

2012) .

- 14) 中畑龍俊、丹羽明：幹細胞増幅、第10章 内科疾患と再生医療、カラー版内科学、門脇孝、永井良三（総編集）、p447-450, 2012, 西村書店、東京.
- 15) 斎藤潤、中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞. 再生医療 12(1):19-29,2013.

2. 学会発表

【国際学会】

- 1) Manabe A, Kikuchi A, Kojima S, Tsuchida M, Hayashi Y, Koike K, Ohara A, Ishii E, Komada Y, Nakahata T: Long-term follow-up of more than 545 children with myelodysplastic syndrome (MDS) and myeloproliferative neoplasms(MPN). VI International Symposium on Myelodysplastic Syndromes and Bone Marrow Failures in Childhood, November 7-9, 2012, Prague
- 2) Honda Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Kojima S, Ito M, Kikuchi A, Nakahata T, Manabe A: Clinic characteristics of 23 children with juvenile myelomonocytic leukemia who developed blast crisis: MDS Committee of LSPHO. VI International Symposium on Myelodysplastic Syndromes and Bone Marrow Failures in Childhood, November 7-9, 2012, Prague
- 3) Hasegawa D, Chen X-j, Hirabayashi S, Ishida Y, Watanabe S, Zaiki Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A: Treatment outcome of 67 cases with refractory cytopenia of childhood(RCC): A Prospective Registration Through The Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology(JSPHO). VI International Symposium on Myelodysplastic Syndromes and Bone Marrow Failures in Childhood, November 7-9, 2012, Prague
- 4) Tomizawa D., Tawa A., Watanabe T., Saito A.M., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., MD, Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Koh K., Kigasawa H., Kosaka Y., Miyachi H., Horibe K., Nakahata T., Adachi S.: Excess reduction of anthracyclines results in inferior event-free survival in core binding factor acute myeloid leukemia in children; A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). 54th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 8-11, 2012, Atlanta.
- 5) Suzuki N., Hira A., Niwa A., Saito M., Matsuo K., Nakahata T., Takata M., Yabe M.: Mesodermal development from reprogrammed Fanconi anemia cells is affected by ALDH2 enzymatic activity. 54th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 8-11, 2012, Atlanta
- 6) Yagasaki H., Watanabe K., Kudo K., Tsuchida M., Shichino H., Morimoto A., Kobayashi R., Yabe H., Kikuchi A., Ohga S., Ito E., Ohara A., Nakahata N., Kojima S.: Immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin and Cyclosporine for fulminant aplastic anemia. 54th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 8-11, 2012, Atlanta
- 7) Tomizawa D., Tawa A., Watanabe T., Saito A.M., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Koh K., Kigasawa H., Kosaka Y., Miyachi H., Horibe k., Nakahata T., Adachi S.: Appropriate dose modification in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia; A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). 54th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 8-11, 2012, Atlanta

8) Hasegawa D., Tawa A., Tomizawa D., Watanabe T., Saito A., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Koh K., Kigasawa H., Kosaka Y., Miyachi H., Horibe K., Nakahata T., Adachi S.: Attempts to optimize post-induction treatment in childhood acute myeloid leukemia without core binding factors: A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). 54th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 8-11, 2012, Atlanta

【国内学会】

1) 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞研究の今、その可能性と将来展望. 第 115 回日本小児科学会学術集会 2012 年 4 月 20 日 福岡国際会議場 福岡市

2) 井澤和司、土方敦司、西小森隆太、小原収、田中尚子、河合朋樹、八角高裕、斎藤潤、中畑龍俊、平家俊男：次世代シーケンサーによる NLRP3 体制モザイクの診断. 第 115 回日本小児科学会学術集会 2012 年 4 月 20-22 日 (21 日) 福岡国際会議場 福岡市 (口演)

3) 石田宏之、今井耕輔、本間健一、田村真一、今村俊彦、斎藤潤、大嶋宏一、伊藤雅文、中畑龍俊、野々山恵章：白血球減少、骨髓異形成とリンパ浮腫を呈する GATA-2 異常. 第 115 回日本小児科学会学術集会 2012 年 4 月 20-22 日 (21 日) 福岡国際会議場 福岡市 (口演)

4) Yanagimachi M, Niwa A, Tanaka T Oshima K, Saito M Nakahata T: Differentiation of monocytic lineage cells from human iPS cells by using a serum and feeder free culture method. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.

5) Niwa, Akira, Saito, Megumu, Oshima, Koich,

Yanagimachi, Masakatsu, Tanaka, Takayuki, Kato, Itaru, Nakahata, Tatsutoshi: Human ESC/IPSC-Derived mesenchymal stroma can support hematopoietic progenitors. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.

6) Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Tanaka T, Saida S, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Matsubara K, Adachi S, Nakahata T, Heike T: Induced pluripotent stem cell model of severe congenital neutropenia with HAX1 gene deficiency. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.

7) Yokoyama K, Ikeya M, Nasu A, Tanaka T, Saito M, Umeda K, Nishikomori R, Nakahata T, Heike T, Toguchida J: Understanding the pathology of the arthropathy in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome by using iPS cells technology. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.

8) Tanaka T, Saito MK., Takahashi K, Yamanaka S, Nakahata T: Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.

9) 中畑龍俊：特別講演、患者さんから樹立する iPS 細胞を用いた今後の小児医療. 第 8 回医学生・若手医師のための小児科診療最前線 2012 年 6 月 23 日 きたのホール、大阪

10) 川村晃久、十河孝浩、上辻麻子、加藤格、長

- 谷川浩二、戎家美紀、西田栄介、中畑龍俊：表面マーカーによる初期化成功予測因子の解析．第33回日本炎症・再生医学会 2012年7月5-6日(5日) ホテル日航福岡(ポスター)
- 11) 川村晃久、十河孝浩、尾野亘、加藤格、長谷川浩二、中畑龍俊：初期化誘導過程で出現する心筋前駆様細胞を用いた安全かつ効率的な心筋再生療法の確立．第33回日本炎症・再生医学会 2012年7月5-6日(5日) ホテル日航福岡(ポスター)
- 12) 井澤和司、西小森隆太、吉岡耕平、斉藤潤、中畑龍俊、平家俊男：CINCA 症候群におけるNLRP3 体細胞モザイク変異．第33回日本炎症・再生医学会 2012年7月5-6日(5日) ホテル日航福岡(ポスター)
- 13) 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞を用いた今後の医療の可能性．第23回小児科血液セミナー 2012年7月19日 広島
- 14) 中畑龍俊：招待講演、難治性血液疾患と iPS 細胞．再生つばさの会(再生不良性貧血、骨髄異形成症候群、発作性夜間ヘモグロビン素尿症患者・家族の会)「横浜医療講演会」 2012年9月8日 神奈川県総合薬事保健センター
- 15) 中畑龍俊：教育講演、小児患者における iPS 細胞の応用．第49回日本小児アレルギー学会 2012年9月16日 大阪国際会議場
- 16) 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞の今とこれから．第一回市民公開講座「iPS 細胞こんにちは！～さい帯血は生命のお母さん～」 2012年11月29日 よみうりホール(東京)
- 17) 中畑龍俊：招請講演、iPS 細胞研究の進展．第59回日本臨床検査医学会学術集会 2012年11月29日～12月2日(11/30) 国立京都国際会館
- 18) 本田裕子、土田昌宏、増永敦子、吉見礼美、小島勢二、伊藤雅文、菊池陽、中畑龍俊、真部淳：経過中に急性転化した JMML23 例の検討；MDS 委員会のデータベースから(口演)
- 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 2012年11月30-12月2日(11/30) パシフィコ横浜会議センター
- 19) 才田聡、渡邊健一郎、佐藤亜以子、照井君典、吉田健一、奥野友介、土岐力、王汝南、白石友一、宮野悟、加藤格、森嶋達也、梅田雄嗣、平松英文、藤野寿典、足立壮一、丹羽明、中畑龍俊、伊藤悦朗、小川誠司、平家俊男：NOG マウスを用いた TAM の病態解析(口演) 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 2012年11月30-12月2日(12/2) パシフィコ横浜会議センター
- 20) Hasegawa D, Chen X-j, Hirabayashi S, Ishida Y, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A: Treatment outcome of refractory cytopenia of childhood(RCC):A prospective registration through the Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology(JSPHO) between 1999 and 2008.(ワークショップ) 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 2012年11月30-12月2日(12/2) パシフィコ横浜会議センター
- 21) Yagasaki H, Shichino H, Ohara A, Kudo K, Tsuchida M, Kobayashi R, Ito E, Watanabe K, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Ohga S, Nakahata T, Kojima S on behalf of Japanese Childhood Aplastic Anemia Study Group: Outcome of Immunosuppressive therapy in children with fulminant aplastic anemia. (ワークショップ) 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 2012年11月30-12月2日(12/2) パシフィコ横浜会議センター
- 22) 中畑龍俊：特別講演、患者さんから作成する iPS 細胞を用いた今後の医療．第6回高知県血液・細胞治療研究会 2012年12月15日、高知

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）

分担研究年度終了報告書

研究分担者

中辻 憲夫

京都大学 再生医科学研究所 教授

研究要旨

ヒト幹細胞を用いた再生医療の安全性・有効性を高める研究開発体制の構築を目的として、ヒト ES 細胞の臨床利用のために必要となるプロセス及び品質管理の各段階で収集されるデータを正確かつ効率的に収集し、詳細なインフォマティクス分析に供する。24年度は臨床用細胞バンク構築の工程管理システムを用い、臨床用バンク作製の実証実験を行いその過程で収集される分析結果やデータフォーマットの最適化を進めた。今後、より多くの事例についてデータを収集し分析を行うことにより、工程や品質管理の標準化、安全性の向上に寄与することが出来ると考えられる。

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

これまで、基礎研究用のヒト ES 細胞株の樹立と特性解析を行ってきた。そこで蓄積した培養/解析技術をもとに、臨床用ヒト ES 細胞株を作成・利用する上で必要となるプロセス及び品質管理の各段階で収集されるデータを効率良く活用するための検査項目・評価基準などの標準化を行うとともに、正確かつ効率的な実験データの記録方法を確立する。これらの研究から、さらに後工程で生じる問題からのフィードバックに対し、より迅速・適切な対応を可能とするシステムの構築を試みる。

（倫理面への配慮）

ヒト ES 細胞を用いる研究に関しては、文部科学省「ヒト ES 細胞の樹立および分配に関する指針」「ヒト ES 細胞の使用に関する指針」に従い実施された。

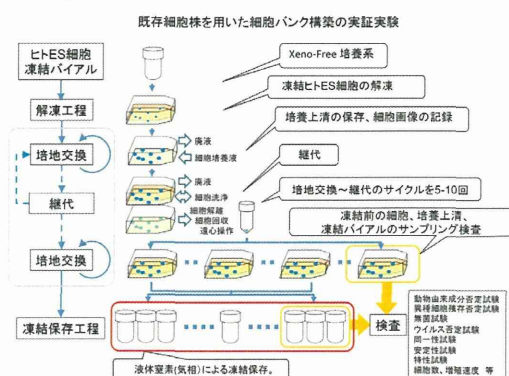
ヒト ES 細胞を用いる研究に関しては、文部科学省「ヒト ES 細胞の樹立および分配に関する指針」「ヒト ES 細胞の使用に関する指針」に従い実施された。

C. 研究結果

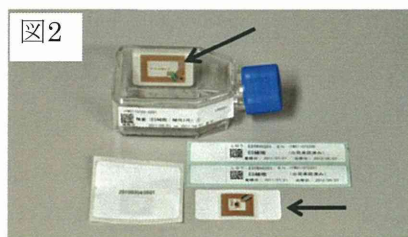
本分担研究を実施する京都大学再生医科学研究所では、基礎研究用のヒト ES 細胞株の樹立と特性解析を行ってきた。このような研究の過程で蓄積した培養/解析技術をもとに、臨床用ヒト ES 細胞株を作成・利用する上で必要となる細胞バンク構築のプロセス及び品質管理の方向性について検討を進めた。臨床用ヒト ES 細胞の樹立・培養の各段階で収集されるデータを効率良く活用するため、まず、既存の細胞株を利用し、動物由来成分

を含まない合成培地を用いるなど臨床用に近い培養システムでの実証実験を進めた(図1)。細胞バンクの構築を前提として、ロットスケールや検査項目の設定を行った。設定した培養条件下で実際の利用形態に近いと考えられるバンク構築の予備検討を行い、100バイアル程度のストック作製を行った。現在、凍結保存時の細胞について、細胞表面抗原や未分化特異的遺伝子の発現、核型などの解析を進めている。

図1



これにより、凍結保存サンプルを解凍後一定期間培養した後同様の試験を行うことで、ロット内の均一性を担保するために必要となる基準値の設定が可能となる。このためには、検査項目・評価基準などについて統計的妥当性をどのようにさだめるかについて、中核機関での分析が必要になると考えられる。検査結果などを含め、正確かつ効率的に各種操作プロセスや実験データを記録する方法や適切なデータフォーマットなどの検討を行った(図2)。



無線タグ(矢印)と2次元バーコード



無線タグへのread/write

これらに合わせて、作業が適切に実施されていることを担保するための工程管理システムは、これまでにほぼ完成しているが、工程の見直し、新規技術/分析法の導入などによりアップデートが必要になる。このような改変に関しても、データの効率的な収集・記録を行うことが必要である。

また、同様の臨床用細胞バンクの構築を目指す他機関の担当者との連携を含め、バンク構築の標準化について国際的な進行状況を含めて調査を進めている。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hasegawa, K., Yasuda, S., Teo, J.-L., Nguyen, C., McMillan, M., Hsieh, C.-L., Suemori, H., Nakatsuji, N., Yamamoto, M., Miyabayashi, T., Lutzko, C., Pera, M. F. and Kahn, M. Wnt signaling orchestration with a small molecule DYRK inhibitor provides long-term xeno-free human pluripotent cell expansion. *Stem Cells Translational Medicine* 1: 18–28 (2012)
- 2) Wada, T., Goparaju, S. K., Tooi, N., Inoue, H., Takahashi, R., Nakatsuji, N. and Aiba, K. Amyotrophic lateral sclerosis model derived from human embryonic stem cells overexpressing mutant superoxide dismutase 1. *Stem Cells Translational Medicine* 1: 396–402 (2012)
- 3) Otsuji, T. G., Kurose, Y., Suemori, H., Tada, M. and Nakatsuji, N. Dynamic Link between histone H3 acetylation and an increase in the functional characteristics of human ESC/iPSC -derived cardiomyocytes. *PLoS One* 7(9): e45010 (2012)
- 4) Minami, I., Yamada, K., Otsuji, T. G., Yamamoto, T., Shen, Y., Otsuka, S., Kadota, S., Morone, N., Barve, M., Asai, Y., Tenkova-Heuser, T., Heuser, J. E., Uesugi, M., Aiba, K. and Nakatsuji, N. A

Small Molecule that Promotes Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells under Defined, Cytokine- and Xeno-free Conditions. Cell Reports 2(5): 1448–1460 (2012)

- 5) Tsuneyoshi, N., Kim Tan, E. K., Sadasivam, A., Poobalan, Y., Sumi, T., Nakatsuji, N., Suemori, H., and Dunn, N. R.. The SMAD2/3 corepressor SNON maintains pluripotency through selective repression of mesendodermal genes in human ES cells. Genes Dev. 26: 2471-2476 (2012)
- 6) Kadota, S., Minami, I., Morone, N., Heuser, J. E., Agladze, K. and Nakatsuji, N. Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets. European Heart Journal | Published online 30 November 2012 | DOI: 10.1093/eurheartj/ehs418
- 7) Miyazaki, T., Futaki, S., Suemori, H., Taniguchi, Y., Yamada, M., Kawasaki, M., Hayashi, M., Kumagai, H., Nakatsuji, N., Sekiguchi, K. and Kawase, E. Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. Nature Communications 3: article number 1236 (2012)

2. 学会発表

- 1) 中辻憲夫 ランチョンセミナー「ヒト ES/iPS 細胞研究の現状と医学創薬応用への展望」第53回日本哺乳動物卵子学会 2012年4月1日 大阪千里
- 2) Norio Nakatsuji “Chemical control of human pluripotent stem cell differentiation and creation of neurodegenerative disease model cells” British Society for Developmental Biology, British Society for Cell Biology and Japanese Society of Developmental Biologists Joint Spring Meeting 2012年4月17日 Warwick (UK)
- 3) 中辻憲夫 「ヒト ES/iPS 細胞の細胞治療と創薬応用に向けた研究開発：化合物による幹細胞

制御と大量培養システムの技術開発」第11回日本再生医療学会総会 2012年6月13日 横浜

- 4) 中辻憲夫 ランチョンセミナー「ヒト多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)の再生医療・創薬応用—世界の現状と展望」日本薬物動態学会第27回年会 2012年11月20日 東京
- 5) 中辻憲夫 特別講演「ヒト ES/iPS 細胞研究の現状と医学創薬応用への展望」第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012年12月1日 大阪

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）

分担研究年度終了報告書

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、その細胞における詳細な性質を、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。本年度は転写因子を用いてヒト iPS 細胞から運動ニューロン、オリゴデンドロサイトを効率よく誘導する方法を確立した。また、マーマセット iN 細胞の誘導に世界で初めて成功した。センダイウイルスを用いてヒト線維芽細胞から iN 細胞、神経幹細胞を直接誘導することに成功した。円滑なデータ共有のため、国内再生医療拠点研究機関と中核機関・データセンターを結ぶ計算機ネットワークシステムへの構築を開始した。

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、創薬研究が進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。

具体的に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。

一方、プロジェクト全体の共通な目的として、上記の研究で得られたデータを4つの拠点研究機関と中核機関・データセンターを結ぶ計算機ネットワークシステムへの供与を行う。効率的なデータ収集・活用を行なうためのソフトウェア群を導入する。再生医療の臨床応用実用化に役立つ情報を積極的に収集し、公開するための準備を進める。

B. 研究方法

1. 転写因子を用いたヒト線維芽細胞からのニューロンの直接誘導

iN 細胞誘導因子 (Ascl1、Brn2、Myt11 もしくは Zic1) を強制発現する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、ヒト iN 細胞の誘導を試みた。

2. 転写因子を用いたマーモセット線維芽細胞からのニューロンの直接誘導

iN 細胞誘導 4 因子を強制発現するテトラサイクリン誘導型レンチウイルスベクターを構築し、マーモセット iN 細胞の誘導を試みた。

3. 転写因子を用いたiPS細胞から運動ニューロンへの迅速な誘導

運動ニューロンを誘導する転写因子 (Ngn2、Lhx3、Isl1、Hb9) を強制発現するアデノウイルスベクターを構築する。ヒト iPS 細胞へ導入することによりヒト iPS 細胞から運動ニューロンを短時間で効率よく誘導することを試みた。また、誘導した運動ニューロンのレポーターとして Hb9-GFP を発現するアデノウイルスベクターの構築を行った。

4. 転写因子を用いたヒトiPS細胞からのオリゴデンドロサイトの誘導

オリゴデンドロサイトを誘導すると考えられる転写因子候補 4 種 (新規の組み合わせ) を発現するレンチウイルスベクターを作製し、ヒト iPS 細胞に感染させオリゴデンドロサイトの誘導を試みた。

5. 転写因子を用いたヒト線維芽細胞からの神経幹細胞の直接誘導

ヒト線維芽細胞から短期間での神経幹細胞の直接誘導を目指した。我々がこれまで報告した方法 (Matsui et al.2012) の効率化と培養条件に関して検討を行った。

6. 転写因子を用いたヒトiPS細胞からのプルキンエ細胞の誘導

これまでヒト多能性幹細胞からのプルキンエ細胞の効率的な誘導法は世界的にも報告はない。

新規の誘導法を開発するため、誘導細胞のレポーターを作製することから着手した。マウス L7(Pcp2)プロモーターに RFP 遺伝子をつないだレポーターをトランスジェニックに導入したヒト

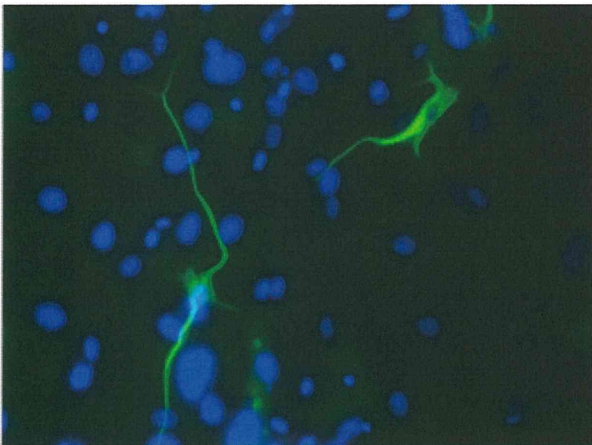
ES および iPS 細胞株を樹立することを試みた。平行してプルキンエ細胞への分化を促進する可能性のある転写因子群をテトラサイクリン誘導発現型レンチウイルスベクターとして構築を進めた。

7.上記の知見を共有するためのネットワーク構築と基幹サーバへのデータの供与

(倫理面への配慮)
特になし

C. 研究結果

1. iN 細胞誘導因子 (Ascl1、Brn2、Myt1l もしくは Zic1) を強制発現するセンダイウイルスをヒト線維芽細胞に感染させたところ、感染 12 日後には TuJ-1 陽性の直接誘導ニューロン (iN 細胞) が出現した。



ヒト線維芽細胞から誘導した iN 細胞
(緑 : TuJ-1)

2. マーモセット線維芽細胞に iN 細胞誘導 4 因子を発現するテトラサイクリン誘導型レンチウイルスを感染させ、Doxycycline を添加して発現を誘導したところ、誘導 21 日後に Synapsin-GFP で標識される iN 細胞が直接誘導された。

3. Hb9-GFP を発現するアデノウイルスベクターを作製し、ヒト iPS 細胞から従来の方法で運動

ニューロンを行うと、運動ニューロンと思われる GFP 陽性細胞を多数みとめた。次に運動ニューロンを誘導する転写因子 (Ngn2、Lhx3、Isl1、Hb9) を強制発現するアデノウイルスを神経幹細胞に感染させて培養を継続したところ、アデノウイルス非感染群と比べて運動ニューロンと思われる Hb9 陽性細胞が 10 倍以上に激増した。

4. オリゴデンドロサイトを誘導すると考えられる転写因子候補 4 種 (新規の組み合わせ) を発現するレンチウイルスを作製し、ヒト iPS 細胞に順次感染させたところ、これまで誘導に約 100 日間要していた O4 陽性のオリゴデンドロサイトが 25 日間で出現した。

5. 山中 4 因子を発現するセンダイウイルスをヒト線維芽細胞に感染させ、数種類の化合物を培地中に添加することにより、レトロウイルスによる誘導 (Matsui et al. 2012) よりも高効率にニューロスフェアを誘導した。

6. ヒト iPS 細胞株 2 系統について L7-RFP を、リポフェクション法により一過性導入し、安定導入株を約 10 株ずつ樹立した。これらのうち PCR により L7-RFP の導入が確実なものをさらに選定中である。一方で、これまでに過去の論文情報よりプルキンエ細胞での発現が知られる転写因子や一過性強制発現させることにより発現プロファイルをプルキンエ細胞様に変化させる転写因子について十数個程度をリストアップし、テトラサイクリン誘導発現型レンチウイルスベクターに載せたものを構築した。

7. 慶應義塾大学総合医科学研究棟 9N2 室 (CPC ルーム前室) に、本プロジェクトでの情報共有の拠点とするための日立社製サーバの設置を行った。また、本プロジェクトに関連したマウス線維芽細胞から直接誘導した神経幹細胞各種の発現アレイ

データを提供した。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) I. Ohyama T, Nagata T, Tsuda K, Kobayashi N, Imai T, Okano H, Yamazaki T, Katahira M. Structure of Musashi1 in a complex with target RNA: the role of aromatic stacking interactions. *Nucleic Acids Res.* 40(7):3218-3231, 2012.
- 2) Kelava I, Reillo I, Murayama AY, Kalinka AT, Stenzel D, Tomancak P, Matsuzaki F, Lebrand C, Sasaki E, Schwamborn JC, Okano H, Huttner WB, Borrell V.: Abundant occurrence of basal radial glia in the subventricular zone of embryonic neocortex of a Lissencephalic Primate, the Common Marmoset *Callithrix jacchus*. *Cereb Cortex.* 22(2): 469-481, 2012.
- 3) Kuzumaki N, Suzuki A, Narita M, Hosoya T, Nagasawa A, Imai S, Yamamizu K, Morita H, Nagase H, Okada Y, Okano HJ, Okano H, Suzuki T, Narita M: Effects of μ -opioid receptor agonist on the growth of non-small-cell lung cancer (NSCLC) cells. *Br J Cancer*106 (6):1148-1152, 2012.
- 4) Lee EK, Kim W, Tominaga K, Martindale JL, Yang X, Subaran SS, Carlson OD, Mercken EM, Kulkarni RN, Akamatsu W, Okano H, Perrone-Bizzozero NI, de Cabo R, Egan JM, Gorospe M. RNA-Binding Protein HuD Controls Insulin Translation. *Mol Cell.* 45(6): 826-835, 2012.
- 5) 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.
- 6) 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.* 143(5):597-609, 2012.
- 7) Yamamoto-Hino M, Abe M, Shibano T, Setoguchi Y, Awano W, Ueda R, Okano H, Goto S.: Cisterna-specific localization of glycosylation-related proteins to the Golgi apparatus. *Cell Struct Funct.* 37(1):55-63, 2012.
- 8) Shibata S, Umei M, Kawahara H, Yano M, Makino S, Okano H. Characterization of the RNA-binding protein Musashi1 in zebrafish. *Brain Res.* 1462:162-73, 2012.
- 9) 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.* 419(2):188-193, 2012.
- 10) Muto J, Imai T, Ogawa D, Nishimoto Y, Okada Y, Mabuchi Y, Kawase T, Iwanami A, Mischel PS, Saya H, Yoshida K, Matsuzaki Y, Okano H. RNA-Binding protein Musashi1 modulates glioma cell growth through the post-transcriptional regulation of Notch and PI(3) Kinase/Akt signaling pathways. *PLoS One.* 7(3):e33431, 2012.
- 11) Mashiko H, Yoshida AC, Kikuchi SS, Niimi K, Takahashi E, Aruga J, Okano H, Shimogori T: Comparative anatomy of marmoset and mouse cortex from genomic expression. *J. Neurosci* 32(15): 5039-5053, 2012.
- 12) 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.* 125(Pt 13):3210-3220, 2012.
- 13) Matsui T, Takano M, Yoshida K, Ono S, Fujisaki C, 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* 30(6):1109-1119, 2012.
 - 14) Kagara N, Huynh KT, Kuo C, Okano H, Shin Sim M, Elashoff D, Chong K, Giuliano AE, Hoon DS. Epigenetic Regulation of Cancer Stem Cell Genes in Triple-Negative Breast Cancer. *Am J Pathol.* 181(1):257-267, 2012.
 - 15) Yano H, Yamamoto-Hino M, Awano W, Aoki-Kinoshita KF, Tsuda-Sakurai K, Okano H, Goto S. Identification of Proteasome Components Required for Apical Localization of Choptin Using Functional Genomics. *J Neurogenet.* 72(7):1059-1067, 2012.
 - 16) Mochizuki S, Soejima K, Shimoda M, Abe H, Sasaki A, Okano HJ, Okano H, Okada Y: Effect of ADAM28 on Carcinoma Cell Metastasis by Cleavage of von Willebrand Factor. *J Natl Cancer Inst.* 104(12): 906-922, 2012.
 - 17) Matsumoto K, Yokoo T, Matsunari H, Iwai S, Yokote S, Teratani T, Gheisari Y, Tsuji O, Okano H, Utsunomiya Y, Hosoya T, Okano HJ, Nagashima H, Kobayashi E.: Xenotransplanted embryonic kidney provides a niche for endogenous mesenchymal stem cell differentiation into erythropoietin-producing tissue. *Stem Cells.* 30 (6) 1228-1235 2012 Apr 4.
 - 18) Seko Y, Azuma N, Kaneda M, Nakatani K, Miyagawa Y, Noshiro Y, Kurokawa R, Okano H, Umezawa A.: Seko Y, Azuma N, Kaneda M, Nakatani K, Miyagawa Y, Noshiro Y, Kurokawa R, Okano H, Umezawa A. *PLoS One.*7(4):e35611, 2012.
 - 19) Hirota Y, Sawada M, Kida YS, Huang SH, Yamada O, Sakaguchi M, Ogura T, Okano H, Sawamoto K.: Roles of Planar Cell Polarity Signaling in Maturation of Neuronal Precursor Cells in the Postnatal Mouse Olfactory Bulb. *Stem Cells.* 30(8):1726-1733, 2012
 - 20) Suyama S, Suanabori T, Kanki H, Sawamoto K, Okano H.: Purinergic signaling promotes cell proliferation of transit-amplifying cells in adult mouse subventricular zone. *J. Neurosci* 32(27):9238-9247, 2012.
 - 21) Ince-Dunn G, Okano HJ, Jensen KB, Park WY, Zhong R, Ule J, Mele A, Fak JJ, Yang C, Zhang C, Yoo J, Herre M, Okano H, Noebels JL, Darnell RB. Neuronal Elav-like (Hu) Proteins Regulate RNA Splicing and Abundance to Control Glutamate Levels and Neuronal Excitability. *Neuron* 75(6):1067-1080, 2012.
 - 22) Yagi T, Kosakai A, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Nabetani A, Ishikawa F, Arai Y, Hirose N, Okano H, Suzuki N. : Establishment of induced pluripotent stem cells from centenarians for neurodegenerative disease research. *PLoS ONE* 7(7):e41572, 2012.
 - 23) Matsuda S, Okano HJ, Tsutsumi S, Aburatani H, Saga Y, Matsuzaki Y, Akaike A, Sugimoto H and Okano H.: Sox21 promotes hippocampal adult neurogenesis through the transcriptional repression of Hes5 gene. *J Neurosci.* 32(36):12543-12557, 2012.
 - 24) Sasaki T, Niizeki H, Shimizu A, Shiohama A, Hirakiyama A, Okuyama T, Seki A, Kabashima K, Otsuka A, Ishiko A, Tanese K, Miyakawa SI, Sakabe JI, Kuwahara M, Amagai M, Okano H, Suematsu M, Kudoh J. Identification of mutations in the prostaglandin transporter gene *SLCO2A1* and its phenotype-genotype correlation in Japanese

- patients with pachydermoperiostosis. *J Dermatol Sci.* 68(1):36-44, 2012.
- 25) Mukai A, Yamamoto-Hino M, Komada M, Okano H, Goto S. Balanced ubiquitination determines cellular responsiveness to extracellular stimuli. *Cell Mol Life Sci.* 69(23) 4007-4016 2012 Jul 24. [Epub ahead of print]
- 26) Kuzumaki N, Suzuki A, Narita M, Hosoya T, Nagasawa A, Imai S, Yamamizu K, Morita H, Nagase H, Okada Y, Okano HJ, Okano H, Suzuki T, Narita M: Multiple analyses of G-protein coupled receptor (GPCR) expression in the development of gefitinib-resistance in transforming non-small-cell lung cancer. *PLoS ONE* 7(10):e44368, 2012.
- 27) Namiki J, Suzuki N, Masuda T, Ishihama Y, Okano H: Nestin is phosphorylated in adult neural stem/progenitor cells and not endothelial progenitor cells. *Stem Cell International*, 2012:430138, 2012.
- 28) Konomi T, Fujiyoshi K, Hikishima K, Komaki Y, Tsuji O, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Nakamura, M: In vivo diffusion tensor imaging of injured spinal cord in common marmosets. *Neuroimage*, 63(4):1841-1853, 2012.
- 29) Omoto M, Yoshida S, Miyashita H, Kawakita T, Yoshida K, Kishino A, Kimura T, Shibata S, Tsubota K, Okano H and Shimmura S.: The Semaphorin 3A inhibitor SM-345431 accelerates peripheral nerve regeneration and sensitivity in a murine corneal transplantation model. *PLoS ONE* 7(11):e47716, 2012.
- 30) Kumamaru H, Ohkawa Y, Saiwai H, Yamada H, Kubota K, Kobayakawa K, Akashi K, Okano H, Iwamoto Y, Okada S. Direct isolation and RNA-seq reveal environment-dependent properties of engrafted neural stem/progenitor cells. *Nature Commun* 3:1140, 2012.
- 31) Hatou S, Yoshida S, Higa K, Miyashita H, Inagaki E, Okano H, Tsubota K, Shimmura S. Functional corneal endothelium derived from corneal stroma stem cells of neural crest origin by retinoic acid and Wnt/ β -catenin signaling. *Stem Cells Dev.* 2012 Oct 19. [Epub ahead of print]
- 32) Hikishima K, Sawada K, Murayama AY, Komaki Y, Kawai K, Sato N, Inoue T, Itoh T, Momoshima S, Iriki A, Okano HJ, Sasaki E, Okano H.: Time-course and high-resolution magnetic resonance imaging of brain development in the common marmoset. *Neuroscience.* 230(29) 102-113, 2013
- 33) Takagi T, Kimura Y, Shibata S, Saito H, Ishii K, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Tabata Y, Nakamura M. Sustained bFGF-Release Tubes for Peripheral Nerve Regeneration: Comparison with Autograft. *Plast Reconstr Surg.* 130(4):866-876, 2012.
- 34) Kanzaki S, Fujioka M, Yasuda A, Shibata S, Nakamura M, Okano HJ, Ogawa K, Okano H. Novel in vivo imaging analysis of an inner ear drug delivery system in mice: comparison of inner ear drug concentrations over time after transtympanic and systemic injections. *PLoS One.* 7(12):e48480, 2012.
- 35) Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Koike M, Kuzumaki N, Hayakawa H, Nihira T, Kobayashi T, Ohyama M, Sato S, Takanashi M, Funayama M, Hirayama A, Soga T, Hishiki T, Suematsu M, Yagi T, Ito D, Kosakai A, Hayashi K, Shouji M, Nakanishi A, Suzuki N, Mizuno Y, Mizushima N, Amagai M, Uchiyama Y, Mochizuki H, Hattori N, Okano H. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Mol Brain.* 5(1): 35, 2012.

- 36) Shimada H, Okada Y, Ibata K, Ebise H, Ota S, Tomioka I, Nomura T, Maeda T, Kohda K, Yuzaki M, Sasaki E, Nakamura M, Okano H. Efficient derivation of multipotent neural stem/progenitor cells from non-human primate embryonic stem cells. *PLoS One*. 7(11):e49469, 2012;
- 37) Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Mishima T, Kato S, Grad S, Alini M, Risbud MV, Chan D, Cheah KSE, Yamamura K, Masuda K, Okano H, Ando K, Mochida J.: Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc. *Nat Comm*. 3, 1264, 2012.
- 38) Kobayashi Y, Okada Y, Itakura G, Iwai H, Nishimura S, Nori S, Hikishima K, Konomi T, Fujiyoshi K, Tsuji O., Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, H. Okano H: Human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmosets without tumorigenicity. *PLoS ONE*, 7(12): e52787, 2012.
- 39) Takahashi T, Suzuki H, Imai T, Shibata S, Tabuchi Y, Tsuchimoto K, Okano H, Hibi T.: Musashi-1 post-transcriptionally enhances phosphotyrosine-binding domain-containing m-Numb protein expression in regenerating gastric mucosa. *PLoS ONE*, 8(1) e53540, 2012.
- 40) Takano M, Komaki Y, Hikishima K, Konomi T, Fujiyoshi K, Tsuji O, Toyama Y, Okano H, Nakamura M.: In vivo tracing of neural tracts in tip-toe walking Yoshimura mice by diffusion tensor tractography. *Spine* 38(2) E66-72 2012 Nov 2. [Epub ahead of print]
- 41) Takano M, Hikishima K, Fujiyoshi K, Shibata S, Yasuda A, Konomi T, Hayashi A, Baba H, Honke K, Toyama Y, Okano H, Nakamura M: MRI characterization of paranodal junction failure and related spinal cord changes in mice. *PLoS ONE*, 7(12):e52904, 2012.
- 42) Murata J, Ikeda K, Okano H. Notch signaling and the developing inner ear. *Adv Exp Med Biol*. 727:161-173, 2012.
- 43) Okano H.: The first clinical trial in Tohoku University Hospital after the great east Japan Earthquake: The heroic efforts of my friend, Professor Masashi Aoki. *Keio J Med*. 61 (1):3-9, 2012.
- 44) Kawahara H, Imai T, Okano H.: MicroRNAs in Neural Stem Cells and Neurogenesis. *Front Neurosci*. 6:30. Epub 2012 Mar 12.
- 45) Ito D, Okano H, Suzuki N: Accelerating progress in iPS cell research for neurological diseases. *Annal. Neurol* 72(2):167-74, 2012
- 46) Nakamura M, Tsuji O, Nori S, Toyama Y, Okano H: Cell transplantation for spinal cord injury focusing on iPS cells. *Expert Opin Biol Ther*. 12(7): 811-21. 2012.
- 47) Sakaguchi M, Okano H: Neural stem cells, adult neurogenesis and Galectin-1: from bench to bedside. *Dev Neurobiol*. 72(7):1059-1067, 2012.
- 48) Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, Niibe K, Araki D, Suzuki S, Okano H and Matsuzaki Y: Prospective isolation of murine mesenchymal stem cells based on positive expression of Sca-1 and PDGFR α . *Nature Protoc.*, 7(12):2103-2111, 2012.
- 49) Okano H, Hikishima K, Iriki A, Sasaki E: The common marmoset as a novel animal model system for biomedical and neuroscience research applications. *Semin Fetal Neonatal Med*. 17(6):336-340, 2012.
- 50) Fujiyoshi K, Konomi T, Yamada M, Hikishima K, Tsuji O, Komaki Y, Momoshima S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H.: Diffusion tensor imaging and tractography of the spinal cord: From experimental studies to clinical application. *Exp Neurol*. 242 74-82, 2013.
- 51) Imamura M, Okuno H, Tomioka I, Kawamura Y, Lin ZY, Nakajima R, Akamatsu W, Okano HJ,

- Matsuzaki Y, Sasaki E, Okano H. Derivation of induced pluripotent stem cells by retroviral gene transduction in Mammalian species. *Methods Mol Biol.* 925:21-48, 2012.
- 52) Matsui K, Akamatsu W, Nakamura M, Okano H.: Regeneration of the damaged central nervous system through reprogramming technology: basic concepts and potential application for cell replacement therapy. *Exp Neurol.* pii: S0014-4886(12) 00378-0, 2012.
- 53) Hirata A, Utikal J, Yamashita S, Aoki H, Watanabe A, Yamamoto T, Okano H, Bardeesy N, Kunisada T, Ushijima T, Hara A, Jaenisch R, Hochedlinger K, Yamada Y.: Dose-dependent roles for canonical Wnt signalling in de novo crypt formation and cell cycle properties of the colonic epithelium. *Development.* 140(1):66-75, 2013.
- 54) Nishimura S, Yasuda A, Iwai H, Takano M, Kobayashi Y, Nori S, Tsuji O, Fujiyoshi K, Takahashi Y, Ebise H, Toyama Y, Okano H, Nakamura M.: Time-dependent changes in the microenvironment of injured spinal cord affects the therapeutic potential of neural stem cell transplantation for spinal cord injury. *Mol. Brain,* 6:3, 2013.
- 55) Takahashi T, Suzuki H, Imai T, Shibata S, Tabuchi Y, Tsuchimoto K, Okano H, Hibi T.: Musashi-1 Post-Transcriptionally Enhances Phosphotyrosine-Binding Domain-Containing m-Numb Protein Expression in Regenerating Gastric Mucosa. *PLoS One,* 8(1):e53540, 2013.
- 56) Mizutani K, Fujioka M, Hosoya M, Bramhall N, Okano HJ, Okano H, Edge ASB. : Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery from noise-induced hearing loss. *Neuron* 77(1):58-69, 2013.
- 57) Imai S, Ikegami D, Yamashita A, Shimizu T, Narita M, Niikura K, Furuya M, Kobayashi Y, Miyashita K, Okutsu D, Kato A, Nakamura A, Araki A, Omi K, Nakamura M, Okano HJ, Okano H, Ando T, Takeshima H, Ushijima T, Kuzumaki N, Suzuki T and Narita M. Epigenetic transcriptional activation of MCP-3 contributes to long-lasting neuropathic pain. *Brain,* 136(3) 828-843. 2013 Jan 30. [Epub ahead of print]
- 58) Nishimoto Y, Okano HJ, Imai T, Poole AJ, Suzuki N, Keirstead H and Okano H: Cellular toxicity induced by the 26-kDa fragment and amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-associated mutant forms of TDP-43 in human embryonic stem cell-derived motor neurons. *Neurology and Clinical Neuroscience,* 1, 24-31, 2013.
- 59) Veraitch O, Kobayashi T, Imaizumi Y, Akamatsu W, Sasaki T, Yamanaka , Amagai M, Okano H and Ohyama : Human induced pluripotent stem cell-derived ectodermal precursor cells contribute to hair follicle morphogenesis in vivo. *J Invest Dermatol.* 2013 Jan 15.
- 60) Shinozaki M, Yasuda A, Nori S, Saito N, Toyama Y, Okano H, Nakamura M.: Novel method for analyzing locomotor ability after spinal cord injury in rats. *Neurologia medico-chirurgica* In Press, 2013.
- 61) Araki D, Kawamura Y, Niibe K, Suzuki S, Morikawa S, Mabuchi Y, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y: Primary evaluation of induced pluripotent stem cells using flow cytometry. *Inflammation and Regeneration,* In Press, 2013.
- 62) Nitta M, Imamura M, Inoue Y, Kunitomo Y, Lin ZY, Ogawa T, Yogo K, Ishida-Kitagawa N, Fukunaga N, Okano H, Sato E, Takeya T, Miyoshi J.: Aberrant gene expression and sexually incompatible genomic imprinting in oocytes derived from XY mouse embryonic stem cells in vitro. *PLoS ONE* In Press, 2013.
- 63) Nihei Y, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Yagi T,

- Yoshizaki T, Okano H, Suzuki N.: Enhanced aggregation of androgen receptor in induced pluripotent stem cell-derived neurons from spinal and bulbar muscular atrophy. *J Biol Chem.* 2013 Jan 30. [Epub ahead of print]
- 64) Iwanami A, Gini B, Zanca C, Assuncao A, Nael A, Dang J, Yang H, Zhu S, Kohyama J, Kitabayashi I, Cavenee WK, Cloughesy TF, Furnari TF, Nakamura M, Toyama Y, Okano H, Mischel P.: PML mediates Glioblastoma resistance to mTOR-targeted therapies. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA* In 2013 Feb 25. [Epub ahead of print]
- 65) Nakamura M, Okano H: Cell transplantation for spinal cord injury focusing on induced pluripotent stem cells. *Cell Res.* 23(1):70-80, 2013.
- 66) 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*, 112(3):523-533, 2013.
- 67) Ohta S, Imaizumi Y, Akamatsu W, Okano H, Kawakami Y. Generation of Human Melanocytes from Induced Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 989:193-215, 2013.
2. 学会発表
【国内学会】
- 1) 岡野栄之 : iPS 細胞を用いた再生・疾患・創薬研究 : 第 131 回神経内科臨床研究会・特別講演, 2012.4.6 *2012.4.6 (中央大学駿河台記念館、東京)
- 2) 岡野栄之 : iPS 細胞技術を用いたトランスレーショナル研究 (Translational Research using iPS cell technology) : BIOtech2012・特別講演, 2012.4.27 *2012.4.25-27 (東京ビッグサイト、東京)
- 3) 岡野栄之 : iPS 細胞を用いた神経再生・疾患研究 : 第 101 回日本病理学会・特別講演, 2012.4.27 *2012.4.26-28 (京王プラザホテル、東京)
- 4) 岡野栄之 : iPS 細胞技術を用いた神経発達障害および神経変性疾患の病態解析と治療法の開発 : 第 54 回日本小児神経学会総会・基調講演, 2012.5.17 *2012.5.17-19 (ロイトン札幌、札幌)
- 5) Hideyuki Okano : Investigation of Pathophysiology of Parkinson's Disease Using iPS Cells Technology : 第 53 回日本神経学会学術大会・AAN-JSN Joint Symposium, 2012.5.24 *2012.5.22-25 (東京国際フォーラム、東京)
- 6) 岡野栄之 : iPS 細胞を用いた再生・疾患・創薬研究 : 第 53 回日本神経学会学術大会・シンポジウム, 2012.5.24 *2012.5.22-25 (東京国際フォーラム、東京)
- 7) 岡野栄之 : iPS 細胞および直接誘導技術を用いた中枢神経系の再生疾患研究 : 第 4 回 Brainstorming Medical Conference・特別講演, 2012.5.26 *2012.5.26-27 (泉ガーデン コンファレンスセンター、東京)
- 8) 岡野栄之 : iPS 細胞技術と直接誘導法を用いた神経系の再生・疾患研究 : 文部科学省 iPS 細胞等研究ネットワーク第 4 回合同シンポジウム, 2012.6.17 *2012.6.17 (パシフィコ横浜、横浜)
- 9) 岡野栄之 : Investigation of CNS Disorders and Regeneration by using Reprogramming Technologies. : 第 18 回日本遺伝子治療学会学術集会・教育講演, 2012.6.29 *2012.6.28-30 (ホテル熊本テルサ、熊本)
- 10) 岡野栄之 : Investigation of CNS disorders and regeneration By using reprogramming technologies: 第 5 回最先端脳科学セミナー「iPS 細胞と遺伝子改変霊長類技術を用いた神経再生・疾患研究」, 2012.7.13 *2012.7.13 (富山大学杉谷キャンパス、富山)
- 11) 岡野栄之 : iPS 細胞を用いた神経再生・疾患・創薬研究 : 第 2 回細胞再生医療研究会, 2012.7.29 *2012.7.29 (臨床研究情報センター、

神戸)

- 12) 岡野栄之：iPS 細胞を用いた神経再生・疾患研究：第 17 回日本病態プロテオーム学会学術集会・特別講演, 2012.8.10 *2012.8.10-11 (オークラアクトシティホテル浜松、浜松)
- 13) 岡野栄之：iPS 細胞技術を用いた神経再生・神経疾患研究：《ルイ・パスツール生誕 190 周年記念》チャリティー・シンポジウム「脳神経障害からの回復を目指して」～パスツール研究所ジャン＝ピエール・シャンジュー教授来日シンポジウム～, 2012.9.1 *2012.9.1 (ベルサール神田、東京)
- 14) 岡野栄之：iPS 細胞を用いた神経再生・疾患・創薬研究：第 60 回北日本産科婦人科学会総会・学術講演会・招請講演, 2012.9.8 *2012.9.8-9 (山形テルサ、山形)
- 15) 岡野栄之：マームセットにおける大脳皮質形成：第 35 回日本神経科学学会大会・ランチョンセミナー, 2012.9.18 *2012.9.18-21 (名古屋国際会議場、名古屋)
- 16) 岡野栄之：iPS 細胞などリプログラミング技術を用いた中枢神経系の再生医療の開発：第 35 回日本神経科学学会大会・シンポジウム, 2012.9.21 *2012.9.18-21 (名古屋国際会議場、名古屋)
- 17) 岡野栄之：幹細胞研究と脳科学研究の最前線：昭和女子大学附属昭和小学校・父母会主催講演会, 2012.9.24 *2012.9.24 (昭和女子大学附属昭和小学校、東京)
- 18) 岡野栄之：中枢神経系の再生医療：Walk Again 2012, 2012.10.6 *2012.10.6 (東京国際交流館・国際交流会議場、東京)
- 19) 岡野栄之：iPS 細胞を用いた神経再生と疾患研究：神奈川県立こども医療センター医師の会, 2012.10.11 *2012.10.11 (神奈川県立こども医療センター、横浜)
- 20) 岡野栄之：中枢神経系の再生医療と疾患研究：ライフイノベーション地域協議会主催セミナー・京浜臨海部ライフイノベーション国際戦略総合特区の最新動向～京浜臨海部・始動～, 2012.10.12 *2012.10.12 (パシフィコ横浜、横浜)
- 21) 岡野栄之：iPS 細胞技術と直接誘導法を用いた神経系の再生・疾患研究：第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会・特別講演, 2012.10.27 *2012.10.26-27 (名古屋国際会議場、名古屋)
- 22) 岡野栄之：幹細胞技術を用いた神経系の再生・疾患研究：神経組織の成長・再生・移植研究会第 27 回学術集会・特別講演, 2012.10.27 *2012.10.27 (独立行政法人国立精神・神経医療研究センター研究所、東京)
- 23) 岡野栄之：iPS 細胞技術と直接誘導法を用いた神経系の再生・疾患研究：第 24 回日本脳循環代謝学会・プレイブニングセミナー, 2012.11.7 *2012.11.8-9 (リーガロイヤルホテル広島、広島)
- 24) 岡野栄之：iPS 細胞技術と直接誘導法を用いた神経系の再生・疾患研究：第 21 回東海新生児研究会・特別講演, 2012.12.8 *2012.12.8 (名古屋ダイヤビル、名古屋)
- 25) 岡野栄之：iPS 細胞技術と直接誘導法を用いた神経系の再生・疾患研究：社団法人・新化学技術推進機構ライフサイエンス部会材料分科会, 2012.12.27 *2012.12.27 (新化学技術推進機構・会議室、東京)

【国際学会】

- 1) Hideyuki Okano: Modelling the pathophysiology of neurodegenerative and neuro-developmental diseases using iPS cell technology: the Joint 12th International Child Neurology Congress and 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology / Plenary Lecture, 2012.5.31 *2012.5.27-6.1 (Brisbane Convention and Exhibition Centre, Brisbane, AUS)
- 2) Hideyuki Okano: Translation of reprogramming technologies for CNS disorders. The ISSCR 10th

- Annual Meeting / Plenary Lectuer, 2012.6.14
*2012.6.13-16 (the Pacifico Yokohama,
Yokohama, Japan)
- 3) Hideyuki Okano: Regenerative Medicine and
clinical applications. : Dutch-Japanese Cross
Debate Workshop on RM and Stem cells,
2012.6.17 *2012.6.17 (Pacifico Yokohama,
Yokohama, Japan)
- 4) Hideyuki Okano: Translational research of CNS
disorders using iPS technologies. : 4th
International Conference on Stem Cell and Tissue
Formation, 2012.7.19 *2012.7.8-20 (CRTD -
Center for Regenerative Therapies Dresden
Dresden, Germany)
- 5) Hideyuki Okano:Regeneration of the damaged
CNS using human iPSCs-derived neural
progenitor cells :the 16th Congress of International
Society for Biomedical Research on Alcoholism
(ISBRA2012) / Plenary Lecture, 2012.9.10
*2012.9.9-12 (Sapporo Convention Center,
Sapporo, Japan)
- 6) Hideyuki Okano: iPS cells modeling neural stem
cells and neurological Diseases: Commemorative
Symposium of the 28th International Prize for
Biology, International Symposium “Neurogenesis
throughout Life” , 2012.11.28 *2012.11.28-29
(RIKEN Center for Developmental Biology
(CDB), Kobe, Japan)
- 7) Hideyuki Okano: iPS cells modeling neural stem
cells and neurological disease : Focusing on
Alzheimer & Parkinson Diseases : The 17th
Takeda Science Foundation Symposium on
Bioscience, 2012.12.6-7 (Center for Learning and
Innovation, Takeda Pharmaceutical Company Ltd.,
Suita, Osaka, Japan)
- 8) Hideyuki Okano : iPS cells as neurological disease
models: The 4th Biennial Symposium on Brain
and Mind Research in the Asia-Pacific
(APRU-BMAP 2012), 2012.8.31 *2012.8.29-31
(North Hall, Mita Campus, Keio University,
Tokyo, Japan)
- F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許取得
【平成 25 年度】国内 3 件 国外 1 件
- 【国内】
- 1) 発明の名称 神経幹細胞の増殖抑制剤
出願番号 特願 2006-034444
特許番号 登録日 第 4997432 (2012/05/25)
出願日 2006/2/10
出願人 学校法人慶應義塾 (独) 産業技術
総合研究所
発明者 岡野栄之、坂口昌徳、澤本和延、平
林淳
- 2) 2.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生物、検定方
法、スクリーニング方法
出願番号 特願 2005-513873
特許番号 登録日 第 5099288 (2012/10/05)
出願日 2004/9/8
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 (東京医科歯科大学)、
石橋 哲 (東京医科歯科大学)
- 3) 発明の名称 ヒトグリオーマ治療に有用なり
コンビナント HSV
出願番号 特願 2007-542269
特許番号 登録日 第 5070583 (2012/08/31)
出願日 2006/9/14
出願人 学校法人慶應義塾
発明者 矢崎貴仁、岡野栄之、河瀬斌、金井隆一

【国外】

1) 発明の名称 Notch シグナル伝達系活性化検
知方法

出願番号 登録日 米国 11/665,264(2012/09/04)

特許番号 8,257,920

出願日 2005/5/10

出願人 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、徳永 暁憲、中尾 啓子、
神山 淳

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）
分担研究年度終了報告書

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

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、研究結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 Open Innovation 環境を構築する。これにより、継続的新知見及び新技術創出、具体的研究データに基づく臨床利用のためのヒト幹細胞の品質（製造工程等を含む。）基準等を得て、より安全で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 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。本年度は特にヒト ES 加工医薬品の原材料として用いる ES 細胞樹立時および維持・培養時等に取得したデータの記録法について検討をおこなう。特に電子的記録法、電子的データ採取法については、東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター機能解析イン・シリコ分野の中井謙太教授と共同で検討を行なっていく。

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 加工医薬品の原材料として用いる ES 細胞樹立時および維持・培養時等に取得したデータの記録法について検討をおこなう。特に電子的記録法、電子的データ採取法については、東大中井研と共同で検討を行なっていく。

（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、