

平成 2 5 年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術部

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) ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発

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 1 5 条第 1 項第 2 号

3. 背景及び目的・目標

多能性を有する幹細胞は様々な細胞に分化する能力を有している。適切に誘導を行うことで神経、心筋、膵臓β細胞など様々な細胞を得ることができる。このため、創薬における薬効評価や安全性薬理試験などの創薬スクリーニング、発生・分化や疾患メカニズムの解明、再生医療への応用など生命科学や医療への貢献が大きく期待されている。中でも iPS 細胞（人工多能性幹細胞）は、皮膚等の組織から作製可能であることから倫理的な障壁が低く、加えて遺伝的に多様な細胞を容易に得られること、免疫拒絶反応を回避あるいは軽減可能であることなどから、有用な細胞源として期待が大きい。

しかし、ヒト幹細胞を産業利用に繋げるためには、細胞の効率的な確保方法、腫瘍化の問題、様々な状態が混在したヘテロな細胞集団から目的細胞を選別する方法、品質を維持・管理し培養する方法の確立など、「品質の確保されたヒト幹細胞の安定的な大量供給」を可能とすることが、幅広い応用に繋げていく上での根幹となる基盤技術として極めて重要である。このためには幹細胞の性質をよりよく理解した上で、「幹細胞の品質評価指標」を設定することが必要である。

一方、ヒト幹細胞の産業応用として最も早い実用化が期待されている創薬分野では、ヒト幹細胞から分化誘導を行った各種ヒト細胞を、開発候補薬の有効性や安全性の評価に用いることで、開発効率の向上やリスクを低減する技術の開発が求められている。中でも安全性評価については、製薬企業全体で共通的に用いることが可能である。薬効と副作用は表裏一体の関係にあり、創薬研究のより早い段階で、ヒトに対する安全域の程度が許容範囲となるかどうかを的確に推測することが、開発候補薬として臨床開発に進めるかどうかを判断する上で重要な情報である。このため、現在用いられている動物細胞ベースの技術を革新し、ヒト個体での薬効と安全性をより精度高く予測する基盤技術の開発が重要な課題となっている。

こうした状況を踏まえ、本研究開発は、様々な細胞に分化する能力を有するヒト幹細胞の産業利用促進の重要な基盤となる、品質の管理されたヒト幹細胞の安定的な大量供給を可能とする基盤技術の開発を行う。また、ヒト幹細胞から心筋などの細胞に効率よく分化させ、これを利用して、開発候補薬の潜在的な致死性不整脈を誘発する可能性を、ヒト個体と高い相関性をもって予測する創薬スクリーニングシステムの開発を行う。

これにより、我が国が世界を先導している科学的成果であるヒト iPS 細胞や、その他のヒト幹細胞をいち早く産業応用に繋げるとともに、培養装置や基材などの周辺産業を含めた国際市場への展開を図り、産業競争力の確保に繋げることが期待できる。加えて、(1) 品質の管理された細胞源の安定的な供給体制の構築が促進され、再生医療の早期実現の促

進、(2)創薬研究のより早い段階において、開発候補薬を効率よく絞り込むことが可能となり、開発期間の短縮や研究開発費の削減、さらには、より安全な医薬品の開発の促進が期待される。

なお、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、個別化医療・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「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施する。また、「医療イノベーション5か年戦略」(平成24年6月医療イノベーション会議策定)においても、「再生医療やその他幹細胞関連産業の実現化のため、iPS細胞等幹細胞を安定的に大量供給可能とする基盤技術を開発」することや、「新薬開発の効率性の向上を図るため、iPS細胞を用いた医薬品の安全性評価システムを開発」することが位置づけられている。

[委託事業]

研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」

【最終目標（平成27年度末）】

「ヒト幹細胞の品質評価指標」を策定し、再生医療への応用を可能とする品質レベルで管理された4種以上のヒト幹細胞を、安定的に大量供給可能とするシステムを確立する。加えて、確立した品質評価技術をベースとするヒト幹細胞の標準化原案を策定する。

【中間目標（平成25年度末）】

ヒト幹細胞の培養操作を自動化した安定培養装置のプロトタイプを完成させるとともに、本装置を用いて複数の異なる性質を持ったヒト幹細胞の培養実験を通じて、改良の基礎となる培養液・培養基材のプロトタイプを完成させる。また、融解後の生存率が80%以上となる凍結保存技術を構築する。

加えて、細胞から得られる多次元情報の統合によって説明される、ヒト幹細胞の品質管理に有効な評価指標候補を複数策定する。

研究開発項目②「ヒトiPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」

【最終目標（平成25年度末）】

健常人由来、心疾患患者由来のヒトiPS細胞等幹細胞を活用し、心筋細胞等へ効率的に分化誘導を行い、これを用いて開発候補薬の心毒性等の有無を高い感度と特異度をもって予測できる、製薬企業等が利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。利用する心筋細胞については、通常のフェーズI試験における治験者数と同等の体制となるような数の、異なるヒトiPS細胞等幹細胞から分化させたものを用いることが可能な、細胞供給の準備体制を整えるものとする。

4.実施内容及び進捗（達成）状況

研究開発を取り巻く国内外の環境変化に鑑み、平成21～22年度までの研究開発成果を踏まえ、平成23年1月に研究開発項目の統廃合など基本計画の改訂を行った。これと同時に研究開発マネジメント体制も刷新し、研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」については、国立大学法人京都大学iPS細胞研究所 副所長 中畑龍俊氏を、研究開発項目②「ヒトiPS細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」については、国立大学法人東京医科歯科大学生体材料工学研究所 教授 安田賢

二氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施した。

研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」については、細胞領域毎に四半期に一度程度の頻度で研究開発委員会を開催するとともに、プロジェクト運営会議を行い、相互の研究計画の共有化と今後のテーマ間連携について検討を行った。

研究開発項目②「ヒト iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」については、研究環境の目まぐるしい変化に対応するため、月一度以上の頻度で打ち合わせを開催するとともに、プロジェクト運営会議を行い、進捗確認や今後の展開について協議を行ないつつ研究開発を進めた。

4. 1 平成24年度（委託）事業内容

研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」

(1) ES 細胞領域

国立大学法人京都大学物質-細胞統合システム拠点 拠点長 中辻憲夫サブプロジェクトリーダーのもと、以下の研究開発を実施した。

(a) 「ヒト ES 細胞の安定な培養・保存技術の開発」

・日産化学の保有する低分子化合物、約 3,000 種類についてヒト ES 細胞の未分化増殖に関する効果を調べた（年度内に終了予定）。その中に前年度に見出した化合物よりも効果があり、bFGF（50ng/ml）とほぼ同等の細胞増殖効果をもつ化合物を見出した。

・本年度は大量培養により適している緩慢凍結法について検討を行い、前年度に引き続き不凍ポリアミノ酸での検討を行った。それに加えて、新規な凍結液による効果について検討を行った。

・ヒト ES 細胞三次元大量培養のための、新規培養基質の開発とその条件検討を行った。ナノファイバーを新規培養基質として使用したヒト ES 細胞の新規培養法に関しては特許出願を行った。

・細胞スフェアを浮遊状態に保つ高分子物質を含む培地でのスフェア培養を、ニプロ製ガス透過性膜のチューブ型バックを用いて継代維持に成功、FACS 解析で多能性マーカーを保持することを確認した（特許出願済）。

・ヒト ES 細胞の培養条件に含まれるタンパク質等を置換可能な低分子化合物のさらなる同定および有効な組み合わせを検討し、少なくとも接着培養条件下において短期間安定して培養可能な化合物の組み合わせを見出した。

・ヒト ES 細胞のスフェア浮遊培養を可能とする培養基材（ポリマー2）を見出し、特許出願した。またヒト ES 細胞の自己増殖を促進する低分子化合物並びに細胞足場材料のシードを見出した。

・昨年度京都大学にて開発されたヒト多能性幹細胞の浮遊培養系を自動培養装置に展開するための要素技術の検討を行い、自動培養装置のプロトタイプの開発にも着手した。閉鎖系凍結保存技術の開発としては、予備評価可能な試作品の作製に着手した。

・ヒト ES 細胞イメージング装置試作機を完成し、最適な状態のヒト ES 細胞と分化細胞を培養下で生きたままイメージングにより判別する実験を開始した。

・多能性幹細胞の未分化維持を可能とする動物成分不含（ゼノフリー）の新規培地のプロトタイプの開発に成功した。

（実施体制：国立大学法人京都大学、日産化学工業株式会社、ニプロ株式会社、浜松ホトニクス株式会社、株式会社リプロセル）

(b) 「ヒト ES 細胞の品質評価指標の開発」

・京大保有の ES 細胞株 3 種及び海外株 1 種のゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、メタボローム、糖鎖について統合解析を進め、癌化、ゲノム損傷応答、未分化維持、分化誘導等に関する既知の機能遺伝子群に焦点を置いて、明確な基準の元にリスク要因の検出を行う為の解析パイプラインの構築を行うと共に、大量培養法に対応する浮遊培養細

胞サンプルの解析を開始した。

- ・低分子化合物を用いた安価で簡便な心筋分化誘導法を新たに確立し、複数種の ES 細胞株での心筋分化能の比較を行った (Cell Reports 2012.10.25)。さらにスフェア培養で継代された ES 細胞株 (KhES1) についてもこの心筋分化誘導法を試みた。

- ・ヒト ES 細胞から約 2 週間で神経細胞を誘導する迅速で簡便な誘導系を開発し、従来の方法では神経分化が困難な KhES3 においても神経細胞を得ることができた。

- ・計 7 株のヒト ES 細胞の内胚葉および肝細胞への分化指向性について検定した。

- ・計 5 株のヒト ES 細胞と比較対照としてのヒト iPS 細胞株を用いて、機能的な好中球への分化指向性を比較検討した。

- ・計 6 株のヒト ES 細胞株及び KhES-1 および 3 株の Early/Late passage について、造血細胞への分化能について造血幹前駆細胞 (CD34+CD43+) の出現頻度及び造血細胞コロニー形成能を指標に解析を行った。ヒト ES 細胞株間において分化指向性が異なること、また KhES-3 株では Early/Late passage では分化指向性に有意な差が認められた。

- ・京大樹立の 2 株と外国株 1 株のヒト ES 細胞の各培養条件下におけるエピゲノム (ヒストン化学修飾) 解析を行い、サンプル間での転写とエピゲノム状態の比較を行い、評価指標領域の抽出作業を開始した。

- ・脂質の分析技術開発を進めるとともに、エネルギー代謝系、アミノ酸、核酸など脂質以外の一次代謝産物についても解析技術を検討し、分化誘導における変動および継代数による違いを検討した。

- ・エピゲノム解析用自動化サンプル調製システムを完成し、3 種類の異なるヒト ES 細胞につきマイクロアレイを用いてメチル化及び脱メチル化 DNA 解析を行った。

- ・未分化および分化ヒト ES 細胞を用いて、定量的解析が可能である質量分析装置 (LC-MS) を用いた測定法を開発した。その結果、未分化 ES 細胞の継代の違いを判別できる糖鎖バイオマーカー候補および未分化/分化 ES 細胞で特異的に付加されている糖鎖バイオマーカーを見出した。

- ・3 株のヒト ES 細胞株の各 3 段階の培養サンプルを材料に、幹細胞を特徴づける遺伝子発現を解析し、幹細胞の未分化状態を簡便に調べる試薬を製品化した。

- ・新規ゼノフリー培地で培養した多能性幹細胞の分化指向性の初期検討を開始した。

(実施体制：国立大学法人京都大学 (再委託先：独立行政法人医薬基盤研究所、学校法人慶應義塾、国立大学法人東京大学、国立大学法人千葉大学、独立行政法人理化学研究所)、株式会社島津製作所、ジェネティン株式会社、住友ベークライト株式会社、タカラバイオ株式会社、株式会社リプロセル)

(2) iPS 細胞領域

国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所 副所長 戸口田淳也サブプロジェクトリーダーのもと、以下の研究開発を実施した。

(a) 「ヒト iPS 細胞の安定な培養・保存技術の開発」

- ・自動培養装置、凍結保存装置の開発では京都集中研に可能な限り実験を集中させ、同一条件での細胞培養・保存・形態観察を行い、個々の装置の連結に必要な細胞培養データを収集した。自動培養装置では培養皿から細胞を収集するために必要なスクレーパー装置の試作を行い、最適化を図っている。凍結保存装置に関しては凍結・融解による細胞生存率への影響を種々の凍結・解凍プログラムを用いながら検証し、至適条件を見出してきた。細胞の形態観察試験では熟練者が手培養した種々の条件のコロニーを対象としてコロニーの良否判定を行うために必要な基本画像データならびに判別のアルゴリズムの基本プログラムを検証したが、自動培養装置における自動判別でこれらの機能がどのように反映されるのかを検証中である。更に自動培養装置と形態観察装置の連携については培養皿に幾つかの改良を加えることで対応できることが明らかとなった。一方、今後どのような装置が市場で受け入れられるのかを予想しながら成果機の仕様を検討す

る必要性があるため、iPS 細胞を取り巻く研究ならびに産業動向調査を二度にわたって実施した。現状では多岐にわたる用途が考えられるため、それらの情報をもとに汎用性及び対費用効果の高い装置のイメージを明確にするとともに、調査を継続させ、よりユーザーニーズに適した装置イメージを作り出して行く（川崎重工、太陽日酸、ニコン、京都集中研、医薬基盤研究所）。

・自動培養装置に適した培地・培養基材に関する検討では市販培地ならびに現在 CiRA を中心に進めている開発培地を対象とした基礎検討を行った。培地検討では事前に準備したマザーストック細胞を用い、個々の培地で培養した際の細胞形態、未分化マーカー、幹細胞マーカーの解析、操作の利便性などの複数項目から総合的な評価を行った。今回はまず候補とした培地を用いる手培養での検討を行ったが、現在 CiRA で用いられている培地が最も優れていることが明らかとなった。一方、それ以外にも CiRA 培地に匹敵する培地が見出された。この結果を踏まえ、自動培養装置での検証試験の基本案を作成した（成育研）。一方、培養基材に関する検討ではラミニン活性化フラグメントと CiRA 培地を併用することにより、従来培地を用いた培養成績に比べ、細胞増殖性、未分化性維持などの点で優れた成績を得ることが出来た（大阪大学）。

（実施体制：幹細胞評価基盤技術研究組合（組合員：川崎重工業株式会社、太陽日酸株式会社、株式会社ニコン、独立行政法人国立成育医療研究センター）（共同実施：国立大学法人名古屋大学）、独立行政法人医薬基盤研究所、国立大学法人大阪大学）

（b）「ヒト iPS 細胞の品質管理・安定供給技術の開発」

・用語の標準化に関しては有識者を交えた用語検討会を設立し、標準化を必要とする用語の絞り込みを行うとともに、それらの用語の定義づけを順次行ってきた。平成 25 年 3 月までに本活動は一旦集結させ、これまでの成果を纏める（バイオインダストリー協会）。（実施体制：幹細胞評価基盤技術研究組合（組合員：一般財団法人バイオインダストリー協会））

（3）滑膜由来間葉系幹細胞領域

株式会社ツーセル 代表取締役社長 辻紘一郎サブプロジェクトリーダーのもと、以下の研究開発を実施した。

・大量培養に相関する一連の細胞調整方法（組織からのMSC分離法、培地の組成、細胞剥離・継代）の検討、大量培養による連続継代が細胞に与える影響の解析と移植に適する継代数の検討、大量培養した滑膜由来MSCから作製された細胞製品の安全性評価と有効性確認のための移植試験方法の検討を行った。組織からのMSC分離法においては、Explant法でMSC分離し、無血清条件で培養することが安定的な培養に有用なことがわかった。培地の組成においては、培地の性能やコストに大きく関与する成分であるアルブミンとPDGFを、合成・精製方法が違う数種で、滑膜由来MSCにより適合するかの検討と評価を行っている。同時に、培地の安定供給・原価軽減を目標に粉末化・濃縮化を検討した。細胞剥離・継代においては、細胞剥離用溶液としてGMP準拠で製造されている市販品の中に、細胞へのダメージが少なく細胞生存率の高いものがあることが分かった。ヒト滑膜由来MSCを連続継代し、細胞の特性（未分化性、分化能など）と安全性の評価を行った。細胞株によるばらつきを考慮に入れ8継代までは大きな変化を示さないことが判った。移植する細胞の継代数は暫定的に6継代までとすることにし、この結果を安全性評価と有効性確認のための移植試験に反映させた。大量培養した滑膜由来MSCから作製された細胞製品の癌化する危険性を評価するために、軟寒天コロニー形成法、染色体異常試験、重度免疫不全マウス（NOGマウス）を用いた造腫瘍試験を行った。軟寒天コロニー形成法と染色体異常試験では腫瘍化しないことが示唆された。重度免疫不全マウス（NOGマウス）を用いた造腫瘍試験では、3ヶ月間

の経過観察中である。有効性確認のためのブタ移植試験についてはブタ間葉系細胞を必要数増殖させることが出来ないという問題点があったが、培養皿表面をカルボキシル化することにより必要細胞数を確保することが出来るようになった。

・大量培養の自動化・機械化について、ハイブリッド化による大量培養法を開発するために、微小重力環境培養あるいは試作した浮遊回転培養装置を用いた浮遊回転培養法における細胞接着面積の拡大を検討した。微小重力環境培養では、通常の1G環境と比較して約3倍早く増殖することを確認した。浮遊回転培養では、有血清培地及び無血清培地ともに検討をしたが、滑膜由来MSCは増殖しなかった。理由として、マイクロキャリアへの接着が難しいこと、マイクロキャリアから細胞を剥がして回収する際の効率が悪いことが挙げられる。一方、培養容器の検討については中空糸にて滑膜由来MSCの培養を行った実験では、細胞が増殖している可能性はあるものの細胞の回収が難しく、ほとんど回収できなかった。PETフィルムを使った培養では、フィルム表面に特殊なプラズマ処理をすると、滑膜由来MSCが培養できることが分かった。マイクロキャリアや中空糸に比べPETフィルムの表面に接着した細胞の回収は容易である。そこで、培養容器の中で本フィルムの表面積を最大にする形状を検討し、試作した微小重力装置と浮遊培養装置を使った培養条件（培地量、培地循環速度、pH、DO等）を検討している。その他海外メーカー製培養装置での滑膜由来MSCの培養を検討した。

・滑膜由来MSC特定マーカーおよび、滑膜由来MSCと骨髄由来MSC共通マーカーの探索をおこなった。DNAマイクロアレイを用い線維芽細胞と比較して無血清培地培養した滑膜由来MSCで有意に発現が高いマーカー候補遺伝子16遺伝子と有意に低い7候補遺伝子を見出した。それらの遺伝子発現を滑膜由来MSCの株数を増やしてqPCRにてmRNA発現を定量解析し、特定のマーカーにてMSCの純度を判定する方法について検討中である。

・細胞保存液（輸送液）の種類及び保存温度が細胞の生存及び分化特性に与える影響については、温度、ウシ胎仔血清及びハンクス平衡塩溶液（HBSS）の有無等の条件設定を行い、その後の細胞増殖活性、細胞数および生存率を測定するとともに7日間保存後の細胞を軟骨分化培地中で21日間培養後、分化能を評価した。4℃または室温下でDMEMあるいはHBSS中に1日間保存した細胞については増殖活性、生存率は変化がなかった。軟骨への分化能については、室温HBSS群、4℃DMEM群では有意に低下することが示され、細胞製品は冷蔵保存により軟骨分化能の低下をきたすこと、また、HBSSよりもDMEMで保存した方が分化能はより維持されることが明らかになった。細胞の凍結保存法に関してはDMSO、DMSO以外の2種の凍結防止液を用いてCASプログラムフリーザーで凍結し、細胞の生存及び分化特性に与える影響を検討中である。

（実施体制：株式会社ツーセル（共同実施：有限会社スリーブラケット）、株式会社スペース・バイオ・ラボラトリーズ、DSファーマバイオメディカル株式会社、株式会社丸菱バイオエンジ、国立大学法人大阪大学、学校法人福田学園大阪保健医療大学、国立大学法人広島大学）

（4）Muse 細胞領域

国立大学法人東北大学大学院医学系研究科 教授 出澤真理サブプロジェクトリーダーのもと、以下の研究開発を実施した。

これまでに開発した間葉系組織に存在する SSEA3 陽性細胞として分取する手法を用いて取得した Muse 細胞と Non-Muse 細胞の比較、異なるヒト組織（骨髄、皮膚、脂肪）由来の Muse 細胞間の比較及び異なる動物種（ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ）由来の Muse 細胞の取得に成功し、それらの比較による共通因子の解析を、遺伝子発現解析、プロテオーム解析技術等を用いて行い、分離精製によるダメージの少ない Muse 細胞の選別に有用な因子となる候補を複数見出すとともに、今後の Muse 細胞取得のためのマ

ーカーとしての可能性を検討した。

分化能及びクラスター形成能について異なるヒト組織（骨髄、皮膚、脂肪）由来の Muse 細胞間の比較を行なったところ、脂肪組織が含有率やクラスター形成能が高く、有望なソースである可能性を得た。また、レンチウイルスを用いて GFP を導入した Muse 細胞を、肝硬変モデル動物に移植し、*in vivo*における分化能の検証を進めた。

さらに、従来のレーザーによる分離を行うセルソーターに変わる、いくつかの Muse 細胞取得方法について効率等の検証を行うとともに、プロトコルの改善に努めた。

加えて、出澤サブプロジェクトリーダーとは独立した第三者による Muse 細胞の研究を進めることで、Muse 細胞に関する再現性を評価した。

（実施体制：国立大学法人東北大学、国立大学法人京都大学、株式会社 Clio（共同実施：公立大学法人首都大学東京、国立大学法人山口大学））

（5）間葉系幹細胞領域

独立行政法人国立成育医療研究センター 研究所 生殖・細胞医療研究部 幹細胞・生殖学研究室 室長 阿久津英憲サブプロジェクトリーダーのもと、以下の研究開発を実施した。

・細胞の増殖性、生存性、安定性に関する評価をレクチンマイクロアレイなどの新しい技術を取り入れながら検討した。その結果、細胞の未分化性・増殖性などのポテンシャルを示すマーカーを見出すことが出来た。このマーカーが細胞内でどのような経路をたどり細胞の活性化あるいは不活性化と関連しているのかを検証中である（成育医療センター）。

（実施体制：幹細胞評価基盤技術研究組合（組合員：国立成育医療研究センター、独立行政法人産業技術総合研究所）（共同実施：地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター））

研究開発項目②「ヒト iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」

（1）ヒト iPS 細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

1 型、3 型の遺伝性 QT 延長症候群症例から iPS 細胞を樹立し、これらの細胞から心筋細胞を分化誘導した。1 型遺伝性 QT 延長症候群由来の再生心筋細胞では field potential duration (FPD 時間：心電図の QT 時間に相当) が延長していることを確認した。K_r チャンネル遮断薬の E4031 では FPD 時間の延長が観察されたが、K_s チャンネル遮断薬の chromanol 293B では FPD 時間の延長は観察されず、K_s チャンネルの異常であることを確認した。この心筋細胞を用い、不整脈誘発試験を行うと臨床上観察される Torsade de pointES という不整脈が再現された。

（実施体制：学校法人慶応義塾、国立大学法人東京医科歯科大学、一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム (JBIC)）

（2）ヒト iPS 細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

毒性検査指標を総合的に評価できるかを明らかにするため、引き続きシステムおよび細胞ネットワークチップの改良を行い、（1）細胞電位ゆらぎ計測技術、（2）心筋細胞ネットワーク伝導ゆらぎ計測技術、ならびに（3）心筋細胞収縮力（不安定化）変化計測技術について開発ならびに性能評価を推進した。装置システムについては、上記（1）～（3）の計測を同時に総合的に評価するシステム、細胞ネットワークチップと評価法の開発に成功した。細胞についてもヒト ES 細胞由来心筋、ヒト iPS 細胞由来心筋、薬物性 QT 症候群患者 iPS 細胞由来心筋細胞の性能の比較評価を行い細胞品質と毒性試験結果の関連を検討するとともにパネル試験モデルの可能性を検討した。また実用化整備の一環として国際機関とともにワークグループ準備委員会を設立し国際ワークショップの開催を行う。

また、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞から 2D シート作製法を確立すると共に、その品質評

価基準を策定した。そして、試作した2Dシート専用マルチウェル電極プレートおよび実用化簡易計測装置を用いて、既知催不整脈薬剤に対する心毒性検出性能、再現性の確認実験を実行中であり、今年度末には、実用化に向けた基盤整備が整う予定である。また、これらの心筋細胞2Dシート評価システムに関する成果を、関連学会等通じて製薬企業に情報発信する予定である。

(実施体制：国立大学法人東京医科歯科大学、三菱化学メディエンス株式会社、JBIC)

4. 2 実績推移

	H20年度	H21年度	H22年度	H23年度	H24年度
	委託	委託	委託	委託	委託
実績額推移(百万円)					
一般勘定：補助金	1,000	—	—	—	—
一般勘定：交付金	—	1,010	986	2,400(※)	1,703
特許出願数(件)	—	7	12	11	13
論文発表数(報)	—	9	62	76	20
フォーラム等(件)	—	0	0	69	101

(※) うち、補正予算 1,496百万円。

5. 事業内容

5. 1 平成25年度事業内容

目標を達成するため、国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所 副所長 中畑龍俊プロジェクトリーダーのもと、研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」について、国立大学法人東京医科歯科大学 学生体材料工学研究所 教授 安田賢二氏をプロジェクトリーダーのもと、研究開発項目②「ヒト iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」について、以下の研究開発を実施する。

研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」

(1) ES 細胞領域

国立大学法人京都大学物質-細胞統合システム拠点 拠点長 中辻憲夫サブプロジェクトリーダーのもと、以下の研究開発を実施する。

(a) 「ヒト ES 細胞の安定な培養・保存技術の開発」

- ・前2カ年で得られた有効な低分子化合物の効果について、化合物の合成展開に適した化合物を選定し、評価を行う。
- ・前年度に見出した DMSO 不含新規凍結液について、従来法(緩慢凍結)と比較検討を行う。凍結プロトコールに関しても検討を行う。
- ・24年度に引き続き、ヒト ES 細胞の三次元大量培養を行うための、新規培養基質の開発とその条件検討を行う。
- ・開発した浮遊培養法の分化能評価を行うために、ヒト ES 細胞の長期継代維持を行う。また、前年度に開発した静的三次元スフェア培養のヒト多能性幹細胞の安定供給への適合性検討を行い、バッグを用いた自動培養装置に組み込むための技術検討を始める。
- ・同定した低分子化合物の組合せの三次元培養や長期培養への応用を検討し、最適化を目指す。
- ・浮遊培養用材料について大量培養への適用検討を開始する。また、ヒト ES 細胞の自己増殖を促進する化合物・材料について化学合成による最適化に着手する。
- ・ヒト多能性幹細胞を浮遊培養系で大量培養するための自動培養装置の開発について、プロトタイプを完成させ、装置、培養バッグ、回路等の最終仕様を明確化していく。
- ・閉鎖系凍結保存技術の開発としては、凍結保存容器試作品について凍結保存評価を実施し、製品仕様を明確化していく。

・ヒト ES 細胞イメージング装置試作機を用いて、分化／未分化ヒト ES 細胞コロニーを生きたままイメージングし、さまざまなイメージパラメータ、時間的な変化を比較・分析し、細胞状態評価候補パラメータを選定する。

・新規ゼノフリー培地の有効性を複数の多能性幹細胞株を用いて検証する。また、当グループで開発した三次元培養方法への応用を行う。

(実施体制：京都大学、日産化学工業株式会社、ニプロ株式会社、浜松ホトニクス株式会社、株式会社リプロセル)

(a) 「ヒト ES 細胞の品質評価指標の開発」

・前年度までに確立された品質評価指標を用いて、項目①により調整される大量培養サンプルの解析を継続し、データをフィードバックして品質管理されたヒト ES 細胞の大量供給システムの構築を進める。また分析データを簡便かつ正確に取得する為のキット化を継続すると共に、主要な品質評価指標として遺伝性疾患等を追加する。前年度のヒト ES 細胞の分化能評価結果から、大量培養システムで得られる分化誘導細胞の品質評価手法の構築に着手する。

・昨年度未検討のヒト ES 細胞株及びについての心筋分化能の比較を行う。またスフェア培養からの高効率心筋分化法についても検討する。

・前年度までに開発した神経分化誘導方法で、ヒト ES 細胞株について神経分化を定量的に評価する。未分化時に ES 細胞株の神経分化能を予測する因子の検索を行う。

・継代数の異なるヒト ES 細胞株や、新規培養法で培養されたヒト ES 細胞株における内胚葉および肝細胞への分化能について検定する。

・系列および継代数の異なるヒト ES 細胞株について、機能的な好中球への分化指向性評価を継続して行う。新規培養システムにて培養されたヒト ES 細胞株についての評価も実施する。

・本プロジェクトで開発された培養法と従来培養法によるヒト ES 細胞の造血細胞への分化指向性について比較検討を行う。また、継代数の異なるヒト ES 細胞についても解析を行い、新規培養法の有効性について検証を行う。

・京大ヒト ES 株及び入手可能な外国株のヒストン化学修飾情報を取得し、DNA メチル化情報と遺伝子発現情報とを統合的に活用して、ヒト ES 細胞品質評価のための指標となりうるゲノム領域のエピゲノム情報のカタログ化を行う。また、評価に必要なゲノム領域の絞込み作業を進める。

・一次代謝産物について、さらなる解析技術の検討を進め、分化誘導における変動および継代数による違いを評価する。

・前年度で確立したエピゲノム解析自動化システム及び新規に開発した解析法を用いて、ステージの異なる ES 細胞につきエピゲノム解析を行う。

・新規培養法で培養されたヒト ES 細胞株の発現プロファイルとゲノムの安定性について未分化状態を検定する。また、がん関連遺伝子 Exome 解析のキット化と、LNA 技術を利用した miRNA 指標の開発に着手する。

・新規ゼノフリー培地で未分化維持した細胞株について、心筋、神経、肝臓への分化能について検討を行う。

(実施体制：国立大学法人京都大学（再委託先：独立行政法人医薬基盤研究所、学校法人慶應義塾、国立大学法人東京大学、国立大学法人千葉大学、独立行政法人理化学研究所）、株式会社島津製作所、ジェネティン株式会社、住友ベークライト株式会社、タカラバイオ株式会社、株式会社リプロセル)

(2) iPS 細胞領域

国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所 副所長 戸口田淳也サブプロジェクトリーダーのもと、以下の研究開発を実施する。

(a) 「ヒト iPS 細胞の安定な培養・保存技術の開発」

自動培養装置、凍結保存装置の開発では、自動培養装置と凍結保存装置連携の試験・改良を行う。特に解凍後の細胞の自動培養装置への受け渡しを中心に行う。形態観察装置では形態評価アルゴリズムの検証試験を加え、更に精度の高いプログラム開発を目指すと共に、自動培養装置に最も適したプログラムへの転換を図る。

(実施体制：幹細胞評価基盤技術研究組合(組合員：川崎重工業株式会社、大陽日酸株式会社、株式会社ニコン、京都集中研究室、独立行政法人国立成育医療研究センター、独立行政法人医薬基盤研究所、国立大学法人名古屋大学)。

培養基材及び培地の開発では、改良型ラミニン活性フラグメントと CiRA 培地の併用効果を更に検証すると共に、ラミニンフラグメントに活性化因子などの生理活性物質を結合させたハイブリッド型ラミニンフラグメントの開発を目指す。また、自動培養装置での培養に最も適した活性化フラグメントを提供するために長期間安定型ラミニンフラグメントの開発も併せて行う。

(実施体制：幹細胞評価基盤技術研究組合(組合員：川崎重工業株式会社、大陽日酸株式会社、株式会社ニコン、独立行政法人国立成育医療研究センター)(共同実施：名古屋大学)、独立行政法人医薬基盤研究所、国立大学法人大阪大学)

(b)「ヒト iPS 細胞の品質管理・安定供給技術の開発」

ヒト iPS 細胞技術に関して、語彙の標準化から応用研究及び革新的技術開発の動向調査に重点を移し、その成果の開発目標(ヒト iPS 細胞の自動大量培養、長期凍結保存及び解凍)への速やかな反映を図る。

(実施体制：幹細胞評価基盤技術研究組合(組合員：一般財団法人バイオインダストリー協会))

(3) 滑膜由来間葉系幹細胞領域

株式会社ツーセル 代表取締役社長 辻紘一郎サブプロジェクトリーダーのもと、以下の研究開発を実施する。

- ・細胞調整法(MSC分離法、培地組成、細胞剥離・継代)に関する検討を実施する。培地組成については培地のコストダウンと直結するアルブミンとPDGFを複数の市販品で検討するとともに培地の粉末化・錠剤化などについても着手する。他方、培地製造のGMP化を目指した施設・設備の整備を図る。

- ・安全性に関してはNOGマウスでの試験を完了させ、安全性に問題がないことを確認する。有効性に関してはブタ軟骨欠損モデルを用いた移植試験を実施し、軟骨修復効果を評価する。

- ・大量培養に関する検討では特殊表面加工を施したPETフィルムの形状を多面化し、無重力培養装置あるいは浮遊培養装置で用いる培養支持体として活用できるか否かの検討および、海外メーカー製培養装置での大量培養を検討する。これらの結果と、これらの方法での滑膜由来MSCの性質や安全性を評価した結果を基にして、安全性と有効性を維持した上での滑膜由来MSCの培養操作を自動化した安定培養装置のプロトタイプを完成させる。

- ・細胞の品質評価用候補マーカーとして見出した13遺伝子を基に、細胞の品質評価の基準、判定法などを検討する。

- ・血清を含まない保存液ならびに保存温度が細胞分化ならびに増殖に及ぼす影響を検討するとともに、CASプログラムフリーザーを用いた凍害防止剤の検討を行う。

(実施体制：株式会社ツーセル(共同実施：有限会社スリーブラケット)、株式会社スペース・バイオ・ラボラトリーズ、DS ファーマバイオメディカル株式会社、株式会社丸菱バ

イオエンジ、国立大学法人大阪大学、学校法人福田学園大阪保健医療大学、国立大学法人広島大学)

(4) Muse 細胞領域

国立大学法人東北大学大学院医学系研究科 教授 出澤真理サブプロジェクトリーダーのもと、以下の研究開発を実施する。

臨床応用に適した性質をもつ Muse 細胞の品質評価指標の確立を目的として、遺伝子発現解析技術やプロテオーム解析技術を用い、品質評価指標となる候補因子の探索及び培地・細胞密度・継代培養数・培養法等の組み合わせの検討を継続し、臨床応用に適した性質を持つ Muse 細胞の大量精製・培養プロトコルの確立と自動装置化への検討を行う。

(実施体制：国立大学法人東北大学、国立大学法人名古屋大学、株式会社 Clio (共同実施：公立大学法人首都大学東京、国立大学法人山口大学、国立大学法人大阪大学))

(5) 間葉系幹細胞領域

独立行政法人国立成育医療研究センター 研究所 生殖・細胞医療研究部 幹細胞・生殖学研究室 室長 阿久津英憲サブプロジェクトリーダーのもと、以下の研究開発を実施する。

間葉系幹細胞のポテンシャルを示す有効なマーカーを見出すことが出来たため、このマーカーを既存培地に添加することによって細胞増殖、未分化性の維持などにどのような影響が出るのかを検討する。培地に完全に不足している因子なのか、他の成分を代替する代替因子なのかを見極め、高品質・低価格培地の開発を目指す。

(実施体制：幹細胞評価基盤技術研究組合 (組合員：独立行政法人国立成育医療研究センター、独立行政法人産業技術総合研究所) (共同実施：地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター))

研究開発項目②「ヒト iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」

(1) ヒト iPS 細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発

3 型遺伝性 QT 延長症候群症例から iPS 細胞由来再生心筋細胞の FPD 時間の解析、*in vitro* での不整脈の誘発試験の開発を行う。2 型、7 型遺伝性 QT 延長症候群の症例から iPS 細胞を樹立する。さらに、これらの細胞から心筋細胞を分化誘導し、FPD 時間の解析、パッチクランプ試験、不整脈解析等を行う。

(実施体制：学校法人慶応義塾、国立大学法人東京医科歯科大学、三菱化学メディエンス株式会社)

(2) ヒト iPS 細胞等幹細胞を活用した創薬スクリーニングシステムの開発

本プロジェクトにて開発した細胞ネットワークチップ、計測システムおよび自動解析評価ソフトウェアを用い、評価協力製薬企業ならびに国際機関を基盤にして構築した国際評価ワークグループおよび海外メガファーマにて、本プロジェクトで開発した心毒性評価法の国際評価を推進する。また本プロジェクト技術をカスタマイズし、各評価協力企業・機関に、本プロジェクト開発細胞ネットワークチップ、計測システム、ならびに自動解析評価ソフトウェアを必要に応じて貸し出しを行い、本プロジェクト技術を用いた共同評価が行えるように環境を整備する。また、本プロジェクト内でも外部評価で行われた結果の追試をあわせて行い、実用化・標準化に必要なエビデンスの集積を引き続き行う。また、これらの評価プロセスで得られた内外のユーザーのフィードバックに基づいて実用化・標準化に必要な計測手法ならびに装置システムの改良検討を行い、実用化・標準化のために必須となる知財特許の補強を推進する。

また、平成 24 年度に整備した実用化簡易計測装置および 2D シート専用マルチウェル電極プレートを用いて、既知催不整脈薬剤を含む評価化合物データベースの完成を目指す。

また、開発した心筋細胞 2D シート評価システムのオープンラボでの実践および外部評価バリデーションの実施を検討するなどし、ヒト iPS 細胞等幹細胞を用いた心毒性評価スクリーニングシステムの実用化完成を目指す。

(実施体制：国立大学法人東京医科歯科大学、三菱化学メディエンス株式会社、) (共同実施：学校法人法政大学)

5. 2 平成 25 年度事業規模

	委託事業	
一般勘定	1, 394 百万円	(継続)
(合計)	1, 394 百万円	

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) 運営・管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有する NEDO は、経済産業省及び研究開発実施者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、研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」については、研究開発に参加していない外部有識者で構成される運営会議を組織し、目標達成に向けた研究開発マネジメント体制を構築する。研究開発項目②「ヒト iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」については、平成 24 年度と同様に機動的に会議を開催し、変化に即応するとともに、研究開発に参加していない外部有識者で構成される運営会議を組織し、目標達成に向けた研究開発マネジメント体制を構築する。

(2) 関連指針の遵守

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」、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、「ヒトに関するクローン技術等の規制に関する法律」、「特定胚の取扱いに関する指針」、「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」等、関連指針を厳守する。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」を厳守する。なお、関連指針等が改正されたときは、改正後の指針を適用するものとする。

(3) 複数年度契約の実施

昨年度に締結した契約を 1 年間延長する複数年度契約を締結する。なお、研究者の移籍に伴い平成 25 年度より新規に体制に加わる機関については、新規契約を締結する。

7. スケジュール

研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」

平成 25 年 6 月以降	中間評価分科会
10 月以降 1～2 回	運営会議

研究開発項目②「ヒト iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」

平成 25 年 6 月以降 1～2 回	運営会議
---------------------	------

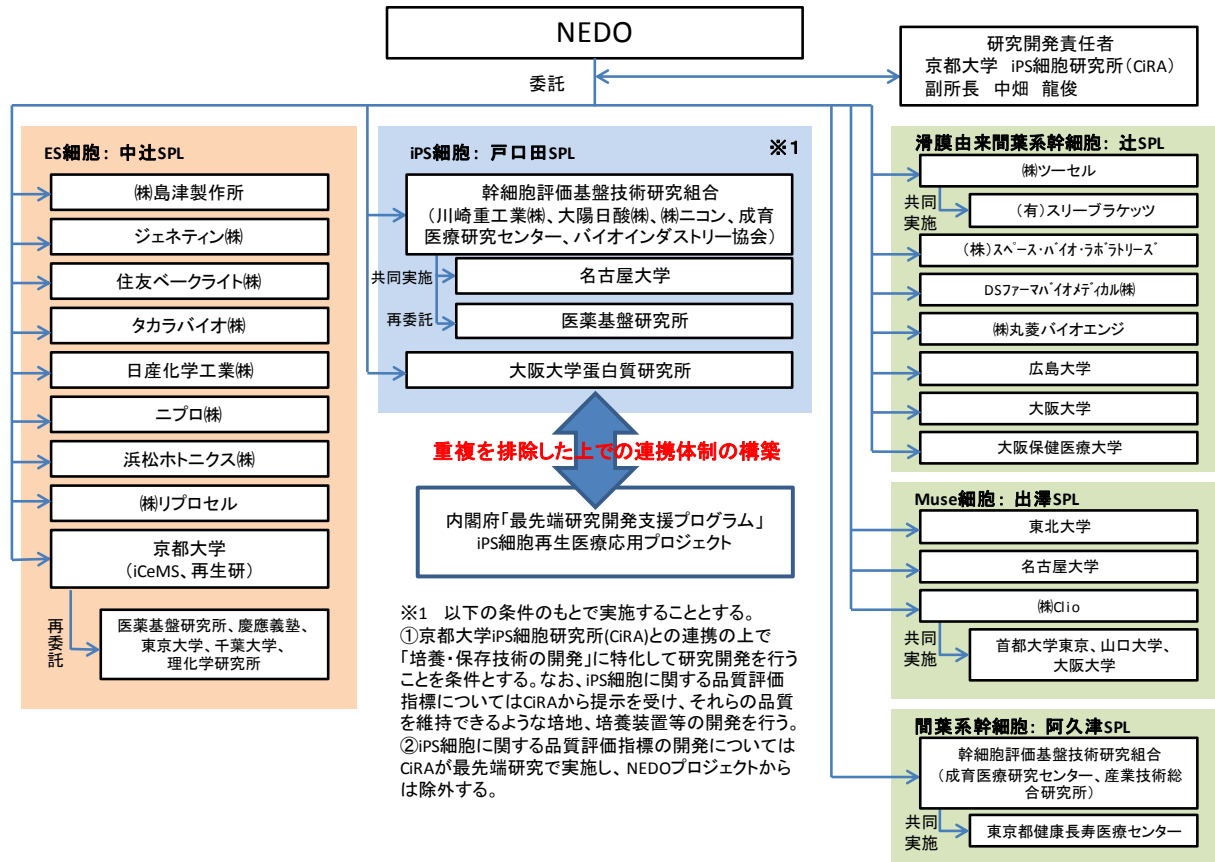
8. 実施方針の改定履歴

(1) 平成 25 年 2 月、制定。

(2) 平成 25 年 4 月 17 日、共同実施先(法政大学)の追加に伴う改定。

(別紙) 事業実施体制の全体図

研究開発項目①「ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」



研究開発項目②「ヒト iPS 細胞等幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」

