

「幹細胞産業応用促進基盤技術開発／
モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発／
研究用モデル細胞の創製技術開発」
事後評価報告書

平成22年11月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構

研究評価委員会

平成22年11月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
理事長 村田 成二 殿

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会 委員長 西村 吉雄

NEDO技術委員・技術委員会等規程第32条の規定に基づき、別添のとおり
評価結果について報告します。

目次

はじめに	1
分科会委員名簿	2
審議経過	3
評価概要	4
研究評価委員会におけるコメント	7
研究評価委員会委員名簿	8
第1章 評価	
1. プロジェクト全体に関する評価結果	1-1
1. 1 総論	
1. 2 各論	
2. 個別テーマに関する評価結果	1-17
2. 1 ヒトES細胞の加工技術開発	
2. 2 ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発	
2. 3 研究用モデル細胞の構築技術の開発	
3. 評点結果	1-31
第2章 評価対象プロジェクト	
1. 事業原簿	2-1
2. 分科会における説明資料	2-2
参考資料1 評価の実施方法	参考資料 1-1
参考資料2 評価に係る被評価者意見	参考資料 2-1

はじめに

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構においては、被評価プロジェクトごとに当該技術の外部専門家、有識者等によって構成される研究評価分科会を研究評価委員会によって設置し、同分科会にて被評価対象プロジェクトの研究評価を行い、評価報告書案を策定の上、研究評価委員会において確定している。

本書は、「幹細胞産業応用促進基盤技術開発／モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発／研究用モデル細胞の創製技術開発」の事後評価報告書であり、第25回研究評価委員会において設置された「幹細胞産業応用促進基盤技術開発／モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発／研究用モデル細胞の創製技術開発」（事後評価）研究評価分科会において評価報告書案を策定し、第26回研究評価委員会（平成22年11月11日）に諮り、確定されたものである。

平成22年11月
独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会

「研究用モデル細胞の創製技術開発」

事後評価分科会委員名簿

(平成22年6月現在)

	氏名	所属、役職
分科会長	おかの ひでゆき 岡野 栄之	慶應義塾大学 医学部 生理学教室 教授
分科会長 代理	たにぐち ひでき 谷口 英樹	横浜市立大学大学院 医学研究科 臓器再生医学 教授
委員	きたむら としお 北村 俊雄*	東京大学 医科学研究所 細胞療法分野/ 幹細胞シグナル制御 教授
	さくらだ かずひろ 桜田 一洋	株式会社ソニーコンピューターサイエンス研究所 シニアリサーチャー
	てらさき てつや 寺崎 哲也	東北大学大学院 薬学研究科 薬物送達学分野 教授
	なかにし あつし 中西 淳	武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 開拓研究所 主席研究員
	ふくだ けいいち 福田 恵一	慶應義塾大学 医学部 循環器内科 教授

敬称略、五十音順

注*：実施者の一部と同一大学であるが、所属部署が異なるため（実施者：東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室）「NEDO 技術委員・技術評価委員規程(平成22年7月1日改正)」第34条（評価における利害関係者の排除）により、利害関係はないとする。

審議経過

● 第1回 分科会（平成22年6月8日）

公開セッション

1. 開会、分科会の設置、資料の確認
2. 分科会の公開について
3. 評価の実施方法と評価報告書の構成について
4. プロジェクトの概要説明

非公開セッション

5. プロジェクトの詳細説明
6. 全体を通しての質疑

公開セッション

7. まとめ・講評
8. 今後の予定
9. 閉会

● 第26回研究評価委員会（平成22年11月11日）

評価概要

1. 総論

1) 総合評価

ヒトES細胞の産業利用を目指した我が国初のプロジェクトとして、戦略的な目標を設定し、ヒトES細胞を用いた研究モデル細胞の創出に大きく貢献した。さらに我が国が現在力を入れているヒトiPS細胞を用いたモデル細胞の創製にも大きな貢献をしたものと考えられ、高く評価できる

プロジェクトリーダーの強力なリーダーシップの下、バックグラウンドが異なる研究者グループを率いて研究開発に取り組んだ結果、世界的に優位性のある複数の成果を創出した。また、創薬利用の観点から実用化につながる複数の芽を創出することが出来、創薬における薬効評価・安全性評価に加えて、幹細胞研究・再生医学研究などの関連分野や今後のiPS細胞研究に大いに活かされると考えられる。

その一方、この優れた成果は、論文発表はされているものの、研究者コミュニティへの還元については、改善の余地がある。事業化あるいは公的バンクへの deposit 等により、研究者コミュニティへの還元を加速されたい。

2) 今後に対する提言

今後の創薬研究の効率化とそのための基盤形成のためにも、ヒトES細胞を用いた研究用モデル細胞の創製技術開発研究をさらにパワーアップし、世界標準を作っていくことを期待したい。

本プロジェクトの成果を創薬の場で実用化に繋げるためには、製薬企業が組みたいと考える疾患分野や治療戦略に基づき評価系を構築するなど、製薬企業との共同開発を推進する必要性がある。

また、実用化に至らなかったモデル細胞について、今後の具体的な検討課題を整理し、得られた成果をより有効に活用するように今後の支援体制について検討することが必要である。

2. 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

安全性が高く、有効性も良好な新薬の開発に資するヒトES細胞の産業応用は、我が国の製薬企業の競争力を高めるための新技術開発であるが、開始時は倫理面、制度面でのハードルが高く、ニーズは高いもののリスクが極めて大きいことから民間活動のみでは改善できないものであることが多く、又は公共性

が高いことに鑑み、NEDOの関与が必要とされる事業である。

本プロジェクトは日本におけるヒトES細胞の基盤研究技術を底上げするもので、国家戦略上も重要な事業と位置づけられ、欧米諸国が国家的支援を行っている状況から、本事業が実施されたことは、健康安心イノベーションプログラムの目標達成のために大きな寄与をしたものと評価できる。

また、本研究で得られた知見は創薬だけではなく幹細胞を用いた再生医療や基礎研究にも利用可能であり、創薬基盤支援のみならず、ライフサイエンス研究全般への大きな波及効果が期待される。

2) 研究開発マネジメントについて

再生医学・再生医療の内外の技術動向、市場動向等を見たとき、本プロジェクトは、ヒトES細胞の加工技術、分化誘導技術、モデル細胞構築という研究の流れを的確に考慮した戦略的な目標が設定されており、適切であると考えられる。プロジェクトリーダーのリーダーシップのもと、幹細胞の基礎生物学だけでなく、企業の研究者、薬理の研究者など分野を超えた世界トップクラスの研究開発実施体制で、各研究グループが連携して研究が推進された。また、直接的に関係が薄かった装置開発テーマの途中中止や、追加公募による細胞外環境の人工制御技術開発を加えるなど、適切なマネジメントがされており評価できる。

しかしこの分野は競争が激しく、特にここ数年で技術が大きく進歩し欧米を中心に実用化も始まっている情勢を考慮し、到達目標の再設定や競争力のあるテーマへの絞込みをより積極的に行なう必要があった。また、一部メンバーの事業全体への貢献度や実用化への積極的な関与に物足りなさを感じた。今後の実用化に向けた課題とその実現体制についてさらなる検討が必要であると考えられる。

3) 研究開発成果について

細胞外マトリックスの研究やヒトES細胞の相同組み換え技術など世界的に優位性がある複数の成果を創出し、全体の目標達成レベルは高く、投入予算に見合った成果が得られている。また、本プロジェクトの成果は一部商品化されており、本邦初のものとして再生医療、再生医学の研究に資するところとして、評価できる。

ヒトES細胞を利用して薬剤候補の毒性試験が可能であることは創薬に役立つことが期待される。世界的にみてヒトES細胞から分化誘導した細胞が創薬向けに広く製造販売されていない現状を考えると、実用化に向けた今後の取り組みこそが重要である。

成果の発表は論文や学会発表など適切に行われているが、今後、本プロジェクトで得られた研究成果に関する情報発信を積極的に行うことにより、様々なヒト細胞の産業利用の重要性についての社会的認知度を高めていくことが期待される。

また、細胞加工技術について特許出願しないでノウハウとして技術を保有していることは、アカデミアでの使用については問題がないが、企業での使用や事業化の際には支障が出る可能性がある。

4) 実用化の見通しについて

全体として実用に向けて研究が進展し、ヒトES細胞由来心筋細胞を用いた心毒性評価法や人工基底膜による分化誘導制御技術開発など他の競合技術と比較して高い優位性を見出すことができる。さらに、創薬における薬効評価・安全性評価に加えて、幹細胞研究・再生医学研究などの関連分野やiPS細胞研究への波及効果も期待出来る。

しかし、本プロジェクトでは、神経、肝臓等将来有望な領域を含むものの、実用化に向けてまだ基礎生物学的な検討のほか、製造した細胞の同等性評価など検討課題が残されている。学術論文を先に出しておきながら、事業化は外国のグループに先をこされた例（ヒトES細胞の未分化維持システム）もあり、一層の努力を期待したい。

研究評価委員会におけるコメント

第26回研究評価委員会（平成22年11月11日開催）に諮り、了承された。研究評価委員会からのコメントは特になし。

研究評価委員会

委員名簿（敬称略、五十音順）

職 位	氏 名	所 属、役 職
委員長	西村 吉雄	学校法人早稲田大学大学院 政治学研究科 (科学技術ジャーナリスト養成プログラム) 客員教授
委員長 代理	吉原 一紘	オミクロンナノテクノロジージャパン株式会社 最高顧問
委員	安宅 龍明	オリンパスビジネスクリエイツ株式会社 事業企画本部 戦略探索部 探索2グループ シニアマネージャー
	伊東 弘一	学校法人早稲田大学 理工学術院総合研究所 客員教授（専任）
	稲葉 陽二	日本大学 法学部 教授
	大西 優	株式会社カネカ 顧問
	尾形 仁士	三菱電機エンジニアリング株式会社 相談役
	小林 直人	学校法人早稲田大学 研究戦略センター 教授
	小柳 光正	東北大学未来科学技術共同研究センター 教授
	佐久間一郎	国立大学法人東京大学大学院 工学系研究科 精密機械工学専攻 教授
	菅野 純夫	国立大学法人東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 教授
	架谷 昌信	愛知工業大学 工学部機械学科 教授・総合技術研究所所長
宮島 篤	国立大学法人東京大学 分子細胞生物学研究所 教授	

第1章 評価

この章では、分科会の総意である評価結果を枠内に掲載している。なお、枠の下の「○」「●」「・」が付された箇条書きは、評価委員のコメントを原文のまま、参考として掲載したものである。

1. プロジェクト全体に関する評価結果

1. 1 総論

1) 総合評価

ヒトES細胞の産業利用を目指した我が国初のプロジェクトとして、戦略的な目標を設定し、ヒトES細胞を用いた研究モデル細胞の創出に大きく貢献した。さらに我が国が現在力を入れているヒトiPS細胞を用いたモデル細胞の創製にも大きな貢献をしたものと考えられ、高く評価できる。

プロジェクトリーダーの強力なリーダーシップの下、バックグラウンドが異なる研究者グループを率いて研究開発に取り組んだ結果、世界的に優位性のある複数の成果を創出した。また、創薬利用の観点から実用化につながる複数の芽を創出することが出来、創薬における薬効評価・安全性評価に加えて、幹細胞研究・再生医学研究などの関連分野や今後のiPS細胞研究に大いに活かされると考えられる。

その一方、この優れた成果は、論文発表はされているものの、研究者コミュニティへの還元については、改善の余地がある。事業化あるいは公的バンクへの deposit 等により、研究者コミュニティへの還元を加速されたい。

〈肯定的意見〉

- 多能性幹細胞（ヒトES細胞）を創薬のツールとして開発するという先見性の高い研究提案を2004年に行い、5年間適切なテーマの選択と集中により運営を行い、幹細胞を用いた創薬（幹細胞創薬）の可能性と課題を明らかにした点で日本に貴重な財産になると考える。特に単に幹細胞の技術があれば事足りるのではなく、創薬の観点から有用な細胞を製造するための技術開発（細胞分化、組み換え細胞）が単純ではないことを明らかにした点が大きい。その上でいくつかの技術的な突破口を開いたことは評価に値する。また疾患フェノタイプ、薬物の副作用を本研究で構築した細胞評価系で再現し、心筋分化成熟因子の薬剤スクリーニングを実施してリード化合物の発見にこぎつけた点も評価に値する。
- ヒト幹細胞の産業利用を目指した我が国初のプロジェクトとして十分に先導的役割を果たしたものと評価できる。
- プロジェクト全体として、5年間に予想以上の進展があった。この成果はiPS研究など他の幹細胞研究分野にも波及効果がある。
- 本事業においては、ヒトES細胞を活用し、①ヒトES細胞の加工技術開発、②ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発、③研究用モデル細胞構築技術開発という3つの柱を基軸にした研究が展開し、ヒト多能性幹細胞を用いた研究モデル細胞の創出に大きく貢献したと思われる。我が国

が現在力を入れている ヒト iPS 細胞を用いたモデル細胞の創製にも大きな貢献をしたものと考えられ、高く評価できる。

- ヒトのES細胞を樹立し、これを加工する技術を具現化させるために多くの研究チームが一体となって研究を進展させたという点、人工細胞外マトリックスのプロトタイプを樹立した点、ES細胞の遺伝子の **homologous recombination** の方法を開発した点は極めて独創性の高い研究であると考えられる。
- 代表者の中辻教授の強力なリーダーシップの下、バックグラウンドが異なる研究者グループを率いて研究開発に取り組んだ結果、「研究用モデル細胞の創製技術開発」においていくつかの画期的な研究成果が生まれた。総合的な評価として、当初の目的を達成することができたと言える。
- 本プロジェクトは日本におけるヒトES細胞の研究プラットフォーム構築に大きく貢献し、創薬利用の観点から実用化につながる複数の芽を創出することが出来た。その成果は、今後のiPS細胞研究に大いに活かされると考えられる。

〈問題点・改善すべき点〉

- 現象論が先行して詳細なメカニズム解析が追いついていない部分もあるが、5年間という期間を考えると今後の課題と考えられる。
- 幹細胞研究者と薬学領域の研究者との間に存在するギャップは、まだ、埋まっているとは言えない。本プロジェクトが推進されたことによって、どのような解決課題が抽出され、どのような課題が未解決のまま残ったのかが必ずしも明確化されていない。
- ヒトES細胞の規制により、大量のヒトES細胞株を樹立できない点は、このプロジェクトの推進において足かせとなっていると考えられる。
- 加工技術、分化誘導技術、構築技術の各々について、一部、当初目標を上回る優れた成果が得られているが、課題の難易度に比べて開発期間が不十分であったため、開発された各要素技術の相乗効果はこれから発揮されるものと考えられる。
- 本事業においては、上記の3つの柱を中心に研究が進行し、多くの成果を生んだことは高く評価できる。その一方、この優れた成果は、論文発表はされているものの、研究者コミュニティへの還元については、改善の余地がある。事業化あるいは公的バンクへの **deposit** 等により、研究者コミュニティへの還元を加速されたい。
- ヒトES細胞を特定の細胞に選択的に分化誘導する技術が一部の領域で未成熟であり、今後の改善が求められる。

〈その他の意見〉

- ・ 再生医療という出口を考えると、倫理面の問題を除けば、多くの点においてヒト ES 細胞が iPS 細胞の方が優れている。その点を強調しつつ、iPS 研究とうまく補完していく研究体制が望まれる。

2) 今後に対する提言

今後の創薬研究の効率化とそのため基盤形成のためにも、ヒトES細胞を用いた研究用モデル細胞の創製技術開発研究をさらにパワーアップし、世界標準を作っていくことを期待したい。

本プロジェクトの成果を創薬の場で実用化に繋げるためには、製薬企業が組みたいと考える疾患分野や治療戦略に基づき評価系を構築するなど、製薬企業との共同開発を推進する必要がある。

また、実用化に至らなかったモデル細胞について、今後の具体的な検討課題を整理し、得られた成果をより有効に活用するように今後の支援体制について検討することが必要である。

〈今後に対する提言〉

- ・ ヒト ES 細胞の使用に関する規制の緩和がなされたとはいえ、まだまだハードルが高いと感じる企業や大学の研究者も少なくないようである。一層の規制緩和を望みたい。
- ・ 今後の創薬研究の効率化とそのため基盤形成のためにも、このヒト多能性幹細胞 (ES 細胞)を用いた研究用モデル細胞の創製技術開発研究は、さらにパワーアップし、世界標準を作っていくことを期待したい。そのためにも、国策的には経済産業省系のグラントによるサポートが相応しいであろう。
- ・ 一方、今回の事業で開発されたヒト ES 関連ツール (標識化されたレポーター細胞株、相同組み換えのための新規ベクターシステム) には大変有用なものも少なくなく、NEDO の成果として、研究者コミュニティに早く available な状況にすべきかと考える。
- ・ ヒト心筋細胞を用いた製品が上市されたことは評価できる。今後、担当企業が引き続き製品の改良を継続的に自力で推進することが出来るかが課題である。また、本プロジェクトの推進によって創出された様々な技術の基礎研究を含む幅の広い活用についての適切な方策も重要である。
- ・ 疾患表現型の細胞アッセイ系での再現ならびに薬物スクリーニングへの応用に向けて、特に細胞分化に関する基礎研究を継続することが望まれる。一方で最終的な医薬品へとつなげるためには、製薬企業が組みたいと考える疾患分野や治療戦略に基づき評価系を構築することが求められる。このような疾患分野と治療戦略は機密の観点で公的なプロジェクトでの公開が難しく、基礎研究と製薬企業を橋渡しするベンチャー企業の育成も必要が必要である。
- ・ 本プロジェクトの成果を創薬の場で実用化に繋げるためには、製薬企業と

の共同開発を推進する必要性がある。これまでの成果に関する情報発信をさらに積極的に行い、ニーズに基づき有望な技術を絞り込んだ上で、新たな産官プロジェクトの立ち上げを期待する。

- **iPS** 研究とうまく連携して、再生医療に役立つトランスレーショナルリサーチとして発展させることも重要であるが、一方細胞分化とエピジェネティクスも関係など基礎的研究を同時に進展させることも重要である。これらの基礎的研究成果はいずれトランスレーショナルリサーチにも必要となってくる。
- 今後の開発成果の有効な活用方法・普及方法について、**NEDO** を含めたプロジェクト関係者で十分な協議を行い、具体的な方策と実施計画を立案することが重要であると考えられる。特に、今回、実用化に至らなかったモデル細胞について、今後の具体的な検討課題を整理し、得られた成果をより有効に活用するように今後の支援体制について検討することが必要であると考えられる。
- 本研究成果を効果的に活用し、我が国の産業を活性化するには、現時点で既に国際競争力のある開発技術をさらに強化することで展開を優位に進める必要がある。さらに、諸外国が先行取得した開発技術を分析し、ブレイクスルーが期待できる、より優れた技術開発を目指すための柔軟な研究組織の構築と長期的で強力な研究支援体制の構築が必要である。
- ヒト **ES** 細胞の種々の細胞への分化に関しては、このためには本邦内にも多くの進んだ領域があり、これらの領域の研究者と積極的に共同研究を進めるべきであると考えられる。

〈その他の意見〉

- ヒト細胞の産業利用の新たなマーケットの創出について、どのような活動が行われ、どのような解決課題が抽出されたのかを取りまとめ、それを周知していくことが、今後の我が国における本領域全体の発展にとって極めて重要である。製薬企業等に対する情報提供なども今以上に行っていく必要性がある。
- この分野では米国の **GE Healthcare** がヒト **iPS** 細胞ではなくヒト **ES** 細胞が有用であるとの明確な判断から、**Geron** 社と共同で創薬に利用可能な細胞の製造と販売のプロジェクトを開始している。ヒト **iPS** 細胞は様々な点でヒト **ES** 細胞とは異なる人工物であることが明らかになっており、ヒト **ES** 細胞の研究は創薬や再生医療への応用だけではなく、ヒト **iPS** 細胞の研究の方向の誤りを修正するためにも不可欠である。今後ともヒト **ES** 細胞研究への投資が継続されることを期待する。

- また **High Through Put Screening** のためには、細胞のイメージャなどの測定機器も開発することが必要であり、細胞評価系の構築とともに測定機器の開発にも取り組むことが必要である。

1. 2 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

安全性が高く、有効性も良好な新薬の開発に資するヒトES細胞の産業応用は、我が国の製薬企業の競争力を高めるための新技術開発であるが、開始時は倫理面、制度面でのハードルが高く、ニーズは高いもののリスクが極めて大きいことから民間活動のみでは改善できないものであることが多く、又は公共性が高いことに鑑み、NEDOの関与が必要とされる事業である。

本プロジェクトは日本におけるヒトES細胞の基盤研究技術を底上げするもので、国家戦略上も重要な事業と位置づけられ、欧米諸国が国家的支援を行っている状況から、本事業が実施されたことは、健康安心イノベーションプログラムの目標達成のために大きな寄与をしたものと評価できる。

また、本研究で得られた知見は創薬だけではなく幹細胞を用いた再生医療や基礎研究にも利用可能であり、創薬基盤支援のみならず、ライフサイエンス研究全般への大きな波及効果が期待される。

〈肯定的意見〉

- 出口が簡単ではなく、製薬会社などで支援することが難しいプロジェクトであり、国民の健康増進という公益のために NEDO から公的な援助がされるのは妥当である。
- 安全性が高く、有効性も良好な新薬の開発に資するヒト細胞の産業応用は公共性の極めて高いテーマである。我が国の製薬企業の競争力を高めるための新技術開発であり、NEDO の関与が必要な事業である。
- 現在の創薬の生産性低下の問題を克服する一つの重要な方法としてヒト多能性幹細胞を用いたヒト細胞評価系の構築があり、それに非常に早い段階から気づきプロジェクト化したことは高く評価される。2004年の段階で事業化を本格的にスタートした企業がなかったことを考えると民間企業では取り組むことができなかったテーマであり NEDO が関与したことを適切であった。また本研究で得られた知見は創薬だけではなく幹細胞を用いた再生医療や基礎研究にも利用可能であり公共性の観点からも妥当である。本研究プロジェクトと関連した研究を何らかたちで継続することができれば本研究の効果は予算の観点からみても十分であると考ええる。
- 健康安心イノベーションプログラムの目標達成のために大きな寄与をしたものと評価できる。一方ヒトES細胞を用いた研究は、公共性が高いにも拘わらず、前述の通り、未だ民間(特に企業)にとってハードルは低くない。そのため、まさしくNEDOの関与が必要とされる事業と考えられる。
- 「モデル細胞の創製」は創薬基盤支援のみならず、ライフサイエンス研究

全般への大きな波及効果が期待される。特に、加工技術、分化誘導技術、構築技術開発において得られた各々の成果の中には、投資対効果が十分に期待されるものがあったと評価される。

- ヒト ES 細胞を用いた研究開発については、開始時は倫理面、制度面でハードルが高く、民間のみで実施することは困難であり NEDO の関与が必要であった。また、本プロジェクトは日本における多能性幹細胞の基盤研究技術を底上げするもので、国家戦略上も重要な事業と位置づけられる。
- 新薬開発の成功確率は低く「健康安心イノベーションプログラム」の目標達成には、新薬開発のボトルネックとも言える「ヒトにおける薬効・毒性・体内動態の優れた評価・予測系を開発すること」が必要である。この創薬基盤支援技術開発は、ニーズは高いものの、リスクが極めて大きいことから、個別の製薬企業が取り組むことは困難である。また、世界的に競争の激しい最先端技術開発であることから、大学や国立研究所の優れた要素技術を相乗的に生かすことができる相互補完的な研究組織を構築して、長期的なプロジェクトとして推進する必要がある。欧米諸国が国家的支援を行っている状況から、本事業が実施されたことはきわめて高く評価される。
- 本プロジェクトは再生医療の初期の段階の研究プロジェクトとしては、健康安心イノベーションプログラムの目標達成に一定の効果をあげたものと言うことが出来る。特に、初期段階の研究では民間活動のみでは改善できないものであることが多く、又は公共性が高いことに鑑み、NEDO の関与が必要とされる事業であると言うことが出来る。本プロジェクトにより設立されたバイオベンチャーのリプロセル社は一部の領域において製品を販売している。産業化の促進という点では評価出来るものと考えられる。

〈問題点・改善すべき点〉

- エンドユーザーである製薬企業が欲している機能細胞の大量創出を目指した内容と、多能性幹細胞自体の操作技術の開発を目指した内容とが混在していたことが問題であった。機能細胞の創出に内容を絞り込んでおけば、製薬企業の関心はもっと高くなったのではないかと思う。
- 本プロジェクトにより設立されたバイオベンチャーのリプロセル社は一部の領域において製品を販売しているものの、巨額の研究費が投じられた割にはその製品はこれに見合うものとはまでは言えないと考えられる。
- ヒト ES 細胞の規制から多数のヒト ES 細胞株を樹立できなかったことは残念である。
- 研究開発目標は、明確で具体的で、挑戦的研究課題に相応しく戦略的に設

定されていたと評価される。目標達成に必要な要素技術を取り上げており、世界トップクラスの研究者を開発担当者に出し、十分な研究開発実施体制で取り組んだと言える。本成果の事業化にあたりリプロセル社の役割りに多大の期待が寄せられる。

- 現時点では開発研究であり、費用対効果の判定は容易ではない。

〈その他の意見〉

- ・ NPO 法人を設立し研究組織に加えた理由が外から見ると分かりにくい部分がある。質疑応答の結果、内容は妥当と判断したが国民から見て分かりやすい説明が公開されることが望ましい。
- ・ この領域は国際的に見て非常に重要な領域で、本プロジェクトの目指したところは正しいと思われる。研究チームの構成も優秀な研究者を集め、構成されているという点では評価されるが、具体的な製品には決して結びついていないと考えられる。本プロジェクトはどちらかといえば、文部科学省の研究費に対する申請の構成であり、NEDOのプロジェクトになっていない。今後、さらに産業化を目指したものを模索すべきである。

2) 研究開発マネジメントについて

再生医学・再生医療の内外の技術動向、市場動向等を見たとき、本プロジェクトは、ヒトES細胞の加工技術、分化誘導技術、モデル細胞構築という研究の流れを的確に考慮した戦略的な目標が設定されており、適切であると考えられる。プロジェクトリーダーのリーダーシップのもと、幹細胞の基礎生物学だけでなく、企業の研究者、薬理の研究者など分野を超えた世界トップクラスの研究開発実施体制で、各研究グループが連携して研究が推進された。また、直接的に関係が薄かった装置開発テーマの途中中止や、追加公募による細胞外環境の人工制御技術開発を加えるなど、適切なマネジメントがされており評価できる。

しかしこの分野は競争が激しく、特にここ数年で技術が大きく進歩し欧米を中心に実用化も始まっている情勢を考慮し、到達目標の再設定や競争力のあるテーマへの絞込みをより積極的に行なう必要があった。また、一部メンバーの事業全体への貢献度や実用化への積極的な関与に物足りなさを感じた。今後の実用化に向けた課題とその実現体制についてさらなる検討が必要であると考えられる。

〈肯定的意見〉

- ES細胞の加工技術、分化誘導技術、モデル細胞構築という研究の流れを的確に考慮した目標設定がなされている。追加公募により細胞外環境の人工制御技術開発を加えたことにより、研究の幅が広がり実用性の高い成果につながった。
- 代表者の中辻教授のリーダーシップには、素晴らしいものがあり、戦略的な目標の設定は、秀逸なものであった。
- 直接的に関係が薄かった装置開発をプロジェクトの途中で中止したことは、適切なマネジメントとして評価できる。全体として、多能性幹細胞の操作技術に関する基礎研究の部分は十分な成果が得られている。
- 各研究グループが連携して研究が推進されている。
- 幹細胞の基礎生物学の研究者だけではなく、企業の研究者、薬理の研究者など分野を超えて集まり研究プロジェクトが運営されており適切なマネジメントが行われたと考える。
- 研究開発目標は、明確で具体的で、挑戦的研究課題に相応しく戦略的に設定されていたと評価される。目標達成に必要な要素技術を取り上げており、世界トップクラスの研究者を開発担当者に出し、十分な研究開発実施体制で取り組んだと言える。本成果の事業化にあたりリプロセル社の役割に多大の期待が寄せられる。

- 再生医学・再生医療の内外の技術動向、市場動向等を見たとき、本プロジェクトは戦略的な目標が設定されており、適切であると考えられる。研究プロジェクトにメンバーは多方面から構成され、個々の人材を見たときには充分優秀な人材であると考えることが出来る。

〈問題点・改善すべき点〉

- iPS 細胞を使用した研究への対応が若干遅れたのではないかとの印象があり、その点は残念である。ヒト ES 細胞とヒト iPS 細胞から共通したプロトコルで分化誘導した例えば心筋細胞の性能比較などは、他の開発プロジェクトでは実施が困難であり、十分に実施していれば重要な研究基盤となったのではないかと思う。
- 若干残念な点は、事業全体への貢献度において、いまひとつ **visibility** が低いメンバーもいない訳ではない。
- 研究開発期間の後期において、研究分担者間で成果をリアルタイムで共有し、する相乗効果を生み出すための仕組みが十分に機能していたか検討することは、今後のプロジェクト推進に生かすことができると考えられる。開発チームは、各要素技術の有機的活用という観点から、今後の実用化に向けた課題とその実現体制についてさらなる検討が必要であると考えられる。
- 個々の研究メンバーは有能であるものの、文部科学省の班研究のごときチーム構成がなされており、実用化に向けてのチーム構成としては物足りなさを感じる。特に、本プロジェクトが NEDO の研究費であることを考えると、成果の実用化を促進するという形になっていないことが惜しまれる。
- プロジェクト開始時あるいは追加公募時から製薬企業が参画しているが、最終目標である創薬の基盤研究における薬効評価系の確立と実用化への積極的な関与・コミットメントは見受けられない。
- この分野は競争が激しく、特にここ数年で技術が大きく進歩し欧米を中心に実用化も始まっている。そのような情勢を考慮し到達目標の再設定や競争力のあるテーマへの絞込みをより積極的に行なう必要があった。

〈その他の意見〉

- ・ iPS 細胞に比べて「より生理的である」という有利な点を意識して研究を進め、プレゼンテーションにおいても iPS 研究と差別化を強調しても良かった。

3) 研究開発成果について

細胞外マトリックスの研究やヒトES細胞の相同組み換え技術など世界的に優位性がある複数の成果を創出し、全体の目標達成レベルは高く、投入予算に見合った成果が得られている。また、本プロジェクトの成果は一部商品化されており、本邦初のものとして再生医療、再生医学の研究に資するところとして、評価できる。

ヒトES細胞を利用して薬剤候補の毒性試験が可能であることは創薬に役立つことが期待される。世界的にみてヒトES細胞から分化誘導した細胞が創薬向けに広く製造販売されていない現状を考えると、実用化に向けた今後の取り組みこそが重要である。

成果の発表は論文や学会発表など適切に行われているが、今後、本プロジェクトで得られた研究成果に関する情報発信を積極的に行うことにより、様々なヒト細胞の産業利用の重要性についての社会的認知度を高めていくことが期待される。

また、細胞加工技術について特許出願しないでノウハウとして技術を保有していることは、アカデミアでの使用については問題がないが、企業での使用や事業化の際には支障が出る可能性がある。

〈肯定的意見〉

- 本プロジェクトの成果はリプロセル社により一部商品化されており、本邦初のものとして再生医療、再生医学の研究に資するところとして、評価できる。成果は市場の拡大或いは市場の創造の観点からみて、これを促進するものであり、評価できる。未分化細胞維持培地の販売や心筋細胞の販売など、**minimum requirement** を満たしていると考えられる。論文の発表は研究内容を踏まえ適切に行われている。
- ヒトES細胞を利用して薬剤候補の毒性試験が可能であることは創薬に役立つことが期待される。病気の原因を調べ治療法を開発する研究において疾患遺伝子安定発現ES細胞を樹立することは有用である。この分野はiPS細胞の守備範囲と考えていたが、iPS細胞より有利な部分もあることがプレゼンテーションで分かった。
- 細胞外マトリックスの研究あるいは、ヘルパー依存性アデノウイルス・ベクターを用いたヒトES細胞の相同組み換え技術において、世界に冠たる成果が上がっている。当該目標を達している課題が殆どであるといえよう。
- 技術は幹細胞の遺伝子操作技術、細胞分化技術、疾患表現型の細胞評価系での発現に分類できる。いずれも直ちに創薬の現場で使えるレベルに達しているわけではないが、この最終目標に向け重要な技術開発の中には独創

性の点で世界トップレベルのものが含まれており評価に値する。世界的にみて、ヒトES細胞から分化誘導した細胞が創薬向けに広く製造販売されていない現状を考える、技術が実用化に達していないことは決してマイナスの評価とはならない。実用化に向けた、今後の取り組みこそが重要である。

- 今後、本プロジェクトで得られた研究成果に関する情報発信を積極的に行うことにより、様々なヒト細胞の産業利用の重要性についての社会的認知度を高めていくことが期待される。
- 研究開始当初の状況と比べ、いずれの検討課題も飛躍的な進捗があったと言える。研究成果は全体として目標値を概ねクリアしていると言える。一部には、世界初、世界最高水準のものがあり、投入予算に見合った成果が得られている。
- 細胞加工技術、細胞外環境の人工制御技術など世界的に優位性がある複数の成果を創出しており、全体の目標達成レベルは高い。

〈問題点・改善すべき点〉

- 産業界にニーズがありながら未解決課題が残った幾つかの個別テーマについては、目標を達成するための課題解決に向けた方策が必ずしも明確化されているとはいえない。
- リプロセル社の販売する心筋細胞は類似のものとしてセラーティス社の販売するものと競合している。現時点では、世界レベルでの販路がなく、世界的な競争力は現時点では無いものと推測される。
- 知的財産権等の取得が当然あるべき課題で、それがなかった事が散見された。また、一部当該目標を達している課題も散見された。
- 成果の発表は論文や学会発表など適切に行われていると評価されるが、その効果的な普及方策に関して、今後、より具体的に検討する必要がある。
- 細胞加工技術については特許出願しないでノウハウとして技術を保有している。アカデミアでの使用については問題がないが、企業での使用や事業化の際にはFTO (Free to operation) が保障されず支障が出る可能性がある。
- 成果についてプロジェクト終了後に公開シンポジウムが実施されたが、ニーズの吸い上げや実用化開発の加速化のために、プロジェクト実施中から研究コミュニティーや民間企業に向けて情報発信をするべきであった。

〈その他の意見〉

- ・ **BBB**（脳血液関門）モデルはユニークであり有用性が多いに期待できる。事業開発につながって行く可能性も高い。

4) 実用化の見通しについて

全体として実用に向けて研究が進展し、ヒトES細胞由来心筋細胞を用いた心毒性評価法や人工基底膜による分化誘導制御技術開発など他の競合技術と比較して高い優位性を見出すことができる。さらに、創薬における薬効評価・安全性評価に加えて、幹細胞研究・再生医学研究などの関連分野やiPS細胞研究への波及効果も期待出来る。

しかし、本プロジェクトでは、神経、肝臓等将来有望な領域を含むものの、実用化に向けてまだ基礎生物学的な検討のほか、製造した細胞の同等性評価など検討課題が残されている。学術論文を先に出しておきながら、事業化は外国のグループに先をこされた例（ヒトES細胞の未分化維持システム）もあり、一層の努力を期待したい。

〈肯定的意見〉

- 「人工基底膜による分化誘導制御技術開発」に関する成果は、特に、優れており、他の競合技術と比較して高い優位性を見出すことができる。実用化・商業化の可能性は高く、波及効果も大きいと予想される。
- (ES細胞)を用いた研究用モデル細胞の創製技術開発研究に関する本事業の成果は、関連分野への波及効果(技術的・経済的・社会的)を期待できる。
- ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞を用いた心毒性評価法など、適切に開発を継続していけば実用化技術としてもものになりそうなシーズが創出されている。今後の継続性が課題である。多能性幹細胞の操作技術については、今後の関連分野(幹細胞研究・再生医学研究など)への波及効果が期待される。
- 全体として実用に向けて研究が進展した。
- 出口は創薬における薬効評価・安全性評価に加えて、再生医療の基盤技術、疾患メカニズム研究など明確である。
- 本プロジェクトの成果についてiPS細胞を用いた検討も実施しており、今後のiPS細胞研究への波及効果も期待できる。
- ヒトES細胞の培養培地、ヒト再生心筋の販売等一部の領域では実用化されており、評価できる。
- 実用化に向けた戦略は明確であり妥当である。実用化にむけて、まだ基礎生物学的な検討が必要であり、並行して製造した細胞の同等性評価(生体内の細胞と異同、製造方法やロット差に異動など)などの研究が今後必要である。

〈問題点・改善すべき点〉

- 「心筋分化技術」の事業化は大きな進展が見られたが、「肝細胞分化技術」「血液脳関門技術」の実用化の実現にはさらなる検討課題が残されていると言える。
- 機能細胞の分化誘導については、実用化イメージの具体的性について、少し不明瞭な点があったのではないか。どのようなスペックの機能細胞が、どの程度の量、どの程度のコストで生産することが求められているのかについての具体的なイメージがやや希薄であるとの印象がある。
- 本プロジェクトでは、神経、肝臓、人工基底膜等将来有望な領域を含むものの、研究プロジェクト終了段階においては、まだ基盤研究レベルであり、実用化にはまだ時間がかかるものと考えられる。今後の研究の発展が期待される。
- 引き続き研究開発を行うための研究費獲得が必須である。
- 一方、学術論文を先に出しておきながら、事業化は外国のグループに先をこされた例もあり、一層の努力を期待したい。
- 関連する新しい予算がないために今後の研究展開のめどがたっていないように受け止められた。

2. 個別テーマに関する評価結果

2. 1 ヒトES細胞の加工技術開発

1) 研究開発成果について

モデル細胞の構築に必須な基盤技術として、ヒトES細胞への遺伝子導入技術、誘導発現技術、相同組換え技術の開発を行い、個別課題のみならず全体としても目標を十分に達成した。ヒトES細胞の相同組み換え技術など、独自性の高い重要な技術で世界初の評価すべき点も多く、幅広い応用の可能性がある。今後これらの成果に関する情報発信を積極的に行えば、市場の拡大或いは市場の創造につながることを期待できる。

一方、遺伝子相同組み換えがベクターや細胞によって大きく異なる理由が明らかになれば効率をより高めることができる可能性があり、そのためにも分子メカニズムの解析を詳細に行う必要がある。今後、相同組み換えの効率を高める新コンセプトの創成と技術開発に期待する。

また、研究成果として多数の論文が発表され、一般研究者に対して積極的な情報発信の努力が認められるが、技術移転などの成果の実用化と普及に関しての効果的な取組みが今後の課題である。

〈肯定的意見〉

- ヒト多能性幹細胞を対象とした相同組み換え技術について、独自性の高い重要な技術が開発されている。今後、これらの成果に関する情報発信を積極的に行えば、関連領域全体の発展に大きく寄与する成果である。
- 遺伝子導入技術の開発に積極的で良い。また技術的にも高いレベルにある。
- 相同組み換え関連の成果は秀逸である。幅広い応用の可能性がある技術であり、今後の効率の向上に期待する。
- 1)遺伝子導入技術開発、2)発現制御可能な Tet-On 株作出、3)高効率の相同組換え体創出、4)マウス ES 細胞で制御可能な RNAi 技術開発、5)ウイルスベクターを用い高効率な相同組換え導入技術開発、などモデル細胞の構築に必須の基盤技術開発に成功しており、個別課題のみならず全体としても目標を十分にクリアしたと評価される。これらの基盤技術は「あらゆる遺伝子導入場面にも利用可能な」新技術として位置づけられ、より利用価値の高い付加機能を保持した ES 細胞の作出を可能にした。実際、複数種類の疾患モデル細胞株の作成などに成功しており、これらの成果は。汎用性があり、市場の拡大や新市場の創造につながることを期待できる。
- ヒトES細胞の加工技術という観点から、本プロジェクトは評価できる。特に、三谷らの相同組み替え技術は優れた成果を示しており、今後の実用化が期待される。

- 本事業は、ヘルパー依存的アデノウイルス・ベクターを用いたヒト ES 細胞の相同組み換え技術など、世界初の評価すべき点も多く、市場の拡大或いは市場の創造につながることを期待できる。
- ヒト ES 細胞への遺伝子導入技術、誘導発現技術、相同組換え技術に関して目標を達成し、実用化につながる成果が出ている。特に、ヘルパー依存型アデノウイルスを用いる相同組換え技術は世界に類を見ない高効率を達成した点で高く評価できる。

〈問題点・改善すべき点〉

- 当初の目標の一つである RNA 干渉法による遺伝子発現制御技術については、マウス ES 細胞で検討しているが、ヒト ES 細胞ではほとんど実施に至っていない。
- 下記（[1] - 2 実用化の見通しについての評価及び今後の提言）の部分の記載を参照されたい。
- 遺伝子相同組み換えがベクターや細胞によって大きく異なる理由が明らかになれば効率をより高めることができる可能性がある。そのためにも分子メカニズムの解析を詳細に行う必要がある。
- 実用化に向けた戦略は明確であり適切である。現時点の技術で様々な応用が可能であると考えられる。しかし、相同組み換えの効率がまだ高くないために、組み換えのプロセスで細胞の性質が変化する可能性が推定される。相同組み換えの頻度の低さはヒト細胞の持つ固有の生物学的特性である可能性もあるが、今後の相同組み換えの効率を高める新コンセプトの創成と技術開発に期待する。
- 知的財産権の確保に関する知財戦略が不明確である。複数の成果の内、どの成果を重要であると考え、どのように周辺特許を確保しようとしてきたのかなどについての戦略性が第三者には解りにくい。
- 研究成果は、多数、論文発表されており、一般研究者に対して積極的な情報発信の努力が認められる。しかし、特許出願件数はゼロであり、技術移転などの成果の実用化と普及に関して効果的な取組みが今後の課題として挙げられる。
- HB9 遺伝子座への相同組み換えについては分化特異的マーカーとしての検証が今後の課題である。

〈その他の意見〉

- ・ これらのヒト ES 細胞加工技術は、民間企業が実施する場合に FTO が不明確。

2) 実用化の見通しについての評価及び今後の提言

ヒトES細胞の加工技術は、ヒトES細胞・iPS細胞の創薬分野、再生医療への活用のために必須の技術であり、技術ライセンスや細胞ビジネスなど実用化のイメージは妥当である。

また、1)キット発売、2)ノウハウのライセンスアウトなど、事業化に取り組みを開始しており、関連分野において一定の波及効果が期待できる。将来的に本法が実用化されれば、遺伝子異常を有するES細胞の遺伝子を修復できる可能性が有ると考えられる。

但し、実用化は世界をリードして行われるべきものであるが、若干出遅れている感もある。また、成果については研究者コミュニティーに早く情報提供すべきである。

〈肯定的意見〉

- 実用化に向けた戦略は明確であり適切である。現時点の技術で様々な応用が可能であると考えられる。しかし、相同組み換えの効率がまだ高くないために、組み換えのプロセスで細胞の性質が変化する可能性が推定される。相同組み換えの頻度の低さはヒト細胞の持つ固有の生物学的特性である可能性もあるが、今後の相同組み換えの効率を高める新コンセプトの創成と技術開発に期待する。
- ヒト幹細胞を対象とした相同組み換えの委託事業など、ヒト細胞の創出以外の部分で事業化できるシーズも在るのではないかと思う。
- 遺伝子技術の開発が進み実用化が現実的な段階に来ているプロジェクトがある。
- ヘルパー依存性アデノウイルス・ベクターを用いたヒトES細胞の相同組み換え技術や、ヒトES細胞のROSA26遺伝子座へのノックイン技術などキット化し、商品化できそうな成果も少なくない。
- 実用化の出口は見えており、ほぼ当初の計画通りの成果が得られている。将来的に本法が実用化されれば、遺伝子異常を有するES細胞の遺伝子を修復できる可能性が有ると考えられる。
- 遺伝子導入法という基盤技術の開発成果は、その技術自体の実用化による短期的波及効果に対する評価だけでなく、ES細胞の付加価値をより高めるために本技術をさらに改良して「モデル細胞の実用化」を如何に加速するかという相乗効果の視点での評価も重要である。開発を推進した研究グループは、1)キット発売、2)ノウハウのライセンスアウトなど、事業化に取り組みを開始しており、関連分野において一定の波及効果が期待できる。さらに、研究開発を継続的に取り組む強い意欲が感じられ、今後の実用化

への取組みに大きく期待される。

- ヒト ES 細胞の加工技術は、ヒト ES 細胞・iPS 細胞の創薬分野、再生医療への活用のために必須の技術であり、技術ライセンスや細胞ビジネスなど実用化のイメージは明確である。

〈問題点・改善すべき点〉

- この領域の技術開発のゴールとして、一体、何を想定しているのかが解りにくい。エンドユーザーである製薬企業のニーズも良く解らない。
- 上記の実用化は世界をリードして行われるべきものであるが、若干出遅れている感もある。
- HB9 あるいは ALB 遺伝子座に EGFP をノックインヒト ES 細胞は、NEDO の成果として、研究者コミュニティーに早く available な状況にすべきかと考える。
- ベクター系による詳細なメカニズムを明らかにすることにより、相同組み換え効率を自在に制御できるようになることが望まれる。

2. 2 ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発

1) 研究開発成果について

世界的にも競争の激しいところであるが、要素技術の開発では、大変優れているものも少なくない。人工基底膜による分化誘導技術の開発は、多数の細胞外マトリックスの系統的な発現解析から人工合成にいたるまでを戦略的・計画的に推進しており、基盤技術として価値が高い。また、心筋分化誘導技術については、ES細胞由来心筋細胞を用いたQT延長測定系を確立し、ベンチャー企業において事業化まで進んでいることを高く評価する。

しかし、神経分化誘導技術については、他の報告と比較して技術の独自性、優位性が必ずしも明確ではない。肝細胞様細胞の樹立研究は大きく進展が見られたものの、肝細胞様細胞の成熟化の促進において検討課題が残されている。

〈肯定的意見〉

- 人工基底膜による分化誘導技術の開発は、多数の細胞外マトリックスの系統的な発現解析から人工合成にいたるまでを戦略的・計画的に推進しており、基盤技術として価値が高い。実際、ヒト多能性幹細胞の維持に有益なマトリックスも見出しており、今後の成果にも大いに期待できる。
- ES細胞から神経細胞が誘導される過程における分子の動きよく調べている。特に、改変ラミニンによるフィーダーフリーES細胞培養系の樹立は素晴らしい成果であり、ES細胞の医療への応用に向けて大きく期待される。
- CSAによってES細胞から心筋細胞への分化誘導効率を高めた点は評価できる。
- 1)新規の分化誘導剤を発見し、拍動性心筋様細胞を安定的に誘導することに成功し、QT延長の評価系として実用化を実現、2)ストローマ細胞を不死化細胞株として樹立することに成功し、ES細胞由来の肝細胞様細胞を十分量作成することを実現、3)細胞外環境の人工制御技術開発及び創薬支援ツール開発、特に、ゲル化能を保持したIV型コラーゲン、11種類のラミニンアイソフォーム、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの安定供給系を確立、など個別の開発目標を十分に達成しており、全体として目標を達成したと言える。
- 本技術で開発した拍動性心筋様細胞は、QT延長の評価系として従来技術で検出不能であった化合物に対しても評価できたことから、既存技術との優位性が認められる。ラミニンアイソフォームの高発現系・安定供給系を確立し、組換えE8フラグメントを培養基材とするヒトES細胞のフィーダーフリー・ゼノフリー培養法に目処がたったことは、今後の研究を飛躍

的に発展させる効果が期待され、当初目的以上の成果として高く評価される。肝細胞の機能評価方法の確立については、創薬研究への応用において非常に重要であり、世界最高水準のレベルと言える。今後、樹立細胞特性評価への応用が期待される。

- 世界的にも競争の厳しいところであるが、要素技術の開発では、大変優れているものも少なくない。とくに基底膜蛋白質の高発現系の開発は、素晴らしいものがある。
- 研究成果は一流雑誌を中心として、多数の論文発表を行うことで一般普及に努めている。さらに、14 件の特許出願があり、積極的な知財の取得への取り組みは高く評価され、投入予算に見合った成果が得られている。
- 心筋分化誘導技術については、ES 細胞由来心筋細胞を用いた QT 延長測定系を確立し、ベンチャー企業において事業化まで進んでいることを高く評価する。
- 肝細胞分化誘導技術については、ヒト初代肝細胞と比較すると課題はあるが、アルブミン産生能、代謝酵素の誘導、多糖類貯蔵能など機能的な成熟肝細胞が誘導できている点で評価できる。
- 細胞分化に関しては、共培養法から人工細胞膜基質を用いた方法へと展開し独創的な技術開発に成功しており高く評価される。また心筋分化ではマウスの系からヒトの系へのブリッジングが単純ではないことが示され、あらためてヒト ES 細胞を用いた研究の有用性を認識させられた。さらに肝臓の系でも心筋の系でも細胞の分化成熟に関して課題が残ること明らかにし、それを克服する技術を開発した点は評価される。これらの技術は実用化のために十分ではないが今回の技術開発により今後の進展が期待される。
- 心筋誘導技術においては、尾辻らの心筋誘導の化合物スクリーニングに関しては機序や安全性は不明であるものの、候補薬剤が見つかり概ね順調である。肝細胞の誘導は研究の方向性が観察でき、概ね良好であると言える。神経細胞の誘導に関しても有る程度の成果は出ている。

〈問題点・改善すべき点〉

- ヒト ES 細胞の心筋への分化誘導など進捗度が今一つの部分もある。
- 肝薬物輸送・代謝・毒性を評価する細胞系を樹立することは、創薬研究において重要である。肝細胞様細胞の樹立研究は大きく進展が見られたものの、成熟化の促進において検討課題が残されている。成熟化の分子機構、人工基底膜や擬似マトリクスなどを応用することで、代謝・安全性・毒性試験などへの実用化に向けて、一層の研究の推進が期待される。

- 本プロジェクトが産業応用を前提としたものであるにも関わらず、知的財産権の確保について必ずしも十分な配慮が行われたとは言えない。しっかりとした、知財戦略の策定が行われたのか疑問である。
- 神経幹細胞作製はノギンと TGF β のみで十分なのか検証が必要。
- CSA による心筋細胞分化誘導の分子機構の解明が待たれる。
- 再接着法による心筋細胞の長期培養系における培養上清の役割なども今後明らかにしていく必要がある。
- CSA などの心筋分化誘導法のヒト ES 細胞への応用は不十分で、成果の達成には至っていない。また、肝細胞の分化に関しては胎児期幹細胞の誘導という面では成果が達成できているが、実際に必要とされるのは成人の肝細胞であり、その点では目標の達成はこれからである。神経の誘導に関しては、本邦内においてもさらに進んだ研究グループは複数有り、競合的な領域まで到達しているとは言えない。
- 神経分化誘導技術については、他の報告と比較して、技術の独自性、優位性が必ずしも明確ではない。

〈その他の意見〉

- ・ 肝細胞分化誘導技術については3つの機関がそれぞれ取り組んでいるが、最も有望な機関にリソースを集中し、他の機関は細胞の機能検証や薬剤評価系構築に取り組めば到達レベルはさらに高くなったと思われる。

2) 実用化の見通しについての評価及び今後の提言

基底膜蛋白質の高発現系の開発とヒトES細胞の分化制御の連携は素晴らしいものがあり、すぐにでも実用化できる可能性を示している。

またヒトES細胞・iPS細胞由来心筋細胞を用いた委託毒性評価をベンチャー企業が世界に先駆けて実用化したことの意義は大きい。さらに多数の薬剤に関する検証データを集め、利便性を向上させることが出来れば、事業規模はさらに広がる可能性がある。

一方、ヒトES細胞の未分化維持システムでは、論文発表では本事業の方が先行していたのにも関わらず、海外で先に商品化された。今後、価格・品質の面で勝る技術を早く事業化し、先行の製品より良い日本発の製品として商品化することが待たれる。

また、基盤研究としての実用化のイメージは明確であり、それにより優れた研究成果が得られたが、実用化を目指すNEDOのプロジェクトとしては更なる努力が求められる。機能細胞の分化誘導について、スペック、量、生産コストなどについての具体的な目標設定や開発行程が不明確であり、今後具体的な目標設定と課題抽出へと適切に発展させて欲しい。

〈肯定的意見〉

- 心筋様細胞はQT延長試験への実用化を実現しており、創薬産業への波及効果が期待される。組換えE8フラグメントを培養基材とするヒトES細胞のフィーダーフリー・ゼノフリー培養法に目処がたったことは、ヒトES細胞の培養技術のブレイクスルーとして、今後の研究に多大の波及効果が期待される。
- 基盤研究としての実用化のイメージは明確であり、それにより優れた研究成果が得られたと考える。しかし、すべての用途に利用可能な完全な分化細胞の構築は容易ではなく、今後は具体的な用途を絞り込んだ上で、該目的にあう細胞系の構築へと展開されることを期待する。
- 基底膜蛋白質の高発現系の開発とヒトES細胞の分化制御の連携は素晴らしいものがあり、すぐにでも実用化できる可能性を示している。
- いずれの個別開発についても、実用化イメージ・出口イメージはある。しかしながら、それらは終了時点においても単なるイメージに止まっているものが多いことから、具体的な目標設定と課題抽出へと適切に発展させて欲しい。
- 作製された運動神経が筋肉に接続する像は印象的。実用化への期待ができる。
- ヒトES細胞・iPS細胞由来心筋細胞を用いた委託毒性評価をベンチャー

企業が世界に先駆けて実用化したことの意義は大きい。さらに多数の薬剤に関する検証データを集め HERG 試験に対する優位性を確実なものとし、利便性を向上させることが出来れば、事業規模はさらに広がる可能性がある。

- **in vitro** の毒性試験（QT 延長など）に有用。
- **iPS** 研究への応用が可能（波及効果）。
- 本プロジェクトでは、一部の研究で実用化イメージが明確になっており、製品化されている領域もあり、評価できる。

〈問題点・改善すべき点〉

- 実用化に向けて各種神経細胞の **purity** をより高める必要がある。
- いずれの機能細胞の分化誘導についても、どのようなスペックの機能細胞が、どの程度の量、どの程度のコストで生産しなければならないのかなどについての具体的な目標設定や開発行程が不明確である。また、開発手法や開発思想自体が産業化に不向きな要素技術の開発がプロジェクト期間を通じて実施され続けたこともマネジメント上の問題がある。ある部分については、途中での縮減などの措置が必要だったのでは？
- 毒性試験に利用する場合 **iPS** 細胞に比べて有利な点はあるのか？
- **ES** 由来の肝細胞は現時点では実用からは遠い。今後の改善が待たれる。
- 全般的に見ると研究の進捗度はこの研究期間内に進捗しているものの、実用化を目指す **NEDO** のプロジェクトとしては更なる努力が求められる。本プロジェクトにつき込まれた資金を鑑みると、実用化に到達できるプロジェクトはごく僅かであり、計画当初から実用化を目指す研究計画を作成すべきであったと考えられる。
- 上記の素晴らしい成果の一方、 **Laminin511** によるヒト **ES** 細胞の未分化維持システムが、論文発表では、本事業の担当者の方が先行していたのにも関わらず、スウェーデンで先に商品化されてしまったのは大変残念である。この点の商品化も、今後価格・品質の面で勝る技術を早く事業化していただきたいものとする。

〈その他の意見〉

- ・ **ES** 細胞のフィーダーフリー培養に向けて組み換え型ラミンを、先行の製品より良い日本発の製品として商品化することが待たれる。

2. 3 研究用モデル細胞の構築技術の開発

1) 研究開発成果について

技術的な観点から、国際的にみてまだまだ未開発な部分が多い **challenging** な領域であるが、困難なテーマに取り組んだ努力は評価できる。

ハイスループットスクリーニング(**HTS**)技術の開発では機器システムのプロトタイプが完成し、心筋分化誘導促進物質の探索において低分子化合物が同定され、実際に幹細胞を用いて化合物の発見へとつながることを実証した。

一方で神経疾患のモデル作成のためにES細胞に遺伝子変異を起こさせる研究や研究用モデル細胞としてのヒト肝細胞は、まだまだ改善の余地があるといえよう。さらに「血液脳関門モデルの創製」では一定の成果が得られたと評価されるものの実用的なレベルまで細胞特性を向上させるには、目標とする細胞特性をより具体的に設定して研究を継続させる必要がある。

〈肯定的意見〉

- ALSの表現型を反映した神経細胞の構築、QT延長の特性を評価できる心筋細胞の構築において実用化に近い成果が得られている。さらに肝臓細胞に関しては分化成熟という問題点が明確にされており、こちらも評価される結果である考える。
- 困難なテーマに取り組んだ努力は評価できる。
- 心筋細胞分化を誘導する低分子化合物のHTS系は有用。既に化合物が同定されている。
- 心筋分化成熟促進化合物の発見そのものは医薬品へと応用されるわけではないが、実際に幹細胞を用いて化合物の発見へとつながることを実証した点ですぐれた成果である。
- 神経変性疾患モデル細胞の創製研究において、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病の疾患遺伝子の安定発現ES細胞の創製に成功し、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症の疾患表現型が再現できたことは高く評価され、十分に当初目標を達成したと言える。「ES細胞由来肝細胞を用いた創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立」研究において、数学モデルを構築して定量的な細胞特性評価法に基づくin vivo予測技術は、世界最高水準の研究成果として評価される。肝以外の臓器の体内動態への影響や、消失過程の律速段階の定量的評価など、当初目標以上の成果が得られたと言える。「ハイスループットスクリーニング(**HTS**)技術の開発」研究において、機器システムのプロトタイプが完成し、心筋分化誘導促進物質の探索で成果が得られており、当初目標を達成したと言える。以上のことから、全体としてもほぼ目標を達成したと評価される。

- 技術的な観点から、国際的にみてまだまだ未開発な部分が多い、**challenging** な領域であるが、よく頑張っているといえよう。
- 研究成果を積極的に論文発表し一般へ成果の普及に努めており、特許出願も 10 件と多いことは高く評価される。
- PS1 発現ヒト ES 細胞を用いた AD モデル細胞において、シナプス活動の低下が観察されており有用なモデルが取得できたと評価できる。
- ヒト ES 細胞由来 BBB モデルは、すべての構成細胞をヒト ES 細胞から作製してモデルを構築するというチャレンジングなテーマであるが、各構成細胞の分化誘導法、量産調整法を確立し、ヒト BBB の性質をある程度有するモデル構築に成功したことは高く評価できる。
- 疾患モデルの ES 細胞に関しては、技術的に部位特異的遺伝子挿入法の技術開発という面では学問的に評価できる。心筋細胞誘導のための **High throughput screening** では利用可能な化合物が幾つか見つかり、内容は未知数であるものの応用面で期待できる。
- ヒト ES 細胞由来 BBB モデルは、すべての構成細胞をヒト ES 細胞から作製してモデルを構築するというチャレンジングなテーマであるが、各構成細胞の分化誘導法、量産調整法を確立し、ヒト BBB の性質をある程度有するモデル構築に成功したことは高く評価できる。

〈問題点・改善すべき点〉

- 研究用モデル細胞としてのヒト肝細胞は、まだまだ改善の余地があるといえよう。
- 「血液脳関門モデルの創製」という困難な課題に挑戦し、一定の成果が得られたと評価されるものの、実用的なレベルまで細胞特性を向上させるには研究を継続させる必要がある。特に、目標とする細胞特性をより具体的に設定することが重要であると考えられる。
- 疾患モデル細胞については、各々の患者から樹立される iPS 細胞との優劣の検討などが必要なのではないか？血液脳関門の構築や HTS 構築については、どのような成果が得られたのか解りにくい。
- ヒト ES 細胞に変異 SOD1 を導入した ALS 細胞モデルの報告はすでであり、運動神経の生存能、アストロサイトとの共培養等について文献結果を検証したレベルである。
- 神経疾患のモデル作成のために ES 細胞に遺伝子変異を起こさせる研究は興味深い研究であるものの、実用化という面では非常に厳しい結果である。遺伝子変異が出来ても、これを疾患モデルとして病因の解明に結びつけるには、かなりの隔りがある。ランダム遺伝子導入法では破壊された

遺伝子が何なのかを調べる事が求められ、実用にならない。また、薬物動態の解析のため肝細胞には、成熟した成人の肝細胞が求められるが、誘導される肝細胞は幼弱な胎児期のもので、創薬支援には使用できない点が問題として残る。

- 心筋分化誘導の分子機構の解明が待たれる。

〈その他の意見〉

- ・ 短い時間内にスライドを詰め込み過ぎたため分かりにくかった。
- ・ 時間内に分かりやすく説明する工夫が必要。
- ・ AD 細胞モデルで見られるシナプス活動の低下のメカニズムが不明。PS1 について A β を介さないシナプス機能との関わりも示唆されており、この細胞モデルを用いたメカニズム研究を期待する。

2) 実用化の見通しについての評価及び今後の提言

ヒトES細胞・iPS細胞由来の分化細胞を用いた創薬評価系は、今後ますます注目される分野であり、基盤研究としての実用化のイメージは明確であり適切である。今後はより具体的な用途に絞って細胞分化、スクリーニングの簡便さなどの改良を進めるとともに、同等性を評価し確保する技術開発が進むことを期待する。

しかし、研究用モデル細胞としては、神経細胞、肝細胞とも興味深いものの、実用化には課題が残る。実用化のためには全般的な技術躍進が必要である。今回構築した神経変性疾患モデル細胞を今後、スクリーニング等の創薬研究で利用するためには、利便性、コスト、細胞供給などの面で改善が必要である。

また、機能細胞の均一性の確保のための技術開発や、機能細胞の大量創出技術の開発などの現実的なテーマ設定があっても良かった。

〈肯定的意見〉

- 均質な細胞の創出技術が達成されれば、HTSなどに関する期待は高い。
- 上記にも述べたが、技術的な観点から、国際的にみてまだまだ未開発な部分が多い、**challenging** な領域であるが、パイオニア的な役割を果たし、よく頑張っているといえよう。
- HTSは実用化のレベルにある。
神経変性疾患モデル細胞についても近い将来研究用に使用できることが期待できる。
- 「神経変性疾患モデル細胞」及び「モデル細胞創製のための要素技術」は、基礎研究から創薬研究へ幅広い利用が期待される。既に、細胞特性を創薬研究に用いるための「ヒトでの体内動態予測モデル」は実用化レベルに達しており、創薬研究への波及効果が現れている。また、汎用性が高いHTSシステムの開発は、分化誘導剤の探索研究に対して大きな波及効果が期待される。
- 基盤研究としての実用化のイメージは明確であり適切である。今後はより具体的な用途に絞って細胞分化、スクリーニングの簡便さなどの改良を進めるとともに、同等性を評価し確保する技術開発が進むことを期待する。
- 予測精度の高いヒトの *in vitro* BBB モデルは創薬の現場で非常にニーズが高く、実用化へのイメージは明確である。
- HTSによる心筋分化誘導化合物のスクリーニングは実用化のマイルストーンが見られ、評価できる。

〈問題点・改善すべき点〉

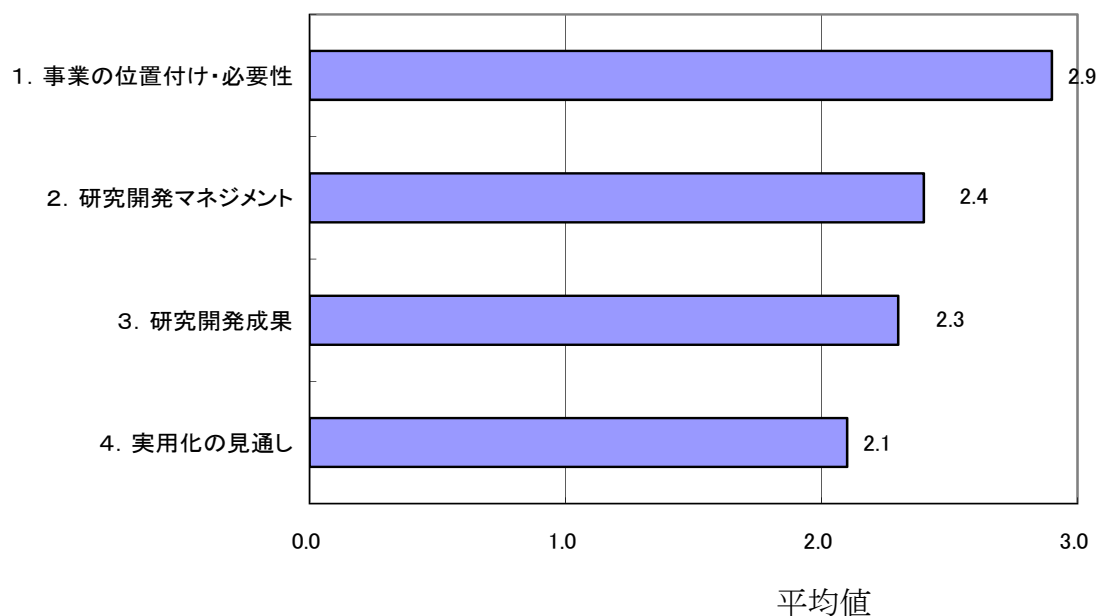
- 今後、「ヒトでの体内動態予測モデル評価法」に関する研究成果との高い相乗効果を生み出すために、「ES 細胞由来肝細胞の創製研究」の具体的課題を検討し、研究を加速する必要がある。創薬研究に対するさらなる波及効果が期待される。
- 今回構築した神経変性疾患モデル細胞は、病態メカニズム解析や少数の薬剤評価に使用可能と考えるが、今後、スクリーニング等の創薬研究で利用するためには、利便性、コスト、細胞供給などの面で改善が必要である。
- 上記の理由により、実用化のためには、全般的な技術躍進が、必要であろう。
- 機能細胞の均一性の確保のための技術開発や、機能細胞の大量創出技術の開発などの現実的なテーマ設定があっても良かったのでは？
- さまざまな HTS を開発して行くことが今後の課題。

〈その他の意見〉

- ・ ヒト ES 細胞・iPS 細胞由来の分化細胞を用いた創薬評価系は今後ますます注目される分野であり、世界的にはすでに実用化が始まっている。
- ・ 研究用モデル細胞としては、神経細胞、肝細胞とも興味深いものの、実用化には課題が残る。実用化への課題として、肝細胞に関しては成人の細胞に成長するための手法の開発が求められる。

3. 評点結果

3. 1 プロジェクト全体



評価項目	平均値	素点 (注)						
		A	A	A	A	A	A	B
1. 事業の位置付け・必要性について	2.9	A	A	A	A	A	A	B
2. 研究開発マネジメントについて	2.4	A	B	A	A	B	B	B
3. 研究開発成果について	2.3	A	A	B	B	A	B	C
4. 実用化の見通しについて	2.1	B	A	B	B	B	A	C

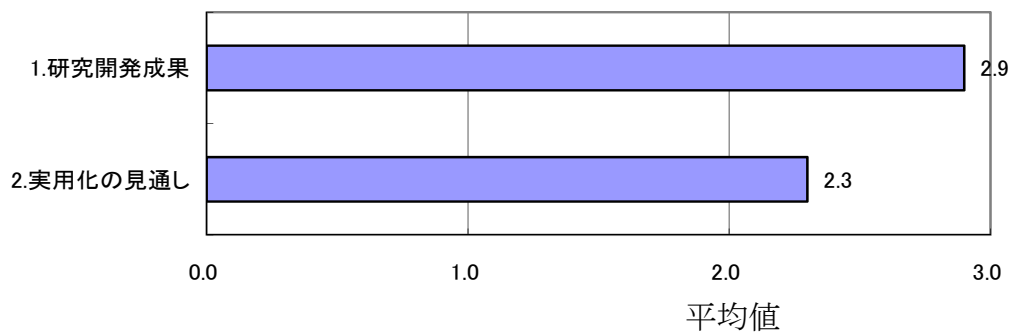
(注) A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

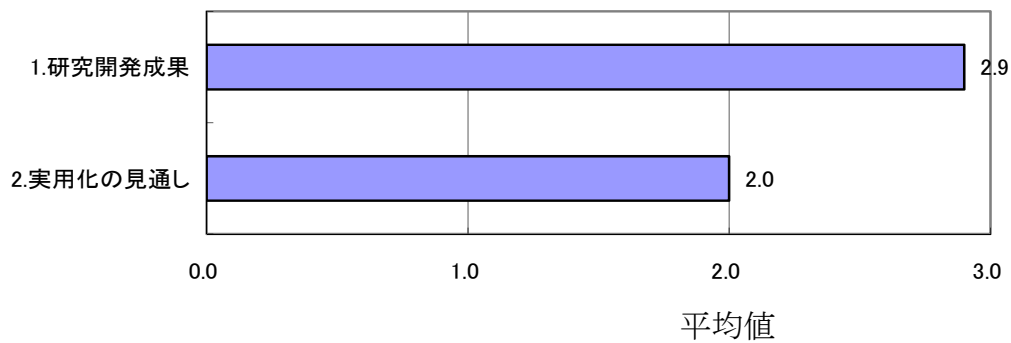
1. 事業の位置付け・必要性について	3. 研究開発成果について
・非常に重要 →A	・非常によい →A
・重要 →B	・よい →B
・概ね妥当 →C	・概ね妥当 →C
・妥当性がない、又は失われた →D	・妥当とはいえない →D
2. 研究開発マネジメントについて	4. 実用化の見通しについて
・非常によい →A	・明確 →A
・よい →B	・妥当 →B
・概ね適切 →C	・概ね妥当であるが、課題あり →C
・適切とはいえない →D	・見通しが不明 →D

3. 2 個別テーマ

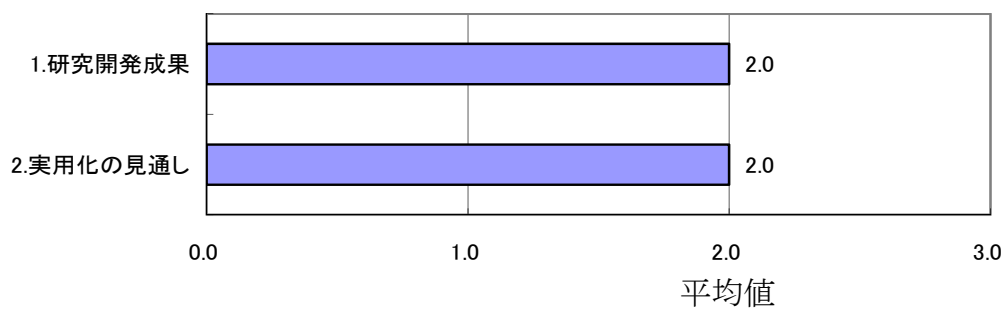
3. 2. 1 ヒトES細胞の加工技術開発



3. 2. 2 ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発



3. 2. 3 研究用モデル細胞の構築技術の開発



個別テーマ名と評価項目	平均値	素点（注）							
3. 2. 1 ヒトES細胞の加工技術開発									
1. 研究開発成果について	2.9	A	A	A	A	A	A	A	B
2. 実用化の見通しについて	2.3	A	A	B	B	B	B	B	B
3. 2. 2 ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発									
1. 研究開発成果について	2.9	A	A	A	A	A	A	A	B
2. 実用化の見通しについて	2.0	A	A	B	B	B	B	C	C
3. 2. 3 研究用モデル細胞の構築技術の開発									
1. 研究開発成果について	2.0	A	B	B	B	B	B	B	C
2. 実用化の見通しについて	2.0	B	A	B	B	B	B	B	C

（注）A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

1. 研究開発成果について

- ・非常によい
- ・よい
- ・概ね適切
- ・適切とはいえない

2. 実用化の見通しについて

- A ・明確
- B ・妥当
- C ・概ね妥当であるが、課題あり
- D ・見通しが不明

第2章 評価対象プロジェクト

1. 事業原簿

次ページより、当該事業の事業原簿を示す。

健康安心プログラム
「研究用モデル細胞の創製技術開発」

事業原簿(公開)

担当部	独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 バイオテクノロジー・医療技術開発部
-----	--

—目次—

概要	5
プロジェクト用語集	9
I. 事業の位置付け・必要性について	16
1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性	16
1.1 NEDO が関与することの意義	16
1.2 実施の効果(費用対効果)	16
2. 事業の背景・目的・位置づけ	17
II. 研究開発マネジメントについて	19
1. 事業の目標	19
2. 事業の計画内容	19
2.1 研究開発の内容	19
2.2 研究開発の実施体制	20
2.3 研究開発の運営管理	22
3. 情勢変化への対応	24
4. 中間評価結果への対応	24
5. 評価に関する事項	24
III. 研究開発成果について	25
1. 事業全体の成果	25
2. 研究開発項目毎の成果	47
IV. 実用化の見通しについて	200
1. 実用化の見通し	200
2. 今後の展開	215

(添付資料)

- ① イノベーションプログラム基本計画
- ② 技術戦略マップ(分野別技術ロードマップ)
- ③ プロジェクト基本計画
- ④ プロジェクト実施方針
- ⑤ 特許/論文/発表リスト
- ⑥ NEDO公開シンポジウム Abstracts

平成22年6月8日発行

編集:大友 純

余白

概要

最終更新日

平成 22 年 6 月 8 日

プログラム名	健康安心プログラム						
プロジェクト名	研究用モデル細胞の創製技術開発	プロジェクト番号：P05010					
担当推進部/担当者	バイオテクノロジー・医療技術開発部 担当者氏名 大友 純（平成 22 年 6 月 8 日現在） バイオテクノロジー・医療技術開発部 担当者氏名 新田 実（平成 17 年 4 月～平成 21 年 8 月）						
0. 事業の概要	<p>ゲノム情報を利用した創薬プロセスの導入によって、新薬の開発プロセスを効率化し、安価な医薬品を迅速に上市することが可能になると期待されている。また、遺伝子機能の解明や新薬の安全性や効果を評価する際には、従来、マウスやウサギなどの動物や長期間にわたって培養されている株化されたヒト細胞を利用して評価を行っていたが、これらの細胞とヒト生体内の細胞は異なった性質を持っているため、実際の生体内の細胞に近い状態の細胞を用いた評価系の確立が望まれている。</p> <p>本プロジェクトでは、無限に増殖できるとともに、あらゆる細胞組織に分化できる多能性を有するヒト ES 細胞（ヒト胚性幹細胞）由来の、均質な遺伝的背景を有したモデル細胞を樹立し利用することによって、前臨床試験の段階で臨床試験に進めるかどうかを、より早期に判断することを可能とする有用な研究用モデル細胞の構築を行う。さらに、モデル細胞と各種デバイス技術とを融合させることにより薬物の効果・毒性・副作用等の定量的な評価を可能とする創薬支援システムの構築をめざす。</p>						
I. 事業の位置付け・必要性について	健康安心プログラムの一環として、モデル細胞の創製技術を行うものである。 所要の整備を図っていくため、国（NEDO）の積極的な関与が必要なものとする。						
II. 研究開発マネジメントについて							
事業の目標	ヒト ES 細胞の加工技術、分化誘導制御技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価、創薬研究の効率化のための技術基盤として有用な研究用モデル細胞を創製する。						
事業の計画内容	主な実施事項	H17fy	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	
	ヒト ES 細胞加工技術開発	→					--
	ヒト ES 細胞分化誘導制御技術開発	→					--
	研究用モデル細胞構築技術開発	→					--
	--	--	--	--	--	--	--
開発予算 (単位：百万円)	会計・勘定	H17fy	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	総額
	一般会計	287	321	686	519	487	2,300
	特別会計	--	--	--	--	--	--
	加速予算	--	--	--	--	--	--
	総予算額	287	321	686	519	487	2,300
開発体制	経産省担当原課	経済産業省製造産業局生物化学産業課 経済産業省産業技術環境局研究開発課					
	プロジェクトリーダー	国立大学法人 京都大学 物質-細胞統合システム 拠点長 教授 中辻 憲夫					

	委託先	<p>国立大学法人京都大学再生医科学研究所、特定非営利活動法人幹細胞創薬研究所、国立大学法人大阪大学蛋白質研究所、国立大学法人東京医科歯科大学、国立大学法人東京大学、独立行政法人国立環境研究所、財団法人日本皮革研究所</p>
情勢変化への対応	<p>研究の進捗に伴い、以下のような対応を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 平成17年スタートした後、研究開発を促進するために、平成18年度は研究内容を追加充実して委託先の追加公募を実施した。 平成18年度は、研究内容の追加による大幅な増額変更を実施した。 	
中間評価結果への対応	<p>中間評価結果への評価書指摘事項に対し、以下のような対応を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> ヒトES細胞研究の大臣確認は必要なグループで取得を完了した。8月の「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」の改定により、使用研究が進められるようになったことを踏まえ、研究を推進していく。 創薬産業利用に資する実用化を目指して、ニーズに基づいた優先課題を現時点で再確認し、モデル細胞の評価基準を明確化するとともに、情報交換・意思統一の強化を進める。なお肝細胞研究については関係者でチームを作り毎月ミーティングを行うなど、統一的に評価できる体制を整えた。 研究実施体制を有効に活用しながら、モデル細胞の評価基準を明確化することにより、具体的に実用化に近いモデル細胞の絞り込みとその創製に向けたマイルストーンの見直し（優先課題の明確化）を平成20年度中に行うこととする。さらに、必要があれば最終目標の見直しも行う。 ヒトES細胞の産業利用に関するニーズ把握は既に行っているところであるが、iPS細胞への適用も含め随時見直し、その状況を踏まえて、社会に向けてプロジェクトの成果を積極的に発信していく。 継続して特許情報を把握し、国際的な競争力が薄保できるように特許出願に努める。 個々のテーマに対しES細胞での実用化に止まらずiPS細胞への適用も含めて現時点で実用化の道筋（ロードマップ）を見直し、実用化の姿について具体例を示しつつ、プレスへの広報等を通じて広く一般に示し、この研究および実用化についての理解を得るように努めていく。 プロジェクトリーダーと連携しつつ、引き続き研究推進委員会や開発担当者会議を活用し、実施者間の情報交換、意思疎通に努め、技術展開を図る。既に肝細胞チームを作って連携強化を図る等の具体的な活動に着手した。 創薬産業界において研究に資することが可能となるモデル細胞の創製順位を明確に設定し、そのモデル細胞を着実に創製していく。 ヒトES細胞の加工技術開発については遺伝子機能の解明や創薬研究での利用に対するニーズを踏まえ、既に明確化している具体的なターゲット（遺伝子、細胞等）について引き続き検討する。 遺伝子導入法については導入効率等／組換え効率等を各手法間で比較できるように研究を進めているところであるが、今後も長所短所を明確にしつつ系統化・体系化し、外部の研究者から見ても分かりやすく示していく。 ヒトES細胞の加工技術を何に应用するかについては産業技術としての実用化ニーズ等を踏まえて決定しているところであるが、具体的な有用性を示せる応用例の研究成果を示せるよう研究を進めていく。 遺伝子導入技術や相同組み換え技術については、まずは組換え効率を上げることに注力し、その後、汎用性について京大の保有する3種のヒトES細胞株において同様の成果を得られることを確認していく。 HPRT 遺伝子座以外の遺伝子座の相同組み換え法についても、全体の優先課題を見直す中で、取り組みの可能性を検討し、実施内容に反映させる。 相同組み換え技術については、まだ、組換え効率向上等の技術改良が必要な段階であるが、研究後半に向けては、分化誘導技術等との組み合わせも含め、具体的な有用性を示す研究を中心に重点化する。 遺伝子機能の解明や創薬研究での応用を目指し、既に実用化プランを作成しているが、本研究開発の進捗や顧客ニーズを踏まえて、必要な見直しを行い、着実な産業利用へつなげることに努める。 中間評価を受け、これまでに開発してきた要素技術の統合を目的として関連ある実施機関をまとめ肝細胞チームを作り、創薬現場等の産業利用で求められる肝細胞の機能の評価基準と到達目標を明確化するとともに、創出した肝細胞を評価することによって以降の開発にデータをフィードバックしながら実用化にむけた開発を順次すすめる。 分化誘導制御技術の優先課題（再現性、効率向上等）に留意して研究を進めているところであるが、指摘事項を踏まえ、引き続き、より注意して進める。 	

<p>中間評価結果への対応</p>	<p>18. 人工基底膜による分化誘導法の開発は、まずは機能の検証を進めることが第一であるが、技術の進展を踏まえつつ有用な技術については適宜取り入れていく。</p> <p>19. 優先課題を重点化し誘導効率を高めた技術の確立を関係するグループの連携のもとで前倒しして進めいち早い提供を目指す。</p> <p>20. 実用化可能性を重視して優先課題を整理し、研究が必要な技術課題について絞込み実施していく。</p> <p>21. 人工基底膜および擬似基底膜についてはヒト ES 細胞を用いた検討を行うべく、京大グループ等に提供し、計画通り機能評価を進める。</p> <p>22. 分化誘導制御技術について進めている様々な方法について、引き続き長所短所を明確にし系統化・体系化に取り組む。</p> <p>23. 指摘事項は構築したモデル細胞の実用化に向けたプロジェクト後半での重要な課題であり、その証明に向けたデータを取得し、その評価に努める。</p> <p>24. ヒト ES 細胞からの神経変性疾患モデル細胞の構築は、先行する類似研究との比較評価を行い、引き続き、研究内容の見直しや前倒し実施も含め優位性の維持に努める。</p> <p>25. ES 細胞由来の心筋細胞を用いた毒性試験はヒト ES 細胞から分化誘導された細胞を用いた研究への展開を進める。</p> <p>26. 肝細胞の機能の評価方法・評価基準等の作成などの取り組みを強化すべく、既に着手した。</p> <p>27. 既に肝細胞チームを立ち上げる等実施しているところであるが、今後とも、グループ間で進行スケジュール等の確認・すり合わせを行い、研究計画を柔軟に効率的に運用していく。</p> <p>28. 個々の技術について、創薬メーカーのニーズを捉えつつ実用化までの課題を整理し、実用化可能性を考慮し、優先順位をつけて目標および配分を見直していく。</p> <p>29. 生命倫理問題についてのアプローチについては 8 月に指針の改定があり研究の制約は緩和されたところであるが、iPS 細胞の利用も視野に入れ実用化を検討していく。</p> <p>30. DNA センサー、細胞センサーなどを用いた生物学的評価分野で用いられる計測技術は、本プロジェクトにおける細胞評価技術とも関連するので、今後も先行する技術については積極的に導入していく。</p> <p>31. これまでも成果発信を行っているところであるが、特に本テーマの成果については一般向けにも広報を進め、本研究への理解を広めていく。</p> <p>なお、本研究の ES 細胞の分化誘導を中心とする技術は iPS 細胞に対しても適用可能な技術と考えられるため、本研究の成果は、iPS 細胞の実用化促進および我が国の優位性確立にも貢献するものであり、実施意義はさらに大きいものになったと考えら。その現状を踏まえ、iPS 細胞に関する技術進歩を踏まえつつ、実用化のロードマップを見直すなど、今後も引き続き柔軟に情勢を捉えて計画を見直していく。</p>	
<p>評価に関する事項</p>	<p>事前評価</p>	<p>なし</p>
	<p>中間評価</p>	<p>19 年度 中間評価実施</p>
	<p>事後評価</p>	<p>22 年度 事後評価実施</p>

III. 研究開発成果について	<p>1. ヒトES細胞の加工技術開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒトES細胞への遺伝子導入による安定Tet-On株の作出に成功（導入遺伝子発現制御に成功） ・ヒトES細胞の相同組み換え技術を確立 世界的な高効率優位技術 <p>2. ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・神経幹細胞・神経前駆細胞への高効率分化誘導に成功（日本人由来のヒトES細胞株を利用） ・心筋細胞、肝細胞、血管系細胞及びアストロサイトへの分化誘導技術を確立 <p>3. 研究用モデル細胞の構築技術の開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・神経変性疾患原因遺伝子の発現ベクターを構築 ・疾患関連遺伝子導入安定発現株樹立（株数増加中） ・BBBモデル構築技術確立（3次元モデル培養系構築技術進展） ・ハイスループットスクリーニング（HTS）技術構築 <p>4. 細胞外環境の人工制御技術開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・マウス基底膜分子構成をデータベース化「Mouse Basement Membrane Bodymap」 ・人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術開発に着手 ・基底膜構造体培養基質を創製 ・脳血流閥門培養系コラーゲン繊維基質開発 <p>5. モデル細胞を利用した創薬支援ツールの開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・薬物動態研究用モデルである肝細胞を用いるサンドイッチ培養法技術を構築 ・無染色画像処理型細胞精製技術開発、データベース化 ・アプタマー可逆修飾細胞精製技術確立 	
	論文/文献/学会発表等	「論文/文献」193件、「学会/研究会」332件
	特許	「出願済」24件（うち国際出願6件）
	その他の外部発表（プレス発表等）	「新聞/マスコミ」45件 平成22年5月18日に、「NEDO公開シンポジウム」を開催し、研究開発成果を広く一般に公表した。
IV. 実用化、事業化の見通しについて	<p>1. ヒトES細胞の加工技術開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・作業効率と付加機能性が向上するとともに細胞医療・細胞加工ビジネスへ期待 <p>2. ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・日本人由来のヒトES細胞を利用したことで日本人における薬効、安全性の確認等への利用に期待 <p>3. 研究用モデル細胞の構築技術の開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・神経変性疾患モデル神経細胞を用いた医薬品候補化合物スクリーニング系への利用に期待 <p>4. 細胞外環境の人工制御技術開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・世界的標準リファレンスとなりうる成果であり一部製品化された他、技術移転交渉中 <p>5. モデル細胞を利用した創薬支援ツールの開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒト肝細胞に適用し創薬プロセスの効率化への期待 ・心筋毒性スクリーニングビジネス 	
V. 基本計画に関する事項	作成時期	平成17年3月制定
	変更履歴	平成18年1月一部改訂。 平成20年1月一部改訂。プロジェクトリーダー名の記載 平成20年7月、イノベーションプログラム基本計画の制定により、「(1)研究開発の目的」の記載を改訂

プロジェクト用語集

[プロジェクト用語集]

項番	分類	用語	説明
001	①-1	スクリーニング	選択あるいは選別検査の意味。条件に合うものを選び出すことを意味する。
002		エレクトロポレーション法	高電圧パルスで一時的に脂質二重層の細胞膜構造を不安定化して穴をあけ、そこから外来の核酸を取り込ませる方法。
003		リポフェクション法	導入する核酸を陽性荷電脂質などと電気的な相互作用により複合体を形成させ、エンドサイトーシスや膜融合により細胞に取り込ませる方法。
004		ウイルスベクター(アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター)	ウイルスが元来持っている細胞侵入機構を利用して、効率良く遺伝子を細胞内に導入するベクター(遺伝子の運び屋)。増殖や病原性を司る遺伝子は除かれており、代わりに発現させたい遺伝子を組み込んで使用する。
005		フィーダー細胞	ES 細胞を未分化維持状態で培養する際、下敷きとして用いる細胞のこと。通常フィーダー細胞は増殖しないようにマイトマイシンなどで処理して後で用いる。
006		FACS	FACS(fluorescence activated cell sorting)は、蛍光抗体で染色した細胞を液流に乗せて流し、レーザー光の焦点を通過させ、個々の細胞が発する蛍光を測定することによって細胞表面にある抗原量を定量的に測定することのできる機器。
007		核型	染色体の形、数、大きさに関すること指す。ヒトの場合、通常は合計46本の染色体を持っている。
008		胚様体	初期胚に似た形態を示す細胞塊のこと。この胚様体の中にはさまざまに分化した細胞が観察される。
009		テラトーマ	テラトーマは奇形腫ともいい内胚葉、中胚葉、外胚葉に由来する組織が種々の程度に腫瘍化し、混ざり合った混合腫瘍のこと。
010		IRES	internal ribosome entry site のこと。リボソームがこの site に結合して翻訳が開始される。
011		Tet-On/Off システム	テトラサイクリンという化学物質により遺伝子の発現を On/Off するシステム。
012		エンベロープ	レンチウイルスなどを覆う膜構造より突き出ているタンパク質。ベクター作製の際にこのタンパク質を変えることにより、感染する細胞種を変えることができる。
013		ウイルス受容体	ウイルスが細胞に感染する際に、最初に結合する膜タンパク質。
014		薬剤(NEO、Hyg)耐性遺伝子	ネオマイシン(NEO)やハイグロマイシン(Hyg)などの薬剤の作用から逃れる機能を持った遺伝子。発現させたい遺伝子と繋げて細胞内に導入し、各薬剤で選択することにより、その遺伝子が染色体上に安定に組み込まれた細胞を得ることが出来る。
015		ヘルパー依存型アデノウイルスベクター	すべてのウイルス遺伝子を除いた、挿入できる DNA のサイズがより大きく、細胞へのダメージがより少ない、改良型アデノウイルスベクター。
016		カプシド	AAV などのウイルス粒子の殻タンパク質のこと。ベクター作製の際にこのタンパク質をを変えることにより、感染する細胞種を変えることができる。
017	①-2	相同組み換え	2遺伝子の相同的な配列が組み換わること。本文中では特に、ヒト ES 細胞のゲノム DNA と相同的な配列を持つベクターを用いて人為的に相同組み換えを起こし、狙った部位の遺伝子を改変することを指す。

018		サイレンシング	遺伝子の発現が抑制される現象。
019		HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase の略称。いかなる細胞でも遺伝子がオープンで、常に転写が行なわれていると考えられている。
020		プロモーター	転写開始に関与するゲノム DNA 上の塩基配列。
021		GFP	Green Fluorescent Protein(緑色蛍光タンパク質)の略称。励起光を当てると発光する。
022		ノックアウト	標的とした遺伝子を改変し、発現できないようにすること。
023		ノックイン	標的とした遺伝子を改変し、内在プロモーターの支配下に任意の遺伝子を挿入すること。
024		アレル	父親と母親の染色体それぞれ一本ずつから由来する対立遺伝子。
025		遺伝子発現カセット	蛋白質をコードする遺伝子にプロモーターとターミネーターを連結した DNA 断片。
026		サザン法	制限酵素で切断したゲノム DNA をゲル電気泳動で分画し、その泳動状態を保ったままニトロセルロースなどのフィルターに移し、標識した DNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行なってプローブと相補配列をもつ DNA 断片を検出する方法。
027	①-3	RNA 干渉法	2本鎖 RNA によって、その2本鎖 RNA に相同な配列を有する RNA が切断され発現が抑制される現象。2006 年ノーベル医学生理学賞の対象となった現象。
028		shRNA	RNA 干渉を起こすことができる短いヘアピン状の RNA
029		Cre-loxP システム	遺伝子組み換え酵素 Cre と Cre の標的配列である loxP 配列を組み合わせることによって、Cre が発現している細胞だけで遺伝子組み換えを起こすシステム。
030		ROSA 領域	マウスゲノム上において、遺伝子発現の抑制が起こらず、常に遺伝子発現を起こすことができることが知られている領域の一つ。
031		インスレーター配列	周囲のプロモーターからの発現制御やゲノム構造のリモデリングによる遺伝子発現抑制(サイレンシング)を受けないように、これらの影響をせき止める機能を持った遺伝子配列。
032		誘導性ノックダウンレスキューシステム	shRNA による標的遺伝子の発現抑制と、標的遺伝子の cDNA 発現を tet-ON/OFF システムなどを用いて誘導性に回復させることの両方が可能な遺伝子発現制御システム。
033	②-1	細胞治療	機能不全に陥った細胞を機能が正常な細胞を移植することによって治療する再生医療のこと。
034		ストローマ細胞	支持細胞の一つ。
035		神経変性疾患(アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病)	神経系細胞が変性し欠失することによって引き起こされる疾患の総称。疾患ごとに異なった神経細胞が変性しそれぞれの神経変性疾患特有の症状を示す。
036		神経幹細胞	神経系のすべての細胞を生み出す幹細胞。
037		神経前駆細胞	幹細胞より分化し、神経細胞のみを生み出す細胞。
038		マトリゲル	EHS 肉腫の腫瘍組織の抽出物で、ラミニン-111 を大量に含む。上皮系細胞の培養基質として利用されている。BD (Becton, Dickinson and Company)から購入可能な細胞外基質タンパク質の商品名。
039		ロゼッタ	ES 細胞から分化してきた神経前駆細胞が作る特徴的な細胞群。
040		ソニックヘッジホッグ	ヘッジホッグファミリーの一つ。ES 細胞から運動神経細胞へ分化させるのに必要なタンパク質。

041		ノギン	トランスフォーミング成長因子 β スーパーファミリーの一つ BMP の拮抗因子。ES 細胞の培養液にノギンを添加することによって、ES 細胞を神経前駆細胞へ分化させることができる。
042		Wnt	細胞で観察される主要なシグナル伝達系の一つで胚発生において重要な機能を果たす。Dkk1 はその伝達系を阻害し、ES 細胞から神経前駆細胞への分化効率を向上させる。
043		Nodal	細胞で観察される主要なシグナル伝達系の一つ。その活性は ES 細胞の未分化維持に必要とされる。
044	②-2	QT 延長	心電図上の QRS 群(Q 波または R 波)の始まりから T 波の終了までを QT 間隔という。QT 間隔は心室の興奮が始まって(脱分極)から終わる(再分極)までの時間を示す。この QT 間隔が長くなることを QT 延長と言う。先天性・後天性のものが知られている。
045		HERG チャネル	human ether a-go-go-related gene の略。hERG は遅延整流性カリウムチャネルの早い成分(I_{Kr})をコードしており、 I_{Kr} が抑制されることにより QT 延長が起こり、QT 延長はさらに TdP につながることもある。薬剤惹起性 QT 延長作用のほとんどは I_{Kr} を抑制することによって生じている。
046		イオンチャネル	細胞膜にある膜貫通タンパク質で、特定のイオンを通過させる性質を持つ。神経、心筋細胞等の興奮性細胞では、膜電位の維持、活動電位の発生等に関与する。
047		細胞外電位	興奮性細胞の活動電位を記録する電気生理学的手法の一つ。神経や心筋の細胞に電極をあて電気活動を記録する。
048		ペースメーカー細胞	心筋には血液のポンプ作用を持つ固有心筋とそれを働かせるための興奮の発生と伝導を司る特殊心筋とがある。特殊心筋で最初に興奮を発生する部位は右心房にある洞房結節と呼ばれここから心臓全体に興奮が伝導して心臓の収縮リズムを作り出している。この部位の細胞をペースメーカー細胞と呼ぶ。
049		心筋の自動能	心臓を構成する筋には自ら律動的に興奮を起こす性質を有するものがあり、その興奮により自動収縮を繰り返す。これを自動能と呼ぶ。
050	②-3	薬物毒性試験(薬物安全性試験)	薬物の薬理作用または副作用の観察を目的として、該薬物のヒトでの安全性を予測するために行われる試験。
051		薬物代謝酵素(CYP)	私たちが飲んだ薬は体の中で主に小腸で吸収され血流に乗って体全体に分布し、必要な場所で作用した後に肝臓で分解され体外へと運び出される。この時、薬を分解する役割を果たす、肝臓で作られる薬物代謝酵素。
052		ミクロソーム	細胞を破碎した後、遠心分離で得られる主に小胞体からなる細胞成分。生体肝細胞からえられるミクロソームは CYP 等の酵素を豊富に持ち、CYP 阻害実験に多く用いられる。
053		不死化	初代培養細胞は通常分裂回数に限度があり、得られる細胞数に限界がある。細胞周期をチェック・制御する機構を阻害することにより細胞が無限増殖能を得、継代培養可能とすることを不死化という。
054		温度感受性 SV40-T 抗原遺伝子	SV40-T 抗原は、細胞周期を制御する働きを持つ癌抑制遺伝子 p53 の働きを阻害し、結果として細胞の増殖を促す作用を持つ。本抗原遺伝子の温度感受性変異株。
055		プロモーター/レポーターベクター	ある遺伝子のプロモーターの下流に蛍光タンパク質などをコードするレポーター遺伝子を連結し、その融合遺伝子産物の活性(蛍光など)を測定する事によって元の遺伝子の発現の有無や、その発現の強さを知らるために用いられる遺伝子のこと。
056		BAC クローン	大腸菌を宿主とするバクテリア人工染色体(Bacteria Artificial Chromosome; BAC)ベクターに入っている 100-200kb 程度の巨大な DNA 断片を指す。

057	②-4	基底膜	上皮組織と結合組織の境界に形成されるシート状の細胞外マトリックス。上皮細胞に限らず、血管内皮細胞や筋細胞など、様々な細胞が基底膜を足場として利用している。
058		免疫組織化学	組織標本における抗原分子の局在を抗体の特異的な反応性を利用して調べる方法。組織標本を特定の抗原に対する抗体と反応させ、結合した抗体を酵素抗体法などにより検出する。
059		in silico	in vivo (生体内で), in vitro (試験管内で)に対して、コンピューターを用いて行う解析を指すことば。コンピューターの半導体にシリコンが使われていることに由来する。
060		分泌シグナル	タンパク質が細胞から外に分泌されるための目印となるアミノ酸配列。通常、タンパク質のアミノ末端領域に存在する疎水性アミノ酸に富んだ配列が分泌シグナルとして機能する。
061		エピブラスト	ほ乳類の胚発生初期に生じる分化多能性を有した細胞層で、単層の柱状上皮様構造を形成する。初期外胚葉、胚盤葉上層ともいう。
062		Ensembl データベース	EBI (European Bioinformatics Institute) と Sanger Institute による共同プロジェクトで様々な生物種のゲノム情報を収集・解析し、インターネット上に公開している。 http://www.ensembl.org/index.html
063		PSORTII	新たに合成されたタンパク質が細胞内のどの小器官に輸送されるかを、目印となるアミノ酸配列に基づいて予測する検索プログラム。
064		SOSUI	タンパク質のアミノ酸配列に基づいて膜結合領域を予測する検索プログラム。
065		ヒドロキシプロリン	コラーゲンに多く含まれる特殊なアミノ酸。プロリルヒドロキシラーゼの作用によってタンパク質中のプロリン残基が変化して生じる。
066		円偏光二色性	内部構造がキラルな物質が円偏光を吸収する際に左円偏光と右円偏光に対して吸光度に差が生じる現象。
067		EHS 肉腫	周囲に基底膜様ゲルを大量に分泌・蓄積するマウス継代移植腫瘍。この腫瘍組織の抽出物は、ラミニン-111 を大量に含み、マトリゲルの商品名で培養基質として広く使われている。
068		マトリゲル	038 に前述。
069		Hanging drop 法	少量の細胞懸濁液を培養皿の蓋などの基板上にのせ、上下逆にして培養することで、懸垂状態の液滴中で細胞塊を形成させる方法。
070		定量 RT-PCR	細胞などから抽出した全 RNA を逆転写して得られた cDNA を鋳型とし、PCR 法によって目的遺伝子の cDNA を増幅する際の増加率を測定することで、もとの目的遺伝子 RNA の発現量を相対的に定量する方法。
071		ラミニン	基底膜を構成する主要構成蛋白質。α鎖(分子量40万)、β鎖(分子量20万)、γ鎖(分子量20万)からなるヘテロ3量体の巨大蛋白質。ヒトでは5種類のα鎖、3種類のβ鎖とγ鎖があり、それらの組み合わせの異なる12種類のアイソフォームの存在が確認されている。組織ごと、細胞ごとに基底膜を構成するラミニンのサブユニット組成は異なる。
072		IV型コラーゲン	コラーゲンの一種で、基底膜だけに存在する。基底膜の特徴であるシート状メッシュワーク構造を形成すると考えられている。遺伝子としてはα1からα6までのタイプが知られており、臓器によってその構成が異なる。
073		I型コラーゲン	ほ乳類の体内に最も豊富に存在する蛋白質。コラーゲンのプロトタイプでもあり、約10万の分子量をもつα鎖3本が3重らせんをまいた直線状の分子である。生体内の皮膚、骨、腱等に大量に存在し、体を支えている。

074		ラミニン E8 フラグメント	ラミニンをエラスターゼ消化した際に得られる断片の一つ。 α 、 β 、 γ 各鎖のC末端領域を含み、全長のラミニン分子の細胞接着活性をほぼ100%保持している。
075	③-1-1	ポリグルタミン病	異常な長さのポリグルタミン鎖が原因で発症する神経変性疾患群の総称。原因遺伝子によってハンチントン病、球脊髄性筋萎縮症などがある。
076		アミロイド β タンパク質	40-42(3)アミノ酸からなるペプチドであり、 β -及び γ -セクレターゼの働きにより前駆体蛋白(APP: amyloid β protein precursor)から切り出されてくる。アルツハイマー病では $A\beta$ が凝集して不溶性の線維形成がなされてアミロイドとなり脳に沈着する(老人斑)。
077		CAG 繰り返し配列	正常な遺伝子で見られないほどの CAG の塩基配列を繰り返しことによってポリグルタミン病の原因となる。遺伝子上の CAG はタンパク質ではグルタミンを意味しており、結果生成されるタンパク質でのグルタミン鎖が異常な長さになる。
078		ハウスキーピング遺伝子	多くの細胞で発現し、細胞の普遍的な機能維持に必要とされる遺伝子。
079	③-1-2	血液脳関門(BBB)	物質(薬物)が血中と脳内との間の物質透過を制御する生体内のバリア機能。 水溶性の高い物質あるいはタンパク質などの大きな分子はこの関門を透過し難いが、栄養素(グルコース、アミノ酸、ヌクレオチドなど)は脳毛細血管に発現している多くのトランスポーターによって選択的に透過する。また、脳毛細血管内皮細胞に発現するP糖タンパク質などの排泄トランスポーターが毒素・薬物を脳内から血中へ汲み出す働きがある。
080		密着結合	細胞間結合形態の一つ。細胞間が密着に結合して気密性を保ち、様々な分子(物質)が細胞間を通過するのを防ぐ。また、膜タンパク質の移動も制限し、頂端領域と基底領域のそれが違うために、細胞の極性が維持できる。
081		薬物動態試験	薬物動態試験とは、投与された薬物が体内でどのように処理(吸収 Absorption, 分布 Distribution, 代謝 Metabolism, 排泄 Excretion)されるかを調べる試験。 略して ADME(薬物動態)とも称される。
082		MACS	磁気細胞分離法(Magnetic Cell Sorting)の略。抗体を担持した磁気ビーズを用いて、特定の細胞を磁石で捕集することにより分別する手法。大量の細胞を一度に処理できる特長をもつ。
083		経内皮電気抵抗	単層培養された血管内皮細胞シートを挟む間での電氣的抵抗のこと。血管内皮細胞によるバリア形成の判断の一指標となる。強度のあるバリアが形成されるほど、電気抵抗は高い値を示す。
084	③-1-3	ハイスループットスクリーニング	創薬初期に薬の種となる化合物を探すために、何万~百万種類という化合物を一斉にテストする手法、HTS と略される。
085		化合物ライブラリ	HTS に供与する何万~百万種類という化合物群のこと。
086	③-2	アガロースマイクロチップ	細胞接着基板上にアガロースを塗布し、集束赤外レーザーを用いて任意の部位のアガロースを溶解することによりチャンバーを作成した微小チップのこと。
087		QT 延長	044 に前述。
088		アプタマー	タンパク質など標的物質と特異的に結合する能力を持った合成核酸分子。DNA を素材にした DNA アプタマー、RNA を素材にした RNA アプタマーなどがある。
089		リエントリー	リエントリー(巡回興奮)と呼ばれる電氣的興奮が消滅することなく、グルグルと回り続けることを言う。持続性不整脈の原因の多くはリエントリーによるものと考えられている。
090		アミロイド蛋白質 $A\beta$	076 に前述。

091		視交叉上核	視交叉上核 (Suprachiasmatic Nucleus: SCN); 脳の視床下部に存在する神経核で生体リズムの中心を担う。
092		LTP	Long Term Potentiation の略。シナプス前ニューロンの軸索に、高頻度連続刺激(テタヌス刺激)を与える事により、それまでよりも大きなシナプス後電位(EPSP)が得られ、長時間にわたってシナプス伝達「効率」が上昇する現象。記憶、学習、シナプス可塑性の基礎とされる。
093		GAD-GFP マウス	GABA neuron に特異的に発現している酵素、グルタミン酸脱炭酸酵素(Glutamic Acid Decarboxylase (GAD))に GFP ラベルされたマウス。
094		オンチップ・セルソーター	一般的なセルソーターは蛍光染色した細胞にレーザー光を照射して蛍光の色を基準に細胞を分離精製する装置であるが、オンチップ・セルソーターは光学画像処理により目的細胞を無染色で分離精製出来る装置である。
095		RT-PCR 法	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction 法: 逆転写-遺伝子増幅法, 細胞内に存在するメッセンジャーRNA の量を測定する方法。細胞内にどのような遺伝子がおおよそどれくらい発現しているか確認できる。
096		TdP	Torsades de pointes の略。致死性の心室頻拍で近年、遺伝性や薬剤惹起性で起こることがわかり注目されている。
097		hERG	045 に前述
098		E4031	エーザイが開発していた抗不整脈薬であるが、副作用(I_{Kr} 阻害作用)の為に開発を断念した。 I_{Kr} 阻害作用が強いので QT 延長作用の assay 系において陽性対象薬として汎用されている。
099		ソタロール	ブリistol・マイヤーズ株式会社からソタコールの商品名で販売されている抗不整脈薬。E4031 同様、 I_{Kr} 阻害作用が強いので QT 延長作用の assay 系において陽性対象薬として汎用されている。
100		ニフェカレント	日本シェーリング株式会社からシンビットの商品名で販売されている抗不整脈薬。E4031 同様、 I_{Kr} 阻害作用が強いので QT 延長作用の assay 系において陽性対象薬として汎用されている。
101		Microfluidics	生体内の微小環境を擬似的にチップ上に再現し、微小空間内で化学反応等を行う実験系。
102		血液脳関門 (BBB)	075 に前述。
103		AMPA 受容体	グルタミン酸受容体の一種。人工アミノ酸である AMPA(α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メソオキサゾール-4-プロピオン酸)を選択的に受容することから名づけられた。中枢神経系に広く分布し、記憶や学習に大きく関与し、他の主要なグルタミン酸受容体である NMDA 受容体が通常不活性の性質を持つため、中枢神経系におけるグルタミン酸の興奮性シナプス伝達は、普段主にこの受容体によって行われている。
104		NMDA 受容体	グルタミン酸受容体の一種。記憶や学習、また脳虚血などに深く関わる受容体であると考えられている。他のグルタミン酸受容体サブタイプである AMPA 受容体やカイニン酸受容体と異なり、NMDA(N-メチル-D-アスパラギン酸)をアゴニストとして選択的に受容することから分類された。NMDA 受容体は通常不活性な性質を持つ。これは、細胞外からのマグネシウムイオンがこの受容体の活動を阻害しているためである。刺激に応じて流す電流は、AMPA 受容体に比べて遅く、持続的である。
105		EPSC	興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current)

106		mEPSC	微小興奮性シナプス後電流 (miniature EPSC)
107		Paired pulse ratio	最初のシナプス電流に対する次の電流の比として定量化される。刺激間隔は数 10msからせいぜい 2-300ms。2発目が大きくなった時を paired-pulse facilitation(PPF)と呼び、小さくなったときは paired pulse depression(PPD)と言う。
108	③-3	サンドイッチ培養	肝細胞をコラーゲンやマトリゲルなどにより上下をはさんで培養することで、極性誘導を図り、細胞間に胆管腔を形成させることができると共に、数日間のレベルで通常の培養では不可能であった異物解毒に関与するトランスポーターの発現を維持することができるという利点を有する培養系
109		OATP ファミリートランスポーター	OATP(organic anion transporting polypeptide)は、サブタイプにより肝臓、小腸など特定の臓器に局在するものと、全身に発現するものが存在する。基質としては主に有機アニオン類を中心に広範な基質を認識することが知られており、薬物についても HMG-CoA 還元酵素阻害剤や angiotensin 変換酵素阻害薬、angiotensin II 受容体拮抗薬など臨床上重要な薬物を多数基質として受け入れる。肝臓においては、特に OATP1B1, OATP1B3 が重要であると考えられている。

I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性

1.1 NEDO が関与することの意義

創薬基盤研究に用いるヒト由来細胞として初代培養細胞や組織幹細胞が考えられるがこれらの細胞は分裂能が限られており、均質な細胞を大量に必要とするスクリーニング系には適当とはいえない。また、疾患モデル細胞構築には細胞の遺伝子改変が必要だが、遺伝子発現解析を行い利用可能な細胞数まで増殖させることは不可能である。さらに、ヒト由来細胞の利用については採取時の安全性の問題や提供者への説明等種々の制限がある。このような初代培養細胞や組織幹細胞を用いる場合の問題点は、ヒトES細胞を用いることで解決できる。ヒトES細胞を用いれば、大量に増殖させた後に必要とする正常細胞に分化させることが可能であるし、特定の遺伝子を導入した疾患モデル細胞を作ることも可能である。

よって本研究開発では、均質な遺伝的背景を有し、無限に増殖できるとともに、あらゆる細胞組織に分化できる多能性を有するヒト ES 細胞(ヒト胚性幹細胞)を対象に、遺伝子の相同組換え、RNA 干渉による遺伝子サイレンシング技術等を用いてヒトES細胞を加工し、様々な分化誘導因子や細胞外環境の制御によって目的細胞への分化誘導を制御する基盤技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能や細胞内ネットワークの解明、薬剤候補の安全性の向上といった創薬の基盤研究に資するヒト由来の細胞を用いた研究用モデル細胞の創製を行うことを目的として実施するものである。

しかし、本目的を達成するためには、基盤的な研究要素が多く、民間企業の力だけではその達成に多大の時間を要し、産学の知見を結集して開発を進めることが必要である。また、ヒト胚を滅失させて作製されたヒトES細胞を用いることから、その使用にあたっては倫理的な配慮が特に必要であるとともに、厳格な管理の下で研究を進める必要があり、使用の条件も厳しく、民間のみで推進するには研究開発リスクが大きい。その一方で、ヒトES細胞から作製されたヒトモデル細胞を利用することにより、ヒト特有の有害事象や薬効を臨床試験前に想定することも可能になると考えられ、有用性が高く汎用性の高い基盤技術として期待されることから、国が関与することにより研究の促進を図る意義がある。

1.2 実施の効果(費用対効果)

ヒトES細胞由来の研究用モデル細胞を創製するとともに、創製した研究用モデル細胞と各種デバイス技術とを融合し、①薬物の効果・毒性・副作用等の定量的な評価を可能とする創薬支援システムの開発によって、前臨床試験の段階で臨床試験に進めるかどうかを、より早期に判断することを可能とする他、②疾患メカニズムの解明を目指す基礎研究等に利用することによって、新たなコンセプトに基づく創薬ターゲットの創出が期待されるなど、創薬基盤を支える有効な技術の

開発が見込まれる。

これらの研究開発成果の実用化は、遺伝子機能・ネットワークや疾患メカニズムの解明を効率的に行うとともに、ヒト生体内において薬剤候補が示す反応を、従来に比べ、より高い精度で予測することが期待されるとともに、それによって新薬の安全性と医薬品開発の効率を向上させ、創薬の開発研究における製品化までの期間を短縮する効果が充分にあるものと判断され、医薬品の迅速かつ安価な提供により、高齢化社会における国民医療費の高騰化を抑制すると同時に、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現に寄与することが期待される。また、本研究で得られる成果は再生医療の分野にも生かされることが期待され、費用の投入に十分に答える大きな効果が得られると考えられる。

2. 事業の背景・目的・位置づけ

製薬産業界では、ライフサイエンス研究における近年の技術的な発展によって蓄積されたゲノムの塩基配列情報や遺伝子発現情報、タンパク質の立体構造情報、タンパク質と低分子化合物の相互作用情報など、様々なゲノムサイエンスの成果としての遺伝子情報を活用するゲノム創薬によって創薬プロセスが飛躍的に効率化し、安価な医薬品を迅速に上市することが可能となると期待されていた。

しかし、実際には投入する研究開発費が年々増加していつているにも関わらず、上市される医薬品の数はむしろ減少しており、ゲノム創薬におけるギャップが生じている。これは、近年のポストゲノム研究の進展により見出された創薬ターゲット候補から真の druggable gene を絞り込むことが困難であることや臨床試験以前での新薬の安全性評価及び薬理評価の制度が十分でないことが一因と考えられる。創薬プロセスの後期である臨床試験において薬剤候補がドロップアウトしてしまうと、それまでに投入した開発費が回収困難となってしまうことから、創薬プロセスの早い段階から効率的に候補化合物や創薬ターゲットを絞り込むことを可能とし、臨床試験に至るプロセスの効率化に有効な新規技術の開発が重要な課題となっていた。

遺伝子機能の解明や新薬の安全性や薬効を評価する際には、従来、マウスやウサギなどの動物や長期間にわたって培養が継続されている株化されたヒト細胞を用いて評価を行っている。しかし、これらの細胞と実際のヒト生体内の細胞は異なった性質を有しているため、実際の生体内での反応を高い精度で予測することが困難であることから、臨床試験において安全性と薬効評価でドロップアウトする確率が高くなっている。

このため、医薬品開発における安全性や薬理評価の確実性の向上等、創薬に向けた研究開発を加速するためには、ヒト生体内における様々な反応や遺伝子の機能をより高い精度で解析し、開発のより早い段階で評価することを可能とする人体の組織や疾病等の様々なヒトモデル細胞株を創製する基盤となる技術開発を行うことが必要であった。このような背景の下、本研究開発では、均質な遺伝的背景を有し、無限に増殖できるとともに、あらゆる細胞組織に分化できる多能性を

有するヒトES細胞(ヒト胚性幹細胞)を対象に、遺伝子の相同組換え、RNA干渉による遺伝子サイレンシング技術等を用いてヒトES細胞を加工し、様々な分化誘導因子を用いて分化誘導を制御する基盤技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能や細胞内ネットワークの解明、薬剤候補の安全性の向上といった創薬の基盤研究に資する研究用モデル細胞の創製を行うことを目的とする。本研究開発は、遺伝子やタンパク質等の生体分子の機能・構造解析等を行うとともに、それらの研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に利用するためのデータベース整備や先端技術を応用した高度医療機器開発等により、テーラーメイド医療・予防医療・再生医療の実現や画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指すことを目的とする「健康安心プログラム」の一環として実施されるものであり、ゲノム創薬加速化支援技術開発の一つとして位置づけられている。

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

最終目標(平成21年度)

ヒトES細胞の加工技術、分化誘導制御技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価、創薬研究の効率化のための技術基盤として有用な研究用モデル細胞を創製する。

つまり、ヒトES細胞から、神経系細胞、心筋細胞、肝細胞への分化誘導技術を開発し、さらにこれらの細胞を加工した疾患モデル細胞を創製し、創薬の基盤研究における薬効評価系、安全性薬理試験系を確立する。

中間目標(平成19年度末)

ヒトES細胞の加工技術及び分化誘導制御技術の開発に目処をつける。

2. 事業の計画内容

2.1 研究開発の内容

遺伝子機能の解明や新薬の安全性や薬効を評価する際には、従来、マウスやウサギなどの動物や長期間にわたって培養が継続されている株化されたヒト細胞を用いて評価を行っている。しかし、これらの細胞と実際のヒト生体内の細胞は異なった性質を有しているため、実際の生体内での反応を高い精度で予測することが困難であることから、臨床試験において安全性と薬効評価でドロップアウトする確率が高くなっており、実際の生体内の細胞に近い状態の細胞を用いた評価系の確立が必要である。

このため、無限に増殖できるとともに、あらゆる細胞組織に分化できる多能性を有するヒトES細胞由来の、均質な遺伝的背景を有したモデル細胞を利用することによって、前臨床試験の段階で臨床試験に進めるかどうかを、新薬の安全性と薬効の観点から、より確実に判断することを可能とする有用な研究用モデル細胞の構築が必要である。

具体的研究開発内容

遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価及び創薬研究の効率化に有用なヒトES細胞由来の研究用モデル細胞の構築を行うため、以下の技術開発を行う。

(1)ヒトES細胞の加工技術開発

外来遺伝子の導入や内在性遺伝子の改変、siRNAによる遺伝子機能抑制などの手法を利用し、研究用モデル細胞として有用な性質をあらかじめヒトES細胞に持たせるための加工技術の開発を行う。

- ①遺伝子導入と発現制御技術の開発
- ②相同組換え技術の開発
- ③RNA干渉法による遺伝子発現制御技術の開発

(2)ヒト ES 細胞の分化誘導制御技術開発

特定の組織系統への分化誘導に重要な役割を果たす外因性因子や増殖因子、加工された特性等を利用して、ヒト ES 細胞を特定の経路に沿った分化誘導を制御する技術の開発を行う。

これに加え、生体内における細胞外環境を人工的に再構築し、細胞の生存する空間を制御することによって、目的とする特定の細胞への分化誘導を制御する技術等の開発を併せて行う。

- ①神経系細胞への分化誘導技術の開発
- ②心筋細胞への分化誘導技術の開発
- ③肝細胞への分化誘導技術の開発

(3)研究用モデル細胞の構築技術の開発

開発した技術を利用して、ヒト生体内において薬物候補物質が示す反応を高い確率で予測することを可能とし、遺伝子機能の解明や新薬の安全性と創薬研究の効率化のための基盤研究に重要な研究用モデル細胞を構築する。

また、構築した細胞を利用し生体組織が有する機能をデバイス上に再構築することによって、より生体内の反応に近い条件下で、有効性を示す候補物質の探索や、毒性試験を簡便・迅速にスクリーニング可能な創薬支援ツールの開発を行う。

- ①神経変性疾患モデル神経系細胞の作出技術の開発
- ②薬物安全性試験用・心臓チャネル病モデルの心筋細胞モデル系の開発
- ③薬物代謝毒性試験用の肝細胞モデル系の開発

実施期間

研究開発期間：平成17～21年度(5年間)

2.2 研究開発の実施体制

研究開発の実施にあたっては、策定した基本計画に対する具体的な提案を公募により募り、①外部有識者から構成され NEDO 内に設置される採択審査委員会による主に技術的な視点からの事前評価、及び、②事前評価結果を踏まえ、技術的な視点に加え財務面等、総合的な視点から契約・助成審査委員会による審議により、最終的な採否を決定し、研究開発体制を構築することとしている。

本プロジェクトでは、研究開発開始時に行った公募に対し、応募があった 11 件の提案の中から選定した2件の提案を核として研究開発体制を構築した。その後、プロジェクト成果の一層の向上のため、策定した基本計画を変更し、「①生体内における細胞外環境を人工的に再構築し、細胞の生存する空間を制御することによって、目的とする特定の細胞への分化誘導を制御する技術の開発」、及び、構築したモデル細胞の機能評価への活用を視野に「②構築した細胞を利用し生体組織が有する機能をデバイス上に再構築することによって、より生体内の反応に近い条件下で、有効性を示す候補物質の探索や、毒性試験を簡便・迅速にスクリーニング可能な創薬支援ツールの開発」を追加、当該技術に関する提案を追加公募により募り、応募があった 13 件の提案の

中から5件の提案を選定し、体制に加える変更を行った。更に、平成 18 年度に研究開発の一部を特定非営利活動法人幹細胞創薬研究所へ承継する体制変更を行い、現在に至っている。

事業開始時点(平成 17 年度)における実施体制

平成 17 年2月 14 日に公募の予告を行い、平成 17 年3月 22 日～4月 26 日に公募を実施した。なお、公募にあたっては、利用するヒトES細胞株は特定しないこととした他、ヒトES細胞株から分化誘導を行ったモデル細胞を研究に利用することがプロジェクトの目的であることから、使用するヒトES細胞株について、①細胞株名、②樹立機関、③利用にあたりどのような条件が存在するかについて、予め提案書に明示させることとした。応募のあった 11 件の提案について、NEDO内に設置した5名の学識経験者等から構成される採択審査委員会において、書面審査及びその結果を踏まえて選考した8件の提案を対象としたヒアリング審査によって採択候補を選考した後、NEDO内の契約・助成審査委員会によって採択審査委員会の選考結果を踏まえて、国立大学法人京都大学再生医科学研究所が樹立したヒトES細胞株を利用する、国立大学法人京都大学、アステラス製薬株式会社、株式会社リプロセルからの全体提案及び埼玉医科大学からの部分提案、計2件を採択とし、国立大学法人京都大学再生医科学研究所長 中辻憲夫氏をプロジェクトリーダーとして、平成17年6月より研究開発を開始した。

追加公募による実施体制の強化とNPO法人への承継による体制変更

(1)追加公募による実施体制の強化

本研究開発において創製する研究用モデル細胞が持つ課題は、「生体内の細胞とどの程度同じ挙動を示すものなのか」「何がどの程度まで言えるのか」を評価し、創製した研究用モデル細胞の特性を明らかとすることが実用化に向けた重要な課題であった。このための一つの方法として、生体由来の細胞や創薬プロセスにおいて使われている細胞株と比較し、どの程度類似した挙動を示すかを解析すること、例えば、心毒性のある既存の化合物を創製した研究用モデル細胞に作用させ、毒性に伴う拍動異常とその回復がこれまでに利用されている細胞株と同等であることを示すことによって細胞機能の評価ができるのではないかと考えた。また、その際には、単に細胞レベルで評価するのではなく、細胞間のインタラクションによって拍動が安定し、かつ、生体組織内の細胞と同等の拍動が再現できると期待され、樹立された研究用モデル細胞を単に細胞として評価するのではなく、創薬支援研究において細胞機能を持った細胞集団として取り扱えるようにすることを指向した。

また、従来から細胞の分化誘導等の研究に利用されている外因性因子は増殖因子や化学物質等の液性因子が主な研究対象となってきたが、細胞周囲に固相化される細胞外マトリクスが細胞の分化形質の維持や安定化に必要であること、また、我が国では細胞外マトリクスの一つであるコラーゲン等の生体組織分子に関する多くの研究の蓄積があり、これら細胞外マトリクスに関する研究成果を本プロジェクトに活かし、例えば生体内環境を模倣した細胞外マトリックスを生体外で再構築して従来から行われてきた液性因子研究の成果と組み合わせることにより、生体内におけ

る細胞外環境を人工的に再構築し、細胞の生存する空間を制御することによって積極的にES細胞の分化誘導効率の向上と分化形質の安定化を図ることを指向し、開発テーマを追加した。

そこで、これら課題の解決に資する新規技術を取り込み、研究開発成果のより一層の向上を目的として基本計画を変更し、追加する技術要件を明示した上で、追加公募による提案の募集を行った。平成 18 年 1 月 13 日に公募の予告を行い、平成 18 年 1 月 27 日～2 月 27 日に公募を実施し、応募のあった 13 件の提案について、NEDO内に設置した5名の学識経験者等から構成される採択審査委員会において、書面審査及びその結果を踏まえて選考した7件の提案を対象としたヒアリング審査によって採択候補を選考した。なお、ヒアリング審査には中辻プロジェクトリーダーが委員長の承認のもとで意見を求めに応じて述べる事が可能なオブザーバーとして出席している。

その後、NEDO内の契約・助成審査委員会によって採択審査委員会の選考結果を踏まえて、大阪大学及び財団法人日本皮革研究所、国立環境研究所、田辺製薬株式会社、東京大学及び東京医科歯科大学の提案、計5件を採択した。なお、東京医科歯科大学は平成 19 年度で開発を終了した。

2.3 研究開発の運営管理

(1) 運営管理

原則として、半期に一度の割合で研究開発推進委員会を開催。上半期の研究開発推進委員会においては、研究成果の報告と今後の研究計画について検討を行う。下半期の研究開発推進委員会においては、1年間の研究成果報告と次年度の研究計画について報告を受けた後、実績とプロジェクト全体目標に照らした役割期待を加味し、次年度以降の研究計画と予算の配分決定を目的として開催する。

この他、京都大学、幹細胞創薬研究所、埼玉医科大学、熊本大学に、研究の進展等に応じて追加公募によりプロジェクトに参画した研究チームを交え、月1回の研究ミーティングを実施し、成果のチェックと問題点の早期発見・解決等による研究計画の円滑な推進を図っている。

平成 17 年度(初年度)は、部分提案として採択した埼玉医科大学の提案とのマッチングを行い、円滑な研究の実施に向けた研究計画の摺り合わせを行うとともに、京都リサーチパーク内に設置した集中研究拠点の立ち上げに注力した。平成 17 年 10 月に主要な設備の導入がほぼ完了し研究開発を本格的に開始した。また、本格稼働に伴い、平成 17 年 10 月 31 日、京都リサーチパークにおいて京都大学再生医科学研究所と共同で、プレス関係者を対象に、①プロジェクトの目的、②研究内容、③期待される効果等に関する説明会を開催し、広く一般にヒトES細胞を利用した研究計画の理解を求める活動を行った。なお、初年度はマウスやサル等の ES 細胞を用いて基礎的な検討を行い、その後「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針(平成13年文部科学省告示第155号)」に基づき、必要な手続きを経た後、ヒト ES 細胞を用いる研究を進める計画であった。

平成 18 年度においては、追加公募により採択した5件の提案内容と、平成 17 年度採択グ

グループとの研究計画の摺り合わせを目的として、中辻プロジェクトリーダーと追加した研究テーマの責任者との間で研究計画の摺り合わせを行うミーティングを設定し、研究目的を共有するとともに、プロジェクト全体計画の中での役割期待の明確化を行った。その後、プロジェクトに参加する各機関が一同に介し、相互の研究内容と研究計画の共有を第 1 の目的として第1回研究開発委員会を、平成 18 年 11 月7日京都市リサーチパークにおいて実施した。また、平成 19 年1月 29 日に、NEDO(川崎)において第2回研究開発委員会を実施し、これまでの研究成果と今後の研究計画についてディスカッションを行い、平成19年度研究計画を策定するとともに、予算配分の決定を行った。

平成 19 年度および平成 20 年度には、研究開発委員会を毎年 2 回開催し、研究進捗状況を各実施機関が発表し議論した。平成 21 年 8 月には、プロジェクト最後の研究推進委員会を開催し、これまでの成果の纏めと、今後の進め方を議論した。さらに、プロジェクト終了後の平成 22 年 5 月 18 日(火)に、「NEDO 公開シンポジウム」を開催し、研究成果を広く一般に発表した。ほぼすべての国内製薬企業から、多くの関係者が集まり活発な議論がなされた。

(2)ヒトES細胞の利用状況

プロジェクト開始後、以下の参加機関が各機関の倫理審査委員会での審議の後、文部科学省の確認を得て、ヒトES細胞を利用した研究に着手している。

○京都大学再生医科学研究所

国内で唯一ヒトES細胞を樹立した研究機関として京都大学再生医科学研究所は、既に平成 14 年 4 月から「樹立計画及び使用計画」に関する大臣確認を得ているが、このプロジェクトに関連して次の研究計画において追加または新たな大臣確認を得て開発研究を推進している。

- ・医学応用を目指したヒト胚性幹細胞(ES細胞)の安全かつ簡便な新規培養技術の開発研究
(平成 16 年 7 月 27 日確認、平成 17 年 7 月 19 日及び平成 18 年 3 月 10 日に追加等の確認)
- ・ヒトES細胞に対する遺伝子導入法の開発と遺伝子改変技術の確立
(平成 16 年 7 月 27 日確認、平成 17 年 7 月 19 日及び平成 18 年 3 月 10 日追加等の確認)
- ・ヒトES細胞からの神経分化誘導及び細胞移植後の機能と安全性の解析
(平成 17 年 3 月 10 日確認)
- ・ヒトES細胞を用いた心血管細胞分化機構に関する研究
(平成 17 年 3 月 10 日確認、平成 18 年 3 月 8 日及び平成 18 年 11 月 14 日追加等の確認)

○熊本大学発生医学研究所

- ・ヒト胚性幹細胞を用いた肝胆膵の発生分化と再生医学の基礎研究
(平成 17 年 12 月 16 日確認)
- ・ヒトES細胞から機能的内胚葉系細胞(肝細胞、膵β細胞)への分化誘導法の確率
(平成 18 年 11 月 14 日確認)

○特定非営利活動法人幹細胞創薬研究所

- ・ヒトES細胞からの創薬基礎研究のためのモデル細胞の創製(平成 18 年 10 月 5 日確認)

○埼玉医科大学

・ヒトES細胞に対する効率の高い遺伝子導入法と染色体操作技術の開発

(平成 18 年 11 月 14 日確認)

3. 情勢変化への対応

「2. 2 研究開発の実施体制」の項で述べたとおり、研究開発成果のより一層の向上を目的とした基本計画の変更を行い、研究加速財源を活用した追加公募の実施により、①細胞外環境制御技術及び②細集団ネットワーク構築技術を追加し、研究体制の変更を行った。

なお、本研究の ES 細胞の分化誘導を中心とする技術は、本プロジェクト実施期間中に発見された iPS 細胞に対しても適用可能な技術と考えられるため、本研究の成果は、iPS 細胞の実用化促進および我が国の優位性確立にも貢献しうるものであり、実施意義はさらに大きいものになったと考えらる。その現状を踏まえ、iPS 細胞に関する技術進歩を踏まえつつ、実用化のロードマップを見直すなど、引き続き柔軟に情勢を捉えて計画を見直し実施した。

4. 中間評価結果への対応

平成 19 年 7 月 27 日に中間評価が行われ、「ヒト ES 細胞を使ったモデル細胞の創出は、生命倫理の観点から解決すべき課題も大きいですが、世界的に見ても今後の大きなテーマであり、ES 細胞への遺伝子導入方法の検討や細胞株の作製に関して得られた成果は、創薬研究のみならず、再生医療などへの波及効果も期待できるので、意義は高い。」と、概ね高い評価を得た。なお、総合評価に対応し、本研究の ES 細胞の分化誘導を中心とする技術は iPS 細胞に対しても適用可能な技術と考えられるため、本研究の成果は、iPS 細胞の実用化促進、および我が国の優位性確立にも貢献しうるものであり、実施意義はさらに大きいものになったと考えた。そのため、iPS 細胞に関する技術進歩を踏まえつつ、実用化のロードマップを見直しなどを行いプロジェクトの後半を効率よく進めた。さらに、創薬産業利用に資する実用化を目指して、ニーズに基づいた優先課題を再確認し、モデル細胞の評価基準を明確化するとともに、情報交換・意思統一の強化を行った。なお、肝細胞研究については関係者でチームを作り毎月ミーティングを行うなど、統一的に評価できる体制を整え推進した。

5. 評価に関する事項

平成 19 年度に中間評価、平成 22 年度に事後評価を外部評価により、NEDO 研究評価部にて行われた。いずれの評価も NEDO が策定した「評価項目/評価基準」に従い進められた。

III. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

①ヒトES細胞の加工技術開発

ヒトES細胞由来の分化細胞を創薬基盤研究のためのモデル細胞として利用するには、例えば疾患遺伝子を目的の遺伝子部位に導入する、導入した遺伝子の発現を任意に制御する等のES細胞を使用目的に沿って加工する技術が必須である。本プロジェクトの基盤技術となるヒトES細胞の加工技術開発を進めた結果、その最も基盤となる遺伝子導入技術の開発に成功したこと、発現制御可能なTet-On株の作出に成功したこと、従来殆ど不可能であった相同組換え体を高効率に創出することに成功したこと、制御可能なRNAi技術の開発にマウスES細胞で成功したこと、ウイルスベクターを用い高効率な相同組換え導入技術を確立したことが主な成果としてあがった。これらの技術は次のステップのモデル細胞構築に向けて大きな推進力となるもので、既にモデル細胞の構築に応用し、③に記すように、いくつかの疾患モデル細胞株の作成に成功している。また、各種遺伝子導入法について諸条件を検討し、あらゆる遺伝子導入場面にも利用可能な世界をリードする技術を確立しつつある。具体的には遺伝子導入法として、それぞれの事業所においてリポフェクション法、エレクトロポレーション法、ウイルス法を用いて検討を行い、いずれにおいてもヒトES細胞で遺伝子導入が可能であることを見出した。これら三つの方法の使い分けとしては、一時的に高効率で遺伝子導入をする場合にはエレクトロポレーション法よりもリポフェクション法の法が優れており、逆に後述する遺伝子相同組換えにおいてはリポフェクション法では非常に難しく、エレクトロポレーション法が適していた。さらにウイルス法はこれら二つの方法よりは遺伝子導入効率あるいは相同組換え効率などの点で優れているが、その一方でベクターの構築やウイルスの調製という点でより手間がかかることから、上記の二つの方法でうまくいかない場合に、非常に有力な手段となる。さらに、複数薬剤による遺伝子改変ES細胞の選別が可能となる系や、制御可能なRNAi技術による標的遺伝子発現抑制技術がマウスES細胞で確立されており、これらのヒトES細胞を加工しうる基盤技術によりヒトES細胞をより利用価値の高い、付加機能を持った細胞に改変することが可能となった。また、このようなノウハウは技術移転が難しい場合もあるが、京都大学、幹細胞創薬研究所、埼玉医科大学においては、お互いに連絡を密にとり、技術移転についても確認を行った。

②ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発

ヒトES細胞由来の分化細胞を薬効評価・安全性薬理試験に利用することを目的として、神経細胞、心筋細胞、肝細胞、血管系細胞への分化誘導技術の開発を行った。

神経変性疾患モデル細胞構築のための神経細胞分化誘導については、疾患の種類により発症する神経の種類が異なること(アルツハイマー病、ハンチントン病:大脳の神経細胞、筋萎縮性側索硬化症:運動神経細胞)を踏まえ、それぞれの神経細胞への分化誘導条件を探索し、BMPシグナル伝達系拮抗因子ノギンを用い神経前駆細胞へ分化誘導する条件が固まり、そこから目的細

胞へさらに分化誘導させる方法を確立した。

心筋細胞はその興奮性に対する薬剤の影響を見る上で重要な細胞である。心筋への分化誘導を強力に支持するフィーダー細胞の利用及び新たに発見された分化誘導化合物を用いることにより、拍動性の心筋様細胞を安定して誘導することに成功した。また、サル ES 細胞を用いた技術開発では、心筋特異的プロモータで駆動される GFP を導入した ES 細胞を分化誘導することにより GFP 陽性の拍動細胞を作出することができた。この拍動細胞を用い、心副作用をもつ典型的薬物及び従来法で陰性であった薬物による QT 延長を再現することに成功した。

ヒト ES 細胞を用いた技術開発においても心筋特異的プロモータで駆動される GFP を導入したトランスジェニック ES 細胞株を樹立し、GFP 陽性拍動細胞の作出に成功した。また長期再接着培養法を確立し、浮遊培養法と組み合わせることでヒト ES 細胞由来心筋細胞(hESC-CMs)を成熟化でき、心副作用をもつ典型的薬物及び従来法で陰性であった薬物による QT 延長の適切な検出に成功した。遺伝子導入サル ES 細胞とハイコンテツ・ハイスループットスクリーニング技術を組み合わせることで、心筋分化誘導促進物質が同定できた。

肝細胞は、薬物代謝酵素の誘導や阻害等の薬物の副作用を検出するのに重要である。肝前駆細胞への分化誘導を強く支持するフィーダー細胞を用い共培養の後、さらに成熟肝細胞への進行を支持するマウス胎児肝ストローマ細胞との共培養を行うことにより主要な薬物代謝酵素(CYP)の発現の促進・維持が認められた。本ストローマ細胞を不死化細胞株として樹立することに成功し、ES 細胞由来の肝細胞様細胞を必要十分な量作成することが可能となった。さらに成熟を促進する条件を整え、安全性薬理試験への応用を目指す。

細胞外環境の人工制御技術開発及び創薬支援ツールの開発においては以下の3点において進展が認められた。

- 人工基底膜・擬似マトリックスを用いたサルES細胞の接着能、増殖能、未分化維持能の評価系を確立することに成功し、ヒトES細胞への応用に発展させる基盤を構築した。さらにヒトES細胞の未分化維持には特定のラミニンを用いることで可能になることを見出した。
- 肝細胞の機能を維持できるコラーゲンサンドイッチ法の最適化を進め、ラット肝細胞を用い胆管構造の形成に成功し、トランスポーター機能の評価系を確立した。本培養評価系をヒト肝臓由来細胞に適用し、各種薬物の代謝・輸送活性の評価系を確立した。
- 主要基底膜タンパク質の局在マッピングをWEB上に公開した。本情報はES細胞の分化誘導時の培養基質等の設計に役立つと考えられる。またゲル化能を保持したIV型コラーゲン、11種類のラミニンアイソフォームおよびヘパラン硫酸プロテオグリカの安定供給系を確立した。

③研究用モデル細胞の構築技術の開発

本プロジェクトの最終目標であるモデル細胞を用いた薬効評価系や微小循環動態試験系を構築することを目的として、神経変性疾患モデル細胞、BBB モデルの構築を目指した。本プロジェクトで創製するモデル細胞は、京都大学再生医科学研究所で樹立された日本人由来のヒト ES 細胞株で、成果として出来上がる薬効評価系・動態試験系は薬剤に対する反応が日本人の遺伝的背景に基づくものとなる。この点において、従来入手条件等の制約からやむなく欧米系の

ゲノムを持つ細胞を用いて行っていた試験系とは一線を画し、遺伝的背景に帰するリスクを回避することが可能となる。

神経変性疾患として、前述のアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病を選択し、疾患原因遺伝子としてそれぞれプレセニン1、スーパーオキシドデスムターゼ1、ハンチンチンを選定した。それぞれの変異遺伝子の発現ベクターを構築し、①で開発された遺伝子導入技術を用いて目的遺伝子を安定に発現する細胞株の作成を試みた。この結果、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病の疾患遺伝子の安定発現ES細胞株が得られ、アルツハイマー病と筋萎縮側索硬化症のモデル細胞では、それぞれの疾患に見られる表現型を再現できていることを確認した。

BBB モデルは、脳内薬物動態をin vitro 予測する上で強力な創薬支援ツールとなり得る。BBB は、血管系細胞(血管内皮細胞、血管周皮細胞)と神経系細胞(アストロサイト)で構成されることから、ここでは、ヒトES 細胞の分化誘導によって調製されるこれらBBB 構成細胞を組み合わせ利用することでモデルを構築する。現在までに、ヒトES 細胞から、アストロサイト・神経前駆細胞の分化誘導と量産調製技術の確立に成功し、モデル構築に供することが可能となっている。血管内皮細胞・血管周皮細胞への分化誘導も確認できている。また、初代培養細胞等を用いてモデル構築形態に関する事前検討やモデル評価技術の取得準備も順調に進めている。さらに血管系細胞の量産化調製技術を確立し、最適なモデル構築形態を検討する中で、実用に堪える優れたヒト型BBB モデルの創製を目指す。

本プロジェクトの最終目標として、モデル細胞を用いたハイスループットスクリーニング系を構築することが挙げられる。ES 細胞の特性としてコロニー状の細胞を播種する必要があり、そのため細胞の調製方法、分注ノズルサイズ、測定プレート等の検討を行った。その結果、ES 細胞を用いるHTS 機器システムのプロトタイプが出来上がり、マウスES 細胞及びサルES 細胞を用いたスクリーニングの実施体制が整った。今後、本プロトタイプを基盤として本プロジェクトで創製されるヒトES 細胞から分化誘導されたモデル細胞を用いたHTS 系構築へと進める予定である。

目 標	研究開発成果	達成度
<p>研究開発項目①「ヒトES細胞の加工技術開発」 ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発</p> <p>①ヒト ES 細胞への遺伝子導入法の検討(京都大学) ・30余種のリポフェクション試薬について試みる。 ・エレクトロポレーション法について試みる。</p> <p>②ヒト ES 細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学) ・Tet-On/Offシステムの導入を試みる。</p> <p>③ヒト ES 細胞へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入の検討(幹細胞創薬研究所) ・予備実験としてサルES細胞へのエレクトロポレーションの条件検討を行い、エレクトロポレーションが可能かどうか見極める。</p> <p>④ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法の開発(埼玉医科大学) ・アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、レンチウイルス由来のベクターを構築する。 ・それぞれのベクター系につき、異なる血清型やエンベロープを持つウイルスを産生・増殖する。</p> <p>⑤ヒトES細胞への遺伝子導入法の検討(京都大学) ・リポフェクション試薬について詳細な検討を試みる。</p> <p>⑥ヒトES細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学) ・Tet-On/Offシステムを導入したサルES細胞において導入遺伝子の発現制御に関する詳細な検討を試みる ・ヒトES細胞へのTet-On/Offシステムの導入を試みる。</p> <p>⑦加工技術開発に適したヒトES細胞株の樹立(京都大学) 加工技術開発に適したヒトES細胞株スクリーニングを試みる。</p> <p>⑧ヒトES細胞へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入の検討(幹細胞創薬研究所) ・ヒト ES 細胞へのエレクトロポレーションが可能かどうか見極める。不可能なようなら、他の方法を施行し、適当な方法を決定する。</p> <p>⑨ウイルスベクターを用いた遺伝子導入(埼玉医科大学) ・アデノウイルスベクターと AAV ベクターを用いた一過性遺伝子発現を試みる。 ・レンチウイルスベクターを用いた安定な遺伝子発現を試みる。</p> <p>⑩ヒト ES 細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学) ・Tet-On/Off システムを導入したヒト ES 細胞株の樹立と導入遺伝子の発現制御に関する検討を試みる</p>	<p>①ヒト ES 細胞への遺伝子導入法の検討(京都大学) ・高遺伝子導入効率の試薬をいくつか見出した。 ・エレクトロポレーション法についてはいくつかの重要な知見を見出した。</p> <p>②ヒト ES 細胞における遺伝子発現制御の開発 ・Tet-On/Offシステムを導入したサルES細胞株の樹立に成功した。</p> <p>③ヒト ES 細胞へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入の検討(幹細胞創薬研究所) ・サルES細胞に対して40%以上の確率でEGFPの遺伝子導入ができた。サルES細胞へのエレクトロポレーションは可能であった。</p> <p>④ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法の開発(埼玉医科大学) ・各ベクター系につき、マーカー遺伝子をコードしたベクターDNAを構築した。 ・産生した各ベクターが機能的に遺伝子を発現することを確認した。</p> <p>⑤ヒトES細胞への遺伝子導入法の検討(京都大学) ・従来より数倍程度遺伝子導入効率の高いリポフェクション試薬を見出した。</p> <p>⑥ヒトES細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学) ・サルES細胞においてTet-On/Offシステムが十分機能することを見出す。 ・Tet-On/Offシステムを導入したヒトES細胞株の樹立に成功</p> <p>⑦加工技術開発に適したヒトES細胞株の樹立(京都大学) ・加工技術開発に適したヒト ES 細胞株(扱いやすいサブライン)の樹立に成功。</p> <p>⑧ヒトES細胞へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入の検討(幹細胞創薬研究所) ヒト ES 細胞へのエレクトロポレーションが可能であることを見出し、効率化に成功した。</p> <p>⑨ウイルスベクターを用いた遺伝子導入(埼玉医科大学) ・アデノウイルスベクターと AAV ベクターとも用いて、それぞれヒト ES 細胞で～98%と～80%の遺伝子導入効率を得た。 ・レンチウイルスベクターを用いて～15%の細胞で安定な遺伝子導入効率を得た。</p> <p>⑩ヒトES細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学) ・Tet-On/Off システムを導入したヒト ES 細胞株が十分機能することを確認。 ・ヒト ES 細胞での新しい遺伝子発現制御2A システムを開発</p>	<p>○</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>○</p>

目 標	研究開発成果	達成度
<p>⑪加工技術開発に適したヒトES細胞株の検討(京都大学) ・加工技術に適したヒトES細胞を用い、ヒトES細胞が扱いやすくなる分子の探索を試みる。</p>	<p>⑪加工技術開発に適したヒトES細胞株の検討(京都大学) ・加工技術に適したヒトES細胞株とその親株との間でトランスクリプトームによる比較解析法を見出した。</p>	○
<p>⑫ウイルスベクターを用いた遺伝子導入(埼玉医科大学) ・レンチウイルスベクターを用いた安定な遺伝子発現方法の最適化を試みる。</p>	<p>⑫ウイルスベクターを用いた遺伝子導入(埼玉医科大学) ・レンチウイルスベクターを用いて至適な条件を検討することによって、70~80%のヒトES細胞で安定な遺伝子導入効率を得た。</p>	○
<p>⑬ヒトES細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学) ・Tet-On/Offシステムを導入した細胞株で特定の遺伝子を過剰発現することによりヒトES細胞株の分化誘導に関する検討を試みる。</p>	<p>⑬ヒトES細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学) ・Tet-On./Offシステムによる特定遺伝子を過剰発現することでヒトES細胞が特定方向に分化誘導可能であることを見出す。</p>	○
<p>⑭加工技術開発に適したヒトES細胞株の検討(京都大学) 加工技術開発に適したヒトES細胞を用い、ヒトES細胞が扱いやすくなる候補分子を探索する。 ・ヒトES細胞が扱いやすくなる候補分子の評価方法の検討を試みる</p>	<p>⑭加工技術開発に適したヒトES細胞株の検討(京都大学) ・ヒトES細胞が扱いやすくなる候補分子を特定した。 ・ヒトES細胞が扱いやすくなる分子の評価方法を見出す頃に成功。</p>	○
<p>⑮ウイルスベクターを用いた遺伝子導入(埼玉医科大学) ・アデノウイルスベクターとAAVベクターを用いた一過性遺伝子発現がヒトiPS細胞にも応用できるか検討する。 ・肝細胞への分化誘導に関わる遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを作製し、肝細胞誘導技術の開発に応用する。</p>	<p>⑮ウイルスベクターを用いた遺伝子導入(埼玉医科大学) アデノウイルスベクターとAAVベクターとを用いて、ヒトiPS細胞でそれぞれ95%と50%の遺伝子導入効率を得た。ヒトES細胞で確立した高効率一過遺伝子発現の条件がiPS細胞へも適用可能である事が示唆された。 ・肝細胞への分化誘導を増進する候補遺伝子(HNF1α, HNF4α, LAP)及び阻害する候補遺伝子(LIP)を発現するアデノウイルスベクターをそれぞれ作製した。</p>	◎
<p>⑯ヒトES細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学) ・Tet-On/Offシステムを導入した細胞株で特定の遺伝子を過剰発現することによりヒトES細胞株の分化誘導に関するさらに詳細な検討を試みる。</p>	<p>⑯ヒトES細胞における遺伝子発現制御の開発(京都大学) ・Tet-On./Offシステムによる特定遺伝子を過剰発現することでヒトES細胞が特定方向への分化誘導が十分機能していることを見出す。</p>	○
<p>⑰加工技術開発に適したヒトES細胞株の検討(京都大学) 加工技術開発に適したヒトES細胞を用い、ヒトES細胞が扱いやすくなる候補分子を探索する。 ・ヒトES細胞が扱いやすくなる候補分子の評価方法の検討を試みる</p>	<p>⑰加工技術開発に適したヒトES細胞株の検討(京都大学) ・ヒトES細胞が扱いやすくなる分子について機能解析を進めた。</p>	△
<p>⑱ウイルスベクターを用いた遺伝子導入(埼玉医科大学) レンチウイルスベクターを用いた安定な遺伝子発現がヒトiPS細胞にも応用できるか検討する。</p>	<p>⑱ウイルスベクターを用いた遺伝子導入(埼玉医科大学) ・レンチウイルスベクターを用いて、ヒトiPS細胞で95%の遺伝子導入効率を得た。ヒトES細胞で確立した安定遺伝子発現の条件がiPS細胞へも適用可能である事が示唆された。</p>	◎

ヒトES細胞における相同組み換え技術の開発		
<p>①ヒト ES 細胞に適した相同組み換えベクターの構築(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒト ES 細胞に適したベクターカセットを検討する。 ・ヒト ES 細胞に適した遺伝子導入法を検討する。 ・サル HPRT 遺伝子を単離し、相同組み換えベクター構築を試みる。 ・ヒト HPRT 遺伝子を単離し、相同組み換えベクター構築を試みる。 	<p>①ヒトES細胞に適した相同組み換えベクターの構築(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒト ES 細胞に適したベクターカセットを見出した。 ・遺伝子導入効率を2倍上げること成功した。 ・サル HPRT 遺伝子を単離し、ベクターを構築した。 ・ヒト HPRT 遺伝子を単離し、ベクター構築をした。 	○
<p>②ヒト及びサル ES 細胞に対する相同組み換えベクターの構築(幹細胞創薬研究所)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・サル HPRT 遺伝子の 1st ATG 付近をターゲットとした相同組み換えベクターを構築する。 ・ヒト HPRT 遺伝子の 1st ATG 付近をターゲットとした相同組み換えベクターを構築する。 	<p>②ヒト及びサル ES 細胞に対する相同組み換えベクターの構築(幹細胞創薬研究所)</p> <p>サル HPRT 遺伝子の 1st ATG 付近をターゲットとした相同組み換えベクターを構築した。</p> <p>ヒト HPRT 遺伝子の 1st ATG 付近をターゲットとした相同組み換えベクターを構築した。</p>	○
<p>③ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・HPRTノックアウトカセットをコードしたアデノウイルスとAAVベクターを調製する。 	<p>③ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ベクターを構築し、多様な血清型由来のウイルスを調製した。 	○
<p>④ヒトES細胞での相同組み換え率の向上と相同組み換え技術の発展(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・リポフェクション試薬により、ヒトES細胞での相同組み換えを試みる。 ・相同組み換えのためのHPRT以外の遺伝子の単離を目指す。 	<p>④相同組み換えのために新たな遺伝子導入法の検討(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・リポフェクション試薬では相同組み換え率の向上に対して効果を見出せなかった。 ・ヒトES細胞の未分化維持不可欠と考えられている OCT-3/4遺伝子ゲノムの単離をほぼ終えた。 	○
<p>⑤ヒト ES 細胞に対する相同組み換えを試行するための基盤技術開発(幹細胞創薬研究所)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・エレクトロポレーション条件の至適化を図る。 ・迅速なスクリーニングシステムを確立する。 	<p>⑤ヒト ES 細胞に対する相同組み換えを試行するための基盤技術開発(幹細胞創薬研究所)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・エレクトロポレーション後の遺伝子導入コロニーの数を、従来の 10 倍以上に上昇させた。 ・スクリーニングに掛かる時間と費用の大幅な削減に成功した。 	◎
<p>⑥ヒト ES 細胞に対する相同組み換えの達成(幹細胞創薬研究所)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒト ES 細胞に適応しうる知見を手に入れるため、サル ES 細胞に対する相同組み換えを成功させる。 ・ヒト ES 細胞に対する相同組み換えを成功させる。 	<p>⑥ヒト ES 細胞に対する相同組み換えの達成(幹細胞創薬研究所)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・サル ES 細胞に対する相同組み換えに成功した。 ・ヒト ES 細胞に対する相同組み換えに成功し、組み換わった細胞を増幅、保存した。 	◎
<p>⑦組み換わった ES 細胞を有効利用するためのアプリケーションの開発(幹細胞創薬研究所)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・基本となるベクターを構築する。 	<p>⑦組み換わった ES 細胞を有効利用するためのアプリケーションの開発(幹細胞創薬研究所)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・基本となるベクターを構築した。 	○
<p>⑧ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・HPRT遺伝子座を標的とした相同組換え実験を行う。 	<p>⑧ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・サルES細胞を用いて、アデノウイルスベクターによる相同組換えに成功した。 	◎
<p>⑨ヒトES細胞での相同組み換え率の向上と相同組み換え技術の発展(京都大学)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・幹細胞創薬研究所で開発されたヒト ES 細胞の相同組み換え技術の技術移転を行う 	<p>⑨相同組み換えのために新たな遺伝子導入法の検討(京都大学)</p> <p>ヒトES細胞に対する遺伝子相同組み換え技術に成功(技術移転も成功)</p> <p>染色体解析を行い、相同組み換え後もヒトES細胞株で染色体異常が行っていないことを確認。</p>	○
<p>⑩相同組み換えヒト ES 細胞を用いた遺伝子置換技術の開発(幹細胞創薬研究所)</p> <p>Cre/LoxPシステムを応用し、相同組み換えを起こしたヒトES細胞のHPRT遺伝子座に好みの遺伝子を高効率で挿入する技術を確立する。</p>	<p>⑩相同組み換えヒト ES 細胞を用いた遺伝子置換技術の開発(幹細胞創薬研究所)</p> <p>セレクションの結果、100%の効率で HPRT 遺伝子座に遺伝子を挿入し、且つそれらを発現させることに成功した。</p>	◎

<p>⑪ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学) ・ヒトES細胞にアデノウイルスを使用し、相同組換え効率を検討する。</p> <p>⑫ヒトES細胞での相同組み換え率の向上と相同組み換え技術の発展(京都大学) ・複数のヒトES細胞株で、遺伝子相同組み換えを試みる。</p> <p>⑬遺伝子置換技術を応用した、単独遺伝子座改変での誘導的遺伝子発現系の構築(幹細胞創薬研究所) 遺伝子置換を用い、Tet-Onシステムに必要な2つのカセットをHPRT遺伝子座に挿入する。</p> <p>⑭ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学) HPRT 遺伝子座以外の実用的な遺伝子を標的とした相同組換え実験に必要なベクターを調整する。 ・HPRT遺伝子座以外の実用的な遺伝子を標的とした相同組換え実験を行なう。</p> <p>⑮ヒトES細胞での相同組み換え率の向上と相同組み換え技術の発展(京都大学) ・ヒトES細胞で培った技術を用い、ヒトiPS細胞株でも試みる。</p> <p>⑯ヒトES細胞で発現していない遺伝子をコードする遺伝子座への相同組み換え(幹細胞創薬研究所) ・HB9遺伝子座を改変した相同組み換え体を少なくとも1クローン得る。</p> <p>⑰ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学) ・樹立したアルブミン及びHB9ノックインヒトES細胞を分配機関に寄託する。 ・アデノウイルスベクターとAAVベクターを用いた相同組換え技術がヒトiPS細胞にも応用できるか検討する。</p>	<p>⑪ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学) ・複数のヒトES細胞株において、アデノウイルスベクターを使用すると、33%-45%もの高効率で相同組換え体が得られた</p> <p>⑫相同組み換えのために新たな遺伝子導入法の検討(京都大学) ・複数のヒトES細胞株で遺伝子相同組み換え技術に成句、染色体の正常性についても確認。 ・幹細胞創薬研究所で開発されたヒトES細胞における遺伝子相同組み換え技術をさらに改良し、より効率を上げることに成功。</p> <p>⑬遺伝子置換技術を応用した、単独遺伝子座改変での誘導的遺伝子発現系の構築(幹細胞創薬研究所) ・カセットの向きやInsulatorの配置を検討することで、HPRT遺伝子座単独でのTet-Onシステムの構築に成功した。</p> <p>⑭ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学) ・熊本大学との共同研究で、肝細胞で特異的に発現するヒトアルブミン遺伝子座に蛍光遺伝子mKO1を組み込んだアデノウイルスベクターと、幹細胞創薬研究所との共同研究で、運動神経細胞で特異的に発現するヒトHB9遺伝子座に蛍光遺伝子EGFPを組み込んだアデノウイルスベクターを作製した。また、未分化特異的マーカー遺伝子であるNANOG遺伝子を標的とした相同組換えベクターをAAVで作製した。 ・アルブミン及びHB9遺伝子座に蛍光遺伝子を組み込んだ分化誘導ヒトESアッセイ細胞を、それぞれ90%、57%の高効率で樹立できた。また、NANOG遺伝子ノックアウト細胞も20%-87%の高効率で作製できた。</p> <p>⑮相同組み換えのために新たな遺伝子導入法の検討(京都大学) ・ヒトiPS細胞でも遺伝子相同組み換え技術に成功。</p> <p>⑯ヒトES細胞で発現していない遺伝子をコードする遺伝子座への相同組み換え(幹細胞創薬研究所) ・HB9遺伝子座へのEGFPノックインを行い、エレクトロポレーションで3クローンの相同組み換え体を得た。</p> <p>⑰ウイルスベクターを用いた相同組換え法の開発(埼玉医科大学) ・樹立したアルブミン及びHB9ノックインヒトES細胞の基本的な性質を確認し、分配機関である京都大学に寄託した。これにより、これらの細胞は各使用機関に分配可能となった。 ・ヒトiPS細胞で、アデノウイルスベクターとAAVベクターとを用いて、ヒトES細胞とほぼ同等の効率で相同組換え体を得られた。ヒトES細胞で確立した高効率相同組換え法がiPS細胞へも応用可能である事が示唆された。</p>	<p>◎</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>◎</p>
---	--	--

<p>ヒトES細胞におけるRNA干渉法による遺伝子発現制御技術の開発</p>		
<p>①テトラサイクリン誘導性shRNA発現ES細胞システムの構築(京都大学)</p>	<p>①テトラサイクリン誘導性shRNA発現マウスES細胞を構築した。種々の条件を検討し、shRNA発現システムの最適化を行った。</p>	○
<p>②Cre-loxP システムを用いた新しいタモキシフェン誘導性shRNA 発現システムの構築(京都大学)</p>	<p>②エストロゲン受容体-Cre融合タンパクを用いたタモキシフェン誘導性shRNA発現システムを構築した。</p>	○
<p>③テトラサイクリン誘導性shRNA発現ES細胞システムの構築(京都大学)</p>	<p>③テトラサイクリン誘導性shRNA発現マウスES細胞を構築した。ES細胞分化途上において標的遺伝子発現の特異的阻害と細胞分化方向の制御に成功した(Hiraoka-Kanie, <i>Biochem Biophys Res Commun</i>, 2006)。</p>	○
<p>④Cre-loxP システムを用いた新しいタモキシフェン誘導性shRNA 発現システムの構築(京都大学)</p>	<p>④エストロゲン受容体-Cre 融合タンパクを用いたタモキシフェン誘導性 shRNA 発現システムを構築した。ES細胞分化途上における標的遺伝子発現の特異的阻害に成功している。</p>	○
<p>⑤テトラサイクリン誘導性 cDNA 発現(Tet-OFF)ES 細胞システムの構築(京都大学)</p>	<p>⑤当初計画より遺伝子発現制御に有用な新しい可能性を見出し、これらのシステムの構築を行っている。</p>	◎
<p>⑥新しい ES 細胞における誘導性ノックダウンレスキューシステムの開発(京都大学)</p>	<p>⑥当初計画より遺伝子発現制御に有用な新しい可能性を見出し、これらのシステムの構築を行っている。</p>	◎
<p>⑦ヒト ES 細胞における shRNA 発現システムの構築</p>	<p>⑦ヒトES細胞培養及び分化実験を開始した。⑤のシステムがマウスES細胞において確立された後に同システムのヒトES細胞への導入を行う。</p>	△
<p>⑧タモキシフェン誘導性shRNA発現システムを構築とテトラサイクリンシステムとの有用性比較</p>	<p>⑧エストロゲン受容体-Cre融合タンパクを用いたタモキシフェン誘導性shRNA発現システムを構築。テトラサイクリン誘導性システムより強力と考えられた。</p>	○
<p>⑨マイクロRNA発現による遺伝子発現抑制システムを構築</p>	<p>⑨タモキシフェン誘導性マイクロRNA発現ベクターの構築に成功。現在ES細胞に導入し機能確認中</p>	○
<p>⑩テトラサイクリン誘導性cDNA発現システムをshRNA発現系と組み合わせたノックダウンレスキューシステムの構築</p>	<p>⑩誘導性cDNA発現ベクターを構築した。HPRT遺伝子座への同ベクターの導入中。</p>	○
<p>⑪タモキシフェン誘導性マイクロRNA発現ES細胞分化システムの構築</p>	<p>⑪タモキシフェン誘導性マイクロRNA発現系をマウスES細胞に導入し、分化途上において標的遺伝子の特異的発現阻害を行うことに成功。</p>	○
<p>⑫テトラサイクリン誘導性cDNA発現系とタモキシフェン誘導性マイクロRNA発現系によるRNA pol.II系を用いた安定したノックダウンレスキューシステムの構築</p>	<p>⑫テトラサイクリン誘導性cDNA発現系を上記①のシステムに導入中。</p>	△
<p>⑬誘導性shRNA発現ES細胞システムによる心筋分化関連遺伝子の機能解析</p>	<p>⑬DNAマイクロアレイにより同定した心筋分化候補遺伝子の機能をshRNA発現ES細胞システムにて検証。心筋分化阻害効果を認めた。</p>	◎
<p>⑭マウスES細胞ノックダウンレスキューシステムの構築と機能確認</p>	<p>⑭Flip-Inシステムを用いてレスキューcDNAの導入に成功。テトラサイクリン誘導性にGFP発現を誘導できることを確認。平成20年度③で機能確認した遺伝子のレスキュー実験施行中。</p>	○
<p>⑮遺伝子発現制御システムの分化研究への応用</p>	<p>⑮テトラサイクリン誘導性cDNA発現系を血管分化機構解析に応用し有用性を確認した(Yamamizu, <i>Blood</i>, 2009; Yamamizu, <i>J Cell Biol</i>, in press)。</p>	◎
<p>⑯ヒトES細胞におけるノックダウンレスキューシステムの構築</p>	<p>⑯マウスでの有用性確認後ヒトへの導入を行う。</p>	△

研究開発項目②「ヒトES細胞の分化誘導制御技術の開発」 ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発		
① サルES細胞から神経系細胞への分化誘導(京都大学) ・神経系への分化誘導技術について幹細胞創薬研究所への技術移転を行う	① ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導(京都大学) ・神経系への分化誘導技術の幹細胞創薬研究所への技術移転を達成。	○
②サル ES 細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・報告されている神経分化誘導方法の情報を集める。 ・神経誘導のための胚様体形成を試みる。 ・神経分化誘導を知るために、共培養系による方法を試みる。	②サルES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・様々な神経分化誘導方法の情報を収集した。 ・サルES細胞の胚様体形成の条件を整えた。 ・ストローマ細胞との共培養系による神経誘導を行い、サルES細胞が神経分化することを確認した。 ・ノギンによる神経誘導法の予備実験を行った。	○
③サルES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・報告されている胚様体を介した運動神経細胞への誘導方法が・サルES細胞に適応可能か調べる。 ノギンによる神経誘導方法がサルES細胞に適応可能か調べる。	③サルES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・適応できない方法があることを明らかにした。 ・胚様体を介した方法で運動神経の分化誘導に成功した。 ・ノギンによって効率よく神経幹細胞・神経前駆細胞に分化誘導させることに成功した。細胞塊を揃えることで均一な分化誘導が可能なお見いだした。 ・神経前駆細胞が凍結保存可能であることを確認した。	○
④ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・報告されている胚様体を介した運動神経細胞および大脳神経細胞への誘導方法がヒトES細胞に適応可能か調べる。 ・ノギンによる神経誘導方法がヒトES細胞に適応可能か調べる。	④ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・胚様体を介した方法で運動神経の分化誘導に成功した。 ・その分化誘導効率を向上させるため、培養日数、培養液の検討を行い、培養日数の短縮に成功した。 ・既報の運動神経細胞誘導方法に、そのままではKhES-11に適応できない方法があることを明らかにした。このことはヒトES細胞株に性質の違いがあるという考えを支持する。 ・ノギンによって神経幹細胞・神経前駆細胞に分化させることに成功し、他の因子と組み合わせることでさらに効率を上げることに成功した。 ・神経前駆細胞が、サルES細胞の場合と同様に凍結保存可能であることを確認した。	○
⑤ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・胚様体を介した方法とノギンを用いる分化誘導法の比較 ・誘導効率向上方法を探索	⑤ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) 神経幹細胞までの神経誘導をノギン神経分化誘導法に統一 ・ノギンによる神経分化誘導の効率を向上させることに成功した	○
⑥運動神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ノギンによって分化誘導された神経幹細胞から分化誘導可能か調べる ・代替可能な低分子化合物の探索	⑥ノギンによる運動神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・マーカー分子、遺伝子発現陽性神経細胞への分化誘導に成功した。 ・分化誘導に必須な組換え蛋白質の代替することが可能な低分子化合物を見いだした。 ・生化学的データ、電気生理学的データによって、運送神経細胞の成熟度を確認した。 ・シナプス形成能を調べ、機能的であることを確認した。	◎
⑦ドーパミン作動性神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ノギンによって分化誘導された神経幹細胞から分化誘導可能か調べる。	⑦ドーパミン作動性神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・マーカー分子、遺伝子発現陽性神経細胞への分化誘導に成功した。 ・ドーパミンの放出、取り込み機能を確認した	○

<p>⑧ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ノギンによって誘導される神経細胞の特徴付け</p>	<p>⑧ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ノギンによって誘導される神経細胞の特徴付けを生化学的、電気生理学的手法で行った。</p>	○
<p>⑨運動神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ヒトiPS細胞へ分化誘導方法が適応可能か調べる ・神経幹細胞の増幅を試す</p>	<p>⑨運動神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ヒトiPS細胞へ分化誘導方法が適応可能であることが分かった。 ・iPS細胞株による分化効率が大きく異なることを明らかにした。 ・ES細胞由来の神経幹細胞を運動神経細胞への分化能を低下させずに、増幅することに成功した。 ・レポーターなしでES細胞由来の運動神経細胞を濃縮することに成功した。</p>	○
<p>⑩中型有棘神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ノギンによって分化誘導された神経幹細胞から分化誘導可能か調べる。</p>	<p>⑩中型有棘神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・マーカー分子、遺伝子発現陽性神経細胞への分化誘導に成功した。</p>	○
<p>⑪グルタミン作動性神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ノギンによって分化誘導された神経幹細胞から分化誘導可能か調べる。</p>	<p>⑪グルタミン作動性神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・様々な試みを行ったが、プロジェクト終了時まで分化効率を上げることが出来なかった。</p>	△
<p>⑫アストロサイトへの分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ノギンによって分化誘導された神経幹細胞から分化誘導可能か調べる。</p>	<p>⑫アストロサイトへの分化誘導(幹細胞創薬研究所) ・ニューロスフェアの継代およびES細胞由来神経幹細胞への因子添加によって効率良くアストロサイトへ分化させることに成功した。</p>	○
ヒトES細胞から心筋細胞への分化誘導技術開発		
<p>①マウス ES 細胞における新しい心筋前駆細胞及び心筋細胞の分化誘導</p>	<p>①マウスES細胞を用いて効率的に心筋細胞を誘導する新しい2次元培養分化誘導法を開発した。新しい心筋前駆細胞を同定・純化した。Dkk1が心筋分化を促進することを明らかにした(Yamashita, FASEB J, 2005)。</p>	○
<p>②マウス ES 細胞を用いた心筋ペースメーカー細胞の分化誘導</p>	<p>②心筋ペースメーカー細胞誘導の基盤技術を開発。心筋自動能維持に必須なイオンチャンネルを同定した。イオンチャンネルの発現を制御する転写因子を見出した。同転写因子発現抑制により自己拍動心筋コロニーが増加した。</p>	◎
<p>③高効率心筋前駆細胞及び心筋細胞分化誘導法の開発</p>	<p>③心筋前駆細胞及び心筋細胞の誘導効率を約10倍促進させる化学物質を見出した。</p>	◎
<p>④ヒト ES 細胞を用いた心筋分化誘導</p>	<p>④ヒト ES 細胞(京大株)から2次元培養下に心筋細胞を分化誘導することに成功した。②③の成果を導入予定である。</p>	△
<p>⑤END-2 細胞を用いたサル ES 細胞の心筋分化誘導系の構築(幹細胞創薬研究所)</p>	<p>⑤コロニーサイズ、血清濃度の検討により効率化実現(幹細胞創薬研究所)</p>	◎
<p>⑥サル ES 細胞由来心筋細胞の細胞外電位測定(東京医科歯科大学)</p>	<p>⑥細胞外電位の取得および QT 延長典型三化合物の評価および QT 延長応用への可能性示唆</p>	○
<p>⑦サル ES 細胞由来神経細胞に発現するイオンチャンネル遺伝子、心筋特異的遺伝子の発現解析(幹細胞創薬研究所、東京医科歯科大学)</p>	<p>⑦心筋特異的遺伝子およびイオンチャンネルの確認</p>	○
<p>⑧α-MHC-GFP 発現サル ES 細胞の構築およびソーティングの検討(幹細胞創薬研究所)</p>	<p>⑧細胞樹立。フローサイトメトリーによる細胞の純化。一細胞での拍動確認</p>	◎
<p>⑨END-2細胞を用いたヒトES細胞の心筋分化誘導系の構築(幹細胞創薬研究所)</p>	<p>⑨ヒトES細胞からの分化開始。</p>	○

⑩ES 細胞由来心筋の自動能維持機構の解明	⑩HCN 及び Cav3 イオンチャネルが ES 細胞由来心筋細胞自動能維持を担っていることを明らかにした(Yanagi, <i>Stem Cells</i> , 2007)。	○
⑪心筋ペースメーカー細胞の誘導・純化法の開発	⑪FACS 可能な抗 HCN4 抗体作製開始(受託研究)	○
⑫輸入ヒト ES 細胞からの心筋分化誘導	⑫輸入ヒト ES 細胞株(H1, H9 株)からの心筋分化誘導に成功。	○
⑬END-2 細胞を用いたヒト ES 細胞の心筋分化誘導系の構築(幹細胞創薬研究所)	⑬誘導初期における KSR 添加による誘導効率の増加。	○
⑭ α -MHC-GFP 発現ヒト ES 細胞の構築(幹細胞創薬研究所)	⑭細胞樹立および特性解析	◎
⑮サイクロスポリン A による高効率心筋分化誘導法の開発	⑮サイクロスポリン A が ES 細胞及び iPS 細胞からの心筋前駆細胞及び心筋細胞分化を 10-20 倍促進することを報告(Yan, <i>Biochem Biophys Res Commun</i> , 2009; PCT 特許出願)。	◎
⑯マウス iPS 細胞からの心筋分化誘導法の開発	⑯マウス iPS 細胞からの系統的心血管分化誘導法を開発し報告(Narazaki, <i>Circulation</i> , 2008; <i>Best Paper Award</i> , <i>Circulation</i> 2008)。	◎
⑰ヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導	⑰ヒト iPS 細胞から心筋分化誘導に成功	◎
⑱ヒト成体心筋モデル細胞取得法の確立(幹細胞創薬研究所)	⑱ヒト ES 細胞由来心筋細胞の長期再接着培養法の確立と浮遊培養法による機能増強	◎
⑲ヒト ES 細胞由来心筋細胞を用いた QT 延長測定評価法の確立(安全性薬理試験への適応)(幹細胞創薬研究所)	⑲細胞外電位の取得および in vivo を反映する薬剤応答性の検出 (⑳㉑Otsubi TG et al., <i>Stem Cell Res</i> , 2010)	◎
㉒ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の機能評価・モデル細胞構築	㉒ヒト iPS 細胞由来心筋細胞において、遺伝子発現・電気生理学的検討・電子顕微鏡的検討等を行い、モデル細胞としての要件を満たすことを確認。	◎
21 ヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導の効率化	21 サイクロスポリン A 法を導入することにより、ヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導効率を約5倍促進。	◎
22 ヒト iPS 細胞への応用(幹細胞創薬研究所)	22 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の取得および薬剤応答性の検出	○
23 化合物によるヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞の機能亢進(幹細胞創薬研究所)	23 適切な薬剤応答性を示す心筋モデル細胞の短期間での取得	◎
ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発		
①マウスES細胞から肝細胞への分化誘導技術の検討(京都大学) ・成熟肝細胞への分化誘導に向けてより適した培養条件を調べる。 ・既存の細胞株による肝細胞の成熟化に対する効果を調べる。	①マウスES細胞から肝細胞への分化誘導技術開の検討(京都大学) ・効率よく肝前駆細胞を見出し、効率よく成熟化させるシステムを構築した。 ・既存の細胞株では肝細胞の成熟化に対する効果がほとんどないことを見出した。	○
②ヒトES細胞における肝細胞特異的プロモーター/レポーター遺伝子の導入(京都大学) ・ベクターの構築を進める。	②ヒトES細胞における肝細胞特異的プロモーター/レポーター遺伝子の導入(京都大学) ・4種類のベクターを構築した。	○
③フィーダー細胞の肝細胞分化誘導能の検討 ・マウス由来 Thy1 陽性細胞株のサル ES 細胞の肝細胞分化誘導能を調べる。	③フィーダー細胞の肝細胞分化誘導能の検討 ・マウス由来細胞株の分化誘導能は認められなかった。	△
④マウスES細胞から肝細胞への分化誘導技術の検討(熊本大学)	④マウスES細胞から肝細胞への分化誘導技術開の検討(熊本大学)	○

<p>⑱肝細胞特異的プロモーター/レポーター遺伝子をノックインしたヒトESとヒトiPS細胞株の評価と分化細胞の純化・解析(熊本大学)</p>	<p>⑱肝細胞特異的プロモーター/レポーター遺伝子をノックインしたヒトESとヒトiPS細胞株の有効性について評価した。(熊本大学)</p>	<p>○</p>
<p>人工基底膜、疑似マトリックスの評価</p>		
<p>①各人工基底膜・疑似マトリックスのES細胞の未分化維持に対する評価方法の検討を、サルES細胞を用いて行う。(京都大学)</p>	<p>①サルES細胞の未分化維持培養に関する人工基底膜・疑似マトリックスの評価方法を確立した。</p>	<p>○</p>
<p>②ヒトES細胞の未分化維持培養に関する人工基底膜、疑似マトリックスの評価方法の検討を行う。</p>	<p>②ヒトES細胞の身分開示に関する人工基底膜・疑似マトリックスの評価方法を確立した。</p>	<p>○</p>
<p>③ヒトES細胞で発現しているラミニンについて検討を行う。</p>	<p>③ヒトES細胞で発現しているラミニンを同定した。</p>	<p>○</p>
<p>④ヒトES細胞で優位に発現しているラミニン332, 511, 111のレコンビナントを用い、ヒトES細胞の未分化維持が可能であるかどうかを検討する。</p>	<p>④ヒトレコンビナントラミニン332,511,111で、ヒトES細胞の未分化維持培養が可能であることを見出した。</p>	<p>○</p>
<p>⑤ヒトレコンビナントラミニン 332, 511, 111を用いたヒトES細胞の未分化維持培養について、詳細な検討を行う。</p>	<p>⑤ヒトレコンビナントラミニン335, 511, 111を用いてヒトES細胞の長期間培養を行っても、ヒトES細胞の特性・品質に異常がないことを見出す。さらに大阪大学で改良されたラミニンを用いても同様な効果があることを見出した。</p>	<p>◎</p>
<p>⑥ヒトレコンビナントラミニンを用いて、ヒトES細胞の分化誘導を試みる。</p>	<p>⑥に特化するため、本プロジェクトに関する詳細な検討は行わなかった。</p>	<p>△</p>
<p>分子構成を最適化した人工基底膜によるES細胞の分化誘導制御技術の開発</p>		
<p>①細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子構成の解明</p>	<p>①細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子構成の解明 ・胎生125日および145日における主要基底膜蛋白質20種の免疫組織化学的解析を完了した。また、得られた染色結果を画像データベース化した。 ・マウス初期胚(胎生5.5~7.5日)の主要基底膜蛋白質20種の局在解析を完了した。マウス初期胚で構成的に発現する基底膜分子を同定した。 ・これにより、初期発生・器官形成に伴う基底膜分子構成の時空間制御の実体解明が大きく進捗した。 ・ゲノム情報を母集団として新規細胞外マトリックス蛋白質を探索し、肝臓類同に局在する新規蛋白質を同定した。</p>	<p>○</p>
<p>②基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築</p>	<p>②基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築 ・ゲル化能を保持した高純度V型コラーゲンをウシレンズ囊から非酵素的に調製する方法を確立した。 ・α鎖の組成の異なる5種類の主要ラミニンアイソフォームの高効率発現系を構築し、精製法を確立した。 ・第一世代人工基底膜の構築に必要な準備を完了した。</p>	<p>○</p>
<p>③人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発</p>	<p>③人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発 ・胚様体を介して、三胚葉(外胚葉、中胚葉、内胚葉)にそれぞれ分化誘導可能な実験評価系を立ち上げた。</p>	<p>○</p>
<p>④細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子構成の解明</p>	<p>④細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子構成の解明 ・主要基底膜蛋白質20種に加え、残り15種の基底膜蛋白質および基底膜関連蛋白質6種について、胎生125日および145日胚の免疫組織化学的解析を完了した。また、得られた染色結果を画像データベース化した。 ・マウス初期胚(胎生8.5~10.5日)の主要基底膜蛋白質20種の局在解析を完了した。 ・これにより、胎生5.5日から16.5日までの発生の各段階における基底膜分子構成を連続的に解析するための情報基盤が整</p>	<p>○</p>

<p>⑤基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築</p>	<p>備された。</p> <p>⑤基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築 ・β2型ラミニンアイソフォーム5種を含む7種のラミニンアイソフォームの組換え蛋白質発現系を構築し、精製法を確立した。 ・これにより、人工基底膜の構築に必要な全12種のラミニンアイソフォームの組換え蛋白質の高発現・安定供給系が確立された。</p>	<p>○</p>
<p>⑥人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発</p>	<p>⑥人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発 ・IV型コラーゲンと特定のラミニンアイソフォームを組み合わせた第一世代人工基底膜を構築し、マウスES細胞を用いる分化誘導評価系を立ち上げた。 ・組換えラミニン-511および-332がヒトES細胞のフィーダーフリー培養用基材として有効であることを見いだした(京都大学との共同研究)。 ・ヒトES細胞が発現しているラミニンおよびそのインテグリン受容体のタイプを明らかにした。</p>	<p>○</p>
<p>⑦細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子構成の解明</p>	<p>⑦細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子構成の解明 ・心臓、肝臓を対象を絞り、マウス胚発生の各段階および成体臓器での基底膜分子構成を詳細に解析した。 ・心臓の形成初期ではα4鎖ラミニンを主成分とする基底膜が構築され、発生が進むとα2鎖ラミニンが心筋細胞の基底膜に強く発現することを明らかにした。 ・肝臓の発生初期では、α1鎖およびα3鎖のラミニンが発現し、その局在パターンが血管内皮細胞のマーカーと類似していることを見いだした。</p>	<p>○</p>
<p>⑧基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築</p>	<p>⑧基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築 ・第二世代人工基底膜の構築に必要なニドゲン2種およびヘパラン硫酸プロテオグリカン(アグリリン)の発現系を構築し、精製法を確立した。 ・IV型コラーゲンの脆弱性を克服するI型/IV型コラーゲン混成ゲルの開発に成功した(平成21年に特許を申請した)。 ・第二世代人工基底膜の素材となるIV型コラーゲン、各種ラミニン、ニドゲン2種、およびヘパラン硫酸プロテオグリカンの間の親和性を網羅的に解析し、第二世代人工基底膜構築のための基本戦略を策定した。</p>	<p>◎</p>
<p>⑨人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発</p>	<p>⑨人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発 ・マウスES細胞の評価系を用い、I型/IV型コラーゲン混成ゲルがI型コラーゲン単独ゲルとは異なる活性をもつことを示した。 ・nogginを利用した心筋細胞への選択的分化誘導系を導入し、I型/IV型コラーゲン混成ゲルの評価を行った。</p>	<p>○</p>
<p>⑩細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子構成の解明</p>	<p>⑩細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子構成の解明 ・脳内毛細血管の基底膜分子構成を網羅的に解析し、他の毛細血管基底膜と発現が異なる基底膜分子を同定した。 ・成体神経幹細胞の足場となる基底膜様細網構造の分子組成を明らかにした。 ・成体臓器の幹細胞ニッチの解明に不可欠な臓器幹細胞の網羅的可視化技術を確立した。</p>	<p>○</p>
<p>⑪基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築</p>	<p>⑪基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築 ・基底膜の主要なヘパラン硫酸プロテオグリカンであるパールカンの発現系を構築し、組換え蛋白質の安定供給系を確立した。 ・I型/IV型コラーゲン混成ゲルを基材とし、これにラミニン、ニドゲン、パールカンを組み込んだ第二世代人工基底膜の構築</p>	<p>◎</p>

<p>⑫人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発</p>	<p>技術を確立した。 ・ラミニンの活性部位¹だけを含む活性フラグメントの組換え蛋白質の発現系を構築し、このフラグメントが全長ラミニンの活性をほぼ100%保持しているだけでなく、収量が大幅に向上することを見いだした。</p>	○
<p>研究開発項目③「研究用モデル細胞の構築技術の開発」 ヒトES細胞から神経変性疾患モデル細胞の構築</p>		
<p>① 神経変性疾患の情報を収集(幹細胞創薬研究所) ・モデル構築に必要な神経細胞の種類などの情報収集</p>	<p>① 神経変性疾患の情報を収集(幹細胞創薬研究所) ・神経変性疾患モデルとして、アルツハイマー病、筋萎縮側索硬化症、ハンチンチン病を選定。 ・神経幹細胞・前駆細胞、運動神経細胞の分化方法の情報を取得。</p>	○
<p>②アルツハイマー病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・家族性アルツハイマー病原因遺伝子の入手 ・発現ベクターの構築 ・構築されたベクターをES細胞に導入</p>	<p>②アルツハイマー病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・家族性アルツハイマー病原因遺伝子プレセニリン1を京都大学医学部より入手。 ・EF1αプロモーター制御下の発現ベクターを構築。 ・上記ベクターをヒトES細胞に導入。</p>	○
<p>③筋萎縮側索硬化症モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・家族性筋萎縮側索硬化症の原因遺伝子の入手 ・発現ベクターの構築 ・構築されたベクターをES細胞に導入</p>	<p>③筋萎縮側索硬化症モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・家族性筋萎縮側索硬化症の原因遺伝子SOD1を京都大学から入手。 ・CMVプロモーターよりEF1αプロモーターがES細胞内でより強い活性を持つことを確認。 ・EF1αプロモーター制御下の発現ベクターを構築。 ・上記ベクターをヒトES細胞に導入、安定株を樹立。 ・Cre-loxP系の発現調節ベクターを構築中。</p>	◎
<p>④ハンチンチン病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・ハンチンチン病の原因遺伝子の入手 ・発現ベクターの構築</p>	<p>④ハンチンチン病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・ハンチンチン病の原因遺伝子ハンチンチン(エクソン1領域)を東京大学から入手した。 ・Cre-loxP系の発現調節ベクターを構築。</p>	○
<p>⑤アルツハイマー病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・ランダム遺伝子導入法で得られたPS1安定発現細胞株の未分化状態や神経分化能を確認。 ・神経細胞へ分化させ、PS1発現量を確認</p>	<p>⑤アルツハイマー病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・過剰なPS1発現があっても、ES細胞の未分化状態や神経分化能に影響がないことを確認。 ・分化後の神経細胞でのベクター由来のPS1発現が比較的高い株を選択</p>	○
<p>⑥筋萎縮側索硬化症モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・ランダム遺伝子導入法で得られたPS1安定発現細胞株の未分化状態や神経分化能を確認。</p>	<p>⑥筋萎縮側索硬化症モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・過剰なSOD1発現があっても、ES細胞の未分化状態や神経分化能に影響がないことを確認。 ・SOD酵素活性の上昇を確認。 ・分化後の神経細胞でのベクター由来のSOD1発現が比較的高い株を選択。</p>	○
<p>⑦ハンチンチン病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・Cre-loxP系の発現調節ベクターをES細胞へ導入</p>	<p>⑦ハンチンチン病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・薬剤耐性株の樹立、Cre発現ベクター導入によって、HTT</p>	○

<p>⑧部位特異的遺伝子挿入による疾患モデル細胞(第二世代)の構築(幹細胞創薬研究所) ・HPRT遺伝子座挿入用の発現ベクターの構築</p> <p>⑨アルツハイマー病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・神経細胞へ分化させ、ADモデルとしての特徴付け ・HPRT遺伝子座挿入用の発現ベクターのES細胞へ導入</p> <p>⑩筋萎縮側索硬化症モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・運動神経細胞へ分化させ、ALSモデルとしての特徴付け ・HPRT遺伝子座挿入用の発現ベクターのES細胞へ導入</p> <p>⑪ハンチンチン病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・HPRT遺伝子座挿入用の発現ベクターのES細胞へ導入</p>	<p>が発現したことを確認。 ・変異型HTTを発現していても未分化なES細胞の細胞死が起きないことを確認。</p> <p>⑧部位特異的遺伝子挿入による疾患モデル細胞(第二世代)の構築(幹細胞創薬研究所) ・遺伝子座挿入用の発現ベクターの構築完了</p> <p>⑨アルツハイマー病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・ES細胞由来の神経細胞の培養上清でのアミロイドβ42の比率変化を確認。 ・神経分化後のPS1タンパク質レベルの確認 ・第二世代のPS1発現ES細胞株を作成し、神経細胞への分化能を確認した。</p> <p>⑩筋萎縮側索硬化症モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) ・変異型SOD1発現運動神経細胞での細胞死を確認。 ・第二世代のSOD1発現ES細胞株を作成し、神経細胞への分化能を確認した。 ・第二世代のTDP43発現ES細胞株の作成を試みたが、変異型TDP43発現ES細胞株を得ることが出来なかったことが明らかになった。</p> <p>⑪ハンチンチン病モデル細胞の構築(幹細胞創薬研究所) 第二世代のHTT発現ES細胞株を作成し、神経細胞への分化能を確認した。</p>	<p>◎</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>○</p>
<p>血液脳関門(BBB)モデルの創製</p> <p>①血液脳関門(BBB)モデル構築用細胞の調製技術の確立</p> <p><u>神経系細胞への高効率な分化誘導技術</u> ・ヒトES細胞からアストロサイト、神経系前駆細胞を高効率に分化誘導する技術を検討し、量産調製技術として確立する。</p> <p><u>血管系細胞への分化誘導技術</u> ・ヒトES細胞から血管内皮細胞、血管周皮細胞を分化誘導する技術を検討し、量産調製技術として確立する。</p> <p>②in vitro 血液脳関門モデルの構築</p> <p><u>従来モデルの試作による性能評価とBBB特性評価技法の取得</u> ・非ヒト動物由来初代培養細胞等を用いて従来モデルを試作し、そのBBB特性の性能評価を通して、物質透過性をはじめとする血液脳関門特性の評価技法を技術取得する。 ・評価技法を技術取得の過程で得られる評価結果を、後に構築するヒトES細胞由来in vitro 血液脳関門モデルの特性解析の比較参照データとして蓄積する。</p> <p>③血液脳関門(BBB)モデル構築用細胞の調製技術の確立</p> <p><u>神経系細胞への高効率な分化誘導技術</u> ・ヒトES細胞からアストロサイト、神経系前駆細胞を高効率に分化誘導し、量産調製技術として確立する。</p> <p><u>血管系細胞への分化誘導技術</u> ・ヒトES細胞から血管内皮細胞、血管周皮細胞を分化誘導する技術を検討し、これら血管系細胞の量産調製技術として確立する。</p>	<p>①・BBBモデル構築用細胞の調製 ・神経系細胞分化誘導技術の確立 Neural Stem Sphere(NSS)法の改良/ヒトES細胞による高効率な神経系細胞の分化誘導に成功/ヒトES細胞由来神経系前駆細胞のin vitro増幅法と凍結保存法を確立した/アストロサイトの選択的調製法を確立した ・血管系細胞分化誘導技術の確立 OP9共培養系(計画)に加えて、新たに6種サイトカイン含有培地を用いる血管内皮細胞誘導技術を導入し、ヒトES細胞から血管内皮(前駆)細胞、血管周皮(平滑筋)細胞の誘導を確認した</p> <p>②in vitro 血液脳関門モデルの構築 ・従来モデルの性能評価とBBB特性評価技法の取得 ウシ脳微小血管内皮細胞やラット脳アストロサイト等の初代培養細胞の共培養系従来モデルを構築し、BBBモデルとしての性能を把握した また、TEER測定や物質透過性評価をはじめとする各種BBB特性評価技法を取得した</p> <p>③BBBモデル構築用細胞の調製 ・神経系細胞分化誘導技術の確立 前年度に確立したNSS改良法を用いてヒトES細胞由来の神経系前駆細胞およびアストロサイトを量産調製した ・血管系細胞分化誘導技術の確立 OP9共培養法、6種サイトカイン法によりヒトES細胞から血管内皮細胞、血管平滑筋、および血管前駆細胞の誘導し、分離・量産化に目処を立てた</p>	<p>◎</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>○</p>

<p>④in vitro 血液脳関門モデルの構築</p> <p><u>BBB モデル構築形態に関する事前検討</u> ・初代培養細胞やマウス・サルES細胞から調製したBBB構成細胞等を用いて、モデル構築形態(共培養系)を予備検討し、最適な構築形態についての情報を蓄積する。</p> <p>⑤血液脳関門(BBB)モデル構築用細胞の調製技術の確立</p> <p><u>血管系細胞の分化誘導・量産調製技術の完全確立</u> ・血管系細胞(血管内皮細胞など)の量産化体制を完全確立する。 ・血管系/神経系細胞を量産調製してモデル構築に供する。</p> <p>⑥in vitro 血液脳関門モデルの構築</p> <p><u>ヒトES細胞由来BBB構成細胞によるモデル化検討</u> ・ヒトES細胞由来血管内皮細胞を基軸とした共培養系モデルを構築・評価してBBB機能発現に最適な構築形態を見出す</p> <p>⑦血液脳関門(BBB)モデル構築用細胞の調製技術の確立 ・モデル構築用細胞としての好適化を図る。</p> <p>⑧in vitro 血液脳関門モデルの構築</p> <p><u>ヒトES細胞由来BBB構成細胞を用いたモデル構築</u> ・ヒトES細胞由来血管内皮細胞を基軸とした共培養系モデルを構築・評価してBBB機能発現に最適な構築形態を見出す。 ・BBB特性の獲得に向けてモデル構築の最適化・高性能化を図る。 ・完成したヒトES細胞由来BBBモデルの精度を検証する。</p> <p>ハイスループットスクリーニング(HTS)技術の開発</p> <p>①HTS実施環境の整備</p> <p>②化合物ライブラリの整備</p> <p>③マウスES細胞を用いたHTSフローの確認</p> <p>④心筋分化誘導促進物質の探索スクリーニング系の構築(幹細胞創薬研究所)</p> <p>⑤心筋分化誘導促進物質探索HTS系への化合物ライブラリの適用と、αMHCプロモータGFP蛍光変化の解析手法の開発(幹細胞創薬研究所)</p> <p>⑥心筋分化誘導促進物質探索HTS系によって見出された心筋分化促進化合物Xの解析(幹細胞創薬研究所)</p>	<p>④in vitro 血液脳関門モデルの構築 ・BBBモデル構築化の事前検討 ウシ脳微小血管内皮細胞を用いて、Mesh-fib培養インサート(国立環境研究所技術)活用による近接共培養構築やES細胞由来神経系前駆細胞の共培養効果を検討した結果、単層培養したウシ脳微小血管内皮細胞に対してES細胞由来神経系前駆細胞の共培養によるバリア形成の促進効果を見出した</p> <p>⑤BBBモデル構築用細胞の調製 ・血管系細胞分化誘導技術の完全確立 更なる誘導効率の向上を図り、高率(>20%)かつ短期間(誘導日数5日)で血管内皮(前駆)細胞を誘導可能な高効率分化誘導法を新規に開発した MACSを用いるソーティング技術を確認し、高純度な血管内皮細胞の分離を実現した 継代による増幅/凍結保存技術を確認し、モデル構築に供する十分な量産体制を構築した</p> <p>⑥in vitro 血液脳関門モデルの構築 ・ヒトES細胞由来BBB構成細胞によるモデル化 ES細胞由来血管平滑筋細胞や神経前駆細胞の共培養効果を確認した/基底膜構造体上でも良好な内皮シート形成を確認した</p> <p>⑦BBBモデル構築用細胞の調製 ・モデル構築用細胞としての好適化 ヒトES細胞から量産調製された血管内皮前駆細胞を血管平滑筋細胞や神経前駆細胞の培養上清を用いてBBB特異的TJタンパク質Claudin-5を高発現する血管内皮細胞へ性状改変することができた</p> <p>⑧in vitro 血液脳関門モデルの構築 ・ヒトES細胞由来BBB構成細胞によるモデル化 性状改変したヒトES細胞由来血管内皮細胞を基軸とするモデルにおいて、脳毛細血管内皮細胞を使用する従来モデルに匹敵する静的バリア性能(細胞間物質透過性)の獲得に成功した</p> <p>①細胞分注機の改良開発完了。検体分注、培地交換システムの導入。検出機器の整備</p> <p>②京都大学上杉研からの供与12000化合物のDMSO溶液ライブラリの整備完了</p> <p>③基材、蛍光検出時の条件設定の完了</p> <p>④サルES細胞の96ウェルHTSプレート上での心筋分化系を確立、HTSプレートを選定、心筋分化シグナルの自動検出装置を構築。</p> <p>⑤HTSシステムにおけるGFP蛍光変化の検出方法を確立し、約1万検体の化合物ライブラリから活性化化合物を検出。</p> <p>⑥心筋分化促進物質として化合物Xを発見(用途特許申請)し、化合物X添加によるヒトES細胞由来心筋細胞の遺伝子発現変化、電気生理学的変化を解明。</p>	<p>○</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p>
---	--	---

<p>擬似基底膜を利用したES細胞の分化誘導制御技術の開発 (非公開)</p> <p>①ヒトES細胞の維持・分化誘導に特化した基底膜構造体の培養基質の創製。</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・上皮細胞や間充織系細胞を、コラーゲン分子の生合成と架橋沈着を促進させる因子を添加した培地を用い、プラスチック培養皿上に、基底膜成分が沈着した細胞外基質を試作した。この細胞外基質上にサルES細胞を播種し、細胞接着性を検討した。細胞外基質の作製に用いた細胞による違いはあるが、基本的にサルES細胞はどの培養基質にも接着できた。しかし、長期培養には適さなかった。 ・ES-hepatocyteを作製している研究グループに、LN-10 isoformの基底膜基質(LN10-sBM)の提供を開始した。ES細胞は、LN10-sBMに支障無く接着・生育した。この培養方法によってfeederが必要なくなり、その結果、message にfeeder細胞混入の恐れが無くなった。更には、分化・成熟の誘導に適した細胞との共培養が適宜可能になった。 ・基底膜構造体の形成に関わると想定されるシンデカン接着受容体遺伝子4種類をクローニングし、各々の遺伝子を293細胞に強制発現させた安定発現株(rSN-1, -2, -3, -4)を作製した。それぞれの syndecan recombinantsを用い、基底膜形成を促進する程度を比較検討した。 ・LN10-sBMは、肝臓のマトリックスを構築する細胞群を考慮に入れていない。ラミニン-10を分泌する細胞を肝由来の不死化星細胞と共培養することで、発生期の肝臓における細胞外基質の固相環境に、一層近づけた基底膜培養基質(LN10/LI90-sBM)を作製し、ES-hepatocyteの研究グループに提供した。LN10/LI90-sBMを用いることで、ES細胞からdefinitive endodermへの分化誘導が一層促進された。 ・シンデカン安定発現株から、発現量の多いクローンを選抜した。その中から特に発現量の多いrSN-2のクローンをを用い、マトリゲル存在下で培養し、基底膜構造体(LN-111-sBM)の形成を確認した。 ・definitive endodermから成熟肝細胞への更なる分化誘導を促進するために、ヒト不死化肝実質細胞(T3-Alb7)を用いて、基底膜基質を作製した。また、肝成熟過程に於ける類洞形成と肝実質細胞の成熟を勘案し、ヒト不死化類洞内皮細胞(TMNK-1)との共培養による基底膜基質の作製も併せて行った。 ・異物であるマトリゲルに代わり、ヒトLN-511を供給する共培養細胞としてrLN-10を用い、rSN-2細胞による基底膜形成を検討した。 	<p>○</p>
<p>②ヒトES細胞に特化した細胞接着リガンドを結合した化学合成ポリマー(擬似マトリックス)の創製</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・擬似マトリックスのレパートリーを充実させるため、市販品が無いoligo-GlcNAcをリガンドとする擬似マトリックスを開発した。 ・サルES細胞を、種々の擬似マトリックス上で培養したが、効果は思わしくなかった。 ・サルES細胞を、種々の擬似マトリックス上で培養した。ヒト間充織幹細胞(hMSC)クローンを入手し、その順化培地を添加することで、維持できた。擬似マトリックス間で特に大きな差異は無かった。 	<p>○</p>
<p>③基底膜構造体基質及び擬似マトリックスを用いた幹細胞の新規培養技術の開発</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・脳血流閉門培養モデル作製に必要な培養基質を試作した。 ・十分な間隙を有するコラーゲン線維基質を極限の1μm程度の厚さにまで成形し、両面上皮細胞と間充織細胞または内皮細胞を播種・共培養できる極薄膜コラーゲン線維基質(mesh-fib)を開発した。 ・極薄膜基質の片面にそれぞれ牛脳血管内皮細胞(BBMVEC)及びラット肺線維芽細胞(RPF)を播種・共培 	<p>○</p>

<p>ES細胞由来肝細胞を用いた、創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立</p> <p>①動物細胞並びにヒト肝細胞を用いたコラーゲン・サンドイッチ培養法の確立し、胆汁排泄の評価系を構築する。</p> <p>②ヒト凍結肝細胞を用いたヒトにおける肝取り込み・代謝能力の評価系の確立</p> <p>③肝細胞と腎スライスを同時に用いた薬物の肝腎振り分けの予測系の確立</p> <p>④ヒト肝細胞を用いた肝取り込み過程における個々のトランスポーターの寄与率の解析</p> <p>⑤サンドイッチ培養肝細胞を用いた胆汁排泄トランスポーターの寄与率の解析法の確立</p>	<p>養することで、内皮細胞直下に基底膜構造を有する薄膜基底膜基質 (BBMVEC/RPF mesh-sBM) を作製した。別の選択肢として、LN-511 を分泌する細胞を主に、共培養する細胞としては不死化星細胞 (LI90) を用いることで、薄膜基底膜基質 (LN10/LI90mesh-sBM) を作製した。BBBモデル開発グループに提供。</p> <p>・新たな細胞の組み合わせで、BBBモデルのための基底膜基質を作製した。HPAECは、不死化されていないことや、rLN10との共培養培地の条件設定が難しい。そこで、rLN10と同じ培地が使用可能なヒト不死化類洞内皮細胞 (TMNK-1) を、共培養細胞に選択した。mesh-fibの内面には、rLN-10細胞、外面にはTMNK-1細胞を播種し、2週間共培養することで、基底膜を形成させた。薄膜基底膜基質 (rLN10/TMNK1 mesh-sBM) のrLN-10側には血管内皮細胞を、TMNK-1側には、周皮細胞やastrocyteを播種することで、BBBモデル作製を想定。BBBモデル開発グループに提供。</p> <p>・大量スクリーニングを指向するマトリックスとして、mesh-fib の代わりに、多孔性のプラスチック薄膜上に作製したコラーゲン線維基質 (fib) を用いて、rLN10/TMNK1 mesh-sBMとほぼ同等の性能を発揮できる rLN10/ TMNK1-sBMやrLN10/LI90-sBMを作製した。これらのマトリックスは、BBBモデル開発グループに提供。</p> <p>・ヒトES細胞を成熟した肝実質細胞に分化誘導するための最適な基底膜基質は、成熟肝実質細胞の機能が最も安定して維持できるマトリックスと同義語であるとして、a) マトリックスの違いによるtransporterの遺伝子発現への影響、b) マトリゲルによるサンドイッチ培養の効果、c) AlbuminやCyp3a11 (ヒトCyp3a4に対応) 遺伝子発現へのサンドイッチ培養の影響を検討し、hLN-511基底膜基質が優れていること、及び、サンドイッチ培養によって、その効果が増強・安定化することが判明した。</p> <p>①</p> <p>・ラット肝細胞を用いてサンドイッチ培養系における胆管形成が進行する条件を最適化し、胆汁排泄される物質について胆管腔への排出を確認した。</p> <p>・ラット肝細胞において胆汁排泄に関与する個々のトランスポーターの寄与率を定量的に決める方法論のためのMdr1、Bcrpの選択的阻害剤を見つけ、評価に使うことを示した。</p> <p>・ヒト肝細胞においても同様の培養系により胆管腔への排出を確認した。</p> <p>②</p> <p>後実験を進める上で必須である、輸送活性を十分に有しており評価が可能なヒト凍結肝細胞のロットを複数見出した。</p> <p>③</p> <p>ラットにおいて、in vitro実験から得られた肝細胞・腎スライスにおける取り込みクリアランスを元に、in vivoにおける肝腎振り分け率を良好に推定できることを示した。</p> <p>④</p> <p>ヒト肝細胞において、複数の方法論を用いて各種薬物の肝取り込みにおけるOATPファミリートランスポーターの寄与率を定量的に示す実験系を用いて、複数の薬物について検討を行った。</p> <p>⑤</p> <p>・Mdr1、Bcrpに加え、Mrp2についても選択的な阻害を実現する薬剤の選択ができ、Mdr1、Bcrp、Mrp2といった薬</p>	<p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>○</p>
--	--	--

<p>⑥凍結肝細胞を用いた in vivo レベルでの肝胆系輸送能力の評価系の確立および検証</p>	<p>剤の胆汁排泄に必要なトランスポーターの寄与を実験的に分けることに成功した。 ・ヒト肝細胞での検討を進める前段階として、市販されている肝細胞の中で、実際に胆汁排泄に関して十分な活性を持っており、in vitro実験系として適切なロット選択法を確立すると共に、ロットを確保することができた。</p>	<p>○</p>
<p>⑦凍結肝細胞と腎スライスを同時に用いた薬物の肝腎振り分けの予測系の確立</p>	<p>⑥昨年度に続き、薬物の種類を増やしてin vitro実験からin vivo肝クリアランスの予測が可能であるかどうか検討したところ、良好な相関関係が認められた。さらにヒト凍結肝細胞を用いて、ヒトにおけるin vivo腎外クリアランスの予測を実施したところ、良好に予測が可能であることが示された。</p> <p>⑦年度に続き、薬物の種類をさらに増やして肝腎振り分け率の予測を実施したところ、良好な相関関係が認められた。さらにヒトサンプルを用いて、同様にヒトにおける肝腎振り分けの予測についても良好に成立することを見出した。</p>	<p>○</p>
<p>⑧ES細胞由来肝細胞のより定量的な性能評価のための代謝酵素・トランスポーター遺伝子のmRNA発現量の測定法の標準化および性能評価の支援</p>	<p>⑧CYP3A4, OATP1B1について、mRNAならびに蛋白発現量を定量化して、各施設間で比較できるような実験条件の統一化を図り、分化細胞を作製する拠点施設に対して、条件の提示・比較すべきヒト肝細胞の標準サンプルの発送を行った。</p>	<p>○</p>
<p>⑨ラット・ヒト肝細胞を用いたサンドイッチ培養系による胆汁排泄トランスポーターの寄与率の解析法の確立ならびに胆汁排泄クリアランスの予測</p>	<p>⑨ ・bile pocketへの薬物の排出クリアランスを複数の薬物についてin vitro実験で求めると共に、in vivo動物実験により胆汁排泄クリアランスを算出したところ、in vitro実験から得られた結果と良好な相関関係が認められることを示した。さらに、in vitro実験からの絶対値の予測が、in vivo実験から求められた実測値と比較して、約1/10程度であることを見出し、その原因が取り込みトランスポーターの機能低下に起因することを見出した。 ・ヒト肝細胞においてラットで見出された条件でMrp2, Mdr1, Bcrpの阻害を実施したところ、ヒトにおいては、ラットとは異なる阻害プロファイルを示したことから、ヒト肝細胞にあった実験系を構築する必要性が認められた。</p>	<p>○</p>
<p>⑩サンドイッチ培養による薬物動態評価に利用可能なヒト肝細胞のロット確保のためのスクリーニング</p>	<p>⑩今後のヒトES細胞由来肝細胞と胆汁排泄機能に関して比較できる、ヒト肝細胞のロットを選択すべく、典型的基質のbile pocketへの排出クリアランスを算出することにより選択する方法論を構築し、複数のロット選択を行うことができた。</p>	<p>○</p>
<p>⑪肝細胞を含む動物・ヒト組織サンプルや動物・ヒト遺伝子発現系を併用した結果をもとにした、動物・ヒト全身の薬物の体内動態を予測可能な数理モデルの構築法に関する検討</p>	<p>⑪in vitro実験から得られた代謝・輸送に関するパラメータを全身の薬物動態を表現するための適切な数理モデルを構築して、代入することにより、モデル化合物であるプラバスタチンのヒトおよびラットにおける血中ないしは臓器中濃度の時間推移をシミュレーションにより良好に予測することに成功した。</p>	<p>○</p>
<p>⑫ヒトES細胞由来肝細胞のより定量的な性能評価のための代謝酵素・トランスポーター遺伝子の mRNA および蛋白発現量の測定法の標準化および性能評価の支援</p>	<p>⑫昨年度に引き続き重要な代謝酵素CYP2C9およびトランスポーターMRP2に関して、mRNAおよび蛋白発現量の測定法の標準化を実施し、定量方法ならびに対照となるヒト肝臓サンプルについて分化細胞を作出する施設に情報・試料提供を実施した。</p>	<p>○</p>
<p>⑬肝細胞を用いた薬物間相互作用の予測のための方法論確立および検証(ラットin vivo実験ならびにin vitro実験の結果に基づく)</p>	<p>⑬肝臓の取り込み・排泄過程で起こる薬物間相互作用をin vitro実験系(肝細胞・胆管側膜ベシクル)を用いて予測するための方法論を構築すべく、Pravastatinをモデル化合物としてラットにおける複数の薬物間相互作用の</p>	<p>○</p>

<p>⑭代謝酵素・トランスポーターが同時に体内からの薬物消失に関わる場合の各分子の相対的重要性を評価するための実験系の確立</p> <p>⑮ヒトES細胞由来肝細胞のより定量的な性能評価のための代謝酵素・トランスポーター遺伝子の一般的な機能の測定法の標準化およびヒト肝細胞との比較試験</p>	<p>予測を試みたところ、良好に予測することができた。</p> <p>⑭代謝酵素ならびにトランスポーターの両方がクリアランスに関与する薬剤においても、これまでの方法論による薬物動態の予測が可能であるかどうかを検討すべく、2種類の非代謝性スタチンと2種類の代謝性スタチンについて、取り込みクリアランスから良好にin vivoにおける肝クリアランスを予測できることを示すことができた。</p> <p>⑮前年度までに構築した発現量を定量する実験系に加え、トランスポーターおよび代謝酵素の活性を簡便に測定するための方法論の構築を行った。また、それを用いて実際に幹細胞創薬研究所より提供されたヒトES細胞由来幹細胞の輸送・代謝活性を測った所、多少の輸送活性は見られたものの、ヒト肝細胞との比較においては、発現も機能も低値であることが示された。</p>	<p>○</p> <p>○</p>
---	--	-------------------

<p>オンチップ・ヒト組織・臓器モデルを用いた毒性・創薬技術の研究開発</p> <p>①動物細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築</p> <p>①-1 動物臓器・組織モデル構築技術のための細胞操作・長期培養・薬剤添加技術の開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・1細胞単位での細胞状態の計測が可能となる計測システムとチップの構築を試みる。 ・薬剤の添加によって計測データがどのように変化するかを計測することで、その対策について検討する。 <p>①-2 オンチップ動物心筋モデルの構築と薬剤応答の機能評価</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル「心筋細胞ネットワークチップ」を構築するために必要な細胞の特性(集団効果、繊維芽細胞の効果等)の基礎データを取得する。 <p>①-3 オンチップ動物神経モデルの構築と薬剤応答の機能評価</p> <ul style="list-style-type: none"> ・グリア細胞を共存させない神経細胞1細胞単位でのチップ上での細胞培養技術の開発 ・細胞1細胞レベルでの発火信号の計測、そしてさらに単一細胞から伸長する神経突起1本単位での電気計測技術の開発 <p>②ヒトES細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築</p> <p>②-1 ヒトES細胞からの分化細胞を用いた健常(標準)臓器・組織モデル構築技術のための細胞操作技術の開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・オンチップ・セルソーターを用いた無染色での心筋細胞、神経細胞の精製技術について検討を行う。 ・アプタマー等の可逆修飾技術を利用することで細胞を精製する技術についても検討を行う。 <p>②-2 オンチップ・ヒト心筋モデルの構築と薬剤応答の機能評価</p> <ul style="list-style-type: none"> ・サルES細胞由来の拍動細胞を用いた、薬剤に対する細胞の応答解析、細胞イオンチャンネルの発現状態の解析を行う。 <p>②-3 ヒトES細胞を用いた疾患臓器・組織モデル構築技術の開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・動物細胞ベースでの心筋細胞と繊維芽細胞の組合せによる「心肥大臓器モデルチップ」の構築の検討 ・細胞ネットワークの形状制御による不整脈発生機構モデルである「リエントリーモデルチップ」の構築を行うことで、表現型を再現したモデルチップの構築の検討 	<p>①動物細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築</p> <p>①-1 動物臓器・組織モデル構築技術のための細胞操作・長期培養・薬剤添加技術の開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・1細胞単位での細胞状態の計測が可能となる計測システムとチップの構築に成功。 ・薬剤の添加によって変化するデータの計測法の対応策を開発。 <p>①-2 オンチップ動物心筋モデルの構築と薬剤応答の機能評価</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル「心筋細胞ネットワークチップ」を構築するために必要な集団効果、繊維芽細胞の効果等の基礎データの取得に成功。 <p>①-3 オンチップ動物神経モデルの機能評価</p> <ul style="list-style-type: none"> ・グリア細胞を共存させない神経細胞1細胞単位でのチップ上での細胞培養技術の開発に成功 ・細胞1細胞レベルでの発火信号の計測、そしてさらに単一細胞から伸長する神経突起1本単位での電気計測技術の開発に成功 <p>②ヒトES細胞を用いたオンチップ臓器モデル構築</p> <p>②-1 ヒトES細胞からの分化細胞を用いた健常臓器・組織モデル構築技術のための細胞操作技術</p> <ul style="list-style-type: none"> ・オンチップ・セルソーターを用いた無染色での画像ベースでの心筋細胞、神経細胞の精製に成功。 ・アプタマーと磁気ビーズによる可逆修飾細胞精製技術の開発に成功。 <p>②-2 オンチップ・ヒト心筋モデルの機能評価</p> <ul style="list-style-type: none"> ・サルES細胞由来の拍動細胞を用いた、K,Ca,Na 薬剤に対する細胞の応答解析、細胞イオンチャンネルの発現状態の解析が可能であることを確認。 <p>②-3 ヒト疾患臓器・組織モデル構築技術の開発</p> <ul style="list-style-type: none"> ・心筋細胞と繊維芽細胞の組合せによる「心肥大臓器モデルチップ」の構築に成功 ・細胞ネットワークの形状制御による不整脈発生機構モデルである「リエントリーモデルチップ」の構築に成功 	<p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>◎</p> <p>○</p> <p>◎</p>
--	---	--

2. 研究開発項目毎の成果

2.1 研究開発項目①「ヒトES細胞の加工技術開発」

2.1.1 ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発

京都大学

共同実施：幹細胞創薬研究所

埼玉医科大学

(1) 事業目的と背景

ヒトES細胞の応用研究において、遺伝子加工技術開発は不可欠なものである。例えば、特定の遺伝子の発現制御による分化誘導の効率化やマーカー遺伝子を利用した目的細胞種の分取、薬剤に対する反応の鋭敏な検出などが可能になると考えられる。しかし、一般的にヒトES細胞に対する遺伝子導入効率は低く、大規模なスクリーニングなどは困難である。

また、ヒトES細胞への遺伝子導入の場合、高い導入効率だけではなく、ES細胞に対して低毒性であることや、ES細胞の未分化性・増殖能を阻害しないことなどが要求される。さらにヒトES細胞では、その原因は未だ不明であるが導入された遺伝子が発現しなくなるというサイレンシングという問題も不可避である。

1998年にThomsonらによってヒトES細胞株の樹立がはじめて発表されて以降、遺伝子加工技術の開発はヒトES細胞の応用研究においてもまた基礎研究においてさえも重要であるにもかかわらず、本プロジェクトの開始時点であまり進展が見られていなかった。多くの研究は遺伝子加工技術開発をむしろ回避する方向で進められており、一部で試みられているものの単発的に発表されている程度であった。

(2) 事業内容と目標

① ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その1) 京都大学

事業目的と背景に述べたように、ヒトES細胞の応用研究において、遺伝子改変技術は不可欠であり、ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発はさらにその土台となっている。世界的な情勢としては、遺伝子加工技術開発の困難さもあってこれらを回避して研究が進められており、また遺伝子導入を用いた論文は単発的にある程度である。しかしながら、遺伝子導入技術開発の重要性は多くの研究者の共通な認識でもあり、本プロジェクトの開始時点では特にレンチウイルスによる遺伝子導入法の検討が世界中で盛んに行われていた。

そのような世界的な情勢の中で我々としては、中間目標として遺伝子導入技術に関してはシステムティックに展開できることとし、また導入遺伝子発現制御技術の開発に関しては調節可能な細胞株を樹立することとした。さらに、最終目標としてはこれらの技術をブラッシュアップし、さらなる遺伝子導入効率の向上を目指すとともに、同時に重要な周辺技術においてもさらなる開発を進め、ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術に関してさまざまなニーズ(特に本プロジェクトを進めるにあたり必要とされる技術)に積極的にフレキシブルに対応できるようにしていきたい。

② ヒト ES 細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その2)幹細胞創薬研究所
幹細胞創薬研究所では、相同組換えのための遺伝子導入技術の開発を目的としている。そのため、相同組換えの実績があるエレクトロポレーション法での遺伝子導入の技術開発が達成できることが望ましい。

中間目標:

エレクトロポレーション法で遺伝子導入が可能かどうかを見極める。不可能なようなら、リポフェクション法やウイルスベクターによる遺伝子導入方法を試し、最適な方法を決定する。

最終目標:

中間目標で選択した遺伝子導入方法を用いて、遺伝子相同組換えの実験遂行に耐えうるだけの効率を持つ遺伝子導入条件を見出す。具体的には、1 回の試行で数十個のコロニーを得られるようにする。

③ ヒト ES 細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その3)埼玉医科大学

物理的もしくは化学的な遺伝子導入法と比較して、ウイルスベクターは細胞表面の受容体タンパク質に結合して細胞内に侵入するために、細胞に対するダメージは少なく、多様な細胞種に対して細胞数を問わず高効率に導入が可能である。そこで本研究では、ヒト ES 細胞に対して高い効率で一時的もしくは安定な遺伝子発現を得る方法論を確立する目的で、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター並びにレンチウイルスベクターを比較する。

中間目標:

- 1)一過性の遺伝子導入効率は、現在数%であるのを数十%にすることを目標とする。
- 2)安定な遺伝子導入効率に関しては、現在 10^7 個の細胞あたり数個程度であるのを数十個にする。

最終目標:

一過性な遺伝子導入と安定な遺伝子導入共に 100%の効率にすることを目標とする。

(3)研究成果

① ヒト ES 細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その1)京都大学

ア. ヒト ES 細胞に適した遺伝子導入法の検討

a. リポフェクション試薬の検討

入手可能な37種の遺伝子導入試薬について、遺伝子導入法を検討し、ヒトES 細胞に対して従来の数倍程度遺伝子導入効率が高い手法を確立できた。

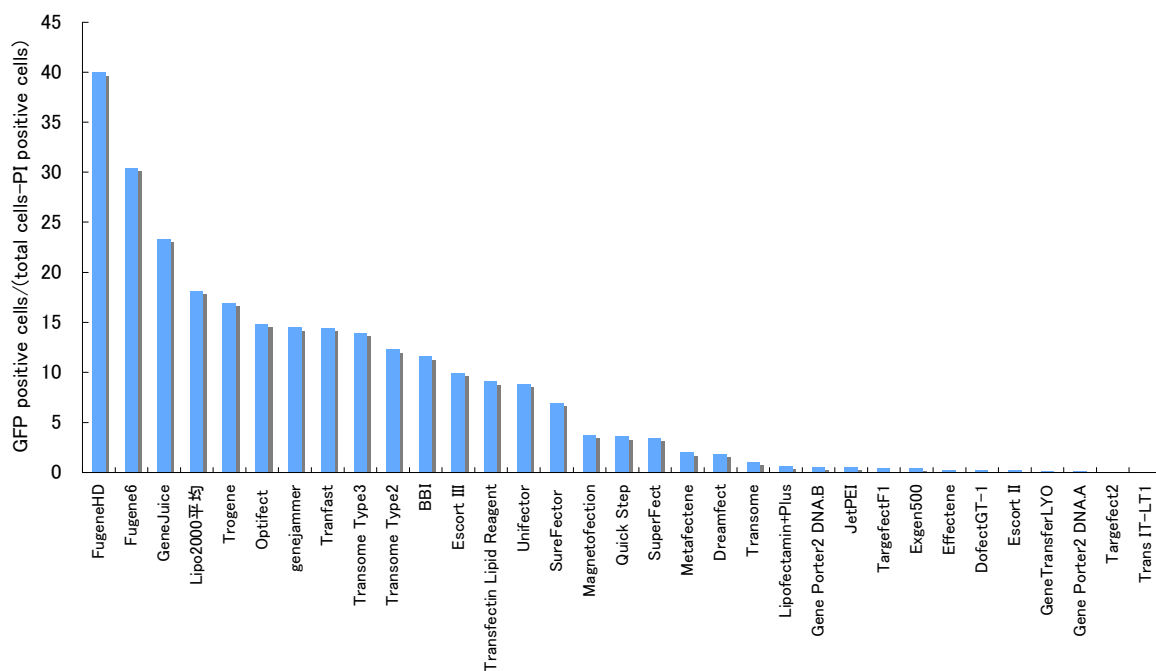
具体的には以下のような手順を進めた。まず入手可能な37種の遺伝子導入試薬について、pCAG-EGFP-SV40-Neo プラスミドを導入した。このプラスミドの利点として、導入された細胞はその遺伝子産物であるEGFP が蛍光を発するとともにneo 遺伝子産物により抗生物質であるG418に耐性を示すようになる。遺伝子導入後48時間後にEGFP 陽性細胞の割合を、蛍光を指標としてFACS を用いて解析し、遺伝子導入効率として評価した。ヒトES 細胞に対する効果を明確に測定するために、フィーダー細胞を用いない培養系でアッセイを行った。

その結果、ヒトES 細胞(KhES-1)に対する遺伝子導入効率はFuGENE HD を用いた場合が最も高かった(図1上段)。また、遺伝子導入効率を調べるのと同時にヒトES 細胞に対する細胞毒性についても遺伝子導入操作後の細胞の生存率で調べたところ、FuGENE HD では顕著な細胞毒性は認められなかった(図1下段)。このことから、FuGENE HD はヒトES 細胞に対して、低毒性でかつ高遺伝子導入効率の試薬であることが明らかになった。他のヒトES 細胞株であるKhES-2、KhES-3 細胞でも同様の検討を行った。その結果いずれの場合もFuGENE HD が最も高い遺伝子導入効率と良好な細胞生存率を示した。

導入遺伝子の発現様式と導入された細胞の形態についても検討を行った。他の試薬を使用した場合はES 細胞のコロニーの周辺部のみにはしか導入遺伝子が高発現した細胞が認められない場合がほとんどであったのに対し、FuGENE HD では比較的コロニーの中央部にも導入遺伝子を高発現した細胞が認められた(図2)。このことから、FuGENE HD は遺伝子導入効率が優れているだけでなく、比較的均一に遺伝子導入が可能であることが分かった。解離等の物理的ダメージに弱く、細胞塊として扱うことを要求されるヒトES 細胞において、コロニー21内の細胞の位置によらず遺伝子導入が可能でFuGENE HDは非常に有効な遺伝子導入試薬であると考えられた。また、FuGENE HD による遺伝子導入後の細胞に顕著な形態の変化は認められず、FuGENE HD はヒトES 細胞の未分化性に対して影響を与えないことも示唆された。ES細胞の安定的な継代維持に必要なフィーダー細胞への影響もほとんど観察されなかった。

この成果は国際誌 *Biochemica* 4, 19-21(2006)に掲載された。

GFP positive



survival

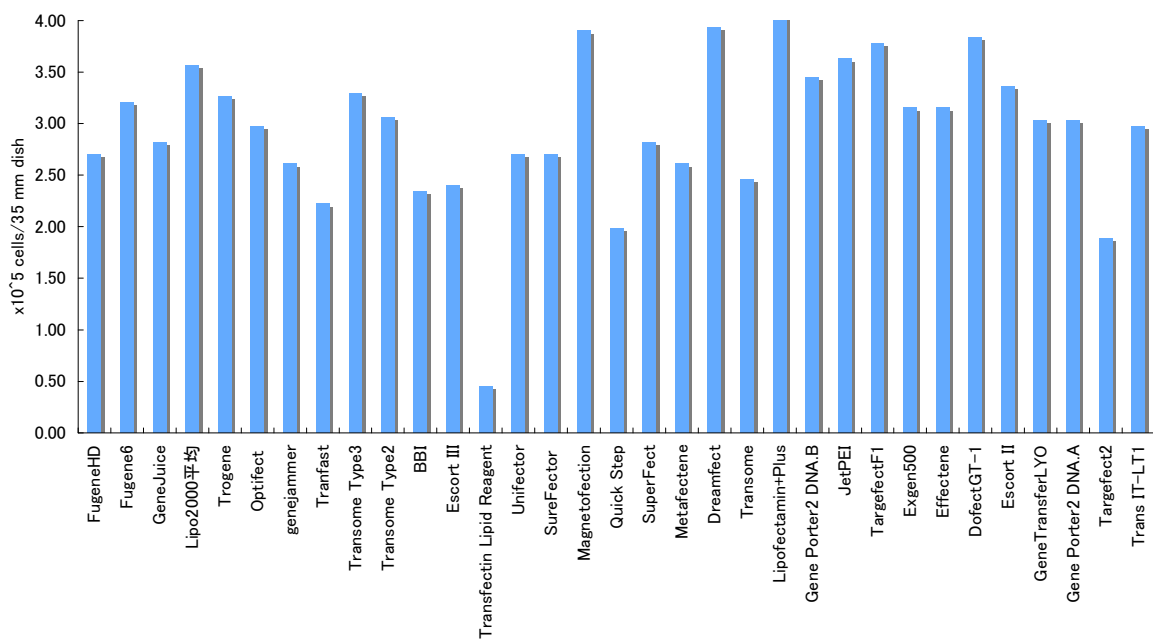
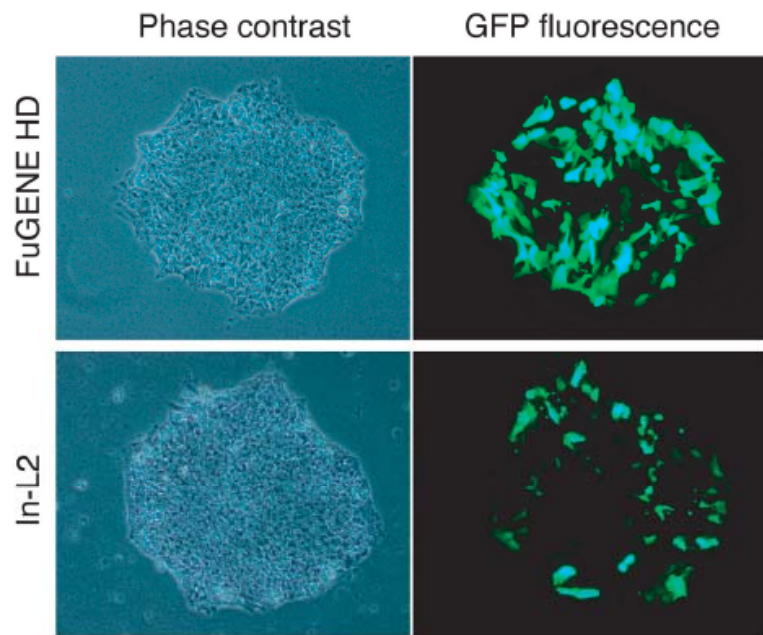


図 1 ヒト ES 細胞(KhES-1 株)における各遺伝子導入試薬による遺伝子導入効率(上段)と 48 時間後の生存率(下段)。Biochemica 4, 19-21(2006)から引用。

図 2 リポフェクション試薬による遺伝子導入の効率の比較。FuGENE HD と In-L2 (Invitrogen Lipofectamine 2000)。FuGENE HD ではほぼ半数近くの細胞で導入遺伝子の発現が確認できたが、In-L2 ではヒト ES 細胞のコロニーの周辺部分でのみ、その発現が確認できる程度であった。Biochemica 4, 19-21(2006)から引用。



b. エレクトロポレーション法

ヒトES 細胞におけるエレクトロポレーション法に対してエレクトロポレーション条件検討を行い、遺伝子導入細胞株を得たことを確認した。京都大学でも幹細胞創薬研究所からエレクトロポレーション法の技術移転を行い、ヒトES細胞においてHPRT遺伝子座での遺伝子相同組換えに成功しており、さらに独自に発展させ、効率の向上を達成した。より具体的な技術情報に関しては遺伝子相同組換えの項目で記述する。

イ. 加工技術開発に適したヒトES 細胞株の作出

ヒトES 細胞をマウスのES 細胞同様に維持を行うと、ヒトES 細胞は物理的操作、化学的操作に弱いこともあり、細胞の生存効率が1%ぐらいまでに減少し、また核型異常の発生頻度が高くなる。現在、ヒトES 細胞で用いられている継代培養法はいずれも多大な時間と労力が要求されるために細胞数の拡大には不向きな操作であり、ヒトES 細胞の使用範囲が限定されてしまう要因となる。そこでこのような一連の操作に対してより耐性を持ったヒトES 細胞株を樹立することにより、ヒトES 細胞の加工技術開発の発展に大きな貢献が期待できる。以下にその技術内容を記載する。

京都大学再生医科学研究所で樹立されたヒトES 細胞株の3種全てをコロニー形状から完全分離させ、フィーダー細胞上で培養を繰り返すことにより複数のサブラインを作製した。サブラインそれぞれの継代回数に対するクローニング効率と核型異常の有無との関連性について長期に渡り検討した結果、核型に異常は無くクローニング効率が5%未満である状態が一定期間続いた後、正常核型を保持しながらもクローニング効率が約28%にまで上昇した状態が続き、最終的には約55%まで上昇するが核型異常を認める状態に変化する、段階的な形質の変化が継代培養中に生じていることを発見した。この成果を基に、正常核型を保持しながらもクローニング効率が上昇

した状態が長期的(約20継代)に継続されるサブラインを特定し、単離することに成功した。このサブラインの有用性を評価するため、親株とサブラインの倍加時間を測定して増殖効率を計測した結果、サブラインは親株に対して5倍の速度で拡大増殖することが判明した。

単離されたサブラインがES細胞としての特性を維持しているのかを検証するために、未分化状態の維持と多分化能の保持を評価した。未分化指標であるOct-3、SSEA-3、SSEA-4、TRA、NANOGの抗体を用いて免疫蛍光染色を施した結果、全抗体に対して陽性反応を示した。また別の未分化指標であるアルカリホスファターゼ活性を調べた結果でも陽性反応を示したことから、クローニング効率が良いサブラインは未分化状態を親株と同等に維持していることが確認できた。次に、サブラインの多分化能を調べるために胚様体の作成とテラトーマ作成による評価を行い、外胚葉、中胚葉、内胚葉いずれにも分化しうることを見出した。このようにサブラインはES細胞としての特性を損なわず、且つES細胞の加工技術に適した細胞株であることを見出した。この成果は国際誌Stem Cell 24, 2649-2660 (2006)に掲載された。

今後はクローニング効率の上昇に寄与した因子を探索し同定することで、ヒトES細胞の培養法の更なる改善を目指し、ヒトES細胞への加工技術をより簡便なものにしたい。

中間評価以後、使いやすいサブラインとその親株と間でマイクロアレイを行い、遺伝子発現の比較解析を進めた。さらに候補遺伝子を20個近くまでしぼることに成功した。この中でいくつかの遺伝子についてRNA干渉を用い、ヒトES細胞における機能解析を行った。

ウ. 導入遺伝子の効率的発現に向けた技術開発

ヒトES細胞における遺伝子導入法が我々のグループで大きく前進しているが、依然として遺伝子導入安定株の得られる率は低い。導入遺伝子が複数に及ぶ場合は、遺伝子導入を何段階も行う必要が生じ、時間的にもコスト的にも大きな壁となる。同一プロモーターで複数の遺伝子を発現させる場合、単一のプロモーターが複数の遺伝子を発現できるシステムの開発ができれば時間的な節約となり、またコストの削減にもなる。実際、単一の転写単位から2種類以上の遺伝子産物を作る方法としてIRES (internal ribosome entry site)がよく用いられている。しかしながらES細胞ではIRESが効率よく機能せず、下流側の遺伝子産物の産生効率が非常に悪いことが知られており、これに代わる方法の開発が必要と考えられてきた。そこで我々はヒトES細胞においても単一の転写単位から効率よく複数の遺伝子産物の産生を可能とする2Aベクターの開発を進めている(図3)。詳細な検討が必要であるが、現時点では当初の期待通り、ヒトES細胞でも2AがIRESよりも効率よく働くことを見出している。

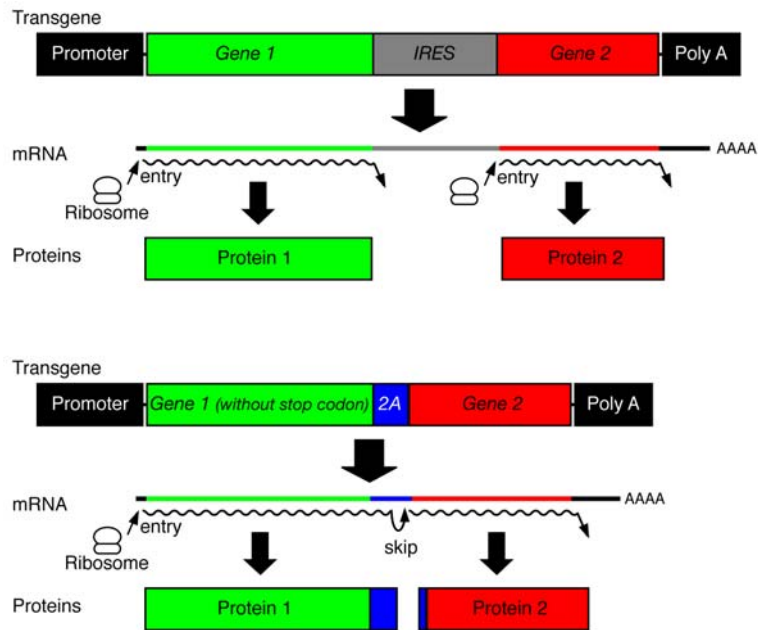


図3 IRESと2Aによる遺伝子発現システムの違い

エ. 導入遺伝子発現制御技術の開発

導入遺伝子の発現制御システムとして、Cre-loxP、ER(エストロゲンレセプター)、Tet-On/Offシステムなどが挙げられる。これらの中で可逆的にさまざまな遺伝子発現をOn/OffできるTet-On/Offシステムでの遺伝子発現制御を目指した。霊長類ES細胞を用いたTet-On/Offによる遺伝子発現制御の成功は世界ではじめてであり、その成果は国際誌Stem Cells 24, 2566-2572(2006)に掲載された。またヒトES細胞においても同様なシステムの開発に成功し、現在詳細な解析を積極的に進めている。以下にその技術内容を記載する。

ヒトES細胞におけるTet-On/Offシステムの開発に先だって同じ霊長類のカニクイザルES細胞株を用い検討を進めることにした。カニクイザルES細胞株に、調節プラスミドを導入し、次に目的遺伝子(本検討ではEGFP)を入れた応答プラスミドを導入した。Tet-Off遺伝子発現制御系が機能しているかどうかは、テトラサイクリンの誘導体であるドキシサイクリン(Dox)によって、導入した遺伝子の発現を量的に調節できるかどうかで検討した。Tet-Off遺伝子発現制御系を導入したサルES細胞でも、ES細胞の特性を保持していること、またDoxにより未分化状態だけではなく、さらには胚様体(EB)やテラトーマなどの分化状態でもOn/Offの制御ができていることを確認した。さらに詳細な検討を進め、ES細胞から分化誘導した、外胚葉、中胚葉、内胚葉にいずれにおいても、このOn/Offの制御ができることを確認した(図4、5)。このことは我々の当面の標的細胞である、神経細胞(外胚葉)、心筋細胞(中胚葉)、肝細胞(内胚葉)での遺伝子発現制御技術に向け大いに期待できる結果である。

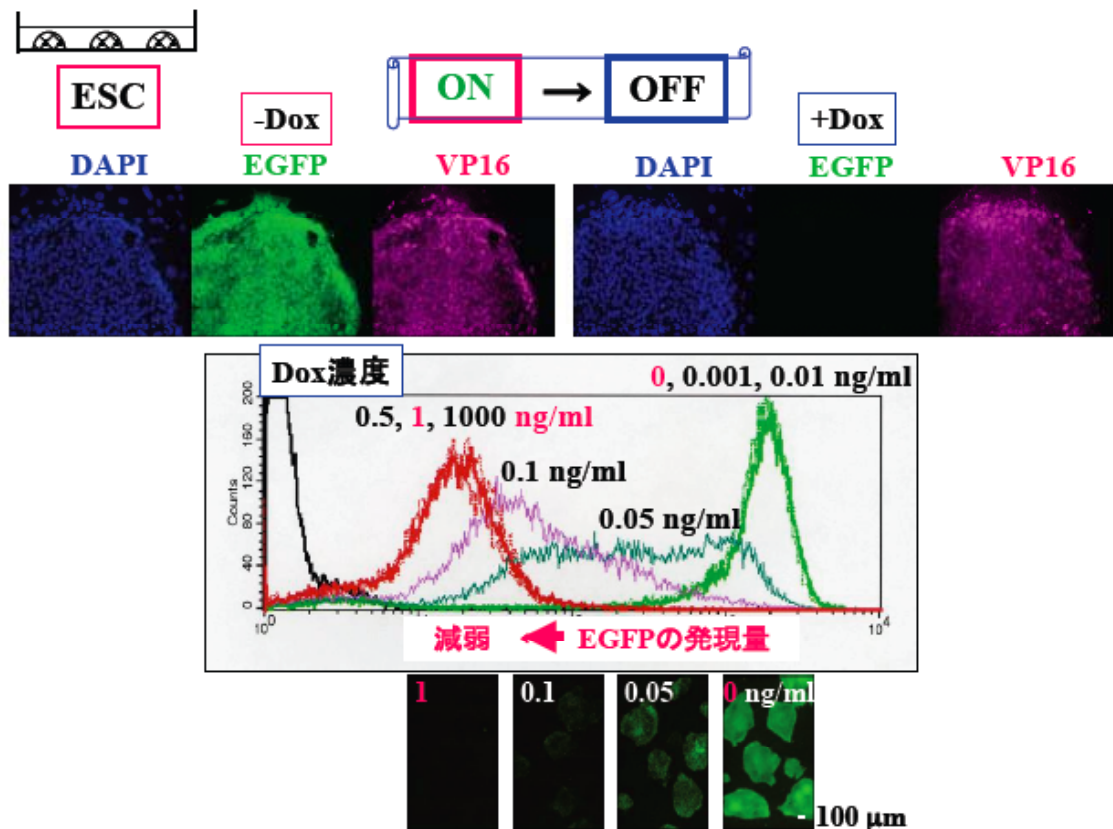


図4 カニクイザル ES 細胞での Dox による Tet-Off 発現制御(EGFP の発現抑制)
 培地中に Dox を添加することにより、EGFP の発現が抑制される。Dox は 0.05 ng/ml の濃度以上で効果が見られ、1ng/ml 以上の濃度では蛍光顕微鏡下で EGFP の発現は検出感度以下になった。Stem Cells 24, 2566-2572(2006)から引用。

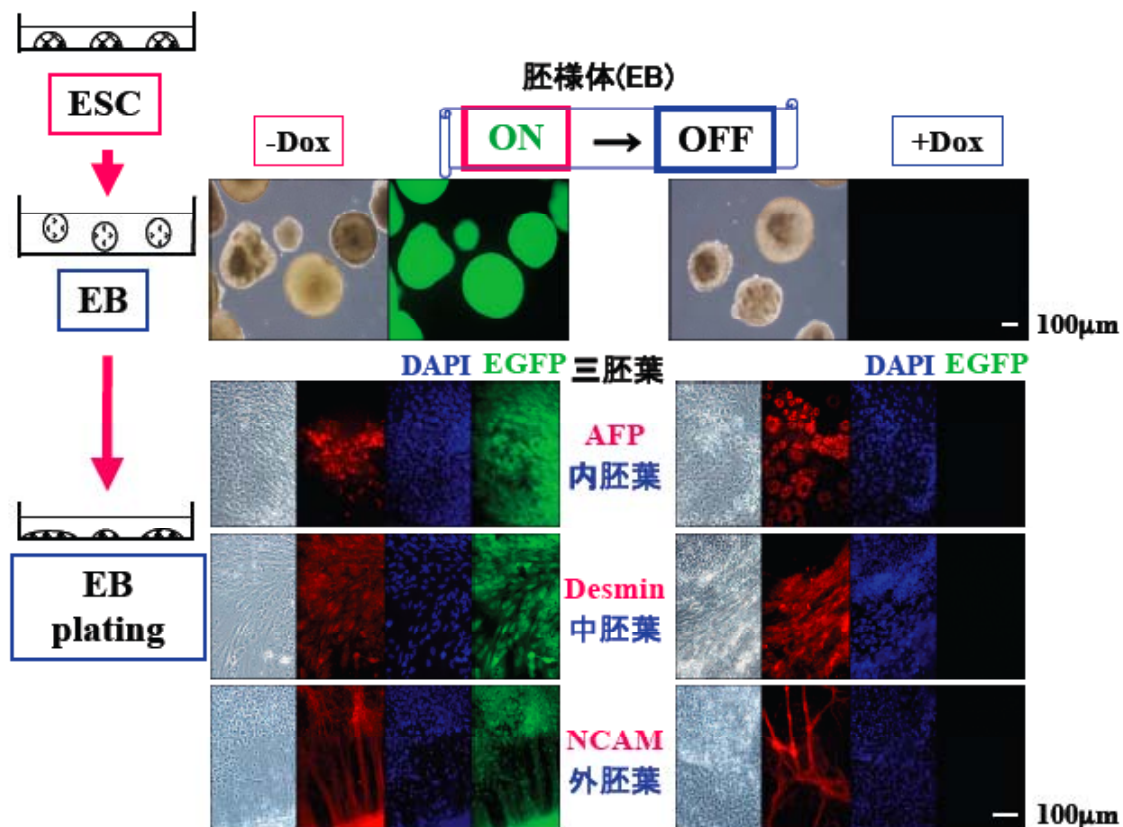


図 5 カニクイザル ES 細胞により分化誘導した、胚様体とさらに三胚葉分化した細胞における、Dox による Tet-Off 発現制御(EGFP の発現抑制)。胚様体及び三胚葉(外胚葉、中胚葉、内胚葉)に分化した細胞においても、Dox による Tet-Off 発現制御が機能し、EGFP の発現が抑制された。Stem Cells 24, 2566-2572(2006)から引用。

カニクイザルES 細胞株でのこれら培った経験と、ヒトES 細胞における遺伝子導入法の検討での結果を組み合わせ、ヒトES 細胞でも調節遺伝子導入細胞株の樹立ができた。今後詳細な解析を進め、同システムの確立を目指す。

上記で述べたように中間評価後、カニクイザル ES 細胞での検討を進めると同時に、その中で培った経験を生かし、ヒト ES 細胞株を用いて検討を行い、KhES-1 においては、Tet-On 遺伝子発現制御系を導入した正常染色体を有するヒト ES 細胞株を樹立することに成功した。

Tet-On 遺伝子発現制御システムをヒト ES 細胞で構築する場合、本プロジェクトを進める上で、確認すべき事項としては、(1)ヒト ES 細胞の未分化状態とそこから分化誘導した細胞の両方でこのシステムが働くか、(2)特定遺伝子の発現を制御することで、ヒト ES 細胞からより効率的に分化誘導を進められるかである。この両者が達成されることにより、創薬基盤研究のためのヒト ES 細胞由来の分化細胞の作出を前進させることが期待できる。前者においては、GFP というレポーター遺伝子を導入することによりカニクイザル ES 細胞株を用いて中間評価までで確認済みである、さらにヒト ES 細胞株でもその確認を行った。しかしながら、後者についてはまだ不明のまま

あった。そこで、まず特定の遺伝子を導入したヒト ES 細胞株を樹立し、その特定遺伝子を発現誘導させる系を確立した。さらに特定方向への分化誘導が可能かどうかの検討を行った。その結果、例えばある遺伝子(K)を誘導的に過剰発現することでヒト ES 細胞から神経及び腺上皮細胞への効率のよい分化誘導が可能であることを見出した(図 1)。このように後者の課題も達成することができた。

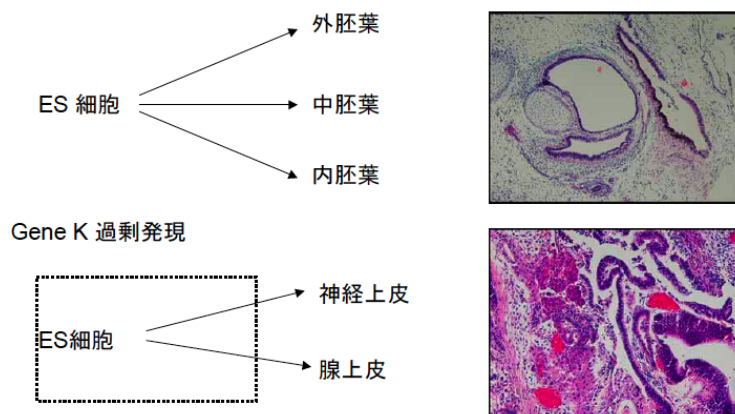


図 1 ヒト ES 細胞において遺伝子 K を過剰発現におけるテラトーマ形成。ヒト ES 細胞は、外胚葉、中胚葉、内胚葉とさまざまな細胞株に分化するが、遺伝子 K を過剰発現させることで神経上皮と腺上皮の特定方向に分化誘導させることができる。

② ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その2)幹細胞創薬研究所

細胞の分散方法、エレクトロポレーション時の細胞数、エレクトロポレーションのプログラム等を検討した結果、①イで樹立されたサブラインで1回の試行につき数百のコロニーが得られ、ヒトES細胞KhES-1でも1回の試行につき平均して数十のコロニーが得られるようになった。これは、遺伝子相同組換えの実験遂行に耐えうるだけの遺伝子導入効率といえる。

また、遺伝子導入を確認する手段として、これまでは専らネオマイシンによるセレクションが行なわれていたが、耐性遺伝子上流のプロモーターを工夫することで、ハイグロマイシンによるセレクションが可能であることを見出した。この成功は、複数の遺伝子の発現制御や、遺伝子置換の実験に応用できる。

③ ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その3)埼玉医科大学

以下に述べる各ベクター系において、一時的な遺伝子発現効率はGFP遺伝子をコードしたベクターを用いてGFPの発現をFACSで検出することによって解析した。また、染色体へのベクターの組み込みによる安定な遺伝子導入は、ネオマイシン耐性遺伝子をコードしたベクターを感染させた細胞におけるG418耐性コロニーの出現頻度によって検討した。

ア. ヘルパー依存型アデノウイルスベクター

我々はこれまでに、従来のアデノウイルスベクター上から全てのウイルス遺伝子を除いた、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを開発した。この改良型ベクターは、従来のアデノウイルスベクターと比べると、細胞毒性が低く挿入可能なDNAのサイズが36 kbと大きい(従来型ベクターでは8 kb)。また、現在用いられているヒト5型アデノウイルス由来のアデノウイルスベクターは、ウイルス受容体であるCARの発現が低い細胞への遺伝子導入は困難であった。そこで、その欠点を克服するために、ベクターの構造の一部をCD46を受容体として感染する35型ウイルスに変えたヘルパー依存型アデノウイルスベクターを開発した。

まず、高感度型GFP遺伝子を発現する5型もしくは35型由来のヘルパー依存型アデノウイルスベクターを産生し、カニクイザルES細胞(CMK6)における一過性遺伝子導入効率について比較した。その結果、5型と35型のどちらの血清型のベクターを使用した場合もほぼ同等の効率を示し、生細胞中最大80%以上の細胞での遺伝子発現に成功した。これらベクター感染細胞では未分化性が維持されていた。また、遺伝子発現を経時的に調べたところ、ベクター感染2日後にGFP発現は最大となり、その後発現が低下することがわかった。このベクターはネオマイシン耐性遺伝子もコードするため、薬剤選択によって安定な遺伝子導入効率も測定したところ、染色体に組み込まれる効率は 5.0×10^4 個の感染細胞あたり1個(細胞あたり 2.0×10^{-5})と低かった。

カニクイザルES細胞で得られた結果をヒトES細胞(①イで樹立されたサブライン)で再現するため、同様の実験によって一過性遺伝子発現効率を検討したところ、生細胞中最大98%もの細胞で遺伝子発現を確認した。この効率は一般的な遺伝子導入試薬を使用した場合(40-50%)に比べ高効率であった。また、KhES-1サブライン株とKhES-3株の両方で同様の効率が得られ、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターの汎用性が示された。これまでに他グループにより、従来のE1欠損型と呼ばれるアデノウイルスベクターを用いた場合に、一過性の遺伝子導入効率が11%であることが報告されているが、細胞毒性の低いヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いたことにより、それと比べて数倍の高効率での遺伝子導入に成功したことになる。これらの研究成果は国際誌 *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 13781-13786 (2008) に掲載された。また、ヒトiPS細胞への応用を検討したところ、生細胞中最大92%の細胞で遺伝子発現が見られ、ヒトES細胞の結果がそのままヒトiPS細胞へと反映される事が示唆された。

イ. アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター

AAVウイルスベクターについては、従来用いられている2型の血清型(AAV2)由来のベクターのみならず、計10種類の血清型由来のベクターを網羅的に比較した。これらの異なる血清型由来のベクターは細胞表面上の異なる受容体タンパク質に結合して細胞に感染するが、霊長類ES細胞においてどの血清型が最も感染効率が高いかについては、これまでは詳細な解析はなされていなかった。

まず、GFPをコードするベクターを用いてカニクイザルES細胞を感染させた結果、至適の血清型由来のベクターで最高約30%の細胞への遺伝子導入に成功した。その一方、染色体への組込み頻度をネオマイシン耐性遺伝子をコードするベクターを用いて比較検討した結果、最高でもその頻度は 6.0×10^3 個の感染細胞あたり1個(細胞あたり 1.7×10^{-4})と低い値であった。

ヒトES細胞 (KhES-1サブライン)においては、最適な血清型のベクターを用いて細胞当たり20000ウイルス粒子の濃度で感染させた場合に感染細胞の68%、60000ウイルス粒子で80%という高い一過性導入効率を達成した。一方、KhES-3株においては、同量のベクターを用いても最高25%程度の遺伝子導入効率であり、AAVによる遺伝子導入効率はヒトES細胞株間で大きく異なる事が示唆された。しかしながら、これらの結果は従来他グループにより報告されていた0.012%という効率に対して、1000-10000倍高い結果であり、これらの研究成果は国際誌 Biochemical and Biophysical Research Communications 388: 711-717 (2009) に掲載された。一方、染色体への組み込みについては、 4.5×10^3 個の感染細胞あたり1個(細胞あたり 2.2×10^{-4})の頻度であった。

ウ. レンチウイルスベクター

レンチウイルスベクターは、安定な遺伝子発現を得る目的で優れたベクターであり、得られる遺伝子発現の大部分は宿主染色体に組み込まれたベクターに由来する。また、ウイルスを産生する時に異なるウイルス由来のエンベロープ遺伝子を発現することにより、様々な感染能を示すベクターを調製することが可能である。そこで、HIV-1由来レンチウイルスベクターを用いて、カニクイザルES細胞とヒトES細胞に対して多様なエンベロープを網羅的に比較した。用いたエンベロープは、レトロウイルス由来、水疱性口内炎ウイルス由来、バキュロウイルス由来、狂犬病関連ウイルス由来、リンパ球系脈絡髄膜炎ウイルス由来等の計10種類である。その結果、カニクイザルES細胞では、最も効率の高いエンベロープで15%、その他4種類のエンベロープにおいても、1-5%の細胞で安定に遺伝子発現を得ることが可能であった。

HIV-1由来ベクターは、カニクイザル細胞では内在性のTRIM5 α 遺伝子により感染効率が落ちることが知られている。我々は、siRNAを用いてカニクイザルES細胞のTRIM5 α 遺伝子をノックダウンすることにより、ベクター感染効率が2倍程度上昇することを確認した。ヒトES細胞ではこの種間の制限がないため、実際に、ヒトES細胞においてはサルES細胞を用いたときよりも全般的に高頻度に遺伝子導入が可能であった。さらに超遠心法により濃縮したウイルス液を用いることにより、平成19年度の間評価までに49%の感染細胞で安定に遺伝子発現を得ることに成功した。また、エンベロープによってはマウス細胞に感染しないため、マウス由来のフィーダー細胞上でヒトES細胞のみに選択的に遺伝子導入が可能となることが示唆された。

平成 21 年度までに最終目標を達成するため、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入効率方法の更なる至適化を試みた。この結果、プロモーターは EF-1 α が一番発現強度が高く、エンベロープは VSVG とバキュロウイルス gp64 の 2 種類が最も遺伝子導入効率が高かった。これらの組み合わせにより、細胞当たり 300 ウイルス粒子の濃度で感染させた場合に、ヒト ES 細胞株 (KhES-1 サブライン)で最高 76%の遺伝子導入効率を得ることが出来た。また、ヒト iPS 細胞への応用を検討したところ、至適条件下で最大 95%の細胞で遺伝子発現が見られ、ヒト ES 細胞の結果がそのままヒト iPS 細胞へと反映される事が示唆された。

(4) 目標の達成度と意義

① ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その1)京都大学

本項目において、当チームは総括すると当初の計画は十分に達成されたといえる。初年度の平成17年度は本プロジェクトが7月27日よりスタートしたこともあり、遺伝子導入法の検討に焦点をあてて検討することになっていた。しかし平成18年度に開始予定であった遺伝子発現制御技術の開発、具体的にはTet-On/Off システムの開発を前倒して開始することができ、さらにそれにおいても成果を収めることができた。また平成18年度には加工技術に適したヒトES細胞株(使いやすいサブラインの樹立)というややチャンレンジ的なプロジェクトを開始したが、それについても研究成果を収めることができています。この勢いは平成19年度にも継続されており、本年度は既に同一プロモーターによる複数の遺伝子発現制御の開発をIRES 以外のシステムにおいても成果を上げてきている。さらに中間評価以後も確実に成果を上げています。

今回の成果を国際的なレベルで位置づけると、本プロジェクトが開始時点では世界的に行われていたレンチウイルスによる遺伝子導入法では遺伝子導入効率がよいものの、サイレンシングの問題が従来の方法に比べてさらに大きく、導入遺伝子の安定細胞株の樹立という側面では期待していたほど効果が得られていない。リポフェクション試薬を用い展開を進めているヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発については世界的にトップランクの位置を維持しており、その成果はいくつもの国際誌に掲載されていることで実証されている。

② ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その2) 幹細胞創薬研究所

計画通り終了した。エレクトロポレーション法によるヒトES細胞への遺伝子導入に成功したことは、相同組換えへの応用を視野に入れた場合、非常に強力な手段を手に入れることができたといえる。且つ、ネオマイシンだけでなくハイグロマイシンによるセレクションが可能であることを見出したことにより、複数の遺伝子カセットを細胞内に導入することが可能となっただけでなく、遺伝子置換の基盤技術が確立された。

③ ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発(その3) 埼玉医科大学

これまでに報告されていないスケールで、多様なアデノウイルスベクター、AAVベクター、レンチウイルスベクターを網羅的に比較することにより、過去に他グループにより報告されているよりも高い効率で遺伝子導入効率を得ることが出来、平成19年度の中間目標を計画通りに達成した。すなわち、一過性の遺伝子発現においては、目標とした効率である数十%に対し、アデノウイルスベクターとAAVベクターでそれぞれ98%と80%の高効率を達成した。安定な遺伝子導入に関しては、 10^7 個の細胞あたり数十個($\sim 0.01\%$)までに改善する目標に対し、レンチウイルスベクターで49%の効率を達成した。特に、ヒトES細胞で約100%の効率で一過性の遺伝子発現を達成した報告は本研究が世界で最初であり、最終目標も達成できた。レンチウイルスベクターを用いた安定な遺伝子導入効率に関しても、ヒトES細胞で最高76%、ヒトiPS細胞で最高95%の効率を示し、最終目標を達成した。さらに、複数のヒトES細胞及びヒトiPS細胞でも同様の効率で一過性及び安定遺伝子発現が見られ、ウイルスベクターを使用した本技術の汎用性が証明された。また、本プロジェクトでの研究成果がそのまま今後ヒトiPS細胞を用いた研究へと応用可能である事も示唆された。

高効率の一過性もしくは安定に遺伝子を導入するベクター系を確立したことによって、本プロジェクトの他グループによって開発された遺伝子発現調節法や分化誘導法へと応用可能になった。

実際に、肝細胞への分化誘導を増進する候補遺伝子 (HNF1 α 、HNF4 α 、LAP)及び阻害する候補遺伝子 (LIP) を発現するアデノウイルスベクターをそれぞれ作製し、熊本大学条グループと連携し共同研究を行なった。このように本プロジェクト内の他グループの研究に貢献できた。

2. 1. 2 ヒトES細胞における相同組換え技術の開発

京都大学

共同実施: 幹細胞創薬研究所

埼玉医科大学

(1) 事業目的と背景

遺伝子相同組換え技術とは、細胞が持つゲノム遺伝子のうち、狙った部位の遺伝子を改変する技術のことである。これは、単に遺伝子を導入してそれを一過的に発現させたり、或いは、ゲノム領域に無作為に遺伝子を組み込んだりすることよりも遥かに難易度が高い。ヒトES 細胞に対する遺伝子相同組換えはいくつか報告があるものの、あくまでそれは偶然の産物であるようだ。世界中で多くの研究者やグループがヒトES 細胞に対する遺伝子相同組換えの追試を試みているものの、成功したという報告は学会レベルでさえ殆ど聞かない。とはいえ、世界中で多くの研究者やグループが試みているということからも容易に推測できるように、ヒトES 細胞への相同組換えに対するニーズは非常に大きい。理由は主に3つである。1つは、サイレンシングの心配が少ないということ。ゲノム領域に無作為に遺伝子を組み込む方法だと、組み込まれた領域によっては、その領域の影響を受け、転写が起こらないことがある。これをサイレンシングという。ヒトES 細胞への遺伝子導入では、理由はよく分かっていないが、サイレンシングを起こしやすいということが知られている。遺伝子相同組換え技術が確立されれば、サイレンシングが起こらないことが知られている領域に遺伝子を挿入でき、サイレンシングの問題が回避できる。2つ目は、予期せぬ遺伝子の異常な制御が起こりにくいということ。無作為に遺伝子が組み込まれた場合、もともとその領域が持っていた機能を壊すことになり、場合によっては細胞の癌化が惹起されることが報告されている。遺伝子相同組換え技術が確立されれば、機能を失っても問題ないことが知られている領域に遺伝子を挿入でき、予期せぬ遺伝子の異常な制御は起こらないはずである。3つ目は、遺伝子のノックアウト技術につながるということ。マウスES 細胞では日常茶飯事で行なわれている遺伝子のノックアウトだが、ヒトの細胞では報告がない。これはとりもなおさず、ヒトES 細胞での遺伝子相同組換えが成功していないことの証である。ヒトES細胞の遺伝子の両アレルへの相同組換えができれば、ヒト細胞のノックアウトも可能となるはずだ。

当プロジェクトでは、前段落で3つ挙げた理由のうち2つ、“サイレンシングの回避”と“予期せぬ遺伝子の異常な制御の回避”を可能とするため、常にオープンであり、ヘテロノックアウトをしても正常であることが知られているHPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) 遺伝子座を第一の標的として研究を行なっている。

さらにHPRT遺伝子座での遺伝子相同組換え技術開発が確立を進展させ、このHPRT遺伝子座へのレポーター遺伝子の導入あるいは遺伝子発現制御システムの開発を目指したい。また、HPRT以外の遺伝子座においても遺伝子相同組換え技術が可能かどうかの検討をおこなう。

(2)事業内容と目標

① ヒトES細胞における相同組換え技術の開発(その1)京都大学

マウスES細胞における相同組換え実験では、リポフェクション法よりもエレクトロポレーション法がよく用いられており、実績もある。そこで中間目標としては、エレクトロポレーションをはじめとするヒトES細胞での相同組換え技術の基盤づくりに目処をつける、また最終目標としてはヒトES細胞の分化誘導制御技術開発、研究用モデル細胞の構築技術の開発に有益な遺伝子での相同組換えヒトES細胞を構築する。

② ヒトES細胞における相同組換え技術の開発(その2)幹細胞創薬研究所

中間目標:

ヒトES細胞の加工技術開発に目処をつける。即ち、ヒトES細胞に対する相同組換えが可能かどうかを判断する。“事業目的と背景”にも記載したように、これまでもヒトES細胞への遺伝子相同組換えに成功したとの報告があるにはあるが、それらは全て単発で、偶然の産物に過ぎないようだ。そのため、複数回のトライアルで相同組換えが確認されるかどうかを見極めることができれば尚望ましい。そして相同組換えに成功したならば、組換え体を増幅、保存して、組換え体を有効利用するための体制を構築する。“事業目的と背景”にも記載した理由で、標的はHPRT遺伝子座とする。

最終目標:

本プロジェクトにとって有用な遺伝子組換えヒトES細胞を少なくとも1つ以上樹立する。目標達成のため、2つの手段を考案している。1つは、HPRT遺伝子座が組み換わったヒトES細胞の、組み換わった部位に望みの遺伝子カセットを置換できるシステムを構築し、このシステムを利用するものである。中間目標のための研究でも、このシステムに適合しうる形の遺伝子相同組換えを試行している。もう1つは、内在プロモーターの下流に望みの遺伝子カセットをノックインする方法である。

③ ヒトES細胞における相同組換え技術の開発(その3)埼玉医科大学

現在、ヒトES細胞における相同組換えについては論文2報しか報告がなく、これらの報告では、他の細胞種と同様エレクトロポレーションもしくはリポフェクションが用いられている。物理的もしくは化学的な遺伝子導入法と比較して、ウイルスベクターはウイルスの細胞侵入メカニズムを利用して細胞表面のウイルス受容体を介して細胞内に侵入するために、多様な細胞種で細胞の数を問わず高い効率を示し、特にヒトES細胞のような物理的に弱い細胞には適していると考えられる。我々はこれまでに、マウスES細胞においてヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いて高効率の相同組換えを達成した。そこで本研究では、ヒトES細胞に対して高い効率で相同組換えを得

る方法論を確立する目的で、アデノウイルスベクター、AAVベクターならびにレンチウイルスベクターを比較する。

中間目標:

主にカニクイザルES細胞を用いて相同組換えの実現化を目指し、疾患モデル細胞構築技術の基盤を確立する。

最終目標:

カニクイザルES細胞を用いて得た知見をヒトES細胞に応用し、より簡便に相同組換えを得る方法を確立し、特定の遺伝子座を標的としてマーカー遺伝子を組み込んだアッセイ細胞や遺伝子をノックアウトした疾患モデル細胞を創製する。

(3) 研究成果

① ヒトES細胞における相同組換え技術の開発(その1) 京都大学

ア. 相同組換えベクターの作製の検討

マウスES細胞における相同組換え体の作製において、様々なポジティブ選択用の遺伝子発現カセットとネガティブ選択用のカセットが用いられる。そこで、ヒトES細胞用の相同組換えベクターを作製するにあたって、これらの遺伝子発現カセットのヒトES細胞における効果の検討を行った。ポジティブ選択用カセットとして、ネオマイシン耐性カセット、ハイグロマイシン耐性カセット、ピューロマイシン耐性カセットを検討し、それぞれヒトES細胞における薬剤選択の至適薬剤濃度を決定した。ネガティブ選択用カセットとしてはチミジンキナーゼ発現カセット、ジフテリアトキシンA断片発現カセットを検討した結果、チミジンキナーゼ発現カセットに適したガンシクロビル濃度を見出すことに成功したが、ジフテリアトキシンA断片は細胞毒性が高く適していないことが判った。これらの結果をもとに、サルES細胞及びヒトES細胞から単離したHPRT遺伝子断片を選択用カセットと組み合わせ、相同組換えベクターを作製した。

イ. 相同組換えに向けた遺伝子導入法の検討

マウスES細胞における相同組換え実験では、リポフェクション法よりもエレクトロポレーション法がよく用いられており、実績もある。そこで、ヒトES細胞におけるエレクトロポレーション法の確立を目指し、種々の条件を決めることに成功した。

京都大学再生医科学研究所では最適化したリポフェクション法とマウスES細胞でよく用いられているエレクトロポレーション法と用い、遺伝子相同組換え技術を開発する計画であったが、中間評価時点で幹細胞創薬研究所及び埼玉医科大学では既にHPRT遺伝子座において遺伝子相同組換えに成功したことから、これらの技術を導入し、それをさらに発展させることという計画の変更を行った。特定非営利活動法人幹細胞創薬研究所で用いられているエレクトロポレーション法を用い、さらに改良することでHPRT遺伝子での遺伝子相同組換えについて成功をした(表1)。

表1に示したように使用したヒト細胞株の違い、またターゲティングベクターのコンストラクトの違いもあるが、ヒト ES 細胞における相同組換えにはじめての成功が発表された Nature Biotechnology の 2003 年の論文と遜色のないあるいはそれ以上の成功率で相同組換え体を作成することに成功した。また 3 つのプロトコールを比較し、効率が大きく異なることを見出した。さらに得られた5細胞株について、染色体解析を行い、正常な染色体をもつものがほとんどであり本研究目的に問題はないが、一部では変異が起こっている細胞も含んでいることから、定期的に染色体解析を行う必要性もあることを見出した(表 2)。さらに KhES-1 ヒト ES 細胞株以外でも成功し、ヒト iPS 細胞でも HPRT 遺伝子での遺伝子相同組換えに成功した。ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞とよく性質が似ていることが知られており、ヒト ES 細胞で培った技術は、ヒト iPS 細胞にそのまま適用できるということを研究成果として見出すことに成功した。

Exp. No.	locus	Insert	Cell line	cells	stable	HR	HR/stable (%)	HR/cells
Nature Biotech.	HPRT	tk-neo	H1.1	1.5E+07	350	7	2.00	4.67E-07
	Oct3/4	IRES-neo	H1.1	1.5E+07	103	28	27.18	1.87E-06
Total	HPRT	PGK-neo	KhES1	4.4E+07	239	5	2.09	1.14E-07
Protocol 1	HPRT	PGK-neo	KhES1	2.2E+07	68	0	0	0
Protocol 2	HPRT	PKG-neo	KhES1	2.2E+07	171	5	2.92	2.27E-07
Protocol 3	HPRT	PKG-neo	KhES1	2.2E+07	238	7	2.94	3.18E-07

表1 ヒト ES 細胞における相同組換え効率

細胞株	核型	染色体数									合計	正常率
		42	43	44	45	46	47	48	49	50		
KHES1-HPRT36	XX		1	1	1	26	3				32	81%
KHES1-HPRT133	XX		1		2	36	1				40	90%
KHES1-HPRT150	XX			2	1	34	1				38	89%
KHES1-HPRT171	XX				2	37					39	95%
KHES1-HPRT204	XX				5	31	1				37	84%

表2 得られた相同組換え体における正常染色体の占める割合

ウ. HPRT 以外への遺伝子相同組換えに関する検討

HPRT 遺伝子以外のいくつかの遺伝子をターゲットとしてベクターの構築を行った。

② ヒト ES 細胞における相同組換え技術の開発(その2)幹細胞創薬研究所

ア. 技術革新

遺伝子相同組換えは非常に稀にしか起こらない現象であるが、それ以上に、相同組換えを試行した際の細胞の致死率が高いことや、相同組換えが起こったかどうかを判定することに多大な時間と労力を浪費することが、相同組換え体の取得を困難にしている。これらの問題点を克服するため、a. エレクトロポレーションによる遺伝子導入方法の改良と、b. スクリーニングシステムの改善を行なった。

a. エレクトロポレーションによる遺伝子導入方法の改良

ウイルスを使用しない遺伝子導入方法にはエレクトロポレーションとリポフェクションの2つがあるが、遺伝子導入後の相同組換えは、前者の方が遥かに効率良く起こることが知られている。しかし、霊長類 ES 細胞はエレクトロポレーションの電氣的刺激に弱く、従来法では遺伝子導入されたクローンを僅かしか得ることができなかった。この問題を解決するため、エレクトロポレーションに関する種々の条件を検討したところ、遺伝子導入されたクローンを従来法より 10 倍以上多く獲得する条件を見出すことに成功した。

b. スクリーニングシステムの改善

従来のスクリーニングシステムだと、コロニーの出現からファーストスクリーニングまでに 3 週間かかる。このため、スクリーニングまでの培養に多大な労力と費用が必要となり、これがボトルネックとなって、相同組換えのトライアルを数多く行なうことが不可能であった。この問題を解決するため、コロニーをピックアップする際に、そのコロニーの一部からスクリーニングのための PCR に使用しうるゲノム DNA を迅速に抽出する方法を確立した。同時に、コロニーの一部から抽出したゲノム DNA という僅かなテンプレート量でも、長距離の PCR を可能とする方法を確立した。これらの方法を用いることで、これまで 3 週間かかっていたファーストスクリーニングまでの期間を 10 時間にまで大幅に短縮でき、費用面からも、スクリーニングに掛かる費用だけをとっても年間約二千万円と試算されていたものが、多く見積もっても年間約五万円程度で済むようになった。これにより、トライアルを数多く行なうことが可能となった。

イ. HPRT 遺伝子座への相同組換え

アで確立された技術を基盤とし、常にオープンである HPRT 遺伝子座を標的として遺伝子相同組換えを試みた。その結果、ヒト ES 細胞 KhES-1 で 6 クローンの相同組換えを確認し、うち 5 クローンの増幅・保存に成功した(残り 1 クローンは継代時に死亡した)。“事業内容と目標”の中間目標にも記述したように、複数回のトライアルで相同組換えが起こったのならそれは更に望ましいのだが、確認された 6 回の相同組換えは、計 4 回のトライアルで起こったものであり、我々の行なった相同組換えが偶発的なものではないことが示された。相同組換えが起きた確率はヒト ES 細胞 KhES-1 で 1.42% である。この数字は、世界的な状況を鑑みると非常に高い確率だと考えられ、ヒト ES 細胞に対する相同組換えの実用化の目処が立ったといえる。また、2. 1. 1 で樹立さ

れた“加工技術開発に適したヒト ES 細胞株のサブライン”でも 0.89% の組換え効率を達成している。更に、サル ES 細胞 (CMK6) でも 1.34% の相同組換え効率を達成しており、世界で初めてサル ES 細胞への相同組換えに成功した。これらの事例からも、我々の確立した遺伝子相同組換え技術が優れていることが示されたといえる。各々の細胞における相同組換え試験の結果を以下

に	ES細胞株	No. of G-418 resistance	No. of homologous recombination	Efficiency(%)
	ヒトES細胞KhES-1	424	6	1.42
	ヒトES細胞サブライン	336	3	0.89
	サルES細胞CMK6	969	13	1.34

ウ. ベクター構築

ベクター構築は、マウス ES 細胞に対する遺伝子相同組換えと同様の戦略を用いて行なった。即ち、標的とする部位 (HPRT) 近傍のゲノム DNA 配列を両側に持ち、間にセレクションカセットを挟むというものである。セレクションカセットにはネオマイシン耐性カセットを用いた。また、ネオマイシン耐性カセットが外部の影響を受けないようにするため、カセットの両脇に insulator を挿入した。更に、“事業内容と目標”の最終目標で記述したように、HPRT 遺伝子座に望みの遺伝子カセットを置換できるようにするため、ネオマイシン耐性カセットの両側には LoxP を配し、更に下流側の LoxP の下流には、メチオニンを含まないハイグロマイシン耐性遺伝子を挿入している。このベクターが目論見通り HPRT 遺伝子座に相同組換えされれば、その組み換わった部位に望みの遺伝子を置換することができ、且つ置換されたものだけがネオマイシン耐性からハイグロマイシン耐性に変化する(図1参照)。このシステム確立のための基盤となる一連のベクターを構築した。

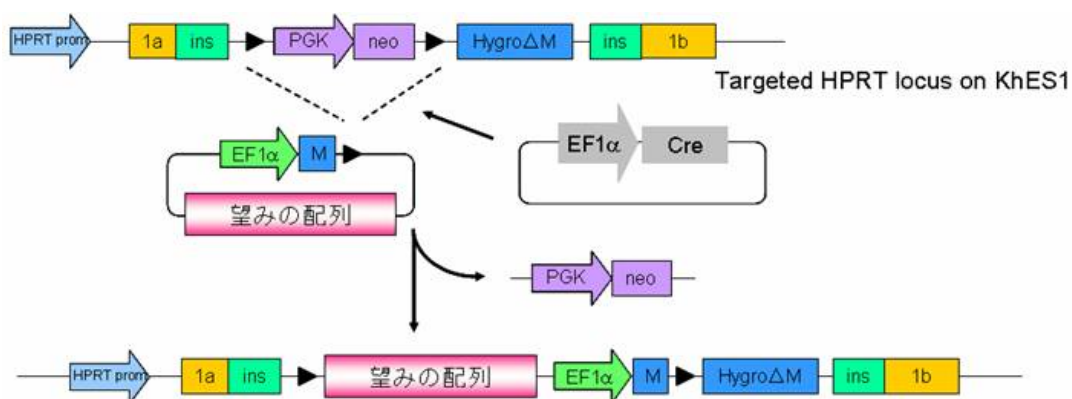


図 1

エ. 遺伝子置換

項目ウで作製したベクターを用いて、高効率で HPRT 遺伝子座に好みの遺伝子を挿入する遺伝子置換の技術を確認した。詳細は、Nucleic Acids Research, doi:10.1093/nar/gkp1234 に記載されている通りだが、図1中の“望みの配列”に CAG-EGFP 配列を用いた場合、出現したハイグロマイシン耐性クローンを 186 クローン調べたところ、186 全てのクローンが EGFP の蛍光を発していた。同時に、そのうち 80 クローンについてネオマイシン耐性を失っているか調べたところ、80

全てのクローンがネオマイシン耐性を失っていた。このことから、遺伝子置換を起こしたクローンを100%という高い効率でセクションすることができ、且つ、この方法で HPRT 遺伝子座に挿入された遺伝子はサイレンシングを受けにくいことが分かった。また、この細胞を神経に分化させた場合でも EGFP の発現が維持されることも明らかとなっている。

更に、遺伝子置換を応用して、誘導的遺伝子発現システムである Tet-On システムを HPRT 遺伝子座単独で機能させることにも成功した。Tet-On システムには、rtTA 発現カセットと、TRE プロモーター支配下の ORF 配列が必要だが、これら2つをまとめて環状のプラスミドに搭載することで、HPRT 遺伝子座単独での Tet-On システムを構築した。

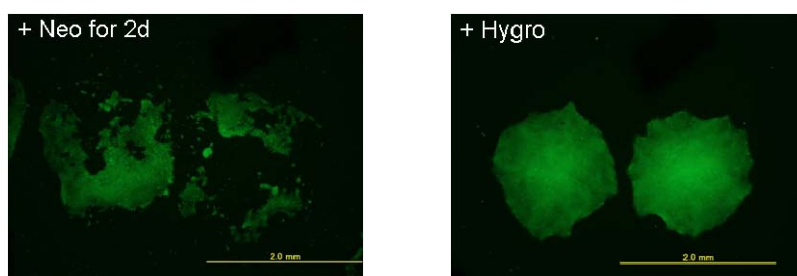


図 2

オ. HB9 遺伝子座への相同組換え

HB9 遺伝子は、運動神経特異的に発現する転写因子であり、運動神経マーカーとして一般的に知られている。HB9 遺伝子座は ES 細胞ではクローズドであるため、ここへの相同組換えは困難が予想されたが、本研究により、HB9 遺伝子座に対して EGFP をノックインした細胞株を取得した。ノックインのためのコンストラクトは HPRT 遺伝子座への相同組換えで用いたのと同様の戦略で、ターゲティングアームのみを替えて作製し、エレクトロポレーション後はネオマイシンとガンシクロビルとのダブルセクションで相同組換え体を得た。ジェノタイプングを行なった 136 クローンのうち、5 クローンについて相同組換えが確認され、3.68%の効率で相同組換え体をセクションすることができた。この成果により、運動神経を濃縮することが可能になると考えられ、神経変性疾患の治療薬開発を加速できると期待される。

③ ヒトES細胞における相同組換え技術の開発(その3) 埼玉医科大学

ア. ヘルパー依存型アデノウイルスベクター

はじめに、相同組換え技術を確立するためのモデル実験として、HPRT 遺伝子座ノックアウトカセットを組み込んだヘルパー依存型アデノウイルスベクターを作製し、ベクターをカニクイザル ES 細胞(CMK6)に感染させたところ、至適条件下では 3 個のネオマイシン耐性コロニーのうち 1 個が相同組換えにより HPRT が欠損した細胞であることを、6-チオグアニン耐性とサザンブロット法により確認した。このクローンが ES 細胞の未分化性を維持していることを、種々の未分化特異的マーカー遺伝子の発現で確認し、ヘルパー依存型アデノウイルスベクター感染により ES 細胞の本来持つ性質に影響を及ぼさない事を示し、中間目標を達成した。平成 19 年度以降には、カニクイザル ES 細胞での知見をヒトに応用するため、ヒト HPRT 遺伝子座ノックアウトカセットとネガティ

ブ選択マーカーHSV *tk* 遺伝子を組み込んだヘルパー依存型アデノウイルスベクターを作製し、ヒト ES 細胞を用いて同様の実験を行った。KhES-1 サブライン株を用いた実験では、ネオマイシン/ガンシクロビル二重耐性コロニー中最大 45%もの高効率(細胞あたり 2.7×10^{-6})で相同組換え体が得られた。ベクターDNA を感染ではなくエレクトロポレーションで細胞に導入した時と比較し、細胞当たりの相同組換え効率は約 300 倍近く高かった。また、KhES-3 から相同組換え体を得られ、複数の細胞株において応用可能であることを示した。これらの研究成果は国際誌 Proceedings of the National Academy of Sciences 105: 13781–13786 (2008) に掲載された。

次に、これまで確立した高効率相同組換え技術を用いて、*HPRT* 遺伝子座以外の分化特異的に発現する遺伝子座にヘルパー依存型アデノウイルスベクターを利用した相同組換えにより蛍光遺伝子を挿入する応用実験を進めた。具体的には熊本大学との共同研究で、肝細胞で特異的に発現するヒトアルブミン (*ALB*) 遺伝子座に蛍光遺伝子 mKO1 を組み込んだヒト ES 細胞株 (KhES-3 株)の樹立を、幹細胞創薬研究所との共同研究で、運動神経細胞で特異的に発現するヒト *HB9* 遺伝子座に蛍光遺伝子 EGFP を組み込んだヒト ES 細胞株を樹立する。これらのノックイン ES 細胞では特定細胞への分化を蛍光で容易にモニターできるため、分化誘導の条件検討に最適なアッセイ細胞の作製を試みた。ヒト *ALB* 遺伝子座ノックインカセットもしくはヒト *HB9* 遺伝子座ノックインカセットと HSV *tk* を組み込んだヘルパー依存型アデノウイルスベクターを作製し、KhES-3 に感染させたところ、ネオマイシン/ガンシクロビル二重耐性コロニー中それぞれ 90%、57%もの高効率で相同組換え体を得られた。この結果から、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いた相同組換えは ES 細胞では発現していない遺伝子座でも高効率で起こり、このベクターが様々な遺伝子座の相同組換えに応用可能であることが示唆され、最終目標を達成した。さらに、ヒト iPS 細胞でも同様の効率で相同組換え体を得られたため、本プロジェクトでの研究成果がそのまま今後ヒト iPS 細胞を用いた研究へと応用可能である事が示唆された。

これらの樹立した分化誘導アッセイ用ヒト ES 細胞について、未分化性・多分化能など ES 細胞としての基本的性質の維持を確認し、ヒト ES 細胞分配機関である京都大学に樹立した細胞株を寄託した。

イ. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター

カニクイザル *HPRT* 遺伝子座ノックアウトカセットをコードしたベクターを網羅的に比較した。その結果、 1.5×10^6 個の感染細胞あたり 1 個 (細胞あたり 6.7×10^{-7}) の頻度で相同組換え体を得て、中間目標を達成した。

ヒト ES 細胞 (KhES-1 サブライン) の *HPRT* 遺伝子座に対しても、同様のノックアウトカセットを持つベクターを用いて、 5.8×10^6 個の感染細胞あたり 1 個 (細胞あたり 1.7×10^{-7}) の頻度で相同組換えを得た。また、KhES-3 株やヒト iPS 細胞からもほぼ同様の効率 (染色体組み込みあたり約 1%、細胞あたり 5.3×10^{-7} ~ 7.0×10^{-6}) で相同組換え体を得られ、複数の細胞株において応用可能であることを示した。

次に、AAV を用いた相同組換え技術を更に改良し染色体組み込み当たりの効率を上げるため、*HPRT* 遺伝子座以外の ES 細胞で高発現している *NANOG* 遺伝子座に遺伝子が本来持つプロ

モーターを活用する『プロモータートラップ法』を利用した相同組換えによりネオマイシン耐性遺伝子を挿入する相同組換え実験を行なった。この結果、KhES-3 株の *NANOG* 遺伝子座に対して、染色体組み込みあたり 20%~87%の高効率で相同組換えに成功し、ES 細胞で発現している遺伝子座における相同組換えには AAV ベクターが非常に有効である事を示した。これらの研究成果は国際誌 *Biochemical and Biophysical Research Communications* 388: 711-717 (2009) に掲載された。

ウ. レンチウイルスベクター

細胞に感染するが染色体へ組み込まれない変異型レンチウイルスベクターにカニクイザル *HPRT* 遺伝子座ノックアウトカセットを組み込み、相同組換えの効率を検討した。その結果、 1.8×10^6 個の感染細胞あたり 1 個(細胞あたり 5.5×10^{-7})の頻度で相同組換えを得て、中間目標を達成した。

ヒト ES 細胞 (KhES-1 サブライン) の *HPRT* 遺伝子座に対しても、同様のノックアウトカセットを持つベクターを用いて実験を行なったが、相同組換え体は得られなかったため、更なる改良が必要である事が示唆された。

(4) 目標の達成度と意義

① ヒトES細胞における相同組換え技術の開発(その1) 京都大学

本事業項目において、京都大学では従来方法の踏襲とその発展的なアプローチにより、ヒトES細胞での相同組換え相同組換え技術を進めてきた。その中でヒトES細胞に適したポジティブ選択用の遺伝子発現カセットとネガティブ選択用のカセットを同定することができた。これらをもとに *HPRT* の遺伝子での相同組換え用のベクターの構築に成功した。

また、ヒトES細胞の未分化維持に不可欠な遺伝子のクローニングを行い、相同組換えベクターを作成中である。目標達成についてはほぼ計画通りであるが、中間評価時点で幹細胞創薬研究所及び埼玉医科大学は、現在までに偶然以外ではほとんど不可能と考えられていた霊長類ES細胞での相同組換えに成功したことから、リポフェクションを使って遺伝子相同組換え技術のさらなる開発を目指すのではなく、幹細胞創薬研究所あるいは埼玉医科大で開発された技術を京都大学でも導入し、さらなる技術開発を目指すという計画の変更を行った。実際、独自に工夫をすることで、より効率が上がり、複数のヒトES細胞で達成されただけでなく、ヒトiPS細胞においても遺伝子相同組換えが可能であることを示した。ヒトiPS細胞はヒトES細胞とよく似た性質を持つことが知られており、我々が培ってきたノウハウがヒトiPS細胞にそのまま適用できるということを示すことができた。

② ヒトES細胞における相同組換え技術の開発(その2) 幹細胞創薬研究所

計画通り終了した。当事業項目は、世界中の多くの研究者やグループがチャレンジしては失敗を繰り返し、結局為しえていなかったヒトES細胞への相同組換えにチャレンジし、相同組換えに成功すれば計画通り、成功しなければ計画を下回ったという位置付けになる。*HPRT* 遺伝子座への

相同組換え、遺伝子置換と、遺伝子置換を応用した単一遺伝子座におけるTet-Onシステムの構築に成功しただけでなく、ES細胞でクローズドなHB9遺伝子座への相同組換えにも成功した。

③ ヒトES細胞における相同組換え技術の開発(その3) 埼玉医科大学

試したすべてのウイルスベクターで相同組換えを達成し、少ない細胞数又は多様な細胞種で相同組換えを得るための基盤を確立し、平成19年度の間目標を計画通りに達成した。

特に、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターは1) 最も相同組換え効率が高い。2) 大きなDNAを導入可能であり、マーカー遺伝子のノックインなど、複雑なカセットを用いた相同組換えに適している。といった特徴を持つ事から、実際にこのベクターを用いて、ES細胞で発現しておらず、肝細胞で特異的に発現するALB遺伝子座に蛍光遺伝子mKO1のノックインと、運動神経細胞で特異的に発現するヒトHB9遺伝子座に蛍光遺伝子EGFPのノックインとに高効率で成功した(染色体組み込みあたり57%~90%)。これらのノックインヒトES細胞は、特定細胞への分化を蛍光で容易にモニターできるため、分化誘導の条件検討に最適なアッセイ細胞の創製に成功し、予定通り最終目標を達成できた。今後これらの樹立したノックインヒトES細胞を分配する事で、様々な使用機関でヒトES細胞からの肝細胞や運動神経細胞の誘導条件の検討を容易に行なえるようになる。また、本研究で確立した、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いた分化特異的遺伝子座へのマーカー遺伝子のノックイン技術を用いる事で、様々な分化誘導アッセイ細胞の創製が可能となり、ヒトES及びヒトiPS細胞を用いた分化誘導技術の開発へ大きく貢献できると思われる。

一方、ES細胞で発現している遺伝子座への相同組換えに対しては、作製が容易であるAAVベクターが非常に有効である事を示し、相同組換えの目的に応じて使用するウイルスベクターの種類を選択できる事が示唆された。

2. 1. 3 ヒトES細胞における RNA 干渉法による遺伝子発現制御技術の開発

京都大学

(1) 事業目的と背景

京都大学再生医科学研究所の山下潤助教授(現・准教授)のグループは、すでにマウス ES 細胞を用いて RNA 干渉法による遺伝子発現抑制技術の開発を平成 17 年度より開始している。テトラサイクリン誘導性 short hair-pin RNA (shRNA)発現系を用いて、ES 細胞分化途上の任意の段階において標的遺伝子の発現抑制を起こすことにすでに成功している。また、cre-loxP システムを導入して、簡便に標的 shRNA を変換できるシステムの開発を開始している。これをヒト ES 細胞に適用して方法を最適化し確立するための研究を行う。これによって、多数の内在遺伝子発現の抑制を網羅的に実施して解析することが可能になる。

(2) 事業内容と目標

平成 19 年度まで: 基本的技術を確立する。すなわち、細胞分化途上で遺伝子発現抑制(サイ

レンシング)を受けない部位への遺伝子導入ヒト ES 細胞株(テトラサイクリン誘導性発現制御遺伝子および shRNA 遺伝子発現株)の作製、Cre-loxP 手法によるタモキシフェン誘導性 shRNA 発現システムの作製、およびヒト ES 細胞分化途上における shRNA 発現とその効果の評価システム構築を行う。これらにより、ヒト ES 細胞分化過程においても簡便に遺伝子機能解析が可能な遺伝子発現制御システムを構築する。

平成 21 年度まで:さらに、遺伝子発現抑制と促進の両方を独立して制御可能なシステムを構築し、多彩な遺伝子発現制御により分化における遺伝子機能評価と新たな分化誘導法への応用を可能とすることを試みる。上記タモキシフェン誘導性 shRNA 発現システムとテトラサイクリン誘導性 cDNA 発現システムを組み合わせたノックダウン-レスキューシステムを新たに構築する。このように構築した RNA 干渉システムを用いて神経、心筋、肝細胞等の分化における機能遺伝子を複数同定する解析手法を開発し、創薬ターゲットの探索など創薬研究技術として確立する。

(3)研究成果

①テトラサイクリン誘導性 shRNA 発現 ES 細胞システムの構築

ア. 効果的に shRNA を発現し標的遺伝子発現を抑制するために以下の種々の方法を組み合わせ、ES 細胞分化における最適条件の shRNA 発現システムの構築を行った。

- ・ shRNA 発現プロモーター:テトラサイクリン制御性配列 tetO を有する U6 プロモーター及び tRNA バリンプロモーター
⇒ tRNA バリンプロモーターの方が、shRNA 発現活性がやや高かった。
- ・ shRNA 発現プラスミドの ES 細胞への導入:電気穿孔法による多コピーの導入及びマウス ROSA 領域への相同組換えによる単一コピーの導入
⇒ ROSA 領域への単一コピーの導入では、shRNA による遺伝子発現抑制効果が不十分であった。電気穿孔法による多コピー導入法が遺伝子発現抑制効果に優れていた。
- ・ 遺伝子サイレンシングの抑制:サイレンシングを受けないとされる ROSA 領域への導入、及びサイレンシング抑制効果を有するとされるインスレーター配列で shRNA 発現ベクターを両側からはさむ
⇒ ROSA 領域への導入により shRNA の効果が減弱。インスレーター配列導入により shRNA の効果が減弱。サイレンシングを確実に抑制するのは困難であった。ただし、単純な電気穿孔法による導入でも全くサイレンシングを認めず正常に働く細胞株もあったのでそのような細胞株を選択することで問題回避可能と考えられる。
- ・ テトラサイクリン制御性タンパクの導入:テトラサイクリンの添加により shRNA 発現を誘導するテトラサイクリン制御性タンパク(tTS)を ROSA 領域に導入した。安定したテトラサイクリンによる制御が可能であった。

上記の検討により、「tRNA プロモーターによる shRNA 発現」、「電気穿孔法による多コピーの shRNA ベクターの導入」、「ROSA 領域への tTS 導入」の3者併用により効率的 shRNA の発現が可能と考えられた。

イ. ES 細胞分化途上における shRNA 発現による特異的遺伝子発現抑制

ア. において構築したシステムを用いて、ES 細胞分化途上において標的とした遺伝子の特異的発現抑制を試みた。中胚葉細胞マーカーである VEGFR2 (2型血管内皮増殖因子受容体) 及び血管内皮マーカー VE-カドヘリンの特異的発現抑制に成功した。

ウ. ES 細胞分化途上における shRNA 発現による ES 細胞分化方向の制御

イ.において構築したシステムを用いて、血管内皮細胞分化に必須である VEGFR2 遺伝子の発現を中胚葉段階において誘導性に shRNA により発現抑制したところ、血管内皮細胞分化を抑制することに成功した。shRNA を誘導性に発現させることにより、細胞分化の運命を制御できることが可能となった(Hiraoka-Kanie, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006)。

② Cre-loxP システムを用いた新しいタモキシフェン誘導性 shRNA 発現システムの構築

ROSA 領域にエストロゲン受容体(ER)と遺伝子組換えタンパク Cre の融合タンパク遺伝子(ER-Cre)を導入し、恒常的に ER-Cre を発現する細胞株を構築する。同細胞に loxP 配列には含まれた shRNA 発現ベクターを導入することにより、ER のリガンドであるタモキシフェン投与すると ER-Cre が核内に移行し loxP 配列を組換えることにより、誘導性に shRNA を発現させる新しいシステムを構築している。タモキシフェン誘導性に VEGFR2 遺伝子発現を選択的に抑制することに成功している。さらにマウス ES 細胞の心筋分化過程において発現が上昇する遺伝子群に対する shRNA を同システムを用いて発現させることにより、心筋分化が抑制できる予備的結果を得ている。

③ テトラサイクリン誘導性 cDNA 発現(Tet-OFF)ES 細胞システムの構築

サイレンシングを受けないとされるマウス ROSA 遺伝子座に、テトラサイクリン制御性遺伝子(tTA)、及びテトラサイクリン制御性プロモーター下に標的遺伝子 cDNA をつないだベクターを導入することにより、テトラサイクリン誘導性に標的遺伝子 cDNA を ES 細胞分化途上において発現させるシステムを構築した。同システムを用いて ES 細胞分化途上(中胚葉段階)において活性型 Protein kinase A (PKA)をテトラサイクリン誘導性に発現させることにより、PKA が VEGF 受容体の発現調節を介して内皮細胞分化を制御していることを明らかにした。従来の 1/10 量の VEGF により内皮細胞を分化誘導することに成功した(Yamamizu, *Blood*, 2009)。さらに同様に活性型 β -catenin を発現させるシステムを用いて、内皮細胞の動脈化が Notch と β -catenin の協調的作用により誘導されることを明らかにした(Yamamizu, *J Cell Biol*, in press)。このように本システムの有用性は確立された。

④ 新しい ES 細胞における誘導性ノックダウン-レスキューシステムの構築

②③のシステムを組み合わせることにより、ES 細胞分化の任意の段階において、特定の遺伝子発現抑制と過剰発現を誘導することができる新しい機能解析システム、誘導性ノックダウン-レスキューシステムを構築している。②で構築した細胞の ROSA 領域に FRT 配列を導入し、ROSA 領域にテトラサイクリン誘導性 cDNA を追加導入できるシステムを構築した。この FRT 配列部分にタモキシフェン誘導性 GFP 遺伝子を導入し、誘導性に GFP を発現させる予備的実験にすでに成功している。

⑤ヒト ES 細胞におけるノックダウン-レスキューシステムの構築

現在マウスにおいて最も効率的に遺伝子発現制御を行えるシステムを構築中であり、同システムが確立した上でヒト ES 細胞への導入を検討する。ヒト ES 細胞培養はすでに開始し、血管細胞及び心筋細胞の分化誘導にすでに成功している。

(4) 目標の達成度と意義

①テトラサイクリン誘導性 shRNA 発現 ES 細胞システムの構築

マウス ES 細胞において、テトラサイクリン誘導性 shRNA 発現 ES 細胞システムを構築することに計画通りに成功した。実際に ES 細胞分化方向を制御できることを明らかにし、本方法の有用性を示すことも計画通り行うことができた。

②Cre-loxP システムを用いた新しいタモキシフェン誘導性 shRNA 発現システムの構築

①とは別の新しい制御性 shRNA 発現システムもほぼ予定通り構築することに成功した。②を新たに構築したことにより、③④の新しい遺伝子発現制御システム開発を行うことができた点は当初計画を上回る成果と考えられる。

③テトラサイクリン誘導性 cDNA 発現(Tet-OFF)ES 細胞システムの構築

④新しい ES 細胞における誘導性ノックダウン-レスキューシステムの構築

上記は当初計画にはなかったが、より有効な遺伝子発現制御技術開発に有用であると考え研究を進めた。これにより、loss-of-function、gain-of-function の両面を恣意的に制御しながら組み合わせ、簡便かつ効率的に標的遺伝子の分化における機能的意義の検討が可能となる。実際テトラサイクリン誘導性 cDNA 発現 ES 細胞システムを用いた検討により、ES 細胞分化における新たな知見を見出し、論文を 2 報完成するに至っており(Yamamizu, *Blood*, 2009; Yamamizu, *J Cell Biol*, in press)、本方法の高い有用性を示すことに成功した。さらに ROSA 領域に FRT 配列を挿入し Flip-In 組換えシステムを用いてレスキューcDNA を導入できる ES 細胞を構築した。同 ES 細胞を用いて分化途上における種々の遺伝子の発現制御を行い、実際に ES 細胞分化を制御できるかの確認を開始している。ヒト ES 細胞に導入した場合、その機能解析や目的細胞の分化誘導などにおいてとりうる戦略は飛躍的に増大すると考えられ、その意義は非常に大きい。

⑤ヒト ES 細胞におけるノックダウン-レスキューシステムの構築

③④により、新しいより効率的な ES 細胞における遺伝子発現制御システムの可能性が見出されたため、ヒト ES 細胞における shRNA 発現システムの構築は現段階では見合わせている。

④で確立されたシステムをヒト ES 細胞に導入することにより、当初計画よりも柔軟性と応用範囲の広いヒト ES 細胞遺伝子発現制御システムの構築が期待される。

2. 2 研究開発項目②「ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発」

2. 2. 1 ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発

幹細胞創薬研究所

(1)事業目的と背景

マウスやサル ES 細胞から各種の神経系細胞への分化誘導研究は国内外の研究室で、発生分化の基礎的研究や再生医療の細胞治療の目的として主に行われている。これらの分野ではマウス ES 細胞を用いた研究がもっとも進んでいるが、ヒト ES 細胞が樹立されてきて以来、現在ヒト ES 細胞からの分化誘導研究も国外では盛んに行われている。

ES 細胞から様々な神経系細胞への分化誘導方法は、大きく 2 つのタイプに分けることが出来る。一つは、ES 細胞から胚様体 (Embryoid body; EB) を形成させ、神経系細胞へと分化させる方法である。EB 内で内胚葉、中胚葉、外胚葉のそれぞれの細胞へ分化できる細胞が生じるが、外来因子の刺激により神経系細胞への分化と増幅を誘導し、神経分化細胞を得ることが出来る。二つめの方法は EB 形成を行わず、単層培養の ES 細胞に対し主に神経幹細胞・神経前駆細胞への神経誘導を行う方法で、この方法は他の細胞との共培養系と ES 細胞だけの培養系に分けることが出来る。具体的には、共培養系では ES 細胞を他生物由来のストローマ細胞上で培養し、未同定要因によって神経誘導させる方法であり、ES 細胞だけを培養する系では、既知の外来因子を細胞に作用させ分化誘導させる方法である。

ヒト ES 細胞の分化誘導では、マウス ES 細胞で確立された誘導方法を応用する機会が多いが、種の違いのせいか、そのままマウス ES 細胞の方法をヒト ES 細胞に適用することは難しく、神経誘導に要する培養日数、培養液など様々な条件を検討しなければならない。また、ヒト ES 細胞由来の神経系細胞を得ることが出来ても、その誘導効率はマウス ES 細胞の効率と比べると低いとされる報告もあり、ヒト ES 細胞の分化誘導効率をより高める技術開発が不可欠である。

また、既に報告されているヒト ES 細胞の分化誘導方法が、すべてのヒト ES 細胞株に適用できるわけではない。なぜなら、既存のヒト ES 細胞株は、同じ ES 細胞と称しているが互いに性格が異なっているためである。その違いは ES 細胞樹立時の培養条件等に起因しているのかもしれないが、遺伝的バックグラウンド(ゲノム DNA の塩基配列の違い)による違いもあると考えられる。

本事業では、創薬研究に利用できる研究用モデル細胞を、京都大学で樹立されたサル ES 細胞と日本人由来のヒト ES 細胞から創製することを目指しており、そのモデル細胞の一つとして、神経変性疾患モデル細胞を構築する。そのために必要とされる神経細胞を得るために、サルやヒト ES 細胞を様々な神経系細胞(神経幹細胞・神経前駆細胞、運動神経細胞など)へ効率よく分化誘導させる基盤技術の確立を目指す。

(2)事業内容と目標

神経系細胞には、形態的にも機能的にも異なった多くの種類が存在するといわれている。そして、例えば生理的機能が異なる二つの神経細胞では、互いに遺伝子やタンパク質の発現プロファイルが異なっていると考えられる。このことは、異なった機能をもつ神経細胞は外来因子に対し、違った反応性を示すであろうことは容易に考え得る。神経変性疾患では、それぞれの疾患で症状の現れる神経細胞の種類が異なっていることが知られている。よって、より良い神経変性疾患モ

デル細胞を構築するためには、目的とする疾患にあわせた神経細胞を ES 細胞から分化させる系を確立する必要がある。本プロジェクトでは、神経変性疾患として、アルツハイマー病(AD)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、そしてハンチントン病(HD)の 3 疾患の研究用モデル細胞を創製しようとしているため、神経分化誘導の技術開発においては、AD と HD に対しは脳の神経細胞を、ALS では運動神経細胞を ES 細胞から分化させる系を確立することを目指す。

そのために、中間報告までには既に報告されている神経分化誘導法が京都大学で樹立されたサル ES 細胞(CMK6)と日本人由来の ES 細胞株(KhES-1)に適用可能かどうかを検討し、神経幹細胞・神経前駆細胞や分化神経細胞などの神経系細胞を得ることが出来る神経分化誘導方法を確立することを中間目標とした。その際、モデル細胞創製の目的(遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価、創薬研究の効率化)を考慮し、分化誘導過程において他生物細胞の混入を伴う共培養は行わない分化誘導技術の開発を目指した。そして、二つのタイプの分化誘導方法である、「EB を介した神経系細胞への分化誘導」と「ES 細胞だけの単層培養による神経前駆細胞への分化誘導」でもって神経分化誘導技術の開発を進めていった。

中間報告以後は、二つに分かれていた神経分化誘導方法のやり方、神経幹細胞までの神経分化誘導方法を統一し、そこから必要とされる因子を用いて目的神経細胞への分化誘導を行った。

(3) 研究成果

①-ア. ES 細胞から胚様体を介した運動神経細胞への分化誘導

EB を利用する分化誘導方法は、これまで多くの研究者によって行われており、研究結果も多数報告されている。京都大学から ES 細胞培養のための基礎的な培養技術(未分化維持、継代、凍結保存方法等)の移転を受けた際、分化誘導技術では必須技術にあたる EB の形成方法を、メソッド集には記載されないような細かい点を含め取得した。その後、これまでに既に発表されている方法が、サル ES 細胞(CMK6)と日本人由来のヒト ES 細胞(KhES-1)に適用可能かどうか調べてみた。まず、Zhang 研究室(米国 University of Wisconsin-Madison)で開発された方法を試みた。彼らの方法は未分化なヒト ES 細胞(使用株;H1 と H9 株)から EB を形成させ、培養 4 日目の EB をディッシュに接着させた後、神経前駆細胞へと分化させ、その後、様々な既知因子を添加することによって、ドーパミン産生神経細胞や運動神経細胞へと分化誘導させる方法である。運動神経細胞への分化誘導方法をサル ES 細胞(CMK6)とヒト ES 細胞(KhES-1)に対し適用したところ、用いた ES 細胞株の性質の違いの為か、EB のディッシュへの接着性や分化過程で観察された細胞コロニーの状態が報告されているような経過を CMK6、KhES-1 共にたどらなかった。まず EB のディッシュへの未接着性はマトリゲルを用いることで解決した。さらに彼らの報告では、接着後、コロニーの中心部にロゼッタと呼ばれる神経前駆細胞へと分化した細胞群が形成されてくるとされたが、CMK6 と KhES-1 では同じようなコロニー形態にならなかった。しかし、コロニーの周辺部に神経前駆細胞(PAX6 陽性及びロゼッタ形態)への分化は認められ、さらに、低濃度のプロテアーゼでコロニーを処理することによって、ロゼッタ構造が高頻度で得られることを見いだした。その後、彼らの方法に従い運動神経細胞への誘導を行なった。多数の β III-tubulin 陽性神経細胞を得る

ことには成功したが、運動神経細胞特異的な遺伝子マーカー(HB9)陽性の運動神経細胞への分化程度は良くなかった。彼らの方法では、運動神経細胞へと分化させる誘導因子の処理時期が重要であるとされている。しかし、CMK6 と KhES-1 には、H1 と H9 で示された処理時期が合致していなかったようである。これらの結果で示されたコロニー形態の違いや誘導因子の反応性の違いなどは事業背景の項で記述したヒト ES 細胞株間の性格の相違の実例を端的に表しているが、KhES-1 に適した方法にするためには、更なる条件検討が必要である。

次に Jessell 研究室(米国 Columbia University)の方法を試みた。彼らの方法は EB 形成後、外来因子による処理を EB に対し行い、運動神経細胞へと分化させる方法である。しかし、マウス ES 細胞を用いた分化誘導方法であるため、サル及びヒト ES 細胞に適用させるには培養条件等の検討が必要であった。ES 細胞を運動神経細胞へと分化させるためには、分化誘導途中でレチノイン酸による処理が必要であるが、マウス ES 細胞での方法を適用し培養初期の EB にレチノイン酸処理を行うと、EB の急激な死滅を引き起こすことを見いだした。EB の死滅を起こさないようにする条件検討を行った結果、EB を 12 日から 14 日間以上培養する必要があることを明らかにした。そして、レチノイン酸処理に続くソニックヘッジホッグ処理により、運動神経細胞特異的な遺伝子マーカー(HB9)を発現する分化細胞をサル ES 細胞で 7-25%(平均 17%)の頻度で得ることに成功し(Fig.1)、またヒト ES 細胞 KhES-1 からも同様に分化誘導に成功している。

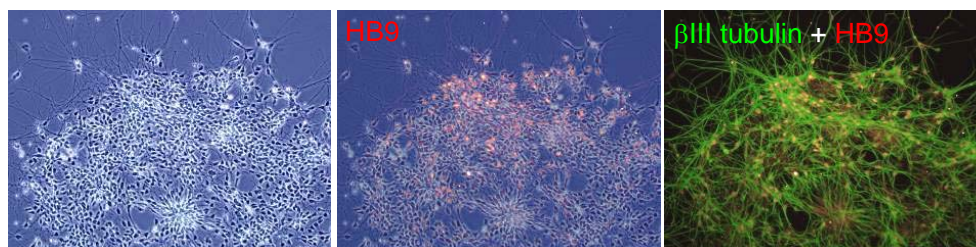


Fig.1 サル ES 細胞から運動神経細胞への分化誘導

サルとヒト ES 細胞に対し行った今回の方法では、運動神経細胞を得るまでに 5 週間という長期の培養を要する。また、分化効率も既に報告されている頻度(20-30%)に比べて、それほど高くない。そこで分化誘導時間短縮と分化効率向上のために、培養液や培養日数などの検討を行った。EB 内では神経系細胞以外の細胞も分化してくる。そのため分化効率を上げる一つの方法は EB 内部で非神経細胞への分化を抑制することである。EB の培養や分化誘導には ES 細胞培養培地(ES 培地)を用いていたが、非神経細胞への分化抑制を期待し、ES 培地から神経誘導用無血清培地に代えた。組成の異なる3種類の神経誘導培地(N2 培地、N2(2:1)培地、N2B27 培地)を用意した。EB を形成させる際、初めから神経誘導培地を用いた場合、多くの細胞が EB を形成できないことが分かったため、まず 4 日間 ES 培地で EB を形成させ、その後神経誘導培地に代えた。N2 培地では培養中一部 EB の死滅が起きてくるが、それ以外の神経誘導培地では EB は順調に増殖した。さらに長期培養を行っていくと、N2 培地、N2(2:1)培地では、EB のディッシュへの接着が認められてくるが、N2B27 培地では認められなかった。これらのことは培地による違いが明ら

かに細胞分化へ影響していることを示している。次にレチノイン酸に対する反応性に変化が起きているのか確かめた。レチノイン酸による EB の細胞死を起こさせない様にするには、ES 培地培養の EB では 14 日間以上要するのに対し、N2B27 培地を用いると 10 日間に短縮させることに成功した(Fig.2)。

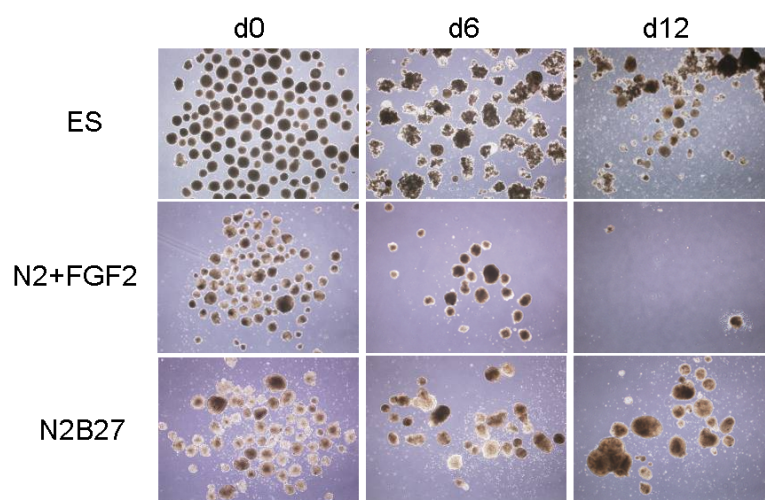


Fig.2 神経誘導培地で培養された KhES-1EB のレチノイン酸への反応性
4 日間培養した EB をその後 ES 培地、無血清培地(N2 培地と N2B27 培地)で 6 日間培養後、レチノイン酸を添加、添加直後(d0)、6 日後(d6)、12 日後(d12)の EB。

よって分化誘導時間の短縮が、ES 培地でなく神経誘導培地を用いることで僅かであるが可能になった。今後、他の各ステップでの詳細な条件検討を行う。また、神経誘導培地を用いているので運動神経細胞分化誘導で分化頻度向上が期待できると思われる。事実、原始内胚葉のマーカ遺伝子の発現を抑えることに成功している。さらに、マウス ES 細胞を用いた系では 10-20 ボルトの低電圧刺激が EB からの神経細胞分化誘導を有意に上昇させるとの報告があり、サル ES 細胞の EB を用いた場合は、30-40 ボルトで刺激したところ、無刺激および 10-20 ボルト処理培養と比べ、わずかながら Nestin 陽性神経幹細胞の増加が認められ、今後ヒト ES 細胞にも効果があるのか検討する。

①-イ. ES 細胞から胚様体を介した大脳神経細胞への分化誘導

マウス ES 細胞から大脳神経細胞(錐体細胞)への分化誘導方法が報告されている。そこでヒト ES 細胞から大脳神経細胞の誘導にその方法が有効かどうか調べた。レチノイン酸処理を施す方法であるため、上記のように EB の長期培養が必要であった。結果としては、マウス ES 細胞を用いた場合、ほぼ均一な神経細胞(β III-tubulin、Tau 二重陽性)が得られるとされるのに対し、ヒト ES 細胞では、細胞形態と免疫染色の反応性の違いから少なくとも 3 種類の細胞(β III-tubulin 陽性、GFAP 陽性、両抗原陰性)に分化していたことが明らかになった。両抗原陰性細胞は大脳の発生過程で生じてくる神経細胞であるかもしれないが今の段階では不明である。今後は詳細な分化誘導の条件検討を行い、また生じてきた神経細胞の特徴付けを行う。

マウス ES 細胞の手法をヒト ES 細胞に適応させた場合、運動神経細胞への分化には培養条件を変えることで神経分化誘導に成功したが、大脳神経細胞への分化には単純には適応できず、得られた結果も異なったものであった。このことはマウス ES 細胞を用いた方法がヒト ES 細胞に容易に適用できない場合があることを明白に示している。

その後の研究において、後述の単層培養による分化誘導がより効率よく神経誘導が可能なことが判明したため、中間評価以降は EB を介した分化誘導方法は中止した。

②-ア. ES 細胞の単層培養による神経前駆細胞への分化誘導

EB を用いて、様々な神経細胞の分化方法が報告されてきているが、EB 内では非神経細胞の分化もあり、また外来因子が EB 内部にまで作用しないという欠点がある。その欠点を避けるために細胞に外来因子を均一に作用させることが可能である単層培養による分化誘導法を試みた。

マウス ES 細胞を単層培養で N2B27 培地を用い神経前駆細胞に分化させる方法が報告されていたが、その N2B27 培地を用いてサル ES 細胞を単に培養しても、上記のように種間差の為か神経細胞へ分化することはなく、多くの細胞は非神経細胞へと分化する。そこで、神経発生において非常に重要な働きをしている BMP シグナル伝達系の阻害因子であるノギンに注目した。本プロジェクトの一年目の 2005 年に、ノギンを用いてヒト ES 細胞(H1 と H7 株)を神経前駆細胞に分化誘導させた方法が報告された。そこでサル ES 細胞(CMK6)及びヒト ES 細胞(KhES-1)の神経分化誘導へのノギンの効果を調べた。

サル ES 細胞の場合、N2B27 培地へのノギンの添加によって、単層培養しているサル ES 細胞のほぼすべてを nestin 陽性神経前駆細胞に分化させることに成功した。その際、ES 細胞塊を 40-70 μm のサイズに揃えることにより、より均一な分化誘導が可能となることを見いだした。さらにこのノギン神経分化誘導法で得られた神経前駆細胞は凍結保存を行っても、若干の細胞死が観察されたが、細胞の増殖および神経細胞への分化能が損なわれていないことも確認した。このように神経分化誘導を未分化な ES 細胞から開始しなくてもよいことが判明し、通常一ヶ月ほど分化誘導にかかる時間を短縮できることが期待できる。さらに、各ステップで均一な細胞ストックを作製することで繰り返しの条件検討が可能となる。

サル ES 細胞での結果を踏まえ、ヒト ES 細胞(KhES-1)に対してもノギンに神経前駆細胞への分化誘導効果があるかどうかを確かめた。その結果サル ES 細胞の場合と異なり、未分化な細胞(Oct3/4 陽性)が残ったが、さらに培養を続けると、約 35%の割合で β III-tubulin 陽性の神経細胞へ分化誘導させることが出来た(Fig.3)。分化効率を向上させるために、ノギンと共に Dkk1(Wnt シグナル伝達系の阻害因子)と LeftyA(Nodal シグナル伝達系の阻害因子)を添加したところ、未分化な ES 細胞数が減少し、さらに β III-tubulin 陽性神経細胞への分化効率を約 70%まで向上させることに成功した(Fig.3)。さらに神経細胞数も約 5 倍に増加させることが出来た。LeftyA の代わりに Nodal シグナル伝達系の化学阻害剤でも、同様な効果があることも明らかにした。一方、bFGF のノギン神経誘導系への添加は、神経細胞の分化頻度を約 5%までに下げる結果になり、bFGF がノギンによる神経分化誘導に対し阻害的に働くことも見いだした。また、サル ES 細胞の場合同様、分化誘導途中で得られる神経前駆細胞の凍結保存が可能なることも確認した。

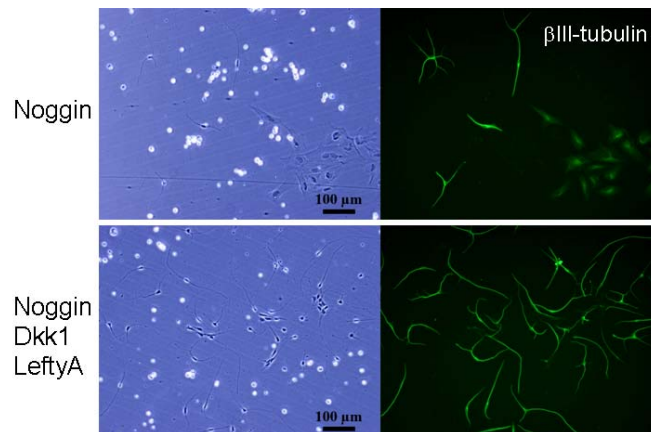


Fig.3 ヒト ES 細胞のノギンによる神経分化誘導

この方法で得られたヒト ES 細胞由来の神経前駆細胞の特徴を調べたところ、終脳の特異的遺伝子マーカーである FOXG1/BF1 を発現しており、終脳領域の神経前駆細胞であることが明らかになった。

②ーイ. 神経前駆細胞への分化誘導効率の向上

これらの結果を踏まえ、中間評価以後において、モデル細胞創製に必要とされる神経細胞(大脳神経細胞と運動神経細胞)を得るために、神経前駆細胞から目的神経細胞の分化誘導と成熟化の培養条件の検討および分化誘導率を向上させる条件の検討をさらに進めた。

前述したとおり、ノギンの添加によってヒト ES 細胞を神経系の細胞へと分化誘導が可能であったが、サル ES 細胞に較べて、未分化細胞が多く残り誘導効率が低かった。TGF- β /Activin 系シグナルの阻害剤である SB431542 または SB505124 をノギンと共添加することで、誘導初期の未分化細胞が減少して分化効率が増加した。さらに誘導途中での継代方法を工夫した結果、その後のコロニーの接着性が向上し、得られる分化細胞数を増やすことができた。誘導開始から継代を 2 回繰り返して 17-19 日後には、ロゼッタ状のコロニーが多数形成された。このロゼッタ状のコロニーをシングルセルにして播種することで、突起を伸展させた神経細胞へと分化した。

②ーウ. ノギン誘導神経細胞の特徴づけ

ノギンによって分化誘導された神経前駆細胞に、特異的な成長因子などを入れずに培養をつづけた神経細胞は、電気生理学的な解析からマイナス 50 mV から 60 mV の静止膜電位を有し自発的な活動電位も観測され、電位依存性の Na チャネルの発現が確認できた。さらに免疫染色の結果から、成熟神経細胞のマーカーである MAP2、NEUROFILAMENT の発現も確認できたことから、得られた神経細胞は比較的成熟していることが明らかとなった(Fig.4)。分化誘導されてくる神経細胞は終脳マーカーである FOXG1 を発現しており、さらに自発的シナプス応答では GABA のみに反応したことより GABA 作動性ニューロンが主な細胞種であることが分かった。

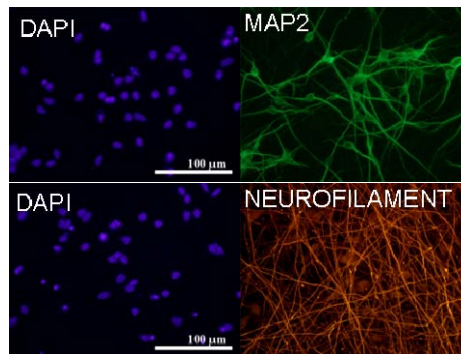


Fig.4 ヒト ES 細胞由来の成熟神経細胞

③ 特定タイプの神経細胞への分化誘導

③ーア. ドーパミン作動性神経細胞への分化誘導

上記のようにノギンと TGF- β /Activin 系シグナルの阻害剤である SB431542 処理によって分化誘導させた神経前駆細胞は、特に何の処理をせず培養しつづけると GABA 作動性神経細胞に分化成熟していく。このことは、ヒト ES 細胞を神経幹細胞まで分化させた後、目的とする神経細胞へ分化させるためには、何らかの因子が必要とされることを示している。我々はドーパミン作動性神経細胞へ分化誘導させるために FGF8 とソニックヘッジホッグによる処理をおこなうことで、ドーパミン神経細胞としての特徴を有する細胞へ分化させることに成功した。誘導から 53 日後、成熟ドーパミン作動性神経細胞に特徴的な形態を示し、Tyrosine Hydroxylase (TH) 陽性細胞を検出した。また、TH、Engrailed-1、Nurr-1 といったドーパミン作動性神経細胞のマーカー遺伝子の発現も確認され、さらにドーパミントランスポーターの遺伝子発現も認められた。また、この分化細胞が機能的かどうかの確認実験を行った。塩化カリウム処理によって、ドーパミン作動性神経細胞からドーパミンが放出されることが知られている。そこで、ES 細胞由来のドーパミン作動性神経細胞に塩化カリウム処理を行い、培養液中に含まれるドーパミン量を測定したところ、約 11 倍の濃度増加が見られ、ドーパミンの大幅な放出を確認した (Fig.5a)。放出されたドーパミンは、その後ドーパミン作動性神経細胞によって回収される。その際、ドーパミントランスポーター阻害剤で処理すると、蛍光色素で標識された神経伝達物質アナログの取り込みが阻害された (Fig.5)。これらのことは、ヒト ES 細胞から分化誘導させたドーパミン作動性神経細胞は、機能的であることを示唆している。

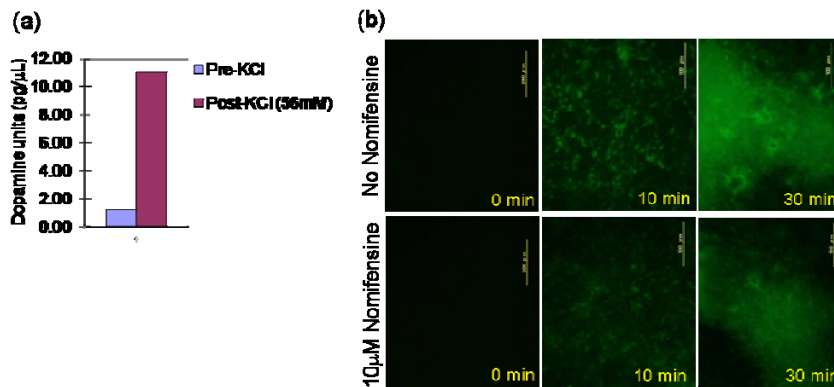


Fig.5 ヒト ES 細胞から分化したドーパミン作動性神経細胞

③ーイ. 脊髄運動神経細胞への分化誘導

ヒトおよびサル ES 細胞を Noggin 添加による培養を 17 日間行ったところ、ほぼ全ての細胞が Nestin 陽性神経上皮細胞となり Oct3/4 陽性未分化細胞は観察されなかった。さらにその後、レチノイン酸・ソニックヘッジホッグにより脊髄運動神経細胞へ効率よく分化させることに成功した。脊髄運動神経細胞の分化マーカーである HB9 や Isl1 の陽性細胞を指標にした分化効率は、サル ES 細胞で 40%、ヒト ES 細胞で 30%の分化効率であった(Fig.6)。

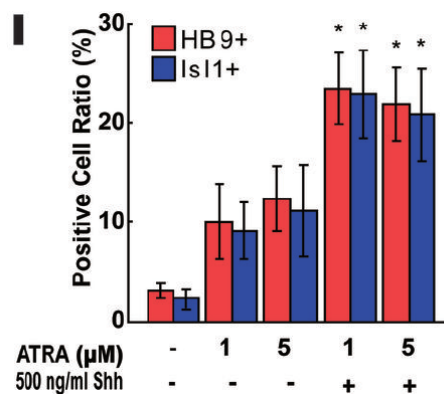


Fig.6 ヒト ES 細胞から運動神経細胞への分化効率

(Wada et al. PLoS ONE, 2009 より引用)

また、分化誘導された脊髄運動神経細胞の長期培養による成熟化についても試みた。BDNF/NT3/CNTF 添加培養条件で 2 週間培養後、電気生理学的実験を行ったところ活動電位等成熟神経細胞の特徴を観察した。また、アセチルコリン合成に必要とされるコリンアセチルトランスフェラーゼの発現が確認できた。さらに、電気生理実験以外での脊髄運動神経細胞の機能性・成熟度を調べるために、筋細胞との共培養を行った。ラット筋芽細胞 C2C12 を成熟筋へと分化誘導し、脊髄運動神経細胞と共培養させた。その結果、神経筋接合部に存在するアセチルコリン受容体に強く結合する α ブンガロトキシン(蛍光標識済み)は、神経細胞の末端に検出され、またシナ

プスマーカーであるシナプシンのシグナルと共局在した。これらのことは、ヒト ES 細胞から分化させた脊髄運動神経細胞が成熟しており機能的であることを示唆している。

最終目的であるモデル細胞を構築する上で、必要とされることの一つに目的細胞を多量に準備することが上げられる。そこで、ノギンによって分化誘導された神経幹細胞集団を運動神経細胞への分化能を保持したまま増幅が可能かどうかを、ニューロスフェア形成を介した浮遊培養系を試みた。FGF2 存在、もしくは FGF2 と EGF 存在下で、ニューロスフェア形成を行い、ニューロスフェアを継代し、その後、運動神経細胞への分化能を確認した。その結果、FGF2 存在下、FGF2 と EGF 存在下、共に細胞数を増やすことは出来たが、FGF2 と EGF 存在下では、3 継代目のニューロスフェア内の神経幹細胞の運動神経細胞への分化能が急激に落ち込んだ。一方、FGF2 存在下で培養したニューロスフェアでは、3 継代目のニューロスフェアでも、十分な運動神経細胞への分化能を維持しており、約 30 倍の神経幹細胞集団の増幅に成功した (Fig.7)。

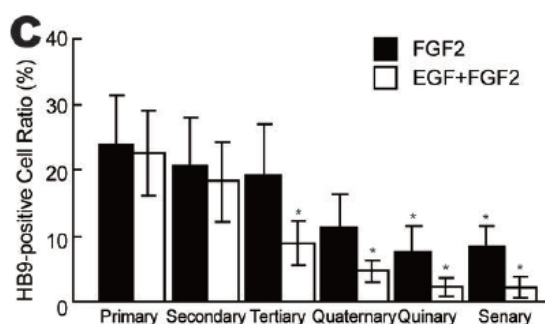


Fig.7 ES 細胞由来神経幹細胞の増幅
(Wada et al. PLoS ONE 2009 より引用)

また、産業化を考慮した場合、培養コストが大きな問題の一つになる。そこで、高価な組換え蛋白質を、安価な低分子化合物に代替可能かどうかを調べた。さらに、低分子化合物に代替可能であれば、ロット間による品質の違いがある組換え蛋白質とは異なり安定して、分化誘導を行える利点がある。そこで、我々の分化誘導系で使用されている組換え蛋白質であるノギンの代替化合物としてドルソモルフィン (Dorsomorphin) とソニックヘッジホッグの代替化合物としてソニックヘッジホッグアゴニストのそれぞれの分化誘導活性について検討を行った。ドルソモルフィンとノギンと同様に神経幹細胞にまで分化誘導できることを確認し、またソニックヘッジホッグアゴニストもソニックヘッジホッグ同様に脊髄運動神経細胞への分化を問題なく誘導する活性を持っていた。このような結果は、低分子化合物の使用によって、安定的にかつ低予算で分化誘導系を構築することが可能になることを示唆しており、将来の実用化において重要な結果を得ることが出来た。

さらに脊髄運動神経細胞の分化誘導効率は 100%ではない。つまり、目的外の神経細胞、非神経細胞が混在している。モデル細胞を用いたアッセイ系では必ずしも均一な細胞集団である必要はないが、ただアッセイ系としてのアウトプットの質を良くするためにも、目的細胞の濃度が高い方が望ましい。そこで、我々は GFP などのレポーター遺伝子を用いず、ヒト ES 細胞由来の脊髄運動神経細胞を濃縮する技術を開発した。密度勾配遠心法によって、約 30%の HB9 陽性細胞を約

80%までに濃縮することに成功した。しかし、現在の方法では濃縮後の細胞数の減少が大きいため、今後の改善が必要である。

③ーウ. アストロサイトへの分化誘導

アストロサイトは、過去の報告により ALS 発症に重要な役割を果たす細胞であると考えられている。これまでの研究では、ALS マウス脳由来のアストロサイトが利用されており、また ALS 患者脳からのアストロサイトの利用は様々な問題があり、モデル構築用の細胞ソースとしては現実的ではない。そのため、ヒト細胞だけからなる ALS モデル細胞構築を目指す場合、ヒト ES 細胞からのアストロサイトへの分化誘導系が必要となる。ニューロスフェアを数継代後には神経細胞分化能が低下する結果を上記のように得ていたが、その時のニューロスフェアでのアストロサイトへの分化能について調べた。その結果、ニューロスフェア継代に伴ってアストロサイト分化能が徐々に向上することがわかった。しかしながら、アストロサイトの分化マーカーである GFAP の陽性細胞割合は最大 50%程度であった。さらに、積極的にヒト ES 細胞由来の神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導効率を高める目的で、分化誘導法を検討した結果、最大約 80%GFAP または S100 陽性アストロサイトへの分化誘導が可能であることを見だし、効率よくアストロサイトへ分化誘導出来る系を確立した。

③ーエ. 中型有棘神経細胞への分化誘導

ノギンと SB431542 処理によってヒト ES 細胞から分化誘導させた神経前駆細胞を、中型有棘神経細胞へ分化させることを目指し、まずソニックヘッジホッグ、DKK1、BDNF で処理し、その後 BDNF、dbcAMP、バルプロ酸処理を行った。その結果、免疫染色によって中型有棘神経細胞のマーカー分子である DARPP32 の陽性細胞が観察され (Fig.8)、また、遺伝子発現解析においても、高レベルでの DARPP32 遺伝子の発現を検出した。一方 GABA 作動性神経細胞では、DARPP32 遺伝子の発現は検出出来なかった。このことは、さらなる解析を行う必要はあるが、中型有棘神経細胞への分化誘導が成功したことを示唆している。

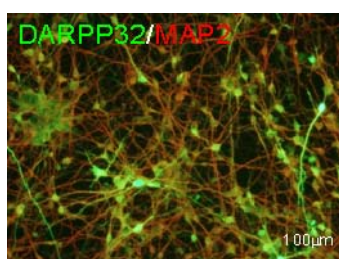


Fig.8 ヒト ES 細胞から中型有棘神経細胞への分化

④ 人工多能性幹細胞(iPS 細胞)への分化誘導法の適応

京都大学山中教授によって開発された iPS 細胞は、ES 細胞同様、多能性を持つことが示されており、今後の研究の展開が大いに期待されている。ヒト iPS 細胞においても、我々がヒト ES 細胞 (KhES-1) で確立した分化誘導技術が適応可能かどうかの検討を行った。

ウイスコンシン大学ヒト iPS 細胞3株および京都大学ヒト iPS 細胞2株を用い、運動神経細胞への分化誘導を行った。その結果、ノギンおよびドルソモルフィンでの神経幹細胞誘導、さらにレチノイン酸・ソニックヘッジホッグアゴニストによる脊髄運動神経細胞への分化が、ヒト ES 細胞と同等に観察され、我々の分化誘導技術が iPS 細胞へも適応可能であることが示された。しかしながら、iPS 細胞株によって、分化誘導割合がかなり低くなってしまいうものもあり、iPS 細胞でも研究に使用する最適な細胞株の選択が重要であることが分かった。

(4) 目標の達成度と意義

京都大学で樹立されたサル ES 細胞やヒト ES 細胞を用いて、ノギンと TGF- β /Activin 系シグナルの阻害剤である SB431542 を用いて神経前駆細胞へ効率よく分化誘導させ、その後、様々な蛋白質や因子を用いることで、ヒト ES 細胞を様々な神経系細胞へ分化誘導させる方法を確立し、計画通りに進んだ。また、モデル細胞構築のために必要とされる細胞の供給の際、問題とされる培養コストの低分子化合物による代替による低減や神経幹細胞を増幅させる方法、目的細胞の濃縮にも成功している。本プロジェクト期間中に見いだされたヒト iPS 細胞へも、我々が開発した分化誘導技術が問題なく適応可能であることも示された。今後、広く iPS 細胞研究にも応用されることが期待できる。

薬効や安全性は人種によって異なる場合があることが知られており、白人 (Caucasian) に効果ありとされた薬がアジア人に効果がない、またはその逆の場合もあり得る。よって、創薬や薬理学分野において本プロジェクトで用いている日本人由来の ES 細胞 KhES-1 の価値は非常に高く、その ES 細胞を用いて分化誘導方法を確立したことは非常に意義がある。

さらに他の研究者によって開発された神経誘導分化法を KhES-1 で検討した際に、KhES-1 に適用できない方法もあることを明らかにした。この結果は、既存のヒト ES 細胞株は、多分化能という基本的な性質は共通に持っているが、他面では ES 細胞株間で異なった性質を保持しているという考えを支持しており、今後の創薬や薬理学ばかりでなく幹細胞生物学、発生生物学などの基礎研究などの発展には、さらに多くのヒト ES 細胞株の数が必要であることを示唆している。このことは、ヒト iPS 細胞にも当てはまり、我々の方法では分化誘導できていない株があった。元々その iPS 細胞株が、in vitro では神経系細胞への分化能力を失っていた可能性もある。そのため、iPS 細胞においても数多くの株が必要であり、さらにヒト ES 細胞とヒト iPS 細胞との違いも最近報告されているため、今後、両者の比較研究が必要である。

2. 2. 2 ヒトES細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発

京都大学

共同実施：幹細胞創薬研究所

(1) 事業目的と背景

薬物がイオンチャンネルに作用し、心電図における QT 間隔を延長させ、重篤な不整脈を引き起

こすことはよく知られている。これは薬物誘発性 QT 延長症候群あるいは後天性 QT 延長症候群と呼ばれ、創薬の過程においてこのような副作用を惹起する可能性のある薬物をいかに排除し、安全な化合物を選択するかが非常に重要な課題となっている。QT 延長作用を持つ薬物の比較的多くが HERG(human ether-a-go-go related gene)チャンネルを抑制するものであることから、創薬の早い段階での後天性(薬物誘発性)QT 延長症候群のスクリーニングには哺乳類培養細胞に HERG チャンネルを発現させたものを用いることが多い。しかし、近年の電気生理学的、分子生物学的研究法の進歩によって、心筋細胞の再分極過程には多くのイオンチャンネルが関与することが明らかとなってきていることから、この方法は HERG チャンネルの過剰発現細胞を使用していることから、的確な評価をしているとは言い切れない例が報告されている。一方、微小電極法により活動電位に対する作用を検討する場合は、非霊長類の初代培養細胞をはじめとする心臓組織・心筋由来の細胞を用いることが多いが、ヒトへの外挿性や創薬前期で使用するほどの細胞量の供給の難しさや調製ロット差という問題が横たわっている。

すなわち本事業では、産業規模で供給可能な均一なヒトへの外挿性を有する細胞を使用し、創薬現場で使用可能な世界で最初の試験を事業化することを目的とした、ヒト ES 細胞から分化誘導した心筋細胞を用いた QT 間隔延長試験を構築する。

(2) 事業内容と目標

① ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発(その1) 京都大学

平成 19 年度まで: マウス ES 細胞からの効率的な心筋前駆細胞および心筋細胞の分化誘導法を確立し、その方法をサルやヒト ES 細胞へと応用して心筋細胞分化誘導技術を開発する。

平成 21 年度まで: ペースメーカー細胞等機能特異的心筋細胞の誘導・純化法を開発するなど、種々のヒト心筋細胞および前駆細胞の誘導・純化技術を確立する。平成 20 年度に新たに見出したサイクロスポリン A の強力な心筋分化誘導作用をヒト ES 細胞に応用し、ヒト ES 細胞の心筋分化の効率化を図る。新たに樹立された多能性幹細胞である iPS 細胞に関して、ES 細胞のノウハウを導入し心筋分化誘導法を開発する。

② ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発(その2) 幹細胞創薬研究所

本プロジェクトではヒト ES 細胞由来の心筋細胞を用いた QT 間隔延長薬物の *in vitro* での評価法を構築することを目標としている。QT 間隔測定系の完成には細胞技術およびデバイス、被評価化合物群、および解析方法との組み合わせが必須である。しかし、ヒト ES 細胞を用いた評価系は本プロジェクトの最終目標であるが、ヒト ES 細胞由来の分化細胞は、現在のところ他の機関に譲与することができないため、前述した評価系の完成に必要なこれらの要素が一箇所に集めることが不可能である。よって、事業化検討を実施するためにはヒト ES 細胞よりも、実施における制約が少なく、かつ有効性を確認するためにはヒトに近縁の動物種で実施することが適当であると考えた。

そのための中間目標としてヒト ES 細胞に先行してサル ES 細胞を用いて効率的な心筋分化技術を構築しデバイスに供与することにした。また、得られた心筋細胞のデバイスへの移行の方法

や拍動の持続性、維持性能の確認を行うとともにイオンチャンネルの発現プロファイリングを行い心筋細胞に分化しているかの確認を行う。

最終目標は、ヒト ES 細胞を用いた QT 延長評価系の確立である。そのためにサル ES 細胞で得られた知見のヒト ES 細胞への適応を目指す。その後、適切な QT 延長検出を可能とする為に、ヒト ES 細胞由来心筋細胞の成熟化法を確立し、成体心筋モデル細胞の取得を試みる。さらに、その発展型として成体心筋モデル細胞の短期間での取得法の確立を目指す。

(3) 研究成果

①ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発(その1) 京都大学

ア. マウス ES 細胞における新しい心筋前駆細胞及び心筋細胞の分化誘導

- a. マウス ES 細胞から誘導した VEGFR2 (2型血管増殖因子受容体) 陽性の中胚葉レベルの細胞を FACS により純化した後、マウスストローマ細胞株 OP9 上で培養することにより、効率的(従来の EB 法の約3倍)に心筋細胞が分化誘導されることを明らかにした。
- b. VEGFR2 陽性細胞から心筋細胞分化途上において種々のマーカーを用いて、特異的に心筋分化能を有する細胞分画の探索を行い、VEGFR2 陽性/CXCR4 陽性細胞 (FCV 細胞) が高い心筋分化能を有する新しい心筋前駆細胞であることを明らかにした。
- c. Wnt シグナル阻害物質である Dkk1 が VEGFR2 陽性細胞からの心筋分化を促進することを明らかにした。

以上、新しい心筋前駆細胞の同定と効率的な心筋細胞分化誘導法の開発に成功した(Yamashita, *FASEB J*, 2005)。

イ. マウス ES 細胞を用いた心筋ペースメーカー細胞の分化誘導

- a. 上記心筋分化誘導法を用いて、ES 細胞由来心筋の経時的性状解析を行い、ES 細胞由来心筋の自動能維持において、過分極誘発陽イオンチャンネル(HCN1,4)および電位依存型カルシウムチャンネル(Cav3.1, 3.2)が必須であることを明らかにした(Yanagi, *Stem Cells*, in revision)。
- b. 上記イオンチャンネルの発現を制御する転写因子(X)を見出している。
- c. 転写因子(X)の発現を、本プロジェクト2. 1. 3. RNA 干渉法による遺伝子発現制御技術を用いて抑制したところ、自己拍動心筋細胞コロニーが増加することを見出している。

以上により、心筋ペースメーカー細胞の特異的な分化誘導法開発の基盤となる技術構築に成功した。

ウ. 高効率心筋前駆細胞及び心筋細胞分化誘導法の開発

アの心筋分化誘導途上において、サイクロスポリン A を投与することにより、心筋前駆細胞及び心筋細胞の分化誘導効率を約 10 倍促進することに成功した(Yan, *Biochem Biophys Res Commun*, 2009; PCT 特許出願)。

エ. ヒト ES 細胞を用いた心筋分化誘導

ヒト ES 細胞をストローマ細胞上で培養することにより、自己拍動心筋細胞を誘導することに成功している。サイクロスポリン A の投与により、心筋分化誘導効率が有意に増加する予備的結果

を得ている。

オ. マウス iPS 細胞からの心筋分化誘導

マウス ES 細胞分化システムを iPS 細胞に導入することにより、iPS 細胞を種々の心血管細胞に分化誘導する系統的分化誘導法の樹立にいち早く成功した(Narazaki, *Circulation*, 2008)。

カ. ヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導

ヒト ES 細胞心筋分化誘導法を導入し、ヒト iPS 細胞から機能的な心筋細胞を誘導することに成功している。ヒト心筋細胞マーカーの発現、電気生理学的特性、電子顕微鏡的特徴等ヒト心筋細胞としての性質を満たすことを確認している。またサイクロスポリン A 法の導入により、ヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導効率も増加する予備的結果を得ている。

② ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発(その2) 幹細胞創薬研究所

ア. カニクイザル ES 細胞から心筋細胞への分化誘導

Mummery らによって報告された END-2 細胞との共培養系 (Stem Cells, 23: 772-780, 2006) を用いて、カニクイザル ES 細胞株 CMK6 を用いて心筋細胞への分化誘導系の確立を試みた。心筋分化誘導における牛胎仔血清 (FCS) の濃度依存性を 0、0.5、1、2.5、5、10、20%FCS で検討したところ、拍動心筋細胞は、2.5%FCS 存在下において最も多く得られた。また、拍動細胞は共培養開始の 8 日後から出現し始め、12 日から 15 日をピークとして検出された(図 1)。次に、共培養開始時の ES 細胞のコロニーの大きさを検討した。フィルターを用いて 100 μm 以上、70-100 μm 、40-70 μm の 3 種類の大きさに分けたところ、70-100 μm のコロニーを用いた場合において最も多く得られた。これら 2 つの条件を用いることで、コロニーの 10%以上が安定して拍動するようになった。さらに分化誘導効率を高めるために、心筋分化に効果があるとされる aFGF、oxytocin、京大山下准教授から供与された化学物質(Y)の効果を調べたところ、前二者では効果がなかったが、化学物質(Y)で約 1.4 倍誘導効率が上昇した。得られた拍動細胞は、END-2 細胞上での培養を続けると徐々に拍動しなくなるが、回収し撒き直すことで拍動し続けることを見出した。このことは拍動細胞を長期に維持でき、また適当なアッセイ系へ移行できることを意味し、実用化への大きな知見である。また、拍動細胞から RNA を回収し RT-PCR を行いイオンチャネル遺伝子の発現を調べたところ、ERG、Cav1.2、HCN-2、Nav1.2 の発現が認められた。

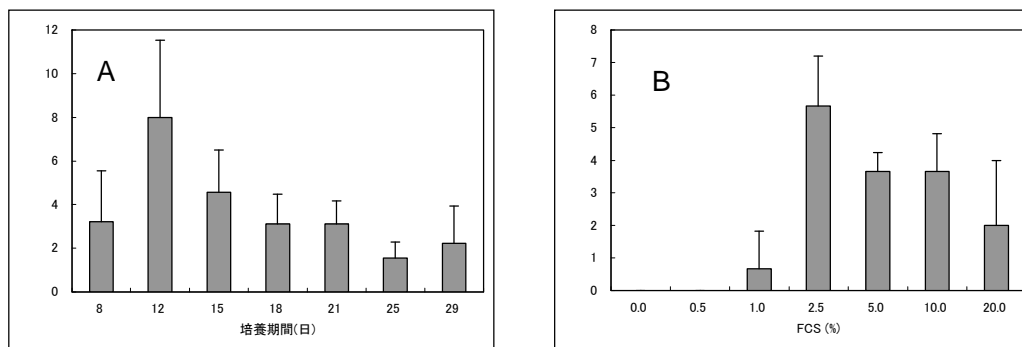


図 1 FCS の濃度依存性(A)と拍動細胞出現の日数(B)

イ. カニクイザル ES 細胞への心筋特異的遺伝子(α -MHC)-GFP の導入

心筋細胞をより効率的に回収するために、心筋特異的 GFP 発現株を作成した。心筋特異的遺伝子であるヒト α -MHC のプロモータを新たにクローニングし、pEGFP-1 (Clontech) に挿入した。これをカニクイザル ES 細胞に、遺伝子改変グループによって開発された遺伝子導入法を用いて導入し、 α -MHC::GFP 株を得た。得られたクローンを分化誘導し、拍動領域と GFP の発現が一致している細胞株を得ることができた。さらに免疫染色法において、GFP の発現は心筋特異的遺伝子である Troponin T、 α -actinin、 α -HMC の発現と一致していることを確認し、心筋様に分化していることを示唆する結果を得た(図 2)。

α -MHC::GFP 株を用いて、心筋細胞の回収方法を検討した。0.25% Trypsin-EDTA で処理し、21G の注射針に通して分散することで、1 細胞に分離でき、さらにフローサイトメトリーを用いた分取が可能となった。処理後 GFP の蛍光を指標にして観察すると、1 細胞でも拍動している細胞が検出された。さらに、この細胞を用いて、GFP 由来の蛍光を指標に、心筋分化を促進させる化合物の検索を行うための HTS 系の構築に着手した。

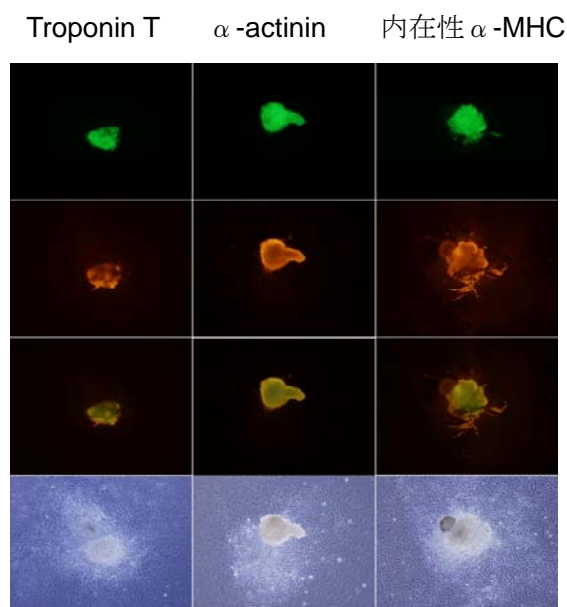


図 2 MHC::GFP の発現と心筋マーカー遺伝子の局在(免疫染色)

ウ. ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導

京大再生研で樹立されたヒト ES 細胞株 (KhES-1、KhES-2、KhES-3)を用いて、END-2 との共培養系の条件検討を行った。カニクイザル ES 細胞同様、コロニーの大きさと FCS の濃度を検討した結果、KhES-1 は誘導後 21 日において 70-100 μ m のコロニー、20% FCS 存在下で 7%のコロニーが、KhES-3 では誘導後 12 日において 100 μ m 以上のコロニー、5% FCS 存在下で 8%のコロ

ニーが拍動した。しかし、KhES-2 は安定して拍動する条件は得られなかった。

次にクローニングの効率や他の研究との比較を考慮して、KhES-1 を用いて更なる条件検討を試みた。ヒト ES 細胞の培養には KSR が用いられているのに対し、共培養系では FCS を用いている。そこで、誘導初期に FCS のみだけでなく、KSR の添加を検討した。FCS を含む共培養用培地に KSR を 0、1%、2.5%、5% の濃度で添加したところ、1%KSR 添加条件において拍動心筋様細胞数は著しく増加した。京大山下准教授より供与された CSA は、誘導後期において心筋誘導を促進することが明らかとなっているが、1%KSR 添加誘導系の後期に CSA を添加することで、さらに拍動心筋細胞コロニー数の増加に成功した。

エ. ヒト ES 細胞への心筋特異的遺伝子(α -MHC)-GFP の導入

均一なヒト心筋細胞を選別分取するために、サル ES 細胞同様心筋特異的遺伝子であるヒト α MHC プロモータにレポーター遺伝子である GFP をつないだベクターを KhES-1 に導入し、 α MHC::GFP 株を得た。得られた 35 株を分化誘導し、拍動領域と GFP の発現が一致している細胞株を 3 株樹立した。免疫染色法により、GFP の発現領域は内在性 α MHC の発現と一致し、さらに心筋特異的遺伝子である Troponin T や α -actinin、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)の発現と一致することを確認した(図 3)。以上の結果より、 α MHC::GFP の発現が拍動細胞の指標として使用可能であることが示された。

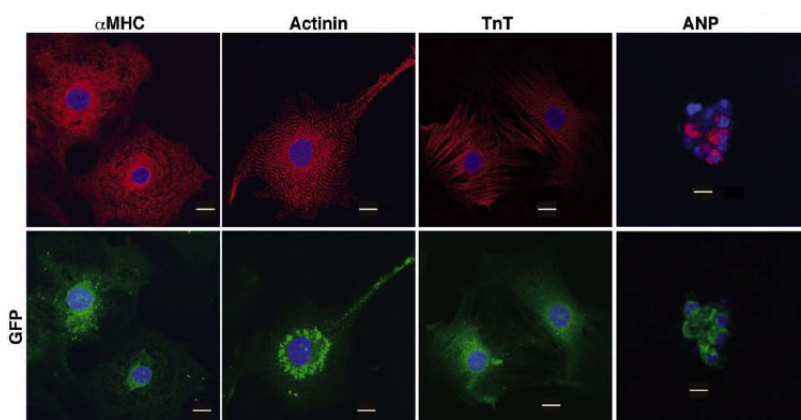


図 3. ヒト ES 細胞由来心筋細胞における α MHC::GFP の発現と心筋マーカー遺伝子の局在 (免疫染色)

オ. ヒト ES 細胞由来心筋細胞(hESC-CMs)の成熟化法の確立

END-2 細胞との共培養系を用いて得られた hESC-CMs の拍動性は誘導後徐々に失われる。そこで二週間毎の定期的な継代を行うことで、拍動性を維持したまま一年以上 hESC-CMs クラスターを長期培養できる「長期再接着培養法」を我々は確立した。得られた hESC-CMs の機能を定量 PCR 法、パッチクランプ法、細胞外電位測定を用いて評価した。8 ヶ月継代後の hESC-CMs に

において、心筋特異的遺伝子発現の著しい増加が認められ、特に QT 延長関連分子である ERG や KCNQ1 の高発現を定量 PCR で検出した。また、パッチクランプ法を用いた電気生理学的な特性解析では、単一の拍動 hESC-CM の活動電位の発火、Na 電流、Ca 電流、K 電流(HERG 電流)が検出され、長期培養維持によるそれぞれのイオンチャネル活性の増加が認められた。さらに、浮遊培養を介することで一過的な遺伝子発現の誘導が可能であった。このように、長期再接着培養・浮遊培養を行うことで、hESC-CMs の機能的成熟化を促すことができ、hESC-CMs が心筋モデル細胞としての性質を獲得していることを確認した。

カ. ヒト ES 細胞由来心筋細胞の QT 延長測定評価法の確立 (安全性薬理試験への適応)

薬剤候補化合物の心筋細胞に対する安全性を調べる QT 延長評価法を構築する目的で、多電極システムを用いた hESC-CMs クラスターの細胞外電位測定を行った。既知のチャネル阻害剤である E4031 に対する hESC-CMs の応答性(図 4)は、浮遊培養を介することにより格段に向上した。しかし、浮遊培養を介しても未熟な hESC-CMs クラスター(day21)では QT 延長を検出できなかった。よって、長期再接着培養による hESC-CMs の成熟化が適正な薬剤応答性の獲得に有効であることが明らかとなった(図 5)。次に既存の安全性試験である HERG 試験との比較を行った。hESC-CMs クラスターは、HERG 試験で QT 延長陽性であり in vivo でも陽性を示すニフェカレントに対して QT 延長を示した。一方、HERG 試験で QT 延長陰性に関わらず in vivo では陽性を示すソタロールに対する QT 延長も明確に検出できた(図 6)。ネガティブコントロールのアスピリンに対しては、波形に変化は見られず、陰性応答を的確に示した。このように、成熟型 hESC-CMs を用いることで、既存の HERG 試験より in vivo を反映する薬剤応答を示す QT 延長評価法を確立できた。

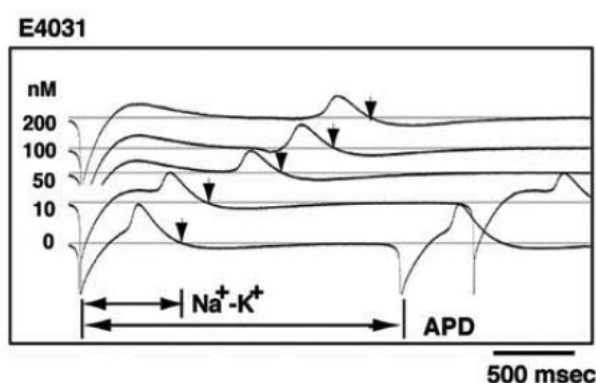


図 4. hESC-CMs クラスターの細胞外電位と E4031 による T 波の延長

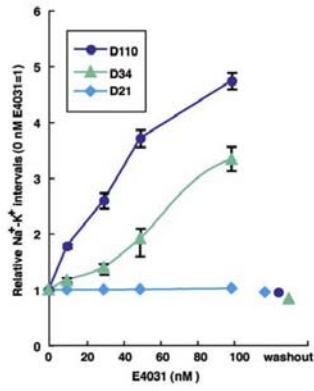


図 5. 長期再接着培養による
適正な薬剤応答の獲得

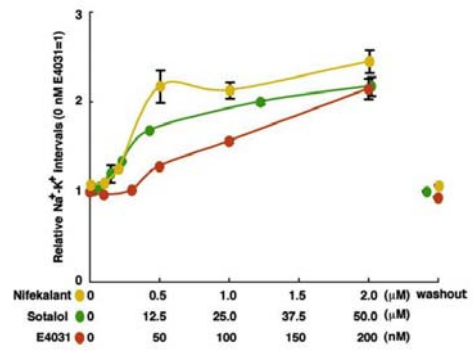


図 6. E4031, Nifekalant, Sotalol による
QT 延

キ. ヒト iPS 細胞への応用

上記で確立した心筋分化誘導法や長期再接着培養法をヒト iPS 細胞へ応用した。用いたヒト iPS 細胞株は、京都大学山中教授が樹立した株(253G1、201B7)と Wisconsin 大学 Thomson 教授が樹立した株(IMR90-1、IMR90-4、fskin-1)である。心筋細胞の誘導効率は細胞株毎に異なり、京都大学の株は、ヒト ES 細胞株の 3 倍以上であった。心筋特異的遺伝子である Troponin T や α -actinin、 α MHC は全ての iPS 細胞株由来の心筋細胞で発現していることを免疫染色法にて確認した。qRT-PCR による解析では、京都大学の 253G1 株は KhES-1 由来と同等もしくはそれ以上の発現レベルを示したが、他の 4 株の発現レベルは低かった。また浮遊培養法による心筋機能の増強はヒト iPS 細胞由来心筋細胞でも認められ、E4031 による QT 延長の検出も可能であった。このようにヒト ES 細胞を用いて確立した技術はヒト iPS 細胞への応用が可能である。

ク. 化合物によるヒト ES および iPS 細胞由来心筋細胞の機能亢進

長期再接着培養法によるヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞の成熟化には時間が必要であり、浮遊培養法による機能増強は一過的であることから、スクリーニング系を確立する為には、均一で生体心筋に近いモデル細胞の短期間での取得が求められる。そこで我々は化合物による心筋機能の亢進を試みた。初期誘導で得られた hESC-CMs を化合物 A で処理したところ、心筋特異的遺伝子発現の増強や一分間当たりの拍動数の増加が認められた。さらに細胞外電位による解析では、E4031 による QT 延長を検出できなかった未熟な hESC-CMs クラスターを化合物 A で処理すると、QT 延長の検出が可能となり、心筋機能の亢進が認められた。またニフェカントやソタロールによる QT 延長も検出できた。この化合物 A による心筋機能の亢進はヒト iPSC-CMs に対しても有効であった。このように、QT 延長を安定に検出できるヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞の短期間での取得が可能となった。

(4) 目標の達成度と意義

①ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発(その1)京都大学

ア. マウス ES 細胞における新しい心筋前駆細胞及び心筋細胞の分化誘導

心筋細胞を分化誘導する新しい方法を開発し、新規心筋前駆細胞の同定と心筋分化誘導シグナルの同定に成功した。効率的な心筋分化誘導法の確立に計画通りに成功した。

イ. マウス ES 細胞を用いた心筋ペースメーカー細胞の分化誘導

心筋ペースメーカー細胞分化誘導のための基本的技術・理論基盤の構築に成功した。自動能維持に必要なチャネルの同定と同チャネルの発現制御法を見出し、モデルペースメーカー細胞の誘導が技術的にも可能になったと思われる。当初計画よりも進んだと考えられる。

ウ. 高効率心筋前駆細胞及び心筋細胞分化誘導法の開発

全く新しい高効率心筋前駆細胞及び心筋細胞の誘導法を見出した。従来の分化誘導効率を 10 倍から 20 倍も増加させる画期的な技術であり、マウス ES 細胞よりも心筋分化誘導効率が低いヒト ES 細胞にも応用可能であれば、ヒト ES 細胞由来心筋細胞を潤沢に誘導する上で不可欠な技術基盤となる。当初計画には全くなかった新しい成果である。

エ. ヒト ES 細胞を用いた心筋分化誘導

ヒト ES 細胞から2次元培養下に心筋を誘導することに成功し、マウス ES 細胞と同様の分化シ

システムを構築できる可能性を見出している。ウの成果を導入することにより、分化誘導効率の改善に成功している。

オ. マウス iPS 細胞からの心筋分化誘導

研究分担者の持つ ES 細胞研究における先進性を iPS 細胞に応用し、iPS 細胞からの心血管分化誘導に世界に先駆けて成功した(Narazaki, *Circulation*, 2008)。同業績は、2008 年 *Circulation* 掲載全論文の中から、基礎科学部門第 1 位 **Best Paper Award** に選出され、非常に高い評価を受けている。

カ. ヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導

ヒト iPS 細胞からも機能的な心筋細胞の誘導にいち早く成功した。患者由来 iPS 細胞などからのモデル細胞構築に必要な基本的技術基盤となる。

当初計画に加え、新たに生まれてきた iPS 細胞に関しても迅速に対応し、従来計画を大きく上回る成果を上げた。

② ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発(その2)幹細胞創薬研究所

総括すると当初の計画より進んだと言える。一般にスクリーニング系は細胞技術、デバイス技術、被評価化合物、および解析技術のそれぞれが綿密に組み合わさって成立する。これら全てのリソースが一箇所に存在させるのが不可能な現段階では、使用制限がヒト ES 細胞より低くかつヒトに近い動物種であるサル ES 細胞を用いた技術を構築することが、事業応用化するためには効率的である。そのためサル ES 細胞を用いて技術の先行構築を行ったが、分化心筋細胞の取得および、分化心筋細胞の細胞外電位の測定、および既知薬剤による QT 延長に及ぼす影響を評価できたこと、さらにはその内容が現行法の弱点を補完できる可能性を示唆できたことは、細胞技術とデバイス技術の組合せが有効であることが示されただけでなく、本技術を創薬現場で応用できる可能性があり意義深いことである。霊長類 ES 細胞を実際の創薬現場で使用している報告は世界的にも例がないが、本研究が世界で最初の実用例となるために、本技術の事業化のためのライセンスアウトを進めた。

ヒト ES 細胞を用いた技術は、サル ES 細胞で得られた知見をさらに応用することで、既知薬剤による QT 延長に及ぼす影響を適切に評価できた。また、ヒト ES 細胞の指針改正によりヒト ES 由来分化細胞は譲与可能となったので、種差の違いによる影響を考慮しなくてよい本技術は、創薬現場での応用の可能性がより期待できる。さらにヒト iPS 細胞へ適応可能であることから、薬剤の安全性試験だけでなく薬効薬理試験に対する応用の可能性が示唆される。このように、本技術の幅広い応用の可能性を示せたことはとても意義深いことである。

2. 2. 3 ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発

京都大学
共同実施: 幹細胞創薬研究所
熊本大学

(1)事業目的と背景

肝細胞は創薬研究において中心的役割を果たす細胞であり、新薬候補物質の体内での代謝および薬物毒性試験などにおいて、動物肝細胞とヒト肝細胞では物質代謝の大きな違いがあることから、動物実験だけでは毒性と有効性の検定が不可能である。またヒト肝細胞の供給も極めて限定されており、多数の提供者から集められた細胞組織では試験データのばらつきが大きく有意な結果を得ることは困難である。

例えば、生体に投与された薬物は肝臓の薬物代謝酵素(CYP)により処理されるが、この酵素の活性を阻害する薬物はそれ自体の濃度のみならず、同時に投与された薬物の濃度も高く維持することになる。逆に、CYP の発現を誘導する薬物は、投与した薬物の濃度を下げる作用をもつ。このため、新規薬物候補は CYP 阻害・誘導作用の有無について厳格に調べられている。CYP には 50 種以上の分子種があることが確認されており、その発現レベルも個体、人種により異なることが知られている。現在、薬物の CYP 阻害作用のスクリーニングには、ヒト肝臓ミクロソームの CYP 活性を測定しているが、検体のロットにより活性が異なり安定した検証ができていない。

本事業におけるヒト ES 細胞から成熟肝細胞への分化誘導技術が確立できれば、創薬研究分野における極めて重要な技術革新となり、世界的にも大きなインパクトを生み出す。さらには、ヒト ES 細胞への遺伝子改変を行うことによって、肝臓における物質代謝に関わる個体差や疾患に対応して創薬試験に使用できる肝細胞モデル系の構築が可能になる。

(2)事業内容と目標

① ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その1)京都大学

京都大学再生医科学研究所では、京都大学大学院医学研究科肝胆膵・移植外科グループとのこれまでの共同研究において、マウス胎児肝臓由来のストローマ細胞との共培養系によって、未熟な肝前駆細胞を成熟肝細胞へと分化誘導することに成功している。ES 細胞から未熟な肝前駆細胞への分化誘導には活発に進められているが、そこから成熟肝細胞への分化はマウス ES 細胞でさえもほとんど成功がなく、世界的に見ても我々の開発した系はインパクトがある。そこで本プロジェクトではヒト ES 細胞から高効率で肝細胞への分化誘導を行う技術を確立することを最終目的として研究開発を行う。中間目標としては、(1) 肝前駆細胞を分離・生成することを可能とすべく、レポーターベクターを導入したヒト ES 細胞株の樹立、(2) 共培に必要なストローマ細胞は現段階では初代培養細胞のため調整が困難であるという問題点があり、調整の容易な細胞株で代用できるかに向けて目処をつける。また最終目標としてはこれらを組み合わせ、マウス ES 細胞から成熟肝細胞への分化誘導技術を、ヒト ES 細胞を用いての技術開発の確立を目指す。

② ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その2)幹細胞創薬研究所

幹細胞創薬研究所においては、次項③の熊本大学の高効率に ES 細胞を内胚葉系細胞～肝前駆細胞へと分化誘導する技術と、①の京都大学の肝前駆細胞へ分化誘導したマウス ES 細胞を成熟肝細胞へ誘導する技術を融合させ、ヒト ES 細胞から高効率に成熟肝細胞を分化誘導させる系を確立することを目指す。中間目標として、(1)マウス胎仔肝臓由来ストローマ細胞株の樹立：初めに、成熟誘導に用いるストローマ細胞が初代培養調製により細胞数に限りがあることや調製

の度に細胞の性質が異なる可能性があるなど本プロジェクトで目指している創薬支援のためのヒト ES 細胞由来の肝細胞を大量に得るには実用的ではないため、該細胞を不死化し十分量の細胞が準備できる系を構築することを試みる。(2)不死化ストローマ細胞との共培養によるヒト ES 細胞由来肝細胞の分化誘導:熊本大学の技術で肝前駆細胞へと分化誘導した細胞を(1)の細胞株と共培養し成熟肝細胞が誘導される培養条件を検討し、ヒト ES 細胞由来肝細胞分化誘導法の確立の目処をつける。最終目標としては、本技術により薬物安全性試験に利用可能な生体内の成熟肝細胞に近い性質を持つ細胞を誘導することを目指す。

③ ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その3)熊本大学

熊本大学発生医学研究センターでは、これまでマウス ES 細胞から内胚葉系の細胞への分化誘導法の技術開発研究を進めてきており、支持細胞を用いる独自の共培養系を開発した。本方法は肝臓を含む内胚葉系の細胞への分化誘導の効率が高く、しかも非常に簡便に、大規模に分化した細胞を得ることが出来る(国際出願 PCT/JP2005/310324)。本事業ではこの支持細胞との共培養方法を用いて、成熟肝臓への分化誘導に向けてより適した培養条件を検討する。最終的にヒト ES 細胞から高効率で肝細胞への分化誘導を行う技術確立することを目的として研究開発を行う。中間目標としては、(1) マウス ES 細胞から肝細胞への分化誘導技術の検討:一連の分化誘導過程を数ステップに分けて、それぞれのステップにおいて分化誘導に適した成長増殖因子などの条件検討を行い、分化誘導条件を最適化する。(2)ヒト ES 細胞を用いて成熟肝細胞への分化誘導方法を検討し、成熟肝細胞の誘導方法を確立する。最終目標として、開発した分化誘導技術を用いて、ヒト ES 細胞から正常な成熟肝細胞を誘導する。分化途上と分化最終段階の細胞について遺伝子発現プロファイル解析、ならびに機能解析を行い、正常な成熟肝細胞に近い肝細胞の創製を目指す。

(3) 研究成果

① ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その1)京都大学

ア. 未熟な肝前駆細胞から成熟肝細胞への分化誘導効果のあるマウス胎児肝臓由来のストローマ細胞の特性解析

京都大学ではマウス胎児肝臓に存在する間葉系細胞のThy1 陽性の細胞が共培養によって肝前駆細胞の成熟化を促進することを見出した^[1]。さらに詳細な検討を行いCD45⁻CD49f[±]Thy1⁺gp38⁺の分画の細胞(以下Thy1⁺gp38⁺細胞と称する)のみが、肝前駆細胞の成熟化を促進することをつきとめることに成功した^[2]。

イ. 未熟な肝前駆細胞から成熟肝細胞への分化誘導効果のある細胞株の探索

この共培養に必要なストローマ細胞の調整が困難であるという問題点があり、調整の容易な細胞株で代用できるならば肝細胞の分化誘導を効率よく行うことが期待できる。そこでマウスES 細胞由来内胚葉細胞と共培養し肝細胞への成熟化能を有する細胞株の探索を進めたが、どれも効果がないことを見出した。

ウ. マウス胎児肝臓由来のストローマ細胞株の樹立と肝成熟に関する効果の検討

ア、イの成果に基づき、幹細胞創薬研究所においてマウス胎児肝臓 (E13.5)の肝臓から、フローサイトメトリーでThy1⁺gp38⁺細胞分画をソート・アウトした。得られた細胞に温度感受性SV40 large

T antigen を遺伝子導入し、持続的に増殖する細胞をピック・アップして細胞株を得ることが出来た。この得られた細胞株と、マウス胎児肝前駆細胞あるいは、マウスES細胞由来alpha-fetoprotein (AFP)産生細胞とを実際に共培養してみると、共培養時のみRT-PCR では肝臓発生後期のマーカーであるTAT やG6P の発現が認められ、さらにはグリコーゲンの産生・蓄積を示すPAS 染色で陽性となった。これらの細胞株は依然としてヘテロな細胞集団であるため、この細胞株をクローン化しその中で最も肝細胞成熟可能を持つクローンを獲得することに成功した(以下MLSgt20細胞株と称する)。この細胞株と共培養することにより、マウス肝臓由来肝前駆細胞およびマウスES細胞由来AFP産生細胞が成熟肝細胞マーカーを発現することを示した。この肝成熟化能は、コンディションドメディウムだけでも固定した細胞でも示されることはなかった。さらに成熟化していることを確認するために、肝細胞機能として培地中のアンモニア除去能(図1A)、アルブミン分泌能(図1B)およびチトクローム酵素活性(図1C)で、形態観察として電子顕微鏡(図1D)で、検討した。その結果、我々の細胞株と共培養した群のみ肝細胞成熟化能を示した。以上の実験により、肝細胞成熟化能を有する細胞株を作製できたことが示された^[3]。

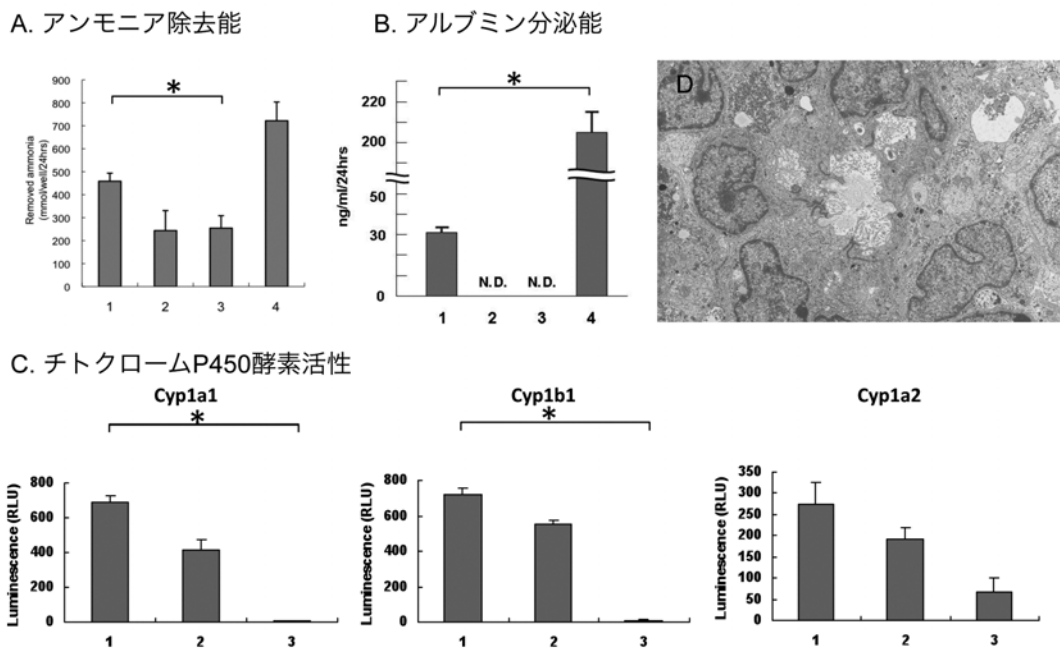


図1 MLSgt20細胞と共培養したマウスES細胞由来AFP産生細胞。(A) アンモニア除去能、および (B) アルブミン分泌能。1; MLSgt20細胞と共培養したマウスES細胞由来AFP産生細胞、2; マウスES細胞由来AFP産生細胞単独培養、3; MLSgt20細胞、4; 成体マウス肝細胞。(C) チトクロームP450酵素活性。1; MLSgt20細胞と共培養したマウスES細胞由来AFP産生細胞、2; マウスES細胞由来AFP産生細胞単独培養、3; MLSgt20細胞。(D) 共培養したマウスES細胞の電子顕微鏡像。成熟肝細胞に特徴的な像を呈している。文献3より改変して引用。

エ. 肝細胞特異的に発現するプロモーター/レポーターベクターの構築とその検定

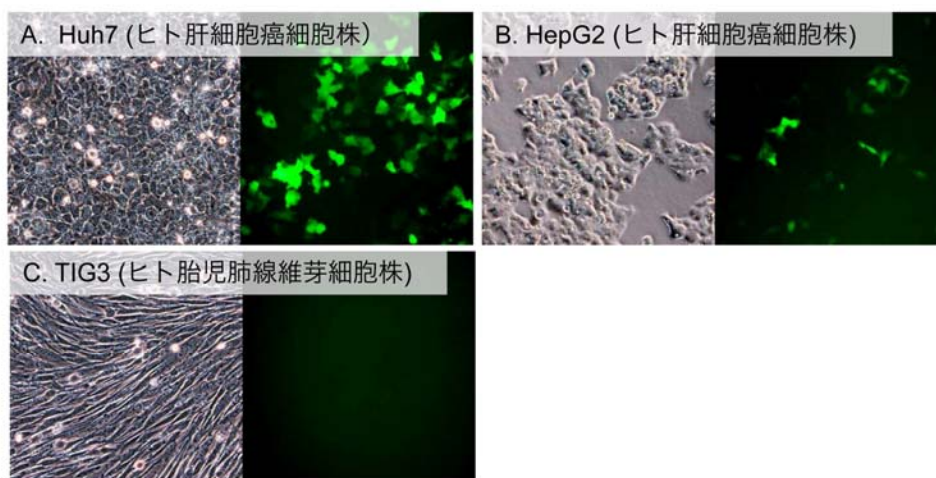


図2 ヒトAFPエンハンサー/プロモーターEGFPベクター導入ヒト各種細胞株. 文献4より改変して引用.

肝前駆細胞を分離・生成することを可能とするべく、レポーターベクターの構築を行った。内胚葉特異的なマーカーとして、AFP に注目して研究開発を進めた。AFP は胎児肝細胞や肝前駆細胞、腹側前腸内胚葉などに発現しており、胎児期の主要な血清蛋白質であることから同じ内胚葉マーカーであるアルブミンと比較して多量に発現していると考えられ、マーカーとして適当であると考えた。ヒト AFP のエンハンサー/プロモーター領域をクローニングし、そのプロモーター活性の下に、レポーター遺伝子である EGFP を導入した数種類のベクターを構築した。このベクターをヒト肝細胞癌由来細胞株である Huh7 や HepG2 に導入すると、AFP を発現しているため EGFP の蛍光を認めた(図 2A, B)。しかしながらヒト胎児肺由来線維芽細胞株である TIG3 へ遺伝子導入しても AFP を発現していないため、EGFP の発現は認めなかった(図 2C)。このように我々が構築したレポーターベクターは、これを遺伝子導入すると、AFP の発現に伴い EGFP が発現するという、意図した機能を有することが分かった。

オ. 肝細胞特異的に発現するプロモーター/レポーターベクターを導入したヒトES 細胞株の樹立
このAFP-EGFP ベクターを実際にヒトES 細胞へ遺伝子導入し、安定導入株をそれぞれ約30株得ることが出来た。しかしながら、ヒトES 細胞では頻繁に生じるsilencing という現象のためと思われるが、実際にヒトES 細胞を分化させてAFP を発現するようになってもEGFP の蛍光を認めないという株が多かったが、その中でAFP とEGFP とが同一細胞で発現する株をKhES-3株において樹立することに成功した(図3)。

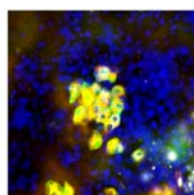


図3 遺伝子導入KhES-3ヒトES細胞株. 黄色い細胞はAFPとEGFPとが同一の細胞で発現していることを示す.文献4より改変して引用.

カ. ヒトES細胞から肝前駆細胞への分化誘導

上記、ヒトAFPエンハンサー／プロモーター下にEGFPを発現する遺伝子導入ヒトES細胞を用いて様々な細胞外基質と増殖因子との組み合わせで分化誘導効率を検討したところ、マトリゲル上でアクチビンAおよびhepatocyte growth factorを加えると21%程度のAFP-EGFP誘導効率を得ることができ、さらに細胞数収量も多く獲得できることが分かった(図4A-H)。この方法により得られた内胚葉細胞はまず中胚葉のマーカを出現してから内胚葉へと分化してきたことから、definitive endodermに相当することが示唆された(図4I)。さらに複数のヒトES細胞株においても我々の分化誘導法が有効であることが示された(図4J)^[4]。

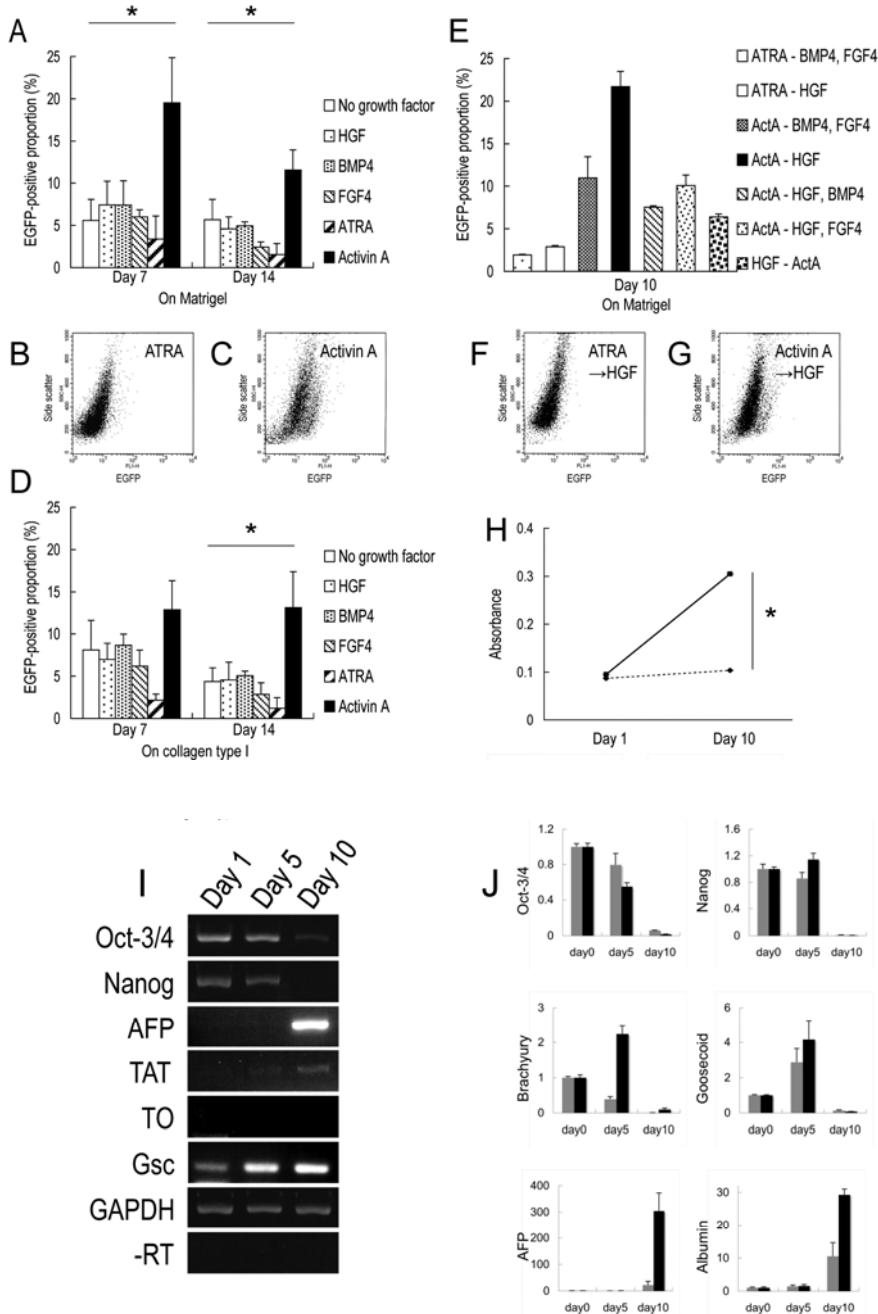


図4 (A-H) ヒトES細胞をマトリゲル上で、アクチビンAおよびhepatocyte growth factor添加により約21%の細胞がAFPを発現する。さらに細胞増殖も良い。(I) RT-PCR解析。(J) 定量的PCR。グレー；KhES-1細胞株、黒；KhES-2細胞株。文献4より改変して引用。

これらの結果は、ヒトES細胞からAFP産生肝前駆細胞様細胞への高効率かつ高収率の分化誘導法を確立したことを意味する。

キ. ヒトES細胞由来肝前駆細胞から機能性肝細胞への成熟化

MLSgt20細胞を用いてヒトES細胞から機能性肝細胞へと成熟させることを目的とした。前項で既述のごとく、AFPエンハンサー／プロモーター下にEGFPを発現するヒトES細胞をマトリゲル上でアクチビンAおよびhepatocyte growth factorを用いてAFPを産生する初期肝細胞へと分化させた。AFP産生細胞をフローサイトメトリーで分離した後に、MLSgt20細胞と混合し浮遊培養することにより共培養を行った(図5)。

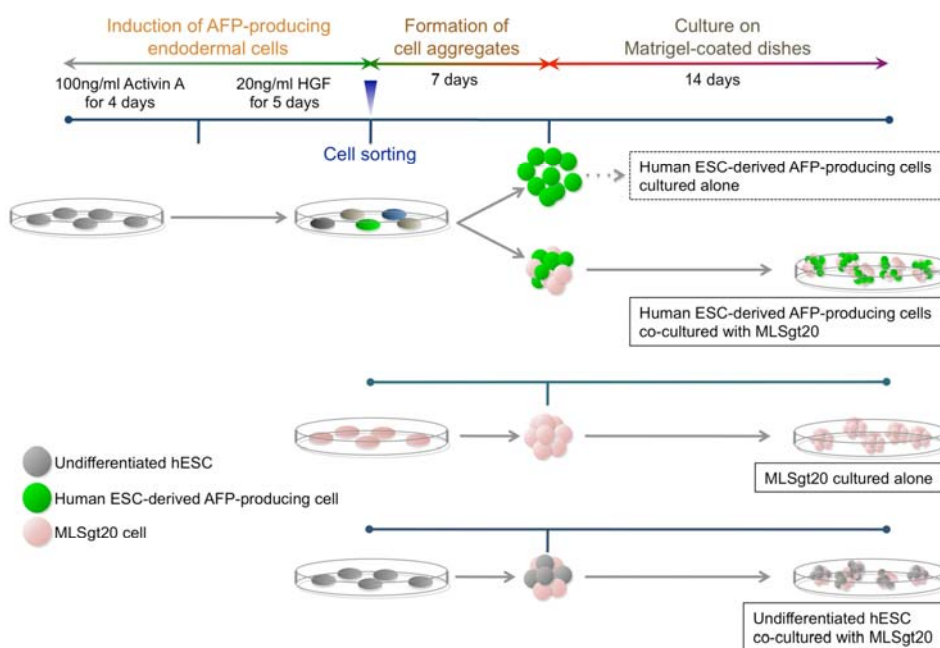


図5 MLSgt20を用いたヒトES細胞分化成熟化法の概要。文献5より引用。

共培養で得られた細胞は2核を有するアルブミン陽性の細胞であり(図6A), RT-PCRにて成熟肝細胞マーカーを発現していた(図6B)。

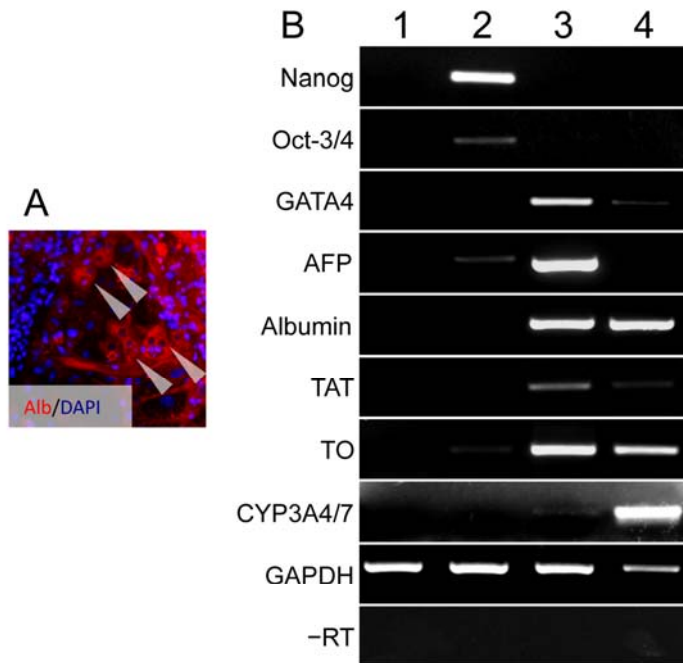


図6 MLSgt20細胞と共培養したヒトES細胞. (A) ヒトES細胞はヒトアルブミン陽性であり、ときに2核の形態を示す(矢頭). (B) RT-PCR. 1; MLSgt20細胞, 2; 未分化ヒトES細胞とMLSgt20細胞の共培養群, 3; MLSgt20細胞と共培養したヒトES細胞由来AFP産生細胞, 4; ヒト成体肝臓.文献5より改変して引用.

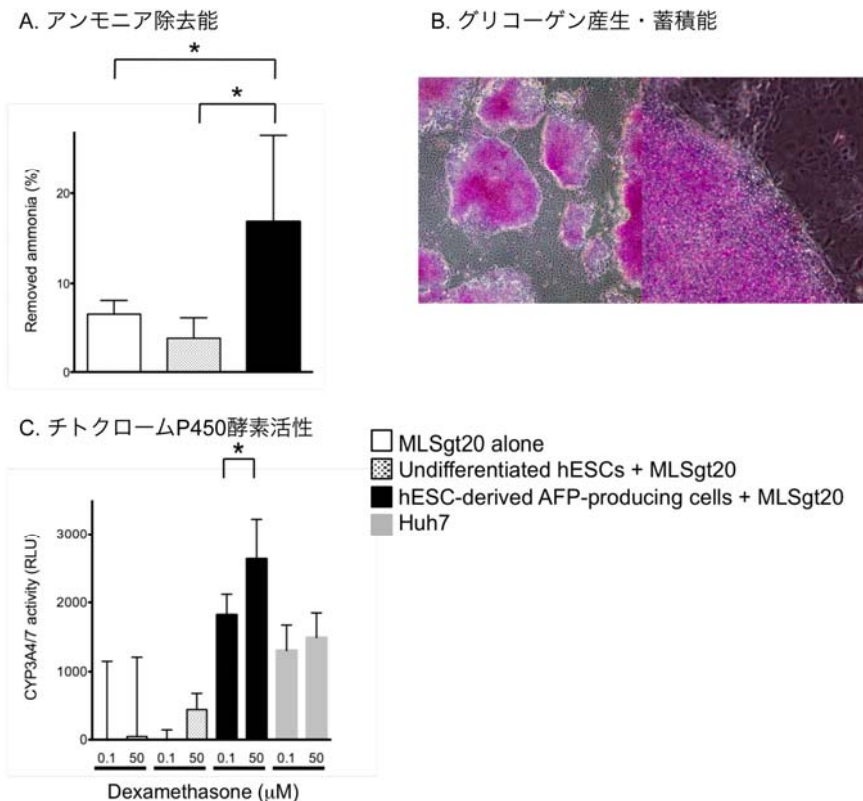


図7 MLSgt20細胞と共培養したヒトES細胞由来肝細胞の細胞機能. (A) アンモニア除去能, (B) PAS染色(赤色被染色部分がグリコーゲンの存在を示す), (C) チトクロームP450酵素活性. 文献5より引用.

さらには肝細胞機能であるアンモニア除去能(図7A)やグリコーゲン産生・蓄積能(図7B)を有していた. また, 高いチトクロームP450酵素活性を持ち, さらにはデキサメサゾンによるチトクローム

P450酵素が約1.45倍誘導されたことから、より生理的な肝細胞機能を有していることが示唆された(図7C)。このチトクロームP450酵素活性はヒト肝臓由来細胞株であるHuh7よりも高いことも示された。一方、未分化ヒトES細胞を直接MLSgt20細胞と共培養しても肝細胞成熟化を示さなかった。以上により、MLSgt20細胞を用いた共培養法により、ヒトES細胞由来初期肝細胞から機能性肝細胞へと成熟させることに成功した^[5]。

参考文献

1. Ishii T, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Baba S, Naito M, Machimoto T, Kamo N, Suemori H, Nakatsuji N, Ikai I. In vitro differentiation and maturation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Exp Cell Res.* 2005; 309(1): 68-77.
2. Kamo N, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Machimoto T, Ishii T, Fujita N, Tsuruo T, Yamashita JK, Kubo H, Ikai I. Two populations of Thy1-positive mesenchymal cells regulate in vitro maturation of hepatic progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292(2): G526-34.
3. Fukumitsu K, Ishii T, Yasuchika K, Amagai Y, Kawamura-Saito M, Kawamoto T, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, Ikai I, Uemoto S. Establishment of a cell line derived from a mouse fetal liver that has the characteristic to promote the hepatic maturation of mouse embryonic stem cells by a coculture method. *Tissue Eng Part A.* 2009; 15(12): 3847-56.
4. Ishii T, Fukumitsu K, Yasuchika K, Adachi K, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, Ikai I, Uemoto S. Effects of extracellular matrixes and growth factors on the hepatic differentiation of human embryonic stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008; 295(2): G313-21.
5. Ishii T, Yasuchika K, Fukumitsu K, Kawamoto T, Kawamura-Saitoh M, Amagai Y, Ikai I, Uemoto S, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N. In vitro hepatic maturation of human embryonic stem cells by using a mesenchymal cell line derived from murine fetal livers. *Cell Tissue Res.* 2009; *in press.*

② ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その2)幹細胞創薬研究所

ア. ヒト ES 細胞の内胚葉系・肝前駆細胞系への分化誘導

熊本大学・糸研究室で開発された支持細胞(M15細胞)を用いる肝前駆細胞分化誘導法を導入し、ヒトES細胞の内胚葉系・肝前駆細胞系への分化誘導の条件の検討を行った。KhES-1, KhES-2, KhES-3細胞株を支持細胞と共培養した結果、それぞれ肝前駆細胞の分化マーカーであるAFP、肝細胞マーカーのアルブミン、胆管マーカーのサイトケラチン19がそれぞれ免疫染色で陽性となった。また、部分的ではあるが細胞質が高密度で時に二核の細胞も現れ肝細胞に良く似た形態を示した。次に支持細胞へ播種する際のES細胞の細胞塊の大きさを $\sim 40\ \mu\text{m}$ 、 $40\sim 70\ \mu\text{m}$ 、 $70\sim 100\ \mu\text{m}$ 、 $100\ \mu\text{m}\sim$ に分けて分化マーカーをRT-PCRで比較したところ、 $40\sim 70\ \mu\text{m}$ に揃えた場合にAFP、アルブミンの発現が共培養7日目で確認でき早期に分化が誘導されることが認められた。分化マーカーの発現レベルや細胞の形態から、肝細胞分化誘導に用いる細胞株をKhES-3に決定した。KhES-3細胞をM15細胞と共培養すると、肝細胞様の細胞が数多く出現した。これらの細胞を回収しRT-PCRを行った結果、薬物代謝酵素のCYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4、CYP7A1が発現されていることが証明された。これらの薬物代謝酵素の発現パターンは共培養初期に現れ長期間発現が維持されるもの、培養期間途中で現れ消失するもの、培養期間に応じて発現が高くなるもの、の3通りに分かれた。これらの発現プロファイルが長期間高く維持される条件を検討することとし、ウ以下の実験を行った。

イ. マウス胎仔肝臓由来ストローマ細胞株の樹立

(2)②に記したように、肝細胞成熟支持能を持つマウス胎仔肝臓由来ストローマ細胞は初代培養

で調製しなければならず、細胞数の制限や細胞の性質の均一性などの問題点を残している。京都大学石井先生等の方法(Exp. Cell Res., 309: 68-77, 2005)に従ってマウス胎仔肝臓由来ストローマ細胞の初代培養から Thy1、gp38 共に陽性の細胞を得た後、Neomycin 耐性ベクターに組み込んだ温度感受性 SV40-T 抗原遺伝子を Lipofectamine 2000(Invitrogen)を用いてリポフェクション法により導入した。薬剤(G418)添加培地で継代培養することにより SV40-T 抗原遺伝子安定導入細胞株を樹立した。本細胞は低温条件(33°C)での培養で SV40-T 抗原の働きで高い増殖能を有し、継代を続けた後にも分取条件の Thy1、gp38 抗原を保持していた。また、①ウに記されているように、京都大学での解析で本細胞株は共培養下でマウス胎児肝前駆細胞やマウス ES 細胞由来 AFP 産生細胞を成熟肝細胞へ誘導する能力を持つことが明らかになった。このように、本細胞株は不死化後も期待された元々のストローマ細胞の性質を保持しており初代培養で調製することによる問題点は解決できた。本細胞株からクローンを 73 個分離したので、個々のクローンの肝細胞成熟支持能について京都大学でさらに詳細に調べ、より目的に合う細胞を選択した結果、クローン 20(MLSgt20:fetal mouse liver stroma gp38+ Thy1+ cell line clone 20)がマウス及びヒト ES 細胞由来肝前駆細胞を機能性肝細胞へ成熟誘導する能力を持つことが判明した。詳細は前項京都大学の記載を参照。

ウ. ヒト ES 細胞からの肝細胞分化・成熟誘導

ア、イにより当初目標としていた熊本大学と京都大学の技術を融合させ、ヒト ES 細胞由来の肝細胞を高効率に創出する可能性が高い培養条件が整ったので実行に移した。アに示した方法で KhES-3 細胞を肝細胞へ分化誘導を支持する M15 細胞上で共培養を行った後に細胞塊を回収し、さらにイの不死化ストローマ細胞株との共培養を行った結果、支持細胞上では 2~3 週間で発現がピークを迎えその後低下してしまった薬物代謝酵素(CYP1A2、CYP7A1)の発現が促進あるいは維持されていた。また、その他の酵素についても発現が強く促進されたものもあり(CYP2A19、CYP3A4)、本共培養系がヒト ES 細胞由来の肝細胞成熟支持に少なくとも主要な薬物代謝酵素の発現については有効であることが証明された。

M15 細胞との共培養による初期分化誘導条件を検討した結果、M15 細胞、KhES-3 細胞共に播種密度を上げることでアルブミン陽性細胞出現率が高まり分化効率が上がることが確認された。さらにこれらの細胞を回収しコラーゲンコート皿に再播種することにより肝前駆細胞が増殖しアルブミン、OATP1B1 の発現が高まることが分かった。また、M15 細胞上で薬物代謝酵素 CYP3A7 を主に発現していたものがコラーゲンコート皿に植え替え後 CYP3A4 も発現するようになることが PCR 産物の制限断片長多型解析で判明し、発生過程で胎児型 CYP3A7 から成人型 CYP3A4 へスイッチングが見られるのと同様な現象が生じることが認められた。次に、肝細胞初代培養において立体的な構造を取らせる方法で肝細胞としての機能が維持・増強できるとの情報に基づき、三次元培養を試みた。M15 細胞上で肝前駆細胞に初期分化誘導した KhES-3 細胞を回収後、コラーゲンコート皿上に再播種することで肝前駆細胞を増幅した。続いてこの肝前駆細胞と MLSgt20 細胞とを混合し超低接着性のプレートに植え込んだ。この状態で培養すると細胞は互いに集合して集塊を形成し、“スフェロイド”と呼ばれる構造を取るようになった。スフェロイド構造を取った肝細胞様細胞は薬物代謝酵素 CYP3A4 を高く発現する場合があります、本酵素を誘導するこ

とが知られているリファンピシンを投与することにより発現誘導も生じた。しかしながらスフェロイド培養による薬物代謝酵素発現亢進や化合物による発現誘導の再現性は低く、肝モデル細胞としての利用にはさらなる条件検討を要すると考えられた。

一方、M15 細胞との共培養による初期分化誘導、コラーゲンコート皿への再播種による肝前駆細胞の増幅というステップで得られる肝細胞様細胞は肝機能関連遺伝子発現について再現性が高く、大量の肝前駆細胞を調製する方法として発展させることとした。M15 細胞共培養、コラーゲンコート皿再播種で培養した細胞をさらに酵素処理で分散し、新たにコラーゲンコート皿に再播種したところ、スフェロイド状の細胞集塊が形成された。この細胞集塊中の細胞はアルブミン、CYP3A4/7 の免疫染色に強陽性を示し、肝機能保持細胞集団であることが示唆された。CYP3A4/7 陽性細胞の比率は FACS 解析の結果約 10%の割合であった。これらの細胞は薬物代謝酵素 CYP3A4 及び CYP3A7 とともにデキサメタゾン及びリファンピシンにより発現が誘導された。特に成人肝で薬物代謝に主要な役目を果たす CYP3A4 については遺伝子発現誘導とともに酵素活性そのものの亢進も認められた。さらにこの亢進現象は免疫染色で CYP3A4/7 陽性細胞集塊が数的に増えるということで捉えることに成功した。本プロジェクトの目標の一つとするところの創薬基盤研究に資するモデル細胞としての肝細胞に要求される薬剤応答性を備えたものが創出できたといえる。これらの細胞において、多糖類の貯蔵を PAS 染色で、排出型トランスポーター MRP2 活性を特異的基質の排出でそれぞれ確認できている。また、この細胞集塊はヒト ES 細胞用分散液とトリプシンとの段階処理で集塊のまま回収することが可能で機能保持細胞を大量に取得する目処がついた。

エ. 分化誘導技術のヒト iPS 細胞への適用

今回開発された肝細胞分化誘導技術をヒト iPS 細胞へ適用し、その汎用性を確認した。ヒト ES 細胞については KhES-1、2、3 を比較した結果 KhES-3 株が分化誘導効率が高いことが判明し、その後の実験に供した。今回試した iPS 細胞は WiCell 社の IMR90-1、IMR90-4、fskin-1、京大株の 201B7、253G1 の 5 株のうち、IMR90-1、IMR90-4、201B7 を用いた。これらのうち IMR90-4 細胞が最も KhES-3 株と挙動が類似しており、開発された分化誘導法を適用したところ、肝機能関連蛋白質の免疫染色及び遺伝子発現で KhES-3 株に匹敵する結果となった。これにより本研究で開発された分化誘導法が iPS 細胞へ適用であることが判明した。

③ ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その3)熊本大学

ア. マウス ES 細胞を用いた分化誘導の検討

熊本大学では、マウス ES 細胞から内胚葉系の細胞への分化誘導法の技術開発研究を進めてきており、ES 細胞から肝臓を含む内胚葉系の細胞へ分化誘導できる独自の共培養系を開発した(桑ら、国際出願 PCT/JP2005/310324)。

マウス ES 細胞を用いて中内胚葉、胚性内胚葉そして未熟肝臓への各分化誘導のステップについて検討を行った。今年度は特に肝細胞への分化が決定される時期特異的に、分化誘導因子を添加したり除去したりすることにより、肝臓細胞への臓器特異的な誘導条件の最適化に焦点を絞り検討を行った。その結果、支持細胞存在下において、まず肝臓への分化誘導への前段階として、中内胚葉と胚性内胚葉への分化誘導のステップにおいて添加する成長増殖因子、および分

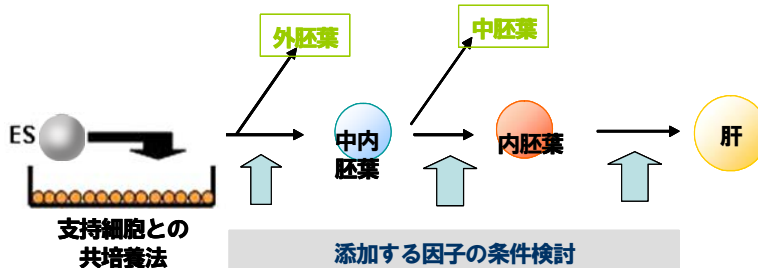
化誘導のタイミングの条件を最適化した。そしてその次段階として、胚性内胚葉から肝前駆細胞を誘導するための培養条件について、添加する因子の濃度、コンビネーション、タイミングを検討した(図1)。

その結果、高い効率で肝前駆細胞への分化誘導を達成できる培養条件を見出した。

誘導された肝細胞の成熟度について分子マーカーの発現により評価したところ、まず分

化誘導後 10 日目には α フェトプロテイン (AFP) 陽性 (+) の肝前駆細胞が出現してくるが、その後 18 日目頃には AFP+, アルブミン (Alb) + の肝芽細胞が検出され、さらに長期培養すると 30 日目頃には形態的にも、遺伝子マーカーの発現からでも区別できる、胆管細胞 (DBA; Dolichos biflorus agglutinin +) と肝細胞 (Alb+) のコロニーがそれぞれ分かれてくるのが観察された。このように、成熟段階の異なる肝細胞が正常発生に沿った形で分化誘導が達成されていることが強く示唆された(図2)。

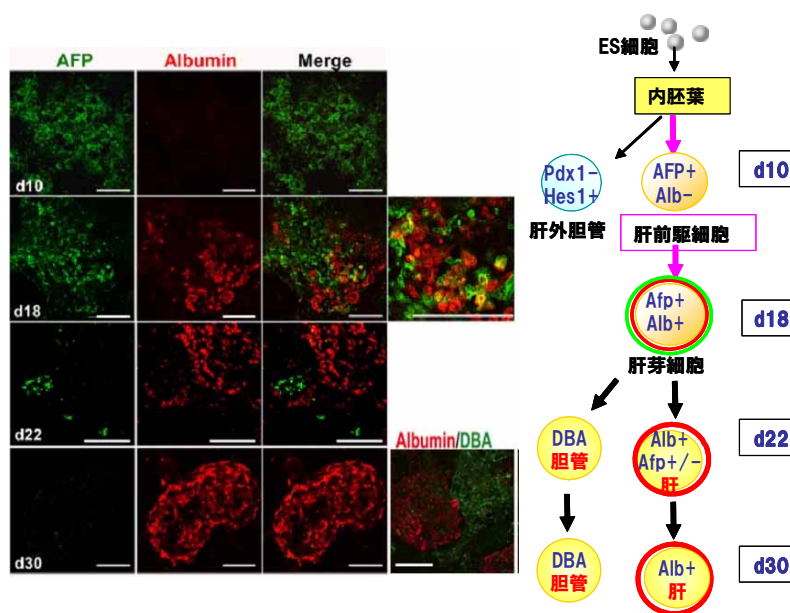
(図1) ES細胞から肝細胞までの分化誘導過程



(図2) 発生に沿った肝、胆管細胞系譜の分化

分化誘導された肝細胞の分化段階を調べるために、免疫組織染色、および real-time PCR を用いて、遺伝子発現について解析を行った。その結果、免疫組織染色法により、Alb 陽性細胞では α 1-trypsin、Cyp3A、Cyp7A1 が発現していることを確認した(図3A)。また、real-time PCR 法により、Alb、Keratin 19 (Krt19)、チトクロム P450 ファミリーの Cyp2b10、

Cyp3a11、Cyp3a13、hydroxysteroid sulfotransferase enzyme (Sult2a1)、UDP-glucuronosyltransferase (Ugt1a1)、organic anion transporting polypeptides (Slco1a4)、bile salt export pump (Abcb11) など解毒作用を有する酵素、チトクロム P450 代謝酵素、トランスポーターが発現していることを確認した(図3B)。さらに、グリコーゲンが蓄積されていることを PAS 染色により確認した(図3C)。



以上の結果を総合して考えると、本分化誘導方法により、分化成熟段階の高い肝細胞が誘導されていることが示唆された。

イ. サル

ES 細胞を

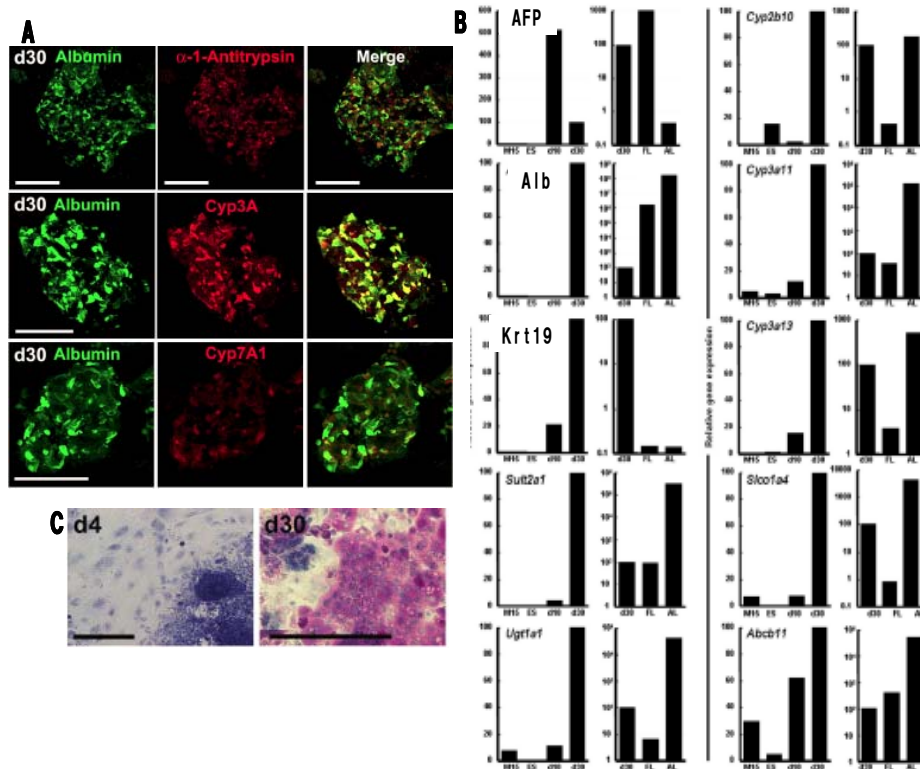
(図3) 成熟肝細胞の分子マーカーが誘導されている

用いた分
化誘導技
術の検討

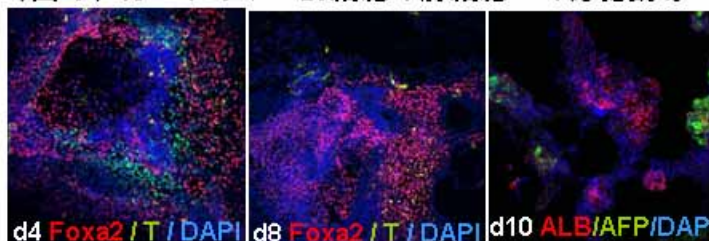
ヒト ES
細胞が使用
できるま
での間、カ
ニクイザル
ES 細胞を
用いて条件
検討を行っ
た。

図 4 には
サル ES 細胞につ
いての
4,8,10 日

目の分化細胞の染色像を示す。10日目にはすでに AFP, Alb 陽性細胞が誘導されている。以上の結果より、サル ES 細胞についても、マウス ES 細胞と同様に支持細胞を用いる誘導法が応用可能であることが明らかとなった。



(図4) カニクイザルES細胞の肝細胞への分化誘導



ウ.ヒト ES 細胞を用いた分化誘導技術の検討

マウス ES 細胞を用いた上記の培養条件を基にヒト ES 細胞を用いて検討を行った。その結果、ヒト ES 細胞の誘導には若干の日程の変更が必要であるが、基本的にはマウス ES 細胞と同様な条件で、正常発生に沿った形で、ヒト ES 細胞から肝細胞への分化したことが分かった。

現在の分化培養条件において、免疫組織染色法により、AFP 陽性細胞が非常に高い効率で分化誘導していることが分った。分化40日目には Alb 陽性の肝細胞のコロニーと DBA 陽性の胆管細胞のコロニーの2つの系譜に分かれる。マウス ES 細胞の場合に比べ、Alb 陽性の肝細胞のコロニーは DBA 陽性細胞のコロニーの割合よりも高いことから、ヒト ES 細胞ではより肝細胞へ分

化誘導されていることを示唆している(図5)。

ヒト ES 細胞から誘導された肝細胞について分子マーカーの発現を real-time PCR 法により検討を行った。かなり多くの分子マーカーの発現が確認できた。グリコーゲンの蓄積を示す PAS 染色が陽性であった(図5)。これらの成果を論文として報告している(Shiraki et al., Genes Cells, 2008)。論文発表後もヒト ES 細胞の分化誘導条件を至適化し、アルブミン分泌能がヒト成人肝初代培養細胞と同程度、10 日間ほど成熟培養でき、リファンピシンに反応して Cyp3A4 活性が上昇するヒト ES 由来肝細胞が得られるようになった(図6)。

以上の結果から総合すると、支持細胞を用いる分化誘導方法はヒト ES 細胞を成熟肝細胞に分化誘導へ分化誘導できることが明らかとなった。なお、この M15 細胞を用いた分化誘導系は従来法 plating 効率が 10 倍よいため、1/10のヒト ES 細胞で十分可能である(図6)。多数の肝細胞を効率よく分化誘導でき、かつヒト ES 細胞にも応用できることで大変有用である。M15 細胞で分化誘導後、第二段階として後述の sBM 基底膜培養基質に接続することで、成熟肝細胞を得ることができることも分かったので、大変有用な肝細胞の培養方法であることが大きな成果である。

(図5) ヒトES細胞の分化誘導

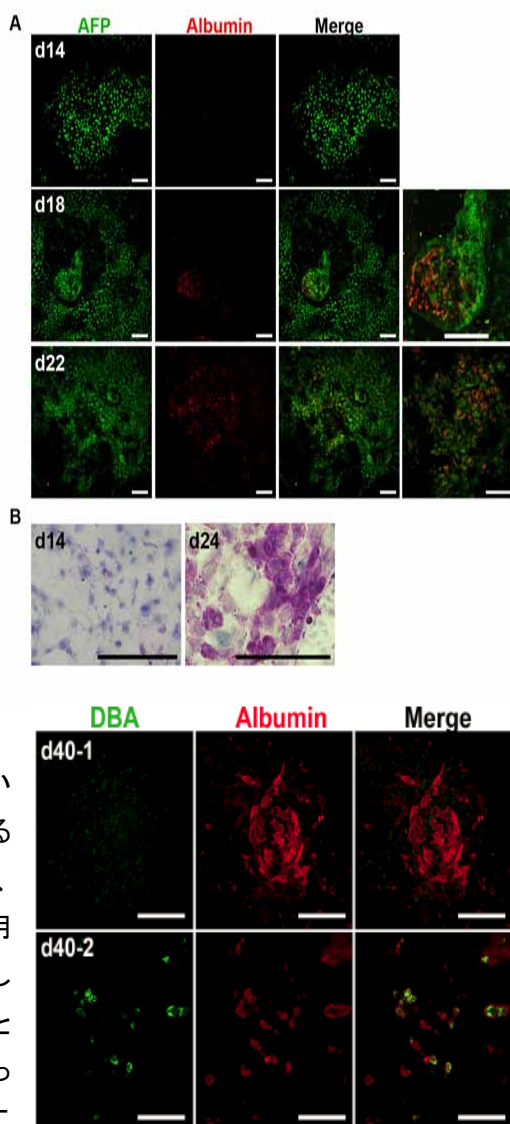
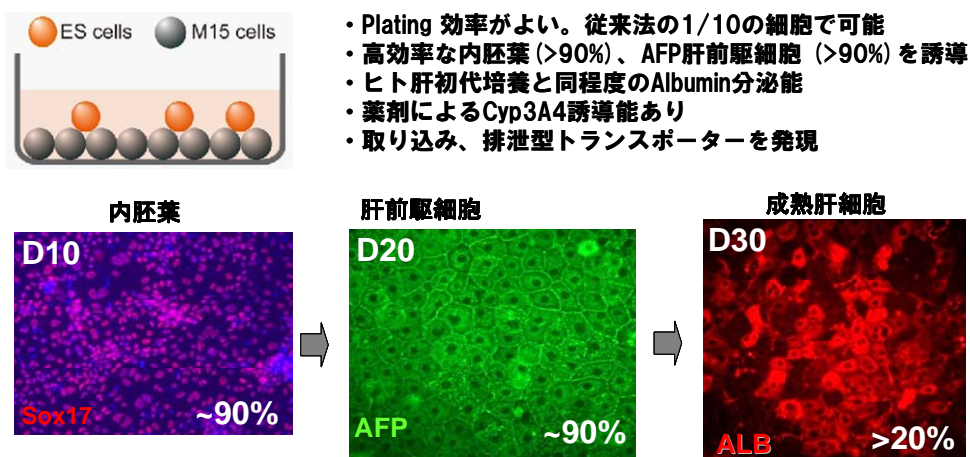


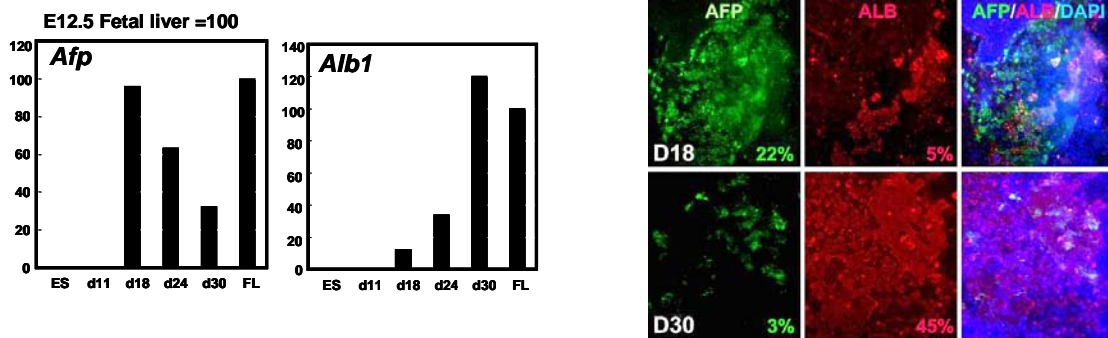
図6. M15細胞によるヒトES細胞から肝細胞の分化誘導



エ. 生きた状態で肝前駆細胞を追跡できる ES 細胞株の作成

肝前駆細胞を追跡できる ES 細胞株を創出するため、アルブミン遺伝子プロモーター200kb 程度を含む BAC クローンを用いて、アルブミンプロモーターの下流に蛍光タンパク質遺伝子(mKO1, monomeric Kusabira Orange1)を挿入した BAC コンストラクトを作成した。これをさらにアデノウイルスベクターに組み込み、埼玉医大三谷先生との共同研究により、ヘルパー依存性アデノウイルスの調製、ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞への導入による、ノックインヒト ES 細胞株及び iPS 細胞株を得た。これらのノックインヒト ES 細胞株から分化誘導した細胞におけるアルブミン蛋白と mKO1 の発現および他の機能分子の発現について検討を行った。

図7. sBM上でマウスES細胞が肝細胞へ分化誘導される



オ. sBMを用いた分化誘導の検討

オ-1. マウスES細胞

環境研の持立先生から提供された、ラミニン10安定発現株を用いた基底膜培養基質の作製技術により開発したsBMを用いて、分化誘導に対する効果について詳細に解析を進めた。sBM上で直接マウスES細胞を分化させることにより、マウスES細胞が効率良く内胚葉へ分化誘導されることを見いだした。図7に示すように、 α フェトプロテインの発現が18日目ピークに減少し、その後アルブミン発現が上昇した。30日目には45%程度のアルブミン陽性細胞が検出される。また、アルブミン分泌量はラット初代培養肝細胞の約1/10程度であった(特願2009-136520「細胞の分化誘導」)。M15細胞上で分化誘導した肝細胞とほぼ同程度であった。活性測定については、肝細胞へのインドシアニングリーン(ICG)の取り込み、肝細胞胆管側膜排泄型トランスポーター(Ntcp, Oatps)の基質であるCholyl-lysyl-fluorescein (CLF)蛍光色素のES細胞由来微細胆管への排出が観察された(図8)。

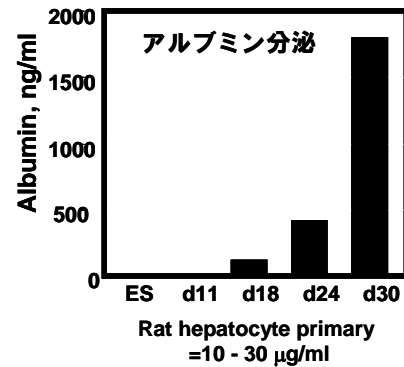
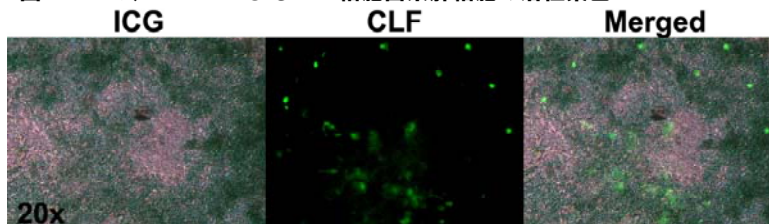


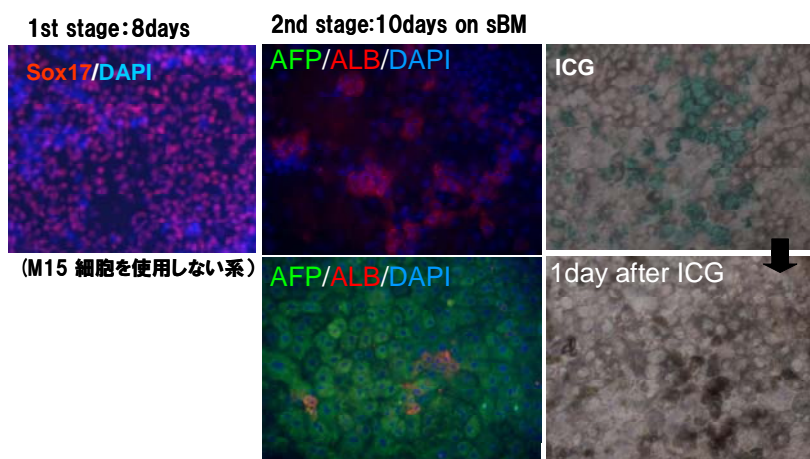
図8 ICG/CLFによるES細胞由来肝細胞の活性染色



オー2. ヒトES細胞の分化誘導

sBM上でのヒトES細胞の分化誘導も試みた。支持細胞を用いない系でまず内胚葉細胞を誘導し、sBM上に播種して10日間培養下細胞において、 α フェトプロテインの発現が見られ、アルブミン陽性細胞もその中に散在して存在した。機能アッセイとして、インドシアニングリーン色素の取り込みおよびその排出が見られた。従って、支持細胞を使用せずに、sBMを用いることでヒトES細胞から肝細胞が誘導されることが言える。

図9. sBM上でヒトES細胞からアルブミン陽性細胞を分化誘導可能



キ. 人工基底膜の肝細胞への分化誘導における有用性

大阪大学から提供を受けて、肝細胞への分化誘導における特定な基底膜の成分の有用性について評価を行った。

(4) 目標の達成度と意義

① ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その1)京都大学

これまでの文献報告の大半が単なる肝細胞マーカー発現のみで終わっていることでも示されている様に、ES細胞から肝細胞、特に成熟肝細胞への分化はきわめて困難であった。我々は、胎児肝に存在する間葉系細胞が肝成熟化能を持つという肝臓発生学の知見に基づき、肝前駆細胞ならびにES細胞を成熟肝細胞へと分化せしめる機能を有する細胞株MLSgt20を新たに樹立することに成功した。このような肝細胞成熟化能を持つ細胞株は他に報告がない。さらにMLSgt20細胞はマウス由来の細胞株であるが、ヒトES細胞に対しても肝細胞成熟化能を持つことが示された。本研究において作製されたヒトES細胞由来成熟肝細胞様細胞はチトクロームP450酵素活性を示した。しかも、この酵素活性は酵素誘導薬剤であるデキサメサゾンで増強するなど、生理的な応答を示していた。このような肝細胞機能を有するヒトES細胞由来肝細胞を得たとする報告はまだない。チトクロームP450酵素は肝臓における薬剤代謝の中心を担う酵素であり、この酵素活性を持つヒトES細胞由来肝細胞は創薬研究支援において大きな役割を持つことが予想される。

本研究で確立したMLSgt20細胞株の樹立やヒトES細胞の分化誘導法、肝細胞成熟化法は最終目標を達成していると同時に、世界的に見ても全く独創的かつ有益な成果であると思われる。そのことは本研究の成果がいくつもの国際誌に掲載されていることでも示されている。

② ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その2) 幹細胞創薬研究所

中間目標の(1)に挙げているマウス胎仔肝臓由来のストローマ細胞株の樹立に成功し、本細胞株が上記①にあるように、マウス ES 細胞の肝細胞成熟誘導能を持つことが確認できた。これにより、熊本大学の技術でヒト ES 細胞から高効率に分化誘導した肝前駆細胞から必要とされる量の成熟肝細胞を安定して誘導する培養系が確立される目処が立った。

この系を用い、実際に熊本大学の技術で分化誘導したヒト ES 細胞を本ストローマ細胞に移植したところ、本技術開発で最終目標としている創薬基盤研究に資するモデル細胞として指標とする主要な薬物代謝酵素群の発現が強く促進された。これを受けて現在、本培養系で分化誘導された肝細胞様細胞の薬物代謝酵素の活性を測定する段階にあり、中間目標は達成できたと考える。

中間評価で指摘を受けた分化効率について FACS 解析で約 10%の細胞が CYP3A4/7 陽性と実測値を求めることができた。この細胞集塊は選択的に回収可能なので実質的には 100% CYP3A4/7 陽性細胞を得ることができる。また、機能を持った肝細胞として薬剤の影響を評価する系の構築が求められたが、本技術開発において成人肝で薬物代謝に主要な役目を果たす CYP3A4 について、その遺伝子発現並びに酵素活性がリファンピシン、デキサメサゾン投与により誘導されることを捉えることができた。また、多糖類貯蔵能、トランスポーター活性、アルブミン産生能、各種肝機能関連遺伝子発現レベル等を総合的に判断すると本技術開発で得られた肝細胞分化誘導法は、薬剤のスクリーニングに資するモデル細胞の要件をほぼ満たしており、さらに方法の精緻化を図ることで薬剤評価系を構築する基盤は確立できた。最終目標は達成できたと考える。

③ ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発(その3) 熊本大学

中間目標の(1)に挙げているマウス ES 細胞から肝細胞への分化誘導技術の検討では、支持細胞の系はマウスのみでなく、サル ES 細胞についても効率よく肝前駆細胞を効率よく分化誘導したことが確認できた。肝細胞への分化誘導の一連の過程において促進因子、阻害因子についての知見を得た。自然胚発生過程における肝臓発生に関わる因子が、試験管内 ES 細胞を用いた分化誘導の系においても有効であることが確認できた。中間目標の(2)についても、サル及びヒト ES 細胞を用いて成熟肝細胞への分化誘導方法の検討を行った。また、現在の支持細胞を用いた分化誘導方法により、ヒト ES 細胞から成熟度の高い肝細胞が誘導できていることを確認している。従って、中間目標が達成できたと考える。今後は、幹細胞創薬研究所と連携し、誘導された肝細胞の活性測定、遺伝子発現パターンについての検討を行う段階に進められる状況になった。さらに、今後肝細胞系譜を生きた状態で追跡するために、BAC ベクターを用いた肝細胞特異的プロモーター/レポーター遺伝子コンストラクトを構築した。

本事業では、マウス ES 細胞を用いて、成熟肝臓への分化誘導過程において、各段階での必要な成長増殖因子の条件検討を行った。ヒト ES 細胞を用いて、支持細胞上で成熟化させる培養条

件の至適化を行った。この方法を用いてヒト ES 細胞より肝アルブミン陽性細胞が多く誘導出来る条件を見いだした。

一方、支持細胞を用いない方法として、本事業で開発したsBM を用いた方法により、ヒト ES 細胞より、肝アルブミン陽性細胞の誘導も成功している。その成熟度は支持細胞を用いた方法までは至らないが、支持細胞を用いない方法によるため、今後再生医療的な応用面、および肝分化成熟の分子機構解明に使用できる点において、その意味が大きい。

さらに、埼玉医科大学三谷教授との共同開発によるアルブミン/mKO1 ノックインヒト ES 細胞、およびノックインヒト iPS 細胞の創製により、成熟した細胞の純化・解析が可能になった。今後、この事業で開発したノックインヒト ES 細胞、iPS 細胞を用いて、成熟肝細胞を得るための薬剤スクリーニングに資するモデル細胞として薬剤評価系の構築に使用できる。これにより創製した肝細胞についての応用開発がさらに躍進し、展開出来ると考える。

2. 2. 4 分子構成を最適化した人工基底膜によるES細胞の分化誘導技術の開発

大阪大学
共同実施: 日本皮革研究所

生体組織における細胞の増殖と分化は、周囲の環境から提供される様々な情報に基づいて制御されている。この情報の主たる担い手は、周囲の細胞から分泌される液性因子と細胞の足場となる細胞外マトリックスである。細胞外マトリックスは、細胞表面の受容体と結合することにより、それ自身がシグナル分子として機能するだけでなく、様々な液性因子を結合することにより、それらの組織内での分布や濃度勾配の形成に深く関わっている。細胞外マトリックスの分子構成は、細胞ごとに異なっており、同じ細胞であっても発生や分化段階の違いによって変化することが知られている。このような細胞ごとに最適化された細胞外マトリックスを生体外で再構築することは、ES細胞の分化を選択的に誘導し、また、特定の分化形質を獲得した細胞を安定に維持するために不可欠である。

本課題では、多くの臓器実質細胞の直近の足場となっている基底膜に着目し、細胞ごとに最適化された基底膜の分子構成を解明し、それをできるだけ忠実に模倣した人工基底膜を設計・構築することにより、ES細胞を選択的に分化誘導する技術基盤を確立することを目的とする。具体的には、構成的基底膜分子であるラミニンと IV 型コラーゲンを組み合わせたものを第一世代の人工基底膜とし、これに細胞特異的に発現する基底膜分子を組み込んだものを第二世代人工基底膜として、細胞ごとに分子構成を最適化した人工基底膜を用いて、ES細胞を特定の細胞系譜に分化誘導する基盤技術の開発を行う。なお、(1) 細胞ごとに最適化された基底膜分子構成の解明、(2)ラミニンおよび他の基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の確立は大阪大学で行い、IV型コラーゲンの安定供給系の確立は日本皮革研究所で行う。また、(3)人工基底膜の再構築およびそれを用いたES細胞の選択的分化誘導制御は、大阪大学と日本皮革研究所が共同して実施する。

2. 2. 4. 1 細胞毎に最適化された基底膜分子構成の解明とデータベース化

大阪大学

(1) 事業目的と背景

細胞ごとに最適化された基底膜の分子構成とその発生および細胞分化に伴う時間空間的制御の全貌を解明するため、発生段階の異なるマウス胎仔および成体マウス組織を用いた基底膜蛋白質の生体内局在解析を行い、ES細胞の分化誘導および分化形質の安定化に有効な基底膜分子構成を解明する。基底膜蛋白質は、これまでに約 50 種が同定されており、中でもラミニン、IV 型コラーゲン、ニドゲン、パールカンはどの基底膜にも含まれる構成的構成分子である。ラミニンと IV 型コラーゲンには、それぞれ 11 種および 6 種の異なるサブユニット鎖があり、ニドゲンには 2 種類のアイソフォームが存在する。どのタイプのラミニン、IV 型コラーゲン、ニドゲンで基底膜が構築されているかは、細胞ごとに異なっている。これら 20 種の主要基底膜分子の他にも、細胞・組織特異的に発現する 30 近い基底膜分子が存在する。事業分担者は、これまでに 44 のマウス基底膜蛋白質に対する抗体を作製し、胎生 16.5 日の胎仔の全身における局在を免疫組織化学的に解析し、その染色結果を画像のまま収録したデータベースを構築している。本課題では、ES細胞の選択的分化誘導制御に有用な基底膜の分子構成を解明することを目的として、胎生 5.5～7.5 日、8.5～10.5 日、および 12.5～16.5 日のマウス胎仔における全基底膜蛋白質の局在を免疫組織化学的手法により網羅的に解析し、ES細胞の選択的分化誘導制御に必要な発生初期から中期までの基底膜分子構成の時間空間的制御の全貌を解明することを目的とする。

一方、これまでに同定された基底膜分子の他に、未同定の基底膜分子も残されている可能性は高い。細胞ごとに最適化された基底膜の分子構成を解明するためには、このような基底膜分子を新たに同定し、その局在を明らかにする必要がある。本課題では、このような未同定の基底膜分子の候補をゲノム情報に基づいて *in silico* で選別し、その基底膜への局在性を免疫組織化学的に検証する。また、ヒトES細胞の分化に伴う基底膜の分子構成の変化を解析するためには、ヒト基底膜蛋白質の局在解析に利用可能な組織染色適合抗体を整備する必要がある。主要なヒト基底膜蛋白質に対する組織染色適合抗体を整備するとともに、抗体ごとに組織染色条件の最適化を行う。

(2) 事業内容と目標

発生初期から中期にかけての胎生 5.5～7.5 日、8.5～10.5 日、12.5～16.5 日のマウス胎仔を対象として、主要基底膜分子 20 種(ラミニンおよび IV 型コラーゲンの全サブユニット鎖、ニドゲン-1 および-2、およびパールカン)の発現部位を免疫組織化学的手法により網羅的に解析する。具体的には、発生段階の異なる ICR マウス胎仔の全身薄切標本をこれまでに調製済みの 20 種の抗体で染色し、発生初期から中期にかけての基底膜分子構成の時間空間的変化の実体を明らかにする。また、胎生 12.5 日、14.5 日の染色標本については、高解像度のデジタル画像に変換後、インターネットで閲覧可能な画像データベース(“マウス基底膜ボディマップ”)に収録する。平成 18 年度は、胎生 5.5～7.5 日および 12.5～14.5 日のマウス胎仔における主要基底膜蛋白質 20 種の局在解析を完了することを目標とした。平成 19 年度～平成 21 年度は、解析の対象を胎生 8.5～

10.5 日のマウス胎仔および成体組織に拡大し、マウス発生のほぼ全過程を通じた主要基底膜蛋白質の発現プロファイルを心臓、肝臓、脳・血管に重点をおいて解明する。胎生 12.5～16.5 日の解析結果は、高解像度のデジタル画像に変換後、画像データのままデータベース化する。また、臓器実質細胞および臓器幹細胞周囲の基底膜分子組成について解析を進める。

これと並行して新規基底膜蛋白質を同定するため、分子量 20 万以上かつ機能未知の分泌性蛋白質をゲノム情報に基づいて抽出し、得られた候補蛋白質の生体内局在部位を免疫組織化学的に検索する。平成 18 年度は、Ensembl データベースの情報に基づいて分子量 20 万以上の機能未知分泌蛋白質を選別し、その中でも優先順位の高いものに関して抗体作製を行うことを目標とした。平成 19 年度は、得られた候補蛋白質の中でも肝臓の類洞に局在する蛋白質、胃や腸の基底膜直下に局在する蛋白質に焦点を絞り、その組換え蛋白質を作製し、生理機能の解明を目指した。また、ヒト基底膜蛋白質の局在解析に必要な抗体の整備を進めるとともに、抗体ごとに組織染色条件の最適化をはかる。平成 18 年度は、これまでに調製済みのヒトラミニン単クローン抗体の組織染色条件を最適化するとともに、ヒト基底膜蛋白質に対する組織染色適応単クローン抗体のスクリーニング条件を確立することを目指した。平成 19 年度は、その成果を踏まえて、アグリン等のヒト基底膜蛋白質に対する組織染色適合単クローン抗体の取得を目標とした。

(3) 研究成果

① 胎生 12.5 日および 14.5 日胚における基底膜分子構成の解析

ICR マウス胎生 14.5 日胚および 12.5 日胚の全身薄切標本を 11 種のラミニンサブユニット鎖、6 種類の IV 型コラーゲンサブユニット鎖、2 種のニドゲンおよびパールカンに対する抗体でそれぞれ免疫組織染色し、合計 20 種の主要基底膜蛋白質の局在部位を調べた(図1)。得られた染色標本は、500～1,000 の視野に分割して顕微鏡下で連続撮影し、各染色標本の高解像度のデジタル画像を取得した。また、デジタル画像の取得にライン CCD カメラを実

図1:マウス胎仔胚における主要 20 種の基底膜蛋白質の免疫組織染色(胎生 14.5 日胚)

11 種のラミニンサブユニット鎖、6 種の IV 型コラーゲンサブユニット鎖、ニドゲン-1 および-2、パールカンの各抗体の染色結果を示す。これらの染色標本は、胎生 12.5 日および 16.5 日の染色結果とともに高解像デジタル画像として「基底膜ボディマップ」データベースに収録されている。



装した Aperio ScanScope を導入し、染色標本のデジタル画像取得を効率化した。得られた画像は、高解像度のままインターネット上で閲覧可能なデジタルバーチャルスライドに変換し、既に画像データを取得済みの胎生 16.5 日胚の結果と合わせて画像データベース化した。この画像データベースを「基底膜ポディマップ」と呼んでいる。

収集された胎生 12.5～16.5 日胚における主要な基底膜構成分子 20 種の染色結果を基盤とし、必要に応じて特定の臓器の成体組織標本の染色結果も加味して、心臓など特定の臓器における基底膜の分子構成を解析した。

平成 19 年度からは「基底膜ポディマップ」データベースに新たに 15 種類の基底膜蛋白質の情報を追加し(後述の項目⑥を参照)、それらを含む計 34 種類の基底膜蛋白質の発現様式について解析を行った。

(ア)肝臓類洞における基底膜蛋白質の局在解析: 肝臓は肝実質細胞と類洞壁内皮細胞、クッパー細胞、星細胞、ピット細胞、胆管上皮細胞などの非実質細胞から構成されている。肝実質細胞は外分泌と内分泌の両方の作用を持ち、そのため肝臓の主な機能は肝実質細胞によって営まれている。肝実質細胞は類洞壁に間質マトリックスを介して接着している。この間質マトリックスには基底膜成分が含まれていることが知られている。マウス胎児および成体の間質マトリックスに含まれる基底膜成分を検討した結果、ラミニン α 1鎖が胎生 12.5 日の肝臓においてのみ検出されるのに対し、 α 4および β 2鎖は成体マウスで検出された。ニドゲンでは、ニドゲン-2 が胎児期において主要な構成成分として検出されたが、成体ではニドゲン-2 は減少し、それに代わってニドゲン-1 の発現が亢進していた。IV 型コラーゲン α 1, α 2鎖およびパールカンはいずれの時期の類洞にも存在していた。

(イ)心筋基底膜の解析: 心臓は最も早い時期から働く臓器のひとつである。E12.5 の心臓はすでに 2 心房 2 心室からなる。胎児期の心臓壁は緻密層と肉柱に分けられ、前者は増殖能を持つ細胞、後者は分化した細胞より構成される。肉柱は胎児心臓の拍動を担うが、成体になると緻密層に取り込まれ、その構造は消失する。

緻密層の心筋細胞は IV 型コラーゲン α 1, α 2鎖、ラミニン α 2, α 4, β 2, γ 1鎖、およびニドゲン-1、パールカンを構成的成分として発現していた。ラミニン β 2鎖は胎児期では検出されなかったが、成体では強く発現していた(図2)。一方、ニドゲン-2 は胎児期において強く発現するが、成体では血管にのみ認められ、心筋基底膜での発現は消失していた。これらのことから、胎児および成体心筋基底膜はラミニン β 2鎖とニドゲン-2 の発現パターンにより大きく区別されることがわかった。なお、IV 型コラーゲン α 3, α 4鎖およびラミニン γ 3鎖も成体でのみ発現していたが、その発現部位は乳頭筋に局限していた。一方、肉柱の心筋では緻密層の心筋基底膜構成成分に加え、IV 型コラーゲン α 5, α 6鎖およびラミニン α 5鎖が存在し、発生後期になるにしたがってその発現は亢進していた。これらの基底膜成分はいずれも成体心臓壁には存在しないことから、緻密層型心筋に特徴的な基底膜成分であると考えられる。

以上の結果を踏まえ、心臓壁緻密層の基底膜組成は以下のように推定された。

胎児心筋: IV 型コラーゲン (α 1)²(α 2)、ラミニン-211/221, 411/421、ニドゲン-1, -2、および

パールカン

成体心筋:IV型コラーゲン ($\alpha 1$) 2 ($\alpha 2$)、ラミニン-211, ラミニン-411、ニドゲン-1、パールカン

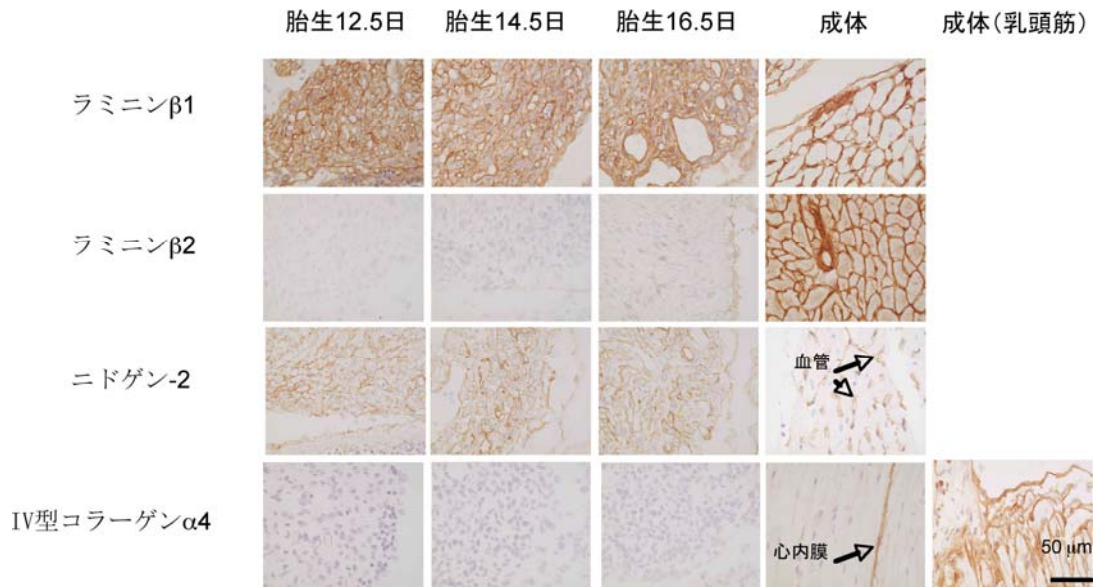


図2:心筋における基底膜分子構成の時空間制御 左心室心筋壁における基底膜蛋白質ラミニン β 1, β 2鎖、ニドゲン-2、IV型コラーゲン α 4鎖の局在部位を胎生12.5日、14.5日、16.5日の胎児および成体マウスで調べた結果を示す。

(ウ)消化管基底膜蛋白質の時空間的発現変化の解析: 原始的な消化管からは肝臓、膵臓、肺等が形成され、消化管自身も発生、分化の過程で前後軸に沿って領域化され上皮細胞の機能的特異化が進む。消化管の領域化には間充織からの作用が関わっていることは古くから分かっているが、そのシグナルを介在すると考えられる基底膜組成の知見はほとんどない。そこで、データベース化した胎生12.5~16.5日の画像情報から、新たにデータベースに収載した計34種類の基底膜蛋白質の消化管上皮細胞直下の発現レベルを、免疫組織染色の染色強度から解析した。調べた消化管の領域は食道、胃(胃底および胃体)、十二指腸、小腸、結腸、直腸である(図3A)。観察結果は染色強度により大きく3段階に分類し、部位ごとの類似性を比較した。12.5日胚消化管では26種類、14.5日胚消化管では28種類、16.5日胚では29種類の蛋白質の発現が認められ、すべての部位で発現しているものと部位特異性が見られるものがあった。

染色強度に基づいたクラスター解析により部位ごとの類似性を検討したところ、12.5日胚では部位による大きな組成の違いは認められなかったが、14.5日胚以降では食道、胃底、直腸からなるグループと胃体、十二指腸、小腸からなるグループに大別されることがわかった(図3Bに16.5日胚の解析結果を示す)。皮膚の基底膜組成も同様に評価し、そのパターンを比較したところ、食道、胃底、直腸のグループは消化管の一部でありながら小腸や胃体のグループよりも皮膚と近い基底膜組成を持つことが明らかとなった。小腸や胃体は腺構造をもつ単層上皮細胞からなる領域だが、食道や胃底は皮膚同様、重層化した上皮細胞で覆われている。これら二つのグループはラミニン α 3、 β 3、 γ 2、18型コラーゲン、MAEGの発現の有無で明確に区別されることがわかった。

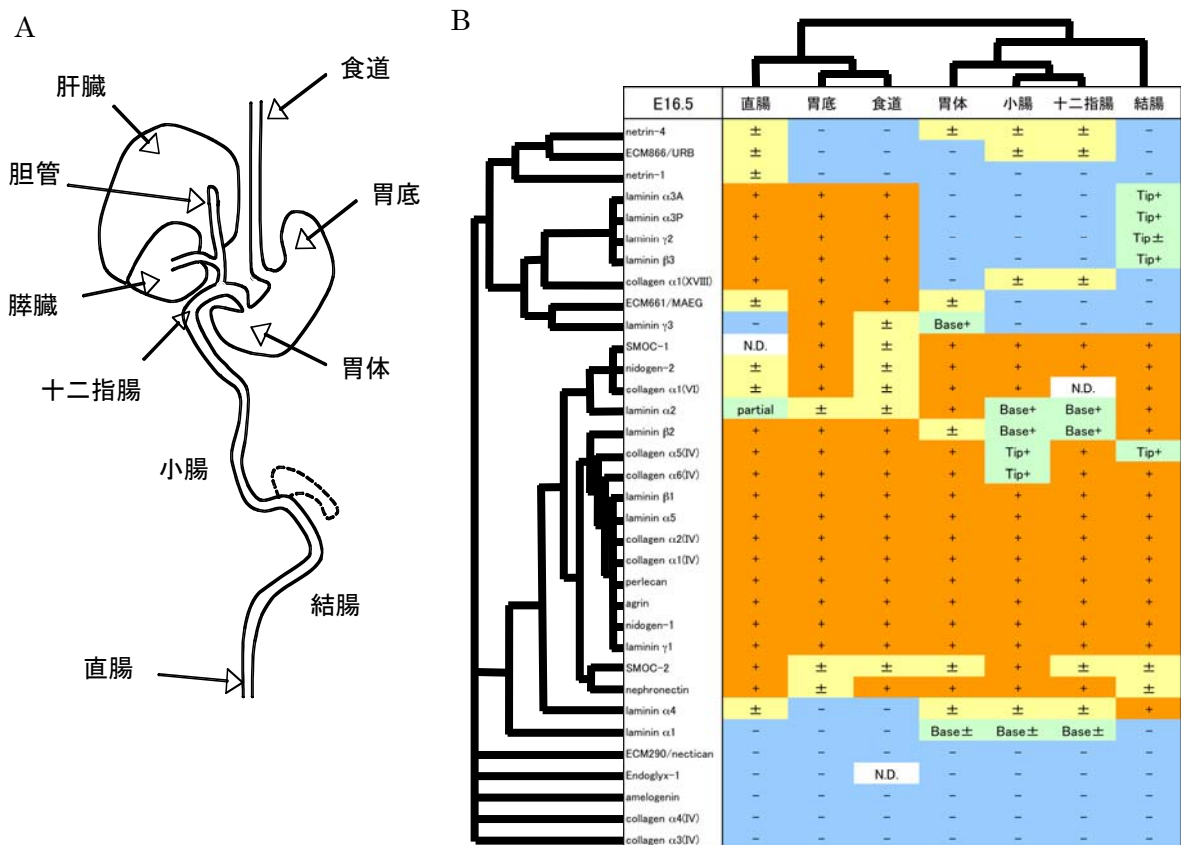


図 3: 消化管の概略図(A)とクラスター解析の結果の一例(B) 消化管の構造の模式図と部位名称を A に、部位ごとの各蛋白質の発現レベルとそれに基づくクラスター解析の結果を B に示す。B では発現パターンから得られた蛋白質組成および部位の類似性をそれぞれ左端、上端にデンドログラムで示してある。基底膜の組成が食道、胃底、直腸のグループと胃体、十二指腸、小腸のグループで大きく異なることがわかる。

基底膜組成の違いを生み出している代表例としてラミニン $\alpha 3$ をとりあげ、その発現パターンを単層上皮と重層上皮の境界部位(胃底と胃体の境界)で調べた(図4)。重層化の細胞マーカーである 2 種類のケラチンと多重染色を行ったところ、重層上皮のマーカーであるケラチン 14 陽性細胞はラミニン $\alpha 3$ を含む基底膜に接しており、一方単層上皮のマーカーであるケラチン 8 陽性細胞はラミニン $\alpha 3$ を含まない基底膜と接していた。この結果は、上皮細胞の形態と基底膜蛋白質の組成の間に明確な相関関係があることを示しており、基底膜の組成が細胞の分化方向の決定、もしくは分化形態の維持に関わる可能性を強く示唆している。

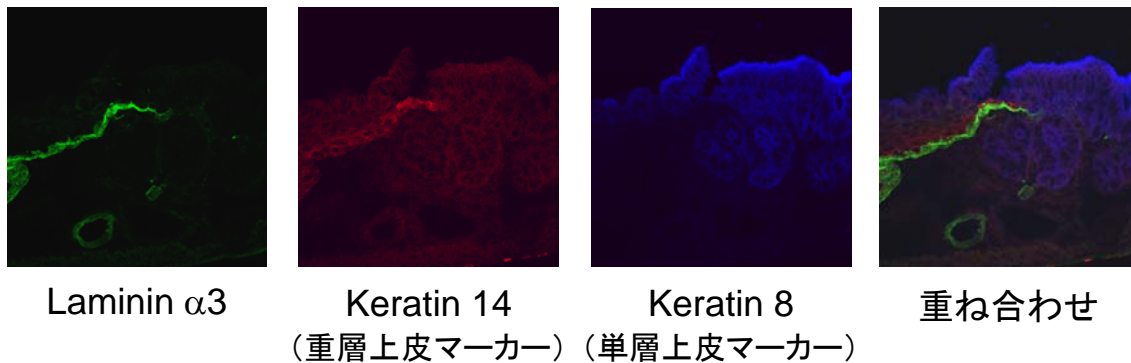


図 4: ラミニン $\alpha 3$ と単層および重層上皮細胞のマーカーとの三重染色 新生児マウスの胃底と胃体の境界部を写真下に示す蛋白質に対する抗体で染色した。右端に 3 種類の染色像をすべて重ね合わせた結果を示す。重層上皮細胞はラミニン $\alpha 3$ を含む基底膜上でのみ観察された。

(エ) 毛細血管における基底膜蛋白質の局在解析: 血管系の内壁は、心臓とつながる大血管から末梢の毛細血管まで連続した内皮細胞のシートで覆われており、内皮細胞はさらに基底膜によって裏打ちされている。毛細血管内皮細胞は均一でなく、組織ごとに特殊化した機能を持つことが知られている。すなわち、中枢神経系では血液脳関門として知られる強固なバリア機能を持ち、逆に腎系球体の血管は物質の輸送や濾過機能のために有窓の血管壁になっている。毛細血管の機能の違いが基底膜の組成の違いに反映されているかどうかを確認するため、マウス発生過程における脳内と皮下の毛細血管の基底膜蛋白質のプロファイリングをおこなった。その結果、12.5 日胚から 16.5 日胚まで両組織の毛細血管に共通して発現している蛋白質としてラミニン $\alpha 4$ など 15 種類が同定された。一方、WARP は脳内の毛細血管では 12.5 日胚から発現が確認できたのに対して、皮下では 16.5 日胚以降でしか検出できなかった(図5)。すなわち、中枢神経系の毛細血管基底膜では早い時期から WARP が局在し、他の末梢臓器の毛細血管の基底膜とは区別化されていることがわかった。この組成の違いが血液脳関門の形成と関係があるのか、ノックアウトマウスの解析等で明らかにできる可能性がある。

また、成体脳では毛細血管の先端は一部フラクトンと呼ばれる超微細な線維状構造をとり、脳室下帯の上皮細胞層近くに存在する神経幹細胞の足場を構築している、という報告がある。このフラクトン構造は、神経幹細胞のニッチとして機能しているという可能性がある。フラクトンの構成成分として、IV 型コラーゲン $\alpha 1, \alpha 2$ 鎖、パールカン、ニドゲン 1、ラミニン $\beta 1, \gamma 1$ 鎖がこれまでに報告されている。成体マウス脳の染色結果を詳細に調べた結果、ラミニン $\alpha 3B, \alpha 5, \beta 2$ 鎖、アグリリン、SMOC-1、XVIII 型コラーゲン、ネフロネクチンがフラクトンに局在することが明らかになった。一方、フラク톤は毛細血管の先端から伸びている構造にもかかわらず、ラミニン $\alpha 4$ などいくつかの血管基底膜に特徴的な蛋白質は検出されなかった(図6)。

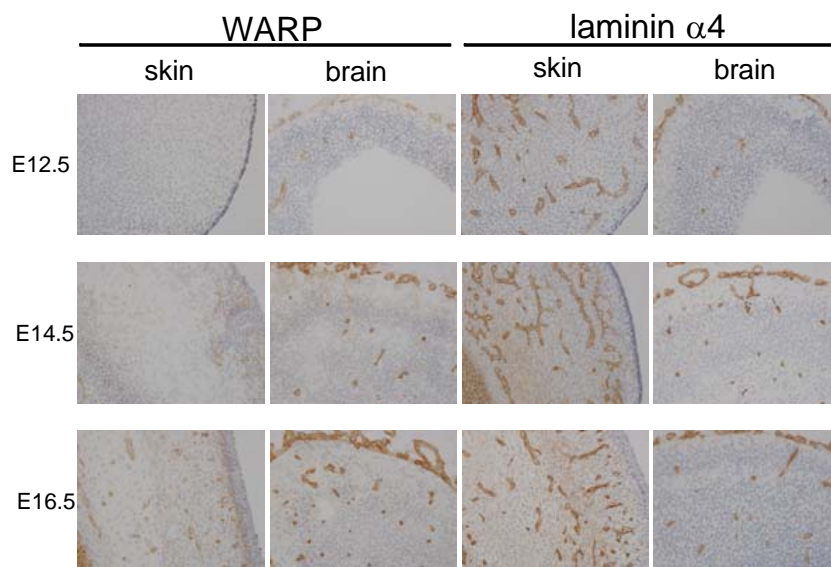


図 5 : 胎生期脳と皮膚の毛細血管における WARP とラミニン $\alpha 4$ の発現 胚性 12.5 ~ 16.5 日胚の脳と皮膚における WARP とラミニン $\alpha 4$ の染色像を示す。

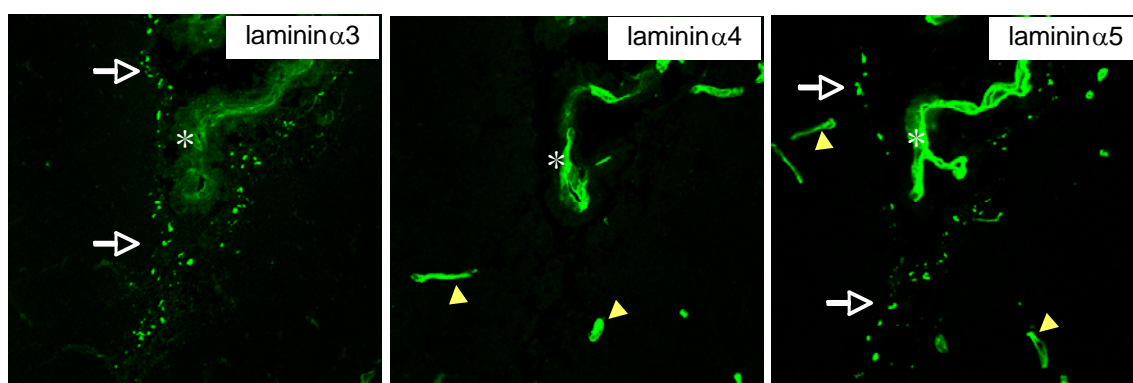


図 6 : 成体脳の側脳室周囲に見られるフラクトン構造の組織染色画像 成体脳の矢状凍結切片(側脳室周辺)を各ラミニンアイソフォーム抗体で染色した。脳室内に脈絡叢(*)が認められる。脳室周辺にはラミニン $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 鎖を含む毛細血管基底膜が認められ(黄色矢頭)、上皮細胞周囲にラミニン $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 鎖を含むフラクトン構造が見られる(白矢印の微細構造)。

② 胎生 5.5~7.5 日胚における基底膜分子構成の解析

胎生 5.5 日のマウス胎仔は円筒胚とよばれる細長い袋状の形態を示し、先端側からは胎仔本体が形成され(胚領域)、基部側から羊膜など胎仔周辺の組織が発生する(胚外領域)。胚領域の内側はエピブラスト層、外側は臓側内胚葉層で構成されており、これらの細胞層の間には基底膜が存在する。この基底膜は、中胚葉形成が始まる胎生 6.5 日胚では陥入部(原始線条)で部分的に消失する。胎生 7.5 日では胚全体にわたって中胚葉層が形成されるとともに、外胚葉層では予定神経領域が分化するなど、領域特異化がおこる。しかし、どの発生段階で基底膜組成の特異化が起こるかは未だ明らかとなっていない。これら不明の点に関する情報を収集し、ES 細胞の選択的

分化誘導に必要な基底膜環境の実体を解明するため、エピブラスト層の成立、中胚葉形成、三胚葉の成立と領域特異化、および胚と胚外組織との対比に着目して、代表的な基底膜蛋白質 20 種の胎生 5.5～7.5 日胚における分布を解析した。

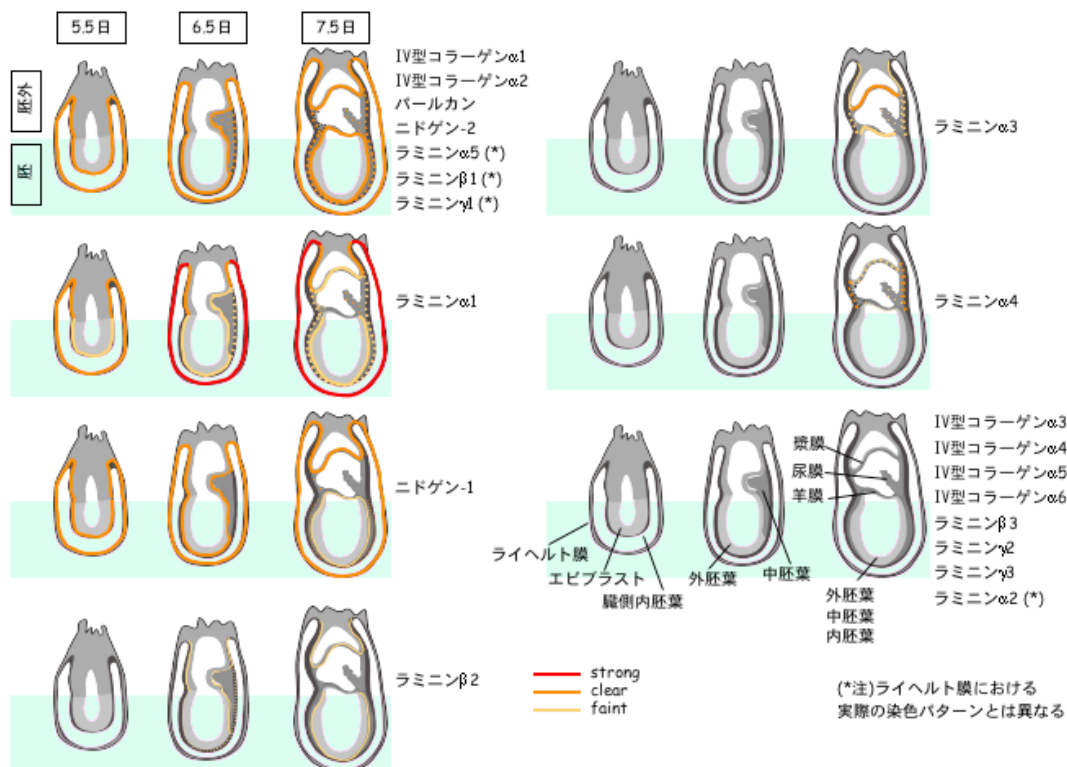


図7: マウス初期胚における基底膜蛋白質の分布 胎生 5.5～7.5 日の胚の矢状断面の模式図と、各種基底膜蛋白質の分布様式を模式的に示した。赤、橙、黄色の線は免疫染色の強度を示す。図の左上にあげた 7 種類の蛋白質は、基底膜様の構造が存在する領域ではほぼ一様に局在が見られた(ライヘルト膜は除く)。一方、右下にあげた 8 種類の蛋白質は初期胚での特異的な染色は認められなかった。

(ア)胎生 5.5 日胚の解析結果: 胎生 5.5 日では円筒胚を構成する二層の細胞層の間に連続的な基底膜が存在する。円筒胚の先端側(エピブラストが存在する胚領域)と基部側(胚外領域)の基底膜の組成に着目して解析を行った。20 種の基底膜蛋白質のうち、ラミニン $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 、IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、ニドゲン-1、ニドゲン-2、パールカンは円筒胚の基底膜の全体にわたって明瞭な局在が認められた(図7)。一方、ラミニン $\alpha 1$ は胚外領域では明瞭な基底膜様の染色がみとめられたものの、胚領域ではその免疫染色シグナルは非常に弱く、エピブラストの基底膜には比較的わずかしか存在しないことが示唆された。他のラミニンサブユニットおよび IV 型コラーゲンサブユニットの抗体では円筒胚の基底膜の染色は認められなかった。

(イ)胎生 6.5 日胚の解析結果：胎生 6.5 日では胚の外胚葉の尾側から中胚葉細胞が分化し、陥入を開始する。胎生 5.5 日と同様に、ラミニン $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 、IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、ニドゲン-1、ニドゲン-2、パールカンは原腸陥入部を除く外胚葉の全体にわたって明瞭な基底膜様の染色が認められた(図7)。また、ニドゲン-1 およびパールカンの一部の切片では、頭側の基底膜で特に強い染色が認められた。尾側の原腸陥入部では基底膜様の染色が途切れており、基底膜構造そのものが消失していた。胚外領域においても上記 8 種類の基底膜蛋白質はほぼ一様に局在が認められた。ラミニン $\beta 2$ については、外胚葉層全体にわたってごく弱い基底膜様の染色が認められ、内胚葉層では特異的な染色は認められなかった。ラミニン $\alpha 1$ の染色シグナルは胚外領域の外胚葉基底膜では明瞭に認められたのに対し、胚領域では弱く、存在量が相対的に少ないことが示された。他のラミニンサブユニットおよび IV 型コラーゲンサブユニットの抗体では、胚・胚外領域ともに基底膜の染色は認められなかった。

(ウ)胎生 7.5 日胚の解析結果：胎生 7.5 日の胚領域において、外・中・内胚葉それぞれの基底膜蛋白局在の比較、細胞の領域特異化に伴う基底膜組成の変化について着目し、解析した。ラミニン $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 、IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、ニドゲン-2、パールカンは胚領域の外胚葉では明瞭な基底膜様の染色が、内胚葉では断片的な染色が認められた(図7および図8)。ラミニン $\alpha 1$ も、比較的染色シグナルが弱いものの、同様の染色パターンを示した。また、IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、ニドゲン-2、パールカンは中胚葉層でも細胞間に断片的な染色が認められた。ラミニン $\beta 2$ は外胚葉でのみ、ごく弱い基底膜様の染色が認められた。一方、外胚葉基底膜におけるニドゲン-1 の染色は、胎生 6.5 日までの染色強度に比して非常に弱くなっていることが見いだされた。ニドゲン-2 が胎生 5.5~7.5 日のどの時期の胚でも連続的で明瞭な基底膜様の染色パターンを示すのに対し、ニドゲン-1 は胎生 6.5 日から 7.5 日への発達過程で外胚葉基底膜における存在量が減少するのではないかと考えられる。他のラミニンおよび IV 型コラーゲンのサブユニット鎖の抗体では、胚領域における特異的な染色は認められなかった。

胎生 7.5 日の胚外領域では、胚周辺の膜組織となる羊膜、尿膜、漿膜、およびそれらの膜に仕切られた胚体外体腔、外胎盤腔が形成される。羊膜は外胚葉性細胞層と中胚葉性細胞層で形成されており、それらの細胞層の間に存在する基底膜構造にはラミニン $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 、IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、ニドゲン-2、パールカンを局在することが示された。この羊膜の基底膜様構造は胚領域の基底膜と連続しており、上記 7 種類の基底膜蛋白質については、その染色強度は胚領域と羊膜の間で顕著な差異はなかった。胚基底膜で弱い染色がみられたラミニン $\alpha 1$ は羊膜においては染色が認められなかった。それに対し、羊膜におけるニドゲン-1 の染色は胚の基底膜よりも強く、明瞭な染色パターンが認められた。また、胚の基底膜で染色が認められなかったラミニン $\alpha 3$ も羊膜には存在することが示された。さらに、ラミニン $\alpha 4$ は胚の基底膜では染色が認められないものの、尿膜や胚体外体腔の中胚葉由来組織では明瞭な染色シグナルが認められた。

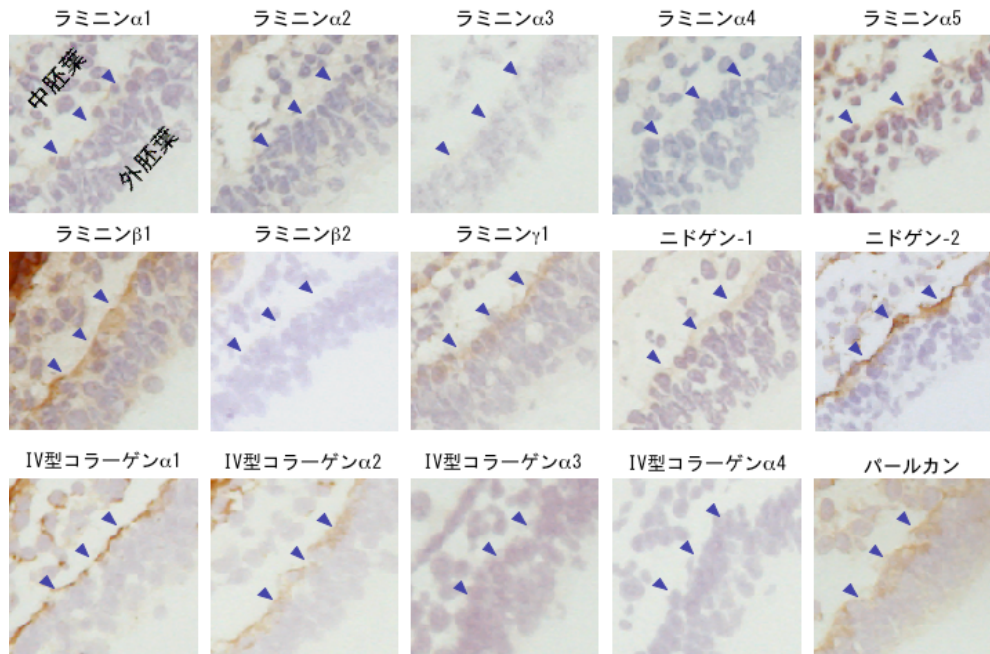


図 8: 胎生 7.5 日胚の外胚葉基底膜における基底膜蛋白質の分布 免疫組織染色の結果の一例として、代表的な 15 種類の基底膜蛋白質について、胎生 7.5 日胚の外胚葉基底膜(矢尻)における染色像を示した。

以上の結果をまとめると、ラミニン $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 、IV 型コラーゲン・ $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、ニドゲン-2、パールカンは、胎生 5.5 日から 7.5 日のすべての段階において基底膜様構造が存在する部位にはほぼ一様に分布し、これらが初期胚基底膜の基本的な構成因子であることが示唆された(表1)。ラミニン $\alpha 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、および IV 型コラーゲン $\alpha 3 \sim \alpha 6$ は解析した胚のいずれの組織でも特異的な染色が認められなかった。一方、胚外領域においては胎生 5.5 日、6.5 日でラミニン $\alpha 1$ が胚領域よりも強い染色シグナルが認められた。胎生 7.5 日の羊膜ではラミニン $\alpha 3$ 、尿膜ではラミニン $\alpha 4$ の特異染色が認められたが、両者とも胚の基底膜では染色が認められなかった。

		IV型コラーゲン ^{α1}	IV型コラーゲン ^{α2}	ハールカン	ニドゼン-2	ラミニン ^{α5}	ラミニン ^{β1}	ラミニン ^{β1}	ラミニン ^{α1}	ニドゼン-1	ラミニン ^{β2}	ラミニン ^{α2}	ラミニン ^{α3β3}	ラミニン ^{α4}	ラミニン ^{β3}	ラミニン ^{β2}	ラミニン ^{β3}	IV型コラーゲン ^{α3}	IV型コラーゲン ^{α4}	IV型コラーゲン ^{α5}	IV型コラーゲン ^{α6}			
7.5日胚	胚領域	外胚葉 (基底膜)	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
		内胚葉 (基底膜)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
		中胚葉	(+)	(+)	(+)	(+)	+/+	+/+	+/+	-	-	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+	-	
	胚外領域	羊膜	++	++	++	++	++	++	++	-	+	-	-	+	(+)	-	-	-	-	-	-	+/+	-	
		尿膜	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	+/+	-	
		外胎盤壁	++	++	++	++	++	++	++	+/+	-	+/+	-	(+)	++	-	-	-	-	-	-	+/+	-	
		胎膜	++	++	++	++	++	++	++	(+)	++	+	-	+/+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	
		外胎盤腔壁	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	+/+	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	
		ライヘルト膜	++	++	++	++	+/+	+++	++	+++	++	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-	-	-	-	+/+
	6.5日胚	胚領域	外胚葉 (基底膜)	++	++	++	++	++	++	+/+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			内胚葉 (基底膜)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			原始中胚葉	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+/+	(+)	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
中胚葉			(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
胚外領域		外胚葉 (基底膜)	++	++	++	++	++	++	++	+/+	++	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		内胚葉 (基底膜)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		中胚葉	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		ライヘルト膜	++	++	++	++	+/+	+++	++	+++	++	-	+/+	+/+	-	+/+	+/+	+/+	-	-	-	-	-	
5.5日胚	胚領域 (エピブラスト) 基底膜	++	++	++	++	++	++	+	+	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	胚外領域基底膜	++	++	++	++	++	++	+	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	ライヘルト膜	++	++	++	+	+/+	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

++ positive, strong
++ positive, clear, continuous
+ positive, faint, (partly or fragmented)
+/- ambiguous
- undetectable

表1: マウス初期胚における基底膜蛋白質の分布(まとめ) マウス初期胚の各組織における基底膜蛋白質の免疫染色の結果を染色強度に基づいてまとめた。記号[+++]および[++]は連続的で明瞭な基底膜様染色が観察されたもの、[+]は非常に薄いの特異的な染色と認められるもの、[(+)]は染色が断片的であるもの、[+/-]はバックグラウンドが高い等の理由で特異的な染色があるかどうか判断できないもの、[-]は特異染色が観察されなかったものを示す。連続的な基底膜で部位によって染色強度に差がみとめられるものは[+~++]のように表記した。

③ 胎生 8.5~10.5 日胚における基底膜分子構成の解析

胎生 8.5~10.5 日は主要な臓器・器官形成の初期段階にあたり、活発な細胞増殖・分化を伴ったダイナミックな形態変化がおこる。胎生 8.5 日胚では神経管、心臓、消化管(前腸)の形成が始まり、さらに前腸からは肝臓前駆細胞の分化が起こる。胎生 10.5 日になると、中枢神経系では神経管

の分化と脳胞の発達、心臓においては左右心房・心室の形成が見られる。消化管は食道、胃、腸管の領域ごとに分化が進み、食道付近からは気管が分岐して肺原基が形成される。前腸から分化した肝臓前駆細胞は、消化管から間充織へと移動しながら増殖し、間充織細胞と混じり合った状態の肝臓原基となる。それ以外にも胎生 10.5 日胚では体幹部の筋節、前後肢芽、間充織や中枢神経系中での末梢血管の形成が見られる。この時期の基底膜蛋白質の変化を解析することで、器官形成期における細胞周囲の環境の変化を明らかにし、さらに胎生 5.5~7.5 日、12.5~16.5 日の解析結果と合わせてマウス発生期を通じた基底膜組成の総体的な理解に資するため、胎生 8.5、10.5 日胚の基底膜蛋白質分布について免疫組織化学的な解析を行った。その結果、これらの器官形成に伴って基底膜の組成もダイナミックに変化し、多様化(器官ごとに多様化するだけでなく、特定の基底膜に含まれる蛋白の種類も増加)することが示された。以下に代表的な器官(中枢神経、心臓・血管、消化管)ごとの解析結果を示す。

(ア) 中枢神経系(神経管)の発生における基底膜組成の変化: 胎生 7.5 日胚で外胚葉細胞層から分化した神経外胚葉は、正中軸の左右で隆起して背側で融合し、表皮外胚葉から分離して神経管を形成する。このとき、外胚葉細胞層の基底膜も神経領域と表皮領域に分離する。神経管の形成は胎生 8.5 日胚の体幹部から始まって胎生 10.5 日までに完了し、さらに内部での神経細胞分化が進行する。この間の基底膜組成の変化を解析したところ、まず神経管と表皮外胚葉で基底膜組成の明らかな変化が見られ、さらに神経管の分化に伴って基底膜構成成分の多様化と背側・腹側基底膜の組成の変化が明らかとなった。図9にその概要を示す。

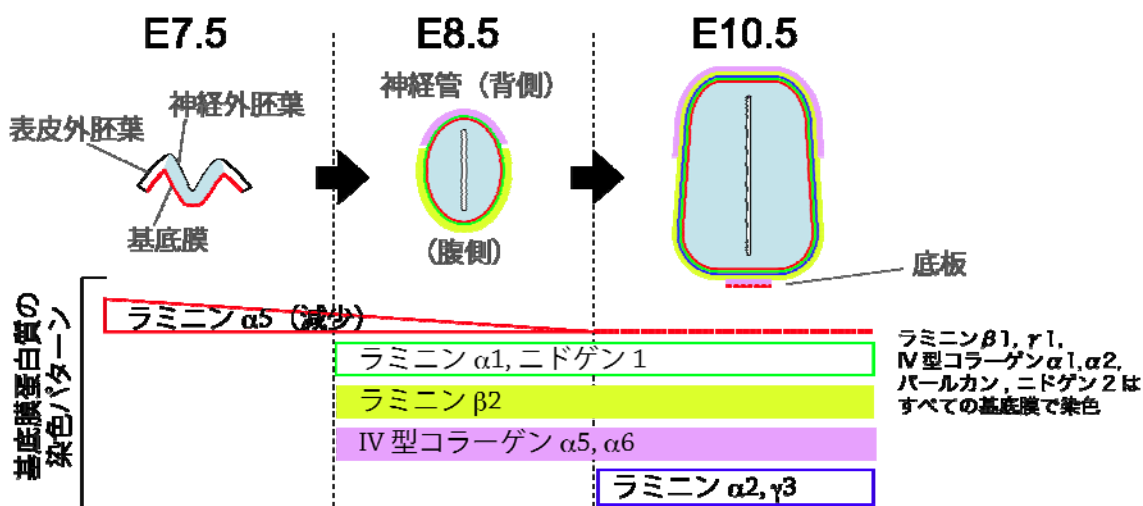


図9: 神経管発生過程における基底膜組成の変化 胎生 7.5 日の外胚葉基底膜の組成はほぼ一様であるが、胎生 8.5~10.5 日では段階的に新たな基底膜蛋白質の染色が認められるようになった。さらに胎生 10.5 日においては IV 型コラーゲン $\alpha 5, \alpha 6$ は神経管背側に、ラミニン $\alpha 5$ は底板に局限した発現パターンも見られた。

特徴的な変化として、(i) 胎生 7.5 日胚の外胚葉の基底膜ではラミニン $\alpha 5$ が多く存在するが、神経管形成後の基底膜ではラミニン $\alpha 5$ が次第に減少し、入れ替わるようにラミニン $\alpha 1$ のシグナル

が上昇した。ラミニン $\alpha 5$ の局在は、胎生 10.5 日では神経管底板のみに限局された。(ii) ラミニン $\beta 2$ は胎生 8.5 日の神経管では腹側の基底膜で新たに染色が見られ、胎生 10.5 日になると神経管基底膜全体に一様に局在が認められた。(iii) 胎生 10.5 日では新たにラミニン $\alpha 2$ 、 $\gamma 3$ の発現も見られた。(iv) IV 型コラーゲン $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ は胎生 8.5~10.5 日にかけて、神経管背側に限局した発現が見られた。

(イ) 初期心臓形成および血管系の形成・発達における基底膜組成の比較： 心臓は胎生 7.5 日以降に頭側の中胚葉層から形成される。胎生 8.5 日では屈曲した管状の構造(心筒)をとり、部位ごとに将来の心房・心室領域へと分化する。胎生 10.5 日では左右の心房・心室が形態的に明らかに区別できるが、内部の中隔はまだ形成されない。基底膜は胎生 8.5 日の心筒では壁の内膜側に、胎生 10.5 日では壁の心筋細胞層を挟んだ内膜側と外膜側にそれぞれ形成される(図10)。

解析の結果、胎生 8.5 日の心筒内膜の基底膜では、基本的な構成蛋白質に加えてラミニン $\alpha 4$ の強い染色が見られ、他にラミニン $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 2$ の染色も確認された。わずかながら IV 型コラーゲン $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ の染色も検出された。これらの基底膜蛋白質の局在は心筒全体でほぼ一様で、心房・心室領域に対応するような明瞭な差は見られなかった。

胎生 10.5 日心臓の基底膜については、心房と心室領域で組成の違いが見られた。また、心筋細胞層を挟んだ内膜側と外膜側の基底膜での組成の違いも明らかとなった。心房と心室の比較では、ラミニン $\alpha 5$ の染色が心房の基底膜では明瞭だが、心室ではほとんど染色が認められなかった。一方でラミニン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ は心房で比較的明瞭な染色が見られ、心室では染色がほとんど見られなかった。内膜・外膜の違いに関しては、内膜側の基底膜は胎生 8.5 日と同様にラミニン $\alpha 4$ の強い染色が見られたのに対し、外膜側基底膜では、ラミニン $\alpha 4$ の染色がほとんど認められなかった。結果の概要を表 2 に示す。

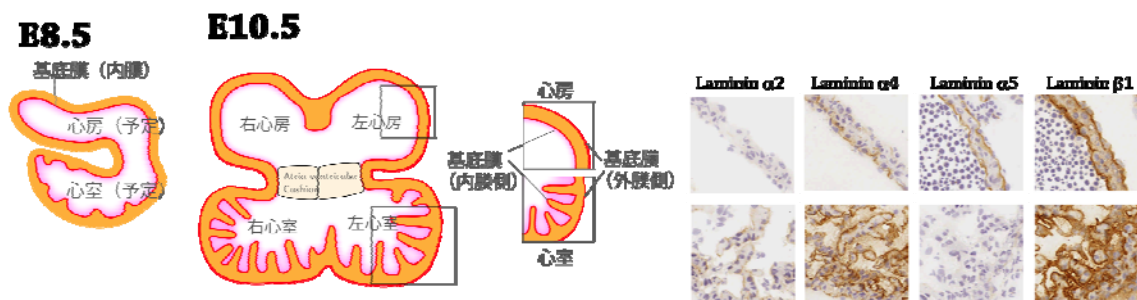


図 10: 胎生 8.5~10.5 日の心臓の断面模式図と基底膜蛋白質の局在 胎生 8.5 日の心臓(E8.5)は屈曲した筒状で、心筋細胞層(橙色)の内側に基底膜が形成される(赤いライン)。胎生 10.5 日(E10.5)では左右の心房・心室の形態が明瞭になり、基底膜は内膜側に加えて外膜側に新たに形成される(赤いライン)。図の右に胎生 10.5 日の心房(上段)、心室(下段)における代表的な基底膜蛋白質の染色パターンを示した。ラミニン $\alpha 2$ は心室領域のみ、ラミニン $\alpha 5$ は心房領域のみに局在することが示された。ラミニン $\alpha 4$ は内膜側基底膜だけに存在し、外膜側は染まらなかった。ラミニン $\beta 1$ などの構成的な基底膜蛋白質はすべての基底膜で染色が認められた。

A		ラミニンβ1	コラーゲン(NV)α1	コラーゲン(NV)α2	ニロシエン-1	ニロシエン-2	パールカン	ラミニンα5	ラミニンγ1	ラミニンα1	ラミニンα3	ラミニンβ2	コラーゲン(NV)α5	コラーゲン(NV)α6	ラミニンβ3	ラミニンγ2	ラミニンγ3	ラミニンα2	ラミニンα4	コラーゲン(NV)α3	コラーゲン(NV)α4	
		E8.5	消化管内胚葉	++	++	++	++	++	++	++	+	(+)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E10.5	消化管内胚葉	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-
E10.5	肝臓	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E10.5	肺	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-

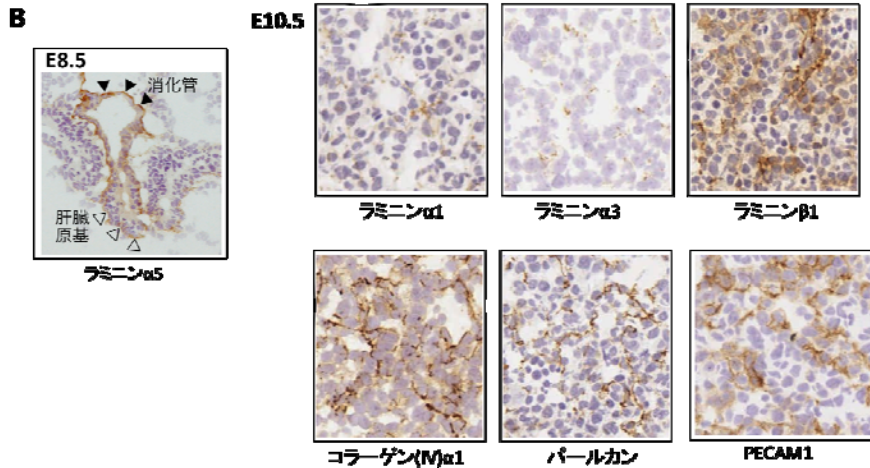


図 11: 胎生 8.5～10.5 日の消化管および形成初期の肝臓・肺の基底膜蛋白質組成 (A) 胎生 8.5、10.5 日の基底膜組成の概要。消化管内胚葉ではラミニン α 5 の発現が高く、肝臓や胚ではさらに特徴的な組成が見られた。(B)形成初期の肝臓における代表的な基底膜蛋白質の分布。胎生 8.5 日(E8.5)では消化管から肝臓原基が出芽する際に基底膜がその周囲に存在する様子が見られた。胎生 10.5 日では肝臓の内部に基底膜蛋白質の染色が認められ、その分布パターンは血管マーカーである PECAM1 の分布と類似していた。

④ 新規基底膜蛋白質の探索とその生体内局在解析

Ensembl データベース (<http://www.ensembl.org/info/about/index.html>) に収録されている約 65,000 のマウスおよびヒトのゲノム情報を母集団として、分子量 20 万以上の蛋白質をコードする遺伝子を抽出し、その中から分泌性の細胞外蛋白質をコードすると判断されるものを N 末端シグナルペプチドの有無およびそれ以外の膜結合ドメインの有無を基準としてさらに抽出した。コードする蛋白質の分子量が 20 万以上という条件を設定したのは、細胞外マトリックス蛋白質の中には分子量 10 万以上のものが多く、未同定の新規細胞外マトリックス蛋白質の多くはより分子量の大きい巨大蛋白質である可能性が高いと考えられるからである。また、細胞外マトリックス蛋白質の多くは分泌蛋白質であり、N 末端に分泌シグナルを持つ一方で、それ以外の膜貫通ドメインは持たないと予想される。N 末端分泌シグナルの有無は PSORTII (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>) により、その他の膜結合ドメインの有無は SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) によりそれ

ぞれ検索した。

これらの検索の結果、分子量 20 万以上かつ分泌性蛋白質の候補から既知の細胞外マトリックス蛋白質および機能が同定済みの蛋白質を除くと、7 個の新規細胞外マトリックス蛋白質の候補遺伝子が同定された。この結果を踏まえ、さらに分子量の閾値を 15 万として再度 *in silico* の検索を行った結果、あらたに 5 個の新規細胞外マトリックス蛋白質候補遺伝子が得られた。これらの候補遺伝子の中から、特に Arg-Gly-Asp (RGD) 配列をもつ候補蛋白質 (ECM-N001, ECM-N002) および特徴的な Sushi ドメインの繰り返し構造を持つ ECM-N003、フィブロネクチン III 型モジュールを複数もつ ECM-N008 を最優先候補蛋白質としてさらに免疫組織染色による *in vivo* スクリーニングを行うこととした。

ECM-N001 と ECM-N002 については、それぞれ2つの独立した抗原ペプチド(分子量 20,000～70,000)を大腸菌あるいはヒト由来細胞 293F を用いて発現・調製し、これらのうち1つずつを家兎に免疫して抗血清を得た。抗体は抗原ペプチドを不溶化したカラムを用いてアフィニティー精製した。得られた抗体を用いてマウス組織の染色性を検討した結果、ECM-N002 抗体が新生仔の腎臓の血管様構造および成体肝臓の類洞様構造を染色することが判明した(図12)。これらの結果は、ECM-N002 が腎臓や肝類洞に局在する新規基底膜蛋白質である可能性を強く示唆している。

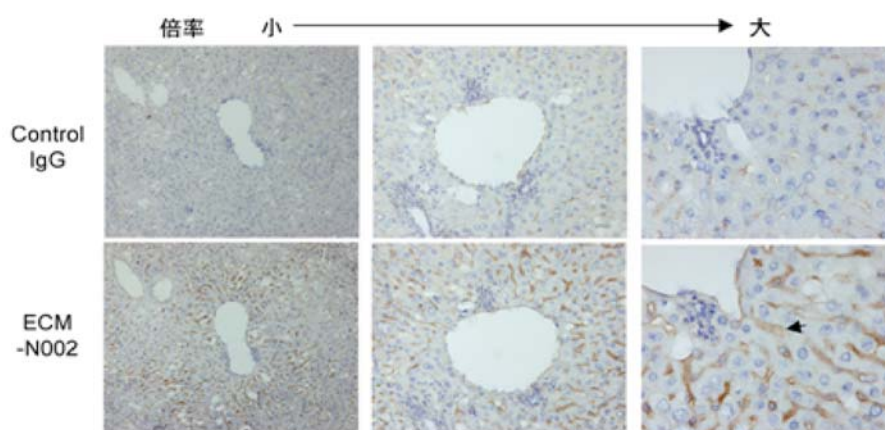


図 12: 新規基底膜候補蛋白質 ECM-N002 の組織局在解析 マウス成体肝臓の染色。

左から右にかけて門脈周囲の拡大染色像を示す。類洞様構造が染色された(矢印)。

平成 19 年度は ECM-N003 についても同様に抗原を調製し、家兎に免疫して抗血清を得て、抗体を精製した。得られた抗体を用いてマウス組織の染色性を検討した結果、ECM-N003 抗体が胎仔肺の間質領域、胃・小腸の粘膜固有層など、基底膜直下にある細胞外領域を染色することが判明した(図13)。また ECM-N003 蛋白質を精製して細胞接着活性を調べたところ、 β 1 インテグリンを介した細胞接着活性を示すことが明らかとなった(図14)。これらの結果は、ECM-N003 が基底膜近傍に存在する細胞接着性の細胞外マトリックス蛋白質であることを示している。

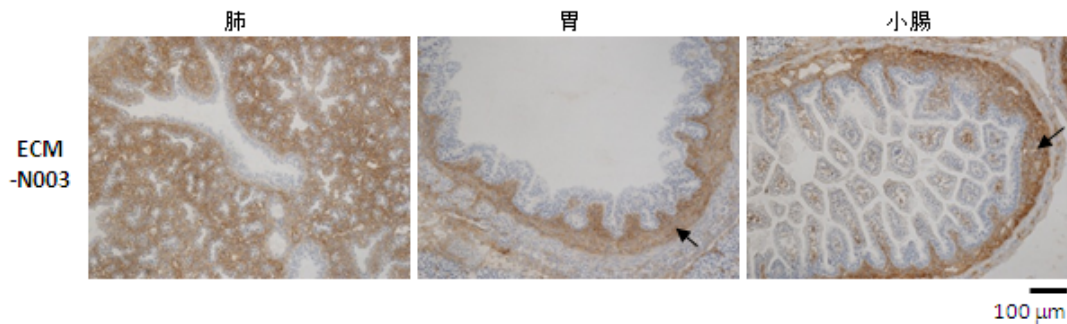


図 13: 新規基底膜候補蛋白質 ECM-N003 の組織局在解析 マウス胎生 16.5 胚の肺・胃・小腸の染色像。肺の間質、胃・小腸の粘膜固有層(矢印)が染色された。

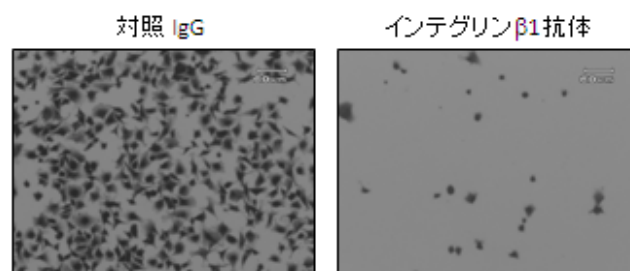


図 14: 新規基底膜候補蛋白質 ECM-N003 の細胞接着活性およびその $\beta 1$ インテグリン依存性 精製 ECM-N003 ($3 \mu\text{g/ml}$) をコートした基質上にヒト横紋筋肉腫由来細胞 RD を播種し、インテグリン $\beta 1$ 阻害抗体(AIIB2)(右)あるいは対照 IgG(左)の存在下で 37°C 、30 分間インキュベートした。図は非接着細胞を除去した後の基質に接着した細胞を示す。ECM-N003 への細胞接着はインテグリン $\beta 1$ に対する抗体で強く阻害される。

⑤ ヒト基底膜ボディマップ解析の技術基盤の整備

ヒト ES 細胞の選択的分化誘導制御に有用な人工基底膜を設計するためには、ヒト臓器の基底膜分子構成を解析することが必要であり、そのための技術基盤の整備は不可欠である。事業分担者は、9 種類のラミニンサブユニット鎖に対する単クローン抗体を既に作製済みであり、6種の IV 型コラーゲンに対する組織染色適応抗体は国内の研究者より入手可能である。その他のヒト基底膜蛋白質に関しても免疫組織染色に必要な抗体を整備するため、市販抗体の有無とその組織染色適合性、ドメイン構造に基づく抗原蛋白質の設計の容易さ、および組織発現の特異性などの情報を考慮して、ラミニン $\beta 2$ 鎖、アグリン、ネフロネクチンを新規抗体作製の最優先候補とした。ラミニン $\beta 2$ 鎖に関しては、組換えヒトラミニン-221 を抗原としてラットを免疫し、腸骨リンパ節より調製したリンパ球をマウスミエローマ細胞 Sp2 と融合後、ヒトラミニン-221 ($\alpha 2\beta 2\gamma 1$) 陽性/ヒトラミニン-211 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$) 陰性のハイブリドーマを選択した。さらに、凍結ヒト小腸組織標本に対する基底膜染色性陽性クローンを選択し、最終的に2個の組織染色適応抗体を分離することに成功した。アグリンとネフロネクチンについては、免疫原として用いる組換え蛋白質をヒト 293F細胞での発現系を用いて発現・精製した。

ヒト基底膜蛋白質に対する新規抗体の作製と並行して、既に作製済みのヒトラミン抗体を用いたヒト組織の染色条件の最適化を行った。ヒト組織標本の場合は、多くがパラフィン包埋標本であるため、パラフィン包埋ヒト組織切片を標準標本として、7種類のヒトラミン抗体の染色条件を(i)各種プロテアーゼによる抗原賦活化処理、(ii)抗体濃度、(iii)二次抗体試薬の観点から最適化した。抗原賦活化処理にあたっては、主に2種類のプロテアーゼ(Protease XXIV, Protease XIV)を検討し、7種類中5種類の抗体(抗ラミン α 2, α 4, α 5, β 1, γ 1抗体)で、Protease XIV処理(0.25 mg/ml, 室温 30分)を行うことによりパラフィン包埋組織切片において明確な染色が得られることを見いだした。

平成19年度～20年度においては、項目2.2.5.2で確立した基底膜蛋白質の発現系を用い、組換えアグリンおよびニドゲン-2蛋白質を抗原とした単クローン抗体の作成を進め、得られた抗体の組織染色条件の最適化を行った。その結果、Protease XIV処理を行ったパラフィン包埋ヒト組織切片を染色することができるアグリン抗体(#112-2)、ニドゲン-2抗体(#121-1)を得ることに成功した(図15)。

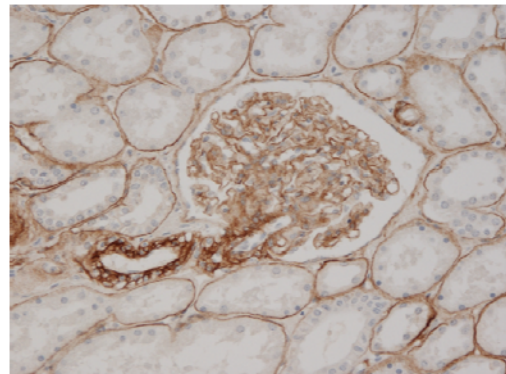


図15: アグリン抗体による組織染色。パラフィン包埋ヒト腎臓組織切片を、プロテアーゼ XIV 処理を行った後、アグリン抗体で染色した。

⑥ マウスボディマップデータベースのホームページの作成とその公開

平成18年度までに公開した胎生12.5、14.5、16.5日胚における主要20種の基底膜蛋白質の全身高解像免疫組織染色像に加えて、新たに基底膜蛋白質15種類と基底膜周辺に局在する細胞外マトリックス蛋白質6種類の画像を取得し、マウスボディマップデータベースに追加して公開した(<http://www.matrixome.com/hpbeta/>)。追加した基底膜蛋白質は、XVIII型コラーゲン、アグリン、ネトリン1、ネトリン4、ネフロネクチン、パピリン、Fras1、QBRICK/Frem1、エンドグリックス1、SMOC-1、アメロジェニンと機能未知のMAEG、WARP、URB、SMOC-2の計15種類の基底膜蛋白質である。また、追加した基底膜関連蛋白質はレプレカン、ポドカン、VI型コラーゲン、フィブリリン1、フィブリリン2、 β ig-H3の6種類である。すべて胎生12.5、14.5、16.5日胚の画像を掲載した。これにより、臓器形成時の41種類の細胞外マトリックス蛋白質の経時的な発現変動を、細胞レベルの解像度で解析することが可能となった。これらの情報は、インターネット上で公開しているデータベースから入手可能である。

⑦ 幹細胞の可視化とそのニッチの解析

マウスボディマップデータベースで用いた免疫組織染色と画像取得の手法は、成体臓器や病態モデルマウスにも応用可能であり、特定の細胞を標識する技術と組み合わせることで、当該細胞の周囲にどのような基底膜成分が存在するかを解析することができる。そこで、成体幹細胞を可視化し、その周囲の環境(幹細胞ニッチ)の解析に向けた技術の確立に取り組んだ。成体幹細胞はほとんど増殖しないため、一度染色体に取り込まれた標識は長期間維持される(図16)。この性

質を利用して、皮膚や小腸の幹細胞を検出する方法が確立されているが、他の臓器においてもこの方法が有効かどうかはまだ十分に検証されていない。

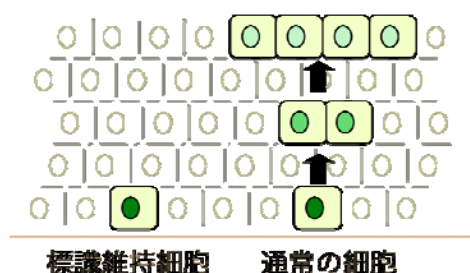
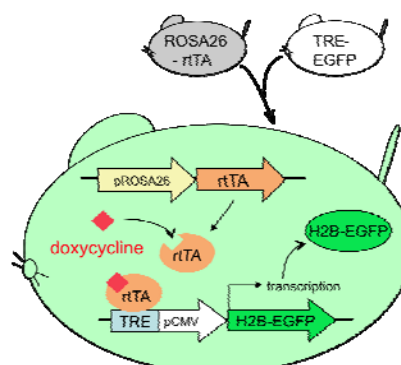


図 16: 標識維持細胞と組織幹細胞 一過的に DNA に標識を入れて一定期間おくと、増殖・分化が活発な細胞では標識が増殖に伴って希釈され消失していく。しかし、標識後に分裂を停止した細胞、あるいは増殖がきわめて遅い細胞ではその標識が維持され、“標識維持細胞”と言われる。幹細胞は通常の細胞よりも細胞分裂の頻度が低いため、標識維持細胞は幹細胞の一種と考えられている。

幹細胞を可視化するための標識方法として、5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU)を用いる場合と、誘導型 EGFP 融合ヒストン 2B (H2B-EGFP) 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いる場合でそれぞれ条件検討を行い、心臓や肝臓で幹細胞が検出できるかどうかを調べた。

BrdU は染色体の塩基対中にチミジンの類縁体として取り込まれ、特異抗体で検出可能である。凍結組織切片で検出するための条件検討を行い、反応特異性を示す市販抗体、組織の変性条件(2N HCl で 20 分)を決め、マウスへの BrdU の投与量(50 μ g/g body weight)と投与時期(生後 3 日目から 1 日 2 回 3 日間)の条件を決定した。BrdU 投与後 24 週経過した肝臓では、次に述べる H2B-EGFP で標識した場合と同様の標識維持細胞が検出できた。しかし、この変性処理条件では、基底膜蛋白質との二重染色は難しいことがわかった。

H2B-EGFP は発現すると染色体クロマチン構造に取り込まれ、融合させた EGFP の



rTA : reverse tetracycline-controlled transactivator 逆テトラサイクリン依存性転写調節因子
 pROSA26 : ROSA26 locus promoter(全身で遺伝子発現を誘導する)
 doxycycline : tetracycline の誘導剤(tetracycline より活性が高い)
 TRE : tetracycline-responsive element: テトラサイクリン応答領域
 pCMV : Cytomegalovirus promoter
 H2B-EGFP : histone H2B-enhanced green fluorescent protein(核局在型EGFP)

図 17: EGFP 発現誘導システムを利用した標識維持細胞の検出方法 ROSA26 プロモーター下で rTA (reverse tetracycline-controlled transactivator) を発現するトランスジェニックマウスと、TRE (tetracycline responsive element) の下流で histone H2B-EGFP を発現するマウスのかけ合わせにより両方の遺伝子を持つマウスを得る。そのマウスは、ドキシサイクリンの投与に依存して全身に H2B-EGFP の発現が誘導される。数日間ドキシサイクリンを投与することにより、一時的に EGFP の発現誘導を行い、DNA に標識をする。その後、一定期間放置すると、通常細胞では標識が希釈されるが、分裂・増殖頻度が低い幹細胞では標識が維持されるので、EGFP の蛍光により検出することが可能である。

蛍光シグナルにより検出できる。そのため、染色や変性等の操作をせずに標識維持細胞を検出可能である。H2B-EGFP 遺伝子の発現はドキシサイクリンにより活性化される転写因子 (rtTA) により制御されており、一定期間だけ発現させることで染色体を標識することができる (図 17)。H2B-EGFP を誘導するためのドキシサイクリン投与条件を検討し、出産時から 1 週間、母体に 2 mg/ml の濃度で飲用水として与えることで、全身性に H2B-EGFP が発現することを確認した。標識蛍光強度を経時的に観察し、投与終了後 6~12 週の時点で、肝臓等で標識維持細胞が集団として特定の部位に存在していることが確認できた。肝臓では、それらは胆管上皮細胞の一部として存在していることがわかった (図 18)。これらの結果は H2B-EGFP の標識方法を用いることで、これまで難しいと考えられていた肝臓や心臓などの臓器でも幹細胞を標識維持細胞として簡便に検出できる可能性を示唆している。この方法では基底膜蛋白質との二重染色を行うことで、成体幹細胞のニッチを解析することが可能である。

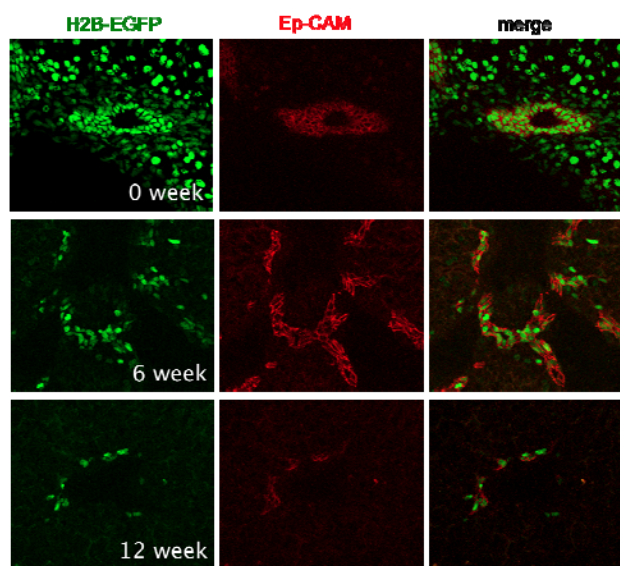


図 18: EGFP ラベルマウス肝臓における標識維持細胞と幹細胞マーカー Ep-CAM の局在 薬剤による EGFP 発現誘導直後から 12 週後の肝臓で、EGFP 発現細胞と Ep-CAM 発現細胞は一致している。

(4) 目標の達成度と意義

① 胎生 12.5 日および 14.5 日胚における基底膜分子構成の解析

中間評価までの目標とした主要基底膜蛋白質 20 種の抗体による染色を完了し、得られた染色標本は高解像度のデジタル画像に変換後、インターネットで閲覧可能な画像データベース (基底膜ポディマップ) に収録した。また、肝臓類洞、心筋、脳内血管については、胎生 12.5~16.5 日の基底膜分子構成を成体マウスの当該器官の基底膜分子構成と比較検討し、成体器官で選択的に発現する基底膜分子を特定することに成功した。ここで得られた情報は、ES細胞から心筋細胞、肝臓実質細胞、脳血管内皮細胞を分化誘導させるためのロードマップとなるばかりでなく、成体臓器に存在する組織幹細胞の培養・維持に適した培養基質の設計においても大きな役割を果たすと期待される。これらの成果は当初の目標を十分に達成している。

平成 19 年度~平成 21 年度には、さらに 21 種類の蛋白質の画像データを収集し、そのうち 34 種類の基底膜蛋白質の消化管および毛細血管での局在解析を行った。追加した基底膜蛋白質の

ほとんどが、時期や部位特異的に発現する分子であり、器官形成過程ごとの基底膜蛋白質の組成の違いを理解する上で非常に有用である。解析の結果、消化管上皮細胞が重層化するかどうかという形態の違いが基底膜組成の違いと相関していること、脳内と末梢組織で毛細血管周囲の基底膜組成が違うことなどを明らかにした。さらに成体脳の解析を行い、神経幹細胞の足場を提供していると最近報告されたフラクトン構造の構成成分を明らかにした。これらの解析結果は、ES細胞から目的臓器の機能を持つ細胞へと分化させる際の培養基質の開発に有益な情報を与えるものである。研究期間を通して、心臓、肝臓、脳での特徴的な構造における基底膜蛋白質の組成を明らかにしており、これらの成果は本課題の目標を十分達成していると考えられる。

② 胎生 5.5 日～7.5 日胚における基底膜分子構成の解析

胎生 5.5～7.5 日胚についても、目標とした主要基底膜 20 種の抗体による染色を完了し、三胚葉分化がおこる発生初期の胚および胚外領域の基底膜分子構成の全体像を解明することに成功した。特に、胎生 5.5 日～7.5 日にかけて、ラミニン-511, IV 型コラーゲン $\alpha 1$ および $\alpha 2$ 鎖、ニドゲン-2、パールカンが構成的に発現していること、一方、胚外領域では羊膜と尿膜でラミニン $\alpha 3$ と $\alpha 4$ がそれぞれ特異的に発現することを明らかにしたことは大きな成果である。これらの結果は、多数のラミニンアイソフォームの中でもラミニン-511 が胚発生における中核分子として機能していることを示しており、ES細胞の培養・維持および初期分化誘導においてラミニン-511 が培養基質として有用であることを示唆している。実際、京都大学再生医科学研究所との共同研究において、ラミニン-511 がES細胞の培養機材として利用可能であることを示す予備的結果が得られている。以上の成果は、当初の目標を十分に達成していると考えられる。

③ 胎生 8.5～10.5 日胚における基底膜分子構成の解析

マウス胚で主要な器官形成が始まる胎生 8.5～10.5 日において、上記と同様に主要基底膜蛋白質 20 種類の局在解析を完了した。これにより、器官形成期には基底膜の蛋白質組成もダイナミックに変化する様子が明らかとなった。基底膜組成の変化は細胞周囲の微小環境の変化をもたらすものであり、器官形成に伴う細胞分化や組織構築において基底膜組成のカスタマイズが大きな意味を持つことを示している。ES細胞から特定の細胞の分化を誘導するにあたって、その細胞に適した基質を用いることの重要性は近年広く認識されるようになってきている。器官形成初期の細胞は *in vitro* 分化誘導の過程にある細胞に相当し、その基質を選択する上で本研究で得られた知見は非常に有用なものといえる。

④ 新規基底膜蛋白質の探索とその生体内局在解析

当初予定していた分子量 20 万以上の蛋白質に加えて、分子量 15 万以上の蛋白質まで範囲を広げて候補蛋白質のスクリーニングを行い、12 個の機能未知分泌蛋白質の候補遺伝子を抽出することに成功した。その中には、インテグリン認識モチーフである Arg-Gly-Asp 配列を含むものが 2 個含まれており、その両方について組換え蛋白質を抗原として家兎抗血清を調製した。その一つである ECM-N002 抗体は、肝臓の類洞および腎臓の毛細血管様構造を選択的に染色することから、ECM-N002 は類洞を含む一部の毛細血管に特異的に発現する基底膜分子である可能性が

示唆された。類洞特異的に発現する細胞外マトリックス蛋白質はこれまで報告されておらず、ECM-N002 は肝実質細胞の培養や人工肝臓の構築に有用な培養基質の開発に大きな手がかりを与えるものと期待される。また、胃・小腸の基底膜直下に局在するインテグリンリガンド ECM-N003 を新たに同定した。しかし、新規の基底膜蛋白質の同定には至らず、本課題は平成 19 年度末で中止とした。

⑤ ヒト基底膜ボディマップ解析の技術基盤の整備

これまでに作製済みのラミニン抗体を中心にパラフィン包埋ヒト組織標本の染色条件の最適化を行い、protease XIV による前処理が抗原賦活化に有効であることを明らかにした。また、組織適応抗体のスクリーニングにこの前処理を採用し、ヒトラミニン $\beta 2$ 鎖に対する組織染色適応性単クローン抗体を 2 クローン分離することに成功した。ヒトアグリンおよびヒトニドゲン-2 に対する免疫組織化学適合抗体の作製にも成功した。これらの成果は当初の目標を十分に達成している。ヒトを対象として基底膜蛋白質の局在解析は、ヒト組織標本の入手が限られているため、パラフィン包埋組織標本の利用が不可避であり、抗原賦活化条件の最適化は技術的に重要な課題である。この点で着実な進捗があったことの意義は大きい。

⑥ マウスボディマップデータベースのホームページの作成とその公開

中間報告時点で 20 種類、さらにそれ以降 21 種類の基底膜あるいはその近傍に局在する蛋白質の胎生 12.5 日、14.5 日および 16.5 日胚の局在を示す画像データをマウス基底膜ボディマップに収録した。基底膜蛋白質の種類はこれまでに約 50 種類が同定されているが、今回の成果はその 8 割近くの発現情報を提供するものである。当初の「網羅的解析に使えるデータベースを公開する」という目的を十分に達成している。これだけの数の染色結果を同じフォーマットで比較できる例は他になく、基底膜分子の発現パターンを評価する際のスタンダードとなり得る重要な成果である。また、基礎研究から医療応用まで世界中のさまざまな研究者がこのデータベースを利用することで、情報交流の場となることが期待される。それにより、異分野との多角的な共同研究が生まれる土壌となりうる。

⑦ 幹細胞の可視化とそのニッチの解析

成体幹細胞の特徴の一つである細胞分裂をほとんどしない、という性質を利用して、EGFP 融合ヒストン蛋白質で全身性に幹細胞を可視化することに道筋をつけた。この技術と我々がすでに確立している基底膜蛋白質の抗体シリーズを併用して組織染色を行うことで、成体幹細胞周囲の基底膜の分子の実体を解明することが可能となった。これまでは成体幹細胞がどのような足場を利用してその未分化維持や分化方向の決定を制御しているか未解明な点が多かったため、培養系でこれら幹細胞を扱うことが難しかった。今回確立した技術を用いて成体幹細胞周囲の組成(幹細胞ニッチ)が明らかになれば、マウス成体幹細胞の培養技術の開発につながり、ひいては基礎的な解析がほぼ不可能であるヒト成体幹細胞の培養技術に重要な手がかりを与えるものである。

2. 2. 4. 2 基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築

大阪大学および日本皮革研究所

(1) 事業目的と背景

細胞ごとに最適化された基底膜の分子構成を反映した人工基底膜を生体外で再構築するためには、まずその材料となる様々な基底膜構成分子を自由に調合し、本来の基底膜を模倣した空間配置をとらせることが必要である。本課題では、このような人工基底膜の構築を以下の 2 段階で行う。すなわち、基底膜の中核となる IV 型コラーゲンとラミニンからなる 2 成分コンポジット人工基底膜(第一世代人工基底膜)をまず構築し、これに細胞特異的に発現する他の基底膜分子を組み込んだ多成分コンポジット人工基底膜(第二世代人工基底膜)を次ぎに構築する。

本分担課題では、これら人工基底膜の構築に必要な基底膜構成分子の高発現系・安定供給系の構築とそれを利用した人工基底膜の構築を目的とする。基底膜の中核となるのは、IV 型コラーゲンとラミニンであり、第一世代人工基底膜の構築に必要な IV 型コラーゲンの安定供給系は日本皮革研究所が担当し、組換えラミニンの高発現系・安定供給系の構築は大阪大学で行う。また、ラミニンに加えて、第二世代人工基底膜の構築に必要な細胞特異的基底膜分子の高発現系・安定供給系の構築は大阪大学が担当する。

通常、IV 型コラーゲンはペプシン等の酵素による部分分解によって可溶性・精製されるが、このような方法で調製した IV 型コラーゲンは基底膜内にあるような超分子会合体を再構築するには不向きである。日本皮革研究所では、以前報告された方法を改良して、非酵素的に IV 型コラーゲンを抽出し、精製する方法を確立している。この方法をさらに改良して、生体外で基底膜様超分子会合体を安定に再構成する IV 型コラーゲンの調製法および超分子会合体の再構成技術を確立することを目的とする(日本皮革研究所)。

ラミニンに関しては、マウス EHS 腫瘍から分離・精製されたラミニン-111 が広く利用されている。しかし、それ以外のアイソフォームに関しては、ヒト胎盤や培養細胞の培養上清を材料とした調製法が報告されているものの、得られる精製蛋白質の量は少なく、大量かつ安定した精製蛋白質の供給には適していない。一方、遺伝子組換えによるラミニンの発現・供給系は、一旦確立されれば安定な供給が可能であるが、ラミニンは α 鎖(400 kDa)、 β 鎖(200 kDa)、 γ 鎖(200 kDa)のヘテロ 3 量体であり、6~10 kb の 3 本の cDNA を細胞に共発現させる必要がある。大阪大学では既にラミニン-411 および-511 の発現系を構築しており、これまでの実績を踏まえて、既に同定されている 15 種類のラミニンアイソフォームの発現系を確立し、各アイソフォームの安定供給系を確立することを目的とする。また、これら精製基底膜分子を組み合わせた第一世代および第二世代の人工基底膜の構築技術を開発する。さらに、増殖因子をあらかじめ固相化したオールインワン型の人工基底膜の構築を視野にいれて研究開発を展開する。

(2) 事業内容と目標

① IV 型コラーゲンの安定供給系の開発(日本皮革研究所)

非酵素的に純度の高い、ゲル化能を保持した IV 型コラーゲンを調製する方法を確立することを目標とする。具体的には、林らが 1993 年に報告した方法(Muraoka and Hayashi, 1993; Nakazato

et al., 1996)を参考にして、眼球のレンズ嚢(水晶体嚢)から非酵素的に IV 型コラーゲンを調製する方法を確立する。材料としては、ウシ、ブタなど、大量に眼球が入手可能な大動物を用いる。また抽出した IV 型コラーゲンの分子組成、アミノ酸組成、円偏光二色性測定等、蛋白質としての化学的物性を検討するとともに、そのゲル化能についての評価を行う。平成 18 年度は、100 mg のゲル化能を保持した IV 型コラーゲンの抽出・調製を行うことを数値目標とした。

②ラミニンの高発現系・安定供給系の構築 (大阪大学)

基底膜の基本骨格となるラミニンは、3本のサブユニット鎖(α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖)からなるヘテロ3量体蛋白質である。 α 鎖には5種類($\alpha 1 \sim \alpha 5$)、 β 鎖と γ 鎖には3種類($\beta 1 \sim \beta 3$ および $\gamma 1 \sim \gamma 3$)のタイプがあり、これらの組み合わせに違いにより15種類のアイソフォームの存在が知られている(表3)。細胞表面の受容体と結合する領域は α 鎖のC末端領域にあり、 α 鎖のタイプがラミニンの基本的生理活性を規定している。本課題では、15種類すべてのラミニンアイソフォームの高発現系・安定供給系を構築することを目標とし、平成18年度はその中でも α 鎖のタイプの異なる代表的なアイソフォーム5種類(ラミニン-111, -211, -332, -411, -511)の発現系・安定供給系の構築を完成させることを目標とした。

ラミニン	旧名称	サブユニット組成
ラミニン-111	ラミニン-1	$\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$
ラミニン-211	ラミニン-2	$\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$
ラミニン-121	ラミニン-3	$\alpha 1 \beta 2 \gamma 1$
ラミニン-221	ラミニン-4	$\alpha 2 \beta 2 \gamma 1$
ラミニン-332	ラミニン-5	$\alpha 3 \beta 3 \gamma 2$
ラミニン-311	ラミニン-6	$\alpha 3 \beta 1 \gamma 1$
ラミニン-321	ラミニン-7	$\alpha 3 \beta 2 \gamma 1$
ラミニン-411	ラミニン-8	$\alpha 4 \beta 1 \gamma 1$
ラミニン-421	ラミニン-9	$\alpha 4 \beta 2 \gamma 1$
ラミニン-511	ラミニン-10	$\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$
ラミニン-521	ラミニン-11	$\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$
ラミニン-213	ラミニン-12	$\alpha 2 \beta 1 \gamma 3$
ラミニン-423	ラミニン-13	$\alpha 4 \beta 2 \gamma 3$
ラミニン-523	ラミニン-14	$\alpha 5 \beta 2 \gamma 3$
ラミニン-333	ラミニン-15	$\alpha 3 \beta 3 \gamma 3$

表3:ラミニンアイソフォームの種類

③第二世代人工基底膜構築に必要な基底膜蛋白質の高発現・安定供給系の構築(大阪大学)

基底膜の主要な構成分子としては、IV 型コラーゲンとラミニンに加えて、ニドゲンとヘパラン硫酸プロテオグリカンがある。細胞ごとに分子組成をカスタマイズした人工基底膜を構築するためには、これら主要構成分子の組換え蛋白質の発現系の構築と大量調製法の確立が不可欠である。ニドゲンにはニドゲン-1 とニドゲン-2 の 2 種類があり、ヘパラン硫酸プロテオグリカンにもパールカンとアグリンの 2 種類がある。これら 4 種類の基底膜主要構成分子の組換え蛋白質を mg 単位で安定に供給できる発現・精製法を確立することを目標とする。

④分子組成をカスタマイズした人工基底膜の構築技術の開発(大阪大学および日本皮革研究所)

はじめに IV 型コラーゲンとラミニンの 2 成分からなる第一世代人工基底膜を構築する。そのために必要な IV 型コラーゲンのゲル化条件の最適化を行うとともに、IV 型コラーゲンゲルにラミニンを不溶化するための条件検討を行う。次にニドゲンやヘパラン硫酸プロテオグリカンを第一世代人工基底膜に組み込んだ第二世代人工基底膜の構築技術を確認する。そのために必要となる各基底膜分子間の相互作用を定量的に解析し、人工基底膜の構築に必要な基盤情報を取得する。

⑤基底膜組み込み型増殖因子の創製(大阪大学)

細胞外マトリックスの役割は、単に細胞が接着するための足場を提供するだけではない。組織間相互作用のインターフェイスとなる基底膜には、双方の組織から分泌された様々な増殖因子や細胞分化誘導因子が組み込まれ、生体内での局在と活性の制御を受けている。生体内での基底膜の機能を真に反映した人工基底膜を構築するためには、単に基底膜分子の組成をカスタマイズするだけでなく、そこに組み込まれる増殖因子もカスタマイズする必要がある。この条件を満たす人工基底膜を構築するため、本来可溶性の増殖因子を基底膜に固相化する技術開発を行う。具体的には、ラミニンへの強い結合活性を賦与した基底膜組み込み型増殖因子の創製を行う。

(3)研究成果

①IV型コラーゲンの安定供給系の開発(日本皮革研究所)

IV型コラーゲンの抽出のための材料には、眼球レンズ嚢を用いた。3次元再構成コラーゲンを人工基底膜構築の材料とするには、できるだけ大量のコラーゲンを得る必要がある。回収量は材料の大きさと材料の得やすさに依存すると考え、ウシ、ブタ、ダチョウ、マグロの眼球よりレンズ嚢を採取し、IV型コラーゲンの抽出を行った。IV型コラーゲンの調製にあたっては、1回の抽出作業で100mg以上のコラーゲンが得られることを念頭において調製法の検討を行った。

様々な条件検討の結果、現在採用しているIV型コラーゲン調製法の概略を図19に示す。この調製法ではウシ眼球10個を出発材料の単位としている。まず、眼球をメスで切開し、水晶体を傷つけないように取り出した後、水晶体内から水晶体成分を慎重に絞り出し、水晶体を包む嚢を取り出す。取り出したレンズ嚢より図19に示す非酵素的でコラーゲンを抽出、精製した。抽出したコラーゲンを還元条件下でSDSゲル電気泳動すると、180 kDa, 175 kDa, 160 kDaのIV型コラーゲンのバンドが検出された(図20)。また、円偏光二色性測定によってコラーゲンらせん特有の210 nmの円偏光が見られ(図21)、変性温度は38°Cであった。また、アミノ酸分析の結果では、1000アミノ酸残基中ヒドロキシプロリンが90残基を占め、ほぼ純粋なコラーゲンであることが確認された。また、このように精製したIV型コラーゲンは、中性条件下で3次元ゲルを形成し、ゲル上で皮膚上皮細胞の培養が可能であった。ウシの眼球1個あたり0.27 mgのIV型コラーゲンが得られた。ブタ眼球を用いても同様の分子量のコラーゲンが得られたが、眼球1個あたりの収量は0.05 mgとウシの1/5程度であった。ダチョウの場合は、酢酸条件ではIV型コラーゲンが抽出されず、尿素存在下で抽出された。また、コラーゲン以外の夾雑蛋白質の混入が認められた。マグ

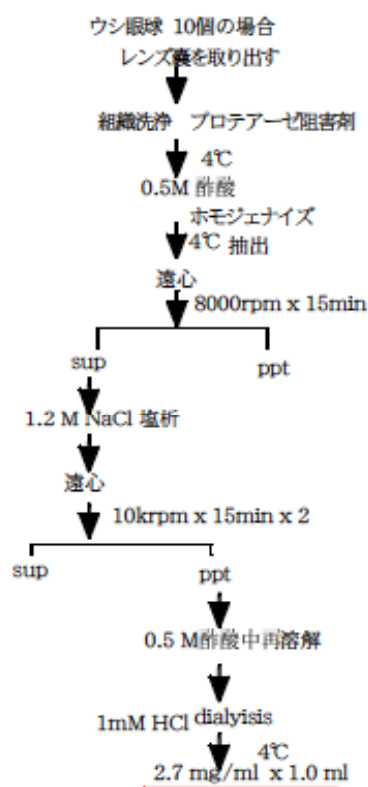


図 19: IV 型コラーゲンの抽出・精製プロトコール

口の場合は、1個の眼球あたり 1 mg 以上の蛋白質が得られたが、円偏光二色性測定ではコラーゲンらせん構造に由来するピークが得られず、なんらかの理由で変性したものと考えられた。

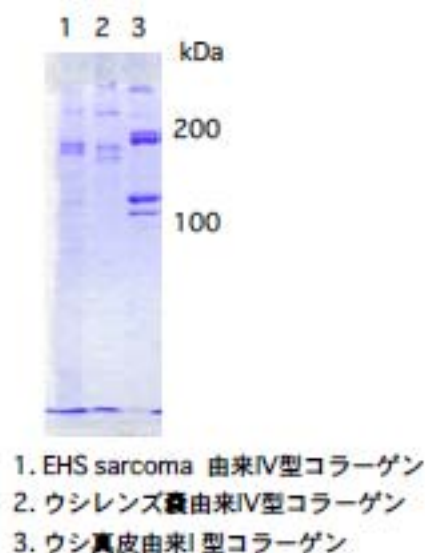


図 20: 精製 IV 型コラーゲンの SDS ゲル電気泳動パターン

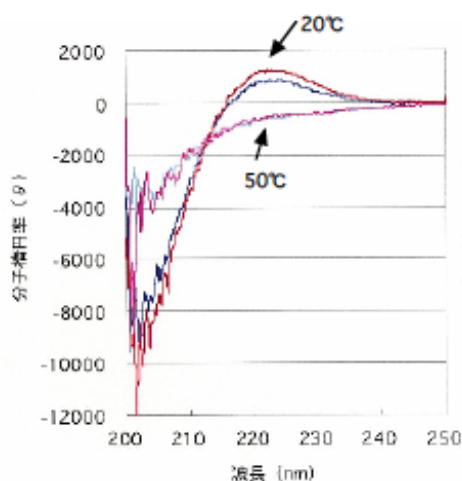


図 21: 精製 IV 型コラーゲンの円偏光二色性スペクトル

以上の結果を踏まえ、これまで調べた材料の中では、ウシ眼球が収量および純度の点から最も有利であると判断される。これまでにウシ眼球 500 個を材料として、約 100 mg の高純度の IV 型コラーゲンが得られている。

②ラミニンの高発現系・安定供給系の構築 (大阪大学)

(ア) $\beta 1$ 鎖をもつラミニンおよびラミニン-332 の高発現・安定供給系の構築

α 鎖の異なる5種類のラミニンアイソフォームの発現系は、浮遊培養に馴化したヒト 293F 細胞を用いる哺乳動物細胞遺伝子発現システム(インビトロジェン社製)を利用して構築した。 $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 4$ 鎖、 $\alpha 5$ 鎖を含むアイソフォームは、 $\beta 1$ 鎖および $\gamma 1$ 鎖とのヘテロ三量体(ラミニン-111、ラミニン-211、ラミニン-411、ラミニン-511)として発現させ、 $\alpha 3$ 鎖を含むアイソフォームは $\beta 3$ 鎖および $\gamma 2$ 鎖とのヘテロ三量体であるラミニン-332 として発現させた。発現系を構築した5種類のラミニンアイソフォームの構造を図22に示す。なお、 $\alpha 3$ 鎖の場合は、その C 末端側球状ドメインを構成する LG3 モジュールと LG4 モジュールの間でプロテアーゼによるプロセッシングを受けるため、LG4~LG5 モジュールを欠失させた成熟型ラミニン-332 の発現系を構築した(図22参照)。発現系の構築に必要な各サブユニット鎖の発現ベクターは、既に構築済みのもので($\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$)と市販されているもの($\beta 3$ 、 $\gamma 2$)を除き、残りはすべて RT-PCR により cDNA をクローニングし、発現ベクターを構築した。

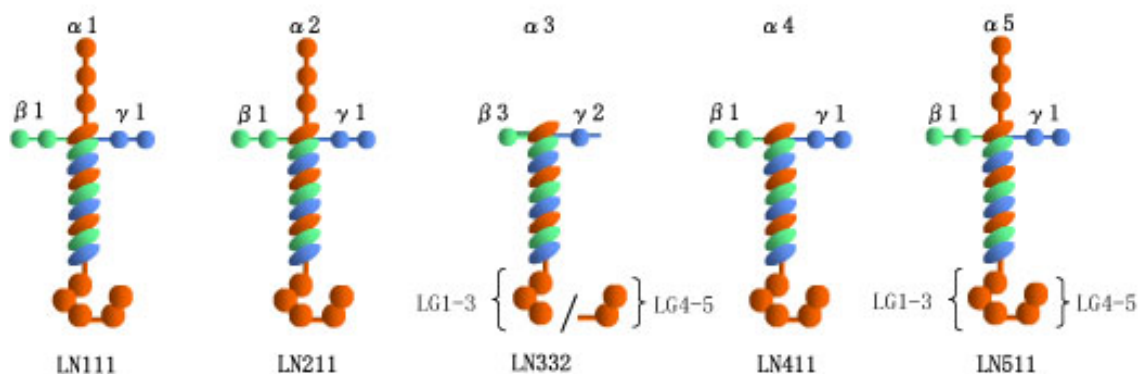


図 22: 組換えラミニンアイソフォームの構造

ヒト 293F を用いる発現系は、高密度浮遊培養した細胞に α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖をコードする3種類の発現ベクターを導入し、一過的に大量の組換えラミニンを発現させる系である。現在採用している標準的組換えラミニン発現系では、293F 細胞 1.0×10^9 個/1000 ml を1単位として、これに各サブユニット鎖の発現ベクターを 330 mg ずつ 293fectin を用いて導入し、3日間の浮遊旋回培養後に培地を回収して、分泌された組換えラミニンを当該 α 鎖に対する単クローン抗体を不溶化したカラムで精製している。なお、5種類のヒト α 鎖に対する単クローン抗体は既に大阪大学において取得済みである。抗体カラムに結合したラミニンは 0.1 M トリエチルアミンで溶出した後、速やかに PBS に対して透析し、最終精製標品とした。抗体カラムの素通り画分にもかなりの未回収ラミニンが含まれているため、抗体カラムによる精製操作は3～5回に渡って繰り返す行い、収量の増加をはかった。このような一連の操作で得られる組換えラミニン量は、1回のトランスフェクション操作あたり 0.3 mg ～0.6 mg、全行程に要する時間は 2～2.5 週間である。これまでの精製によって、5 mg 前後の精製ラミニンが各アイソフォームについて得られている。なお、ラミニン-511 を発現させる場合は、 $\alpha 5$ 鎖のC末端領域の G4-G5 領域がプロセッシングを受け易いため、293F 細胞の培地にヘパリン(25 mg/ml)を添加して培養を行い、G4-G5 がプロセッシングされていない完全長の $\alpha 5$ 鎖をもつラミニン-511 が得られるよう工夫した。

精製した5種類のラミニンアイソフォームの還元条件下での SDS-ゲル電気泳動のパターンを図 23に示す。ラミニン-111 およびラミニン-411 については、分解の少ないインタクトな標品が得られている。ラミニン-211 は $\alpha 2$ 鎖に若干分解がみられたが、これは LG4-LG5 モジュールのプロセッシングによるものと思われる。ラミニン-332 は $\gamma 2$ 鎖が分解を受けたと思われるバンドが認められるが、これは $\gamma 2$ 鎖の N 末端側でのプロセッシングによる可能性が高い。ラミニン-511 は遺伝子導入した 293F 細胞をヘパリン存在下で培養した場合と非存在下で培養した場合で、 $\alpha 5$ 鎖の大きさに違いが認められた。これは、ヘパリン存在下で培養した時に LG3 と LG4 モジュールの間のプロセッシングが阻害されたためと考えられ、ラミニン-511 の発現・精製時におけるヘパリン添加の有用性が確認された。なお、各ラミニンの銀染色法を行った際に、ラミニン以外の蛋白質由来と思われる

るバンドが 150 KDa 付近に見られたため、 γ 1 鎖に結合することが知られているニドゲン-1 の可能性を考え、ニドゲン-1 に対する抗体でウエスタンブロットを行った。その結果、予想通り γ 1 鎖を含む組換えラミニン標品はニドゲン-1 を含むことが確認された。これは 293F 細胞が内在的に発現しているニドゲン-1 がラミニンの γ 1 鎖に結合して共精製されたためと考えられる。

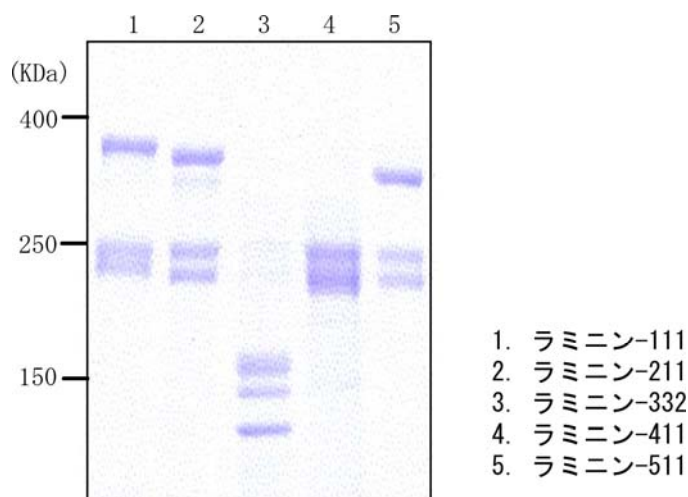
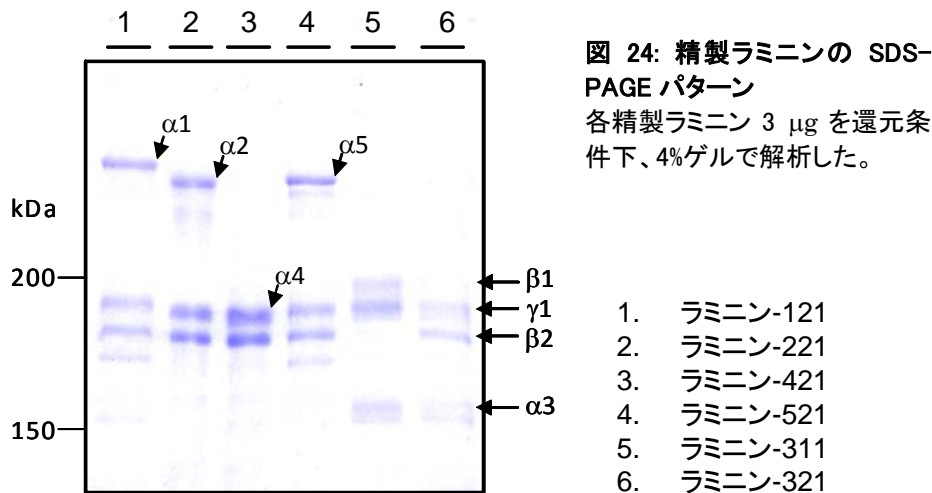


図 23: 精製ラミニンの SDS-ゲル電気泳動パターン

各精製ラミニン 2 mg を還元条件下、5%ゲルで解析した。

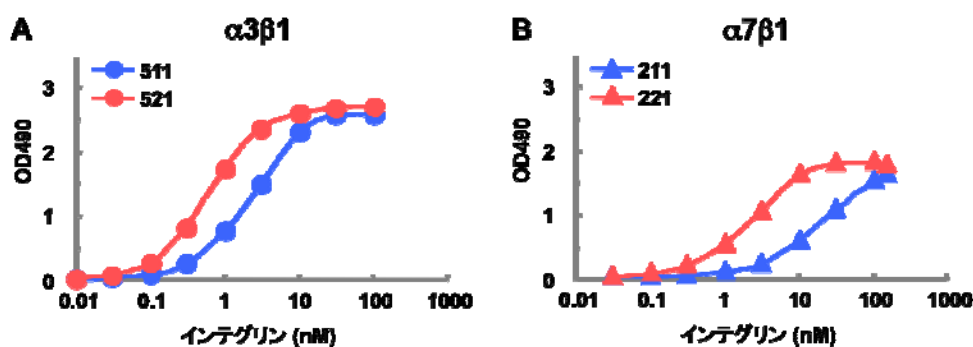
(イ) β 2 鎖をもつラミニンの高発現・安定供給系の構築

平成 19 年度は、先の5種類に次いで生体内での発現量が比較的高い β 2 鎖を含む5種類のラミニンアイソフォーム(ラミニン-121, -221, -321, -421, -521)の発現・精製系の構築を行った。また、 α 3 鎖と β 1 鎖を含むラミニン-311 の発現・精製もあわせて行った。ラミニン β 2 鎖の遺伝子はヒト胎盤由来 cDNA から PCR 法によりクローニングを行い、pcDNA3.1(+)(インビトロジェン社製哺乳細胞発現ベクター)に組み込んだ。組換え蛋白質の発現は、 β 1 鎖ラミニンの場合と同様に 293F 細胞を用いて行い、各 α 鎖と γ 1 鎖とのヘテロ三量体として発現・精製した。各ラミニンの精製は各 α 鎖を認識する抗体を用いてアフィニティ精製法により行った。 β 2 鎖を含むラミニンの発現量は、 β 1 鎖を含むラミニンの発現量より低く、ラミニン-121 とラミニン-521 については 293F 細胞の内在性 β 1 鎖の発現によるラミニン-111 とラミニン-511 の混入が問題となった。これらの問題点を解決するために、293F 細胞のトランスフェクション条件や精製手順の見直しを行った結果、発現量および精製収量の改善に成功し、293F 細胞の培養液 1L あたり 0.4~0.6 mg の組換えラミニンの精製が可能になった。これら精製ラミニンの純度を SDS-PAGE で確認したところ、 β 1 鎖のバンドはほとんど認められず、 β 2 鎖をもつラミニンが高純度で精製できていることが確認された(図24)。



なお、ラミニン-311 およびラミニン-321 に関しては、他のラミニンアイソフォームと比較して発現量が低く、ラミニン-321 では 293F 細胞の内在性ラミニン $\beta 1$ 鎖に由来すると思われるラミニン-311 の混入も認められた。これらの問題を解決するため、トランスフェクションする発現ベクターの比率の見直し、培養スケールの拡大など、精製収量を上げる工夫を行った。その結果、ラミニン-311 とラミニン-321 とともに精製に成功し、SDS-PAGE でいずれも高純度精製品を 293F 細胞の培養液 1L あたり 0.1~0.2 mg 精製することが可能になった(図24)。

精製した $\beta 2$ 鎖をもつラミニンアイソフォーム(ラミニン-121, 221, 521)のインテグリン結合活性を測定した結果、 $\beta 2$ 鎖をもつラミニンは $\beta 1$ 鎖をもつラミニンよりもインテグリン $\alpha 3\beta 1$ および $\alpha 7\beta 1$ に対して高い結合親和性をもつことが判明した(図25)。このことから、 $\beta 2$ 鎖をもつラミニンを人工基底膜に組み込むことにより、これらインテグリンを発現する細胞に対してはより接着活性が期待できる。



(ウ) $\gamma 3$ 鎖をもつラミニンアイソフォームの高発現・安定供給系の構築

$\gamma 3$ 鎖を含む4種類のラミニンアイソフォームは、完全長で精製した報告はなく、インテグリン結合活性も不明であった。そこで、ヒト胎盤由来 cDNA を用いて PCR 法により $\gamma 3$ 鎖 cDNA のクローニングを行った。クローン化した cDNA を pSecTag2A (インビトロジェン社製哺乳細胞発現ベクター) に組み込み、 $\gamma 3$ 鎖を含むラミニンアイソフォームを 293F 細胞に発現させた。しかしその発現量は極めて低く、さらにインテグリン結合部位を欠失していることが判明した。そのため、 $\gamma 3$ 鎖を含む4種類のラミニンアイソフォームは人工基底膜の構成成分から除外することにした。

(エ) 組換え蛋白質の発現条件および精製法の改良

人工基底膜を ES 細胞の培養基材として利用するためには、大量の精製ラミニンの調製が必要となる。さらなるラミニンの精製収量の増加を目的として、各ラミニンアイソフォームの発現条件や精製手順の最適化を行った。まず、ラミニンアイソフォームごとにトランスフェクションに使用するプラスミドの配合比を変え、293F 細胞におけるラミニン発現量の変化を比較し、各アイソフォームの発現に最適化された配合比を求めた。また、培養上清をあらかじめ濃縮することにより、カラムに添着するラミニン量を増加させ、一回の精製サイクルあたりの収量と純度を向上させた。このような精製法の改良により、ラミニン-332、-511 では、培養上清 1L あたりの収量が 2 倍以上に増加した。

(オ) ラミニン E8 フラグメントの発現・安定供給系の構築

マウス EHS 腫瘍から得られるラミニン-111 をエラストラーゼで限定分解すると、全長ラミニンと同程度の細胞接着活性を有するフラグメントが得られる。このフラグメントは E8 フラグメントと呼ばれ、ラミニンの coiled-coil 領域 C 末端部と α 鎖の球状ドメイン (LG1-LG3) から構成されている (図26)。E8 フラグメントは、完全長のラミニンと同様の細胞接着活性が期待されるだけでなく、低分子量であるため発現量が高く、ニドゲンやアグリンなどと結合する領域を欠損していることから、全長ラミニンと比較してこれらの混入が回避されるというメリットも予想される。そこで、平成 21 年度においてはラミニン-511 とラミニン-332 の E8 フラグメント相当領域を組換え体として作製した (図27)。

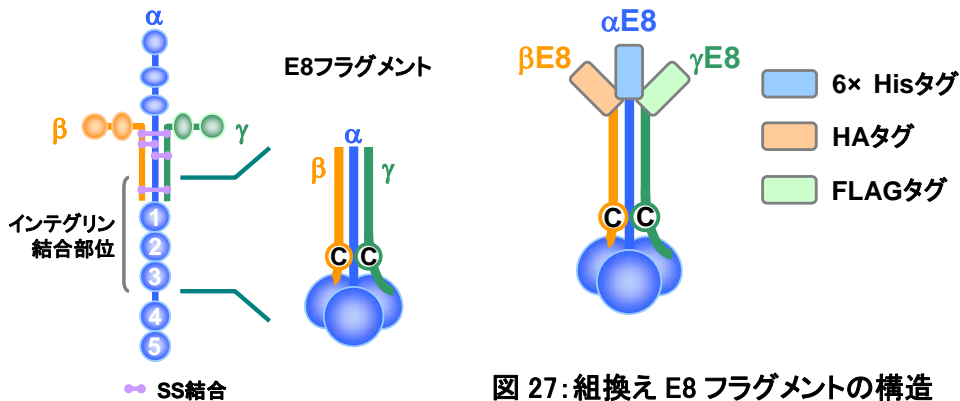


図 26: ラミニン分子における E8 フラグメントの位置

図 27: 組換え E8 フラグメントの構造

ヒトラミン-511 の組換え E8 フラグメントの作製にあたり、マウスラミン-111 の E8 フラグメントのアミノ酸配列と比較して、ヒトラミン $\alpha 5$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖の E8 相当部位のアミノ酸配列を決定した。次に、ヒトラミン $\alpha 5$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖の全長 cDNA 配列を含むプラスミドを鋳型として PCR を行い、各鎖の E8 部位に相当する cDNA 領域を増幅し、哺乳細胞用発現ベクター pSecTag2B に挿入した。E8 フラグメントの各鎖の N 末端側には、 $\alpha 5$ 鎖には $6 \times \text{His}$ タグ、 $\beta 1$ 鎖には HA タグ、 $\gamma 1$ 鎖には FLAG タグを付加した(図27)。同様に、ヒトラミン-332 の E8 フラグメントの作製にあたってマウスラミン $\alpha 3$ 鎖、 $\beta 3$ 鎖、 $\gamma 2$ 鎖の E8 相当部位のアミノ酸配列を決定し、N 末端側に $6 \times \text{His}$ 、HA、FLAG の各タグを付加した発現ベクターを作製した。

組換えラミン-511E8 とラミン-332E8 の発現には全長ラミンと同様に 293F 細胞発現系を用い、培養上清からの精製には His タグ、FLAG タグを利用したアフィニティークロマトグラフィーを用いた。精製した組換え E8 フラグメントの純度を SDS-PAGE で確認したところ(図28)、両組換え体とも分解物や不純物が少なく高純度で精製されていることが確認された。マウスラミン-111 由来の E8 フラグメントは β 鎖と γ 鎖がジスルフィド結合で、 α 鎖は非共有結合で相互に結合している。SDS-PAGE 解析の結果から、組換え E8 フラグメントのサブユニット鎖も同じ様式で結合しており、組換え E8 フラグメントがマウスラミン-111 由来 E8 フラグメントを模倣できていることが確認された。インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ 、 $\alpha 6 \beta 1$ に対する結合活性を確認したところ、ラミン-511E8 とラミン-332E8 とともに全長ラミン-511 とラミン-332 と同程度のインテグリン結合活性を有することが確認された。

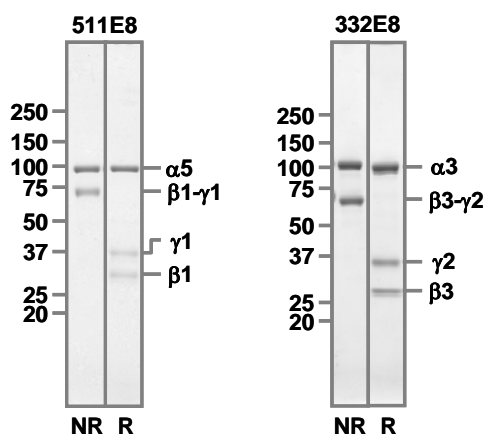


図 28: 精製したラミン E8 フラグメントの SDS-PAGE パターン 各組換え E8 フラグメント $1.5 \mu\text{g}$ を非還元(NR)または還元(R)条件化で 5-20%グラディエントゲルで解析した。

組換え E8 フラグメントの収量は培養上清 1L あたり $>5 \text{ mg}$ と完全長ラミンの収量よりも大幅に向上していた。また、293F 細胞由来の内在性プロテオグリカンの混入を確認したところ、完全長ラミン-511 にはプロテオグリカンの混入が検出されたのに対し、ラミン-511E8 フラグメントにはほとんど混入がみられなかった。これらの結果から、ラミン E8 フラグメントは完全長ラミンと同程度のインテグリン結合活性を保持している一方で、大量調製に有利な特性をもつことが明らかとなった。

③第二世代人工基底膜構築に必要な基底膜蛋白質の高発現・安定供給系の構築(大阪大学)

平成 20 年度は、ニドゲン-1、ニドゲン-2、アグリンの高発現・精製系の構築を行った。これらの基底膜蛋白質はラミニンや IV 型コラーゲンに結合する基底膜の主要構成成分であり、より生体内環境を反映した人工基底膜の構築には欠かせない分子である。発現ベクターの作製に際して、ニドゲン-1 とニドゲン-2 は市販の cDNA を利用し、アグリン cDNA はヒト胎盤由来 cDNA ライブラリーより PCR 法によって増幅・クローニングした。発現する蛋白質の C 末端には His タグが付加されるように構築した。ラミニンの場合と同様、ヒト 293F 細胞を用いて発現させ、各蛋白質に付加し

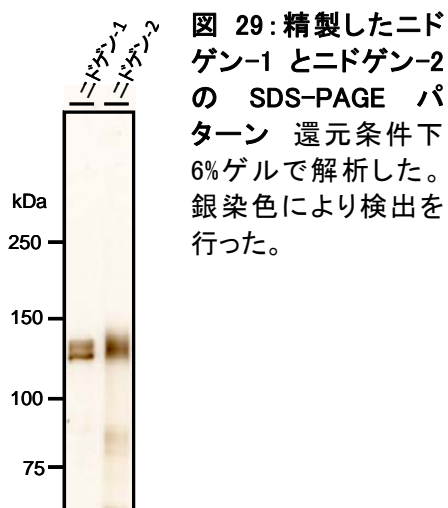


図 29: 精製したニドゲン-1 とニドゲン-2 の SDS-PAGE パターン 還元条件下 6%ゲルで解析した。銀染色により検出を行った。

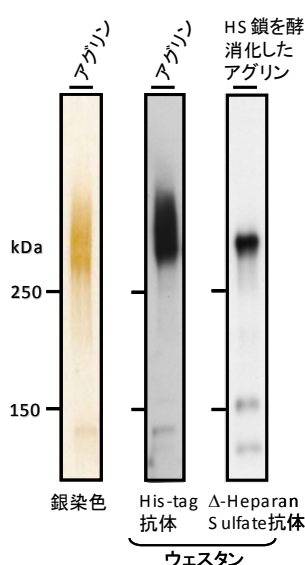


図 30: 精製アグリンの SDS-PAGE とウェスタンブロット 還元条件下 4%ゲルで解析した。銀染色および His タグ認識抗体によるウェスタンブロットで検出した。右端のレーンはヘパラン硫酸(HS)鎖を酵素消化したアグリンを泳動し、HS 鎖付加部位を認識する抗体で検出した。

た His タグを利用してニッケルレジン(キアゲン社製)によるアフィニティ精製を行った。発現条件や精製手順の最適化を行い、最終的に、293F 細胞培養上清 1L からニドゲン-1、ニドゲン-2、アグリンのいずれも >5 mg の精製が可能となっている。各精製蛋白質の SDS-PAGE を行い、銀染色およびウェスタンブロットングで確認したところ、ニドゲン-1 とニドゲン-2 はともに N 末端部分が分解を受けていたものの(図29)、ラミニン及び IV 型コラーゲンに結合するドメインは保持されており、実際に ELISA によって結合能が保持されていることが確認された(次項④-(イ)参照)。一方、アグリンはヘパラン硫酸プロテオグリカンの特徴であるヘパラン硫酸鎖が付加されていることが確認された(図30)。また、精製蛋白質の大部分はコア蛋白質が完全長であり、ラミニン結合能は保持されていることが確認された。

また、平成 20 年度から 21 年度にかけてパールカンの発現・精製系の構築を行った。パールカンは基底膜の代表的なヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、そのヘパラン硫酸鎖は液性因子や他の細胞外マトリックス蛋白質、膜蛋白質との相互作用に重要な働きをしていることが知られている。最初に、内在的にパールカンを発現しているヒト子宮ガン由来 JAR 細胞の培養上清を採集して、パールカン抗体を固相化したイムノアフィニティカラムにかけてパールカンの精製を行った。この精製方法により得られたパールカンの量は、JAR 細胞培養上清 1L あたり 30 μ g と極めて少ないものであった。そこで、パールカン全長 cDNA をヒト胎盤 cDNA ライブラリーより PCR 法によって増幅・クローニングし、発現する蛋白質の C 末端には His タグが付加されるように発現ベク

ターを構築した。これを 293F 細胞で発現させ、その培養上清からニッケルレジジンによるアフィニティ精製を行った。精製条件の最適化を行った結果、純度の高い精製品を培養上清 1L あたり約 5 mg 精製することが可能になった。精製したパールカンの SDS-PAGE を行い、銀染色およびウェスタンブロットで確認したところ、JAR 細胞の培養上清から精製したものと比較して分解が少なく、液性因子との相互作用に重要であるヘパラン硫酸鎖の付加が確認できた(図31)。JAR 細胞を用いた発現系よりも 293F 細胞を用いた発現系の方が純度、発現量、いずれの点においても優れていることから、293F 細胞発現系を採用することとし、パールカンの発現・精製の構築を完了した。

人工基底膜の構築に供する基底膜蛋白質は ES 細胞などの細胞培養系に使用するため、すべて無菌的にしておく必要がある。そのため精製した基底膜蛋白質は PBS (-)で透析後、蛋白質低吸着ディスク型フィルター(0.22 μ m, 13 mm, 親水性 PVDF メンブレン、ミリポア製)を使用して濾過滅菌を行った。フィルトレーション後の回収率は蛋白質の種類によって異なるものの、概ね 65%以上であった。また、SDS-PAGE でフィルター操作前後での精製蛋白質の純度に変化がないことも確認した。このようにして ES 細胞の分化誘導制御技術の開発に必要な基底膜成分を安定供給する態勢が整備された。

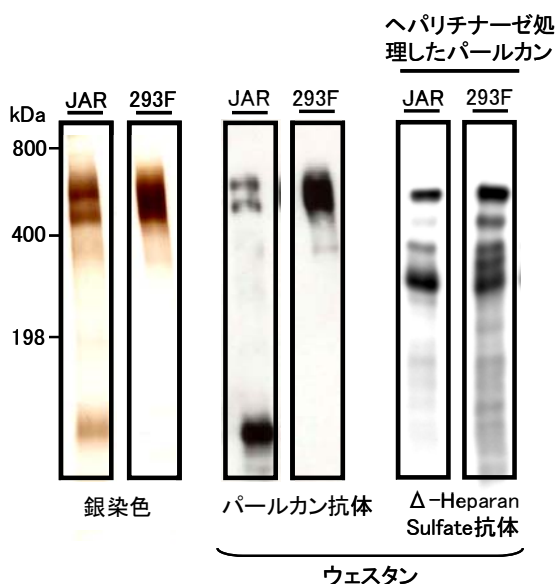


図 31:JAR 細胞と 293F 細胞から精製したパールカンの SDS-PAGE パターン還元条件下 4%ゲルで解析した。銀染色とパール認識抗体によるウェスタンブロットで検出した。右端のレーンはヘパリチナーゼ処理によりヘパラン硫酸鎖を消化してパールカンを泳動し、ヘパラン硫酸付加部位を認識する抗体で検出した。

④人工基底膜の構築技術の開発(大阪大学および日本皮革研究所)

(ア)第一世代人工基底膜の構築: IV 型コラーゲンゲルと様々なラミニンアイソフォームを組み合わせた第一世代人工基底膜を構築するための基礎的条件を検討するため、各ラミニンアイソフォームと IV 型コラーゲンの結合を定量的に解析した。対照として、3 次元培養基材として使用されている I 型コラーゲンと各ラミニンとの結合もあわせて解析した(図32)。その結果、調べた 11 種類のラミニンアイソフォームの中で、ラミニン-332 を除くすべての β 1 鎖ラミニンおよび β 2 鎖ラミニンが IV 型コラーゲンに対して強い親和性を有することが明らかとなった。一方、I 型コラーゲンはどのラミニンに対しても弱い親和性しか示さなかった。これらの結果から、ラミニンを組み込んだ

人工基底膜を構築するためには、I 型コラーゲンではなく IV 型コラーゲンを使う必要があることがわかる。実際に IV 型コラーゲンゲルにラミニン-111 とラミニン-511 を結合させたところ、どちらも結合することが確認された(図33)。しかし、IV 型コラーゲンとラミニンからなる人工基底膜はゲル自体が非常に柔らかく、その上で細胞を培養すると、培地交換の際にゲルが破損し易いことが判明した。また、IV 型コラーゲンをゲル化させるには 4°C で 5 日間以上静置する必要がある、IV 型コラーゲンゲルを ES 細胞の培養用基材として用いるには、これらの問題をまず解決する必要があると考えられた。

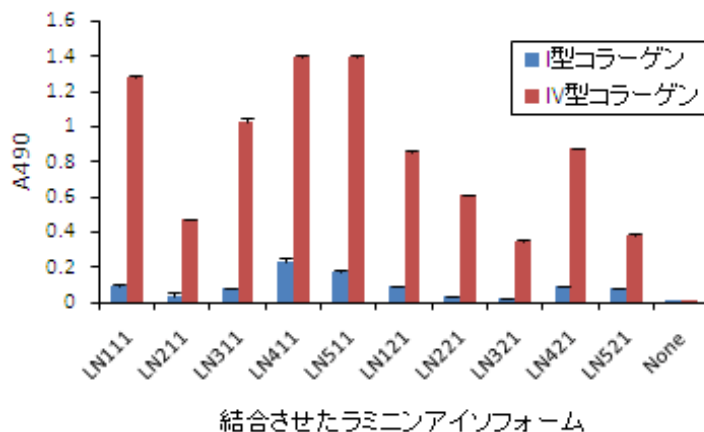


図 32: I 型コラーゲンおよび IV 型コラーゲンに対するラミニンアイソフォームの結合活性 I 型コラーゲンと IV 型コラーゲンを 10 μ g/ml でコーティングしたプレートに、各ラミニンアイソフォームを 10 μ g/ml で添加して室温で 1 時間インキュベートした。結合したラミニンはラミニン γ 1 抗体で検出した。None はラミニンを添加していない対照である。いずれのラミニンも IV 型コラーゲンとは結合したが、I 型コラーゲンとはほとんど結合しなかった。

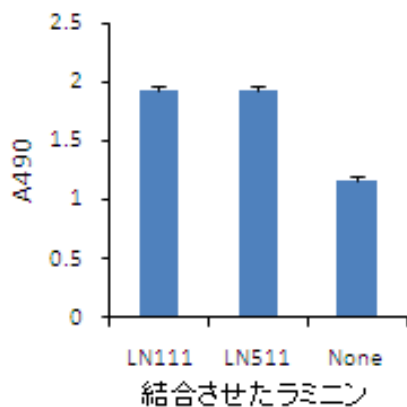


図 33: IV 型コラーゲンゲルへのラミニン結合量評価

1 mg/ml の IV 型コラーゲンを 4°C、5 日間インキュベートしてゲル化させた後、10 μ g/ml のラミニン(LN)-111 または LN-511 を添加して室温で 3 時間インキュベートした。洗浄後、結合したラミニンはラミニン γ 1 抗体で検出した。None はラミニンを添加していない条件(対照)を示す。バックグラウンドが高いものの、IV 型コラーゲンへのラミニンの結合が確認された。

IV 型コラーゲンゲルがもつこれらの問題を解決するため、ゲル化が容易でゲル強度の増加が期

待できる I 型コラーゲンと IV 型コラーゲンとの混成ゲルの形成を試みた。I 型コラーゲンと IV 型コラーゲンをあらかじめ混合し、37°C で 1 時間インキュベートしたところ、物理的に安定なゲルが形成されることがわかった。この I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲルには、洗浄後も IV 型コラーゲンが残っていることを確認している。I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲルの表面構造を走査型電子顕微鏡で観察したところ、I 型コラーゲンの線維上に膜様の付着物が確認され、基底膜様の構造が I 型コラーゲンゲル上で形成されていると考えられた(図34)。この膜様構造は、I 型コラーゲンゲルや、ゲル化能を持たない市販の IV 型コラーゲンを使った混成ゲルでは認められず、ゲル化能を有する IV 型コラーゲンのみで観察された。この I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲルにラミニン-111 またはラミニン-511 を加えて 37°C、2 時間インキュベートし、洗浄後に残ったラミニン量を評価したところ、I 型コラーゲンゲルや、ゲル化能を持たない市販の IV 型コラーゲンとの混成ゲルと比較して、効率よくラミニンがゲル上に保持されていることがわかった(図35)。このようにして、I 型/IV 型コラーゲン混成ゲルを 3 次元ゲル基材とする第一世代人工基底膜の作製に成功した。

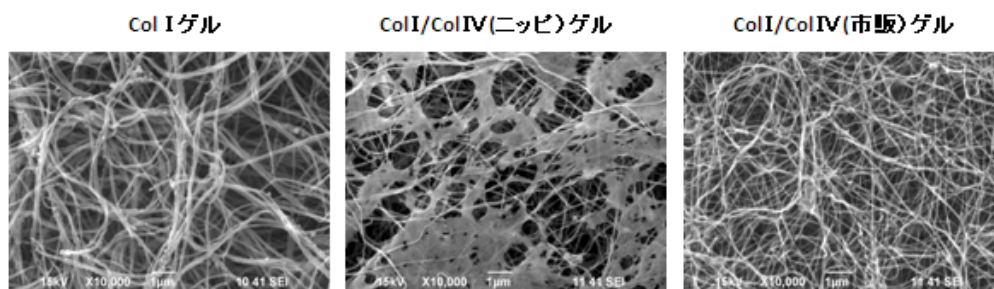


図 34:コラーゲンゲル表面の走査型電子顕微鏡像 1.5 mg/ml の I 型コラーゲン(Col I)ゲルとニッピ(Col IV ニッピ)または市販(Col IV 市販)の IV 型コラーゲン 0.5 mg/ml を I 型コラーゲン 1.5 mg/ml と混合して形成させたゲルの表面構造。ゲル化能を持つニッピの IV 型コラーゲンを混成したゲル(中央)では、I 型コラーゲンの線維上に膜様の付着物が確認された。

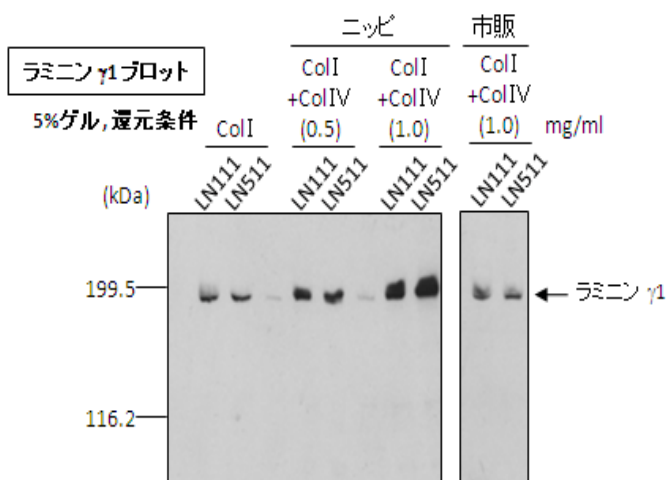


図 35:コラーゲンゲル上へのラミニン結合量の評価 I 型コラーゲン(1.5 mg/ml)に濃度を変えた IV 型コラーゲン(ニッピまたは市販品)を混合してゲル化させ、50 μ g/ml のラミニン(LN)111 または LN511 を加えて 37°C で 2 時間インキュベートした。洗浄後、ゲルを溶解して LN γ 1 抗体でブロットした。ゲル化能を保持した IV 型コラーゲンの含量に比例して、LN の結合量が増加している。

(イ) 第二世代人工基底膜の構築

ラミニン以外の基底膜成分(ニドゲンおよびヘパラン硫酸プロテオグリカン)を組み込んだ第二世代人工基底膜の構築方法を探るため、ニドゲン 2 種(ニドゲン-1、ニドゲン-2)、ヘパラン硫酸プロテオグリカン 2 種(アグリンとパールカン)とラミニンおよび I 型、IV 型コラーゲンとの結合活性を固相結合アッセイ法により検討した(図36)。その結果、ニドゲンはニドゲン-1、ニドゲン-2 ともにラミニンには強く結合し、IV 型コラーゲンには微弱な結合活性しか示さないことがわかった。I 型コラーゲンにはどちらのニドゲンも結合しなかった。同様に、アグリンとパールカンもラミニンに対して強い結合活性を示したが、I 型コラーゲンとはまったく結合せず、IV 型コラーゲンに対しても結合しないか(アグリン)、弱い結合活性しか示さなかった(パールカン)。以上から、第二世代人工基底膜を構築するためには、IV 型コラーゲンにラミニンを結合させ、その上にニドゲン・アグリン・パールカンを結合させればよいと考えられる(図37)。

I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲルにラミニン 511・ニドゲン-1・パールカンを添加したところ、パールカン単独ではほとんど結合しなかったのに対し、3 者を混合した場合はいずれもゲルに結合したことが確認された(図38)。パールカンの代わりにアグリンを使用した場合も同様に結合可能であることを確認している。以上から、IV 型コラーゲンとラミニンに加え、ニドゲンやヘパラン硫酸プロテオグリカンを組み込んだ第二世代人工基底膜の構築に成功した。

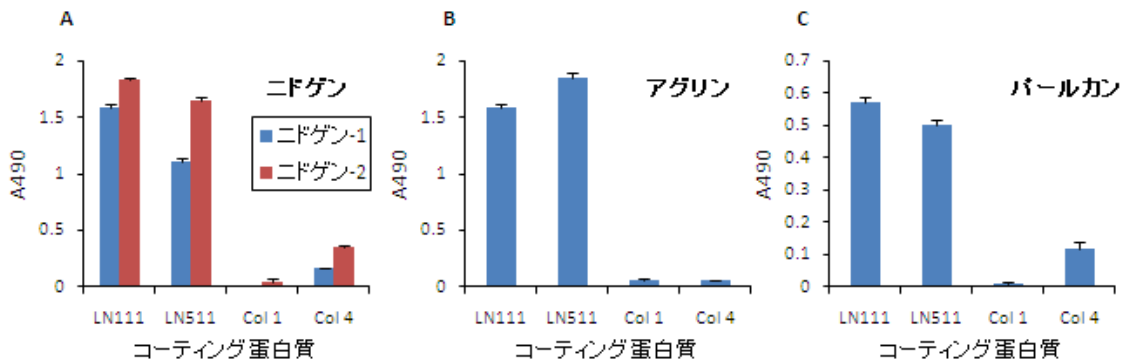


図 36: ニドゲン、アグリン、パールカンのラミニンとコラーゲンへの結合特異性評価 ラミニン(LN)-111、LN511、I 型コラーゲン(Col 1)、IV 型コラーゲン(Col 4)を 10 μ g/ml でコーティングしたプレートに、ニドゲン-1 またはニドゲン-2 (A)、アグリン(B)、パールカン(C)を 10 μ g/ml で添加し、室温で 1 時間インキュベートした。結合した各蛋白質の量は、各組換え蛋白質に付加している His タグに対する抗体で検出した。

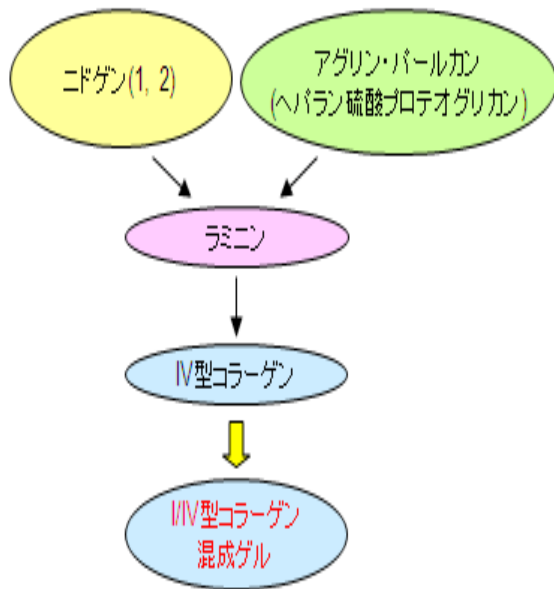


図 37: 基底膜蛋白質間の結合特異性と第二世代人工基底膜構築の戦略 IV 型コラーゲンはラミニンと強く結合するが、ニドゲンやアグリン・パールカンとの結合は弱い。ラミニンはニドゲンやアグリン・パールカンとも強く結合することから、第二世代人工基底膜の構築には、IV 型コラーゲンゲルにラミニンを結合させ、その上にニドゲンやアグリン・パールカンを結合させるとよいことがわかる。IV 型コラーゲン単独ゲルよりも I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲルが 3 次元基材として適している。

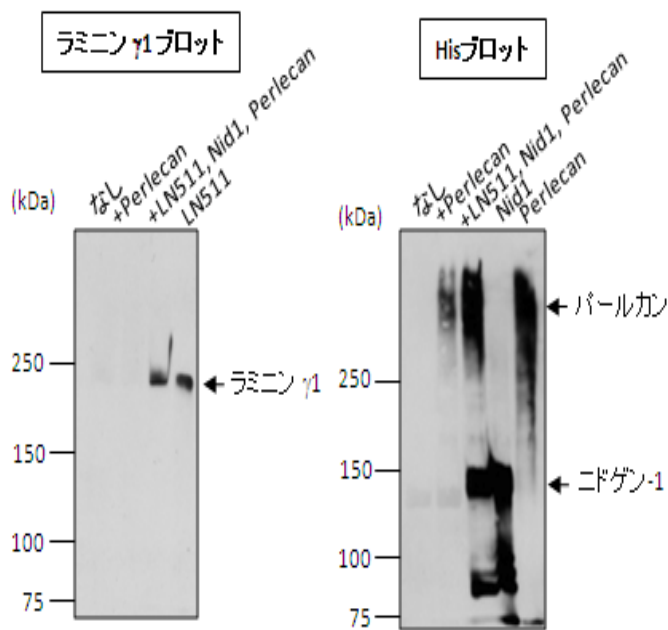


図 38: I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲル上へのラミニン・ニドゲン・パールカンの結合 I 型/IV 型コラーゲン混合ゲル化に、パールカン単独(+perlecan)、あるいはラミニン(LN)511、ニドゲン-1(Nid1)、パールカン混合物(+LN511, Nid1, perlecan)を添加し、37°Cで 2 時間インキュベートした。洗浄後ゲルを溶解して、LN・1 抗体(左)および抗 His 抗体(右)でプロットした。パールカン単独でほとんどゲルに結合しなかったが、LN511・ニドゲン-1 と同時に添加するとパールカンが混成ゲルに保持されている。

この I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲルを基材とした人工基底膜は、-80°Cで凍結保存・輸送が可能である。また、37°Cで解凍してもゲルの形状を保ち、結合させた基底膜蛋白質も保持されていることを確認している。解凍後のゲルはそのまま ES 細胞の培養に利用可能である。I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲルは、IV 型コラーゲン単独ゲルよりも短時間で作製可能な上に、ラミニンや他の基底膜構成成分をカスタマイズすることが可能であり、3 次元人工基底膜の基材として有用であると考えられる。本混成ゲルの作製法については、2009 年 10 月に特許申請を行った。

⑤基底膜組み込み型増殖因子の創製(大阪大学)

細胞外マトリックスは、細胞が接着するための単なる足場ではなく、近傍の細胞を含めた外部環境(間質)から発信される情報(増殖因子)を受け取り、増殖因子シグナルを制御するインターフェイスとしての役割を果たしている。そこで、細胞増殖と分化に深く関わる HGF とアクチビン A を人工基底膜に選択的に不溶化する方法の確立をめざした。具体的には、アグリン N 末端ドメインがラミニンと結合する性質を利用し、これを増殖因子とキメラ化することにより基底膜組み込み型の増殖因子の創製を試みた。ニワトリアグリン N 末端ドメイン(Nt)は γ 1鎖を含むマウスラミニン-111、-211、-221 と強く結合することが知られている。しかし、それ以外のラミニンとの結合については不明である。事業分担者は、まず 293F 細胞を用いて Nt ドメインを調製し、各ラミニンアイソフォームとの結合活性を調べた。その結果、Nt はラミニン-111、-221、-511 と強く結合したが、血管基底膜に存在するラミニン-411 との結合能はラミニン-211 の約2割にとどまった。表皮基底膜に存在するラミニン-332 とは結合しなかった。また Nt-GFP 融合蛋白質は基底膜様成分マトリゲルに不溶化されることが判った(図39)。

293F 細胞を用いて HGF-Nt 融合蛋白質を発現させ、ニッケルレジンカラムで組換え蛋白質を精製した。HGF は Nt と融合することによって、ラミニン-111、-221 との結合能を獲得し、かつ HGF の本来の生理活性(受容体 c-Met のリン酸化、細胞分散活性、血管内皮細胞の増殖促進活性)を完全に保持していることが明らかとなった。このようなラミニン結合型 HGF を用いてラミニン上において血管内皮細胞の増殖促進活性を調べた結果、HGF-Nt は細胞増殖活性を保持していた。また、ラミニン-111 に固定化された HGF-Nt も血管内皮細胞に対して増殖促進活性を示した。

次に、ヒトアグリン N 末端ドメイン Nt について検討した。ヒト Nt はニワトリ Nt と同様、ラミニン-511 と ラミニン-221 に最も高い親和性を示した。アクチビン A(Act)はヒト Nt と融合することによって、ラミニン-511 との結合能を獲得した。Nt-Act 融合蛋白質はラミニン-511 に結合後もアクチビン A の生理活性(Smad 依存的遺伝子発現活性)を保持していた。これらの結果は、Nt とキメラ化した増殖因子(HGF-Nt と Nt-Act)がラミニン-111、-221、-511 を含む人工基底膜上での細胞培養、分化誘導の制御に有用であることを示している。

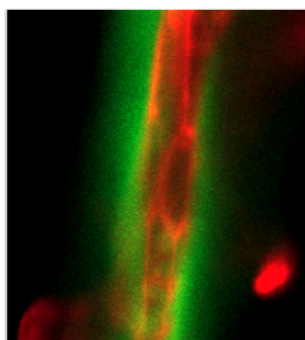


図 39:細胞周囲に不溶化された Nt-GFP Nt-GFP を発現する A431 細胞をマトリゲル上で3日間培養した後、発現蛋白質の局在を観察した。Nt-GFP(緑)は細胞周辺のマトリゲルに不溶化されている。細胞をアクチン(赤)で染色した。

(4) 目標の達成度と意義

①IV型コラーゲンの安定供給系の開発(日本皮革研究所)

平成 18 年度の目標は、生体内に近い3次元ゲル構造をとることができる IV 型コラーゲンの安定供給系を確立することであった。材料は IV 型コラーゲンを豊富に含むレンズ囊に定め、できるだけ収量の上がる動物から検索を始めた。連続的な材料供給が可能で、眼球の大きな4種の動物から IV 型コラーゲンの抽出を試みた結果、ウシを材料に用いた場合に最も効率よく IV 型コラーゲンが得られることが明らかとなった。これまでに約 100 mg の高純度の IV 型コラーゲンが得られており、当初の目標を十分に達成することができた。

従来、マウス EHS 肉腫を材料とした IV 型コラーゲンが市販されているが、正常動物から抽出されたゲル化能を有する IV 型コラーゲンは市販されておらず、今回はじめて安定的に供給できる体制を整えることができた。平成 19 年度～平成 21 年度は、このようにして調製した IV 型コラーゲンを基材に用いる第一世代人工基底膜、さらに第二世代人工基底膜の開発を大阪大学と共同して進め、計画通りに IV 型コラーゲン、ラミニン、ニドゲン、パールカンを組み合わせた第二世代人工基底膜の構築に成功した。また、その過程で、人工基底膜の基材として I 型コラーゲンと IV 型コラーゲンの混成ゲルを開発し、改良型の人工基底膜の構築に成功した。これらの成果は、当初の目標を十分に達成している。

②ラミニンの高発現系・安定供給系の構築(大阪大学)

当初の計画通り、 α 鎖の異なる5種類のラミニンアイソフォームの高発現系・安定供給系を確立し、それぞれ 5 mg 以上の精製ラミニンの調製に成功した。また、得られた精製ラミニン標品は、SDS-ゲル電気泳動に見る限り、分解の少ない高純度標品であることが確認された。また、精製標品のインテグリン結合活性についても予備的解析を進めているが、これまでに調べた限り、従来の方法で調製した標品と同等の活性が確認されている。これらの結果より、平成 18 年度の目標は十分に達成されたといえる。また、平成 19 年度～21 年度においては、 $\beta 2$ 鎖を含むラミニンアイソフォームの発現・精製法を確立し、細胞接着活性を持たない $\gamma 3$ 鎖ラミニンを除く全アイソフォームの安定供給系の構築を完了した。また、 $\beta 1$ 鎖ラミニン、 $\beta 2$ 鎖ラミニンともに、トランスフェクションの条件および精製法を改良し、収量を 1.5～2 倍高めることに成功した。さらに、ラミニンの細胞接着活性部位だけを含む組換え E8 フラグメントの発現系を構築し、このフラグメントが全長ラミニンとほぼ同等の細胞接着活性を有すること、収量は全長ラミニンと比べて 5～10 倍増加し、不純物の混入もほとんどないことを確認した。この組換え E8 フラグメントはヒト ES 細胞のフィーダーフリー培養基材として有用であることが、京都大学との共同研究で明らかにされている。以上の成果は、当初の目標を達成するに止まらず、ヒト ES 細胞の培養技術開発におけるブレークスルーとなるものである。

③第二世代人工基底膜構築に必要な基底膜蛋白質の高発現・安定供給系の構築(大阪大学)

第二世代人工基底膜の構築に必要な 2 種類のニドゲン(ニドゲン-1、ニドゲン-2)および 2 種類のヘパラン硫酸プロテオグリカン(アグリニン、パールカン)の組換え蛋白質の発現系を構築し、これ

らを安定に供給する態勢を整え、期間内に完了した。パールカンの場合は、完全長 cDNA が 13 kb という巨大な糖蛋白質であり、そのクローニングには多くの労力を要したが、比較的短い期間でこれを達成することができた。また、高発現・安定供給の要求を満たすため、発現・精製系の最適化を行い、いずれも mg 単位の精製収量を達成している。これらの成果より、当初の目標は十分に達成されたと考えられる。なお、これら組換え蛋白質を利用することにより、第二世代人工基底膜の構築が可能となり、分子組成を細胞ごとにカスタマイズした人工基底膜の構築が可能となった。

④人工基底膜の構築技術の開発(大阪大学および日本皮革研究所)

分子組成をカスタマイズした人工基底膜の構築は、本プロジェクトの中核となる研究課題である。当初の計画通り、平成 19 年度には IV 型コラーゲンとラミニンの 2 成分からなる第一世代人工基底膜の構築に成功し、平成 21 年度には IV 型コラーゲン、ラミニン、ニドゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの 4 成分からなる第二世代人工基底膜の構築に成功した。どちらの場合も、ラミニンのタイプやヘパラン硫酸プロテオグリカンのタイプを細胞ごとにカスタマイズすることが可能であり、当初の「細胞ごとに分子組成をカスタマイズした人工基底膜の構築」という目標を達成している。なお、当初計画していた IV 型コラーゲン単独のゲルでは細胞培養用基材として物理的強度が不十分であるため、IV 型コラーゲンと I 型コラーゲンの混成ゲルを利用する新たな 3 次元培養基材の開発に成功している。この I 型/IV 型コラーゲン混成ゲルは、I 型コラーゲンの物理的強度と IV 型コラーゲンの生理活性(ラミニンやその他の基底膜分子に対する結合能)を併せ持ち、人工基底膜の 3 次元ゲル基材としては理想的である。これらの成果は、当初の目標を十分に達成しているだけでなく、I 型/IV 型コラーゲン混成ゲルを利用した新たな 3 次元細胞培養用基材の開発の嚆矢となるものである。

⑤基底膜組み込み型増殖因子の創製(大阪大学)

生体内では基底膜に様々な増殖因子、分化誘導因子が結合し、その局在と活性が制御されている。足場としての機能に加えて、増殖因子の貯蔵機能・活性制御機能を持たせることにより、生体内での機能をより忠実に反映した人工基底膜の構築が可能となる。本課題では、アグリンの N 末端ドメイン Nt が強いラミニン結合活性を持つことに着目し、Nt とのキメラ化により、HGF を基底膜組み込み増殖因子の改造することに成功した。また、アクチビン A にこの方法を適用し、本来の生理活性を保持したままラミニン結合能を獲得した基底膜組み込み型アクチビン A の作製にも成功した。この方法を様々な増殖因子、分化誘導因子に応用することにより、本来拡散性の液性因子をあらかじめ組み込んだオールインワン型人工基底膜の構築が可能となる。

2. 2. 4. 3 人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発

大阪大学および日本皮革研究所

(1)事業目的と背景

分子構成の異なる人工基底膜を用いて、ES細胞を特定の細胞系譜に分化誘導する技術開発を行う。従来、ES細胞の選択的分化誘導制御は、主に液性因子の側から研究が進められており、

細胞外基質の側からES細胞の分化誘導を系統的に解析した研究はごくわずかである。特に、基底膜の分子構成に着目した解析は、細胞培養に利用可能な基底膜分子が EHS 腫瘍由来の基底膜粗抽出物マトリゲルやそこから分離・精製されたラミニン-111 と IV 型コラーゲンにほぼ限定されるため、それ以外の基底膜分子を含めた網羅的解析はこれまで皆無といってもよい状況にある。本課題では、細胞ごとに最適化された基底膜分子構成を反映させた人工基底膜を構築し、その有用性をマウスES細胞の選択的分化誘導の観点から検証することを目的とする。なお、ヒトES細胞を用いた選択的分化誘導活性の評価は京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究所、熊本大学と共同して別途行う。

(2) 事業内容と目標

ES 細胞から組織特異的な細胞分化を誘導するためには、まず分化の初期段階において、外胚葉、内胚葉、中胚葉それぞれの細胞系譜への選択性を制御することが重要である。未分化ES細胞をいったん分散させ、浮遊細胞塊(以下、胚様体と呼ぶ)として leukemia inhibitory factor (LIF) 非存在下で培養すると、自発的な分化により外胚葉、中胚葉(心筋を含む)、内胚葉を含む複数の系譜の細胞が誘導される。本課題では、胚様体を介したマウスES細胞の三胚葉分化誘導実験系の立ち上げ、人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導を実証することを目標とする。人工基底膜としては、様々なラミニンと IV 型コラーゲンを組み合わせた第一世代人工基底膜およびこれに細胞特異的に発現する基底膜分子を組み込んだ第二世代人工基底膜を用いる。初年度の平成 18 年度は、人工基底膜の活性評価に不可欠なマウスES細胞の三胚葉分化誘導系を立ち上げることを達成目標とした。平成 19 年度～21 年度は、マウス三胚葉分化誘導系を利用して、心筋細胞、肝臓細胞、膵臓前駆細胞への分化誘導条件を検討するとともに、京都大学、幹細胞創薬研究所、熊本大学と共同して、ヒトES細胞の未分化性維持(京都大学)、心筋細胞分化(幹細胞創薬研究所)、肝臓・膵臓前駆細胞分化(熊本大学)に最適化した人工基底膜の開発を行う。

(3) 研究成果

①人工基底膜によるES細胞の三胚葉分化誘導制御(大阪大学)

2 種類のES細胞、ht7 および Nkx2.5-GFP(Hidaka et al., FASEB J, 17, 740, 2003)を用いて、胚様体形成を介する三胚葉分化誘導系を立ち上げ、その妥当性を検討した。ht7 はフィーダーフリー培養が可能で、Oct-3/4 遺伝子制御下で発現するハイグロマイシン耐性遺伝子が組み込まれており、ハイグロマイシンを培地に常時添加することで未分化細胞が選択的に維持される。Nkx2.5-GFP は ht7 を親株とし、さらに心筋分化マーカーである Nkx2.5 遺伝子座に GFP が挿入されている。これらの未分化 ES 細胞を trypsin/EDTA 処理で分散させ、10%血清含有 DMEM に懸濁し、細胞 500 個を一単位として hanging drop 法により 2 日間培養して胚様体を形成させた。これらの胚様体を 5 日間浮遊培養した後、再び trypsin/EDTA 処理で細胞を再分散させ、ゼラチン被覆基質上に播種して培養を継続し、三胚葉の分化マーカーの発現を定量 RT-PCR 法により解析した(図 40)。なお、Nkx2.5-GFP については、GFP 蛍光を心筋分化の指標としてフローサイトメーターによる解析を行ったが、Nkx2.5 制御下の GFP 蛍光が非常に弱く、心筋分化の指標としては適当ではないと判断している。

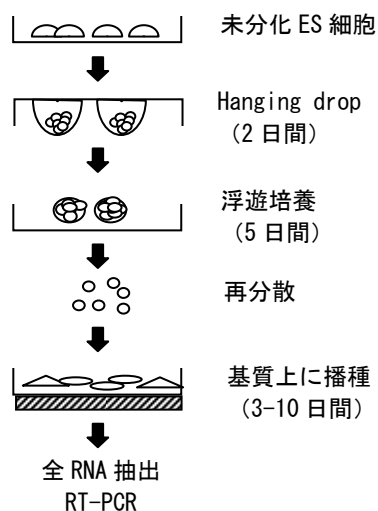


図 40: 胚様体を介したES細胞の分化誘導系

未分化 ES 細胞は feeder-free、10% Knockout Serum Replacement (Invitrogen)および 1%血清含有 DMEM、LIF、ハイグロマイシン存在下で維持した。胚様体の形成以後は 10%血清含有 DMEM で培養を行った。

定量 RT-PCR による解析から、ht7 と Nkx2.5-GFP とともに、5 日間浮遊培養した胚様体では Oct3/4 の発現が顕著に低下し、初期内胚葉分化マーカーである Gata4 の発現が上昇していることが示された。さらに、胚様体を再分散させてゼラチン被覆基質上で培養した細胞では、初期外胚葉マーカーである Fgf5、中胚葉マーカーである Brachyury の発現がそれぞれ上昇することが確認された(図 41)。これらの結果から、いずれのES細胞においても、胚様体形成による自律的な分化を介して、三胚葉それぞれの系譜への初期分化が誘導されることが確認された。

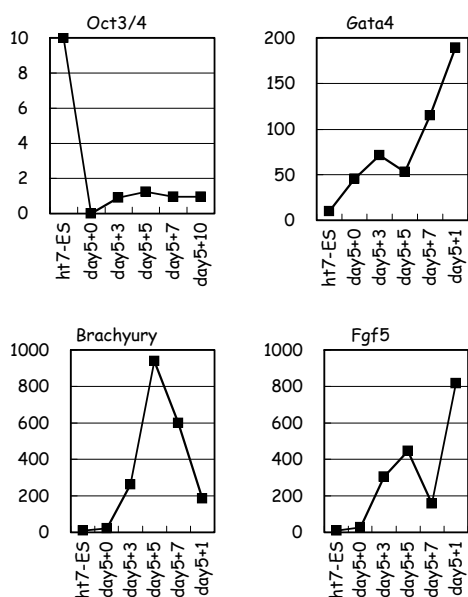


図 41: 胚様体を再分散させたES細胞における分化マーカーの発現挙動 定量 RT-PCR による分化マーカーの発現。グラフは ht7 の結果で、未分化ES細胞(ht7-ES)、胚様体浮遊培養 5 日目(d5+0)、胚様体を再分散した細胞をゼラチン被覆基質上に播種し、3、5、7、10 日目(d5+3, 5, 7, 10)の値を示す。定量 RT-PCR の値は Gapdh を標準として補正し、ht7-ES の値を 10 とした場合の相対値を縦軸に示した。

次に、培養基質の効果を解析するための予備的検討として、ht7 の胚様体を再分散した細胞を異なる細胞外マトリックス蛋白質被覆基質上に播種し、細胞接着、増殖、分化マーカーの発現について解析した。細胞外マトリックス蛋白質として、EHS 腫瘍由来ラミニン-111、組換えラミニン-511、

ヒトフィブロネクチン、ウシ IV 型コラーゲン、マトリゲルを用いた。これらの蛋白質はいずれも PBS 中で 20 mg/ml に希釈後、24 ウェル細胞培養プレート上に 4°C 一晚吸着させ、被覆基質とした。この基質上に胚様体を再分散させた細胞を低密度で播種し、3~10 日間培養した後、全 RNA を回収して各分化マーカーの発現を定量 RT-PCR により解析した。

全 RNA の収量を指標として、各基質上での細胞の増殖を比較したところ、ラミニン-111 および IV 型コラーゲン上に播種した細胞では全 RNA 収量の増加率が小さく、ラミニン-511、フィブロネクチン、マトリゲル上の細胞と比べて細胞増殖が遅延していることが示唆された(図42A)。また、代表的な分化マーカー遺伝子の継時的な発現を比較したところ、特に中胚葉マーカー Brachyury の発現パターンについて基質間で顕著な差異が観察された(図42B)。未分化 ES 細胞および胚様体では Brachyury の発現はほとんど認められないが、胚様体を再分散して IV 型コラーゲンやマトリゲル上に播種した場合には一過性に発現が上昇した。ラミニン-111、ラミニン-511、フィブロネクチン上では明瞭な発現上昇は確認されなかった。外胚葉マーカーである Fgf5 の発現は未分化 ES 細胞や胚様体では低く、胚様体を再分散して播種すると発現が若干上昇し、基質間でも発現パターンに差異が認められた(図42C)。内胚葉マーカーである Gata4 の発現は胚様体の浮遊培養の段階で誘導され、再分散して播種した細胞においては発現が維持もしくは緩やかに増加した。検討した範囲では基質間の Gata4 発現の明瞭な差異は見出されなかった(図42D)。以上の結果から、胚様体を介する誘導系が三胚葉への選択的分化誘導の評価系として利用可能であることを示された。

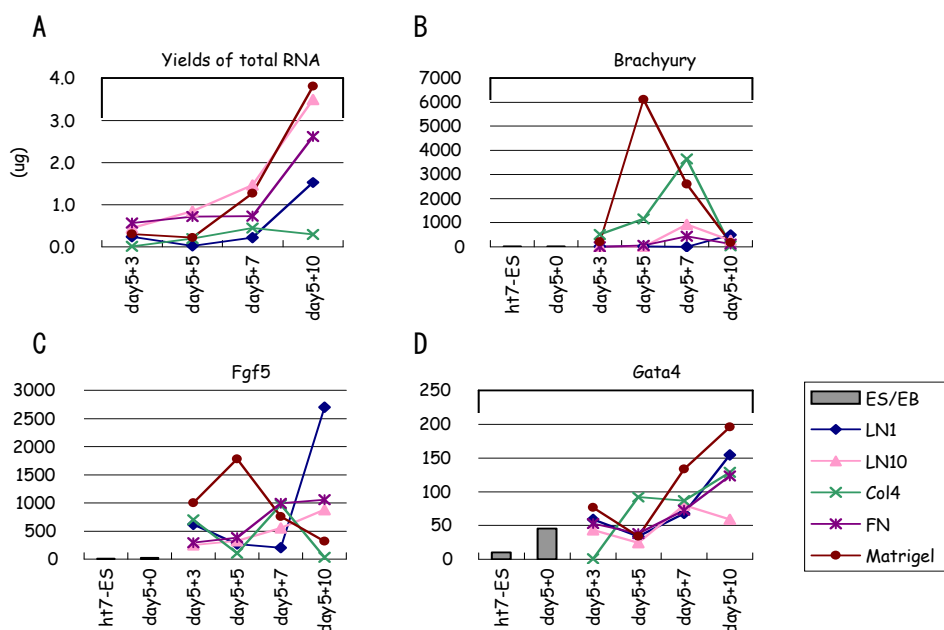


図 42: 各種基質上に播種した ES 細胞の全 RNA 量および分化マーカーの発現 A) ht7 の胚様体を浮遊培養後に再分散させ、各種被覆基質上に播種して継時的に全 RNA を抽出し、RNA 収量 (μg) を示した。B-D) 定量 RT-PCR により各種分化マーカーの発現を継時的に解析した。定量 RT-PCR の値は Gapdh を標準として補正し、未分化 ES 細胞 (ht7-ES) の値を 10 とした場合の相対値を縦軸に示した。

②人工基底膜による心筋分化誘導(大阪大学)

(ア) マウスES細胞を用いた条件検討: 平成 19 年度以降は、胚葉体を用いた心筋分化誘導における基底膜蛋白質の効果について検討を行った。ES細胞からの心筋分化誘導法としては、noggin で前処理したES細胞を浮遊培養する方法(Yuasa et al, Nature Biotech, 23, 607, 2005)を改変して用いた(図43)。LIF 存在化で noggin 処理した細胞を解離し、低密度で浮遊培養して胚葉体を形成させると、高い効率で心筋細胞の分化が誘導されることを確認した。

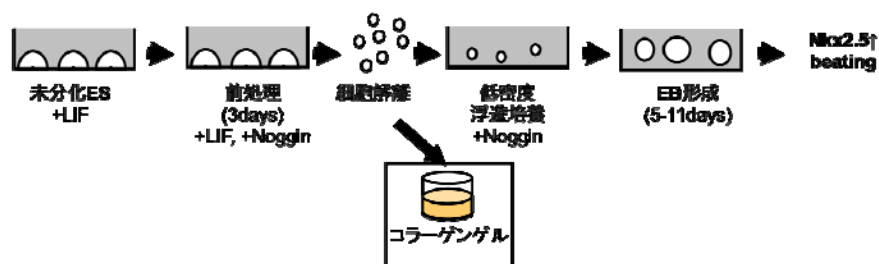


図 43: Noggin 処理による心筋分化誘導法 LIF 存在化でマウスES細胞を 3 日間 noggin 処理し、低密度での浮遊培養により胚葉体を形成させると、高効率で拍動細胞が出現し、Nkx2.5 など心筋分化マーカー遺伝子の発現上昇が確認された。心筋分化における細胞外マトリックスの影響を検討するため、浮遊培養の際にコラーゲンゲルを用いた方法、浮遊培養中への細胞外マトリックス蛋白質の添加を検討した。

次に心筋分化初期における細胞外マトリックスの分化誘導効果を検討するため、浮遊培養と基質上で培養した細胞で心筋分化効率の比較を行った。基質としては I 型コラーゲンゲル、および新たに開発した I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲルを用いた。noggin で前処理した細胞を I 型コラーゲンゲル上で培養したところ、心筋分化マーカー遺伝子の発現上昇は見られなかった。また、細胞をゲル内に包埋して培養した場合には、I 型コラーゲンゲルでは細胞が増殖せず、I 型/IV 型混成ゲルでは細胞は増殖したが心筋への分化は見られなかった。これらの結果から、少なくとも心筋分化の初期段階では基質への接着が抑制的な効果をもつ可能性が示唆された。

そこで、細胞が基質に接着することによる影響を排した状態での細胞外マトリックスからのシグナルの効果を検討するため、浮遊培養の培地中に各種細胞外マトリックス蛋白を添加して分化誘導を行なった。上記実験と同様に noggin 処理した細胞を用い、浮遊培養の培地中に、心臓形成初期の基底膜で発現が見られるラミニン-111、-411、-511、およびマトリゲルを添加して 11 日間培養後の心筋分化マーカー遺伝子の発現レベルを定量した。その結果、いずれの蛋白質を添加した場合でもマーカー遺伝子の発現の上昇は見られず、むしろ心筋分化には抑制的な影響があることが示唆された(図44)。

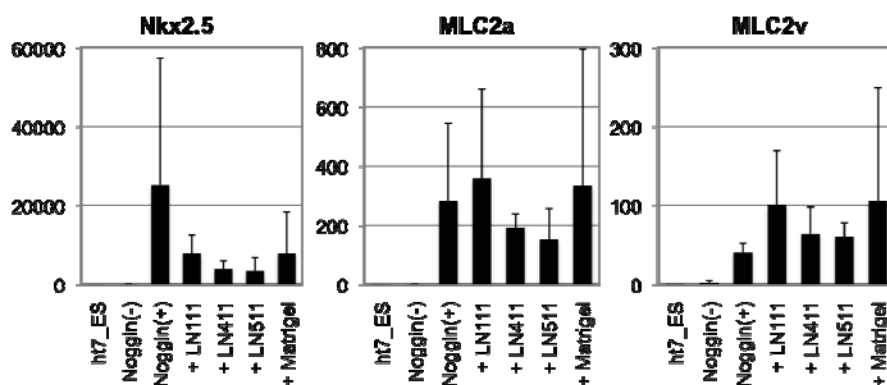


図 44: 心筋分化誘導で培地中に添加した細胞外マトリックスの影響 noggin 処理を行ったマウスES細胞を低密度で浮遊培養すると心筋分化マーカー遺伝子(Nkx2.5、MLC2a、MLC2v)の発現上昇が確認された(Noggin (-)、Noggin (+))。さらに浮遊培養の培地にラミニン、マトリゲルを添加した場合、Nkx2.5 の発現は抑制され、MLC2a、MLC2v についても有意な促進効果は認められなかった。遺伝子発現量は定量 RT-PCR により評価し、未分化ES細胞(ht7_ES)を1とした相対値で示した。

(イ)ヒト ES 細胞を用いた条件検討: 心筋細胞周囲の基底膜の発現プロファイルの解析(2.2.5.1の項を参照)から、心筋細胞は発生がすすむにしたがって細胞周囲にラミニン-211 を主体とする基底膜を形成することが判明している。このことから、心筋細胞の分化後期において、ラミニン-211 が何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。この可能性を検討するため、幹細胞創薬研究所と共同して、ヒトES細胞由来心筋細胞の分化後期におけるラミニン-211 の影響について検討した。ヒトES細胞を END-2 細胞と共培養することで心筋細胞が誘導され(初期誘導)、さらに長期培養すると成熟型的心筋細胞へと分化がすすむ。初期誘導後の心筋コロニーを接着培養と浮遊培養に分け、それぞれ未添加、PBS 添加、ラミニン-211 添加で2週間培養を行い、分化マーカー遺伝子の発現を調べた。しかし検討した範囲では、ラミニン-211 添加による心筋成熟分化マーカー発現の促進は見られなかった。

③人工基底膜による肝細胞・膵臓細胞への分化誘導(大阪大学)

熊本大学と共同して、ヒトES細胞の肝臓前駆細胞への分化誘導における人工基底膜の有用性を検討した。あらかじめ M15 細胞との共培養により内胚葉に選択的に分化誘導したヒトES細胞を様々な分子組成の人工基底膜上に播種し、6日間培養すると、 α フェトプロテインが高発現する組み合わせが確認された。また、同様に、M15 細胞との共培養により内胚葉に分化誘導したマウスES細胞を様々な分子組成の人工基底膜上に播種し、2週間培養すると、膵臓分化マーカーが高発現する組み合わせがあることがわかった。これらの結果は、分子組成をカスタマイズした人工基底膜が特定の細胞系譜への選択的分化誘導に有効であることを示している。

④人工基底膜の分化誘導活性評価(大阪大学および日本皮革研究所)

(ア)マウスES細胞を用いた条件検討(大阪大学): 本研究で開発した I 型/IV 型コラーゲン混成ゲルを基材とする人工基底膜の有用性を評価するため、マウスES細胞を組成の異なるコラーゲンゲル上で LIF 非存在下で培養し、その形態と分化マーカー遺伝子の発現を比較した。IV 型コラーゲン・ラミニンを含む人工基底膜上に播種したES細胞は、ゲル上に接着・増殖して小型のコロニーを多数形成し、I 型コラーゲンゲルとはコロニー形態が大きく異なっていた(図45)。分化マーカー遺伝子の発現を確認したところ、いずれのゲル上でも未分化マーカーOct-3/4 の発現は低下し、細胞が分化したことが示唆された。また、I 型コラーゲンゲル上では中胚葉マーカー遺伝子である Flk1 の発現が誘導されるのに対し、人工基底膜上では Flk1 の誘導が比較的強く抑えられることが示された。一方、初期外胚葉(エピプラスト)のマーカー遺伝子である Fgf5 の発現は人工基底膜上で I 型コラーゲン単独ゲルよりも効果的に誘導されることを見いだされた。これらの結果から、IV 型コラーゲンとラミニンからなる人工基底膜は I 型コラーゲンとは明らかに異なる生理活性を持ち、中胚葉系への分化を抑制してエピプラスト分化を促進あるいは安定化すると考えられる。

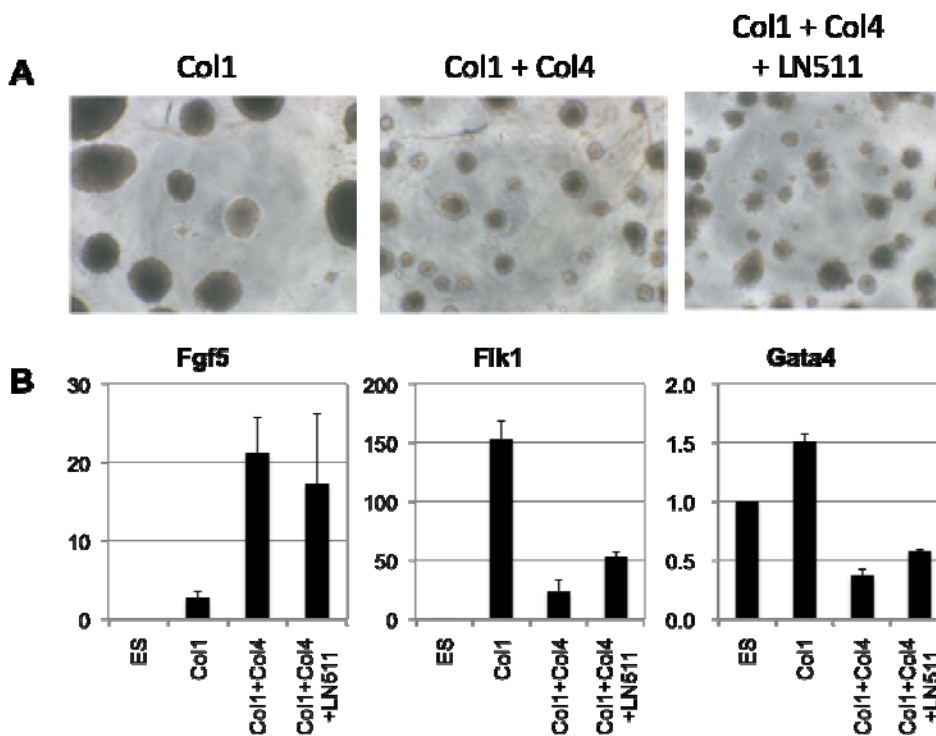


図 45: 人工基底膜上で培養した ES 細胞の挙動はコラーゲンゲルとは異なる マウスES細胞を LIF 非存在化で I 型コラーゲンゲル、I 型/IV 型コラーゲン混成ゲル、さらにラミニン-511 を添加した人工基底膜上で 5 日間培養した。(A)細胞コロニーの形態はゲル間で顕著な違いが見られた。(B)遺伝子発現パターンも、I 型コラーゲンゲルと I 型/IV 型混成ゲル、人工基底膜上では顕著な違いがみられた。遺伝子発現レベルは定量 RT-PCR によって評価し、未分化ES細胞(ES)を 1 とした相対値を示した。

(イ)ヒトケラチノサイトを用いた条件検討(日本皮革研究所): 細胞の分化形質維持における人工基底膜の有用性を評価するため、ヒト皮膚ケラチノサイト(HFKs)を用いた検討をあわせて行った。

HFKs は I 型コラーゲンゲルと IV 型コラーゲンゲル上で培養した場合に異なる挙動を示すことが知られており、その増殖、分化にはラミニンからのシグナルが関わっていると考えられている。そこで、ラミニン 511 を含む人工基底膜上で培養した HFKs の生存、増殖、分化を従来の I 型コラーゲンゲルと比較した。しかし、人工基底膜上の HFKs は I 型コラーゲンゲル上の細胞と同じような生存、増殖パターンを示し、いずれのゲル上においても分化抑制が観察された。

⑤組換えラミニンを利用したヒトES細胞フィーダーフリー培養基材の開発(大阪大学)

ヒトES細胞のフィーダーフリー培養基材としての組換えラミニンの有用性を京都大学と共同して検討した(2.2.6 を参照)。α鎖の組成が異なる 5 種類の組換えラミニンアイソフォームを被覆した培養基質上でヒトES細胞を培養したところ、ラミニン-332 および -511 を被覆した基質上では、未分化性を維持されたままヒトES細胞が経代培養可能であることがわかった。ラミニン-332 および -511 はどちらもインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ と強く結合することが知られている。ヒトES細胞が発現しているインテグリンを定量 PCR で解析したところ、 $\alpha 6 \beta 1$ がヒト ES 細胞で強く発現していることが確認された(図46)。また、ヒトES細胞が産生するラミニンを同様に解析した結果、ヒトES細胞はラミニン-511/-521 を主に発現していた(図47)。これらの結果は、ヒトES細胞が発現するインテグリン受容体に対して高親和性のラミニンアイソフォーム(ラミニン-332 および-511)が培養基材として有効であること、そしてこれらのラミニンアイソフォームがヒト ES 細胞のフィーダーフリー培養基材として有用であることを示している。

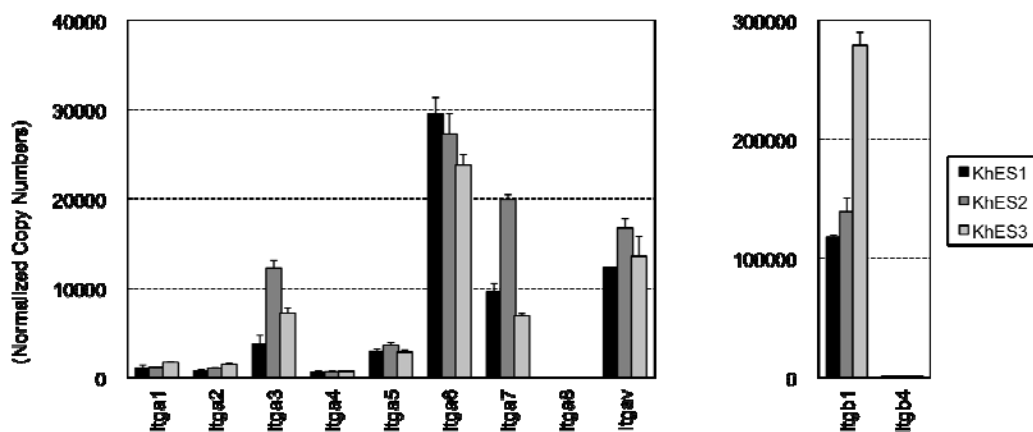


図 46: ヒト ES 細胞におけるインテグリンの発現パターン 京都大学で使用しているヒト ES細胞 KhES1, KhES2, KhES3 それぞれについて、インテグリン α サブユニット 9 種類 (左)と β サブユニット 2 種類(右)の mRNA 発現量を、定量 RT-PCR により測定した。既知濃度のヒトインテグリン cDNA を鋳型として検量線を作成し、コピー数を算出した。ヒト ES 細胞はインテグリン $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 αv および $\beta 1$ を主に発現していることが示された。

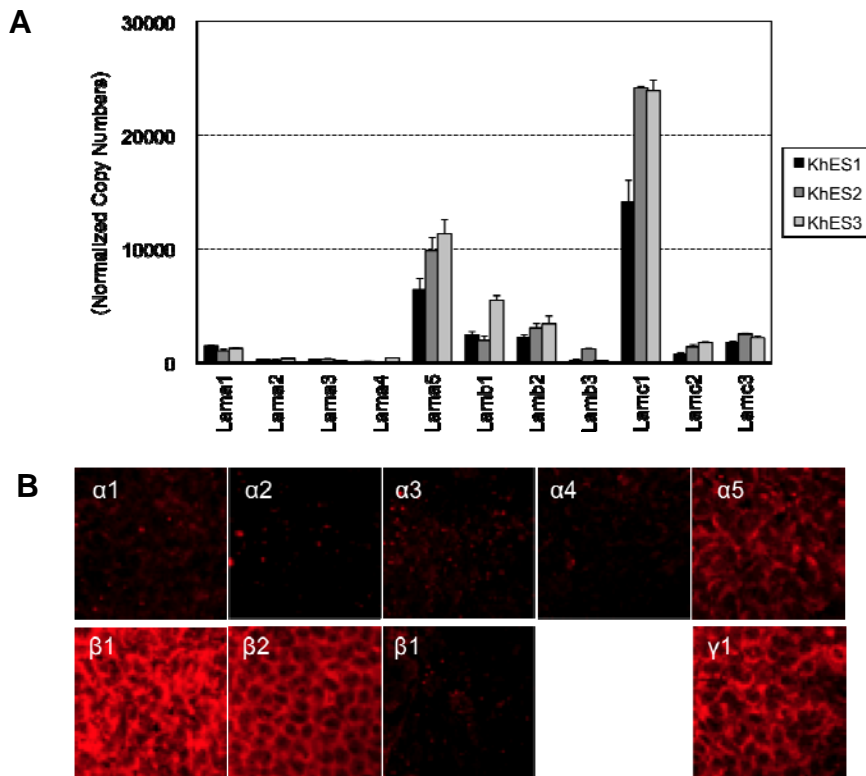


図 47: ヒトES細胞におけるラミニンの発現パターン 京都大学で使用しているヒトES細胞 KhES1, KhES2, KhES3 それぞれについて、ラミニンサブユニット 11 種類の mRNA 発現量を、定量 RT-PCR により測定した(A)。既知濃度のヒトラミニン cDNA を鋳型として検量線を作成し、コピー数を算出した。また、ヒトラミニンのサブユニット特異抗体を用いた蛍光抗体染色により、ヒト ES 細胞コロニー中のラミニン蛋白質発現を可視化した(B)。いずれも、ヒト ES 細胞ではラミニン $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$ が主に発現し、ラミニン-511、-521 として存在することが示された。

ヒトES細胞のフィーダーフリー培養基材としてのラミニン-332 および -511 の有用性を踏まえ、その活性部位の組換えフラグメント(E8 フラグメント)が全長ラミニンと同様に有効であるかどうかを引き続き京都大学と共同で解析した。E8 フラグメントは全長ラミニンとほぼ同等のインテグリン結合活性を保持していることは確認済みである。現在、その解析が進行中であるが、全長ラミニンと同等以上の未分化性維持活性を保持していることが確認されている。なお、組換えラミニンフラグメントを用いるヒトES細胞フィーダーフリー培養基材について 2009 年度に特許申請を行った。

(4) 目標の達成度と意義

4年計画の初年度にあたる平成 18 年度は、マウス ES 細胞を利用して、人工基底膜による三胚葉への選択分化誘導制御の評価系を立ち上げることを目標とした。上記のように、2種類のマウス ES細胞(ht7 および Nkx2.5-GFP)を用い、胚様体を介した分化誘導系を立ち上げ、この実験系が三胚葉への分化誘導の評価系として利用可能であることを確認した。また、再現性の確認が今後必要であるが、被覆基質に違いによって、三胚葉への分化誘導に違いが出ることが示された。これらの成果は、当初の目標を十分に達成しているものと判断される。

平成 19 年度～平成 21 年度は、2.2.5.2 で調製した基底膜蛋白質を組み合わせた人工基底膜上でマウスES細胞を培養し、特に心筋および内胚葉(肝臓)への分化誘導に焦点を絞り、研究開発を進めた。マウスES細胞を用いた心筋分化誘導の検討では基底膜蛋白質の添加方法や添加時期などの工夫を行い、ヒトES細胞の心筋分化に関しては幹細胞創薬研究所グループとの共同研究で成熟分化への影響を検討した。心筋分化においては、未だ人工基底膜の有用性を示す結果は得られていないが、熊本大学と共同で進めている肝臓および膵臓への分化誘導系では基底膜蛋白質の組み合わせが重要であるという結果を得ている。これらの結果は、細胞ごとに分子組成をカスタマイズした人工基底膜がヒトES細胞を特定の細胞系譜に分化誘導する上で有用であることを示しており、本研究の当初の目標は達成できたと判断される。これに加えて、京都大学との共同研究により、ヒトES細胞のフィーダーフリー培養にラミニン-332 およびラミニン-511 が有効であることを明らかにした。ヒトES細胞を再生医療に利用するためには、フィーダーフリーかつゼノフリーの条件下でヒトES細胞を培養する必要がある。組換えラミニンを培養基材とするヒトES細胞のフィーダーフリー・ゼノフリー培養法の目処がたったことの意義は極めて大きい。

2. 2. 5 擬似基底膜を利用したヒトES細胞の分化誘導技術の開発

環境研究所

ここから非公開

ここまで非公開

2. 2. 6 人工基底膜、疑似マトリックスの評価

京都大学
共同実施:環境研究所
大阪大学
日本皮革研究所

(1)事業目的と背景

ヒトを含む霊長類ES 細胞では通常支持となるフィーダー細胞を用いて維持される。しかしこのような支持細胞を完全に除去することは難しく、創薬スクリーニングに必要なモデル細胞への分化誘導を遅延あるいは阻害している可能性もある。現在、支持細胞を用いないヒトES 細胞の未分化維持培養としては、マトリゲルとよばれるものが一般的に用いられている。しかしながら、マトリゲルはマウスEHS 腫瘍から抽出・精製される構成成分であり、これを用いた培養系では、先に述べた

様な創薬スクリーニングの問題点以外にも異種動物細胞や異種生物由来成分、腫瘍由来成分に由来する成分の混入が懸念される他、再生医療への臨床応用としての適用範囲は非常に限られている。またマトリゲルの構成成分と同質の成分を大量に分泌できるヒト由来の代替物は存在しない。このようにヒトES 細胞の未分化維持に適した簡素な細胞外基質の組み合わせは今のところ同定できていない。

これまでにヒトES 細胞における細胞外基質の検討についてはXu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK; Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells; Nat Biotechnol. 2001 Oct;19(10):971-4. などいくつかの論文で、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどで調べられているものの、ヒトES細胞の未分化維持に十分効果があるものは未だ同定されていないのが現状である。マトリゲルと同等以上の、ヒトES 細胞に最適な細胞外基質が未だ発見できていない理由として、市販の細胞外基質でその効果を調べるという一方向での検討しかなされていないとことが大きいと思われる。今回のプロジェクトにおいて、細胞外基質のエキスパートである大阪大学、日本皮革研究所、国立環境研究所が新たに加わったことで、京都大学でのヒトES 細胞での評価をフィードバックし、細胞外基質のさらなる改良、開発を進めることが可能になり、今まで見出すことができなかったヒトES 細胞の未分化維持が可能な人工基底膜あるいは疑似マトリックスの開発を達成することが期待できる。

またマウスES細胞では細胞外基質を用い特定のES細胞へと分化誘導していくシステムもよく使われており、同様なシステムをヒトES 細胞においても確立していくことで、創薬スクリーニングへの分化誘導を効率よく行うことが期待できる。このように細胞外基質を用いた効率の良いヒトES細胞の未分化維持、あるいは分化誘導に関する技術開発を達成できれば従来の分化誘導よりも簡便に行うことが期待できる。またこのような細胞外基質成分あるいはそれをプレコートした培養ディッシュを商品として販売が可能であり、かつこれらは継続的に使われる消耗品となりうることから、将来的な実業化への展開も十分に期待できる。

また効率の良いヒトES 細胞の未分化維持、あるいは分化誘導に関する技術開発を達成できれば従来の分化誘導よりも簡便に行うことが期待できる。またこのような細胞外基質成分あるいはそれをプレコートした培養ディッシュを商品として販売が可能であり、かつこれらは継続的に使われる消耗品となりうることから、将来的な実業化への展開も十分に期待できる。

(2)事業内容と目標

本プロジェクト全体の流れとして、まず大阪大学・日本皮革研究所で開発された人工基底膜、国立環境研究所で開発された疑似マトリックスを、京都大学(あるいは特定非営利活動法人幹細胞創薬研究所)で評価を行い、ES 細胞の未分化維持あるいは分化誘導制御に適したものを開発していく。この際、人工基底膜及び疑似マトリックスを開発するサイドでも、マウスES 細胞などを用いた自らの評価系を持ち、よりヒトES 細胞で適した改良されたものをこちらで評価を進める方が、効率的である。「細胞外環境制御」は平成18年度から開始されたこと、またその成果をもとに本プロジェクトが進められていくということを踏まえ、中間目標としては実際にいくつかの人工基底膜や疑似マトリックスを用いて検討を行い、評価系の確立を目指す。また最終目標としては効果のある

ヒトES細胞の未分化維持、特定方向への分化誘導系の確立を目指す。またヒトES細胞とよく似た性質を持つことが知られているヒトiPS細胞においても検討を進めたいと考えている。

(3) 研究成果

事業内容と目標で述べたように、細胞外環境制御自体は平成18年度から開始されたこと、またその成果をもとに本プロジェクトが進められていくことを踏まえ、評価系の開発を進め、それを確立することに成功した。

具体的には国立環境研究所に供与を受けた疑似マトリックスを用いて、カニクイザルES細胞での未分化維持に関する有効性の評価の検討を行った。評価系としては、(1)ES細胞の接着能、(2)ES細胞の増殖能、(3)ES細胞未分化維持能、(4)長期培養における(1)~(3)の評価を行い、またこれらの検討項目が十分であることを見出した。最終的には長期培養において、多分化能が低下していないのか、また染色体が正常であるかなど詳細な検討が必要になってくるが予想される。

今回評価を行った疑似マトリックスでも興味深い結果がでており、さらなる改良を行うことで、ヒトES細胞の未分化維持に適した基質の開発が期待できる。上で述べたように今後はカニクイザルES細胞での評価については疑似マトリックスを開発する国立環境研究所で行い、京都大学ではヒトES細胞で評価を進めることとした。さらに、この確立した評価系を用い、大阪大学から供与を受けた人工基底膜を用いてヒトES細胞での評価を進めた。

ヒトES細胞はマウス胎仔繊維芽細胞上で、あるいはその馴化培地を用いて基底膜成分マトリゲル上で恒常的に培養される。これらの支持基質は多種の基底膜成分を含み、ヒトES細胞の未分化維持に不適な物を含む可能性、あるいは逆にヒトES細胞から創薬基盤研究に用いるモデル細胞作出に必要な分化誘導を抑制している問題がある。そこで、我々はマトリゲルの主成分であるラミニンに着目し、人工的に作製した組換え基底膜がヒトES細胞の培養に適用できるかを検討課題とした。またこのように人工的に作成した組換え基底膜を用いることで、異種の成分の除外が可能になり、ヒトES細胞の医療応用への加速も期待できる。

ラミニンは α 、 β 、 γ から成る三量体で、その組合せから現在までに15種類のアイソフォームの存在が知られている。細胞毎にアイソフォームの発現パターンや効果が異なるため、対象の細胞に適したアイソフォームを選別する必要がある。これまでヒトES細胞培養時の細胞外環境について調べた報告例がないことから、ヒトES細胞が産生しているラミニンアイソフォームを特定するため、初めに基底膜タンパク質の解析方法の確立に努めた。今期では基底膜成分の構成比が反映される染色前処理の検討を重点的に行った。アセトン、パラフォルムアルデヒド、そして透過処理の有無の組合せを検討した結果、パラフォルムアルデヒド固定および透過処理を行うと染色時の蛍光バックグラウンドが高くなる傾向があり、特異的シグナルの検出が困難であった。一方、アセトン固定を施した場合は、バックグラウンドが軽減されることが判明し、抗体間の差が明瞭に検出された。また透過処理を施さずアセトン固定を行うことで、マウス胎仔繊維芽細胞に対する非特異的染色が抑えられた。従って、アセトン固定かつ透過無処理の前処理操作が、ヒトES細胞培養下の細胞外基質を解析するのに最良であることが判明した。

次に、確立した評価系を用い、大阪大学蛋白質研究所により作製されたラミニンサブユニットを認識する抗体で免疫染色を行い、ヒトES細胞上におけるラミニンサブユニットの発現を検出した。

結果として、 α 鎖においては $\alpha 5$ のみが陽性であり、 β 鎖においては $\beta 1$ と $\beta 2$ 、 γ 鎖においては $\gamma 1$ が陽性であった。従って、この組合せから得られるラミニン-511/521 が、ヒト ES 細胞が特異的に産生するアイソフォームであることが判明した。今後はこの解析結果を元にし、組換えタンパク質を用いてヒト ES 細胞を培養することが課題である。

antibody species	ECM	staining intensity
human	laminin $\alpha 1$	+/-
	laminin $\alpha 2$	-
	laminin $\alpha 3$	-
	laminin $\alpha 4$	-
	laminin $\alpha 5$	+
	laminin $\beta 1$	+++
	laminin $\beta 2$	+++
	laminin $\beta 3$	-
	laminin $\gamma 1$	+++
	mouse	laminin $\alpha 1$
mouse	laminin $\alpha 2$	-
mouse	laminin $\alpha 3$	-
mouse	laminin $\alpha 4$	-
mouse	laminin $\alpha 5$	-
mouse	laminin $\beta 1$	-
mouse	laminin $\beta 2$	-
mouse	laminin $\beta 3$	-
mouse	laminin $\gamma 1$	++
human/mouse	fibronectin	+
human/mouse	collagen	+/-
human/mouse	perlecan	-

表 免疫染色法によるヒト ES 細胞培養が産生する細胞外基質の検出

ヒト ES 細胞は通常、マウス胎仔繊維芽細胞上で、あるいはその馴化培地を用いてマウス EHS 腫瘍由来基底膜成分マトリゲル上で未分化維持培養される。これまでに約 9 種類のヒト ES 細胞用完全合成培地の作製報告例があるが、そのほぼ全てにおいて培養の支持基質にマトリゲルを用いている。マトリゲルの組成にはまだ不明なものもあり、ヒト ES 細胞からモデル細胞の作成に阻害的な影響を与えている可能性もある。またヒト ES 細胞からのヒト ES 細胞の医療応用等への有効利用には、異種由来成分であるそれら支持基質の使用が弊害となると考えられるため、分子構成が明確なヒト由来成分である代替物の開発が望まれている。そこで本開発項目においては、マトリゲルの主要成分であり細胞接着に大きく関与しているラミニンに着目し、人工的に作製した組換えヒト型ラミニンがヒト ES 細胞の未分化維持培養に適しているかを評価した。

そこで本年度は、1) ラミニンの細胞表面受容体であるインテグリンアイソフォームのヒト ES 細胞における発現パターンを特定し、2) 得られた結果を基に選別した組換えヒト型ラミニン上で長期培養を行い、ヒト ES 細胞の未分化維持状態を確認する、2 段階評価を行った。

1) インテグリンを構成する $\alpha \cdot \beta$ 鎖それぞれの発現量を、インテグリンサブユニットを包含するプラスミドベクターを用いて定量 PCR 操作により絶対定量を行ったところ、ヒト ES 細胞はラミニン結合型に分類されるインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ を主に発現していることが判明した。ラミニン結合型インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ は、同じラミニンでも特に、ラミニン-511/521, ラミニン-332, ラミニン-111 のアイソフォームに強い親和性を持つことが明らかにされている。これらの成果・情報を基に、次に、候補となる組換えヒト型ラミニンアイソフォーム上で実際にヒト ES 細胞を培養し、その適応性を評価した。

2) rhLM アイソフォームを培養器にコーティングし、MEF 馴化培地を用いてヒト ES 細胞の接着効率と増殖速度を測定した結果、KhES-1・KhES-3 の両細胞共に rhLM-332 に対して非常に強い接着を示し、rhLM-511, rhLM-111 上においても良い接着を示した。一方、対照群に用いた rhLM-411, rhLM-211 にはほぼ接着を示さなかった(図1)。接着を示した rhLM アイソフォーム上で長期

培養を行い、細胞の状態を表面抗原解析・RT-PCR 解析で評価した結果、ヒト ES 細胞は未分化状態を維持していることが判明した(図2および図3)。また胚葉体を作製後に RT-PCR 解析を行い、分化マーカーの発現を調べたところ、いずれの rhLM アイソフォームを用いた場合においても分化マーカーの上昇が確認可能であったことから、多分化能の維持においても問題ないことが判明した。以上より、組換えヒト型ラミニンアイソフォームである rhLM-332, rhLM-511, rhLM-111 はヒト ES 細胞の未分化維持培養に非常に適した支持基質であり、これら人工基底膜成分を用いることで、将来的に完全な xeno-free culture が可能であることが、本年度の成果から示唆された。

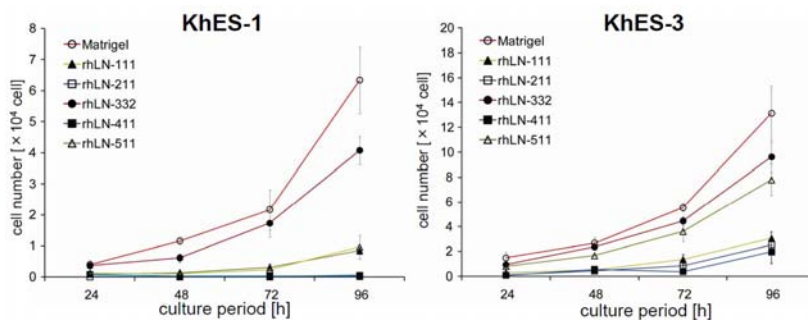


図 1. 組換えラミニン上におけるヒト ES 細胞の増殖曲線

BBRC 375, 27-32(2008)から引用

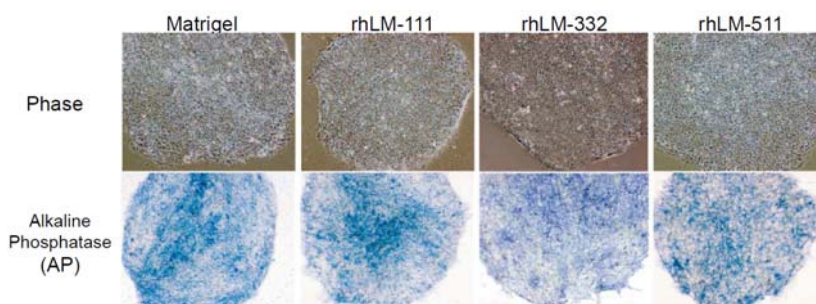


図 2. 組換えヒト型ラミニン上におけるヒト ES 細胞の長期培養時の細胞形態

BBRC 375, 27-32(2008)から引用

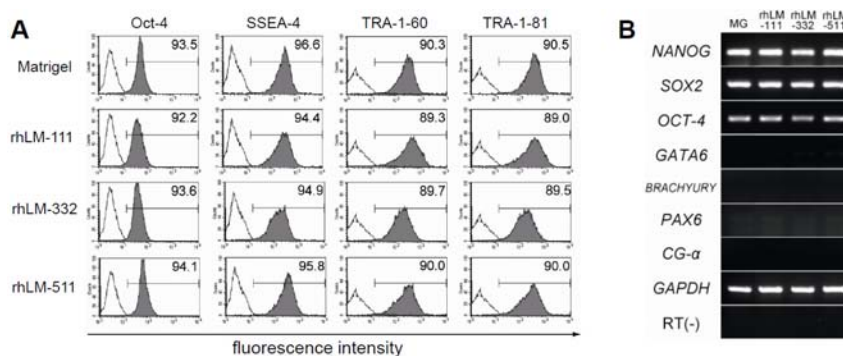


図 3. 長期培養時における未分化状態の評価。A)表面抗原解析、B)RT-PCR 解析

BBRC 375, 27-32(2008)から引用

(4) 目標の達成度と意義

上の項目で何度か述べたように、「細胞外環境制御」自体は平成18年度から開始されたこと、またその成果をもとに本プロジェクトが進められていくことを踏まえ、今回、未分化維持に対する評価系の確立を達成できたことは、計画通りと判断する。評価系の確立ができたことで、今後大阪大学・日本皮革研究所から供与を受ける人工基底膜、あるいは国立環境研究所から供与を受ける疑似マトリックスの評価を効率よく検討することが可能になり、本プロジェクトを進める上でその意義は十分値する。

中間評価以後、レコンビナントのラミニンを用いてヒトES細胞の支持細胞の培養が可能となることを見出した。従来はマトリゲルと呼ばれる物を用いることが多かったがこれは構成成分に不明なものが多く、ヒトES細胞の未分化維持、あるいは効率的なモデル細胞作出に不利益になる可能性があったことから、大きな前進といえる。また本研究成果は例えばヒトES細胞の臨床使用へもそのまま適用できる可能性が高いことから、非常に意義が高いとなる。

2. 3 研究開発項目③「研究用モデル細胞の構築技術の開発」

2. 3. 1 研究用モデル細胞の構築

2. 3. 1. 1 ヒトES細胞から神経変性疾患モデル細胞の構築

幹細胞創薬研究所

(1) 事業目的と背景

神経変性疾患には、アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、プリオン病などがあり、痴呆、ふるえ、運動失調、筋力低下、行動異常などのそれぞれ神経変性疾患特有の症状を示す。これらの神経変性疾患の根本的な治療法は今のところ見いだされていない。そのため、神経変性疾患の予防および根本的な治療法の開発は急務である。さらに日本社会は今後世界に類を見ない高齢社会を迎えようとしており、平成 18 年版高齢社会白書によると 2050 年には 65 歳以上の高齢者が 3 人に1人の割合になると予想されている。そのため、アルツハイマー病などのような高齢になるにつれ発症率が上昇する疾患は、社会的にも非常に大きな問題になってきている。

これまでにも神経変性疾患のモデル動物を用いて治療薬や予防薬が開発されてきている。しかし、マウスやラットなどのモデル動物に対し有効とされた薬が、治験を始めると全くヒトの疾患に対し効果が見られない場合が多い。この種間差の影響は、創薬研究での開発時間や費用において無視することの出来ない状況にある。

本プロジェクトでは神経変性疾患モデル細胞の創製にあたり、アルツハイマー病(AD)、筋萎縮

性側索硬化症(ALS)、ポリグルタミン病の一疾患であるハンチントン病(HD)の三つの神経変性疾患のモデル細胞を創製することを目指し研究を進めている。

アルツハイマー病(AD)では、60歳以上10万人に対し2000人を超える有病率で、その率は年齢と共に上昇する。神経変性疾患の中でも高い有病率をもつ疾患の一つである。アルツハイマー病の大部分は孤発性であるが、アミロイドβ蛋白質(Aβ)の脳内の蓄積など家族性アルツハイマー病と共通する病態も多く、変異を導入したモデル細胞の解析はアルツハイマー病全体の有望な治療戦略の構築、例えば、細胞死などの分子細胞機構を解析や細胞死軽減治療のための方策などに役立つものと考えられる。

ハンチントン病(HD)に代表されるポリグルタミン病は、CAG繰り返し配列の異常延長を原因とする遺伝性の神経変性疾患であり、延長ポリグルタミン鎖を有する変異蛋白質が核内に蓄積し、種々の蛋白質を巻き込んで凝集体を形成することにより、細胞機能維持に必要な蛋白質の機能を阻害し、神経細胞障害に至ることが明らかとされつつある。原因遺伝子にCAG繰り返し配列を挿入することにより、変異蛋白質の核内での凝集をモデル細胞で誘導することが可能である。そのようなモデル細胞を用いることで、変異蛋白質の凝集の結果もたらされる病態の解析や凝集の抑制法が開発され、ポリグルタミン病の治療法開発に大きく貢献するものと考えられる。

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動神経細胞が傷害され、多くは2~5年のうちに呼吸不全で死亡する神経変性疾患である。ALSの90%以上は孤発性で原因不明であるが、家族性ALSの病理像は孤発性ALSと共通点も多く、家族性ALSの発症機序を明らかにすることは、孤発性ALSの原因解明のためにも重要である。家族性ALSの原因遺伝子の一つは常染色体優性遺伝で、Cu/Znスーパーオキシジスムターゼ1(SOD1)遺伝子に変異を認め、家族性ALSの10~20%程度を占める。このような変異を導入したモデル細胞を用いて運動神経細胞変性のメカニズムを解明することは、原因不明の難病克服のための重要な取り組みであると考えられる。

(2)事業内容と目標

最初に構築するモデル細胞として、疾患原因遺伝子の恒常的な過剰発現により疾患が誘導される細胞を創製する。これまでにこのような戦略でいくつかの研究が行われてきていたが、多くの場合において腫瘍細胞株を用いている。神経系でない細胞株を用いているモデル系もあるが、神経疾患が疾患特異的な神経細胞に症状が現れることを考えると、モデル細胞としては決して良い系とはいえない。また、神経系細胞株を用いても、その後の治療薬の探索や原因解明などへの利用を考えあわせると、細胞が腫瘍化していることを無視することは出来ない。さらに、組織からのプライマリー培養では、モデル細胞を構築できるほどの細胞数を得ること及び遺伝子改変を行うことは困難である。これらのことを考慮すると、増幅可能で正常な細胞であるES細胞がモデル細胞の元になる細胞として適していると考えられる。最近ではヒトiPS細胞も利用可能になって来ている。この考えは世界的にもコンセンサスと成りつつあり、ES細胞やiPS細胞を用いたモデル細胞の論文も発表されてきている。また、ヒトゲノムの塩基配列が既に明らかになっているが、人種によって塩基配列に違いが存在することも明らかになっている。そのことは、海外で樹立された欧米人型のゲノムを持つヒトES細胞やiPS細胞から構築されたモデル細胞を用いて確認された治療薬の効果や安全性が、場合によっては日本人やアジア人に適さない可能性があること

を示している。よって、京都大学で樹立された日本人の遺伝的バックグラウンドをもつヒト ES 細胞を用いることは、本プロジェクトにおいて非常に重要である。

本プロジェクトの最終目標は、創薬研究に利用可能な神経変性疾患モデル細胞を構築することであるが、目標達成には、ヒト ES 細胞の加工技術開発とヒト ES 細胞の分化誘導制御技術の進捗状況に大いに依存している。つまり、神経変性疾患が特定の神経細胞タイプにだけ症状が現れることを鑑みると、モデルとしては、ES 細胞を特定の神経細胞へと分化させなければならない。また、疾患原因遺伝子の厳密な発現調節も必要になる可能性もある。これらの技術が順調に成果を上げていたため、それらの成果を取り入れ、疾患モデル細胞の構築を目指した。

(3) 研究成果

① ランダム遺伝子導入法によって得られた疾患遺伝子発現 ES 細胞によるモデル細胞構築

①-ア. 疾患遺伝子安定発現 ES 細胞株

疾患原因遺伝子が既に明らかになっている神経変性疾患、家族性 AD、家族性 ALS、そして単一遺伝子病である HD のモデル細胞を構築するために、まず、それぞれの疾患原因遺伝子として、AD ではプレセニリン1(PS1)、ALS ではスーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1)、そして、HD ではハンチンチン(HTT)を選定し、家族性 AD の変異 PS1 遺伝子(2 種)、家族性 ALS の変異 SOD1 遺伝子(3 種)、そして様々な長さで過剰延長した CAG リピートを持った HTT 遺伝子(エクソン 1 領域)を含むベクターを京都大学、東京大学の共同研究者から入手した。

ES 細胞で遺伝子を発現させるためのプロモーターとして、頻繁に使用されている CMV プロモーターを当初用いたところ、導入されたヒト SOD1 遺伝子の発現をサル ES 細胞で確認することができなかった。おそらくサイレンシングが起きたためと考えられたため、ウイルス由来のプロモーターよりはサイレンシングが起き難いと期待されるヒトのハウスキーピング遺伝子 EF1 α のプロモーターを用いることとし、その ES 細胞内での活性を確認した。EF1 α プロモーターをもったプラスミド(GFP の蛍光で活性確認可能)を ES 細胞に導入したところ、GFP の蛍光は CMV プロモーター制御下のそれより明るく、CMV プロモーター活性より強いことが確認された。

PS1 および SOD1 の正常遺伝子と家族性変異遺伝子を EF1 α プロモーターで制御する発現ベクターへ組み入れ発現プラスミドを構築した。SOD1 野生型と変異遺伝子(SOD1-G93A)、また、PS1 野生型と変異遺伝子(PS1-P117L)発現ベクターをヒト ES 細胞(KhES-1)に導入し、各 50~100 の薬剤耐性安定株を得た。その後、未分化細胞での外来遺伝子の発現レベルを RT-PCR によって確認し、クローンの選択をおこなった。ランダム遺伝子導入法では、多くの場合、細胞の状態が変化、例えば神経細胞へ分化すると外来遺伝子の不活性化、つまりサイレンシングが観察される。そこで、未分化細胞での外来遺伝子の発現レベルが高いクローンを、「分化誘導制御技術」の成果であるノギンによる分化誘導を行い、分化細胞での外来遺伝子の発現レベルを確認した。その結果、多くの細胞株でサイレンシングが確認されたが、未分化細胞でのレベルよりは発現が低下していたが、比較的高発現な株もあり、それらを今後の研究に用いた。

①-イ. AD モデル細胞

変異型遺伝子 PS1-P117L を分化細胞でも高レベルで発現している ES 細胞を得ることが出来た。しかし、野生型と変異型 PS1 の発現レベルに差があり、今後の研究にはあまり向いていなかった。

そのため、「ヒト ES 細胞の加工技術開発」の成果を取り入れた加工細胞を用いることとした(後述)。しかし、それらの細胞が得られる前に、実際に変異型 PS1 発現神経細胞が、AD の表現型を示すか否かを調べた。アミロイド仮説によると、AD 患者の脳内では、アミノ酸 42 残基数のアミロイド β 42(A β 42)の量が増え、アミノ酸 40 残基数のアミロイド β 40(A β 40)との比率が上昇し、神経細胞毒性を有する A β の凝集体が形成されやすくなることが提唱されている。具体的には、 γ -secretase の活性中心である PS1 に疾患由来型の変異が起こると、A β の切り出しに異常が起こり A β 42 の産生比率が増加する。これらのことから疾患由来型変異 PS1 を発現した AD モデル細胞の必須な特徴として、さらに期待される表現型として、A β 42 の産生比率が増加することが挙げられる。そこで、培養液上清に含まれるアミロイド β の濃度を測定した。その結果、親株である KhES-1、野生型 PS1 発現 ES 細胞から分化誘導させた神経細胞の培養上清では、A β 42 の存在比は 10%程度であったが、変異型 PS1-P117L が発現している ES 細胞由来の神経細胞の培養上清では、約 20~25%にまで上昇していた。このことは、変異型 PS1 遺伝子の発現によって、AD 表現型が再現できることを示しており、「ヒト ES 細胞の加工技術開発」の成果を取り入れた加工細胞を用いた場合でも同様な結果を得ることが出来るであろう一つの証拠となった。

①ーウ. ALS モデル細胞

樹立した SOD1 発現ヒト ES 細胞株の表現型解析を行うために、既に確立した脊髄運動神経細胞分化誘導法を適用した。その結果、変異 SOD1 発現ヒト ES 細胞は、未分化 ES 細胞から神経幹細胞までの分化状態では、親株である KhES-1 細胞および野生型 SOD1 発現ヒト ES 細胞と変化は見られなかった。しかし、運動神経細胞への分化誘導系に持って行ったところ、変異 SOD1 発現ヒト ES 細胞での HB9 陽性運動神経細胞割合は、野生型 SOD1 発現運動神経細胞に比べて、劇的に低くなっていた(Fig.1)。更に、変異 SOD1 発現ヒト ES 細胞での TUNEL 陽性死細胞割合が野生型 SOD1 発現ヒト ES 細胞でのそれと比べると、有意に高くなっていることがわかった(Fig.1)。このことにより、運動神経細胞特異的細胞死が変異 SOD1 発現ヒト ES 細胞で起こっていることがわかった。

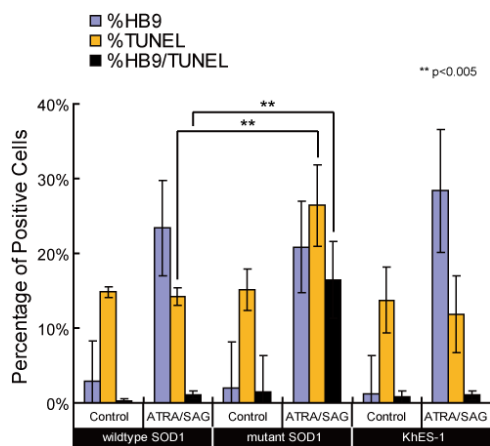


Fig.1 SOD1 発現神経細胞の細胞死の測定

また、変異 SOD1 発現運動神経細胞での疾患特異的マーカーであるユビキチンや SOD1 の凝集体を観察し、ALS モデル細胞としての特徴が示された。既に、マウス ES 細胞を用いた ALS モデルの報告では、変異 SOD1 発現アストロサイト培養上清の運動神経細胞死誘導活性が示されている。このことを、我々のモデル細胞で確認した。変異 SOD1 発現ヒト ES1 細胞由来アストロサ

イトの培養上清を、密度勾配遠心濃縮を行った運動神経細胞集団に添加したところ、高頻度な細胞死が観察された。これは、野生型 SOD1 発現運動神経細胞では認められなかったことから、変異 SOD1 発現アストロサイトから分泌された細胞死活性であると考えられる。この活性は、炎症誘導物質である Prostaglandin で類似した作用が確認されており、アストロサイトからの炎症関連物質の可能性が考えられる。

②部位特異的遺伝子挿入法によって得られた疾患遺伝子発現 ES 細胞によるモデル細胞構築

②ーア. 第二世代の疾患遺伝子安定発現 ES 細胞株

「ヒト ES 細胞の加工技術開発」の成果によって、HPRT 遺伝子座へ任意の遺伝子カセットを挿入することが可能になった。この技術を使うことで、外来遺伝子のサイレンシングや挿入突然変異が起こる可能性を避けることができる。それによって、①ランダム遺伝子導入法では、薬剤耐性クローンを数多く取得、培養しなければならなかったが、開発された方法では HPRT 遺伝子座への遺伝子の挿入がほぼ確実なため、数クローンの薬剤耐性クローンを培養すれば良いことになり、時間的にも、コスト的にも効率を上げることが出来る。

このシステムを利用するため HPRT 遺伝子座挿入用発現ベクター(CAG プロモーター)を構築した。疾患遺伝子は、これまで同様に SOD1、PS1、そしてハンチンチン(HTT)であるが、SOD1 と PS1 では 3 種類の異なった変異型遺伝子を発現するベクターを構築した。HPRT 遺伝子座挿入用の親株に遺伝子を導入し、構築した全ての発現ベクターに関して、疾患原因遺伝子(野生型もしくは変異型)を安定に発現しているヒト ES 細胞株を作成し、これらを第二世代の疾患遺伝子安定発現 ES 細胞株とした。加えて、最近 ALS の原因遺伝子として同定された TDP43 を発現する ES 細胞株の作成を試みたが、変異型 TDP43 に毒性があるためか、野生型 TDP43 発現 ES 細胞株は樹立できたが、変異型 TDP43 発現 ES 細胞株は樹立出来なかった。

これらの疾患遺伝子安定発現 ES 細胞は、その未分化細胞のコロニー形態に違いは見られず、遺伝子発現解析を行ったところ、未分化維持に関与する OCT3/4 や NANOG の遺伝子の発現レベルに差は見られなかった。また、内在性の疾患遺伝子発現レベルも親株との間に差はなく、唯一、発現ベクター由来の外来遺伝子の発現に差が見られた。疾患遺伝子遺伝子の強制発現による未分化細胞への影響は、調べた限りではないと分かった。

②ーイ. 第二世代の AD モデル細胞

AD 原因遺伝子 PS1 が HPRT 遺伝子座で発現しているヒト ES 細胞(HPRT1-hESC-PS1)を用いて AD モデル構築を行なった。使用した PS1 遺伝子の種類は WT, P1117L, G378E, D385A の 4 種類である。WT は野生型、P1117L, G378E が家族性 AD 由来、D385A は PS1 非活性型である。PS1 遺伝子の挿入部位を確認するためにサザンブロットを行なった。解析したすべての細胞(4 種類の PS1 それぞれ 2 クローンずつ)で想定どおりの大きさのバンドが見られ、HPRT 遺伝子座への遺伝子導入が確認できた。HPRT1-hESC-PS1 は、通常のヒト ES 細胞と同様に継代培養が可能であり、未分化マーカーの発現に対する RT-PCR と免疫染色の結果から正常に未分化状態が維持されていることが確認された。さらに、これまでに開発してきたノギンによる神経細胞への分化誘導技術も適応でき、成熟した神経細胞への誘導が可能であった。そこで分化誘導後の神経細胞での PS1 発現量をウェスタンブロットのバンドより比較した。外来性、内在性のどちらも含んだ PS1 の発現

量は親株に対して、N 端断片では WT : 2.7, P117L : 3.4, G378E : 2.7, D385A : 0.7 倍、全長では WT : 2.4, P117L : 2.1, G378E : 2.8, D385A : 20.0 倍の増加が見られた。D385A の変異は PS1 を切断出来ない変異であることが報告されている。前述のようにランダムインテグレーション法で作製した細胞株では分化誘導後にサイレンシングを強く受けるクローンが現れ、PS1 の発現が極端に低下している株も出現したが、HPRT1-hESC-PS1 株では、分化誘導した 7 種類(WT;2 株, P117L;2 株, G378E;2 株, D385A;1 株)すべての細胞株で安定した外来遺伝子(PS1)の発現が見られた。このことから、本プロジェクトで作製した HPRT 遺伝子座へ遺伝子が挿入するシステムは、各種遺伝子を発現するヒト ES 細胞を神経細胞へ分化させた細胞でも有用であることがわかった。

さらに疾患由来型変異 PS1(P117L, G378E)発現株を用いて AD モデル細胞としての特性解析を行なった。前述したように、AD モデル細胞の必須な特徴として A β 42 の産生比率が増加することが挙げられる。そこで、変異 PS1 を発現した神経細胞の培養上清中にある A β の濃度測定を ELISA により行なった。それぞれの発現株での A β 42/ A β 40 比は以下の通りであった。親株を1として、WT : 1.0, P117L : 3.9, G378E : 2.6, D385A : 1.0(Fig.2)。

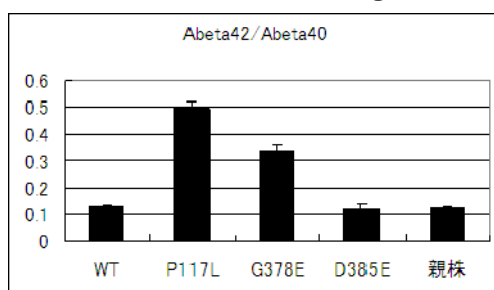


Fig.2 アミロイド β の測定

疾患由来の変異 PS1(P117L・G378E)を発現する株では、有意に A β 42 の産生比率が増加しており、アルツハイマー病としての特徴を再現していた。産生された A β 40 と A β 42 の総量は、親株を1として、WT : 0.82, P117L : 0.78, G378E : 1.10, D385A : 1.39 であり、PS1 の発現量は数倍の違いが見られたが、培養上清中の A β 総量には影響はなかった。また、培養上清中の A β 量は、 γ -secretase 阻害剤の DAPT の添加によって減少したことから、外来遺伝子由来の変異 PS1 を含む γ -secretase でも阻害剤に対し問題なく応答することが判明した。このことは、この AD モデル細胞を用い、 γ -secretase のインヒビターまたはモジュレーターをアルツハイマー病治療薬の候補分子としてスクリーニング出来る可能性を示唆している。

次に、アルツハイマー病は認知機能障害が認められ、それはシナプス活動の低下を伴っていることから、シナプス活動への影響を調べる目的で、自発的な活動電流の発生頻度の比較を行なった。疾患由来型変異 PS1 発現株では自発的な興奮性活動電流の発生頻度の減少が認められた。自発的な興奮性シナプス後電流頻度(sEPCsf) (/sec)は、親株 : 1.28, WT : 0.99, P117L : 0.45, G378E : 0.37(Fig.3)であったが、一方、自発的な抑制性シナプス後電流頻度(sIPCSf) (/sec)は、親株 : 0.33, WT : 0.33, P117L : 0.41, G378E : 0.68 であり、抑制性シナプス後電流頻度では大きな違いは見られなかった。

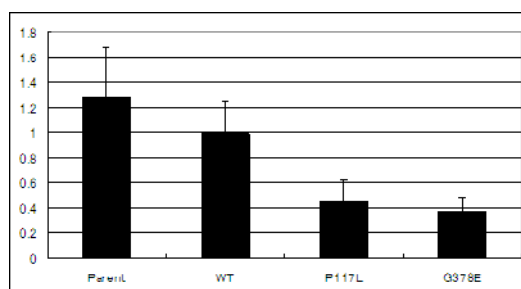


Fig.3 自発的な興奮性シナプス後電流の発生頻度

さらに、この発現頻度の減少にはシナプス関連蛋白質の変化が関与していると考えられるため、各種シナプス関連蛋白質の発現量の比較を行なった。野生型 PS1 発現株に対して疾患型変異 PS1 発現株では、ポストシナプスに存在する PSD95、AMPA(GLUR2/3)、GABAAR の発現量は P117L 発現株で AMPAR の発現が有意に増加していたが、他は同程度であった。それに対して、プレシナプスに存在する synaptophysin の発現量は G378E 発現株で有意に減少しており、P117L 発現株でも減少傾向が見られた。同様に免疫染色により synaptophysin 陽性ドットの数と比較した結果でも G378E 発現株で有意に減少が認められ P117L 発現株では減少傾向であった。synaptophysin はアルツハイマー病の機能障害において相関関係が示唆されており、得られた細胞株(G378E 発現株)は、その特徴を強く表していると考えられる。これらの特徴を持つ細胞は、アルツハイマー病における神経細胞機能の低下機構の解明に有用であると考えられる。

これまでのところ、他のアルツハイマー病の特徴である神経細胞死やリン酸化タウの蓄積は現れていないが、これらは疾患の後期に見られる現象であるため、長期培養等の条件検討によって、それらの表現型を認めることが可能になるかもしれない。

②ーウ HD モデル細胞

HTT 遺伝子(エクソン 1 領域)に GFP 遺伝子が融合した cDNA を、HPRT 遺伝子座挿入用発現ベクターに組み入れた。HTT に含まれるポリグルタミン残基数 25 を野生型タイプとして、97 を変異型とした。さらに、核移行シグナル、核排出シグナル、シグナルなしの各発現ベクターも構築した。変異型 HTT の発現は、細胞の種類によっては細胞死を招くことが知られているが、未分化ヒト ES 細胞に変異 HTT 強制発現させも細胞死が観察されないことは、ランダム遺伝子導入法によって得られた HTT 安定発現 ES 細胞によって確認されていた。HPRT 遺伝子座へ挿入された第二世代 HTT 安定発現細胞は、薬剤耐性および GFP 蛍光によって確認できた。

HD で影響を受けるのは線条体であり、線条体の主な神経細胞タイプは、中型有棘神経細胞である。そこで、得られた HTT 安定発現 ES 細胞を「ヒト ES 細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発」の成果である中型有棘神経細胞へ分化誘導し、野生型 HTT 発現神経細胞と変異型 HTT 発現神経細胞で HD 疾患症状である細胞死に差が生じるか否かを観察した。WST-1 アッセイ、Live/Dead reduced biohazard viability/cytotoxicity kit(インビトロジェン)による細胞死を測定したが、親株由来の神経細胞、野生型 HTT 発現神経細胞、変異型 HTT 発現神経細胞、いずれにおいても差が見られなかった。最近、線条体特異的に細胞死が起こる原因として、線条体特異的に発現している分子 RASD2/RHES が同定された。我々が分化誘導した中型有棘神経細胞にも、RT-PCR によって RASD2/RHES が発現していることは確認できていた。そのため、変異型 HTT

を発現している細胞に細胞死が見られなかった原因としては、HTT 遺伝子のエクソン1部分だけを利用したためか、ES 由来の中型有棘神経細胞の成熟度が足りなかったためなのか、今段階では明らかではない。

(4) 目標の達成度と意義

ALS モデル細胞、AD モデル細胞の構築は順調に進んだ。特に AD モデル細胞では、ヒト ES 細胞の加工技術開発で得られた成果を、モデル構築に組み込んでいくことによってより良いモデル細胞が創製出来た。両モデル細胞とも、疾患に見られる表現型を再現することに成功している点は大きな成果である。また、ALS モデル細胞においても第二世代の疾患遺伝子安定発現 ES 細胞株は作成できているため、今回得られた ALS モデル細胞での結果を第二世代の細胞を用いても再現できると考えられる。今回、HD モデル細胞では、疾患の特徴である細胞死が見られなかったが、今回作成した HTT 発現 ES 細胞株を用いることで、HTT 遺伝子の発現を抑制もしくは蛋白質の分解に関与する分子等の探索に利用が出来る可能性はある。

作成したモデル細胞は、ヒト細胞由来で大量調製が可能な神経細胞としての特徴とあわせ、新たな治療薬スクリーニングにおける有用な材料となることが期待できる。また、AD モデル細胞では多電極システムを用いれば、多数の神経細胞が構成するネットワークの解析が可能であり、マルチウェルでの電気シグナルの取得を行えば、神経機能に対する治療薬スクリーニングへの利用も期待できる。

創製されたモデル細胞は、それぞれの神経変性疾患研究での創薬分野ばかりでなく、疾患発症機序解明などの基礎的研究でも大いに寄与することが出来ると考えられる。さらに、疾患遺伝子を変えれば他の神経変性疾患のモデル細胞も作成可能であり、他の組織や臓器の疾患も、原因遺伝子とその分化誘導系を組み合わせることで作成可能であるため、その利用価値は非常に高い。

2. 3. 1. 2 血液脳関門(BBB)モデルの創製

幹細胞創薬研究所

(1) 事業目的と背景

血液脳関門(Blood-Brain Barrier; BBB)は、血管周皮細胞およびアストロサイトに周囲を覆われた脳毛細血管内皮細胞同士が緊密に結合した密着結合(tight junction)を主体とするバリア構造であり、体循環系と脳内との間の単純拡散による物質透過を制限する他、栄養物質、神経伝達物質、脳内不要代謝産物、薬物を含む生体異物の物質交換を能動的に制御する dynamic interface として機能している。この BBB を介する物質交換の機構は、中枢神経系に限定される特殊なものであり、薬物の有効性や安全性を評価する医薬品開発プロセスにおいては、その開発の運命を左右するといっても過言ではないほど大きく関与している。

創薬活動の現場において、中枢神経系医薬品の開発は、末梢組織をターゲットとする医薬品に比べて 20 倍以上難しいといわれる。何故ならば、中枢薬では BBB を介した中枢移行という高いハードルを余分にクリアしなければならないからである。多くの開発化合物は BBB のバリア機能

により脳内への移行を阻止されてしまったり、一旦脳内へ入ったものが BBB の生体異物排除機構によって脳外に汲み出されてしまい、開発を断念しなければならないケースが多く発生する。また逆に、末梢組織での薬効発揮を期待する医薬品の開発において、開発化合物がこの BBB を簡単に通過してしまい中枢毒性をもたらしてしまうことが問題となるケース等もある。

このように脳内の薬物動態試験は、創薬活動に不可欠なものであり、これまでは主に開発の後期の段階の動物個体レベルでの評価によって行われていた。勿論こうした *in vivo* 脳内薬物動態試験は、前臨床試験項目として今後もその重要性は変わるものではない。しかし、その一方で近年、開発の時間やコストを低減させるため、より早期段階で多くの候補化合物群から有望候補を絞り込もうとする動きが高まると、これを動物試験によって対応することは難しく、短時間に多数の薬物を効率よくスクリーニングできる *in vitro* 細胞評価系が強く求められるようになってきている。

BBB モデルの構築の試みは、これまでも、ウシ・ラット・マウスなど非ヒト動物の脳組織から調達される脳毛細血管内皮初代培養細胞や株化培養細胞(脳毛細血管内皮細胞株)等を用いた例が報告されており、それらの多くはアストロサイトや血管周皮細胞との共培養系として構築されている。しかし、脳毛細血管内皮細胞の初代培養を利用する場合には、分裂回数が有限であり頻回の細胞調製が必要となるといった制限に加え、脳毛細血管内皮細胞は脳全体の 0.1%程度しか存在せず調製が困難であるという量的な問題、さらに生体内から培養系への移行によって多くの BBB 機能が欠落してしまうという問題が生じていた。また、培養細胞株やその他脳毛細血管以外に由来する血管内皮細胞を代替利用した場合には、BBB 機能の獲得が難しかった。今のところ、実用に耐える十分な性能を有した *in vitro* BBB モデルは存在しないと思われる。

優れたヒト型 *in vitro* 血液脳関門(BBB)モデルは、医薬品開発において、特に中枢作用型薬の脳内移行性や中枢での副作用が問題となる薬物等を早期段階で予見可能にする創薬支援ツールとして有用であるばかりでなく、脳神経・血管系の機能発現・維持の理解を助ける基礎研究材として、その開発の意義は大きいと考えられる。

そこで本開発では、ヒト ES 細胞から BBB モデル構成細胞として、血管系細胞(血管前駆細胞、血管内皮細胞、血管周皮細胞)および神経系細胞(アストロサイト、神経系前駆細胞)を量産調製する技術を確認するとともに、ここで得られる各種細胞を利用して、生体機能に限りなく近い特性を有するヒト型 BBB モデルを創製することを目的とする。

(2)事業内容と目標

① BBB モデル構築用細胞の調製技術の確立

in vitro BBB モデルの構築に供する細胞として、ヒト ES 細胞から血管系細胞(血管内皮細胞、血管周皮細胞)と神経系細胞(アストロサイト、神経細胞)を量産調製する技術を確認する。

中間目標(平成 19 年度末まで):

・ヒト ES 細胞から血管系細胞への分化誘導技術の確立

—BBB モデル構築に供する血管系細胞材として、ヒト ES 細胞から血管内皮細胞、血管周皮細胞を分化誘導する技術を検討し、血管系細胞の量産調製技術として確立する。

・ヒト ES 細胞から神経系細胞への分化誘導技術の確立

—BBB モデル構築に供する神経系細胞材として、ヒト ES 細胞からアストロサイトや神経系前駆細胞

胞を高効率に分化誘導する技術を検討し、神経系細胞の量産調製技術として確立する。

最終目標(平成 21 年度末まで):

・ヒト ES 細胞由来 BBB モデルの性能を評価・判断しながら、用いる細胞性状の最適化を図り、モデル構築に好適な細胞調製技術として確立する。

② in vitro BBB モデルの構築

ヒト ES 細胞から調製される各種 BBB 構成細胞をデバイス上に共培養することで、生体機能に限りなく近い特性を有する BBB モデルを in vitro 構築する。

中間目標(平成 19 年度末まで):

・従来モデルの試験的構築による性能把握と BBB 機能評価技法の取得

—非ヒト動物由来初代培養細胞等による従来モデルを試作し、その性能評価を通して、物質透過性をはじめとする BBB 特性の評価技法を取得する。

・BBB モデル構築形態に関する事前検討

—初代培養細胞やマウス・サル ES 細胞から調製した BBB 構成細胞等を用いて、モデル構築形態(共培養系)を予備検討し、最適な共培養形態についての情報を先行蓄積する。

最終目標(平成 21 年度末まで):

・ヒト ES 細胞由来 BBB 構成細胞を用いたモデル構築

—ヒト ES 細胞の分化によって得られる血管系細胞(血管内皮細胞、血管周皮細胞)および神経系細胞(アストロサイト、神経系前駆細胞)を用いて BBB モデルを in vitro 構築する。

—BBB 特性の獲得に向けたモデル構築の最適化を図る。

—各種 BBB 特性を評価し、バックグラウンドデータとして蓄積する。

—完成したヒト ES 細胞由来モデルに化合物ライブラリーを適用し、BBB 透過/非透過物質、透過促進/抑制物質、BBB 形成促進/抑制物質などの評価を実行し、スクリーニングアッセイ系としての精度を検証する。

(3) 研究成果

① BBB モデル構築用細胞の調製技術の確立

①—ア:ヒト ES 細胞から神経系細胞の分化誘導技術の確立

当初の計画に従って、神経系細胞分化誘導法“Neural Stem Sphere(NSS)法”(「神経系細胞の製造方法」(WO2004-007700))を技術基盤とし、簡便性と量産性を有する BBB モデル構築用神経系細胞の調製法として国産ヒト ES 細胞に適用可能な系への改良検討を行った。

ヒト ES 細胞(KhES-2、KhES-3 株)のコロニー丸ごとをセルスクレーパーで回収し、これをグリア培養上清(神経細胞培養液 MB-X9501、住友ベークライト)で約 10 日間浮遊培養後、形成された凝集塊(NSS)を bFGF(20ng/mL)を添加した Neurobasal B27 培地を用いて、ポリ L リジン/ラミニンコート培養皿にて接着培養を行った。その結果、ディッシュ底面に接着した NSS 凝集塊の周辺部に一様形態の細胞の遊走増殖が観察された。この遊走増殖する細胞は神経幹細胞マーカー Nestin を発現しており、培養環境を変えることで神経細胞(β III tubulin 陽性)にもアストロサイト(GFAP 陽性)にも分化させることができることから“神経系前駆細胞“と呼べる分化段階の細胞性状であることが判定された。更に、この神経系前駆細胞集団(Nestin 陽性)は、0.05%トリプシンを

用いての継代が可能であり、数継代後には培養器中の殆ど(90%以上;残りの細胞は神経細胞に分化している)が Nestin 陽性細胞になること[高純度な神経系前駆細胞の調製と in vitro 増幅]、汎用の細胞保存液によって十分な生存率を確保しての凍結保存が可能であることが確認された。

[神経系前駆細胞の凍結保存]

また、アストロサイトの調製については、上記の量産した神経前駆細胞集団を、組織培養ディッシュへの接着性の違いによる選別(アストロサイトは他の細胞と比較して接着性が強い)や、N2 添加物含有 D-MEM/F-12(1:1)培地で継代する操作により、神経細胞の混入が殆ど認められない状態でアストロサイト集団(GFAP 陽性)を選択的に調製する技術として確立した。[アストロサイトの選択的調製]

①—イ:ヒト ES 細胞から血管系細胞の分化誘導技術の確立

ヒト ES 細胞からの血管系細胞の調製では、神経系細胞のように高い誘導率を確保した分化誘導技術を確立することは困難で現実的ではない。そこで、ヒト ES 細胞から血管前駆細胞や血管内皮前駆細胞を先ず分化誘導し、これをソーティング技術(磁気細胞分離装置 MACS や FACS)で分取・純化した後、再培養下で in vitro 増幅する様式で最終的に血管内皮細胞や血管周皮細胞を量産調製する技術の確立を目指した。

①—イ a: 血管系細胞分化誘導法の初期検討

当初の計画に掲げたマウスストローマ細胞 OP9 株との共培養による分化誘導法(M. Sone et al., Circulation, 107:2085-2088, 2003、「霊長類動物胚性幹細胞から血管系細胞への分化方法」米国特許出願 20050191744、「霊長類動物胚性幹細胞からの血管内皮細胞の製造方法」特願 2004-184138))に加えて、6種類のサイトカイン含有培地を用いる手法(6種サイトカイン法;国立国際医療センター開発技術)も導入し、ヒト ES 細胞(KhES-2、KhES-3 株)から血管系細胞の分化誘導を試みた。その結果、いずれの分化誘導手法でも血管内皮細胞(VE-cadherin 陽性、PECAM 陽性)、血管周皮(平滑筋)細胞(α SMA 陽性)の誘導を確認することはできたが、分化誘導効率を FACS 解析により比較した結果では、血管内皮細胞の分化誘導効率は低レベルに留まった(OP9 共培養法; < 約 1%、6種サイトカイン法; 約 2-5%)。加えて、この低い分化誘導効率に起因して、その後のソーティング操作での分離精度が悪く、血管前駆細胞(VEGFR-2 陽性)や血管内皮前駆細胞(VE-cadherin 陽性)の効率的な分離・純化に支障を来たことが判明した。

①—イ b: 新規な血管系細胞分化誘導法の開発

ヒト ES 細胞から血管系細胞の分化誘導手法に関して更なる分化誘導効率の向上を図る目的で GSK-3 β 阻害剤 BIO を使用する新たな手法の検討を行った。本法は 1)GSK-3 β 阻害剤 BIO 処理と、それに続く 2)VEGF 含有培養液での培養を、段階的に施すことを特徴とするオリジナルな分化誘導法である。未分化状態のヒト ES 細胞を 5 μ M 濃度の BIO で 3 日間処理することによって先ず中/内胚葉分化への選択的分化を誘起し、これを VEGF 含有培養液で引き続き培養することで、分化誘導日数わずか 5 日間で約 20~25%の高誘導率で血管内皮細胞(VE-cadherin 陽性)を誘導することに成功した。ここで誘導された血管内皮細胞は、VE-cadherin の他に、VEGF-R2, CD34, PECAM-1(CD31)などの内皮マーカーを共発現する“血管内皮前駆細胞”と定義づけられる単一の細胞集団であり、管腔形成能や LDL 取り込み能やなどの内皮細胞に特徴的な基本機能を有することを確認した。

血管系細胞分化誘導技術の普遍性と iPS 細胞への適用検討:新規開発した BIO を使用する血管系分化誘導法の普遍性を調べる目的で、ヒト KhES-1、KhES-2、KhES-3 の 3 株について血管内皮細胞の分化誘導効率と分化誘導タイムコースを比較した。その結果、いずれの株においても分化誘導開始後 5 日目に 15-20%の誘導率で血管内皮細胞(VE-cadherin 陽性)の出現が誘導で、本法の普遍性が確認された。更に、本技術のヒト iPS 細胞への適用の可否を検討した結果では、253G1 株、IMR90-1、IMR90-4 細胞株において、ヒト ES 細胞株と比較して誘導率は若干低減するものの、血管内皮前駆細胞(VE-cad 陽性/TRA-1-60 陰性/VEGFR-2 陽性)を誘導可能であることが確認できた。

①-イc: 血管内皮細胞の分離・純化と量産化

分化誘導したヒト ES 細胞全細胞集団から血管内皮(前駆)細胞を分離・純化する目的で、VE-cadherin の発現を指標として、ソーティング技術で分離・純化することを試みた。その結果、GSK-3 β 阻害剤 BIO を使用する分化誘導法で誘導した血管内皮(前駆)細胞(VE-cadherin 陽性、誘導率~20%)は、磁気細胞分離装置 MACS による簡便かつ迅速な操作によって 95%以上の純度を確保した状態で分離することができた。また、こうして MACS 操作により分離・純化した細胞は十分なバイアビリティと増殖性を示し、標準的なトリプシン処理による継代操作によって、約1ヶ月の期間で 100 倍以上の細胞数に in vitro 増幅できることも確認した。こうして量産した血管内皮(前駆)細胞は、分離・増幅後の間でも内皮マーカー発現(VE-cadherin⁺、VEGF-R2⁺、CD34⁺、PECAM-1⁺)や内皮機能(LDL 取り込み能、管腔形成能)を安定に維持しており、通例の凍結保存手法によって大きく生存率を低下させない状態で保存可能であった。

更に、血管周皮(平滑筋)細胞についても、同じ BIO を使用する新規分化誘導法を用いて誘導される血管前駆細胞(VEGFR-2 陽性)を一旦 MACS で分離した後、10%FBS 含有 DMEM 培養液を使用した再培養下で血管周皮(平滑筋)細胞(α SMC 陽性、calponin 陽性)へと分化させ、継代によって増幅・量産化を行うことにも成功している。

以上のように血管系細胞の調製に関しても、BIO を使用する分化誘導技術を新規開発することで、これまで他に報告されていない水準の高効率での血管内皮細胞や血管周皮(平滑筋)細胞を分化誘導し、BBB モデル構築に供する十分な血管系細胞の量産調製体制を確立することができた。

② in vitro 血液脳関門(BBB)モデルの構築

②-ア: 従来モデルの試験的構築による性能把握と BBB 機能評価技法の取得

ヒト ES 細胞由来 BBB 構成細胞の調製体制が整うまでの間、動物由来脳毛細血管内皮細胞を使用する従来モデルを試験構築し、その基本性能を把握すると同時に、当プロセスで使用する技術手法を後のヒト ES 細胞由来 BBB 構成細胞によるモデル構築化検討にも活用できる BBB 機能評価技法として取得することを行なった。具体的には、多孔性の膜フィルターを貼った培養インサート(ミリポア社製 Millicell、グライナー社製 Thincert 等)の内側にウシ脳毛細血管内皮細胞(初代培養)を単層培養し、外側にアストロサイト(ラット胎児脳由来、ヒト正常脳由来)を共培養する様式モデルを構築し、tight junction 形成(ZO-1, claudin-5 等タンパク質の発現解析)、経内皮電気抵抗(trans endothelial electric resistance; TEER)、物質透過性(受動拡散能)といった静的バリア性能を評価した。また脳毛細血管内皮細胞マーカー酵素といわれる Alkaline phosphatase

(ALP)や γ -Glutamyl transpeptidase (γ GTP)の活性についてもその確認手法を習得した。

このように BBB 特性に関する各種評価技法を習得することで、後に実施するヒト ES 細胞由来 BBB 構成細胞によるモデル構築化検討を円滑に推進することができた。また、従来モデルの性能限界(生体内 BBB 機能との乖離)を把握することができ、本開発で目指すモデルの性能基準を明確にすることができた。

②ーイ:BBB モデル構築化の事前検討

ヒト ES 細胞から BBB 構成細胞の調製ができるようになるまでの間、ウシ脳微小血管内皮細胞(初代培養細胞)を用いて、Mesh-fib 培養インサート(国立環境研究所技術)の活用による近接共培養構築形態や、マウス ES 細胞由来神経系前駆細胞の共培養効果に関する検討を行った。Mesh-fib 培養インサート(途上、コラーゲン線維の架橋程度を強化することや、培養インサートの規格を 6well から 12well スケールへ変更を実施)上に単層培養したウシ脳微小血管内皮細胞に対してマウス ES 細胞由来神経系前駆細胞を共培養し、形成された内皮細胞シートの電気抵抗値や FITC 標識デキストランを披験物質とした物質透過性の評価を行った。その結果、約 40%の強度上昇効果が検出され、モデル構築における ES 細胞由来神経系前駆細胞利用の有効性が確認できた。更に、この ES 細胞由来神経前駆細胞の共培養によるバリア形成の促進効果は、血管内皮細胞単層に対する相互作用の様式(近接培養された場合とそうでない場合)に関わらず同程度であったことから、神経系前駆細胞集団(アストロサイトや神経細胞への分化過程を伴う)から分泌される液性因子を介した作用に因るものであることが示唆された。

②ーウ:ヒト ES 細胞由来 BBB 構成細胞によるモデル構築

生体における脳毛細血管の新生と BBB 形成過程には血管内皮前駆細胞が関与しており、高度な BBB 機能の発現・維持は、脳毛細血管の特徴的な構造と連関し、血管内皮細胞にアストロサイトや血管周皮細胞が相互作用することが重要と考えられている。そこで本開発では、「BBB モデル構築用細胞の調製技術(開発目標①)」で確立した技術を用いて量産調製したヒト ES 細胞由来の血管系細胞(血管内皮細胞、血管周皮細胞)や神経系細胞(アストロサイト、神経細胞)を組み合わせることで BBB モデル化の検討を行った。すなわち、多孔性フィルターが貼られた培養インサートの内側(フィルター上面)にヒト ES 細胞由来血管内皮(前駆)細胞を単層培養し、これにヒト ES 細胞由来の血管周皮(平滑筋)細胞や神経系細胞(アストロサイトや神経前駆細胞)を共培養・相互作用させるスタイル(共培養形態)を基本構想とした。構築スタイル自体は一見従来モデルと類似しているが、以前から試みられてきた従来型モデル構築戦略とは異なる性格の新しいアプローチといえる。従来モデルがもともと生体内で BBB 機能を発現していた成熟細胞を成体外に再構成するというやり方をしてきたのに対して、ここでは ES 細胞由来血管内皮細胞(ES 細胞の分化誘導によって得られる機能細胞は、総じて成熟分化を遂げていない分化幼若な性状である)をはじめとする各種 BBB 構成細胞がモデル構築下の共培養・相互作用によってはじめて分化を促され、最終的に BBB 機能の獲得へ向かわせることを狙っている。

BBB 機能の本態は 1)血管内皮細胞間に形成されたタイトジャンクションによる強固なバリア機構と、その上に備わる 2)各種トランスポーターによる選択性と方向性を有した物質輸送機能といわれている。そのため、検討するモデルの性能判断は、タイトジャンクション(TJ)形成や物質透過性(細胞間受動拡散性)をみる静的バリア性能評価に重点を置き、これに各種トランスポーターの

発現・機能を加えた評価を指標として行なった。

②ーウ a: ヒト ES 細胞由来血管内皮(前駆)細胞の性状改変

本開発で調製した量産直後の血管内皮細胞は、VE-cadherin の他に、VEGF-R2, CD34, PECAM-1(CD31)などを共発現する“血管内皮前駆細胞”と呼べる比較的未熟な分化段階の細胞であり、単独培養による内皮シート形成では TJ 形成(ZO-1 や Ckudin-5 発現)を示さずモデル構築に適さないものであることが明らかとなった。そこで、この細胞を TJ 形成能を有する細胞へと性状改変を行うことを検討した。その結果、同じ ES 細胞由来の神経前駆細胞や血管平滑筋細胞(α SMA 陽性、calponin 陽性)の培養上清(馴化培地)で約1週間程度培養することで TJ 形成能を有する血管内皮細胞に変化させることができた。

更に、トランスポーター発現量も上昇させる性状改変を目指した検討からは、血管平滑筋細胞馴化培地(StemPro34 SFM 培養液)で一旦、性状改変した後に、引き続き EGM-2 培養液で調製した ES 細胞由来神経前駆細胞の培養上清(馴化培地)で培養することにより、排出系トランスポーター群(MDR1、BCRP、MRP1)の発現レベルを増大させることができ、TJ タンパク質(Claudin-5 や ZO-1)の発現レベルも高い細胞集団を調製できることを明らかにした。血管内皮細胞分化における神経系細胞の関与は BBB 環境に特徴的なものであり、脳微小血管内皮細胞(Claudin-5 の高発現により強固な静的バリア形成能を有する)への分化方向づけを示唆する結果として興味深い知見の一つと考えられた。

②ーウ b: ヒト ES 細胞由来 BBB 構成細胞によるモデル構築

ヒト ES 細胞由来 BBB 構成細胞を用いたモデル化検討では、上述のモデル基軸として用いる血管内皮細胞の性状(分化段階)以外にも、共培養する細胞の性状やその組み合わせ位置、共培養のタイミング、あるいは培養インサート等については多角的かつ試行錯誤的な検討が必要となる。本開発でも相当の試行錯誤的検討を実施したが、ここでは最終的に優れた成績を示した成果についてのみ以下に記載する。

血管平滑筋細胞の馴化培地(StemPro34 SFM 系)と神経前駆細胞の馴化培地(EGM-2 系)を用いて段階的に性状改変したヒト ES 細胞由来血管内皮細胞を市販の培養インサート(Thincert, 孔径 $0.4 \mu\text{m}$)上に播種することで単層シートを形成させ、その静的バリア性能(経内皮電気抵抗 TEER、物質透過性、タイトジャンクションタンパク質発現)を評価した。その結果、培養インサート上でも内皮細胞間境界部に Claudin-5 を集積強発現し、良好なタイトジャンクション形成を示すことが認められた。また、2 種類の蛍光物質 FITC-Dextran(平均分子量 4kDa)および Fluorescein-Na(分子量 376Da)を用いて物質透過性(単純拡散・細胞間物質通過抑制性)を解析した結果では、それぞれ $P[\text{FD4}] = 0.26\text{--}0.42 \times 10^{-3} \text{ cm/min}$, $P[\text{NaF}] = 0.83 \times 10^{-3} \text{ cm/min}$ という透過係数値が計測された。得られた上記の数値は、いずれもヒト脳毛細血管内皮細胞(初代培養)により形成される単層シートの数値(文献値)を大幅に上回るものであり、ヒト細胞由来の血管内皮細胞単層ではこれまでに報告されていないレベルの静的バリア強度を実現できることを示す成績である。また従来モデルの中で優位とされているウシ脳微小血管内皮細胞 BBMVEC を用いたモデルに匹敵する性能であった。

ヒト ES 細胞由来血管平滑筋細胞および神経系前駆細胞の共培養効果:ヒト ES 細胞由来血管内皮細胞が形成する単層シートの静的バリア強度は、同じ ES 細胞由来の血管平滑筋細胞や神

経系前駆細胞と共培養することで更に増強されることも確認された。

②-ウ c: 人工基底構造体(sBM)培養インサート器材の活用

市販の培養インサート及び Mesh s-fib(コラーゲン基質 fib)培養インサートに基底膜構造体 sBM を形成させた各種器材 [rLN10/LI90 sBM、rLN10/TMNK sBM、rLN10/LI90 Mesh-sBM、BBMVEC only Mesh-sBM、BBMVEC/RPF Mesh-sBM 等]の提供を国立環境研究所から受け、これらの活用についても検討した。各培養インサート上に形成させた内皮単層において、蛍光標識デキストランを用いた物質透過性の評価を行った結果、sBM 器材上では良好な内皮シートを形成できることが確認された。特にヒト型ラミニン 10 を高発現する hLN10 をヒト肝星細胞株 LI90 と共培養することで作製した sBM(hLN10/LI90)上で形成されるシートが最も良好な成績を示した。また、代表的トランスポーター10 種類について遺伝子発現を RT-PCR 比較解析した結果からは、排出系トランスポーター(MDR1、MRP、BCRP など)の発現レベルに差異が生じやすい傾向が認められ、BCRP については血管平滑筋細胞や神経前駆細胞の共培養による発現量上昇効果が確認された。しかし、P 糖タンパク質 MDR1 の発現については、むしろヒト ES 細胞由来血管内皮細胞単独の方が高発現しており、好適なモデル化に向けて活用の優位性を判断することが難しい結果となった。

(4) 目標の達成度と意義

① BBB モデル構築用細胞の調製技術の確立

BBB モデル構築に供する細胞として、血管系細胞(血管内皮細胞と血管周皮細胞)と神経系細胞(アストロサイト、神経細胞)をヒト ES 細胞から高効率で分化誘導する技術、及びこれら各種細胞を量産調製する技術を確立した。これにより細胞調製が律速となることなく、BBB モデル開発を円滑に推進することが可能となった。

神経系細胞:当初の計画通り、技術基盤 NSS 法を国産ヒト ES 細胞株に適応した系に改良することによって、神経系前駆細胞(Nestin 陽性)を高効率に分化誘導し、これを増幅、凍結保存する技術を確立できた。更に、この神経系前駆細胞から神経細胞(β -tubulin 陽性)やアストロサイト(GFAP 陽性)の選択的な量産調製を実現させた。

血管系細胞:当初計画していた OP9 共培養法や6種サイトカイン含有培地を用いる手法による血管系細胞の分化誘導効率は、いずれも 5%以下の低値に留まる結果となったが、これを克服するオリジナルな手法として、GSK-3 β 阻害剤 BIO を用いる新規な高効率分化誘導法を開発することができた意義は大きい。本法における血管内皮細胞の分化誘導成績(誘導率;20%以上、誘導日数;5日間)は、他に報告されている多くの手法と比較しても、血管内皮細胞を高効率に誘導できる分化誘導技術として注目に値する。また本開発で量産化が実現した血管内皮前駆細胞は、BBB モデル構築の基軸材としてのみならず、血管の発生分化機構を解明するための基礎的研究や細胞移植治療や血管組織工学等の応用研究ツールとして広く活用できる。よって本開発成果は、ヒト ES 細胞由来血管内皮(前駆)細胞の効率的な量産調達手段としても、その有用性は高いと考えられる。

② in vitro 血液脳関門(BBB)モデルの構築

ヒト ES 細胞由来 BBB 構成細胞によるモデル開発は、平成 21 年度末までに完遂させることは

できなかった。BBB 特性の獲得を更に追及し、生体を反映した BBB 特性を獲得したモデルとして完成させるためには、今後も更なる継続検討が必要となる。

しかしながら、ヒト ES 細胞由来血管内皮(前駆)細胞を基軸として、これに同ヒト ES 細胞から調製した血管平滑筋細胞や神経系細胞(神経系前駆細胞、アストロサイトなど)を組合せるこれまでの検討において、ヒト ES 細胞から調製された分化幼若な血管内皮(前駆)細胞が血管周皮(平滑筋)細胞や神経前駆細胞の培養上清を用いることによって BBB 特異的タイトジャンクションタンパク質 Claudin-5 を高発現する血管内皮細胞へ性状改変できたという結果や、この性状改変した血管内皮細胞を培養インサート上に播種することで形成される内皮単層においてウシ脳毛細血管内皮細胞等を用いて構築される従来モデルに匹敵する静的バリア性能(細胞間物質透過性)の獲得に成功した結果は、後の開発を進展させる上で重要な知見といえる。未だ不明な点が多い BBB 機能の発現・維持を理解する点で、また量産性や安定性など実用化面で従来モデルが抱えていた問題を克服できるヒト型モデル実現の可能性を示唆する点で、本開発成果の意義は極めて大きいものと考えている。

2. 3. 1. 3 ハイスループットスクリーニング(HTS)技術の開発

幹細胞創薬研究所

(1)事業目的と背景

ハイスループットスクリーニング(HTS)は創薬では必須の技術であるが、ES 細胞を用いた HTS 系は現段階で実用化されている公知の報告はない。特に霊長類の ES 細胞を用いる場合には、細胞の取り扱いには細心の注意を払う必要があり、既存の機器がそのまま使用できないという問題点がある。HTS には細胞だけでなく周辺機器の整備も必須であるが、機器の検討には時間を要するために細胞技術と並んで開発を進める必要がある。本プロジェクトにおいて、創薬現場での実用上不可欠な ES 細胞の播種や培地交換を自動化することを実現し、分化制御の化合物をスクリーニングすること、分化後細胞を用いて化合物をスクリーニングできる技術確立することを目的に HTS 技術の開発を行っている。

(2)事業内容と目標

HTS には用いる生物試料の他に最適な基材や分注機器、測定機器が必要である。細胞は、本プロジェクトのテーマから供与される細胞を用いることを前提に、その他の HTS 機器や消耗品の開発・検討を行う。

霊長類の ES 細胞の継代の際には細胞はコロニーで行う。そのため、細胞懸濁液をムラなくプレートに分注するためにはコロニーの沈降をおさえるために攪拌しながら、コロニーに物理的な損傷を与えずらく液切れのよい分注精度のよいノズルを開発する必要がある。攪拌も細胞に与える傷害を最小限にすることが求められる。このような、霊長類 ES 細胞に適合した機器は現段階で市販されていないために市販機器をベースに開発する。また、蛍光や発光といった read-out の検出については、現在、創薬現場で使われている HTS 用の検出器で十分な能力を有していると考えている。これらの機器を導入し、心筋分化を促す化合物の 95 スクリーニングおよび、分化

神経細胞を用いた HTS 系の構築および運用を計画している。ES 細胞に適用可能な HTS 条件の設定、およびより効率的な創薬モデル細胞を作出可能な活性を有する化合物を見出すことが目標である。

(3) 研究成果

ハイコンテント・ハイスループットスクリーニング(HTS)技術を用いた心筋分化誘導促進物質の探索

ヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞は、薬剤誘発性 QT 延長試験の創薬スクリーニングや、心臓疾患への細胞移植技術に重要であるが、それらの試験に使用できる安定した細胞系は今のところ十分に確立されておらず、心筋分化をさらに誘導・促進する因子の探索が望まれている。そこで、我々は ES 細胞の心筋分化を促進する化合物を探索するための HTS 系を構築した(図 1)。特異的心筋マーカーである α -MHC のプロモータで駆動される GFP 遺伝子を導入したサル ES 細胞を、HTS 用マルチプレート上で心筋分化培養し、化合物ライブラリー中の約 1 万化合物を培養プレートに添加した。化合物を添加後約1週間培養し、GFP 陽性拍動心筋細胞が増加している化合物を我々の HTS 系により検出したところ、心筋分化促進効果がみられる低分子化合物が 2 個(化合物 X、化合物 Y)見出された(図2)。各化合物については濃度依存性が認められ、その適正濃度で約2~5倍の GFP 陽性コロニー数の増加、拍動コロニー数の約 10 倍前後の増加がみられた(図3)。また化合物 X については HERG チャネルなど各心筋チャネル遺伝子の発現量の増加が見られ、それと同時に HERG 電流の増加や活動電位の短縮など、心筋細胞の電気生理学的成熟も確認できた(図4)。化合物 X については現在、化合物用途特許を申請済みであり、化合物 Y についても物質特許を申請予定である。さらに、ヒト ES 細胞株や iPS 細胞株でも顕著な心筋分化促進効果が確認されており、この HTS 系はヒト ES/iPS 細胞にも適用することが可能である。

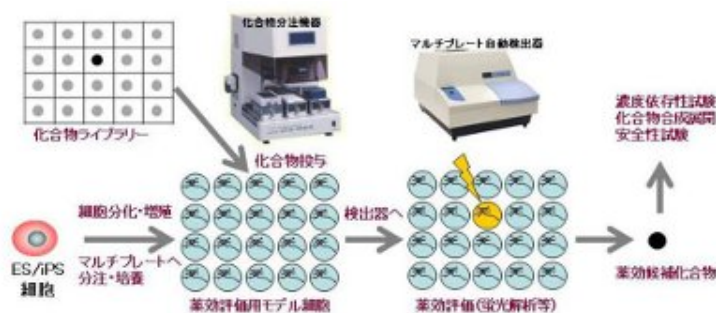


図1. ES/iPS細胞を用いたハイスループットスクリーニング(HTS)系

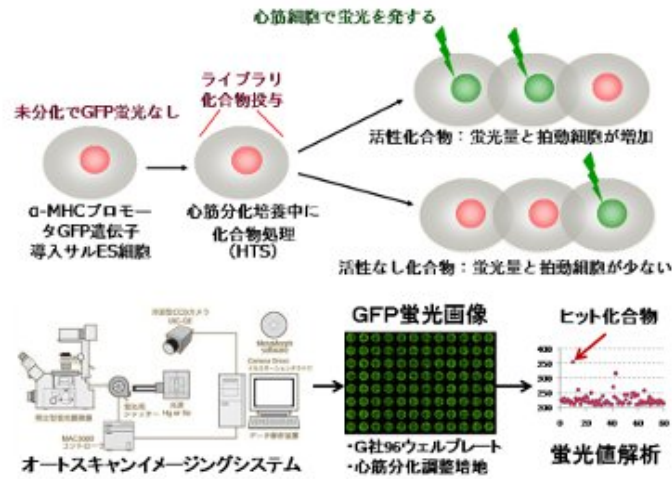


図2. 心筋分化誘導促進物質探索HTS

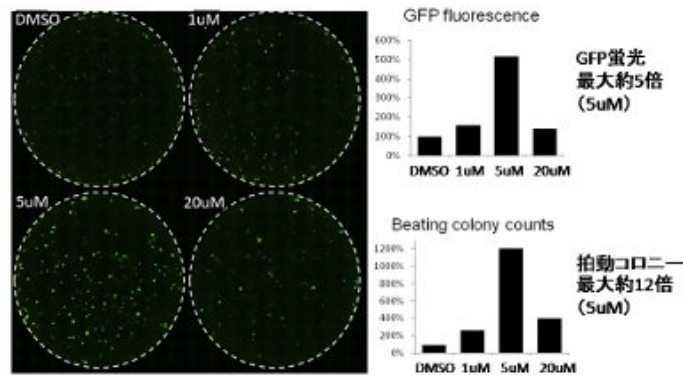


図3. 化合物XのES細胞に対する心筋分化促進効果

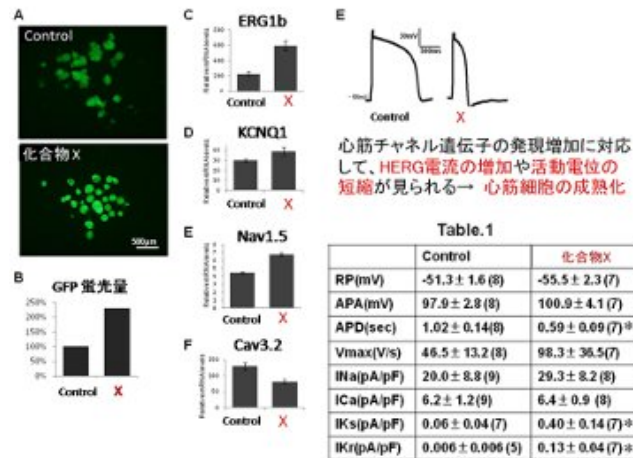


図4. 化合物Xによる心筋チャンネル増加と心筋の電気生理学的成熟

(4) 目標の達成度と意義

α-MHC プロモータ GFP 遺伝子を導入したヒト・サル ES 細胞を用いた HTS 系の開発により、心筋分化を促進する新たな化合物を検出することができた。これらの化合物はヒト ES/iPS 細胞にも有効であるため、QT 延長スクリーニング系の開発や移植細胞生産への応用が期待できる。またこの心筋分化促進物質探索 HTS 系は、様々な化合物ライブラリーに適用することができ、今後さらに新たな心筋分化促進物質の発見も期待できると考えられ、QT 延長評価系・心筋分化誘導技術の開発を大きく進展させるものとなっている。

2. 3. 2 オンチップ・ヒト組織・臓器モデルを用いた毒性・創薬技術の研究開発

東京医科歯科大学

(1) 事業目的と背景

創薬プロセスの効率化に寄与する有用な技術の開発を目的として、ヒト ES 細胞から臓器細胞へ分化した細胞をバイオチップ上に構成的にネットワーク構築することで「オンチップ・ヒト臓器組織モデル」を作成し、個体内で機能している臓器と同様な結果を得ることが期待できる、創薬スクリーニングや毒性評価用のデバイスの構築を行う。

現在までに東京医科歯科大学安田研究室で進めてきた構成的に構築した細胞集団・細胞ネットワークの研究である「オンチップ・セロミクス」計測技術を、動物細胞ベースでの臓器モデルチップ、そして京都大学再生医科学研究所で推進されているヒト ES 細胞分化制御技術によって構築したヒト臓器細胞を利用した臓器モデルチップ、を用いることで従来、動物あるいはヒト個体ベースでなければ困難であった創薬・毒性検査を、ヒト ES 細胞から臓器細胞へ分化した細胞をバイオチップ上に構成的にネットワーク「オンチップ・ヒト臓器組織モデル」で実用化し新しい薬剤・医療スクリーニング法へと発展させる。

実際には、すでに開発を推進してきた独自の細胞精製装置技術および手法、オンチップ細胞ネットワーク長期培養計測装置技術、1 細胞発現解析技術などを駆使して、臓器・組織と同様な機能の解析が可能となる細胞ネットワークモデルチップを動物細胞臓器細胞からチップ上に再構築し、さらにこのチップを用いることで薬効・毒性判断が可能な解析システムと解析プロトコルを開発する。さらに、個体レベルでの表現型の違いを再現できるプロトコルの開発を通じて、応答を推測できるセロミクス・データベースの構築、これらの臓器モデルからの解析結果を分析することで個体の応答を予測できる一連の「システム」「プロトコル」「ノウハウ」「ソフトウェア」の開発を並行して進める。

これらの研究を統合し、従来無かった「細胞ネットワーク」の「パターン」の重要性の理解に基づいた新しい細胞ベースの計測技術を実現し、動物実験、ヒト個体レベルの毒性・薬効評価を補佐できる「オンチップ・臓器モデル」の実用化を目的とする。さらにヒト ES 細胞より分化した神経組織、心臓、肝臓などの臓器細胞の実現に併せて、これらを動物細胞から置き換えてバイオチップ上に構築することで、ヒト臓器のモデルとなりうる組織、臓器モデルの構築条件を明らかにする。

本研究の推進によって、医療検査、食品衛生検査などでの信頼性の高いスクリーニング技術として少サンプルを高速・低コストで計測が可能となり、我々の健康に大きく寄与することが期待されるとともに、生命システムの新たな理解を促すことによって、基礎研究分野へも大きな貢献が期待される。

(2) 事業内容と目標

① 動物細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築

動物臓器由来の初代培養細胞を用いて構成的にチップ上に臓器・組織モデルを構築し、この動物臓器モデルチップの薬剤等の刺激に対する応答と動物個体レベルでの応答の評価結果との比較検討を行い、臓器モデルチップが個体レベルと同程度の応答特性を持つための技術の最適

化を行うとともに、ヒト ES 細胞由来の細胞を用いたデバイス構築のための基礎データを取得することを目的とする。さらに、従来の個体では困難であった表現型の違いを細胞集団の配置の違いによって実現する「臓器モデルネットワークチップ」および表現型に基いた計測が可能となる創薬・毒性検査システムの構築を目指す。このために、具体的には下記課題に分けて開発を推進する。

①-1 動物臓器・組織モデル構築技術のための細胞操作・長期培養・薬剤添加技術の開発

これまでに開発してきたアガロース(寒天)を素材とした一連のマイクロ加工技術、アガロースマイクロチップ中での細胞培養・細胞集団の構成的配置技術、1細胞多電極アレイ刺激計測技術を組み合わせるとともに、薬剤添加による細胞の応答計測を可能とするマイクロチップ形状の追加、長期培養計測を実現するために必要な技術等を検討する。

平成 18 年度目標(中間目標)として、1細胞単位での細胞状態の計測が可能となる計測システムとチップの構築を目指す。さらに、薬剤の添加によって計測データがどのように変化するかを計測することで、その対策について検討を行う。特に、平成 19 年度には実質的な薬剤効果の評価が可能となるように、薬剤添加システムの構築を完了させる。

平成 21 年度目標(最終目標)としては、実用サイド(創薬企業、薬剤評価企業)からのアドバイスに基づいて、実用性を持った評価システムの構築、長期培養系の構築を完成させる。

①-2 オンチップ動物心筋モデルの構築と薬剤応答の機能評価

創薬・毒性検査のための臓器モデルとして最適な課題として心筋モデルの構築を選び、これについて検証をおこなう。ここでは、まず、心臓ネットワークの形状によって、どのように臓器に近い応答を行うモデル「心筋細胞ネットワークチップ」を構築できるかを検討する。そして、これに並行して、個体ベースでの QT 延長の計測に必要な変数をいかに細胞の状態データから取得するか、ハードウェア技術「細胞ベース QT 延長計測システム」とソフトウェア技術「細胞ベース QT 延長評価ソフト」の開発を進める。そして、最終的に、開発した「心筋細胞ネットワークチップ」と「細胞ベース QT 延長計測システム」「細胞ベース QT 延長評価ソフト」を組み合わせ、個体ベースで QT 延長が報告されている既知の試薬に対する応答を検証して実用化を目指す。

平成 18 年度目標(中間目標)として、心臓ネットワークの形状によって、どのように臓器に近い応答を行うモデル「心筋細胞ネットワークチップ」を構築するために必要な細胞の特性(集団効果、繊維芽細胞の効果等)の基礎データを取得する。平成 19 年度は、引き続き個体ベースでの QT 延長計測評価に匹敵する細胞ベースでの評価技術の理解のためのハードウェア技術「細胞ベース QT 延長計測システム」の開発を進める。さらに開発したシステムを用いて、そのデータ解析によって評価ソフト開発に必要な各イオンチャンネルの応答についての基礎データの集積を進める。

平成 21 年度目標(最終目標)には、細胞ベースでの QT 延長計測が行える「心筋細胞ネットワークチップ」の実用化と、「細胞ベース QT 延長計測システム」「細胞ベース QT 延長評価ソフト」の実用化を完了させる。

①-3 オンチップ動物神経モデルの構築と薬剤応答の機能評価

創薬・毒性検査のための臓器モデルとしてさらに神経モデルを選び、「神経細胞ネットワークチッ

チップ」の構築と、神経細胞への機能的解析が可能となる細胞ネットワークのヒステリシス(記憶)計測が可能システムを構築する。特に、神経細胞ネットワークについては、どのような在ニューロンの空間ネットワークパターンが持つ意味を明らかにすることで、機能解析に最適な「細胞ネットワーク」についての知的財産化と実用化を目指す。

平成 18 年度目標(中間目標)として、グリア細胞を共存させない神経細胞 1 細胞単位でのチップ上での細胞培養技術の実現と、細胞 1 細胞レベルでの発火信号の計測、そしてさらに単一細胞から伸長する神経突起 1 本単位での電気計測を可能にすることで、1 細胞内での情報処理を明らかにする技術の実現を目指す。平成 19 年度は、さらに興奮性神経細胞と抑制性神経細胞を識別する技術を実現し、これをすでに開発した軸索・樹状突起を識別してネットワークの方向性を制御する技術と組み合わせることで、完全に構成的な神経細胞ネットワークの構築を目指す。

平成 21 年度目標(最終目標)には、開発した神経細胞ネットワークチップの技術を駆使して、さまざまな神経回路パターンを構築することで、情報が記憶されるメカニズムの空間パターンの複雑さ、大きさとの関係を明らかにできるデータベースの構築を完成させ、構成的神経細胞ネットワークパターンの機能データベースについての標準化技術を実現する。さらに、機能ベースでの解析技術を利用することで、神経毒性だけでなく、神経機能障害の定量的評価技術となる創薬のための神経機能計測の標準化技術の実現を目指す。

②ヒト ES 細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築

動物細胞を用いて検討を進めた技術を、ヒト細胞に適用し、ヒト ES 細胞由来の臓器細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築を目的とする。平成 18 年度においては、上記①の動物細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築に集中し、また、ヒト細胞が開発されたときに必要となる技術を事前に開発し、ヒト分化細胞の開発が完了したところで、オンチップ・ヒト臓器モデルの構築を開始する予定である。

②-1 ヒト ES 細胞からの分化細胞を用いた健常(標準)臓器・組織モデル構築技術のための細胞操作技術の開発

臓器・組織内の細胞や ES 細胞から分化した細胞塊は、異なる分化程度、機能を持った細胞が組み合わされてできている。極力細胞に損傷を与える事無く、これらの細胞を機能の違いに応じて分離精製する技術を開発することは、細胞利用の観点から非常に重要である。

平成 18 年度目標(中間目標)は、これまでに開発したオンチップ・セルソーターを用いた細胞の精製方法の開発、細胞データベースの構築を行うことで、無染色での細胞精製の方法について検討する。特に、毒性検査技術で用いることが予定されている心筋細胞、神経細胞の精製技術について検討を行う。また、アダプター等の可逆修飾技術を利用することで細胞を精製する技術についても検討を行う。

平成 21 年度目標(最終目標)には、さらに臓器細胞の画像データベースを充実させることで、画像データベースでの細胞精製技術についての標準化技術となることを目指す。また、アダプターを用いた可逆細胞精製技術についても、アダプターでの修飾に最適な細胞分化状態・表現型の違いを示す指標細胞表面マーカーへのラベル用アダプターの開発を推進して、細胞表面アダプター

の精製方法について確立して、可逆ラベル法による細胞精製技術の標準化技術となることを目指す。

②-2 オンチップ・ヒト心筋モデルの構築と薬剤応答の機能評価

①で開発した動物細胞ベースでの技術を「ヒト細胞」に利用することを目指す。京都大学再生医科学研究所でヒト ES 細胞由来の心筋細胞の開発に成功した後、動物細胞ベースでの技術を転用して、心毒性の評価を可能とするオンチップ・ヒト心筋モデルの構築を進め、ヒトに特異的な毒性が知られている既知の薬剤を用いて、創薬支援(毒性検査)技術としての可能性を検討する。

平成 18 年度目標(中間目標)は、まだヒト ES 細胞由来の心筋細胞の開発が完了していないことから、サル ES 細胞由来の拍動細胞を用いた、薬剤に対する細胞の応答解析、細胞イオンチャンネルの発現状態の解析を行う。

平成 21 年度目標(最終目標)には、ヒト ES 細胞由来の心筋細胞あるいはヒト体性幹細胞から分化させた心筋細胞を用いて、心毒性の評価を可能とするオンチップ・ヒト心筋モデルの構築を進め、ヒトに特異的な毒性が知られている既知の薬剤を用いて、創薬支援(毒性検査)技術を実用化させる。

②-3 ヒト ES 細胞を用いた疾患臓器・組織モデル構築技術の開発

遺伝性疾患情報を付与したヒト ES 細胞由来の疾患モデル細胞の機能を、実際の疾患モデル個体から抽出した疾患臓器由来の細胞と比較することで、ヒト ES 細胞由来の疾患モデルが疾患組織の表現型を継承していること(あるいは環境からのヒステリシスを刷り込む必要が無いこと)を確認し、「オンチップ細胞ネットワークモデル」が、さらに病理・創薬の分野でも利用できる技術となるようにする。具体的には、上記、①でも検討している、チップ上での異種細胞の配置、細胞集団サイズの効果の評価、細胞集団の空間配置の意味を理解し、これを利用することで異なる表現型をチップ上に構築することが可能とすることと、より臓器に近くなるように、チップ上に他の器官の一部を構成的に構築してより複雑なモデルを構築することを目指すものである。

平成 18 年度目標(中間目標)は、心筋細胞については、まず、動物細胞ベースでの心筋細胞と繊維芽細胞の組合せによる「心肥大臓器モデルチップ」の構築、細胞ネットワークの形状制御による不整脈発生機構モデルである「リエントリーモデルチップ」の構築を行うことで、表現型を再現したモデルチップの構築を実現する。さらに平成 19 年度には引き続き、神経細胞ネットワークにアルツハイマー因子であるアミロイド蛋白質 A β を添加することで、神経細胞ネットワークの応答の変化の有無から疾患モデル系の構築が可能か検討する。さらに、脳関門モデルの構築を行い、脳関門の機能評価を神経細胞ネットワークで可能とするより複雑なオンチップ臓器モデルシステムの構築を目指す。

平成 21 年度目標(最終目標)には、ヒト ES 細胞由来の心筋細胞あるいはヒト体性幹細胞から分化させた心筋細胞および繊維芽細胞等を用いて、病理心筋組織モデル計測システムの実現を目指す。また、①-3で得られる予定の、神経細胞ネットワークモデルの空間パターンデータを利用して、ヒト ES 由来の興奮性神経細胞・抑制性神経細胞ネットワークを組み合わせることでヒトと動物細胞との間での神経細胞ネットワークの特性の違いを明らかにし、ヒト神経細胞ネットワーク

計測システムを実現する。また、脳関門もでの組み合わせなど、より複雑な機構の再構築をチップ上で進めることで、より生体の反応に近い応答計測を可能とするシステムの構築を目指す。

(3) 研究成果

①動物細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築

①-1 動物臓器・組織モデル構築技術のための細胞操作・長期培養・薬剤添加技術の開発

これまでに開発してきたアガロース(寒天)を素材とした一連のマイクロ加工技術、アガロースマイクロチップ中での細胞培養・細胞集団の構成的配置技術、1細胞多電極アレイ刺激計測技術を組み合わせるとともに、薬剤添加による細胞の応答計測を可能とするマイクロチップ形状の追加、長期培養計測を実現するために必要な技術等を検討した。その結果、参照電極の構成の改善およびノイズ低減技術の開発によって、従来の多電極システムでは、細胞単位でしか取得できなかった信号を、神経細胞の神経突起単位で計測することに成功した。また、従来の電極では、白金黒を電極上に付加することでしか細胞電位が計測できなかったため、電極上の細胞の観察ができなかったが、参照電極の配置の工夫とノイズ低減技術によって透明電極上に直接配置した細胞の電氣的計測が可能となった。これによって、細胞の形状変化と細胞の電位変化を同時に計測することが可能となった。

さらに、上記、試作システムで得られた心筋細胞のデータに基づいて、システムの実用化につながる装置コスト低減のための装置のスペックダウン(最適化)と、より多くの電極での計測を可能とする多電極化を推進し、多サンプル同時計測が可能な 96 穴ウエルプレート内で計測が可能となるシステムの試作を行うことができた。

以上、本課題での成果をまとめると以下のとおりとなる。

- ・参照電極の構成の改善およびノイズ低減技術の開発によって、透明電極上に直接配置した細胞の電氣的計測が可能となった。

- ・薬剤の添加によって変化するデータの計測法の対応策を開発。

- ・実用化につながる多サンプル同時計測技術の試作機の製作に成功した。

①-2 オンチップ動物心筋モデルの構築と薬剤応答の機能評価

心筋モデルについては、細胞の集団効果に着目し、安定した細胞応答をもたらすために従来のチップ上での培養では注目されていなかった細胞集団の数とその空間配置に基づいた安定性の確認を行った。特に、安定性の確認については QT 延長に着目して、既知の QT 延長が報告されている試薬に対する応答を検証し、対象とする細胞集団の薬剤に対する応答が数分で起こること、また、集団サイズの違いによって応答後に薬剤を洗浄した後の、状態の復元能力が異なること等を明らかにした。

さらに、心臓の中に40%存在する線維芽細胞の機能についても計測を行い、より心臓に近いモデルを構築するための基礎データの取得を行うことに成功した。

以上、本課題での成果をまとめると以下のとおりとなる。

・モデル「心筋細胞ネットワークチップ」を構築するために必要な心筋細胞の集団効果、繊維芽細胞の効果等の基礎データの取得に成功。

①-3 オンチップ動物神経モデルの構築と薬剤応答の機能評価

神経組織の神経モデルについては、まず、神経細胞 1 細胞から伸長する神経突起レベルでの計測を可能とするアガロース微細加工技術の開発、および計測チップ、ノイズ低減技術の開発を行い、1 本の神経突起上での信号伝達を計測することに成功した。

さらに神経細胞の長期計測をする上で障害となるグリア細胞の増殖の影響を排除するために、グリア細胞と共存しない神経細胞 1 細胞単位での培養技術の開発に成功した。

SCN 系に関連した視覚上核と LTP に関係した海馬組織に注目し、細胞集団を構築した。SCN については、チップ上で 24 時間の周期で活動状態の変化を連続して計測する標準化モデルを構築することができた。

神経細胞ネットワークにアルツハイマー病の因子であるアミロイド蛋白質 $A\beta$ を添加することで、神経細胞ネットワークの応答の変化の有無から疾患モデル系の構築が可能か検討し、これら $A\beta$ がミクログリアに特異的に集積されることが確認された。また、神経細胞ネットワークを用いた LTP モデルの構築に成功したことから、これを利用してアルツハイマー病の原因ペプチドとして考えられている $A\beta$ を添加したときの LTP の変化を計測したが、これについては有意な差は計測できなかった。

さらに、現状では神経細胞とグリア細胞との識別は画像処理ベースで可能であることは確認できたが、神経細胞のうち興奮性神経細胞と、抑制性神経細胞との区別は難しかったため、GAD-GFP マウスを入手し、これを飼育して、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞を区別して利用できる環境を構築することに成功した。

以上、本課題での成果をまとめると以下のとおりとなる。

・細胞 1 細胞レベルでの発火信号の計測、そしてさらに単一細胞から伸長する神経突起 1 本単位での電気計測技術の開発に成功。

・グリア細胞を共存させない神経細胞 1 細胞単位でのチップ上での細胞培養技術の開発に成功。

・SCN について、チップ上で 24 時間の周期で活動状態の変化を連続して計測する標準化モデルを構築することができた。

・神経細胞ネットワーク LTP モデルを利用してアルツハイマー病原因ペプチド $A\beta$ を添加したときの LTP の変化を計測したが有意な差は計測できなかった。

・GAD-GFP マウスを飼育して、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞を区別して利用できる環境を構築した。

②ヒト ES 細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築

②-1 ヒト ES 細胞からの分化細胞を用いた健常(標準)臓器・組織モデル構築技術のための細胞操作技術の開発

ES 細胞からの分化細胞を利用する上での最大の課題のひとつは、普通の癌化細胞株と異なり、ES 分化細胞の塊はその分化状態や分化経路が異なる細胞が混入したヘテロな集団であることである。これを実際に利用するためには、ES 分化細胞塊からの細胞の精製が必要となる。これまでに開発したオンチップ・セルソーター及びアプタマー等の可逆修飾技術を組み合わせ、ヒト ES 細胞からの分化細胞の低侵襲抽出手法の開発を進めるための予備検討として、オンチップ・セルソーターシステムを用いて、細胞の形状の違いを見分けることで、心筋細胞と繊維我細胞、神経細胞とグリア細胞が識別分離可能であることを確認し、そのプロトコルを開発した。

以上、本課題での成果をまとめると以下のとおりとなる。

- ・オンチップ・セルソーターを用いた無染色での画像ベースでの心筋細胞、神経細胞の精製に成功。
- ・アプタマーと磁気ビーズによる可逆修飾細胞精製技術の開発に成功。
- ・金ナノ粒子を用いた細胞表面発現チャンネルタンパク質の定量解析技術を開発

②-2 オンチップ・ヒト心筋モデルの構築と薬剤応答の機能評価

動物用の技術を利用して、京都大学再生医科学研究所から供与を受けるヒト ES 細胞由来の心筋細胞を用いて、心毒性の評価を可能とするオンチップ・ヒト心筋モデルの構築を進め、ヒトに特異的な毒性が知られている既知の薬剤を用いて、創薬支援(毒性検査)技術としての可能性を検討した。ヒト ES からの心筋細胞に代わり、サル ES 細胞から分化した拍動細胞を用いて、この細胞のイオンチャンネルの発現状態、薬剤に対する応答などを実際に検討し、薬剤に対しての応答を計測することに成功した。

また、波形データのノイズ低減技術によって得られたきれいな波形を用いて、各イオンチャンネルの状態変化を見積もるためのデータの取得情報の確認、さらにモデルとの整合性評価技術の原理開発に成功した。

以上、本課題での成果をまとめると以下のとおりとなる。

- ・サル ES 細胞由来の拍動細胞を用いた、K,Ca,Na 薬剤に対する細胞の応答解析、細胞イオンチャンネルの発現状態の解析が可能であることを確認。
- ・イオンチャンネルの状態を見積もるための波形評価のための基礎データの取得、およびモデルを用いたチャンネル状態の推測技術についての原理検討に成功した。

②-3 ヒト ES 細胞を用いた疾患臓器・組織モデル構築技術の開発

臓器モデル計測システムの開発については、まず心筋臓器モデルの計測評価技術の開発と、心筋モデルチップの構築を試みた。

装置開発については、1 細胞培養計測技術の特長を生かして、隣接細胞間の伝達速度変化計測に基づく Na イオンチャンネル遅延の計測、1 細胞単位での電位変化信号の計測による K、Ca イオンチャンネルの状態変化の計測、心筋細胞の拍動強度変化に基づく心筋拍出量の見積もりが可能なシステムの開発の試作に着手し、プロトタイプ構築に成功した。

心筋細胞については、まず、動物細胞ベースでの心筋細胞と繊維芽細胞の組合せによる「心肥大臓器モデルチップ」の構築のために必要な基礎データとなる「心筋－繊維芽細胞－心筋細胞」直列接合モデルによる伝達遅延時間計測に成功した。この基礎データによって、細胞ネットワークの形状制御による不整脈発生機構モデルである「リエントリーモデルチップ」の構築を行うことが可能となった。また、直列に 1 細胞単位で接合した心筋細胞ネットワークを用いることで、心筋細胞の伝達遅延と細胞集団の局所的動機現象についても確認することに成功した。これらによって、表現型を再現したモデルチップの構築を実現する可能性を示唆することができた。

また、神経組織のオンチップ構築に併せて、関連性の高い脳閾門モデルの構築を開始し、ペリサイト、血管内皮細胞の初代培養からの継代を可能にした。

以上、本課題での成果をまとめると以下のとおりとなる。

- ・心臓臓器モデル総合計測評価システムの基礎システムの開発に成功。
- ・心筋細胞と繊維芽細胞の組合せによる「心肥大臓器モデルチップ」の構築に成功。
- ・細胞ネットワークの形状制御による不整脈発生機構モデルである「リエントリーモデルチップ」の構築に成功。
- ・極微量での薬剤透過性を評価するための In vitro Microfluidics 系 血液脳閾門モデルの構築の検討

(4) 目標の達成度と意義

平成 18 年度より開始した本研究計画の中で、当初の中間目標としていたオンチップモデル臓器による毒性検査技術としての立ち上げについては、実用化の検討を前提にすでに製薬企業等と共同研究を開始しており、目的に対する本プロジェクトでの装置ハードウェアの技術の実用化レベルへの到達という今年度の目標達成状況は、ほぼ100%であると評価する。今後の残された課題は主に、実際に利用できるようにするためのソフトウェア、データベースの構築、そして特定の検査項目に対応するためのハードウェアのカスタマイズとなる。これらすべての開発に成功すれば、われわれが目標としていた創薬・毒性検査システムの構築は終了できることとなる。今後は、ユーザーとの打合せにより、ハードウェアおよびソフトウェアについて、実際に事業として最適なユーザーフレンドリーなシステムとしてゆく予定である。

更に、従来の発現解析ベースの計測では説明が困難であった心臓リエントリーモデルなどの臓器の空間構造に由来する創薬・毒性検査モデルの概念についても世界で初めて具体的な検討を

行い、特に心筋細胞ネットワーク内に繊維芽細胞の比率が増大する病理モデルである心肥大モデルの構築に必要な心筋・繊維芽細胞の細胞間の Na⁺ 電位伝達速度計測などに成功し、拍動の衝突などの計測も成功した。これらのことは、将来の新しい細胞ベースでの創薬・毒性検査の方向性を示唆するものであり、達成状況としてはすでに実用の70%に達していると考え、初年度の目標であった原理検討という観点からの成果としては100%以上と考える。

細胞の無侵襲精製についても、画像認識ベースでの細胞精製、アプタマーをもちいた新しい細胞精製技術などの立ち上げに成功し、これらも原理検討については達成状況100%、実用化についてはデータベースの蓄積、細胞表面結合アプタマー精製技術の開発などの課題があるため、まだ50%程度と考える。

2. 3. 3 ES細胞由来肝細胞を用いた創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立

東京大学

(1) 事業目的と背景

本研究では、本プロジェクトにより作製される ES 細胞由来肝細胞を用いて、創薬の過程で評価することが必須である薬物動態・毒性を的確に定量的に評価可能な実験系ならびに評価方法を提案することにより、創薬プロセスの効率化を図り、新薬の創製を支援できるシステムを提供することにある。薬物動態や毒性の評価に関しては、大きな種差があることが知られており、ヒトにおける薬物動態や毒性を適切に評価するためには、ヒトサンプルを用いた検討が欠かせない状況である。しかしながら一方で、ようやくヒトサンプルを薬物動態のスクリーニングに用いる状況にはなってきたが、まだ利用できる量が限られており、さらには高価であることから、薬物候補化合物が多いような創薬研究の初期段階において大量にスクリーニングをかけることができるほど量的にも金銭的にも供給が困難な状況にある。もし、ヒト ES 細胞由来肝細胞が、一般に提供できるようになれば、事実上無限に同じ遺伝子背景を持った肝臓を提供でき、さらに再現よく代謝・輸送機能を評価できる点で、非常に有用な系を提供できると考えられる。現時点では、ヒト肝細胞を用いた薬物動態・毒性評価については、まだ系統的に定量的な評価系が確立しているとはいえない状況である。よって、本プロジェクトにより創製される ES 由来肝細胞を用いた薬物動態・毒性評価を行うための準備段階として、ヒト凍結肝細胞や動物由来肝細胞を用いて多くの観点から薬物動態・毒性を評価可能な実験系を提供することを目標として、検討を行っている。さらに、他のグループよりヒト ES 細胞由来肝細胞が作出されてきた折に、ヒト肝細胞と比較してどの程度の代謝・輸送能を有しているかを定量的に判断するための方法論を構築することを目的として、発現量の定量方法の確立や、個々の代謝酵素・トランスポーターの機能評価法の標準化についても併せて検討を行った。

(2) 事業内容と目標

①動物細胞並びにヒト肝細胞を用いたコラーゲン・サンドイッチ培養法の確立ならびに胆汁排泄の評価系の構築

従来型の I 型コラーゲン dish 上で肝細胞を培養すると、極性形成の効率が悪く、胆管側に発現する薬物トランスポーターの内在水が見られるとともに、培養後わずか数時間で種々の代謝酵素・トランスポーターの発現量が劇的に低下することから、特に胆汁排出を評価するための系としては利用できないとされてきた。一方で近年、肝細胞をコラーゲンやマトリゲルなど種々の細胞外マトリックス成分ではさんで培養するサンドイッチ培養法を用いることで、肝細胞の極性が効率よく形成されるとともに、トランスポーターなど異物解毒に関与するタンパク質の発現量が培養後数日の単位で肝細胞単離直後のレベルで維持されることが報告されていることから、まず入手が容易であるコラーゲンを用いて単離したラット肝細胞を用いてサンドイッチ培養の実験系を立ち上げるとともに、種々の化合物の胆汁排泄を定量的な評価を行った。また、薬物の胆汁排泄過程には複数のトランスポーターが関与することが明らかとされているが、それぞれの基質認識性がオーバーラップしているために、1つの薬物が複数のトランスポーターの基質となる事例が報告されており、個々の薬物についてそれぞれの排出トランスポーターが胆汁排泄全体に占める寄与率を明らかにするための方法論の構築の検討を行った。その実現のために、MDR1, MRP2, BCRP といった代表的な薬物の排泄トランスポーターの輸送を選択的に阻害できる薬物の探索ならびに濃度条件の最適化を試みた。さらに、胆汁排泄クリアランスについて、サンドイッチ培養系から求められた bile pocket への薬物の移行を medium 中濃度で除した *in vitro* における胆汁排泄クリアランスと、*in vivo* での動物実験から求められた胆汁排泄クリアランスとの間の相関がどの程度あるのかについて検討を実施した。

併せて、ヒト凍結肝細胞を用いてサンドイッチ培養肝細胞の実験系を構築し、またヒト肝細胞の性質を十分に発揮できるロット選択の基準を作り、評価用の適切なロットを選択した。

②ヒト凍結肝細胞を用いたヒトにおける肝取り込み・代謝能力の評価系の確立

ヒト凍結肝細胞を用いた、ヒトにおける輸送・代謝能力の精度よい定量的な薬物動態予測を進めるに当たってどのような評価法が必要であるかについて ES 由来肝細胞が作出されたときに備えて検討を進めておくと共に、ES 由来肝細胞の薬物動態評価における性能を比較するための実験系として用いることを目的として、複数のロットのヒト肝細胞のうち、予測系の確立のために使用可能な肝細胞のロットを複数確保するためのスクリーニング作業を行った。過去の検討から、ヒト凍結肝細胞は輸送活性についてロット間のばらつきが非常に大きいことが知られており、購入可能なロットのうち 30%程度でしか取り込み能力が保持されていないことが経験的に分かっている。従って、ヒト肝細胞を用いて輸送・代謝活性を評価する際には複数の活性が良好なロットを用いることが必要とされる。そのため、多数のロットの肝細胞を購入し、OATP(organic anion transporting polypeptide)ファミリートランスポーターの代表的な基質である Estradiol-17 β -glucuronide (E₂17 β -G)および NTCP(Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide)の基質である taurocholate を用いて、取り込み活性をスクリーニングして、輸送活性の良好なロットを確保し今後の計画を円滑に進めることを目的として検討を行った。

③肝細胞と腎スライスを同時に用いた薬物の肝腎振り分けの予測系の確立

薬物は、主に肝臓からの代謝・胆汁排泄、腎臓からの尿中排泄の 2 ルートから消失を受ける。

例えば高齢者において腎機能の低下が見受けられるが、薬物の肝腎振り分け率によって、同レベルの腎機能低下患者においても薬物の体内全体からの消失効率の低下割合は異なってくる。従って、肝腎振り分けの予測は、肝機能・腎機能低下時の薬物動態の変動を理解する上で必要な情報の1つである。一方、薬物の消失には種差があることから、ヒトにおける肝腎振り分け率の予測が可能な方法論を確立していくことが必須であるといえる。まず前段階として、ラット肝細胞とラット腎スライスを用いて肝クリアランス・腎クリアランスならびに肝腎振り分け率を見積もり、*in vivo* における実際の振り分け率の結果と付き合わせることで予測の妥当性について評価した。さらにヒトにおいても、ヒト凍結肝細胞およびヒト腎スライスを用いて同様の検討を行うことで、ヒトにおける腎クリアランス・肝クリアランス(=腎外クリアランス)、肝腎振り分け率の見積もりを試み、実測の値と比較した。

④ヒト肝細胞を用いた肝取り込み過程における個々のトランスポーターの寄与率の解析

個々の取込みトランスポーターが、ある薬物の肝取り込みクリアランス全体に占める寄与率を推測することは、個々の分子の様々な要因(遺伝子変異、病態、薬物間相互作用など)による機能変動が起きた際に、薬物動態全体に与える影響を予測する上で必須の情報となりうる。また、特に種々のアニオン性薬物の肝取り込み輸送を担うトランスポーターOATPファミリーについては、げっ歯類とヒトとの間で遺伝的な対応が見つからないことが知られており、ヒトにおける予測を進めるためにはヒトサンプルを用いた解析が必須である。そこで本研究では、本プロジェクトからヒトES細胞由来肝細胞が作出されたときに備えて、ヒト凍結肝細胞を用いてヒトにおける薬物の肝取り込みに関与するトランスポーターの寄与率を見積もるための方法論を複数考案しており、これらを用いて種々の薬物について検討を進め、解析事例を集積させることを目的として検討を行った。

⑤ES細胞由来肝細胞のより定量的な性能評価のための代謝酵素・トランスポーター遺伝子のmRNA発現量の測定法の標準化および性能評価の支援

各グループによって作製されたES細胞由来分化肝細胞について、創薬スクリーニングに利用するにあたって、通常の肝細胞と比較して性能が十分に維持されているかについて適切に定量的に評価を進めるために、異物解毒に関与する代謝酵素・トランスポーターのmRNAならびに蛋白の発現量を定量化するための標準的な方法論を確立した。このことによって、複数の施設で同じ方法を用いて評価することで、相互比較ができるデータが取れるように考慮した。また、通常の肝細胞における発現レベルとの比較を通じて、どの程度創薬に対して汎用性のある細胞が構築されているかについて、評価を実施した。

⑥肝細胞を含む動物・ヒト組織サンプルや動物・ヒト遺伝子発現系を併用した結果をもとにした、動物・ヒト全身の薬物の体内動態を予測可能な数理モデルの構築法に関する検討

In vitro 実験において得られた各種速度論パラメータを元にして、最終的には *in vivo* における薬物動態や臓器分布を明らかにすることが創薬過程においては望まれている。従って、ES細胞由来肝細胞が完成したときに、どのようにして薬物動態の予測を全身レベルに持っていかを事前に検討しておくために、適切な全身の薬物動態をシミュレーション可能な生理学的薬物速度論モデ

ルを構築し、in vitro 実験のパラメータをその数理モデルにいかにして組み込むかについて検討を進めた。

⑦肝細胞を用いた薬物間相互作用の予測のための方法論確立および検証(ラット in vivo 実験ならびに in vitro 実験の結果に基づく)

トランスポーターを介した薬物間相互作用に関して、臨床試験などを通じて事例が集積しつつある。取り込み及び排泄トランスポーターの阻害は、血漿中・臓器中濃度の変動に対してそれぞれ異なった影響を与える。さらに、1つの阻害剤が両方のトランスポーターを同時に阻害するケースも考えられる。そこで本研究では、将来 ES 細胞由来肝細胞が創薬に使えるレベルの細胞として成熟したときを見越して、in vitro 実験系の結果から in vivo における血漿中・臓器中濃度の変動を定量的に予測することを目的とした検討を実施した。

(3)研究成果

①動物細胞並びにヒト肝細胞を用いたコラーゲン・サンドイッチ培養法の確立ならびに胆汁排泄の評価系の構築

ラット肝細胞を用いて、ゲルの厚さ、種類、培養時間など非常に多くの項目にわたって検討を行ったところ、下層には I 型コラーゲンが precoat された dish、上層にはマトリゲルをかぶせた培養フォーマットが最も胆汁排泄の評価には適していることが示された。位相差顕微鏡による観察の結果、培養を初めてマトリゲルをかぶせた後、経時的に線状の胆管腔 (bile pocket) の構築が進み、培養後 4 日目に最適な状態となった。さらに、薬物排出トランスポーター Mrp2 (multidrug resistance associate protein 2) の蛍光基質である CDF (carboxydifluorescein) のエステル体 (CDF-DA (diacetate)) を用いて、蛍光により胆管腔の形成、トランスポーターの機能を可視化して評価した。その結果、培養後 4 日目をピークにして、胆管腔への CDF の集積が認められ、本実験系が胆汁排泄トランスポーターの機能を評価するうえで有用な系となることが示された。さらに、 Ca^{2+} の非存在下で胆管腔の tight junction が開放される性質を利用して、 Ca^{2+} の有無の条件下でそれぞれ dish 上の細胞への化合物の蓄積の差分をとることで、経時的に胆管腔中に排出された化合物を定量することができる。我々は、薬物トランスポーターの基質の放射標識化合物を利用して、各種薬物の胆管腔中への排出を観察することに成功した。さらに、薬物の胆汁排泄過程における個々のトランスポーターの寄与率の評価法の構築へ向けて、個々のトランスポーターの選択的阻害剤・選択的基質を用いて検討を行った。その結果、Mdr1 (multidrug resistance 1), Bcrp (breast cancer resistance protein) については、verapamil, Ko143 がそれぞれ選択的阻害剤として用いることが示唆される結果を得た。さらに、それらを用いて rosuvastatin の胆管腔中への排出を評価したところ、Ko143 の共存により排出は約半分程度まで阻害された一方で、verapamil では阻害されなかったことから、rosuvastatin の胆汁排泄には、Bcrp は約半分程度関与するのに対して、Mdr1 はほとんど関与しないことが示唆された。この結果は、過去の動物実験の結果と矛盾せず、この系で、胆汁排泄トランスポーターの寄与率の評価が可能であることが示唆された。

さらに7化合物について、ラット in vivo における血中濃度基準の胆汁排泄クリアランスを求め、一方で、ラット肝細胞サンドイッチ培養系を用いて、胆管腔中に排出される薬物の速度を medium 中

の薬物濃度で除した値を *in vitro* における胆汁排泄固有クリアランスとして計算し、蛋白結合率や肝血流を考慮して well-stirred model の式に当てはめることにより、予測される胆汁排泄クリアランスを見積もった。その結果、7化合物について予測値と実測値の間には、比較的良好な相関が見られたが、その傾きを見ると、*in vitro* からの予測値が、実測値の約 1/10 程度の値を示していた。次にこの原因の1つとして、これら化合物の胆汁排泄が、肝取り込み過程が律速となっており、かつサンドイッチ培養系において取り込みトランスポーターの発現量が低下している可能性を考え、培養時間依存的な取り込みクリアランスの低下を各化合物で観察したところ、いずれの化合物においても取り込みクリアランスが大きく低下することが明らかとなった。さらに、培養後 5 時間後の *in vitro* 取り込みクリアランスをもとに *in vivo* 胆汁排泄クリアランスを予測したところ、1:1 の相関関係が比較的良好に観察され、取り込み過程が胆汁排泄クリアランス全体の律速段階になっており、短時間培養によっては取り込みトランスポーターの機能が維持されているがために相関が良好に見られたと考えられた。一方、サンドイッチ培養において胆管腔の形成が見られる4日後の肝細胞における取り込みクリアランスは短時間培養後の取り込みクリアランスと比較していずれの化合物においても低下しており、*in vivo* 胆汁排泄クリアランスの実測値より予測値が小さな値となることが示された。従って、胆管側膜の排出トランスポーターの機能を見るためには有用な系であるが、胆汁排泄過程全体を *in vivo* と同じ状況で比較しようとする場合には、取り込みトランスポーターの発現量低下を抑制できる何らかの手段をとる必要があることが示唆された。

また、ヒト凍結肝細胞を用いて同様の実験を行い、taurocholate や rosuvastatin の経時的な胆管腔への排出を観察することができた。そのことをうけ、ヒト肝細胞を用いたサンドイッチ培養肝細胞の検討ならびにロットチェックを行った。代表的な有機アニオントランスポーターの基質である taurocholate, estradiol-17 β -glucuronide の輸送を測定しており、その結果、サンドイッチ培養肝細胞として、胆汁排泄の解析にたえる肝細胞のロットを見つけ出すことに成功し、今後のさらなる解析のために、この肝細胞を一定数入手することができた。さらに、ヒト肝細胞を用いてラット肝細胞で行ったものと同様に MDR1, MRP2, BCRP の寄与率を阻害剤による阻害率で算定することを試みたが、BCRP の選択的阻害剤としてラットでは有効であった Ko143 が、ヒト肝細胞においてはあまり明確な阻害効果が見られなかったことから、Ko143 の肝細胞内における代謝安定性や BCRP 選択的基質として用いている rosuvastatin が不適切であるのかなど、今後詳細な検討を通じて、ヒト肝細胞において胆汁排泄に関与するトランスポーターを同定する方法論を構築していく必要があると認められた。

②ヒト凍結肝細胞を用いたヒトにおける肝取り込み・代謝能力の評価系の確立

現在、ヒト肝細胞を購入可能な4業者から 30 ロット程度について、E₂17・G, taurocholate それぞれの輸送活性について評価をした。その結果、ロット間でそれぞれの取込み活性にはいずれも数十倍程度の差が観察された。さらに、E₂17・G の輸送活性と taurocholate の輸送活性をそれぞれグラフの縦軸・横軸にプロットすると、一定の相関が見られた。これらは共に輸送するトランスポーターが異なることから、ヒト肝細胞において見られているロット間差は、個々のトランスポーターの機能の個体差というよりは、むしろ肝細胞自身の持つ輸送能力の差に起因する(intact hepatocyte theory に基づく)可能性が推察された。また、各肝細胞を取り扱う業者が公表している

代謝酵素(CYP)の酵素活性とトランスポーターにおける輸送活性に関して相関を調べたところ、有意な相関は見られなかったことから、トランスポーターと代謝酵素の機能維持については、別のファクターが関与していることが推察された。従って、目的に応じて評価したいタンパク質の輸送・代謝活性のよいロットをあらかじめスクリーニングしておいて、適切なロットだけを用いてヒトにおける代謝・輸送活性を評価することに一定の意味があることが示唆された。また今回の検討から、今後輸送活性を測定するのに適切な肝取り込み活性を有するロットを 7 ロット選択することができた。

③肝細胞と腎スライスを同時に用いた薬物の肝腎振り分けの予測系の確立

本検討では、in vivo において直接胆汁排泄と尿排泄が同時に測定可能であるラットを用いて、ラット肝細胞とラット腎スライスを用いて、主に代謝をあまり受けず胆汁排泄もしくは腎排泄を受ける薬物群を中心として取り込み活性について検討を行った。また、各種薬物の取り込みクリアランスから、薬物速度論に基づいてラットにおける臓器血流速度・蛋白非結合型分率などを考慮して in vivo における予測される肝・腎クリアランスを計算により求め、さらにその比として肝腎振り分け率を見積もった。一方でラット in vivo において実際の薬物排泄の胆汁排泄クリアランスと腎クリアランスの比較を行ったところ、肝クリアランスについては、ほぼ1:1の良好な相関性が認められたのに対して、腎クリアランスについては、分泌クリアランス基準での比較では、約 10 倍程度 in vivo のクリアランスが大きいという結果を得たが、相関性としては非常に良好であった。さらに、肝腎振り分け率について比較を行ったところ、両者の間に非常に良好な相関性を認めることができたことから、in vitro 実験の系から肝クリアランス・腎クリアランスならびに肝腎振り分けの予測が可能であることが示された。同様の実験をヒト凍結肝細胞およびヒト腎スライスを用いて検討しているが、ラットで行ったときと同様に、比較的良好的な相関関係が見られており、創薬初期段階における予測精度はクリアしていると考えている。

④ヒト肝細胞を用いた肝取り込み過程における個々のトランスポーターの寄与率の解析

肝取り込みトランスポーターの寄与率の評価については、

1)トランスポーター選択的基質(cholecystokinin octapeptide: OATP1B3 選択的基質など)について、それらの輸送活性をヒト肝細胞ならびにトランスポーター遺伝子発現系を用いて、それぞれ輸送活性比を測定し、一方で、試験化合物の輸送活性を遺伝子発現系を用いて測定し、先の比に乗じることで、肝細胞における各トランスポーターを介した試験化合物の取り込みクリアランスを算定する。

2)トランスポーター選択的阻害剤(estrone-3-sulfate: OATP1B1 選択的阻害剤など)を用いて、ヒト肝細胞における試験化合物の取り込み活性を阻害剤存在下・非存在下で比較することで寄与率を検討する。

3)Western blot 法を用いて、各トランスポーターの発現量を、ヒト肝細胞ならびにトランスポーター遺伝子発現系を用いて相対的な比を算出し、トランスポーター発現系を用いた試験化合物の輸送活性と乗じることで、1)と同様に寄与率を算定する。

の 3 つの方法論が使いうるが、各トランスポーターの肝取り込み全体に占める寄与率の算定を多くの薬物間で比較することによって、実例を増やし評価の妥当性を検討するために、angiotensin II

受容体拮抗薬である olmesartan, 肺動脈性高血圧症治療薬 bosentan についてそれぞれ検討を行い、両化合物とも OATP1B1, OATP1B3 の寄与率はほぼ同等であることを示した。この結果は、過去に報告をしている telmisartan が、OATP1B3 により主に取り込まれることを考えると、同じ薬理カテゴリーに属する薬物であり、共に未変化体で排泄され肝臓に集積するという共に同じ性質を有する薬物であっても、その分子機構は異なる可能性が考えられ興味深い結果であると考えており、このような評価系により個々の分子が薬物動態に与える影響の相対的な寄与を定量的に決める上で有用であることが考えられた。

⑤ES 細胞由来肝細胞のより定量的な性能評価のための代謝酵素・トランスポーター遺伝子の mRNA 発現量の測定法の標準化および性能評価の支援

定量的 PCR を用いた CYP3A4, OATP1B1, OATP1B3 の mRNA 定量法の標準化プロトコールを作成し、各分化細胞を扱っている組織に対して、標準とする肝細胞およびプロトコールの供給をできる体制を整えた。また、複数の肝細胞における CYP3A4, OATP1B1, OATP1B3 の mRNA 発現量についても測定を行ない、測定の再現性についても良好にあることを確認した。またさらに、現在、蛋白量についても Western blot 法で定量するためのプロトコールを作製した。これらに基づき、実際に幹細胞創薬研究所ならびに熊本大学には、標準となる肝細胞サンプル、測定方法に関する情報を公開している。また幹細胞創薬研究所の細胞については、当研究室でうけいれ、ヒト肝細胞との発現・機能比較を実施した。その結果、CYP や取り込みトランスポーターの発現量は著しくヒト肝細胞と比較して極微量か検出限界を切っていた。さらに、活性で評価するために、OATP 類の典型的な基質を用いた輸送活性や、蛍光基質を用いた CYP3A4 の活性を評価したが、いずれもヒト肝細胞と比較すると、著しく低下しており、さらなるヒト ES 細胞由来肝細胞の性能向上へ向けて頑張っていく必要があると考えられた。

⑥肝細胞を含む動物・ヒト組織サンプルや動物・ヒト遺伝子発現系を併用した結果をもとにした、動物・ヒト全身の薬物の体内動態を予測可能な数理モデルの構築法に関する検討

まず、HMG-CoA 還元酵素阻害薬の1つで、肝臓において代謝をほとんど受けず主に未変化体の胆汁排泄によって消失し、さらにその肝取り込み・排泄過程にいずれもトランスポーターの関与が認められているプラバスタチンをモデル基質として用い、まずはラットにおける薬物動態の予測が可能であるかどうか検討を行った。その結果、適切な数理モデルに *in vitro* 実験から得られたパラメータを適切な補正係数(*scaling factor*)を乗じることで代入してシミュレーションを試みることが出来た。また、プラバスタチンの投与量依存的なラットにおける血漿中濃度推移および胆汁排泄量の実測値の変化を数理モデルにより良好に再現することが出来、本数理モデルに基づき、プラバスタチンの肝クリアランスの飽和が良好に予測できることが実証できた。次にヒトにおいても、ヒト肝細胞やヒト胆管側膜ベシクルを *in vitro* 実験系として用いることで *in vivo* ヒト薬物動態の予測を試みた。その結果、ラットと同一のモデルを用いてパラメータだけを *in vitro* 実験の結果に基づき変化させたと、経口・静脈内投与されたプラバスタチンの血中濃度推移を良好に再現することが出来た。また、そのモデルを用いて、肝取り込み・排泄トランスポーターの機能がそれぞれ変動した場合に、副作用(筋毒性)と関係する血中曝露および効果(HMG-CoA 還元酵素の阻害)と関

係し実測が *in vivo* では不可能な肝臓内濃度がどのように変動するかについて、シミュレーションを試みた。その結果、取り込みクリアランスの低下は、血漿中濃度の上昇を招くが、肝臓内濃度は血漿中濃度の上昇よりは比較的寛容であることが示された。一方で、胆汁排泄クリアランスの低下は、血漿中濃度にはあまり大きな影響は及ぼさないものの、肝臓内濃度は著しく上昇することが示された。このことは、過去臨床研究において、プラバスタチンの肝取り込みに寄与する OATP1B1 の機能低下を引き起こす遺伝子変異(V174A)を保有するヒトにおいて、血漿中濃度が有意に上昇するものの、コレステロール低下効果としては、あまり遺伝子多型による差が見られていないことと矛盾しない結果といえる。

⑦肝細胞を用いた薬物間相互作用の予測のための方法論確立および検証(ラット *in vivo* 実験ならびに *in vitro* 実験の結果に基づく)

本研究では、将来 ES 細胞由来肝細胞が創薬に使えるレベルの細胞として成熟したときを見越して、*in vitro* 実験系の結果から *in vivo* における血漿中・臓器中濃度の変動を定量的に予測することを目的として、ラットを用いて、pravastatin を門脈内投与後の体内動態に対する rifampicin、cyclosporin A、probenecid の併用投与の影響を検討した。いずれも高投与量条件下では pravastatin の肝濃縮率を低下させ、rifampicin は肝臓内濃度基準の胆汁排泄クリアランスも低下させた。一方で、肝取り込み・胆汁排泄の各過程を反映する *in vitro* 実験系として、ラット遊離肝細胞・胆管側膜ベシクルを用いた輸送実験により阻害定数を算出し、肝臓内の阻害剤血中濃度の予測値より見積もった結果、rifampicin、probenecid で阻害した場合、pravastatin の門脈内投与後クリアランス、肝濃縮率、肝臓中濃度基準の胆汁排泄クリアランスの変動は定量的に予測できた。Cyclosporin A については、阻害剤の蛋白非結合型濃度に基づく予測は、実際の阻害程度より小さく、蛋白結合型の阻害剤もトランスポーターの阻害に関わる可能性が考えられた。また、遊離肝細胞を用いて見積もった阻害剤の蛋白非結合型薬物の肝濃縮率と血中蛋白非結合型薬物濃度の情報から、阻害剤の肝臓中非結合型濃度を予測できることが示唆される結果も得た。

⑧代謝酵素・トランスポーターが同時に体内からの薬物消失に関わる場合の各分子の相対的重要性を評価するための実験系の確立

これまでは、トランスポーターもしくは代謝酵素単独による消失を受ける薬物に関する予測が主であったが、一方で、代謝酵素とトランスポーターが同時に肝クリアランスに寄与する薬物も多く報告されるようになってきた。血中濃度を考える際には、もし肝取り込み過程にトランスポーターが関与する場合、速度論的な考察から、代謝酵素とトランスポーターの両方が消失に関与する場合であっても、取り込みトランスポーターによる輸送過程が律速段階となっているケースが多く、この場合、取り込みトランスポーターによる輸送能力が肝クリアランスを決定すると考えられる。このことを実証するために、2種類の非代謝性スタチンおよび2種類の代謝性スタチンについて *in vitro* 実験で代謝クリアランスならびに肝取り込みクリアランスを見積もる実験を肝ミクロソームならびに肝細胞を用いて実施すると共に、*in vivo* における肝クリアランスとの比較を実施したところ、理論どおり、肝取り込みクリアランスからの予測のほうが、代謝クリアランスに基づく予測より良好な予測が成立することが明らかとなった。このことから、ヒト肝細胞における取り込みクリアランスの予測

法が、複合的な消失経路を持つ薬物の肝クリアランス予測にも有効であることが示唆された。

(4) 目標の達成度と意義

①～⑧すべての項目について、いずれも当初の目標を達成するものであり、今後 ES 由来肝細胞が作出されてきたときに、順次ヒト肝細胞を用いた実験の結果と比較して、どの程度異物解毒関連遺伝子の発現が維持されており、また、異物解毒機能の面から見て使用に耐える性能を有しているかについて明確な答えを出しうる程度に、複数の面から評価できる実験系の構築に成功してきた。本研究で得られた成果は、いずれもヒトないし動物由来の肝細胞を用いて薬物動態を様々な角度から評価するための複数の方法論の確立であり、ヒト ES 細胞由来肝細胞が正常な肝細胞と同等の性質を有するならば、理論的には同じ実験系・評価方法を用いることで、本プロジェクトの趣旨であるヒト ES 細胞由来肝細胞を用いた創薬支援ツールの開発に直結すると考えている。創薬研究には、一般的に莫大な費用と年月がかかることから、開発の初期段階で市場に出せる薬物を的確に見分けるための方法論が切望されている。本成果は、ヒト由来細胞を用いた定量的な予測系を提案することで、種差を超えて直接ヒトにおける体内動態の予測へとつながるものであり、この成果を元にしたスクリーニング系により創薬の効率化が進めば、経済的な面から見ても中長期的な波及効果は大きいものになると予想している。

特許に関しては、現在の成果だけでは不十分であるが、今後我々の実験系にヒト ES 由来肝細胞を搭載して良好な予測が成立するとすれば、実験系だけでなく定量的な評価方法(必要があればそれを実現するためのソフトウェア)まで含めて1つの創薬支援ツールボックスとしてパッケージ化することにより特許化することができると予想される。論文発表については、現在上記の成果についていずれも積極的に論文公表しており、また、学会においては既に発表を行ったものも含め、今後も広く国内外の関係学会で発表を行い、大学や会社の創薬研究者との議論を重ねることにより最適なかつニーズのある実験系の提案を続けて行きたいと考えている。

IV. 実用化の見通しについて

1. 実用化の見通し

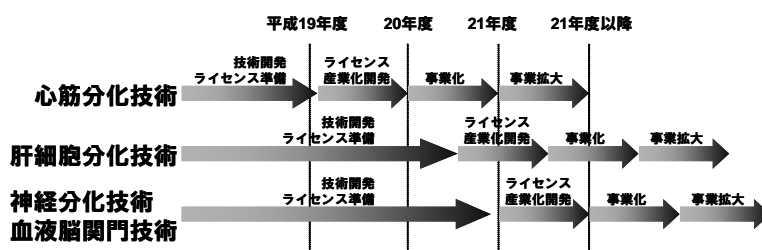
本プロジェクトでは、ヒトES細胞を用いた創薬基盤技術の開発を目的としており、得られた研究成果に関しては、医薬品メーカーおよび創薬受託試験を手がける企業にライセンスアウトすることで実用化・事業化することを目指している。

具体的なライセンスアウト先の候補としては、本委託事業に採択された後、幹細胞創薬研究所に権利譲渡を行ったアステラス製薬株式会社、田辺製薬株式会社、株式会社リプロセルが有力である。アステラス製薬株式会社、田辺製薬株式会社は、日本有数の大手医薬品メーカーであり、本プロジェクトの研究成果を自社内の創薬開発技術として実用化することにより、「安全」かつ「薬効の高い」新薬を「迅速」かつ「低コスト」で開発することが可能になると考えられる。また、日本を代表する医薬品メーカーが本新規技術を先行導入することで、我が国の医薬品業界全体への波及効果を見込むことができる。一方、株式会社リプロセルは京都大学・東京大学との共同研究契約に立脚して発足した産学連携バイオベンチャーである。リプロセル社は、本プロジェクトの研究成果を、「ES細胞を用いた新規創薬受託試験ビジネス」という形で事業化し、我が国の医薬品メーカー全体の創薬開発に大きく貢献すると考えられる。

本プロジェクトの具体的な事業化項目とスケジュールを以下に示す。

- 1、 ES細胞由来の心筋細胞を用いた毒性試験(QT延長):平成20-21年度事業化
- 2、 ES細胞由来の肝細胞を用いた代謝毒性試験:平成21-22年度事業化
- 3、 神経疾患モデル細胞および血液脳関門モデルによるスクリーニング:平成22-23年度事業化

技術の進捗により事業化のタイミングは異なるが、心筋毒性試験は平成20-21年度、肝細胞代謝毒性試験は平成21-22年度に事業化を見込んでいる。また、その他の事業に関しても、本プロジェクト終了後の平成22年度および平成23年度には事業化するスケジュールで開発を進めている。



事業化のタイムフレーム

(1)ES細胞由来の心筋細胞を用いた毒性試験(QT延長)

①事業化の進捗状況

本プロジェクトは平成 17 年からスタートし、当初はヒトES細胞に性質が類似したカニクイザルES細胞を用いて研究開発を進めてきた。それと同時に、ヒトES細胞の使用許可申請の手続きを進め、平成 18 年 10 月に文部科学大臣の確認を経て、ヒトES細胞の使用が可能となった。

サルES細胞から心筋細胞への分化誘導技術に関しては、平成 17-18 年の2年間で大きな進捗が見られ、平成 19 年度に、創薬における副作用試験のひとつである QT 延長試験に使用するための心筋細胞分化技術のライセンスアウトが可能となった。平成 19 年度上半期にはライセンスを希望する企業に対してライセンスの供与を行う予定であり、すでに株式会社リプロセルへのライセンスが決まっている。リプロセル社では平成 20 年 4 月には、サルES細胞を用いた QT 延長の受託事業を開始する予定である。幹細胞創薬研究所としては、プロトコルの作成および細胞株の譲渡等を含め積極的に技術供与を行い、ライセンス先企業の速やかな実用化・事業化を促進する。

更に、アステラス製薬株式会社、田辺製薬株式会社等の医薬品メーカーにおける実用化に関しても、積極的に推進する。

現在開発中のヒト ES 細胞を用いた心筋細胞への分化誘導技術に関しても、上記と同様の方式でライセンスを行い、事業化につなげていきたい。

②市場ニーズ

本技術のニーズは極めて高いと考えている。近年、新薬創製の研究開発費が増大している一方で、新薬承認件数の減少等により、創薬に関わる企業負担と開発リスクが増大している。そのため、製薬企業では新薬創製の各段階で効率的な方法論を積極的に導入し、膨大な候補化合物から新薬の種を見つけ出しているが、初期試験を合格する候補化合物は、臨床試験に移行する以前に実施する動物実験等のキャパシティに比して多く、開発プロセスの早期での開発候補品の簡便な絞り込みが重要であると考えられるようになってきている。しかしながら、早期に候補化合物を絞り込むための指標不足という課題にも直面している。そこで、新薬候補化合物の絞り込みには主たる薬効によるものの他、創薬後期に開発中止となる可能性のある化合物をできるだけ早期に切り捨てられるかに注目し、早期安全性も重要な判定基準となると考えられるようになってきている。

新薬の安全性の判定には、いくつか重要な項目があるが、その一つが心電図における QT 間隔の延長である。QT 延長は、過去 20 年間で米国で販売中止となった 25 薬剤のうちの 5 つの原因とされ、現在最も克服しなくてはならない副作用の一つであると考えられている。

現在、早期に QT 延長のリスクを排除するために、hERG 試験と呼ばれる試験法が広く適用されている。これは QT 延長に関わる多くの既知の薬剤が hERG(human ether-a-go-go related gene)チャンネルに結合してその活性を抑制することに起因するということが明らかになってきたからである。そこで hERG チャンネルを HEK293 細胞等の哺乳類培養細胞に発現させたものを用いることで簡便な試験法が開発された。しかしながら、それで完全に QT 延長の危険性を排除できるかといえば必ずしもそうではない。QT 延長をひきおこす化合物が必ずしも hERG チャンネルを介

するとは限らないためである。また、強制発現細胞を用いることで、感受性を上げているが、その感受性の高さ故に有望被検化合物がこの評価系で偽陽性となり開発から外れてしまうこともある。また、この細胞は拍動能を有していない。

このような組換え細胞に対して実験動物から摘出した心臓組織をもちいて評価するという方法もあるが、ヒトやヒトに近縁の動物種から安定した心臓や心臓由来の細胞が得られず処理能力は格段に下がるだけでなく、調製ロット差が試験ごとに発生するという問題もあり、化合物当たりの試験例数に乏しい開発早期に使用するだけの適合性に乏しい。

そこで、ヒトと同じ霊長類のサル ES 細胞から分化した拍動心筋細胞を用いて、実際に細胞外電位を測定することで心電図様のシグナルを得、QT 延長を測定することで、hERG 試験法や動物からの摘出組織の成績を上回ることができ、臨床試験への高い外挿性が期待できると考えられる。本プロジェクトにより、世界で初めて ES 細胞技術を用いた創薬試験への実用化・事業化が達成される。

新薬承認審査の基準を国際的に統一し、医薬品の特性を検討するための非臨床試験・臨床試験の実施方法やルール、提出書類のフォーマットなどを標準化することにより、製薬企業による各種試験の不必要な繰り返しを防いで医薬品開発・承認申請の非効率を減らす日米 EU 医薬品規制調和国際会議である ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) の提唱するヒト薬品の再分極過程に関連した頻脈性心室不整脈評価に関する非臨床試験ガイドラインにおける in vitro 試験で、医薬品開発早期に QT 延長の可能性を検出できることが求められている。このような制度上の要請もあり、製薬各社は簡便さと正確さのバランスのとれた試験法の出現を強く望んでいる。

現在、年間の医薬品の開発に5兆円が投じられ、毎年 8~10%の成長ということと、安全性薬理が現在重要な位置を占めることや現在実施されている試験法のコストなどから少なくとも本試験法の市場は 500~1000 億円規模であると見積もっている。

(2)ES細胞由来の肝細胞を用いた代謝毒性試験

①事業化の進捗状況

上述のように、肝細胞への分化誘導技術の開発に関しては、スケジュールどおりに進んでおり、今年度は成熟肝細胞取得に向けて大きな成果をあげることができた。今後、更に開発を進めることで、目標である平成 21 年度には薬物の代謝・毒性試験に応用できる肝細胞を得ることができると考えている。肝細胞のアッセイ系についても同様に、構築の見通しが立つであろう平成 21 年度には、事業化を希望する企業にライセンスアウトする準備を進め、ライセンス先企業において速やかに事業展開が可能なようにサポートする。

②市場ニーズ

心筋毒性と同様に重要な肝細胞を用いた代謝・毒性試験であるが、創薬初期段階から薬効のみならず心筋細胞や肝細胞を用いて安全性・薬物動態を総合的に評価する事は有用な医薬品を効率的に創生するのに重要である。医薬品開発候補化合物の選択には、多面的な科学領域からの総合的な評価が望まれているからであり、従来型の段階評価ではない平行評価が HTS の実

用化に伴い求められている。すなわち、創薬の初期に安全性、薬物動態、物性に関する評価をすることが可能となる心筋細胞の安全性試験および肝細胞の動態・毒性試験を構築することに対する必要性の理解は深まっているが、さらに HTS に応用できる世界でも類を見ない肝細胞アッセイ系の可能性については少量で多種の化合物について評価する必要性が出てきた昨今の創薬に対応した技術構築であり、産業化に即している。

今後、「良い薬」の創生には創薬の早い段階からその時代の科学を駆使してその薬効と安全性を総合的に評価する手法が主流となっていく。医薬品開発候補化合物の評価は、多面的にかつ総合的科学的領域からのアプローチが望まれ、心筋および肝細胞の技術構築の完成は各々単独技術の創薬現場に与えるインパクトよりも大きな相乗効果も期待できる。また、肝細胞技術は試験の性質上、心筋細胞よりもさらに簡便なハイスループットアッセイが構築可能と考えられ、グローバル展開も急速であると予想しており、普及は速いと考えている。現在国内では肝細胞試験は 1000 億円以上の受託市場性を見込んでいるが、海外展開によりこの数倍以上の市場が見込まれている。

(3) 神経疾患モデル細胞および血液脳関門モデルによるスクリーニング

上述のように、神経への分化誘導技術および血液脳関門モデルの開発に関しても、スケジュールどおりに進んでおり、平成 21 年度完成を目指して研究を進めている。現在、有効な治療方法や適当なモデル系がないために効率的なスクリーニング系が存在しない中枢神経系に作用する薬剤開発あるいは中枢での動態研究は他の疾患領域と比べ創薬研究が進んでいない。しかし、ALS やアルツハイマー病をはじめ多くの疾患で苦しんでいる患者は多く、例えば ALS では 10 万人に 8~10 人といわれ治療薬のない難病であるし、アルツハイマー病(型認知症)の推定患者数は、米国で 250 万人、欧州で 150 万人、日本で 70 万人とされ、2010 年代半ばには、その患者数は 1.5 倍に増加すると予測されている。満足する治療薬に乏しいこれらの疾患の治療薬を探索する系を構築しうる本技術開発は、創薬研究では不可欠な技術となるため事業化へのハードルは低いと考えている。

(4) 我が国の医薬品業界への貢献

日本の医薬品大手の研究開発費は2003年時点で7000億円を超えたが、世界の医薬品の研究開発費は5兆円規模である。一社平均では欧米企業の3000億円に対し、日本企業は400億円前後であり、研究開発費の規模の差は歴然である。一方、医薬品開発には薬効試験や安全性試験が研究開発(企業)規模の差とは無関係に同様に課されており、開発品数を絞ろうとも、薬理試験や安全性試験の構築・維持は欧米列強と自社開発する限りは同等のコストが必要である。一方で、売上に対する研究開発費の比率は、欧米も日本の企業もほぼ同じレベルであるので、試験系の構築・維持により医薬品そのもののプロジェクト数が圧迫されている。

このような背景の中、創薬初期段階から薬効のみならず安全性・薬物動態を総合的に評価する事で、開発期間および開発コストを大幅に圧縮する新規技術の開発が望まれている。ヒト ES 細胞は、正常な状態を保ったまま、無制限に増殖でき、かつ、幅広い種類の細胞(例えば、神経、

心筋、肝、血管等)に分化する能力を有しているという点で、創薬技術において、「究極の理想」となる可能性がある。

世界的に見ても、ヒト ES 細胞の可能性に注目が集まっており、早期創薬技術を議論する世界最大の学会、Society for Biomolecular Sciences の2007年大会においても、ES 細胞の早期創薬への応用可能性が議論され、より自然な細胞で、かつ HTS 可能な ES 細胞の創薬研究応用は世界中が渴望している技術であることが確認されている。特に、サルやヒトといった霊長類 ES 細胞を用いた創薬基盤技術の一刻も早い実用化が望まれている。世界でまだ事業化に成功している例はないため、おそらく本プロジェクトの事業化が日本発の世界最初の霊長類 ES 細胞の応用事業となるであろう。

規模で劣る日本の製薬企業において、ヒト ES 細胞を用いた本創薬基盤技術は重要な競争力源泉となりうる。本プロジェクトの技術により削減できた研究開発費を新薬開発に投入することで、より多くの新薬開発が期待され、国民の健康福祉の向上に大きく貢献することになる。

1. 1 研究開発項目①「ヒトES細胞の加工技術開発」

1. 1. 1 ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発

京都大学

共同実施: 幹細胞創薬研究所

埼玉医科大学

(1) 京都大学

細胞の遺伝子を導入するという一見単純なプロセスにも関わらず遺伝子導入法(遺伝子導入試薬を含む)は未だ日進月歩に開発されている。適した遺伝子導入法が細胞ごとに異なるということ踏まえ、開発メーカーにとっては需要が期待できる細胞株を中心として開発を行っているのが現状である。京都大学では市販のリポフェクション試薬について検討を進めてきたが、これらの試薬はいずれもヒトES細胞をターゲットとして開発されたものではなく、改良の余地が大きいと言える。ヒトES細胞の扱いには独自の経験が必要であり、開発にはメーカーが独自に進めるよりは、ノウハウを持っている我々と共同して開発を進める方がはるかに効率的である。今後、ヒトES細胞の研究がより広く普及されれば、遺伝子導入はほとんど不可避の技術となり、ビジネスモデルを展開できるマーケットとして認識されていくことが期待できる。実際、今回我々がFuGENE HDを見出した際に、製造開発元であるRocheは、この成果を第46回北米細胞生物学会で発表する機会を我々に与えており、開発メーカーにとってもヒトES細胞は魅力的な対象であることは間違いない。従って、我々としては5年度、10年後ヒトES細胞での研究が大きく展開してくる時期に、その機会を十分に活用できるように、ノウハウの蓄積とさらなるレベルアップに努めていくことが重要である。

(2) 幹細胞創薬研究所

エレクトロポレーションにはBio Rad社のGene Pulser Xcellを用いているが、このアプリケーションとして、本研究によって確立された条件や試薬をパッケージにしたキットの発売が可能となる。

(3) 埼玉医科大学

本実験で得た結果により、他グループの研究を一層推進することが期待される。例えば、京都大学のグループが開発した遺伝子発現制御法並びに遺伝子ノックダウン法をヒトES細胞においてより効率良く応用するためには、それらの遺伝子発現カセットを高い効率で細胞に導入する必要があることは明白である。さらに、目的によってはレンチウイルスベクターを用いることで、薬剤選択なしでもほぼ100%の細胞で安定な遺伝子発現が得られることを示した。他テーマで開発したの分化誘導法をさらに高効率化する上で、ウイルスベクターを用いた一過性並びに安定な遺伝子導入法が必須となると考え、実際に熊本大学桑グループと連携し、肝細胞への分化誘導を増進する候補遺伝子 (HNF1 α , HNF4 α , LAP) 及び阻害する候補遺伝子 (LIP) を発現するアデノウイルスベクターをそれぞれ作製し、肝細胞誘導技術の開発に実用化された。また、ヒトiPSへの遺伝子導入効率もほぼ同等である事を示し、ヒトES細胞を用いて確立した遺伝子導入技術が、そのままヒトiPS細胞を用いた研究に実用化できるをと考えられる。

1. 1. 2 ヒトES細胞における相同組換え技術の開発

京都大学

共同実施: 幹細胞創薬研究所

埼玉医科大学

(1) 京都大学

マウスES細胞では相同組換えベクターの構築までは自前でやるものの、それ以後は外注というものがはや世界的に当たり前となってきている。ヒトES細胞においても相同組換え技術がさらに今後進歩すれば、同様な状況になっていくことが期待される。ヒトES細胞の培養にもその取り扱いに熟練した経験が必要であることを考えれば、遺伝子相同組換えを行った心筋細胞、肝細胞へ分化誘導した細胞を提供するというビジネスモデルは十分に考えることができる。

(2) 幹細胞創薬研究所

ヒトES細胞への遺伝子相同組換えを、ウイルスを使わずに再現よく行なえるのは、世界中で我々のみがつ技術だと言っても過言ではない。また、創薬研究や医療応用の見地から、ヒトES細胞への相同組換えは、多くの人が望んでいる技術である。これらのことから、独占的にヒトES細胞への相同組換え技術を有することは大きなメリットであり、我々が展開する創薬スクリーニングのアプリケーションのみならず、相同組換えによって樹立された“使いやすい”ヒトES細胞を、研究や臨床のニーズを満たした形に加工するビジネスにも応用の可能性がある。

(3) 埼玉医科大学

ウイルスベクターを用いる相同組換え法の長所として、細胞数や細胞種の影響を受けにくいことが挙げられる。すなわち、より少ない細胞数(特に分離・培養が困難な一部の幹細胞)での相同組換えや、多様な幹細胞や分化細胞への応用も比較的容易であると考えられる。実際にヒトiPSへの応用可能であることを示した。これらベクターの使い分けとして、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターは、染色体上のランダムな部位へのベクターの組み込みに対して相同組換えの割合が33%~90%と極めて高く、またES細胞での遺伝子発現量に左右されない。すなわち、どんな遺伝子座に対しても相同組換え体のスクリーニングが容易であるため、分化細胞特異的な遺伝子座にマーカー遺伝子をノックインし、分化誘導効率を可視的にモニターできる細胞の樹立や様々な遺伝子ノックアウト細胞の樹立に至適である。また、ES細胞で発現している遺伝子を標的としたモデルES細胞の創製には、プロモーターラップ法が使えるため、産生の容易なAAVベクターが向いている。レンチウイルスベクターを用いた相同組換えの応用については今後の検討課題である。

本プロジェクトで確立した『ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いた高効率なヒトES/iPS細胞への相同組換え法』のノウハウを企業にライセンスアウトし事業化を進めている最中であり、本技術を用いたビジネスモデルの構築を目指している。一方、アカデミックな機関に対しては、これらのノウハウを無償で提供し、共同研究ベースでベクターの作製を引き受けている。実際に、複数の研究室と共同研究を行い、様々なヒトES/iPS細胞のノックイン・ノックアウト細胞の樹立を進めている。

1. 1. 3 ヒトES細胞におけるRNA干渉法による遺伝子発現制御技術の開発

京都大学

細胞分化は、複数の遺伝子群が分化ステージ特異的な発現制御を受けながら進行していると考えられる。単一の遺伝子により分化方向が決定される例は、骨格筋細胞における MyoD 遺伝子などごくわずかであり、心筋細胞や血管、神経細胞などで MyoD に相当するマスター遺伝子は同定されていない。したがって、ES 細胞を恣意的に分化誘導して目的の細胞を得るためには、複数個以上の遺伝子を同時に制御できることが望ましい。

現在マウス ES 細胞において構築を進めている「誘導性ノックダウンレスキューシステム」(研究成果2. 1. 3参照)は、複数の遺伝子の発現抑制と過剰発現が分化途上の任意の段階において誘導性に行うことが可能であり、ES 細胞分化誘導においてとりうる戦術選択を飛躍的に増大させると考えられる。実際 cDNA 発現システムを用いて血管細胞の分化・多様化を制御することに成功している(Yamamizu, Blood, 2009; J Cell Biol, in press)。同システムをヒトES細胞に導入することにより、様々なヒトモデル細胞を恣意的に誘導することが可能になると考えられる。本プロジェクトが目的とする研究用モデル細胞の創製の基盤となる技術と考えられるとともに、同システムを用いた様々なヒトモデル細胞の開発が期待される。

1. 2. 1 ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発

幹細胞創薬研究所

ヒト ES 細胞から神経系細胞への効率のよい分化誘導方法が確立されると、本事業の目的である研究用モデル細胞創製の基盤技術としての利用ばかりでなく、細胞移植による再生医療研究にも寄与することができる。つまり効率の良い分化誘導技術が開発できれば、ヒト ES 細胞から分化した神経細胞を用いる再生医療研究への波及効果が考えられる。また、現在、再生医療の研究は主にマウス ES 細胞を用いているが、マウスとヒトには明らかな種間の差が存在する。細胞移植が実際に行われるまでにはまだまだ多くの課題を解決しなければならないが、種間差の問題はマウス細胞だけを用いても解決することは難しいと思われる。そのため、ヒト ES 細胞が使用できない機関においては、ヒト ES 細胞由来の神経細胞は非常に魅力的な研究対象であり、それを供給するような事業化は考える。そのことにより、異なった種間での相違点を明らかにするための比較研究が推進されることが期待できる。また、ヒト ES 細胞で確立された分化誘導技術は、そのままヒト iPS 細胞へ適応可能であることも本プロジェクトで示すことが出来た。確立された分化誘導技術のノウハウ利用し、ヒト iPS 細胞からの分化細胞の販売などを事業化することも考えられる。

ES 細胞から分化細胞への分化過程は、実際に胚で起きている発生過程を再現しているという研究報告が多々ある。よって、ヒト ES 細胞から神経系細胞への分化誘導技術を用いることで、ヒトの神経発生分化の分子機構の解明を行うような基礎研究分野において利用されることが期待される。さらにヒトの神経発生の分子機構が解明されると、その結果が分化誘導技術の更なる改善や創薬研究へのフィードバックになると予想される。

1. 2. 2 ヒトES細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発

京都大学

共同実施：幹細胞創薬研究所

(1)京都大学

心臓には、洞房結節に存在し拍動を規定している PM 細胞、PM 細胞からの電氣的刺激を伝える刺激伝導系、ポンプ機能の中心として働く心室筋細胞など多様な心筋細胞が存在しており、その特性や心機能における役割は全く異なっている。モデル心筋細胞を創製する場合にはこうした心筋の多様性を考慮し、それぞれ機能特化した心筋細胞を用意することが望ましい。研究成果 2. 2. 2にあるように、心筋ペースメーカーとしての特性を明らかにし、その特性発現に関与している遺伝子発現を制御することにより、ペースメーカーが特異的に分化誘導できる可能性を見出したことは、機能特化した有用なモデル心筋細胞の創製に重要な意義を有する。2. 1. 3. ヒト ES 細胞における RNA 干渉法による遺伝子発現制御技術の開発を中心とするヒト ES 細胞の加工技術を応用することにより、ヒト心筋ペースメーカー細胞を誘導し、不整脈誘起などに対する薬剤安全性試験に利用可能なモデル細胞の開発が期待される。iPS 細胞からの分化誘導システムの構築、

特にヒト iPS 細胞からの機能心筋細胞の誘導は、細胞治療による再生医療応用の可能性及び患者由来 iPS 細胞から誘導した疾患モデル心筋細胞の樹立の基盤技術として広く応用可能と考えられる。またサイクロスポリン A による効率的な心筋分化誘導法は、マウス ES 細胞からヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞に至るまで応用可能であること及び特許申請済みであることから心筋分化誘導の基本的アイテムとして応用・実用化が期待される。

(2) 幹細胞創薬研究所

これまでにサル ES 細胞由来の心筋細胞の細胞外電位測定と典型 3 化合物の本細胞への評価は終了している。これらの結果について希望する企業に秘密保持契約下で公開し、本技術のライセンスを希望する機関にはライセンスアウトを行う。公開した情報だけでなく、ライセンス先企業が今後の事業化のための検討に際して必要な技術供与を幹細胞創薬研究所が行い、ライセンス先の企業が幹細胞創薬研究所で確立された方法をベースに本試験法を実施できるようになることを目的とする。ライセンス先企業は、さらなる典型化合物の評価および品質管理、スケールアップの検討を実施することで創薬現場での技術評価に導入できるようになる。受託機関であれば製薬企業と共同で最終的に技術開発および事業化を実施し、製薬会社がライセンス先であれば、自社創薬に応用できるようになる。

1. 2. 3 ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発

京都大学

共同実施: 幹細胞創薬研究所

熊本大学

(1) 京都大学

肝細胞は創薬研究において中心的な役割を果たす細胞であり、新薬候補物質の体内での代謝及び薬物毒性実験などにおいて極めて重要である。ヒト肝細胞を用いて、アッセイする安定な系が現在までに存在していないことから、京都大学で技術開発を進めているヒト ES 細胞から、肝前駆細胞、そして成熟肝細胞の系を確立し提供できれば、製薬会社などにとって今までにない極めて魅力的な系となることが期待できる。ユーザーにとって、ヒト ES 細胞から成熟肝細胞を自らが調達するよりは、必要時に必要量成熟肝細胞を調達できる方が簡便であり、そのためには成熟肝細胞をコンスタントに供給できるシステムの開発が重要である。我々が樹立した MLSgt20 細胞株はそのような将来的展開を可能にする。と、同時に共培養におけるストローマ細胞が肝細胞の成熟化にどのように関わっているのを分子学的に明らかにしていくことも可能となってくる。本研究でも既に生理的応答性を持つチクローム P450 酵素活性を有するヒト肝細胞様細胞が得られているが、成熟化の分子機構を応用し、さらに本プロジェクトの人工基底膜や疑似マトリックスなどの成果を組み合わせることで、共培養を経過しない肝細胞成熟化をより効率的に行うことも可能になることが予想される。また代謝アッセイや薬物毒性実験など得られる数値データもノイズの少

ないシャープなものが期待できる。

(2) 幹細胞創薬研究所

ヒト ES 細胞の医療・創薬への応用を推し進めている Geron 社、Cellartis 社がそれぞれヒト ES 細胞由来の肝細胞を用いた安全性薬理試験を手がけ始めたように、従来ヒト由来肝細胞で問題となっていた細胞の供給量・供給時期や細胞のロット差等を解決できる手段として、ヒト ES 細胞由来の肝細胞は期待や要求が大きいものと考えられる。本プロジェクトでは、京都大学で樹立された日本人由来のヒト ES 細胞株を用いて安全性試験に利用可能な肝細胞を分化誘導させることを目指しており、日本人に投与する薬剤を調べる系を確立する意味で大変有用性の高いものを提供できるといえる。現段階で、主たる薬物代謝酵素(CYP)の発現が確認できたので、各々の酵素活性が測定可能なレベルにあれば化合物の CYP 阻害・誘導実験に供することが可能となり、安全性試験系の実用化の目処が立つと考えられる。また、これらの酵素群のプロモーターにルシフェラーゼや GFP などのレポーター遺伝子をつないだものを細胞に安定導入することにより、HTS 化することも期待できる。

最終的に薬剤応答をリアルタイムで検出する系が望ましいが、その前段階としての CYP3A4/7 発現レベルの変動を免疫染色で捉えることができた。さらに small scale での分化誘導にも成功しているため上記のようなプロモーター/レポーター細胞が構築できれば本プロジェクトで構築に成功した心筋分化促進物質 HCS システムと同様なシステムが開発できると期待される。

(3) 熊本大学

本プロジェクトでは、支持細胞を用いてヒト ES 細胞からある程度の成熟した肝細胞を創出できることを確認している。現在「ES 細胞の分化誘導方法」という題目で特許出願した。支持細胞から分泌される肝臓分化促進因子について、同定する作業を今後進めていくが、これを同定することができれば、無細胞系を用いた分化誘導技術として事業化が出来る。ヒト ES 細胞から創製した成熟肝細胞が創薬スクリーニングのモデル細胞として有用であることはもとより、このような分化促進因子は、将来再生医療への応用の可能性を秘めている。

今回開発したヒト ES 細胞の肝細胞分化誘導技術は、正常発生と似た過程を試験管内で再現させていると考えられる。今後ヒト ES 細胞から創出した肝細胞について、分化途上の細胞と終分化の細胞など、いくつか分化段階の異なる細胞を回収し、それぞれについて遺伝子プロファイルを調べることで、ヒトの肝臓の発生分化に関わる遺伝子について多くの発現情報を得ることができる。これまでのヒトの発生についての研究は、倫理的な観点から材料が手に入りにくい状況であった。ヒト ES 細胞からの分化誘導の技術開発により、発生段階に沿ったヒトの肝臓の遺伝子発現情報の蓄積が可能となる。このような発生段階に沿った遺伝子情報の蓄積が将来創薬のみでなく、医学的に有用であると期待される。

もう一つの特徴として、M15 細胞の系は、肝前駆細胞を大量に増幅させるためにきわめて有用な手法である。将来大量にかつ簡便に成熟ヒト肝細胞を培養する技術開発を進めることにより、モデル細胞として使用できる可能性が高く、きわめて有用な技術である。また、sBM を用いた方法

は「細胞の分化誘導」という題名で特許出願した(特願 2009-136520)。sBM を用いる方法は無細胞系により分化誘導できるため、肝成熟化に効果のある薬剤のスクリーニングにも使用出来ると考えられる。

1. 2. 4 分子構成を最適化した人工基底膜によるES細胞の分化誘導制御技術の開発

大阪大学

共同実施: 日本皮革研究所

本課題では、細胞ごとに最適化した分子構成の人工基底膜を構築し、ES細胞を特定の細胞系譜に分化誘導制御する技術開発を目標とした。平成 18 年度～平成 21 年度の4年間で得られた成果は、「Ⅲ. 研究成果について」に記載の通りであるが、その中から実用化・事業化につながる重要なシーズがいくつか生まれている。その一つは、組換えラミニンおよびそのフラグメントを利用したヒトES細胞用フィーダーフリー培養基材である。京都大学との共同研究により、ヒトのラミニン-332 およびラミニン-511 がヒトES細胞および iPS 細胞のフィーダーフリー培養基材として有効であることが確認されている。ヒトES細胞の現在の標準的培養法は、マウス線維芽細胞をフィーダー細胞として用いるものであり、ヒト iPS 細胞でも同様の培養方法が用いられている。しかし、高品質のフィーダー細胞を安定に確保することは容易ではなく、また安全性確保の観点からも問題がある。ヒトES/iPS 細胞のフィーダーフリー培養基材の開発は喫緊の課題である。組換えヒトラミニンおよびそのフラグメントを利用するフィーダーフリー培養基材は、この問題を解決する重要なブレークスルーである。組換えラミニンおよびそのフラグメントの大量生産に向けての技術開発が今後さらに必要であるが、数年以内に組換えラミニンおよびそのフラグメントを用いるヒトES/iPS 細胞用フィーダーフリー培養基材の実用化が可能であると考えている。

二つめのシーズは、I 型コラーゲンと IV 型コラーゲンの混成ゲルを利用した 3 次元培養基材である。コラーゲンを直接ポリスチレンプレートに被覆した 2 次元基質よりも、3 次元コラーゲンゲルを基質とした方が細胞の機能がよく維持されると報告されている。生体内環境を反映した 3 次元ゲルに対するニーズは益々高まっている。しかし、現在広く使われている I 型コラーゲンゲルは上皮系細胞に対しては有効ではなく、基底膜様活性をもつ 3 次元ゲル基材の開発が求められている。本研究で開発した I 型/IV 型コラーゲン混成ゲルは、I 型コラーゲンゲルの物理的強度と IV 型コラーゲンの基底膜分子保持活性を併せ持っており、上皮系細胞の 3 次元培養基材としては極めて有用である。I 型/IV 型コラーゲン混成ゲルおよびそれにラミニン等を組み込んだ第一世代/第二世代人工基底膜は、ヒトES細胞に限らず、様々な臓器の実質細胞や幹細胞の培養基材として高いポテンシャルを有している。幅広い細胞を対象とした 3 次元培養基材としての製品化に近い将来可能であると考えている。

三つ目のシーズは、マウス胎児の全組織にわたる基底膜の分子組成プロファイル情報である。現在収集しつつある成体組織でのプロファイル情報、特に臓器幹細胞近傍の基底膜のプロファイル情報は、幹細胞ニッチの実体解明の糸口となり、臓器幹細胞を利用する様々な再生医療の実現につながるブレークスルーとなり得る。これまでに収集されたマウス胎仔および成体マウスでの

基底膜の分子組成プロファイル情報は、それ自体をライセンス化することにより、事業化の対象となり得る。胎生 12.5 日、14.5 日、16.5 日のマウス胎仔における主要 41 種類の基底膜分子の局在情報が免疫組織染色画像としてデータベース化され、現在、インターネットで閲覧可能な状態にある。

1. 2. 5 擬似基底膜を利用したヒトES細胞の分化誘導技術の開発

環境研究所

非公開

1. 2. 6 人工基底膜、疑似マトリックスの評価

京都大学

共同実施:環境研究所

大阪大学

日本皮革研究所

事業目的と背景で述べたように、ヒトを含む霊長類ES 細胞では通常支持細胞であるフィーダー細胞を用いて維持されるが、このような支持細胞を完全に除去することは難しく、創薬スクリーニングに必要なモデル細胞への分化誘導を遅延あるいは阻害している可能性もある。またヒトES細胞を分化誘導し、その後治療に使う場合にも、フィーダー細胞なしに培養維持されたヒトES細胞を用いることが望ましい。このようにヒトES細胞をフィーダー細胞なしに培養できる技術が開発されれば、それがもたらすビジネスチャンスは非常に大きいと期待されている。

現在フィーダー細胞なしの培養として最も効果があると考えられているのは、マトリゲルである。実際、京都大学をはじめ多くの研究室でES細胞の未分化維持あるいは分化誘導に対する評価系としてマトリゲルを定期的に購入し、使用している。したがって、マトリゲルと同等の細胞外基質を見出すことができれば、これにとって代わることが期待できる。またマトリゲルには不確定成分を含まれることまた臨床的応用ができないことを踏まえると、マトリゲルほど効果がなくても、十分な効果があれば、商品として十分に成立できる。このように細胞外基質は、今後ビジネス展開が非常に期待できる分野の一つであるといえよう。

ヒトES細胞株一つ一つに個性があると考えており、ES細胞の未分化維持にあるいは分化誘導に適した人工基底膜や疑似マトリックスは若干異なる可能性もある。しかし、例えばKhES-1、KhES-2、KhES-3の内、一株だけでも強い効果が特定できれば十分商品として成立すると考えられる。第一に、培養に合わせてフィーダー細胞を用意するということから開放され、ユーザーにとって時間を節約できること、またそれに関わる人件費などの削減も可能になるからである。商品としては、溶液あるいは培養ディッシュに予めコートしたものになると思われるが、いずれのケースでも継続した消耗品として使われる、すなわちユーザーが継続的に購入することが期待される。また効果のない細胞株においては、何らかの未知の構成成分が不足していることが考えられる、それ

を見出すことで他の細胞にも十分効果のあるものが期待でき、さらなる開発を効率よく進めることが可能になる。

1. 3 研究開発項目③「研究用モデル細胞の構築技術の開発」

1. 3. 1 研究用モデル細胞の構築

1. 3. 1. 1 ヒトES細胞から神経変性疾患モデル細胞の構築

幹細胞創薬研究所

ヒト ES 細胞から創製される神経変性疾患のモデル細胞は、新薬のスクリーニングや安全性などの創薬研究の効率化のための基盤研究に使用することができる。また、本プロジェクトで構築された神経変性疾患モデルは、家族性疾患の原因遺伝子を用いているが、家族性神経変性疾患の病理と孤発性のそれには類似している点が多くあるため、家族性ばかりでなく孤発性の神経変性疾患の発症機構の解明のための基礎研究にも利用することができるなど、汎用性は非常に高いと思われる。よって、それらの研究を支援、促進させるモデル細胞またはモデル構築技術の供給を行うような実用化は考えられる。モデル細胞構築に関しては特許も申請済みであり、今後の実用化、事業化に向けて研究を進めている。

同様な展開をもって、別の神経変性疾患のモデル細胞を遺伝子発現制御技術や相同組換え技術の連携によって構築することも可能になると考えられ、今後本プロジェクトで示されるであろう成果の技術的な波及効果は大であると思われる。

1. 3. 1. 2 血液脳関門(BBB)モデルの創製

幹細胞創薬研究所

in vitro 血液脳関門モデルの実用化形態としては、製薬企業の創薬活動の効率化を図る創薬支援ツールとしての活用以外に、薬物動態受託アッセイのスタイルが考えられる。ヒト生体の BBB 機構を反映し、BBB 透過を簡便かつ精度よく評価できる in vitro システムがあれば、候補薬の脳内移行性や中枢副作用の可能性を創薬プロセスの早期段階で予見できる評価系として創薬の迅速化や成功確率の向上など医薬品開発の効率化に大きく貢献することが期待される。また BBB は、アルツハイマー病や脳卒中など様々な中枢神経疾患の発症や病態と密接に関与している。これら病態下では、BBB 機能は破綻もしくは機能低下しており、健常時とは異なる BBB 透過性を示す。in vitro で病態を再現することで、疾患の発症や病態を解析や新しい治療法の確立、罹患時における BBB 透過の評価に活用することも可能となる。こうしたニーズに応えるべく、海外ではラットなど動物由来細胞で構成された BBB モデルを用いた受託アッセイビジネス展開がいくつか認められる。また本邦でも、大学発バイオベンチャーが READY-TO-USE のラット BBB モデルキットの商品化を行う事例が見受けられるが、ヒト生体機能(ヒト BBB 特性は動物のそれとは異なることが既に知られている)を忠実に反映できるヒト型モデルの実用化例は未だ報告されていない。

ヒト ES 細胞の分化誘導によって得られる血管系細胞、神経系細胞を用いて構築される BBB モデルは、言うまでもなくヒト型(ヒト細胞で構成されたもの)であり、また材料となる ES 細胞の無限増殖性と多分化能の特長を反映した量産性、安定性、遺伝的背景の均質性など実用化上のアドバンテージが十分に期待できる。よって、ヒト ES 細胞から創製され BBB 機能を再現した BBB モデルは、安定的かつ量産性に優れた信頼度の高い評価系として、その実用化・事業化の期待度は極めて大きいと考えられる。

1. 3. 1. 3 ハイスループットスクリーニング(HTS)技術の開発

幹細胞創薬研究所

ES細胞やiPS細胞といった多能性幹細胞の心筋分化誘導技術の開発は、心臓再生医療の実現やインビトロでの心疾患薬効評価試験、あるいは薬剤安全性試験の確立の鍵を握るものである。特に、心臓に対して心不全や不整脈など重篤な副作用を引き起こす薬物が多いことから、心毒性試験に用いることのできる均一な心筋細胞の供給が求められている。これまで、ヒトES細胞を心筋細胞へ分化させる手法として、マウス由来の支持細胞であるEND2細胞との共培養や、ES細胞から胚様体を形成し、そこに数種類のサイトカインを添加する方法が報告されているが、心筋細胞へのマウス由来細胞の混入の問題や、サイトカインのコストの問題、さらに分化効率が十分でない等の理由から、再生医療や薬剤安全性試験への実用化には至っていない。

本研究での心筋分化誘導促進物質探索HTS技術の開発によって、約1万検体の化合物ライブラリのスクリーニングから心筋分化誘導促進物質として化合物Xと化合物Yが見出されており、そのうち化合物Xについては既に特許出願済、化合物Yについても物質特許を申請予定である。これらの心筋分化誘導促進物質の発見により、支持細胞を使用することなく、多能性幹細胞を心筋細胞へ分化誘導し、純粋な心筋細胞を得ることが可能となった。また、既知の方法と比較して高効率かつ低コストに心筋細胞への分化を誘導し、心筋細胞を製造することが可能となった。これらの化合物は、薬剤安全性試験として重要なQT延長試験を高速スクリーニング系で行うため、あるいは心疾患に対する薬効評価に用いる均一かつ成熟したヒト心筋細胞の大量生産や、心臓疾患などに対する移植用心筋細胞の生産に特に有用であり、これらの技術の実用化へ向けて大きな寄与をもたらすものである。

このように、本研究の開発によってもたらされたGFP蛍光変化の検出システムが活性化化合物を実際に検出できたことは、再生医療や創薬分野への応用に対し大きな意義がある。すなわち、このHTSシステムを、多能性幹細胞における特定の遺伝子発現変化を指標にした活性化化合物の検出に普遍的に応用することが考えられる。特定の遺伝子プロモーターを持ったGFP遺伝子を発現する多能性幹細胞を作製することで、心筋細胞のみならず、神経系や肝細胞等の分化系あるいは病態モデルにおいてもGFP蛍光を利用したHTSシステムを適用することが可能となり、多種の細胞・組織に関する薬効化合物を効率的に検出できる汎用的な創薬スクリーニング技術として、本研究の実用化が期待できる。

1. 3. 2 オンチップ・ヒト組織・臓器モデルを用いた毒性・創薬技術の研究開発

東京医科歯科大学

1. 細胞利用のための細胞精製技術の事業化への展開

ヘテロな集団である細胞集団を精製して再利用する技術の実用化は、細胞を利用するさまざまなバイオ産業において、必須の基礎技術となるものである。ここで重要なことは、抗体のような不可逆なバイオマーカーラベル技術ではなく、無修飾あるいは可逆修飾技術による細胞の識別を可能にすることである。

(1) 画像データによる細胞精製技術の実用化

画像処理ベースのセルソーティングによって従来の比重遠心法などでは精製が困難であった神経細胞とグリア細胞の精製、心筋細胞と線維芽細胞の精製が可能となった。従来の細胞精製技術は、蛍光標識細胞の精製あるいは散乱光の特性による細胞の精製という間接情報に頼った精製であり、このように詳細な画像データに基づいて細胞を高速に精製する技術は、いまだ業界において認知されていない。これは、細胞の画像データベースの不足に起因するものと考えられる。本プロジェクトにおいて画像データベースを充実させることで、新しい細胞画像データに基づいた細胞精製技術の業界標準を目指すことが可能と考えている。

(2) RNA/DNAアプタマーによる可逆標識技術の実用化

細胞表面に存在するさまざまなバイオマーカーを的確に識別することは、上記、画像ベースでは判別できない、より詳細な細胞の分化状態、表現型の識別をするのに有効であるが、従来の抗体の問題点は、これが不可逆な標識であることである。われわれは、細胞表面のマーカーをターゲットとしたDNAアプタマーと磁気ビーズを用いることで、特定の細胞を選択的に抽出し、抽出後にDNA分解酵素を用いることで細胞に傷をつける事無く細胞を精製する技術の開発に成功した。あとは、細胞表面の特定のバイオマーカーに特異的に結合するアプタマーを精製する技術を実現できれば、抗体に替わる普遍的細胞可逆標識、精製技術が実用できるものと期待している。

本可逆修飾の手法とコンセプトは、われわれのオリジナルであり、すでにEP特許庁からは、基本概念として特許競合無しとのサーチレポートを受け取っており成立の見込みである。

2. 細胞ベースでの心筋毒性検査技術の実用化について

製薬企業等と共同での実用化のためのさまざまな検討を開始している。すでに動物細胞ベースおよび、ヒト心筋(拍動)細胞株を用いた検討を進めており、H19年度から20年度中には実用化の可能性を判断するのに十分な技術検討が完了できるものと考えている。

3. 病理モデル臓器チップの実用化について

心筋細胞については、繊維芽細胞の機能評価を通じて、「心肥大モデル」「リエントリーモデル」の構築の可能性が大きくなってきた。また、細胞の種類や空間配置を制御することによる疾患モデルの構築の試みは、他に無く、本プロジェクトのオリジナルである。これを実用化することで、さらに再現性ある細胞ネットワークという毒性検査・創薬分野における細胞ベースでの計測の優位

性を強調することで、業界標準化技術とできることを目指す。

本課題については、特にFDAおよびICHへの提案を含めて新たな業界標準化技術となるべく海外での学会活動も活発に進めてゆく予定で、FDA および ICH に強い影響力を持った国内の著名研究者との共同研究を推進している。

1. 3. 3 ES細胞由来肝細胞を用いた創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立

東京大学

本研究の成果は、ヒトにおける薬物動態を定量的に予測できる実験系および評価方法(必要があればそれを実現するためのソフトウェア)まで含めて1つの創薬支援ツールボックスとしてパッケージ化したものとして実用化提案できるのではないかと考えられる。現時点では、動物由来の肝細胞を用いた検討やヒト凍結肝細胞を用いた薬物動態を評価する検討が始まっており、一部は定量的なレベルで *in vivo* 薬物動態を良好に説明できることが明らかとなったが、多様な化合物に関して一般化ができるレベルにまでデータの蓄積を行うには、さらなる検討が必要であると考えている。さらに、動物種差の問題や、ヒト凍結肝細胞の活性の人為的と推測されるばらつき、入手が限られていることなどを考慮すると、現時点ではヒト由来試料を使った創薬初期におけるスクリーニングは採算面から考えても不可能であると考えられる。しかしながら、もしヒト ES 細胞由来肝細胞が異物解毒に関連する一連のタンパク質の発現をある程度維持しており、我々の構築してきた実験系に利用可能であれば、ヒト ES 細胞の特性として事実上無限にヒト由来細胞を供給できる。さらには、遺伝的背景の異なるヒト ES 細胞をバンク化することができれば、もしくは ES 細胞の段階でゲノムの操作(変異導入など)をすることができれば、遺伝子多型による薬物動態の影響を直接ヒトサンプルを用いて大量にアッセイすることが可能となり、広く国内外の製薬会社の注目を集める新規実験系を提案することができると考えている。創薬研究における最も重要な問題のひとつに、ヒト臨床試験にまで到達してはじめて予期せぬことが起こり開発からドロップアウトする薬物があとを絶たないことである。この原因として、ヒトにおける薬物動態・効果・毒性を前臨床の段階で未だに定量的に予測できていないことが挙げられる。もし、創薬初期段階で大量の候補化合物についてスクリーニングをかける段階でヒト試料を大量に用いることができれば、よりいち早くヒトにおける薬物動態・薬効・毒性予測に結びつき、効率よい創薬研究が進むものと考えられる。従って、本成果の最終的な予測ツールは、製薬業界全体の創薬の方法論を根本から変えうるほどの大きな波及効果を持っており、そのことにより資金と時間をより効率よく運用した薬物開発が進むことが期待され、長期的には経済的な面や保健医療行政の面にも波及効果がでることが予想される。

2. 今後の展開

2. 1 研究開発項目①「ヒトES細胞の加工技術開発」

2. 1. 1 ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発

(1) 京都大学

京都大学ではリポフェクション試薬を用いてのヒトES細胞への遺伝子導入法の技術開発、遺伝子、加工技術開発に適したヒトES細胞株の探索、2Aによる同一プロモーターによる複数遺伝子発現制御システムの開発、あるいは導入遺伝子発現制御技術の開発などで成果を上げてきた。

今後、使いやすいサブライン、あるいはTet-On/Offシステムによる遺伝子制御などは引き続き発展させ、遺伝子導入技術に関して確立した技術となるよう向け開発を進めたい。また、ヒトES細胞の研究開発に向けて今後重要となることが予想される新しい技術の開発やその技術のさらなる向上を展開していきたい。またヒトES細胞の増殖が遅いことから、目的の安定遺伝子導入株をいかに効率よくスピーディにスケールアップしていくか、そのシステムの開発を検討していきたい。

(2) 幹細胞創薬研究所

幹細胞創薬研究所では、エレクトロポレーション法によるヒトES細胞への高効率な遺伝子導入方法を確立した。今後は、エレクトロポレーション法において、我々の開発したプロトコルが基準となることが期待される。

(3) 埼玉医科大学

平成19年度中間評価までは、多くの型のベクターを網羅的にスクリーニングすることを目的とする実験を行ってきたために、ベクターのデザインや産生法について特別な至適化は行っていなかったが、至適なベクターを決定したため、その後は、これらのベクター技術をより一層改良して、又、プロモーターなどのベクター構造をさらに至適化することにより、出来るだけ細胞を痛めずに、100%の効率で一過性もしくは安定に遺伝子を導入する技術の確立を目指した。この結果、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いることでほぼ100%の一過性遺伝子導入効率を、レンチウイルスベクターを用いることで70~80%の安定遺伝子導入効率をヒトES細胞で得た。今後は、本プロジェクトで開発された高効率遺伝子導入技術を、他の研究者が使えるように、幅広く情報提供を行なう。

2. 1. 2 ヒトES細胞における相同組換え技術の開発

(1) 京都大学

京都大学においてもヒトES細胞における相同組換え技術の開発に向けて順調に前進しているが、共同実施研究先でもある幹細胞創薬研究所あるいは埼玉医科大学では、現在までに偶然以外ではほとんど不可能と考えられていたヒトESでの相同組換えを効率よく成功しており、京都大学の方法をブラッシュアップしていくよりは、これらの相同組換え技術を導入していきたい。京都大学としては、平成18年度より始まった新たなプロジェクト(人工基底膜、疑似マトリックスの評価)に本格的に取り組んでいく必要もあり、相同組換え技術を自ら開発していくよりは、開発された技術を導入し、他のプロジェクトに有効利用していく方がプロジェクト全体の成果を上げていく方向にもつながるので、若干の軌道修正をすることにしたい。

(2) 幹細胞創薬研究所

本プロジェクトにより開発されたHPRT遺伝子座への相同組換え体は、その後の遺伝子置換を行なうことで、安定して遺伝子を発現させることができる。研究材料として従来のES細胞よりも格段に使いやすくなっていることから、今後はこの相同組換え体が、遺伝子改変用ES細胞のスタンダードとして使用されることが期待される。

(3) 埼玉医科大学

平成19年度の間評価以降は、至適化したベクター産生条件により調製した高濃度ベクターを用いて、相同組換え効率の改善を試みた。またそれと同時に、他のテーマを支援しながら、実際に相同組換えによって特定の遺伝子座 (*HB9*, *ALB*) にマーカー遺伝子を組み込んだ分化誘導アッセイ細胞の樹立に成功した。今後は、本プロジェクトで確立した技術を、企業にライセンスアウトしてビジネスモデルを構築すると同時に、アカデミアの機関に対しては無償で技術移転を行い、多くの研究機関で使用可能となる事を目指す。しかしながら、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターはその作製方法が煩雑である事が原因でこれまで一般に広く普及してこなかった。そのためベクター作製方法の簡易化を計る事も今後の課題であろう。また、ヒトES細胞を用いて本プロジェクトで確立した技術をそのままヒトiPS細胞へと応用できることが示されたため、ヒトiPS細胞を用いた遺伝子ノックアウト・ノックインや遺伝病患者由来のiPS細胞を用いた変異修復など、ウイルスベクターによる高効率相同組換え法を利用した今後の展開は様々な分野に広がるであろう。

2. 1. 3 ヒトES細胞におけるRNA干渉法による遺伝子発現制御技術の開発

京都大学

①マウスES細胞における「誘導性ノックダウン-レスキューシステム」の構築

まずマウスES細胞を用いて、ヒトES細胞に移行可能なシステムを確立する。

②ヒトES細胞における「誘導性ノックダウン-レスキューシステム」の構築

①の技術をヒトES細胞に導入し、ヒトES細胞分化途上において標的遺伝子発現の制御が可能なシステムを構築する。①の成功とともに、HPRT 遺伝子座への遺伝子導入など、本プロジェク

トにおける他の加工技術の導入を必要とする。3種類の異なる誘導性ノックダウンシステム(テトラサイクリン誘導性 shRNA 発現系、タモキシフェン誘導性 shRNA 発現系、タモキシフェン誘導性マイクロ RNA 発現系)はさまざまな組み合わせで遺伝子発現の制御を可能とすると期待される。

③ヒト ES 細胞を用いたモデル細胞の創製

②の技術を応用して、様々なヒト ES 細胞由来研究用モデル細胞を誘導する。本プロジェクトにおける分化誘導制御技術の併用・導入を必要とする。神経細胞、心筋細胞、肝細胞等いずれの細胞の誘導に対しても当該技術は有効である。

2. 2 研究開発項目②「ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発」

2. 2. 1 ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発

幹細胞創薬研究所

本事業の最終目標である神経変性疾患モデル細胞構築のために、本プロジェクトではノギンによるサルおよびヒト ES 細胞から神経幹細胞・神経前駆細胞への分化誘導及び凍結保存に成功している。さらに、神経幹細胞から運動神経細胞など各種の神経細胞への分化誘導へも成功している。今後はその系をさらにブラッシュアップさせ、実用化させるためには分化効率をさらに上げる、また大量培養法の確立も必要である。さらに、他のタイプの神経細胞、例えばコリン作動性、またはグルタミン作動性神経細胞への分化誘導法の確立を行う必要がある。

2. 2. 2 ヒトES細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発

京都大学

共同実施: 幹細胞創薬研究所

(1) 京都大学

① マウス ES 細胞における特異的ペースメーカー細胞誘導法の確立

すでに見出している転写因子(x)の発現抑制(研究成果2. 2. 2)により、実際にペースメーカー細胞が効率的に誘導されていることを明らかにする。誘導された細胞のペースメーカー細胞としての機能ならびに薬剤反応性などを検証する。さらに誘導ペースメーカーの純化法の開発を行う。

②ヒト ES 細胞における特異的ペースメーカー細胞誘導法

①の技術をヒト ES 細胞に導入し、ヒト ES 細胞からペースメーカー細胞を特異的に誘導・純化する方法を開発する。shRNA 発現システムなど本プロジェクトにおけるヒト ES 細胞加工技術の開発と導入を必要とする。

③ヒト ES 細胞を用いた効率的な心筋分化誘導法の開発

現在マウス ES 細胞において見出している高効率心筋前駆細胞・心筋細胞誘導法(研究成果2.

2. 2)をヒト ES 細胞に導入し、これまでにない高効率のヒト ES 細胞からの心筋細胞分化誘導法を開発する。

④iPS 細胞を用いた心筋分化誘導法の開発

上記ノウハウを利用してヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導法を確立する。

これらの研究により、新しい薬剤安全試験や疾患研究が可能なヒト心筋細胞モデルを開発する。

(2)幹細胞創薬研究所

現段階では拍動細胞がどの程度分化しているのか、心臓のどの部位の細胞であるのか、分化後培養日数経過に伴う影響が観察可能であるのかといったことの検討は実施していない。また、心筋分化の効率を上げる検討および、フローサイトメトリーを用いた心筋細胞や心筋前駆細胞の効率的な回収方法の検討を行う。これらの検討についてヒトおよびサル ES 細胞の両方について実施する。また、パッチクランプ法を用いた本細胞の電気生理検討を実施し、電気生理的な本細胞のプロファイリングも行う。さらに、心筋細胞の産業規模の供給をサポートする目的で、心筋分化を促進する化合物を、ハイスループット技術を用いて幹細胞創薬研究所保有 12000 検体を対象に検索した。

ヒト ESC-CMs は、長期再接着培養法や浮遊培養法を用い心機能を増強することで QT 延長試験系に使用できる適切な成体心筋モデル細胞であることが示された。さらに化合物 A を用いることで、成体心筋モデル細胞の短期間で取得が可能となった。今後、本技術を用いたスクリーニング系の開発が期待され、創薬現場にとって有用な技術となるであろう。

2. 2. 3 ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発

京都大学

共同実施：幹細胞創薬研究所

熊本大学

(1)京都大学

京都大学では肝前駆細胞から成熟肝細胞への分化誘導に対して、マウス ES 細胞からヒト ES 細胞へと展開を進めている。そのため必要となる肝臓特異的プロモーター/レポーターを導入したヒト ES 細胞株を樹立した。また共培養に用いるマウス胎児肝臓由来の間葉系の初代細胞では多量な調達は現実的には不可能であり、何らかの細胞株で置き換えることが重要課題となっている。今後これらのツールを使い、KhES-1、KhES-2、KhES-3 いずれのヒト ES 細胞株を用いても、肝前駆細胞、そして成熟肝細胞への分化誘導ができるように技術開発を進めていきたい。

(2)幹細胞創薬研究所

現在、肝細胞成熟を支持する能力をもつことが確認されたマウス胎仔肝臓由来ストローマ細胞株からクローンを 73 個分離しているので、これらの肝細胞成熟支持能を個別に確認し、さらに成

熟を促進する条件を確立する。また、細胞外マトリクスの存在下で支持細胞との共培養を行うことによりさらに生体に近い肝細胞を創出できる可能性を探る。これらを通じてヒト ES 細胞を高効率に肝細胞へ分化・成熟させる系を確立する。本分化誘導技術を用いて作出された肝細胞の薬物代謝酵素群の活性を測定し、化合物による酵素阻害・誘導の検証系の確立を目指す。

京大での解析で、マウス胎仔肝臓由来ストローマ細胞株から高い肝細胞成熟支持能を持つクローン MLSgt20 が選別できた。一方、幹細胞創薬研究所では M15 細胞との共培養、コラーゲンコート皿での肝前駆細胞の増幅、分散培養での肝機能保持細胞集団の誘導に成功しており、薬物代謝酵素 CYP3A4 の発現並びに酵素活性の薬剤による誘導を検出している。改めてこれらの誘導法を組み合わせることにより、生体肝細胞に匹敵する肝細胞をヒト ES 細胞から誘導できる可能性が開かれるものと考えられる。

(3) 熊本大学

現在、成熟度の高い肝細胞をヒト ES 細胞から創出できていることが確認できた。得られたヒト ES 細胞由来の肝細胞について幹細胞創薬研究所と連携して活性測定を行っていく予定である。さらに、ヒト ES 細胞より創出した肝細胞の遺伝子プロファイルについて、正常肝細胞と比較検証を行う。必要に応じて、より完成度の高い分化誘導の系の改良を検討する。今後 M15 細胞および sBM を組み合わせた方法により、大量かつ簡便に成熟ヒト肝細胞を分化誘導し、モデル細胞として使用できる肝細胞を創製し、創薬のためのスクリーニング系として、あるいは毒性評価系として有用であると期待される。一方、基底膜の有効成分についてさらに解析を進めることにより、肝細胞の成熟化にさらに寄与できると期待される。

2. 2. 4 分子構成を最適化した人工基底膜によるES細胞の分化誘導制御技術の開発

大阪大学

共同実施： 日本皮革研究所

分子構成をカスタマイズした人工基底膜をヒトES細胞の選択的分化誘導のための培養基材として実用化するためには、その構成部品となる各種ラミニンおよび IV 型コラーゲンの調製法をさらにもう一段スケールアップする必要がある。現在採用している浮遊高密度培養が可能な 293F 細胞を使う組換えラミニンの発現系をそのままスケールアップすることも可能であるが、コスト面からはより安価で大量調製が可能な酵母での発現系やカイコを使う発現系などを今後検討する必要がある。同様に IV 型コラーゲンの場合もどのようにスケールアップするかが今後の課題である。また、ラミニンと IV 型コラーゲンに加えて、細胞特異的に発現する他の基底膜分子を組み込んだ第二世代の人工基底膜を実用化するためには、素材として利用可能な基底膜蛋白質の種類を拡大する必要がある。また、それらの高発現系・安定供給系の構築も必要である。人工基底膜の製品化を視野に入れた場合、人工基底膜の活性を安定に保持する保存技術の開発も今後の課題である。

ES細胞の分化誘導制御や組織幹細胞の培養・維持は、培養基材の工夫だけで可能となる訳ではなく、培地に含まれる増殖因子やモルフォゲン等の液性因子の配合にも大きく依存している。培養基材の設計・開発という視点に立つとき、そのような液性因子も同時に組み込んだ培養基材の開発が今後の課題となる。事業分担者は、様々な液性因子をその活性を保持したまま基底膜やフィブロネクチンマトリックスに不溶化する新たな技術開発を進めている。この技術を人工基底膜と組み合わせることにより、増殖因子をあらかじめ組み込んだ高機能人工基底膜を実用化することも今後の研究開発の視野に入っている。

一方、基底膜分子の生体内局在情報のデータベースは、成体組織での局在情報を今後追加することによって、その情報源としての付加価値が高まり、ライセンス化した場合のニーズも高まると予想される。また、解析の対象を正常の個体だけでなく、様々な病態モデルマウスやノックアウトマウスに広げることにより、基底膜分子構成を指標とした新たな病因解析の基盤情報としての役割を持たせることも可能である。さらにヒト基底膜分子に対する抗体を整備することにより、ヒト組織を対象とした基底膜分子局在情報データベースを立ち上げることも視野に入れる必要がある。ヒトの様々な疾患における基底膜分子構成のデータベースは、新たな腫瘍マーカーの開発を含め、医薬品開発の様々な分野で利用可能な基盤情報ツールとなるであろう。

2. 2. 5 疑似基底膜を利用したヒトES細胞の分化誘導技術の開発

環境研究所

非公開

2. 2. 6 人工基底膜、疑似マトリックスの評価

京都大学

共同実施:環境研究所

大阪大学

日本皮革研究所

平成18年度までに、京都大学では霊長類ES細胞を用いての未分化維持に対する人工基底膜、疑似マトリックスの評価系をほぼ確立できたので、これを用い特にはじめは未分化維持について大阪大学・日本皮革研究所から供与される人工基底膜、国立環境研究所から供与される疑似マトリックスについて評価を進める。平成18年度での経験から単独ではあまり効果がなくても、いくつかの物質を組み合わせることで効果が出てくる可能性もあり、注意深く検討を進めたい、またヒトES細胞は細胞株ごとに性格がやや異なることを踏まえ、KhES-1、KhES-2、KhES-3すべての細胞株で評価を行っていく。と、同時に分化誘導に関する評価系の確立についても目指したい。

2.3 研究開発項目③「研究用モデル細胞の構築技術の開発」

2.3.1 研究用モデル細胞の構築

2.3.1.1 ヒトES細胞から神経変性疾患モデル細胞の構築

幹細胞創薬研究所

構築された神経変性疾患モデル細胞は、創薬研究分野ばかりでなく、疾患発症機構を解明するための有用なツールになる。創薬研究分野に利用するためには、今後大型培養方法の確立や各種表現型を感度良く検出するアッセイ系の構築が必要になるだろう。また、創薬研究分野だけでなく、疾患発症機構を研究する上でも、構築されたモデル細胞を長期に維持できる培養法の確立が必要であるだろう。

2.3.1.2 血液脳関門(BBB)モデルの創製

幹細胞創薬研究所

当面は、中間目標の達成に向けて残された課題である、ヒト ES 細胞から血管系細胞への分化誘導技術(血管内皮細胞・血管周皮細胞の量産調製技術)の確立を目指すとともに、BBB モデル構築形態に関する事前検討に注力する予定である。

本事業で目指すヒト型 BBB モデルが、従来モデルに優る性能を獲得できるブレークスルーの鍵は、細胞材が ES 細胞に由来することにあると考えている。

ES 細胞の分化誘導によって得られる機能細胞は、総じて成熟分化を遂げておらず分化段階において幼若な性状であることが多く、このことは成体から分離調達した初代培養細胞や株化培養細胞を用いて長年行われてきたモデル創製とは異なる性格の新しい試みになることを示すものである。

血管内皮細胞をはじめ、ヒト ES 細胞から調製した各種 BBB 構成細胞が *in vitro* での共培養・相互作用過程に伴って分化成熟化を遂げ、これまでに実現されなかった優れた BBB 特性の発現に向けて好結果が得られることが期待される。この意味において、ヒト ES 細胞(及びマウス ES 細胞)から血管内皮細胞の調製が出来次第、これを基軸としたモデル構築形態の検討段階に移行し、静的バリア性能のみならず、能動的物質輸送機能(取込系、排出系トランスポーターの発現)にも着目した検討を重点化する展開を考えている。

ヒト ES 細胞から血管内皮細胞の調製が出来次第、これを主軸としたモデル構築形態の検討段階に移行し、ここでは静的バリア性能のみならず、能動的物質輸送機能(取込系、排出系トランスポーター)の発現にも着目した検討を推進していく展開を考えている。

2. 3. 1. 3 ハイスループットスクリーニング(HTS)技術の開発

幹細胞創薬研究所

心筋分化誘導促進物質探索 HTS 系においては、約 1 万検体の中から、ヒト・サル ES 細胞の心筋分化促進に効果のある化合物を見出し、現在特許申請を行っている。今後は、このシステムをより自動化・高速化して、別の化合物ライブラリから新たな心筋分化促進物質を探索する。さらに、発見された新規化合物の解析を通して心筋分化機構を解明し、ヒト iPS 細胞に適用することで移植技術への応用や、QT 延長試験等の創薬スクリーニング系の更なる改良・発展を目指す。また、特定の遺伝子プロモーターを持った GFP 遺伝子を発現する ES/iPS 細胞を用いて、様々な細胞・組織に関する分化系あるいは病態モデル等にも GFP 蛍光を利用した HTS システムを適用したい。

2. 3. 2 オンチップ・ヒト組織・臓器モデルを用いた毒性・創薬技術の研究開発

東京医科歯科大学

上記、実用化の見通しのある技術の開発の実現を最優先課題として、当初の開発計画を変更して、今後、まず、下記3つの技術開発への集中化を図る。

1. 細胞を再利用するための無染色・可逆修飾細胞標識技術による細胞精製技術の展開

上記、細胞精製技術の実用化のため、画像データベースの構築、細胞表面標識アプタマーの精製技術の開発を推進する。

2. 細胞ベースでの心筋毒性検査技術に関する展開

すでに製薬企業等との実用化のための条件抽出に入っており、この方向性をさらに強力に推進し、最短の期間で、原理実験のための装置システム・プロトコルから、実用化が可能な装置システム・プロトコルとなるように集中して開発を推進する。特に、ヒト細胞でのシステムの性能を評価するために、現在すでに開始しているヒト心筋株を用いたデータ取得を、継続して推進する。

3. 病理モデル臓器チップの実用化のための展開

これについても、個体ベースでの病理モデル毒性検査を進めている研究グループとの強力な連携によって、最短の期間でのモデルの構築と、その機能の評価を進める。評価では、すでに個体ベースで得られている一連のデータとの比較によってその信頼性についての客観的な評価を行い、国内の製薬企業との実用化のための協議もさらに強力に推進する

2. 3. 3 ES細胞由来肝細胞を用いた創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立

東京大学

これまで、肝取り込み・排出過程についてトランスポーターを介した輸送に関して輸送能力および寄与率の解析を進めてきた。今後さらに事例を増やしてこれらについては検証を進める予定である。また、さらに長期に異物解毒タンパク質を維持できるような培養方法を考案し、長期に肝細胞に対して薬物を曝露させたときの誘導能の予測や薬剤誘導性肝障害の予測を可能とする実験系の構築へ向けて研究を進めていきたいと考えている。また、トランスポーターと代謝酵素両方が消失に関与する薬物について、それぞれの薬物の全身からの消失に占める相対的な寄与率の推定を行う方法論についても、速度論的な解析を通じて構築していきたいと考えている。

当研究室は、これまでも一貫して *in vitro* 実験系から得られた結果を定量的に解釈し、適切な数理モデルを介して *in vivo* における薬物動態を予測する手法を数多く報告しており、それら経験に基づいて、最終的な成果として単に適切な実験系の構築にとどまらず、*in vitro* 実験から得られた結果を元に *in vivo* における薬物動態特性を定量的に理解するための評価方法に至るまでを構築してきた。また、全身の薬物動態を予測する数理モデルの構築を行い、*in vitro* 実験系から得られた結果をこれらモデルに適切に導入することによって、全身薬物動態の予測を可能とする方法論の確立も複数の化合物のデータを説明できるような汎用的なモデル構築が可能であることをプラバスタチンの例をもって示すことができた。今後さらに他の化合物でも同様の検討をすすめ、本方法論の普遍化を図りたいと考えている。現在、ヒトにおける薬物動態の *in vitro* 実験系からの定量的な予測は創薬研究において最も切望されている方法論であり、事実上無限に均質な細胞を供給可能な ES 由来肝細胞を我々が構築する薬物動態評価法に取り込んでいくことによって、最終的には、世界の創薬研究者によって新規スクリーニング方法としてすぐに汎用されることが期待される薬物動態・毒性評価のためのスクリーニングシステムを評価法と合わせてパッケージとして提供できると考えている。

添付資料①

イノベーションプログラム基本計画

健康安心イノベーションプログラム基本計画

平成22年4月1日

産業技術環境局

製造産業局

1. 目的

今後、世界に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題である。具体的には、個の医療を通じて健康寿命の延伸、QOL（Quality of Life：生活の質）の向上を図ることが求められている。

この目的を達成するため、創薬に資する基盤技術の開発、再生医療の確立、医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の提供を実現するほか、関連産業の競争力強化・ベンチャー企業の創出を図る。

2. 政策的位置付け

○新成長戦略（基本方針）（2009年12月30日）

強みを活かす成長分野として「グリーン・イノベーション」分野と「ライフ・イノベーション」分野を策定、人材育成や技術開発を後押しするほか、需要を創造すると同時に利用者の立場に立った社会ルールの変更に取り組む。また、政府は新たな分野に挑戦する人々を支援するとしている。

○革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略（2009年2月12日改訂）

内閣府、文部科学省、厚生労働省及び経済産業省の間において革新的な医薬品・医療機器の創出に向け、研究資金の集中投入、ベンチャー企業の育成、臨床研究・治験環境の整備、アジアとの連携、薬事法における審査の迅速化・質の向上、イノベーションの適切な評価、官民対話等、研究から上市に至る過程の一貫かつ集中的な支援を実施することとしている。

○「ドリームBTジャパン」（2008年12月11日BT戦略推進官民会議）

2002年に策定した「バイオテクノロジー戦略大綱」以降、バイオテクノロジーをめぐる状況が変化してきたことを背景に、新産業の育成・創出、食糧問題解決、バイオマス利活用等の課題に対処すべく、イノベーション強化11項目や官民が協働で取り組むべき最重点課題を策定した。

○新経済成長戦略のフォローアップと改訂（2008年9月19日閣議決定）

2006年6月に経済産業省がとりまとめた「新経済成長戦略」を、資源価格の高騰等の構造変化を踏まえフォローアップと改訂を行った。「資源生産性競争」時代における経済産業構造の構築、世界市場獲得と持続的発展のためのグローバル戦略の再構築、地域・中小企業・農林水産業・サービスの未来志向の活性化を3つの柱として、「新経済成長戦略」を強化した。

○「iPS細胞研究の推進について（第一次とりまとめ）」（2008年7月3日総合科学技術会議 iPS細胞研究WG）

iPS細胞研究の成果がもたらす医療への波及効果や新しいバイオインダストリーの進展等について検討を行い、iPS細胞研究を推進するための研究推進体制、国の支援の在り方、知的財産戦略、国際化協力の在り方等をとりとまとめた。

○「イノベーション25」（2007年6月閣議決定）

生涯健康な社会形成に向けて中長期的に取り組むべき課題として、治療重点の医療から予防・健康増進を重視する保健医療体系の転換、生命倫理・安全性と医療技術促進政策の調和などをとりあげ、再生医療及び在宅医療・介護に係る社会還元加速プロジェクトを実施するとともに、臨床研究・臨床への橋渡し研究をはじめとする研究開発ロードマップの提示により所要の措置を講じていくこととしている。

○がん対策推進基本計画（2007年6月閣議決定）

がん対策基本法に基づき、国、地方公共団体及び関係者等が、がん対策を総合的かつ計画的に推進するために策定された基本方針であり、取り組むべき施策の一つとして「がん研究」が取り上げられている。具体的には、現状、診断薬・診断機器の開発、治療薬・治療機器の開発等が推進されているが、さらに、有用な早期診断技術についての研究開発の推進等に取り組むことが提示されている。

○新健康フロンティア戦略（2007年4月新健康フロンティア戦略賢人会議）、同アクションプラン（2007年12月）

健康寿命の延伸や生活の質の向上を図ることを目的として策定された新健康フロンティア戦略及び新健康フロンティア戦略アクションプランの中で、「人間の活動領域の拡張に向けた取組」及び「医療・福祉技術のイノベーション」において、「先進的予防・診断・治療技術の開発」や「医薬等ベンチャー・基盤産業支援対策」等の施策が提示されている。

3. 達成目標

- ①医薬品開発の成功確率の向上に資する技術開発や、基礎研究から臨床への橋渡し研究等を通じた、医薬品の上市期間の短縮や開発コストの低減を図る。
- ②再生医療の早期実現を目標とし、産業化を促進する。
- ③医療機器¹など先進的な技術開発等の推進による国際競争力の強化、厚生労働省との連携事業（医療機器開発ガイドラインの策定など）による開発から製品に至るまでの期間の短縮等を達成する。
- ④高齢者・障害者の自立促進や介護者の負担軽減等のため、優れた技術や創意工夫のある福祉機器の実用化支援を行う。

¹ 医療機器は、画像診断システムなどの「診断機器」、内視鏡下手術支援システムなどの「治療機器」、その他家庭用医療機器、歯科材料、眼科用品を含む。

4. 研究開発内容

I. 創薬・診断

I-1. 革新的医薬品の創出

(1) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）

①概要

我が国が強みを持つ糖鎖工学分野において、これまでに取得・開発した「糖鎖遺伝子ライブラリー」「糖鎖構造解析技術」「糖鎖合成技術」を活用し、癌や感染症など様々な疾病に関与する糖鎖の機能を解析する基盤技術を確立し、我が国の優位性を維持するとともに、創薬・診断等の分野における糖鎖機能の産業利用の促進を図る。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、糖鎖や糖タンパク質などの機能を分子レベルで効率的に解明するための基盤技術、糖鎖の機能解析・検証技術、及び、有用性が認められた糖鎖機能を産業利用するための基盤技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発）（運営費交付金）

①概要

我が国が強みとする完全長cDNAライブラリーやタンパク質相互作用解析技術等を最大限に活用し、重要なタンパク質ネットワーク解析等により創薬の対象となるタンパク質の効率的な絞り込みを行うとともに、疾患等の生物現象を制御する化合物の探索まで、一貫した技術開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術や疾患を制御する化合物の探索・評価技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(3) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発）

①概要

創薬上重要な膜タンパク質は複合体を形成していることも多く、その構造解析及び相互作用の情報を取得することは創薬研究において重要であるが、その解析は非常に困難である。そこで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造及びその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析及び構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。

②技術目標及び達成時期

2011年度までに生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体の構造解析手法、リガンド分子との相互作用解析手法を確立するとともに、当該技術から得られた情報に基づく in silico スクリーニング手法を確立する。

③研究開発期間

2007年度～2011年度

(4) 新機能抗体創製技術開発 (運営費交付金)

①概要

ポストゲノム研究や診断・創薬等において重要となっている機能を有する抗体を創製するため、創薬標的として産業利用上重要だが、解析が困難な膜タンパク質やタンパク質複合体を特異的に認識できる抗体を系統的に作成する技術や抗体の分離・精製を高効率に行うための技術の開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、産業上有用と考えられるタンパク質やその複合体を特異的に認識する抗体を創製するための基盤技術、及び、製造コスト低減に向けた抗体の分離・精製等を高効率に行う技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(5) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発 (運営費交付金)

①概要

がん対策等の国民医療高度化を目指し、急速に発展している多様なバイオ技術の融合と医療現場への円滑な橋渡しによるイノベーションの創出・加速のため、総合科学技術会議のもと文部科学省及び厚生労働省と連携し、橋渡し研究の強化に一体的に取り組む。具体的には、民間企業と臨床研究機関（文部科学省や厚生労働省が整備する橋渡し研究拠点等）が一体となって行う、医薬品、医療機器、診断ツール等の開発を推進する。

②技術目標及び達成時期

2011年度までに医療現場及び臨床研究からのフィードバックに基づく研究開発により、医薬品、医療機器、診断ツール等の研究開発成果を円滑に実用化につなげる仕組みを確立する。

③研究開発期間

2007年度～2012年度

(6) 幹細胞産業応用促進基盤技術開発 (運営費交付金)

①概要

創薬プロセス効率化や再生医療への応用が期待される iPS 細胞等幹細胞について、産業応用に不可欠な基盤技術の開発や、iPS 細胞に関連した産業応用例創出の促進を行う。

②技術目標及び達成時期

2013年度までに、安全で効率的なiPS細胞の作製技術を開発するとともに、産業応用に繋げるために必要となるiPS等幹細胞の選別・評価・製造技術を開発し、産業上利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。

③研究開発期間

2009年度～2013年度

(7) 後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発

①概要

がんや生活習慣病などの後天的疾患の原因として重要な因子である「後天的な遺伝子の変化（後天的ゲノム修飾）」を解析する技術や疾患との関連づけにより診断の指標を特定する手法の開発等を実施する。

②技術目標及び到達時期

2014年度までに、後天的ゲノム修飾解析技術開発として、極微量サンプルに対応した解析技術の高精度・高感度化、システム化を行うとともに、開発した技術やモデル動物等を活用し、後天的ゲノム修飾と疾患との関連づけを行う。また、探索的実証研究として、制御因子の探索・同定、制御に関する検証を行う。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

I-2. 診断ツールの開発

(1) 個別化医療実現のための技術融合バイオ診断技術開発（運営費交付金）

①概要

我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、診断への応用を可能とする全自動解析システムの開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発する。さらに、臨床現場において、微量サンプル（数ナノグラム）から、12時間以内に染色体異常（増幅、欠失、コピー数多型等）を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）【再掲】

(3) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

I-3. 創薬・診断に係る基盤整備

(1) 統合データベースプロジェクト

①概要

ライフサイエンス分野では、自身の研究成果と既存の研究成果と対比することにより、自身の研究成果の仮説を考案する手がかりが得られたり、新しい実用化の発想が得られたりする可能性があるため、国家プロジェクト等により産生された研究データを一括して活用できるデータベースが、産業界や社会から要望されている。

このため、政府全体の“生命科学データベース統合化の取組”の一環として、経済産業省関連の公的資金研究から産出される研究データを、産業上の有用性を評価のうえ、統合化し、産業界等に提供する。

②技術目標及び達成時期

2010年までに経済産業省関連機関により実施されたライフサイエンス分野の研究開発プロジェクトの成果に関する情報提供サイトを構築・運用する。また、ヒト遺伝子に関連した各種研究成果に関しては、平成17～19年度に実施したゲノム情報統合プロジェクトにおいて構築した「ヒト全遺伝子のアノテーション統合データベース (H-Invitational)」を基礎として、経済産業省関連の研究成果を連携して利用できるシステムを構築する。

③研究開発期間

2008年度～2010年度Ⅱ. 再生医療

II. 再生医療

II-1. 再生医療の実用化

(1) 次世代機能代替技術研究開発事業（うち、次世代再生医療技術研究開発）（運営費交付金）

①概要

生体内で自己組織の再生を促すセルフリー型再生デバイスや、少量の細胞により生体内で自律的に成熟する自律成熟型再生デバイスの実用化を促進するとともに、これら再生デバイスにおける有効性・安全性の評価技術等を確立する。

②技術目標及び達成時期

2014年度までに、生体内で自己組織の再生を促進するための細胞外マトリクス、幹細胞誘導・分化促進因子等の再生医療技術を確立し、工学的技術との組み合わせにより、セルフリー型再生デバイス及び自律成熟型再生デバイスを作製する。また、それらを用いて再生した組織等の有効性・安全性に関して、低侵襲で高精度な評価技術の標準化に取り組む。さらに、開発する再生デバイスを低侵襲に植込む技術を確立する。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

(2) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

II-2. 再生医療に係る基盤整備

(1) 医療機器開発ガイドライン策定事業

①概要

医療機器産業への投資、新規企業参入、医療機器研究開発の促進及び薬事法審査の円滑化・迅速化にも資する「医療機器開発ガイドライン」を厚生労働省との連携の下、産学の協力を得て、個別の機器ごとに策定し、国内での機器開発促進の環境整備を図るとともに、医療機器産業に製品として、または部品・部材の供給として参入しやすい環境を整備するための方策を検討し、医療機器分野の活性化・国際競争力の強化を図る。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、今後実用化が期待される先進的な医療機器について、工学的安定性や生物学的安定性等に関する詳細な評価基準を策定し、開発ガイドラインとして取りまとめる。また、平成21年度事業において検討・整理された医療機器産業への参入を促す方策や部材供給の活性化方策の具体化を図るため、様々なマッチング機会をコーディネートする人材育成や事業者の海外展開支援策並びに部材供給取引契約にかかるガイドラインの作成及びPL保険のあり方や普及方法等についてさらに検討を加え、医療機器産業の活性化に資するものとする。

③研究開発期間

2008年度～2010年度

III. 医療機器

III-1. 医療機器の開発

(1) がん超早期診断・治療機器総合研究開発プロジェクト（運営費交付金）

① 概要

がんの診断・治療の革新を一体の課題として捉え、多様な治療法選択が可能なより早期のステージのがんに対して、治療方針を決定するために必要ながん性状、並びに位置に関する正確な情報を確実に取得し、得られた診断情報に基づく侵襲性の低い治療を可能とすることで、患者のQOLを向上させる。

② 技術目標及び到達時期

診断機器システムとしては、分子プローブ等の薬剤並びにそれらの薬剤を用いる高感度・高解像度な画像診断システム、病理診断の効率・信頼性を向上させる病理画像等診断支援システム、遺伝子診断の信頼性を向上させる検体前処理技術を備えた血中がん分子・遺伝子診断システム等を開発する。

治療機器システムとしては、より侵襲性の低い外科的治療を実現する内視鏡下手術支援システム並びに高精度で容易なオペレーションを可能とするX線治療機器を開発する。

③ 研究開発期間

2010年度～2014年度

(うち、内視鏡下手術支援システムは 2007年度～2011年度)

(2) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

(3) 次世代機能代替技術研究開発事業（うち次世代心機能代替治療技術研究開発）（運営交付金）

①概要

小柄な体格にも適用可能な小型の製品で、血栓形成や感染を防ぎ、長期在宅使用が可能な植込み型補助人工心臓を開発する。

②技術目標及び達成時期

2014年度までに、小児を含めた小柄な患者への適用を可能とする、長期使用可能な小型の植込み型補助人工心臓を作製するとともに、有効性及び機械的・電氣的・生物学的な安全性の評価を行う。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

Ⅲ-2. 医療機器の開発に係る基盤整備

(1) 医療機器開発ガイドライン策定事業【再掲】

①概要

医療機器産業への投資、新規企業参入、医療機器研究開発の促進及び薬事法審査の円滑化・迅速化にも資する「医療機器開発ガイドライン」を厚生労働省との連携の下、産学の協力を得て、個別の医療機器ごとに策定し、国内での機器開発促進の環境整備を図るとともに、医療機器産業に製品として、または部品・部材の供給として参入しやすい環境を整備するための方策を検討し、医療機器分野の活性化・国際競争力の強化を図る。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、今後実用化が期待される先進的な医療機器について、工学的安定性や生物学的安定性等に関する詳細な評価基準を策定し、開発ガイドラインとして取りまとめる。また、平成21年度事業において検討・整理された医療機器産業への参入を促す方策や部材供給の活性化方策の具体化を図るため、様々なマッチング機会をコーディネートする人材育成や事業者の海外展開支援策並びに部材供給取引契約にかかるガイドラインの作成及びPL保険のあり方や普及方法等についてさらに検討を加え、医療機器産業の活性化に資するものとする。

③研究開発期間

2008年度～2010年度

Ⅳ. 福祉機器

Ⅳ-1. 福祉機器の開発

(1) 福祉用具実用化開発推進事業（運営費交付金）

①概要

「福祉用具の研究開発及び普及の促進に関する法律」（福祉用具法）に基づき、高齢者・障害者及び介護者の生活の質の向上を目的として、生活支援分野、社会活動支援分野を中心とした福祉用具の実用化開発を行う民間企業等に対し、研究開発費

用の2/3以内を補助することで、多様な福祉ニーズに対応するとともに、当該分野における新産業の創出、成長の促進に資する。

②技術目標及び達成時期

高齢者、障害者の生活支援、社会参加支援に資する福祉用具の実用化開発を促進することにより、高齢者等の生活における負担の軽減を図り、安全で安心のできる生活を実現する。より具体的な目標として、各々の補助対象事業終了後3年経過した時点で50パーセント以上を製品化する。

③研究開発期間

1993年度～

IV-2. 福祉機器の開発に係る基盤整備

(1) 福祉機器情報収集・分析・提供事業

①概要

福祉用具法に基づき、民間による福祉機器の実用化のための研究開発を促進するため、福祉機器に関する産業技術に係る情報の収集・分析・提供事業を実施することで、当該分野における福祉機器の普及や新規産業の創出・成長の促進を図る。

②技術目標及び達成時期

各年において福祉機器に係るニーズ等の調査の実施及び福祉用具実用化推進事業で開発された福祉機器の各種展示会等への出展による情報収集・分析・情報の提供を実施する。

③研究開発期間

1993年度～

5. 政策目標の実現に向けた環境整備（成果の実用化、導入普及に向けた取組）

[標準化]

- ・各プロジェクトで得られた成果のうち、標準化すべきものについては、適切な標準化活動（国際規格（ISO/IEC）、日本工業規格（JIS）、その他国際的に認知された標準の提案等）を実施する。具体的には、統合データベースの情報やインターネットに公開されている情報資源等を相互運用するために、必要なデータ形式、フォーマット等の標準化を推進する。
- ・高齢者等支援機器については、関係省庁との緊密な連携の下、標準化等の手法による実用化及び普及の方策を検討する。

[導入普及促進]

- ・ゲノム研究の進展は、個人遺伝情報を用い、情報技術を駆使した幅広い医療・健康サービスによる人々の健康や福祉の向上、さらには新しい医療・健康サービス産業の育成に重要な役割を果たそうとしているが、その際、人権を尊重し、社会の理解と協力を得て、個人遺伝情報の厳格な管理の下で適正に事業を実施することが不可欠である。そのため、個

人遺伝情報を安全に保護するために作成した事業者が遵守すべきルール「経済産業分野のうち個人遺伝情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン（2004年12月17日告示）」（個人遺伝情報保護ガイドラインという）を適切に運用する。

[産業間連携]

- ・バイオベンチャーは商品を市場に送り出すまでに長期間を要する、研究開発のために多額の資金調達を必要とする、事業を行うために様々な規制・審査を経る必要がある等、他業種のベンチャー企業と比較して困難な問題を抱えていることが多い。そのため、バイオベンチャーの様々な問題に対して施策への反映を検討し、補助金等の施策の紹介を通じてバイオベンチャー振興を図る。
- ・「産業クラスター計画」に基づき、全国のバイオクラスターにおいて、企業間のネットワーク形成の支援、産学連携による研究開発プロジェクトの支援、地域系ベンチャーファンドによる資金調達支援等を実施していく。
- ・医療の進歩・国民の健康に貢献する医療機器・用具の産業技術力向上及び国際競争力強化を目指し、研究開発から市場化までのすべてのプロセスにおけるマクロな戦略の検討と、医療機器の重要性について社会的認知の向上を実現するための仕組み及び個別プロジェクトの形成をはかることを使命とした「医療技術産業戦略コンソーシアム（METIS）」が平成13年に設立され、平成21年10月より第4期に入っている。

[プロジェクト等間の連携について]

- ・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発）については、タンパク質機能解析・活用プロジェクトの成果を活用することで、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術を開発する。
- ・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発）については、「生体高分子立体構造情報解析」の成果を活用することで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造及びその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析及び構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。
- ・糖鎖機能活用技術開発については、糖鎖合成関連遺伝子ライブラリー構築、糖鎖エンジニアリングプロジェクトの成果を活用することで、糖鎖の機能を効率的に解析するための基盤技術を開発する。
- ・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発の「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」、「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」については、必要に応じ、各々の成果を活用し、効率的、効果的な研究開発を図る。

[関係機関との連携]

- ・総合科学技術会議が推進する基本政策推進専門調査会 分野別推進総合PT ライフサイエンスPT及び科学技術連携施策（「生命科学の基礎・基盤」、「臨床研究・臨床への橋渡し研究」）の下、各プロジェクトについて、関係府省との適切な連携を図る。

[その他]

・一段と激化する特許戦争の中、成果実用化・効率的な研究開発を推進するため、プロジェクト企画段階から、研究テーマ周辺の論文及び特許状況のサーベイ実施やプロジェクト実施段階における特許出願後の事業化構想等、特許に関する戦略的取組（プロパテントアプローチの導入）を実施する。

・医療機器の審査体制の強化による薬事法審査の迅速化の観点から、2004年より独立行政法人産業技術総合研究所の工学系研究者を独立行政法人医薬品医療機器総合機構へ派遣しているところである。

・福祉機器においても、中小企業等産業側の観点を福祉政策に活かすため2008年より独立行政法人産業技術総合研究所の職員を厚生労働省に派遣中である。

6. 研究開発の実施に当たっての留意事項

事業の全部又は一部について独立行政法人の運営費交付金により実施されるもの（事業名に（運営費交付金）と記載したものは、中期目標、中期計画等に基づき、運営費交付金の総額の範囲内で、当該独立行政法人の裁量によって実施されるものである。

なお、適切な時期に、実用化・市場化状況等について検証する。

7. 改訂履歴

- (1) 平成12年12月28日付けがん・心疾患等対応高度医療機器プログラム制定。
- (2) 平成14年2月26日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。
- (3) 平成14年2月28日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。がん・心疾患等対応高度医療機器プログラム（平成12・12・27工総第13号）は、廃止。
- (4) 平成15年1月27日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画（平成14・02・25産局第4号）は、廃止。
- (5) 平成15年3月10日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画（平成14・02・05産局第2号）は、廃止。
- (6) 平成16年2月3日付け制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画（平成15・01・23産局第4号）及び健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画（平成15・03・07産局第17号）は、本プログラム基本計画に統合することとし、廃止。
- (7) 平成17年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成16・02・03産局第12号）は、廃止。
- (8) 平成18年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成17・03・25産局第1号）は、廃止。
- (9) 平成19年4月2日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成18・03・31産局第2号）は、廃止。
- (10) 平成20年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成19・03・20産局第5号）は、廃止。

- (11) 平成21年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成20・03・25産局第6号）は廃止。
- (12) 平成22年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成21・03・26産局第3号）は廃止。

添付資料②

技術戦略マップ(分野別技術ロードマップ)

創薬・診断分野

健康寿命の延伸、QOL（Quality of Life：生活の質）の向上は世界全体の願いであり、特に、今後、少子高齢化が他国に先駆けて進行する日本にとっては、喫緊の課題である。このために創薬・診断分野では、①「疾患の早期診断」、「適切な治療法の提供」によって、より良い医療サービスを提供していくとともに、②「予防医療による健康維持増進」によって、治療から予防へと転換し、より個人に適切に対応する「個の医療」を実現することを目指す。また、これらの手段の進展に伴い、健康産業のプレーヤー及び市場の拡大が見込まれる。

創薬・診断分野の目標実現に向けた各般の取組みを進めるため、導入シナリオ、技術マップ、技術ロードマップからなる技術戦略マップを策定する。導入シナリオは関連施策を含む、当該分野の全体像をまとめたものであり、技術マップ、技術ロードマップは以下に示す技術の観点から策定されている。

- ・ 治療にあたっての医薬品開発、疾患の早期発見及び個人の遺伝情報等に合わせた医薬品の投与を可能とする診断技術
- ・ 医療関連分野において共通基盤となるポストゲノム研究に係る知見・技術

また、技術戦略マップの策定にあたっては、医薬品の開発・上市には長期間を要することを踏まえて、今後 20 年間程度を見据えたものとする。

創薬・診断分野の技術戦略マップ

I. 導入シナリオ

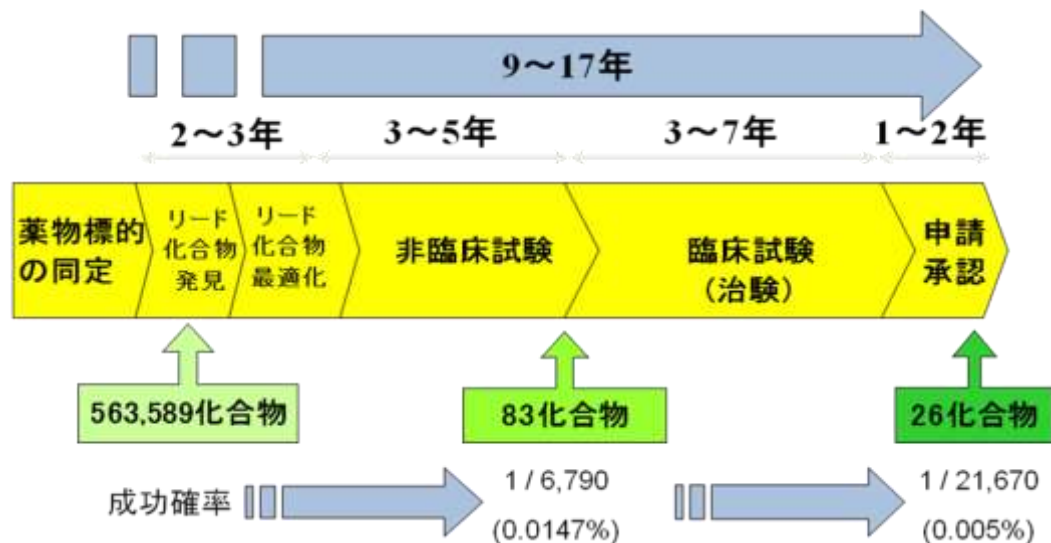
(1) 創薬・診断分野の目標と将来実現する社会像

今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは、喫緊の課題である。そのために創薬・診断分野が果たす役割は大きい。具体的には、①疾患を予防することによる健康維持増進、②疾患の早期診断・早期治療による迅速な社会復帰、③適切な治療法の提供による個々の医療の実現を通じて健康寿命の延伸、QOLの向上を図るとともに、本分野における関連産業の国際競争力強化を目指す。

(2) 研究開発の取組み

現在の創薬プロセスにおいては、1つの医薬品が製品化されるまでに9～17年程度の期間及び500億円を超える開発費が必要であるといわれている。研究開発費のうちの7割強は臨床試験までに投入されている。

図1 新薬開発の特質 (03年～07年の例)



出典：てきすとぶっく 製薬産業 2009

また、臨床試験開始後の成功確立が減少傾向にあることから、製薬企業における研究開発費の総額は増大し、創薬におけるR&Dリスクはますます高まる傾向にある。

我が国の企業の研究開発投資は、欧米と比べると規模で劣る。例えば全世界・日本の製薬企業の研究開発投資トップ5社を比べると、研究開発費・売上高ともに、規模の格差が顕著である。また、政府の研究開発規模も10倍近くの差がある。

一方で、このような状況下、売上高は必ずしも多くないが、医薬品の世界売り上げランキング50位以内に日本オリジンの医薬品が9品目入っており、差別化された領域

での強みが伺われる。

図2：全世界・日本の製薬企業トップ5社の比較

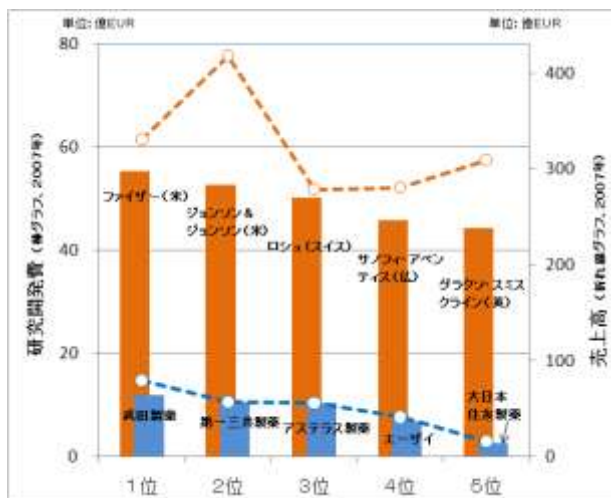
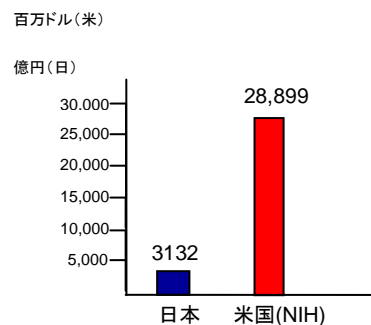


図3：政府における研究開発費の日米比較(2007年)



(出典) NIHホームページ、総合科学技術会議ライフサイエンスPTより経済産業省作成

(出典) European Commission The 2008 EU Industrial R&D Investment Scoreboard より経済産業省

また、バイオベンチャーは他分野ベンチャー企業以上に重要な役割を担うところであるが、企業数、ベンチャーキャピタルからの投資額、開発起源企業別にみたバイオ医薬品数において我が国のバイオベンチャーは、欧米との比較において未成熟といえる。

このため、我が国が少ない研究開発費で効率的な創薬を達成し、国際競争力を高めていくためには、基礎研究の成果を迅速に臨床に橋渡ししていくことを含め、産業界のニーズや我が国の強みを踏まえつつ、創薬プロセスにおける初期段階で成功率を高める研究開発に政府予算を投資していくことが重要である。

このような状況の中、経済産業省においては、ポストゲノム研究等により進展してきている遺伝子やタンパク質、糖鎖、RNA等の生体分子の機能・構造・ネットワーク解析やそれら研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に活用するためのデータベース整備等を行うことにより、個々人に適切に対応した医療、予防医療の実現や画期的な新薬の開発、健康維持・増進に係る新しい産業の創出に係る取組を行ってきたところである。また、文部科学省、厚生労働省、経済産業省における創薬分野の関連予算を俯瞰した図を【参考資料 1：平成 20 年度→21 年度医薬品研究俯瞰図】に示す。

また、日本製薬工業会が「革新的創薬等のための官民対話」において平成21年度重点化施策として「安全性バイオマーカー」や「疾患の進行度や治療効果の度合いを示すバイオマーカーの探索」を基礎研究領域として提言しているように、これまでのプロジェクト等により定量・同定されたバイオマーカーデータの生物学的意味づけと検証が今後重要となってくることがうかがえる。

(3) 関連施策の取組み

創薬・診断分野における将来像を実現するためには、研究開発のみならず、開発の迅速化や成果普及につながる制度整備、標準化等の関連施策を一体的に推進する必要がある。このため、政府関係機関において以下の取組がなされている。

[起業・事業支援]

- ・ バイオベンチャーの抱える諸問題に対し、「革新的創薬等のための官民対話」ベンチャーWG等の場を通じた取組。
- ・ 「産業クラスター計画」に基づき、全国のバイオクラスターにおいて、企業間のネットワーク形成の支援、産学連携による研究開発プロジェクトの支援、地域系ベンチャーファンドによる資金調達支援等の実施。

[導入補助・支援]

- ・ 個人遺伝情報保護ガイドラインの適切な運用
- ・ バイオインダストリー安全対策調査の実施
- ・ バイオ事業化に伴う生命倫理問題等に関する研究の実施

[ガイドライン整備]

- ・ 検体の品質管理マニュアル(JCCLS)、テーラーメイド医療用診断機器(DNAチップ)ガイドラインの積極的活用。
- ・ 「分子遺伝学的検査における精度保証に関するガイドライン」(OECD)に準拠した日本版ガイドラインの策定と積極的活用。

[規制・制度改革・他省庁との連携]

- ・ 総合科学技術会議が推進するライフサイエンスPT、革新的技術戦略、社会還元プロジェクト、iPS(induced pluripotent stem cell)細胞研究WGの下での関係府省間における適切な連携の実施。
- ・ 内閣府、文部科学省、厚生労働省及び経済産業省の間で2009年2月に改訂した「革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略」に基づき、研究資金の集中投入、ベンチャー企業の育成、臨床研究・治験環境の整備、アジアとの連携、薬事法における審査の迅速化・質の向上、イノベーションの適切な評価など、本分野における研究から上市に至る過程の一貫かつ集中的な支援の実施。【参考資料2-1：革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略の概要】
- ・ 「革新的創薬等のための官民対話」の場を通じ、医薬品分野のイノベーション創出と産業の国際競争力強化に係る諸施策の方向性に対する製薬業界、教育・研究機関、行政(内閣府、文部科学省、厚生労働省、経済産業省)のトップの認識の共有化。
- ・ 2008年7月22日に設置された「健康研究推進会議」による、先端医療開発特区(スーパー特区)制度の推進と各省が実施している臨床研究や橋渡し研究を一体的に運用していくための司令塔機能の発揮。【参考資料2-2：平成21年度健康研究関係施策額】

〔基準・標準化〕

- ・ バイオチップのデータ信頼性・互換性向上のための基準・標準化活動の推進。

〔知的基盤整備〕

- ・ 研究開発の企画段階から研究テーマ周辺の論文及び特許状況のサーベイ実施や研究開発の実施段階における特許出願後の事業化構想等、特許に関する戦略的取組の実施をサポート。

〔特許化〕

- ・ 特許庁は、2008年10月より現行の早期審査よりも更に早期に審査を行う「スーパー早期審査制度」を創設、早期の事業化を目指す発明やライフサイクルが短い発明への早期審査のニーズを充足させるべく制度を構築。

（４）海外での取組み

米国では、NIHにおける約3兆円の研究開発予算のうち、83%が大学や病院といった外部研究に充当され、10%がNIH クリニカルセンターなどの内部研究に充てられている。また、NIHにおける生物医療学研究を推進するため、NIHに属する27研究所全体として取り組むべき研究分野を見極めることを目的にNIHロードマップを2003年9月に作成している。

NIHロードマップでは以下の主要テーマについて取組が行われている。

①New Pathways to Discovery :

生体メカニズムの理解を主眼とした細胞や組織を構成する生体分子のネットワーク、分子イメージング、構造生物学、バイオインフォマティクス、ナノ医療等に係る研究開発。

②Research Team of the Future

専門分野を越えた学際的研究を行うチーム、新しい組織モデルの検討。

③Re-Engineering the Clinical Research Enterprise

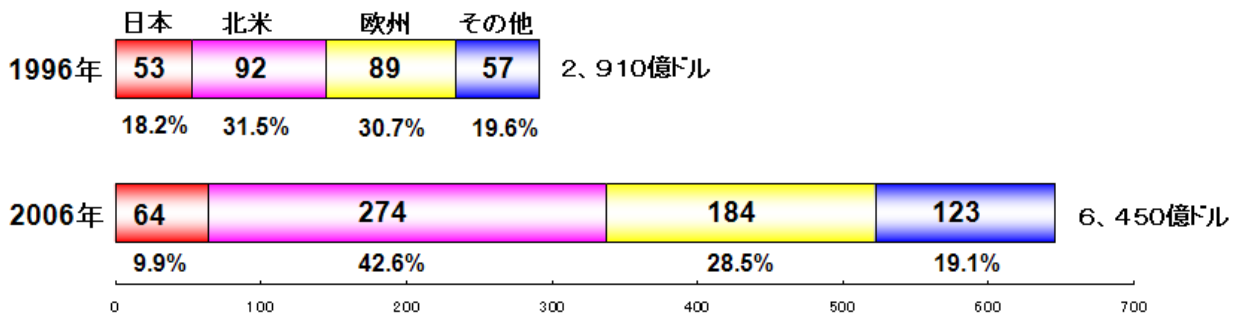
研究上の発見や諸成果を迅速に臨床現場に展開するためのシステム構築。

欧州では、科学技術に関する総合的なプログラム（Framework Programme）を3～4年単位で実施している。2006年12月には2007年～2013年の取組を示したFP7が策定・開始されている。FP7においては欧州レベルでの官民パートナーシップを実現化する新たな手法として共同研究イニシアチブが取り組まれており、6領域のイニシアチブの1つとして「革新的医薬品イニシアチブ」が展開されている。当該イニシアチブではアンメットメディカルニーズを含む医療領域に研究成果の迅速な橋渡しを促進する仕組みを構築することを狙いとしている。

（５）民間での取組み

過去10年で世界の医薬品市場はおおよそ倍近く拡大しているが、日本市場の伸びは2割程度にとどまり、結果として日本が占める割合は半減している。

図 4 世界の医薬品市場の推移



出典：「革新的創薬等のための官民対話」資料（IMS Health, IMS World Review 1998 2007）

こうした中、経営基盤の強化を図るため、企業間の再編や外部リソースの活用が進んでいる。

表 1：近年の再編動向（国内）

統合年	主たる企業名
2005年	・アステラス製薬（山之内製薬、藤沢薬品工業） ・大日本住友製薬（大日本製薬、住友製薬）
2007年	・第一三共（三共、第一製薬） ・田辺三菱製薬（田辺製薬、三菱ウェルファーマ）
2008年	・協和発酵キリン（協和発酵、キリンファーマ）

外部リソースの活用は経営基盤の強化を図ることに止まらず、企業にとってこれまで研究が立ち後れていた有用技術の早期導入に役立っているケースもあり、技術が国境を越える一つの契機にもなっている。

また、主要薬が相次いで特許切れになる「2010年問題」を見据え、米国企業を中心とした大規模な買収・合併の動きが加速していることも、今後の企業における研究開発に影響を与えることが予想される。

表 2：国境を越えた組織再編・技術提携

公表時期	内容
2008年5月	武田薬品工業がミレニアム・ファーマシューティカルズ社（米）を88億ドルで買収
2008年9月	ベーリンガーインゲルハイム（独）と北海道大学発ベンチャー、イーベックが5,500万ユーロで抗体作成技術のライセンス契約を締結
2009年1月	ファイザー（米）がワイス（米）を680億ドルで買収
2009年3月	メルク（米）がシェリング・プラウ（米）を411億ドルで買収
2009年3月	ロシュ（スイス）がジェネンティック（米）を468億ドルで買収

なお、iPS細胞研究をめぐる新しい動きとして、2008年7月に、京都大学をはじめ

とする iPS 細胞研究成果の産業界への円滑な移転を促進するため、「有限責任中間法人 iPS ホールディングス」が京都大学及び金融機関 3 社により設立された。

このほか、日本製薬工業会において、2008 年 11 月から活動期間 1 年として、iPS 細胞関連技術を研究する大学など各研究機関の知財戦略構築・遂行を支援するプロジェクトを開始している。

診断関連市場としては、2017 年には医療分野において 1 兆 3,000 億円、健康管理・予防分野において 1,500 億円の市場規模が見込まれる。特に医療分野では今後 10 年で 2,000 億円の伸びが見込まれ、製薬企業と素材・分析機器メーカー等の診断技術開発企業との連携、制度整備、標準化等のさらなる取組が重要となっている。

こうした中、診断ツールとして大きな役割を担う DNA チップをはじめとするバイオチップの標準化を推進することにより、バイオチップ関連の産業化の促進及び市場の創生を目的としたバイオチップコンソーシアムが 2007 年 10 月に設立され、国内連携を軸に DNA チップのデータ信頼性・互換性向上のための基準・標準化の取り組みを開始した。

(6) 改訂のポイント

- 世界・日本の製薬会社のトップ5の比較、政府における研究開発費の日米比較、世界の医薬品市場の推移のベンチマーク等を策定、変更した。
- 民間での取組みに、京都大学が中心となって設立した「有限責任会社 iPS ホールディングス」の記述を挿入した。
- 関連施策として、「健康研究推進会議」及び「先端医療特区」の記述を追加した。
- 導入シナリオに新規プロジェクトを追加した。

II. 技術マップ

(1) 技術マップ

国民にとって最大の関心事項である健康とは、病気になった場合に早期に健康状態に戻れること、そして、そもそも病気にならず健康であり続けることに大きく二分される。この 2 つのニーズに対応するためには、副作用の少ない最適な医薬品の提供を可能とするとともに、将来の疾患リスクを事前に把握した上で、各人において日々の健康管理を行える環境の整備が重要となっている。

このため、①「より良い医薬品の開発・提供」及び②「健康産業の創造（治療から予防への転換）」を研究開発の柱として位置づけ、ニーズに従って必要な技術を技術マップ上に俯瞰した。

① より良い医薬品の開発・提供

個々人の病態や遺伝的背景に応じて薬剤を選択することを可能とするためには、画期的な医薬品の開発を促進し、薬剤の母数を拡大することが重要であり、このためには、疾患メカニズムを踏まえ、医薬品のターゲットとなるタンパク質、糖鎖、RNA 等

の生体分子を探索・特定し、これを医薬品としていち早く市場化することが必要である。また、薬効や副作用の大小は個々人により異なるため、多数の医薬品の中から個々人に応じた最適な医薬品の選択・処方が求められている。このため、技術マップでは、画期的な医薬品開発のための技術課題と医薬品の最適な使用のための技術課題に分け、前者については、医薬品の種類と医薬品開発プロセスという軸から技術課題を整理している。

なお、疾患と医薬品との関係については、がんやその他の疾患を見ても、その疾患メカニズムはある特定の疾患の中でも異なっており、また治療用のターゲットが複数存在することから、開発過程において、それぞれの疾患に対し固有の医薬品形態にとられない複数のアプローチが取られている。

② 健康産業の創造

病気を予防するためには、自らの罹患リスクを遺伝的に認識した上で、日々の健康管理を行える環境の整備が必要であり、このための技術課題を整理している。さらに、バイオマーカーに着眼し、当該技術より可能な予防及び超早期診断による健康維持のあり方について深化して検討を行い、技術マップを整理している。

また、①、②の戦略を推進するうえで重要となる「ゲノム情報等をベースとした新規診断技術」のビジネスモデルを【参考資料3】に示す。このビジネスモデルから以下の点が見込まれる。

- 現在の臨床現場における利用は治療に比べて相対的に保険点数が低いものの、健康産業を含む公的保険以外の自己負担、民間保険、雇用主負担等でカバーするエリアでの展開は有望である。
- 医薬品開発におけるファーマコゲノミクスの進展により、医薬品と診断法の一体化開発や臨床現場での薬物療法における投薬前診断分野における市場の成長性が期待できる状況である（ただし、この分野では診断技術を提供する企業と製薬企業との密な協業が必要）。

(2) 重要技術の考え方

この分野の具体的目標である

- ・ 画期的な医薬品をより早く効率的に提供することにより、優れた治療法を提供する。
- ・ 個の医療を支える薬剤のバラエティを拡大し、幅広い選択肢を提供する。
- ・ 個々人の特性・病態に合わせた最適な医療を実現する。
- ・ 疾患・罹患リスクの把握とこれに対応した予防・早期診断による適切な健康管理を実現する。

を踏まえて、下記の観点から重要技術を抽出し、技術マップに示している。

なお、我が国発の技術として脚光を浴びているヒト iPS 細胞については、再生医療分野だけでなく、創薬分野においても「健常人 iPS 細胞に由来する健常モデル細胞（心筋細胞、肝細胞など）を用いた毒性評価」、「患者 iPS 細胞由来の疾患モデル細胞を用

いた創薬スクリーニング」系の構築による創薬プロセスの効率化（成功率の向上やスピードアップ）や疾患メカニズム解明による新規医薬品の創出などに資する重要技術として幅広い観点から期待されており、技術マップ及びロードマップの該当箇所に明示している。また、iPS細胞研究の展開には、これまで取り組んできているES細胞及び体性幹細胞における知見が大いに活用されるものであり、我が国における幹細胞研究全体の加速が期待できる。

① 「画期的な医薬品・診断技術の開発」

創薬シーズの創出、バイオマーカーの探索、疾病状態における細胞内分子状態の把握等、画期的な医薬品及び診断技術の開発のために重要であると考えられる技術・機器。

具体的には、画期的な医薬品ターゲットや各種診断マーカー探索のために重要となるゲノム、プロテオーム、糖鎖、RNA等の生体分子とこれらの相互作用解析や、研究を支援する研究ツール・機器の開発といった診断・医薬品開発への応用に必要な技術開発が挙げられる。

② 「医薬品開発の効率化」

成功確率の向上、製造コスト低減、開発期間短縮等、医薬品開発の効率化のために重要であると考えられる技術・機器。

具体的には、医薬品開発の早期段階において毒性や薬剤有効性の評価に利用されるモデル生物系（iPS細胞から構築されるモデル細胞を含む）の構築、細胞ネットワーク解析、バイオマーカーの活用、化合物ライブラリーの充実、ファーマコゲノミクス等が挙げられる。

③ 「QOLの向上」

診断の正確さや早期性・簡便性を向上し、日々の健康状態を把握し、疾病状況に応じた適切な医薬品投与や治療を可能とする技術・機器、また、将来の疾患リスクを予測可能とし、日々の健康状態の把握により疾患を未然に防ぐ技術・機器。

具体的には、遺伝子情報と疾患との関連解明のための研究開発で得られた情報を有効に活用したバイオマーカーの同定、薬剤投与前に医療現場において安価かつ迅速に個人毎の疾患状態を詳細に診断するためのツールの開発と測定データの評価方法の標準化、薬物動態の個人差を考慮した薬効・毒性把握等が挙げられる。

④ 「日本の強みが活かせる技術分野の更なる強化」

日本における研究が進んでいる分野や他分野での技術力を踏まえた分野等、現在及び将来の技術競争力を保持する上で重要であると考えられる技術・機器。

具体的には、糖鎖、完全長cDNA、iPS細胞作製技術、発酵技術、中間体生産技術、微細加工技術等が挙げられる。

⑤ 「波及効果の高い技術」

他分野への波及も含め、波及効果の高い技術・機器。

具体的には、新たな研究領域として開拓されつつあり、画期的な医薬品開発への寄与が期待される機能性 RNA 等が挙げられる。

(3) 改訂のポイント

- バイオマーカーの利用のうち、バイオチップについて「データの標準化」を追加した。

Ⅲ. 技術ロードマップ

(1) 技術ロードマップ

技術マップで抽出された重要技術を中心として作成したロードマップにおいては、個別技術の進展を示すⅢ、「技術進捗」、技術の進展により得られる直接的な効果を上記の重要技術の分類のうち①～③毎に示したⅡ、「具体的効果」、及び、この「具体的効果」がもたらす医療現場における変化をⅠ、「医療現場における進展」として三段階に分けて整理した。

例えば、具体的効果の部分では、①2010 年にはがんの抗体医薬のターゲットがほぼ探索され、2025 年には自己免疫疾患や生活習慣病及び精神・神経疾患等の発症メカニズムがほぼ解明されているなど、種々の疾患に対する分子レベルでの解明が進むとともに、これを活用した医薬品の開発が進展することが予想される。②また、医薬品の臨床時のドロップアウトを低減する、ヒト臨床症状を反映した疾患モデルの作製技術の確立等により、医薬品の成功確率が現在の 5%程度から 2025 年には 50%程度まで向上するなど医薬品の開発効率の向上が予想される。③更に、早期診断・確定診断に有効な疾患マーカー、罹患リスク診断マーカー及び健康モニターマーカーが順次開発され、予防のための環境が整備されるとともに、1 つの診断ツールで複数の薬剤の薬効を評価できるなど 2015～2025 年には個々人の特性を踏まえた治療方法を提供するための技術の確立が見込まれる。

これらの技術的効果により、現在の治療を中心とした医療から、予防を重視した医療へと変遷し、また、病気になった場合であっても、現在、治療困難な疾患も含め、患者の体質・遺伝情報や病態に応じた個別療法の提供が可能になるなど、個別化医療が進展していると考えられる。

(2) 改訂のポイント

- 疾患モデル動物に「ヒト化マウスによる疾患モデル系の確立」を挿入した。

Ⅳ. その他の改訂のポイント

○ベンチマーキングの更新

- 研究開発投資額・企業数の各国比較を追加した。
- 国際競争力ポジションの改訂を行った。
- 参考資料に平成 21 年度健康研究関係施策内示額を追加した。

創薬・診断分野の導入シナリオ

現状(2009年)

2010年

2015年

2025年

健康維持増進

～「疾患を予防する」ことが幅広く行われ、病気になる人が減ると共に、健康産業が拡大される～

疾患の早期診断

～疾患の早期診断により、早期段階での治療を行い、より早く回復すると共に医療費増大が抑制可能となる～

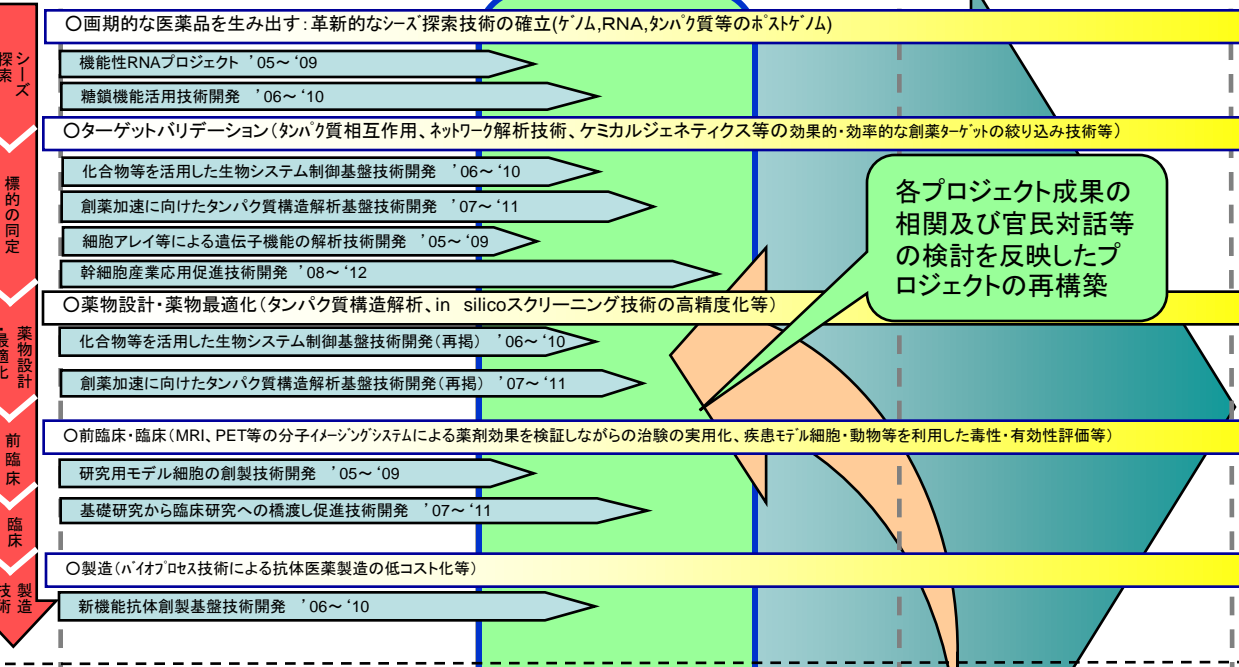
適切な治療法の提供

～治療がより低侵襲になり回復が早くなるとともに、患者の病状や個人差に基づき適切な治療法が選択できるようになり、治療効果の向上、QOLの向上が図られる～

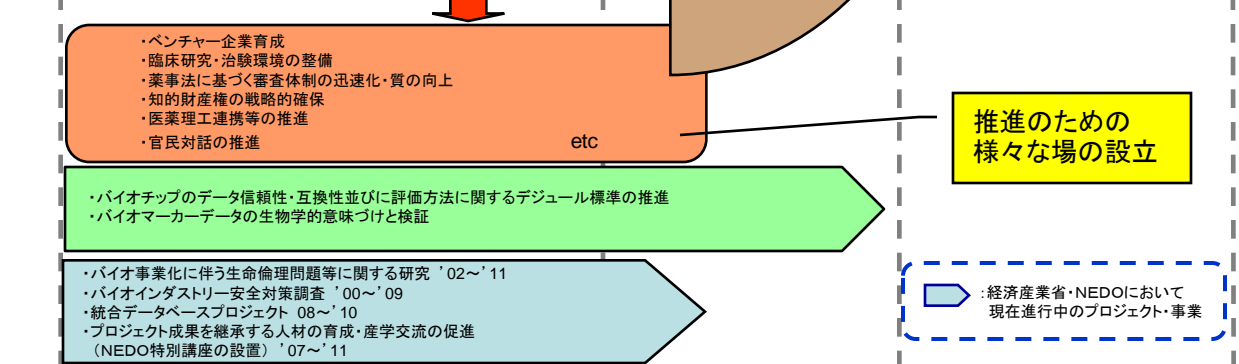
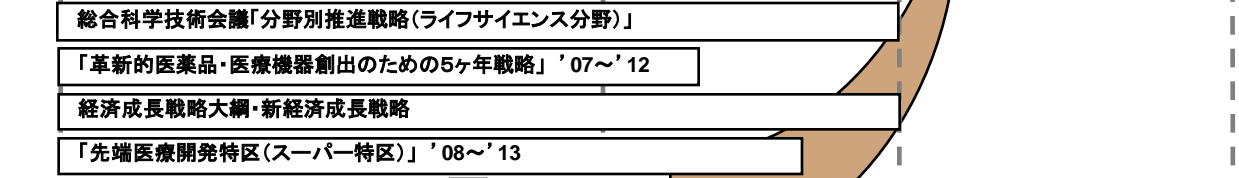
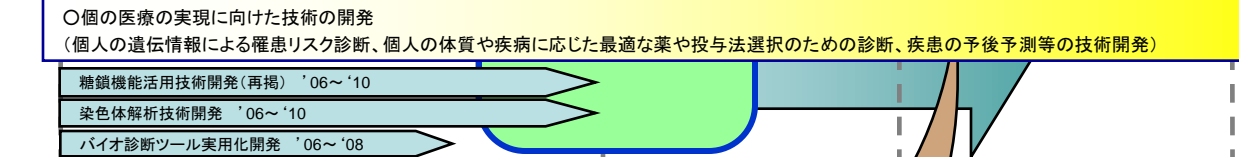
将来像

疾患別・目標	がん患者 5年生存率	60% (20%向上※1)
	<生活習慣病関連> ・糖尿病 ・脳卒中 ・心疾患	・発生率の20%改善※1 ・死亡率の25%改善※1 ・死亡率の25%改善※1
産業構造	創薬 創薬ベンチャーの増加 異業種参入の進展	創薬開発プロセスの分業化の進展
	健康 健康管理と医療の連携による健康サービス産業の創出	健康産業の拡大

※1:健康フロンティア戦略(2005年-2014年)による。



創薬パイプラインに即した基盤技術の確立



創薬・診断分野の技術マップと重要技術(1/2)

ニーズ

重要技術の抽出項目	凡例
画期的な医薬品・診断技術の開発	水色
医薬品開発の効率化	黄色
QOLの向上	ピンク
強みが活かせる技術分野の更なる強化	茶色・太字
波及効果の高い技術	下線・太字

*) マップ上、上記のいずれかの色がついている技術が重要技術

戦略1 より良い医薬品を生み出し、利用できるようにする

【革新的なシーズ探索技術の確立】

シーズ探索

○シーズを探索する方法としては、
 ・文献や学会発表の先行品調査から推測
 ・民間伝承療法(薬)調査から推測
 ・病態研究から明らかになった新規生理作用から推測
 ・ゲノム情報、新規疾患遺伝子から推測

【個別製品毎に特異的に見られる課題】

ターゲットハ'リデーション

○創薬標的タンパク質の同定方法としては、
 ・タンパク質の分離は二次元電気泳動法に依存する
 ・タンパク質の同定は伝統的な方法による
 ・遺伝子改変生物(ノックアウトマウスなど)も用い同定する
 ・評価用の標的タンパク質は、少量しか得られない
 ・ハイパフォーマンスを利用し配列情報検索、データマイニング'実施

低分子化合物の薬物設計・

○創薬標的タンパク質と反応する化合物の選別・最適化
 ・多数の化合物をスクリーニングし候補化合物を見出す
 ・試行錯誤的にリード化合物の最適化を行う
 ・薬物構造活性相関(SAR)を利用して薬物構造を設計する
 ・invitro invivo試験で薬効スクリーニングを行う
 ・研究者の経験や勘に負うところが多い

前臨床・臨床

○治療対象化合物の薬効/安全性の確認
 ・疾患モデル動物を用いて既存薬との効果/安全性を比較
 ・薬物動態試験の実施
 ・製剤技術の開発
 ・急性/亜急性/慢性など毒性確認技術の実施

製造技術

○最適な製造方法の確立
 ・化学合成法による製造技術を確立する
 ・発酵法による製造技術を確立する
 ・精製技術を確立する
 ・品質安定化技術を確立する

従来技術

★臨床データとゲノム研究の統合的推進による疾患メカニズムの解明

○遺伝子機能解析
 ・ゲノム解読(DNAシーケンサー、PCR、ゲノム・mRNA、ゲノムの多様性(SNP、欠失等)、エピジェネティクス、比較ゲノム)
 ・遺伝子操作・導入技術(マイクロインジェクション、ベクター、導入試薬、機能性RNA)

○疾患遺伝子の推定
 ・マイクロアレイ、SNPs、ゲノム・染色体構造解析
 ・SNPアソシエーション技術

○タンパク質の取得技術
 ・組換えタンパク質(動物細胞)
 ・無細胞タンパク質合成系
 ・ペプチド合成技術(修飾体・長鎖)
 ・新規原理に基づくタンパク質分離担体/手法
 ・特定機能分子の作出(ファージディスプレイ、キメラ抗体、ヒト抗体)

○タンパク質の機能解析
 ・発現頻度解析(マイクロアレイ、MS)
 ・相互作用解析(MS、プロテインチップ、SPR、クウォーツ、光学顕微鏡)
 ・一分子ソーティング技術

○タンパク質の構造解析
 ・結晶化技術
 ・タンパク質構造解析(電子・X線顕微鏡、NMR、X線レーザー、中性子線回折)
 ・データベース

○タンパク質修飾
 ・糖鎖解析・制御
 ・糖鎖付加部位の推定(特にムン型)
 ・タンパク質/ペプチドへの糖鎖付加技術

○代謝物
 ・メタボローム解析
 ○幹細胞操作技術
 ・幹細胞作製・樹立技術
 (iPS細胞、ES細胞、組織間細胞等)
 <幹細胞共通技術>
 ・特定細胞の培養・分離
 ・分化・培養(クローン技術、分化マーカー)
 ・分離(フローサイトメトリ、セルソーター)

○細胞活用関連技術
 ・遺伝子/タンパク質発現の検出、一分子計測
 ・細胞内外分子の機能(定性・定量)
 ・動態解析(蛍光・共焦点・全反射顕微鏡)
 1細胞解析)

○統合バイオロジー
 ・臨床インフォマティクス
 ・健康インフォマティクス

○研究基盤整備
 ・バイオリソース(サンプル、完全長cDNA、細胞株、微生物株、モデル生物等整備)
 ・各種データベース

★革新的な創薬コンセプトアプローチ技術の開発
 ○既存薬剤のマルチターゲット化技術
 ○ネットワーク創薬技術
 ・転写制御メカニズムの解析技術
 ○エピジェネティクス創薬技術
 ・環境・年齢要因などによる遺伝子発現
 ・RNA遺伝子
 ・メチル化、アセチル化解析技術

戦略2における活用

○標的タンパク質の同定・解析技術
 ・極微量タンパク質操作技術
 ・定量的質量分析
 ・同一遺伝子からのmRNAの多様性(SV、TSSなど)やゲノムの多様性(cSNP、欠失など)を考慮したタンパク質解析技術

○標的タンパク質探索効率化
 ・標的タンパク質構造解析技術
 ・分子間相互作用解析技術
 ・膜タンパク質の汎用的解析技術
 ・ケミカルジェネティクス
 ・解析用タンパク質の大量発現系構築
 ・翻訳後修飾の反映・活性を保持したタンパク質生産
 ・膜タンパク質等難溶性タンパク質無細胞合成系・汎用解析系
 ・疾患モデル細胞(疾患ヒトiPS細胞の活用等)
 ・細胞内ネットワーク解析技術

○糖鎖機能からのターゲット探索技術

○疾患特異的RNAの同定技術

○対象標的の同定技術

○体外細胞処理技術
 ○細胞機能測定技術
 ○特定細胞の分離・回収技術

○治療効果・副作用等評価技術

○標的タンパク質に最適な薬物設計
 ・構造多様性に富んだ化合物ライブラリの構築
 ・ケミカルライブラリーの化合物機能アノテーション
 ・ドッキングベースの in silicoスクリーニング
 ・低分子・タンパク質親和性解析技術
 ・疾患モデル細胞(疾患ヒトiPS細胞の活用等)

○標的タンパク質探索効率化
 ・標的タンパク質構造解析技術
 ・分子間相互作用解析技術
 ・膜タンパク質の汎用的解析技術
 ・ケミカルジェネティクス
 ・解析用タンパク質の大量発現系構築
 ・翻訳後修飾の反映・活性を保持したタンパク質生産
 ・膜タンパク質等難溶性タンパク質無細胞合成系・汎用解析系
 ・疾患モデル細胞(疾患ヒトiPS細胞の活用等)
 ・細胞内ネットワーク解析技術

バイオ医薬品の薬物設計・薬物最適化
 ○生体適合性と効果の最適化
 ・ナチュラルタイプに近い製剤を製造
 ・効果を向上させる技術は未完成

○免疫原性のないタンパク質創製技術
 ・抗原性を呈さないタンパク質創製技術
 ・ステルス技術
 ・ヒト型免疫モデル実験動物/実験系の開発
 ○人工タンパク質創製技術
 ・低分子化合物・ペプチド化技術
 ・Long Acting 化技術

○効果的な抗体の作製技術
 ・抗体の半減期の適正化
 ・低分子化、アブタマー化
 ・特異性の向上
 ・無細胞系での発現系、宿主の改良
 ・抗体の改変技術

○RNA配列設計技術
 ・サイレンシング効果の高い配列設計技術
 ・効果を高めるモディフィケーション技術

○遺伝子組換え細胞の作成技術(発現系、支援機器/試薬)
 ・迅速発現安定株
 ・発現調整技術(KO/KI/KD/OE)

バイオマーカーの同定
 ○バリデーション、アッセイ法に関する技術開発
 ○ファーマコゲノミクス進展のための薬物の生体内作用機構の解明
 ○薬物と生体タンパク質の相互作用データベース

○生体そのまま薬効効果を検証できるイメージング技術
 ○疾患モデル細胞・動物(疾患ヒトiPS細胞の活用等)を利用したヒトでの有効性・問題点評価技術
 ○薬物動態シミュレーション
 ○細胞・臓器モデル(健康ヒトiPS細胞の活用等)による薬物代謝および安全性評価技術
 ○投与方法変更技術(静注から経口へ)
 ○ターゲットへのデリバリーシステムの開発
 ・DDS等の新規投与法の開発

○品質(保存安定性)のための技術

○生体適合性と効果の最適化
 ・ナチュラルタイプに近い製剤を製造
 ・効果を向上させる技術は未完成

○治療用ベクター開発(組込部位の特定・遺伝子毒性の低減技術)
 ○細胞内への高効率導入技術
 ○siRNA、ncRNAの作用メカニズム解析

○安全性評価

○安全性評価

○安全性評価、品質管理

投与前診断ツール開発
 ○安価で迅速な疾患関連遺伝子多型等解析技術
 ○安価で迅速な細胞診断技術(遺伝子・タンパク質等の薬物標的分子・バイオマーカー)
 ○DNAチップの信頼性向上
 ○患者に負担をかけない生体試料採取法

○医薬品中間体製造のための発酵技術
 ○生合成・代謝変換遺伝子

○低コスト、高収率な生産系の開発
 ・発現系・発現宿主・培養技術開発
 ・糖鎖修飾制御

○低コスト、高収率な生産系の開発
 ・発現系・発現宿主・培養技術開発
 ○抗体製造の低コスト化技術
 ・動物細胞以外のヒト抗体産生の宿主開発
 ・精製技術開発

○天然糖質原材料の開発技術(糖質医薬品)
 ・グリコサミノグリカン糖鎖原材料製造技術

○細胞機能/細胞内の分子挙動の測定技術/機器・試薬
 ・In vitro 安全性(毒性)・代謝。薬効評価技術

○細胞タイピング技術
 ○移植後の長期安全性、トラッキング

○DNAワクチン技術
 ○感染診断・検査技術

診断ツール、診断キット

個の医療、健康安心社会の実現(個人に合わせた優れた治療法の提供・予防)・産業競争力の強化

・画期的な医薬品の迅速・効率的な提供
 ・薬剤パラエティの増加

個々人の特性に応じた使用方法の確立

健康で長生き
 病気になるたとしてもいち早く健康に戻りたい

1. 画期的な医薬品をいち早く生産できるようにする

2. 医薬品の最適な使用方法を確立する

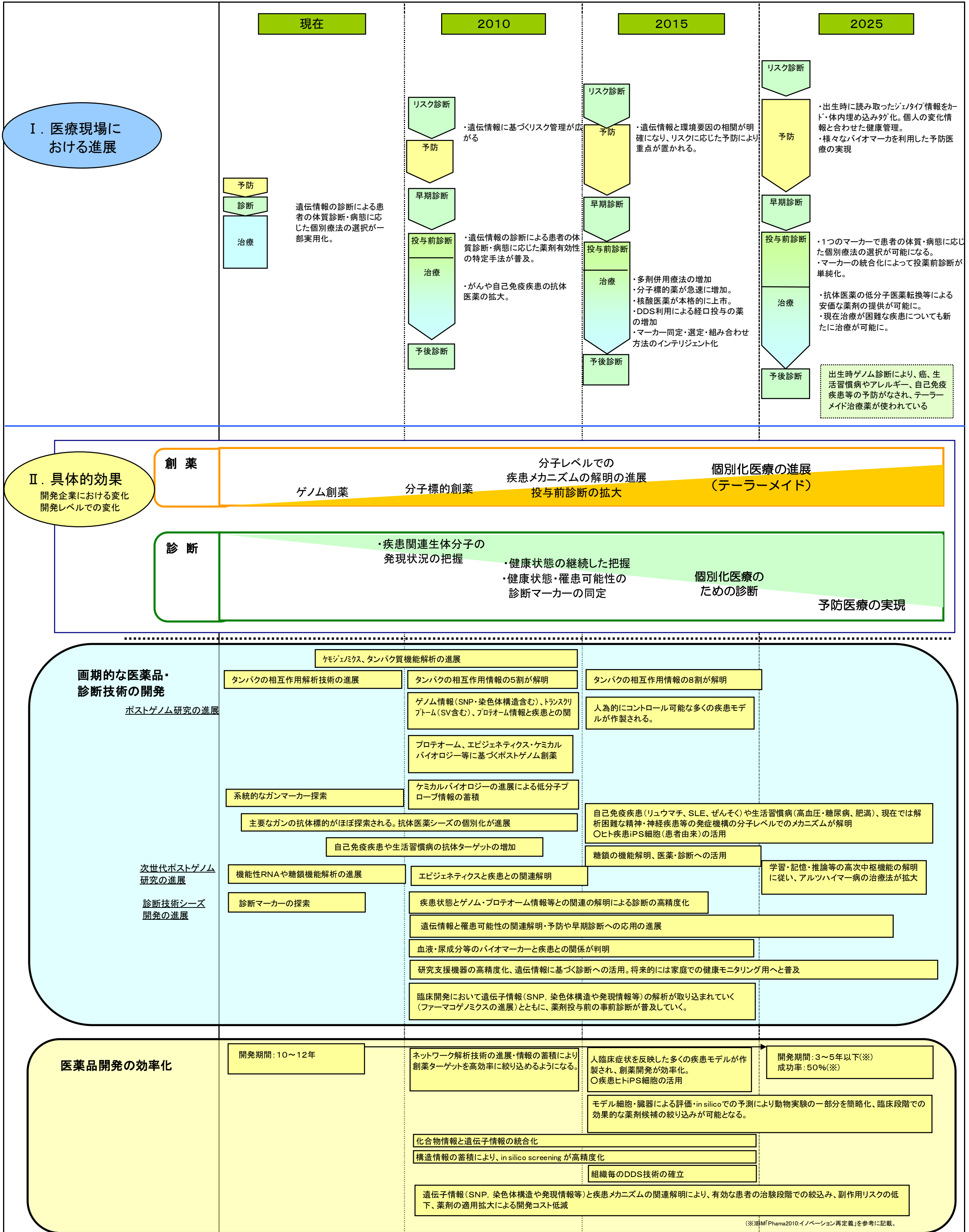
課題解決のための技術

様々なレベルの情報を統合し生命現象の解明へとつな

創薬研究開発前段階へのフィードバック

疾患状態の適切な把握に基づき薬剤評価

創薬・診断分野の技術ロードマップ



		現在	2010	2015	2025
医薬品の変化	低分子医薬	ゲノム情報に基づいた分子標的薬シーズの創製(標的:GPCR、核内レセプター、キナーゼ等)	より多くの疾患において、分子標的薬が活用されていく。	抗体医薬の機能を代替する低分子医薬実現	多くの疾患について低分子医薬が製造される。薬剤の適用拡大も進展。
	抗体医薬		ガンに対する抗体医薬がほぼ提供され、テーラーメイド型抗体治療が開始される。(例:個々人のガンの状態に合わせた抗体を処方できる)	パーキンソン・アルツハイマーに対する抗体療法が行われている。 抗体医薬の低分子化 DDS利用の抗体医薬(※)が上市される。(※:抗体そのものをDDSを利用して組織へ集中させる。) 細胞内分子を標的とする抗体が創製される。	
	核酸医薬		siRNAのサイレンシング機能を薬剤に利用 導入効率が良く、毒性が低いベクターが遺伝子治療に利用できるようになる。	RNAiの薬剤として使用が開始される。	
	(糖)タンパク医薬	バイオジェネリック(後発品)の上市	タンパク修飾技術やDDS利用の第2世代タンパク医薬への置換えが進む	プロテオーム情報に基づく新たなタイプのタンパク医薬が作られる。	
	糖質医薬				人工的グリコサミノグリカン医薬品
	細胞医薬		体外で分化させた細胞を用いた治療法が始まる。	遺伝子を改変した細胞を用いた治療が始まる。	特定の目的に応じて自在に細胞を制御できる技術が確立(人工臓器)
	ワクチン	細胞性免疫を誘導するワクチン開発(臨床試験開始)		免疫機能を増強制御する薬剤・方法が開発される。	生体防御機構の誘導を自在にコントロールできるワクチン
診断手法の標準化			検査対象マーカーのバリデーションによるEBD(科学的根拠に基づいた診断)が本格化	個別化医療への応用	
QOLの向上	利用の	診断情報をフィードバックし、医療情報と連携を図る			
	予防・早期診断	早期診断、確定診断に有効な“疾患診断マーカー(遺伝情報、タンパク、糖鎖情報等)”の開発	疾患メカニズム解析の進展により、罹患リスク診断に有効な“リスク診断マーカー”の開発が進展	遺伝的なリスクと生活習慣の相関解析の進展により、日々の健康管理に有効な“健康モニターマーカー”の開発が進展	
	最適な治療の選択	医薬品と診断薬の同時開発により、薬剤選択に有効な“薬剤応答性マーカー”の開発	単剤ごとの“薬剤応答性マーカー”	1つの薬剤応答性マーカーで複数の薬剤選択が可能なマルチマーカーの開発が進展	バイオマーカーの統合的利用 ・様々なバイオマーカーの組み合わせ利用 ・シミュレーションによる治療プロセスの医師と患者での共有化 ・臨床インフォマティクスの充実
	標準化の推進	検体の採取・保存・管理方法 測定データの評価方法 機器・試薬による新規測定方法 データ処理	遺伝情報に基づく薬剤投与前の副作用リスク・薬剤有効性の判定が普及	個人の時系列データの解析による基準値設定	
	ガンにおける分子標的薬	・分子標的薬に対応したマーカー数はほとんどない(現在10:グリベック、イレッサ、リツキサン、ハーセプチン等)		がん治療薬の5割に分子標的薬が登場し、マーカーの需要性が増す	がん治療薬の9割に分子標的薬が登場し、マーカーの需要性が増す
診断場所	検査センター		患者のそば(POCT)	生活の場で、自分でモニター	
検査対象	分子機能		細胞・臓器機能	個体機能	

	現在	2010	2015	2025
<p>Ⅲ. 技術進捗</p> <p>創薬(診断)</p> <p>【シーズ探索・ターゲットハリデーション】</p>				
シーケンサー	DNA解読技術の進展	現在の100倍の速度	現在の1000倍の速度:個人のゲノム解析が安価で可能に	疾患リスク把握・予防技術への展開
エピジェネティクス	癌との関連等、一部で機能が示唆される。	癌メカニズムとの関係説明	ターゲット分子のエピジェネティックな制御に利用	移植医療への応用
機能性RNA	in vitroでの転写制御に利用	創薬ターゲット同定への活用	特定遺伝子の転写・翻訳制御による治療の実施	
DNA・発現頻度等解析技術	研究用の基本技術が確立しつつある。データの互換性や機器毎のデータの一致率の低さに課題。	同時多項目診断チップの実用化 (コンテンツが順次増加するとともに、医療機関から家庭へと普及)	薬剤投与前の有効性・副作用診断ツールとしての活用が一部で実用化	●多くの疾患の効果判定がゲノム解析で可能となる。
プロテインチップ・抗体チップ	検出感度の向上・タンパク質発現技術等要素技術の開発	血液・尿中のバイオマーカーの同定のためのツールや診断チップとして利用	診察所で簡便かつ安価に活用される。	個人・家庭レベルでの罹患可能性把握・健康モニタリング機
タンパク質取得技術	・組換えや発現が一般化し成熟しているが、インクタンパク質の発現技術としては不十分。 ・無細胞合成系が実験室で実用 ・ペプチド合成技術が一般化し成熟	・発見・分離・精製技術が向上し、膜タンパク質/タンパク質の取得技術が確立 ・8割のタンパク質を取得	・(ヒト発現臓器と同等の糖鎖構造や修飾をもつ)天然型糖蛋白質の発現や合成が自由自在となり、自動化されている。	・必要に応じて患者別に治療に必要な治療薬を選択するための検査が可能(→「1分子ソーティング」の項)となり、「個の組換え体」がGMPで低コストで供給される。(ワクチン、抗体など)
分離担体・機器修飾	・合成担体等を利用した化学的クロマトグラフィーによる「分子群」ソーティング ・機械駆動型ポンプによる送液系 ・分光光学的モニタリング	・コンベンショナルな「分子群ソーティング」から「1分子ソーティング」への移行が模索され、実用化研究が進展。	・高速な「1分子ソーティング」が可能となり、生体分子は1分子毎に多数のパラメータ(サイズ、修飾、切断など)が解析され、その集合データによって特定の分子と病態との関連が調べられている。 ・用途によって、「分子群ソーティング」と「1分子ソーティング」が使い分けられる。	・「1分子ソーティング」が高速スケールアップされ、短時間で膨大な分子データの獲得が可能となり、個の医療・診断に活用されている。 ・極少量の検体から、同時に多数の分子について、それぞれ多項目パラメータの取得が可能となり、確定診断や健康管理に応用されている。
タンパク質相互作用解析	広範に解析中であり、いくつかの系では成果が出ている。	ハイスループット化・汎用性・検出効率・相互作用部位解析精度の向上	リアルタイムでタンパク質相互作用が1分子レベルで測定可能 (相互作用検出の蛍光プローブ等が進展)	
糖鎖機能解析	構造解析の基盤技術に目処	構造解析装置が普及。糖鎖解析が本格化、診断技術、バイオ医薬品評価等への実用化	ガン、感染症、免疫等の分野において糖鎖機能の幅広い応用が行われている。	
構造解析技術	膜タンパク質発現技術の向上 結晶化の効率化	・NMR・軟X線レーザー・中性子線・低温電子顕微鏡(高分子タンパク質への適用拡大) ・単粒子解析等新たな構造解析技術の進展	膜タンパク質以外については、一次構造から推定可能に。 タンパク質の動的な構造変化が観察可能になる。	・特別な施設や機器を保有しなくても、検査対象となる高分子の構造や修飾は、制限られたパラメータを取得してデータベースで検索可能。
メタボローム解析	・ヒト、モデル動物由来の細胞、組織、その他生体材料(血液、尿、唾液など)中の代謝物の網羅的解析で、病態や薬剤応答性(薬効、毒性)のバイオマーカーの探索が始まっている。	・ヒト臨床サンプルやモデル動物でのメタボロームのプロファイリングデータベースの蓄積とアルゴリズムの進展で、ヒトの疾患マーカーや動物モデル系(げっ歯類)におけるヒト臨床予測マーカーが数多く見出されている。	・ヒトおよびモデル動物でメタボローム統合データベースが完備する。	・ヒト生体サンプルのメタボローム解析で、即日の病態診断、薬剤応答性予測が可能となる。

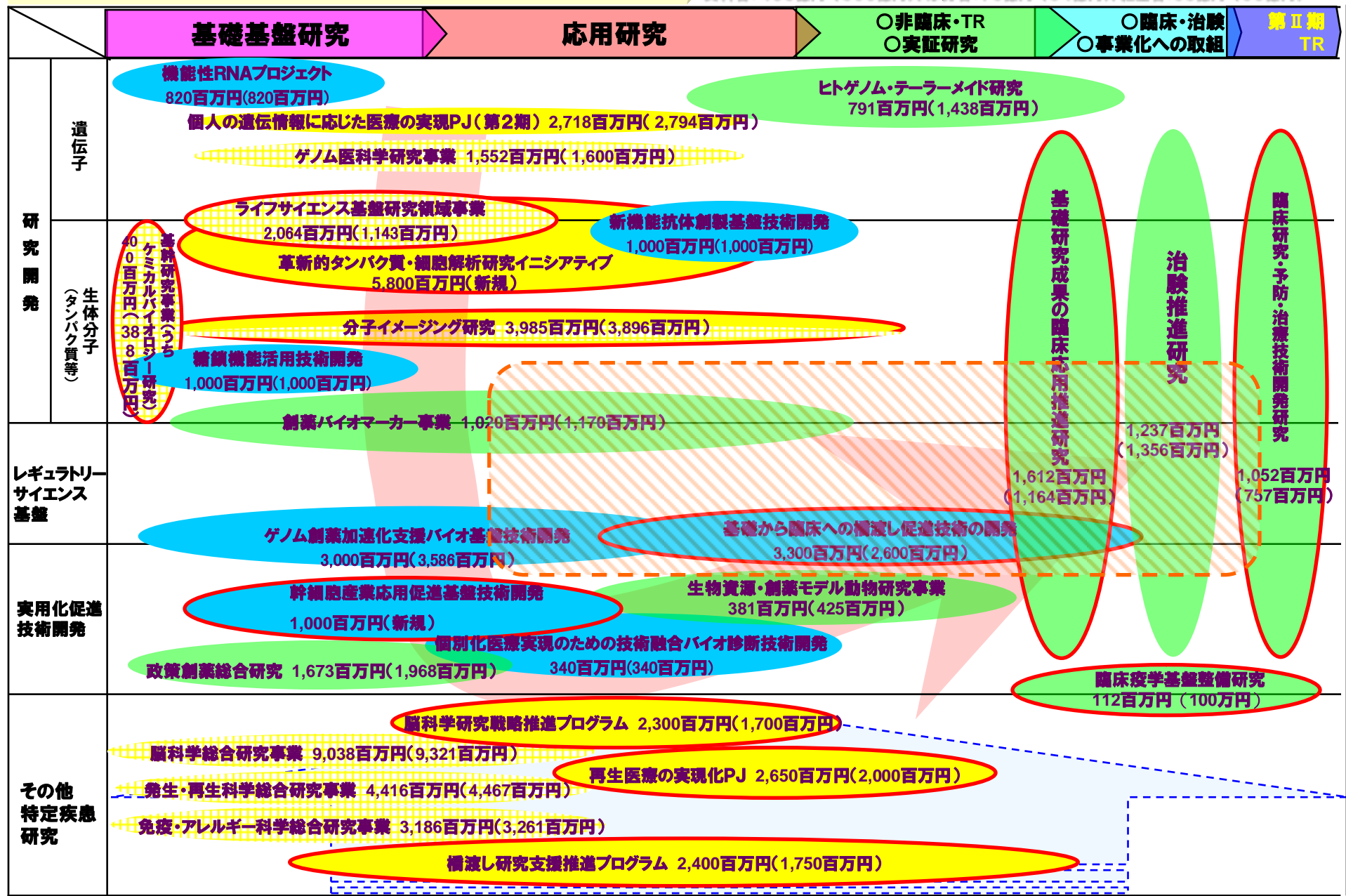
※「技術進捗」中の各枠の色は、「具体的効果」の「画期的な医薬品・診断技術の開発」(青)、「医薬品開発の効率化」(黄色)、「QOLの向上」(ピンク)にそれぞれ対応。
 ※「技術進捗」中の四角囲いは技術を、丸囲いは技術開発による成果を示す。
 ※下線で表記しているものは、ナノバイオ分野と関係の深い研究開発・技術要素を意味する。

	現在	2010	2015	2025
特定細胞・組織の培養・分離	<ul style="list-style-type: none"> ・浮遊細胞については、1細胞単位での分離が可能。 ・付着細胞については、レーザーを利用した特定細胞の分離が可能。 	<ul style="list-style-type: none"> ・性質を維持したインテグリティな細胞の分離培養が可能となりターゲット探索、薬剤開発が効率化される。 ・1細胞分離の全く新たな原理が登場。 		
疾患モデル動物・細胞系	<ul style="list-style-type: none"> 臓器モデル・細胞モデル(※)による創薬ターゲット絞り込み・ネットワーク解析(※)iPS/ES細胞等ヒト細胞による疾患モデル系の構築 多様な生物を活用した疾患モデル系の構築 ・疾患モデル数が少なく(特に霊長類)、データベースも不十分で、かつ統合されていない。 ・導入遺伝子の発現コントロールによる、疾患の程度の調節ができるモデル動物の開発は途上段 	<ul style="list-style-type: none"> ヒト化マウスによる疾患モデル系の確立 ・霊長類を含め、疾患モデル動物の作成技術の進展により、モデル数、種類が増加し、それら動物の維持・分与システムが確立される。 	<ul style="list-style-type: none"> 患者毎の性質を維持したインテグリティな細胞の分離培養が可能となる。 ・疾患モデルの動物種ごとのプロテオーム・メタボローム、メタボリズム(生理学的)解析法が確立し、系統化される。 	<ul style="list-style-type: none"> ・主要な疾患全てにおいてモデル動物が整備される。
細胞内ネットワーク解析 ／セローム	<ul style="list-style-type: none"> 細胞アレイによるネットワーク解析 セロミクス技術の進展 <浮遊細胞> ・1細胞単位での分析が可能。 ・レーザー光学系や高速演算系を備えたフローサイトメトリやセルソーターなどの設備が基幹施設で稼働 ・抗体磁気ビーズなどを利用した細胞の大量分離が可能。造血幹細胞移植などの移植細胞濃縮や不要細胞の除去が自動化、臨床利用。 ・一部に、診断目的で細胞膜マーカーや細胞内分子を定量的に測定。 ・移植細胞の品質管理に利用。 ・機器機材や消耗品となる試薬が高価で、運用が高コスト。 ・走化性因子の探索、走化性測定法の開発 	<ul style="list-style-type: none"> フローサイトメトリ用の機器開発元は、寡占状態から脱し、国内外各社で開発・市販される。特に低廉で小型な装置の実用化が始まる。 ・ハードウェアは次世代に移行し、より高速で安定な分離と解析が実現。 ・一細胞解析の全く新たな原理が登場。 ・抗体に依存しない細胞標識法や、分子標識法が登場し、実用化途上。 ・1細胞から多数(30以上)のパラメータが同時取得可能となっている。 ・走化性関連研究の成果として、細胞動態を指標とする創薬スクリーニングシステム開発 ・走化性関連研究の成果として、細胞動態制御薬の開発開始 	<ul style="list-style-type: none"> ・低価格のペンチトプ型のフローサイトメトリ装置が広く普及し、多様な疾患において細胞マーカーの検出類型や、定量化された臨床データが豊富に蓄積されている。 ・特定の表現型をもつ細胞に、1細胞単位で、核酸や蛋白質などを導入したり、機能を欠失する機能など、新たなモードが実現。 ・新たな原理に基づいた細胞解析装置や標識法、可視化法が実用化され、研究用に活用されている。 ・走化性関連研究の成果として、癌転移制御薬の開発 ・走化性関連研究の成果として、動脈硬化制御薬の開発 	<ul style="list-style-type: none"> ・個々の細胞の表現型と遺伝子型の参照データセットが揃っており、最少のパラメータセットを測定することによって、それぞれの細胞や細胞群、組織や臓器の運命や機能の変化について予測可能となる。 ・走化性関連研究の成果として、癌の転移の大半が薬により抑制可能に。
細胞内イメージング技術	<ul style="list-style-type: none"> 細胞内での各分子の挙動が平均値として検出されている。 分子間相互作用解析結果の生細胞内での検証 	<ul style="list-style-type: none"> 個々の分子の挙動がリアルタイムで解析可能になる。 分子イメージングのスループットの向上・高精度化によりスクリーニングに応用可能 	<ul style="list-style-type: none"> 1分子レベルでの解析可能 1分子レベルでの分子イメージングのスループットの向上・高精度化によりスクリーニングに応用可能。 	
臨床インフォマティクス	<ul style="list-style-type: none"> ・検査値の統合処理 ・多変量解析が一部で実施(卵巣癌) 	<ul style="list-style-type: none"> 情報の蓄積が可能となり、①シーズ探索に活用できる 血液・尿成分のバイオマーカーと疾患の関係が判明 ・テラーメイド医療の有効性の検証。 臨床データと各種omicsデータの統合 ・免疫ゲノム検査に至るまで ・検査方法の標準化・データの統一化が可能と 	<ul style="list-style-type: none"> ・臨床インフォマティクスデータが蓄積され、バイオマーカーのプロファイリングによるテラーメイド医療の治療が普及。 ・検査の多変量解析による効率化により、個人別基準値の設定・管理ができる 	<ul style="list-style-type: none"> 超早期発見、超早期診断が可能となり、罹患時点・罹患早期で治療が可能となる。 ・個人別の基準値データベースのカード化
【薬物設計/前臨床・臨床】				
<ul style="list-style-type: none"> ・ライブラリー構築、 ・化合物アノテーション、 ・低分子-タンパク相互作用解析 	<ul style="list-style-type: none"> タンパク質相互作用解析技術(Y2H, MS, タンパクチップ, SPR等) 化合物アノテーション・ケミカルジェネティクス HTS技術の進展 コンピケム・分子インプリンティング、構造多様性に富んだライブラリー構築 	<ul style="list-style-type: none"> in silicoと連携した化合物設計がハイスループットで可能に。 		
In silico スクリーニング	<ul style="list-style-type: none"> ・精度向上・情報量拡大により構造情報に基づいたドラッグデザインが可能。 ・複合体や標的タンパク質の相互作用も含めたスクリーニング 	<ul style="list-style-type: none"> 細胞機能をシミュレート可能なバーチャルスクリーニング技術が確立 	<ul style="list-style-type: none"> コンピュータ上での薬剤設計 	
抗体作製技術	<ul style="list-style-type: none"> 抗体の特異性向上・製造コスト低減技術 宿主の多様化 低分子化・アプタマー化 		<ul style="list-style-type: none"> 細胞内タンパクをターゲットとする抗体医薬の作製技術が確立 	
細胞医薬	<ul style="list-style-type: none"> 体外での細胞の分化制御技術 	<ul style="list-style-type: none"> 免疫原性の低い細胞の創出 	<ul style="list-style-type: none"> 疾患状態や外部刺激に応じて効用や細胞機能が制御できる細胞医薬 	
核酸医薬	<ul style="list-style-type: none"> siRNAを活用した核酸医薬開発におけるベクターの開発 	<ul style="list-style-type: none"> 導入効率が高く、毒性が低いベクターが遺伝子治療に利用できるようになる。 		
ヒト細胞による毒性・有		<ul style="list-style-type: none"> 細胞チップ技術とモデル細胞・臓器との組み合わせ 		
生体そのまま薬剤効果を検証できるイメージング技術		<ul style="list-style-type: none"> 情報のデジタル化による網羅的解析・スループット向上 動物実験に適用するための分解能の向上・小型化 		
薬物動態シミュレーション	<ul style="list-style-type: none"> 半減期・変異原性については簡単に分かる。それ以外で課題がある。候補化合物を実際にアッセイせずに評価できるようにする。既に設計の段階でどの酵素に代謝を受けるかは織り込んだ上で開発が進展している状況。 	<ul style="list-style-type: none"> in silicoでの予測による動物実験の簡略化 	<ul style="list-style-type: none"> 個人差も反映したシミュレーションが可能になる(試験の対象の選択にも利用可能) 	

※「技術進捗」中の各枠の色は、「具体的効果」の「画期的な医薬品・診断技術の開発」(青)、「医薬品開発の効率化」(黄色)、「QOLの向上」(ピンク)にそれぞれ対応。
 ※「技術進捗」中の四角囲いは技術を、丸囲いは技術開発による成果を示す。
 ※下線で表記しているものは、ナノバイオ分野と関係の深い研究開発・技術要素を意味する。

		現在	2010	2015	2025
DDS (低分子・抗体)		<ul style="list-style-type: none"> ・ターゲティング、持続時間延長、溶解温度の改善等々、要素技術が多い。 ・ガンの場合はターゲティングが主要課題 ・ガン以外においては抗体医薬もデリバリーが課題 	<ul style="list-style-type: none"> リポソーム型の一部実用化、様々な接着因子の利用 ①低分子をリポソームに包み、膜上に抗体を入れることでターゲティング ②がん細胞と正常細胞内での代謝酵素の活性の差を利用する手法も存在。これらが実用化されていく。 	<ul style="list-style-type: none"> DDS利用抗体の実用化 細胞を利用した運搬技術が進展(タンパク医薬、抗体医薬) 	
	DDS (核酸)		<ul style="list-style-type: none"> (共通) プラッドブレンバリア(BBB)の制御 導入効率が高く、毒性が低いベクターが遺伝子治療に利用できるようになる。 siRNAのサイレンシング機能を薬剤に利用 	<ul style="list-style-type: none"> RNAiの薬剤としての使用が開始 	
【製造技術】		<ul style="list-style-type: none"> バイオロジクス製造技術の改良(宿主:ウシ・ニワトリ・植物や糖鎖改変技術等) バイオロジクス製造技術の改良(分離精製技術・大量生産・低コスト化) 			
診断	【検査手段の開発】				
	ゲノム診断装置	<ul style="list-style-type: none"> ・DNAシーケンサーを利用 ・SNP解析が実施されている。 	<ul style="list-style-type: none"> ・疾患別解析ゲノムの統一化 ・解析装置の小型化・高速化 	<ul style="list-style-type: none"> 異型・多型を含めた個人レベルでの遺伝子情報解析 	<ul style="list-style-type: none"> 個人データのカード化・体内埋め込み型
	タンパク質診断装置	<ul style="list-style-type: none"> 一般生化学検査では、化学的多項目自動測定が可能。 	<ul style="list-style-type: none"> 質量分析装置に定量性を付加する技術の開発 	<ul style="list-style-type: none"> ・定量的MSの普及 ・蛋白質/糖/核酸などの広範囲なマーカー検出に定量的MSが利用される。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ベンチトップ/ベッドサイドMSの開発 ・生体1分子毎に多項目(サイズ、修飾、切断など)が、同時計測可能となり、集合データによって特定の分子と病態との関連が調べられる。
	代謝物診断(メタボローム解析)装置	<ul style="list-style-type: none"> 分子特異的定量分析では、RIAやELISA。 	<ul style="list-style-type: none"> GC-MS、LC-MS、CE(キャピラリー電気泳動)-MS、NMRの活用により、多くの代謝物種の網羅的解析が可能 	<ul style="list-style-type: none"> すべての代謝物種の網羅的解析を可能とする、定量的・高感度解析手法が開発される。 	<ul style="list-style-type: none"> ベンチトップ/ベッドサイドで使用可能な低コスト化解析装置が開発される。 メタボロームデータベースの蓄積、アルゴリズムの進展で、オールインワン型病態診断装置が開発される。
	細胞診断装置	<ul style="list-style-type: none"> 光学的分子標識が必要/細胞膜分子 FCM:1細胞計測(散乱光・蛍光) ・高額大型装置(海外製寡占) ・高コストな運用 ・診断/臨床利用は限局(主に研究) 	<ul style="list-style-type: none"> 蛍光標識法が多様化/細胞内分子 FCM:1細胞計測(散乱光・蛍光) ・高性能高額機と低価格機の二極化 ・既存機器の低価格小型版が普及 ・診断/臨床利用へ展開 	<ul style="list-style-type: none"> ・ポストソーティング解析技術の融合 ・1細胞動的解析技術(*)の適用 ・非標識による細胞分子同定が可能 FCM/CS高性能低価格機の普及 ・診断/臨床ベッドサイドで常用 	<ul style="list-style-type: none"> ・浮遊細胞・付着細胞の双方について、1細胞の動的変動 多変量パラメータ ・細胞表現型と遺伝子型のプロファイリングデータによって、細胞/組織/臓器の運命や機能変動の予測が可能 ・1分子計測・1細胞計測が高速かつスケールアップされ多変量パラメータを高速演算が可能となる。 ・これにより、表現型と遺伝子型のプロファイリングや疾病/病型/疫学的データとの連鎖解析が可能となる。 ・その後、出力の単純化により、細胞/組織/臓器/個体の運命を予測可能となり、確定診断個の健康管理に活用
	細胞診断装置	<ul style="list-style-type: none"> ※FCM:フローサイトメトリ 1分子計測技術装置の発展と普及 ・標識法(高寿命蛍光・蛍光/分子プローブ) ・細胞内分子標識法 ・高出力半導体レーザー ・装置(顕微鏡装置/検出器/制御装置)の単純化と低価格化 ・新原理の出現 細胞機能改変技術の進展(核酸、蛋白質等の無毒性 高効率導入、機能発現/機能抑制/刺激付加) 	<ul style="list-style-type: none"> 分子群分離から1分子ソーティングへ 	<ul style="list-style-type: none"> 1分子ソーティングと1分子解析の融合 	<ul style="list-style-type: none"> 1分子計測値の集積により、特定分子群の特性を把握
細胞診断装置	<ul style="list-style-type: none"> 化学的クロマトグラフィーや電気泳動法による分子群分離～分子群モニタリング 	<ul style="list-style-type: none"> 診断ターゲット分子(タンパク質)の自在な創製 	<ul style="list-style-type: none"> 診断ターゲット分子(タンパク質)の自在な創製 	<ul style="list-style-type: none"> 1分子計測値の集積により、特定分子群の特性を把握 	
バイオチップ	<ul style="list-style-type: none"> 共通基盤 マイクロfluidicチップ ・サンプルの微量化 ・操作の簡便化 ・検査時間の短縮 	<ul style="list-style-type: none"> ナノfluidicチップ(20マーカー、100検体同時測定) マルチ解析の臨床応用(100マーカー以上、非標識検出) ・人工リガンド 	<ul style="list-style-type: none"> 統合バイオチップ:確定診断精度の飛躍的向上 複数のマーカーを利用して、1つの疾患の診断精度を向上 マルチバイオチップ 1つのバイオチップで複数の疾患を同時診断 パネル化して利用普及 	<ul style="list-style-type: none"> パネル化して利用普及 	
核酸	DNAチップの実用化	抗体チップの実用化	プロテインチップの実用化	セルアレイの実用化	ティッシュアレイの実用化
細胞					
組織					
【検査基盤】					
バイオインフォマティクス	<ul style="list-style-type: none"> 臨床情報のデータベース化進展 ・タムの統一 ・画像データのストレージ ・データベース間の相互利用の実現 ゲノム情報の統合化 	<ul style="list-style-type: none"> 臨床情報とゲノム情報の統合プラットフォーム化 ニュートリジェノミクスデータの整備 遺伝子と食品の関係が明らかとなり、リスクに合わせた食生活の選択が可能になる。 ネットワークの拠点構築 多様性をもったゲノム情報の取得 高速で高精度な多変量解析技術の進展 	<ul style="list-style-type: none"> コンピュータ健康支援システムの普及 診断支援に活用 	<ul style="list-style-type: none"> 個別化された健康管理手法の確立 	
標識法、標識物質、可視化	<ul style="list-style-type: none"> ・蛍光発光感度(ng) ・BKGの抑制剤が一部開発されている(MPCホリマー)。 ・病理標本のテレメディスン化が一部実施され 	<ul style="list-style-type: none"> 蛍光発光の感度UP (→fg) 	<ul style="list-style-type: none"> 標識体及び検出機器の改良により感度が更に向上し、複数の標識体が同時に使用可能(100マーカー)となりコストダウンする。 病理標本の画像解析システムが一般化 		
非標識解析技術	<ul style="list-style-type: none"> ・安定同位体による解析が研究レベルで使用されている。 	<ul style="list-style-type: none"> MS・MSの解析能があがり感度向上する。 	<ul style="list-style-type: none"> ベンチトップMS・MSの開発により普及 定性的検査から定量的検査へ 		
検体採取、検体処理	<ul style="list-style-type: none"> 侵襲度の低い検体採取技術の開発 汗、呼吸、尿、唾液などの侵襲度の低い検体の利用技術 抽出方法が施設・項目により異なる。フィルター上でDNA保存(標準化迄至っていない) 	<ul style="list-style-type: none"> DNA・RNA抽出の標準化 保存・輸送技術の一般化 	<ul style="list-style-type: none"> 保管する上での倫理規定を整備 		
共通基盤	<ul style="list-style-type: none"> バイオリソース (cDNA、微生物、動植物、モデル生物等) データベース整備(ゲノム、cDNA、SNP、ハプロタイプ、発現頻度、細胞内局在等の情報の統合化) 				

※「技術進捗」中の各枠の色は、「具体的効果」の「画期的な医薬品・診断技術の開発」(青)、「医薬品開発の効率化」(黄色)、「QOLの向上」(ピンク)にそれぞれ対応。
 ※「技術進捗」中の四角囲いは技術を、丸囲いは技術開発による成果を示す。
 ※下線で表記しているものは、ナノバイオ分野と関係の深い研究開発・技術要素を意味する。



革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略の概要

<参考資料2-1>

平成19年4月

平成20年5月(改定)

平成21年2月(改定)

内閣府・文部科学省

◎厚生労働省・経済産業省

世界最高水準の医薬品・
医療機器を国民に提供

医薬品・医療機器産業を日
本の成長牽引役に

日本先行開発・日本参加の世界同時開発を目指した施策群

①研究資金の集中投入

- ・医薬品・医療機器関連予算の重点化・拡充
- ・産官学による重点開発領域等の調整組織の設置
- ・研究開発税制の充実・強化
- ・先端医療開発特区における研究資金の統合的・効率的な運用の方策の検討
- ・先端医療開発特区に関連する研究資金の重点化・集中配分等

②ベンチャー企業育成等

- ・研究資金の拡充
- ・施設や機器の共用化等
- ・企業化支援体制の整備、OB人材の活用、相談窓口の充実等
- ・エンジェル税制の活用等に関する支援施策の拡充
- ・バイオベンチャーの国際展開支援の実施
- ・国民経済上重要な新技術の企業化開発の推進
- ・審査手数料の支援検討
- ・医療機器の部材提供を活性化する方策の検討

③臨床研究・治験環境の整備

- ・国際共同治験の推進
- ・国立高度専門医療センターを中心に産官学が密接に連携して臨床研究を進める「医療クラスター」の整備
- ・橋渡し研究拠点、再生医療拠点、臨床研究体制の整備
- ・医療クラスターを中心とした治験の拠点化・ネットワーク化・IT化
- ・医師や臨床試験を支援する人材の育成・確保
- ・医師等の臨床業績評価を向上させるための取組
- ・臨床研究の規制の適正化の推進
- ・中央IRB機能等を有し、高度な国際共同研究が実施可能なグローバルな臨床研究拠点の整備
- ・先端医療開発特区における研究開発側と規制担当との開発段階からの並行協議の場の設置

④アジアとの連携

- ・重要な疾病について共同研究推進
- ・東アジアで収集されたデータの活用方法の共同研究

⑤審査の迅速化・質の向上

- ・新薬の上市までの期間を2.5年間短縮(ドラッグ・ラグの解消)
- ・審査人員を倍増・質の向上(3年間で236人増員)
- ・承認審査の在り方や基準の明確化、GCPの運用改善
- ・全ての治験相談にタイムリーに対応できる体制の整備
- ・日米欧審査当局との間での共同治験相談の導入の協議
- ・新医療機器の承認までの期間を19ヶ月短縮(デバイス・ラグの解消)
- ・医療機器審査人員の増員・質の向上(5年間で69人増員)
- ・新医療機器・改良医療機器・後発医療機器の3トラック審査体制を導入し承認審査の合理化を促進
- ・医療機器の相談業務の質・量の向上
- ・医療機器GCPの運用改善

⑥イノベーションの適切な評価

薬価制度等における革新的な製品のより適切な評価等

⑦官民対話

関係省・研究機関・産業界の連携強化

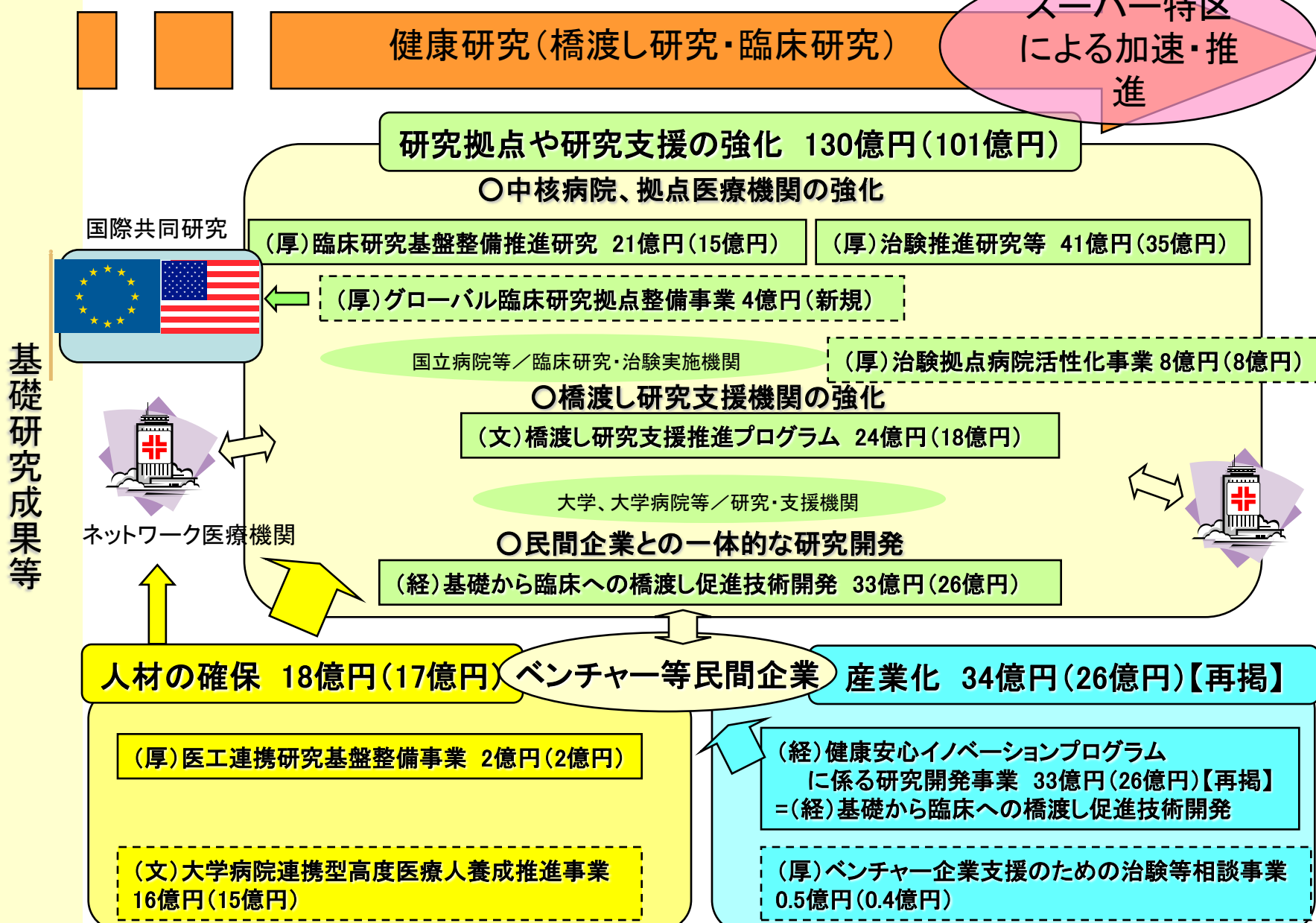
定期的な官民対話の実施

平成21年度健康研究関係施策 148億円 (118億円)

<参考資料2-2>

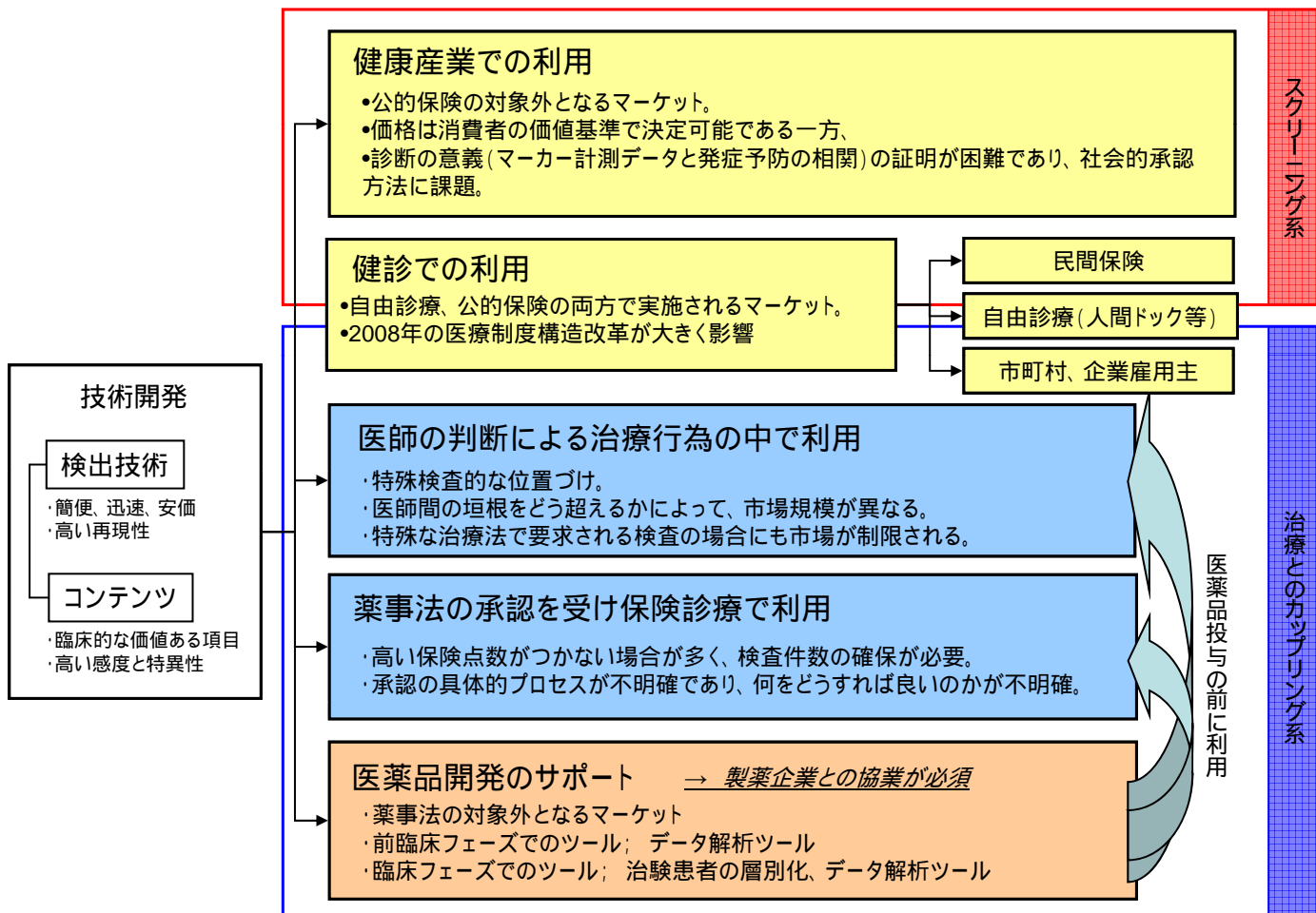
国民への画期的治療薬・医療機器・医療技術の迅速な提供

平成21年度各省予算のうち、健康研究推進研究にかかるものの額

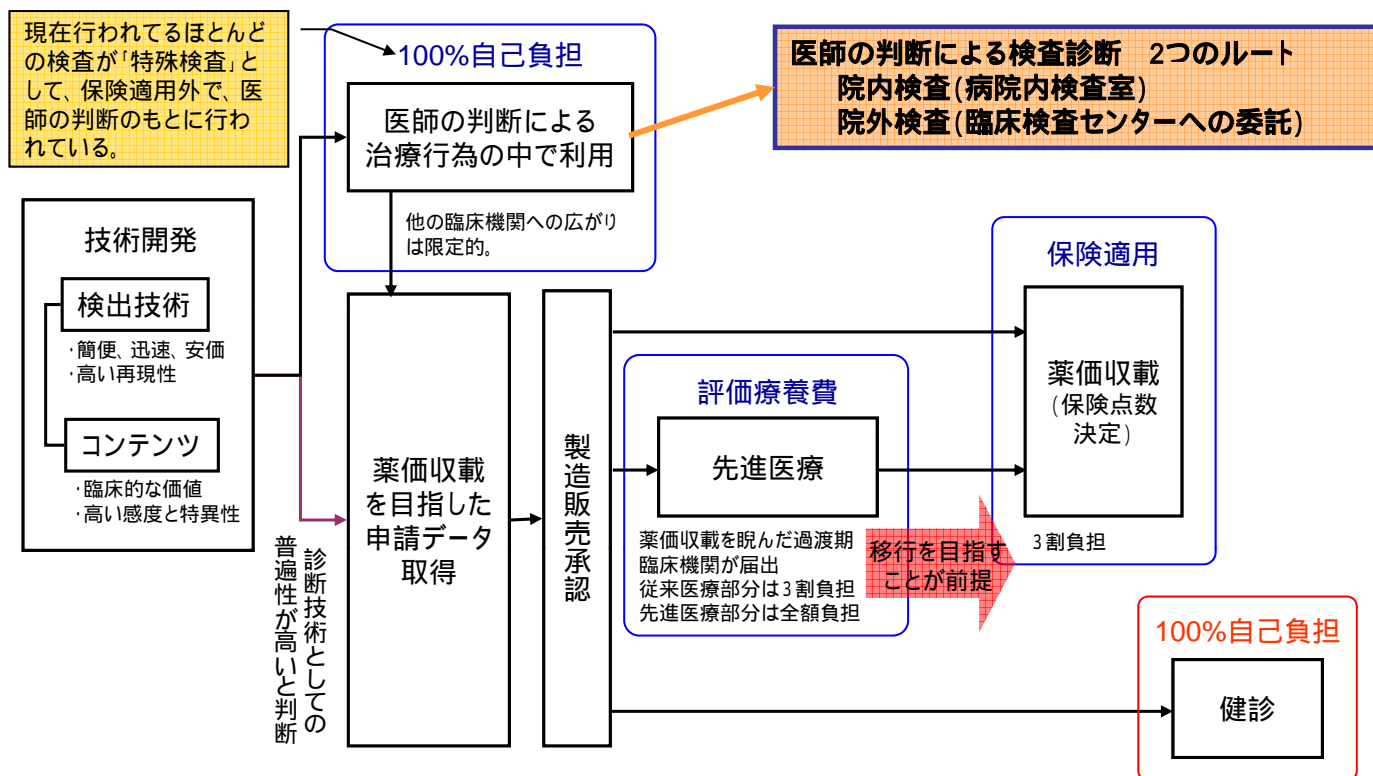


※平成21年度健康研究概算要求方針に基づく施策のうち、□:科学技術振興費 □:科学技術振興費以外。()内は、昨年度予算額。

検査診断技術のビジネスエリア



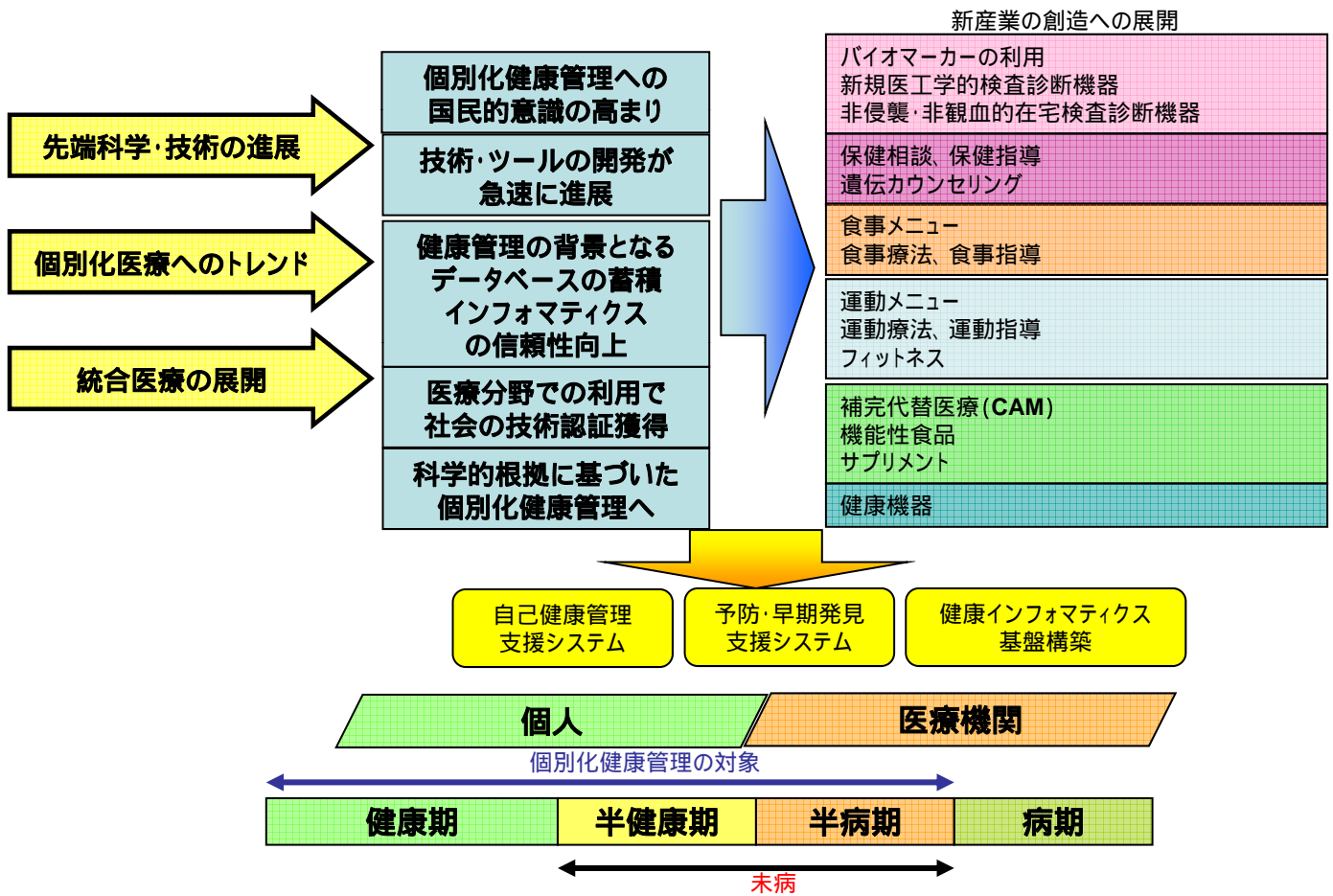
医師による臨床現場での利用



市場化までの時間



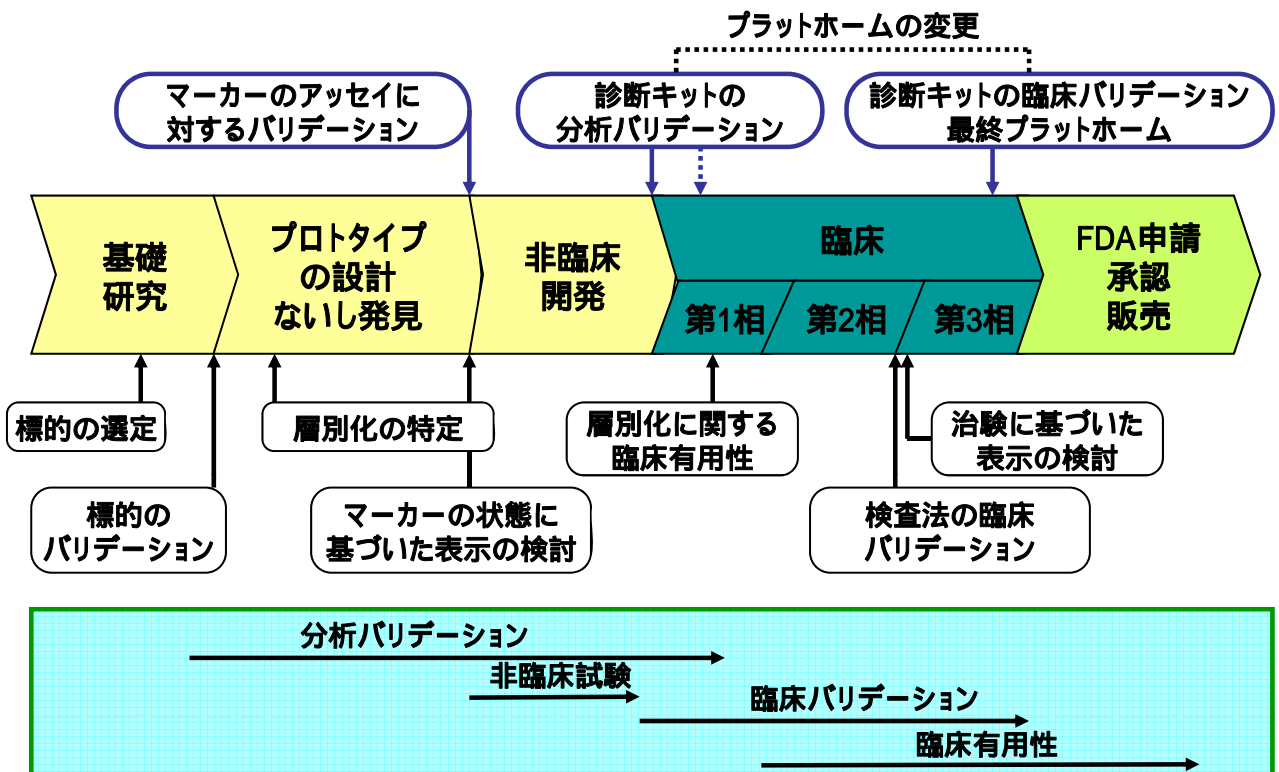
健康産業での利用



医薬品開発のサポート

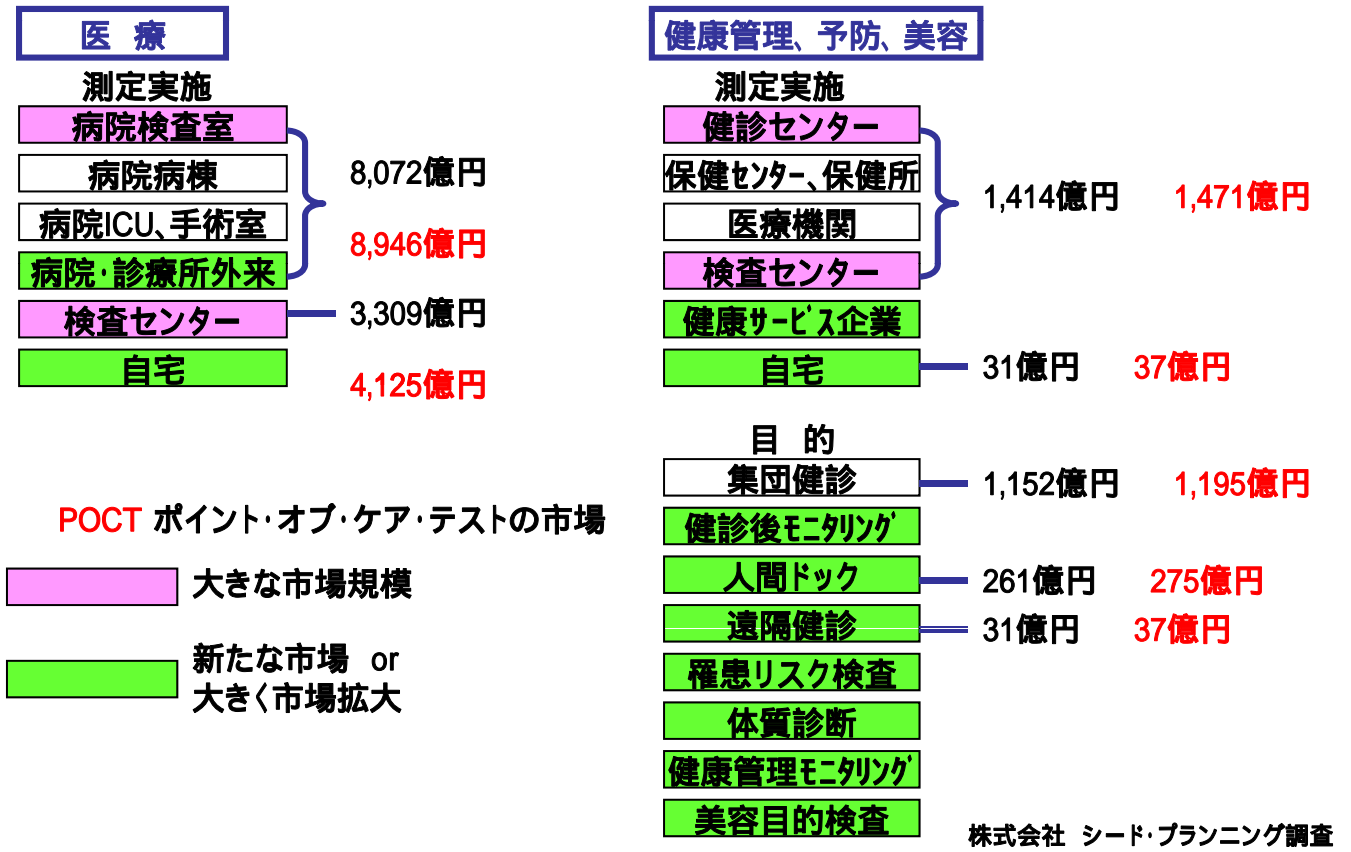
製薬企業との協業が基本

米国FDAが2005年4月のConcept Paperで提案している「医薬品と診断法の一体化開発」の考え方



検査診断市場の動向予測

(現在 10年後)



診断技術の利用場面

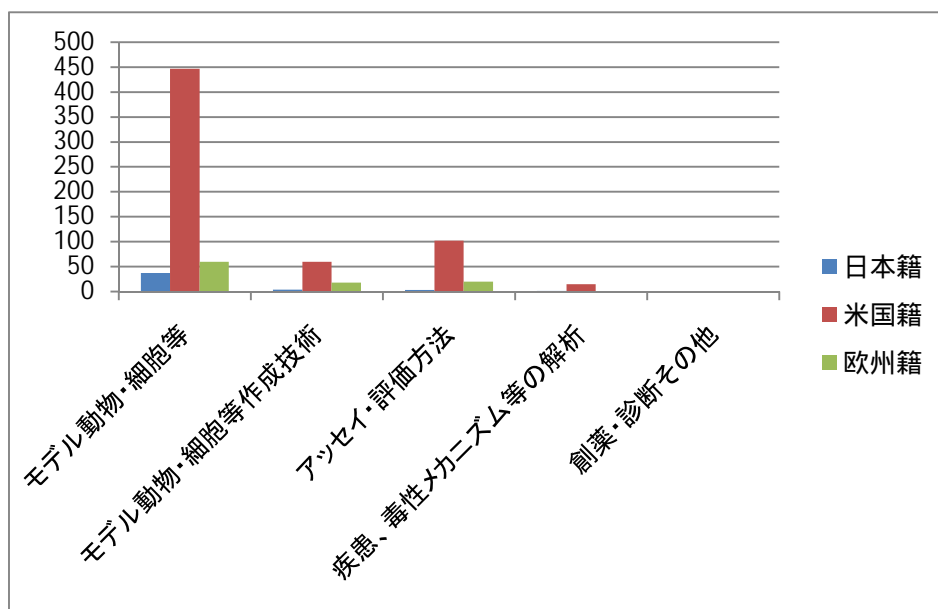
		診断の種類	試料及び測定対象	効果	診断技術	
家庭		罹患リスク診断	口内粘膜、血液など	多型	ゲノム塩基配列情報の多型による個人の体質を把握。ゲノムの多型情報及び疾患情報の相関を解明することが必要。	ゲノムシーケンス、インベーターアッセイ、DNAチップなど
		健康管理診断	汗、尿、唾液、呼吸、血液など	タンパク質、二次代謝産物など	罹患リスクに基づき個人毎のリスクに応じた健康管理をサポート。	イムノアッセイ、タンパク質チップなど
医療機関		健康診断 (早期発見)	血液、尿、呼吸など	mRNA タンパク質、糖鎖、プロファイリングデータ	日々の健康管理や、健康診断などの定期検診に、年齢に応じた診断項目が追加され、疾患の早期発見に向けたファーストスクリーニングをサポート。	DNAチップ、イムノアッセイ、RT-PCR、質量分析装置など
		確定診断 (治療方針決定のサポート)	血液、疾患組織	mRNA、タンパク質、糖鎖、ゲノム構造など	疾患関連遺伝子の発現プロファイル解析や、疾患特異的なタンパク質などの生体分子の検出、画像情報を用いて疾患の種別や性質を特定。臨床情報との連携で最適な治療方針の決定サポート。	PET、CT、MRIなどのモダリティ 組織染色、RT-PCR、質量分析技術、DNAチップ、タンパク質チップなど
医療機関での臨床用途	薬物投与前診断	投与量	口内粘膜、血液など	多型	肝臓の薬物代謝酵素の多型等に応じた用量決定による副作用回避。	ゲノムシーケンス、イムノアッセイ、DNAチップなど
		疾患組織	疾患組織	タンパク質など	薬剤の送達や取り込み能力などのトランスポーターの多型による用量決定で副作用回避。	
	奏功性	疾患組織	疾患組織	ターゲット分子、プロファイルデータ	薬が効くか効かないかを個人毎の病状や体質に応じて選択し、投与。	イムノアッセイ、組織染色、タンパク質チップなど
	予後診断	血液	タンパク質、二次代謝産物など	治療効果や快復状態を診断し、適切な予後管理をサポート。	DNAチップ、イムノアッセイ、RT-PCR、質量分析装置など	
<p>医薬品開発から得られた知見を活用し、診断目的にマッチしたバイオマーカーを選択</p>						
	医薬品の開発過程	血液、疾患組織	mRNA、タンパク質、プロファイリングデータ	開発中の新薬の薬理メカニズムに基づき、薬が効く患者を選択し、臨床試験を行う。	DNAチップ、質量分析装置、タンパク質チップなど	

創薬・診断分野の国際競争ポジション

～平成 19 年度特許出願動向調査報 幹細胞関連技術～

近年 iPS 細胞で話題になっている幹細胞関連技術について、米国への産業応用特許出願を国籍別にみると、創薬・診断分野では米国籍、欧州国籍の出願が圧倒的に多いことがわかる。我が国では今後、iPS 細胞を活用した創薬ビジネス・再生医療ビジネスの創出が期待されているが、産業化へのハードルは高く出遅れた形となっている。

図 幹細胞関連技術の創薬・診断分野における国籍別出願数（米国への出願）



1980 年～2005 年（優先権主張年）のデータをもとに作成

出典：平成 19 年度特許出願動向調査報告書 幹細胞関連技術

添付資料③

プロジェクト基本計画

(健康安心イノベーションプログラム)
「ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発」
モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発／研究用モデル細胞の創製技術開発」
基本計画

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

本研究開発は、創薬に資する基盤技術の開発、再生医療の確立、医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の提供を実現し、個の医療を通じた健康寿命の延伸、生活の質の向上を図り、今後、成果に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現をめざすことを目的とする「健康安心イノベーションプログラム」の中の「ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発」の一環として実施する。

製薬産業界では、ライフサイエンス研究における近年の技術的な発展によって蓄積されたゲノムの塩基配列情報や遺伝子発現情報、タンパク質の立体構造情報、タンパク質と低分子化合物の相互作用情報など、様々な情報を活用するゲノム創薬によって創薬プロセスを効率化し、安価な医薬品を迅速に上市することが可能となると期待されていた。

しかし、実際には投入する研究開発費が年々増加していつているにも関わらず、上市される医薬品の数はむしろ減少しており、ゲノム創薬におけるギャップが生じている。これは、近年のポストゲノム研究の進展により見出された創薬ターゲット候補から真の druggable gene を絞り込むことが困難であることや臨床試験以前での新薬の安全性評価及び薬理評価の制度が十分でないことが一因と考えられる。創薬プロセスの後期である臨床試験において薬剤候補がドロップアウトしてしまうと、それまでに投入した開発費が回収困難となってしまうことから、創薬プロセスの早い段階から効率的に創薬ターゲットを絞り込むための新規な技術の開発が重要な課題である。

本研究開発は、均質な遺伝的背景を有し、無限に増殖できるとともに、あらゆる細胞組織に分化できる多能性を有するヒト ES 細胞（ヒト胚性幹細胞）を対象に、遺伝子の相同組換え、RNA 干渉による遺伝子サイレンシング技術等を用いてヒト ES 細胞を加工し、様々な分化誘導因子を用いて分化誘導を制御する基盤技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能や細胞内ネットワークの解明、薬剤候補の安全性の向上といった創薬の基盤研究に資する研究用モデル細胞の創製を行うことを目的とする。

これにより、遺伝子機能・ネットワークや疾患メカニズムの解明を効率的に行うとともに、ヒト生体内において薬剤候補が示す反応を、従来に比べ、より高い精度で予測することが期待されるとともに、それによって新薬の安全性と医薬品開発の効率を向上させ、医薬品の迅速かつ安価な提供、高齢化社会における国民医療費の高騰化を抑制すると同時に、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現に寄与することが期待される。また、本研究で得られる成果は再生医療の分野にも生かされるものと期待される。

(2) 研究開発の目標

①最終目標（平成21年度末）

ヒト ES 細胞の加工技術、分化誘導制御技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価、創薬研究の効率化のための技術基盤として有用な

研究用モデル細胞を創製する。

②中間目標（平成19年度末）

ヒトES細胞の加工技術及び分化誘導制御技術の開発に目処をつける。

（3）研究開発内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

- ・ヒトES細胞の加工技術と分化誘導制御技術開発及び研究用モデル細胞の構築

2. 研究開発の実施方式

（1）研究開発の実施体制

①本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下、「NEDO技術開発機構」という。）が、単独ないし複数の原則、本邦の企業、研究組合、公益法人等の研究機関（原則、国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点からの国外企業との連携が必要な場合はこの限りではない。）から公募によって研究開発実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を構築し、委託して実施する。

②共同研究に参加する各研究開発グループの有する研究ポテンシャルの最大限の活用により効率的な研究開発の推進を図る観点から、研究体にはNEDO技術開発機構が指名した国立大学法人京都大学再生医科学研究所 中辻憲夫教授を研究開発責任者（プロジェクトリーダー）とし、その下に研究者を結集して効果的な研究開発を実施する。

（2）研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDO技術開発機構は、経済産業省及びプロジェクトリーダーと密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて、NEDO技術開発機構に設置する委員会及び技術検討会等、外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、四半期に一回程度プロジェクトリーダー等を通じて研究開発の進捗について報告を受けること等を行う。

3. 研究開発の実施期間

本研究開発の実施期間は、平成17年度から平成21年度までの5年間とする。

4. 評価に関する事項

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義ならびに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成19年度、事後評価を平成22年度に実施する。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

5. その他重要事項

（1）研究開発成果の取り扱い

①共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発成果のうち、下記共通基盤技術に係る研究開発成果については、NEDO技術開発機構、実施者とも普及に努めるものとする。

a)ヒトES細胞加工技術

- b)分化誘導・制御技術
- c)安全性・有効性評価技術
- d)微細加工技術

②知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備または標準化等との連携を図るため、データベースへのデータ提供、標準情報（TR）制度への提案等を積極的に行う。

③知的財産権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、すべて受託先に帰属させることとする。

④成果の産業化

- a)受託者は、本研究開発から得られる研究開発成果の産業面での着実な活用を図るため、本研究開発の終了後に実施すべき取り組みのあり方や研究開発成果の産業面での活用のビジネスモデルを立案するとともに、立案した取り組みのあり方とビジネスモデルについて、研究開発の進捗等を考慮して、本研究開発期間中に必要な見直しを行う。
- b)受託者は、上記 a)で立案した取り組みとビジネスモデルを本研究開発終了後、実行に移し、成果の産業面での活用に努めるものとする。

（2）基本計画の変更

NEDO 技術開発機構は、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済状況、内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

（3）根拠法

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号に基づき実施する。

（4）関連指針の厳守

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）及びヒトES細胞に関する研究については「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」（平成13年文部科学省告示第155号）を厳守しなければならない。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」（平成16・12・24 製局第1号）を厳守しなければならない。

6. 基本計画の改訂履歴

- （1）平成17年3月制定。
- （2）平成18年1月一部改訂。
- （3）平成20年1月一部改訂。プロジェクトリーダー名の記載。
- （4）平成20年7月、イノベーションプログラム基本計画の制定により、「（1）研究開発の目的」の記載を改訂。

（別紙）研究開発計画

研究開発項目「ヒト ES 細胞の加工技術と分化誘導制御技術開発及び研究用モデル細胞の構築」

1. 研究開発の必要性

遺伝子機能の解明や新薬の安全性や薬効を評価する際には、従来、マウスやウサギなどの動物や長期間にわたって培養が継続されている株化されたヒト細胞を用いて評価を行っている。しかし、これらの細胞と実際のヒト生体内の細胞は異なった性質を有しているため、実際の生体内での反応を高い精度で予測することが困難であることから、臨床試験において安全性と薬効評価でドロップアウトする確率が高くなっており、実際の生体内の細胞に近い状態の細胞を用いた評価系の確立が必要である。

このため、無限に増殖できるとともに、あらゆる細胞組織に分化できる多能性を有するヒト ES 細胞由来の、均質な遺伝的背景を有したモデル細胞を利用することによって、前臨床試験の段階で臨床試験に進めるかどうかを、新薬の安全性と薬効の観点から、より確実に判断することを可能とする有用な研究用モデル細胞の構築が必要である。

2. 具体的研究開発内容

遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価及び創薬研究の効率化に有用なヒト ES 細胞由来の研究用モデル細胞の構築を行うため、以下の技術開発を行う。

（1）ヒト ES 細胞の加工技術開発

外来遺伝子の導入や内在性遺伝子の改変、siRNA による遺伝子機能抑制などの手法を利用し、研究用モデル細胞として有用な性質をあらかじめヒト ES 細胞に持たせるための加工技術の開発を行う。

（2）ヒト ES 細胞の分化誘導制御技術開発

特定の組織系統への分化誘導に重要な役割を果たす外因性因子や増殖因子、加工された特性等を利用して、ヒト ES 細胞を特定の経路に沿った分化誘導を制御する技術の開発を行う。

これに加え、生体内における細胞外環境を人工的に再構築し、細胞の生存する空間を制御することによって、目的とする特定の細胞への分化誘導を制御する技術等の開発を併せて行う。

（3）研究用モデル細胞の構築技術の開発

開発した技術を利用して、ヒト生体内において薬物候補物質が示す反応を高い確率で予測することを可能とし、遺伝子機能の解明や新薬の安全性と創薬研究の効率化のための基盤研究に重要な研究用モデル細胞を構築する。

また、構築した細胞を利用し生体組織が有する機能をデバイス上に再構築することによって、より生体内の反応に近い条件下で、有効性を示す候補物質の探索や、毒性試験を簡便・迅速にスクリーニング可能な創薬支援ツールの開発を行う。

3. 達成目標

（1）最終目標（平成 21 年度末）

ヒト ES 細胞の加工技術、分化誘導制御技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価、創薬研究の効率化のための技術基盤として有用な研究用モデル細胞を創製する。

（2）中間目標（平成 19 年度末）

ヒト ES 細胞の加工技術及び分化誘導制御技術の開発に目処をつける。

添付資料④

プロジェクト実施方針

平成18年度実施方針(案)

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名:(プログラム名)健康安心プログラム

(大項目)ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発

(中項目)モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発

(小項目)研究用モデル細胞の創製技術開発

2. 背景及び目的・目標

製薬産業界では、ライフサイエンス研究における近年の技術的な発展によって蓄積されたゲノムの塩基配列情報や遺伝子発現情報、タンパク質の立体構造情報、タンパク質と低分子化合物の相互作用情報など、様々な情報を活用するゲノム創薬によって創薬プロセスを効率化し、安価な医薬品を迅速に上市することが可能となると期待されていた。

しかし、実際には投入する研究開発費が年々増加していつの間にも関わらず、上市される医薬品の数はむしろ減少しており、ゲノム創薬におけるギャップが生じている。これは、近年のポストゲノム研究の進展により見出された創薬ターゲット候補から真の druggable gene を絞り込むことが困難であることや臨床試験以前での新薬の安全性評価及び薬理評価の制度が十分でないことが一因と考えられる。創薬プロセスの後期である臨床試験において薬剤候補がドロップアウトしてしまうと、それまでに投入した開発費が回収困難となってしまふことから、創薬プロセスの早い段階から効率的に創薬ターゲットを絞り込むための新規な技術の開発が重要な課題である。

本研究開発は、均質な遺伝的背景を有し、無限に増殖できるとともに、あらゆる細胞組織に分化できる多能性を有するヒト ES 細胞(ヒト胚性幹細胞)を対象に、遺伝子の相同組換え、RNA 干渉による遺伝子サイレンシング技術等を用いてヒト ES 細胞を加工し、様々な分化誘導因子を用いて分化誘導を制御する基盤技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能や細胞内ネットワークの解明、薬剤候補の安全性の向上といった創薬の基盤研究に資する研究用モデル細胞の創製を行うことを目的とする。

(1)最終目標(平成 21 年度末)

ヒト ES 細胞の加工技術、分化誘導制御技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価、創薬研究の効率化のための技術基盤として有用な研究用モデル細胞を創製する。

(2)中間目標(平成 19 年度末)

ヒト ES 細胞の加工技術及び分化誘導制御技術の開発に目処をつける。

3. 実施内容及び進捗(達成)状況

集中研究の実施場所を京都リサーチパーク内に整備。平成 17 年 10 月にほぼ全ての設備の導入が完了。ヒト ES 細胞と性質が近いと言われるサル ES 細胞を用いた分化誘導条件検討を行うため前準備を行った。(アステラス製薬株式会社、リプロセル株式会社)

(1)ヒト ES 細胞の加工技術開発

a. ヒト ES 細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発

ヒト ES 細胞に最適な遺伝子導入方法を確立することを目的として、最適な試薬と至適条件の検討のため、エレクトロポレーション法とリポフェクション法を中心に検討を進めた。エレクトロポレーション法については、電圧とパルスの型やパルス幅、パルス回数等を変化させ、様々な条件下での遺伝子導入効率の検討を行った。リポフェクション法については、市販されてい

るさまざまなリポフェクション試薬を対象にトランスフェクション条件(細胞密度、DNA量、リポソーム量、培養時間、培地など)の検討を進めた。(京都大学再生医科学研究所)

さらに霊長類のES細胞に対する高効率な遺伝子導入する新たな技術を開発するため、アデノウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルスなど約10種類のウイルスベクターの導入効率を比較するため、GFPを組み込んだベクター系の構築を行った。(埼玉医科大学)

また、遺伝子導入法の開発の終了後にTet-On/Tet-Offシステム、Cre-LoxPシステム、エストロゲンレセプターシステム等の導入遺伝子の発現を制御の開発を順次行う予定であるが、平成17年度はサルES細胞を用いて、Tet-Off系の開発を進めた。遺伝子発現の制御はGFPをモニターとして検討し、Tet-Offが速やかに制御できるサルES細胞株を複数樹立することに成功した。(論文投稿中)(京都大学再生医科学研究所)

b. ヒトES細胞における相同組み換え技術の開発

平成17年度は、サル及びヒトES細胞から転写が活性化されており選別手法が確立しているHPRTゲノム遺伝子を単離し、相同組み換えベクター構築を進めた。なお、同一ベクターによる遺伝子導入効率の比較検討を可能とするため、作成したターゲティングベクターについては、株式会社リプロセル及び埼玉医科大学に供与を行っている。(京都大学再生医科学研究所)

また、aで用いたのと同じウイルスベクターを用いて染色体上のHPRTへの相同組替え効率を比較するため、ネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだベクター系の構築を行い、サルES細胞を用いた導入実験を行うための準備を進めた。(埼玉医科大学)

c. ヒトES細胞におけるRNA干渉法による遺伝子発現制御技術の開発

平成17年度は、マウスES細胞を用いて、分化途上の任意の段階において遺伝子発現抑制を行うことができる新しいES細胞分化システムの構築を行った。すなわち、テトラサイクリン誘導性shRNA(short hair-pin RNA)発現システムを導入したマウスES細胞株を構築し、血管内皮細胞の分化途上において内皮分化に必須であるFlk1遺伝子発現の抑制を試みた。Flk1に対するshRNAを発現させた細胞において内皮細胞分化を阻害することに成功した(蟹江ら、平成17年度日本分子生物学会)。(京都大学再生医科学研究所)

(2) ヒトES細胞の分化誘導制御技術の開発

a. 平成17年度は、マウスES細胞を用いて、単一細胞レベルで心筋分化を誘導できる新しい心筋分化誘導系の構築、心筋前駆細胞の同定と純化および誘導心筋細胞の純化に成功した(Yamashita et al, FASEB J, 2005)。また、ペースメーカー細胞や刺激伝導系細胞、心室筋細胞等種々の心筋細胞が誘導できることも明らかにした。(京都大学再生医科学研究所)

b. ヒトES細胞において肝細胞への分化誘導技術の開発の前段階として、マウスES細胞を用い培養下での特定の時期に種々の成長因子を添加することにより、内胚葉前駆細胞、そして未熟な肝細胞への分化誘導条件の至適化の検討などを行った。特に内胚葉系の細胞分化には、アクチビンAが重要な役割を示すことを見出した。(熊本大学、京都大学再生医科学研究所)

また、次のステップである共培養法によって肝前駆細胞から成熟肝細胞に分化させるための条件検討も行った。肝前駆細胞から成熟肝細胞への分化誘導条件の検討に不可欠なヒトES細胞から肝細胞への分化誘導の検出が容易になるような、肝臓特異的発現遺伝子のプロモーター/レポーター(GFP)のベクター構築を進めた。(京都大学)

再生医科学研究所)

(3)研究用モデル細胞の構築技術の開発

創薬プロセスにおいて有望と思われる細胞株に関する検討を進めた。(アステラス製薬株式会社、リプロセル株式会社)

実績額推移(百万円):	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度
一般会計		238	750		

特許出願件数(件): 0

論文発表件数(報): 2

フォーラム件数(件): 0

4. 事業内容

(1) 平成 18 年度事業内容

国立大学法人京都大学再生医科学研究所教授 中辻憲夫をプロジェクトリーダーとして、遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価及び創薬研究の効率化に有用なヒト ES 細胞由来の研究用モデル細胞の構築を行うため、以下の技術開発を行う。実施体制については、別紙を参照のこと。

①ヒト ES 細胞の加工技術開発

外来遺伝子の導入や内在性遺伝子の改変、siRNA による遺伝子機能抑制などの手法を利用し、研究用モデル細胞として有用な性質をあらかじめヒト ES 細胞に持たせるための加工技術の開発を進める。

②ヒト ES 細胞の分化誘導制御技術開発

特定の組織系統への分化誘導に重要な役割を果たす外因性因子や増殖因子、加工された特性等を利用して、ヒト ES 細胞を特定の経路に沿った分化誘導を制御する技術の開発を進める。

また、生体内における細胞外環境を人工的に再構築し、細胞の生存する空間を制御することによって、目的とする特定の細胞への分化誘導を制御する技術等の開発に着手する。

③研究用モデル細胞の構築技術の開発

ヒト生体内において薬物候補物質が示す反応を高い確率で予測することを可能とし、遺伝子機能の解明や新薬の安全性と創薬研究の効率化のための基盤研究に重要な研究用モデル細胞の構築を進めるため、培養条件や細胞選別条件の検討を進める。

また、構築した細胞を利用し生体組織が有する機能をデバイス上に再構築することによって、より生体内の反応に近い条件下で、有効性を示す候補物質の探索や、毒性試験を簡便・迅速にスクリーニング可能な創薬支援ツールの開発に着手する。

(2) 平成 18 年度事業規模

一般会計 750百万円(継続・新規)

※約4億円を追加公募

5. その他重要事項

(1)運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)及びヒトES細胞に関する研究については「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」(平成13年文部科学省告示第155号)を厳守しなければならない。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16・12・24製局第1号)を厳守しなければならない。

(2)複数年度契約の実施

平成17～19年度の複数年度契約を行う。なお、平成18年度から追加して実施する研究テーマについては、平成18～19年度の複数年度契約を行う。

(3)年間スケジュール

平成18年9月、平成19年2月を目処に、研究開発推進委員会を開催する。

平成18年1月上旬・・・部長会

1月上旬・・・運営会議

1月下旬・・・追加公募開始

2月中旬・・・追加公募〆切

3月下旬・・・契約・助成審査委員会、採択決定

なお、応募総数が多い場合等、特段の事情がある場合を除き、公募締切から原則45日以内での採択決定を行う。

(注)事業規模については、変動があり得る。

平成19年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名:(プログラム名)健康安心プログラム

(大項目)ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発

(中項目)モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発

(小項目)研究用モデル細胞の創製技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号

3. 背景及び目的・目標

製薬産業界では、ライフサイエンス研究における近年の技術的な発展によって蓄積されたゲノムの塩基配列情報や遺伝子発現情報、タンパク質の立体構造情報、タンパク質と低分子化合物の相互作用情報など、様々な情報を活用するゲノム創薬によって創薬プロセスを効率化し、安価な医薬品を迅速に上市することが可能となると期待されていた。

しかし、実際には投入する研究開発費が年々増加していつにわたるにも関わらず、上市される医薬品の数はむしろ減少しており、ゲノム創薬におけるギャップが生じている。これは、近年のポストゲノム研究の進展により見出された創薬ターゲット候補から真の druggable gene を絞り込むことが困難であることや臨床試験以前での新薬の安全性評価及び薬理評価の制度が十分でないことが一因と考えられる。創薬プロセスの後期である臨床試験において薬剤候補がドロップアウトしてしまうと、それまでに投入した開発費が回収困難となってしまうことから、創薬プロセスの早い段階から効率的に創薬ターゲットを絞り込むための新規な技術の開発が重要な課題である。

本研究開発は、均質な遺伝的背景を有し、無限に増殖できるとともに、あらゆる細胞組織に分化できる多能性を有するヒト ES 細胞(ヒト胚性幹細胞)を対象に、遺伝子の相同組換え、RNA 干渉による遺伝子サイレンシング技術等を用いてヒト ES 細胞を加工し、様々な分化誘導因子を用いて分化誘導を制御する基盤技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能や細胞内ネットワークの解明、薬剤候補の安全性の向上といった創薬の基盤研究に資する研究用モデル細胞の創製を行うことを目的とする。

(1)最終目標(平成 21 年度末)

ヒト ES 細胞の加工技術、分化誘導制御技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価、創薬研究の効率化のための技術基盤として有用な研究用モデル細胞を創製する。

(2)中間目標(平成 19 年度末)

ヒト ES 細胞の加工技術及び分化誘導制御技術の開発に目処をつける。

4. 実施内容及び進捗(達成)状況

国立大学法人京都大学再生医科学研究所教授 中辻憲夫をプロジェクトリーダーとして、以下の技術開発を行った。

京都市リサーチパーク内に設置した集中研究所においてヒト ES 細胞を扱うための認可を取得し、ヒト ES 細胞を用いた本格的な実験を開始した。また、分化誘導技術及びモデル細胞の創薬で

の利用を強化すべく、追加公募により採択した課題との連携を進め、プロジェクト実施体制の強化を図った。

4. 1 平成18年度事業内容

(1) ヒト ES 細胞の加工技術開発

a. ヒト ES 細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発

ヒト ES 細胞に最適な遺伝子導入方法を確認することを目的として、最適な試薬と至適条件の検討を進め、従来法に比べて数倍程度遺伝子導入効率が高まるトランスフェクション条件を見いだした。また、この条件は KhES1、KhES2、KhES3 いずれの細胞株においても最も遺伝子導入効率が高い条件であることを確認した。(京都大学再生医科学研究所)

また、Tet-On/Off システムについて、サル ES 細胞での経験を用いてヒト ES 細胞株での導入検討を進め、幾つかの細胞株を樹立した。しかし、サル ES 細胞に比べ、安定細胞株の樹立が困難であったことから、ベクターのデザイン等の再検討が必要であることを見いだした。(京都大学再生医科学研究所)

b. ヒト ES 細胞における相同組み換え技術の開発

HPRT1 遺伝子部位へのネオマイシン耐性遺伝子の導入について、サル ES 細胞において構築した相同組換え条件をヒト ES 細胞へ適用し、相同組換えに成功した。(幹細胞創薬研究所)

構築した種々のアデノウィルスベクターについて、サル ES 細胞を用いた遺伝子導入実験によって、一過性導入、安定導入、相同組換えの高効率化に成功した。また、サル ES 細胞で構築した系がヒト ES 細胞で再現出来るかどうかを確認するために必要な文部科学大臣の確認を得、ヒト ES 細胞の入手を完了した。(埼玉医科大学)

c. ヒト ES 細胞における RNA 干渉法による遺伝子発現制御技術の開発

マウス ES 細胞を用いて、分化途上の任意の段階において遺伝子発現抑制を行うことができる新しい ES 細胞分化システムの構築を行った新たに Cre-LoxP 遺伝子組換えシステムによる shRNA の制御性発現とエストロゲン受容体-Cre 遺伝子組換え酵素の融合タンパクによるエストロゲン制御性 Cre 発現システムを組み合わせ、エストロゲン誘導性に shRNA を発現させるシステムの構築を進めた。(京都大学再生医科学研究所)

(2) ヒト ES 細胞の分化誘導制御技術の開発

a. ヒト ES 細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発

Noggin を用いた神経幹・前駆細胞への分化誘導を行い、サル ES 細胞を用いた誘導実験により最適な誘導条件の検討を進めるとともに、ヒト ES 細胞への誘導条件の至適化を進めた。また、サル ES 細胞の胚様体から運動神経細胞への分化誘導の結果をもとに、ヒト ES 細胞の分化誘導条件の検討を行った。電気刺激(低電圧)によって細胞の生存率が向上することを確認した。(幹細胞創薬研究所)

b. ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発

開発した心筋分化誘導系により作出した誘導心筋細胞の自動能に関与するイオンチャンネルを解析し、重要なチャンネルを明らかとした。(京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究所)

c. ヒト ES 細胞から肝細胞への分化誘導制御技術の開発

肝臓特異的発現遺伝子のプロモーター/レポーターのベクターをヒト ES 細胞に導入し、KhES1、KhES2、KhES3 いずれからも安定細胞株の樹立に成功した。これら樹立細胞株を用いて、内胚葉系の細胞への分化誘導に伴いレポーター遺伝子の発現が認められるいくつかの細胞株を見いだすことに成功した。(京都大学再生医科学研究所)

マウス ES 細胞から肝細胞分化を誘導する系をヒト ES 細胞への至適化を進めるとともに、マウス胎仔肝臓由来ストローマ細胞の不死化細胞株の樹立を行った。(熊本大学、幹細胞創薬研究所)

d. 分子構成を最適化した人工基底膜による ES 細胞の分化誘導制御技術の開発

マウス発生初期(E5.5~7.5)及び中期(E12.5、E14.5)のマウス胎児の前進標本を対象に 11 種類の全ラミニンサブユニット鎖を含む主要基底膜成分 20 個の局在解析を行った。また、ES 細胞の分化誘導への基底膜環境の影響を調べるため、 α 鎖の組成の異なる 5 種類のラミニンアイソフォームの発現系を構築し、精製法を確立した。(大阪大学)

人工基底膜を構成する成分として重要な IV 型コラーゲンを生物試料から非酵素的に精製する方法の開発を進めた。ウシ及びウシ以外の材料からの IV 型コラーゲン調製法検討を行い、IV 型コラーゲンの収量はウシがもっとも高いことを明らかとした。また調製した IV 型コラーゲンを二次元電気泳動で解析した結果、市販品とは異なる泳動パターンを示し、インタクトな性状を維持していることが示唆された。また、レンズカプセル IV 型コラーゲンに含まれる α 鎖組成を明らかとした。(日本皮革研究所)

e. 疑似基底膜を利用した ES 細胞の分化誘導制御技術の開発

ヒト ES 細胞の維持・分化誘導に特化した基底膜構造体を創製し京都大学に供与した。また、組織特異的な疑似基底膜を構成するため、基底膜構造体の形成に関わるヒトシンデカン接着受容体の遺伝子をクローニングし、安定発現株を作成した。(国立環境研究所)

f. 人工基底膜、疑似マトリックスの評価

国立環境研究所から提供された疑似マトリックスを用いてサル ES 細胞の培養を行い、有効性の評価を進めた結果、サル ES 細胞については未分化維持が不十分であり、培養条件の検討が必要なが見いだされた。また、大阪大学との共同研究により、ヒト ES 細胞がどのような細胞外基質により未分化性が維持されているのかについて検討を進めた。(京都大学再生医科学研究所、大阪大学、国立環境研究所)

(3) 研究用モデル細胞の構築技術の開発

a. 神経変性疾患モデル細胞の創製

モデル疾患として筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、ハンチントン病を選定し、原因遺伝子を恒常的に発現するベクターの構築及び発現調整を可能とする Cre-loxP 系の発現ベクターの構築を進めた。(幹細胞創薬研究所)

b. 血液脳関門(BBB)モデルの創製

NSS 法を改良しヒト ES 細胞への適用を進め、BBB モデル構築に必要なアストロサイト、神経細胞の調製技術を確立した。また、初代培養細胞株等を用いて BBB 構築に向けた共培養モデルの試験的構築を行い、BBB 特性評価技術の検討を進めた。(京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究所)

c. ES 細胞由来肝細胞を用いた、創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立

ヒト肝細胞を用いて定量的な評価を可能とするための方法論構築を目的としてコラーゲンサンドイッチ培養法の確立・最適化を行い、肝細胞間に胆管腔が効率良く形成され、胆汁排泄能力についても評価可能なことを確認した。本評価系を用いることによってヒトにおける肝取り込み・胆汁排泄・代謝すべての過程を in vitro で同時に評価できる可能性を見いだした。また、トランスポーターの機能を見る輸送実験に使用可能な肝細胞のスクリーニング作業を進め、高活性を示すロットの確保を行った。(東京大学)

d. オンチップ・ヒト組織・臓器モデルを用いた毒性・創薬支援技術の研究開発

ヒト ES 細胞由来の細胞を用いたデバイス構築のための基礎データ取得を目的に、細胞

集団の構成的配置技術と1細胞多電極アレイ刺激計測技術を組み合わせ、薬剤添加による細胞の応答計測を可能とするデバイス構築に関する検討を進め、参照電極の構成の改善及びノイズ低減技術の開発によって、従来の多電極システムでは細胞単位でしか取得できなかった信号を神経細胞の神経突起単位で計測することが可能となった。また、開発したバイスを用いて心筋モデル、神経モデルを用いた評価を進めた。(東京医科歯科大学)

4. 2 実績推移

	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度
実績額推移(百万円): 一般会計(委託事業)	238	750	750		
特許出願件数(件):	0	0			
論文発表件数(報):	2	4			
フォーラム件数(件):	0	0			

5. 事業内容

5. 1 平成 19 年度事業内容

国立大学法人京都大学再生医科学研究所教授 中辻憲夫をプロジェクトリーダーとして、遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価及び創薬研究の効率化に有用なヒト ES 細胞由来の研究用モデル細胞の構築を行うため、以下の技術開発を行う。実施体制については、別紙を参照のこと。

①ヒト ES 細胞の加工技術開発

外来遺伝子の導入や内在性遺伝子の改変、siRNA による遺伝子機能抑制などの手法を利用し、研究用モデル細胞として有用な性質をあらかじめヒト ES 細胞に持たせるための加工技術の開発を進める。

平成 18 年度に見いだしたトランスフェクション条件を用いて遺伝子導入した安定細胞株の樹立を行う。また、単一のプロモーターにより複数の導入遺伝子を効率よく発現することが可能な、ヒト ES 細胞に対する発現システムの構築を行う。遺伝子導入等の操作に対して高い耐性を持つサブラインが持つ特性の解析を進め、当該遺伝子の探索を行う。Tet-On/Off システムについては、リーク発現あるいは毒性の問題を解決しうるベクター構築の改変を進めるとともに、KhES1 以外のヒト ES 細胞株への適用を図る。(京都大学再生医科学研究所)

平成 18 年度に取得した HPRT1 遺伝子部位がネオマイシン耐性遺伝子に組変わったヒト ES 細胞株について、ネオマイシン耐性遺伝子から他の遺伝子に入れ替えを可能とするシステムの構築を進める。また、HPRT1 以外の領域への組み換えについても検討を進める。(幹細胞創薬研究所)

平成 18 年度に構築したサル ES 細胞での結果をヒト ES 細胞で再現するための条件を検討する。また、分化誘導効率の至適化をモニター可能な GFP ノックインモデル細胞株の創製を進める。(埼玉医科大学)

②ヒト ES 細胞の分化誘導制御技術開発

特定の組織系統への分化誘導に重要な役割を果たす外因性因子や増殖因子、加工された特性等を利用して、ヒト ES 細胞を特定の経路に沿った分化誘導を制御する技術の開発を進める。

平成 18 年度に引き続き、ヒト ES 細胞から神経細胞(Noggin を用いた神経細胞への分化条件の至適化と電機刺激による分化効率向上の検討等)、心筋細胞(心筋系列細胞への分化検証等)、肝臓細胞(分化誘導ヒト ES 細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養に

よる肝細胞成熟の検証等)への効率的な分化誘導条件の検討を進める。(京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究所、熊本大学)

器官形成が始まるマウス胚(E8.5~E10.5)の基底膜構成成分の局在解析を行い、マウス胚発生のほぼ全過程を通じた主要基底膜分子の発生段階依存的な発現制御の実態を解析する。また、ヒトラミニンアイソフォーム 10 種類の発現系を構築し、その精製法を確立する。(大阪大学)

平成 18 年度に開発した IV 型コラーゲン調製法により調製したウシ由来 IV 型コラーゲンの成分組成の詳細な解析を進める。また、性状を確認した IV 型コラーゲンを大阪大学蛋白質研究所に供与し、細胞接着能機能を確認することによって機能の確認を行う。さらに、大阪大学蛋白質研究所で作製した基底膜蛋白質と組み合わせ、二成分の再構築基底膜を構築し、マウス ES 細胞の培養を行うことによって、増殖・分化への作用を評価する。(大阪大学、日本皮革研究所)

ヒト ES 細胞の維持・分化誘導に特化した基底膜構造体の改良を行い、サル ES 細胞を用いて培養条件の詳細検討を進める。(国立環境研究所)

③研究用モデル細胞の構築技術の開発

ヒト生体内において薬物候補物質が示す反応を高い確率で予測することを可能とし、遺伝子機能の解明や新薬の安全性と創薬研究の効率化のための基盤研究に重要な研究用モデル細胞の構築を進めるため、培養条件や細胞選別条件の検討を進める。

心毒性評価系の構築については細胞系を含め、システムの至適化を進める(幹細胞創薬研究所、東京医科歯科大学)。神経変性疾患については選択した疾患原因遺伝子を安定的に発現する ES 細胞株の樹立を進める(幹細胞創薬研究所)。in vitro 血液脳関門(BBB)モデルについては、モデル構築に必要な血管内皮細胞及び血管周皮細胞の調製技術を確立するとともに、BBB モデル構築形態の検討を進める(幹細胞創薬研究所)。

平成 18 年度に確立したサンドイッチ培養肝細胞の系を用いて、各薬物動態制御分子を選択的に阻害する薬物を用いることで、薬物の胆汁排泄トランスポーターの寄与率を決定する方法論を確立する。また、ヒト肝細胞を用いて各種化合物の輸送クリアランスを測定した結果を用いて、ヒトにおける肝クリアランスを予測するための方法論の検証を進める(東京大学)。

平成 18 年度の検討結果を踏まえ、実際の製薬企業でのスクリーニングを念頭においた細胞ネットワークレベルでの多電極培養計測システムの開発を行い、より安価なシステムとなるよう装置仕様の簡素化を検討する。また、マウス及びラット由来の心筋や神経細胞を用いたネットワークモデルをチップ上への構成方法について検討を進める。(東京医科歯科大学)

5.2 平成 19 年度事業規模

一般会計 686百万円(委託事業・継続)

(注)事業規模については、変動があり得る。

6. その他重要事項

(1)評価

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成 19 年 7 月(予定)に実施する。

(2)運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)及びヒトES細胞に関する研究については「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」(平成13年文部科学省告示第155号)を厳守のうえ推進する。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16・12・24製局第1号)を厳守する。

(3)複数年度契約の実施

平成17～19年度の複数年度契約を行う。なお、平成18年度から追加して実施する研究テーマについては、平成18～19年度の複数年度契約を行う。

7. スケジュール

平成19年9月、平成20年2月を目処に、研究開発推進委員会を開催する。また、中間評価を上期中に実施する。

平成19年3月上旬・・・部長会

3月中旬・・・運営会議

7月前後・・・中間評価

9月・・・第1回研究開発推進委員会

平成20年2月・・・第2回研究開発推進委員会

平成20年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名:(プログラム名)健康安心プログラム

(大項目)ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発

(中項目)モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発

(小項目)研究用モデル細胞の創製技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第二号

3. 背景及び目的・目標

製薬産業界では、ライフサイエンス研究における近年の技術的な発展によって蓄積されたゲノムの塩基配列情報や遺伝子発現情報、タンパク質の立体構造情報、タンパク質と低分子化合物の相互作用情報など、様々な情報を活用するゲノム創薬によって創薬プロセスを効率化し、安価な医薬品を迅速に上市することが可能となると期待されていた。

しかし、実際には投入する研究開発費が年々増加していつにわたるにも関わらず、上市される医薬品の数はむしろ減少しており、ゲノム創薬におけるギャップが生じている。これは、近年のポストゲノム研究の進展により見出された創薬ターゲット候補から真の druggable gene を絞り込むことが困難であることや臨床試験以前での新薬の安全性評価及び薬理評価の制度が十分でないことが一因と考えられる。創薬プロセスの後期である臨床試験において薬剤候補がドロップアウトしてしまうと、それまでに投入した開発費が回収困難となってしまうことから、創薬プロセスの早い段階から効率的に創薬ターゲットを絞り込むための新規な技術の開発が重要な課題である。

本研究開発は、均質な遺伝的背景を有し、無限に増殖できるとともに、あらゆる細胞組織に分化できる多能性を有するヒト ES 細胞(ヒト胚性幹細胞)を対象に、遺伝子の相同組換え、RNA 干渉による遺伝子サイレンシング技術等を用いてヒト ES 細胞を加工し、様々な分化誘導因子を用いて分化誘導を制御する基盤技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能や細胞内ネットワークの解明、薬剤候補の安全性の向上といった創薬の基盤研究に資する研究用モデル細胞の創製を行うことを目的とする。

(1)最終目標(平成 21 年度末)

ヒト ES 細胞の加工技術、分化誘導制御技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価、創薬研究の効率化のための技術基盤として有用な研究用モデル細胞を創製する。

(2)中間目標(平成 19 年度末)

ヒト ES 細胞の加工技術及び分化誘導制御技術の開発に目処をつける。

4. 実施内容及び進捗(達成)状況

国立大学法人京都大学再生医科学研究所教授 中辻憲夫氏をプロジェクトリーダーとして、以下の技術開発を行った。

(1)ヒト ES 細胞の加工技術開発(京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究所、埼玉医科大学)

1)ヒト ES 細胞への遺伝子導入と導入遺伝子の発現制御技術の開発

- ①同一プロモーターによる複数の導入遺伝子発現を効率よくできるシステムの開発を推進した。
- ②京都大学で樹立したヒト ES 細胞と遺伝子導入などの操作に対して耐性を持ち、増殖能が高い使いやすいサブラインについて、発現している遺伝子の網羅的な比較解析を行い、ヒト ES 細胞が使いやすい分子候補を見出した。
- ③ヒト ES 細胞での Tet-On/Off システム(化学物質テトラサイクリンにより遺伝子の発現を On/Off するシステム)の構築を行い、このシステムを用いヒト ES 細胞の分化誘導が可能であることを見出した。
- ④非増殖性組換えウイルスベクターを用いた、ヒトES細胞に高効率で遺伝子導入ができる系の開発に成功した。

2)ヒト ES 細胞における相同組換え技術の開発

- ①ヒト ES 細胞 (KhES-1) を用いて、世界的にみても非常に高い効率で HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase の略) 遺伝子での相同組換えに成功した。
- ②さらに別のヒト ES 細胞株 (KhES-3) でも HPRT 遺伝子での相同組換えに成功した。

3)ヒト ES 細胞における RNA 干渉法による遺伝子発現制御技術の開発

- ①従来のテトラサイクリン誘導性システムより有効なシステムを構築した。
- ②より安定した発現が可能となるマイクロ RNA 発現による遺伝子発現による遺伝子発現抑制システムを構築した。
- ③shRNA (RNA干渉を起こすことができる短いヘアピン状のRNA) を誘導的に発現させることにより、遺伝子発現を特異的に抑制することに成功した。

(2)ヒト ES 細胞の分化誘導制御技術開発(京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究所、熊本大学、大阪大学、日本皮革研究所、国立環境研究所)

1)ヒト ES 細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発

ES 細胞から神経細胞への分化誘導技術の開発を目的として、「胚様体を介した神経系細胞への分化誘導技術」と「ES 細胞の単層培養による神経系細胞への分化誘導技術」について検討を行い、誘導効率の比較等を行い、神経分化誘導法の最適化を進めた。

2)ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発

- ①ヒト ES 細胞から心筋を分化させる方法および心筋前駆細胞への誘導法について、その効率を大幅に改善する新たな方法を発見した。
- ②ES細胞由来心筋細胞の純化法の確立や、電気生理学的な特性解析法における基礎的な技術確立した。
- ③ES細胞由来自己拍動心筋細胞と静止心筋細胞におけるイオンチャネルの発現と機能解析し、HCNチャネルとT型Caチャネルが心筋自動能の維持に必須であることを明らかにした。

3)ヒト ES 細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発

- ①肝細胞成熟能を有するマウス胎仔肝臓由来間葉系細胞株を同定し、初代培養を用いなくても肝細胞成熟を行うことが可能になった。
- ②AFP(肝臓のマーカータンパク質であるαフェトプロテインの略)を指標としたヒトES細胞から内胚葉への分化誘導についても、共培養を用いず20%以上誘導できる条件を見出すことができた。
- ③共培養系(中胚葉由来細胞株を用いる)において、ヒトES細胞から成熟肝細胞マーカー発現細胞へ誘導する条件を見出した。

4)分子構成を最適化した人工基底膜による ES 細胞の分化誘導制御技術の開発

- ①マウス胎生 8.5〜10.5 日胚における主要基底膜分子 20 種の免疫組織化学的解析を完

了し、胎生 5.5 日から 16.5 日までの発生各段階における基底膜分子構成の時空間制御を解明するための情報基盤が整備された。

- ②マウス生体内で発現する 11 種の全ラミニンアイソフォームの発現・精製法を確立した。
- ③IV 型コラーゲンとラミニンを組み合わせた第 1 世代人工基底膜の構築法を確立し、マウス ES 細胞を用いた人工基底膜の活性評価を行った。また、ヒト ES 細胞の継代維持効果のあるラミニンを見出した。

5) 擬似基底膜を利用した ES 細胞の分化誘導制御技術の開発

- ①ヒト ES 細胞の維持・分化誘導に特化した基底膜構造体の培養基質を創製し、ES 細胞分化研究グループへ提供した。
- ②また、基底膜形成受容体を安定発現する細胞株を作製し、基底膜形成に対する促進効果を確認した。

6) 人工基底膜、擬似マトリックスの評価

- ①ヒト ES 細胞上で特異的に発現している細胞外基質のラミニンを特定した。
- ②特定したヒトラミニンを用いても、ヒト ES 細胞が未分化状態を維持しながら拡大培養が可能であることを見出した。

(3) 研究用モデル細胞の構築技術の開発(京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究所、国立環境研究所、東京大学、東京医科歯科大学)

1) 神経変性疾患モデル細胞の創製

下記の代表的神経変性疾患原因遺伝子の変異遺伝子を発現する発現ベクターの構築を完了し、それら変異遺伝子をヒト ES 細胞へ導入し、変異遺伝子を安定発現する ES 細胞株の樹立を行った。

①アルツハイマー病モデル細胞構築

恒常的発現ベクターの構築を完了し、プレセニリン 1 (PS1) 安定発現株を樹立(遺伝子発現、蛋白質発現の確認)、さらに、PS1 安定発現株の神経分化能保持も確認した。

②筋萎縮性側索硬化症モデル細胞構築

恒常的発現ベクターの構築を完了し、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) 安定発現株の樹立(遺伝子発現、蛋白質発現の確認)、さらに、SOD1 安定発現株の神経分化能保持も確認した。

③ハンチントン病モデル細胞構築

Cre-loxP 系(遺伝子組換え酵素 Cre とその標的配列である loxP 配列を用いることにより、遺伝子発現調節を可能とするシステム) 発現調節ベクターの構築を完了し、Cre-loxP システムの動作確認及び変異ハンチンチン蛋白質の凝集塊形成を確認した。

2) 血液脳関門 (BBB) モデルの創製

①ES 細胞の血管系細胞分化誘導技術としてストローマ細胞 OP9 株との共培養法と 6 種のサイトカイン含有培地による分化誘導法を実施し、ヒト ES 細胞から血管内皮細胞や血管周皮細胞の分化誘導を確認した。

②開発モデル基軸となる血管内皮(前駆)細胞を量産調製するためのソーティング技術 (MACS 及び FACS) と増幅技術について検討を行った

③ヒト ES 細胞からの血管内皮細胞 (VE-cad 陽性) の高純度調製に成功した。

④mesh-fib デバイスの活用による近接共培養構築形態を事前検討した。

ウシ脳微小血管内皮細胞を用いて ES 細胞由来細胞の共培養効果を検討し、ES 細胞由来神経系前駆細胞のバリア形成促進効果を確認した。

3) ES 細胞由来肝細胞を用いた、創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立

①サンドイッチ培養肝細胞による排出トランスポーターの寄与率解析法の確立ならびに、遊

離肝細胞の系において測定された取り込みクリアランスを利用して、肝クリアランスを予測するための方法論を構築ならびに複数の化合物を用いた検証を行った。

- ②19年度途中の開発委員会において、細胞分化に携わるチームからの要望に基づき、薬物動態スクリーニングに利用可能なレベルの肝細胞を定量的に判断するための明確な基準作りの一環として、CYP3A4、OATP1B1 の発現量をヒト肝細胞における発現量と定量的に比較可能な実験系の標準化ならびに標準となる肝細胞のロットの設定を行った。

4) オンチップ・ヒト組織・臓器モデルを用いた毒性・創薬支援技術の研究開発

特に心筋、神経細胞を用いた計測システム、計測手法の開発において以下の成果が得られた。

- ①1細胞ネットワーク計測システムの構築・薬剤添加実用計測系のハードウェアを試作構築し、データ集積を開始、光学計測と電気計測を組み合わせた評価ソフトウェアを考案し、開発に成功した。
- ②神経細胞1細胞孤立系の樹立とその自発活動発火計測技術・手法を開発し、興奮性・抑制性ニューロンの組み合わせによる神経ネットワーク構築技術の開発に成功した。
- ③蛍光標識 DNA アプタマーの開発に成功し、細胞への損傷が無く可逆的に標識・離脱できることを確認した。
- ④超高速 1細胞定量発現解析システムを開発し、超高速で評価が可能であることを確認した。
- ⑤サル ES 細胞由来の拍動細胞を用い1細胞レベルでのK、Ca、Na、薬剤に対する細胞の応答解析、細胞イオンチャンネルの発現状態の解析が可能であることを確認した。
- ⑥臓器モデル計測システムとして「心臓リエントリーモデル」「心肥大モデル」の原理検討に成功した。

以上、平成18～19年度において、分化誘導を行った細胞の機能評価を行うための各種デバイス及び計測システムを構築し、特定非営利活動法人幹細胞創薬研究所への設置を完了した。当該研究開発は所期の目標をほぼ達成したため、平成19年度で終了する。

4.2 実績推移

	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度
実績額推移(百万円): 一般会計(委託事業)	238	750	725		
特許出願件数(件):	0	2	9		
論文発表件数(報):	2	23	42		
フォーラム件数(件):	0	0	0		

5. 事業内容

5.1 平成20年度事業内容

国立大学法人京都大学再生医科学研究所教授 中辻憲夫氏をプロジェクトリーダーとして、遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価及び創薬研究の効率化に有用なヒト ES 細胞由来の研究用モデル細胞の構築を行うため、以下の技術開発を行う。実施体制については、別紙を参照のこと。

平成20年度は、平成19年度に実施した中間評価を踏まえ、以下の点を重視して実施する。

創薬産業の利用ニーズに基づき実用化への道筋を随時見直し、実用化可能性を考慮した優先課題への重点化を図る。また、構築したモデル細胞の評価基準を明確化するとともに、解析データを以降の開発にフィードバックしながら実用化に向けた開発を着実に進める。更に、必要

に応じて目標値の見直しや新規技術の導入を行うとともに、開発した技術の iPS 細胞への適用などを検討する。

(1)ヒトES細胞の加工技術開発(京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究所、埼玉医科大学)

1)ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子の発現制御技術の開発

- ①平成 19 年度に見出したヒトES細胞が使いやすくなるため候補遺伝子の中から特に強い候補遺伝子約 20 個について、遺伝子発現を抑制し ES 細胞にどのような影響を及ぼすかについての検討を行う。
- ②Tet-On/Off システムについては、分化制御効果の確認を行うとともに、より毒性が低く感度を上げるためのベクターの改変などを含めて引き続き検討を行う。
- ③ウイルスベクターの系を用いたヒトES細胞への遺伝子導入に関する最適化の検討を進める。

2)ヒトES細胞における相同組換え技術の開発

- ①HPRT遺伝子を相同組換えしたヒトES細胞クローンにおいては、それをさらに利用するために必要な検討事項の確認を行っており、平成 20 年度においても引き続きその検討を進める。
- ②この相同組換え技術を応用した遺伝子置換技術と誘導遺伝子発現技術を発展させ、有用モデル細胞の創出を目指す。

3)ヒトES細胞におけるRNA干渉法による遺伝子発現制御技術の開発

- ①誘導性マイクロRNAの効果をマウスES細胞において確認する。
- ②誘導性cDNAレスキューシステムを構築する。
- ③構築されたシステムのうち最善のものをヒトES細胞へ導入する。

(2)ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発(京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究所、東京大学、熊本大学、大阪大学、日本皮革研究所、国立環境研究所)

1)ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発

- ①これまでに得られたES細胞からノギン(骨形成蛋白質 BMP の活性阻害因子の一つ)を用いて神経前駆細胞を分化させる技術により、さらに大脳神経細胞への効率的な分化誘導を試みる。
- ②様々な外来因子または細胞外基質を用いることで、ES細胞由来の生理学的機能性をもった神経細胞を効率よく成熟化させることを目指す。
- ③京都大学が樹立したヒトES細胞の2株(KhES-2とKhES-3)においても、これまでに確立した神経分化誘導方法が有効であるか確かめる。

2)ヒトES細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発

平成 19 年度までの成果を踏まえて、マウス ES 細胞において基礎基本技術を確立し、ヒト ES 細胞へ適用する開発を行う。

- ①効率的ペースメーカー細胞誘導及び純化法をマウス ES 細胞において確立する。
- ②ヒト ES 細胞由来の拍動心筋様細胞の純化法を確立する。
- ③ヒト ES 細胞由来の拍動心筋様細胞の特性解析を行う。
- ④ヒト ES 細胞由来の拍動心筋様細胞の細胞外電位測定法を確立する。
- ⑤ヒト ES 細胞由来の拍動心筋様細胞を用いた QT 延長(心電図上の QRS 群[Q 波または R 波]の始まりからT波の終了までを QT 間隔という、QT 間隔は心室の興奮が始まって[脱分極]から終わる[再分極]までの時間を示す。この QT 間隔が長くなることを QT 延長という)評価法を確立する。

3)ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発

平成 19 年度において得られた成果を踏まえて、以下の開発を行う。

- ①マウス ES 細胞からの分化誘導制御系を用いてどの程度成熟肝細胞としての特性を有しているのかを、初代培養と比較しさらに詳細な検討を行う。
 - ②AFPを指標としてヒト ES 細胞から分化誘導して得られる肝前駆細胞の分化誘導について、分化誘導率の向上、より安価な分化誘導法を検討する。
 - ③内胚葉系細胞、肝前駆細胞、肝細胞の純化法については、FACS (Fluorescence Activated Cell Sortingの略)法と薬剤による純化について検討を行い、薬剤による純化については純化が期待できる複数のベクター構築を行う。
 - ③東京大学杉山研究室で行われているヒト肝細胞機能検証系を導入し、ヒト ES 細胞由来肝細胞様細胞との比較を行う。
 - ④培養器材・細胞外基質の検討を行い、より成熟したヒト ES 細胞由来肝細胞の創出を目指す。
- 4) 分子構成を最適化した人工基底膜による ES 細胞の分化誘導制御技術の開発
- ①平成 19 年度までの成果を踏まえ、研究開発の重点を人工基底膜の構築およびその高機能化に移し、ES 細胞の選択的分化誘導における有用性を様々な細胞分化誘導系を用いて検証する。
 - ②基底膜分子構成のプロファイリングの対象を心筋や内胚葉細胞系譜、分化誘導の標的となる細胞群に絞り、生体組織を含めたより詳細な解析を行う。
 - ③最適化された人工基底膜の、ヒト ES 細胞の分化誘導系における有用性を検証する。
- 5) 擬似基底膜を利用した ES 細胞の分化誘導制御技術の開発
- ①ヒト ES 細胞の維持・分化誘導に特化した基底膜構造体のより精度の高い培養基質の創製を進める。
 - ②基底膜構造体基質及び擬似マトリックスを用いた幹細胞の新規培養技術を開発する。
- 6) 人工基底膜、擬似マトリックスの評価
- ①ヒト ES 細胞を未分化維持させたまま増殖させることが可能である人工基底膜、マトリックスの改良などのさらなる検討を行う。
 - ②ES 細胞から特定方向への分化誘導が可能かどうかについての検討も行う。
- (3) 研究用モデル細胞の構築技術の開発 (京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究、国立環境研究所、東京大学)
- 1) 神経変性疾患モデル細胞の創製
平成 19 年度に樹立した神経変性疾患原因遺伝子 (野生型または変異型) を安定発現するヒト ES 細胞株を用いて、平成 20 年度はそれらの ES 細胞株の特徴付け (SOD1 酵素活性や β アミロイド産生変化など) を行うとともに、それらの株から目的神経系細胞への分化誘導法を試みる。
 - 2) 血液脳関門 (BBB) モデルの創製
ヒト ES 細胞から調製された各種 BBB 構成細胞の共培養によるモデル構築の開発をプロジェクト関係機関の連携を強化し推進する。
 - 3) ES 細胞由来肝細胞を用いた、創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立
 - ①平成 19 年度に達成した予測法をさらに統合的に組み入れた全身の薬物動態を予測可能な数理モデルの構築を行うとともに、in vitro 実験の結果を利用した全身の薬物の血中濃度推移や臓器分布をリアルタイムに予測することを試みる。
 - ②薬物間相互作用について、ハイスループットに予測可能な実験系を構築することにより、迅速な相互作用予測技術を確立する。
 - ③平成 19 年度に引き続き、サンドイッチ培養肝細胞を用いた胆汁排泄クリアランスの絶対値の in vitro-in vivo の相関関係をより明確に探る予測系を確立する。

- ④ES 細胞由来肝細胞のより正確な性能評価を進めるため、代謝酵素・トランスポーターの発現量を定量可能とする系の構築をより多種類の分子について進める。
- ⑤肝細胞機能維持に細胞外基質がどのような影響を果たすかについて、種々検討を進める。

5.2 平成 20 年度事業規模

一般会計 550百万円(委託事業・継続)

(注)事業規模については、変動があり得る。

6. その他重要事項

(1) 評価

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の事後評価を平成 23 年(予定)に実施する。

(2) 運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 13 年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)及びヒトES細胞に関する研究については「ヒトES 細胞の樹立及び使用に関する指針」(平成 13 年文部科学省告示第 155 号)を厳守し研究開発を推進する。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成 16・12・24 製局第 1 号)を厳守する。

(3) 複数年度契約の実施

平成 17~21 年度、もしくは平成 19~21 年度の複数年度契約を行う。

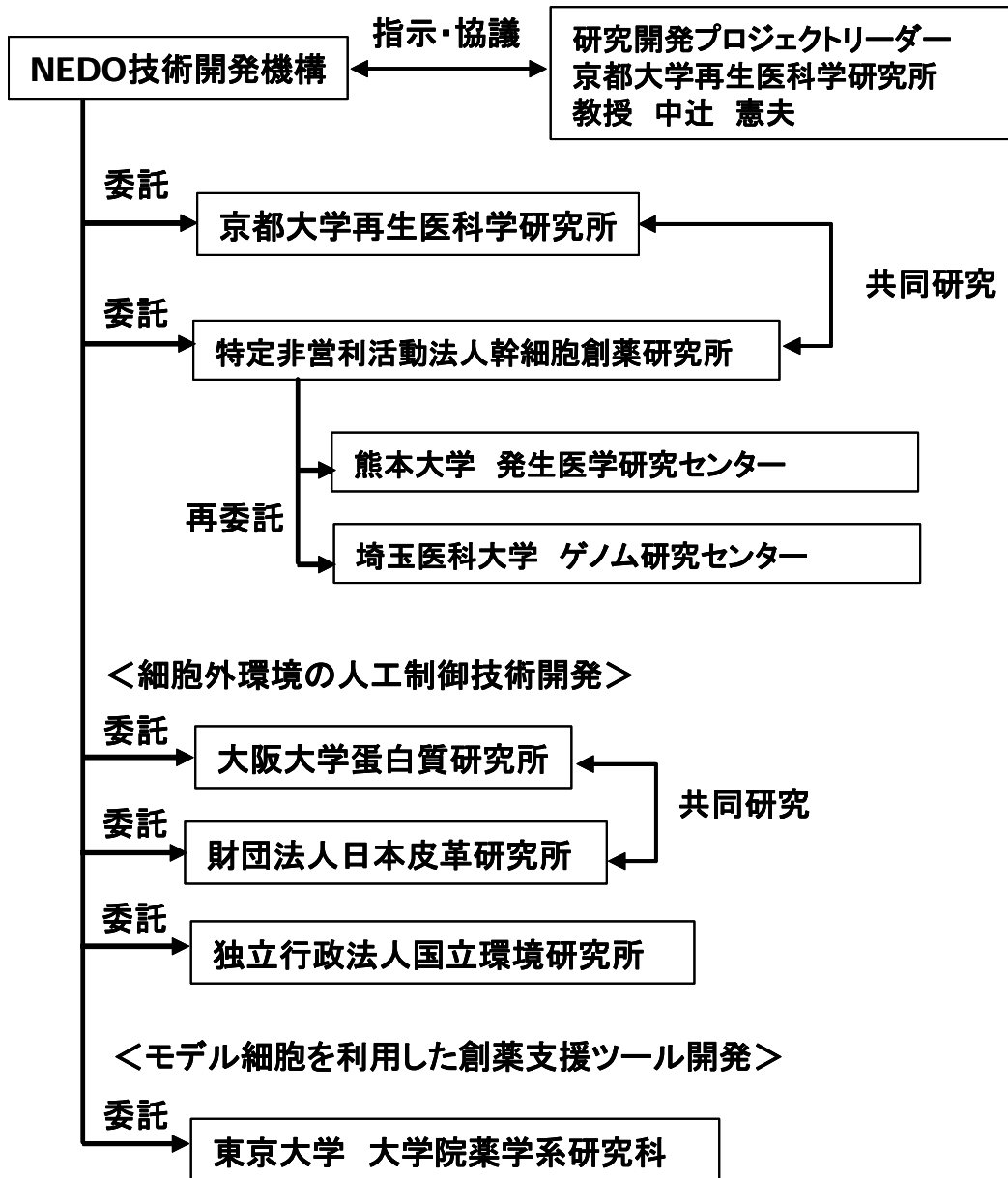
(平成 20 年度に 2 年間の延長契約を行う。)

7. スケジュール

平成20年10月 第1回開発推進委員会

平成21年1月 第2回開発推進委員会

平成20年度実施体制



平成21年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名:(プログラム名)健康安心イノベーションプログラム
(大項目)幹細胞産業応用促進基盤技術開発
(中項目)モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発
(小項目)研究用モデル細胞の創製技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第二号

3. 背景及び目的・目標

製薬産業界では、ライフサイエンス研究における近年の技術的な発展によって蓄積されたゲノムの塩基配列情報や遺伝子発現情報、タンパク質の立体構造情報、タンパク質と低分子化合物の相互作用情報など、様々な情報を活用するゲノム創薬によって創薬プロセスを効率化し、安価な医薬品を迅速に上市することが可能となると期待されていた。

しかし、実際には投入する研究開発費が年々増加しているにも関わらず、上市される医薬品の数はむしろ減少しており、ゲノム創薬におけるギャップが生じている。これは、近年のポストゲノム研究の進展により見出された創薬ターゲット候補から真の druggable gene を絞り込むことが困難であることや臨床試験以前での新薬の安全性評価及び薬理評価の制度が十分でないことが一因と考えられる。創薬プロセスの後期である臨床試験において薬剤候補がドロップアウトしてしまうと、それまでに投入した開発費が回収困難となってしまうことから、創薬プロセスの早い段階から効率的に創薬ターゲットを絞り込むための新規な技術の開発が重要な課題である。

本研究開発は、均質な遺伝的背景を有し、無限に増殖できるとともに、あらゆる細胞組織に分化できる多能性を有するヒト ES 細胞(ヒト胚性幹細胞)を対象に、遺伝子の相同組換え、RNA 干渉による遺伝子サイレンシング技術等を用いてヒト ES 細胞を加工し、様々な分化誘導因子を用いて分化誘導を制御する基盤技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能や細胞内ネットワークの解明、薬剤候補の安全性の向上といった創薬の基盤研究に資する研究用モデル細胞の創製を行うことを目的とする。

(1)最終目標(平成21年度末)

ヒト ES 細胞の加工技術、分化誘導制御技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価、創薬研究の効率化のための技術基盤として有用な研究用モデル細胞を創製する。

(2)中間目標(平成19年度末)

ヒト ES 細胞の加工技術及び分化誘導制御技術の開発に目処をつける。

4. 実施内容及び進捗(達成)状況

国立大学法人京都大学再生医科学研究所教授 中辻憲夫氏をプロジェクトリーダーとして、以下の技術開発を行った。

(1)ヒト ES 細胞の加工技術開発

1)ヒト ES 細胞への遺伝子導入と導入遺伝子の発現制御技術の開発

①同一プロモーターによる複数の導入遺伝子発現を効率よくできるシステムの開発を推進

した。

- ②京都大学で樹立したヒト ES 細胞と遺伝子導入などの操作に対して耐性を持ち、増殖能が高い使いやすいサブラインについて、発現している遺伝子の網羅的な比較解析を行い、ヒト ES 細胞が使いやすくなる遺伝子候補を見出した。さらにヒト ES 細胞でこれら候補遺伝子の発現を抑制することにより、ES 細胞が扱いやすいかどうかを検討できる評価系を確立した。この評価系により、ES 細胞を使いやすくなる遺伝子候補が、ヒト ES 細胞に対してどのような機能があるかを解析することが可能になった。
 - ③ヒト ES 細胞での Tet-On/Off システム(化学物質テトラサイクリンにより遺伝子の発現を On/Off するシステム)の構築を行い、このシステムを用いヒト ES 細胞を特定の方向へ分化誘導可能であることを見出した。
 - ④ヒト ES 細胞 (KhES-1 subline 1, KhES-3) とヒト iPS 細胞に対してヘルパー依存型アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV) ベクター、レンチウイルスベクター、リポフェクションを用いて一過性遺伝子発現の効率を検討した。ヘルパー依存型アデノウイルスベクターの場合は、細胞種を問わず高効率(90~100%)で遺伝子導入が可能であることを確認した。
 - ⑤熊本大学との共同研究で、肝細胞の成熟化を促進する遺伝子の候補である LIP や LAP 遺伝子を強発現するアデノウイルスベクターを産生した。
- 2)ヒト ES 細胞における相同組換え技術の開発
- ①ヒト ES 細胞 (KhES-1) を用いて、世界的にみても非常に高い効率で HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase の略) 遺伝子座と、ROSA26 遺伝子座への相同組換えに成功した。
 - ②さらに別のヒト ES 細胞株 (KhES-3) でも ROSA26 遺伝子座への相同組換えに成功した。
 - ③HPRT 遺伝子座を相同組み換えしたヒト ES 細胞クローンの未分化性維持、高い増殖性能維持など ES 細胞として普及するために必要な条件に関する性状解析および核型解析による染色体数異常の有無の確認を行い、現在までのところ異常が見られないことを確認した。
 - ④KhES-1 の HPRT 遺伝子座、ROSA26 遺伝子座に対して好みの遺伝子を挿入できる遺伝子置換技術を確立した。また、KhES-3 の ROSA26 遺伝子座への遺伝子置換にも成功した。
 - ⑤遺伝子置換技術を応用し、KhES-1 の HPRT 遺伝子座単独での誘導的遺伝子発現に成功した。
 - ⑥肝細胞特異的なヒトアルブミン遺伝子座にマーカー遺伝子を組み込んだヘルパー依存型アデノウイルスベクターを産生した。また、神経細胞に特異的なヒト HB9 遺伝子座にマーカー遺伝子を組み込んだヘルパー依存型アデノウイルスベクターを産生した。
- 3)ヒト ES 細胞における RNA 干渉法による遺伝子発現制御技術の開発
- ①タモキシフェン投与により誘導的に発現させる新しい誘導性 shRNA (RNA 干渉を起こすことができる短いヘアピン状の RNA) 発現システムを構築し、マウス ES 細胞の分化途上において遺伝子発現を特異的に抑制することに成功した。この方法は、従来のテトラサイクリン誘導性システムより有効と考えられた。
 - ②またこの方法を上記項目 1) のヒト ES 細胞導入遺伝子の発現制御技術における Tet-OFF cDNA 発現システムと組み合わせて、ノックダウンレスキューシステムの構築を可能にした。
 - ③①の shRNA 発現システムは、徐々にサイレンシング(遺伝子発現率が低下)が起こる傾向があるという結果が得られ、より安定した遺伝子の発現が可能となるマイクロ RNA (miRNA: RNA 干渉を起こすことができる短い RNA) をタモキシフェンにより発現誘導することができ

る遺伝子発現抑制システムを新たに構築した。

- ④マイクロRNAをタモキシフェンにより誘導的に発現させることにより、マウスES細胞の分化途上において遺伝子発現を特異的に抑制できる予備的な結果を得た。この結果により、心筋等の分化に関与する種々の遺伝子群の発現抑制を行い、遺伝子機能解析及び細胞分化誘導への応用が可能となった。

(京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究所、埼玉医科大学)

(2) ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発

1) ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発

- ①ノギン(BMPシグナルの拮抗因子)を用いて効率的な神経前駆細胞への分化誘導法をこれまで確立していたが、さらに外来因子を用いることで、神経前駆細胞から各種の神経細胞への分化を促し、生理的機能をもつ成熟した運動神経細胞、GABA作動性神経細胞、そしてドーパミン作動性神経細胞を得た。
- ②神経分化誘導途中において神経前駆細胞の細胞数を増幅させる方法、さらにES細胞由来の運動神経細胞を濃縮する方法を確立した。
- ③KhES-1以外の京都大学で樹立されたヒトES細胞株の2株(KhES-2とKhES-3)においても、これまでに確立した神経分化誘導方法が適応可能であること、さらに、外国産のヒトES細胞(H9)由来である神経幹細胞からも、これまでに確立した同じ方法で運動神経細胞を誘導出来ることを確認した。

2) ヒトES細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発

- ①マウスES細胞からの心筋細胞及び心筋前駆細胞の誘導効率を従来の10-20倍促進する新たな方法を開発した(サイクロスポリンA投与方法)。マウスES細胞由来FLK1(マウス血管内皮細胞増殖因子受容体の一種)陽性細胞の約60%を心筋に誘導することができる、世界最高レベルと判断される誘導効率結果が得られた。同方法に関して、特許申請及び論文発表を行った。成果に関して日本経済新聞にて報道された。
- ②マウス人工多能性幹細胞(iPS細胞)からの心血管細胞誘導法を開発し、論文に発表した。
- ③ヒトES細胞由来心筋細胞(hESC-CMs)の拍動性を長期維持できる「長期再接着培養法」を確立した。
- ④浮遊培養法の併用により短期間で心筋機能を増強できた。
- ⑤「長期再接着培養法」により心筋特異的遺伝子発現の増加およびNa、Kイオンチャネル機能の成熟化に成功した。
- ⑥成熟化したhESC-CMsで、既知のチャネル阻害剤による明瞭なQT延長を検出できた。特にhERG試験で検出不可能であった化合物でin vivoを反映する結果を検出できた。

3) ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発

- ①肝細胞成熟能を有するマウス胎仔肝臓由来間葉系細胞株を同定し、初代培養を用いなくても肝細胞成熟を行うことが可能になった。さらに検討を行い、共培養系としてより効果のあるストローマ細胞由来のMLSgt細胞株を見いだすことに成功した。
- ②AFP(肝臓のマーカータンパク質である α フェトプロテインの略)を指標としたヒトES細胞から内胚葉への分化誘導についても、共培養を用いず20%以上誘導できる条件を見出すことができた。特にその中で、マトリゲル、アクチビン、HGFが重要な役割をしていることを見出した。
- ③共培養系(中胚葉由来細胞株を用いる)において、ヒトES細胞から成熟肝細胞マーカー発現細胞へ誘導する培養条件を見出し、アルブミン発現量を向上させるための培養条件を決定した。さらに、共培養系を用いず、擬似基底膜を利用して肝細胞への分化誘導

できる条件を見出した。

- ④ヒトES細胞と中胚葉由来細胞株との共培養で肝前駆細胞への初期分化誘導を行い、さらにコラーゲンコート皿への植替え及びMLSgt細胞との共培養を行い、肝前駆細胞を増幅・成熟させる技術の開発に成功した。本分化細胞において既知化合物による薬物代謝酵素の誘導が確認された。

4) 分子構成を最適化した人工基底膜による ES 細胞の分化誘導制御技術の開発

- ①I型コラーゲンと IV型コラーゲンの両方の長所を併せ持つI型/IV型混成コラーゲンゲルを基材とした改良型人工基底膜の調製法を確立した。また、ヘパラン硫酸プロテオグリカンおよびニドゲンの発現・精製法を完成し、これらを組み込んだ第二世代人工基底膜の作製に成功した。
- ②標的臓器を心臓と消化管内胚葉(肝臓、肺を含む)に絞り、発生段階の異なるマウス胎仔および成体臓器について解析を進めた。心臓発生初期では $\alpha 4$ 鎖ラミニンが心筋層と心内膜の間に主として発現し、発生が進行すると心筋細胞の周囲に $\alpha 2$ 鎖ラミニンを主体とする基底膜が形成されることを明らかにした。また、肝臓発生の初期では、 $\alpha 1$ 鎖および $\alpha 3$ 鎖を含むラミニンが類洞様構造部位に発現することを見出した。
- ③ノギン処理による心筋分化誘導系を導入し、心筋前駆細胞が再現性よく誘導されることを確認した。この方法を利用した人工基底膜の機能評価系を構築した。

5) 擬似基底膜を利用した ES 細胞の分化誘導制御技術の開発

- ①ヒト ES 細胞の分化誘導と成熟化に特化した、精度の高い基底膜構造体の培養基質を、ラミニン安定発現株や不死化肝実質細胞株、及び共培養細胞を用いて創製し、ES 細胞由来肝細胞分化誘導研究グループへ提供した。
- ②ラミニン安定発現株を用いて、簡略化した基底膜培養基質を作製する技術を開発し、胚葉体から神経への分化誘導について、十分効果が期待できることを確認した。
- ③シンデカン/293細胞は、基底膜構造体の形成を促進することを明らかにした。

6) 人工基底膜、擬似マトリックスの評価

- ①他の基底膜成分が揃っている場合は、特定のラミニン・アイソフォームが、胚葉体から神経への分化においてニューロン伸張などに効果を示した。
- ②さらにこの化学的組成が明確な培養条件下で培養したヒト ES 細胞は長期培養が可能であることを、未分化状態の維持、分化能の保持、正常染色体の保持などについて確認した。

(京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究所、熊本大学、大阪大学、日本皮革研究所、国立環境研究所)

(3) 研究用モデル細胞の構築技術の開発

1) 神経変性疾患モデル細胞の創製

- ①樹立した神経変性疾患原因遺伝子(SOD1、PS1、HTT 遺伝子の野生型または変異型)を安定発現するヒト ES 細胞株が神経分化能を失っておらず、神経細胞へ分化することを確認した。
- ②これら ES 細胞株から分化した神経細胞の特徴付け(SOD 酵素活性や β アミロイド産生変化など)を行い、親株に比べ SOD1 発現細胞では SOD 酵素活性の増加、また変異型 PS1 発現細胞では β アミロイド産生の比率変化を確認した。
- ③幹細胞創薬研究所、遺伝子改変グループが開発した HPRT 遺伝子座への外来遺伝子を挿入する系を用いる神経変性疾患原因遺伝子を発現する挿入用発現ベクターを構築した。その発現ベクターの一部はヒト ES 細胞へ導入し、原因遺伝子が安定発現するヒト ES 細胞株を得た。

2) 血液脳関門 (BBB) モデルの創製

- ①ヒト ES 細胞から血管系細胞の高効率分化誘導法を新規開発した。
- ②血管内皮細胞のソーティング技術およびその量産化(継代増幅) 技術を確立することにより、モデル構築に十分な血管内皮細胞の供給体制を整備した。
- ③血管前駆細胞のソーティング技術を確立し、血管平滑筋(周皮)細胞の量産化技術を確立することにより、モデル構築に十分な血管平滑筋細胞の供給体制を整備した。
- ④コラーゲン線維基質 (fib) および超薄膜コラーゲン線維基質 (s.mesh-fib) から、基底膜構造体を有する培養基質 (sBM および mesh-sBM) を創製し、良好なバリア形成を実現できる培養基質を選択し、これを ES 細胞由来血管内皮細胞 (EC:ES-Endothelial Cell) 分化誘導研究グループに提供した。
- ⑤ヒトES細胞由来血管系細胞(血管内皮細胞および血管平滑筋細胞)や神経系細胞を組み合わせる血液脳関門 (BBB) モデルを構築し、静的バリア形成を確認した。

3) ES 細胞由来肝細胞を用いた、創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立

- ①これまでに本プロジェクト中で構築した様々な予測法を統合的に用いることにより、全身の薬物動態を予測可能な数理モデルの構築を行うとともに、in vitro 実験の結果を利用した全身の薬物の血中濃度推移や臓器分布に関して pravastatin をモデル化合物として用い良好に予測することに成功した。
- ②薬物間相互作用について、肝細胞を用いるラット in vivo における複数の阻害剤による基質の濃度変化を比較的良好に予測することができる方法論を確立した。
- ③サンドイッチ培養肝細胞を用いた胆汁排泄クリアランスの絶対値の in vitro-in vivo の相関関係が scaling factor を用いることで比較的良好に予測可能であることを示した。
- ④ES 細胞由来肝細胞のより正確な性能評価を進めるため、前年度に続き、新たに MRP2, CYP2C9 の発現量をヒト肝細胞における発現量と定量的に比較可能な実験系の標準化ならびに標準となる肝細胞のロットの設定を行った。

(京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究所、国立環境研究所、東京大学)

4. 2 実績推移

	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度
実績額推移(百万円): 一般会計(委託事業)	237	750	686	520	
特許出願件数(件):	0	2	9	1	
論文発表件数(報):	2	23	42	24	
フォーラム件数(件):	0	0	0	0	

5. 事業内容

5. 1 平成21年度事業内容

国立大学法人京都大学再生医科学研究所教授 中辻憲夫氏をプロジェクトリーダーとして、遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価及び創薬研究の効率化に有用なヒト ES 細胞由来の研究用モデル細胞の構築を行うため、以下の技術開発を行う。実施体制については、別紙を参照のこと。

平成21年度は、最終年度であることから、創薬産業の利用ニーズに基づき実用化への可能性を考慮し、解析データを以降の開発にフィードバックしながら実用化に向けた開発を着実に進める。更に、必要に応じて目標値の見直しや新規技術の導入を行うとともに、開発した技術の iPS 細胞への適用などを検討する。

(1)ヒト ES 細胞の加工技術開発

1) ヒト ES 細胞への遺伝子導入と導入遺伝子の発現制御技術の開発

- ①平成19年度に見出したヒトES細胞が使いやすくなるため候補遺伝子の中から特に強い候補遺伝子約20個を見いだすことに成功している。また平成20年度には、遺伝子発現を抑制しES細胞が使いやすくなる効果に関する機能評価系を見いだした。平成21年度は、これらの評価系を組み合わせ、候補遺伝子がヒトES細胞に対しどのような影響を及ぼすかについての検討を行う。
- ②Tet-On/Offシステムについては、特定方向への分化制御効果の詳細な検討を行う。
- ③これまでの知見を元に、一過性もしくは持続的遺伝子発現の目的に応じて、例えば、肝細胞への分化誘導遺伝子の候補として HNF-1、HNF-6、C/EBP α を、神経細胞への分化誘導遺伝子の候補として HB9、Nol3 等を強発現するウイルスベクターを作成し、分化における効果を確認する。

2) ヒト ES 細胞における相同組換え技術の開発

- ①平成20年度に引き続き、HPRT 遺伝子座を相同組み換えしたクローンの性状解析を継続する。
 - ②遺伝子置換技術を分化誘導制御技術と融合させ、有用モデル細胞の創出を補助する。
 - ③ヘルパー依存型アデノウイルスベクターと比べて産生法が比較的簡便な AAV ベクターやレンチウイルスベクターを用いた相同組み換えの効率を上げるため、shRNAを用いたネガティブ選択法の改良を進める。
 - ④相同組み換えのヒト iPS 細胞への技術展開が可能かどうかの検討を行う。
- ## 3) ヒト ES 細胞における RNA 干渉法による遺伝子発現制御技術の開発
- ①誘導性マイクロRNAの技術をマウスES細胞において確立し、種々の細胞分化に関与する関連遺伝子を標的とした遺伝子発現抑制実験を行い、新規分子機構の解明と細胞分化方法を探索する。
 - ②Tet-OFF cDNA レスキューシステムと組み合わせ、新しいノックダウンレスキューシステムを構築する。
 - ③構築されたシステムのうち最善のものを用いたヒトES細胞システムを構築する。
 - ④以上の開発で得られた技術の、マウス及びヒトiPS細胞への応用を試みる。
- (京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究所、埼玉医科大学)

(2) ヒト ES 細胞の分化誘導制御技術開発

1) ヒト ES 細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発

モデル細胞構築の際、必要とされる神経系細胞の分化方法の確立を行う。また、分化誘導時のコストを下げる方法を探索する。

- ①アストロサイトへの分化誘導方法の確立
- ②前脳領域のグルタミン酸作動性神経細胞への分化誘導方法の確立
- ③神経誘導時に必要である高価な組換え蛋白質(ノギンなど)の代替可能となる安価な低分子化合物の探索

2) ヒト ES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発

平成20年度までの成果を踏まえて、マウス ES 細胞において基礎基本技術を確立し、ヒト ES 細胞へ適用する開発を行う。

- ①効率的ペースメーカー細胞誘導及び純化法を確立する。
- ②効率的ヒトES細胞由来心筋分化誘導法を確立する。
- ③上記技術のマウス及びヒトiPS細胞への移転・適用を行う。
- ④ヒトES細胞を用いたHTS系で心筋分化誘導促進物質を探索する。

- ⑤創薬スクリーニングを目的とした均質な成熟心筋細胞の大量取得法の確立を試みる。
 - ⑥QT 延長症候群に関する ES 細胞由来疾患モデル細胞を樹立する。
- 3) ヒト ES 細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発
- 平成20年度までに得られた成果を踏まえて、以下の開発を行う。
- ①共培養系によって肝細胞成熟に効果のあることを確認したストローマ細胞由来の MLSgt 細胞株について、ヒト ES 細胞における肝細胞分化誘導における詳細な検討を進める。
 - ②AFP を指標として支持細胞を用いない実験系を用い、ヒト ES 細胞から肝前駆細胞への分化誘導を見出すことに成功した。さらにこの分化誘導方法では、マトリゲル、アクチビン、HGF が重要な役割を果たしていることを見出すことに成功しており、その知見をもとにさらなる分化誘導率の向上、より安価な分化誘導法について検討を行う。またその一方でヒト ES 細胞から分化誘導した肝前駆細胞を用い肝細胞の成熟能について検討を行う。
 - ③内胚葉系細胞、肝前駆細胞、肝細胞の純化法については、FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting の略) 法と薬剤による純化について検討を行い、薬剤による純化については純化が期待できる複数のベクター構築を行う。さらに、これら開発技術および構築ベクターの利用により、モデル幹細胞も作出を進める。
 - ④培養器材・細胞外基質、培養条件の検討を行い、引き続きより成熟したヒト ES 細胞由来肝細胞の創出を目指す。さらに、ES 細胞由来の肝細胞についての機能評価を行う。
 - ⑤共培養による肝成熟誘導法を精緻化し、より成熟したヒト ES 細胞由来肝細胞の創出を目指す。最終的には薬物代謝酵素やトランスポーター機能を指標とした安全性薬理試験に資する肝細胞誘導法を確立する。
 - ⑥東京大学杉山研究室のヒト肝細胞機能検証系にヒト ES 細胞由来肝細胞を導入し、肝細胞機能の比較検討を行う。
- 4) 分子構成を最適化した人工基底膜による ES 細胞の分化誘導制御技術の開発
- ①ラミニン、IV 型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ニドゲンに加え、標的細胞により選択的に発現する基底膜蛋白質を組み込んだ第三世代人工基底膜を構築する。また、増殖因子をあらかじめ固相化したオールインワン型人工基底膜の構築を検討する。
 - ②心筋と消化管内胚葉細胞 (肝臓、膵臓を含む) を主な標的臓器として、引き続き臓器形成に伴う基底膜分子組成のプロファイリングを進める。また、成体の組織幹細胞周囲の基底膜分子組成を調べ、幹細胞ニッチの分子実体を解明する。
- 5) 擬似基底膜を利用した ES 細胞の分化誘導制御技術の開発
- ①ヒト ES 細胞の分化誘導に特化した基底膜構造体のより精度の高い培養基質の創製を進める。
 - ②ヒト ES 細胞由来肝細胞への分化誘導及び成熟化に最適な基底膜培養基質の仕様を確定し、分化誘導研究グループに安定供給する。
 - ③ヒト ES 細胞由来肝細胞または ES 細胞由来血管内皮細胞 (EC) に分化誘導を掛けた、あるいは、分化過程にある未成熟細胞を、継代・増殖させるために、簡略化した基底膜培養基質 (擬似基底膜基質) の仕様を確定し、両研究グループに提供する。
 - ④ヒトラミニン-10リコンビナントに、更に第4番目の遺伝子ヒトエンタクチンを安定発現させたリコンビナント γ LN10/EN 細胞株を作製し、これまでの基底膜基質 γ LN10-sBM を改善した基底膜基質 γ LN10/EN-sBM を創製・提供する。
- 6) 人工基底膜、擬似マトリックスの評価
- ①ヒト ES 細胞を未分化維持させたまま増殖させることが可能である人工基底膜、マトリックスの改良などのさらなる検討を行う、一方でヒト iPS 細胞への展開も行う。
 - ②ES 細胞からさまざまな基底膜を用い、分化方向、さらには特定方向への分化誘導が可

能かどうかについての検討も行う。

- ③ラミニンを除く他の主要基底膜成分共存下において、ヒト ES 細胞由来肝細胞または ES 細胞由来血管内皮細胞 (EC) への分化誘導と成熟化に最適なラミニン・アイソフォームを明らかにする。

(京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究所、東京大学、熊本大学、大阪大学、日本皮革研究所、国立環境研究所)

(3) 研究用モデル細胞の構築技術の開発 (京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究、国立環境研究所、東京大学)

1) 神経変性疾患モデル細胞の創製

神経分化誘導技術開発の結果を取り入れ、モデル細胞構築を行っていく。

- ①HPRT 遺伝子座への遺伝子挿入系を用いた神経変性疾患原因遺伝子を発現するヒト ES 細胞株 (第2世代) の作成を完了させる。
- ②SOD1 安定発現ヒト ES 細胞 (以前に樹立した株) を用いた疾患モデル細胞の構築を行う (ES 細胞由来アストロサイトとの共培養、運動神経細胞と筋細胞との神経筋結合など)。
- ③PS1 安定発現 ES 細胞 (第2世代) 由来の神経細胞での β アミロイド産生比率変化の確認、シナプス活動の観察などを行い、モデル細胞構築を行う。
- ④HTT 安定発現 ES 細胞 (第2世代) 由来の神経細胞での細胞死を確認し、モデル細胞を構築する。

2) 血液脳関門 (BBB) モデルの創製

- ①ヒト ES 細胞から調製した各種 BBB 構成細胞を組み合わせる BBB モデル化検討において、プロジェクト関係機関と連携しながら、更なる BBB 特性の獲得を追及するとともに、構築モデルの精度を検証する。
- ②ES 細胞由来血管内皮細胞 (EC) から血液脳関門モデルを作製するために最適な、基底膜構造体の培養基質 (sBM)、及び、超薄膜基底膜基質 (mesh-sBM) の仕様を確定し、ES 細胞由来血管内皮細胞 (EC) 研究グループに安定供給する。

3) ES 細胞由来肝細胞を用いた、創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立

- ①前年度に構築した方法論を用いた薬物間相互作用の予測事例の集積による方法論の妥当性の評価、さらに、トランスポーター・代謝酵素など複数の分子が同時に薬物間相互作用の作用点となりうるような複雑なケースの相互作用についても、肝細胞を利用することで定量的に予測するための方法論を構築する。
- ②前年度に構築した生理学的薬物速度論モデルの考え方に基づき、さらに複数の化合物について、肝細胞実験などから得られたパラメータを利用することで、数理モデルを構築し、in vivo における薬物動態の予測の妥当性を評価するために事例をさらに集積させる。
- ③平成20年度度までに構築してきたラット・サンドイッチ培養肝細胞を用いた胆汁排泄トランスポーターの寄与率の解析法を、ヒト・サンドイッチ培養肝細胞における寄与率解析法へと拡張し、複数の化合物について解析することで、方法論の妥当性を評価する。
- ④平成20年度に引き続き、ES 細胞由来肝細胞の薬物動態評価系としての性能評価をさらに進めるため、複数の代謝酵素・トランスポーターの発現量を定量可能な系を構築し、標準化プロトコールの作成および標準化サンプルの発現量の調査を進める。また、簡便な活性評価法についても、標準化を図り、他施設に対して必要な技術協力をを行う。
- ⑤ヒト肝細胞の培養下における長期機能維持を目指して、細胞外基質を構築する研究グループと協力しながら、細胞外基質が長期培養条件下における薬物の異物解毒に関わる分子群の機能維持にどのような影響を果たすかについて、種々検討を進める。

⑥肝細胞機能維持に効果的な基底膜主要成分とそのアイソフォームを、基底膜培養基質(sBM)または擬似基底膜基質を用いて明らかにし、その培養方法についても確定する。

5.2 平成21年度事業規模

一般会計 475百万円(委託事業・継続)

(注)事業規模については、変動があり得る。

6. その他重要事項

(1) 評価

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の事後評価を平成23年(予定)に実施する。

(2) 運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)及びヒトES細胞に関する研究については「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」(平成13年文部科学省告示第155号)を厳守し研究開発を推進する。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16・12・24製局第1号)を厳守する。

(3) 複数年度契約の実施

平成17～21年度、もしくは平成19～21年度の複数年度契約を行う。

(平成20年度に2年間の延長契約を行う。)

7. スケジュール

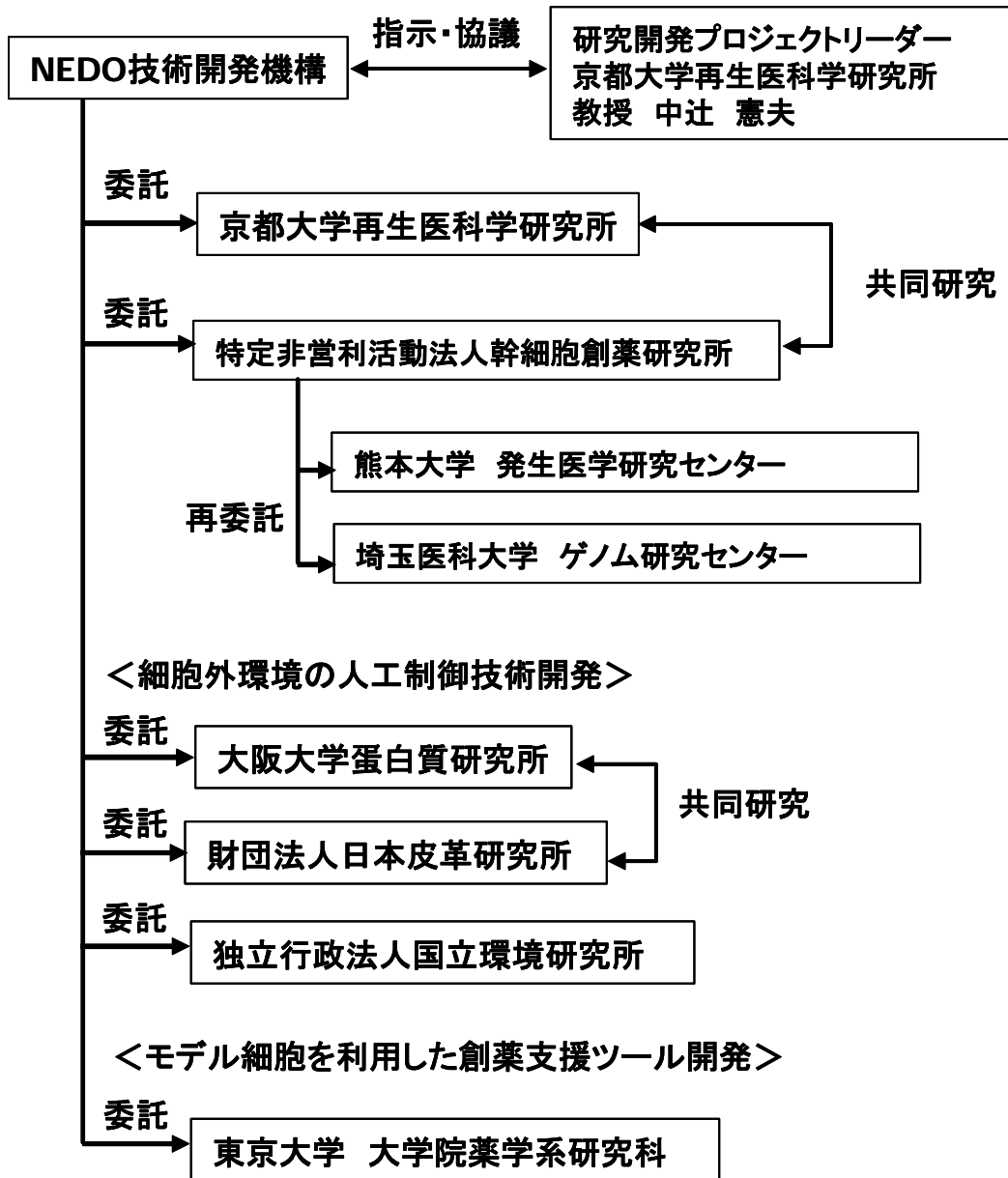
平成21年10月 平成21年度第1回開発推進委員会

平成22年 1月 平成21年度第2回開発推進委員会

8. 改訂履歴

平成21年3月5日制定

平成21年度実施体制



添付資料⑤

特許/論文/発表リスト

【知的所有権】

[知的所有権] 研究開発項目②「ヒトES 細胞の分化誘導制御技術開発」

ヒトES 細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発

番号	出願人	出願番号	出願日	状態	名称	発明人
001	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
002	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
003	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[知的所有権] 研究開発項目②「ヒトES 細胞の分化誘導制御技術開発」

ヒトES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発

番号	出願人	出願番号	出願日	状態	名称	発明人
001	京都大学	PCT/JP2008/066033	2008 年8 月29 日	出願済	Efficient and specific expansion of highly cardiogenic progenitors and cardiomyocytes from embryonic and induced pluripotent stem cells	顔培美、山下潤

[知的所有権] 研究開発項目②「ヒトES 細胞の分化誘導制御技術開発」

ヒトES 細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発

番号	出願人	出願番号		出願日	状態	名称	発明人
001	国立大学法人 京都大学	60/660,692(仮出願 番号)	米国特許	2006/3/9(仮 出願日 2005/3/10)	出願済	In vitro differentiation and maturation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes.	Norio Nakatsuji, Kentaro Yasuchika, Takamichi Ishii, Toshitaka Hoppo, Iwao Ikai, Tetsuo Hirose, Hideaki Fujii, Hajime Kubo, Naoko Kamo.
002	国立大学法人 熊本大学	PCT/JP2005/310324	国際出願	2006 年5 月24 日	出願済	ES 細胞の分化誘導方 法	桑昭苑、白木伸明、吉田哲、後藤秀生、桑 和彦
003	国立大学法人 熊本大学	特願2007-143225 PCT/JP2008/060029	国際 出願	2007 年 5 月30 日	出願済	ES 細胞から肝細胞の 分 化誘導方法	桑昭苑、白木伸明、梅田香穂子、桑和 彦
004							
005							
006							

[知的所有権] 研究開発項目②「ヒトES 細胞の分化誘導制御技術開発」

分子構成を最適化した人工基底膜によるES細胞の分化誘導技術の開発

番号	出願人	出願番号		出願日	状態	名称	発明人
001							

002							
-----	--	--	--	--	--	--	--

[知的所有権] 研究開発項目②「研究用モデル細胞の構築技術の開発」

擬似基底膜を利用したES細胞の分化誘導制御技術の開発

番号	出願人	出願番号	出願日	状態	名称	発明人
001						
002						

[知的所有権] 研究開発項目③「研究用モデル細胞の構築技術開発」

ヒトES 細胞から神経変性疾患モデル細胞の構築

番号	出願人	出願番号	出願日	状態	名称	発明人
001						
002						
003						

[知的所有権] 研究開発項目③「モデル細胞を利用した創薬支援ツール開発」

オンチップ・ヒト組織・臓器モデルを用いた毒性・創薬技術の研究開発

番号	出願人	出願番号		出願日	状態	名称	発明人
001	東京医科歯科大学	2007-78622	日本特許	2007/3/26	出願済 PCT	標的細胞に特異的に結合する核酸のアニーリングによる選択法	安田 賢二、安西 悠、寺藺 英之、福島 守
002	東京医科歯科大学	2007-111322	日本特許	2007/04/20	出願済 PCT	細胞応答計測装置及び方法	安田 賢二、金子 智行、鈴木 郁郎、寺藺 英之、服部 明弘、福島 守
003	東京医科歯科大学	2007-125474	日本特許	2007/5/10	出願済 PCT	神経細胞とグリア細胞の細胞識別方法	鈴木 郁郎、寺藺 英之、安田 賢二、福島 守
004	東京医科歯科大学	2007-130257	日本特許	2007/5/16	出願済 PCT	標的タンパク質に特異的に結合する核酸のハイブリダイゼーションによる選択法	安西 悠、安田 賢二、寺藺 英之、福島 守
005	東京医科歯科大学 三菱安全科学研究所	2007-152692	日本特許	2007/6/8	出願済 PCT	心臓リエントリーモデルチップおよび心臓リエントリーモデルチップによる薬剤の評価装置および方法	安田 賢二、杉山 篤、安東 賢太郎、野村 典正、寺藺 英之、金子 智行、福島 守
006	東京医科歯科大学 三菱安全科学研究所	2007-152696	日本特許	2007/6/8	出願済 PCT	モデル細胞による薬効評価装置	安田 賢二、杉山 篤、安東 賢太郎、野村 典正、寺藺 英之、金子 智行、福島 守
007	東京医科歯科大学 三菱安全科学研究所	2007-152711	日本特許	2007/6/8	出願済 PCT	心筋毒性検査装置、心筋毒性検査チップおよび心筋毒性検査方法	安田 賢二、杉山 篤、安東 賢太郎、野村 典正、寺藺 英之、金子 智行、福島 守

[論文・文献発表]

[論文・文献発表] 研究開発項目①「ヒトES 細胞の加工技術開発」

ヒトES 細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	京都大学	Ishii, T., Yasuchika, K., Fujii, H., Hoppo, T., Baba, S., Naito, M., Machimoto, T., Kamo, N., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Ikai, I.	In vitro differentiation and maturation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes.	Exp. Cell Res. 309, 68-77	査読 済み	2005/9
002	京都大学	Ikeda, R., MD; Kurokawa, M. S., Chiba, S., Yoshikawa, H., Ide, M., Tadokoro, M., Nito, S., Nakatsuji, N., Kondoh, Y., Nagata, K., Hashimoto, T.,	Transplantation of neural cells derived from retinoic acid-treated cynomolgus monkey embryonic stem cells successfully improved motor function of hemiplegic mice with experimental brain injury.	Neurobiology of Disease 20, 38-48	査読 済み	2005/10
003	京都大学	Sasaki E., Hanazawa, K., Kurita R., Akatsuka A., Yoshizaki T., Ishii H., Tanioka Y., Ohnishi Y., Suemizu H., Sugawara A., Tamaoki N., Izawa K., Nakazaki Y., Hamada H., Suemori H., Asano S., Nakatsuji N., Okano H. and Tani K.	Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (<i>Callithrix jacchus</i>).	Stem Cells 23, 1304-1313	査読 済み	2005/10

004	京都大学	Umeda, K., Heike, T., Yoshimoto, M., Shinoda, G., Shiota, M., Suemori, H., Luo, HY., Chui, DH., Torii, R., Shibuya, M., Nakatsuji, N. and Nakahata, T	Identification and characterization of hemoangiogenic progenitors during cynomolgus monkey embryonic stem cell differentiation.	Stem Cells 24, 1348-1358	査読済み	2006/3
005	京都大学	Suemori, H., Yasuchika, K., Hasegawa, K., Fujioka, T., Tsuneyoshi, N. and Nakatsuji, N.	Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage.	Biochem. Biophys. Res. Comm., 345, 926-932	査読済み	2006/7
006	京都大学	Yasuda, S., Tsuneyoshi, N., Sumi, T., Hasegawa, K., Tada, T., Nakatsuji, N. and Suemori, H.	NANOG maintains self-renewal of primate ES cells in the absence of a feeder layer.	Genes Cells, 11, 1115-1123	査読済み	2006/9
007	京都大学	Adachi, K., Kawase, E., Yasuchika, K., Sumi, T., Nakatsuji, N. and Suemori, H.	Establishment of the gene-inducible system in primate embryonic stem cell lines.	Stem Cells, 24, 2566-2572	査読済み	2006/11
008	京都大学	Hasegawa, K., Fujioka, T., Nakamura, Y., Nakatsuji, N. and Suemori, H.	A method for the selection of human embryonic stem cell sub-lines with high replating efficiency after single cell dissociation.	Stem Cells, 24, 2649-2660	査読済み	2006/12
009	京都大学	Hosseinkhani, M., Hasegawa, K., Ono, K., Kawamura, T., Takaya, T., Morimoto, T., Wada, H., Shimatsu, A., Prat, S. G., Suemori, H., Nakatsuji, N., Kita, T.	Trichostatin A induces myocardial differentiation of monkey ES cells.	Biochem. Biophys. Res. Comm. 356, 386-391	査読済み	2007/3

010	京都大学	Nakajima, F., Tokunaga, K., Nakatsuji, N.	HLA Matching Estimations in a Hypothetical Bank of Human Embryonic Stem Cell Lines in the Japanese Population for Use in Cell Transplantation Therapy.	Stem Cells 25, 983-985	査読済み	2007/4
011	京都大学	Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N., Suemori, H.	Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc.	Oncogene		2007/9
012	京都大学	Hasegawa, K., Cowan, A. B., Nakatsuji, N., Suemori, H.	Efficient multicistronic expression of a transgene in human embryonic stem cells.	Stem Cells		2007/7
013	京都大学	Suemori H., Norio Nakatsuji	Generation and characterization of monkey embryonic stem cells.	Methods of Molecular Biology 329:81-9.		2006/2
014	京都大学	Suemori H., Sasai Y., Umeda K., Nakatsuji N.	ES cell lines from the cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>).	"Embryonic Stem Cells, A Practical Approach" (Oxford University Press, NY, USA)		2006/4
015	京都大学	Suemori H.	Establishment and therapeutic use of human embryonic stem cell lines.	Hum Cell 19(2)65-70.		2006/5
016	京都大学	Fujimoto Y., Hasegawa K., Suemori H., Ito J., Nakatsuji. N.,	Molecular cloning and function of Oct-3 isoforms in cynomolgus monkey embryonic stem cells.	Stem Cells and Development 15(4), 566-574.	査読済	2006/8
018	京都大学	Hasegawa K., Yasuda S., Suemori H.	Superior transfection of human embryonic stem cells with Fu GENE HD transfection reagent	Biochemica .4, 19-21.		2006/10
019	京都大学	Tsuneyoshi, N., Sumi, T., Onda, H., Nojima, H., Nakatsuji, N., Suemori, H	PRDM14 suppresses expression of differentiation marker genes in human embryonic stem cells.	Biochem. Biophys. Res. Comm. 367, 899-905	査読済み	2008/3

020	京都大学	Ma, F., Kambe, N., Wang, D., Shinoda, G., Fujino, H., Umeda, K., Fujisawa, A., Suemori, H., Nakatsuji, N., Miyachi, Y., Torii, R., Tsuji, K., Heike, T. and Nakahata, T	Direct Development of Functionally Mature Tryptase/chymase Double Positive Connective Tissue-Type Mast Cells from Primate ES Cells.	Stem Cells 26, 706-714	査読済み	2008/3
021	京都大学	Nakatsuji, N., Nakajima, F. and Tokunaga, K	HLA-haplotype banking and iPS cells.	Nature Biotechnol. 26, 739-740	査読済み	2008/7
022	京都大学	Ishii, T., Fukumitsu, K., Yasuchika, K., Adachi, K., Kawase, E., Suemori, H., Nakatsuji, N., Ikai, I. and Uemoto, S	Effects of extracellular matrixes and growth factors on the hepatic differentiation of human embryonic stem cells.	Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 295, G313-G321	査読済み	2008/8
023	京都大学	Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N. and Suemori, H	Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/b-catenin, Activin/Nodal, and BMP signaling.	Development 135, 2969-2979	査読済み	2008/9
024	京都大学	Miyazaki, T., Futaki, S., Hasegawa, K., Kawasaki, M., Sanzen, N., Hayashi, M., Kawase, E., Sekiguchi, K., Nakatsuji, N. and Suemori, H	Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells.	Biochem. Biophys. Res. Comm., 375, 27-32	査読済み	2008/10
025	京都大学	Taura, D., Noguchi, M., Sone, M., Hosoda, K., Mori, E., Okada, Y., Takahashi, K., Homma, K., Oyamada, N., Inuzuka, M., Sonoyama, T., Ebihara, K., Tamura, N., Itoh, H., Suemori, H., Nakatsuji, N., Okano, H., Yamanaka, S. and Nakao, K.	Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: Comparison with that of human embryonic stem cells.	FEBS Lett. 583, 1029-1033	査読済み	2009/3

026	京都大学	Yamauchi, K., Hasegawa, K., Chuma, S., Nakatsuji, N. and Suemori, H.	In vitro germ cell differentiation from cynomolgus monkey embryonic stem cells.	PLoS ONE 4, e5338	査読済み	2009/4
027	京都大学	Adachi, K., Suemori, H., Yasuda, S. -Y., Nakatsuji N., Kawase, E	The role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells	Genes to Cells	査読済み	2010/5
028	埼玉医科大学	Ohbayashi F, Balamotis MA, Kishimoto A Aizawa E, Diaz A, Hastly P, Graham FL, CaskeyCT, and Mitani K.	Correction of chromosomal mutation and random integration in embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors.	Proc Natl Acad Sci USA, 102: 13628-13633, 2005.	査読済み	2005/9/7
029	埼玉医科大学	Suzuki, K., Mitsui, K., Aizawa, E., Hasegawa, K., Kawase, E., Yamagishi, T., Shimizu, Y., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Mitani, K	Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors.	Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 105, 13781-13786	査読済み	2008/9
030	埼玉医科大学	Mitsui, K., Suzuki, K., Aizawa, E., Kawase, E., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Mitani, K.	Gene targeting in human pluripotent stem cells with adeno-associated virus vectors.	Biochem. Biophys. Commun. 388, 711-717 Res.	査読済み	2009/10
031	京都大学	安達啓子、川瀬栄八郎、末盛博文、中辻憲夫	ヒトおよびサルES 細胞の培養法～長期安定増殖を可能にする継代維持方法	バイオテクノジャーナル (2005)5、547-551.		2005/9/1
032	京都大学	中辻憲夫、長谷川光一、安達啓子、末盛博文	ヒトES 細胞株の樹立研究と実用化への展望	医学のあゆみ. 220, 131-138		2007/1
033	京都大学	長谷川光一、末盛博文	ヒトES 細胞研究の現状と展望	蛋白質核酸酵素 52,256-263		2007/3

034	京都大学	安達啓子、川瀬栄八郎、 中辻憲夫	ES 細胞—その万能性—	再生医療技術の最前線監修： 岡野光男、大和雅之 シーエム シー出版第3章細胞ソース 69-75 (2007)		2007/6
035	京都大学	末盛博文、中辻憲夫	使ってみたいバイオリソース大集 合 第12回:ヒトES 細胞	細胞工学. 26, 1172-1173		2007/10
036	京都大学	川瀬栄八郎	ヒトES 細胞	最新医学 64 巻3 月増刊号 「幹細胞研究の最近の進歩(前 編)」(2009) 507-516.		2009/3

[論文・文献発表] 研究開発項目① 「ヒトES 細胞の加工技術開発」

ヒトES 細胞における相同組み換え技術の開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	幹細胞創薬研究所	Sakurai K., Shimoji M., Tahimic C.G.T., Aiba K., Kawase E., Hasegawa K., Amagai Y., Suemori H., Nakatsuji N.	Efficient integration of transgenes into a defined locus in human embryonic stem cells.	Nucleic Acids Research doi:10.1093/nar/gkp1234	査読済み	2010/1/13
002	埼玉医科大学	Suzuki, K., Mitsui, K., Aizawa, E., Hasegawa, K., Kawase, E., Yamagishi, T., Shimizu, Y., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Mitani, K	Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors.	Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 105, 13781-13786	査読済み	2008/9

003	埼玉医科大学	Mitsui, K., Suzuki, K., Aizawa, E., Kawase, E., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Mitani, K.	Gene targeting in human pluripotent stem cells with adeno-associated virus vectors.	Biochem. Biophys. Commun. 388, 711-717 Res.	査読済み	2009/10
-----	--------	--	---	--	------	---------

[論文・文献発表] 研究開発項目①「ヒトES 細胞の加工技術開発」

ヒトES 細胞におけるRNA 干渉法による入遺伝子発現制御技術の開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	京都大学	Yamashita JK.	Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors.	Trends Cardiovasc Med, 17: 59-63, 2007.	査読済み	2007/2/1
002	京都大学	Kamo N, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Machimoto T, Ishii T, Fujita N, Tsuruo T, Yamashita JK, Kubo H, Ikai I.	Two populations of Thy1-positive mesenchymal cells regulate the in vitro maturation of hepatic progenitor cells.	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 292: G526-534, 2007.	査読済み	2007/2/1
003	京都大学	Hiraoka-Kanie M, Miyagishi M, Yamashita JK	Differentiation stage-specific analysis of gene function with inducible short hair-pin RNA in differentiating embryonic stem cells.	Biochem Biophys Res Commun, 351: 669-674, 2006.	査読済み	2006/12/22
004	京都大学	Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, Nakano A, Narazaki G, Kita F, Yanagi K, Hiraoka-Kanie M, Inoue E, Ara T, Nagasawa T, Just U, Nakao K, Nishikawa SI, Yamashita JK.	Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors.	Arterioscler Thromb Vasc Biol, 26: 1977-1984, 2006.	査読済み	2006/9/1

005	京都大学	Kono T, Kubo H*, Shimazu C, Ueda Y, Takahashi M, Yanagi K, Fujita N, Tsuruo T, Wada H, Yamashita JK	Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells.	Arterioscler Thromb Vasc Biol, 26: 2070-2076, 2006.	査読済み	2006/9/1
006	京都大学	Nakao Y, Yoshida S, Matsunaga S, Shindoh N, Terada Y, Nagai K, Yamashita JK, Ganesan A, Soest van RW, Fusetani N.	Azumamides A-E: Histone Deacetylase Inhibitory Cyclic Tetrapeptides from the Marine Sponge Mycale izuensis.	Angew Chem Int Ed, 45: 7553-7557, 2006.	査読済み	2006/11/20
007	京都大学	Hisatsune H, Matsumura K, Ogawa M, Uemura A, Kondo N, Yamashita JK, Katsuda H, Nishikawa S, Chiba T, Nishikawa SI.	A high level of endothelial cell-specific gene expression by a combination of 5' flanking region and 5' half of the first intron of VE-cadherin gene.	Blood, 105: 4657-4663, 2005.	査読済み	2005/1/15
008	京都大学	Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, Miyazono K, Yamashita JK, Obi S, Ohmura N, Matsushita A, Kamiya A, Ando J.	Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro.	Am J Physiol Heart Circ Physiol, 288: H1915-1924, 2005.	査読済み	2005/4/1
009	京都大学	Yamamizu K, Kawasaki K, Katayama S, Watabe T, Yamashita JK	Enhancement of vascular progenitor potential by protein kinase A through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1	Blood, 114: 3707-3716, 2009	出版済み	2009/8/25

010	京都大学	Yamamizu K, Matsunaga T, Uosaki H, Fukushima H, Katayama S, Hiraoka-Kanie M, Mitani K, Yamashita JK	Convergence of Notch and β -catenin signaling induces arterial fate in vascular progenitors	J Cell Biol, in press	印刷中	
-----	------	---	--	-----------------------	-----	--

[論文・文献発表] 研究開発項目② 「ヒトES 細胞の分化誘導制御技術の開発」

ヒトES 細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	幹細胞創薬研究所	Aiba K., Sharov AA., Cater MG., Foroni C., Vescovi AL. and Ko MSH	Defining a developmental path to neural fate by global expression profiling of mouse embryonic stem cells and adult neural stem/progenitor cells	Stem Cells, 24, 889-895	査読 済	2006/4
002	幹細胞創薬研究所	Aiba K., Carter MG., Matoba R. and Ko MSH.	Genomic approach to earlyembryogenesis and stem cell biology	Seminars in Reproductive Medicine 24, 330-339		2006/12
003	幹細胞創薬研究所	饗庭一博	ヒト胚性幹細胞から作成されるモデル 細胞と創薬研究	メディカル・サイエンス・ダイジェス ト、33 巻14 号、p9(1248)		2007/12
004	幹細胞創薬研究所	饗庭一博	胚性幹細胞から誘導された分化細胞 のゲノミクス解析	遺伝子医学MOO K別冊「進 み続ける細胞移植治療の実際－ 再生医療の実現に向けた科学・ 技術と周辺要素の理解－」第2 章 移植細胞のための周辺の基 礎生物医学p149-153		2008/8
005	幹細胞創薬研究所	和田圭樹、中辻憲夫	多能性幹細胞株の医療および創薬に おける活用の展望	Drug Delivery System (日本医学 館)、23(5), 569-574		2008/8

006	幹細胞創薬研究所	Aiba K, Nedorezov T, Piao Y, Nishiyama A, Matoba R, Sharova LV, Sharov AA, Yamanaka S, Niwa H, and Ko MSH	Defining developmental potency and cell lineage trajectories by expression profiling of differentiating mouse embryonic stem cells	DNA Research 16, 73-80	査読済	2009/2
007	幹細胞創薬研究所	Wada T, Honda M, Minami I, Tooi N, Amagai Y, Nakatsuji N and Aiba K.	Highly efficient differentiation and enrichment of spinal motor neurons derived from human and monkey embryonic stem cells.	PLoS ONE4(8): e6722	査読済	2009/8
008	幹細胞創薬研究所	Sakurai K, Shimoji M, Tahimic CGT, Aiba K, Kawase E, HasegawaK, Amagai Y, Suemori H and Nakatsuji N	Efficient integration of transgenes into a defined locus in human embryonic stem cells	Nucleic Acids Research, doi:10.1093/nar/gkp1234	査読済	2010/1
009	幹細胞創薬研究所	饗庭一博、尾辻智美、中辻憲夫	ヒトES 細胞の創薬産業における有用性	iPS 細胞の産業的応用技術、p69-76、CMC出版		2009/9
010	幹細胞創薬研究所	本田誠、饗庭一博、中辻憲夫	ヒトES 細胞株の遺伝子改変と神経細胞分化誘導によるAlzheimer 病モデル細胞	医学のあゆみ232 巻2 号 p123-127		2010/1
011	幹細胞創薬研究所	饗庭一博、櫻井健二、中辻憲夫	ヒトES 細胞から作成される疾患モデル細胞	実験医学増刊再生医療の最前線 2010、p211-126、羊土社		2010/1
012	幹細胞創薬研究所	和田圭樹・南一成・中辻憲夫	ヒト多能性幹細胞株(ES およびiPS 細胞株)を用いた分化誘導技術および HTS への応用展開	新薬展望2010 (医薬ジャーナル社)、46(S-1), 247-253		2010/1

[論文・文献発表] 研究開発項目②「ヒトES 細胞の分化誘導制御技術開発」

ヒトES 細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	京都大学	Yanagi K, Takano M, Narazaki G, Uosaki H, Hoshino T, Ishii T, Misaki T, Yamashita JK	HCN and Cav3 ion channels confer automaticity of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes.	Stem Cells	査読済み	2007/5
002	京都大学	Yamashita JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, Shimazu C, Yan P, Yanagi K, Nakano A, Inoue E, Kita F, Nishikawa SI.	Prospective identification of cardiac progenitor potentials by a novel single cell-based cardiomyocyte induction.	FASEB J, 19: 1534-1536, 2005.	査読済み	2005/9/1
003	京都大学	Huang H, Nakayama Y, Qin K, Yamamoto K, Ando J, Yamashita J, Itoh H, Kanda K, Yaku H, Okamoto Y, Nemoto Y.	Differentiation from embryonic stem cells to vascular wall cells under in vitro pulsatile flow loading.	J Artif Organ, 8: 110-118, 2005.	査読済み	2005/8/11
004	京都大学	Narazaki G, Uosaki M, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, Yamanaka S, Yamashita JK	Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells	Circulation, 118: 498-506, 2008	出版済み	2008/7/14
005	幹細胞創薬研究所	饗庭一博、尾辻智美、中辻憲夫	ヒトES 細胞の創薬産業における有用性	iPS 細胞の産業的応用技術(監修：山中伸弥)、69-76、シーエムシー出版、東京(2009)		2009

006	幹細胞創薬研究所	Otsuji T.G., Minami I., Kurose Y., Yamauchi K., Tada M., Nakatsuji N.	Progressive maturation in contracting cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells: Qualitative effects on electrophysiological responses to drugs.	Stem Cell Research, 4: 201-213	査読済み	2010
007	幹細胞創薬研究所	Asai Y, Tada M, Otsuji TG, Nakatsuji N.	Combination of Functional Cardiomyocytes Derived from Human Stem Cells and a Highly-Efficient Microelectrode Array System: An Ideal Hybrid Model Assay for Drug Development	Curr Stem Cell Res Ther. In press		2010

[論文・文献発表] 研究開発項目②「ヒトES 細胞の分化誘導制御技術開発」

ヒトES 細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	京都大学	Ishii, T., Yasuchika, K., Fujii, H., Hoppo, T., Baba, S., Naito, M., Machimoto, T., Kamo, N., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Ikai, I.	In vitro differentiation and maturation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes.	Exp. Cell Res. 309, 68-77	査読済み	2005/9
002	京都大学	Kamo N., Yasuchika K., Fujii H., Hoppo T., Machimoto T., Ishii T., Fujita N., Tsuruo T., Yamashita J.K., Kubo H., Ikai I.	Two populations of Thy1-positive mesenchymal cells regulate in vitro maturation of hepatic progenitor cells.	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292:526-534, 2007	査読済み	2007/2

003	京都大学	Ishii, T., Yasuchika, K., Machimoto, T., Kamo, N., Komori, J., Konishi, S., Suemori, H., Nakatsuji, N., Saito, M., Kohno, K., Uemoto, S., Ikai, I.	Transplantation of embryonic stem cell-derived endodermal cells into mice with induced lethal liver damage	Stem Cells 25, 3252–3260	査読 済み	2007/12
004	京都大学	<u>Ishii, T., Fukumitsu, K., Yasuchika, K., Adachi, K., Kawase, E., Suemori, H., Nakatsuji, N., Ikai, I., Uemoto, S.</u>	Effects of extracellular matrixes and growth factors on the hepatic differentiation of human embryonic stem cells	<u>Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008 ; 295 (2): G313–21</u>	査読 済み	2008/8
005	京都大学・幹 細胞創薬研 究所	Fukumitsu, K., Ishii, T., Yasuchika, K., Amagai, Y., Kawamura-Saito, M., Kawamoto T, Kawase, E., Suemori, H., Nakatsuji, N., Ikai, I., Uemoto, S.	Establishment of a cell line derived from a mouse fetal liver that has the characteristic to promote the hepatic maturation of mouse embryonic stem cells by a coculture method.	Tissue Eng Part A. 2009; 15(12): 3847–56.	査読 済み	2009/12
006	京都大学・幹 細胞創薬研 究所	Ishii, T., Yasuchika, K., Fukumitsu, K., Kawamoto, T., Kawamura-Saitoh, M., Amagai, Y., Ikai, I., Uemoto, S., Kawase, E., Suemori, H., Nakatsuji N.	In vitro hepatic maturation of human embryonic stem cells by using a mesenchymal cell line derived from murine fetal livers.	Cell Tissue Res. 2009	査読 済み	In press
007	熊本大学	Shiraki N., Lai C-J., Hishikari Y. and Kume, S.	TGF- β signaling potentiates differentiation of embryonic stem cells to Pdx-1 expressing endodermal cells.	Genes Cells 10, 503–16, 2005.	査読 済み	
008	熊本大学	Kume, S.	Stem cell- based approaches for regenerative medicine.	Develop. Growth Diff. 47, 393–402, 2005.	査読 済み	

009	熊本大学	Shiraki,N.,Yoshida, T., Araki,K.,Umezawa,A., Higuchi,Y.,Goto,H., Kume,K.,and Kume, S.	Guided differentiation of ES cells into Pdx1-expressing regional specific definitive endoderm.	Stem Cells 26, 874-885, 2008	査読 済み	
010	熊本大学	Yoshida T., Shiraki N., Baba, H., Goto, M., Fujiwara, S., Kume K.and Kume S.	The expression patterns of Epiplakin1 in pancreas,pancreatic cancer and regenerating pancreas.	Genes Cells 13, 667-678,2008	査読 済み	
011	熊本大学	Shiraki, N., Umeda, K., Sakashita, N., Takeya, M., Kume K. and Kume S.	Differentiation of mouse and human ES cells into hepatic lineages.	Genes Cells 13, 731-746, 2008	査読 済み	
012	熊本大学	Shiraki,N.,Higuchi,H.,Harada,S,U meda,K,. Isagawa,T.,Aburatani, H.,Kume,K.,and Kume,S,.	Differentiation and characterization of embryonicstem cells into three germ layers.	Biochem. Biophys. Res. Comm. 381, 694-9, 2008	査読 済み	
013	熊本大学	Yoshida, T., Murata, K., Shiraki, N., Kume, K., Kume, S.	Analysis of gene expressions of ES-derived Pdx1-expressing cells: Implications of genes involved in pancreas differentiation. Develop. Growth Differ.	Develop. Growth Differ. 51, 463-472, 2009.	査読 済み	
014	熊本大学	Katsumoto, K., Shiraki, N., Miki, R., Kume, S.	Embryonic and adult stem cell systems in mammals: Ontology and regulation	Develop. Growth Diff. 52, 115-129, 2010	査読 済み	
015	熊本大学	Shiraki, N., Miki, R., Kume, S.	The potential of ES cells and tissue stem cells in the regenerative medicine of type I diabetes.	'Stem Cell in Medicine' (Edited by Kenichi Isobe) Research Signpost/Transworld Research Network, in press		
016	熊本大学	Shiraki N, Harada S, Ogaki S, Kume K. and Kume S.	Identification of DAF1/CD55, a novel definitive endoderm marker.	Cell Struct. & Function <i>in press</i>	査読 済み	

017	熊本大学	Higuchi Y, Shiraki N, Yamane K, Qin Z, Mochitate K, Hara M, Kume K and <u>Kume S</u>	The synthesized basement membrane substrata direct ES/iPS cells to differentiate into the pancreatic lineages.	J.Cell Science, <i>in pres</i>	査読済み	
018	熊本大学	桑 昭苑	「ヒトES細胞を用いた肝胆膵の発生分化と再生医学研究」医歯薬出版刊行(中辻憲夫他編集)『ヒトES細胞研究のネクストステージ』	医学のあゆみ220,153-157, 2007.		
019	熊本大学	桑 昭苑・谷口英樹	「消化器官における幹細胞研究の動向」共立出版刊行(菊池裕編集)『内胚葉分化の分子メカニズム』特集号	蛋白核酸酵素 52, 139-144, 2007		
020	熊本大学	白木伸明, 桑昭苑	「ES 細胞から膵β 細胞への誘導」 「ここまで進んだ幹細胞研究と再生医療2006」(田賀哲也他編集)	実験医学24 no.2, 182-187, 2006.		
021	熊本大学	桑 昭苑・谷口英樹	消化器官における幹細胞研究の動向 『内胚葉分化の分子メカニズム』特集号	蛋白核酸酵素 52, 139-144, 2007		
022	熊本大学	桑 昭苑	「ヒトES細胞を用いた肝胆膵の発生分化と再生医学研究」(中辻憲夫他編集)『ヒトES細胞研究のネクストステージ』	医歯薬出版刊行医学のあゆみ220, 153-157, 2007.		
023	熊本大学	桑 昭苑	「ES細胞から体性幹細胞を作る」シリーズ「幹細胞技術の現状と展望」(松崎文雄企画)	共立出版刊行 蛋白核酸酵素52(7):796-800, 2007.		
024	熊本大学	白木伸明、桑昭苑	「ES 細胞からの内胚葉系細胞の誘導」	培養細胞実験ハンドブック改訂第2版、羊土社(東京), 297 - 301, 2008		

025	熊本大学	樋口裕一郎、白木伸明、桑 昭苑	「ES 細胞をもちいて消化器系幹細胞を高効率に作製培養する技術」	『幹細胞の分化誘導と応用』119-126, 2009 株式会社エヌ・ティー・エヌ企画・編集 有限会社ブッカーズ		
026	熊本大学	梅田香穂子 桑 昭苑	「再生医療の現状と将来」	化学と教育57,no.10, 446-449,2009 年		
027	熊本大学	白木伸明、桑昭苑	「ES 細胞から膵細胞への分化」特集『肝胆膵領域における幹細胞研究の最前線』	「肝胆膵」誌59 巻4号,611-617 (2009)アークメーディア(株)		
028	熊本大学	三木梨可桑昭苑	「肝臓、膵臓の再生を支える幹細胞システムはどうなっているのか?」『特集: 幹細胞を用いた消化器再生医療の展望』	先端医学社 分子消化器病 6,no.4,332-337,2009.		
029	熊本大学	白木伸明桑昭苑	「各種幹細胞を用いた消化器官の再生医療」特集:再生医療の現状と進歩～ES 細胞、iPS 細胞と体性幹細胞の臨床への応用～	血液フロンティア2009 年11 月号 in press		
030	熊本大学	山添太士・白木伸明、桑昭苑	「ES 細胞由来分化肝細胞の創出」、『ヒト幹細胞による薬物代謝・トランスポート・副作用予測—iPS・ES 細胞・間葉系幹細胞を用いた新たな創薬スクリーニング』	医学の歩み232(2), in press		

[論文・文献発表] 研究開発項目②「ヒト ES 細胞の分化誘導制御技術の開発」

分子構成を最適化した人工基底膜による ES 細胞の分化誘導技術の開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	大阪大学	Kiyozumi, D., Sugimoto, N., and Sekiguchi, K.	Breakdown of the reciprocal stabilization of QBRICK/Frem1, Fras1, and Frem2 at the basement membrane provokes Fraser syndrome-like defects.	Proc Natl Acad Sci USA 103:11981-11986	査読済み	2006/8/8
002	大阪大学	Kiyozumi, D., Sugimoto, N., Nakano, I., and Sekiguchi, K.	Frem3, a member of the 12 CSPG repeats-containing extracellular matrix protein family, is a basement membrane protein with tissue distribution patterns distinct from those of Fras 1, Frem2, and QBRICK/Frem1.	Matrix Biol 26: 456-462.	査読済み	2007/3/30
003	大阪大学	Ido, H., Nakamura, A., Kobayashi, R., Ito, S., Li, S., Futaki, S., and Sekiguchi, K.	The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of the laminin γ chains in integrin binding by laminins.	J Biol Chem 282:11144-11154.	査読済み	2007/4/13
004	大阪大学	Willberg, J., Hormia, M., Takunen, M., Kikkawa, Y., Sekiguchi, K. and Virtanen, I.	Lutheran blood group antigen as receptor for alpha5-laminins in gingival epithelia.	J Periodontol 78:1810-1818.	査読済み	2007/9/15
005	大阪大学	Fujiwara, H., Hayashi, Y., Sanzen, N., Weber, C. N., Emoto, T., Futaki, S., Niwa, H., Murray, P., Edgar, D., and Sekiguchi, K.	Regulation of mesodermal differentiation of mouse embryonic stem cells by basement membranes.	J Biol Chem 282:29701-29711.	査読済み	2007/10/5

006	大阪大学	Gao, J., DeRouen, M. C., Chen, C. H., Nguyen, M., Nguyen, N. T., Ido, H., Harada, K., Sekiguchi, K., Morgan, B. A., Miner, J. H., Oro, A. E., Marinkovich, M. P.	Laminin-511 is an epithelial message promoting dermal papilla development and function during early hair morphogenesis.	Genes Dev 22:2111-2124.	査読済 み	2008/8/1
007	大阪大学	Takashima, S., Yasuo, M., Sanzen, N., Sekiguchi, K., Okabe, M., Yoshida, T., Toda, A., and Nikaïdo, T.	Characterization of laminin isoforms in human amnion.	Tissue Cell 40:75-81.	査読済 み	2008/4
008	大阪大学	Virtanen, I., Banerjee, M., Palgi, J., Korsgren, O., Lukinius, A., Thornell, L. E., Kikkawa, Y., Sekiguchi, K., Hukkanen, M., Konttinen, Y. T., and Otonkoski, T.	Blood vessels of human islets of Langerhans are surrounded by a double basement membrane.	Diabetologia 51:1181-1191.	査読済 み	2008/7
009	大阪大学	Manabe, R., Tsutsui, K., Fukuda, T., Yamada, T., Kimura, M., Nakano, I., Shimono, C., Sanzen, N., Furutani Y., Fukuda T., Oguri, Y., Shimamoto, K., Kiyozumi, D., Sato, Y., Sado, Y., Senoo, H., Yamashina, S., Fukuda, S., Kawai, J., Sugiura, N., Kimata, K., Hayashizaki, Y., and Sekiguchi, K.	Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins.	Proc Natl Acad Sci USA 105:12849-12854.	査読済 み	2008/9/2
010	大阪大学	Miyazaki, T., Futaki, S., Hasegawa, K., Kawasaki, M., Sanzen, N., Hayashi, M., Kawase, E., Sekiguchi, K., Nakatsuji, N., and Suemori, H.	Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells.	Biochem Biophys Res Commun 375:27-32.	査読済 み	2008/10/10
011	大阪大学	Ido, H., Ito, S., Taniguchi, Y., Hayashi, M., Sato-Nishiuchi, R., Sanzen, N., Hayashi, Y., Futaki, S., and Sekiguchi, K.	Laminin isoforms containing the $\alpha 3$ chain are unable to bind to integrins due to the absence of the glutamic acid residue conserved in the C-terminal regions of the $\gamma 1$ and $\gamma 2$ chains.	J Biol Chem 283:28149-28157.	査読済 み	2008/10/17

012	大阪大学	Kariya, Y., Kato, R., Itoh, S., Fukuda, T., Shibukawa, Y., Sanzen, N., Sekiguchi, K., Wada, Y., Kawasaki, N and Gu, J.	N-Glycosylation of Laminin-332 Regulates Its Biological Functions: a novel function of the bisecting GlcNAc.	J Biol Chem 283:33036-33045.	査読済み	2008/11/28
013	大阪大学	Dainichi, T., Kurono, S., Ohyama, B., Ishii, N., Sanzen, N., Hayashi, M., Shimono, C., Taniguchi, Y., Koga, H., Karashima, T., Yasumoto, S., Zillikens, D., Sekiguchi, K. and Hashimoto, T.	Anti-laminin gamma-1 pemphigoid.	Proc Natl Acad Sci USA 106:2800-2805.	査読済み	2009/2/24
014	大阪大学	Taniguchi, Y., Ido, H., Sanzen, N., Hayashi, M., Sato-Nishiuchi, R., Futaki, S., and Sekiguchi, K.	The C-terminal region of laminin α 1 chains modulates the integrin binding affinities of laminins.	J Biol Chem 284:7820-7831.	査読済み	2009/3/20
015	大阪大学	Sato, Y., Uemura, T., Morimitsu, K., Sato-Nishiuchi, R., Manabe, R., Takagi, J., Yamada, M., Sekiguchi, K.	Molecular basis of the recognition of nephronectin by integrin α 8 β 1.	J Biol Chem 284:14524-14536.	査読済み	2009/5/22
016	大阪大学	Vuoristo, S., Virtanen, I., Takkunen, M., Palgi, J., Kikkawa, Y., Rousselle, P., Sekiguchi, K., Tuuri, T., Otonkoski, T.	Laminin isoforms in human embryonic stem cells: Synthesis, receptor usage and growth support.	J Cell Mol Med 13: 2622-2633.	査読済み	2009/8/13
017	大阪大学	関口清俊	再生医療・細胞組織工学のためのマトリックス生物学入門	再生医療のための細胞生物学、コロナ社、pp.76-98		2007/3/7
018	大阪大学	眞鍋理一郎、関口清俊	マトリックス組込型増殖因子とマトリックス工学	再生医療のための細胞生物学、コロナ社、pp.158-172		2007/3/7
019	大阪大学	山田雅司、関口清俊	細胞外マトリックスと増殖因子：細胞を制御するシグナル伝達の分子機構	再生医療のための細胞生物学、コロナ社、pp.76-98		2007/3/7

020	大阪大学	西内涼子、関口清俊	細胞接着因子の生物学	ティッシュエンジニアリング、日本医学館 pp.88-95		2007/6/27
021	大阪大学	浄住大慈、関口清俊	基底膜のカスタマイゼーションとその器官形成における役割	THE LUNG perspectives 15:336-340		2007/7/10
022	大阪大学	二木杉子、関口清俊	細胞外環境による形態形成の制御：新しい生物学の胎動、基底膜の多様性と形態形成の制御	細胞工学 26:1113-1117		2007/9/22
023	大阪大学	藤原裕展、関口清俊	細胞外マトリックスによる EMT の制御	細胞工学 27:321-325		2008/3/22
024	大阪大学	関口清俊	特集「細胞外基質—研究の新たな展開」に寄せて	生体の科学 59:82-83		2008/4/15
025	大阪大学	藤原裕展、関口清俊	初期胚細胞分化における基底膜の役割	生体の科学 59:111-117		2008/4/15

[論文・文献発表] 研究開発項目②「研究用モデル細胞の構築技術の開発」

擬似基底膜を利用したES細胞の分化誘導制御技術の開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	国立環境研究所	持立克身・古山昭子・細川剛	基底膜形成テクノロジーを用いた人工組織の構築	再生医療 5:365-371		2006
002	国立環境研究所・北海道大学	Hosokawa T, Furuyama A, Katagiri K, Betsuyaku T, Nishimura M, and Mochitate K	Differentiation of Tracheal Basal Cells to Ciliated Cells and Tissue Reconstruction on the Synthesized Basement Membrane Substratum In Vitro	Connective Tissue Res. 48: 9-18		2007

003	東京工業大学・ 国立環境研究所	Hoshiba T, Mochitate K, and Akaike T	Hepatocytes maintain their function on basement membrane formed by epithelial cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun. 359:151-156		2007
004	ニッピ・ 国立環境研究所	Fujisaki H, Ebihara T, Irie S, Kobayashi T, Adachi E, Mochitate K and Hattori S	Keratinocyte apoptosis on type I collagen fibrils is prevented by Erk1/2 activation under high calcium condition	Connect Tissue Res. 48: 159-69, 2007.		2007
005	国立環境研究所	Furuyama A, Hosokawa T, and Mochitate K	Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha have opposite effects on fibroblasts and epithelial cells during basement membrane formation	Matrix Biol. 27: 429-440		2008
006	北海道大学・ 国立環境研究所	Hosokawa T, Betsuyaku T, Odajima N, Suzuki M, Mochitate K, Nasuhara Y, and Nishimura M	Role of basement membrane in EMMPRIN/CD147 induction in rat tracheal epithelial cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun. 368: 426-32, 2008		2008
007	国立環境研究所	細川剛・永野麗子・ 持立克身	再構成基底膜構造体 sBM 基質 - 精緻な人工組織を可能にする培養基質 -	遺伝子医学 MOOK 別冊 “進みつづける細胞移植 治療の実際”(上巻) pp.211-217		2008
008	国立環境研究所	永野麗子・細川剛・ 古山昭子・持立克身	基底膜構造体を培養基質に用いた人工組織の構築	移植 43:10-16, 2008		2008

[論文・文献発表] 研究開発項目②「ヒトES 細胞の分化誘導制御技術の開発」

人工基底膜、疑似マトリックスの効果

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	京都大学・大阪大学	Miyazaki, T., Futaki, S., Hasegawa, K., Kawasaki, M., Sanzen, N., Hayashi, M., Kawase, E., Sekiguchi, K., Nakatsuji, N., and Suemori, H.	Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun. 375, 27-32.	査読済み	2008/10
002	京都大学	The International Stem Cell Initiative Consortium, Veronika Akopian, Peter W. Andrews, Stephen Beil, Nissim Benvenisty, Jennifer Brehm, Megan Christie, Angela Ford, Victoria Fox, Paul J. Gokhale, Lyn Healy, Frida Holm, Outi Hovatta, Barbara B. Knowles, Tenneille E. Ludwig, Ronald D. G. McKay, Takamichi Miyazaki, Norio Nakatsuji, Steve K. W. Oh, Martin F. Pera, Janet Rossant, Glyn N. Stacey, and Hirofumi Suemori	Comparison of defined culture systems for feeder cell free propagation of human embryonic stem cells.	<u>In Vitro Cell Dev Biol Anim.</u> 46:247-58		2010/4

[論文・文献発表] 研究開発項目③「ヒトES 細胞の分化誘導制御技術の開発」

ヒトES 細胞から神経変性疾患モデル細胞の構築

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	幹細胞創薬研究所	Aiba K., Sharov AA., Cater MG., Foroni C., Vescovi AL. and Ko MSH	Defining a developmental path to neural fate by global expression profiling of mouse embryonic stem cells and adult neural stem/progenitor cells	Stem Cells, 24, 889-895	査読済	2006/4
002	幹細胞創薬研究所	Aiba K., Carter MG., Matoba R. and Ko MSH.	Genomic approach to early embryogenesis and stem cell biology	Seminars in Reproductive Medicine 24, 330-339		2006/12
003	NPO 法人幹細胞創薬研究所	饗庭一博	ヒト胚性幹細胞から作成されるモデル細胞と創薬研究	メディカル・サイエンス・ダイジェスト、33 巻14 号、p9(1248)		2007/12
004	幹細胞創薬研究所	饗庭一博	胚性幹細胞から誘導された分化細胞のゲノミクス解析	遺伝子医学MOO K別冊「進み続ける細胞移植治療の実際ー再生医療の実現に向けた科学・技術と周辺要素の理解ー」第2章 移植細胞のための周辺の基礎生物学p149-153		2008/8
005	幹細胞創薬研究所	和田圭樹、中辻憲夫	多能性幹細胞株の医療および創薬における活用の展望	Drug Delivery System (日本医学館)、23(5), 569-574		2008/ 9
006	幹細胞創薬研究所	Aiba K, Nedorezov T, Piao Y, Nishiyama A, Matoba R, Sharova LV, Sharov AA, Yamanaka S, Niwa H, and Ko MSH	Defining developmental potency and cell lineage trajectories by expression profiling of differentiating mouse embryonic stem cells	DNA Research 16, 73-80	査読済	2009/2
007	幹細胞創薬研究所	Wada T, Honda M, Minami I, Tooi N, Amagai Y, Nakatsuji N and Aiba K.	Highly efficient differentiation and enrichment of spinal motor neurons derived from human and monkey embryonic stem cells.	PLoS ONE4(8): e6722	査読済	2009/ 8

008	幹細胞創薬研究所	Sakurai K, Shimoji M, Tahimic CGT, Aiba K, Kawase E, HasegawaK, Amagai Y, Suemori H and Nakatsuji N	Efficient integration of transgenes into a defined locus in human embryonic stem cells	Nucleic Acids Research, doi:10.1093/nar/gkp1234	査読済	2010/1
009	幹細胞創薬研究所	饗庭一博、尾辻智美、中辻憲夫	ヒトES 細胞の創薬産業における有用性	iPS 細胞の産業的応用技術、p69-76、CMC出版		2009/ 9
010	幹細胞創薬研究所	本田誠、饗庭一博、中辻憲夫	ヒトES 細胞株の遺伝子改変と神経細胞分化誘導によるAlzheimer 病モデル細胞	医学のあゆみ232 巻2 号 p123-127		2010/1
011	幹細胞創薬研究所	饗庭一博、櫻井健二、中辻憲夫	ヒトES 細胞から作成される疾患モデル細胞	実験医学増刊再生医療の最前線 2010、p211-126、羊土社		2010 /1
012	幹細胞創薬研究所	和田圭樹・南一成・中辻憲夫	ヒト多能性幹細胞株(ES およびiPS 細胞株)を用いた分化誘導技術およびHTS への応用展開	新薬展望2010 (医薬ジャーナル社)、46(S-1), 247-253		2010 /1

[論文・文献発表] 研究開発項目③「研究用モデル細胞の構築技術開発」

血液脳関門(BBB)モデルの創製

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	幹細胞創薬研究所	Tatsumi R., Suzuki Y., Sumi T., Sone M., Suemori H., Nakatsuji N.	Simple and highly efficient method for production of endothelial cells from human embryonic stem cells.	Cell Transplantation	投稿中	
002	幹細胞創薬研究所	鈴木豊, 巽理恵	ヒト幹細胞による薬物代謝・トランスポート・副作用予測-iPS・ES 細胞・間葉系細胞を用いた新たな創薬スクリーニング『In vitro 血液-脳関門モデルの創製ーヒトES 細胞を活用する新たな試み』	医学のあゆみ 232,128-132, 2010.		2010/1/9

[論文・文献発表] 研究開発項目③「研究用モデル細胞の構築技術の開発」

ES細胞由来肝細胞を用いた、創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	東京大学	Akihiro Yamada, Kazuya Maeda, Emi Kamiyama, Daisuke Sugiyama, Tsunenori Kondo, Yoshiyuki Shiroyanagi, Hayakazu Nakazawa, Teruo Okano, Masashi Adachi, John D Schuetz, Yasuhisa Adachi, Zhuohan Hu, Hiroyuki Kusuhara, and Yuichi Sugiyama	Involvement of multiple transporters in the membrane transport of olmesartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT1-receptor, in humans	Drug Metab Dispos, 35, pp.2166-76		2007/9/6
002	東京大学	Kazuya Maeda and Yuichi Sugiyama	In vitro-in vivo scale-up of drug transport activities	Drug Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition		2007/3/10
003	東京大学	前田 和哉	肝取り込み・排泄の予測	最新創薬学 2007 (遺伝子医学 MOOK7), pp. 123-134		2007/4/10
004	東京大学	前田 和哉	薬物トランスポーター:臨床医療での意義と in vitro 実験からの予測の留意点	薬剤学 67, pp. 47-58		2007/1/1
005	東京大学	Satoshi Kitamura, Kazuya Maeda, Yi Wang and Yuichi Sugiyama	Involvement of multiple transporters in the hepatobiliary transport of rosuvastatin.	Drug Metab Dispos, 36, pp.2014-23		2008/7/10
006	東京大学	Takao Watanabe, Hiroyuki Kusuhara, Kazuya Maeda, Yoshihisa Shitara and Yuichi Sugiyama	Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict transporter-mediated clearance and distribution of pravastatin in humans.	J Pharmacol Exp Ther, 328, pp.652-62		2008/11/10
007	東京大学	Satoshi Kitamura, Kazuya Maeda and Yuichi Sugiyama	Recent progresses in the experimental methods and evaluation strategies of	Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 377,		2008/6/7

			transporter functions for the prediction of the pharmacokinetics in humans	pp.617-28		
008	東京大学	Takao Watanabe, Hiroyuki Kusuvara, Kazuya Maeda, Hiroshi Kanamaru, Yoshikazu Saito, Zhuohan Hu and Yuichi Sugiyama	Investigation of the Rate-Determining Process in the Hepatic Elimination of HMG-CoA Reductase Inhibitors in Rats and Humans	Drug Metab Dispos, 38, pp.215-22		2009/10/29
009	東京大学	Hiroyuki Kusuvara and Yuichi Sugiyama	In vitro-in vivo extrapolation of transporter-mediated clearance in the liver and kidney.	Drug Metab Pharmacokinet, 24, pp.37-52		2009/1/12
010	東京大学	前田和哉、杉山雄一	創薬における in vitro ヒト組織細胞を利用した薬物動態・薬効・副作用予測の重要性	医学のあゆみ 232, pp.83-88		2010/1/9
011	東京大学	前田和哉	胆汁排泄とトランスポーター	日本薬理学雑誌 135, pp. 76-79		2009/11/11
012	東京大学	Kazuya Maeda, Hiroshi Suzuki and Yuichi Sugiyama	Hepatic Transport	Drug Bioavailability, 2 nd edition		2009/10/1

[論文・文献発表] 研究開発項目③「モデル細胞を利用した創薬支援ツール開発」
オンチップ・ヒト組織・臓器モデルを用いた毒性・創薬技術の研究開発

番号	発表会社	発表者	タイトル	発表誌名	状態	発表日
001	東京医科歯科大学	Kazunori Matsumura, Kazuki Orita, Yuichi Wakamoto, Kenji Yasuda.	Phagocytic response to fully controlled plural stimulation of antigens on macrophage using on-chip microcultivation system.	J Nanobiotechnology 4, 2006, 7.	査読済	2006/8/16
002	東京医科歯科大学	Kensuke Kojima, Tomoyuki Kaneko, Kenji Yasuda.	Role of the community effect of cardiomyocyte in the entrainment and reestablishment of stable beating rhythms.	Biochem. Biophys. Res. Comm. 351(1), 2006, PP. 209-215.	査読済	2006/10/20

003	東京医科歯科大学	Ikurou Suzuki, Kenji Yasuda.	Detection of tetanus-induced effects in linearly lined-up micropatterned neuronal networks: application of a multi-electrode array chip combined with agarose microstructures.	Biochem. Biophys. Res. Comm. 356, 2007, pp. 470-475.	査読済	2007/3/8
004	東京医科歯科大学	Tomoyuki Kaneko, Kensuke Kojima, Kenji Yasuda.	Dependence of the community effect of cultured cardiomyocytes on the cell network pattern.	Biochem. Biophys. Res. Comm. 356, 2007, pp. 494-498.	査読済	2007/3/7
005	東京医科歯科大学	Hyonchol Kim, Koudai Oikawa, Naoya Watanabe, Masatsugu Shigeno, Yoshiharu Shirakawabe, Kenji Yasuda.	Identification of Size Differences of Gold Nano-particles on Cell Surface by Curvature Reconstruction Method using Atomic Force Microscopy.	Jpn. J. Appl. Phys. 46 (8), 2007, pp.L184 - L186.	査読済	2007/2/16
006	東京医科歯科大学	Ikurou Suzuki, Kenji Yasuda.	Constructive formation and connection of lined-up micropatterned neural networks by stepwise photothermal etching during cultivation.	Jpn. J. Appl. Phys., 46(9B), 2007, pp. 6398-6403.	査読済	2007/9/1
007	東京医科歯科大学	Koudai Oikawa, Hyonchol Kim, Naoya Watanabe, Masatsugu Shigeno, Yoshiharu Shirakawabe, Kenji Yasuda.	Measuring the sizes of nanospheres on a rough surface by using atomic force microscopy and a curvature-reconstruction method.	Ultramicroscopy, 107(10-11), 2007, pp.1061-1067.	査読済	2007/10/1
008	東京医科歯科大学	Tomoyuki Kaneko, Kensuke Kojima, Kenji Yasuda.	An on-chip cardiomyocyte cell network assay for stable drug screening regarding community effect of cell network size.	Analyst, 132(9), 2007, pp. 892-898.	査読済	2007/9/1

[学会・研究発表]

[学会・研究発表] 研究開発項目①「ヒトES 細胞の加工技術開発」

ヒトES 細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	京都大学	Norio Nakatsuji	Establishment and manipulation of monkey and human ES cell lines for biomedical and pharmaceutical research.	第5回日本再生医療学会総会 International Symposium on Regenerative Medicine – Prospects on Human ES cell-based Therapies	2006. 3.9
002	京都大学	Norio Nakatsuji	Establishment and manipulation of monkey and human ES cell lines.	日本組織培養学会第79 回大会 International Symposium “Frontiers in Human ES Cell Research.”	2006.5.24
003	京都大学	Norio Nakatsuji	Establishment and genetical alteration of monkey and human ES cell lines for biomedical research and drug discovery.	International Symposium on Stem Cells and Regenerative Medicine	2006.10.21
004	京都大学	Norio Nakatsuji	Embryonic stem cells as versatile tools for biology, cell therapy and drug discovery.	Symposium on Germ cells and earlymammalian development	2007.4.23
005	京都大学	Hasegawa K., Fujioka T., Nakamura Y., Nakatsuji N., Suemori H.	Isolation of human embryonic stem cell lines showing high cloning efficiency	International Sympodium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells (Kyoto, Japan).	2005/11

006	京都大学	Ishii T, Yasuchika K, Fujii H., Naito M., Baba S., Hoppo T., Machimoto T., Kamo N., Suemori H., Nakatsuji N., Ikai I.	In vitro differentiation and maturation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes.	International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells (Kyoto, Japan).	2005/11
007	京都大学	Suemori H., Yasuchika K., Hasegawa K., Sumi T., Nakatsuji N.	Establishment and characterization of new human ES cell lines.	International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells (Kyoto, Japan)	2005/11
008	京都大学	Yasuda S., Tsuneyoshi N, Sumi T., Hasegawa K., Tada T., Nakatsuji N., Suemori H.	Nanog maintains self-renewal of Primate ES cells in the absence of a feeder layer.	International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells (Kyoto, Japan).	2005/11
009	京都大学	Hasegawa K., Suemori H., Nakatsuji N.	Establishment, Self-renewal Mechanism, and Preclinical Application of Cynomolgus Monkey Embryonic Stem Cells	First German-Japanese Symposium on Nonhuman Primates: Embryonic Stem Cells and Transgenesis (Gottingen, Germany).	2006/3
010	京都大学	Hasegawa K., Fujioka T., Nakamura Y., Nakatsuji N., Suemori H.	Establishment of human embryonic stem cell sub-lines showing high cloning efficiency.	Keystone Symposia: Stem Cells (Whistler, Canada).	2006/3
011	京都大学	Adachi K., Kawase E., Yasuchika K., Sumi T., Nakatsuji N., Suemori H.	Establishment of the gene-inducible system in primate embryonic stem cell lines.	20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto,2006).	2006/6

012	京都大学	Yasuda S., Tsuneyoshi N, Sumi T., Hasegawa K., Tada T., Nakatsuji N., Suemori H.	Nanog is sufficient for self-renewal of primate ES cells.	20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto,2006).	2006/6
013	京都大学	Adachi K., Kawase E., Yasuchika K., Sumi T., Nakatsuji N., Suemori H.	Establishment of the gene-inducible system in primate embryonic stem cell lines.	4th International Society for Stem Cell Research (Toronto, 2006).	2006/7
014	京都大学	Yasuda S., Tsuneyoshi N, Sumi T., Hasegawa K., Tada T., Nakatsuji N., Suemori H.	NANOG is sufficient for self-renewal of primate ES cells	4th International Society for Stem Cell Research (Toronto, 2006),	2006/7
015	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞株とバイオメディカル	R&D. BioJapan 2005	2005.9.7
016	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞株の樹立と利用：なぜ万能細胞と呼ばれるのか	ナショナルバイオリソースプロジェクト「細胞」シンポジウム	2005.9.29
017	京都大学	中辻憲夫	招待講演「ヒトES 細胞株の樹立と医学応用-なぜ万能細胞と呼ばれるのか」	第14回日本形成外科学会基礎学術集会	2005.10.14
018	京都大学	中辻憲夫	サルおよびヒトES 細胞株樹立による生物医学研究と創薬研究への応用	第53回日本実験動物学会総会公開シンポジウム「再生医学の現状と今後の展望」	2006.5.13
019	京都大学	中辻憲夫	ES 細胞が持つ不思議な能力と難病治療への期待-なぜ万能細胞と呼ばれるのか	京都大学再生医科学研究所第1回公開講演会	2006.7.29
020	京都大学	中辻憲夫	教育講演「ヒトES 細胞株の樹立と医学応用-なぜ万能細胞とよばれるのか」	日本人類遺伝学会第51回大会	2006.10.18
021	京都大学	中辻憲夫	ES 細胞研究をめぐる国内外の動きと創薬および医療活用への展望	かわさきサイエンス&テクノロジーフォーラム2006	2006.11.21

022	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞株の樹立と再生医療および創薬への活用	日本分子生物学会2006フォーラム シンポジウム「再生医療の最前線」	2006.12.7
023	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞をめぐる国内外の動きと再生医療および創薬利用への展望	第21回ライフサイエンス天城セミナー	2007.2.10
024	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞株の医学と創薬への活用：日本の現状と将来展望	第6回日本再生医療学会総会	2007.3.13
025	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞研究の現状と展望	第27回日本医学会総会	2007.4.6
026	京都大学	末盛博文	ヒトES細胞、その医療応用に必要なこと	第23回日本ヒト細胞学会大会市民公開シンポジウム「ヒトの臓器はどこまで再生できるか」(筑波)	2005/ 8/27
027	京都大学	末盛博文	ヒトES細胞と再生医療	第8回日本組織工学会シンポジウム「発生と再生の接点と展開」(東京)	2005/ 9/1
028	京都大学	安田晋也, 恒吉法尋, 角智行, 長谷川光一, 多田高, 中辻憲夫, 末盛博文	霊長類ES 細胞におけるNanog の機能	第28回日本分子生物学会年会(福岡)	2005/12/8-12/10
029	京都大学	安達啓子, 川瀬栄八郎, 中辻憲夫, 末盛博文	霊長類ES 細胞における遺伝子発現制御系の構築	第28回日本分子生物学会年会(福岡)	2005/12/8-12/10
030	京都大学	佐藤秀樹, 三浦 傑, 山口歌奈子, 末盛博文, 中辻憲夫, 宮崎純一, 岩田博夫	Pdx1 遺伝子を導入したカニクイザルES 細胞からインスリン産生細胞への分化誘導	第28回日本分子生物学会年会	2005/12/8-12/10
031	京都大学	藤岡剛, 安近 健太郎, 中村幸夫, 中辻憲夫, 末盛博文	ガラス化法を用いた簡便で効率よい霊長類ES 細胞の凍結保存法の検討	第28回日本分子生物学会年会(福岡)	2005/12/8-12/10

032	京都大学	長谷川光一	ヒトES 細胞を利用した研究の実際	東京医科歯科大学難治疾患研究所・病態生化学分野、医歯学総合研究科・研究開発学分野、医歯学総合研究科・肝胆膵総合外科学分野合同セミナー(東京)	2006/2
033	京都大学	安達啓子、川瀬栄八郎、角智行、中辻憲夫、末盛博文	Establishment of the gene-inducible system in primate embryonic stem cell lines.	Joint Forum (IFMS, IMEG, CDB) (京都)	2006/10/10
034	京都大学	恒吉法尋、安田晋也、角智行、長谷川光一、多田高、中辻憲夫、末盛博文	NANOG is an essential factor for undifferentiated proliferation of monkey ES cells.	Joint Forum (IFMS, IMEG, CDB) (京都)	2006/10/10
035	京都大学	川瀬栄八郎	ヒトES(万能)細胞を用いた遺伝子加工基盤技術の開発	野口基子先生退職記念講演シンポジウム(静岡)	2007/3/17
036	京都大学	安達啓子、末盛博文、中辻憲夫、川瀬栄八郎	ヒトES 細胞におけるSOX2 の機能解析	第七回日本再生医療学会(名古屋)	2008/3/14
037	京都大学	安達啓子、末盛博文、中辻憲夫、川瀬栄八郎	ヒトES 細胞におけるSOX2 の多分化能維持に関する役割	第31回日本分子生物学会(神戸)	2008/12/9
038	京都大学	安達啓子、末盛博文、安田晋也、熊谷英明、中辻憲夫、川瀬栄八郎	SOX2 のヒトES 細胞における未分化維持に関する役割	第九回日本再生医療学会(広島)	2010/3/18
039	埼玉医科大学	Fumi Ohbayashi, Emi Aizawa, Atsuhiko Kishimoto, Ko Mitani.	Frequency Of Random And Targeted Chromosomal Integration Of Helper-Dependent Adenoviral Vector.	The eighth annual meeting of the America Society of Gene Therapy	2005/6/2

040	埼玉医科大学	Fumi Ohbayashi, Atsuhiko Kishimoto, Kohnosuke Mitani.	FREQUENCY OF RANDOM AND TARGETED CHROMOSOMAL INTEGRATION OF HELPER-DEPENDENT ADENOVIRAL VECTOR.	第11 回日本遺伝子治療学会	2005/7/28
041	埼玉医科大学	大林 富美、三谷 幸之介	ヘルパー依存型アデノウイルスベクターのマウスES 細胞相同・非相同組換え頻度とその組み込み部位	第53 回日本ウイルス学会学術集会	2005/11/20
042	埼玉医科大学	Fumi Ohbayashi, Atsuhiko Kishimoto, Kohnosuke Mitani	FREQUENCY OF RANDOM AND TARGETED CHROMOSOMAL INTEGRATION OF HELPER-DEPENDENT ADENOVIRAL VECTOR.	The Gordon Research Conferences: The Science Of Viral Vectors For Gene Therapy	2006/3/12
043	埼玉医科大学	Ko Mitani	Frequency of random and targeted chromosomal integration of replication-incompetent adenoviral vector in mouse ES cells. 8th International Adenovirus Meeting	8th International Adenovirus Meeting	2006/9/1
044	埼玉医科大学	Ko Mitani, Fumi Ohbayashi, Atsuhiko Kishimoto, Masato Isono, Keiichiro Suzuki, Kaoru Mitsui, Kittiphong Paiboonsukwong, Emi Aizawa, Yuki Moroyama, Haruka Shiiba	Gene targeting with viral vectors for gene therapy and stem cell research.	The 2nd UK-Japan Gene Therapy Workshop	2006/10/12
045	埼玉医科大学	三谷幸之介	アデノウイルスベクターの改良と臨床応用の可能性	日本人類遺伝学会第51 回大会	2006/10/18

046	埼玉医科大学	Keiichiro Suzuki, Kouichi Hasegawa, Kaoru Mitsui, Emi Aizawa, Haruka Shiiba, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Ko Mitani	Transient Gene Expression, Random Chromosomal Integration And Homologous Recombination in Cynomolgus Monkey Embryonic Stem Cells with Helper-Dependent Adenoviral Vectors	The tenth annual meeting of the America Society of Gene Therapy	2007/5/31
047	埼玉医科大学	Fumi Ohbayashi, Emi Aizawa, Atsuhiko Kishimoto, Ko Mitani.	Frequency Of Random And Targeted Chromosomal Integration Of Helper-Dependent Adenoviral Vector.	The eighth annual meeting of the America Society of Gene Therapy	2005/6/2
048	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞株の樹立と医学研究	日本生殖医療エンジニアリング研究会	2007.2.25
049	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞株の樹立と医学と創薬への応用	化学工学会第72年会	2007.3.20
050	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞株の再生医学と創薬への応用	第48回日本神経学会総会	2007.5.18
051	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞研究をめぐる国内外の現状と展望	第55回日本輸血・細胞治療学会総会	2007.6.1
052	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞株を用いた医学研究と産業利用の現状と将来展望	第6回国際バイオEXPO	2007.6.22
053	京都大学	Norio Nakatsuji	Human ES cell lines for biomedical research and drug discovery – Current status and future prospect.	Kyoto University 21st Century COE Symposium on Integration of Transplantation Therapy and Regenerative Medicine	2007.6.30
054	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞株の樹立と医学および創薬への応用	第28回日本炎症・再生医学会	2007.8.2

055	京都大学	Norio Nakatsuji	Human ES cell lines for biomedical research and drug discovery.	International Symposium on Regenerative Medical Therapy	2007.9.19 – 20
056	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞研究の国内外の現状と展望	21世紀COE シンポジウム「再生医療と生命倫理2」	2007.10.6
057	京都大学	中辻憲夫	ES 細胞を使った再生医療で病気を治す	かずさDNA 研究所開所記念講演会	2007. 10. 13
058	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞株の樹立と医学および創薬への応用	東京理科大学総合研究機構フォーラム	2007.11.12
059	京都大学	Norio Nakatsuji	Human embryonic stem cell lines for biomedical research and drug discovery.	2007 Seoul Symposium on Stem Cell Research	2007.11.15
060	京都大学	Norio Nakatsuji	Human ES cell lines for biomedical research and drug discovery.	Tissue Engineering International and Regenerative Medicine Society Asia-Pacific Chapter Meeting 2007	2007.12.3
061	京都大学	中辻憲夫	幹細胞研究における日本の現状と展望	第38 〃〃w系大学倫理委員会連絡会議「国際シンポジウム」	2008.1.25
062	京都大学	Norio Nakatsuji	Human and monkey ES cell Lines for biomedical research and drug discovery.	First International Symposium on Human Embryonic Stem Cell Research	2008.1.31
063	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞研究と医学および創薬への応用	Millipore Bio Forum Asia 2008	2008.3.7
064	京都大学	中辻憲夫	ES 細胞株を用いた基礎研究と医学および創薬への応用	科研費特定領域バイオ操作第5回公開シンポジウム	2008.3.7
065	京都大学	中辻憲夫	ES 細胞の驚異的能力と可能性—なぜ万能細胞と呼ばれるのか	京都大学附置研究所・センターシンポジウム	2008.3.8

066	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞株の樹立と医学および創薬への応用	第7 回日本再生医療学会	2008.3.13
067	京都大学	中辻憲夫	Pluripotent Stem Cell Lines for Biomedical Research, Drug Discovery and Regenerative Medicine.	国際シンポジウム『iPS 細胞研究が切り拓く未来』	2008.5.11
068	京都大学	中辻憲夫	多能性幹細胞 (ES/ iPS 細胞) はなぜ万能細胞と呼ばれるのか—研究の現状と医学応用の展望	大阪府立高等学校生物教育研究会総会	2008.5.14
069	京都大学	中辻憲夫	ヒト多能性幹細胞 (ES 細胞・iPS 細胞) の医学研究および創薬スクリーニングへの利用	第15 回HAB 研究機構学術年会	2008.5.16
070	京都大学	中辻憲夫	万能細胞(多能性幹細胞、ES/ iPS 細胞) 研究と再生医療および新薬開発への応用	未来エネルギー研究協会総会特別講演会	2008.5.30
071	京都大学	中辻憲夫	ヒト多能性幹細胞を用いた基礎研究と再生医療および創薬への応用	第31 回日本神経科学大会	2008.7.11
072	京都大学	Norio Nakatsuji	Embryonic Stem Cells and Other Pluripotent Stem Cells as Versatile Tools for Biology, Cell Therapy and DrugDiscovery.	Controlled Release Society' s 35th Annual Meeting and Exposition	2008.7.15
073	京都大学	中辻憲夫	多能性幹細胞 (ES/ iPS 細胞) の基礎研究および医学と創薬への応用	日経BP 社・インビトロジェン社共催Gateway 開発記念10 周年シンポジウム	2008.9.2
074	京都大学	Norio Nakatsuji	Application of embryonic stem cell lines to basic research and production of model cells for drug discovery.	National Health Research Institute Stem Cell Symposium	2008.9.22
075	京都大学	中辻憲夫	万能細胞 (ES/ iPS 細胞などの多能性幹細胞) の素晴らしい能力と医学および新薬開発への応用	西宮市第24 回ライフサイエンスセミナー	2008.10.3

076	京都大学	中辻憲夫	幹細胞医学の現状と未来：その応用の社会的インパクト	メディカルイノベーションフォーラム2008	2008.11.10
077	京都大学	中辻憲夫	ヒト多能性幹細胞 (ES/ iPS 細胞) を用いた基礎研究と医学および創薬への応用	日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008	2008.11.17
078	京都大学	中辻憲夫	万能細胞 (ES/ iPS 細胞) とは何か、その不思議な能力と素晴らしい可能性	西宮市平成20 年度湯川記念科学セミナー	2008.11.29
079	京都大学	中辻憲夫	多能性幹細胞株の限らない可能性と医学および創薬への活用	日本薬学会第129 年会「創と療の伝統と革新」	2009.3.26
080	京都大学	中辻憲夫	ヒトES 細胞株を用いた疾患モデル細胞作成および創薬毒性スクリーニングへの応用	英国再生医療センターワークショップ	2009.6.22
081	京都大学	中辻憲夫	実用化が始まった多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞)：新薬開発研究と安全性試験の必須ツール	第8 回国際バイオEXPO	2009.7.3
082	京都大学	Nakatsuji, N.	Embryonic and other pluripotent stem cells as versatile tools for medical research, drug discovery and toxicology testing.	Biotechnology Taiwan 2009. International Symposium of Stem Cells, Vaccine, and Molecular Medicine.	2009.11.7
083	京都大学	Nakatsuji, N.	Embryonic stem cells and other pluripotent stem cells as versatile tools for basic research, cell therapy and drug discovery.	11th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry.	2009.11.13
084	京都大学	Adachi, K., Suemori, H., Yasuda, S.-Y., Nakatsuji, N., and Kawase, E.	The role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells.	7 th International Society for Stem Cell Research (Barceelona)	2009.7.9

[学会・研究発表] 研究開発項目①「ヒトES 細胞の加工技術開発」

ヒトES 細胞におけるRNA 干渉法による遺伝子発現制御技術の開発

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	京都大学	Hiraoka-Kanie M, Yamashita JK	In vitro functional analysis of genes for cell differentiation using inducible short hair-pin RNA expressing-embryonic stem cells.	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress	2006/6/22
002	京都大学	Hiraoka-Kanie M, Yamashita JK	In vitro functional analysis of genes for differentiation using inducible short hair-pin RNA expression system in embryonic stem cells.	The 19th Naito Conference. Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells [II]	2006/11/15
003	京都大学	蟹江美奈, 山下 潤	ES 細胞における誘導性shRNA 発現系を用いたin vitro 遺伝子機能解析システム	第27 回日本炎症再生学会	2006/7/11
004	京都大学	蟹江(平岡)美奈, 山下 潤	テトラサイクリン誘導性shRNA 発現ES 細胞を用いた細胞分化におけるin vitro 遺伝子機能解析システムの構築	日本分子生物学会	2005/11/9
005	京都大学	Hiraoka-Kanie M, Yamashita JK	In vitro functional analysis of genes for cell differentiation using inducible short hair-pin RNA expressing-embryonic stem cells.	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress	2006/6/22
006	京都大学	Hiraoka-Kanie Yamashita JK M,	In vitro functional analysis of genes for differentiation using inducible short hair-pin RNA expression system in embryonic stem cells.	The 19th Naito Conference. Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells [II]	2006/11/15

007	京都大学	蟹江美奈, 山下 潤	ES 細胞における誘導性shRNA 発現系を用いたin vitro 遺伝子機能解析システム	第27 回日本炎症再生学会	2006/7/11
008	京都大学	蟹江(平岡)美奈、山下 潤	テトラサイクリン誘導性shRNA 発現ES 細胞を用いた細胞分化におけるin vitro 遺伝子機能解析システムの構築	日本分子生物学会	2005/11/9
009	京都大学	山下 潤	ES 細胞を用いた構成的アプローチによる血管分化多様化機構の解析.	日本血栓止血学会シンポジウム	2007/11/16
010	京都大学	山下 潤	ES 細胞を用いた新しい構成的アプローチによる血管分化多様化機構の解析と再構成.	第30 回日本分子生物学会ワークショップ「血管リンパ管研究の新展開」(オーガナイザー)	2007/12/14
011	京都大学	Yamashita JK	Cellular and molecular mechanisms for diversification of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells.	THE U.S.-JAPAN COOPERATIVE CANCER RESEARCH PROGRAM WORKSHOP 2008 (invited)	2008/3/19
012	京都大学	Yamashita JK	Molecular mechanisms of arterial-venous specification.	第16 回日本血管生物医学学会・日韓合同血管生物シンポジウム(invited)	2008/12/3
013	京都大学	Yamashita JK	Vascular cell differentiation & diversification from ES and iPS cells	The 7th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology (invited)	2009/8/21
014	京都大学	Yamamizu, K, Yamashita JK	Augmentation of vascular progenitor potential by Protein kinase A through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1	Presentation of Young Investigator Award, The 7th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology	2009/8/20
015	京都大学	Yamamizu K, JK Yamashita	Differentiation and diversification of vascular endothelial cells in ES cell differentiation system.	2009 年日本分子生物学会ワークショップ(招請講演)	2009/12/12

016	京都大学	Yamashita JK	Novel roles of cyclic AMP pathway in endothelial cell differentiation and specification	14th International Congress of Endocrinology, Symposia (invited)	2010/3/26
017	京都大学	Hiraoka-Kanie M, Yamashita JK	In vitro functional analysis of genes for cell differentiation using inducible short hair-pin RNA expressing-embryonic stem cells.	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress	2006/6/22
018	京都大学	Hiraoka-Kanie M, Yamashita JK	In vitro functional analysis of genes for differentiation using inducible short hair-pin RNA expression system in embryonic stem cells.	The 19th Naito Conference. Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells [II]	2006/11/15

[学会・研究発表] 研究開発項目②「ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発」

ヒトES細胞の神経系細胞への分化誘導技術の開発

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	幹細胞創薬研究所	饗庭一博	ヒトES 細胞由来のモデル細胞と創薬研究	第7回日本再生医療学会総会	2008/3
002	幹細胞創薬研究所	村上学、井上治久、月田香代子、浅井康行、饗庭一博、上杉志成、中辻憲夫、高橋良輔	転写を標的とした家族性筋萎縮性側索硬化症新規治療法の開発	第49回日本神経学会総会	2008/5
003	幹細胞創薬研究所	Wada T., Honda M., Tooi N., Aiba K., Nakatsuji N.	High-efficient spinal motor neuron culture method to establish als model from human/monkey embryonic stem cells	6th ISSCR Annual Meeting	2008/6

004	幹細胞創薬研究所	Tahimic C.G.T., Sakurai K., Shimoji M., Honda M., Aiba K., Amagai Y., Nakatsuji N.	Human es cell-derived dopaminergic Neurons as tools for drug discovery	6th ISSCR Annual Meeting	2008/6
005	幹細胞創薬研究所	Aiba K., Nakatsuji N.	Application of human ES cells for drugdiscovery	4th Annual Stem Cell Asia Congress-Stem Cell Research and Application	2008/6
006	京都大学・幹細胞創薬研究所	井上治久、村上学、月田香代子、中辻憲夫、上杉志成、饗庭一博、浅井康行、高橋良輔	家族性筋萎縮性側索硬化症治療標的分子の標的細胞における発現モニタリングシステムの確立	第26回 日本神経治療学会総会	2008/6
007	京都大学・幹細胞創薬研究所	Murakami G. , Inoue H., Tsukita K., Asai Y., Aiba K., Amagai Y., Uesugi M., Nakatsuji N., Takahashi R.	Development of a high-throughput screening assay for drug discovery in SOD1-mediated ALS	第31回 日本神経科学大会Neuroscience2008	2008/7
008	幹細胞創薬研究所	Wada T., Honda M., Tooi N., Aiba K., Nakatsuji N.	High Efficiency Spinal Motor Neuron Differentiation Methods from Human Embryonic Stem Cells	第31回 日本神経科学大会Neuroscience2008	2008/7
009	京都大学・幹細胞創薬研究所	Inoue H., Murakami G., Tsukita K., Asai Y., Aiba K., Amagai Y., Uesugi M., Nakatsuji N., Takahashi R.	Development of a high-throughput screening assay for drug discovery in SOD1-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	19th the annual International Symposium on ALS/MND	2008/11
010	幹細胞創薬研究所	本田誠、遠井紀江、南一成、和田圭樹、高橋良輔、木下彩栄、植村健吾、饗庭一博、中辻憲夫	ヒトES 細胞由来神経細胞を用いたアルツハイマー病モデル細胞	日本分子生物学会第31回年会)日本生化学会との合同大会	2008/12/
011	幹細胞創薬研究所	Kazuhiro Aiba	Human ES cell-derived cellular models for neurodegenerative diseases and cardiotoxicity assay	5th Stem Cell Research & Therapeutics	2009/3

012	幹細胞創薬研究所	Wada T., Tooi N., Honda M., Aiba K., Nakatsuji N.	Human pluripotent stem cell-derived neurosphere culture based neural differentiation control method and application	第7回幹細胞シンポジウム	2009/5
013	幹細胞創薬研究所	Aiba K., Sakurai K., Tooi N., Honda M., Wada T., Shimoji M., Nakatsuji N.	A site-specific gene integration system and human embryonic stem cell lines carrying neurodegenerative disease genes	第7回幹細胞シンポジウム	2009/5
014	幹細胞創薬研究所	饗庭一博	創薬のためのヒトES 細胞由来のモデル細胞	日本組織培養学会第82回大会	2009/5/
015	幹細胞創薬研究所	Sakurai K., Shimoji M., Tahimic CGT, Aiba K., KawaseE., Hasegawa K., Amagai Y., Suemori H., Nakatsuji N.	Efficient system to integrate functional genes into a defined locus in human embryonic stem cells	7th ISSCR Annual Meeting	2009/7
016	幹細胞創薬研究所	Wada T., Tooi N., Honda M., Aiba K., Nakatsuji N.	Stable and low-cost protocol of spinal motor neuron and astrocyte production from both human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells for generating als model culture system	7th ISSCR Annual Meeting	2009/7
016	幹細胞創薬研究所	Aiba K., Tooi N., Honda M., Wada T., Shimoji M., Sakurai K., Nakatsuji N.	Generation of human embryonic stem cell lines carrying neurodegenerative disease genes using a site-specific gene integration system	7th ISSCR Annual Meeting	2009/7
017	京都大学・幹細胞創薬研究所	村上学、井上治久、月田香代子、浅井康行、饗庭一博、天貝裕地、上杉志成、中辻憲夫、高橋良輔	SOD1 関連ALS の創薬ハイスループット・スクリーニング・アッセイ系の確立	第32回 日本神経科学大会 Neuroscience2008	2009/9
018	幹細胞創薬研究所	Wada T., Tooi N., Honda M., Aiba K., Nakatsuji N.	Neural lineage cell differentiation protocol from human embryonic stem cell and human induced pluripotent stem cell	第32回 日本神経科学大会 Neuroscience2008	2009/9
019	幹細胞創薬研究所	Kazuhiro Aiba	Human ES cell-derived cellular models for drug discovery and development	第22回日本動物実験代替法学会	2009/11

020	幹細胞創薬研究所	Wada T., Aiba K., Tooi N., Inoue H., Takahashi R., Nakatsuji N.	Establishment of a human ES cell-derived familial ALS model	20th International Symposium on ALS/MND	2009/12
021	幹細胞創薬研究所	Aiba K.	Human ES cell-derived cellular models for drug discovery and development	日本分子生物学会第32 回年会	2009/12
022	幹細胞創薬研究所	和田圭樹、饗庭一博、遠井紀 江、井上治久、高橋良輔、中 辻憲夫	ヒトES 細胞由来家族性ALS モデル系の樹立	第9 回日本再生医療学 会総会	2010/3
023	幹細胞創薬研究所	本田誠、遠井紀江、南一成、 饗庭一博、中辻憲夫	変異型Presenilin1 発現ヒトES 細胞由来のアル ツハイマー病モデル細胞の構築	第9 回日本再生医療学 会総会	2010/3

[学会・研究発表] 研究開発項目②「ヒトES 細胞の分化誘導制御技術開発」

ヒトES 細胞の心筋細胞への分化誘導技術の開発

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	京都大学	Kentoku Yanagi, Hideki Uosaki, Takurou Misaki, Jun K. Yamashita	Cardiac ion channels constituting automaticity of pacemakers in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes	第61 回日本循環器学 会	2007/3/17
002	京都大学	柳 賢徳, 山下 潤	ES 細胞由来心筋ペースメーカー細胞の自動能 維持におけるイオンチャネルHCN1, 4 および Cav3.1 の意義	日本心血管内分泌代謝 学会	2006/11/18
003	京都大学	山下 潤	ES 細胞を用いた心血管分化再生研究	第12 回KIX Cardiac Symposium.(invited)	2006/10/11
004	京都大学	山下 潤	構成的アプローチによる新しい心血管分化再 生研究	京都大学臨床心血管再 生研究会	2006/2/8
005	京都大学	山下 潤	ES 細胞研究に基づく新しい心血管再生治療戦 略の開拓	第9回循環器専門医懇 話会(招請講演)	2007/1/20
006	京都大学	山下 潤	ES 細胞を用いた心血管分化再生研究	第8回分子病態制御研 究会(招請講演)	2007/1/31

007	京都大学	Yamashita JK	Prospective identification of cardiac progenitors.	4th Annual Symposium of the American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences -Cardiovascular Repair and Regeneration. (Invited)	2007/7/30
008	京都大学	Yamashita JK	Effective cardiac regeneration in vivo by ES cell-derived cardiac progenitors.	Japan-Korea Cardiovascular Conference, 第72回日本循環器学会(招請講演)	2008/3/28
009	京都大学	山下 潤	ES 細胞及びiPS 細胞を用いた心血管分化再生研究.	心血管再生先端治療フォーラム(特別講演)	2008/7/5
010	京都大学	Yamashita JK	Specific Expansion of Cardiac Progenitors and Cardiomyocytes from ES and iPS Cells.	The Second International Cell Therapy Conference (invited)	2008/11/20
011	京都大学	Yamashita JK	Research for vascular development and regeneration using ES and iPS cells.	The 24th Kumamoto Medical Bioscience Symposium "Frontiers of Vascular Medical Science and Innovative Therapy" (invited)	2008/11/27
012	京都大学	山下 潤	ES 細胞及びiPS 細胞からの心血管分化.	BMB2008 シンポジウム: 1S1 多能性幹細胞を規定する因子群 -臨床応用を見据えて-(招請講演)	2008/12/9

013	京都大学	山下 潤	ES 細胞及びiPS 細胞を用いた心血管分化再生研究	熊本Science Frontier 研究会(特別講演)	2008/12/10
014	京都大学	山下 潤	iPS 細胞からの心血管系への分化誘導	第2 回iPS 細胞研究産業応用懇話会	2009/2/2
015	京都大学	山下 潤	ES 細胞・iPS 細胞からの心筋分化研究	第8 回日本再生医療学会総会シンポジウム「ES 細胞研究の現状と課題」(招請講演)	2009/3/5
016	京都大学	Yamashita JK	Research for cardiovascular development and regeneration with ES and iPS cells	Waseda-NUS Joint symposium, “Chemical EPIgenomics”- The fusion of epigenomics, stem cell biology and chemical biology - (invited)	2009/3/12
017	京都大学	Yamashita JK	Perspectives of induced pluripotent stem cells in regenerative medicine	第73 回日本循環器学会トピック「再生医療2009」(招請講演)	2009/3/20
018	京都大学	Yamashita JK	Cardiac Progenitors and Cardiomyocytes from Induced Pluripotent Stem Cells	第73 回日本循環器学会プレナリーセッション”Frontiers in Regeneration with Pluripotent Cells” (招請講演)	209/3/21
019	京都大学	山下 潤	ES 細胞及びiPS 細胞を用いた血管分化・多様化・再生機構の解析	日本内分泌学会シンポジウム「血管新生と心血管系内分泌の新展開」(招請講演)	2009/4/23
020	京都大学	山下 潤	ES 細胞およびiPS 細胞を用いた心血管分化再生研究	第11 回循環器再生医療研究会(特別講演)	2009/5/23

021	京都大学	Yamashita JK	Cardiovascular cell differentiation from ES and iPS cells.	EMBO Workshop, Lymphatic and Blood Vasculature: from models to human disease (invited)	2009/6/4
022	京都大学	山下 潤	再生医療の新展開 -ES 細胞及びiPS 細胞を用いた心血管分化再生研究-	第19 回臨床検査専門 医会春季大会(特別講 演)	2009/6/13
023	京都大学	山下 潤	ES 細胞及びiPS 細胞を用いた心血管分化再生 研究	第12 回小児心血管分 子医学研究会(特別講 演)	2009/7/15
024	京都大学	Narazaki G, Yamashita JK	Cardiovascular cell differentiation from ES and iPS cells	FASEB Summer Research Conference 2009 (invited)	2009/8/3
024	京都大学	山下 潤	ES 細胞及びiPS 細胞を用いた心血管分化再生 研究	日本薬学会「生体機能と 創薬シンポジウム 2009」(招請講演)	2009/8/26
026	京都大学	Yamashita JK	iPS cells for cardiovascular research	JSPS presents, Sweden - Japan Joint Colloquium, "Advances in Cellular Reprogramming and Stem Cell Biology" (invited)	2009/9/5
027	京都大学	山下 潤	ES 細胞及びiPS 細胞を用いた心血管分化再生 研究	第14 回静岡健康・長寿 学術フォーラム(招請講 演)	2009/10/3

028	京都大学	Yamashita JK	Cardiovascular cell differentiation and diversification from ES and iPS cells	KSMBMB 2009 Annual International Conference, Symposium “Cardiogenesis, Angiogenesis, and Lymphangiogenesis” (invited)	2009/10/29
029	京都大学	山下 潤	iPS 細胞による心臓再生	第13 回日本心不全学会学術集会シンポジウム「心臓の再生医学の現状と展望」(招請講演)	2009/11/1
030	京都大学	Yamashita JK	Directed and Systematic Differentiation of Cardiovascular Cells from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells	American Heart Association Scientific Session 2009, Groundbreaking Studies in the Practice of Cardiovascular Medicine: Circulation Editors’ Choices (invited)	2009/11/14
031	京都大学	山下 潤	再生医療の最前線 —ES 細胞・iPS 細胞を用いた心臓・血管の再生—	日本化粧品技術者会大阪支部創立60周年記念行事(特別講演)	2010/1/27
032	京都大学	山下 潤	ES 細胞及びiPS 細胞を用いた心血管分化再生研究	第2回神戸生活習慣病研究会(特別講演)	2010/2/6
033	京都大学	Yamashita JK	iPS Cells for Cardiovascular Research and Regeneration	第74 回日本循環器学会フォーカスセッション(招請講演)	2010/3/6
034	京都大学	山下 潤	ES 細胞及びiPS 細胞を用いた心血管再生	第9回日本再生医療学会シンポジウム「心血管再生」(招請講演)	2010/3/15

035	京都大学	山下 潤	心血管細胞の分化制御機構の解明と医療応用に関する研究	日本心血管内分泌代謝学会高峰譲吉奨励賞	2010/3/31
036	幹細胞創薬研究所	尾辻智美、南一成、黒瀬裕子、山内香織、多田政子、中辻憲夫	ヒトES 細胞由来心筋細胞の長期拍動性維持と成熟化	日本分子生物学会第31 回年会	2008/12/9
037	幹細胞創薬研究所	Otsuji T.G., Minami I., Kurose Y., Yamauchi K., Tada M., Nakatsuji N.	Progressive maturation in long-term cultured cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells	7th ISSCR	2009/7/10

[学会・研究発表] 研究開発項目②「ヒトES 細胞の分化誘導制御技術開発」

ヒトES 細胞の肝細胞への分化誘導技術の開発

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	京都大学	Ishii T, Yasuchika K, Fujii H., Naito M., Baba S., Hoppo T., Machimoto T., Kamo N., Suemori H., Nakatsuji N., Ikai I.	In vitro differentiation and maturation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes.	International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells (Kyoto, Japan).	2005/11/17
002	京都大学	石井隆道, 安近健太郎, 待本貴文, 末盛博文, 中辻憲夫, 齊藤美知子, 河野憲二, 猪飼伊和夫, 上本伸二	マウスES 細胞由来内胚葉細胞を用いた細胞移植による致死性肝障害モデルマウスの生存率改善効果	第6回日本再生医療学会(横浜)	2007/3/13
003	京都大学	Ishii T., Yasuchika K., Machimoto T., Suemori H., Nakatsuji N., Saito M., Kohno K., Uemoto S., Ikai I.	Cell transplantation of embryonic stem cell-derived endodermal cells into life-threatening liver injury model mice	17th APASL (Kyoto, Japan)	2007/3/28
004	京都大学	石井隆道, 安近健太郎, 待本貴文, 末盛博文, 中辻憲夫, 齊藤美知子, 河野憲二, 猪飼伊和夫, 上本伸二	マウスES 細胞由来内胚葉細胞を用いた細胞移植	第107 回日本外科学会定期学術集会(大阪)	2007/4/1

005	京都大学	石井隆道, 安近健太郎, 待本貴文, 末盛博文, 中辻憲夫, 斉藤美知子, 河野憲二, 猪飼伊和夫, 上本伸二	マウスES 細胞由来内胚葉細胞を用いた細胞移植	第107 回日本外科学会定期学術集会(大阪)	2007/4/11
006	京都大学	Ishii, T., Yasuchika, K., Machimoto, Y., Suemori, H., Nakatsuji, N., Saito, M., Kohno, K., Uemoto, S., Ikai, I.	Transplantation of embryonic stem cell-derived endodermal cells into life-threatening liver injury model mice	5th International society of stem cell research (Cairns, Australia)	2007/6/18
007	京都大学	石井隆道, 安近健太郎, 末盛博文, 中辻憲夫, 斉藤美知子, 河野憲二, 猪飼伊和夫, 上本伸二	マウスES 細胞由来内胚葉細胞を用いた細胞移植により致死性肝障害モデルマウスの生存率が改善される	第28 回日本炎症・再生学会(東京)	2007/8/2
008	京都大学	福光剣, 石井隆道, 安近健太郎, 末盛博文, 中辻憲夫, 猪飼伊和夫, 上本伸	ヒトES 細胞を用いた初期肝細胞への分化誘導法の検討	第7回日本再生医療学会(名古屋)	2008/3/13
009	京都大学	石井隆道, 安近健太郎, 福光剣, 末盛博文, 中辻憲夫, 猪飼伊和夫, 上本伸二	胆管癌における癌幹細胞としてのAFP 産生細胞	第7回日本再生医療学会(名古屋)	2008/3/14
010	京都大学	Ishii, T., Yasuchika, K., Fukumitsu, K., Suemori, H., Nakatsuji, N., Ikai, I., Uemoto, S.	Alpha-fetoprotein producing cells as a candidate for cancer stem cells of cholangiocellular carcinomas	43th ESAL (Milan, Italy)	2008/4/24
011	京都大学	Fukumitsu, K., Ishii, T., Yasuchika, K., Adachi, K., Kawase, E., Suemori, H., Nakatsuji, N., Ikai, I., Uemoto S.	The effects of extracellular matrices and growth factors on hepatic lineage differentiation of human embryonic stem cells	Digestive Disease Week 2008 (SanDiego, U.S.A.)	2008/5/20
012	京都大学	Ishii, T., Yasuchika, K., Fukumitsu, K., Konishi, S., Kajiwara, M., Kamimura, R., Sasaki, N., Suemori, H., Nakatsuji, N., Ikai, I., Uemoto, S.	Alpha-fetoprotein producing cells as a candidate for cancer stem cells of cholangiocellular carcinoma	4th Academic Surgical congress (Fort Meyers, USA)	2009/2/5

013	京都大学	福光剣、石井隆道、安近健太郎、天貝裕地、斉藤美保、川本達也、川瀬英八郎、末盛博文、中辻憲夫、猪飼伊和夫、上本伸二	ES 細胞を成熟肝細胞へ分化誘導させる細胞株の樹立	第8 回日本再生医療学会総会(東京)	2009/3/5
014	京都大学	Ishii T., Sasaki, N., Yasuchika, K., Kamimura R., Suemori, H., Nakatusji, N., Doi R., Ikai, I., Uemoto, S.	Alpha-fetoprotein-producing cells act as cancer stem cells in human pancreatic cancer	7th International society of stem cell research (Barcelona, Spain),	2009/7/8
015	京都大学	Ishii, T., Fukumitsu, K., Yasuchika, K., Kawase. E., Suemori, H., Nakatsuji, N., Ikai, I., Uemoto, S.	In vitro hepatic maturation of human embryonic stem cells using a mesenchymal cell line derived from murine fetal livers	7th International society of stem cell research (Barcelona, Spain),	2009/7/9
016	京都大学	Fukumitsu, K., Ishii, T., Yasuchika, K., Amagai, Y., Saitou, M., Kawamoto, T., Kawase, E., Suemori, H., Nakatsuji, N., Ikai, I., Uemoto, S.	Establishment of a cell line that possesses the ability to promote the hepatic maturation of mouse embryonic stem cells.	7th International society of stem cell research (Barcelona, Spain),	2009/7/9
017	京都大学	石井隆道, 安近健太郎, 末盛博文, 中辻憲夫, 猪飼伊和夫, 上本伸二	胆管癌においてAFP 産生細胞は癌幹細胞の特徴を持つ	第63 回日本消化器外科学会総会(札幌)	2009/7/26
018	京都大学	石井隆道, 安近健太郎, 福光剣, 川本達也, 天貝裕地, 猪飼伊和夫, 上本伸二, 川瀬栄八郎, 末盛博文, 中辻憲夫	ヒトES 細胞から機能性肝細胞への成熟分化法-マウス胎仔肝由来間葉系細胞株を用いて	第9 回日本再生医療学会総会(広島)	2010/3/18
019	熊本大学	Shiraki, N*, Yoshida, T, Araki, K., Kume, K., and Kume, S.	Mesodermal derived inducing activity for potentiating embryonic stem cell differentiation into pdx-1 expressing pancreatic cells	15th International Society of Developmental Biologists Congress.(Sydney)	2005/9/5

020	熊本大学	Yoshida, T*, Shiraki, N, Araki K, Kume K. and Kume, S.	Analysis of pancreatic progenitor cells derived from ES cells.	15th International Society of Developmental Biologists Congress.(Sydney)	2005/9/5
021	熊本大学	Shiraki, N., Tetsu Y., Araki K., Kume K., Kume S.	Mesodermal derived inducing activity for potentiating embryonic stem cell differentiation into pdx-1 expressing pancreatic cells.	International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells	2005/11/15
022	熊本大学	桑 昭苑	ES細胞から内胚葉系譜への分化誘導	Joint Forum (IFMS,IMEG, CDB) (熊本)	2006/1/30
023	熊本大学	桑 昭苑	ES 細胞を用いた膵臓の再生医学の現状と展望 (招待講演)	第49 回日本糖尿病学会年次学術集会(東京)	2006/5/27
024	熊本大学	桑 昭苑	Directed differentiation of ES cells into endoderm cell lineages]招待講演)	第39 回日本発生生物学会(広島市)	2006/6/3
025	熊本大学	Shoen Kume	Directed differentiation of ES cells into pancreatic progenitors (招待講演)	第8回インスリンリサーチフォーラム(大阪)	2006/11/26
026	熊本大学	白木伸明、吉田 哲、荒木喜美、桑和彦、桑昭苑	ES 細胞からPdx1 陽性胚性内胚葉への正常発生に沿った分化誘導	第29回分子生物学会 2006 フォーラム	2006/12/6
027	熊本大学	Shoen Kume	ES cells as a tool for developmental biology and regenerative medicine of pancreas	International Workshop on Bioelectronics (Kumamoto)	2007/2/7
028	熊本大学	吉田 哲・白木伸明・桑 和彦・桑 昭苑	ES 細胞由来の内胚葉系細胞の解析と新規膵幹細胞マーカーの同定	幹細胞シンポジウム(淡路島)	2007/5/17
029	熊本大学	Nobuaki Shiraki, Tetsu Yoshida, Kimi Araki, Akihiro Umezawa, Yuichiro Higuchi, Hideo Goto, Kazuhiko Kume, Shoen Kume	「Guided differentiation of ES cells into Pdx1-expressing regional specific definitive endoderm 」	第40 回発生生物学会 第59 回細胞生物学会合同年会(東京)	2007/5/30

030	熊本大学	Tetsu Yoshida, Nobuaki Shiraki, Kazuhiko Kume, Shoen Kume	Search for the marker molecule of the pancreatic stem/progenitor cell	第25回内分泌・代謝学サマーセミナー(淡路島)	2007/7/17
031	熊本大学	桑 昭苑	「消化器系へのES 細胞の分化誘導と医学応用」〈招待講演〉	第7 回日本再生医療学会(東京)	2008/3/13
032	熊本大学	Matsuo, A., Yoshida, T., Kume, K. and Kume, S.	The characterization of liver progenitor during development and liver injury	41th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biology, Tokushima	2008/5/28
033	熊本大学	Shiraki, N., Umeda, K., Higuchi, Y., Goto, H. Araki, K., Sakashita, N., Takeya, M., Kume, K, Kume, S.	Differentiation of ES cells towards pancreatic and hepatic lineages.	第60 回日本細胞生物学会大会 (横浜)	2008/6/29
034	熊本大学	桑 昭苑	「ES 細胞を用いた消化器官の分化誘導」〈招待講演〉	第29 回日本炎症・再生医学会(東京)	2008/7/9
035	熊本大学	Shoen Kume	Guided differentiation of ES cells into pancreatic and hepatic lineages 〈招待講演〉	Academia Sinica Seminar (Taipei)	2008/8/20
036	熊本大学	Shiraki, N., Umeda, K., Higuchi, Y., Goto, H. Araki, K., Sakashita, N., Takeya, M., Kume, K, Kume, S.	Guided differentiation of ES cells towards pancreatic and hepatic lineages. Kumamoto	The 1st Joint Symposium of KAIST and Kumamoto University (Korea)	2008/9/9
037	熊本大学	Shoen Kume	Differentiation of ES cells into pancreatic and hepatic cells.	Suez Canal University-Kumamoto University G. CO E joint symposium (Ismalia)	2008/11/18
038	熊本大学	Shiraki, N., Umeda, K., Higuchi, Y., Goto, H. Araki, K., Sakashita, N., Takeya, M., Kume, K, Kume, S.	支持細胞を用いたES 細胞から膵臓系譜内胚葉への正常発生に沿った分化誘導	第31 回日本分子生物学会年回・第81 回日本生化学会大会 合同大会(東京)	2008/12/8

039	熊本大学	Matsuo, A., Yoshida, T., Kume, K. and Kume, S.	The expression patterns of a candidate hepatic stem / progenitor marker gene during embryonic development and liver regeneration.	発生研再生研CDB慶應 ジョイントフォーラム(熊本)	2009/1/7
040	熊本大学	Shiraki, N., Umeda, K., Higuchi, Y., Goto, H., Araki, K., Sakashita, N., Takeya, M., Kume, K., Kume, S.	Differentiation of ES cells towards pancreatic and hepatic lineages using supporting cells.	発生研再生研CDB慶應 ジョイントフォーラム(熊本)	2009/1/7
041	熊本大学	Kume S	Stem cell research on digestive tissues. (招待講演)	第5回宮崎サイエンスキャンプ	2009/2/22
042	熊本大学	糸 昭苑	「幹細胞を用いた消化器官の再生医学研究」(招待講演)	第8回日本再生医療学会(東京)	2009/3/5
043	熊本大学	白木伸明、樋口裕一郎、山添太士、曾勤、持立克身、小林直哉、糸和彦、糸昭苑	「人工基底膜を用いたES細胞から肝細胞への分化誘導」	第9回日本再生医療学会総会 シンポジウム 「肝移植・再生」(広島)	2009/3/12
044	熊本大学	糸 昭苑	幹細胞を用いた消化器官の再生医学研究」(招待講演)	第112回日本小児科学会学術集会(奈良)	2009/4/17
045	熊本大学	糸 昭苑	「ES・iPS細胞から消化器官細胞への分化誘導研究」(招待講演)	医工学フォーラム(京都)	2009/5/29
046	熊本大学	糸 昭苑	「ES・iPS細胞から消化器官細胞への分化誘導研究」(招待講演)	先天異常学会(鹿児島)	2009/6/1
047	熊本大学	Yuichiro Higuchi, Keitaro Yamane, Nobuaki Shiraki, Zeng Qin3), Katsumi Mochitate3), Kazuhiko Kume and Shoen Kume.	Novel differentiation procedures of the mouse ES or iPS cells into pancreatic cell lineages.	ISSCR, Barcelona	2009/7/8
048	熊本大学	Nobuaki Shiraki, Zeng Qin2), Katsumi Mochitate2), Yuichiro Higuchi, Kahoko Umeda, Kazuhiko Kume and Shoen Kume.	Efficient differentiation of mouse and human ES cells into hepatic cells using feeder free basement membrane substratum in vitro.	ISSCR, Barcelona	2009/7/8
049	熊本大学	Shoen Kume	Differentiation of ES cells into pancreatic and hepatic cells	ISREC seminar (Lausanne)	2009/7/14

050	熊本大学	桑 昭苑	「幹細胞を用いた消化器官の発生再生研究」 (招待講演)	阿蘇シンポジウム(阿蘇)	2009/8/1
051	熊本大学	Shoen Kume	The Guided differentiation of ES cells into the pancreatic lineage	The 25th Kumamoto Medical Bioscience and Global COE Cell Fate Regulation Research and Education Unit Joint Symposium	2009/11/13
052	熊本大学	桑 昭苑	「幹細胞を用いた消化器官細胞への分化誘導」(招待講演)	大阪大学医療組織工学フォーラム(大阪)	2009/12/1
053	熊本大学	Matsuo Akira, Yoshida Tetsu, Miki Rika, Kume Kazuhiko, and Kume Shoen	Epiplakin1 marks the cholangiocytes and hepatic stem/progenitor cells in adult and injured liver	第32回日本分子生物学会(横浜)	2009/12/9
054	熊本大学	Shiraki,N.,Zeng,Q.,Mochitate K.,Higuchi,Y.,Umeda,K.,Kume K., Kume S.	Efficient differentiation of mouse and human ES cells into hepatic cells using feeder free basement membrane substratum in vitro.	第32回日本分子生物学会(横浜)	2009/12/9
055	熊本大学	Yuichiro Higuchi, Keitaro Yamane, Nobuaki Shiraki, Zeng Qin3), Katsumi Mochitate3), Kazuhiko Kume and Shoen Kume.	Synthesized basement membrane dependent differentiation procedures of the mouse ES or iPS cells into pancreatic cell lineages	第32回日本分子生物学会(横浜)	2009/12/9

**[学会・研究発表] 研究開発項目②「ヒトES細胞の分化誘導制御技術の開発」
分子構成を最適化した人工基底膜によるES細胞の分化誘導技術の開発**

番号	発表会社	発表者	タイトル	学会・研究名	発表日
001	大阪大学	Kiyozumi, D., Sugimoto, N., and Sekiguchi, K.	Cooperative function of three Fraser syndrome-associated extracellular matrix proteins Fras1, Frem2, and QBRICK.	20 th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11 th FAOBMB Congress	2006/6/19

002	大阪大学	Sekiguchi, K.	Untangling the complexities of the basement membrane: a 'matriomic' approach toward difining the customized extracellular microenvironment.	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology	2006/6/20
003	大阪大学	Fujiwara, H., Hayashi, Y., Weber N. C., Emoto, T., Futaki, S., Murray, P., Edgar, D., and Sekiguchi, K.	Basement membrane prevents mesodermal differentiation of mouse embryonic stem cells through suppression of epithelial-mesenchymal transition.	20 th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11 th FAOBMB Congress	2006/6/20
004	大阪大学	Nikaido, T., Izumi, N., Takashima, S., Sekiguchi, K., Toda, A., Okabe, M., Yoshida, T., and Saito, S.	Human amniotic cells have side population cells and several types of the subunits of laminin isoform.	20 th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11 th FAOBMB Congress	2006/6/22
005	大阪大学	関口清俊	基底膜の多様性	大阪大学蛋白質研究所セミナー「基底膜研究の新展開」	2006/9/7
006	大阪大学	関口清俊	細胞外環境のカスタマイゼーションとマトリオーーム	第 52 回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会	2006/9/16
007	大阪大学	関口清俊	細胞外環境のカスタマイゼーションとマトリオーーム	第 4 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム	2006/10/24
008	大阪大学	Kiyozumi, D., Sugimoto, N. and Sekiguchi, K.	Reciprocal stabilization of Fraser syndrome-associated proteins.	American Society for Matrix Biology Biennial National Meeting 2006	2006/11/4
009	大阪大学	関口清俊	細胞の外に広がる世界:細胞外マトリックスを読む	佐藤了メモリアルシンポジウム・引き継がれた学問系譜	2006/12/16
010	大阪大学	Sekiguchi, K.	Molecular basis of adhesive interactions of cells with the basement membrane.	Glycobiology and Sphingobiology 2007	2007/3/1
011	大阪大学	関口清俊	基底膜の多様性とその細胞特異的カスタマイゼーション	第 6 回日本再生医療学会総会	2007/3/14

012	大阪大学	関口清俊	細胞による細胞外マトリックスの識別機構とその構造的基盤	大阪大学蛋白質研究所セミナー「放射光が拓く繊維高分子のルネッサンス」	2007/6/8
013	大阪大学	Sekiguchi, K.	Diversity and specificity of the adhesive interactions of cells with the basement membrane.	XIIIth International Symposium on Basement Membranes	2007/9/20
014	大阪大学	Ido, H., Ito, S., Taniguchi, Y., Hayashi, M., Sanzen, N., Manabe, R., Tsutsui, K., Nakano, I., and Sekiguchi, K.	Characterization of the gamma3 chain-containing laminins.	XIIIth International Symposium on Basement Membranes	2007/9/20,21
015	大阪大学	Yamaguchi, Y., Ohshima, M., Sekiguchi, K., and Otsuka, K.	Tetraspanin CD151 regulates morphology, motility and intracellular signaling of A549 human lung adenocarcinoma cells on laminin-10.	XIIIth International Symposium on Basement Membranes	2007/9/20,21
016	大阪大学	関口清俊	インテグリンによるラミニンの識別機構	大阪大学蛋白質研究所セミナー Current topics on cellular control mechanisms mediated by adhesion receptors(情報伝達マシナリーとしての細胞接着受容体—分子構造、シグナル、そして疾患まで—)	2007/11/1
017	大阪大学	関口清俊	生体内環境の網羅的プロファイリングとその再構築	第29回 日本バイオマテリアル学会大会、シンポジウム「タンパク質工学によるバイオマテリアルの合理的設計」	2007/11/26
018	大阪大学	井戸寛之、伊藤俊輔、谿口征雅、林麻利亜、三千典子、眞鍋理一郎、筒井 仰、中野伊津子、関口清俊	Characterization of the γ 3 chain-containing laminins.	第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同大会 (BMB2007)	2007/12/12

019	大阪大学	谿口征雅、井戸寛之、林麻利亜、 三千典子、二木杉子、関口清俊	The C-terminal region of laminin beta1/2 chains regulates the binding-affinity to integrin alpha3beta1.	第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同大会 (BMB2007)	2007/12/12
020	大阪大学	関口清俊	Decoding the complexity and specificity of cell-basement membrane interactions.	第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同大会 (BMB2007)	2007/12/13
021	大阪大学	二木杉子、中野伊津子、眞鍋理一郎、筒井仰、三千典子、佐渡義一、関口清俊	マウス胚発生初期における基底膜蛋白質の局在プロファイル	第 40 回日本結合組織学会学術大会、第 55 回マトリックス研究会大会合同学術集会	2008/5/29
022	大阪大学	浄住大慈、武市真希子、佐藤祐哉、上村俊人、高木淳一、関口清俊	Qbrick ノックアウトマウス基底膜におけるインテグリンリガンドの発現低下	第 40 回日本結合組織学会学術大会、第 55 回マトリックス研究会大会合同学術集会	2008/5/29
023	大阪大学	李 紹良、乗岡尚子、原田兼司、井戸寛之、中村 彩、関口清俊	ヒトラミン 511 におけるインテグリン結合部位の探索	第 40 回日本結合組織学会学術大会、第 55 回マトリックス研究会大会合同学術集会	2008/5/29
024	大阪大学	Sekiguchi, K.	Molecular basis of basement membrane recognition by integrins.	Gordon Research Conference on Basement Membranes	2008/6/23
025	大阪大学	Futaki, S., Nakano, I., Manabe, R., Tsutsui, K., Sanzen, N., Sado, Y., Sekiguchi, K.	Diversification of the basement membrane composition during early stages of mouse embryogenesis.	Gordon Research Conference on Basement Membranes	2008/6/23,24
026	大阪大学	Tsutsui, K., Manabe, R., Sanzen, N., Nakano, I., Sado, Y., Futaki, S., Sekiguchi, K.	Construction of Mouse Basement Membrane Bodymap, an immunohistochemical image database of basement membrane proteins in mouse embryos.	Gordon Research Conference on Basement Membranes	2008/6/25,26

027	大阪大学	Taniguchi, Y., Ido, H., Sanzen, N., Hayashi, M., Nakano, I., Nishiuchi, R., Futaki, S., Sekiguchi, K.	The carboxyl-terminal region of laminin beta chains modulates the integrin binding activity of laminins.	Gordon Research Conference on Basement Membranes	2008/6/25,26
028	大阪大学	関口清俊	Customization of the basement membrane in embryonic development.	第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)	2008/12/10
029	大阪大学	浄住大慈、諸岡七美、杉浦信夫、木全弘治、関口清俊	基底膜分子 QBRICK の C 型レクチン様ドメインの機能	第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)	2008/12/12
030	大阪大学	佐藤(西内)涼子、山崎清、諸岡七美、中野伊津子、杉浦信夫、木全弘治、安永照雄、二木杉子、関口清俊	In silico スクリーニングによる機能未知細胞外マトリックス蛋白質 polydom の同定	第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)	2008/12/12
031	大阪大学	筒井仰、眞鍋理一郎、三千典子、中野伊津子、佐渡義一、二木杉子、関口清俊	Construction of Mouse Basement Membrane Bodymap, an immunohistochemical image database of basement membrane proteins in mouse embryos.	第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)	2008/12/12
032	大阪大学	武市真希子、浄住大慈、佐藤祐哉、上村俊人、高木淳一、関口清俊	組換えインテグリンを用いた in situ リガンド検出	第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)	2008/12/12
033	大阪大学	諸岡七美、佐藤(西内)涼子、山崎清、杉浦信夫、安永照雄、二木杉子、木全弘治、関口清俊	細胞外マトリックス蛋白質 polydom と結合する細胞外基質の探索	第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)	2008/12/12
034	大阪大学	Sekiguchi, K.	Customization of the basement membrane during embryonic development.	Gordon Research Conference on Fibronectin, Integrins and Related Molecules	2009/2/4

035	大阪大学	Sato, Y., Uemura, T., Morimitsu, K., Sato-Nishiuchi, R., Manabe, R., Takagi, J., Yamada, M., Sekiguchi, K.	Molecular basis of the recognition of nephronectin by integrin $\alpha 8 \beta 1$.	Gordon Research Conference on Fibronectin, Integrins and Related Molecules	2009/2/4,5
036	大阪大学	Sekiguchi, K	Customization of the basement membrane during embryonic development.	Yokosuka Science Festa 2009, 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium	2009/6/4
037	大阪大学	Taniguchi, Y., Ido, H., Sanzen, N., Hayashi, M., Nishiuchi, R., Futaki, S., Sekiguchi, K.	The carboxyl-terminal region of laminin beta chains modulates the integrin-binding affinities of laminins.	Yokosuka Science Festa 2009, 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium	2009/6/5
038	大阪大学	浄住大慈、武市真希子、佐藤祐哉、中野伊津子、関口清俊	Evaluation of physiological roles of integrin-binding activity of basement membrane protein QBRICK.	第 82 回日本生化学会大会	2009/10/22
039	大阪大学	佐藤(西内)涼子、二木杉子、藤崎ひとみ、佐々木純、川崎美和、林麻利亜、下野知性、小山洋一、服部俊治、関口清俊	Collagen I/IV composite gels as the platform for construction of basement membrane-like 3D matrix and their application to stem cell culture.	第 82 回日本生化学会大会	2009/10/22
040	大阪大学	佐藤祐哉、上村俊人、盛満圭介、佐藤(西内)涼子、眞鍋理一郎、高木淳一、山田雅司、関口清俊	Molecular basis of the recognition of nephronectin by integrin $\alpha 8 \beta 1$.	第 82 回日本生化学会大会	2009/10/22
041	大阪大学	片岡高志、下野知性、林麻利亜、八木芳子、浄住大慈、二木杉子、関口清俊	肝芽細胞の培養に適した細胞外基質の探索	第 9 回日本再生医療学会	2010/3/19

[学会・研究発表] 研究開発項目②「研究用モデル細胞の構築技術の開発」

擬似基底膜を利用したES細胞の分化誘導制御技術の開発

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	国立環境研究所	持立克身	基底膜構造を有する培養基質を用いた人工組織の構築	第9回日本組織工学会総会, シンポジウム4	2006/9
002	国立環境研究所	持立克身	基底膜構造体を培養基質に用いた人工組織の構築—細胞の極性と分化の制御をめざして	第6回日本再生医療学会総会, シンポジウム8	2007/3
003	国立環境研究所	持立克身	基底膜構造体を培養基質を用いた人工組織の構築	第34回日本臓器保存生物医学会総会	2007/11
004	国立環境研究所	持立克身	基底膜培養基質を用いた人工組織の機能構築	第10回日本組織工学会, シンポジウム2	2007/3
005	国立環境研究所	中村宣篤・細川剛・小高真希・曾勤・山古里織・持立克身	シンデカン接着受容体を利用した基底膜様構造体の形成促進	第81回日本生化学会大会	2008/12
006	熊本大学・国立環境研究所	Higuchi Y, Shiraki N, Zeng Q, Mochitate K, Yamane K, Kume K, and Kume S.	Novel differentiation procedures of the mouse ES or iPS cells into pancreatic cell lineages.	7th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research	2009/7
007	熊本大学・国立環境研究所	Shiraki N, Zeng Q, Mochitate K, Higuchi Y, Umeda K, Kume K, and Kume S.	Efficient differentiation of mouse and human ES cells into hepatic cells using feeder free basement membrane substratum in vitro	7th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research	2009/7
008	岡山大学・国立環境研究所	岩室雅也、小林直哉、持立克身、窪田康浩、清田正之	基底膜基質を用いた iPS 細胞からの効率的な肝細胞分化方法の確立	第9回日本再生医療学会総会	2010/3

[学会・研究発表] 研究開発項目②「ヒトES 細胞の分化誘導制御技術の開発」

人工基底膜、疑似マトリックスの効果

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	京都大学・大阪大学	Miyazaki, T., Futaki, S., Hasegawa, K., Kawasaki, M., Sanzen, N., Hayashi, M., Kawase, E., Sekiguchi, K., Nakatsuji, N., Suemori, H.	Recombinant human isoforms are effective in culture of human embryonic stem cells.	7 th International Society for Stem Cell Research (Barcelona)	2009/7/6
002	京都大学・大阪大学	宮崎隆道、二木杉子、長谷川光一、川崎美和、三千典子、林麻利亜、川瀬栄八郎、関口清俊、中辻憲夫、末盛博文	組み替えヒトラミニンアイソフォームを用いたヒトES細胞の未分化維持培養	第8回日本再生医療学会（東京）	2009/3/25

[学会・研究発表] 研究開発項目③「研究用モデル細胞の構築技術開発」

ヒトES細胞から神経変性疾患モデル細胞の構築

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	幹細胞創薬研究所	饗庭一博	ヒトES 細胞由来のモデル細胞と創薬研究	第7 回日本再生医療学会総会	2008/3
002	幹細胞創薬研究所	村上学、井上治久、月田香代子、浅井康行、饗庭一博、上杉志成、中辻憲夫、高橋良輔	転写を標的とした家族性筋萎縮性側索硬化症新規治療法の開発	第49 回 日本神経学会総会	2008/5
003	幹細胞創薬研究所	Wada T., Honda M., Tooi N., Aiba K., Nakatsuji N.	High-efficient spinal motor neuron culture method to establish als model from human/monkey embryonic stem cells	6th ISSCR Annual Meeting	2008/6

004	幹細胞創薬研究所	Tahimic C.G.T., Sakurai K., Shimoji M., Honda M., Aiba K., Amagai Y., Nakatsuji N.	Human es cell-derived dopaminergic Neurons as tools for drug discovery	6th ISSCR Annual Meeting	2008/6
005	幹細胞創薬研究所	Aiba K., Nakatsuji N.	Application of human ES cells for drugdiscovery	4th Annual Stem Cell Asia Congress-Stem Cell Research and Application	2008/6
006	京都大学・幹細胞創薬研究所	井上治久、村上学、月田香代子、中辻憲夫、上杉志成、饗庭一博、浅井康行、高橋良輔	家族性筋萎縮性側索硬化症治療標的分子の標的細胞における発現モニタリングシステムの確立	第26回 日本神経治療学会総会	2008/6
007	京都大学・幹細胞創薬研究所	Murakami G. , Inoue H., Tsukita K., Asai Y., Aiba K., Amagai Y., Uesugi M., Nakatsuji N., Takahashi R.	Development of a high-throughput screening assay for drug discovery in SOD1-mediated ALS	第31回 日本神経科学大会Neuroscience2008	2008/7
008	幹細胞創薬研究所	Wada T., Honda M., Tooi N., Aiba K., Nakatsuji N.	High Efficiency Spinal Motor Neuron Differentiation Methods from Human Embryonic Stem Cells	第31回 日本神経科学大会Neuroscience2008	2008/7
009	京都大学・幹細胞創薬研究所	Inoue H., Murakami G., Tsukita K., Asai Y., Aiba K., Amagai Y., Uesugi M., Nakatsuji N., Takahashi R.	Development of a high-throughput screening assay for drug discovery in SOD1-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	19th the annual International Symposium on ALS/MND	2008/11
010	幹細胞創薬研究所	本田誠、遠井紀江、南一成、和田圭樹、高橋良輔、木下彩栄、植村 健吾、饗庭一博、中辻憲夫	ヒトES 細胞由来神経細胞を用いたアルツハイマー病モデル細胞	日本分子生物学会第31回年会)日本生化学会との合同大会	2008/12/
011	幹細胞創薬研究所	Kazuhiro Aiba	Human ES cell-derived cellular models for neurodegenerative diseases and cardiotoxicity assay	5th Stem Cell Research & Therapeutics	2009/3

012	幹細胞創薬研究所	Wada T., Tooi N., Honda M., Aiba K., Nakatsuji N.	Human pluripotent stem cell-derived neurosphere culture based neural differentiation control method and application	第7回幹細胞シンポジウム	2009/5
013	幹細胞創薬研究所	Aiba K., Sakurai K., Tooi N., Honda M., Wada T., Shimoji M., Nakatsuji N.	A site-specific gene integration system and human embryonic stem cell lines carrying neurodegenerative disease genes	第7回幹細胞シンポジウム	2009/5
014	幹細胞創薬研究所	饗庭一博	創薬のためのヒトES 細胞由来のモデル細胞	日本組織培養学会第82回大会	2009/5/
015	幹細胞創薬研究所	Sakurai K., Shimoji M., Tahimic CGT, Aiba K., Kawase E., Hasegawa K., Amagai Y., Suemori H., Nakatsuji N.	Efficient system to integrate functional genes into a defined locus in human embryonic stem cells	7th ISSCR Annual Meeting	2009/7
016	幹細胞創薬研究所	Wada T., Tooi N., Honda M., Aiba K., Nakatsuji N.	Stable and low-cost protocol of spinal motor neuron and astrocyte production from both human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells for generating ALS model culture system	7th ISSCR Annual Meeting	2009/7
016	幹細胞創薬研究所	Aiba K., Tooi N., Honda M., Wada T., Shimoji M., Sakurai K., Nakatsuji N.	Generation of human embryonic stem cell lines carrying neurodegenerative disease genes using a site-specific gene integration system	7th ISSCR Annual Meeting	2009/7
017	京都大学・幹細胞創薬研究所	村上学、井上治久、月田香代子、浅井康行、饗庭一博、天貝裕地、上杉志成、中辻憲夫、高橋良輔	SOD1 関連ALS の創薬ハイスループット・スクリーニング・アッセイ系の確立	第32回日本神経科学大会 Neuroscience2008	2009/9
018	幹細胞創薬研究所	Wada T., Tooi N., Honda M., Aiba K., Nakatsuji N.	Neural lineage cell differentiation protocol from human embryonic stem cell and human induced pluripotent stem cell	第32回日本神経科学大会 Neuroscience2008	2009/9
019	幹細胞創薬研究所	Kazuhiro Aiba	Human ES cell-derived cellular models for drug discovery and development	第22回日本動物実験代替法学会	2009/11

020	幹細胞創薬研究所	Wada T., Aiba K., Tooi N., Inoue H., Takahashi R., Nakatsuji N.	Establishment of a human ES cell-derived familial ALS model	20th International Symposium on ALS/MND	2009/12
021	幹細胞創薬研究所	Aiba K.	Human ES cell-derived cellular models for drug discovery and development	日本分子生物学会第32回年会	2009/12
022	幹細胞創薬研究所	和田圭樹、饗庭一博、遠井紀江、井上治久、高橋良輔、中辻憲夫	ヒトES 細胞由来家族性ALS モデル系の樹立	第9 回日本再生医療学会総会	2010/3
023	幹細胞創薬研究所	本田誠、遠井紀江、南一成、饗庭一博、中辻憲夫	変異型Presenilin1 発現ヒトES 細胞由来のアルツハイマー病モデル細胞の構築	第9 回日本再生医療学会総会	2010/3

[学会・研究発表] 研究開発項目③「研究用モデル細胞の構築技術開発」

血液脳関門(BBB)モデルの創製

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	幹細胞創薬研究所	巽理恵, 鈴木豊, 角智行, 末盛博文, 中辻憲夫	ヒトES細胞から血管内皮前駆細胞の高効率分化誘導法	第9回日本再生医療学会総会(広島)	2010/3/18

[学会・研究発表] 研究開発項目③「研究用モデル細胞の構築技術の開発」

ES細胞由来肝細胞を用いた、創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	東京大学	山田 哲裕、前田 和哉、杉山 雄一	オルメサルタンの肝臓・腎臓における輸送メカニズムに関する検討	第21回日本薬物動態学会年会	2006/12
002	東京大学	久保 和也、前田 和哉、杉山 雄一	ボセンタンの肝取り込みにおける OATP ファミリートランスポーターの関与	第21回日本薬物動態学会年会	2006/12/1
003	東京大学	前田 和哉、平松 万里子、杉山 雄一	sandwich culture 培養系を用いたラット肝細胞における胆汁排泄の定量的予測系の確立のための検討	第6回日本再生医療学会総会	2007/3

004	東京大学	杉山 雄一	医薬品候補化合物の肝臓での解毒能をスクリーニングする細胞系の開発	第6回日本再生医療学会総会	2007/3
005	東京大学	久保 和也、前田 和哉、杉山 雄一	エンドセリン受容体拮抗薬ボセンタンの肝取込みにおける OATP ファミリートランスポーターの関与	第15回肝病態生理研究会	2007/5
006	東京大学	平松 万里子、前田 和哉、竹澤 俊明、Yi-an Bi、Kenneth R Brouwer、杉山 雄一	サンドイッチ培養肝細胞を用いた薬物の胆汁排泄過程におけるトランスポーターの寄与の検討	日本薬剤学会第22年会	2007/5
007	東京大学	前田 和哉、杉山 雄一	遺伝子多型が基質薬物の体内動態に与える影響の in vitro データからの予測法	CBI 学会第 275 回研究講演会	2007/5
008	東京大学	Yamada A, Maeda K, Kondo T, Shiroyanagi Y, Nakazawa H, Okano T, Adachi Y, Hu Z and Sugiyama Y	INVESTIGATION OF THE TRANSPORT MECHANISMS OF OLMESARTAN IN LIVER AND KIDNEY	Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC) 2007	2007/4
009	東京大学	Sugiyama Y	Predicting drug disposition and response in individual patients	Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC) 2007	2007/4
010	東京大学	Kubo K, Maeda K and Sugiyama Y	エンドセリン受容体阻害薬ボセンタンの肝臓への取り込みに対するOATPファミリートランスポーターの関与	第 15 回肝病態生理研究会	2007/5
011	東京大学	Watanabe T, Kusahara H, Maeda K and Sugiyama Y	トランスポーターを組み入れた生理学的薬物速度論モデリングによるヒトにおける薬物動態の予測と解析	第 15 回肝病態生理研究会	2007/5
		Hiramatsu M, Maeda K and Sugiyama Y	Analysis of the contribution of efflux transporters to the biliary excretion of drugs using B-CLEAR® (sandwich-cultured rat hepatocytes)	日本薬剤学会第 22 年会	2007/6
012	東京大学	Maeda K, Hiramatsu M, Bi Y, Takezawa T and Sugiyama Y	Analysis of the contribution of efflux transporters to the biliary excretion of drugs using B-CLEAR® (sandwich-cultured rat hepatocytes)	6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences	2007/8
013	東京大学	Sugiyama Y.	PBPK Modeling for Transporter-mediated Drug Disposition in the Body: Prediction from In Vitro to In Vivo and from Animal to Human	8th International ISSX Meeting	2007/10

014	東京大学	Sugiyama Y.	Transporter-based Drug Interactions: When Have We Been Are We going?	AAPS Workshop on Enzyme and Transporter Based Drug Interactions	2007/11
015	東京大学	Sugiyama Y.	Transporter Mediated Drug-drug Interactions; Prediction from In Vitro to In vivo	The Impact of Pharmacokinetics in Modern Drug Development – 10 Years Later	2007/11
016	東京大学	Sugiyama Y.	The role of influx and efflux transporters in drug disposition	Joint Meeting of the Southeast Asian Western Pacific Regional Federation of Pharmacologists and the Australasian Society of Clinical and Experimental Pharmacologists and Toxicologists	2007/12
017	東京大学	Maeda K, Hiramatsu M, Watanabe T, Gong L-K, Debori Y, Takezawa T, Kusuhara H and Sugiyama Y	創薬ツールとしての肝細胞を用いたin vitro実験系からの胆汁排泄の定量的予測	第7回日本再生医療学会総会	2008/3
018	東京大学	Sugiyama Y.	Integration of In Vitro and In Vivo Data of Transporter Mediated Drug-drug Interaction and Pharmacogenomics	The 2nd Asia Pacific ISSX Meeting	2008/5
019	東京大学	Maeda K and Sugiyama Y	ヒト組織由来サンプルを用いたin vitro実験に基づくin vivo薬物動態予測法の現状と将来展望	第15回HAB研究機構学術年会	2008/5
020	東京大学	Watanabe T, Maeda K, Watanabe T, Debori Y, Kondo T, Kusuhara H, Sugiyama Y.	遊離肝細胞、腎スライスを用いた医薬品の消失の肝腎振り分けのin vitro予測法の検討	第15回HAB研究機構学術年会	2008/5
021	東京大学	Watanabe T, Maeda K, Watanabe T, Debori Y, Kondo T, Kusuhara H, Sugiyama Y.	トランスポーター基質となる医薬品の肝・腎クリアランスのin vitro予測法の検討	日本薬剤学会第23年会	2008/5
022	東京大学	Maeda K, Watanabe T, Watanabe T, Debori Y, Kusuhara H, Sugiyama Y.	遊離肝細胞を用いたin vitro取り込み実験の結果に基づくin vivo肝クリアランスの予測の検討	第16回肝病態生理研究会	2008/6

023	東京大学	Maeda K	トランスポーターレベルでの薬物間相互作用: in vitro実験データと臨床データの対応付け	CBI 研究講演会	2008/7
024	東京大学	Maeda K	薬物トランスポーターが関与する薬物間相互作用の事例解析と予測法の構築へ向けて	第12回薬物動態談話会セミナー	2008/8
025	東京大学	Sugiyama Y.	Non-selective inhibitors of hepatic influx and efflux transporters: Implications to pharmacokinetics and hepatic drug disposition	FDA Critical Path Transporter Workshop	2008/10
026	東京大学	Sugiyama Y.	P-glycoprotein and other efflux transporters (Bcrp, Mrp2) on the luminal membrane in absorption, distribution, and elimination	2008 AAPS Annual Meeting & Exposition	2008/11
027	東京大学	Gong L-K, Maeda K, Hiramatsu M, Takezawa T, Sugiyama Y.	Prediction of the relative importance of efflux transporters in overall biliary excretion from in vitro sandwich-cultured hepatocytes in rats	第23回日本薬物動態学会年会	2008/11
028	東京大学	Maeda K and Sugiyama Y	Investigation of the importance of transporter-mediated drug-drug interaction from the literature clinical information	第23回日本薬物動態学会年会	2008/11
029	東京大学	Maeda K, Sugiyama Y	ヒト凍結肝細胞を利用した薬物の肝取り込み・胆汁排泄の予測法	細胞アッセイシンポジウム	2009/1
030	東京大学	Maeda K, Gong L-K, Hiramatsu M, Takezawa T, Sugiyama Y.	サンドイッチ培養肝細胞を用いたトランスポーター基質のin vivo胆汁排泄クリアランスの予測	第8回日本再生医療学会総会	2009/3
031	東京大学	前田和哉、杉山雄一	ヒト薬物動態の定量的予測のためのヒト由来組織・細胞の活用	第16回HAB研究機構学術年会	2009/5
032	東京大学	前田和哉、北村吏司、杉山雄一	トランスポーターを介した薬物間相互作用による血漿中・組織中濃度の変動のin vitro実験に基づく定量的予測法の検討	日本薬剤学会第24年会	2009/5
033	東京大学	Maeda K and Sugiyama Y	QUANTITATIVE PREDICTION OF THE CLEARANCE PATHWAYS OF TRANSPORTER SUBSTRATES FROM IN VITRO EXPERIMENTS	7 th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting symposium	2009/6
034	東京大学	Sugiyama Y	Drug Transporters in the New Drug Discovery and Development	3rd Asian Pacific Regional Meeting of ISSX	2009/5

[学会・研究発表] 研究開発項目③「モデル細胞を利用した創薬支援ツール開発」
 オンチップ・ヒト組織・臓器モデルを用いた毒性・創薬技術の研究開発

番号	発表会社	発表者	発表内容	学会・研究名	発表日
001	東京医科歯科大学	Yasuda K.	On-chip single cell based analysis: newly developed reconstructive approach for artificial tissue/organ formation.	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress	2006/6/18
002	東京医科歯科大学	Yasuda K.	On-chip Single-Cell-Based Tissue/Organ Model Analysis: Newly Developed Reconstructive Approach for Artificial Tissue/Organ Re-Formation.	World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006	2006/8/29
003	東京医科歯科大学	Yasuda K.	On-Chip Cellomics Assay: Artificial Re-Construction of Tissue Model for Cell Based Drug Discovery.	The 10th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2006)	2006/11/8
004	東京医科歯科大学	Suzuki I., and Yasuda K.	Plasticity in Single-Cell-Based Reconstructed Neuronal Network Pattern.	5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan	2006/11/13
005	東京医科歯科大学	Yasuda K.	On-chip single-cell-based tissue/organ model analysis: newly developed reconstructive approach for artificial tissue/organ re-formation.	The 3rd International Symposium on Bioprinting & Biofabrication	2006/11/22
006	東京医科歯科大学	Yasuda K.	Yasuda K. On-chip single-cell-based analysis system for drug discovery.	Nanobio Tokyo 2006	2006/12/6

[新聞・マスコミ・その他 発表]

[新聞・マスコミ・その他 発表] 研究開発項目①「ヒトES 細胞の加工技術開発」

ヒトES 細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発

番号	会社名	内容	掲載物	掲載日
001	京都大学	「新薬開発にES 細胞活用へ」の見出しで発表された。	朝日新聞	2005/10/29
002	京都大学	「ES 細胞使い新薬開発」の見出しで発表された。	京都新聞	2005/11/1
003	京都大学	「京大などES 細胞活用研究拠点」の見出しで発表された。	産経新聞	2005/11/1
004	京都大学	「ES 細胞使い新薬開発スタート」の見出しで発表された。	産経新聞	2005/11/8
005	京都大学	「再生医療真の切り札なるか？」の見出しで発表された。	読売新聞	2006/3/8
006	京都大学	「万能細胞を唯一提供」の見出しで発表された。	読売新聞	2006/3/11
007	京都大学	「全組織・臓器を修復」の見出しで発表された。	日刊工業新聞	2006/3/16
008	京都大学	「ヒトES 細胞は公共の資源」の見出しで発表された。	朝日新聞	2006/4/13
009	京都大学	「新薬の開発研究に利用」の見出しで発表された。	読売新聞	2006/6/5
010	京都大学	「ES 細胞新段階へ」の見出しで発表された。	日刊工業新聞	2006/6/9
011	京都大学	「国際協力で基準づくり」の見出しで発表された。	読売新聞	2006/6/12
012	京都大学	「免疫の拒絶反応軽減」の見出しで発表された。	日本経済新聞	2006/11/6
013	京都大学	「京大再生研人の融合細胞形成へ」の見出しで発表された。	京都新聞	2006/12/15
014	京都大学	「再生医療 議論急げ」の見出しで発表された。	京都新聞	2006/12/15
015	京都大学	「8 割 移植の拒絶反応軽減」の見出しで発表された。	毎日新聞	2006/12/22
016	京都大学	「日本人の8 割 移植可能」の見出しで発表された。	日本経済新聞	2006/12/22
017	京都大学	「受精卵使わずES 細胞」の見出しで発表された。	朝日新聞	2006/12/24
018	京都大学	「難病治療への効果期待」の見出しで発表された。	読売新聞	2007/3/2
019	京都大学	「ES 細胞 肝移植で病状改善」の見出しで発表された。	日本経済新聞	2007/4/30
020	埼玉医科大学・京都大学	「ES 細胞、遺伝子操作自在」の見出しで発表された。	日本経済新聞	2008/8/26
021	埼玉医科大学・京都大学	「ES 細胞効率よく成長」の見出しで発表された	毎日新聞	2008/8/26

022	埼玉医科大学・京都大学	「万能細胞の遺伝子操作」の見出しで発表された	朝日新聞	2008/8/26
023	埼玉医科大学・京都大学	「ES 細胞操作容易に」の見出しで発表された	京都新聞	2008/26
024	埼玉医科大学・京都大学	ES 細胞で新技術 自由に遺伝子操作」の見出しで発表された	読売新聞	2008/8/31
025	京都大学	京都大学山下研究室がES 細胞から血管細胞を誘導して行っている研究に関する特集記事	日刊工業新聞	200/12/13
026	京都大学	京都大学山下研究室がマウスiPS 細胞から心血管細胞の分化誘導に世界に先駆けて成功した。	日本経済新聞、京都新聞	2008/3/9
027	京都大学	サイクロスポリンA により、ES 細胞からの心筋分化誘導効率を従来の10倍以上亢進させた。	日本経済新聞	2008/12/8
028	京都大学	京都大学山下研究室のiPS 細胞研究論文がCirculation 誌年間ベスト基礎科学論文賞を受賞	メディカルトリビューン	2009/12/17

[新聞・マスコミ・その他 発表] 研究開発項目②「ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発」

ヒトES細胞の神経系細胞への分化誘導技術の開発

番号	会社名	内容	掲載物	掲載日
001	幹細胞創薬研究所	「輸入細胞の販売開始国内の成果はどこへヒトES細胞由来分化細胞」の見出しで発表された	日経バイオテク	2008/9/8
002	幹細胞創薬研究所	「運動ニューロンの高効率分化ES細胞から誘導」の見出しで発表された	日刊工業新聞	2008/7/11
003	京都大学・幹細胞創薬研究所	「ES 細胞から「病気モデル」」の見出しで発表された	朝日新聞	2008/7/18
004	京都大学・幹細胞創薬研究所	「ヒトES細胞から病気のモデル細胞を作成」の見出しで発表された	毎日新聞	2008/7/20
005	京都大学・幹細胞創薬研究所	「神経変性疾患にES細胞」の見出しで発表された	読売新聞	2008/7/22
006	幹細胞創薬研究所	「万能細胞使う創薬研究活発」の見出しで発表された	日本経済新聞	2009/12/21

[新聞・マスコミ・その他 発表] 研究開発項目① 「ヒトES 細胞の加工技術開発」

ヒトES 細胞の心筋細胞への分化誘導制御技術の開発

番号	会社名	内容	掲載物	掲載日
001	京都大学・幹細胞創薬研究所	「ES 細胞から心筋細胞 心臓毒性チェックに新技術」の見出しで発表された。	朝日新聞	2007/6/25
002	京都大学・幹細胞創薬研究所	「ES 細胞から「病気モデル」」の見出しで発表された	朝日新聞	2008/7/18
003	京都大学・幹細胞創薬研究所	「ヒトES 細胞から病気モデル細胞を作成」の見出しで発表された	毎日新聞	2008/7/20
004	京都大学	「ES 細胞で神経疾患解明へ」の見出しで、発表された	読売新聞	2008/7/22
005	京都大学	「マウスES 細胞から「心筋」」の見出しで、発表された	日本経済新聞	2008/12/8
006	京都大学・幹細胞創薬研究所	「ES 細胞で症状再現」の見出しで、発表された	読売新聞	2009/7/4
007	京都大学・幹細胞創薬研究所	「万能細胞使う創薬研究活発」の見出しで、発表された	日本経済新聞	2009/12/21

[新聞・マスコミ・その他 発表] 研究開発項目② 「ヒトES 細胞の分化誘導制御技術開発」

ヒトES 細胞の肝細胞への分化誘導制御技術の開発

番号	会社名	内容	掲載物	掲載日
001	京都大学	マウスES 細胞由来の肝細胞に分化させ、それを移植することで病状改善したことを発表した。	日本経済新聞	2007/04/30

[新聞・マスコミ・その他 発表] 研究開発項目②「ヒトES細胞の分化誘導制御技術の開発」

分子構成を最適化した人工基底膜によるES細胞の分化誘導技術の開発立

番号	会社名	内容	掲載物	掲載日
001	大阪大学	「細胞のたんぱく質局在状態一阪大が電子画像化」の見出しでマウス基底膜ボディマップデータベースが紹介された	日刊工業新聞	2008/8/20
002	大阪大学	「マウス全身の組織倍率自由に観察」の見出しでマウス基底膜ボディマップデータベースが紹介された	読売新聞	2008/8/20
003	大阪大学	「臓器ごとたんぱく質画像 DB 化」の見出しでマウス基底膜ボディマップデータベースが紹介された	朝日新聞	2008/8/24
004	大阪大学	「たんぱく質の種類わかる画像」の見出しでマウス基底膜ボディマップデータベースが紹介された	朝日新聞	2008/9/1

[新聞・マスコミ・その他 発表] 研究開発項目③「研究用モデル細胞の構築技術開発」

ヒトES細胞から神経変性疾患モデル細胞の構築

番号	会社名	内容	掲載物	掲載日
001	幹細胞創薬研究所	「輸入細胞の販売開始国内の成果はどこへヒトES細胞由来分化細胞」の見出しで発表された	日経バイオテック	2008/9/8
002	幹細胞創薬研究所	「運動ニューロンの高効率分化ES細胞から誘導」の見出しで発表された	日刊工業新聞	2008/7/11
003	京都大学・幹細胞創薬研究所	「ES細胞から「病気モデル」」の見出しで発表された	朝日新聞	2008/7/18
004	京都大学・幹細胞創薬研究所	「ヒトES細胞から病気のモデル細胞を作成」の見出しで発表された	毎日新聞	2008/7/20
005	京都大学・幹細胞創薬研究所	「神経変性疾患にES細胞」の見出しで発表された	読売新聞	2008/7/22
006	幹細胞創薬研究所	「万能細胞使う創薬研究活発」の見出しで発表された	日本経済新聞	2009/12/21

添付資料⑥

NEDO公開シンポジウム Abstracts

NEDO公開シンポジウム 研究用モデル細胞の創製技術開発

**多能性幹細胞株の遺伝子改変・分化誘導・ケミカルスクリーニングによる
正常/疾患モデル細胞作成と創薬産業応用**

Abstracts

開催日：平成22年5月18日(火)

会場：京都大学 東京オフィス

主催：独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)

NEDO公開シンポジウム
研究用モデル細胞の創製技術開発

多能性幹細胞株の遺伝子改変・分化誘導・ケミカルスクリーニングによる
正常／疾患モデル細胞作成と創薬産業応用

CONTENTS

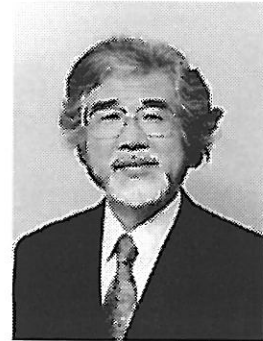
タイムスケジュール	2
中辻 憲夫 要旨 (京大iCeMS/京大再生研)	3
関口 清俊 要旨 (阪大)	7
櫻井 健二 要旨 (SCDI)	11
三谷 幸之介 要旨 (埼玉医大)	15
饗庭 一博 要旨 (SCDI/京大iCeMS)	19
尾辻 智美 要旨 (SCDI/京大再生研)	23
糸 昭苑 要旨 (熊大)	27
川瀬 栄八郎 要旨 (京大再生研)	31
浅井 康行 要旨 (SCDI/ReproCELL)	35

Time schedule

- 14:00～14:05 主催開催挨拶
森田 弘一 (NEDO)
- 14:05～14:10 来賓挨拶 (METI)
- 14:10～14:30 プロジェクトリーダーによる概要説明：
ES細胞やiPS細胞など多能性幹細胞株の遺伝子改変、分化誘導、
ケミカルスクリーニングによる正常/疾患モデル細胞作成と創薬産業応用
中辻 憲夫 (京大iCeMS/京大再生研)
- 14:30～14:50 多能性幹細胞の培養と分化誘導制御のための完全合成型人工基底膜の開発
関口 清俊 (阪大)
- 14:50～15:20 ヒトES細胞に対する新たな遺伝子改変技術の開発
櫻井 健二 (SCDI)
ヒト多能性幹細胞における遺伝子改変技術の開発 ～ウイルスベクターを用いて～
三谷 幸之介 (埼玉医大)
- 15:20～15:50 ヒトES細胞からの神経分化誘導法の確立と神経変性疾患モデル細胞の作製
饗庭 一博 (SCDI/京大iCeMS)
- 15:50～16:20 休憩
- 16:20～16:40 心筋分化誘導と心筋毒性検定への応用
尾辻 智美 (SCDI/京大再生研)
- 16:40～17:00 肝細胞への分化誘導技術の開発
糸 昭苑 (熊大)
- 17:00～17:20 ヒトES細胞からの肝細胞分化誘導系の開発
川瀬 栄八郎 (京大再生研)
- 17:20～17:50 多能性幹細胞を用いた低分子化合物ハイコンテンツスクリーニング系の構築
浅井 康行 (SCDI/ReproCELL)
- 17:50～17:55 閉会の挨拶
森田 弘一 (NEDO)
- 17:55～18:40 意見交換会

中辻 憲夫

京都大学物質-細胞統合システム拠点長／再生医科学研究所教授



[略歴]

- | | |
|------------|-----------------------------------|
| 1972年 | 京都大学理学部卒業 |
| 1974年 | 京都大学大学院理学研究科修士課程 修了 |
| 1977年 | 京都大学大学院理学研究科博士課程 修了（理学博士） |
| 1978年 | スウェーデン ウメオ大学 助手 |
| 1978年 | 米国 マサチューセッツ工科大学 ポストドク研究員 |
| 1980年 | 米国 ジョージワシントン大学医学部 研究員 |
| 1983年 | 英国 ロンドン大学MRC哺乳類発生学部門 客員研究員 |
| 1984年 | 明治乳業ヘルスサイエンス研究所 主任研究員のち研究室長 |
| 1991年 | 国立遺伝学研究所 教授 |
| 1999年 | 京都大学再生医科学研究所 教授 |
| 2003-2007年 | 京都大学再生医科学研究所 所長 |
| 2007 | 京都大学物質-細胞統合システム拠点長(再生医科学研究所教授兼務)。 |

プロジェクトリーダーによる概要説明：

「ES細胞やiPS細胞など多能性幹細胞株の遺伝子改変、分化誘導、ケミカルスクリーニングによる正常／疾患モデル細胞作成と創薬産業応用」

中辻 憲夫

創薬プロセスにおいては、早い段階から効率的に医薬品候補分子を絞り込むことが、開発期間と費用の効率化にとって非常に重要であるが、従来用いられてきたヒト株化細胞や動物細胞では、生体内反応を高い精度で予測することは困難である。このような創薬プロセスにおけるボトルネックを解消するためには、無限に増殖できるとともに、あらゆる生体組織の細胞に分化できる多能性幹細胞株（ヒトES細胞やiPS細胞など）由来のモデル細胞の利用が極めて有効である。NEDO「研究用モデル細胞の創製技術開発プロジェクト」（平成17－21年度）では、難病発症機構の解明や新薬の安全性評価及び創薬研究の効率化に有用な、研究開発用モデル細胞の創製技術を開発するため、ヒトES細胞株などを用いて遺伝子改変、分化誘導制御、細胞を用いたケミカルスクリーニング、正常および疾患モデル細胞の作成を目指した研究を展開してきた。

今回、5年間のプロジェクトで得られた研究開発成果を広く紹介するため公開シンポジウムを開催して、以下の項目などについて発表する。

- 1) ヒトES/iPS細胞株の培養系に関する新規技術開発
- 2) ヒトES/iPS細胞株に適用可能な新規遺伝子改変技術の開発
- 3) ヒトES細胞株の遺伝子改変による神経変性疾患モデル細胞の作成と解析
- 4) 多能性幹細胞株を用いた心筋分化誘導と心筋毒性検定への応用
- 5) 多能性幹細胞株を用いた肝細胞分化誘導系の開発
- 6) ES/iPS細胞などを用いた低分子化合物のスクリーニング系の構築

幹細胞の種類と特徴

多能性幹細胞 Pluripotent Stem Cell

- ・ES細胞(胚性幹細胞)Embryonic Stem Cell
初期胚由来 分化能:高 増殖能:無制限
- ・EG細胞 Embryonic Germ Cell
胎児生殖細胞由来 分化能:高 増殖能:無制限
- ・mGS細胞 Multipotent Germ Stem Cell
新生児精巣内生殖細胞由来 分化能:高 増殖能:高 or 無制限
- ・iPS細胞(体細胞を遺伝子導入で再プログラム化した細胞株)

組織幹細胞 Tissue Stem Cell(体性幹細胞 Somatic Stem Cell)

造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞など

- ・(胎児)組織幹細胞
中絶胎児由来 分化能:中 増殖能:中
 - ・(成体)組織幹細胞(成体幹細胞 Adult Stem Cell)
成人由来(一部は生体から採取可能)
分化能:低~中 増殖能:低~中
- 多能性に近い特性をもつ成体組織幹細胞?
成人由来 分化能:高? 増殖能:高?(再現性確認が困難)

ヒト多能性幹細胞株の 創薬研究における重要性

創薬研究に必要な多種類ヒト組織細胞の大量供給

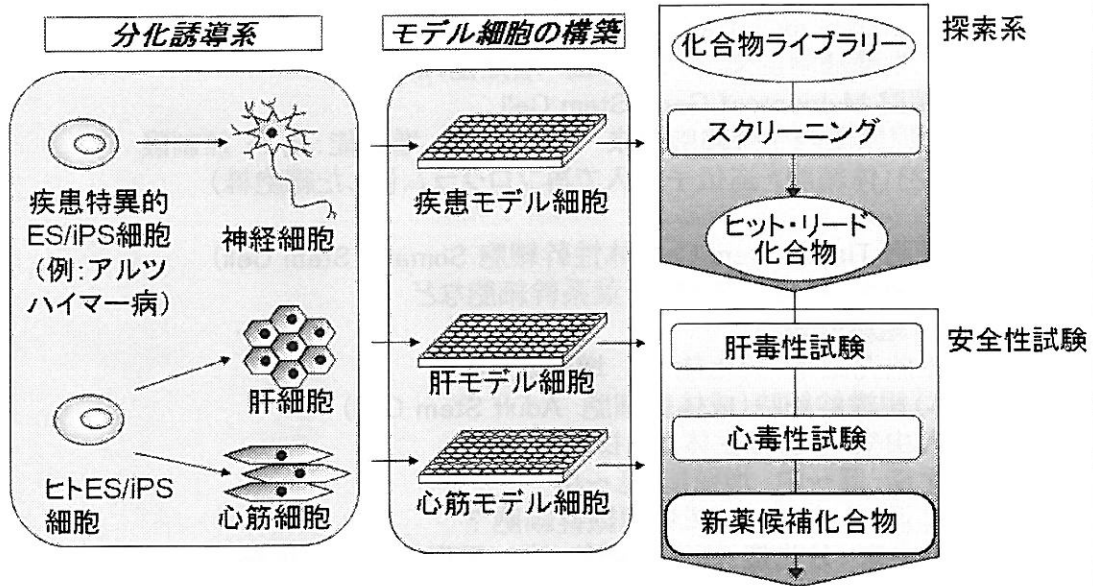
- ・均一な特性(ゲノム)をもつヒト細胞
- ・外来遺伝子ベクターを組み込んだヒト細胞
- ・内在遺伝子を改変したヒト細胞(疾患モデルヒト細胞)
- ・各種細胞内活性を検出するレポーター遺伝子導入ヒト細胞

- ・各種ヒトモデル細胞への薬物効果と生理活性のアッセイ系
- ・ヒト細胞(肝細胞や心筋細胞)を使った安全性試験

- ・各種神経細胞、心筋、網膜細胞、皮膚、軟骨、脂肪細胞
- ・肝細胞、膵島細胞

創薬研究のためのヒトES/iPS細胞由来のモデル細胞の開発

- ・ 探索系 (疾患モデル細胞を用いたハイスループットスクリーニング)
- ・ 安全性試験 (肝モデル細胞、心筋モデル細胞を用いた試験)



ヒト多能性幹細胞株の遺伝子改変による疾患モデル細胞と患者由来iPS細胞株による疾患モデル細胞の利点比較

既存ヒトES (またはiPS) 細胞株の遺伝子改変

有利な点

- 1) 同じ遺伝的背景をもった細胞株で病因遺伝子保有と健常型遺伝子保有細胞の厳密な比較対照が可能
- 2) 発現誘導型プロモーターを用いた病因遺伝子の発現制御が可能 → 病因遺伝子発現の影響を厳密な時間軸で解析可能
- 3) 異常蛋白質などの過剰発現により疾患関連異常の発症を早めることが出来る可能性

不利な点

- 1) 病因遺伝子が不明または多数遺伝子関与の場合にはモデル作成が困難

患者の体細胞由来iPS細胞株の作成

有利な点

- 1) 病因遺伝子が不明または多数遺伝子関与の場合にも患者のゲノムをもつ細胞株樹立が可能 → 疾患モデルとして使える可能性

不利な点

- 1) 患者と健常者からのiPS細胞株は異なる遺伝的背景をもつ → 厳密な比較対照が困難
- 2) 不完全な再プログラム化 (初期化) によるエピジェネティクスの異常が細胞表現型の解析を乱す可能性
- 3) 慢性疾患や加齢疾患などでは実験可能期間内に細胞の異常発生が確認できない可能性



関口 清俊

大阪大学蛋白質研究所 細胞外マトリックス研究室 教授

[略歴]

- 昭和48年 3月 東京工業大学理学部化学科卒業
昭和53年 3月 大阪大学大学院理学研究科生物化学専攻博士後期課程修了（理学博士）
昭和54年 3月 米国フレッドハッチンソン癌研究所 博士研究員
昭和59年 1月 米国ワシントン大学病態生物学科 助教授（併任）
昭和61年 5月 藤田保健衛生大学医学部 講師
平成 2年 6月 藤田保健衛生大学医学部 助教授
平成 3年 4月 大阪大学微生物病研究所 助教授
平成 3年 7月 大阪府立母子保健総合医療センター研究所 部長
平成 4年 4月 大阪府立母子保健総合医療センター研究所 所長
平成 6年 4月 大阪大学大学院医学研究科（連携大学院）客員教授
平成10年 4月 大阪大学蛋白質研究所 教授
平成12年10月 科学技術振興機構創造科学技術推進事業（ERATO）
関口細胞外環境プロジェクト 総括責任者（兼任、～平成18年3月）
平成18年 4月 大阪大学バイオ関連多目的研究施設 施設長（併任）

[受賞歴]

- ・1997年 日本生化学会 JB論文賞

[主な所属学会と活動状況]

日本生化学会（評議員）、日本細胞生物学会、日本結合組織学会（評議員）、日本癌学会、日本再生医療学会、米国生化学分子生物学会、米国細胞生物学会

[研究テーマ・領域]

- ・細胞外マトリックスの構造と機能、再構成マトリックスによる幹細胞の増殖・分化の制御

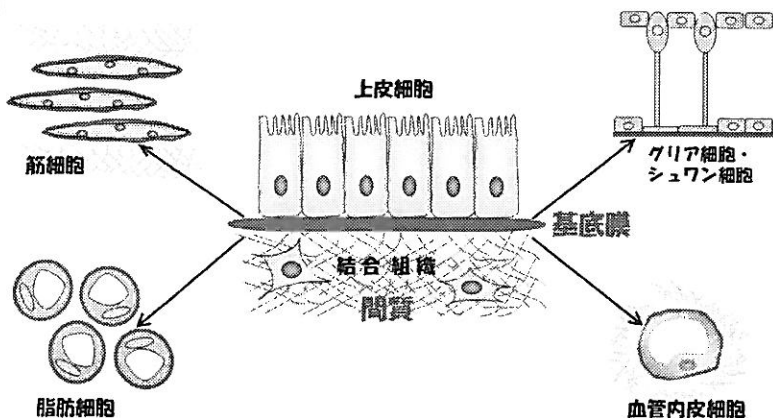
多能性幹細胞の培養と分化誘導制御のための完全合成型人工基底膜の開発

関口 清俊

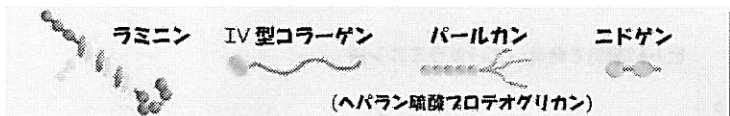
生体組織における細胞の増殖と分化は、周囲の環境から提供される様々な情報に基づいて制御されている。この情報の主たる担い手は、周囲の細胞から分泌される液性因子と細胞の足場となる細胞外マトリックスである。細胞外マトリックスは、細胞表面の受容体と結合することにより、それ自身がシグナル分子として機能するだけでなく、様々な液性因子を結合することにより、それらの組織内での分布や濃度勾配の形成に深く関わっている。細胞外マトリックスの分子構成は、細胞ごとに異なっており、同じ細胞であっても発生や分化段階の違いによって変化することが知られている。このような細胞ごとに最適化された細胞外マトリックスの分子実体を解明し、生体外で再構築することは、ES細胞のフィーダーフリー培養技術および選択的分化誘導技術の開発に不可欠である。本研究開発では、多くの臓器実質細胞の直近の足場となっている基底膜に着目し、細胞ごとに分子構成をカスタマイズした完全合成型人工基底膜の構築技術の開発を行った。

基底膜を構築する蛋白質は、これまで約50種が知られている。なかでも強い細胞接着活性をもつラミニンと自己会合能を有するIV型コラーゲンは、基底膜の機能的・構造的な中核を担うと考えられている。本研究開発では、ラミニンとIV型コラーゲンを組み合わせた2成分コンポジットゲルを人工基底膜の基本骨格とし、これにニドゲンやヘパラン硫酸プロテオグリカンを組み込んだ多成分人工基底膜の構築を目指した。具体的には、これまでに知られている12種のラミニンアイソフォーム、2種のニドゲン、2種のヘパラン硫酸プロテオグリカンの組換え蛋白質の発現・精製法を確立するとともに、IV型コラーゲンの生物活性とI型コラーゲンの物理的強度を併せ持つ改良型IV型コラーゲンを開発し（日本皮革研究所との共同研究）、分子組成をカスタマイズしたラミニン—IV型コラーゲン—ニドゲン—ヘパラン硫酸プロテオグリカンからなる完全合成型多成分人工基底膜の構築に世界ではじめて成功した。また、京都大学再生医科学研究所と共同して、組換え基底膜蛋白質を利用したヒトES細胞用のフィーダーフリー培養基質の開発を進め、組換えラミニン-511およびラミニン-332を固相化した基質上でヒトES細胞が未分化性を維持したまま増殖することを明らかにした。これらの組換えラミニン上では、ヒトiPS細胞の培養と継代も可能であり、ヒト多能性幹細胞用のフィーダーフリー・ゼノフリー培養基質として今後の実用化が期待される。一方、分子組成をカスタマイズした多成分人工基底膜の評価を熊本大学と共同して進めており、ES細胞から肝臓や膵臓への選択的分化誘導においてそれぞれ異なる分子組成の人工基底膜が有効であることが明らかとなりつつある。これらの結果は、本研究開発が目指す完全合成型人工基底膜がヒトES細胞/iPS細胞の培養と分化誘導制御に有効であることを強く支持している。

基底膜は多くの細胞が必要とするユニークな細胞外微小環境



基底膜の構成分子

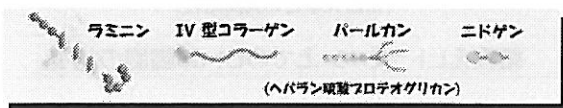


ラミニン	コラーゲン	プロテオグリカン	その他の糖蛋白質
Laminin-111	collagen α 1(IV)	perlecan	nidogen-1
Laminin-121	collagen α 2(IV)	agrin	nidogen-2
Laminin-211	collagen α 3(IV)		SMOC-1
Laminin-221	collagen α 4(IV)		nephronectin
Laminin-311	collagen α 5(IV)		netrin-1
Laminin-321	collagen α 6(IV)		netrin-4
Laminin-332			usherin
Laminin-411	collagen α 1(VI)		amelogenin
Laminin-421	collagen α 2(VI)		endoglyx-1
Laminin-511	collagen α 3(VI)		papilin
Laminin-521	collagen α 1(XV)		TIN-Ag
	collagen α 1(XVIII)		AMACO
			amelotin

48種類

赤字：本研究開発で調製法を確立した基底膜蛋白質

分子組成をカスタマイズした人工基底膜の構築



人工基底膜の構築戦略



- * IV型コラーゲンゲル：ゲル化に非常に時間がかかる。やわらかく取り扱いが難しい。
- * I型コラーゲンゲル：すぐ固まる。適度な硬さを持つ。しかし、ラミニンに対する結合活性が弱い。ES細胞の接着が弱い。

I型コラーゲンとIV型コラーゲンの両者の長所をもつI型/IV型混成コラーゲンゲルの作製に成功

- > I型コラーゲンと同様、速やかにゲル化する
- > IV型コラーゲンの強いラミニン結合活性を保持している

品質の安定したヒトES細胞の培養・増殖法の開発
(京都大学との共同研究)

従来のヒトES細胞の培養方法の問題点

- マウス線維芽細胞をフィーダー細胞として用いる。
 - フィーダー細胞の安定な供給が常に課題となる
 - 異種成分を排除することができない
- コロニーを維持した状態で継代培養する必要がある。
 - スプリット比率が1:2~1.6
 - 操作の標準化が難しい



フィーダーフリーかつゼノフリーの培養方法が求められている！

これまでのフィーダーフリーの培養方法

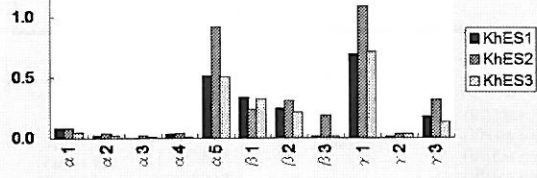
- マトリゲル (Matrigel: マウス腫瘍抽出物を基質とする培養方法
(Xu et al. Nature Biotech, 2001, Ludwig et al., Nature Methods, 2006))
 - 異種成分の持込み(ゼノフリーにはならない)
 - 化学的組成が完全には解明されていない
 - 主成分はラミニン-111 ($\alpha 1, \beta 1, \gamma 1$)



マウスEHS標準

品質の安定したヒトES細胞の培養・増殖法の開発
(京都大学との共同研究)

ヒトES細胞で発現しているラミニン鎖

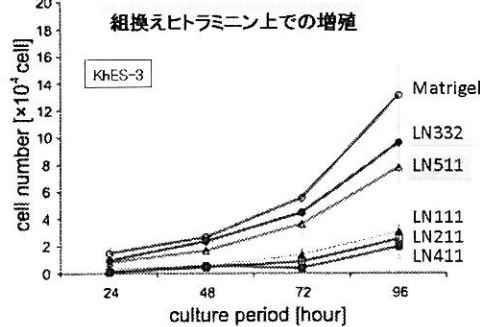


ヒトES細胞は、 $\alpha 5$ 鎖ラミニンを主に発現している

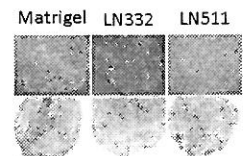


品質の安定したヒトES細胞の培養・増殖法の開発
(京都大学との共同研究)

組換えヒトラミニン上でのヒトES細胞の培養



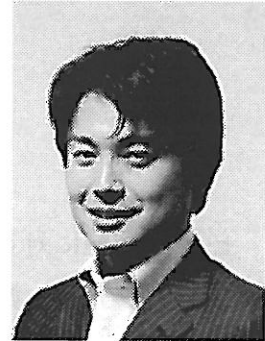
受容体結合特異性が類似している



(Miyazaki et al., Biochem Biophys Res Commun, 2008)

櫻井 健二

特定非営利活動法人幹細胞創薬研究所



[略歴]

- | | |
|-------|---------------------------------|
| 2003年 | 東京大学大学院理学系研究科卒業
キリンビール株式会社入社 |
| 2006年 | 特定非営利活動法人幹細胞創薬研究所 |
| 2008年 | 京都大学大学院医学研究科 |

ヒトES細胞に対する 新たな遺伝子改変技術の開発

櫻井 健二

ヒトES細胞に対して遺伝子改変を行なう場合、越えなくてはならない最大の課題は、サイレンシングの克服である。サイレンシングとは、導入した遺伝子が宿主の染色体に組み込まれているにもかかわらず、機能しないという現象のことである。ヒトES細胞では、原因は不明だがサイレンシングが起きやすく、それによって研究効率の大きなロスが生じている。

この現状を打破するため、我々は新たな遺伝子改変方法を開発した。その方法とは、まず、遺伝子相同組み換えを用い、ハウスキーピング遺伝子のひとつであるHPRTの遺伝子座にドッキングサイトを組み込む。次いで、その株のドッキングサイトに対して、Cre/LoxPによる組み換えを応用した遺伝子置換を行なう、というものである。この方法で遺伝子改変を行なうと、得られたクローンの全てが導入遺伝子を発現しており、サイレンシングを回避することに成功した。さらに、この方法を応用することで、HPRT遺伝子座単独でのTet-On誘導発現システムを構築することにも成功した。

本技術を用いて得られたクローンは理論上、みな同じ遺伝的バックグラウンドとなる。そのため、従来の遺伝子改変方法に比べ、クローニングの負担を大幅に軽減できるという利点を併せ持つ。これらのことから、創薬スクリーニングへの応用のみならず、多能性幹細胞研究のスピードが飛躍的に加速されると期待される。

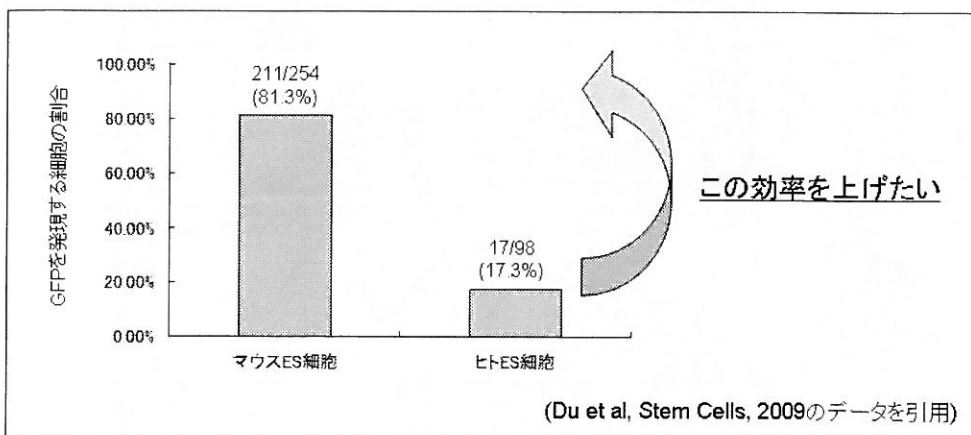
【参考文献】

Sakurai et al, Nucleic Acids Research, April 2010; 38: e96

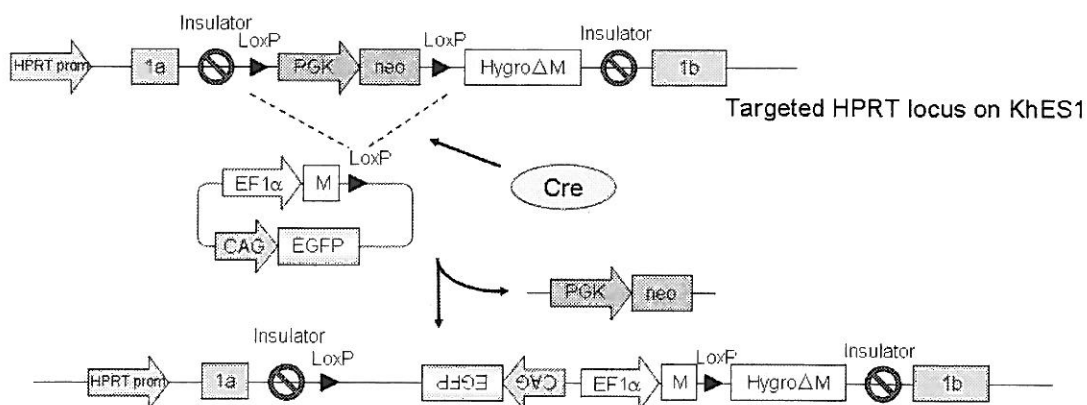
Efficient integration of transgenes into a defined locus in human embryonic stem cells

1. ヒトES細胞への遺伝子導入

- ◆ ヒトES細胞で遺伝子導入すると、何故かサイレンシングが起きやすい。
- ◆ GFP発現カセットを遺伝子導入しても、GFPを発現する細胞はわずか17.3%。
(マウスES細胞では8割以上の細胞がGFPを発現する)
- ◆ サイレンシングを回避できれば、研究スピードが加速される。

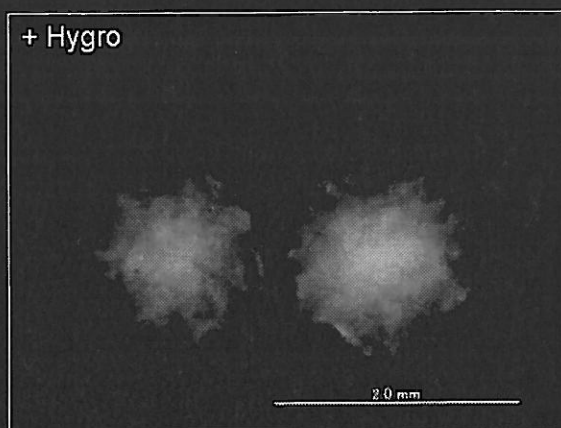


2. HPRT遺伝子座をターゲットとした遺伝子導入



HPRT遺伝子座にドッキングサイトを組み込んだヒトES細胞を作り、そのサイトに好みの遺伝子を高効率で入れるシステムを構築した。HPRT遺伝子はハウスキーピング遺伝子なので、この遺伝子座に入った遺伝子はサイレンシングを受けないはず。ポジティブコントロールとしてEGFP発現カセットを用いた。

3. サイレンシングを回避した遺伝子導入法の確立



Hygro ^r	EGFP ⁺	Efficiency
186	186	100%

全ての薬剤耐性クローンでEGFPの発現が確認された。

三谷 幸之介

埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 遺伝子治療部門 部門長／教授



[略歴]

- 1984年 東京大学 医学部 保健学科 卒業
- 1986年 東京大学大学院 医学系研究科 保健学専門 修士課程 修了
- 1989年 東京大学大学院 医学系研究科 保健学専門 博士課程 修了
- 1989年 国立予防衛生研究所 エイズ研究センター リサーチレジデント
- 1990年 米国ベイラー医科大学 ハワードヒューズ医学研究所 リサーチアソシエイト
- 1994年 東京大学医学部 疾患遺伝子制御（サンド）講座 寄付講座教員
- 1996年 米国 カリフォルニア大学 ロサンゼルス校 微生物学免疫学講座 Assistant Professor
- 2003年 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 遺伝子治療部門 部門長／助教授
- 2007年 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 遺伝子治療部門 部門長／教授

[受賞歴]

- 1989年 Research Resident Fellowship from the Japanese Foundation for AIDS Prevention
- 1997年 The Frontiers of Science Faculty Research Development Awards of the UCLA School of Medicine
- 2000年 Stein-Oppenheimer Endowment Award for the Health Sciences at UCLA

[主な所属学会と活動状況]

- 米国遺伝子治療学会
- 日本遺伝子治療学会 （監事）
- 日本ウイルス学会
- 日本分子生物学会
- 日本人類遺伝学会

[研究テーマ・領域等]

- アデノウイルスを基盤とした新規ベクターの開発
- ヒト幹細胞における高効率相同組換え法の開発

ヒト多能性幹細胞における遺伝子改変技術の開発 -ウイルスベクターを用いて-

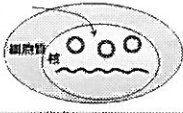
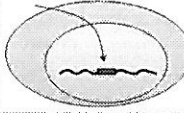
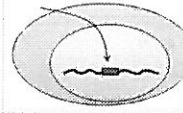
三谷 幸之介

ヒトES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞は、創薬や再生医療等への多様な応用の可能性が注目されているが、遺伝子導入や遺伝子改変が困難であることが研究上の大きなハードルの一つとなっている。私達は、これらの問題を解決し、ヒトES/iPS細胞での高効率な遺伝子操作技術を確立する目的で、種々のウイルスベクターの比較・検討を行った。

まず、ヘルパー依存型アデノウイルスベクター(HDAdV)を用いて KhES-1 subline 1における一過性遺伝子発現効率を検討したところ、98%のベクター感染細胞で遺伝子発現を確認した。さらに、ヒトES細胞KhES-3株やヒトiPS細胞株においても同様の高効率での遺伝子導入を達成した。また、GFPをコードする9種類の血清型由来のアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)について一過性遺伝子発現効率を比較し、KhES-1 subline 1では80%の感染細胞で、KhES-3では23%の細胞で遺伝子発現を確認した。ヒトiPS細胞株での効率は、その中間程度であった。さらに、レンチウイルスベクター(LV)を用いた安定な遺伝子導入を最適化する目的で、KhES-1 subline 1において、異なる受容体を利用して感染する10種類のエンベロープを比較して最適エンベロープを決定し、さらに4種類のプロモーターについて発現強度の比較を行い、それらを組み合わせることによって75%以上の感染細胞で安定に遺伝子発現を得ることに成功した。ヒトiPS細胞での効率は、90-95%に達した。これらのベクター感染細胞では、ヒトES/iPS細胞の未分化性は維持されていた。

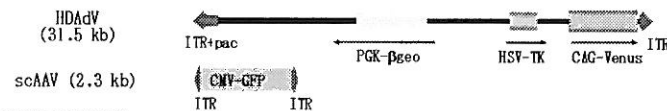
また、最適な相同組換え法を確立する目的で、ヒトES細胞株 (KhES-1 subline 1、KhES-3) の *HPRT* 遺伝子座における相同組換えによる遺伝子ノックアウトの頻度を、HDAdV、AAV、インテグラゼ欠損型LVの3種類のベクターを用いて比較した。その結果、AAVを用いた場合は非ウイルス法と同様に染色体組込みの0.5-1%が相同組換えであり、LVでは相同組換え体が得られなかった。その一方、HDAdVを用いた場合に10%以上の頻度で相同組換え体が得られた。そこで、HDAdVを利用した相同組換え法の汎用性を確認するために、分化細胞特異的に発現する2つの遺伝子座への蛍光遺伝子のノックインと、4つのハウスキーピング遺伝子座のノックアウトを試みた。その結果、いずれの場合も染色体組込みの10-50%が、ネガティブ選択法を組み合わせると薬剤耐性コロニーの30-80%が相同組換え体であった。一方、ヒトES/iPS細胞で強く発現している *NANOG* 遺伝子座でAAVを用いた遺伝子ノックインを試みたところ、プロモータートラップを利用することによって20-40%の効率で相同組換え体を得られた。このように、目的に応じて最適なウイルスベクターを用いることによって、ヒト多能性幹細胞における遺伝子ノックアウト、遺伝子ノックイン、遺伝子修復などが、高い効率で実現可能であり、本研究で開発した技術がヒトES/iPS細胞を用いた基礎・応用研究の重要な技術的基盤となりうることを示された。

遺伝子導入の種類と達成目標

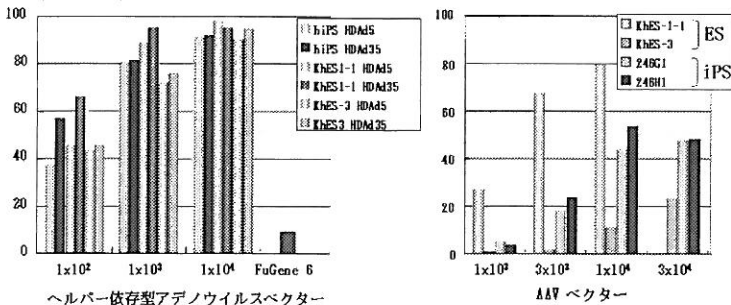
導入法	一時的	安定	相同組換え
			
遺伝子の場所	染色体外	染色体上のランダムな部位	染色体上の特定の部位
遺伝子発現	一時的	細胞分裂後も持続	組込み部位特異的
ES細胞での応用例	・分化誘導遺伝子の強発現	・疾患遺伝子の導入によるモデル細胞	・マーカー遺伝子の分化依存的発現 ・遺伝子ノックアウト
発足当時 (平成17年)	数%	$10^{-6} \sim 10^{-7}$	非常に困難、論文2報のみ
中間目標 (平成19年)	数十%	$10^{-5} \sim 10^{-6}$	カニクイザルES細胞を用いて相同組換えの実現化 ヒトES細胞での相同組換え法を確立、分化特異的可視化ヒトES細胞や疾患モデル細胞の創製
最終目標 (平成21年)	~100%	~100%	

ヒトES・iPS細胞における100%近い遺伝子発現の達成

1. ベクターの構造



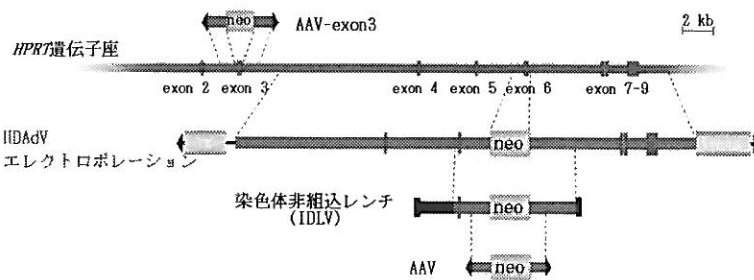
2. 遺伝子発現効率



- ・ アデノで~100%、AAVで~80%の遺伝子導入効率 (未分化性は維持されている)
- ・ ES細胞で至適化した条件は iPS細胞に適用可

ヒトES細胞においてはHDAdVによる相同組換えが最も高効率

(HPR遺伝子座のノックアウト)

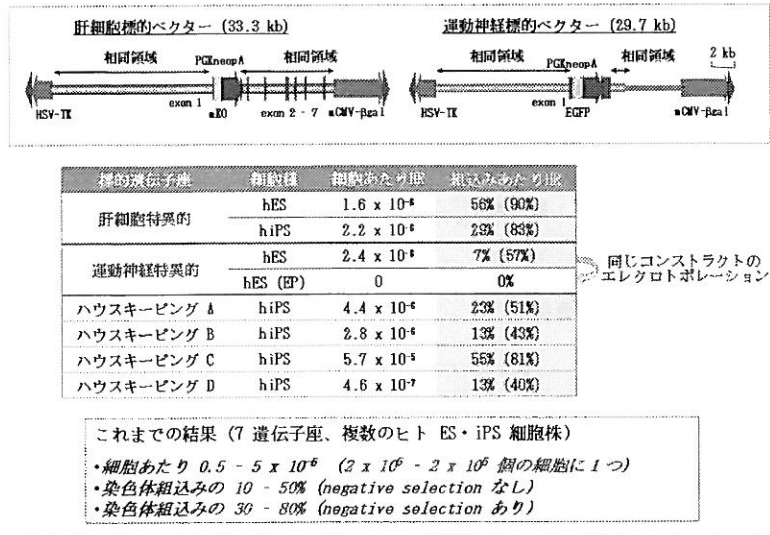


細胞株	遺伝子導入法	遺伝子導入効率	検出数	効率 (%)	組換えあたり検出数	組換えあたり効率 (%)
KhES-1 Subline (IX)	HDAdV	5.1×10^6	136	31	14	10% (45%)
	AAV-exon3	5.8×10^6	207	NA	1	0.5%
KhES-3 (XY)	エレクトロポレーション	1.1×10^6	172	98	1	0.6% (1.0%)
	HDAdV	1.9×10^6	14	6	2	14% (33%)
	IDLV	3.6×10^6	29	NA	0	0%
	AAV	3.6×10^6	353	NA	0	0%
	AAV-exon3	3.5×10^6	800	NA	8	1%

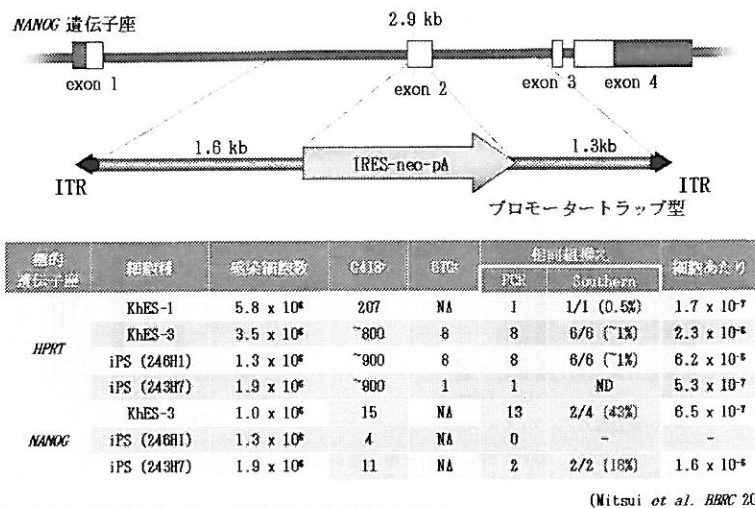
同じコンストラクトのエレクトロポレーション

[Suzuki et al. PNAS 2008, Watanai et al. EBRC 2009, 未発表]

転写されていない遺伝子座における高効率な相同組換えの達成



転写活性の高い遺伝子座では AAV を用いた相同組換えも有用



成果：ヒト ES・iPS 細胞における遺伝子導入法の確立

	ヘルパー依存型アデノ	AAV	レンチ	非ウイルス法
一過性遺伝子発現	~100%	~80%	?	30~60%
安定な遺伝子発現	0.001~0.01%	0.01~0.1%	~8% (安定)	?
相同組換え	10~50% (33~90%)	~1%	~1%	~1%
発現していない遺伝子座での相同組換え	high	low	low	low
大きなカセットの挿入	yes	no	no	yes
ベクター調製の容易さ	-	++	++	+++

ヒトES細胞から

- 分化細胞を高効率に誘導する
- 疾患モデル細胞を高効率で樹立する

ための基盤技術を確立した

ヒトiPS細胞にも適用可能であった

目標を達成

饗庭 一博

京都大学 物質-細胞統合システム拠点
NPO法人 幹細胞創薬研究所



[略歴]

- 1989年 3月 筑波大学第二学群生物学類卒業
- 1989年 4月 筑波大学大学院生物科学研究科博士課程入学
- 1994年 3月 筑波大学大学院生物科学研究科博士課程修了、博士号（理学）取得
- 1994年 4月 日本学術振興会（特別研究員（Ph.D.）（受入機関；筑波大学）
- 1996年 4月 日本科学技術振興事業団 創造科学技術推進事業(ERATO)、研究員
- 2000年11月 米国National Institutes of Health, National Institute on Aging、Courtesy Associate
- 2001年 4月 米国National Institutes of Health, National Institute on Aging、Visiting Fellow
- 2006年 5月 特定非営利活動法人 幹細胞創薬研究所、主任研究員
- 2010年 4月 国立大学法人 京都大学 物質-細胞統合システム拠点 特定拠点講師

[所属学会]

日本発生生物学学会、日本分子生物学学会、International Society for Stem Cell Research

[研究テーマ]

幹細胞生物学、神経変性疾患、疾患モデル細胞

ヒトES細胞からの神経分化誘導法の確立と神経変性疾患モデル細胞の作製

饗庭 一博

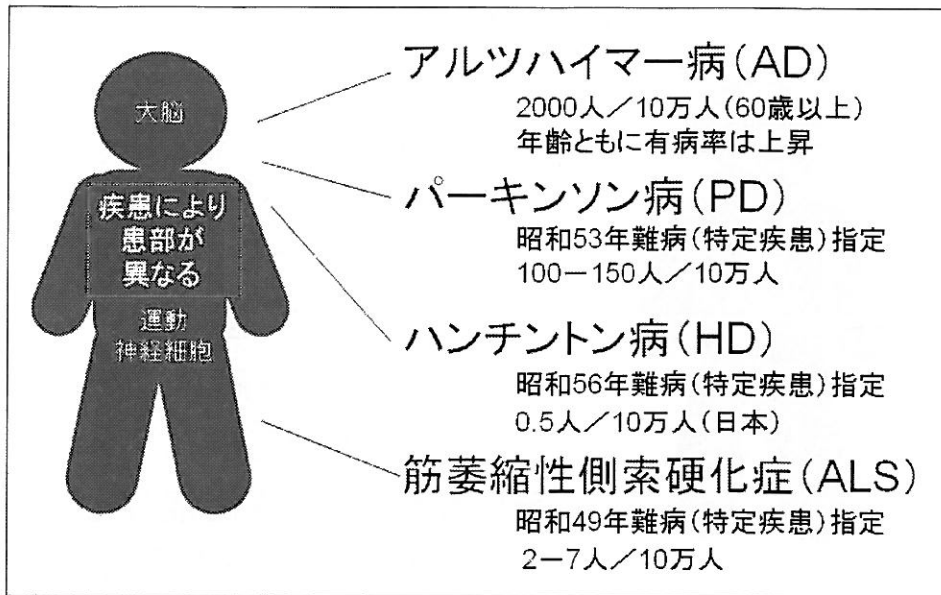
アルツハイマー病などの神経変性疾患を患った患者数は、社会の高齢化に伴い増加してきており、そのための対策が急務であると言われている。しかし、既存薬の治療効果は決して満足のいくものではなく、根本的な治療法や予防法がないのが現状である。このことは最適な疾患モデルの欠如による疾患発症機序の解明や新薬開発が遅れていることを示唆している。神経変性疾患の研究で使われる実験材料としてモデル動物や動物神経細胞、株化ヒト細胞株、ヒト初代培養神経細胞が用いられているが、動物細胞では、種間差の問題がありヒト神経細胞での反応を正確に反映できない、また株化細胞はヒト細胞であるが神経機能喪失がみられ、初代培養細胞では供給数に限界があり安定供給ができないなどの欠点がある。一方、ヒトES細胞・iPS細胞などの多能性幹細胞から分化させた機能的な神経細胞は、ヒトでの反応を模倣でき、さらに細胞供給にも問題がないため、最適な疾患モデルに成りうる。

多能性幹細胞から神経変性疾患モデル細胞を作製する場合、疾患ごとに影響の出る神経細胞の種類が異なることから、薬効性や疾患発症機序を正確に解析するためには、疾患症状が現れるタイプの神経細胞へ多能性幹細胞を分化させることが重要になる。そこで、我々はヒトES細胞から様々なタイプの神経細胞への神経分化誘導方法を確立した。ノギン（BMP拮抗因子）によってヒトES細胞から神経幹細胞まで分化させ、その後処理方法を変えることでGABA作動性神経細胞、ドーパミン作動性神経細胞、運動神経細胞、中型有棘神経細胞、そしてアストロサイトへ分化させることが出来ている。また、確立した神経分化誘導法がヒトiPS細胞にも適応可能であることも確認した。

次に、多能性幹細胞から分化させた神経細胞が、疾患モデル細胞として疾患症状を示す必要がある。正常な多能性幹細胞由来の分化細胞は健康な細胞であるため、疾患細胞となるためには疾患原因遺伝子の変異型遺伝子を発現している細胞、つまり疾患特異的多能性幹細胞株の樹立が必要である。そこで我々は、神経変性疾患の原因遺伝子として、アルツハイマー病ではプレセニン1（PS1）、筋委縮性側索硬化症（ALS）ではスーパーオキシドディスムターゼ1（SOD1）、ハンチントン病ではハンチンチンを用い、汎用方法で作製した疾患特異的ヒトES細胞株以外に、櫻井らによって開発された部位特異的遺伝子挿入方法（櫻井の要旨参照）によって、神経変性疾患原因遺伝子をヒトES細胞のHPRT遺伝子座へ導入したヒトES細胞株を作製した。遺伝子導入後のES細胞形態、多能性関連遺伝子の発現、および神経変性疾患原因遺伝子の内在性遺伝子の発現に特に変化は観察されていない。

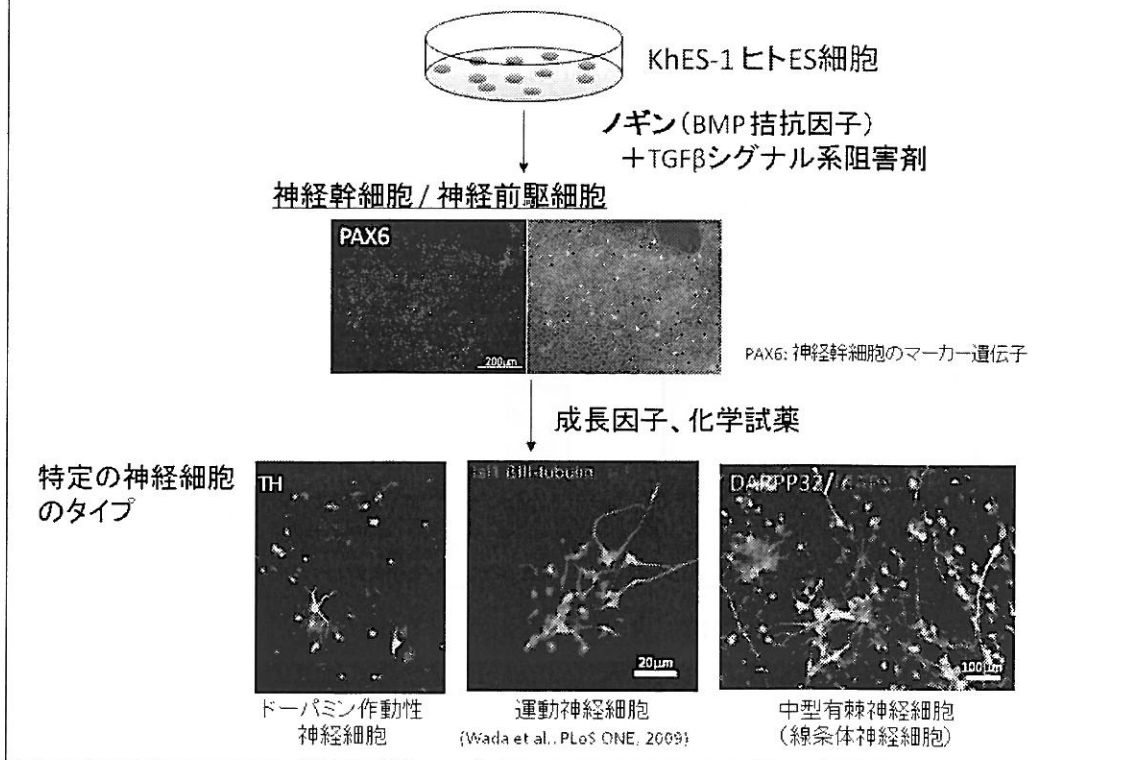
神経変性疾患特異的ヒトES細胞から神経細胞へ分化誘導を行ったところ、アルツハイマー病モデル細胞では、アルツハイマー病での疾患症状（アミロイド比率変化やシナプス活動低下）を再現することが出来ており、また、ALSモデル細胞では、変異型SOD1発現運動神経細胞の細胞死が観察出来ている。よって、我々が作製したこれら神経変性疾患モデル細胞は、疾患発症機序の研究、および新薬探索において重要なツールとなり、基礎研究や創薬研究の促進に大いに寄与すると期待している。

神経変性疾患



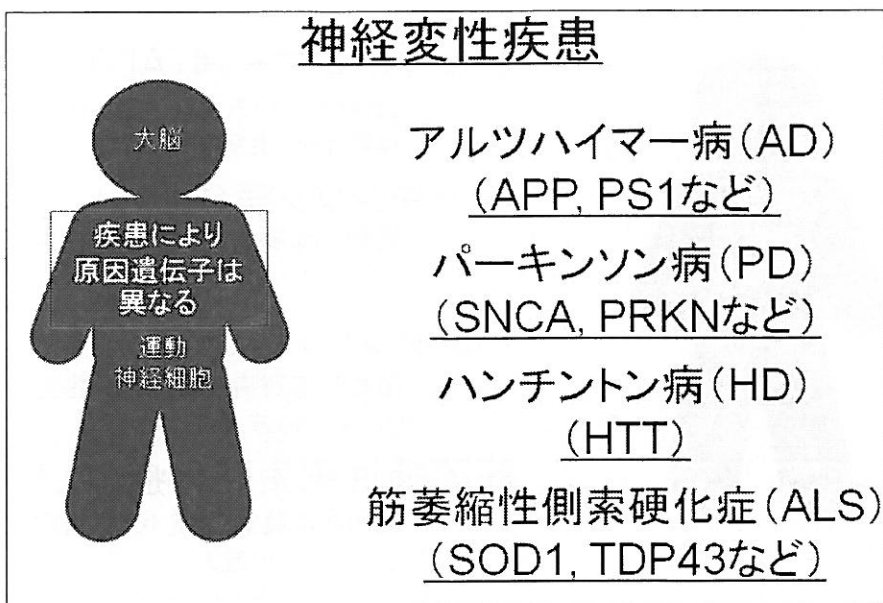
ヒトES細胞から様々な神経細胞タイプへの分化誘導系が必要

ノギン神経分化誘導法



神経変性疾患モデル細胞

神経変性疾患

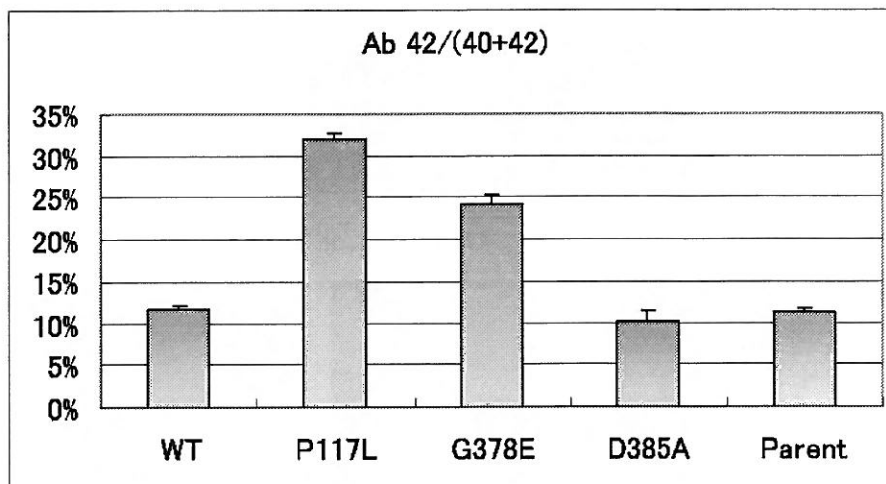


神経変性疾患の原因遺伝子の変異遺伝子を発現するヒトES細胞(疾患特異的ES細胞)が必要

PS1発現ヒトES細胞 - モデル細胞 評価 1

AD表現型: A β 42比率の上昇

• 培養上清のA β の濃度測定



尾辻 智美

NPO法人 幹細胞創薬研究所
(現在) 京都大学 再生医科学研究所

[略歴]

- 2001年4月 独立行政法人 新エネルギー産業技術総合開発機構 (NEDO)
産業技術養成技術者(NEDOフェロー)
独立行政法人 産業技術総合研究所 勤務
- 2003年4月 独立行政法人 産業技術総合研究所 第一号非常勤職員
- 2005年4月 株式会社 リプロセル 研究員
京都大学 再生医科学研究所に出向
- 2006年4月 NPO法人 幹細胞創薬研究所に出向
- 2010年4月 京都大学 再生医科学研究所 特定研究員

心筋分化誘導と心筋毒性検定への応用

尾辻 智美

創薬プロセスで特に心臓に対する安全性が求められる理由は、薬剤が心臓に対して心不全や不整脈など重篤な副作用を引き起こす場合が多いためである。従って、ヒト心筋特有のイオンチャンネルをもつ細胞の必要性は高く、均一な心筋細胞の供給が求められる。そこで、我々はヒトES細胞から心筋細胞への分化誘導技術の確立と安全性薬理試験への応用を試みた。

これまでの研究で、ヒトESC由来心筋細胞（hESC-心筋）は、初期分化誘導技術の向上により安定かつ高率に取得可能な組織細胞である。しかし、分化培養後徐々に拍動性が失われることから、その応用には、拍動性の維持、機能的な成熟化、機能細胞の純化といった課題が残されている。そこで、我々はESC-心筋の純化を容易にするため心筋特異的遺伝子 α MHCの発現制御下でEGFPを発現するヒトおよびカニクイザルの遺伝子導入ESC株を樹立した。それぞれに最適化した条件下で高いEGFP発現を示す拍動コロニーが得られ、成熟心筋特異的な遺伝子発現を確認した。GFP(+)hESC-心筋は、EGFP発現細胞間の接着性が高いことから、スフェア培養または定期的なコロニーの継代が可能であり、拍動が回復または増強された。6ヶ月継代後のhESC-心筋は、成熟心筋マーカーおよびイオンチャンネル関連遺伝子群の多くで成人心臓での発現量を上回る著しい発現増加を示した。特に薬物誘発性QT延長を評価する安全性薬理試験に適した細胞の要件であるQT延長関連主要分子のHERGおよびKCNQ1の高発現がみられ、拍動コロニーの細胞外電位記録ではHERGチャンネル阻害剤E4031など各種薬剤によるQT延長が明確に確認できた。パッチクランプ法では、単一の拍動hESC-心筋細胞で活動電位の発火、Na電流、Ca電流、K電流（HERG電流）が検出され、長期培養によるそれぞれのイオンチャンネル活性の増加が示唆された。hESC-心筋の適切な長期培養は、機能細胞の純化とその機能維持・成熟化を促すと考えられ、創薬の安全性薬理試験に適したヒト心筋モデル細胞の取得を可能とした。

本プロジェクトの成果を、早期に産業応用するために、サルES細胞の心筋分化誘導技術を株式会社リプロセルに技術導出した。株式会社リプロセルでは、本技術を基盤として心筋毒性評価試験系の開発を進めた。たとえば、創薬研究早期でも使用可能な化合物評価用の専用培地を開発したり、試験に使用する心筋の品質基準を策定したりしたことが挙げられる。このような開発プロセスおよび国内外製薬会社とのバリデーションスタディを実施、あるいは現在も継続し、実際に国内外製薬会社向けに拍動心筋細胞を販売、およびQT延長をはじめとする化合物評価試験の受託事業を行っている。

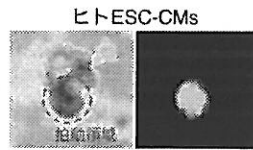
このように、ES細胞由来心筋モデル細胞は、副作用の回避や新薬探索など、創薬研究に対して利用価値が極めて高く、より安全な薬の創製に貢献できる技術を我々は確立した。

1. 心筋特異的GFP発現ES細胞株の樹立と生体心筋モデル細胞の取得法の確立

αMHC::GFP挿入株の樹立

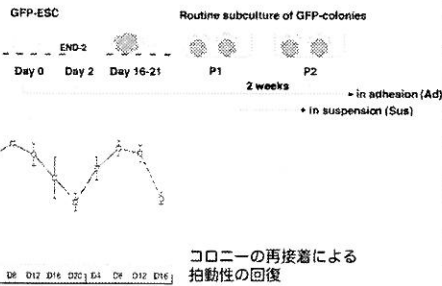
拍動を有する心筋細胞が容易に選別

- *サルESC-CMs 分化誘導技術のライセンスアウト (株)リプロセル → 事業化へ
- *ヒトESC-CMs



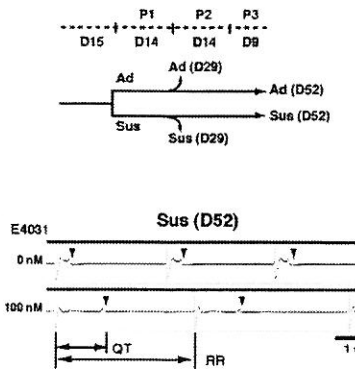
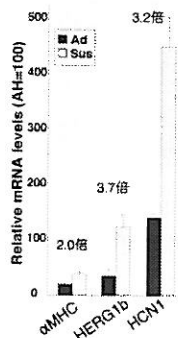
長期再接着培養法の確立

ESC-CMsは一年以上拍動性を維持



1-2. 生体心筋モデル細胞の取得法の確立

浮遊培養による機能増強



短期間での心筋特異的遺伝子の発現増加

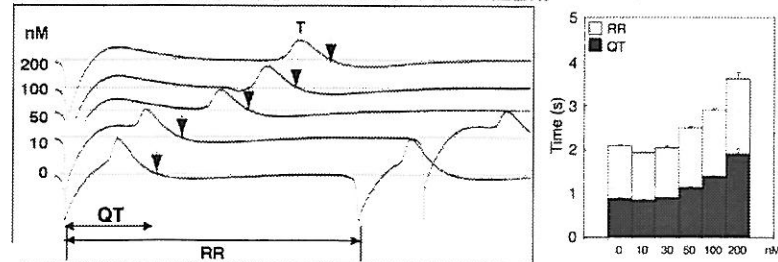
頻脈→QT延長を検出可能

2-2. hESC-CMsコロニーの細胞外電位測定と薬剤応答性

細胞外電位の波形

E4031: QT延長の主な原因分子であるERGチャネルの阻害剤

波形解析グラフ

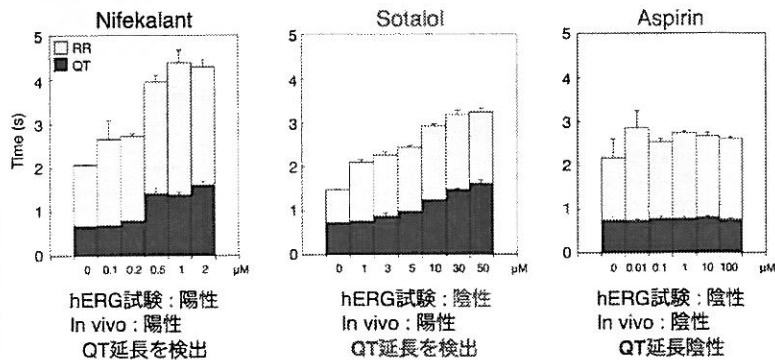


hESC-CMsコロニーの細胞外電位を取得し、チャンネル阻害剤によるQT延長を検出できた。

2-4. 成熟型hESC-CMsの薬剤応答性

<現在の安全性試験> hERG試験
 hERGチャネルを発現させた細胞株を用い、
 hERG電流に対する作用を観察可能。
 拍動細胞を用いたQT測定ではないため、
 QT延長の観察においては、in vivoと
 異なる結果となる場合がある。

従来のhERG試験よりin vivoを
 反映した結果を得ることができた

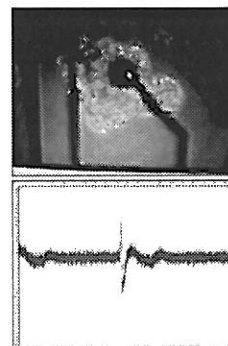


Electro Cardiomyocyte Graph (ECMG) from CLC in ReproCELL Assay Medium


Measurement medium



Key technologies
 Serum/Protein free
 No fluorescent
 Adjusted Glucose level
 Adjusted [Na⁺], [Ca²⁺], [K⁺]
 Normal osmotic pressure



To prevent absorption of test compounds to proteins and lipids,
 ReproCELL assay medium contains no protein and no lipid.

Understanding brings INNOVATION  ReproCELL

桑 昭苑

熊本大学 発生医学研究所 多能性幹細胞分野 教授



[略歴]

- 1985年 東京大学薬学部卒業
- 1987年 東京大学大学院薬学系研究科修士修了
- 1987年 帝人（株）生物医学研究所研究員
- 1989年 大阪大学大学院理学系研究科博士課程（御子柴克彦教授）
- 1993年 日本学術振興会特別研究員
- 1996年 科学技術振興事業団創造科学推進事業(ERATO)
御子柴細胞制御プロジェクト研究員
- 1999年 米国ハーバード大学客員研究員 ハワードヒューズ研究所研究員
- 2002年 熊本大学発生医学研究センター 教授
- 2009年 熊本大学発生医学研究所 教授（改組により名称変更）

[主な所属学会と活動状況]

日本発生生物学会、日本炎症・再生医学会、日本細胞生物学会、国際幹細胞学会

[研究テーマ・領域等]

膵臓と肝臓などの消化器官の発生分化・再生研究

肝細胞への分化誘導技術の開発

桑 昭苑

我々の研究室では、ES細胞から肝臓を含む内胚葉系の細胞へ分化誘導できる、支持細胞を用いた独自の共培養系を開発した（国際出願PCT/JP2005/310324）。

マウスES細胞およびヒトk h ES-1, k h ES-3細胞から内胚葉系細胞、そして肝臓前駆細胞、肝芽細胞、肝細胞への分化誘導法の技術開発を確立した(Shiraki et al., *Stem Cells*, 2008; Shiraki et al., *Genes Cells*, 2008)。

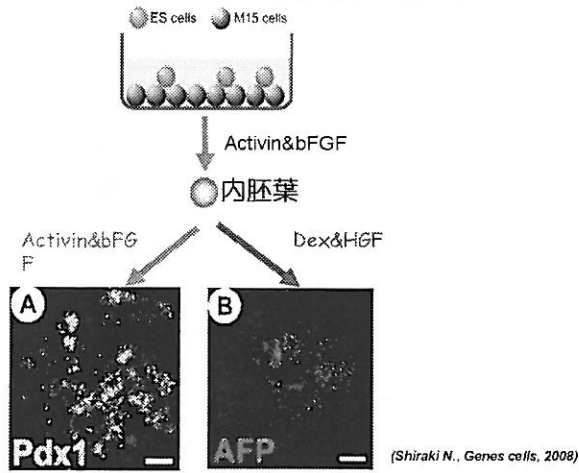
誘導されたヒト肝細胞では、代謝酵素Cyp3A4、有機アニオントランスポーター (OATP 1 B1)、グリコーゲンの蓄積 (PAS染色) などが確認され、20%を越えるアルブミン陽性細胞が安定に得られるものであった。そして、ヒト肝初代培養細胞とほぼ同程度アルブミンを分泌しており、培養下で10日程度アルブミン分泌を維持することができ、薬物によるCyp3A4の誘導活性が見られた。M15細胞を用いた分化誘導系は多数のヒト肝細胞を効率よく分化誘導でき、かつ再現性がきわめてよい点で、大量のヒト肝細胞を得るには、大変有用である。

M15細胞を用いた分化誘導系では、固定されたM15細胞でも、内胚葉および肝・膵への分化誘導活性を示すことから、分化誘導における細胞外基質の関与が考えられた。M15細胞ではラミニン10 (ラミニン511) を高いレベルで発現していることより、ラミニン10による再構築系を用いて分化誘導の検討を行った。ラミニン10安定発現株を用いた基底膜培養基質の作製技術により開発した擬似基底膜 (sBM) が有用であると考えられた (環境研との共同研究)。このsBMを用いて、マウスES細胞およびヒトES細胞の肝細胞分化について検討した。その結果、sBM上でマウスES細胞を培養し、30日目には45%程度のアルブミン陽性細胞が得られることを見出した (特願2009-136520「細胞の分化誘導」)。また、ヒトES細胞の場合も、sBM上でアルブミン陽性細胞が得られた。これらの結果により、sBM基底膜培養基質は肝細胞を分化誘導させるためのよい基質を提供するものと考察される。

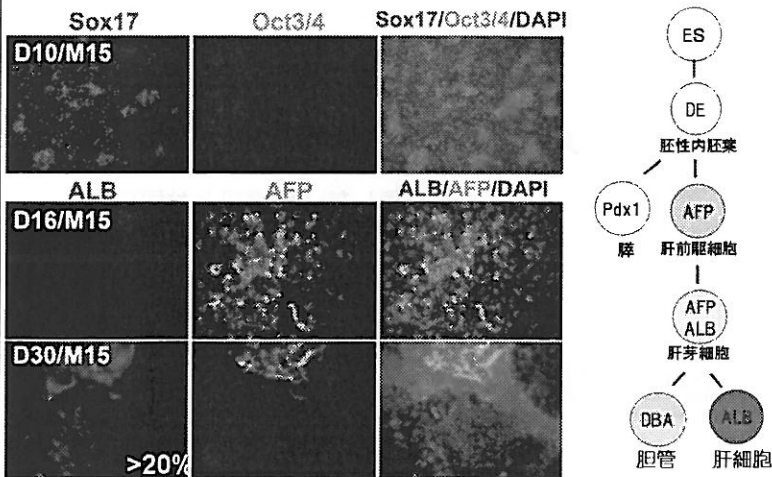
このように、ラミニン511の有用性が強く示唆されたが、さらに、分化誘導に有効な基底膜成分について、大阪大学関口先生との共同研究により、人工基底膜の評価を進めている。また、Albumin-mKO1レポーターノックインヒトES,iPS細胞株を埼玉医大との共同研究により樹立している。これを用いてヒトES分化肝細胞を純化・解析を進めている。

上記の成果により、本事業ではヒトES細胞から成熟肝細胞を分化誘導する技術開発を達成したと言える。今後はこれらの技術を足がかりに、モデル細胞としての有用性を検証し、分化誘導の分子機序を解明することで、完全な人工成分による成熟肝細胞の分化誘導を達成できると期待される。

M15細胞 肝臓分化 mES

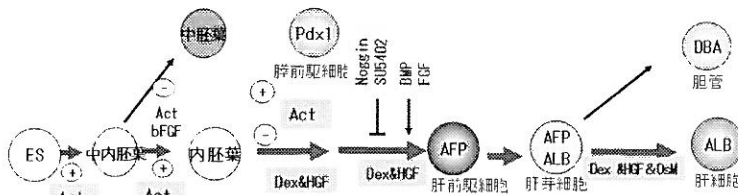


M15細胞 ヒトESからの肝臓分化



支持細胞： ヒトES細胞から肝への分化誘導

アルブミンを分泌： ヒト肝初代培養細胞と同程度
Cyp3A4の誘導活性
高効率で分化誘導

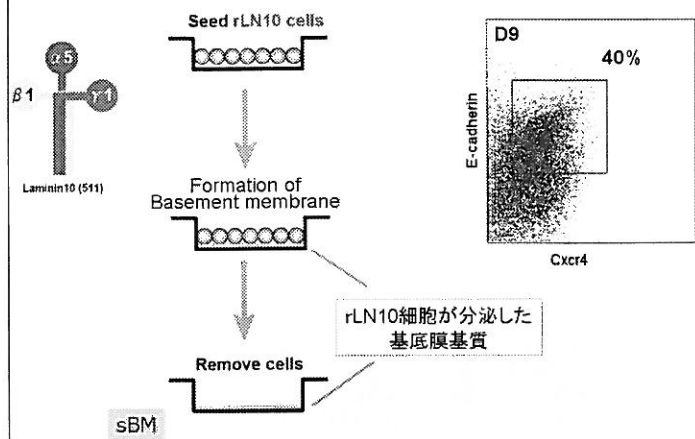


(Shiraki et al., Stem Cells, 2008)

(Shiraki et al., Genes to Cells, 2008)

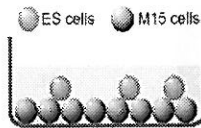
(特願2007-143225 「ES細胞から肝細胞の分化誘導方法」)

擬似基底膜 (sBM) による分化誘導方法の開発



Summary

M15



1. M15細胞を用いることでヒト肝細胞を簡便に成熟化が可能である。

大量培養が可能・簡便・高効率

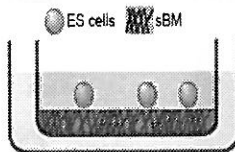
2. 擬似基底膜を用いたヒト肝臓分化誘導を構築した（環境研と共同研究）。

3. 基底膜成分の評価を進めている。

（大阪大と共同研究）

完全な人工成分による成熟肝細胞の作成を目指す。

sBM



川瀬 栄八郎

京都大学 再生医科学研究所 幹細胞医学研究センター 細胞プロセッシング研究領域

[略歴]

- 1987年 東北大学 理学部 生物学科 卒業
1990年 静岡大学理学研究科生物学 修士課程終了
1990年 明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所 勤務 (研究員)
(平成4年～6年)国立遺伝学研究所にて受託研究員
1997年 明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所退職
1997年 カリフォルニア大学サンフランシスコ(UCSF) 産婦人科学・生殖学部、生殖遺伝学研究部
ポストドクトラル フェロー
2000年 カリフォルニア大学サンフランシスコ(UCSF) 産婦人科学・生殖学部、生殖遺伝学研究部
ポストドクトラル リサーチャー
2001年 Stowers Institute for Medical Research
ポストドクトラル リサーチアソシエイト
2004年 国立大学法人京都大学 再生医科学研究所 勤務 (シニア研究員)
2005年 国立大学法人京都大学 再生医科学研究所 勤務 (特任講師)として現在に至る

NEDO「モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発」プロジェクトではサブリーダーを勤めた

[受賞歴]

1998-2000年 Lalor財団フェローシッププログラム(アメリカ)

[主な所属学会と活動状況]

日本再生医療学会

日本分子生物学会

日本発生生物学会

International Society of Stem Cell Research (ISSCR)

Genetics Society of America (GSA)

[研究テーマ領域等]

ヒトES細胞を用いた未分化維持・分化誘導に関する研究を進めている。最近ヒトES細胞を用い、Chemical Geneticsや細胞イメージングを用いた研究を行っている。

ヒトES細胞からの肝細胞分化誘導系の開発

川瀬 栄八郎

京都大学再生医科学研究所では、京都大学大学院医学研究科肝胆膵・移植外科グループとの共同研究で、マウス胎児肝臓由来のストローマ細胞との共培養系を用い、未熟な肝前駆細胞を成熟肝細胞へと分化誘導することに成功している。ES細胞から未熟な肝前駆細胞への分化誘導は活発に進められている一方で、そこから成熟肝細胞への分化は、マウスES細胞でさえもほとんど成功がなく、世界的に見ても我々の開発した系はインパクトがあった。そこで本プロジェクトではヒトES細胞から高効率で肝細胞への分化誘導・成熟を行う技術確立することを最終目的として以下の開発項目を中心として研究開発を行った。(1)肝前駆細胞を分離・生成することを可能とするべく、レポーター遺伝子を導入したヒトES細胞株の樹立とヒトES細胞から効率的な肝前駆細胞誘導技術の開発、(2)未熟な肝前駆細胞を成熟肝細胞へ誘導するための共培養に重要なストローマ細胞について、初代培養細胞から調整の容易な細胞株で代用するための技術開発、さらには(3)最終目標としてはこれらを組み合わせ、ヒトES細胞から成熟肝細胞への分化誘導技術開発の確立を目指した。

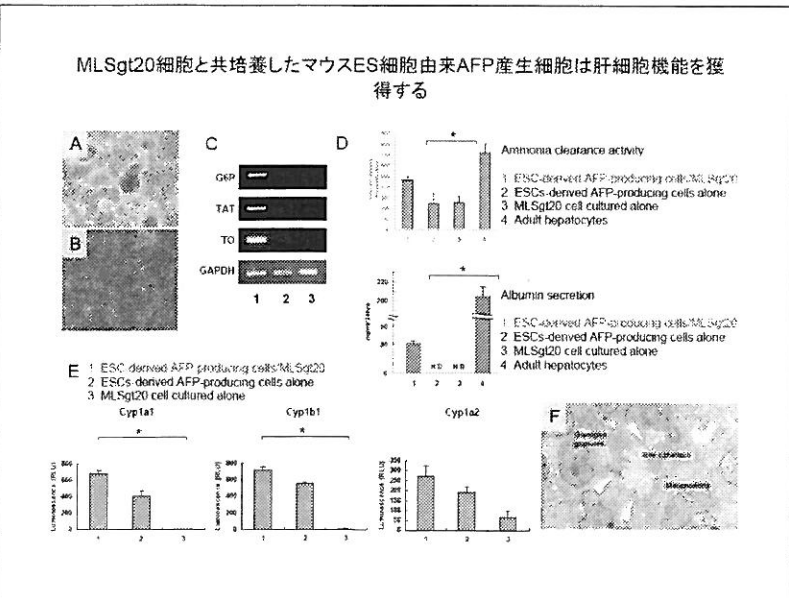
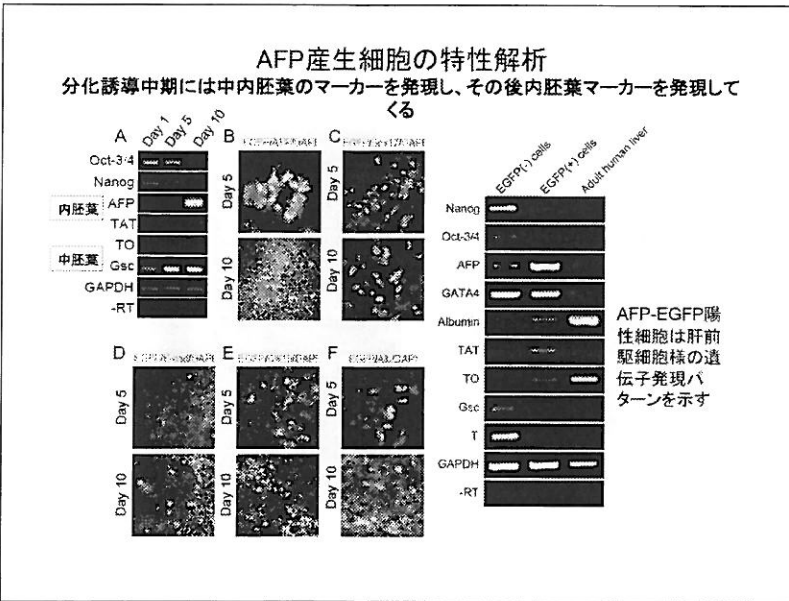
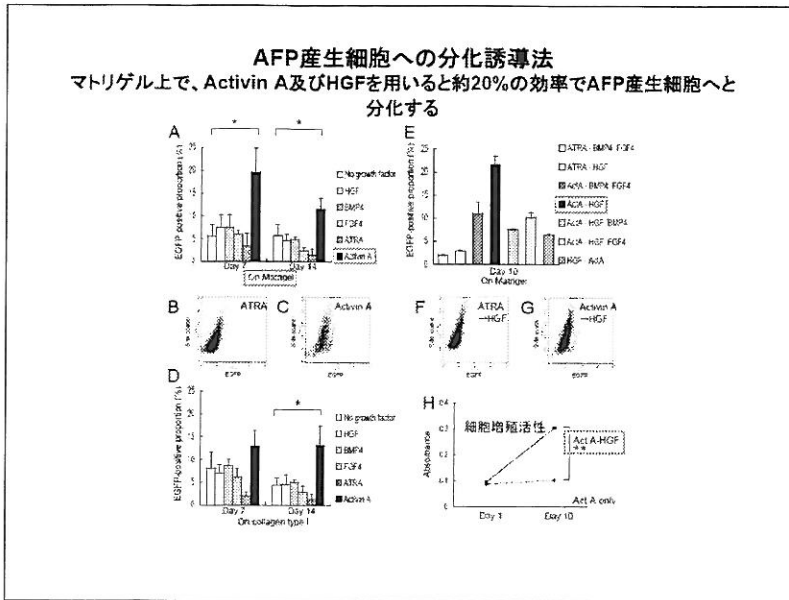
以下に具体的な成果を示す。

(1) 内胚葉特異的なマーカーとして、胎児肝細胞や肝前駆細胞、腹側前腸内胚葉などに発現するAFP (alpha-fetoprotein)に注目して、ヒトAFPのエンハンサー/プロモーターに、レポーター遺伝子としてEGFPを導入したベクターを構築し、ヒトES細胞に遺伝子導入した。さらに、このヒトES細胞株を用いて様々な細胞外基質と増殖因子との組み合わせで分化誘導効率を検討し、マトリゲル上でアクチビンAおよびHGF (hepatocyte growth factor)を加えることで、ヒトES細胞を効率よくAFP-EGF陽性肝前駆細胞に誘導出来る系を開発した。

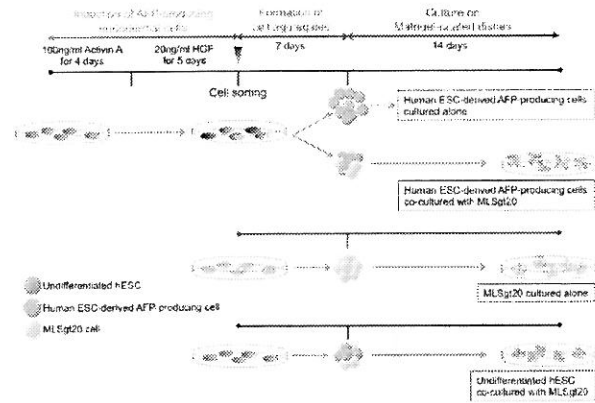
(2) 我々の開発した共培養による未熟な肝前駆細胞から成熟肝細胞への分化誘導系では、共培養に必要なストローマ細胞が初代培養細胞であり、大量調整が困難であるという問題点があった。そこで、この効果のある初代培養細胞すなわちマウス胎児 (E13.5)の肝臓から、フローサイトメトリーでThy1+gp38+細胞分画をソート・アウトし、不死化遺伝子を導入し、マウスES細胞由来AFP産生細胞を、実際に共培養し、効率よく肝細胞成熟化能を有する細胞株(MLSgt20)を見出すことに成功した。

(3) (1)、(2)を組み合わせヒト、ES細胞由来のAFP産生細胞を分離した後に、MLSgt20細胞株と混合し浮遊培養することにより共培養を行った。共培養で得られた細胞は2核を有するアルブミン陽性の細胞であり、RT-PCRでも成熟肝細胞マーカーの発現を確認できた。さらには肝細胞機能であるアンモニア除去能やグリコーゲン産生・蓄積能を有していた。また、高いチトクロームP450酵素活性を持ち、さらにはデキサメサゾンによるチトクロームP450酵素が上昇誘導されたことから、より生理的な肝細胞機能を有していることが示唆された。このチトクロームP450酵素活性はヒト肝臓由来細胞株であるHuh7よりも高いことも示された。一方、未分化ヒトES細胞を直接MLSgt20細胞と共培養しても肝細胞成熟化を示さなかった。以上により、MLSgt20細胞を用いた共培養法により、ヒトES細胞由来肝前駆細胞から機能性肝細胞へと成熟させることに成功した。

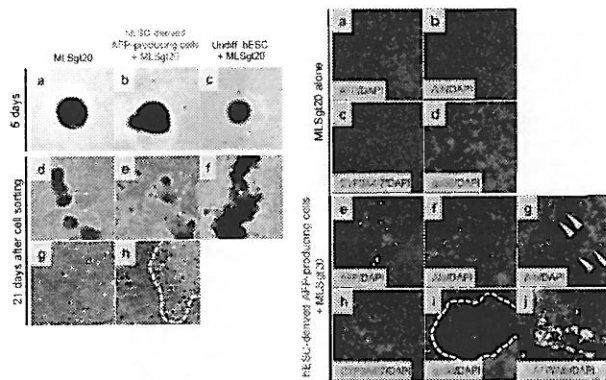
また、最後に幹細胞創薬研究所では熊本大学と京都大学で開発された技術を使い、ヒトES細胞からより成熟した肝細胞への分化誘導に成功したので、そのことについても発表する予定である。



MLSgt20細胞を利用したヒトES細胞の肝細胞成熟化 培養プロトコル概要



MLSgt20細胞と共培養したヒトES細胞由来AFP産生細胞は肝細胞へ分化する



結論

- ・ マトリゲル上で、アクチビンAとHGFとを添加することにより、約20%の誘導効率でヒトES細胞からAFP産生細胞へと分化させることに成功した。
- ・ マウスES細胞のみならずヒトES細胞をも肝細胞成熟化をもたらすマウス胎仔肝由来間葉系細胞株MLSgt20を樹立した。
- ・ MLSgt20細胞との共培養により、*in vitro*においてヒトES細胞由来AFP産生細胞から機能性肝細胞へと成熟化させることができた。特にチトクロームP450酵素はデキサメサゾンで誘導されたことから、生理的応答性を持つことが示された。

浅井 康行

株式会社リプロセル 取締役CTO



[略歴]

- 1993年 京都薬科大学大学院薬学研究科修了
1993年 田辺製薬株式会社入社：創薬研究に従事
1999年 薬学博士学位取得（京都薬科大学）
2000-2002年 バンダービルド大学医学部糖尿病センター（現Center for Stem Cell）勤務
2002年 田辺製薬に復帰：創薬研究に従事
2006年 株式会社リプロセルに入社：ES/iPS細胞および初代培養細胞を用いた創薬アッセイ系の構築に従事
2007年 株式会社リプロセル 取締役CTO 現在に至る

[受賞暦]

1. Society for Biomolecular Science 15th Annual Conference (France) April 2009: Best Poster 2009,
2. Stem Cells and Regenerative Medicine Europe(UK) Sep, 2009 「QTempo: An Assay to Identify Cardiotoxicity Using Stem Cell Derived Beating Cardiomyocytes, Best Poster.

[所属学会]

Society for Biomolecular Sciences, 日本再生医療学会

[研究テーマ]

多能性幹細胞を用いた創薬試験系構築、ハイコンテンツアナリシス、ハイスループットスクリーニング技術

多能性幹細胞を用いた低分子化合物 ハイコンテンツスクリーニング系の構築

浅井 康行

細胞機能性試験のパラダイムシフトの真っ只中に我々はいる。

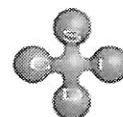
化合物の生物学的評価研究においてcell-based assayと呼ばれる細胞機能性試験は、簡便・迅速なアッセイ方法として頻用されている。この細胞機能性試験の試験材料や検出方法・条件について、近年、急激な変化がある。これまでは、いわゆる“がん化”した細胞株に創薬ターゲット遺伝子を導入し、それをモデル細胞としてハイスループットスクリーニング（HTS）や引き続く試験の材料として使用してきたが、現在は、多能性幹細胞や多能性幹細胞から分化した機能細胞を細胞機能性試験で使用することが盛んに議論され実用の端緒にある。さらに、細胞機能性試験において細胞のなんらかの変化を、例えば蛍光強度の変化というひとつの尺度で観察するシングルコンテンツハイスループットアッセイ（いわゆるHTS）から、蛍光強度とその位置といった二つ以上の尺度で評価するハイスループットハイコンテンツアナリシス(HCA)も発展してきた。二つの技術が融合して、native細胞（幹細胞から分化した機能細胞をこう呼ぶこともある）の性質を使い切る試験系が開発されてきているのである。

化合物の生物学的試験系では、使用細胞をより生理的な材料に進化させていくこと、その細胞を適切に観察できる検出系、そして細胞と検出系を適切に接続する“アッセイ条件”の全てが組み合わって初めて実用的な系となる。また、化合物の生物学的評価の実用—創薬試験系が代表格であるが—において、最終的な成果物であるクスリはヒトに対して投与されるものであるので、ヒト胚性幹（ES）細胞やヒト人工多能性幹（iPS）細胞が創薬ツールとして注目されているというのは当然といえば当然である。よく理解されているように、これらの多能性幹細胞（ES細胞株やiPS細胞株）は、理論的に生体を構成するあらゆる細胞に分化すると考えられているため、創薬研究に必要な化合物のターゲットとなる細胞が得られると期待されている。それだけではなく、ES細胞株は無限に増殖すること、iPS細胞株もES細胞株と同様に無限増殖をされると考えられているため、大規模研究が要求する膨大な細胞量に対しても不安がない。このような理由から創薬研究における幹細胞の応用のための研究は急速に進められている。

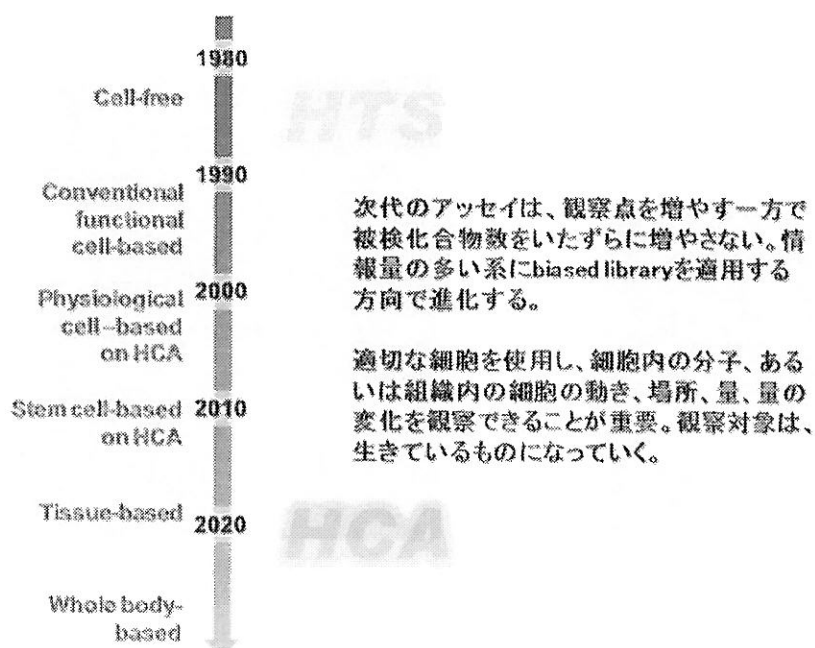
本発表において、われわれが取り組んできた幹細胞を用いたハイコンテンツスクリーニングの技術的側面や実際のライブラリスクリーニングについて議論したい。

多能性幹細胞を用いた低分子化合物 ハイコンテンツスクリーニング系の構築

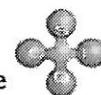
Stem Cell and Drug Discovery Institute



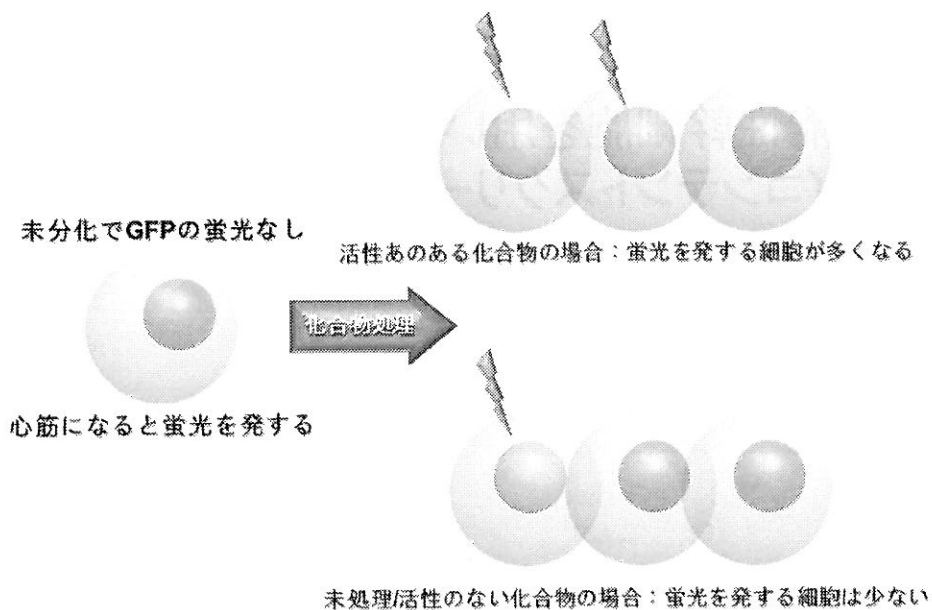
化合物の生物学的活性評価法の変遷



Stem Cell and Drug Discovery Institute



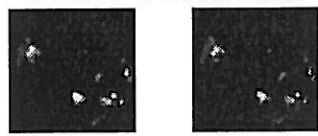
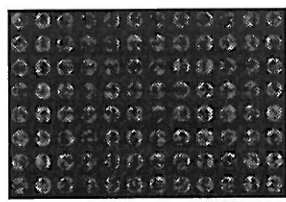
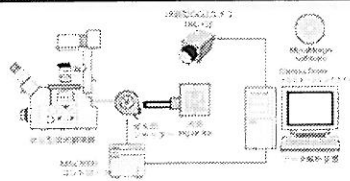
心筋分化誘導物質の探索



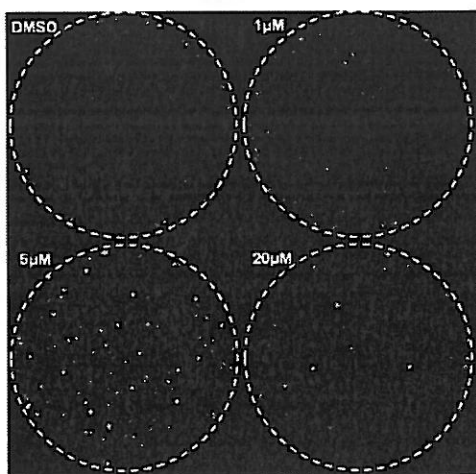
Stem Cell and Drug Discovery Institute



ハイコンテンツアナリシス(HCA)の実施



- ・各GFP+領域(コロニー)の面積
- ・GFP+コロニーの平均蛍光量
- ・GFP+コロニーの総数
- ・GFPの総蛍光量
- など複数のパラメータを解析(HCA)



ヒット化合物の濃度依存性試験等による再現性の確認(2,3次スクリーニング)

Stem Cell and Drug Discovery Institute



2. 分科会における説明資料

次ページより、プロジェクト推進・実施者が、分科会においてプロジェクトを説明する際に使用した資料を示す。

公開

複製禁止

健康安心プログラム
「モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発／
研究用モデル細胞の創製技術開発」プロジェクト
(研究実施期間:平成17年～平成21年度(5年間))

第1回事後評価分科会説明資料

議題4. プロジェクトの概要説明(公開)
4. 1「事業の位置付け・必要性」及び「研究開発マネジメント」

平成22年6月8日(火)

「研究用モデル細胞PJ」
第1回事後評価分科会説明資料
資料5-2-1(公開)

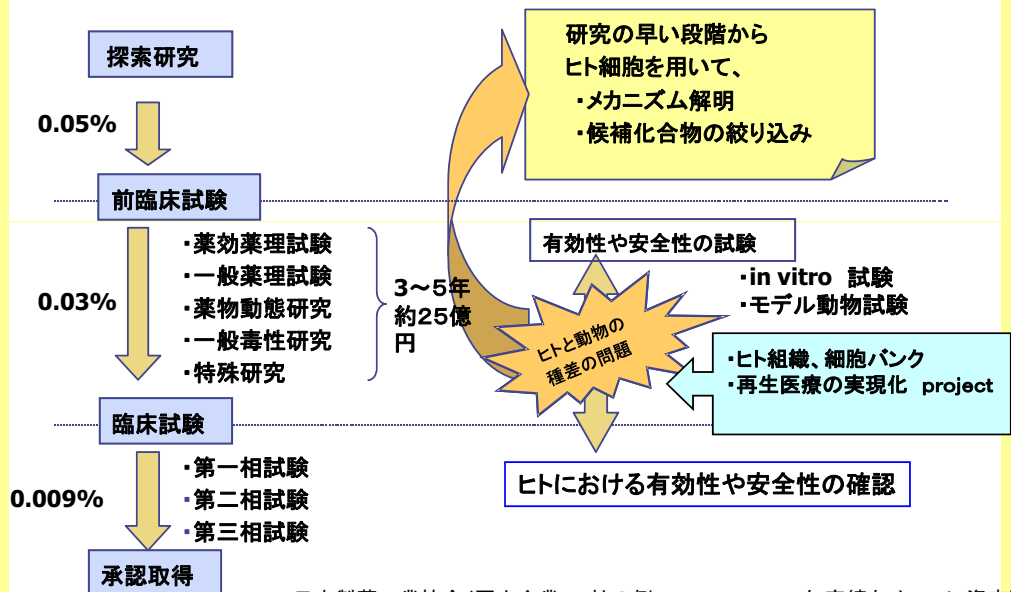
健康安心プログラム
「モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発／
研究用モデル細胞の創製技術開発」
プロジェクト

I. 事業の位置づけと必要性について

1. 事業の背景と必要性について
2. 事業の概要と目的について
3. NEDO事業の妥当性について

事業の背景

医薬品の効率的な創製と安全性を高めるために(1)



日本製薬工業協会 (国内企業18社の例: 1995~1999年実績をベースに資産)

(NEDO発表資料から抜粋して作成)

健康安心イノベーションプログラム基本計画

今後、世界に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題である。具体的には、個の医療を通じて健康寿命の延伸、QOL (Quality of Life: 生活の質) の向上を図ることが求められている。

この目的を達成するため、**創薬に資する基盤技術の開発**、再生医療の確立、医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の提供を実現するほか、**関連産業の競争力強化・ベンチャー企業の創出**を図る。

事業の政策的位置付け(健康安心プログラム)

ライフサイエンス分野の重視

健康寿命の延伸、QOLの向上、産業競争力強化

複数の手段を適切に組み合わせることが重要

モデル細胞・臓器による評価・in silicoでの予測により
動物実験の一部を簡略化、臨床段階での
効果的な薬剤候補の絞り込みが可能と成る。

再生医療

診断・治療機器

創薬・診断

ポストゲノム研究による基盤的知見・技術の充実

(経済産業省2007年技術戦略マップライフサイエンス分野より抜粋して作成)

事業原簿 添付資料 イノベーションプログラム基本計画

事業のNEDOにおける位置付け

NEDOにおける健康バイオ研究開発(NEDO発表資料を抜粋)

創薬プロセス: 創薬・診断シーズ探索 → 創薬ターゲットの絞り込み → 創薬候補となる化合物等の探索 → 民間等による臨床開発

<我が国の優位性の育成・強化>

- ・完全長cDNAリソース
- ・タンパク質機能解析技術

○機能性RNAプロジェクト(H17～)
未開拓領域への先行投資による我が国の優位性の確保

○糖鎖機能活用技術開発(H18～)
我が国が優位にある糖鎖遺伝子、解析技術を活用した優位性の強化

<創薬プロセス等への支援>

ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発(重点分野)

○研究用モデル細胞の創製技術開発

- 細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発(H17～)
- 化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発(H18～)

○新機能抗体創製技術開発(H18～)

個別化医療実現のための技術融合バイオ診断技術開発(重点分野)

- バイオ診断ツール実用化開発(H18～)
- 染色体解析技術開発(H18～)

基礎から臨床への橋渡し技術開発

画期的な薬剤候補化合物等を短期間で数多く創出

個別化医療等による健康安心社会の実現

遺伝子等を対象にした診断ツールの実用化(薬の適性な選択等)

健康安心プログラム

プロジェクト発足当初の事業の位置付け

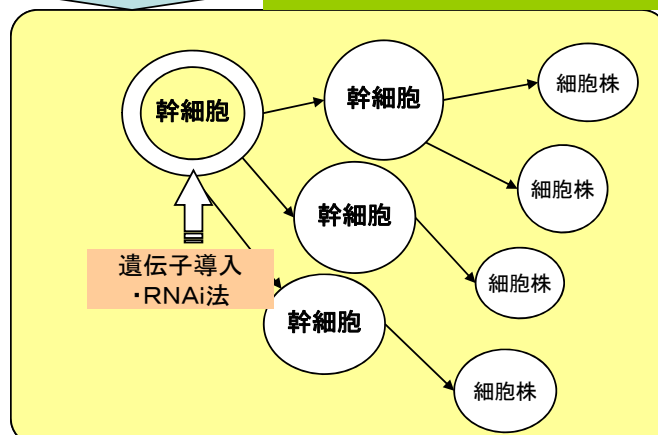
- ・研究開発の目的「モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発／研究用モデル細胞の創製技術開発」は、「健康安心プログラム」において「ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発」として位置づけられている。
- ・医薬品開発における安全性や薬理評価の確実性の向上等、創薬に向けた研究開発を加速するためには、ヒト生体内における様々な反応や遺伝子の機能をより高い精度で解析するツールの開発が重要である。
- ・人体の組織や疾病等の様々なヒトモデル細胞株を創製するための基盤となる技術開発を行う。

事業原簿 16～18

事業目的の妥当性

均質な遺伝的背景を有し、無限に増殖できるとともに、あらゆる細胞組織に分化できる多能性を有するヒトES細胞(ヒト胚性幹細胞)を、遺伝子の相同組換え、RNA干渉による遺伝子サイレンシング技術等を用いて加工し、様々な分化誘導因子を用いて分化誘導を制御する基盤技術を確立するとともに、当該技術を用いて遺伝子機能や細胞内ネットワークの解明、薬剤候補の安全性の向上といった創薬の基盤研究に資する研究用モデル細胞の創製を行う。

様々な組織・疾患を模した実験用モデル細胞株の創製



(NEDO発表資料から抜粋して作成)

事業原簿 16～18

ES細胞研究に関する社会状況

年代	海外の状況	国内の状況
1981年	マウスES細胞作出	
1995年	ウイスコンシン大学(米国)トムソン : アカゲザル由来ES細胞株樹立	
1998年	ウイスコンシン大学ヒトES細胞作出(米国ジェロン社が資金供与)	ヒト胚性幹細胞(ヒトES細胞)の作成過程においてヒト胚を使用することに伴い生じる生命倫理上の問題を検討するヒト胚研究小委員会が科学技術会議生命倫理委員会の下に設置。
2001年		「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」が告示され、運用を開始。
2003年		ナショナル・バイオリソースプロジェクト(文科省) : 京都大学再生医科学研究所がヒトES細胞作成分配拠点 京都大学再生医科学研究所ヒトES細胞株の樹立
2005年		京都大学からヒトES細胞株(KhES-1, KhES-2, KhES-3)提供開始(2007年までに使用研究30件以上に分配の実績) NEDO「モデル細胞創製」PJスタート
2006年～	欧米での再生医療用細胞資源等として研究が本格化	国内でも研究進展(例: 京大再生研で人工万能細胞iPSを世界に先駆け開発成功、理研CDBがヒトES細胞の継代効率を高める因子同定)

プロジェクト発足当初におけるヒトES細胞への期待(1)

ES細胞株の特性

- (1) 長期間の細胞増殖を、正常な性質を保持したまま**無制限**に維持できる細胞株である
- (2) 組織・臓器を構成するほぼ全ての種類の細胞に**分化**できる多能性をもっている

ヒトES細胞株の重要性

- (1) **細胞治療**に用いるために必要な機能をもつ細胞の供給
- (2) 組織工学による人工組織・臓器作製のための多種類**細胞材料**の供給
- (3) 基礎研究や**創薬研究**に必要なヒト細胞の供給

(NEDO発表資料から抜粋して作成)

プロジェクト発足当初におけるヒトES細胞への期待(2)

ヒトES細胞



治療・研究用細胞の供給源

- 再生医療への応用
 - ・細胞治療
 - ・組織工学による人工組織・臓器
- 創薬研究における利用→ヒトES細胞→日本人由来ES細胞
(2007年経済産業省技術ロードマップ)
- 海外の状況
 - ・英国、米国(カルフォルニア州、ウイスコンシン州、マサチューセッツ州など)、スウェーデン、イスラエル、シンガポールなど研究に積極的
 - ・米国(ジェロン社)、スウェーデン(CTS社)等ベンチャー企業の活躍
 - ・2007年度中には、米国で再生医療分野でのES細胞応用が本格化するものと予想
- 世界的なヒトES細胞研究の進展
ヒトES細胞に関する研究論文数
2002年 10 2004年 80 2005年 100以上
2006年～ さらに急速に増加

プロジェクト発足当初の事業の目標

○目的

ヒトES細胞を対象に、遺伝子の相同組換え、RNA干渉による遺伝子サイレンシング技術等を用いてヒトES細胞を加工し、さらに様々な分化誘導因子を用いて分化誘導を制御する技術を確立する。

これら技術を用いて有用な研究用モデル細胞を創製する。

○目標

・中間目標

ヒトES細胞の加工技術及び分化誘導制御技術の開発に目処をつける。

・最終目標

ヒトES細胞から、神経系細胞、心筋細胞、肝細胞への分化誘導技術を開発し、さらに分化した細胞を加工し疾患モデル細胞などの、遺伝子機能の解明や新薬の安全性評価、創薬研究の効率化のための技術基盤として有用な研究用モデル細胞を創製し、創薬基盤研究における薬効評価系、安全性薬理試験系を確立する。

○研究開発期間

2005年度～2009年度

健康安心プログラム

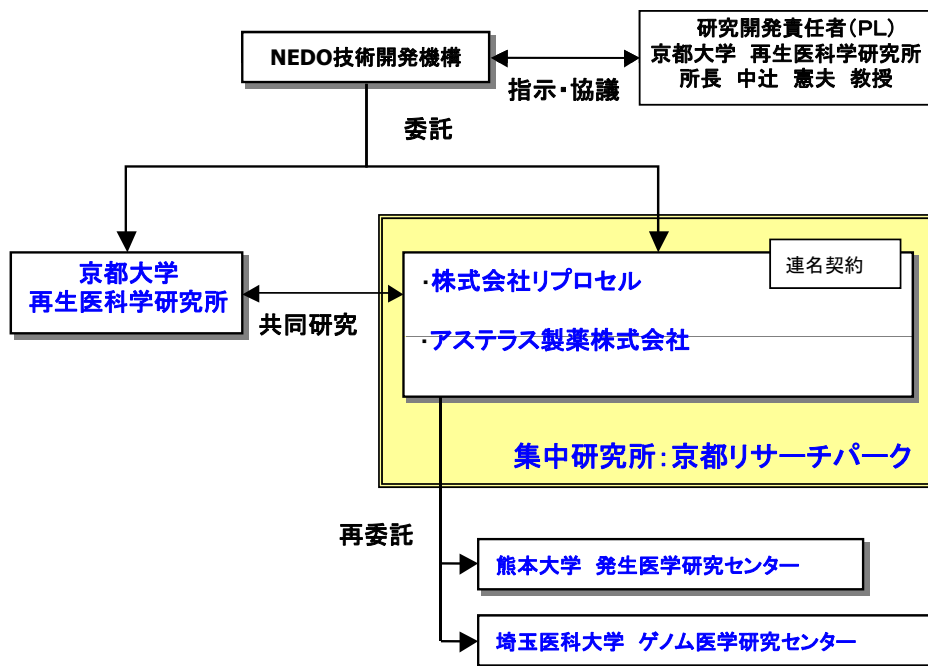
「モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発／ 研究用モデル細胞の創製技術開発」 プロジェクト

I. 事業の位置づけと必要性について

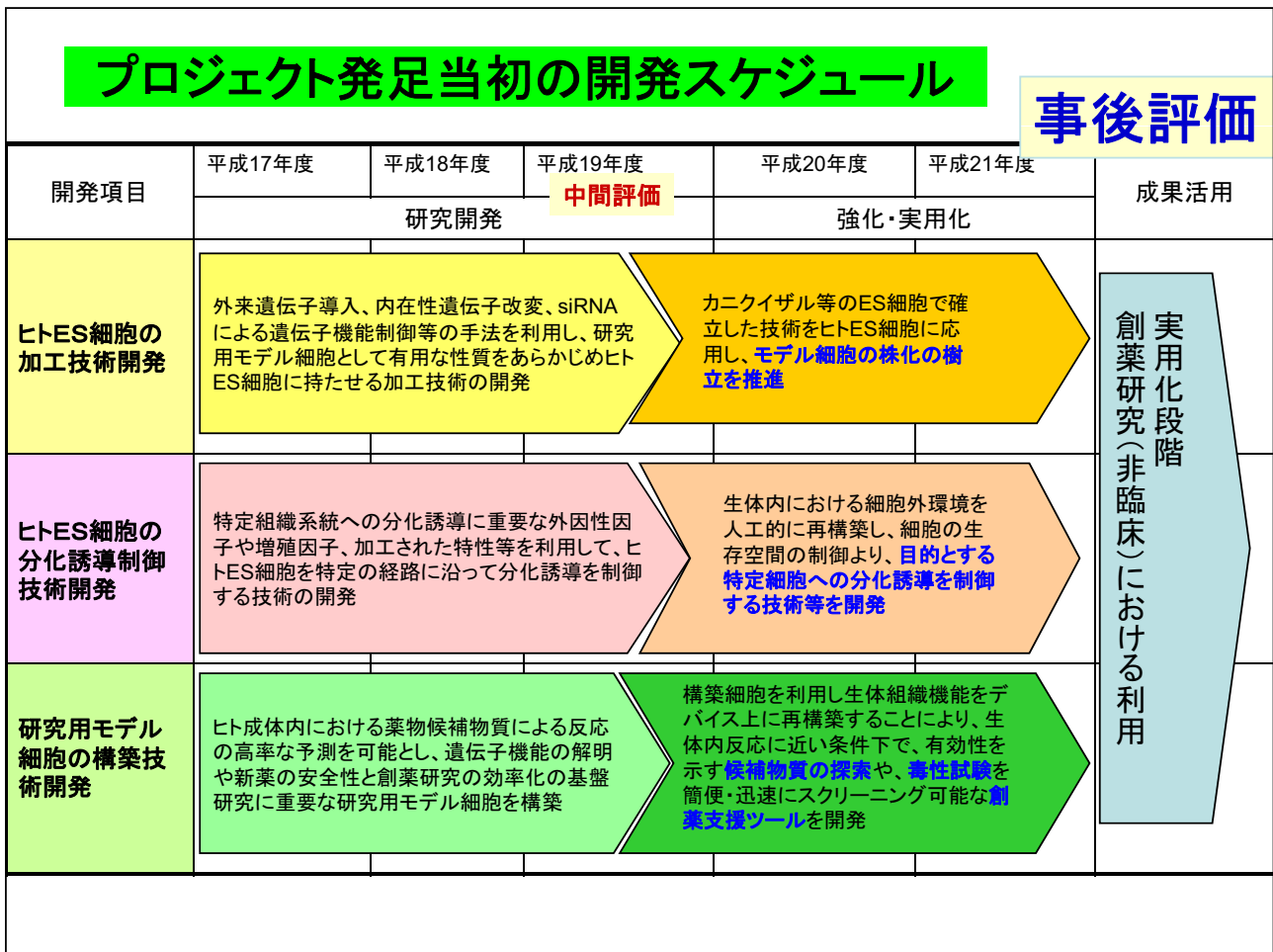
II. 研究開発マネジメントについて

1. 実施体制について
2. 研究開発計画と研究開発予算について

プロジェクト発足時の実施体制(1)



研究開発テーマ・実施機関 研究開発テーマ	研究実施分担機関								
	京 都 大	創 業 研	埼 玉 医 大	熊 本 大	大 阪 大	皮 革 研	東 京 大	環 境 研	医 科 歯 科 大
1. ヒトES細胞の加工技術開発									
①遺伝子導入と発現制御技術の開発	●	●	●						
②相同組換え技術の開発	●	●	●						
③RNA干渉法による遺伝子発現制御技術の開発	●								
2. ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発									
①神経系細胞への分化誘導制御技術の開発		●							
②心筋細胞への分化誘導制御技術の開発	●	●							●
③肝細胞への分化誘導制御技術の開発	●	●		●					
④人工基底膜による分化誘導制御技術の開発					●	●			
⑤擬似基底膜を利用した分化誘導制御技術の開発								●	
⑥人工基底膜、擬似マトリックスの評価	●				●	●		●	
3. 研究用モデル細胞の構築技術の開発									
①神経変性疾患モデル細胞の創製		●							
②血液脳関門(BBB)モデルの創製		●							
③ES細胞由来肝細胞を用いた創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確率							●		
④オンチップ・ヒト組織・臓器モデルを用いた毒性・創薬支援技術の研究開発									●



中間評価結果への対応

総合評価

- ① ヒトES細胞を使ったモデル細胞の創出は、生命倫理の観点から解決すべき課題も大きいですが、世界的に見ても今後の大きなテーマであり、ES細胞への遺伝子導入方法の検討や細胞株の作製に関して得られた成果は、創薬研究のみならず、再生医療などへの波及効果も期待できるので、意義は高い。
- ② 個々の課題がやや分散している印象があるものの、プロジェクトリーダーのもと、我が国のヒトES細胞研究の代表的な研究者で構成され、各テーマの連携体制はよく構築されている。



- ① 本研究のES細胞の分化誘導を中心とする技術はiPS細胞に対しても適用可能な技術と考えられるため、本研究の成果は、iPS細胞の実用化促進、および我が国の優位性確立にも貢献するものであり、実施意義はさらに大きいものになったと考える。そのため、iPS細胞に関する技術進歩を踏まえつつ、実用化のロードマップを見直しなどを行いプロジェクトの後半を効率よく進めた。
- ② 創薬産業利用に資する実用化を目指して、ニーズに基づいた優先課題を再確認し、モデル細胞の評価基準を明確化するとともに、情報交換・意思統一の強化を行った。なお、肝細胞研究については関係者でチームを作り毎月ミーティングを行うなど、統一的に評価できる体制を整え推進した。

開発予算（実績）

開発 予算 実績	会計・勘定（単位:百万円）	H17fy	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	総額
	一般会計	287	321	686	519	487	2,300
	特別会計	—	—	—	—	—	—
	総予算額	287	321	686	519	487	2,300

研究予算配分（合計）

京都大学再生医科学研究所	224百万円
幹細胞創薬研究所	1,441百万円
埼玉医科大学	
熊本大学	
大阪大学蛋白質研究所	296百万円
日本皮革研究所	20百万円
東京大学	92百万円
国立環境研究所	91百万円
東京医科歯科大学	136百万円
予算総額	2,300百万円

公開

複製禁止

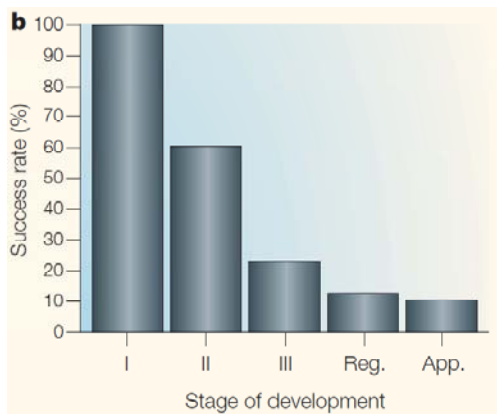
「研究用モデル細胞の創製技術開発プロジェクト」 第1回 事後評価分科会説明資料

議題4.2 プロジェクトの概要説明（公開） 「研究開発成果」及び「実用化の見通し」

平成22年6月8日（火）

臨床試験中での新薬候補のドロップアウト

臨床試験フェーズI以降の成功率



Kola and Landis, Nature Review Drug Discovery 2004

臨床試験後期でのドロップアウト

↓
膨大な開発費の損失
薬価の上昇

ドロップアウト理由

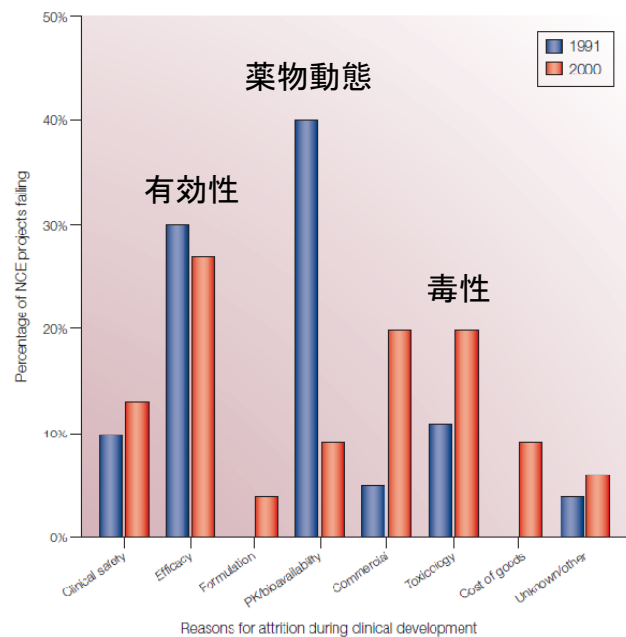
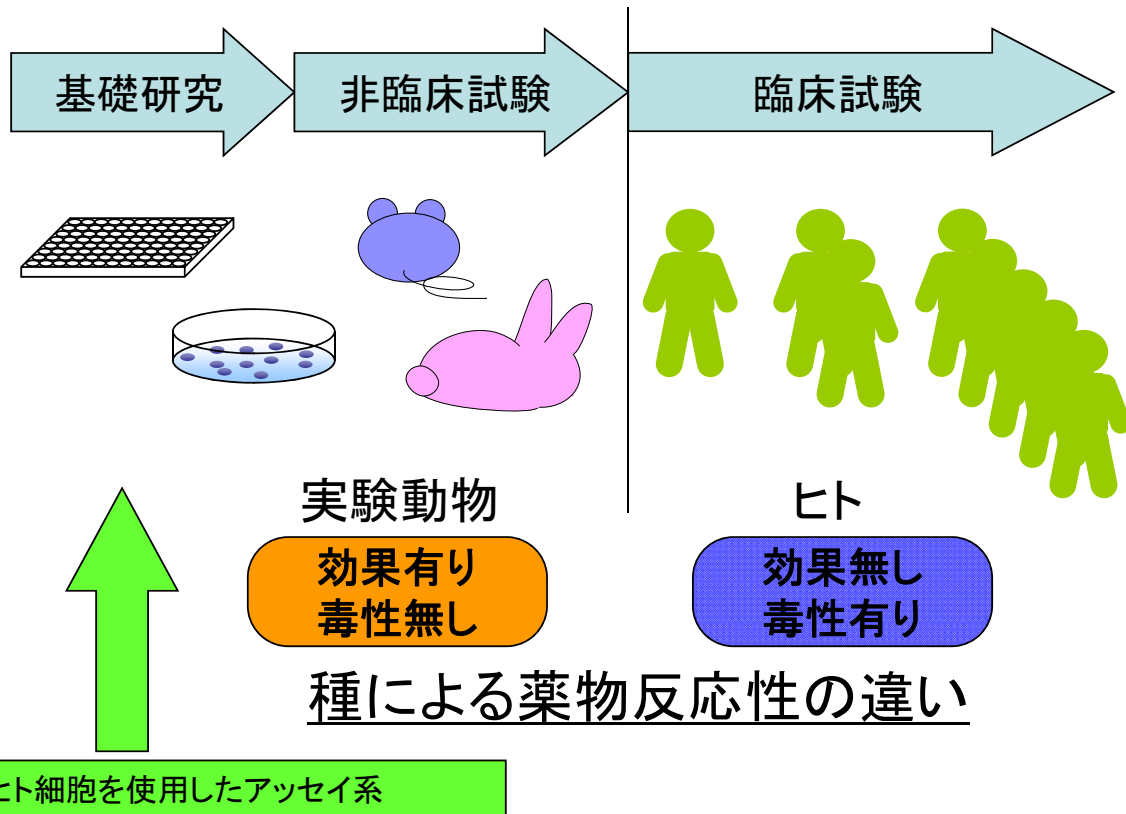


Figure 1 | **Reasons for attrition.** A survey of pharmaceutical companies comparing reasons for attrition between 1991 and 2000, expressed as a percentage of all drug projects stopped during clinical development, reveals a large reduction in losses to pharmacokinetic (PK) failures. NCE, new chemical entity.

Frank and Hargreaves, Nature Review Drug Discovery 2003

臨床試験中での新薬候補のドロップアウト



多能性幹細胞株の特性

- (1) 長期間の細胞増殖を、正常な性質を保持したまま無制限に維持できる細胞株である
- (2) 組織・臓器を構成するほぼ全ての種類の細胞に分化できる多能性をもっている

ヒト多能性細胞株の重要性

- (1) 細胞治療に用いるために必要な機能をもつ細胞を供給できる可能性
- (2) 組織工学による人工組織・臓器作製のための多種類細胞材料の供給可能性
- (3) 基礎研究や創薬研究に必要な多種類ヒト細胞: **品質管理して大量供給可能**

多能性幹細胞株がもつ優れた特質 「重大な特性変化なしの無限増殖能」

- 速い細胞増殖を長期間(無制限に)維持できるとともに、多分化能などの性質が保持されることによって:
- 多様な遺伝子改変を加えることが可能(目的に応じて細胞の特性を加工・改善することができる)
- 同一特性をもつ細胞集団(加工・選別した細胞株のサブラインなど、凍結保存も可能)について、細胞機能や安全性などを十分に検証したのち使用することができる
- 一定の特性と品質をもつ多種類の細胞を大量に供給することができる(大量生産が可能)

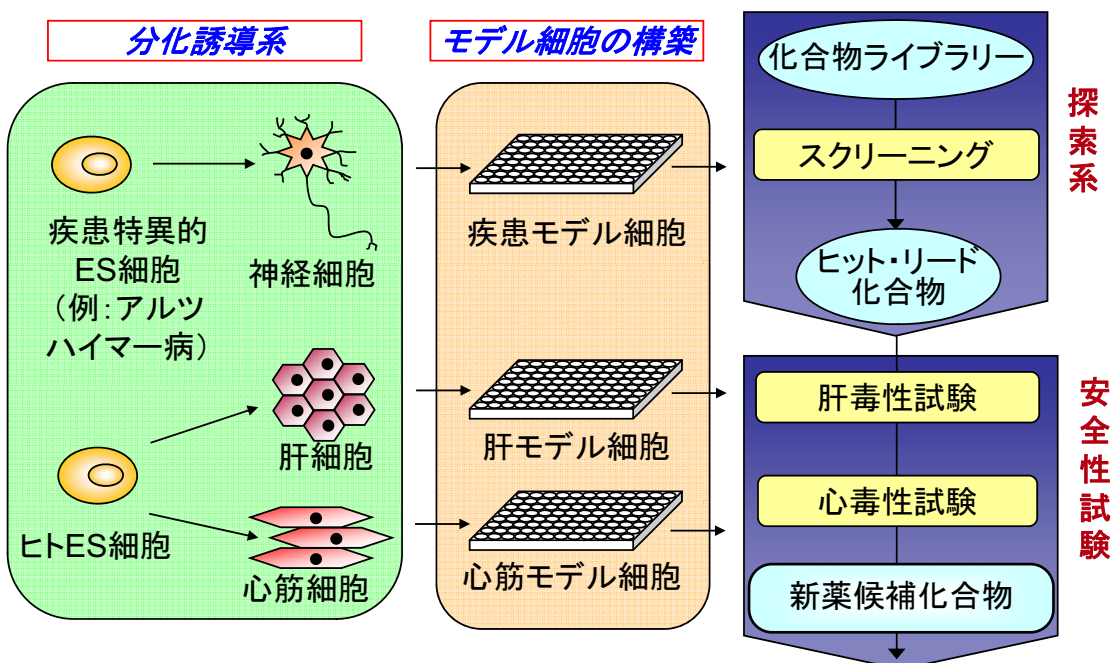
ヒト多能性幹細胞株の 創薬研究における重要性

創薬研究に必要な多種類ヒト組織細胞の大量供給

- ・均一な特性(ゲノム)をもつヒト細胞
 - ・外来遺伝子ベクターを組み込んだヒト細胞
 - ・内在遺伝子を改変したヒト細胞(疾患モデルヒト細胞)
 - ・各種細胞内活性を検出するレポーター遺伝子導入ヒト細胞
-
- ・各種ヒトモデル細胞への薬物効果と生理活性のアッセイ系
 - ・ヒト細胞(肝細胞や心筋細胞)を使った安全性試験
-
- ・各種神経細胞、心筋、網膜細胞、皮膚、軟骨、脂肪細胞
 - ・肝細胞、膵島細胞

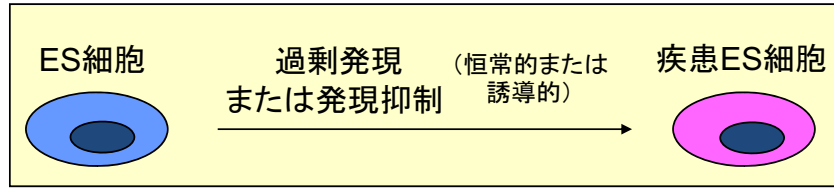
創薬研究のためのヒトES細胞由来のモデル細胞作成 (2005~2009年)

- ・ **探索系** (疾患モデル細胞を用いたハイスループットスクリーニング)
- ・ **安全性試験** (肝モデル細胞、心筋モデル細胞を用いた試験)



ヒトES細胞由来の疾患モデル細胞

- 既存ヒトES細胞の遺伝子改変



- **同じ遺伝的背景**をもった健康な細胞と疾患細胞の**比較が可能**である
- 発現誘導型プロモーターシステム(Tet-On、Tet-Offなど)を用いた**疾患原因遺伝子の発現制御が可能**である
- **特定の遺伝子座**に遺伝子を挿入することが可能である
- **疾患発症を早める**ことが出来る可能性がある

ヒト多能性幹細胞株の遺伝子改変による疾患モデル細胞と患者由来iPS細胞株による疾患モデル細胞の利点比較

既存ヒトES(またはiPS)細胞株の遺伝子改変

有利な点

- 同じ遺伝的背景をもった細胞株で病因遺伝子保有と健常型遺伝子保有細胞の厳密な比較対照が可能
- 発現誘導型プロモーターを用いた病因遺伝子の発現制御が可能 → 病因遺伝子発現の影響を厳密な時間軸で解析可能
- 異常蛋白質などの過剰発現により疾患関連異常の発症を早めることが出来る可能性

不利な点

- 病因遺伝子が不明または多数遺伝子関与の場合にはモデル作成が困難

患者の体細胞由来iPS細胞株の作成

利点

- 病因遺伝子が不明または多数遺伝子関与の場合にも患者のゲノムをもつ細胞株樹立が可能 → 疾患モデルとして使える可能性

不利な点

- 患者と健常者からのiPS細胞株は異なる遺伝的背景をもつ → 厳密な比較対照が困難
- **不完全な再プログラム化(初期化)によるエピジェネティクスの異常が細胞表現型の解析を乱す可能性**
- 慢性疾患や加齢疾患などでは実験可能期間内に細胞の異常発生が確認できない可能性

マネジメント

中辻PLをはじめ本プロジェクト参加者が全体の進捗状況を常に共有し、
タイミング良く、適切な方向性および指示を出す

1. リーダー会 幹細胞創薬研究所 毎月1回 開催
参加者：中辻PLおよび幹細胞創薬研究所のGL
目的：研究の方向性、および、進捗の確認
2. 京大-幹細胞創薬研究所合同会 毎月1回 開催
目的：京大および幹細胞創薬研究所各グループの研究経過報告・情報交換、討論 京大との情報・技術交換
3. 研究方向の新たな検討のための臨時会議
目的：特に必要な研究方向の検討、例えば、肝細胞分化誘導研究と評価系研究との連携体制強化を目的に開催
4. NEDO全体会議
目的：NEDOプロジェクト全体の進捗管理、とりまとめ
5. 研究開発委員会

研究用モデル細胞の創製技術開発(連携を密にした共同研究を展開)

ヒトES細胞の加工技術開発

- ・ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御(京大、幹細胞創薬研の共同研究)
- ・ヒトES細胞の相同組換え技術開発(京大、幹細胞創薬研の共同研究)
- ・ウイルスベクターを用いた高効率遺伝子導入と相同組換え(埼玉医大、京大、幹細胞創薬研、熊本大の共同研究)

ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発

- ・神経幹細胞・神経前駆細胞 及び運動神経細胞への分化誘導(幹細胞創薬研、京大、埼玉医大の共同研究)
- ・心筋細胞への分化誘導法と安全性薬理試験への応用(幹細胞創薬研、京大の共同研究)
- ・高効率な肝細胞への分化誘導法の確立と成熟肝細胞誘導法の開発(京大、熊本大、東大、埼玉医大、幹細胞創薬研の共同研究)

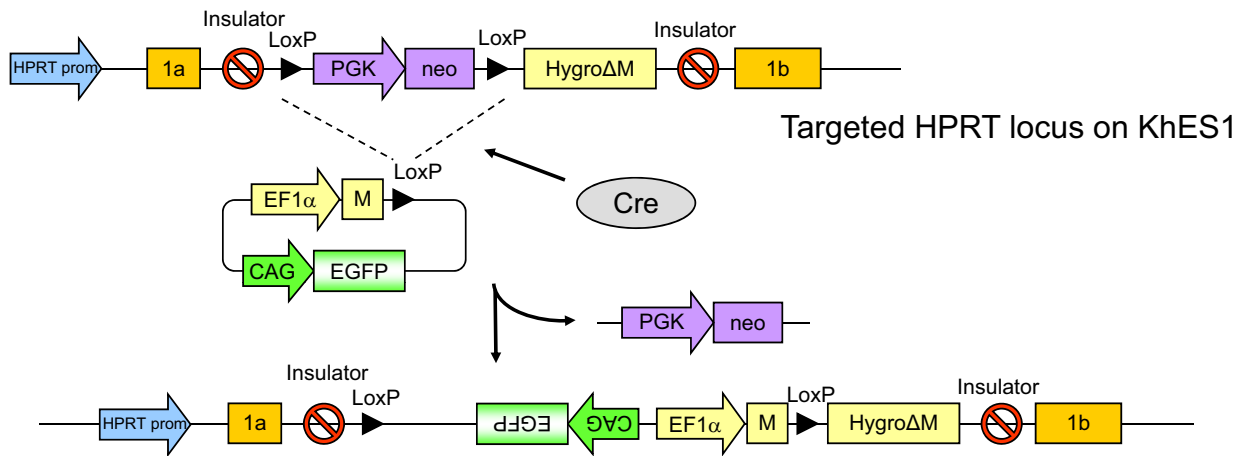
ECM成分や人工基底膜による細胞制御技術開発

- ・ヒトES細胞の組換えECM単一分子コーティングによる未分化維持培養功(京大、阪大の共同研究)
- ・人工基底膜等による分化誘導系の開発(阪大、環境研、熊本大、幹細胞創薬研の共同研究)

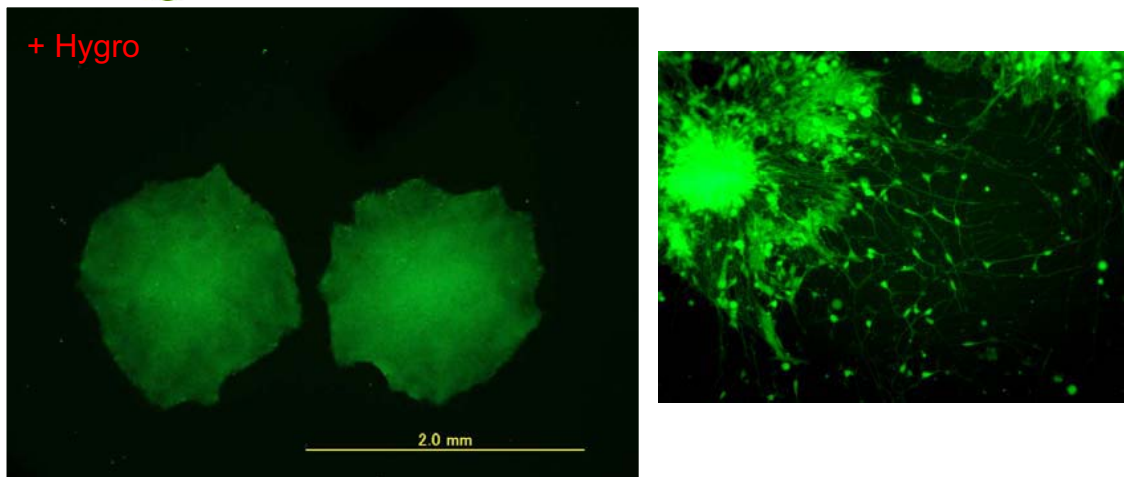
研究用モデル細胞の構築技術の開発

- ・神経変性疾患原因遺伝子組込みによる疾患モデル細胞作成(幹細胞創薬研、京大の共同研究)
- ・脳血液関門モデル構築と神経血管系細胞調製技術(幹細胞創薬研、京大、環境研の共同研究)
- ・ハイスループットスクリーニング(HTS)技術構築(京大、幹細胞創薬研の共同研究)

HPRT site-specific integration



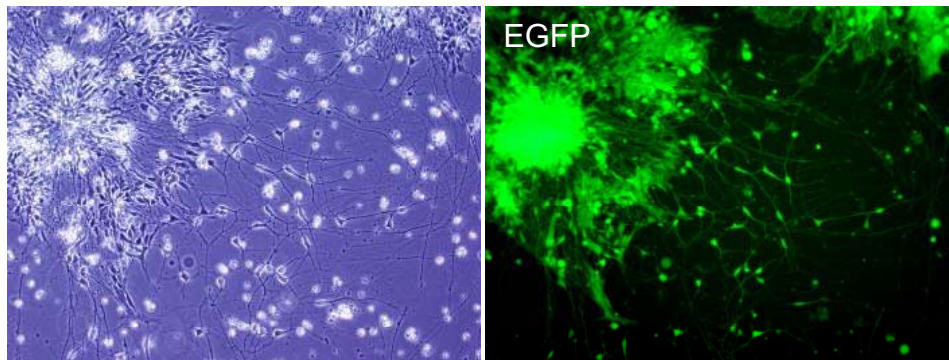
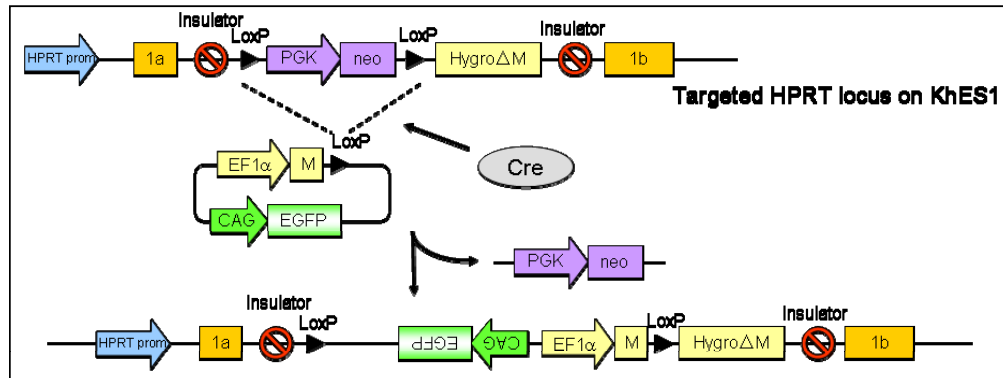
Cre-mediated recombination with a plasmid carrying the desired transgene and EF1 α promoter with an ATG codon results in the rescue of hygromycin resistance.



Hygro ^r	GFP ⁺	Efficiency (%)
186	186	100

We established the HPRT site-specific integration with high efficiency, indicating that this system can circumvent the silencing problem of transgenes

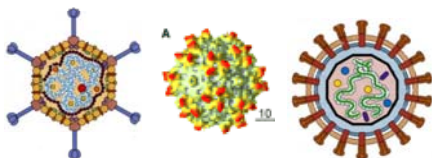
Cre/loxP mediated site-specific gene integration



Sakurai et al. Nucleic Acids Research (2010)

ウイルスベクターを用いた高効率な遺伝子導入

(埼玉医科大学)



1. ウイルスベクターの特徴

- ・ 病原性を除去し増殖ができない変異ウイルス（殻）を利用
- ・ ウイルス感染の巧妙な仕組みを利用した高い効率
- ・ 細胞種や細胞数に影響を受けにくいので広範な応用が可能

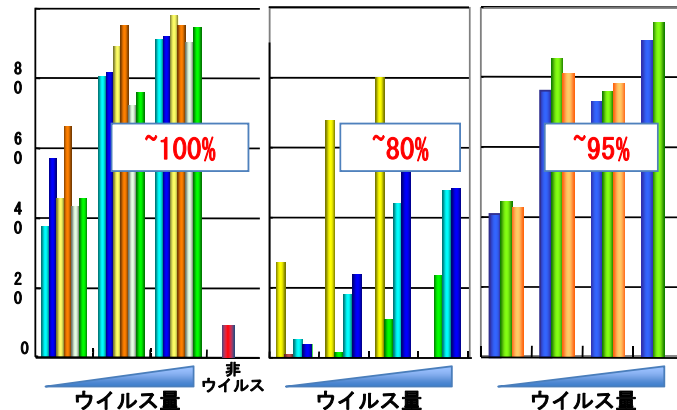
2. これまでに達成した成果

アデノ（一過性）

AAV（一過性）

レンチ（安定）

アデノ（相同組換え）



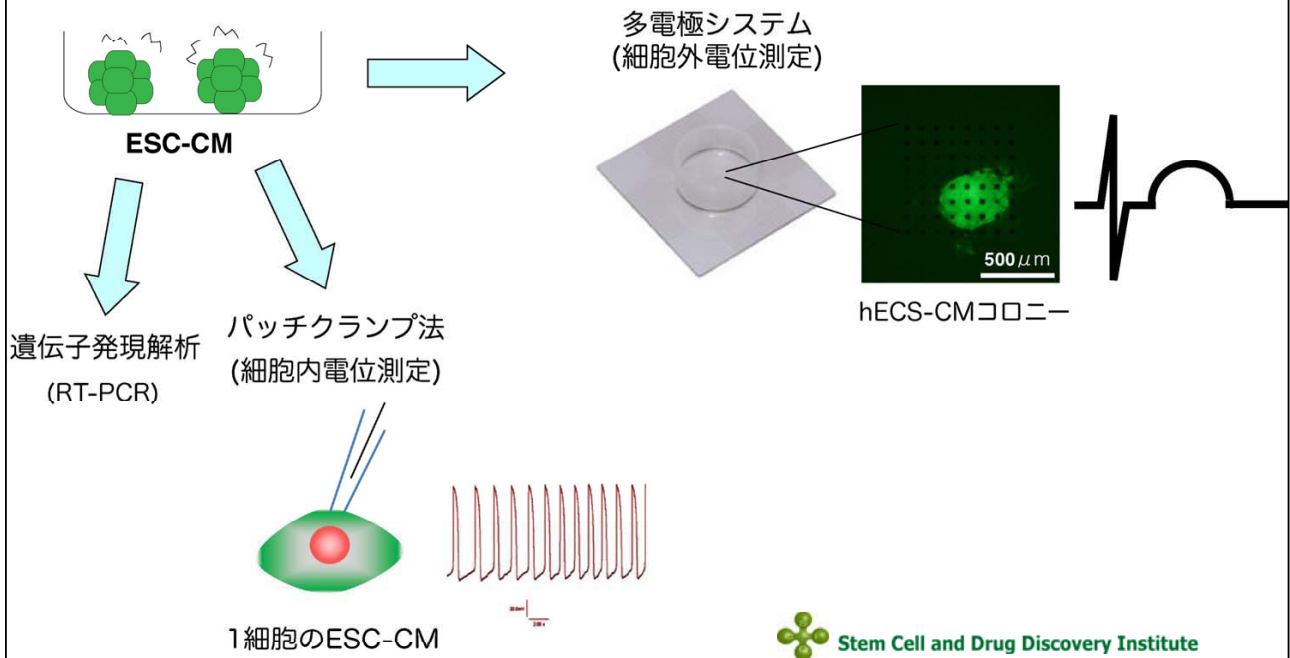
細胞株	ベクター	相同組換え頻度
HPRT	アデノ	3-14% (7-45%)
	非ウイルス	0-0.6% (0-1%)
その他4遺伝子座	アデノ	13-55% (40-81%)
肝細胞特異的	アデノ	29-56% (83-90%)
運動神経特異的	アデノ	7% (57%)
	非ウイルス	0%

3. 産業化への道筋

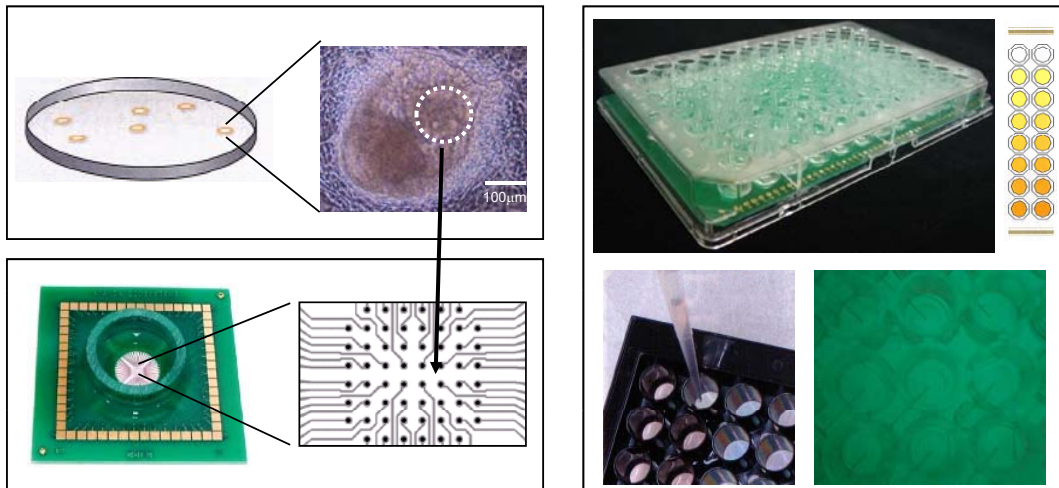
()はnegative selection後

- ・ siRNAや遺伝子発現誘導法への利用
- ・ ~100%のES細胞への遺伝子発現・分化誘導による機能細胞の量産
- ・ ハイスループット化による網羅的な遺伝子ノックアウトES細胞ライブラリーの創製

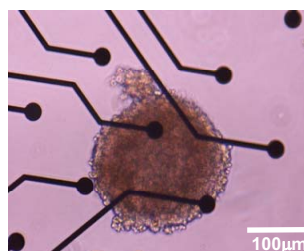
2. hESC-CMsの機能評価法 およびQT延長評価法の確立



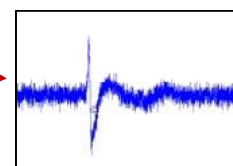
Simple procedure of QT interval assay using ESC-derived CMs



Recording field of
micro electrode arrays
(MEA) (Multi Channel
Systems, Reutlingen,
Germany)

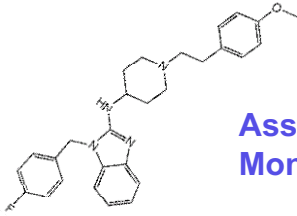


Multiwell MEAs or 96 well plates
by ReproCELL, Tokyo, Japan with
integrated reference and
recording electrodes can be used
for higher throughput screening



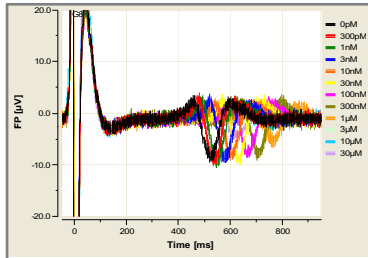
ReproCELL

A

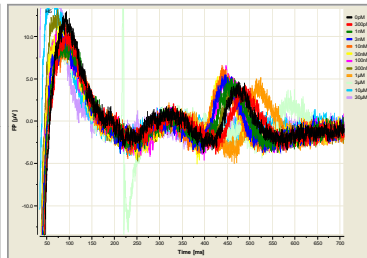


Assay data using cardiomyocytes derived from
Monkey ESCs, Human ESCs and Human iPSCs

B



C



D

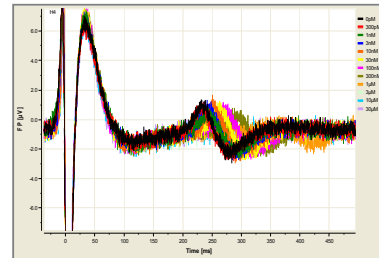


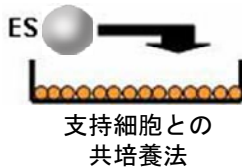
Fig. 7. Assay results for Astemizole, a potent histamine H1-receptor antagonist, which was withdrawn from the market due to QT prolongation,.

A: Structure of Astemizole

B, C, D: Overlay of waveforms recorded with control (compound solvent) and in the presence of each concentration of Astemizole on monkey ES(B), human ES(C), or human iPSC (D) cell-derived cardiomyocytes.

Although detailed waveform shapes for each cell differ, a common analysis method can be applied since the waveform from each cell contains the same ion components. Upon treatment with Astemizole, a prolonged Na⁺-K⁺ interval indicates this compound's potential toxicity to heart.

肝細胞への高効率分化誘導法の開発に成功（熊本大学）



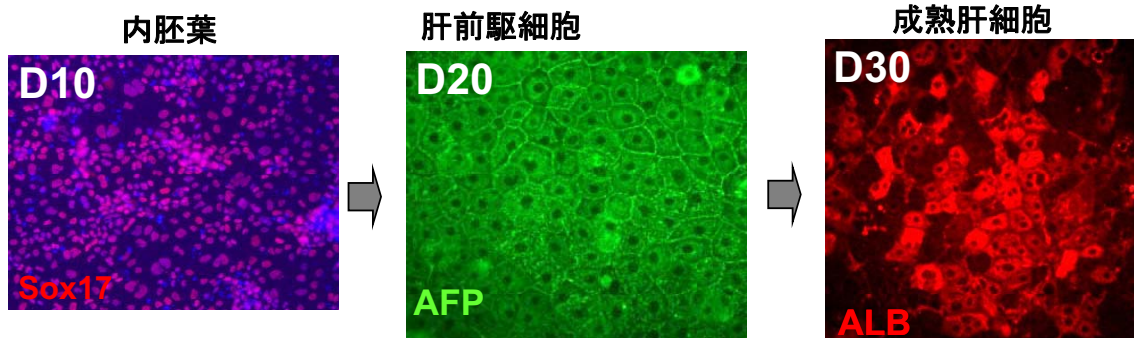
特徴

- ・分化支持細胞（細胞株）を誘導源とする
- ・scale up が簡単である

これまでの成果

- ヒトES細胞から肝前駆細胞（AFP陽性90%）の高効率分化誘導に成功した。
- 成熟肝細胞まで分化する技術も確立した（Alb陽性細胞>20%）

図 ヒトES細胞から内胚葉、肝前駆細胞、肝細胞の順番で分化誘導された

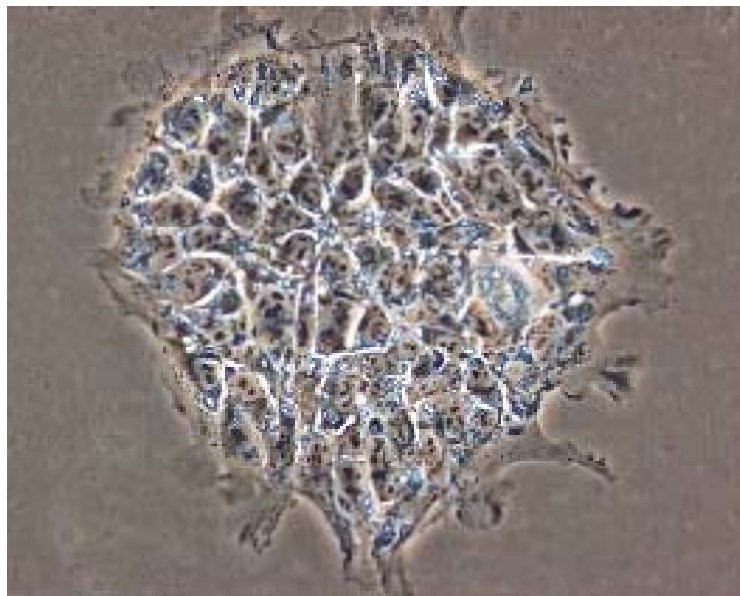


- グリコーゲン蓄積、薬物代謝酵素、抱合系酵素、トランスポーターの発現、薬物によるCyp3A4の誘導。ヒト初代培養肝細胞と同等なアルブミン分泌能が確認された。

多能性幹細胞の応用に必要な培養法の確立

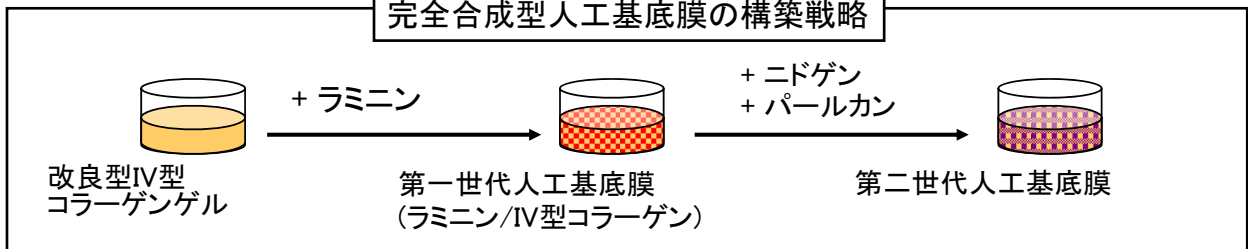
- 無血清培地から完全合成培地へ
 - ・すでに血清添加しない培地で樹立・増殖維持されている
 - ・動物蛋白質などを含まない完全合成培地の開発が進んでいる。
- フィーダー細胞
 - ・すでにヒト細胞を用いた樹立と増殖維持が成功している
 - ・フィーダー細胞を使わない培養維持方法の開発は進行中であるが、マトリゲル(マウスがん細胞株由来ECM)使用など問題点残る

Human ES cell colony cultured without feeder cells
フィーダー細胞なしで培養されたヒトES細胞コロニー

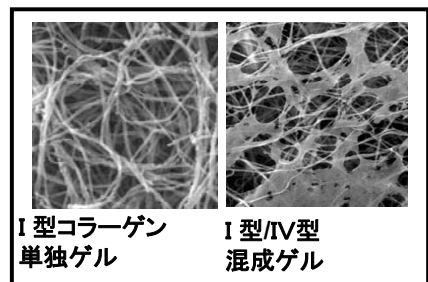


分子組成をカスタマイズした完全合成型人工基底膜の構築技術を開発 (大阪大学・日本皮革研究所)

完全合成型人工基底膜の構築戦略

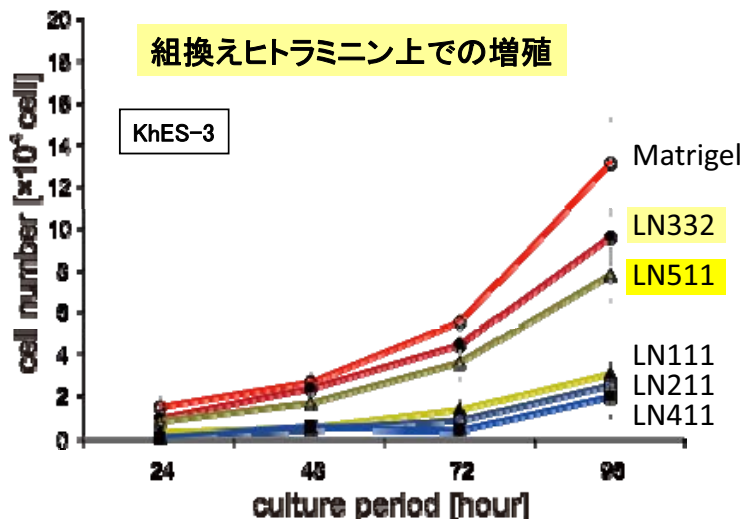


- 主要基底膜構成分子の高発現・安定供給系の確立
 - ✓ 全ラミニンアイソフォーム、パールカン、ニドゲンの組換え蛋白質の発現系を構築
 - ✓ ゲル化能を保持したIV型コラーゲンの安定供給系を確立
- IV型コラーゲンゲルの脆弱性を克服した改良型コラーゲンゲルの開発に成功
 - ✓ I型コラーゲンの安定性とIV型コラーゲンの生物活性を併せ持つ混成コラーゲンゲルの開発
 - * 特許出願:「I型-IV型コラーゲン混成ゲル」(特願2009-235348)
- I型/IV型混成ゲルにラミニン、ニドゲン、パールカンを組み込んだ“第二世代人工基底膜”の構築に成功



世界初の完全合成型人工基底膜！

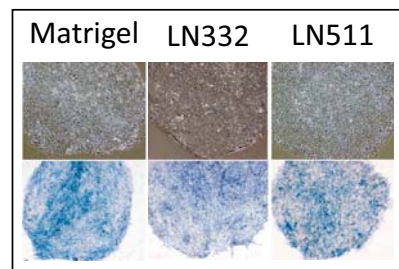
組換えラミニンを利用したヒトES細胞のフィーダーフリー培養に成功 (大阪大学と京都大学の共同研究)



(Miyazaki et al., Biochem Biophys Res Commun, 2008)

ヒト組換えラミニンを利用したヒトES細胞のフィーダーフリー培養の世界初の成功例！

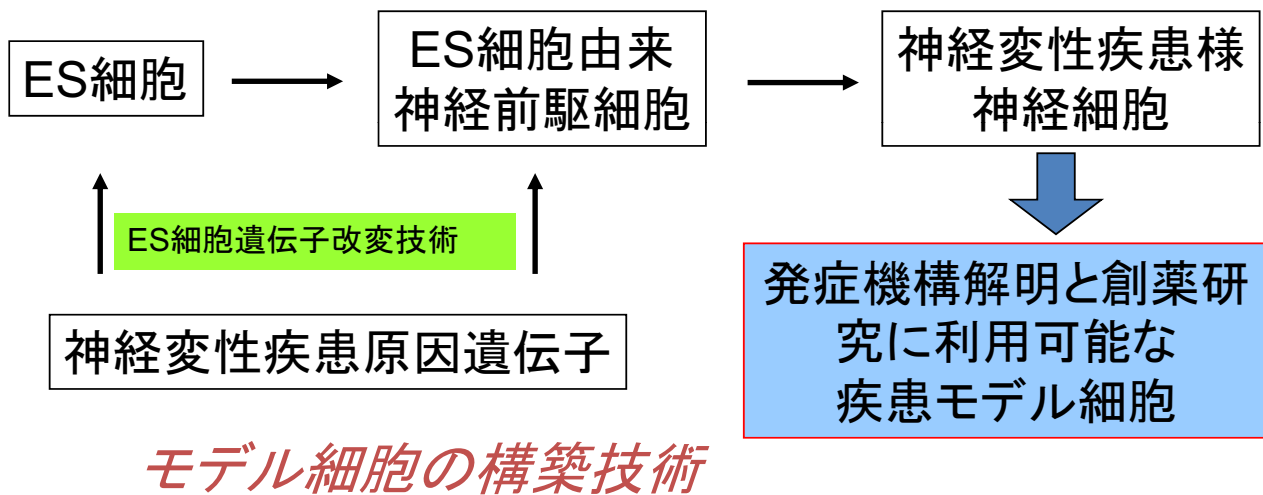
- 組換えラミニン-511および-332をコートした基質上で、ヒトES細胞は未分化性を維持したまま増殖する。
- ラミニン-511および-332は、どちらもインテグリン $\alpha6\beta1$ と強く結合。
- ヒトES細胞はインテグリン $\alpha6\beta1$ を強く発現している。



アルカリフォスファターゼ
活性染色

ヒトES細胞から 神経変性疾患モデル細胞の創製

神経分化誘導技術

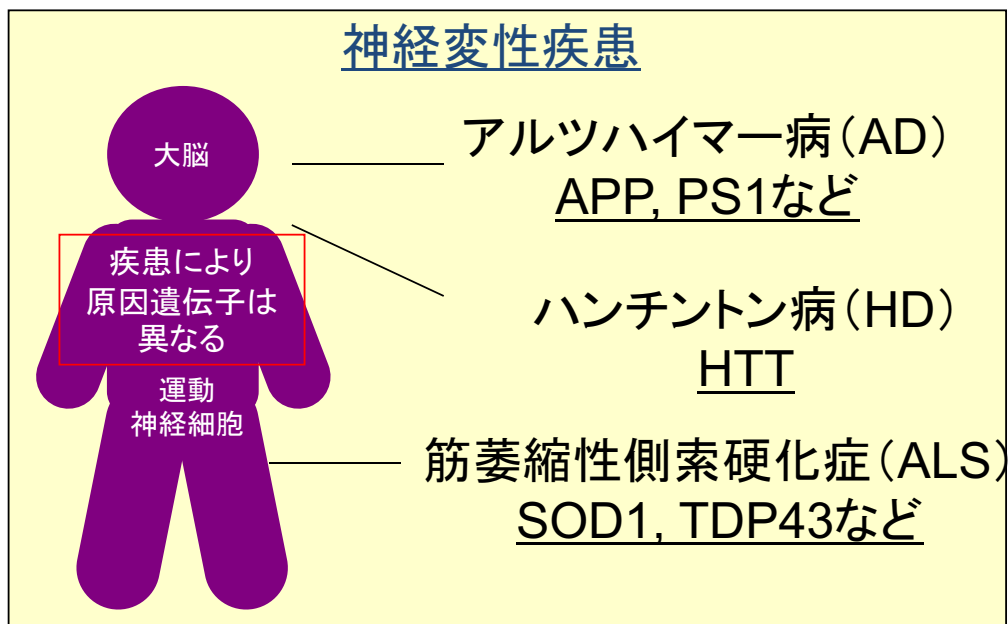


神経変性疾患モデル細胞の創製



Stem Cell and Drug Discovery Institute

神経変性疾患



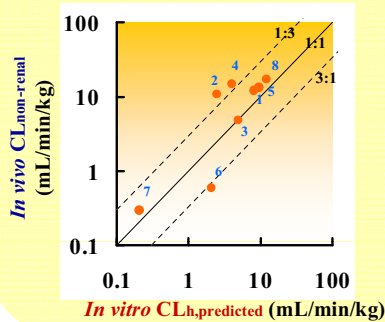
目的とする神経変性疾患の原因遺伝子の**変異型遺伝子**を発見するヒトES細胞 (**疾患ES細胞**) の作成と分化誘導

ES細胞由来肝細胞を用いた、創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立

(東大院・薬／杉山雄一)

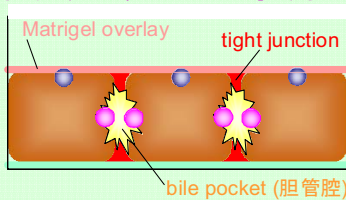
1. ヒト肝細胞を用いた薬物動態の評価・予測系の確立

遊離肝細胞を用いた肝取り込みクリアランスの予測



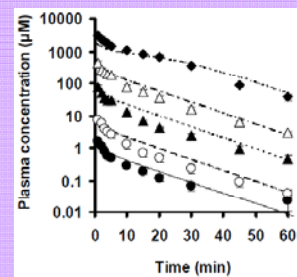
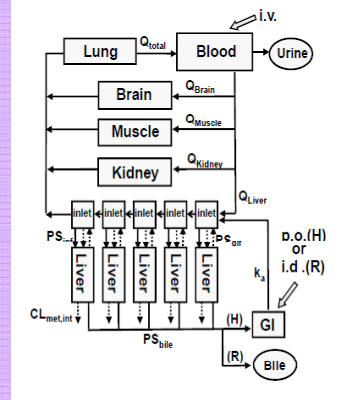
In vivo肝クリアランスをin vitro実験から良好に予測

サンドイッチ培養肝細胞を用いた胆汁排泄クリアランスの予測



胆汁排泄トランスポーターの寄与率・機能の定量的予測につなげる

In vitroデータに基づくin vivo薬物動態の予測モデルの構築



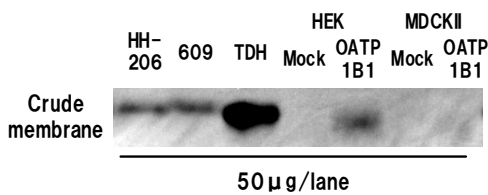
統合

ES細胞由来肝細胞を用いた、創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立

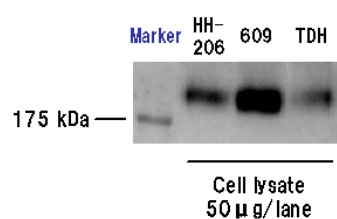
(東大院・薬／杉山雄一)

2. ヒトES細胞由来肝細胞における薬物動態関連遺伝子の発現の評価法の標準化

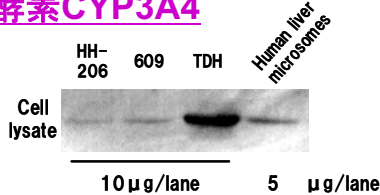
取り込みトランスポーターOATP1B1



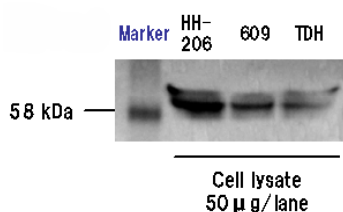
排出トランスポーターMRP2



代謝酵素CYP3A4

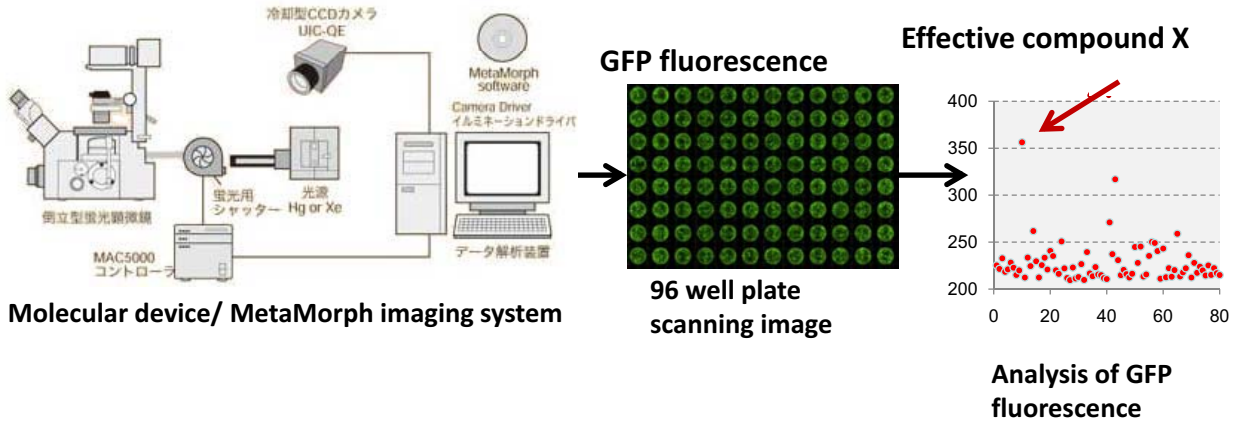


代謝酵素CYP2C9



複数ロットのヒト凍結肝細胞サンプルでの薬物動態関連遺伝子のmRNA, 蛋白発現量を基準に、ES細胞由来肝細胞の創薬利用への可能性を定量的に評価可能とした。

Screening system with a reporter GFP gene for cardiomyocyte differentiation, and detection of effective chemical compounds



1. 事業内容と目標

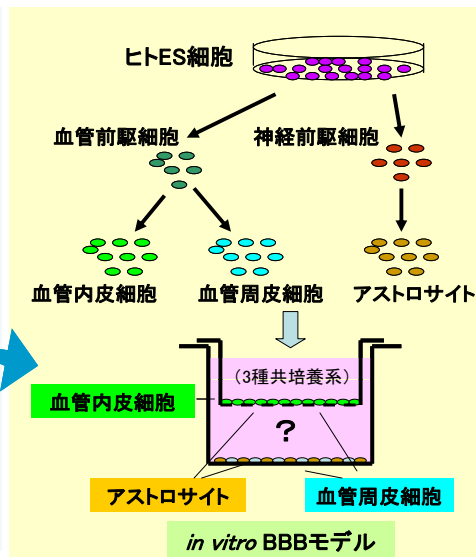
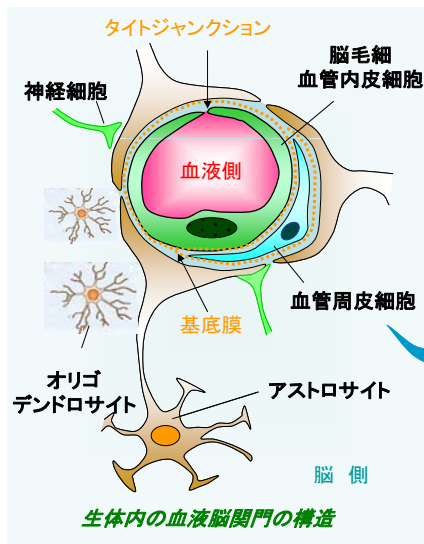
BBBモデル創製

- ① ヒトES細胞から血管系・神経系細胞の分化誘導技術
および量産調製技術の確立

分化誘導技術

モデル細胞創製

- ② 血液脳関門(BBB)モデルの創製



モデル化の基本形態



論文、学会発表、特許、報道

平成17年6月～平成22年3月

論文	学会発表	特許	報道
193	332	24	45

最終目標への達成度

目標達成度

1. ヒトES細胞の加工技術開発・・・・・・・・・・・・・・ 〇大きく達成

TetON/OFF発現誘導系確立、2A配列による複数遺伝子産物の同時発現系確立、HPRT部位への置換力セット相同組込みによる外来遺伝子安定発現系確立、その活用拡がる

①遺伝子導入技術と発現制御技術の開発 ②相同組換え技術の開発 ③RNA干渉法による遺伝子発現制御技術の開発

2. ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発・・・・・・・・・・・・・・ 〇大きく達成

組換えヒト蛋白コーティングによる未分化維持増殖系確立、各種神経細胞への高効率分化誘導系確立、心筋分化成熟化と有効低分子化合物のケミカルスクリーニング成功

①神経系細胞への分化誘導制御技術の開発 ②心筋細胞への分化誘導制御技術の開発 ③肝細胞への分化誘導制御技術の開発 ④人工基底膜や擬似マトリックスによる分化制御評価

3. 研究用モデル細胞の構築技術開発・・・・・・・・・・・・・・ 〇大きく達成

アルツハイマー病/ハンチントン病/ALSモデル細胞作成に成功、心筋毒性アッセイ系の確立

①神経変性疾患モデル細胞の創製 ②血液脳関門 (BBB) モデルの創製 ③ES細胞由来肝細胞を用いた創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立 ④オンチップ・ヒト組織・臓器モデルを用いた毒性・創薬支援技術の研究開発

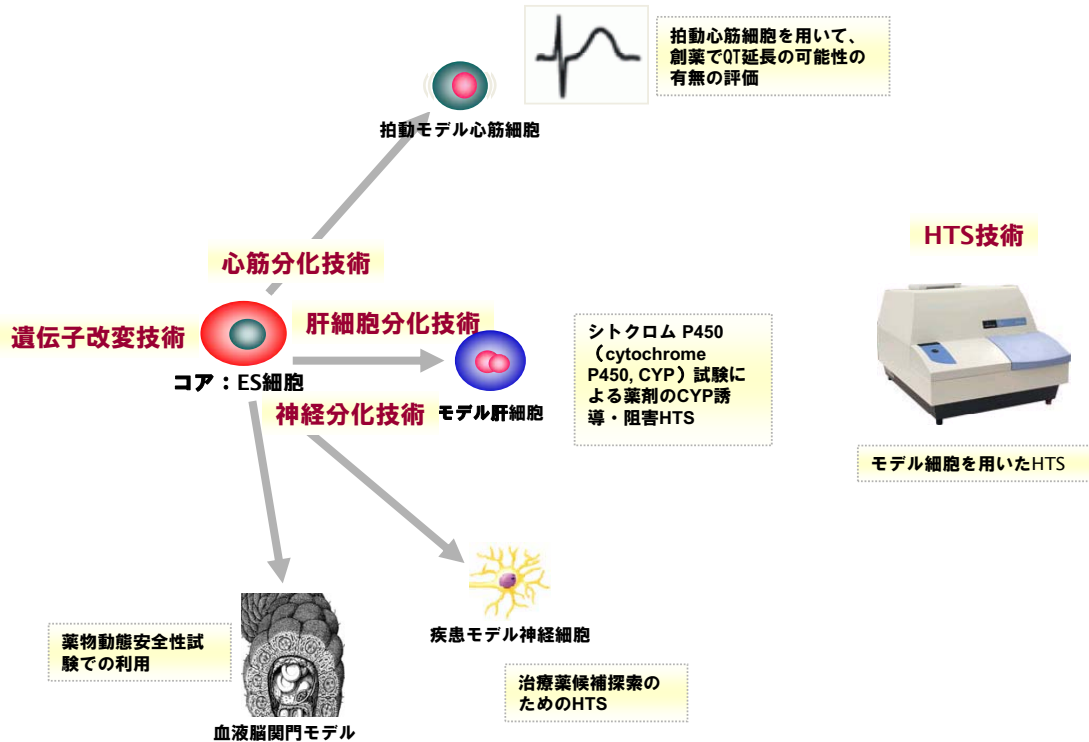
4. 開発技術の産業化・実用化・・・・・・・・・・・・・・ 〇大きく達成

心筋毒性試験の実用化開始、モデル細胞による事業化の計画

①分化心筋細胞をもちいたQT延長試験実用化 ②神経変性疾患などモデル細胞による事業化計画

開発技術の創薬応用

ES細胞をコアに遺伝子改変技術、機能細胞分化技術およびそれらを用いたスクリーニング技術を含む世界でも類を見ない包括的な技術開発の成果をあげつつある。包括的な技術開発展開により、実用化も近い。

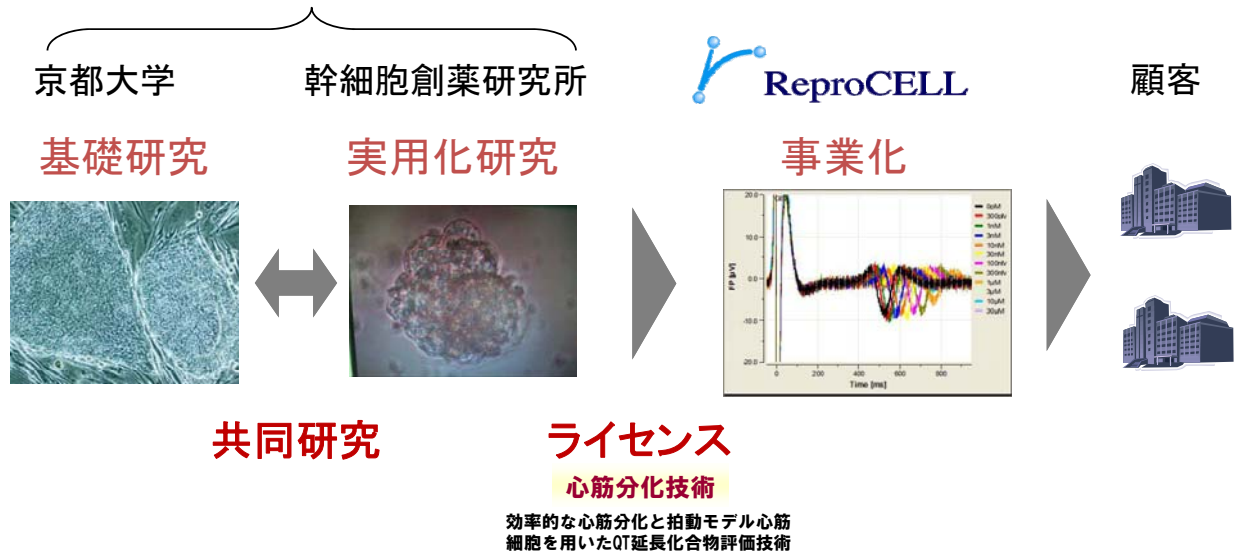


開発技術の産業化

創薬におけるQT延長に使用できる心筋分化技術に関しては平成19年6月に株式会社リプロセルにライセンス供与した。

リプロセル社では平成20年4月に**サルES細胞由来心筋細胞**、平成21年4月に**ヒトiPS細胞由来心筋細胞**の販売および受託試験事業を開始している。

NEDOプロジェクト



NEDOプロジェクトでのES細胞技術をiPS細胞へ適用・実用化

世界で最初にES/iPS細胞由来心筋細胞を使った心筋毒性アッセイ事業実用化開始の報道記事

REUTERS
LATEST NEWS U.S. SENATE BACKS PANEL TO PROBE FINANCIAL FRAUD

Top News
Reuters top ten news stories delivered to your inbox each day. [Subscribe](#)

[Apple iPad now Third Gen Silver \(4 GB, MA9/LL/A\) Digital](#) | Description | [Amazon](#)

You are here: [Home](#) > [News](#) > [Article](#)

New Stem Cell Technology to Improve Drug Safety

Wed Apr 22, 2009 8:11am EDT

[Email](#) | [Print](#) | [Share](#) | [Reprints](#) | [Single Page](#) | [\[-\] Text](#)

First Commercial Test Incorporating iPS Cells

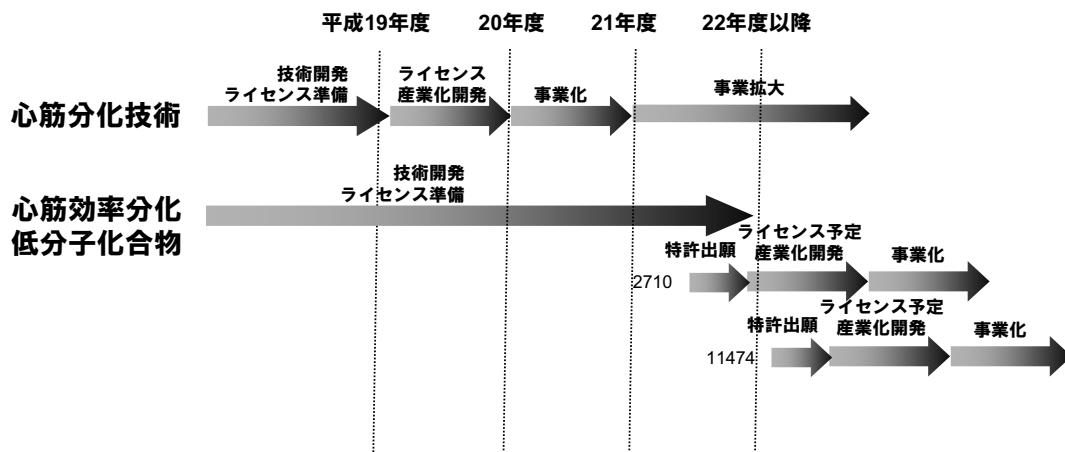
ロイター電子版 (2009年4月22日)

Society for Biomolecular Science 15th Annual Conference (2009)
Best Poster

Stem Cells and Regenerative Medicine Europe (2009)
Best Poster

日本経済新聞 朝刊1面 (2009年2月27日) 日本経済新聞 朝刊9面 (2009年4月9日)

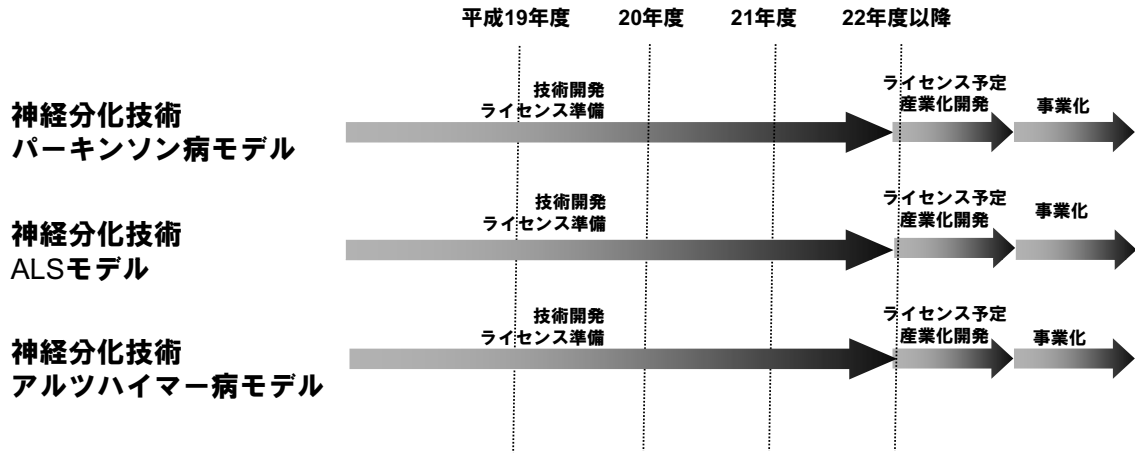
現在開発中の技術の事業化スケジュール(心筋)



本プロジェクトの具体的な事業化項目とスケジュールを以下に示す。

1. ES細胞由来の心筋細胞を用いた毒性試験 (QT延長) : 平成20年度事業化済み
2. ES細胞由来の心筋細胞を用いた毒性試験 (QT延長) を基盤にiPS細胞でも事業化 : 平成21年度事業化済み
3. HTSで見出した低分子2化合物の特許出願とこれらの化合物を用いた効率分化の事業化平成22年度

現在開発中の技術の事業化スケジュール（神経）



本プロジェクトの具体的な事業化項目とスケジュールを以下に示す。

1. 3種の神経疾患モデル細胞：平成22年度に事業化する

ヒトES細胞/iPS細胞技術の事業化の展開(予想)

事業領域	研究試薬・研究機器	有用物質産生	創薬基盤技術	再生医療・細胞治療
事業イメージ				
実現時期	・現在	・1～2年後 -	・現在～1年後 -	・5～10年後 -
市場規模	・数十～数百億円	・数十～数百億円	・数百～一千億円?	・数兆円?
ビジネスモデル	<ul style="list-style-type: none"> 試薬の提供 デバイス・機器の提供 細胞(研究用)の提供 	<ul style="list-style-type: none"> 試薬の提供 デバイス・機器の提供 医薬品の提供 	<ul style="list-style-type: none"> 試薬の提供 デバイス・機器の提供 細胞(事業用)の提供 創薬受託試験サービスの提供 	<ul style="list-style-type: none"> 試薬の提供 デバイス・機器の提供 細胞(医療用)の提供 細胞バンキング・サービスの提供
事業実施事例*	日本	 <small>Cell Science & Technology Institute</small>		
	海外	 		 <small>ADVANCED CELL TECHNOLOGY</small>

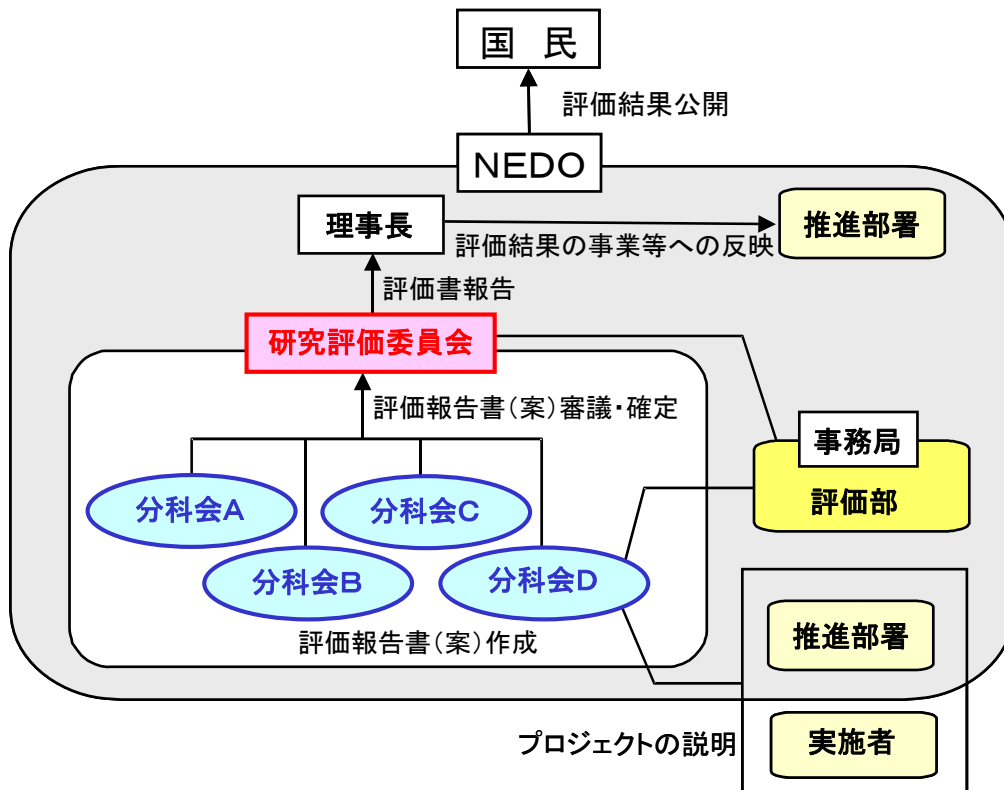
* 事例紹介であり、必ずしも網羅的ではない
出典: 企業公開情報: 筆者作成

参考資料 1 評価の実施方法

本評価は、「技術評価実施規程」（平成 15 年 10 月制定）に基づいて研究評価を実施する。

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）における研究評価の手順は、以下のように被評価プロジェクトごとに分科会を設置し、同分科会にて研究評価を行い、評価報告書（案）を策定の上、研究評価委員会において確定している。

- 「NEDO 技術委員・技術委員会等規程」に基づき研究評価委員会を設置
- 研究評価委員会はその下に分科会を設置



1. 評価の目的

評価の目的は「技術評価実施規程」において。

- 業務の高度化等の自己改革を促進する
- 社会に対する説明責任を履行するとともに、
経済・社会ニーズを取り込む
- 評価結果を資源配分に反映させ、資源の重点化及び業務の効率化を
促進する

としている。

本評価においては、この趣旨を踏まえ、本事業の意義、研究開発目標・計画の妥当性、計画を比較した達成度、成果の意義、成果の実用化の可能性等について検討・評価した。

2. 評価者

技術評価実施規程に基づき、事業の目的や態様に即した外部の専門家、有識者からなる委員会方式により評価を行う。分科会委員選定に当たっては以下の事項に配慮して行う。

- 科学技術全般に知見のある専門家、有識者
- 当該研究開発の分野の知見を有する専門家
- 研究開発マネジメントの専門家、経済学、環境問題、国際標準、その他社会的ニーズ関連の専門家、有識者
- 産業界の専門家、有識者
- ジャーナリスト

また、評価に対する中立性確保の観点から事業の推進側関係者を選任対象から除外し、また、事前評価の妥当性を判断するとの側面にかんがみ、事前評価に関与していない者を主体とする。

これらに基づき、分科会委員名簿にある7名を選任した。

なお、本分科会の事務局については、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構研究評価広報部が担当した。

3. 評価対象

平成17年度に開始された「研究用モデル細胞の創製技術開発」プロジェクトを評価対象とした。

なお、分科会においては、当該事業の推進部署から提出された事業原簿、プロジェクトの内容、成果に関する資料をもって評価した。

4. 評価方法

分科会においては、当該事業の推進部署及び研究実施者からのヒアリングと、それを踏まえた分科会委員による評価コメント作成、評点法による評価及び実施者側等との議論等により評価作業を進めた。

なお、評価の透明性確保の観点から、知的財産保護の上で支障が生じると認められる場合等を除き、原則として分科会は公開とし、研究実施者と意見を交換する形で審議を行うこととした。

5. 評価項目・評価基準

分科会においては、次に掲げる「評価項目・評価基準」で評価を行った。これは、研究評価委員会による『各分科会における評価項目・評価基準は、被評価プロジェクトの性格、中間・事後評価の別等に応じて、各分科会において判断すべきものである。』との考え方に従い、第1回分科会において、事務局が、研究評価委員会により示された「標準的評価項目・評価基準」（参考資料1-7頁参照）をもとに改定案を提示し、承認されたものである。

プロジェクト全体に係わる評価においては、主に事業の目的、計画、運営、達成度、成果の意義や実用化への見通し等について評価した。各個別テーマに係る評価については、主にその目標に対する達成度等について評価した。

評価項目・評価基準

1. 事業の位置付け・必要性について

(1) NEDOの事業としての妥当性

- ・ 「健康安心イノベーションプログラム」の目標達成のために寄与しているか。
- ・ 民間活動のみでは改善できないものであること、又は公共性が高いことにより、NEDOの関与が必要とされる事業か。
- ・ 当該事業を実施することによりもたらされる効果が、投じた予算との関係で十分であるか。

(2) 事業目的の妥当性

- ・ 内外の技術開発動向、国際競争力の状況、エネルギー需給動向、市場動向、政策動向、国際貢献の可能性等から見て、事業の目的は妥当か。

2. 研究開発マネジメントについて

(1) 研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2) 研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3) 研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。

- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4)研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5)情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1)目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2)成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながることが期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に

沿って国内外に適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 実用化イメージ・出口イメージが明確になっているか。
- ・ 実用化イメージ・出口イメージに基づき、開発の各段階でマイルストーンを明確にしているか。それを踏まえ、引き続き研究開発が行われる見通しは立っているか。

(2)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

標準的評価項目・評価基準（事後評価）

2010. 3. 26

【事後評価 標準的評価項目・評価基準の位置付け（基本的考え方）】

標準的評価項目・評価基準は、第25回研究評価委員会（平成22年3月26日付）において以下のとおり定められている。（本文中の記載例による1・・・、2・・・、3・・・、4・・・が標準的評価項目、それぞれの項目中の(1)・・・、(2)・・・が標準的評価基準、それぞれの基準中の・・・が視点）

ただし、これらの標準的評価項目・評価基準は、研究開発プロジェクトの事後評価における標準的な評価の視点であり、各分科会における評価項目・評価基準は、被評価プロジェクトの性格等に応じて、各分科会において判断すべきものである。

1. 事業の位置付け・必要性について

(1) NEDOの事業としての妥当性

- ・ 特定の施策（プログラム）、制度の下で実施する事業の場合、当該施策・制度の目標達成のために寄与しているか。
- ・ 民間活動のみでは改善できないものであること、又は公共性が高いことにより、NEDOの関与が必要とされる事業か。
- ・ 当該事業を実施することによりもたらされる効果が、投じた予算との比較において十分であるか。

(2) 事業目的の妥当性

- ・ 内外の技術開発動向、国際競争力の状況、エネルギー需給動向、市場動向、政策動向、国際貢献の可能性等から見て、事業の目的は妥当か。

2. 研究開発マネジメントについて

(1) 研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2) 研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。
- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4)研究開発成果の実用化、事業化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化、事業化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化、事業化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5)情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1)目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2)成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながる事が期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓する事が期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化、事業化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 産業技術としての見極め（適用可能性の明確化）ができているか。
- ・ 実用化に向けて課題が明確になっているか。課題解決の方針が明確になっているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。

(2)事業化までのシナリオ

- ・ NEDO後継プロジェクト、NEDO実用化助成、企業内研究等、プロジェクト終了後の事業化までの道筋は明確か。
- ・ 市場の規模や成長性、コストダウン、競合技術との比較、導入普及、事業化までの期間、事業化とそれに伴う経済効果等の見通しは立っているか。

(3)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

※基礎的・基盤的研究及び知的基盤・標準整備等の研究開発の場合は、以下の項目・基準による。

*基礎的・基盤的研究開発の場合

2. 研究開発マネジメントについて

(1)研究開発目標の妥当性

- ・内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。
- ・全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4)研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

- ・成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5)情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1)目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。（※）
（※事後評価前倒し実施の場合は、「成果は目標値をクリアする見込みか。」）
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2)成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながることを期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 実用化イメージ・出口イメージが明確になっているか。
- ・ 実用化イメージ・出口イメージに基づき、開発の各段階でマイルストーンを明確にしているか。それを踏まえ、引き続き研究開発が行われる見通しは立っているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。

(2)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

* 知的基盤・標準整備等の研究開発の場合

2. 研究開発マネジメントについて

(1)研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。
- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。

- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4)研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5)情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1)目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。（※）
（※事後評価前倒し実施の場合は、「成果は目標値をクリアする見込みか。」）
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2)成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながることが期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は公開性が確保されているか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 研究内容に新規性がある場合、知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。

- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 整備した知的基盤についての利用は実際にあるか、その見通しが得られているか。
- ・ 公共財として知的基盤を供給、維持するための体制は整備されているか、その見込みはあるか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。
- ・ J I S化、標準整備に向けた見通しが得られているか。注) 国内標準に限る
- ・ 一般向け広報は積極的になされているか。

(2)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

参考資料 2 評価に係る被評価者意見

研究評価委員会（分科会）は、評価結果を確定するにあたり、あらかじめ当該実施者に対して評価結果を示し、その内容が、事実関係から正確性を欠くなどの意見がある場合に、補足説明、反論などの意見を求めた。研究評価委員会（分科会）では、意見があったものに対し、必要に応じて評価結果を修正の上、最終的な評価結果を確定した。

評価結果に対する被評価者意見は全て反映された。

本研究評価委員会報告は、独立行政法人新エネルギー・産業技術
総合開発機構（NEDO 技術開発機構）評価部が委員会の事務局
として編集しています。

平成 22 年 11 月

NEDO 技術開発機構

評価部

部長 竹下 満

主幹 寺門 守

担当 梶田 保之

* 研究評価委員会に関する情報は NEDO 技術開発機構のホームページに
掲載しています。

(<http://www.nedo.go.jp/iinkai/kenkyuu/index.html>)

〒212-8554 神奈川県川崎市幸区大宮町1310番地

ミュージア川崎セントラルタワー20F

TEL 044-520-5161 FAX 044-520-5162