配置し、リング内に2x10⁶cell/wellのiPS細胞を播種、培養皿底部に磁石を設置し、24時間培養することにより、細胞シートの作成に成功した。現在、この作成されたiPS細胞による細胞シートの組織学的検討、シート特性等を検討中である。同時に、MACS(磁気細胞分離)もしくはFACS Vantage sortingを用いて、Flk-1陽性細胞を単離した後、細胞シートを作成すること（マウスiPS細胞由来Flk-1陽性細胞による移植用細胞シートの作成）を試みている。このシート作成のため、添加する磁性粒子濃度やインキュベート時間等の至適培養条件・操作条件等を現在検討中である。しかしながら、現在、iPS細胞単独シートではシートの強度に難点があり、大型シートやシートの大量精製に困難を極めている。そこでiPS細胞単独シートの作成と同時に、iPS細胞と脂肪細胞由来幹細胞



(adipose-derived regenerative cell: ADRC)とのコンビネーションシートの作成にも着手している。ADRCは我々や他の研究施設からの報告により、細胞移植により、血管新生効果を発揮する事が明らかとなっている。しかしながら、ADRCはFLK-1陽性細胞の発現が見られず、血管内皮への分化も認めない事が知られている。以上から、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞とADRCという特性の違う2つの幹細胞群をコンビネーションすることにより、より強力な血管新生作用とシート作成の上での難点であった、強度や大量精製が実現可能と仮説した。我々は最近、下記のごとく、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞とADRCとで重層するシートの作成に成功している（図7）。ADRCとiPSをモザイク状に混合した場合にはシートが非常に脆弱であったが、ADRCシート上にiPSを播種した2層構造のシートは、ADRC単独シートと同程度の強度を有していた）現在、これらコンビネーション・ハイブリッド細胞シートの細胞移植後の血管新生作用（ヌードマウスin vivo）に関して検討中である。



（adipose-derived regenerative cell: ADRC）とのコンビネーションシートの作成にも着手している。ADRCは我々や他の研究施設からの報告により、細胞移植により、血管新生効果を発揮する事が明らかとなっている。しかしながら、ADRCはFLK-1陽性細胞の発現が見られず、血管内皮への分化も認めない事が知られている。以上から、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞とADRCという特性の違う2つの幹細胞群をコンビネーションすることにより、より強力な血管新生作用とシート作成の上での難点であった、強度や大量精製が実現可能と仮説した。我々は最近、下記のごとく、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞とADRCとで重層するシートの作成に成功している（図7）。ADRCとiPSをモザイク状に混合した場合にはシートが非常に脆弱であったが、ADRCシート上にiPSを播種した2層構造のシートは、ADRC単独シートと同程度の強度を有していた）現在、これらコンビネーション・ハイブリッド細胞シートの細胞移植後の血管新生作用（ヌードマウスin vivo）に関して検討中である。

3. 課題全体の論文発表件数	18 件
4. 課題全体の特許出願件数	0 件
5. 当初目標に対する達成度	
① iPS由来血管前駆細胞(VPC)の分化誘導技術の確立 マウスiPS細胞より内皮前駆細胞、血管平滑筋細胞などの血管前駆細胞(Vascular progenitor cell: VPC)の分化誘導技術はほぼ確立した。分化誘導効率化やヒトiPS細胞での分化誘導技術の確立、エイジングによる影響、疾患特異性の有無を検討することが課題である。 ② iPS由来血管前駆細胞(VPC)の安全性と血管新生能の検討 マウスiPS細胞由来Flk-1陽性細胞が血管新生能を有することや短期での安全性は確認できた。移植の効率性、大動物での効果の有無が今後への課題である。同時に、数年単位での長期の安全性も今後の課題である。 ③ iPS細胞由来血管前駆細胞・心筋細胞のシート化技術の確立 現在、磁気シート工学技術を利用し、マウスiPS細胞由来Flk-1陽性細胞を用いた移植用細胞シートを作製中である。シート作成技術は確立し、現在、各シートの強度、性質等を確認中である。iPS細胞由来Flk-1陽性細胞単独シートはシートが脆弱で応用には、さらなる工夫を要すると思われる。iPS細胞と脂肪細胞由来幹細胞とのコンビネーションシートは作成、強度に問題なく、現在その効果を確認中である。	
6. 課題内の情報共有・連携体制	
週一度の本プロジェクトのためのカンファランスを行い、データの解釈、プロジェクトの方向性等に関して指導を行っている。また、カンファランスでは、つねに素データの共有をメンバーで行っている。実験の効率化を計るため、グループが細胞実験グループと動物実験グループに分かれ、連携を密にし、	

効率的にプロジェクトが行えるようなシステム作りを構築している。
7. 課題外の課題との情報共有・連携
平成20年度に、京都大学再生医科学研究所 附属幹細胞医学研究センター 幹細胞分化制御研究領域 山下潤博士のチームとの共同研究により、マウス iPS 細胞由来の血管前駆細胞 (iPS VPC) の分化誘導方法および培養方法を習得して以降、情報の共有や技術提供を相互に行っている。また、細胞シート技術に関して、名古屋大学工学部との連携を深め、より効率的な細胞シート開発を目指している。名古屋大学免疫学教室とは、オリジナル iPS 細胞開発のため、密な連携をとっている。
8. 人材育成
現在、本プロジェクトには、研究代表者の室原から教官、大学院生、海外からの留学生と、世代、国籍を問わず、様々な研究者が参加している。また名古屋大学附属中学、高等学校の学生の研究見学なども積極的に受け入れ、将来の研究者育成にも力を注いでいる。最近、本プロジェクトに参加していた中国人留学生の李医師は、北京市内の大学で教官職を得て帰国した。以上のように本研究プロジェクトを通じて、各世代間の橋渡しができており、人材育成も十分に計られていると自負する。
9. 生命倫理に係る対応
現在のところ、当施設で利用、作成している iPS 細胞はすべてマウス iPS 細胞であり、倫理的には問題ない。今後、ヒト iPS 細胞の利用、作成を計画しているため、現在、ヒト iPS 細胞の利用、作成に関する研究計画書を名古屋大学倫理審査委員会に提出する準備を行っているところである。
10. 今後の展望
① iPS由来血管前駆細胞(VPC)の分化誘導技術の確立 マウスiPS細胞より内皮前駆細胞、血管平滑筋細胞などの血管前駆細胞(Vascular progenitor cell: VPC)の分化誘導技術はほぼ確立したため、今後は、分化誘導効率化を検討する必要がある。ヒトiPS細胞での分化誘導技術の確立や、エイジングによる影響、疾患特異性の有無を検討することにより、臨床応用への至適条件の探索を行う。 ② iPS由来血管前駆細胞(VPC)の安全性と血管新生能の検討 マウスiPS細胞由来Flk-1陽性細胞の下肢虚血後の虚血改善効果は確認されたため、今後は、さらに効率性を計るため、シート化技術への移行を行う。また心筋梗塞後の虚血改善効果など、他の疾患への応用を検討する。臨床応用に向けて、ウサギやミニブタ等を利用し、大動物への効果判定を行う。並行して、長期投与における安全性の確認を行っていく。 ③ iPS細胞由来血管前駆細胞・心筋細胞のシート化技術の確立 現在、磁気シート工学技術を利用し、マウスiPS細胞由来Flk-1陽性細胞を用いた移植用細胞シート作製を開始している。iPS細胞由来Flk-1陽性細胞単独シートとiPS細胞と脂肪細胞由来幹細胞とのコンビネーションシートの2種のシートの作成に着手しており、これらのシートを完成させ、その血管新生効果を確認する。また臨床応用を念頭に、大型サイズのシート作成技術の確立を行う。 細胞シート作成技術が確立されれば、様々な細胞移植が可能となる。既に我々は、iPS 細胞シートのみならず、脂肪組織由来幹細胞、間葉系幹細胞を用いた細胞シートの作成、マウス下肢虚血モデルへの移植に成功している。この技術に関しては、現在、今後の展開を、名古屋産業科学研究所(中部 TL0)と相談中である。血管新生治療のみならず、神経疾患、皮膚疾患など、様々な疾患に応用が期待されるものと思われ、シート技術が確立した場合の技術移転等に関して、前向きに進める予定である。 平成22年度-平成24年度の研究計画 ① iPS由来血管前駆細胞(VPC)の分化誘導技術の確立 a) 高齢マウス iPS 細胞からの分化誘導効率や、若齢マウス由来 iPS 細胞と比較検討。 b) ヒト iPS 細胞からの分化誘導法の確立。 c) 循環器領域における疾患特異性 iPS 細胞の作成。 高齢化社会の到来により、虚血性心疾患・閉塞性動脈硬化症などの患者数は顕著に増加している。循環器領域における疾患特異的iPS細胞のバンク登録は非常に有益だと思われる。また、ヒトiPS細胞での分化誘導技術の確立や、エイジングによる影響、疾患特異性の有無を検討することにより、臨床応用への

至適条件の探索を行うことは必須と考える。

② iPS由来血管前駆細胞 (VPC) の安全性と血管新生能の検討

a) 年単位でのiPS細胞由来Flk-1陽性細胞移植後の安全性確認。

b) ミニブタ（大動物）を用いた前臨床研究。iPS細胞由来Flk-1陽性細胞の冠動脈投与により、心筋梗塞巣の縮小効果を有するか否かを検討する。

c) 効率化に向けて、シート化技術への移行。

d) ヒト iPS 細胞を利用した血管新生効果の確認

iPS細胞由来Flk-1陽性細胞の血管新生効果は確認されたため、今後は、臨床応用に向け、ミニブタを用いた前臨床研究とヒトiPS細胞の利用。効率性を計るため、シート化技術への移行を行う。

③ iPS細胞由来血管前駆細胞・心筋細胞のシート化技術の確立

a) マウスiPS細胞由来Flk-1陽性細胞を用いた移植用細胞シート作製。iPS細胞由来Flk-1陽性細胞単独シートとiPS細胞と脂肪細胞由来幹細胞とのコンビネーションシートの2種のシートを作成。その血管新生効果をマウスへの移植にて確認する。

b) 大型サイズの細胞シート作成技術の確立。

c) 大動物での細胞シートの効果確認。

細胞シート作成技術の確立は、様々な疾患への応用が可能となる。既に我々は、iPS細胞シートのみならず、脂肪細胞由来幹細胞、間葉系幹細胞を用いた細胞シートの作成、マウスへの移植に成功している。この技術に関しては、現在、今後の展開を、名古屋産業科学研究所(中部 TL0)と相談中である。血管新生治療のみならず、神経疾患、皮膚疾患など、様々な疾患に応用が期待されると思われる、シート技術が確立した場合の技術移転等を積極的に進める。

1 1. 特記事項

我々はミニブタ心筋梗塞モデル作成と細胞治療の方法として、心筋梗塞時の冠動脈内投与方法（ドラッグデリバリーシステム）を完成させた（Kondo et al. Circ Cardiovasc Interv 2010）。したがって、マウスでの研究成果を、ミニブタを用いた前臨床試験へ速やかに移行出来る準備が出来ている。

1 2. 委託研究費一覧

	2 0 年 度	2 1 年 度	2 2 年 度	計
設備備品費（千円）	23,096	11,550	5,198	39,844
人件費（千円）	3,914	11,637	11,777	27,328
業務実施費（千円）	11,390	15,213	21,426	48,029
間接経費（千円）	11,520	11,520	11,520	34,560
合計（千円）	49,920	49,920	49,920	149,760

(別紙 1)

1. 論文のリスト

- ◎○ Suzuki H, Shibata R, Kito T, Ishii M, Li P, Yoshikai T, Nishio N, Ito S, Numaguchi Y, Yamashita JK, Murohara T, Isobe K. Therapeutic angiogenesis by transplantation of induced pluripotent stem cell-derived Flk-1 positive cells. **BMC Cell Biol.** 2010. in revise. 投稿中
- Kondo K, Shibata R, Unno K, Shimano M, Ishii M, Kito T, Shintani S, Walsh K, Ouchi N, Murohara T. Impact of a single intracoronary administration of adiponectin on myocardial ischemia/reperfusion injury in pig model. **Circ. Cardiovasc. Interventions.** 2010. in press.
- Shumiya T, Shibata R, Shimizu Y, Ishii M, Kubota R, Shintani S, Murohara T. Evidence for the therapeutic potential of ex vivo expanded human endothelial progenitor cells using autologous serum. **Circ J.** 2010;74:1006-1013.
- Onodera R, Teramukai S, Tanaka S, Kojima S, Horie T, Matoba S, Murohara T, Matsubara H, Fukushima M. Bone marrow mononuclear cells versus G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells for treatment of lower limb ASO: pooled analysis for long-term prognosis. **Bone Marrow Transplant.** 2010; in press.
- Murohara T. Cord blood-derived early outgrowth endothelial progenitor cells. **Microvasc. Res.** 2010; 79:174-177.
- Li P, Shibata R, Unno K, Shimano M, Furukawa M, Ohashi T, Cheng X, Nagata K, Ouchi N, Murohara T. Evidence for the importance of adiponectin in the cardioprotective effects of pioglitazone. **Hypertension.** 2009; 55: 69-75.
- Murohara T, Shintani S, Kondo T. Autologous adipose-derived regenerative cells for therapeutic angiogenesis. **Curr. Pharm. Des.** 2009; 15: 2784-2790.
- Kondo M, Shibata R, Miura R, Shimano M, Kondo K, Li P, Ohashi T, Kihara S, Maeda N, Walsh K, Ouchi N, Murohara T. Caloric restriction stimulates revascularization in response to ischemia via adiponectin-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase. **J Biol Chem.** 2009;284:1718-1724.
- Kondo K, Shintani S, Shibata R, Murakami H, Murakami R, Imaizumi M, Kitagawa Y, Murohara T. Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2009;29:61-66.
- Kado M, Lee JK, Hidaka K, Miwa K, Murohara T, Kasai K, Saga S, Morisaki T, Ueda Y, Kodama I. Paracrine factors of vascular endothelial cells facilitate cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2008; 377: 413-418.

2. 特許出願リスト

表題	概要	出願年月日
なし		平成 年 月 日

(別紙 2)

他制度等による助成

他制度（公的資金）による助成を受けているものがある場合には、以下に必要事項を記載してください。該当がない場合には、「助成制度」の欄に「なし」と記入してください。

1. 実施中又は平成 20 年度以降に実施した研究テーマ

1	助成制度	文部科学省 科学研究費補助金 基盤 A		
	研究者氏名	室原 豊明	当該研究者の役割	代表研究者
	研究テーマ	血管再生障害からみた糖尿病性心筋症の基礎解析と新規治療法の開発		
	研究期間	平成 20 年 4 月 ～ 平成 23 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 11,500 千円 21 年度 11,500 千円 22 年度 11,500 千円 期間全体 34,500 千円		
	本プロジェクトとの違い	糖尿病に伴う心筋障害を血管新生の観点から研究するものであり、現時点では iPS 細胞とは関連性がない。しかしながら、将来的に関連する可能性は 0 % ではない。		

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

課 題 名	脳室周囲白質軟化症の幹細胞治療の実現化
代 表 機 関 名	公立大学法人名古屋市立大学
代 表 研 究 者 名	澤本 和延
分担機関・分担研究者名	該当なし

1. 課題開始時における達成目標

研究目的：新生児の虚血性脳疾患である脳室周囲白質軟化症（PVL）の幹細胞治療を目標として、内在性幹細胞の活性化と細胞移植という二つの再生方法を同時に研究し、脳の再生医療の実現に必要な細胞メカニズム解明と基盤技術の開発を目指す。

業務項目 ①脳室周囲白質軟化症幹細胞治療技術の開発（本課題はこの一項目のみから成る）
その内容と到達目標は、以下の三点に区分される。

（１）内在性神経幹細胞による PVL 治療法の開発：代表研究者（澤本）らが解明した脳室下帯幹細胞による再生機構（Sawamoto et al., *Science*, 2006; Yamashita et al., *J Neurosci.*, 2006 など）を用いる。

i) PVL モデルマウスを作成し、脳の傷害部における各種細胞の脱落・増殖とその経時的変化、傷害後の脳室下帯における細胞産生・移動とニューロン・オリゴデンドロサイトへの分化の変化を解析する。

ii) 再生を促進する薬剤を探索し、マウスを用いてその効果を検討する。

iii) コモンマーモセット PVL モデルを作成し、マウスで得られた知見を霊長類で検討する。

（２）iPS 細胞由来神経系細胞の移植による PVL 治療法の開発

i) 慶應義塾大学が開発した ES 細胞および iPS 細胞からの神経幹細胞の誘導方法を習得し、名古屋市立大学において培養技術を確認して、ドナー細胞としての適性を評価する。

ii) 飛田・戸荻らが近年開発したラット PVL モデル(Mizuno et al., *Neonatology*, 2008)へ細胞を移植し、治療効果を組織学的・行動学的に解析する。

（３）腫瘍化防止技術の開発

中西らが近年明らかにした細胞増殖制御機構(Shimada et al., *Cell*, 2008 など)を応用して幹細胞に強制的な早期老化形質を導入し、移植後の腫瘍化を防止する。具体的には、iPS 細胞または ES 細胞に老化誘導遺伝子カセット（TopBP1 フラグメントなど）を薬剤誘導プロモーター制御下で発現誘導し、老化形質誘導能および腫瘍化への影響を解析する。

実施体制：上述の 1-3) の目標を達成するため、名古屋市立大学に所属する研究者の連携によって業務を実施する（図 1）。

澤本（研究代表者、再生医学分野）・戸荻（新生児・小児医学、22 年度より学長）は、PVL の臨床所見に基づきモデル動物を作製し、内在性幹細胞を用いた再生法について検討する。飛田（脳神経生理

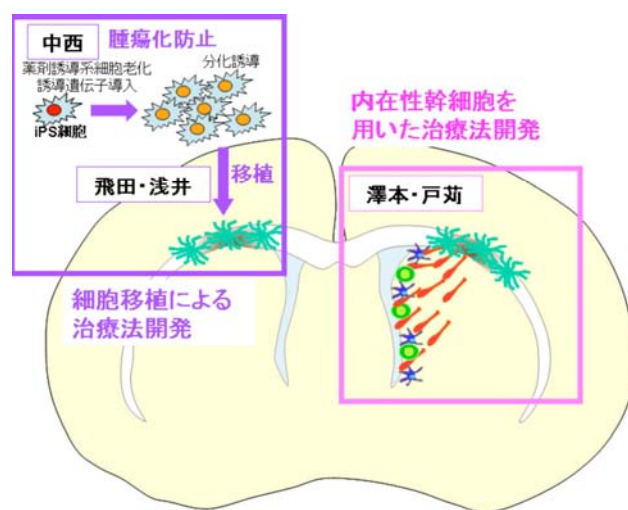


図 1：実施体制

学)・浅井(分子神経生物学)は移植細胞の調製法を確立し、細胞移植による治療法について検討する。中西(細胞生化学)は、移植細胞の腫瘍化防止操作を確立し、その効果を検証する。

2. 平成22年4月末時点における課題全体の事業計画に対する研究成果

(1) 成果概要

業務項目①脳室周囲白質軟化症幹細胞治療技術の開発(本課題はこの一項目のみから成る)

(1) 内在性神経幹細胞による PVL 治療法の開発: 脳室下帯から傷害部位への細胞移動における血管及びアストロサイトの役割、オリゴデンドロサイト前駆細胞による白質再生機構などを明らかにした(図2)。低分子化合物ライブラリー及び既知の薬剤の中から、再生誘導効果を示す候補分子を得た。コモンマーマセツト新生仔および成体の脳室下帯がヒトに類似した構造を有することを確認し、虚血モデルにおける再生を確認した。

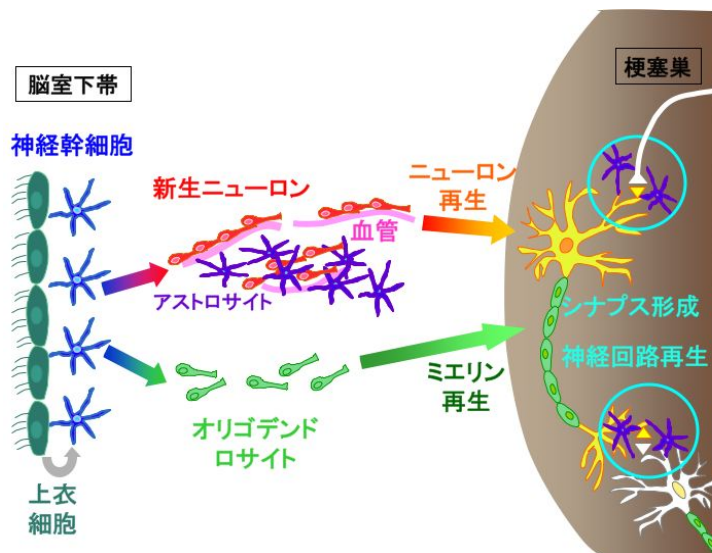


図2: 本研究で明らかになった内在性再生機構

(2) iPS 細胞由来神経系細胞の移植による PVL 治療法の開発: 慶應拠点が開発した ES 細胞・iPS 細胞からの神経幹細胞の誘導方法と独自のオリゴデンドロサイト作成・濃縮方法(図3)により細胞を調製した。ラット PVL モデルへ神経幹細胞を移植したところ、運動機能が改善した。移植した細胞は脳内に生着し、分化していた。

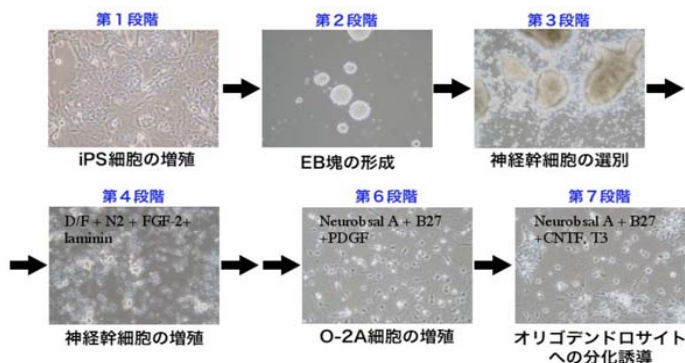


図3: iPS 細胞からのオリゴデンドロサイト誘導

(3) 腫瘍化防止技術の開発: Chk1 のクロマチンからの遊離とヒストン H3-T11 の脱リン酸化による細胞老化誘導のメカニズムを明らかにした。さらに、レンチウイルスを用

いて薬剤誘導性に細胞老化遺伝子を導入する発現系を構築した。当初タモキシフェン/エストロゲン受容体系を用いて実験を行ったが、幹細胞で発現した蛋白質が核内に移行しないことが判明したため、Tet-ON システムを用いた方法を使用して、良好な結果を得た。

(2) 研究の進捗及び成果

業務項目①脳室周囲白質軟化症幹細胞治療技術の開発(本課題はこの一項目のみから成る)

(1) 内在性神経幹細胞による PVL 治療法の開発

i) 脳室下帯から傷害部位へ細胞が移動する際に、血管を足場とし(Kojima et al., *Stem Cells*, 2010)、アストロサイトとの相互作用(Kaneko et al., *Neuron*, accepted pending minor revision)が重要な働きをしていることを明らかにした。トランスジェニックマウスを用いた脳傷害モデルを確立し、オリゴデンドロサイト前駆細胞が傷害後5日で増殖し脳梁で白質を部分的に再生することを明らかにした。ii) 低分子化合物ライブラリー及び既知の薬剤の中から、神経前駆細胞の移動等に影響を及ぼすものをスクリーニングし、候補分子を得た。脳内に投与するため除放化製剤を作成し、投与方法の検討を行っている。iii) コモンマーマセツトの脳室下帯がヒトに類似した構造を有することを明らかにした(Sawamoto et al., submitted)。中大脳動脈閉塞モデルを確立し、傷害部位におけるニューロン再生を確認した。

(2) iPS 細胞由来神経系細胞の移植による PVL 治療法の開発

i) 慶應義塾大学の ES 細胞・iPS 細胞からの神経幹細胞の誘導方法を習得し、名古屋市立大学において培養技術を確認した。さらに独自の方法でオリゴデンドロサイトを作成し、磁気ビーズを用いて濃縮する方法を確認した。ii) ラット PVL モデルへ移植したところ、運動機能の改善が認められた。移植した細胞は脳内に生着し、主にアストロサイトに分化していることが判明した。

(3) 腫瘍化防止技術の開発

Chk1 のクロマチンからの遊離とヒストン H3-T11 の脱リン酸化による細胞老化誘導・腫瘍化防止機構を明らかにした (Niida et al., *EMBO J.* in revision; Shimada et al., *EMBO Rep.* in revision など)。さらに、レンチウイルスを用いて薬剤誘導性に細胞老化遺伝子を導入する発現系を構築した。当初タモキシフェン／エストロゲン受容体系を用いて実験を行ったが、幹細胞で発現した蛋白質が核内に移行しないことが判明したため、Tet-ON システムを用いた方法に切り換えて良好な結果を得ている。

3. 課題全体の論文発表件数	47 件
----------------	------

4. 課題全体の特許出願件数	0 件
----------------	-----

5. 当初目標に対する達成度

業務項目①脳室周囲白質軟化症幹細胞治療技術の開発（本課題はこの一項目のみから成る）：75%
内在性神経幹細胞による PVL 治療法の実現については、業務計画書に記載した内容をほぼ全て実施し、大きな成果が得られた。細胞移植による治療法の実現については、iPS 細胞からの神経幹細胞の作成と移植後の行動解析は計画通りに実施できた。移植後の細胞分化と宿主側組織の解析方法の検討に時間を要したが、現在進行中である。腫瘍化防止技術の実現については、細胞老化誘導技術の基盤となる大きな成果が得られ、細胞の老化を誘導する方法を確認できた。幹細胞に効率良く老化遺伝子を導入する方法の確認に時間を要したが、既に技術的な問題を解決し移植実験を準備中である。

6. 課題内の情報共有・連携体制

代表者によるマネジメント・課題内の情報共有促進のための工夫

本課題の事業には、代表研究者を中心として、五つの研究室にまたがる研究者が参画し、共同で実験を実施している（分担機関は存在しない）。全ての研究者が代表機関である名古屋市立大学の川澄キャンパスに所属しているため、日常的に交流が行われている。

代表者と本課題の参加メンバーは毎月一度、研究ミーティングを開催し、各自が進捗状況と研究の予定を報告し、議論を行っている。これにより、定期的に研究の方向性を全員で確認するとともに、情報を共有して効率良く研究を進めることが可能になっている。代表者は、その他に、メーリングリストによる情報交換、懇親会、学外より関連した研究者を招きセミナーを開催するなどの工夫を行っている。

7. 課題外の課題との情報共有・連携

本プロジェクトの他の実施課題との関係

本課題は、慶應義塾大学拠点と特に強い連携関係にある。ES・iPS 細胞からの神経幹細胞の作成は、本学の研究者を慶應義塾大学に派遣して技術（未発表）を習得し、また研究材料の提供を受けて、本学の研究室で実施している。コモンマーマウス脳虚血モデル（成体）は、慶應義塾大学の岡野研究室のメンバーが実験動物中央研究所で作成し、固定後の脳を名古屋市立大学のメンバーが解析した。名古屋市立大学におけるコモンマーマウス飼育施設の整備に際しては、名古屋市立大学のメンバーを実験動物中央研究所へ派遣して飼育・管理方法を習得するとともに、実験動物中央研究所より伊藤豊志雄部長を本学へ招き、指導を受けた。その他、京都大学よりマウス・ヒト iPS 細胞株の提供を受け、本学の研究者が理化学研究所の iPS 細胞培養講習会に参加した。

本プロジェクト以外の研究者等との関係

本課題の推進に際しては、国内外の多数の研究者から得た情報を活用しながら推進している。さらに、既に臨床研究をスタートしている企業と共同研究を行い、本課題で得られる成果（内在性神経幹細胞による PVL 治療技術）の臨床応用を見据えた検討を行っている。また、本課題のメンバーである戸莉（申請時は病院長・小児科教授、H22 年度より学長）は本プロジェクトの前段階の臨床研究として、「エリスロポエチンによる未熟児脳性麻痺の予防に関する多施設共同研究」を実施している。昨年末に「用法の安全性確認のための事前小規模多施設臨床研究」が終了し、エリスロポエチンの投与の安全性が証明されたので、本年 8 月より、全国主要新生児集中治療室（NICU）約 50 施設を対象に、多施設共同研究が開始する予定である。移植による治療方法の開発に関連した細胞老化誘導機構におけるクロマチン制御の役割の解明に関しては、CREST（iPS 作成・制御等の医療基盤技術）研究課題「ヒト iPS 細胞の分化能と腫瘍化傾向を反映するマーカー遺伝子群の探索」代表である古関明彦博士（理化学研究所）と連携して行っている。	
8. 人材育成	
以下のように、本課題に参加して成果を挙げた若手研究者のキャリアアップに貢献した。 三角吉代 研究員（本プロジェクトで雇用）よりヨーテボリ大学研究員（2009 年 3 月） 匹田貴夫 研究員（本プロジェクトで雇用）より特任助教就任（2009 年 10 月） 島田緑 特任助教（本プロジェクトで雇用）より講師へ昇任（2009 年 4 月） 金子奈穂子 研究員より助教就任（2009 年 4 月） 青山峰芳 助教より講師へ昇任（2009 年 10 月） 飛田秀樹 准教授より教授へ昇任（2009 年 2 月）	
9. 生命倫理に係る対応	
該当しない	
10. 今後の展望	
業務項目①脳室周囲白質軟化症幹細胞治療技術の開発（本課題はこの一項目のみから成る）	
22-24 年度の研究計画と達成目標	
iPS 細胞を用いた PVL 治療に最適なドナー細胞の調製とその移植方法、組織再生を促進する方法、並びに腫瘍化を防止する方法を検討するため以下の実験を行う。 ・PVL モデルに ES 細胞および iPS 細胞より分化誘導させた神経幹細胞またはオリゴデンドロサイト前駆細胞を移植し、移植細胞の生着・分化と機能改善の相関関係、腫瘍形成の可能性について、長期的な解析を行う。 ・ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの分化誘導法を検討し、同様に PVL モデルへの移植を行う。 ・内在性の再生機構を活性化するとともに iPS 細胞由来神経系細胞の移植による組織再生を促進する方法として、これまで効果が認められた化合物または既知の因子について解析し、その脳への投与方法と治療効果を検討する。 ・移植された細胞の腫瘍化を防止する方法として、老化誘導遺伝子の薬剤誘導型発現ウイルスベクターを ES 細胞または iPS 細胞に導入し、恒常的な細胞増殖停止（老化）を誘導できるかどうか検討する。これらの細胞を脳に移植し、薬剤投与によって老化を誘導する。移植細胞の腫瘍化を組織学的に解析し、個体における腫瘍化防止効果を検討する。	
進捗状況と今後の展望、期待される成果など	
脳疾患は iPS 細胞による再生医療の対象としては最も実現が困難なものの一つと考えられる。本課題では、PVL を対象として細胞移植による再生医療の可能性を検討するとともに、薬剤投与による再生誘	

導の技術の開発に取り組んでいる。これらを組み合わせることにより、研究期間終了時まで確実に再生医療の実現化に近づくとともに、脳疾患の再生医療研究が進むべき方向性を示すことができる。

H20-21年度の研究で明らかになった内在性幹細胞による脳組織再生の様々な新規メカニズムを臨床応用へつなげるため、薬剤投与により脳組織再生を誘導する方法の開発を進めている。各々の技術について、動物実験で効果が確認され次第、特許を出願する予定である。また本技術の社会還元を促進するため、臨床研究を推進する企業との共同研究も進めている。さらに、参加メンバーの戸莉（現学長）が中心となり、本学大学病院内に、本プロジェクトに関連した再生医療に関する実施部門の設置を検討しており、将来の臨床応用が可能であると考えている。また本研究で開発される技術は神経幹細胞のみでなく、様々な内在性組織幹細胞に作用して再生を促進することも期待できる。

PVL モデルラットを用いた神経幹細胞移植実験については、これまでに観察された機能改善のメカニズムを、移植後の脳内の組織解析により明らかにする。さらに、我々が確立したマウス iPS 細胞からオリゴデンドロサイトを分化させる培養法を改良して、現在世界的にも知られていないヒト iPS 細胞からオリゴデンドロサイトへ分化させる培養法を確立し、ラット PVL モデルへ移植実験を行う。本研究により得られる成果は、多くの脱髄性疾患の治療に利用される可能性がある。さらに、上述の薬剤投与による再生誘導技術を駆使して、移植された細胞による治療効果を高める方法を開発する。

細胞移植による再生医療を行うためには、移植後の腫瘍形成を防止することが必要不可欠である。しかし、残存未分化幹細胞のみを標的として効率的に細胞死あるいは細胞分裂停止を誘導することは非常に困難である。本課題の特徴は、移植された細胞すべてに恒久的な細胞増殖停止状態である老化形質を誘導することで、再生した細胞の分化機能に影響を及ぼさずに腫瘍形成を完全に防ぐ技術を開発する点にある。22-24 年度においては、既に作成した細胞老化誘導遺伝子のテトラサイクリン誘導発現系ベクターを用いて幹細胞への老化形質誘導法を確立し、腫瘍化防止効果を示す実験を行う。本技術は iPS 細胞による再生医療に広く役立つものであり、技術移転を開始するとともに、本プロジェクトの会議等で積極的に発表し、他の研究者に対して細胞老化誘導技術を広めていきたい。

1 1. 特記事項

参加研究者の受賞

島田緑 Gordon Research Conference Best Poster Prize (2008 年)

島田緑 The 24th Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA (II) Poster Prize (2009 年)

金子奈穂子 日本再生医療学会 Young Investigator Award 基礎研究部門 最優秀賞 (2010 年)

1 2. 委託研究費一覧

	20 年度	21 年度	22 年度	計
設備備品費 (千円)	12,560	3,925	0	16,485
人件費 (千円)	11,854	12,954	7,604	32,412
業務実施費 (千円)	14,046	21,581	19,319	54,946
間接経費 (千円)	11,538	11,538	8,077	31,153
合計 (千円)	49,998	49,998	35,000	134,996

(別紙 1)

1. 論文のリスト (#は責任著者を示す。)

◎は主に本課題の成果から成る論文、○は謝辞に記載されている論文を示す

- ◎○Kaneko N, Marin O, Koike M, Hirota Y, Uchiyama Y, Wu JY, Lu Q, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, Okano H, Rubenstein JLR, Sawamoto K[#]. New neurons clear the path of astrocytic processes for rapid migration in the adult brain.
(神経前駆細胞が脳内を移動する際のアストロサイトとの相互作用の重要性を報告)
2010 年日本再生医療学会 YIA (基礎研究部門) 最優秀賞 受賞論文
Neuron 投稿中 (Accepted pending minor revision)
- ◎○Shimada M, Haruta M, Niida H, Sawamoto K, Nakanishi M[#]. PP1 γ is a phosphatase responsible for dephosphorylation of histone H3 at threonine 11 after DNA damage.
(早期細胞老化誘導における PP1 ガンマーによるヒストン H3 のトレオニン 11 脱リン酸化の重要性を報告)
EMBO Rep. 投稿中 (Minor revision)
- Niida H, Murata K, Shimada M, Ogawa K, Suzuki K, Fujigaki H, Khaw AK, Banerjee B, Prakash H, Miyamoto T, Miyoshi I, Shirai T, Motoyama N, Delhase M, Appela E, Nakanishi M[#]. Cooperative functions of Chk1 and Chk2 reduce tumor susceptibility in vivo.
(早期細胞老化が個体レベルでガン発症を抑制することを報告)
EMBO J. 投稿中 (Minor revision)
- ◎○Sawamoto K[#], Hirota Y, Alfaro-Cervello C, Soriano-Navarro M, He X, Hayakawa-Yano Y, Yamada M, Hikishima K, Tabata H, Iwanami A, Nakajima K, Toyama Y, Itoh T, Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM[#], Okano H. Cellular composition and organization of the subventricular zone and rostral migratory stream in the adult and neonatal common marmoset brain.
(成体および新生マーモセットの脳室下帯がヒト脳に類似し、ヒトPVLモデル作成に適していることを報告。本研究では、マーモセットの供給・飼育は、慶應義塾大学 (岡野)・実験動物中央研究所 (伊藤) が担当した。)
J. Comp. Neurol. 投稿中 (Under review)
- Ikeda M, Hirota Y, Sakaguchi M, Yamada O, Kida Y, Ogura T, Otsuka T, Okano H, Sawamoto K[#]. Expression and proliferation-promoting role of Diversin in the neuronally committed precursor cells migrating in the adult brain.
(神経前駆細胞が移動しながら増殖するメカニズムを報告)
Stem Cells 投稿中 (Under review)
- ◎○Kojima T, Hirota Y, Ema M, Takahashi S, Miyoshi I, Okano H, and Sawamoto K[#]. Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum.
(PVL モデルマウスにおいて脳室下帯神経幹細胞由来の前駆細胞が血管を足場として傷害部位へ移動することを報告)
Stem Cells 28: 545-554 (2010). Faculty of 1000 Biology 推薦論文
- Niida H, Katsuno Y, Sengoku M, Shimada M, Yukawa M, Ikura M, Ikura T, Kohno K, Shima H, Suzuki H, Tashiro S, and Nakanishi M[#]. Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase.
(DNA 損傷部位への dNTP 供給機構を報告)
Genes Dev. 24: 333-338 (2010). Faculty of 1000 Biology 推薦論文
- Katsuno Y, Suzuki A, Sugimura K, Okumura K, Zineldeen DH, Shimada M, Niida H, Mizuno T, Hanaoka F, Nakanishi M[#]. Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells.
(老化誘導における DNA 複製期制御の役割を報告)
Proc Natl Acad Sci U S A. 106: 3184-3189 (2009).
- Kaneko N, Sawamoto K[#]. Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions.
(脳室下帯に存在する内在性の再生機構について解説)
Neurosci Res 63: 155-164 (2009). (日本神経科学学会奨励賞受賞記念総説論文)

2. 特許出願リスト

表題	概要	出願年月日
なし		平成 年 月 日

(別紙 2)

他制度等による助成

他制度（公的資金）による助成を受けているものがある場合には、以下に必要事項を記載してください。該当がない場合には、「助成制度」の欄に「なし」と記入してください。

1. 実施中又は平成 20 年度以降に実施した研究テーマ

1	助成制度	厚生労働科学研究費補助金 疾病・障害対策研究分野 肝炎等克服緊急対策研究		
	研究者氏名	澤本和延	当該研究者の役割	代表
	研究テーマ	慢性 C 型肝炎のインターフェロン療法における幹細胞機能の変化とうつ病発症に関する基礎・臨床連携研究		
	研究期間	平成 21 年 6 月 ～ 平成 24 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 千円 21 年度 8,500 千円 22 年度 7,200 千円 期間全体 22,900 千円		
	本プロジェクトとの違い	C 型肝炎のインターフェロン療法における副作用として生じるうつ病と海馬のニューロン新生の関係について研究する班研究であり、本プロジェクトとは目的・実施内容が全く異なる。		
2	助成制度	科学研究費補助金 若手研究 (S)		
	研究者氏名	澤本和延	当該研究者の役割	代表
	研究テーマ	成体脳におけるニューロン新生のメカニズムの解明		
	研究期間	平成 21 年 4 月 ～ 平成 26 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 千円 21 年度 33,000 千円 22 年度 11,800 千円 期間全体 80,200 千円		
	本プロジェクトとの違い	正常な動物における生理的なニューロン新生のメカニズムを解明する研究である。脳室周囲白室軟化症の病態モデルを用いて再生医療を目指す本事業とは目的・実施内容が異なる。		
3	助成制度	厚生労働省精神・神経疾患研究開発費		
	研究者氏名	澤本和延	当該研究者の役割	分担
	研究テーマ	発達期における骨格系と髄液循環動態の発生学的特性に基づく高次脳脊髄機能障害の治療および総合医療に関する研究		
	研究期間	平成 20 年 4 月 ～ 平成 23 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 1,000 千円 21 年度 1,000 千円 22 年度 1,000 千円 期間全体 3,000 千円		
	本プロジェクトとの違い	二分脊椎・水頭症の病態解明を目的に脳室上衣細胞の繊毛を研究するものであり、本プロジェクトとは全く異なるものである。		
4	助成制度	厚生労働科学研究補助金難治性疾患克服研究事業		
	研究者氏名	澤本和延	当該研究者の役割	分担
	研究テーマ	正常圧水頭症の疫学・病態と治療に関する研究		

	研究期間	平成 20 年 4 月 ～ 平成 23 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 500 千円 21 年度 1,000 千円 22 年度 1,000 千円 期間全体 2,500 千円		
	本プロジェクトとの違い	正常圧水頭症の病態解明の一環として、脳脊髄液中の蛋白質の機能を解析するものであり、本プロジェクトとは全く異なるものである。		
5	助成制度	科学研究費補助金特定領域研究		
	研究者氏名	澤本和延	当該研究者の役割	代表
	研究テーマ	成体マウス・小型魚類脳における新生神経細胞移動の分子機構		
	研究期間	平成 20 年 4 月 ～ 平成 22 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 4,000 千円 21 年度 4,000 千円 22 年度 千円 期間全体 8,000 千円		
	本プロジェクトとの違い	ゼブラフィッシュ成魚脳における神経細胞移動に関する研究であり、本プロジェクトとは全く異なるものである。		
6	助成制度	科学研究費補助金特定領域研究		
	研究者氏名	澤本和延	当該研究者の役割	代表
	研究テーマ	成体脳内における新生ニューロンの長距離・高速移動を可能にする細胞外環境		
	研究期間	平成 20 年 4 月 ～ 平成 22 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 2,300 千円 21 年度 2,300 千円 22 年度 千円 期間全体 4,600 千円		
	本プロジェクトとの違い	正常な動物の脳における神経細胞移動のメカニズムを解明するための研究であり、脳室周囲白室軟化症のモデル動物における再生誘導を研究する本プロジェクトとは目的と実施内容が異なる。		
7	助成制度	科学研究費補助金学術創成研究費		
	研究者氏名	澤本和延	当該研究者の役割	分担
	研究テーマ	成体脳神経幹細胞の活性化とニューロン新生：その制御機構の解明と可視化技術の開発		
	研究期間	平成 19 年 4 月 ～ 平成 22 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 3,000 千円 21 年度 3,000 千円 22 年度 千円 期間全体 9,000 千円		
	本プロジェクトとの違い	ニューロン新生過程の蛍光蛋白質による可視化と成体神経幹細胞の制御因子としての Galectin-1 の機能の解明を目的としたものであり、本研究とは異なる。		
8	助成制度	科学研究費補助金基盤研究 (B)		
	研究者氏名	澤本和延	当該研究者の役割	代表
	研究テーマ	成体脳室下層で生まれる神経細胞の移動制御機構		
	研究期間	平成 19 年 4 月 ～ 平成 21 年 5 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 4,200 千円 21 年度 828 千円 22 年度 千円 期間全体 10,428 千円		
	本プロジェクトとの違い	神経細胞の移動について研究するものであるが、脳室周囲白室軟化症のモデルを用いた研究は対象としない。		

9	助成制度	科学研究費補助金挑戦的萌芽研究		
	研究者氏名	澤本和延	当該研究者の役割	代表
	研究テーマ	脳室上衣細胞による脳脊髄液流の制御		
	研究期間	平成 19 年 4 月 ～ 平成 21 年 5 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 900 千円 21 年度 181 千円 22 年度 千円 期間全体 2,381 千円		
	本プロジェクトとの違い	脳室内の髄液流に関する研究であり、本プロジェクトとは全く異なる研究である。		
10	助成制度	科学研究費補助金特定領域研究		
	研究者氏名	澤本和延	当該研究者の役割	代表
	研究テーマ	成体神経前駆細胞におけるベータカテニン分解制御の意義		
	研究期間	平成 19 年 4 月 ～ 平成 21 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 2,800 千円 21 年度 千円 22 年度 千円 期間全体 5,500 千円		
	本プロジェクトとの違い	ベータカテニンの分解に関与する蛋白質の発現と機能を解析する研究であり、本プロジェクトとは全く異なる研究である。		
11	助成制度	科学研究費補助金特定領域研究		
	研究者氏名	澤本和延	当該研究者の役割	代表
	研究テーマ	上衣繊毛ナノシステムの協調運動制御		
	研究期間	平成 19 年 4 月 ～ 平成 21 年 3 月		
	助成金合計 (見込み)	20 年度 2,600 千円 21 年度 千円 22 年度 千円 期間全体 5,200 千円		
	本プロジェクトとの違い	繊毛の運動の制御メカニズムに関する研究であり、本プロジェクトとは全く異なる研究である。		

