

20113900/A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
(再生医療関係研究分野)

ヒト幹細胞を用いた再生医療の
臨床実用化のための基盤構築に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中井 謙太

平成25(2013)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
(再生医療関係研究分野)

ヒト幹細胞を用いた再生医療の
臨床実用化のための基盤構築に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中井 謙太

平成25(2013)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

ヒト幹細胞を用いた再生医療の臨床実用化のための基盤構築に関する研究 中井 謙太	-----	1
--------------------------------------------	-------	---

II. 分担研究報告

1. ES細胞のマニピレーションに関する研究 梅澤 明弘	-----	6
2. iPS分化誘導に関する研究 岡野 栄之	-----	8
3. 移植、分化誘導に関する研究 高橋 政代	-----	14
4. 統括・情報基盤に関する研究 中井 謙太	-----	16
5. 臨床用ヒトES細胞株の樹立に関する研究 中辻 憲夫	-----	19
6. 分化誘導に関する研究 中畑 龍俊	-----	21
7. 輸送に関する研究 西田 幸二	-----	30
8. 体性幹分化誘導に関する研究 大和 雅之	-----	34
9. iPS樹立に関する研究 山中 伸弥	-----	36

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	39
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	48
-----------------	-------	----

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
（総括）研究報告書

ヒト幹細胞を用いた再生医療の臨床実用化のための基盤構築に関する研究

研究代表者 中井 謙太 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

再生医療臨床化研究を支援しつつ、その研究プロセスに寄与する情報基盤の確立に向け、必要な情報収集を行った。その試行形態として再生医療研究者とゲノム解析研究者による共同研究体制を構築し、独自開発した解析手法により、実験検証可能な仮説を得た。早期の臨床応用に向けた課題整理を行い、最終年度までの計画を策定するとともに、プロジェクト執行のための組織構築に着手し、次年度以降の研究体制を整備した。受け入れ態勢が整った4拠点とデータセンターに情報機器を設置し、ネットワークで接続した情報基盤を構築した。プロジェクト開始にあたり、一般への情報公開計画を策定し、プレスリリース、プレスカンファレンス、ウェブ等を通じ、研究内容を広報した。

研究分担者

梅澤明弘 国立成育医療研究センター
再生医療センター センター長

岡野栄之 慶應義塾大学医学部生理学
教授

高橋政代 独立行政法人理化学研究所
発生・再生科学総合研究センター
網膜再生医療研究チーム
チームリーダー

中辻憲夫 京都大学再生医科学研究所
教授

中畑龍俊 京都大学iPS細胞研究所
特定拠点教授

西田幸二 大阪大学大学院医学系研究科
脳神経感覚器外科（眼科学）
教授

大和雅之 東京女子医科大学 教授

山中伸弥 京都大学iPS細胞研究所 所長

研究協力者

松山晃文 先端医療振興財団 部長

A. 研究目的

ヒト幹細胞を用いた再生医療技術を臨床（治療）、疾患研究、創薬、検査等（以下、「臨床応用」と言う。）に対して早期の実用化を図り国民への技術還元を行うと共に、安全性・有効性をより高めるための革新的なヒト幹細胞に関する研究開発を持続的に行うことができる研究開発体制の構築を目的とする。

B. 研究方法

情報通信技術等を活用することによって、自律（自立）分散した研究機関の連携を図り、研究成果及び成果の効率的活用を可能とする研究開発機関間のオープンイノベーション環境を構築する。これにより継続的な新知見及び新技術創出、具体的研究データに基づく臨床のためのヒト幹細胞の品質（製造工程を含む。）基準等を得

て、より安全かつ有効で倫理面を考慮したヒト幹細胞を用いた再生医療の実用化を行う。

ヒト幹細胞を用いた再生医療研究における実験内容（作業の内容、状況等、計測結果、評価内容、結果等）等の研究情報を共通のデータベースに登録できる研究情報基盤構築（個々の研究者（グループ）の研究情報に対する内外からの漏えい等に対するセキュリティ対策を講じた基盤）のための実証的研究を中核としたこの基盤を活用して、登録された研究情報を「細胞採取」、「樹立」、「保存」、「分化誘導（調整）」、「搬送」、「臨床応用（移植）」、「体内動態」、「廃棄」等の担当拠点を設定し、いくつかの分野で評価分析することによって作成される細胞の採取から移植後までの各段階及び総合的な評価を行うための検査項目、判断基準値の仮説等を実際の研究に基づき導き出した。

また来年度は今年度にインタビューを実施できなかった領域を中心にインタビューを行い、より広い領域で検査項目、判断基準等の仮説を構築していく。

また、複数の拠点機関よりデータをいただき、以下の3つの解析を行った。① iPS細胞、iPS細胞由来神経堤細胞、iPS細胞由来内皮様細胞、培養角膜内皮細胞のRNA-Seqデータを比較し、それぞれの細胞に特異的に発現しているmiRNA群の特定、②様々な組織由来のiPS細胞におけるDNAメチル化状態の経時変化データの解析、③造血幹細胞と造血前駆細胞のRNA-Seqデータをもとに、遺伝子ネットワークの変化を分析。これにより、生データの再解析からみえる諸問題の洗い出し、包括的でより深化したデータ解析法、効率的な細胞分化制御のための新たな方法論、などのディスカッションを行った。

さらに、中核機関にパイロット的に情報機器を導入した後、より本格的な情報基盤構築の第一弾として、受け入れ態勢が整った4拠点と、札幌のデータセンターに比較的大型の情報機器を導入し、セキュアなネットワークで接続することで、各拠点機関において産出された実験情報を、半自動的に収集するための基盤システムを構築した。システムをうまく活用するために必要なソフトウェアなどの整備も開始した。

（倫理面への配慮）

本研究においては、個別研究における数値情報、評価情報等を取り扱うことから、個人情報等の利用が研究遂行上で必須になる可能性は少ないと考えられるが、研究者等の個人情報や、ヒト細胞提供を行っていただいた方の情報が含まれることから被調査対象者等に対しては、口頭及び書面による研究の趣旨等に関してインフォームドコンセントを行ったうえ、書面による同意を得た者のみを調査の対象とする。また、研究における個人情報にかかわる情報については調査票及びデータ等に関する管理を厳重に行い、漏洩等不測の事態に備えるものとする。尚、本研究における個人情報を含む調査等に関しては、それぞれの研究者の所属する機関の倫理審査委員会等の承認を得た上で実施するものとする。

C. 研究結果

1. 中核機関における研究結果

中核機関では、後述の全体システム構築に関わる研究のほか、以下の研究を行った。まず、再生医療臨床化の研究を加速するために必要不可欠な情報基盤構築に必要な情報を収集すると同時に、その試行形態として再生医療研究者と

ゲノム解析研究者による共同研究体制を整えた。情報収集については、市販の電子ラボノートや研究支援システムなどの情報を収集すると同時に、研究者及びシステム専門家らのインタビューを行い、最適なシステムの段階的構築を目指し、継続して検討を行っている。

さらに、共同研究体制によって、再生医療研究者から提供されたデータのパイロット研究を行った。今年度は主に2名の研究分担者から、ゲノム解析データの提供を受け、独自開発した解析手法により分析を行い、再生医療研究者だけでは得られなかった結果を得ることができた。（詳細については、分担者としての研究結果報告を参照）

これらのアクティビティから、早期の臨床応用に向けた課題整理を行い、最終年度までの計画を策定するとともに、プロジェクト執行のための組織構築に着手し、次年度以降の研究体制を整備した。プロジェクト開始にあたり、一般への情報公開計画を策定し、プレスリリース、プレスカンファレンス、ウェブ等を通じ、研究内容を広報した。

2. システム基盤構築（繰越予算による）

システム基盤構築は、諸般の事情により予算を繰り越して、H24年度にまでまたがって行った。

構築したシステムは、中央のサーバを札幌のデータセンターに置き、それをVPN接続などのセキュアな方法により、各拠点機関に置いたサーバと接続して、各拠点機関から日々産出される実験データ等を、現場に負担をかけることなく収集することを可能にするように設計した。拠点に設置するサーバは設置場所にそれなりの水準を要求するため、まずは受け入れが可能であった4機関（大阪大学、慶応義塾大学、国立成育医療研究センター、東京女子医科大学先端生

命医科学研究所）に設置した。中核機関にもパイロット解析用サーバを導入した。拠点から入力されたデータは、適当な共有レベルを指定した後、中央のサーバに自動的に吸い上げられる。

上述の情報基盤を積極的に活用してもらうための入力方法として、日々の実験ノートの電子化に取り組んだ。具体的には、デジタルペンを用いて、専用の用紙に記入した実験記録を適当なキーワード付きの画像情報として自動的に取り込む方法と、市販の電子ラボノートソフトウェアを活用する方法である。いずれも各拠点に配布したスレート端末を通して活用してもらう形にしている。今後、実際に各拠点で利用していただいた使用感などに基づき、より使い易いシステムを模索していく。

また、このシステムへのデータ入力や、入力されたデータの管理、解析などを支援するためのソフトウェア開発を開始した。詳細は次年度以降の報告書で報告するが、3種類のソフトウェアの仕様を策定し、最初のバージョンをH24年度中に完成させた。H25年度以降、実際に拠点機関の研究グループに使っていただき、より良いものに改良していく。

3. 拠点機関による研究成果

本研究では、研究グループ全体として、さまざまなレベルでのデータ共有を図るための情報基盤を構築することを目的としているので、各拠点機関には基本的には自由に再生医療の先端的研究に取り組んでもらい、各自の分担分野の内容にかかわるデータを中心にデータの提供をお願いしている。従って、それぞれの拠点機関で行われた研究成果については、各機関でまとめられた報告を参照されたい。中核機関と各機関とのさまざまな形での共同作業については、上述した通りである。

D. 健康危険情報
特になし

E. 研究発表
1. 論文発表
特になし
2. 学会発表
特になし

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の臨床実用化研究事業）
分担研究報告書

研究分担者

梅澤明弘

（独）国立成育医療研究センター再生医療センター センター長

研究要旨

ヒト幹細胞を用いた再生医療技術の早期の実用化を図り国民への技術還元を行うと共に、安全性・有効性をより高めるための革新的なヒト幹細胞に関する研究開発を持続的に行うことができる研究開発体制の構築にむけ、ES細胞のマニピレーションに関する情報提供を行うことを目的とする。当該目的の達成のため、平成23年度においては、特にヒトES加工医薬品を対象とすることとし、マニピレーション（幹細胞機能維持・分化制御）に関して、製造工程などを含む品質管理についてデータベース構築をおこない、品質管理基準を策定することとした。今年度は、ヒトES加工医薬品の品質管理に関するパイロットスタディとして、次世代シーケンサー、超並列qRT-PCRを用いた遺伝子発現データの取得を開始した。解析に関する作業手順の明確化とデータ保管、管理に関する手順の文書化は、今後これらのデータの共有化を行う際に重要な意義を持つ。

A. 研究目的

ヒト幹細胞を用いた再生医療技術を臨床（治療）、疾患研究、創薬、検査等（以下、「臨床応用」と言う。）に対して早期の実用化を図り国民への技術還元を行うと共に、安全性・有効性をより高めるための革新的なヒト幹細胞に関する研究開発を持続的に行うことができる研究開発体制の構築にあたり、ES細胞のマニピレーションに関する情報提供を行う。

B. 研究方法

ヒトES加工医薬品を対象として、マニピレーション（幹細胞機能維持・分化制御）に関して、製造工程などを含む品質管理についてデータベース構築をおこない、品質管理基準を策定する。一

連の研究を通じて、安全かつ有効なヒトES加工医薬品を用いた再生医療の実用化を促進する。今年度は、ヒトES加工医薬品の品質管理に関するパイロットスタディとして、次世代シーケンサー、超並列qRT-PCRを用いた遺伝子発現データを取得する。メチル化解析も同時に行なっていく。さらに動物を用いた前臨床研究も開始する。これらのデータベース構築の際に、一次情報となる生データの記録、管理等についての検討を行う。

（倫理面への配慮）

国立成育医療研究センターでは「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づきヒトES細胞に関する医学研究が適性に行われるよう、ヒ

ト ES 細胞研究倫理審査委員会が組織されている。
ヒト ES 細胞研究に関する各種規程（「ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会規程」、「ヒト ES 細胞樹立に関する規程」、「ヒト ES 細胞分配に関する規程」、「ヒト ES 細胞使用に関する規程」）も整備され、機関全体として生命倫理及び医の倫理に基づき適切に行う（国立成育医療センターヒト ES 細胞研究倫理審査委員会：<http://www.ncchd.go.jp/essaibou/es.htm>）。申請者らは、当該センターが定期的（年 2 回以上）に開催している生命倫理に関する講演を受講し、適切な生命倫理観をみにつけ常に配慮し研究を実施する。

国立成育医療センター研究所（機関内番号 ES 倫 2）

文部科学大臣確認番号: 1 8 諸文科振第 8 3 2 号

C. 研究結果

次世代シーケンサー、超並列 qRT-PCR を用いた遺伝子発現データの取得、メチル化情報の取得を開始した。これらの一次情報となる生データの記録、管理等についての文書体系の構築に着手した。動物を用いた前臨床研究も開始することができた。解析、動物実験に関する作業手順の明確化とデータ保管、管理に関する手順の文書化は、今後これらのデータの共有化を行う際に重要な意義を持つ。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

特になし

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の臨床実用化研究事業）

分担研究報告書

研究分担者

岡野 栄之

慶應義塾大学医学部生理学 教授

研究要旨

本研究では、ヒト線維芽細胞から神経系細胞を iPS 細胞を経ずに短期間で誘導するシステムを確立し、その細胞における網羅的遺伝子発現解析およびゲノム安定性、iPS 細胞を経て誘導された神経系細胞と比較しながら安全性、有効性を解析することを目的としている。当該目的の達成に向け、本年度は、患者から採取することが比較的容易な細胞から目的の体性幹細胞あるいは体細胞へと直接に分化誘導を行うために、特定の組み合わせの転写因子群を細胞の用途に応じた適切な遺伝子導入法を用いて患者から採取した体細胞に遺伝子導入し、標的細胞の転写/翻訳ネットワークを直接的に制御することで目的細胞への分化誘導を迅速にかつ効率的に行う技術開発を開始した。体細胞からニューロン・運動ニューロン・神経幹細胞への直接誘導法の開発、多能性幹細胞からオリゴデンドロサイトへの効率的な誘導法の開発を行うとともに、体細胞から直接誘導した神経系細胞の網羅的遺伝子発現の検討誘導された細胞の移植後生体内挙動をモニターする方法の検討を開始したところである。

A. 研究目的

再生医療の実用化において、iPS 細胞は極めて有用なツールとして期待されている。患者自身の細胞から iPS 細胞を経て神経系の細胞を誘導することにより、その細胞を患者本人へと移植を行う細胞移植治療と、誘導された細胞を正常対照細胞と比較することによる疾患研究、創薬研究が発展することが期待されている。しかしながら、ヒト多能性幹細胞(ES 細胞/iPS 細胞)は概して培養皿中での分化速度が極めて遅く、成体に存在する体細胞へと分化させるためには数ヶ月の培養期間を有する場合もあり、急性疾患に対する細胞移植においては移植細胞の準備を待つ間に病態が慢性化し

細胞移植が無効となるケースがあり得る。例えば我々はこれまで脊髄損傷に対して細胞移植が有効であるかを検討してきたが、齧歯類モデルにおいては受傷後 10 日を過ぎると細胞移植の効果が次第に減少し無効となる。さらに、我々のこれまでの研究で、iPS 細胞はクローンごとの分化能および腫瘍形成能に大きな差があり、安全で効率よく目的細胞に分化する iPS 細胞のクローンを選択するためにはかなりの時間を要することが明らかになっている。これらの点で現状の iPS 細胞樹立と分化誘導システムを用いた自家細胞移植治療は、細胞を調整するための期間が極めて長く、病状が

変化しうる疾患に対応させることが困難である。この問題点は同様に疾患 iPS 細胞を用いた研究においても律速段階となっている。本分担研究では、ヒト線維芽細胞から神経系細胞を iPS 細胞を経ずに短期間で誘導するシステムを確立し、その細胞における網羅的遺伝子発現解析およびゲノム安定性、iPS 細胞を経て誘導された神経系細胞と比較しながら安全性、有効性を詳細に解析する。また、移植後の生体内での動態のイメージングによる観察技術の開発についての基盤的な研究を行う。

B. 研究方法

患者から採取することが比較的容易な細胞から目的の体性幹細胞あるいは体細胞へと直接に分化誘導を行うために、特定の組み合わせの転写因子群を細胞の用途に応じた適切な遺伝子導入法を用いて患者から採取した体細胞に遺伝子導入し、標的細胞の転写/翻訳ネットワークを直接的に制御することで目的細胞への分化誘導を迅速にかつ効率的に行う技術を確立する。誘導する細胞として高いニーズが予想される神経系細胞は、パーキンソン病で特異的に障害されるドパミン作動性ニューロン、筋繊維軸索硬化症や脊髄損傷の治療に有用性が高いと期待される運動ニューロン、脊髄小脳変性症の病変部位である小脳プルキンエ細胞であると考え、これらの細胞への迅速な誘導法を開発する。一方、中枢神経系での神経再生においては、グリア細胞が神経細胞伝達を積極的に制御し重要な機能を担っていると考えられていることから、オリゴデンドロサイトへの直接的な誘導についても開発を行う。本研究で確立される体細胞から目的細胞への直接誘導法の一部は、すでに樹立されたヒト多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) から同種の目的細胞への分化誘導技術にも応用可能であることが予想されるため、再生医療に向けた細胞調整の技術が大幅に進歩することが期待される。本誘導法により分化させた細胞の分子生物学的評価は、①MiSeq を用いた miRNA プロファイリング

②Genome Analyzer を用いた RNAseq 解析といった手法を用いて遺伝子発現をゲノムワイドに調べることで、従来の方法で多能性幹細胞から誘導された細胞との比較による安全性および有効性の検討を中心に行う。さらに増殖能のある誘導神経幹細胞においては、我々がこれまで多能性幹細胞から誘導した神経幹細胞で同定したゲノム不安定化因子群の遺伝子変動を指標として安全性を慎重に評価する。同時に本誘導系の確立とトランスクリプトームデータベースは、神経疾患由来細胞と正常対照細胞の比較による病態解明研究への適応も期待される。

また、誘導された細胞の細胞移植における有効性を検討するため、動物への移植後の生体内の挙動を、我々が開発したフェリチン (human ferritin heavy chain; hFTH) 遺伝子および、発光タンパク質・蛍光タンパク質の融合タンパク質を同時に移植細胞に導入する方法によりモニターする。hFTH は MRI で、発光タンパク質は ATPase 活性のある生存細胞を Bioimaging で、蛍光タンパク質は免疫染色でそれぞれ導入細胞を同定可能となり、3種類の評価法におけるの相関を検討することができる。なかでも MRI を用いたフェリチンの検出は、貴重な移植動物内の移植細胞を非侵襲的に高解像度で検出することを可能にし、実際に患者に応用できる可能性を持った技術である。

(倫理面への配慮)

動物の飼育・管理は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して行われている。また、当研究室におけるヒト ES 細胞の使用については、文部科学省の「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき、平成19年10月31日に「ヒト胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学の基礎的研究」として承認され、研究計画はそれに準拠したものとなっている。患者からの iPS 細胞および神経系細胞の樹立は「神経疾患患者からの iPS 細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する

る研究」として慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を受けており（2008年6月）、十分な説明の上で患者の同意の下で行われる。他施設との共同研究においては当該施設においても倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

(1) 再生医療を目指した体細胞からニューロンへの直接誘導法の開発

2010年に Wering らにより発表された線維芽細胞から直接誘導されたニューロン(iN 細胞)は、遺伝子導入にレンチウイルスベクターを使用しているため、再生医療には適さないと考えられている。ゲノムへの遺伝子挿入の無い遺伝子導入法が iN 細胞の誘導に使用できるかを検討した。iN 細胞誘導因子 (Ascl1、Brn2、Myt11 もしくは Zic1) を強制発現するレンチウイルスベクター、センダイウイルスベクター、アデノウイルスベクターを構築した。レンチウイルスベクターを用いた iN 細胞誘導はマウスおよびヒト細胞で iN 細胞を誘導することが可能であった。現在、同様の培養条件でセンダイウイルスベクター、アデノウイルスベクターを用いて iN 細胞が誘導可能かを検討している。

(2) 体細胞から運動ニューロンへの直接誘導法の開発

Hester らにより報告されたヒト多能性幹細胞から運動ニューロンを高効率に誘導する転写因子の組み合わせ (Ngn2、Lhx3、Isl1、Hb9) を強制発現するレンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターを構築した。現在、ヒト ES 細胞にこれらのベクターを用いて運動ニューロンへ効率よく誘導する方法を検討している。また、これらを iN 誘導因子と併用して用いることにより、線維芽細胞から直接運動ニューロンを短期間で誘導することを試みている。

(3) 多能性幹細胞からオリゴデンドロサイトへ

の効率的な誘導法の開発

ヒト iPS 細胞から胚様体・神経幹細胞・オリゴデンドロサイト前駆細胞を介して、成熟オリゴデンドロサイトを誘導する培養系を確立した。しかしながら、この方法では誘導に約 100 日の培養期間を要することから、転写因子導入を併用した効率的な誘導法の開発を試みている。誘導に必要と考えられる転写因子候補を発現するレンチウイルスベクターの作成を完了した。

(4) 体細胞から神経幹細胞への直接誘導法の開発

我々はヒト線維芽細胞に山中 4 因子 (Oct4, Klf4, Sox2, cMyc) を導入し部分的にリプログラミングさせた細胞を直接神経分化させることにより神経幹細胞を短期間に得る方法を確立した (Matsui et al. Stem Cells, in press)。この方法を改良し、さらに誘導効率を高める培養方法を検討中である。

(5) 体細胞から直接誘導した神経系細胞の網羅的遺伝子発現の検討

直接誘導された細胞の分子生物学的品質評価のための網羅的な miRNA プロファイリングのために MiSeq 次世代シーケンサーを導入した (イルミナ社)。現在テストランを行い、H24 年度以降に順次誘導された細胞を解析していく予定である。

(6) 誘導された細胞の移植後生体内挙動をモニターする方法の検討

hFTH を多能性幹細胞から誘導した神経幹細胞に導入し、移植細胞を 3 種類の評価法 (MRI, Bio-imaging, 免疫染色) を用いて検出を行い比較検討した。MRI を用いたフェリチンが MRI の T2 強調画像において低信号で描出され検出可能であることを確認した。フェリチンを用いた方法が従来の方法よりも非侵襲的に高解像度で移植細胞を検出することが可能であることを明らかにした。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, Fujiyoshi K, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Yamanaka S, Masaya N, Okano H. : Grafted human induced pluripotent stem cell-derived neurospheres promotes motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108(40):16825-30, 2011
- (2) 2. Yagi T, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Yoshizaki T, Yamanaka S, Okano H, Suzuki N. : Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet.* 20(23):4530-39, 2011
- (3) Renault-Mihara F, Katoh H, Ikegami T, Iwanami A, Mukaino M, Yasuda A, Nori S, Mabuchi Y, Tada H, Shibata S, Saito K, Matsushita M, Kaibuchi K, Okada S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. : Beneficial compaction of spinal cord lesion by migrating astrocytes through glycogen synthase kinase-3 inhibition. *EMBO Mol Med.* 3(11):682-96, 2011
- (4) 4. Fujioka M, Tokano H, Fujioka-Shiina K, Okano H, Edge A.S. : Cre/lox mediated in vivomosaic cell ablation to generate novel models for early stages of degenerative disease and tissue repair. *J. Clin. Invest.* 121(6):2462-2469, 2011
- (5) 5. Kubota Y, Hirashima M, Takubo K, Nagoshi N, Kishi K, Murakami M, Shibuya M, Takakura N, Okano H, Suda T. : Isolation and function of mouse tissue resident vascular precursors marked by myelin protein zero. *J. Exp. Med* 208(5):949-960, 2011
- (6) 6. Ishizuka K, Kamiya A, Oh EC, Kanki H, Sehadri S, Robinson J, Murdoch H, Dunlop AJ, Kubo KI, Furukori K, Huang B, Zeledon M, Hayashi-Takagi A, Okano H, Nakajima K, Houslay MD, Katsanis N, Sawa A. : DISC1-dependent switch from progenitor proliferation to migration in the developing cortex. *Nature* 473(7345):92-96, 2011
- (7) 7. Nagoshi N, Shibata S, Nakamura M, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Toyama Y, and Okano H: Schwann Cell Plasticity After Spinal Cord Injury Shown by Neural Crest Lineage Tracing. *Glia* 59(5):771-84, 2011
- (8) 8. Sawamoto K, Hirota Y, Alfaro-Cervello C, Soriano-Navarro M, He X, Hayakawa-Yano Y, Yamada M, Hikishima K, Tabata H, Iwanami A, Nakajima K, Toyama Y, Itoh T, Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, and Okano H: Cellular composition and organization of the subventricular zone and rostral migratory stream in the adult and neonatal common marmoset brain. *J. Comp. Neurol.* 519(4):690-713, 2011
- (9) 9. Matsui T, Takano M, Yoshida K, Soichiro Ono, Fujisaki C, Matsuzaki Y, Toyama Y, Nakamura M, Okano H, Akamatsu W.: Neural stem cells directly differentiated from partially reprogrammed fibroblasts rapidly acquire gliogenic competency. *Stem*

- Cells. In press
- (10) Ohta S, Misawa A, Fukaya R, Miyoshi H, Okano H, Kawakami Y, Toda M.: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival and proliferation of neural stem/progenitor cells. *J Cell Sci*. In Press
- (11) Muto J, Imai T, Ogawa D, Nishimoto Y, Okada Y, Mabuchi Y, Kawase T, Iwanami A, Mischel PS, Saya H, Yoshida K, Matsuzaki Y, Hideyuki Okano H.: RNA-binding protein Musashi1 modulates glioma cell growth through the post-transcriptional regulation of Notch and PI3 kinase/Akt signaling pathways. *PLoS ONE* In Press
- (12) Hara-Miyauchi C, Tsuji O, Hanyu A, Okada S, Yasuda A, Fukano T, Akazawa C, Nakamura M, Imamura T, Matsuzaki Y, Okano HJ, Miyawaki A and Okano H.: Bioluminescent system for dynamic imaging of cell and animal behavior. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Feb 5. [Epub ahead of print]
- (13) Nakamura-Ishizu A, Kurihara T, Okuno Y, Ozawa Y, Kishi K, Goda N, Tsubota K, Okano H, Suda T, Kubota Y. The formation of an angiogenic astrocyte template is regulated by the neuroretina in a HIF-1-dependent manner. *Dev. Biol.* 363(1):106-114, 2012.
- (14) Lin ZY, Imamura M, Sano C, Nakajima R, Suzuki T, Yamadera R, Takehara Y, Okano HJ, Sasaki E, Okano H.: Molecular signatures to define spermatogenic cells in common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Reproduction* 2012 Feb 8. [Epub ahead of print]
- (15) Okano H, Nakamura M, Yoshida K, Okada Y, Tsuji O, Nori S, Ikeda E, Yamanaka S, Miura K.: Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circulation Research*, In Press
- (16) Kawahara H, Imai T, Okano H.: MicroRNAs in neural stem cells and neurogenesis. *Frontiers in Neurogenesis*, In Press
- (17) Matsui T, Takano M, Yoshida K, Ono S, Matsuzaki Y, Yoshiaki Toyama Y, Nakamura M, Okano H, Akamatsu W: Neural stem cells directly differentiated from partially reprogrammed fibroblasts rapidly acquire gliogenic competency. *Stem Cells*, 2012. In Press

2. 学会発表

- (1) 岡野栄之：iPS 細胞及び遺伝子改変霊長類遺伝子を用いた神経系の再生・疾患・創薬研究：筑波大学・生命科学動物資源センター10周年シンポジウム, 2012. 2. 7* 会期 2012. 2. 7 (筑波大学健康医科学イノベーション棟、つくば)
- (2) 岡野栄之：iPS 細胞と霊長類遺伝子改変技術を用いた脳科学研究：第2回鶴友エビリファイフォーラム, 2012. 2. 14 *会期 2012. 2. 1 名古屋大学・鶴友会館、名古屋)
- (3) 岡野栄之：iPS 細胞を用いた神経再生・疾患・創薬研究：第4回ヘルシイエイジング学会学術集会・特別講演, 2012. 2. 17 *会期 2012. 2. 17 (東京女子医科大学・早稲田大学連携先端生命医学研究教育施設、東京)

- (4) 岡野栄之 : Brain Science using iPScell technology and transgenic non-human primates. : GCOE 第 4 回 NAGOYA グローバルリトリート, 2012.2.24 *会期 2012.2.24-25 (愛知健康プラザ、愛知県知多郡東浦町)
- (5) 岡野栄之 : iPS 細胞を用いた神経系の再生・疾患・創薬研究 : 第 28 回神奈川脳卒中フォーラム・特別講演 2012.2.24 *会期 2012.2.24 (ホテルキャメロットジャパン、横浜)
- (6) 岡野 栄之 : iPS 細胞技術を用いた神経疾患の病態解明 大阪大学蛋白質研究所セミナー2012.3.2
- (7) 岡野 栄之 : *iPS 細胞を用いた神経再生・創薬研究* 第 85 回日本薬理学会 2012.3.16*

出 願 人 : 独立行政法人科学技術振興機構

発 明 者 : 岡野栄之、島崎琢也

(3)

発明の名称 : 神経幹細胞の生存及び/又は増殖及び神経突起伸張を促進する方法並びに促進剤、神経幹細胞を含む医薬組成物、検定方法、スクリーニング方法

出願番号 : 04787726.1 出願日 : 2004/9/8

特許番号 : 1674566

取 得 日 : 2011/04/13

国 名 : 欧州 (イギリス ドイツ フランス)

出 願 人 : 学校法人慶應義塾

発 明 者 : 岡野栄之、坂口昌徳、岡野ジェイムズ
洋尚、水澤 英洋、石橋 哲

【国内】 1 件

(1)

発明の名称 : シグナル伝達系活性化剤

出願番号 : 日本 特願 2006-104610

出 願 日 : 2006/4/5

特許番号 : 特許査定

取 得 日 : 特許査定

国 名 : 日本

出 願 人 : 学校法人慶應義塾 独立行政法人産業
技術総合研究所

発 明 者 : 岡野栄之、坂口昌徳、澤本和延

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

【国外】 3 件

(1)

発明の名称 : インターロイキン-6 アンタゴニスト
を含有する脊髄損傷治療剤

出願番号 : 170399 出願日 2001/10/3

特許番号 : 170399

取 得 日 : 2011/05/29

国 名 : イスラエル

出 願 人 : 中外製薬 (株)、学校法人慶應義塾

発 明 者 : 岡野栄之、岡田誠司、中村雅也、吉崎
和幸

(2)

発明の名称 : 胚性幹細胞からの神経幹細胞、運動
ニューロン及び GABA 作動性ニューロンの製造法

出願番号 : 2443151 出願日 : 2011/06/07

特許番号 : 2443151

取 得 日 : 2011/06/07

国 名 : カナダ

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の臨床実用化研究事業）
分担研究報告書

研究分担者

高橋 政代

独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター
網膜再生医療研究チーム チームリーダー

研究要旨

ヒト iPS 細胞から網膜色素上皮細胞へ分化誘導し、安全な移植治療技術確立のために得られた研究情報を広く活用することで、多施設間の連携・協力を促進し、研究開発支援体制の強化と再生医療実用化に必要となる環境の実現が可能となる。当該目標の達成のため、本年度においては、様々な iPS 細胞のラインから分化誘導した網膜色素上皮細胞について、その作製法によって最終産物の網膜色素上皮細胞の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにて検討し、同等性の確認や品質管理に応用するためのデータ蓄積を行った。これら成果をもとに、作製法と製造過程の手技との相関を検討し、データの集積・解析を行うことで iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の移植治療の安全性と安定性を確保するために必要と考えられる情報収集システムの構築にむけ準備を開始した。

A. 研究目的

ヒト幹細胞を用いた再生医療技術を臨床（治療）、疾患研究に対して早期の実用化を図り、安全性・有効性をより高めるための革新的なヒト幹細胞に関する研究開発を持続的に行うことができる研究開発体制構築を目指す。

ヒト iPS 細胞から網膜色素上皮細胞へ分化誘導し、安全な移植治療技術確立のために得られた研究情報を広く活用することで、多施設間の連携・協力を促進し、研究開発支援体制の強化と再生医療実用化に必要となる環境の実現が可能となる。

B. 研究方法

様々な iPS 細胞のラインから分化誘導した網膜色素上皮細胞について、その作製法によって最終産物の網膜色素上皮細胞の遺伝子発現プロファイルを検討し、同等性の確認や品質管理に応用するためデータの蓄積を行う。

また、作製法と製造過程の手技との相関を検討し、データの集積・解析を行うことで iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の移植治療の安全性と安定性を確保する。

具体的には、今年度は様々な iPS 細胞のラインから網膜色素上皮細胞を分化誘導し、分化誘導した網膜色素上皮細胞の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイで検出するためのサンプル収集を行う。

(倫理面への配慮)

本研究においては、個別研究における数値情報、評価情報等を取り扱うことから、個人情報等の利用が研究遂行上で必須になる可能性は少ないと考えられるが、研究者等の個人情報や、ヒト細胞提供を行っていただいた方の情報が含まれることがあることから被調査対象者等に対しては、口頭及び書面による研究の趣旨等に関してインフォームドコンセントを行ったうえ、書面による同意を得た者のみを調査の対象とする。また、研究についての個人情報にかかわる情報については調査票及びデータ等に関する管理を厳重に行い、漏洩等不測の事態に備えるものとする。尚、本研究についての個人情報を含む調査等に関しては、それぞれの研究者の所属する機関の倫理審査委員会等の承認を得た上で実施するものとする。

また、使用する iPS 細胞は患者由来皮膚細胞を用いるが、すでに患者 iPS 細胞作製研究は先端医療センター病院、理化学研究所のそれぞれの倫理委員会の承認を受けており、iPS 細胞作製のために提供された患者皮膚細胞は遺伝カウンセラーと研究分担者が先端医療センター病院において説明し、インフォームドコンセントを得た後、採取、連結可能匿名化され研究に携わる人員は個人情報を知り得ないしくみになっている。

C. 研究結果

様々な iPS 細胞のラインから分化誘導した網膜色素上皮細胞について、その作製法によって最終産物の網膜色素上皮細胞の遺伝子発現プロファイルを検討し、同等性の確認や品質管理に応用するためのデータ蓄積を行った。

また、作製法と製造過程の手技との相関を検討し、データの集積・解析を行うことで iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の移植治療の安全性と安定性を確保するために必要と考えられる情報収集システム

構築の準備を開始した。

具体的には、実験従事者が実施する個別の培養条件や手技、培養細胞の種別など培養に影響を及ぼすと想定されるデータを詳細に記録し、そのデータを統計解析することでより安全で確実な培養条件と手技の確立を目指すものであり、今年度は様々な iPS 細胞のラインから網膜色素上皮細胞を分化誘導し、分化誘導した網膜色素上皮細胞の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイで検出した。

今後、集積データから得られた結果を解析検討することで細胞の差異を見極め、細胞移植治療に適した細胞ライン、継代回数などの条件の確定を目指す。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表
特になし
2. 学会発表
特になし

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の臨床実用化研究事業）
分担研究報告書

研究分担者

中井 謙太

東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

中核機関において、再生医療における研究情報を適正に管理するためのアーキテクチャ設計のためのデータ収集やインタビューを行い、モデルタイプとなるような領域において、標準プロセスや品質等一部の評価基準案の初期仮説を構築した。また、複数拠点機関よりデータをいただき、以下の解析を行った。① iPS 細胞、iPS 細胞由来神経堤細胞、iPS 細胞由来内皮様細胞、培養角膜内皮細胞の RNA-Seq データを比較し、それぞれの細胞に特異的に発現している miRNA 群の特定、②様々な組織由来の iPS 細胞における DNA メチル化状態の経時変化データの解析、③造血幹細胞と造血前駆細胞の RNA-Seq データをもとに、遺伝子ネットワークの変化を分析した。これにより、生データの再解析からみえる諸問題の洗い出しや包括的でより深化したデータ解析法などのディスカッションを行った。なお、研究班全体にかかわるシステム構築に関しては総括報告書に記した。

A. 研究目的

ヒト幹細胞を用いた再生医療技術を臨床（治療）、疾患研究、創薬、検査等（以下、「臨床応用」と言う。）に対して早期の実用化を図り国民への技術還元を行うと共に、安全性・有効性をより高めるための革新的なヒト幹細胞に関する研究開発を持続的に行うことができる研究開発体制の構築を目的とする。

B. 研究方法

本研究遂行にあたって、3つの側面からアプローチをした。まず、各分担研究者（あるいは情報提供機関）からの生データを、なるべく現場の研究者の負担をかけない形で、さらには現場やラボ

の責任者にもメリットが実感でもらえるような形で収集するにはどのような方式がよいのかという観点。次に、収集されたデータをどのような形で格納し、検索できるようにするのかというシステム設計と構築の観点（データのセキュリティ管理の問題はここに含まれる）。最後に、収納されたデータからどのように有用な情報を引き出すのかというデータ解析の観点である。この最後の観点は、研究分担者をはじめとするデータ提供機関にデータを共有化するメリットを実感させ、今後の緊密な協力体制を構築して行く上で非常に重要であると考えた。そこで、今年度は主に2名（間接的な提供まで含めると3名）の分担者から、ゲノム解析データの提供を受け、独自の観点からの