

- Saito, Keizo Horibe, Tatsutoshi Nakahata, Hayato Miyachi, Akio Tawa, Souichi Adachi: High Event-Free Survival Rate with Minimum-Dose-Anthracycline Treatment in Childhood Acute Promyelocytic Leukemia: A Nationwide Prospective Study By the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG). 56<sup>th</sup> Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 6-9, 2014, San Francisco (poster).
14. Nishinaka Yoko, Akira Niwa, Mitsujiro Osawa, Akira Watanabe, Tatsutoshi Nakahata, Megumu K Saito: Exploring the Pathogenesis of Down Syndrome-Related Myeloproliferative Disorders Using iPSCs. 56<sup>th</sup> Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 6-9, 2014, San Francisco (poster).
15. Daisuke Hasegawa, Shinsuke Hirabayashi, Shizuka Watanabe, Yuji Zaika, Masahiro Tsuchida, Atsuko Masunaga, Ayami Yoshimi, Asahito Hama, Seiji Kojima, Masafumi Ito, Tatsutoshi Nakahata, Atsushi Manabe: Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Refractory Cytopenia of Childhood. 56<sup>th</sup> Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 6-9, 2014, San Francisco (poster).
16. Akira Niwa, Akitsu Ho+a, Megumu K Saito, Tatsutoshi Nakahata: Phenomic Screen in Vivo and in Vitro to Explore Novel Pathogenesis of AML1-ETO-Positive Leukemia Using PSC-Derived Hematopoietic Cells. 56<sup>th</sup> Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 6-9, 2014, San Francisco (poster).
17. Ito M.N., Murakami M., Saito M., Niwa A., Osawa M., Nakahata T., Nishimoto N.: Monocytes differentiated from iPS cells derived from rheumatoid arthritis patients express more M-CSF receptor together with RANK than those from healthy donors resulting in the accelerated osteoclastogenesis. EULAR 15-3229, 2015.
18. 横山宏司、西小森隆太、納富誠司郎、田中孝之、齋藤潤、梅田雄嗣、池谷真、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男：患者由来iPS細胞を用いたCINCA症候群における関節症病態の解明。第117回日本小児科学会学術集会 2014年4月11-13日（11日）名古屋国際会議場口演
19. 桐野浩輔、尾崎富美子、丹羽明、中畑龍俊、齋藤潤、平家勇司：末梢血 Natural Killer 細胞を用いた人口多能性幹細胞の樹立。第35回日本炎症・再生医学会 2014年7月1-4日（2日）万国津梁館（沖縄）ポスター発表

20. 王茂治、丹羽明、齋藤潤、中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞を用いた Chediak-東症候群の病態解析. 第 35 回日本炎症・再生医学会 2014 年 7 月 1-4 日 (2 日) 万国津梁館 (沖縄) ポスター発表
21. 伊藤眞理、村上美帆、丹羽明、齋藤潤、中畑龍俊、西本憲弘：疾患 iPS 細胞を用いた破骨細胞分化系の構築と分化能の検討. 第 1 回日本骨免疫会議 2014 年 7 月 1-4 日 (1 日) 万国津梁館 (沖縄) ポスター発表
22. 中畑龍俊：アカデミアの立場から (テーマ: 日本から発信するレギュラトリーサイエンス). 第 4 回レギュラトリーサイエンス学会学術大会-レギュラトリーサイエンスの世界展開 2014 年 9 月 5-6 日 (6 日) 一橋大学一橋講堂
23. Shigeharu Oh, Akira Niwa, Megumu K. Saito, Tatsutoshi Nakahata: Modeling Chediak-Higashi Syndrome using patient's specific iPS cells. (一般口演) 第 76 回日本血液学会学術集会 2014 年 10 月 31 日-11 月 2 日 (31 日) 大阪国際会議場
24. Kazuki Taoka, Syunya Arai, Masataka Hosai, Fimihiko Nakamura, Masashi Miyauchi, Sho Yamazaki, Akira Honda, Keisuke Kataoka, Keiki Kumano, Akihide Yoshimi, Koji Eto, Hiromitsu Nakauchi, Tatsutoshi Nakahata, Mineo Kurokawa: Modeling chronic myelomonocytic leukemia through patient-derived induced pluripotent stem cells. (一般口演) 第 76 回日本血液学会学術集会 2014 年 10 月 31 日-11 月 2 日 (31 日) 大阪国際会議場
25. Atsushi Nemoto, Takeshi Inukai, Satoshi Saida, Itaru Kato, Toshio Heike, Tatsutoshi Nakahata, Jiro Kikuchi, Yusuke Furukawa, Kumiko Goi, Kanako Uno, Atsushi Watanabe, Sinpei Somazu, Meixian Huang, Keiko Kagami, Kanji Sugita: Mechanisms of CDK4/6 inhibitor hypersensitivity in Ph+ lymphoid leukemia. (一般口演) 第 76 回日本血液学会学術集会 2014 年 10 月 31 日-11 月 2 日 (31 日) 大阪国際会議場
26. 中畑龍俊：招待講演、iPS 細胞を用いた今後の医療. 東京バイオマーカー・イノベーション技術研究組合 TOBIRA 第 4 回研究交流フォーラム 2015 年 2 月 2 日 ソラシティカンファレンスセンター (御茶ノ水) -
27. 中畑龍俊：iPS 細胞の小児がん治療への様々な応用. 東京都福祉保健局委託事業 小児がん早期診断推進研修会公開シンポジウム「小児がん治療の現在」 2015 年 2 月 11 日 聖路加国際大学アリス・C・セントジョンメモリアルホール.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
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（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

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・有効性をさせることを目的に、研究を適切に管理運営する体制の構築を実現するための研究開発を実施している。中核機関において整備が進められている工程管理システムや研究過程の電子的記録システムを分担期間である再生医科学研究所に導入しその評価を行いシステムの改良に貢献した。さらに、従来からの継続事業として、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した。26年度は中核機関に整備されたデータベースへのテラトーマ組織学的画像データの提供や、本機関より提案のプロトコールに基づくヒトES細胞の遺伝子発現プロファイルの多機関比較解析研究を開始し、試料/データの提供を行った。今後、他機関との連携を進めることにより、これらの比較解析データに基づいた安全性を向上させるシステムの構築に寄与することが期待される。

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。本分担研究では、分担研究者が長年取り組んできたヒトES細胞研究の経験と成果をもとに現在構築を行っている臨床用ヒトES細胞バンクについて、そこでの工程管理、品質管理の手技やデータを中核機関において保存を行うとともに、分析技術の標準化について他の参加機関と連携して、標準化等をすすめる。その成果をもって、厚生労働省

が推進する再生医療の実現に向けた基盤技術の構築に寄与することを目的とする。

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。こられる研究から、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

ステムの構築を行う。

これまでに我々は臨床用ヒト ES 細胞を、これを利用しようとする研究機関、医療機関に分配するため、大学の基盤的経費も用いながら細胞バンク構築を進めている。この過程で品質管理基準や標準作業手順書などの整備を進めている。これらを用いて本研究では、分析法や評価方法の標準化のために必要となるプロトコルを他の参加機関と共有しデータを比較することで幹細胞の品質評価の信頼性を向上させる。あわせてデータ収集の電子化を行う。

#### (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。平成 26 年 11 月にそれぞれ「ヒト ES 細胞の樹立に関する指針」「ヒト ES 細胞の分配および使用に関する指針」に改訂されている。この改訂による研究計画の変更は必要なかった。

#### 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文書化を行っている。昨年度から引き続き、既存のヒト ES 細胞を臨床用としてバンク化する技術の確立をモデルとして、工程管理や品質管理データの収集・分析をどのように進めるかを中心に実証的な検証を行った。あわせて、

細胞凍結に関して従来法では困難であった、バッチ処理が可能な緩慢凍結方法の開発を行った。

また、実際のバンク化の工程によるワーキングバンク構築試験について、3 回の繰り返しにより工程や品質管理の信頼性検証を行った(図 1)。

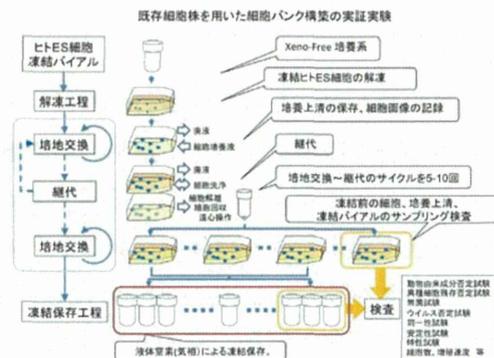


図 1

臨床用ヒト ES 細胞バンクの工程管理や品質管理に関わるシステムから収集されるデータは有用であるが、その信頼性/汎用性についてはより詳細な検討分析が必要である。我々はこれまでにヒト ES 細胞を含め、様々な未分化幹細胞株の発現プロファイルデータを提供してきたが、今後の臨床応用のためにはより信頼性の高いデータベースの構築が必要になると考えた。そこで本事業での多機関連携の仕組みを利用し、未分化 ES 細胞の遺伝子発現プロファイルの他機関比較解析が開始された。複数の機関において培養した同一の細胞株の遺伝子発現プロファイルを中核機関において集約的に分析することにより、標準的な遺伝子発現プロファイルの提唱やそれに基づく細胞の品質評価を可能とすることを目指している。今年度事業として、試料/データを集約的に扱う制度設計と初期的なデータの取得とその分

析を行った。

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。そのため2013年6月に開催された International Stem Cell Bank Initiative 会議に参加し、情報交換を行った。この結果はガイドラインとして2015年1月に公開された。

#### D. 考察

ヒト ES 細胞の培養技術そのものに関しては今後ともさらなる改良/改善が見込まれるものの、現時点で期待される水準の範囲では臨床応用に要求されるレベルをほぼ達成している。この臨床用バンク構築の過程で多くの品質管理、工程管理データが蓄積されたており、この本事業での活用を目指した基盤技術開発を行ってきた。また未分化細胞の標準的な遺伝子発現プロファイルの提唱やそれに基づく細胞の品質評価を目指して試料/データ取得とその分析を進めているが、このようなデータは、株間での同等性や、バンク構築の過程でのロット内の均一性を保証するうえで重要であり、今後もデータの集積を継続することにより、標準化を行うことが重要であると考えられる。そのためには参画する各機関での試薬/資材や培養工程、またサンプル調製などに関して正確な記録が行われていることが、必要である。このために、本事業で整備が進められている、実験データ記録、保存システムは非常に効果的である。

#### E. 結論

これまでの工程管理や品質管理に関わるシステムから収集されるデータは有用であるが、より幅広くその結果の有効性を検証するため、より多くの機関の参加と詳細な検討分析が必要である。今後、共通のプロトコールに基づいた多機関解析により、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と考えられる。そのため、本システムが長期間にわたり安定的に運用されることが重要であり、幹細胞管理技術の標準化に向けて、中核機関にデータを集約、分析を行なうことで、再生医療の安全性/有効性を担保するうえで必要不可欠な仕組みが構築出来ると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Otsuji, T. G., Bin, J. Yoshimura, A., Tomura, M., Tateyama, D., Minami, I., Yoshikawa, Y., Aiba, K., Heuser, J. E., Nishino, T., Hasegawa, K. and Nakatsuji, N. A 3D sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production. *Stem Cell Rep.* 2: 734-745 (2014).
2. Kuo, T. F., Mao, D., Hirata, N., Khambu, B., Kimura, Y., Kawase, E., Shimogawa, H. Ojika, M., Nakatsuji, N., Ueda, K. and Uesugi, M. Selective elimination of human pluripotent stem cells by a marine natural product derivative. *J Am Chem Soc.* 2136: 9798-9801 (2014).

3. Liu, L., Yoshioka, M., Nakajima, M., Ogasawara, A., Liu, J., Hasegawa, K., Li, S., Zou, J., Nakatsuji, N., Kamei, K. and Chen, Y. Nanofibrous gelatin substrates for long-term expansion of human pluripotent stem cells. *Biomaterials* 35: 6259-6267 (2014)
  4. Andrews P, Baker D, Benvenisty N, Miranda B, Bruce K, Brüstle O, Choi M, Choi YM, Crook J, de Sousa P, Dvorak P, Freund C, Firpo M, Furue M, Gokhale P, Ha HY, Han E, Haupt S, Healy L, Hei Dj, Hovatta O, Hunt C, Hwang SM, Inamdar M, Isasi R, Jaconi M, Jekerle V, Kamthorn P, Kibbey M, Knezevic I, Knowles B, Koo SK, Laabi Y, Leopoldo L, Liu P, Lomax G, Loring J, Ludwig T, Montgomery K, Mummery C, Nagy A, Nakamura Y, Nakatsuji N, Oh S, Oh SK, Otonkoski T, Pera M, Peschanski M, Pranke P, Rajala K, Rao M, Ruttachuk R, Reubinoff B, Ricco L, Rooke H, Sipp D, Stacey G, Suemori H, Takahashi T, Takada K, Talib S, Tannenbaum S, Yuan BZ, Zeng F, Zhou Q. Points to consider in the development of seed stocks of pluripotent stem cells for clinical applications: International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI). *Regen Med.* 2015 Mar;10(2 Suppl):1-44.
- 2.学会発表
    1. Norio Nakatsuji: Human pluripotent stem cell research for regenerative medicine and drug discovery – our multidisciplinary academia-industry collaboration project in Japan. World Stem Cells Regenerative Medicine Congress 2014 (invited lecture) (2014.5.21 London)
    2. 中辻憲夫：機能性ポリマーや化合物によるヒト多能性幹細胞の増殖分化制御への応用、第36回日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム2「新時代の細胞操作技術と医療」(2014.11.18 東京)
    3. Norio Nakatsuji: Overview of Japan Symposium – Mass culture system, QC, 3D construction, freezing system & delivery system. World Stem Cell Summit 2014 (invited lecture) (2014.12.4 San Antonio)
    4. 中辻憲夫：ヒト多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) の再生医療と創薬への実用化に必要な技術開発：大量培養法と化合物による分化誘導、京都大学ウイルス研究所・京都大学再生医科学研究所合同学術講演会 (2014.12.22 京都)
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
- 特許取得  
該当なし。  
実用新案登録  
該当なし。  
その他  
該当なし。

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

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室 教授

研究要旨

本分担研究では、患者由来の体細胞から直接あるいはiPS細胞を介して様々な神経系細胞を短時間で誘導するシステムを確立し、神経系に分化誘導された細胞の性質（安全性、有効性）を詳細に解析してそのデータを共有することにより再生医療の実現の加速に貢献することを目指している。本年度は、従来行ってきた神経分化誘導法の研究開発に加えて、データ共有による横断的解析が可能な本研究プロジェクトの特性を活用し、ヒト幹細胞や分化させた細胞における遺伝子発現およびゲノム安定性について次世代シーケンサーを用いた比較解析を行い、安全性や有効性を詳細に検討する*in silico*の研究開発も行った。

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。そこで本分担研究では体細胞からiPS細胞を経てもしくは直接に様々な神経系細胞を短時間で効率

的かつ均一に誘導するシステムを確立し、神経系に分化誘導された細胞の性質（安全性、有効性）を詳細に解析してそのデータを共有することにより再生医療の実現の加速に貢献する。

具体的には患者から採取することが比較的容易な皮膚線維芽細胞や末梢血細胞から目的の神経幹細胞あるいは神経細胞へと直接あるいはiPS/ES細胞を介して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は、今後高いニーズが予想される神経系細胞として、従来から我々が目指してきた脊髄損傷への治癒効果が高い神経幹細胞、パーキンソン病で特異的に障害されるドー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、中枢神経系での神経再生において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ことが知られるオリゴデンドロサイト等を標的とする。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できるため、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。

また、今後これらの分化誘導法により得られた細胞を再生医療のための移植治療等に用いる場合、その分化誘導法の違いが細胞のゲノム安定性や造腫瘍性にどのような影響を与えうるかを検証しておくことが非常に重要である。また一部の遺伝病に対する自家細胞移植治療には、ゲノム編集等によるゲノム操作を施すことが必要と考えられているが、ゲノム編集におけるオフターゲット効果の問題についても検証が必要である。そこで、データ共有による横断的解析が可能な本研究プロジェクトの特性を活用し、ヒト幹細胞や分化させた細胞における遺伝子発現およびゲノム安定性について次世代シーケンサーを用いた解析を行い、安全性や有効性を詳細に検討し、評価する。

そして、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これらの分化誘導法やその評価に関わる解析データを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供与し、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. 転写因子を用いた体細胞からのニューロンの直接誘導

3つの転写因子(ASCL1・BRN2・ZIC1)を発現するセンダイウイルスを用いて、より患者に対して低侵襲な細胞源として、末梢血由来Tリンパ球からの神経誘導を試み

た。

## 2. ヒトiPS細胞から運動ニューロンへの誘導

運動ニューロンへの誘導法をさらに改良し、様々なシグナル阻害剤を利用することで運動神経への分化を促進し、運動ニューロンのマーカーであるHB9の発現によって評価した。

## 3. ヒトiPS細胞からのオリゴデンドロサイトの誘導

ヒトiPS細胞からEB培養を経て神経幹細胞を誘導しオリゴ前駆細胞へと成熟させる方法を確立したが、90日かかるこの過程を加速するため、転写因子の導入などを試みた。

## 4. ヒトiPS細胞からのドパミン作動性ニューロンの誘導

ドパミン作動性ニューロンへの誘導法をさらに改良し、未成熟な前駆細胞を除去しより成熟したニューロンを濃縮するために阻害剤を検討し、THの発現によって評価した。

## 5. 転写因子を用いたヒトiPS細胞からの小脳プルキンエ細胞の誘導

ヒトiPS細胞から迅速に小脳プルキンエ細胞を誘導するために、阻害剤を用いてWNTシグナルとSHHシグナルを調節することにより小脳原基が形成される後脳背側の領域特性をもつ神経幹細胞を誘導し、さらに

転写因子により分化の促進を試みた。

## 6. iPS細胞から分化誘導した神経幹細胞の次世代シーケンス解析によるゲノム安定性・造腫瘍性への評価

脊髄損傷モデルへの移植治療の細胞源としてiPS細胞およびiPS細胞より分化誘導した神経幹細胞について、in vivoでの評価を行うと同時に、次世代シーケンサーによるexome解析を行うことでin silicoでの評価を行った。

## 7. ゲノム編集によるオフターゲット効果の評価

ゲノム編集によるゲノム変化のリスクを評価するモデルケースとして、ゲノム編集を施したiPS細胞について操作前後のゲノム解析結果を比較した。

## 8. 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

昨年度に設置された拠点サーバが未稼働の問題を、設置スペースの防音と空調工事によって解決した。無線LANアクセスポイントを含めて拠点内のネットワーク運用をおこない、モデルケースとして異なる拠点で培養された同一のES細胞株についてRNA-Seq解析を行い、その発現プロファイルを比較することにより、拠点ごとの培養方法の違いがどのような影響を与えるかを評価した。

(倫理面への配慮)

本研究の開始にあたり、まず疾患患者由来 iPS 細胞を樹立し分化誘導を行うことおよびゲノム解析をすることについては「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」に則り慶應義塾大学医学部倫理委員会に「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研究」との表題で倫理申請を行い、承認を得た(承認番号:20080016)。また個別の疾患患者より iPS 細胞株を樹立する場合には、患者との窓口となる医療機関において、インフォームド・コンセントを行い、iPS 細胞株の樹立と研究応用についての承諾を得ている。さらに iPS 細胞を移植治療研究に用いることおよびシーケンス解析によりその評価をすることについては、「ヒト人工多能性幹細胞由来神経幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学に関する基礎研究」との表題で倫理申請を行い、承認を得た(承認番号:2013146)。さらにヒト胚性幹細胞の発現プロファイルを比較することについては、「ヒト胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学に関する基礎研究」との表題で、ヒト胚性幹細胞の使用計画を申請し、承認を得た(2014-01)。またこれらの細胞についてゲノム配列を東大との共同研究で解析するために、共同研究先においても倫理申請を行いそれぞれ承認を得ている。

### C. 研究結果

1. ①ASCL1・BRN2・ZIC1の3因子を発現するセンダイウイルスによりヒト末梢血由

来T細胞からの分化誘導を試みたが、上記転写因子のみでは神経細胞を得られなかった②昨年度までに開発したマーマセツト線維芽細胞からの神経直接誘導については、Molecular Brain誌にて発表した<sup>6)</sup>。

2. 今年度において改良した最新の誘導法によってhiPS細胞から約30日でHB9陽性の運動ニューロンへの分化誘導が可能になった。そのHB9陽性率はβチューブリン陽性の神経細胞あたり50%を超えた。

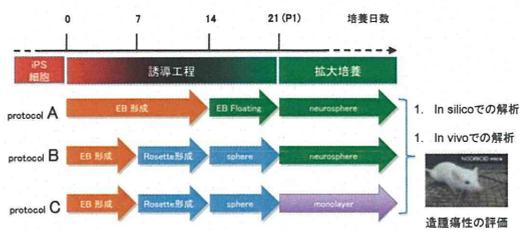
3. 昨年度までに確立したヒトiPS細胞からEBを経て90日かけてオリゴデンドロサイトを誘導する方法についてStem Cell Reports誌に発表した<sup>5)</sup>。一方、転写因子の導入については、今年度はPiggyBacベクターによる導入を試みたが、昨年度までのlentivirusベクターによる結果より効率が下がってしまい、さらなる検討が必要だった。

4.今年度は、ドパミン作動性ニューロン誘導時に一緒に誘導されてくる非神経系細胞を減らすために、GSK3β阻害剤とNotchシグナル阻害剤の添加を検討したところ、TH陽性のドパミン作動性ニューロンの割合を有意に増加させることができた。

5.昨年度に神経幹細胞誘導の過程において、適度なWNTシグナルとSHHシグナルを与えることで、後脳領域特性を持つ神経幹細胞を誘導することに成功したが、プルキンエ前駆細胞の誘導に重要と考えられる転写

因子の発現は十分ではなかった。本年度は、添加する成長因子とBMP阻害剤の添加によって、キーとなる転写因子の発現を誘導することが可能になり、プルキンエ前駆細胞と考えられるIP3R陽性、Calbindin陽性細胞が得られるようになった。

6. 脊髄損傷モデルへの移植治療の細胞源として京大CiRAで樹立された2株のiPS細胞および、そのiPS細胞よりA法、B法、C法の3つのプロトコルにより分化誘導した神経幹細胞について次世代シーケンサーによるexome解析を行うことで腫瘍化関連遺伝子に新に生じた変異の有無をin silicoで評価した。その結果は岡野研で行われたin vivoでの腫瘍化傾向のデータをほぼ裏付けるもので、2種の株のうち腫瘍化の傾向が低く、3種の分化誘導プロトコルで腫瘍化傾向が最も低いものは、in silicoにおいても最も腫瘍化関連遺伝子のexomeにおける変異は少なかった。



#### Exome解析による造腫瘍性に関わる変異の蓄積度

細胞株間の比較 1210B2 < 1231\_A3  
 分化誘導法の比較 protocol A < protocol C > protocol B

#### In vivoの移植実験による造腫瘍性の評価

細胞株間の比較 1210B2 < 1231\_A3  
 分化誘導法の比較 protocol A < protocol B < protocol C

7. TALENを用いたゲノム編集によって変

異遺伝子の修復を行ったDravet症候群患者由来のiPS細胞に対してオフターゲット効果の影響を検討するため、変異導入前後の細胞について、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析おこなったが、データベース上で予測される主要なオフターゲット部位には変異は見つからず、また遺伝子修復に用いたドナーDNAカセットのランダムな挿入もないことが判明した。

8. 本年度初頭より拠点サーバの本格稼働を開始した。上述の2つ次世代シーケンス解析のデータはこのサーバを介したファイル共有によって安全かつ迅速に行うことができた。さらに、複数の拠点を横断しての情報共有による解析として、京大再生研で樹立された2株のES細胞について拠点間での培養方法の違いによる発現プロファイルの違いをみるためのRNA-Seq解析も行ったところ、ES細胞の株ごとではなく、拠点ごとにクラスタリングされた。

#### D. 考察

1. マーモセット線維芽細胞からの直接神経分化誘導に対してヒト線維芽細胞からの直接神経分化誘導効率は低いなりに成功したが、本年度試みた末梢血由来Tリンパ球からの分化誘導は成功しなかった。一方で末梢血由来Tリンパ球からのiPS細胞の誘導には、成功していることから、Tリンパ球から神経細胞への直接分化誘導には、より強力にリプログラムしてやる必要があると考えられる。

2.運動ニューロンへの分化誘導効率をさらに高めるためには転写因子を用いた直接誘導法を再度検証する必要がある。

3.ヒトiPS細胞から分化誘導したオリゴデンドロサイトが髄鞘形成能を持つことから、移植治療などに用いることでの運動機能などの改善が期待される。一方で転写因子を用いない方法ではオリゴデンドロサイトの誘導に約3ヶ月かかることから、より早く機能的に成熟したオリゴデンドロサイトを分化誘導するために、転写因子の導入や薬剤の添加などを再度検証する必要がある。

4.現状でドパミン作動性ニューロンへの分化誘導効率はかなり高まっているが、さらに純度を挙げるためには、信頼性の高いレポーターの準備が焦点とである。

5.iPS細胞から小脳プルキンエ細胞の前駆細胞らしき細胞の分化誘導が可能になってきたが、さらに小脳顆粒細胞との共培養を行って成熟させプルキンエ細胞になることを証明する必要がある、そこでキーとなる転写因子の発現を制御することにより両者を作り分ける技術や、成熟をより進める技術を開発していく必要がある。

6. *in vivo*での腫瘍化傾向の解析から得られた結論と*in silico*のexome解析における腫瘍化関連遺伝子の変異の蓄積にある程度の相関がみられたことから、*in silico*での解析

の重要性が示された。

7.ゲノム編集技術において、株化されたものについてのオフターゲット変異の蓄積は心配されるほど高くはないというデータが蓄積してきており、その結果を支持するものとなりそうである。しかし、iPS細胞としての培養による変異の蓄積は、予想以上に多いようで、オフターゲット変異に限らず、主要な遺伝子についてのexome解析を実施して、表現型解析を行う上で問題のある変異が生じていないことを確認する必要があるだろう。

8.拠点サーバの運用が開始され、本プロジェクトで目指していた複数拠点間での情報共有による再生医療実現ための安全性評価基準の構築がようやく開始された。培養法の差によるES細胞の発現プロファイルの解析などは、現状の培養法改善のための有用なデータとなる可能性がある。

## E. 結論

ヒト iPS 細胞からの運動ニューロン、オリゴデンドロサイト、ドパミン作動性ニューロン、小脳プルキンエ細胞などの分化誘導法は、徐々により洗練されて論文発表できるデータも増えてきたが、直接誘導については、ヒトではまだ十分な検討ができていないため、今後はより強力にリプログラミングを進める方法などを検証していく必要がある。

今年度からの拠点サーバの運用が開始さ

れ、本プロジェクトで目指していた複数拠点間での情報共有による再生医療実現に役立つデータの蓄積が始まった。今後は、さらにデータを増やし再生医療実現のための安全性評価基準の構築を進める必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

<原著論文>

- 1) Kuroiwa-Numasawa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi T, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H.: Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress in Dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with *PLP1* Missense Mutations Shown by Induced-Pluripotent-Stem Cell-Derived Oligodendrocytes. **Stem Cell Reports**, 2(5): 648-661, 2014.
- 2) Zhou Z, Kohda K, Ibata K, Kohyama J, Akamatsu W, Yuzaki M, Okano HJ, Sasaki E, Okano H. Reprogramming non-human primate somatic cells into functional neuronal cells by defined factors. **Mol Brain**. 2014 7(1):24
- 3) Bamba Y, Shofuda T, Kanematsu D, Nonaka M, Yamasaki M, Okano H: Differentiation, polarization, and migration of human induced pluripotent stem cell-derived neural progenitor cells co-cultured with a human glial cell line with radial glial-like characteristics. **Biochem Biophys Res Commun**. 447(4):683-688, 2014.
- 4) Takahashi, T., Hanazawa, K., Suemizu, H., Yagihashi, C., Inoue, T., Eto, T., Sato, K., Sedohara, A., Konno, Y., Okano, H., Suematsu, S. and Sasaki, E.: Birth of healthy offspring following ICSI in in vitro matured common marmoset (*Callithrix jacchus*) oocytes. **PLoS ONE**, 9(4):e95560, 2014.
- 5) Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N, Fukuchi Y, Yuasa S, Yamazaki S, Nishimura T, Sadahira K, Fukuda K, Okano H, Nakauchi H, Morita Y, Matsumura I, Kudo K, Ito E, Ebihara Y, Tsuji K, Harada Y, Harada H, Okamoto S, Nakajima H. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. **Leukemia**. 28(12): 2344–2354,2014
- 6) Itakura G, Okano H and Nakamura M: Control of the survival and growth of human glioblastoma grafted into the spinal cord of mice

- by taking advantage of immunorejection. **Cell Transplant**, 2014. [Epub ahead of print]
- 7) Kondo T, Funayama M, Tsukita K, Hotta A, Yasuda A, Nori S, Kaneko S, Nakamura M, Takahashi R, Okano H, Yamanaka S, Inoue H. Focal Transplantation of Human iPSCs-Derived glial-Rich Neural progenitors Improves Lifespan of ALS Mice. **Stem Cell Reports** 3 (2): 242-249, 2014.
  - 8) Nishimura S, Sasaki T, Shimizu A, Yoshida K, Iwai H, Koya I, Kobayashi Y, Iakura G, Shibata S, Ebise H, Horiuchi K, Kudoh J, Toyama Y, Anderson AJ, Okano H, Nakamura M. Global gene expression analysis following spinal cord injury in non-human primates. 261:171-9.2014
  - 9) Yoshida T, Ozawa Y, Suzuki K, Yuki K, Ohyama M, Akamatsu W, Matsuzaki Y, Shimmura S, Mitani K, Tsubota K, Okano H. The use of induced pluripotent stem cells to Reveal Pathogenic Gene Mutations and explore Treatments for Retinitis pigmentosa **Mol Brain**. 7 (1):. 45, 2014.
  - 10) Kawase S, Kuwako K, Imai T, Renault-Mihara F, Yaguchi K, Itohara S, Okano H. Rfx Transcription Factors Control Musashi1 Transcription in Mouse Neural Stem/Progenitor Cells. **Stem Cells Dev**. 23 (18): 2127-2128 2014.
  - 11) Maekawa M, Yamada K, Toyoshima M, Ohnishi T, Iwayama Y, Shimamoto C, Toyota T, Nozaki Y, Balan S, Matsuzaki H, Iwata Y, Suzuki K, Miyashita M, Kikuchi M, Kato M, Okada Y, Akamatsu W, Mori N, Owada Y, Itokawa M, Okano H, Yoshikawa T. Utility of Scalp Hair Follicles as a Novel Source of Biomarker Genes for Psychiatric Illnesses. **Biol Psychiatry**. 2014[Epub ahead of print]
  - 12) Takenouchi T, Yamaguchi Y, Tanigawa E, Kosaki R, Okano H, Kosaki K.: Novel overgrowth syndrome phenotype due to recurrent de novo PDGFRB mutation. **J. Pediatrics**, 166(2):483-6. 2015
  - 13) Tashiro S, Shinozaki M, Mukaino M, Renault-Mihara F, Toyama Y, Liu M, Okano H.: BDNF induced by treadmill training contributes to the suppression of spasticity and allodynia after spinal cord injury via up-regulation of KCC2. **Neurorehabilitation & Neural Repair**, (in press)2015

- 14) Nori S, Okano H. : Long-term safety issues associated with iPSC-based cell therapy in a spinal cord injury model: Oncogenic transformation with epithelial-mesenchymal transition. **Stem Cell Reports**, (in Press)2015
- 15) Itakura G, Kobayashi Y, Nishimura S, Iwai H, Takano M, Iwanami A, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Controlling immune rejection is a fail-safe system against potential tumorigenicity after human iPSC-derived neural stem cell transplantation. **PLoS ONE** 10(2):e0116413, 2015.
- Okano H.: Leptin Receptor Makes its Mark on MSCs. **Cell Stem Cell**, 15(2): 112-114, 2014.
- 3) Yano M, Ohtsuka T, Okano H. RNA-binding protein research with transcriptome-wide technologies in neural development. **Cell Tissue Res.** [Epub ahead of print]2014
- 4) Okano H. :Stem Cell Research and Regenerative Medicine in 2014: first year of Regenerative Medicine in Japan. **Stem Cells Dev.** 23 (18): 2127-2128, 2014.
- 5) Fujioka M, Okano H., Ogawa K. Inflammatory and immune responses in the cochlea: potential therapeutic targets for sensorineural hearing loss. **Front Pharmacol.** 23;5:287. 2014

<In Revision>

- 1) Fukami S, Kushida-Fukami M, Tokunaga A, Okano HJ, Okano H.: Tead/TEF transcription factors regulate neurogenesis by controlling Hes1 expression through a Notch-independent pathway. (x PNAS) In preparation
- 6) Fujioka M, Okano H., Edge AS. Manipulating cell fate in the cochlea: a feasible therapy for hearing loss. **Trends Neurosci.** pii: S0166-2236(14)00232-X. 2015

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

2. 学会発表

<国際>

<総説論文>

- 1) Imaizumi Y, Okano H.: Modeling human neurological disorders with induced pluripotent stem cells. **J Neurochem.** 129(3):388-399, 2014.
- 2) Matsuzaki Y, Mabuchi Y and Hideyuki Okano : Modeling neurological and psychiatric disorders using iPSCs technologies and transgenic non-human primates. : Keystone Symposia Stem Cells and Reprogramming(Z4),

- 2014.4.10 \*2014.4.6-11 (Resort at Squaw Creek • Olympic Valley, California USA)
2. Hideyuki Okano : Brain science using iPS Cell technology and transgenic non-human primates. : 29<sup>th</sup> CINP World Congress of Neuropsychopharmacology (CINP-The International College of Neuropsychopharmacology), Plenary Lecture, 2014.6.24 \*2014.6.22-26 (Vancouver Convention Centre, Vancouver, Canada)
  3. Hideyuki Okano : Modeling neurological and psychiatric disorders using iPSC technologies and transgenic non-human primates. : BRIDGING BIOMEDICAL WORLDS (BBW 2014) - Turning obstacles into opportunities for stem cell therapy, 2014.10.14 \*2014.10.13-15 (China National Convention Center (CNCC), Beijing, PR China)
  4. Hideyuki Okano : Application of human iPS cells for inner ear biology and human disease modelin. :Inner Ear Biology Workshop 2014 in Kyoto, Lecture, 2014.11.3 \*2014.11.1-4 (Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan)
  5. Hideyuki Okano : iPS Cell Technologies:Significance and Applications to CNS Regeneration and Disease Research. :2014 WASF on Stem Cell Research and Regenerative Medicine “The Impact of Regenerative Medicine 2014”, 2014.11.6 \*2014.11.6-7 (Mission Bay Convergence Center at UCSF, San Francisco, USA)
  6. Hideyuki Okano : Transgenic marmosets for modeling human neurological and psychiatric disorders: Minisymposium 668 "Transgenic Primate Models of Human Brain" at Neuroscience 2014, 2014.11.19 \*2014.11.15-19 (the Walter E. Washington Convention Center, Washington DC, USA)
  7. Hideyuki Okano : Modeling psychiatric/neurological disorders using iPS cell technologies and transgenic non-human primates. : BROAD Institute Seminar, 2014.12.4 \*2014.12.4 (Auditorium, BROAD Institute, MA, USA)

8. Hideyuki Okano : Cell transplantation therapies for spinal cord injury focusing on human iPS cells.: The 18<sup>th</sup> Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience”iPS Cells for Regenerative Medicine”, 2015.1.15 \*2015.1.15-17 (Center for Learning and Innovation (CLI), Takeda Pharmaceutical Company, Ltd., Suita, Japan)
9. 岡野栄之 : Brain Science using Transgenic non-Human Primates : 第5回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム BRI International Symposium 2015 Genome Editing Technology; its Current State-of-Art and Application to Brain Research, Keynote lecture, 2015.3.6 \*2015.3.5-6 (Center for Integrated Human Brain Science (6F), Niigata University, Niigata, Japan)
- <国内>
1. 岡野栄之 : iPS 細胞を用いた神経系の再生・疾患・創薬研究 : 大日本住友製薬社内学術講演会、2014.4.2 \*2014.4.2 (大日本住友製薬株式会社大阪研究所、大阪)
2. 岡野栄之 : iPS 細胞技術を用いた再生医療と疾患研究 : 第1回 Medical Frontier Consortium beyond the Organocentric Dogma、2014.4.5 \* 2014.4.5-6 (第一ホテル東京シーフォート、東京)
3. 岡野栄之 : iPS 細胞を用いた神経系の再生・疾患研究 : 岡崎市医師会学術講演会、2014.4.17 \*2014.4.17 (岡崎市医師会公衆衛生センター、岡崎)
4. 岡野栄之 : iPS 細胞の医療応用について : 東京大学・教養学部全額自由研究ゼミナール、2014.4.30 \*2014.4.30 (慶應義塾大学信濃町キャンパス北棟ラウンジ、東京)
5. 岡野栄之 : iPS 細胞技術を活用した未来の医療について : 特別展「医は仁術 (じんじゅつ)」～江戸の医から未来を眺める展覧会～・特別講演会、2014.5.10 \*2014.5.10 (国立科学博物館、東京)
6. 岡野栄之 : iPS 細胞技術を活用した未来の医療について : BIOtech2014/第1回個別化医療技術展「iPS 細胞研究最前線」、2014.5.15 \* 2014.5.15 (東京ビッグサイト、東京)
7. 岡野栄之 : iPS 細胞研究に伴う新たな倫理的な問題 : 第55回日本神経学会学術大会・シンポジウム、2014.5.23 \*2014.5.21-24 (福岡国際会議場、福岡)

8. 岡野栄之：iPS 細胞技術を用いた神経系の再生・疾患研究：第 55 回日本神経学会学術大会・Super Expert Session 3、2014.5.24\*2014.5.21-24（福岡国際会議場、福岡）
9. 岡野栄之：iPS 細胞を用いた小児神経疾患の病態解析：第 56 回日本小児神経学会学術集会・シンポジウム、2014.5.29 \*2014.5.29-31（アクトシティ浜松、浜松）
10. 岡野栄之：脳のアンチエイジングと先制医療：第 14 回日本抗加齢医学会総会・特別講演、2014.6.6 \*2014.6.6-8（大阪国際会議場、大阪）
11. 岡野栄之：iPS 細胞を用いた神経系の再生・疾患・創薬研究：第 110 回日本精神神経学会学術総会・特別講演、2014.6.27 \*2014.6.26-28（パシフィコ横浜・横浜）
12. 岡野栄之：Neuroscience using iPS cell technologies and Transgenic non-human primates：沖縄科学技術大学院大学セミナー、2014.7.4 \*2014.7.4（沖縄科学技術大学院大学、沖縄県国頭郡恩納村）
13. 岡野栄之：iPS 細胞技術を活用した未来の医療について、第 24 回新世紀政経フォーラム、2014.7.9 \*2014.7.9（パレスホテル東京、東京）
14. 岡野栄之：iPS 細胞技術による神経系の再生医学・疾患研究、第 73 回東京矯正歯科学会学術大会・特別講演、2014.7.10 \*2014.7.10（有楽町朝日ホール、東京）
15. 岡野栄之：iPS 細胞技術の基本概念と再生医療および疾患研究への応用、慶應義塾大学医学部第 103 回生涯教育研修セミナー、2014.7.12 \*2014.7.12（ハイアットリージェンシー東京、東京）
16. 岡野栄之：iPS 細胞技術と革新的脳科学を用いた医療革命、慶應義塾高等学校第 56 回招待会議・基調講演、2014.7.20（慶應義塾大学日吉キャンパス来往舎、横浜市）
17. 岡野栄之：iPS 細胞と遺伝子改変霊長類を用いた神経疾患の病態解明と創薬研究、ゲノム創薬・医療フォーラム第 2 回談話会、2014.8.7 \*2014.8.7（東京大学医科学研究所講堂、東京）
18. 岡野栄之：iPS 細胞技術による神経系の再生医学・疾患研究、ダイアログ株式会社オリジナルセミナー臓器再生を目指した再生医療開発の最前線～早期実用化に向けた Strategy～、2014.8.8 \*2014.8.8（品川コクヨホール、東京）

19. 岡野栄之：iPS 細胞技術を活用した未来の医療について、iPS 細胞技術を活用した未来の医療について、公益財団法人神奈川科学技術アカデミー (KAST) 25 周年記念式典・講演会、2014.9.2 \*2014.9.2 (神奈川サイエンスパーク、川崎)
20. 岡野栄之：革新的な脳科学による認知症克服への挑戦、慶應義塾大学医学部百寿総合研究センター開所記念式・百寿者百万人時代を見据えて、2014.9.2 \*2014.9.2 (明治記念館、東京)
21. 岡野栄之：脊髄損傷の革新的な再生医療、第 15 回運動器科学研究会、2014.9.5 \*2014.9.5 (ベルサール三田・東京)
22. 岡野栄之：iPS 細胞技術が作り出す再生医療の未来、神奈川障害者職業能力開発校「特別講話」、2014.9.10 \*2014.9.10 (神奈川障害者職業能力開発校、相模原)
23. 岡野栄之：iPS 細胞技術：その再生医療と疾患研究への応用、第 37 回日本神経科学大会・シンポジウム、2014.9.11 \*2014.9.11-13 (パシフィコ横浜、横浜)
24. 岡野栄之：RNA 結合蛋白質 Musashi による幹細胞機能の転写後レベルでの調節機構、第 37 回日本神経科学大会・シンポジウム、2014.9.11 \*2014.9.11-13 (パシフィコ横浜、横浜)
25. 岡野栄之：iPS 細胞技術の神経系の再生医療および疾患研究への応用、第 50 回日本移植学会総会・特別講演、2014.9.12 \*2014.9.10-12 (京王プラザホテル、東京)
26. 岡野栄之：iPS 細胞技術を用いた再生医療と脳科学、千葉市科学館・大人が楽しむ科学教室・健康と科学シリーズ・特別講演会、2014.9.14 \*2014.9.14 (千葉市科学館、千葉)
27. 岡野栄之：iPS 細胞・幹細胞技術と革新的脳科学を用いた認知症の克服への挑戦、北海道大学遺伝子病制御研究所・IGM スペシャルセミナー、2014.9.17 \*2014.9.17 (北海道大学遺伝子病制御研究所、札幌)
28. 岡野栄之：iPS 細胞による中枢神経系の再生医療、日本せきずい基金創立 15 周年記念 Walk Again 2014・脊髄再生国際シンポジウム・慢性期への挑戦、2014.9.20 \*2014.9.20 (東京国際交流館、東京)

29. 岡野栄之：ヒト iPS 細胞技術及び遺伝子改変動物を用いた ALS を始めとする神経変性疾患の病態の解明、厚生労働科学研究委託費 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））「筋萎縮性側索硬化症（ALS）新規治療法開発をめざした病態解明」班・平成 26 年度ワークショップ、2014.9.26  
\*2014.9.26（都市センターホテル、東京）
30. 岡野栄之：iPS 細胞を用いた神経系の再生・疾患研究、Hypertension Expert Forum, 2014.10.4 \*2014.10.4（ザ・プリンス パークタワー東京、東京）
31. 岡野栄之：ヒト iPS 細胞と霊長類モデルを用いた治療開発の基盤整備、文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究（研究領域提案型）「脳タンパク質老化と認知症制御」キックオフシンポジウム、2014.10.8 \*2014.10.8（KKR ホテル、東京）
32. 岡野栄之：Investigation of Psychiatric/Neurological disorders using iPS cell technologies and transgenic non-human primates、第 87 回日本生化学会大会・シンポジウム、2014.10.16 \*2014.10.15-18（国立京都国際会館、京都）
33. 岡野栄之：iPS 細胞と遺伝子改変霊長類を用いた神経疾患の病態解明と創薬研究、CBI 学会 2014 年大会・プレナリーレクチャー、2014.10.28  
\*2014.10.28-30（タワーホール船堀、東京）
34. 岡野栄之：iPS 細胞と脳科学が切り開く未来医療、読売テクノ・フォーラム ゴールド・メダル賞創設 20 周年記念講演会、2014.11.26 \*2014.11.26（読売新聞東京本社、東京）
35. 岡野栄之：iPS 細胞研究は、医学をどう変えるか？、東京三田倶楽部創立 40 周年記念式記念講演・懇親会、2014.11.29 \*2014.11.29（慶應義塾大学三田キャンパス西校舎、東京）
36. 岡野栄之：iPS 細胞技術を用いた新時代の医療：第 282 回早期食道癌診断勉強会・教育講演、2014.12.13  
\*2014.12.13（大手町ファーストスクエアカンファレンス、東京）
37. 岡野栄之：Brain Mapping Project using the common marmoset.：第 4 回日本マーモセット研究会、2015.1.23 \*2015.1.22-23（犬山国際観光センター フロイデ、犬山）
38. 岡野栄之：iPS 細胞の現状・将来展望：トレリーフ 5 周年記念講演会、