

経済産業省委託事業
平成20年度中小企業支援調査

「iPS細胞の産業応用に向けた要素技術
に関する調査」報告書

平成21年3月

財団法人 バイオインダストリー協会

序

本報告書は、経済産業省の委託事業である平成20年度中小企業支援調査「iPS細胞の産業応用に向けた要素技術に関する調査」を財団法人バイオインダストリー協会が受託し、専門家、学識経験者および関係者で構成される調査委員会を通して実施された調査および検討成果を取りまとめたものである。本報告がiPS細胞の産業利用振興の一助になることを期待する。

本調査の実施および本報告書の作成に当たりご協力いただいた、調査委員会および分科会委員各位、調査委員会ご出席者各位、ヒアリングに応じていただいた研究者各位、ヒアリング先選定にご協力いただいた多くの関係各位、ヒアリング実施者各位、調査委員会におけるご講演者各位、および報告書執筆者各位に深謝いたします

平成21年3月

財団法人バイオインダストリー協会

目次

序	i
目次	ii
1. はじめに	vi
2. 調査内容と方法	viii
3. 実施体制	ix
4. 委員名簿	x
5. 執筆者名簿	xii
第1章 医療、製薬、化学産業等における iPS 細胞等幹細胞の実用化の実態・可能性調査 (ニーズ調査)	
1.1 緒言	1
1.2 調査方法	1
1.2.1 調査(ヒアリングおよびアンケート)実施件数	
1.2.2 調査内容	
1.2.3 ヒアリング項目	
1.3 ニーズ調査結果	3
1.3.1 はじめに	
1.3.2 調査結果(詳細)	
1.3.3 調査結果(要約)	
1.4 ニーズ実現化に向けての提言	10
第2章 iPS 細胞等幹細胞の産業化に関わる要素技術に関する調査 (シーズ、要素技術調査)	
2.1 緒言	14
2.2 実施方法	14
2.3 iPS 細胞・幹細胞の「細胞誘導技術」	17
2.3.1 物理的遺伝子導入技術	19
2.3.1.1 マイクロインジェクション	
2.3.1.2 エレクトロポレーション	
2.3.1.3 ソノポレーション	
2.3.1.4 ナノ針を用いた細胞への遺伝子導入操作	
2.3.1.5 小括	
2.3.2 化学的遺伝子導入技術	25
2.3.2.1 化学的細胞穿孔技術	
2.3.2.2 化合物による遺伝子導入技術	
2.3.2.3 小括	
2.3.3 総括	32

2.4	iPS 細胞・幹細胞の「細胞培養技術」	3 3
2.4.1	培養システムおよび培養室に関する技術	3 3
2.4.1.1	はじめに	
2.4.1.2	細胞自動培養装置	
2.4.1.2.1	継代培養における問題点	
2.4.1.2.2	培養装置の役割	
2.4.1.2.3	培養装置の現状	
2.4.1.2.4	終わりに	
2.4.2	iPS 細胞の培養に関わるマイクロリアクター技術	3 9
2.4.2.1	はじめに	
2.4.2.2	検査用細胞の培養	
2.4.2.3	移植用細胞の培養	
2.4.2.4	均一系での（準）大量培養（三次元リアクター等）	
2.4.2.5	不均一系での少量培養（細胞アレイ等）	
2.4.2.6	マイクロリアクター（小型化・集積化）を用いることの利点と難点	
2.4.2.7	「feeder layer 無しの培養系の発達」はどの程度の可能性か？	
2.4.2.8	マイクロリアクターの構成要素	
2.4.2.9	検討すべき要素技術の項目	
2.4.3	iPS 細胞の培養に関わる設備	4 9
2.4.3.1	はじめに	
2.4.3.2	細胞の品質管理	
2.4.3.3	基本的な培養設備の構成	
2.4.3.4	医薬品・医療機器のための培養設備	
2.4.3.5	iPS 細胞の製造に関わる技術	
2.4.4	iPS 細胞培養のための培地、容器、担体に関する技術	5 4
2.4.4.1	はじめに（ヒト多能性幹細胞培養の現状と問題点について）	
2.4.4.2	無血清培地技術	
2.4.4.3	現在製品化あるいは論文発表されている無血清培養培地等について	
2.4.5	iPS 細胞培養のための細胞凍結保存に関する技術	6 1
2.4.5.1	はじめに	
2.4.5.2	細胞凍結保存液	
2.4.5.3	凍結細胞の搬送	
2.4.6	総括	6 3
2.5	iPS 細胞・幹細胞の「細胞分析技術」	6 4
2.5.1	概要	6 4

2.5.2	細胞表層の物理化学的特性分析技術	6 4
2.5.2.1	概要	
2.5.2.2	細胞表層分子の物理的検出技術	
2.5.2.3	細胞の物理的特性の分析技術	
2.5.2.4	細胞の電荷・ ζ 電位の測定技術	
2.5.2.5	小括	
2.5.3	iPS 細胞の形態的分析技術	7 1
2.5.3.1	概要	
2.5.3.2	細胞イメージング	
2.5.3.3	コロニー単位の分析技術	
2.5.3.4	1 細胞分析技術	
2.5.3.5	大規模視野細胞観察技術	
2.5.3.6	小括	
2.5.4	細胞の新規分析技術	7 4
2.5.4.1	概要	
2.5.4.2	表面増強ラマンによる細胞表面タンパク質の分析	
2.5.4.3	細胞タンパク質の力学検出	
2.5.4.4	ナノファイバーによる細胞内照明技術	
2.5.4.5	1 細胞 NMR	
2.5.4.6	^{13}C -NMR	
2.5.4.7	小括	
2.5.5	遺伝子診断技術（異常染色体・エピジェネティクス分析）	8 0
2.5.5.1	概要	
2.5.5.2	遺伝子マイクロアレイ	
2.5.5.3	細胞アレイ解析	
2.5.5.4	ギガ/テラシークエンサーによるエピジェネティクス分析	
2.5.5.5	Surface Plasmon Resonance による DNA 解析	
2.5.5.6	プロテインチップ技術	
2.5.5.7	トランスポゾンによる脊椎動物の遺伝子機能解析技術	
2.5.5.8	遺伝子相関解析	
2.5.5.9	小括	
2.5.6	総括	8 9
2.6	iPS 細胞・幹細胞の「細胞分離技術」	9 0
2.6.1	概要	9 0
2.6.1.1	マイクロ流路を用いた細胞分離技術	
2.6.1.2	ポリマーによる細胞剥離制御技術	

2.6.1.3	フェムト秒レーザーによる細胞剥離制御	
2.6.1.4	電氣的単一細胞操作・解析	
2.6.1.5	単一細胞単離培養ツール	
2.6.1.6	セルソーター	
2.6.1.7	小括	
2.6.2	1 細胞マーキング技術の概要	1 0 1
2.6.2.1	蛍光による細胞マーキング	
2.6.2.2	CD 抗原と細胞の膜電位を利用した細胞マーキング	
2.6.2.3	磁性粒子を用いた細胞マーキング	
2.6.2.4	1 細胞マーキング技術の小括	
2.6.3	総括	1 0 6
第 3 章	ロードマップ、将来展望および提言	1 0 7
3.1	緒言	
3.2	作成方法	
3.3	ロードマップ	
3.4	将来展望および提言	
おわりに		1 0 8
添付資料 1		
1A.	iPS 細胞研究のロードマップ	
1B.	iPS 細胞実用化のための技術ロードマップ	
添付資料 2		
1.	国内調査結果の集約	1 ~ 4 6
2.	海外調査結果の集約	4 7 ~ 5 2

1. はじめに

本調査事業においては、我が国が世界を先導した科学的成果である iPS 細胞等の幹細胞創製にかかわる研究を基盤に、医療・製薬・化学産業へ応用するための過程に必要な工学的要素技術の調査を行った。また、将来これら細胞を用いた産業分野における国際競争力に繋がる技術開発ニーズの探索とそれらを纏めた技術開発ロードマップの作成を行うことを目的とした。

京都大学の山中らは、平成 18 年マウスの体細胞から、翌 19 年にはヒトの体細胞からも iPS 細胞が創製可能であることを報告した。iPS 細胞は ES 細胞同様、多能性幹細胞でありながら、ES 細胞のようなヒトの受精卵を使用することなく、複数種類の転写因子を体細胞に導入することで創製できる。そのため、元来 ES 細胞が有していたヒトの受精卵由来であるという倫理的問題が解消される可能性が見えてきた。また iPS 細胞は、先天性遺伝子疾患の患者を始めとした様々なヒト由来の体細胞から創製が可能であり、各疾患・各 HLA 型の遺伝的バックグラウンドを有した iPS 細胞が創製できる。こうしたことから、iPS 細胞はこれまで拒絶反応、倫理問題等で困難と考えられていた再生医療の実現や、各種先天性疾患メカニズムの解明、新薬の薬効評価といった医療・製薬・化学産業分野での活用が期待されるに至った。

現在、日本とアメリカを中心に iPS 細胞の創製メカニズムの解明、創製技術、iPS 細胞からの様々な細胞への分化誘導技術等の iPS 細胞そのものに焦点を当てた研究開発が行われている。しかし、iPS 細胞の創製といった日本発の新しい科学的発見を医療・産業応用に繋げるためには、iPS 細胞研究だけではなく、iPS 細胞の産業応用に必要な多くの技術開発が体系的に進められることが必要である。即ち、iPS 細胞をはじめとする細胞創製、検査・分離精製、輸送・保管などの技術の開発も必要となるし、医療・創薬などを中心にした利用応用方法の確立、そして製造から利用までのシステムの整備も求められる。

iPS 細胞など人為的に創製される細胞や医学的に重要な幹細胞は必ずしも大量に得られるとは限らず、ごく少数、場合によっては 1 個の幹細胞を正確に取り扱う技術が必要となることが想定される。例えば、特定の時間に特定の遺伝子を順次導入して分化誘導を厳密に制御し、想定される特性を持った細胞だけを特定・分離するなどの技術である。また、臨床応用に供するには非接触での検査・取り扱いも必要となろう。あるいは、多くの細胞の中から少数の特定の特性を持つ細胞を効率よく探し出す技術が必要となるとも考えられる。しかし、これまでの細胞の取り扱いはシャーレ・フラスコを用いるものが主であり、単数・少数の細胞や高速の細胞取り扱い技術は十分に整備されて来なかった。

一方、我が国は微細加工・ナノテクノロジー・各種精密計測技術などにおいて世界を先導するレベルにある。大学・研究機関・企業では、ナノテクノロジーに代表される微細加工・精密操作を基軸とした細胞の操作・制御・分析システムの開発・作製において、世界に先駆けた研究開発が進められている。かかる分析技術、微細加工・ナノテクノロジーを利用することで、大量に、短時間で、正確に目的細胞を誘導・採取・分析することが可能であり、幹細胞の実用化において、重要な要素技術となることが期待されている。また、先端的な工学技術と医学・バイオ研究が融合する新たな産業分野が形成できれば、我が国が世界をリードする基盤となりうると考えられる。

しかしながら、現状では iPS 細胞等幹細胞を産業的に応用するのに求められる各要素技

術の探索が十分ではなく、またそれらが体系付けられるまでに至っていない。それ故、上に記した新たな産業分野の創成につながる道のりが見えにくいことが問題である。そこで本調査では、iPS 細胞の実用化に関して、単なるシーズの寄せ集めではなく、製品と新規分野形成などのアウトプットを意識した、新しい研究・開発・商品概念を作るための要素技術の特定ならびにそれら要素技術の実現可能性について調査し、新たな産業に至る道程をロードマップとして提示することを目的とした。

2. 調査内容と方法

iPS 細胞を始めとした幹細胞を医療・産業応用に繋げるためには、iPS 細胞・幹細胞研究だけでなく、これら幹細胞の産業応用に必要な多くの技術開発を体系的に進めることが必要である。つまり、iPS 細胞等幹細胞の細胞創製・検査・分離精製・輸送・保管などの各要素技術の開発、医療・創薬などを中心にした利用・応用方法の確立、そして製造から利用までのシステムの整備などが求められる。こうした iPS 細胞の産業化に必要な各要素事項を実現するために、iPS 細胞等幹細胞の製品及び新規分野形成としてのアウトプットの明確化、アウトプットを意識した新しい研究・開発・商品概念を作るための要素技術の特定ならびに要素技術の実現可能性、製造から利用までのシステムの整備はどうあるべきか、我が国が目指すべき健康社会とその経済的な実現の見通しについて、以下の3段階に分類し、調査・検討を行った。

- (1) ニーズ調査：医療、産業界からのニーズ、特に iPS 細胞を実用化する場合のアウトプットである実用化像とそこで要求される細胞の品質について、広くヒアリングを行い、調査した。
- (2) 要素技術調査：想定されるニーズ、アウトプットを実現するために必要となる工学的要素技術について分類し、文献調査、技術調査によって検討・調査を行う。特に、(1) ニーズ調査により明らかになったニーズと要素技術の対応付けを行い、不足があれば追加調査を行いながら関連する技術開発における現状と課題を明確にした。
- (3) ロードマップ作成：我が国での iPS 細胞等幹細胞の産業実用化を加速するための要素技術開発の今後 20 年間の指標となるロードマップを作成し、提示した。

3. 実施体制

バイオインダストリー協会内に専門家および有識者等からなる調査委員会を設置して調査および検討を行った。また、その下に分科会を設置した。

尚、活動の一部は(株)三菱化学テクノロジーに委託して共同で実施した。

報告書執筆は各分科会が分担すると共に、一部は外部専門家の協力を頂いた。

(1) 調査委員会

1) 委員長：産業技術総合研究所 三宅 淳氏

2) 委員：委員名簿参照

3) 開催回数：3回

4) 調査委員会への専門家招聘（講演および質疑）

・第1回調査委員会（平成20年11月12日）

松永 是氏（東京農工大学 副学長、工学部生命工学科教授）

演題「In vivo 細胞解析：単一細胞解析の重要性」

・第2回調査委員会（平成20年12月19日）

末永智一氏（東北大学大学院 環境科学研究科 副研究科長、教授）

演題「単一細胞機能評価のためのマイクロバイオデバイス」

・第3回調査委員会（平成21年2月20日）

濱口宏夫氏（東京大学 理学系研究科教授）

演題「ラマン分光イメージングによる単一生細胞の活性評価」

(2) 分科会

1) ニーズ調査

・ニーズ調査分科会（責任者：産業技術総合研究所 大串 始氏）

2) 要素技術調査

・誘導技術調査分科会（責任者：産業技術総合研究所 中村 史氏）

・培養技術調査分科会（責任者：大阪大学 紀ノ岡正博氏）

・分析技術調査分科会（責任者：東京大学 一木隆範氏）

・分離技術調査分科会（責任者：(株)ニコン 塩野博文氏）

3) ロードマップ作成

・ロードマップ作成分科会（責任者：産業技術総合研究所 三宅 淳氏）

4. 委員名簿

「iPS 細胞の産業応用に向けた要素技術に関する調査」

調査委員会および分科会委員名簿

(敬称略、順不同)

(委員長)

三宅 淳 産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 (RICE) 部門長、
(兼) 東京大学大学院工学系研究科教授、東京農工大学大学院教授

(調査委員会委員および分科会委員)

宮原裕二 物質・材料研究機構 生体材料センター センター長、
(兼) 東京大学大学院工学系研究科 教授

長棟輝行 東京大学大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 教授

松永 是 東京農工大学 理事・副学長、工学府生命工学科 教授

原 正之 大阪府立大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻教授、
(兼) 産学官連携機構 知的財産マネジメントオフィス長

一木隆範 東京大学大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 准教授

紀ノ岡正博 大阪大学大学院基礎工学研究科 物質創成専攻化学工学領域 准教授

田中 剛 東京農工大学大学院 工学府生命工学専攻 准教授

木原隆典 東京大学大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 特任助教

赤木貴則 東京大学大学院 工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 助教

齋藤 敬 東京大学大学院 工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻
特任研究員

中村 史 産業技術総合研究所 RICE 遺伝子応用技術研究グループ グループ長、
(兼) 東京農工大学工学府 客員准教授

平野 隆 産業技術総合研究所 RICE 主幹研究員 生体運動研究グループ
グループ長

中村吉宏 産業技術総合研究所 RICE 招聘研究員

大串 始 産業技術総合研究所 RICE 上席研究員、組織・再生工学研究グループ
グループ長

立花宏一 産業技術総合研究所 RICE 組織・再生工学グループ 主任研究員

細川千絵 産業技術総合研究所 RICE バイオインターフェース研究グループ
研究員

秋葉龍郎 産業技術総合研究所 RICE 遺伝子応用技術研究グループ 主任研究員、
(兼) 金沢工業大学 客員教授

鍵和田晴美 産業技術総合研究所 RICE 遺伝子応用技術研究グループ 研究員

藤森直治 産業技術総合研究所 ダイヤモンド研究センター (DRC) センター長

上塚 洋 産業技術総合研究所 DRC 表面デバイスチーム 招聘研究員

湯村守雄 産業技術総合研究所 ナノチューブ応用研究センター 副センター長

町田雅之 産業技術総合研究所 イノベーション推進室 総括企画主幹
(兼) 金沢工業大学 客員教授

前田典昭 アステラス製薬(株) 研究本部 研究推進部 課長

岡元 訓 味の素(株) アミノ酸カンパニー アミノサイエンス研究所
応用研究部 主任研究員

塩野博文 (株)ニコン インストルメンツカンパニー 開発統括部
バイオサイエンス開発部 第5開発課 マネジャー

中野義太郎 (株)ニコン インストルメンツカンパニー 経営管理部
バイオサイエンス企画課

福島和久 横河電機(株) 技術開発本部 遺伝子計測研究所 主任研究員

和気仁志 横河電機(株) 技術開発本部 遺伝子計測研究所 グループ長

宗林孝明 (株)三菱化学テクノロジーサーチ 調査コンサルティング部門 主幹研究員

山縣 恒 (株)三菱化学テクノロジーサーチ 調査コンサルティング部門 主幹研究員

(関係者)

白神孝一 経済産業省 製造産業局 生物化学産業課 企画官

鈴木隼人 経済産業省 製造産業局 生物化学産業課 課長補佐

諸橋聡美 経済産業省 製造産業局 生物化学産業課

(事務局)

市川茂彰 (財)バイオインダストリー協会

村山仁美 (財)バイオインダストリー協会

5. 執筆者名簿

(敬称略)

第1章 (ニーズ調査) (担当：ニーズ調査分科会)

- ・立花宏一：産業技術総合研究所 RICE 組織・再生工学グループ 主任研究員

第2章 (要素技術調査)

2.3 iPS細胞・幹細胞の「細胞誘導技術」(担当：誘導技術調査分科会)

- ・中村 史：産業技術総合研究所 RICE 遺伝子応用技術研究グループ グループ長
- ・鍵和田晴美：産業技術総合研究所 RICE 遺伝子応用技術研究グループ 研究員
- ・齋藤 敬：東京大学大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 特任研究員
- ・上塚 洋：産業技術総合研究 DRC 表面デバイスチーム 招聘研究員

2.4 iPS細胞・幹細胞の「細胞培養技術」(担当：培養技術調査分科会)

- ・紀ノ岡正博：大阪大学大学院基礎工学研究科 准教授
- ・原 正之：大阪府立大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻 教授
- ・森 英樹：大阪府立大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻 助教
- ・岡元 訓：味の素(株) アミノサイエンス研究所 主任研究員

2.5 iPS細胞等幹細胞の「分析技術」(担当：分析技術調査分科会)

- ・一木隆範：東京大学大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 准教授
- ・赤木貴則：東京大学大学院 工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 助教
- ・木原隆典：東京大学大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 特任助教
- ・中野義太郎：(株)ニコン 経営管理部 バイオサイエンス企画課
- ・秋葉龍郎：産業技術総合研究所 RICE 遺伝子応用技術研究グループ 主任研究員
- ・中村 史：産業技術総合研究所 RICE 遺伝子応用技術研究グループ グループ長
- ・和気仁志：横河電機(株) 技術開発本部 遺伝子計測研究所 グループ長
- ・福島和久：横河電機(株) 技術開発本部 遺伝子計測研究所 主任研究員

2.6 細胞分離技術(担当：分離技術調査分科会)

- ・塩野博文：(株)ニコン インストルメンツカンパニー 開発統括部 マネジャー
- ・赤木貴則：東京大学大学院 工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 助教
- ・木原隆典：東京大学大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 特任助教
- ・細川千絵：産業技術総合研究所 RICE バイオインターフェース研究グループ
研究員
- ・珠玖 仁：東北大学大学院 環境科学研究科 准教授
- ・中村 史：産業技術総合研究所 RICE 遺伝子応用技術研究グループ グループ長
- ・齋藤 敬：東京大学大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 特任研究員
- ・田中 剛：東京農工大学大学院 工学府生命工学専攻 准教授

注) 委員以外の執筆協力者：森 英樹氏、珠玖 仁氏

第1章 医療、製薬、化学産業等における iPS 細胞等幹細胞の実用化の実態・可能性調査 (ニーズ調査)

1.1 緒言

iPS 細胞ならびに幹細胞が実用化される分野を、医療・製薬産業・化学産業の3分野と想定し、実用化される形態とニーズ、市場規模等について医師および各産業界の企業に対してヒアリング等を行い、調査した。さらに、米国を中心とした海外において、iPS 細胞がどのように扱われ・どのような実用化を目指しているのかについても調査を行った。

現状では、世界的にみても参入企業はベンチャー企業が中心で大手企業の参入は少なく、本格的な産業への応用はまだこれからといえる。そのためにも、今後の実用化形態を調査することは、iPS 細胞やその他の幹細胞の実用化において重要な指針となる。

iPS 細胞の実用化を推進するためには、それぞれの産業界における各使用・実用化目的に従って iPS 細胞に求められる品質等の要件を明確化し、iPS 細胞の用途別の品質標準化基準の制定も必要となる。現在のところ、iPS 細胞の品質標準化指標は制定されておらず、品質標準化のための要素を明らかにすることも本事業における重要な調査課題となる。既に知られている各種生化学マーカーや遺伝子発現を始めとした分子生物学的評価だけでなく、産業化というプロセスとその品質を重視した、より正確に、より短時間で、さらにサンプリングからのタイムラグの小さい評価系を新たに組み込んだ基準作りが必要である。また、ヒアリングを通じて想定される iPS 細胞等幹細胞の実用化モデルを構築することで、実用化過程に必要な要素技術調査の指針とする。

1.2 調査方法

調査委員会において、主な調査対象項目およびヒアリング先を選定し、ニーズ調査分科会の主導のもとに調査を実施した。調査件数は国内 30 件以上を目標として進め、予定を超える件数を実施できた。また、海外における訪問調査も実施した。調査は多くは面談で行ったが、一部はアンケート方式で行った。

1.2.1 調査（ヒアリングおよびアンケート）実施件数

国内	・ 大学・公的機関	10 研究室（8 機関）
	・ 製薬企業	8 社
	・ 製薬以外の企業	21 社
	・ 計	39 件
海外	・ 米国	2 機関 (1. Hunter College of City Univ. NY、2. NIH)

1.2.2 調査内容

下記の3分野（医療分野、製薬産業、化学産業等）における iPS 細胞・幹細胞実用化の実態・可能性・実用化モデルを調査した。

具体的な質問事項（ヒアリング項目）は 1.2.3 に示した。

1) 医療分野における iPS 細胞・幹細胞実用化の実態・可能性・実用化モデル

医療分野ではこれまでに自家組織の細胞および間葉系幹細胞などの細胞ソースを用いた再生医療が先行しており、再生医療が医療分野の中で一つの医療方法として確立されつつある。こうした中で、iPS 細胞がどのような形態で再生医療の中に取り込まれるのか、また再生医療といった新しい医療分野をさらに広げることができるのかについて、その実態や可能性を調査した。さらに、既存の医療産業の企業に対して、どのような形態で iPS 細胞を利用した再生医療ビジネスが可能かについても細胞バンクなどを中心に調査を行った。それと同時に医療現場で要求される iPS 細胞の品質、供給量、供給方法などについても調べた。

2) 製薬産業における iPS 細胞・幹細胞実用化の実態・可能性・実用化モデル

製薬分野では iPS 細胞を用いた応用例として主に、先天性疾患患者細胞から作成した iPS 細胞によるドラッグスクリーニング、iPS 細胞から分化させた抗体産生細胞によって作成する自家抗体薬生産、治療細胞開発等について各企業にヒアリング調査を行った。特に、製薬企業では iPS 細胞自体ではなく、ヒト iPS 細胞から分化させた細胞を利用することが主な利用法と考えられることから、どのような品質でこういった細胞の供給が期待されるのか、その細胞を用いた具体的な実用化モデルなどを調査した。

3) 化学産業等における iPS 細胞・幹細胞実用化の実態・可能性・実用化モデル

化学産業はその応用分野が広いことから iPS 細胞に対する様々な実用可能性が見出されることが期待される。例えば、化粧品、特殊な化学物質や食品・添加物など、あるいは他の細胞のための化学物質開発などに資することが考えられる。そこで、積極的に様々な関連分野の企業から広くヒアリングを行うことで、今後の iPS 細胞の実用化像を調査した。また、実用化分野が広いということはその求める iPS 細胞の品質・供給量も様々であることが想定され、こういった iPS 細胞の供給システムが必要になってくるかについてもその実用化モデルを調べた。

1.2.3 ヒアリング項目

医療、製薬産業分野

質問 1. iPS 細胞を用いて先生・御社が開発／実現したい再生医療・産業技術についてお聞かせください。iPS 細胞でなく他の幹細胞についてお答えいただけるなら、その幹細胞の種類（ES 細胞や体性幹細胞等）をお聞かせください。

質問 2. 質問 1 で実現したい再生医療・産業技術に幹細胞を用いる（用いたい）理由について教えてください。特に、現在の医療・再生医療・技術との比較をお聞かせください。

質問 3. 幹細胞を用いた 1 の再生医療・産業技術における現在の問題点について教えてください。（どのような問題がクリアできれば実用化できるか）

- 3 A. 技術的問題点：幹細胞作製方法（効率、元になる細胞、遺伝子導入以外、培地や動物血清など）、幹細胞からの分化誘導方法、幹細胞を用いた細胞治療における安全性の担保（CPC、発癌防止など）など
- 3 B. 非技術的問題点：倫理的問題、規制（遺伝子治療他）、コスト対策

質問 4. 質問 1 で実現したい再生医療・産業技術が可能になった場合どのような benefit が得られると考えておられるかお教えてください。

- ・再生医療：治療可能患疾患名（可能なら患者数、それにより節約できる医療費）など
- ・産業技術：経済効果、周辺技術開発など

質問 5. 質問 1 で実現したい再生医療・産業技術について、お考えになっているタイムスケジュールあるいはロードマップをお教えてください。

- ・早期（数年以内）：
- ・中長期（～10年）：
- ・将来（10年～）：

質問 6. 質問 3 で挙げていただいた問題点解決のために、国、産業界、医学界、研究者、マスコミなどに対する要望がございましたらお願いします。

質問 7. ご自身・御社の研究とは別に、iPS 細胞・幹細胞を用いることで可能になると考えられる再生医療・産業技術があればお聞かせいただければ幸いです。

- ・早期（数年以内）：
- ・中長期（～10年）：
- ・将来（10年～）：

質問 8. 質問 7 でお答えいただいた内容について、達成された場合のインパクトについてお聞かせください。

- ・再生医療：治療可能患疾患名（可能なら患者数、それにより節約できる医療費）など
- ・産業技術：経済効果、周辺技術開発など

化学産業分野

質問 9. 化学産業はその応用分野が広いことから iPS 細胞に対する様々な実用可能性が見出されることが期待されます。例えば、化粧品、特殊な化学物質や食品・添加物など、あるいは他の細胞のための化学物質開発などに資することが考えられます。そこで、今後の iPS 細胞の実用化像についてご意見ををお願いします。

質問 10. また、実用化分野が広いということはその求める iPS 細胞の品質・供給量も様々なことが想定されます。どういった iPS 細胞の供給システムが必要になってくるか、その実用化モデルについてご意見ををお願いします。

1.3 ニーズ調査結果

1.3.1 はじめに

2006年京大の山中らはES細胞に発現している4つの遺伝子をマウス体細胞に導入・発現し、フィーダー細胞と共培養することで体細胞の遺伝子発現をリプログラミングし、ES細胞様の細胞を作製することに世界で初めて成功した。作製した細胞はES細胞様の多分化能を有し、**induced pluripotent stem cell (iPS細胞)**と名付けられた。**Pluripotent**とは「多能性」であり、受精卵のように多くの種類の組織・細胞に分化する能力を有することを意味している。それ以前より、増殖静止状態においた体細胞の核を卵に移植することでクローン動物が作製されており、一度分化した体細胞の核の遺伝子発現を初期胚型にリプログラミングすることが可能であることは分かっていた。しかし、核移植による方法は非常に効率・安全性が悪く、また、その詳細なメカニズムは全く不明であった。山中らによるiPS細胞作製はリプログラミングに必要な遺伝子を特定しており、体細胞のリプログラミングが比較的簡単に可能であることをメカニズム解析の方向性とセットで提示した画期的な発見である。

翌2007年には山中らを含むいくつかのグループがヒト体細胞を用いてヒトiPS細胞を作製し、再生医療・創薬に新たな地平線を切り開く日本発の技術だとして、(特に)日本はiPS細胞狂騒時代に突入した。しかし、iPS細胞に実際にどれほどの医療的・産業的ニーズがあるのか、どのようなタイムテーブルでどのような結果が得られるか、また、どのような問題点があり、それをクリアするためには何が必ずしも明らかになっていない。また、科学界、特に海外の科学界からは日本のモノカルチャー的なiPS細胞研究傾斜への懸念も根強い。そこで今回「iPS細胞の産業応用に向けた要素技術に関する調査」において、iPS細胞を中心とした幹細胞等に医療界・産業界から見てどのような産業的ニーズがあるか調査を行った。

1.3.2 調査結果 (詳細)

添付資料2に記載した。

1.3.3 調査結果 (要約)

iPS細胞を用いて再生医療の研究をしている医療機関／研究機関、iPS細胞／ES細胞の創薬・安全性試験への応用を考えている製薬会社・化学会社、iPS細胞等用の培地や関連試薬関連、培養・評価関連の機械メーカーに対するヒアリングを行った。いずれの場合も基本的なニーズは「ヒト **primary** 細胞を利用したい」ということである。現在、組織によっては利用不可能であったり、コストやロット差など利用環境に問題のあるヒト **primary** 細胞 (注：癌化培養細胞株でないヒト由来細胞) を研究開発／再生医療に利用したいというニーズである。

この産業的ニーズをiPS細胞が満たすかどうかの実態を、ヒアリング結果を元に、

- 1) 薬剤の安全性試験／毒性試験への応用、
- 2) 先天性遺伝子異常を伴う疾患に対する創薬研究、
- 3) 再生医療、

の三つに分けて要約する。

- 1) 薬剤の安全性試験／毒性試験への応用：現時点で最も可能性が高い分野
製薬会社からの現実的ニーズが最も高かったのが薬剤の安全性試験 (毒性試験) への応

用である。製薬会社は薬剤を開発した後で、その薬剤をヒトに投与しても重篤な副作用が発生しないことを確認する必要がある。これは今後も治験等で最終的に確認せざるを得ないが、前臨床試験として *in vitro* の系でヒト細胞に対する重大な毒性を有する薬剤を早期に発見し排除することができれば、治験にかかる多額の資金と時間の節約になる。

この *in vitro* の系にはヒトの正常細胞を使用することが望ましいが、(癌化した) 培養細胞ではなく *primary* のヒト正常細胞はしばしば入手困難でありロット差も大きい。また、一般に *primary* 細胞は増殖させることが困難である。これらの問題より、分化能を有し増殖能の高いヒト正常細胞があれば、その細胞を増殖させた後で目的とする細胞に分化誘導して毒性試験に用いるというストラテジーが考えられる。このカテゴリーに属する細胞としてヒト ES 細胞がこの 10 年来存在していたのであるが、規制の問題および倫理的問題で社会の反発を買うことへの警戒感から安全性試験に実際に ES 細胞を応用した日本企業は皆無だった。そこに ES 細胞とほぼ同等の機能を有すると想定され、倫理的問題／規制の少ない *iPS* 細胞が登場し、期待を集めている。

薬剤の安全性試験は試したい細胞さえあればすぐにでも適応となる点が最も実用に近いとされるポイントである。ただし、実際には様々な科学的／実務的ニーズが存在している。

①分化誘導法および分化評価法の開発

iPS 細胞、あるいは ES 細胞をそのまま発生毒性／催奇形性試験に用いることも考えられるが、多くの企業では心筋、肝臓などに分化させた細胞を用いることを想定している。しかし、*iPS* 細胞ないし ES 細胞からの効率の良い分化誘導方法、高精度の分化細胞分離方法、および分化評価方法が確立していない組織がほとんどである。現在、曲がりなりに *iPS* 細胞よりそれなりの効率で分化できるのは心筋、神経など一部の細胞に限られている。分化誘導法および分化評価法の開発が様々な臓器に分化させた細胞を用いる上で必須である。しかし、このような技術開発を社内で進めようとしている本邦の製薬会社はほとんどなく、アカデミアやベンチャーによる技術開発が待たれる。

②複数の細胞の樹立と、商業利用可能なバンクの設立

この目的に正常人由来 *iPS* 細胞、ないし、それより分化させた細胞が必要である。正常人由来 *iPS* 細胞は製薬会社でも作製可能なはずであるが、実際に自社で作製しようとしている会社は皆無だった。これは *iPS* 細胞樹立に関わる労力・時間を節約したいのみならず、普遍的に認められる細胞を使用したいという願望の表れでもある。従って、正常人由来 *iPS* 細胞においても大学・国立研究機関、あるいは、コンソーシアム等における細胞株樹立と、樹立した細胞を企業を含めて利用できる体制の構築が *iPS* 細胞の産業利用においては必須である。

また、毒性試験／安全性試験においては一人のヒト由来の細胞ではなく、遺伝的背景の異なる複数のヒト由来の細胞株 (100 人由来?) が必要である。特に、将来、動物を用いた安全性試験や、治験に替わる安全性試験を細胞ベースで構築し認められるためには、相当数の細胞株が必要だろうという意見が多かった。目的により異なるが、必要十分な細胞株の数については、社内のみならず数種類というものから、数十から万の単位まで様々な意見があった。本当に必要な細胞株数、実際的な数については、用途別に今後の合意形成が

求められるが、このように多数の iPS 細胞を系統的に樹立、保存、配布する体制の構築が求められている。

③均質な iPS 細胞の供給体制

供給する iPS 細胞の質について、「バリデーションされた均質な iPS 細胞」が必要であるとの意見を多くいただいた。ただし、何をどうバリデーションすれば良いかについての明確なコンセンサスは現時点では得られなかった。細胞の増殖性、必要な細胞への分化能を有していることなどは産業上の利用のために必須である。しかし、多分化能を有していることが本当に必須かという点、例えば、心筋に良く分化する細胞なら神経には分化しなくても良い、という議論も頻繁にあった。また、*in vitro* で利用するので、iPS 細胞／分化細胞の安全性（癌化するかどうか等）は考慮する必要がないということで意見の一致を得ている。結局、「定義としての iPS 細胞」であることが重要なのか、「産業上の出口として求められている細胞」であるかにより、それに適した iPS 細胞／分化誘導細胞の性質は異なり、評価・保証する項目も異なっている。産業利用に適した細胞の評価項目に関して今後ニーズに即した検討と合意形成が必要だと考えられる。

また、バンクから供給可能な同一ロットの iPS 細胞の細胞数は多くない（細胞数 10 の 6 乗／tube で 10～30 tube 程度）ことが明らかになってきた。一方、産業界からは、「いつ、誰が、どこで扱っても均一な結果が出る細胞」が求められている。いかに均質な細胞を供給するか、その方法も研究開発、合意形成を含め求められている。

④基盤的研究開発

分化させた細胞が入手可能であったとして、その細胞を用いてヒト体内における毒性試験を再現できるかは、また別の問題がある。極端な話をすると、通常の 2 次元培養系で培養するだけで正常組織における細胞の機能は変化してしまう可能性があり、そもそも安全性試験に *in vitro* の系がどこまで使えるか、に関しては研究開発／評価が必要である。

また、iPS 細胞より分化させた細胞、例えば心筋細胞が、ES 細胞や体性幹細胞より分化させた細胞と比較して等価かどうかには疑問が残る。iPS 細胞は遺伝子発現を人工的にリプログラミングした細胞であり、樹立した元々の臓器細胞の影響等が残存している可能性や、発癌等にみられる異常な遺伝子発現が起こっている可能性がある。従って、iPS 細胞より分化させた細胞がヒト **primary** 細胞と同じかどうかについては上記に述べた内容以外に iPS 細胞特有の問題がある。しかし、現時点では iPS 細胞と ES 細胞、あるいは iPS 細胞間の違いを調べるにしても、何を調べれば正常に近い、あるいは、役に立つ細胞を選択できるかその指標がない状況である。

正常人由来 iPS 細胞より分化誘導した細胞をヒト **primary** 細胞の代わりに薬効の判定等創薬の安全性試験以外にも使用したいという話もヒアリングで聞いた。しかし、薬効の判定用スクリーニングシステムとして用いるには、安全性試験用よりさらに実際のヒト **primary** 組織細胞に近いことが求められると考えられ、分化誘導技術や細胞の標準化を含め、より高いレベルの基盤的研究開発が必要だと思われる。また、培養／分化誘導／分化細胞選別等にかかる費用、特許関連費用など、コスト面も薬効評価用として採用する場合には問題になる可能性がある。

2) 先天性遺伝子異常を伴う疾患に対する創薬研究：iPS 細胞の特長が最も活かせるが、適応および技術開発の必要性から動きの鈍い分野

iPS 細胞の有する最大のメリットは、ES 細胞と異なり、個々の人間由来の未分化細胞を作製できる点である。従って、個々の患者さん自身から iPS 細胞を作製することが可能で、疾患を反映した細胞が樹立でき、その細胞を用いた疾患の病態解明と創薬の可能性が期待されている。しかし、実際には以下に述べる問題点があり、医療研究機関はともかく、製薬業界の動きは鈍い。

①対象疾患の限定

対象となる疾患は基本的に先天的な遺伝子異常に起因する疾患に当面限られる。疾患の成立には遺伝的素因、環境因子および加齢の後天的因子が考えられるが、患者さん由来 iPS 細胞を作製することで疾患の病態が解明できる可能性が高いのは、先天的な遺伝子異常が疾患の成立と強く結びついている疾患である。一方、例えば癌細胞は遺伝子異常を伴うが後天的な遺伝子変化がほとんどである。従って、癌患者さんの正常細胞から iPS 細胞を樹立しても癌細胞にみられる遺伝子異常をその iPS 細胞が有している訳ではないので、患者さん由来 iPS 細胞を用いた創薬開発の対象にならない。

問題は、多くの先天的遺伝子疾患はどちらかというマイナーな疾患であり、製薬会社の主な創薬ターゲットにはなりにくい。むしろ、遺伝子が特定されていなくとも遺伝的素因が認められる症状、たとえば、過敏症、アレルギー、皮膚が荒れやすい、等を有する患者さんより iPS 細胞を作製／対象細胞に分化誘導して創薬や安全性試験に利用できれば、という期待が大きかった。

②スクリーニングシステム構築の困難性

先天的遺伝子異常を有する患者さん由来 iPS 細胞が作製でき、疾患の細胞（例えば神経変性疾患なら神経細胞）に分化誘導が可能でも、分化させた細胞を用いて病態を再現できるかどうかについては、「簡単ではないであろう」という意見が大勢を占めた。病態を表す性質を細胞が保持するか、時間のファクターはどうか、後天的な因子の病態に及ぼす影響など、基本的に未知の知見をそれぞれの疾患について押さえていかなければならない。特に自己免疫疾患など遺伝子異常が背景にあっても免疫系が発症に深く関係している場合には病態の再現は困難であろう。病態の再現が困難であれば、分化させた iPS 細胞を用いた薬剤スクリーニングシステムの構築も困難である。また、病態の再現のためにどれだけ時間、人手がかかるか不明である。これが製薬会社をしてこのアプローチをとらせるのをためらわせる大きな理由の一つである。

その一方で、患者さんより iPS 細胞を作製することで疾患を発症前より再現することが可能にならないかという「夢」を何カ所かで聞いた。例えば癌のような後天的な疾患でも、正常細胞より作製した iPS 細胞に遺伝子変異を加えることで癌の発症を再現するといった研究も可能かもしれないが、研究の意義や病態の再現性に関しては個々の研究機関による判断が必要である。

③患者さん由来細胞バンク設立の必要性

この分野の iPS 細胞作製用には患者さんの細胞を入手する必要があることから、患者さ

ん由来 iPS 細胞作製は医療機関を併設あるいは連携した研究機関に限られる。従って、このような機関で患者さん由来 iPS 細胞が樹立され、その細胞を病態の解明や創薬に利用できるかどうかは他のキーポイントである。患者さん由来の iPS 細胞を企業にも使えるような形のインフォームドコンセントを取得した上で作製しているかどうかにより、製薬会社等が参加できるかどうかは違ってくる。いずれにしても iPS 細胞の樹立は人手/時間/費用がかかるが、患者さん由来細胞の樹立、さらに企業が利用可能なバンク設立をアカデミックで行うためには、それ相応のシステムを構築することが必要である。

3) 再生医療：期待されているが安全性の観点から現状の iPS 細胞では可能性が低いもの

再生医療を目指している医療機関からは iPS 細胞を再生医療に使用したいという声が多く寄せられた。背景としては移植臓器の圧倒的不足、神経等 ES 細胞から分化させるか胎児以外には代替細胞ソースのない細胞治療、組織適合性抗原の問題などがある。しかし、最近、複数の機関より、iPS 細胞あるいは iPS 細胞を分化させた細胞集団を実験動物に移植したところ（テラトーマではなく）悪性腫瘍を形成したという情報がある。従って、iPS 細胞、あるいは iPS 細胞を分化させた細胞を再生医療として患者さんに移入することは、現時点では慎重にならざるを得ない。また、ほとんどの製薬企業は再生医療を自社で実施すべき事業と考えていない。これは、治療用薬剤として考える場合、細胞は低分子化合物とは全く異なる次元のものであり、製品化が困難であるという理由が多かった。

①悪性腫瘍形成の危険性

別々の複数グループより iPS 細胞あるいは iPS 細胞を分化させた細胞を実験動物に移植したところ（テラトーマではなく）悪性腫瘍を形成したとの情報をヒアリング内外で得ている。一方、ヒト ES 細胞は作製後 10 年間、悪性腫瘍を xenograft で作出したことはない。今後、同じ種類の免疫不全動物で iPS 細胞と ES 細胞の造腫瘍性を確認するといった解析により、iPS 細胞が ES 細胞より悪性腫瘍を実験動物に形成しやすいのか確認する必要があるが、現時点では悪性腫瘍形成は iPS 細胞特有の現象であると考えられる。Xenograft で悪性腫瘍を形成した中には c-myc 遺伝子を使用していないグループも含まれており、悪性腫瘍形成は c-myc 遺伝子によるとは結論できない。用いたウイルスベクターの遺伝子組み込み部位への影響は否定しきれないが、複数の独立の機関から高い頻度で悪性腫瘍が発生するとの情報が得られていることから、ベクター組み込みにより偶発的に悪性腫瘍が発生しているわけではなく、不十分なリプログラミングが原因である可能性が示唆されている。結論として、現在の作製方法の iPS 細胞、あるいはそれを分化誘導した細胞を再生医療目的で患者さんに導入することには、悪性腫瘍形成の可能性より慎重にならざるを得ない。

問題は iPS 細胞癌化のメカニズムが不明であること、および、そのメカニズムが iPS 細胞の成立メカニズムと密接に結びついている可能性があることである。不完全な遺伝子発現のリプログラミングが原因であった場合には、iPS 細胞は本質的に移植用細胞として適さないことになる可能性が高い。iPS 細胞、ならびに、iPS 細胞より分化誘導した細胞を再生医療の細胞移植に使用するためには、まず iPS 細胞の悪性腫瘍形成のメカニズムの解明が必要で、それを受けて、安全性を担保するための評価系の開発、悪性腫瘍を形成しない

移植用細胞の調整法の開発が必須であると考え。後者には、悪性腫瘍化しない分化した細胞を得るための効率の良い分化細胞誘導法・完璧な分化細胞精製法の開発や、可能なら、悪性腫瘍を形成しない iPS 細胞作製法の開発等が含まれる。

②組織適合抗原を有する細胞バンク

前述の安全性の問題が克服されたと仮定して iPS 細胞を再生医療への応用を考える。前述のように iPS 細胞の最大の利点は各個人由来の iPS 細胞を作製できることであり、個人個人にあわせた組織適合性に問題のないテーラーメイド医療が可能になると喧伝されている。しかし、多くの疾患はタイムリーに治療しなければならず、診断がついてから iPS 細胞を作製し、有効性安全性を確認してから使用することができる疾患は多くないと考えられる。iPS 細胞新規作製には3、4ヶ月、樹立した細胞の安全性等の評価には〜1年必要である。また、個人から iPS を作製・評価するには数百万円かかり、税金で国民一人一人に iPS 細胞を用意することは現実的ではない。従って、実際には日本人に多い数十〜数百程度の組織適合抗原を有する iPS 細胞株を集めた細胞バンクが必要になると考えられる。しかし、このようにある程度の組織適合抗原型の細胞を細胞バンクとしてそろえるとすると、ヒト ES 細胞との差別化にならない。また、どの組織が治療用細胞バンクを設立／維持し、それに必要な資金をどう捻出するか国レベルで決定する必要がある。

組織適合型を網羅した細胞バンクが設立されても、疾患が発生して細胞移植を決定してからバンクより細胞を取り寄せ、細胞を増殖、分化誘導・選別し移植するには相当な時間がかかると考えられる。従って、治療用細胞バンクが整備されても、組織適合性を考えた再生医療の適応となる疾患は慢性疾患〜重急性疾患、あるいは使用を前提に常に用意しておく赤血球・血小板などに限定される。

③基礎研究の必要性と再生医療用細胞の選択

現状の iPS 細胞に関しては癌化に関して深刻な懸念があることが明らかになってきた。従って現状の iPS 細胞に関して再生医療の細胞移入療法を想定して安全性を確認する方法を開発するには無理がある。まず、癌化のメカニズムを明らかにする必要があり、次に、iPS 細胞の安全性を評価、確保する方法を開発すべきであろう。その上で、悪性腫瘍化しない分化した細胞を得るための分化細胞誘導・精製法の開発や、可能なら、安全な iPS 細胞作製方法の開発を行う必要がある。さらに言えば、iPS 細胞に比較してはるかに安全であることが実証されており、同等の能力を有する細胞、ヒト ES 細胞がある。今回のヒアリングでも再生医療においてはヒト ES 細胞の方が iPS 細胞より早く実際に使われるであろうという意見が大勢を占めている。再生医療実現化のためには、iPS 細胞の安全性を高める研究をすべきか、現時点でより安全なヒト ES 細胞を用いるか、選択する必要がある。

また、iPS 細胞にせよ ES 細胞にせよ分化誘導した細胞を再生医療に用いるためには、効率の良い分化誘導方法、分化細胞選別方法、分化細胞評価技術等の開発が必要である。再生医療実現のためには、増殖・分化させた細胞を用意する技術開発が、悪性腫瘍を形成しない等の安全性を担保する技術開発、清浄度等移植用細胞の安全性を担保する技術開発とともに必要である。

1.4 ニーズ実現化に向けての提言

調査で判明した上記産業的ニーズ以外に二つの要素を考慮した上で、各ヒアリング先からの国等への要望を集約して近い将来へ向けての提言としたい。

①一つの問題は特許である。産業界には当然特許に対する警戒感が強いが、実際に深く研究している企業は皆無であった。しかし、例えば最も可能性が高い産業応用である薬剤の安全性試験（毒性試験）をとってみると、iPS 細胞の樹立方法、樹立に使われるベクターの使用、iPS 細胞そのもの、培養方法、iPS 細胞からの分化誘導方法、分化させた細胞の評価方法、など多くの知的財産がアッセイ系一つに必要であり、多数の特許化された技術・細胞を利用しなければ実施できない可能性が高い。iPS 細胞樹立方法ひとつとっても最近ほとんどが米国からの出願である。ましてや細胞を分化させる方法はフォローアップできないほど多数の特許が存在する。本来これらの特許をモニターした上で上記アッセイ系を用いるべきか判断すべきであるが、本邦の大製薬企業でも特許調査が追いついていないのが実態のように思われる。また、最近米国の Geron 社が脊髄損傷患者へのヒト ES 細胞移植の phase I trial の認可を FDA より得たが、とある企業の特許やノウハウが FDA で認可されると他のすべての企業も実質的にそれに従わざるを得ないという状況が発生しそうである。その場合、多額の特許料を払ってその系を使用しなければ認可されないという状況が発生することが危惧される。

②米国は政権が変わり、ヒト ES 細胞研究への国家予算投入制限を解除することになった。技術革新を軸に各産業内で革新をおこし、それを米国の新たな力の源泉にしようという意図が汲み取れる。医療においては ES 細胞のような幹細胞を用いた再生医療や創薬がそれに相当するかもしれない。従って、ブッシュ政権下では宗教的・政治的理由で抑制されていた連邦予算を用いて、全米でヒト ES 細胞を含む幹細胞研究が盛んになることは必定である。その研究成果と米国のベンチャー等が結びつくことと上記特許の状況がますます悪化することが考えられる。

これらの情勢の下に日本として何をなすべきかを考えてみたい。

1) ヒト iPS 細胞の産業利用

ヒト iPS 細胞でもっとも早く産業応用される可能性が高いのは、正常人由来 iPS 細胞を用いて分化誘導法・分化評価法の開発や、安全性試験・毒性試験などを行う in vitro（体外）での研究開発である。体外での利用に関しては iPS 細胞の安全性は問題ではないからである。ヒト ES 細胞とは異なり、現在ヒト iPS 細胞樹立・使用に関しては胚の作製や生殖細胞への分化を除くとほとんど規制がない状態である。また、日本国内だけで 200 株以上の iPS 細胞がすでに樹立されていると言われており、その多くは今後バンク化に伴って比較的制限無く使えるようになってくることが期待されている。将来、本邦においてもヒト ES 細胞の使用条件が緩和されるかもしれないが、規制緩和には数年はかかると考えられ、iPS 細胞はそれまでの期間内の研究開発やノウハウの蓄積のための貴重なリソースと考えられる。

一方、患者さん由来の細胞を用いて iPS 細胞を作製し、その細胞を疾患関連組織に分化させて病態を再現する試みは iPS 細胞でなければできない利用法である。これにより先天

性の遺伝子変異に起因する疾患の発症機序の解明や治療法の開発が進むことが期待される。ただし、患者さん由来 iPS 細胞から病態を再現することができるか、その研究開発がどれだけ大変かは個別の問題として残る。また、先天的に遺伝子変異というほどの変異が無い場合、この取り組みにより疾患の発症機序がわかり得るか疑問である。しかし、時間をさかのぼって疾患を見ることで、たとえ後天的な疾患であっても今までと全く異なる捉え方をすることが可能かもしれないという意見もあった。この分野への製薬会社の興味は一致したものではなかったが、iPS 細胞のもっとも独創的な利用方法である。

一方、iPS 細胞の再生医療（細胞治療）への応用に関しては慎重な意見が多かった。現在の iPS 細胞では実験動物に移植後悪性腫瘍が見られる例があり、原因の究明と安全性の担保は大きな課題である。再生医療を実現化するに当たっては、安全な iPS 細胞の樹立・利用を目指すのか、ヒト ES 細胞や体性幹細胞など他の幹細胞を選択するか、いずれかの時点で選択する必要が生じるかもしれない。また、再生医療への応用には、分化誘導法・評価法の開発、GMP グレードの細胞調製、標準化などが求められる。

2) iPS 細胞以外のヒト多能性幹細胞研究開発

ヒト iPS 細胞が出来たのでヒト ES 細胞はもういらぬという議論がある。しかし、iPS 細胞を調べていけばいくほど、ES 細胞の iPS 細胞に対する優位性が明らかになってきた。iPS 細胞が xenograft で悪性腫瘍を形成したのは再生医療を考える上で重要な問題である。それにとどまらず、無理に未分化化を誘導した iPS 細胞は、分化能・遺伝子のエピジェネティック制御状態などに関してどんなによっても ES 細胞と同等、おそらく ES 細胞以下という意見は根強い。また、ヒト ES 細胞は開発後 10 年間の蓄積があり、再生医療には iPS 細胞より ES 細胞の方が早いという意見は根強かった。産業界・アカデミックを問わずヒト iPS 細胞/ES 細胞利用への欲求は非常に高いことを今回の調査を通じて確信したが、こと再生医療に関しては安全性の観点から現状ではヒト ES 細胞のほうが勝っていると考えられる。一方、そもそもこれほど iPS 細胞が注目されている理由の一つは、ヒト ES 細胞に対する規制・倫理的自己規制の問題で非常な努力を払わなければヒト ES 細胞を用いた研究は本邦では難しいからである。

最近 Geron 社が phase I trial を FDA より得たこともあり、現在世界では再生医療用に GMP 基準を満たしたヒト ES 細胞株の樹立競争が起こっている。再生医療、創薬へのヒト ES 細胞の応用を目指した取り組みが本格化する可能性がある。

3) iPS/ES/分化誘導関連特許情報の整理

iPS 細胞の利用を考えている企業のヒアリング担当者が声を揃えて疑念を表明したのが、iPS 細胞を利用して安全性試験や薬剤スクリーニング系を組んだ場合、どこにどれほどの特許料を支払う必要があるか？という問題だった。一部の企業は現在、年数百万の使用料を払って京大株を研究に使用している。しかし、実際に薬剤のスクリーニングなどに使用した場合、どのようなことになるのか理解されていない。また、これらの系においては、iPS 細胞の樹立関連の特許、iPS 細胞使用のローヤルティー、ベクター使用料、分化誘導法・培養法にかかわる特許など、各ステップで特許料の支払いが求められる可能性がある。樹立にかかわる特許料のことだけでも、製薬会社が一社として自前で樹立していない理由の一端かもしれない。

このように、ヒアリングした各企業からは特許関連の懸念が強く表明されているが、同時に、特許関連情報を網羅していると言明された会社は一つも無かった。内情を聞くと、特許部ではなく研究者が一次調査をせねばならないことも多く、手がまわらない場合が多い状況である。幹細胞・分化誘導関連の特許サーチが必要と考えられる。

4) ヒト iPS 細胞、ヒト ES 細胞の細胞バンク整備の必要性

すでに我が国内だけでも 200 株以上 (200 細胞由来と表現すべきかもしれない) の iPS 細胞が各研究者により樹立されている。これらの iPS 細胞を他の研究者・企業が使用しやすくするための細胞バンク化が医薬基盤研、理研 BRC 等で始まろうとしている。これらは現在再生医療実現化プログラムなどの予算で事業化されているが、今後 iPS 細胞の利用が急速に伸びたり、安全性試験などのために多量・多量の細胞が必要になったりすれば医薬基盤研、理研などの公的バンクでは不十分になることが予想される。その場合の対応について今から考えておく必要がある。また、樹立した各研究者により、細胞分与の方針はまちまちであり、営利企業には細胞使用のローヤリティーを要求する研究者、しない研究者等が混在することが予想され、交通整理が必要になる。また、細胞バンクでも営利企業を配布対象とする組織、しない組織が混在することが考えられる。細胞バンクが営利企業にも門戸を開くことが産業化に向けての重要なステップになる。

患者さん由来の iPS 細胞に関しては、本邦においては医療機関において主に樹立されることが予想される。樹立機関がどのような方針で細胞を樹立するか、病態解析ならびに創薬における製薬会社など企業の参加を想定して患者さんよりインフォームドコンセントを取得しているかによって、営利企業がこれら患者さん由来 iPS 細胞を利用できるかは違ってくる。このような機関でも iPS 細胞樹立・バンク化の負担は重く、関連機関より何らかの補助が将来必要であろうと思われる。

また、正常人由来、患者さん由来に関わらず、iPS 細胞樹立・評価には多くの人手と多額の費用がかさむ。従って、樹立操作効率化標準化の観点より、iPS 細胞樹立等の作業は少数の拠点に集約化する等の方策の策定が望ましいと考えられる。

また、癌化した多くの培養細胞とは異なり、ヒト iPS 細胞はフィーダー細胞との共培養が必要な ES 細胞様の細胞であり、培養自体が比較的難しい細胞であることから、培養技術のトレーニングの充実も求められる。

5) ヒト iPS 細胞の標準化

安全性試験・毒性試験を考慮している企業からは、「標準化された iPS 細胞」の必要性のお話が多くあったが、では何を指標に標準化してほしいのか掘り下げて聞いてみると、標準化すべき細胞の性質に関しては個々のニーズにより異なることがわかってきた。心筋に分化させて毒性試験をしたい場合は、極論を言うと神経細胞への分化能を失っていても構わない、という議論が大勢を占めている。言い換えると、「定義としての iPS 細胞を規定するための標準化」が必要なのか、「産業上のニーズにあわせた標準化」が必要なのか選択して別個に考える必要がある。細胞の増殖性や、(定義が難しいが) 未分化性・分化能など、共通に保たれていることが必要な要素もあるが、産業上有用な主な標準化はむしろ分化誘導後の細胞の評価においてなされるべきではないかと思われる。心筋なら心筋、神経細胞なら神経細胞を規定することが薬剤のスクリーニング等における標準化に寄与すると考え

られる。未分化細胞として、あるいは、発生毒性・催奇形性等の研究においては iPS 細胞の性質の評価が必要であるが、その場合は比較の対象として ES 細胞や胚との比較研究が求められる。いずれにせよ、標準化を考える上での要素因子の洗い出しが現状ではまだ出来ていない。

一方、薬剤の安全性試験への応用を考えている会社等からは「均質な細胞」入手に対する欲求が強く出された。しかし、現時点で理研等の細胞バンクが想定している 1 ロットはさほど多くない。このギャップを埋めるために、ロット間や継代数による細胞間の差をなくすための培養法等開発が求められる。

再生医療を見越した iPS 細胞の安全性に関しては、まず、腫瘍化など iPS 細胞の問題点の洗い出し、そのメカニズムの探求が先で、明らかになったメカニズムに対して安全性を担保するための分析方法を開発し、それを元に標準化を図ることが必要だと考えられる。ただし、再生医療において本来もとめられるものは治療としての有効性であり、有効でなければ安全でも意味が無い。治療の有効性の評価基準は個々の再生医療で別々に設定されると思われ、それぞれの場合に対応した細胞の有効性の標準化が必要になると考える。

6) iPS 細胞を用いた細胞工学研究の開発

ここまでは iPS 細胞を利用する方向で何が必要かを列挙してきた。別の考え方として、iPS 細胞を用いて、他の重要な技術開発を行う方が有用という考え方もある。再生医療を実現するにしても iPS 細胞以外にも体性幹細胞やヒト ES 細胞もあり、必ずしも iPS 細胞で実現しなければならない訳ではない。実際、現状の iPS 細胞は癌化の問題等で少なくとも当分再生医療には使えそうもなく、ヒト ES 細胞の研究が先行する部分もあると思われる。しかるに、本邦はヒト ES 細胞の研究は盛んではなく、ヒト ES 細胞を用いた再生医療の対応が不足している感がある。製薬産業においても必要なら海外の研究所でヒト ES 細胞等を用いて研究をする予定であること、必ずしも国内で無理に規制のある ES 細胞なり、特許が厳しく押さえられている iPS 細胞なりを用いて研究する必要があるか疑問をもつところも多い。規制・倫理的問題の少ない iPS 細胞を用いて創薬や再生医療実現の上で必要な分化誘導技術、細胞分離技術、細胞培養技術など種々の細胞工学技術を早期に開発することも我が国の研究技術開発能力の向上に役立つことが考えられる。

第2章 iPS細胞等幹細胞の産業化に関わる要素技術に関する調査 (ニーズ、要素技術調査)

2.1 緒言

前章のヒアリング調査、iPS細胞等幹細胞の実用化モデルの作成と並行して、想定される細胞プロセスを、

- 1) 安全かつ効率的な iPS 細胞・幹細胞の「細胞誘導技術」、
- 2) 大量かつ安定な iPS 細胞・幹細胞の「細胞培養技術」、
- 3) 正確かつ感度のよい iPS 細胞・幹細胞の「細胞分析技術」、
- 4) 短時間かつ精度のよい iPS 細胞・幹細胞の「細胞分離技術」、

の4段階に分類し(図1参照)、各段階における要素技術について、その詳細を調査する分科会を設置し、調査(技術調査、文献調査、専門家のヒアリング等)を行った。特に細胞を取り扱う様々な技術が開発されている中で、どのような技術が存在しているか、これら現状の技術で不足しているものは何か、優れてはいるがまだ不十分な技術をどのようにすれば適合させることが可能なのかについて明らかにした。

要素技術に関しては広く調査を行ったが、iPS細胞等幹細胞の産業応用化に向けた品質管理、細胞操作に重要な役割を果たすと推察されるナノテクノロジーに関しては特に留意した。これは、レトロウイルスを用いる遺伝子導入・形質転換技術が安全性と確実性の点で大きなネックになっていること、細胞の培養を含む取り扱いや繰り返しの安定性を考えると、ナノテクノロジーを含む超微細加工技術が新規なライフサイエンスにおいて一定の役割を果たす可能性が考えられることを考慮したものである。こうしたナノテクノロジーなどが細胞レベルの操作技術として発展する可能性と当該技術を基盤に我が国が世界をリードする位置を形成する可能性についても留意して調査した。実際の調査においては、ニーズ調査の調査結果を受け、適宜、調査対象の修正、追加を行いながら調査・検討を行った。

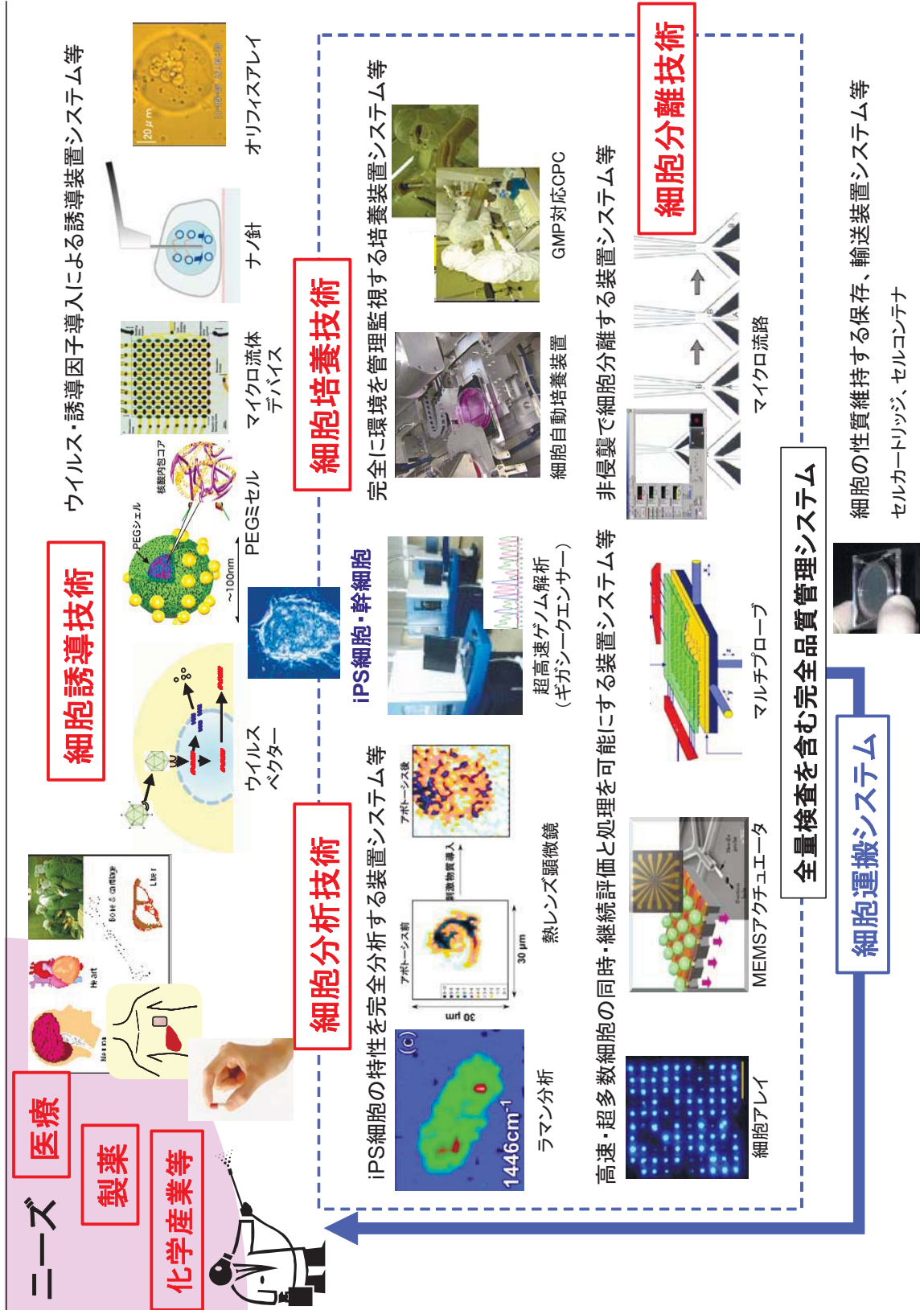
2.2 実施方法

各要素技術調査分科会において、各段階に含まれる主要な要素技術の調査対象項目、対象専門家を細分化し、調査を実施した。その際、ニーズ調査分科会と連携を取り、ニーズ調査分科会において明らかになったニーズに対する要素技術の対応付けを適宜行い、各要素技術分科会においてその不足分をさらに調査・検討した。

1) 安全かつ効率的な iPS 細胞・幹細胞の「細胞誘導技術」に関する調査

iPS細胞は3種類の遺伝子をレトロウイルスあるいはレンチウイルスによって体細胞に導入することで作成している。これらのウイルスは導入遺伝子を宿主細胞の染色体上にランダムに挿入するため、宿主細胞のゲノム情報が部分的に変化することを意味する。iPS細胞の医療・各産業分野への実用化において、ゲノム上への遺伝子の挿入自体が品質管理上許容されないものもある。これまでのレトロウイルスを用いた遺伝子導入によるiPS細胞誘導技術から、非ウイルス性の遺伝子導入によるiPS細胞誘導、さらには遺伝子ではなく安全な薬物あるいはタンパク質の導入によるiPS細胞誘導技術が必要となる。本調査分科会では、遺伝子導入法、iPS細胞誘導法について上記記載技術を中心にどのよう

図1 iPS細胞・幹細胞実用化に必要な工学的技術と開発される装置イメージ



な手法が存在し、それぞれの実用化可能性、またどのような利点があり、iPS細胞へ応用するのに適しているものかについて調査・検討を行った。

2) 大量かつ安定な iPS 細胞・幹細胞の「細胞培養技術」に関する調査

iPS 細胞の培養は ES 細胞の培養技術が基盤となり、マウスからヒトへの移行が速やかに進んだ。しかしながら、ES 細胞は倫理的な問題等により実用化段階まで進んでおらず、iPS 細胞の実用化を目指す上での、スタンダードとなる培養技術が現状で存在していない。今後、iPS 細胞の実用化を目指すうえで、培養方法、培養装置・システムが細胞を用いた産業化工程のスタンダードとなる技術開発を行わなければならない。例えば、実生産における細胞培養工程では、患者ごとに細胞特性が変化する(原料の不均質性)、患部の大きさが変わる(生産量と生産時間の変動)など、再現性の乏しい生産処理工程と考えられる。こうした中で、どのような細胞培養工程、細胞培養技術ならばこうした問題点を克服することができるか調査・検討する必要がある。本調査分科会では、細胞培養システムに関する技術、iPS 細胞の細胞培養培地・容器・基材、細胞輸送法などについてどのような技術が存在し、どのようなことを目的としているのか、iPS 細胞へ適用することは可能なのかについて調査・検討を行った。また、細胞培養技術は iPS 細胞実用化工程においてプラットフォームを形成する技術であり、その点にも留意した。

3) 正確かつ感度のよい iPS 細胞・幹細胞の「細胞分析技術」に関する調査

iPS 細胞の標準化を行うにあたり、iPS 細胞の細胞分析技術は重要な要素である。また、細胞分析方法も既存の技術に代表される侵襲的・破壊的分析技術から、より細胞生産プロセスを重視した非侵襲・非破壊による細胞状態の分析技術を調査・検討することは不可欠である。特に、細胞は非均一な集団として存在しており、iPS 細胞のような、誘導技術によって作成され、またそこから目的細胞へ分化誘導することを想定すると、どれだけの細胞がどのような細胞に誘導されているのかは細胞培養工程上、非常に重要となる。本調査分科会では、細胞分析技術として、主に非侵襲・非破壊的な方法である細胞の物理化学的、形態的特性分析技術、新規細胞分析技術、そして破壊的ではあるがこれまでの細胞分析手法の主要なターゲットとなっている遺伝子診断技術についてどのようなことがわかるのか、どこまでの精度があるのか、iPS 細胞へ適用することは可能なのかについて調査・検討を行った。

4) 短時間かつ精度のよい iPS 細胞・幹細胞の「細胞分離技術」に関する調査

ヒト正常細胞は非均一な存在であるがゆえに、細胞毎でその存在状態が異なる。つまり、1細胞レベルでの細胞分析を行うことで細胞毎の状態を診断すると共に、目的とする細胞のみをその供給量に合わせて分離・濃縮する技術が必要となる。こうした細胞の分離技術は iPS 細胞の誘導によって iPS 細胞のみを分離する段階、iPS 細胞から目的細胞を分化誘導した場合の目的細胞のみを分離する段階といった、主に2段階において必要とされる。特に、iPS 細胞を医療に用いる場合には iPS 細胞を移植すると奇形腫を形成することが知られており、移植に際して iPS 細胞の徹底的な排除が必要となる。本調査分科会では、培養過程にある細胞の分離技術と、分離に供するための細胞マーキング技術について、どのような技術を用いれば短時間で細胞にダメージを与えることなく分離が可能になるのか、iPS 細胞やその他接着性の分化細胞に対しても応用が可能か、細胞診断・分離精度はどの程度あるのかについて調査・検討を行った。

2.3 iPS 細胞・幹細胞の「細胞誘導技術」

2006 年、山中らは Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 遺伝子をレトロウイルスにより導入・発現させることで、マウス胎児繊維芽細胞とマウス成体の繊維芽細胞から ES 細胞のように多分化能をもつ細胞を樹立し、人工多能性幹細胞 (inducible pluripotent stem cell : iPS 細胞) と名づけた¹。発表後直ちに国内外の研究者によって急速に研究が進められ、翌年には、ヒトおよびマウスの体細胞に 4 つの遺伝子を導入することで ES 細胞とほぼ同等の分化多能性を持つ iPS 細胞が作製できることが実証された²⁻⁴。iPS 細胞は受精卵を用いる ES 細胞のような倫理的障壁を持たず、さらに多様な遺伝的背景を持つドナーから誘導することが可能で、移植時の拒絶反応などの障壁も低いと予想されるため、再生医療、新薬開発、評価など各分野での活用が大いに期待されている。

しかしながら iPS 細胞の再生医療への応用に当たっては、腫瘍形成のリスク回避や作製効率の向上が大きな課題となっている。腫瘍形成のリスクについては、導入する 4 遺伝子に癌原遺伝子である c-Myc が含まれていること、さらに遺伝子導入に用いるレトロウイルスやレンチウイルスはゲノムへの遺伝子挿入を伴うために内在性因子の発現等を攪乱してしまう恐れがあることが大きな懸案であった。これに対し、c-Myc を用いなくても iPS 細胞が作製可能であることが報告され⁵、さらにゲノムへの遺伝子挿入を伴わないアデノウイルスやプラスミドを用いた作製方法^{6,7}、低分子化合物 VPA (Valproic Acid, ヒストン脱アセチル化阻害剤)の併用による 2 遺伝子のみでの作製方法⁸、マウス成体の神経幹細胞を用いた 2 遺伝子⁹あるいは 1 遺伝子¹⁰のみでの作製方法、4 つの遺伝子を直列につないだポリシストロニックベクターによりゲノムへの挿入部位を限定した作製方法¹¹、代替遺伝子 Esrrb を用いた作製方法¹²などが報告されている。さらに VPA を用いた場合は iPS 細胞の作製効率も向上することが報告されている¹³。これらの方法以外にも、低分子化合物による遺伝子代替あるいは作製効率向上については現在、国内外で急速に研究が進められている¹⁴。また、細胞内で内在ゲノムに対し自律して存在できる人工染色体を用いることで、ウイルスのようなゲノムへの遺伝子挿入を介さずに目的とする遺伝子を発現させることで、腫瘍形成のリスクを回避する試みも行われている^{15,16}。

iPS 細胞作製に必要な導入遺伝子数や作製効率は、材料となる細胞の種類によっても異なる。これまで iPS 細胞作製に成功している細胞ソースとしては、マウス胎児繊維芽細胞およびマウス成体の繊維芽細胞¹、ヒト成人皮膚の繊維芽細胞⁴、新生児の繊維芽細胞¹⁷、マウス胃上皮細胞¹⁸、肝細胞、^{7,18}、膵臓β細胞¹⁹、リンパ球²⁰、神経前駆細胞^{21,22}、ヒト成人毛髪由来の角化細胞^{14,23}などがある。なかでもヒト成人毛髪由来の角化細胞については、短期間かつ高効率での iPS 作製が可能であることが報告されており¹⁴、さらに細胞摂取時の提供者への負担が極めて少ないことから、臨床応用に向けた強力な候補として期待されている。

以上のように iPS 細胞作製技術については、より安全で効率的な細胞誘導プロトコルの確立にむけて研究レベルで様々な改良が施されている。さらに近年、ヒト ALS (筋萎縮性側索硬化症) 疾患からの iPS 細胞樹立²⁴や自己細胞由来の iPS 細胞を用いた鎌形赤血球貧血症モデル動物の治療例²⁵、ヒトの皮膚繊維芽細胞由来 iPS 細胞からのインシュリン産生細胞の作製例²⁶などが報告されており、iPS 細胞を用いた細胞移植治療や治療法開発に向

けた産業応用への期待が高まっている。しかしながらその実用化までにはまだ大きな壁がある。最も大きな壁は安全性の確保である。特に、ゲノムへの挿入を伴うウイルスを用いた遺伝子導入法は、iPS 作製に当たっては未だ一般的な手法であるが、ゲノムの不安定化など大きな危険性を孕んでおり、実用化に向けた大きな障害となっている。

再生医療に供される細胞に遺伝的な操作を加えるには、より高度な安全性と経済性が求められ、該当する法令を遵守することが求められる。例えばレンチウイルスを用いた遺伝子導入技術は、導入効率が比較的高く、導入できる細胞の種類も幅広いことから、実験室レベルでの細胞の評価では最も有効なベクターの一つとして利用されている。しかし、ウイルスを用いた場合、生殖細胞系へのウイルス関連遺伝子の伝達により子孫に腫瘍や発ガンを引き起こす可能性があるため、再生医療に用いる細胞の遺伝子導入技術として安全性に問題点が指摘されている。また、これらのウイルス系ベクターを利用できる環境は「組み換えDNA実験安全指針」(文部科学省)によって制限されているほか、遺伝子治療のベクターとしてウイルス系を用いることについても「遺伝子治療臨床研究に関する指針について」(厚生労働省)によって制限を受け、再生医療の産業化の場での利用を考慮すればウイルス系ベクターの使用は大きな困難を伴っていると言える。

これに対して、非ウイルス系の場合、組み換え細胞の扱いには制限があるものの、遺伝子を導入する技術としてウイルス系ベクターのような制限を受けることはなく、幅広い現場での利用が考えられる。非ウイルス系の遺伝子導入方法としては、化学的な手法に基づいたリン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、陽イオン性カチオンを用いたリポフェクション法や、物理的に遺伝子を導入する手法など、さまざまな技術の開発が進められている。そこで以下では現在開発が進められているこれらの技術について、1) 物理的遺伝子導入技術、2) 化学的遺伝子導入技術、の2つに大別した調査結果を報告する。

- (1) K. Takahashi *et al.*, *Cell*, 126, 663-676 (2006)
- (2) K. Okita *et al.*, *Nature*, 448, 313-317 (2007)
- (3) M. Wernig *et al.*, *Nature*, 448, 318-324 (2007)
- (4) K. Takahashi *et al.*, *Cell*, 131, 861-872 (2007)
- (5) M. Nakagawa *et al.*, *Nat Biotechnol*, 26, 101-106 (2008)
- (6) K. Okita *et al.*, *Science*, 322, 949-953 (2008)
- (7) M. Stadtfeld *et al.*, *Science*, 322, 945-949 (2008)
- (8) D. Huangfu *et al.*, *Nat Biotechnol*, 26, 1269-1275 (2008)
- (9) J. B. Kim *et al.*, *Nature*, 454, 646-650 (2008)
- (10) J. B. Kim *et al.*, *Cell*, 136, 411-419 (2009)
- (11) B. W. Carey *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 157-162 (2009)
- (12) B. Feng *et al.*, *Nat Cell Biol*, (2009)
- (13) D. Huangfu *et al.*, *Nat Biotechnol*, 26, 795-797 (2008)
- (14) N. Maherali *et al.*, *Cell Stem Cell*, 1, 55-70 (2007)
- (15) X. Y. Ren *et al.*, *Stem Cell Reviews*, 2, 43-50 (2006)
- (16) CREST 戦略的創造研究推進事業, URL: <http://www.wipsccjstgojp/indexhtml>,
- (17) J. Yu *et al.*, *Science*, 318, 1917-1920 (2007)

- (18) T. Aoi *et al.*, *Science*, 321, 699-702 (2008)
- (19) M. Stadtfeld *et al.*, *Current Biology*, 18, 890-894 (2008)
- (20) J. Hanna *et al.*, *Cell*, 133, 250-264 (2008)
- (21) S. Eminli *et al.*, *Stem Cells*, 26, 2467-2474 (2008)
- (22) J. B. Kim *et al.*, *Nature*, 454, 646-U654 (2008)
- (23) T. Aasen *et al.*, *Nature Biotechnology*, 26, 1276-1284 (2008)
- (24) J. T. Dimos *et al.*, *Science*, 321, 1218-1221 (2008)
- (25) J. Hanna *et al.*, *Science*, 318, 1920-1923 (2007)
- (26) K. Tateishi *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 283, 31601-31607 (2008)

2.3.1 物理的遺伝子導入技術

目的とする細胞に遺伝子を導入する技術は大きく分けて物理的手法と化学的手法に二分される。化合物等による反応系を介して遺伝子を導入する化学的手法に対し、細胞膜や核膜を物理的に破断・貫通して遺伝子を細胞内に直接導入する物理的手法は、化学的な修飾等の痕跡を残すことなく狙った細胞に遺伝子のみを導入できる点で有利である。

この章では物理的遺伝子導入方法として現在主に用いられているピペットや電波、音波、針などを用いた遺伝子導入方法について紹介する。

2.3.1.1 マイクロインジェクション

マイクロインジェクション法は、ガラスピペットで物理的に細胞膜を通過し、細胞内の狙った場所に目的とする物質を直接注入する方法である¹。この方法では、細胞内にタンパク質、ペプチド、cDNA から巨大分子までさまざまな物質を、特定の細胞の細胞質内あるいは核内のいずれか希望の位置に、狙ったタイミングで、正確な量だけ運ぶことができる。このような時空間的に正確な制御下での物質導入は、他の遺伝子導入方法、エレクトロポレーションや化学的遺伝子導入方法などでは難しい。また、核内遺伝子注入法ではウイルスを用いた遺伝子導入のようにベクターの作製に時間や手間をかけずに、即座に遺伝子導入をすることができ、また複数の遺伝子を同時に細胞に導入することも容易である。リン酸カルシウム法やリポフェクション法では、複数の遺伝子を導入する場合、実際に細胞に導入される遺伝子量の比を一定に制御するのが難しいが、核内遺伝子注入法では遺伝子量の比を一定に制御することができる²。

このような特徴から、マイクロインジェクション法はこれまで、受精卵や神経細胞、植物などの培養細胞に対し、DNA、RNA、RNAi、タンパク質、ペプチド、薬剤などの導入方法として、トランスジェニック動物の作製や細胞分子生物学的な解析に広く用いられてきたほか、臨床段階でも、卵細胞に対して人工的に精子を導入する人工授精の技術として利用されてきた¹。

しかしながら従来の手動のマイクロインジェクション法ではどうしても手間がかかり、技術的に限界がある。これに対して近年、ピエゾアクチュエーターを用いたマイクロインジェクション法や³⁻⁵、コンピュータ制御による空間的に正確なマイクロインジェクション法⁶、より詳細な量的制御の可能なマイクロインジェクション法^{7,8}など、さまざまな技術

の開発例が報告されている。マイクロインジェクション法による効率的な遺伝子導入には性能の良いマニピュレーター等の装置が重要であるが、これらの装置については現在、ナリシゲ、富士通、eppendorf、drummond、デジタルマイクロシステムズなどが開発・販売している。今後の産業応用にあたっては、より細胞へのダメージが少なく、あらゆる形態の細胞に適応でき、高効率での遺伝子導入を可能にするような技術開発が必要になると考えられる。

- (1) Y. Zhang *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 506-510 (2008).
- (2) 小原圭吾, *生物物理*, 42, 135-136 (2002).
- (3) N. Yoshida *et al.*, *Nat. Protoc.*, 2, 296-304 (2007).
- (4) A.F. Ergenc *et al.*, *Biomed. Microdevices*, 9, 885-891 (2007).
- (5) 工藤謙一 *et al.*, *Journal of Mammalian Ova Research*, 15, 167-172 (1998).
- (6) W. Wang *et al.*, *PLoS ONE*, 2, e862 (2007).
- (7) F.O. Laforge *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 11895-11900 (2007).
- (8) H. Matsuoka *et al.*, *Biotechnol. Lett.* 29, 341-350 (2007).

2.3.1.2 エレクトロポレーション

エレクトロポレーション法は、細胞に短い周期で電圧をかけることにより細胞膜を一時的に穿孔し、膜透過性の増大により DNA を細胞内に取り込ませる技術である^{1,2}。T. Helledie *et al.* (2008)は、遺伝子導入効率の低い間葉系幹細胞に対してエレクトロポレーション法を適用して DsRed 遺伝子の導入を試みたところ、陽性となった細胞数はリポフェクションの陽性数の 2~3 倍となったばかりではなく、最長 3 週間まで導入遺伝子の発現を確認した³。また、S.Y. Han *et al.* (2007)は、同じように遺伝子導入効率の低いメラノーマ細胞に対して、エレクトロポレーションを改良し Nucleofector solution™ を開発することにより、高い導入効率を成功させた⁴。これらの結果から、エレクトロポレーション法は、従来遺伝子導入が難しいとされていた細胞系列に対して容易に遺伝子を導入できるという利点を持つと言える。通常のエレクトロポレーションでは細胞をキュベットに封入して電気穿孔を行う。しかし、再生医療で遺伝子導入する細胞は、その細胞給源が同一であっても均一では

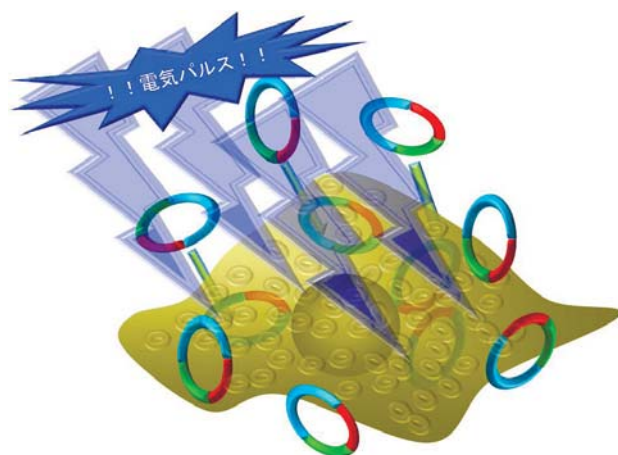


図2. 3-1 エレクトロポレーション: 電気パルスによって細胞表面がせん孔してできるチャンネルを通じて DNA が細胞に取り込まれる。

なく、得られる細胞も非常に少ないことから、数少ない標的細胞に確実に遺伝子を導入することが求められている。これに対して鷺津らの研究グループは、これらのエレクトロポレーションの技術を実験室レベルから産業レベルへ応用する試みを行い、基板上に開けた微小オリフィスに細胞を固定し、基板と溶液間にパルス電圧をかけることで90%以上の導入率を達成した⁵。また、エレクトロポレーションの細胞に対する侵襲性はリポフェクションと同程度であるが、上記の利点を考慮すれば納得できる範囲にある。さらに、エレクトロポレーション法は生体に用いることも可能であり、導入効率は最大50%程度であることが報告されている⁶。

- (1) R.L. Harrison *et al.*, FEBS Lett., 435, 1-5 (1998)
- (2) S. Mehier-Humbert *et al.*, Adv. Drug Deliv. Rev., 57, 733-753 (2005)
- (3) T. Helledie *et al.*, Stem Cells Dev., 17, 837-848 (2008)
- (4) S.Y. Han *et al.*, Exp. Dermatol., 17, 405-411 (2008)
- (5) O. Kurosawa *et al.*, Micro-NanoMechatronics and Human Science, 2006 International Symposium 1-6 (2006)
- (6) I. Roy *et al.*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 4, 89-97 (2008)

2.3.1.3 ソノポレーション

ソノポレーション法は、エレクトロポレーション法と同様に、細胞膜を物理的に穿孔することにより膜透過性を向上させ、細胞内に遺伝子や薬剤を導入する物理的な遺伝子導入方法である。超音波を細胞に照射しただけでは細胞への遺伝子導入効率は低いが、超音波の音響エネルギーを吸収した小さな気泡が細胞表面近傍に生じると導入効率が高くなることが報告されている¹。原理としては、マイクロバブル共存下では気泡が激しく膨張と圧縮を繰り返すキャビテーションという現象が起こりやすくなり、細胞表面の物理的な剪断によりDNAや遺伝子が細胞に取り込まれやすくなるためと考えられている²が、その詳細についてはまだ不明な点が多い。超音波造影剤は像を取得するため生体に使用されていることから、造影剤を用いたマイクロバブルを工夫して超音波と組み合わせることにより、実際の遺伝子治療が必要とされる器官や腫瘍への遺伝子導入が実現された。また、この手法は電場よりも指向性に優れ、数ミリメートルの微小部位へと集束できる他、治療部位の超音波画像により部位を確認できるという利点を持つことから、生体組織に応用される場

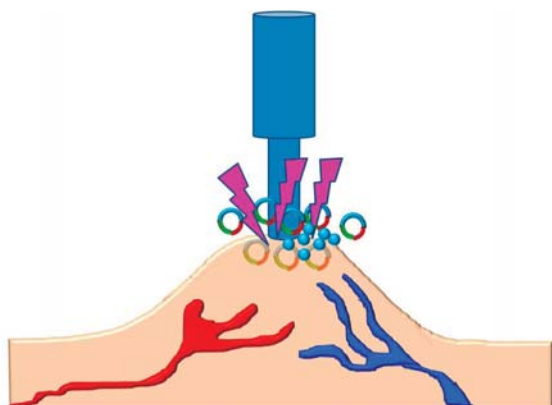


図2.3-2 ソノポレーション:
超音波パルスによってマイクロバブルが運動し、これが組織表面に穿孔してできるチャンネルを通じてDNAが細胞に取り込まれる。

合が多い。鈴木ら(2008)は、超音波造影剤としてのマイクロバブル (PEG-バブルリポソーム) を構築し、超音波遺伝子誘導により既存のリポフェクション法よりも高い遺伝子導入効率を実現した³。また、第三世代マイクロバブル BR14 を用いてプラスミド DNA と siRNA をマウスの心臓に導入することに成功した例⁴や、ガス封入マイクロバブルを用いてプラスミドをラットの肝臓ガン組織に導入した結果、腫瘍細胞の増殖阻害に成功した例⁵も報告されている。

ソノポレーションによって生じた細胞膜の穿孔は、その程度が小さい場合には脂質二重層である膜自身の自己修復能力によって元に戻るが、損傷が大きい場合には細胞が損傷を検出して能動的に修復し、その場合でも約3分間以内に完了することが報告されている²。

- (1) Y. Sakakima *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 12, 884-889 (2005)
- (2) 工藤信樹ら、*生体医工学*, 43, 231-237 (2005)
- (3) 鈴木亮ら、*薬学雑誌*, 128, 187-192 (2008)
- (4) S. Tsunoda *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 336, 118-127 (2005)
- (5) P. Hauff *et al.*, *Radiology*, 236, 572-578 (2005)

2.3.1.4 ナノ針を用いた細胞への遺伝子導入操作

AFM はカンチレバーの先端に設けられた探針と試料表面の間に働くピコニュートンレベルの原子間力を測定出来る装置である。これを利用し、分子内や分子間の相互作用の測定に使用することが出来る。産総研の中村らはナノスケールの非常に細い針を、AFM を用いて力学応答を観察しながら細胞に接近させ、確実に細胞に針を挿入する技術、セルサージェリーを開発した。可能な限り自然な状態の細胞を対象とし、その状態を維持しながら、単一細胞解析、遺伝子導入、細胞選別、細胞診断などあらゆる細胞操作を低侵襲で自在に行う技術の確立を目指している。

ここで使用する針は、単結晶シリコン製の AFM 探針を集束イオンビームによるエッチングによって直径 200 nm 程度、長さ 10 μm 程度の針状に加工したものであり、これをナノ針と呼び使用している。通常のピラミッド状の探針では、単純な斥力上昇のみが観察される。この場合探針は細胞に押し付けられるだけで、細胞内に効率よく挿入できない。これに対してナノ針を細胞に接近させた場合では、フォースカーブ上で斥力増加が始まってから 1 μm ほどのところで斥力のドロップが観察される。この斥力のドロップは、ナノ針の先が細胞膜を通過した点を示している¹。

このように AFM を用いた力学応答の観察によって挿入動作の途中で挿入の成否を判定できることが本方法の大きな特徴である。すなわちノンラベルで細胞への針挿入過程を観察できるということである²。ナノ針によるプラスミド DNA 導入の概念図を図 2. 3-3 に示した。直径数百ナノメートルの針で、マイクロインジェクションのような溶液の注入動作を行うことは高い圧力を必要とするため難しい。よって、針表面へ導入物質を吸着させ、細胞内に運搬する。遺伝子導入においては、DNA をナノ針表面に吸着させ、細胞に挿入し、DNA を細胞内に拡散させる。

iPS 細胞と同様に hMSC をはじめとする様々な幹細胞に対しても、ウイルスを使わない

安全で高効率な遺伝子導入法が求められている。ナノ針を用いた hMSC への遺伝子導入効率について検討を行った。図 2. 3-4 にナノ針を用いて緑色蛍光タンパク質 GFP の遺伝子を有するプラスミド phrGFP の導入操作を行った結果を示している。ヒト乳癌細胞 MCF-7 を用いて遺伝子導入を検討した結果、図 2. 3-4 A に示すような細胞塊に対しても導入操作が可能であり、図 2. 3-4 B に示すように細胞塊中の 1 個の細胞のみに GFP 発現が確認できる³。初代培養 hMSC に対して、同じプラスミド DNA の導入を行った結果が、図 2. 3-4 C、D である。操作を行った 1 個の細胞のみが GFP 蛍光を示している。

表 2. 3-1 は、DNA 導入効率、単一細胞あたりの導入 DNA 分子数、GFP 蛍光の強度を示す。対照としてリポフェクション、マイクロインジェクションを用いた結果を示した。

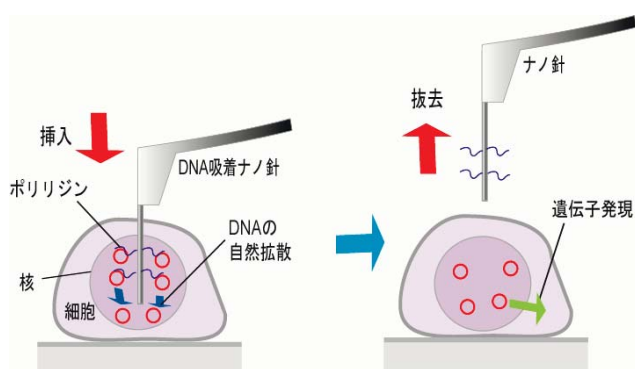
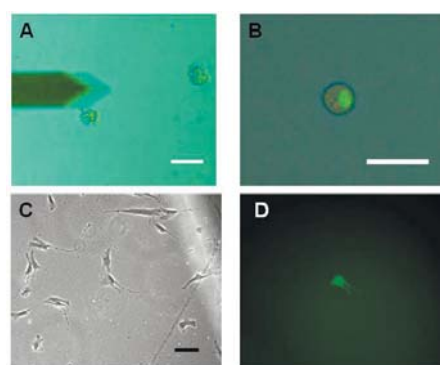


図 2. 3-3 ナノ針を用いた細胞へのプラスミド DNA 導入の模式図



スケールバー：100 μm

図 2. 3-4 ナノ針による DNA 導入操作中の乳癌細胞塊 (A)、乳癌細胞塊中の GFP 発現細胞 (B)、DNA 導入後のヒト間葉系幹細胞の明視野像 (C) と蛍光像 (D)

遺伝子導入効率はリポフェクションで最大 42%、マイクロインジェクションではわずか 8% だったのに対して、ナノ針による導入では 70% 以上の高効率遺伝子導入が可能であった。

	リポフェクション (リポフェクタミン 2000)	マイクロインジェクション (インジェクトマン)	ナノ針
DNA 導入効率	42%	8%	74%
単一細胞あたりの導入 DNA 分子数 (A)	2.1×10^6 (n=22)	9.1×10^4 (n=15)	8.0×10^3 (n=16)
単一細胞あたりの GFP 蛍光強度 (B)	4.9×10^5	1.2×10^4	3.7×10^3
DNA 発現効率 (B/A)	0.23	0.13	0.46

表 2. 3-1 ヒト間葉系幹細胞へのナノ針を用いた遺伝子導入とその他の方法の効率の比

さらに導入した遺伝子の発現効率を調べるため、操作後の細胞 1 個を鋳型として使用する定量 PCR によってプラスミド導入量を評価したところ、ナノ針による方法が 8000 分子程度で最も小さく、ナノ針表面という小さな面積に固定化できる DNA の数が最大でも 10^5 分子程度であることが反映されている。ところが、導入 DNA 量あたりのタンパク質発現

量は他の手法と比べて最も高い。

リポフェクションでは、2百万分子ものプラスミド DNA が導入されている結果となっている。ヒト染色体 DNA は全量で 6.4 Gbp 程度である。定量 PCR の信頼性は高くないが、結果が正しいとすれば導入された 4.3 Kbp のプラスミドの全量は染色体 DNA と同等であることを意味する。このような大量の DNA 導入はゲノム DNA の発現に少なからず影響を与えることが懸念される。正しく細胞の遺伝子発現を評価する、あるいは iPS 細胞の創出で求められるような安全な遺伝子発現を目指すには出来るだけ少量の DNA の導入を行った上で、高効率な遺伝子発現を達成する手法が必要になると考えられる。

今後は、ナノ針の細胞への挿入確率の向上や、より制御された DNA 輸送を達成実現することが目標となる。細胞内に到達するまで減損することなく、細胞核内で確実に DNA を放出するナノ表面での controlled release が課題である。

直径 200 nm のナノ針を用いると細胞へのダメージは非常に小さく、1 時間以上を挿入し続けても細胞を殺すことはない⁴。この利点を生かして、冒頭で述べた細胞内の生体分子検出のための分子プローブの導入に本技術を応用できると考えられる。さらにナノ針表面は 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマーを用いてタンパク質の非特異的な吸着を抑えられることが分かってきており⁵、目的分子の吸脱着を制御し、確実な細胞内への運搬を行うことで、細胞内の様々な生体分子の動態観察が可能になると期待される。

- (1) I. Obataya *et al.*, Nano Lett., 5, 27-30 (2005)
- (2) S. Han *et al.*, Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine, 4, 215-225 (2008)
- (3) S. Han *et al.*, Biosens. Bioelectron., 24, 1219-1222 (2009)
- (4) S. Han *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 322, 633 - 639 (2005)
- (5) T. Kihara *et al.*, Nanobiotechnology, 3, 127-134 (2007)

2.3.1.5 小括

物理的遺伝子導入方法は、古くから卵細胞操作や微生物研究、植物細胞研究等で用いられてきた実績のあるマイクロインジェクションやエレクトロポレーションなどに加え、近年新たに報告されたソノポレーションやナノ針など幅広い技術開発が進められている。これらの技術はいずれも細胞膜を物理的に穿孔することにより膜透過性を向上させて細胞内に遺伝子を導入するもので、化学的な修飾等の痕跡を残すことなく狙った細胞内に目的とする遺伝子のみを直接導入することが可能である。また、抗原抗体反応やリガンド受容体反応などの特異的反応を介さないため、どのような細胞にでも適応できる。このような利点をもつ物理的遺伝子導入技術の開発は、高度な安全性が要求される iPS 細胞や各種幹細胞の産業応用に向けて極めて重要である。今後、細胞膜の物理的穿孔等による細胞へのダメージの抑制や、細胞導入後の発現効率の向上等により、より安全で効率的な iPS および各種幹細胞の創製のための基盤技術となることが期待される。

2.3.2 化学的遺伝子導入技術

化学的遺伝子導入技術は、培養細胞への非ウイルス系の遺伝子導入方法として広く用いられている方法である。従来の一般的な化学的遺伝子導入技術としては、DNA を細胞表面に付着させてエンドサイトーシスによって細胞内に取り込ませるリン酸カルシウム法や、DEAE-dextran 法、陽性あるいは中性の脂質を負に帯電した DNA に結合させて細胞膜に固定し、細胞基質中に取り込むリポソームを介した導入法などがある¹。これらの手法は様々な細胞種に対し有効であり、さらに物理的手法に対し一度に比較的多数の細胞に対して同一の遺伝子導入を行うのに適している。しかしながら従来の一般的な手法では細胞の種類によっては毒性が強いことや、狙った細胞のみに特異的かつ確実に遺伝子導入を行うには不向きであるなどの特徴も併せ持っていた。

この章では近年開発が進められているより安全で効率の高い化学的遺伝子導入技術について紹介する。

(1) Y. Zhang et al., *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 506-510 (2008)

2.3.2.1 化学的細胞穿孔技術

治療に使用可能なほど大量の細胞（数億個以上）を改変・分化誘導する手段として、化学反応による細胞膜穿孔法が近年注目されている。これは細胞膜に一時的かつ局所的に酸化反応を誘発し、細胞膜を変性させて穿孔する方法である。その際の細胞膜の酸化ダメージは、細胞自身が抗酸化能を持つために、ある程度の範囲内であれば修復可能と考えられている。化学的穿孔法には、細胞に酸化反応を誘起するという弱点はあるが、細胞に酸化触媒を接触させ、酸化反応を生じさせるだけで細胞処理可能という、優れた簡便性を有している。

局所的な酸化反応の細胞適用は、90年代末に東京大学と理化学研究所の共同研究の際に発見された、回復可能な細胞酸化傷害に端を発する¹。一細胞を対象とした初期の研究において、回復可能な穿孔部位の直径として0.5~1 μm という非常に大きな値を達成し²、また任意の細胞への確実な遺伝子導入・発現にも成功している³。現在、細胞集団を対象とした大規模集積型システムが細胞膜穿孔を達成しており⁴、今後分化誘導法としての応用が期待される。

化学的穿孔法の適用形態としては、光増感剤を細胞と共に液中に分散、光照射

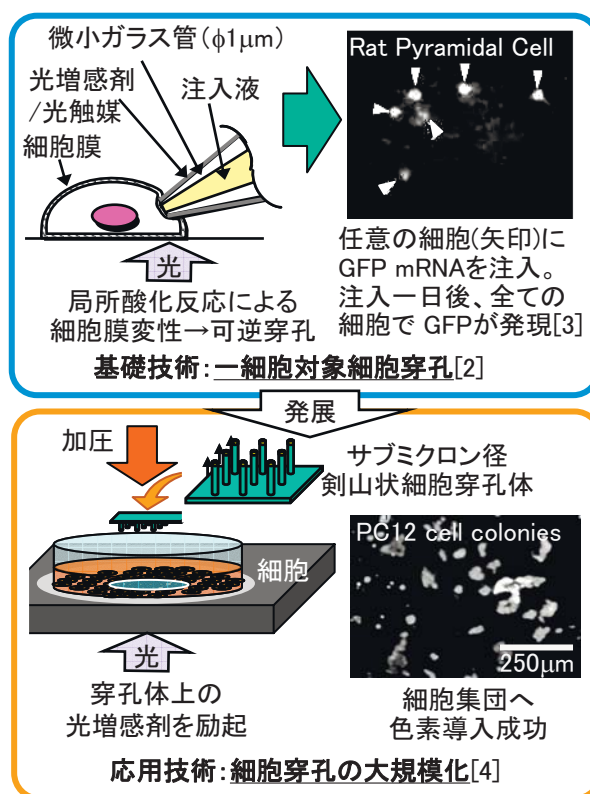


図2.3-5 化学的細胞膜穿孔法概念図

を行う遺伝子導入法が報告されている⁵。その他の例として、超音波照射による物質導入法である音響増感法も、音響増感剤と細胞を液中に分散するという類似の適用形態をとる⁶。音響法の原理は厳密には解明されていないが、超音波による微小気泡が圧壊する際に生ずる光を光源とした、光酸化反応によるものとの報告がある⁷。化学穿孔法の中で特に注目すべき適用形態は、微細な剣山状に形成された酸化触媒を細胞穿孔体として使用した、細胞への直接的な物質導入である。この方法では廉価なナノインプリント技術で穿孔体を作製可能であるため、費用面でも優れている⁸。

iPS 細胞への分化誘導には、細胞外から細胞内へ導入された複数の遺伝子等の物質が、細胞内で機能することが必要とされる。誘導された iPS 細胞の安全性・確実性を高めるため、ウイルスベクター等の生物学的な細胞誘導技術を回避し、かつ効率よく iPS 細胞を誘導するには、細胞膜の穿孔径が重要と考えられる。非生物学的な穿孔技術として代表的な電気穿孔法の場合には、達成可能な細胞膜穿孔径は数 nm 程度とされ、低分子の確率的な導入に限られる。これに対し化学的細胞穿孔法は、先に述べたように 0.5~1 μ m の穿孔径を確実に達成するため、分子量の大小によらず複数の誘導物質を、任意の比率で細胞に導入可能と考えられる。これは iPS 細胞の誘導効率を飛躍的に向上させる可能性が強く、低コストで大規模実施可能という化学法の特徴からも、今後の発展が期待される。

また、化学的穿孔法にはより高度な分化誘導法も期待される。例えば iPS 細胞などから腎臓など臓器機能を再構成する場合、細胞集団を任意の機能グループ群へとシステム的に分化誘導を行う作業は不可欠と考えられる。天然臓器においてはマイクロメートル級の微細な細胞組織構造が構築されているが、現在の誘導法では、天然臓器と比較して異なる種類の組織を誘導する空間分解能、誘導成功率ともに全く能力が不足している。これに対し、剣山状穿孔体による細胞膜穿孔は、細胞を対象とした印刷のような適用形態をとる。このため、細胞集団にマイクロメートル級の分解能かつ任意のパターンでの物質導入が可能であり、様々な組織を再構築しうる可能性がある⁸。化学穿孔法はこのような広範な適用範囲に加え、関連する国際特許も成立しつつあり⁹⁻¹¹、日本発の独自の分化誘導技術として今後の体系的な産業化が期待される。

- (1) T. Saito, *et al.*, Photochem. Photobiol., 68, 745-748 (1998)
- (2) T. K. Saito, *et al.*, Biotechnol. lett., 24, 309-314 (2002)
- (3) R. Yano, *et al.*, NeuroReport, 13, 1263-1266 (2002)
- (4) T.K. Saito, *et al.*, Anal. Bioanal. Chem., 391(7), 2513-2519 (2008)
- (5) Y. Miyamoto, *et al.*, Chem. Lett., 33(3) 240 (2004)
- (6) E. C. Unger, *et al.*, Invest. Radiol. 32, 723-727 (1997)
- (7) N. Takahashi, *et al.*, J. Med. Ultrasonics, 27(1) 33-44 (2000)
- (8) 齋藤敬、文部科学省 科学研究費補助金 特定領域研究「マルチスケール操作によるシステム細胞工学」2008年6月報告書, 50 (2008)
- (9) I. Karube, T. Saitoh, US patent 6,753,171, WO99-46361
- (10) I. Karube, T. Saitoh, US patent 6,537,800, 特許第 4164233 号、WO99-46588
- (11) T. Saito, US patent 7,320,885, WO01-19953

2.3.2.2 化合物による遺伝子導入技術

非ウイルスベクターとして、リポソーム、ポリマー、磁性体等の化合物を用いた遺伝子導入技術が報告されている。特に遺伝子を内包するタイプのベクターは、ホストの様々な修飾により、細胞への取り込み、エンドソーム脱出、核移行、核内転写等の様々な障壁を乗り越えるのに有効な機能を付加できることから、最適化により更なる導入効率の向上が見込まれる。また、安全性の観点から、生体内で分解可能な分子を活用することも重要である。

○カチオン性リポソーム

カチオン性リポソームは、アニオン性 DNA 等の核酸と静電的に複合体を形成し細胞への遺伝子導入ベクターとしての作用を有する。これは、リポフェクション法として知られている。しかし、カチオン性リポソーム自体には細胞毒性があり、アポトーシスを誘導することが問題である。

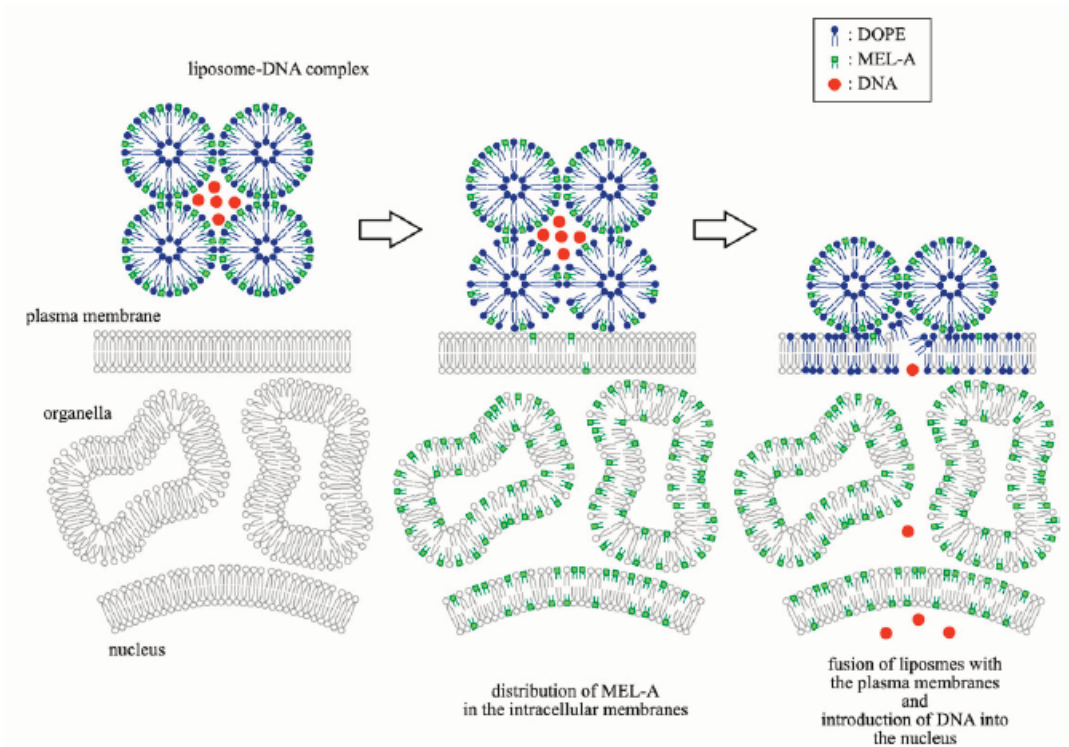


図 2. 3-6 カチオン性リポソームベクターの模式図および膜融合による遺伝子導入メカニズム

イースト菌由来のマノシルエリスリトールリピッド(MEL)-A は、毒性が低く生分解性を有する生物的界面活性剤である。さらに、ヒト白血病細胞、マウス黒色腫、PC12 細胞に対して、細胞分化活性を示す。MEL-A を用いてカチオン性コレステロール誘導体と共にカチオン性リポソーム（粒子径 200~300 nm）を形成し（図 2. 3-6）、NIH-3T3 細胞に対して、アンチセンス DNA のトランスフェクションを行った¹。その結果、市販されているリポフェクションのようなカチオン性リポソームの約 10 倍という高い遺伝子導入効率を

示した。さらに、1時間という短時間のインキュベーションにおいても高い遺伝子導入効率を示した。MEL-A を含有しないカチオン性コレステロール誘導体のみで形成されたリポソームの粒子径は 400~500 nm で、この大きさの違いが高い遺伝子導入効率を示す一因である。最近、共焦点レーザー顕微鏡の連続画像解析により、トランスフェクションの詳細なメカニズムが解明された。その結果、MEL-A を用いることにより、エンドサイトーシス経路ではなく、リポソームと標的細胞の原形質膜の間で膜融合を誘発し、トランスフェクション効率の上昇が可能であることが明らかとなった²。

○多機能エンベロープ型ナノデバイス (MEND)

多機能エンベロープ型ナノデバイス(MEND)を用いた遺伝子導入が報告されている³。粒子径数百 nm の MEND は、脂質エンベロープ内にカチオン性ポリマーを用いてヌクレオチドを濃縮している。また、脂質表面は長期間の血液循環のための PEG、特定のターゲットのためのリガンド、細胞内で有効的なタンパク質形質導入領域ペプチドとエンドソーム脱出を強化するフソジェニックな脂質等の分子で機能化することが可能である (図 2. 3-7)。オクタアルギニンで修飾した R8-MEND の遺伝子導入効率をアデノウイルスと比較した。R8-MEND には、ルシフェラーゼをエンコードしたプラスミド DNA (0.4 μg/ml) を内包させた。一方、アデノウイルスは、ルシフェラーゼ遺伝子を細胞あたり 1×10⁵ 個まで増加させた。HeLa 細胞およびヒト肺上皮癌細胞系 A549 において、R8-MEND のトランスフェクションは、アデノウイルスと同等かそれよりも高い値を示すことが明らかとなった。トランスフェクション後に細胞溶解によるタンパク質量を調べた所、アデノウイルスは高い細胞毒性を示したが、R8-MEND はほとんど細胞毒性を示さなかった。この R8-MEND がカチオン性脂質を含んでいないことがその原因であると考えられる。また、マクロピノサイトーシス経路で遺伝子導入が行われていることを示唆する結果が得られている。また、cytosolic スペースで mRNA の機能を妨げることができるアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) や siRNA の導入についても検討されている。

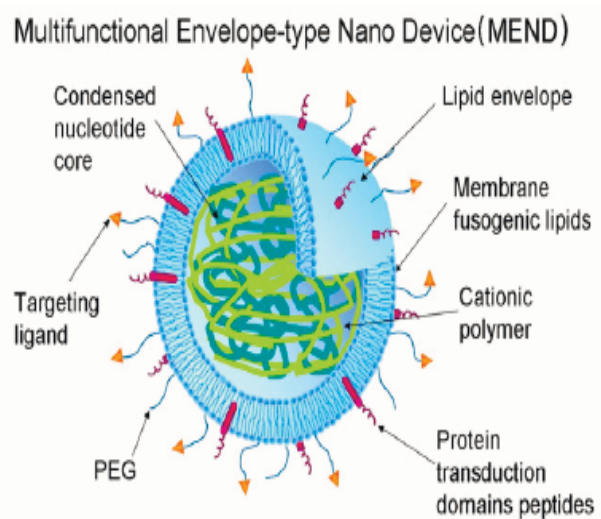


図 2. 3-7 多機能エンベロープ型ナノデバイス (MEND) の模式図

○高分子ナノミセル型遺伝子ベクター

ポリエチレングリコール (PEG) は生化学・薬学分野で広く用いられている物質で毒性が低い。この PEG をシェル形成材料として高分子ナノミセルを形成した遺伝子ベクターが開発されている (図 2. 3-8)⁴。PEG シェルはミセルの凝集や、血液構成材料の非特異吸着を防ぐ機能を持つ。また、PEG 鎖の長さや密度を変えることにより、体内の循環時間の制御や細網内皮系からの認識を免れることができる (ステルス機能)。親水性の PEG と

ポリカチオンであるポリペプチドのハイブリッドによるブロック共重合体で形成されるミセル（粒子径～100 nm）は内部の疎水空間に DNA を凝集させて内包することが可能である。また、PEG-ポリリジンのような反対荷電を有するブロック共重合体から構築されるポリイオンコンプレックス（PIC）ミセルは pDNA だけでなく、アンチセンス DNA も内包することができる。この場合、ミセルの安定性が低下するが、SS 結合によるミセルの架橋による安定性の向上等の工夫がなされている。最近では、生体親和性、エンドソーム脱出性および DNA 濃縮機能をさらに向上させるために、PEG-ポリ aspartamide 誘導体(PAsp(DET))-ポリリジン(PLys)の三ブロック共重合体によるポリプレックスミセルを作製し、遺伝子導入が試みられている⁵。Huh-7 に対するルシフェラーゼアッセイにおいて、従来のブロック共重合体よりも 10 倍高い遺伝子導入効率を示した。

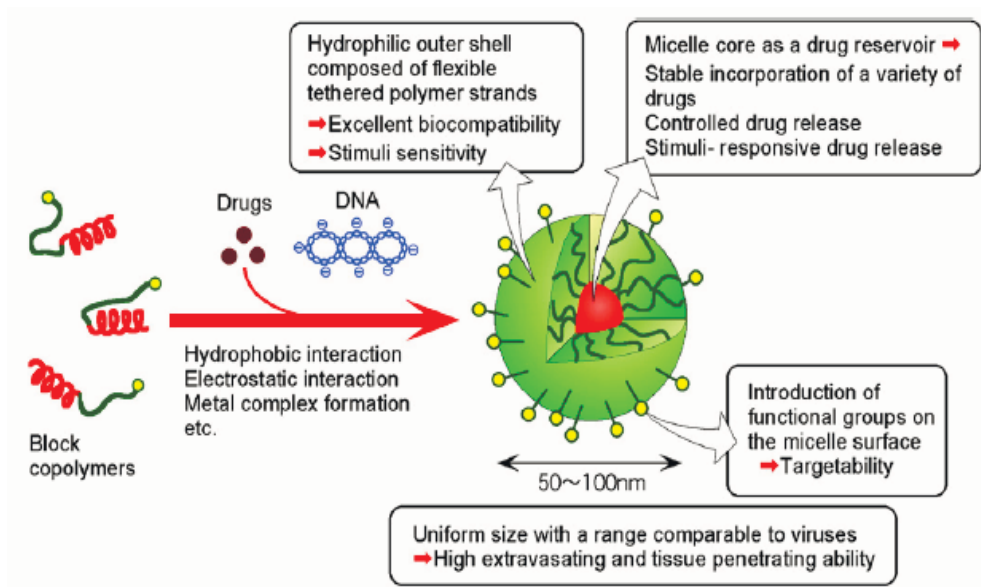


図 2. 3-8 高分子ナノミセル型遺伝子ベクターの模式図

○バブルリポソーム

遺伝子導入効率を向上させるために、バブルリポソームが検討されている⁶。通常マイクロバブルは、超音波画像診断において、造影剤として用いられているため、安全性が高い。あらかじめ準備しておいた PEG-リポソーム懸濁液をパーフルオロプロパン中で超音波処理することにより、リポソーム内にガスを含むバブルリポソーム（粒子径<1 μm）を作製した。pDNA と混合したバブルリポソームを用いて COS-7 細胞に対してルシフェラーゼアッセイを行い、遺伝子導入効率を調べた。アッセイ中に 10 秒間の超音波処理を行った場合にのみ、効率が非常に高いことが明らかとな

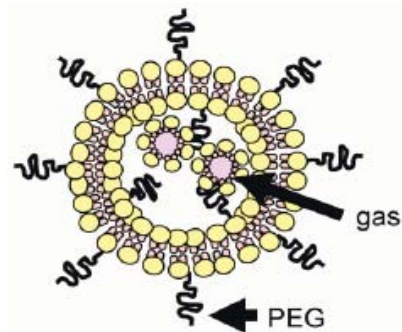


図 2. 3-9 バブルリポソームの模式図

った。また、血清の存在下でもこの性能は妨げられることがなかった。実際、*in vivo* 系でマウスの大動脈にバブルリポソームを注射し超音波を照射することにより、効果が確認されている。上述したように、pDNA とバブルリポソームは複合体を形成しているわけではない。それにもかかわらず高い遺伝子導入効率を示すことは興味深い。今度、遺伝子との複合体を形成したタイプのバブルリポソームの開発が期待される。

○磁性ナノ粒子

トランスフェクションが困難な初代培養細胞に対して、その効率を向上させるために磁性ナノ粒子 (MP) を用いた検討が行われている⁷。カチオン性脂質でコートされた Fe の MP (粒子径 80~90nm) を pDNA と複合化し、5 kGauss の静磁場中に置いた。KB 細胞系に対するルシフェラーゼアッセイにおいて、リポフェクチン等の市販のリポプレックス用ベクターと比較して、300 倍という非常に高い遺伝子導入効率を達成した。また、ポリエチレンイミン

(PEI) およびトランスフェリンと複合体を形成した場合はさらに活性が向上した。また、15 分という比較的短時間のインキュベーションにおいて、もっとも効果的であった。静磁場自体は、MP が細胞表面に堆積しやすくするだけであるが、非特異的な静電相互作用もしくはレセプターを解したメカニズムの可能性が指摘されている。また、カチオンポリマーコートされた MP は、マグネトフェクション試薬として市販されている。

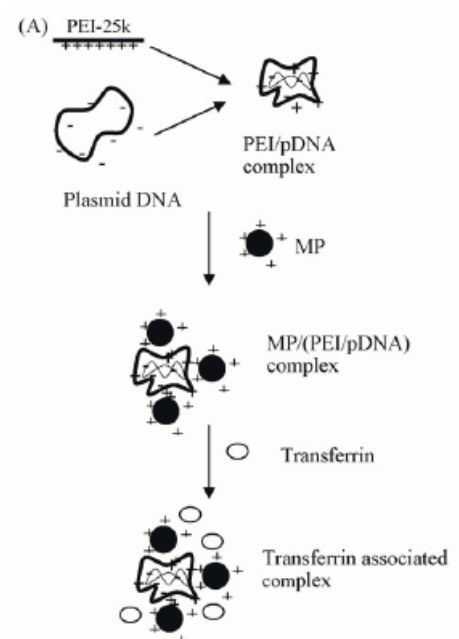


図 2. 3-10 磁性ナノ粒子を用いた遺伝子導入ベクター

○固体脂質微粒子 (SLN)

固体脂質微粒子 (SLN) を核とし、カチオン性脂質と界面活性成分を組み合わせた非ウイルスベクター (粒子径~300nm) が検討されている⁸。安定性が高いため、産業的に使用しやすいという利点を有する。最近、両親媒性である sweet arrow peptide (SAP) を用いた SAP-SLN-DNA ベクターの遺伝子導入についての報告がなされた。HEK293 および ARPE-19 細胞を用いた EGFP 発現率は、いずれも SAP を用いない場合よりも向上したが、HEK293 で 14.5%、ARPE-19 で 6.0%であった。このように、現時点では細胞ごとに遺伝子導入効率が異なるため、ベクター構成成分の最適化、取り込まれやすい細胞の探索および細胞取り込みメカニズムの解明が待たれる。

○生分解性ベクター

近年、ベクター抗生物質自体の蓄積による毒性を回避するために、導入物質の生分解性について注目が集まっている¹⁰。また、このような生分解性は遺伝子をコントロールして放出する観点からも重要である。一般的に寿命は、ベクターを体内の目標の場所に到達す

るまでの 2-3 時間が必要であり、さらに数日以内に分解する必要がある。ポリマーの場合、エステルのような加水分解可能な結合、細胞質の還元的環境で解裂するジスルフィド結合を持つ分子が報告されている。例えば、エステルを有する遺伝子キャリアーとしてポリエステルアミン (PEA) (半減期は pH 7.4, 37°C で 4.5-5 日) は、293T、HepG2、HeLa 細胞に対して細胞毒性を示さなかった¹¹。最近、キチナーゼによって分解できるキトサンポリマーについても研究されている。

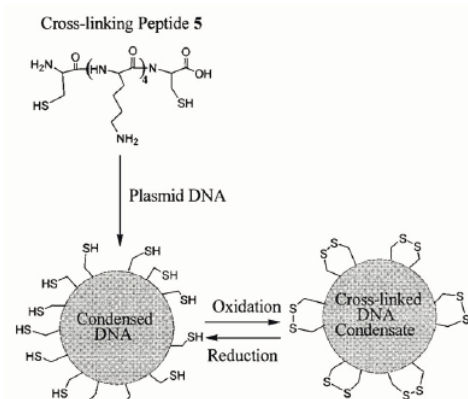


図 2. 3-11 ジスルフィド結合を有するペプチド-DNA 縮合体

- (1) Y. Inoh *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289, 57-61 (2001)
- (2) Y. Ueno *et al.*, *J. Control. Release*, 123, 247-253 (2007)
- (3) K. Kogure *et al.*, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 60, 559-571 (2008)
- (4) N. Nishiyama *et al.*, *Pharmacol. & Ther.*, 112, 630-648 (2006)
- (5) K. Miyata *et al.*, *Pharm. Res.* 25, 2924-2936 (2008)
- (6) R. Suzuki *et al.* *Int. J. Pharm.*, 354, 49-55 (2008)
- (7) X. Pan *et al.* *Int. J. Pharm.*, 358, 263-270 (2008)
- (8) A. del Pozo-Rodríguez *et al.*, *Int. J. Pharm.* 339, 361-268 (2007)
- (9) A. del Pozo-Rodríguez *et al.*, *J. Control. Release*, 133, 52-59 (2009)
- (10) J. Luten *et al.*, *J. Control. Release*, 126, 97-110 (2008)
- (11) R. Arote *et al.*, *Biomaterials*, 28, 735-744 (2007)

図の出典

- 図 2. 3-6 文献 (2) Fig.5
 図 2. 3-7 文献 (3) Fig.2
 図 2. 3-8 文献 (4) Fig.1
 図 2. 3-9 文献 (6) Fig.1(f)
 図 2. 3-10 文献 (7) Fig.3(A)
 図 2. 3-11 文献 (10) Fig.4

2.3.2.3 小括

化合物等による化学反応系を介して遺伝子を導入する化学的遺伝子導入技術は、物理的導入方法と異なり細胞を集団として同時に扱うことが可能で、さらに反応系の制御やベクター分子への機能付与による動態制御により、遺伝子導入の最適化・効率化が可能であるという利点を持つ。化学的遺伝子導入方法は培養細胞への非ウイルス系の遺伝子導入方法としてこれまでも広く用いられてきたが、化合物による細胞毒性などが産業や臨床への応用に対する大きな課題であった。これに対して、本章で取り上げた修復可能なレベルに制御された化学的穿孔法や、低毒性分子・生分解性分子を用いたベクター化合物の構築などさまざまな工夫が試みられている。これらの技術開発は細胞毒性の抑制による安全性の向

上のみならず、細胞集団の微細なパターンニングや、遺伝子導入効率の向上、投与後の体内における動態制御などさまざまな面での技術的な広がりを通して、幅広い産業応用への活用が期待される。

2.3.3 総括

iPS 細胞は ES 細胞とほぼ同等の分化多能性を持ちながら、受精卵を用いる ES 細胞のような倫理的障壁を持たず、さらに多様な遺伝的背景を持つドナーから誘導することが可能で移植時の拒絶反応などの障壁も低いと予想されるため、再生医療、新薬開発、評価など各分野での活用が大いに期待されている。一方で、医療や産業への応用に当たっては腫瘍形成のリスク回避や作製効率の向上が大きな課題となっている。これに対しより安全な細胞を効率よく作製するための細胞誘導技術の開発が現在盛んに行われているが、なかでもウイルスを用いない iPS 細胞作製技術は今後の iPS 細胞の産業応用の促進に重要である¹。

ウイルスを用いない iPS 細胞作製技術として現在、プラスミドによる遺伝子導入や化合物による代替法などが報告されているが²、導入された核酸や代替化合物が産業応用に耐えうる安全性を有しているかどうかについてはさらなる検討が必要である。一方で、遺伝子を非ウイルス的に物理的あるいは化学的手法を用いて直接導入する技術として、既存の技術の応用や、新しい技術の開発などが進められている。

非ウイルス遺伝子導入方法には、狙った細胞の細胞膜や核膜を物理的に破断あるいは貫通して細胞内に核内を直接導入する物理的遺伝子導入法と、酸化反応やベクター化合物による反応系を介して細胞内に遺伝子を導入する化学的遺伝子導入法がある。物理的遺伝子導入法には、以前から培養細胞への遺伝子導入実績のあるエレクトロポレーション法やマイクロインジェクション法に加え、近年開発されたソノポレーション法やナノレベルの細い針を用いた遺伝子導入法などがある。これらの方法は狙った細胞に低侵襲的に遺伝子を導入することができる。作業効率や導入効率などにはまだ課題があるが、導入過程の自動化や集積化による改善が期待される。化学的遺伝子導入法には細胞表面での酸化反応を介した化学的穿孔法や、ベクター化合物を用いた遺伝子導入法などがある。これらの方法は化学反応を介して効率的に細胞内に遺伝子を導入することが可能で、分子修飾などによる機能付与を行うこともできる。細胞への侵襲性や毒性などにまだ課題があるが、反応系の制御や生分解性分子の利用などによる改善が期待される。

しかしながらこれらの技術の中でこれまでに iPS 細胞作製の実績のあるものはまだほとんど無く、いずれの技術も今後 iPS 細胞誘導への適応や最適化、安全性及び効率の向上にむけた技術開発が必要である。一方で、iPS 細胞の産業応用には、細胞移植治療のみならず、難治性疾患の治療法開発研究や薬剤スクリーニングなど様々な応用が期待されている。各技術の最適化や特徴の比較・検討により、目的に応じた誘導プロトコルの確立を適切に進めていくことが iPS 細胞の早期産業化に向けて重要になるであろう。

(1) 田邊剛士ら、再生医療, 7, 171-177 (2008)

(2) W.E. Lowry *et al.*, Nat Biotechnol., 26, 1246-1248 (2008)

2.4 iPS 細胞・幹細胞の「細胞培養技術」

2.4.1 培養システムおよび培養室に関する技術

2.4.1.1 はじめに

iPS 細胞培養における基礎研究は、細胞増殖および分化のための培養環境の調整（細胞と足場、培地成分の調和）を目指してきた。Skottman ら (1) は、ES 細胞の再生医療用途への展開には、動物由来の基質（フィーダーレイヤなど）をなくすことや遺伝的・エピジェネティックに正常であることが不可欠であることを述べている。また、Hentze ら (2) は、今後、目的の細胞への効率的な分化、長時間培養における遺伝的安定性、腫瘍形成の欠如の確認など、安全性に対する最終的な確認手段も必要であると述べている。

培養としては、iPS 細胞の導出培養、細胞増幅のための継代培養、必要に応じて分化を誘導する分化培養が挙げられ、各培養において、細胞加工（セルプロセッシング）が不可欠となる。その際、セルプロセッシングセンター

（CPC）にて、熟練オペレータが煩雑な一連の培養作業を実施しており、労力軽減のために、培養操作の簡略化や自動化が望まれている。さらに、Veraitch ら (3) は、培養中の操作による、培地中のガス濃度、温度、pH の変動が ES 細胞の未分化維持への

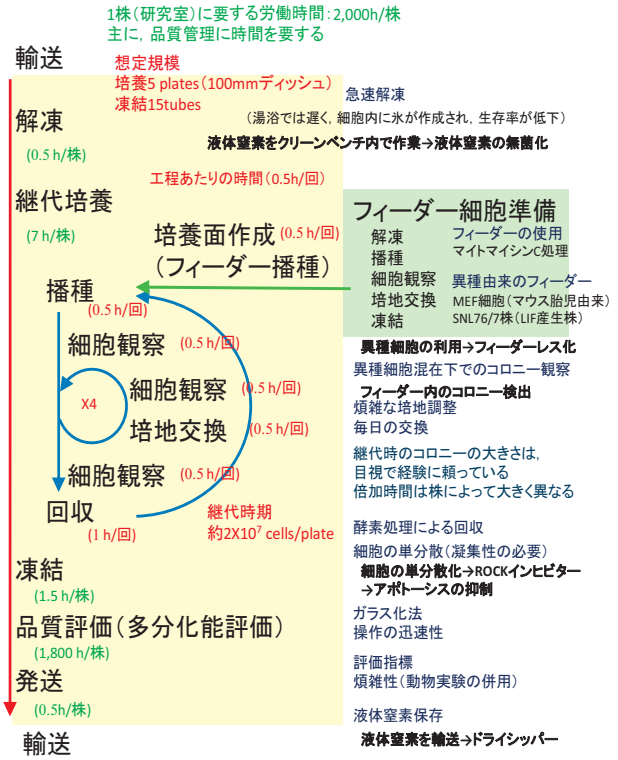


図2. 4-1 iPS 細胞の樹立後 (入手、培養、凍結、発送) の手順と研究室規模における作業時間

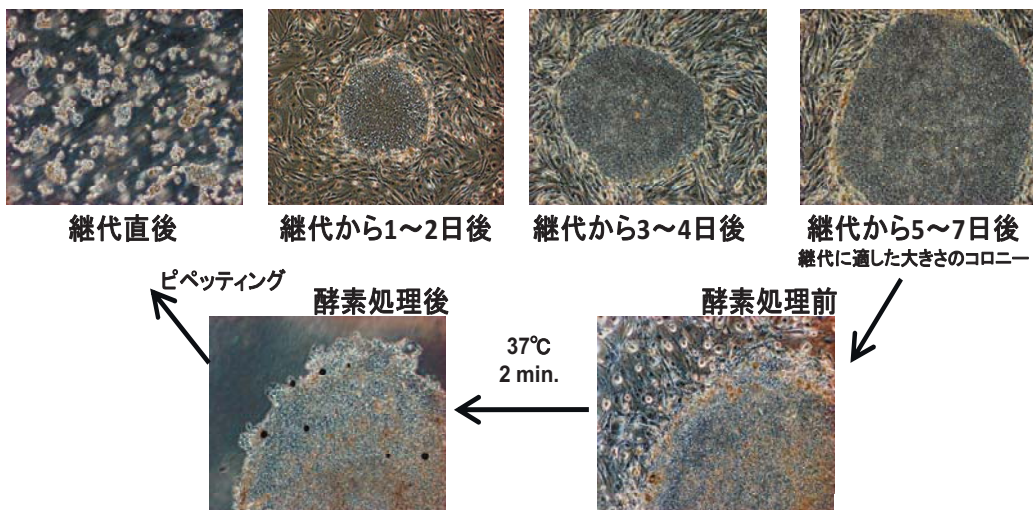


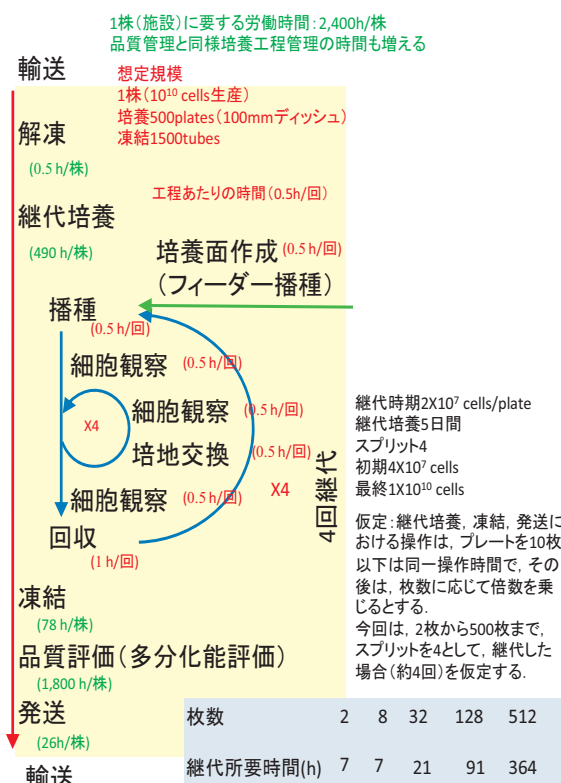
図2. 4-2 iPS 細胞の培養経過

安定性に影響を及ぼし、培養装置の自動化がより細胞安定供給性に貢献できることを示唆している。特に、実践的には、再生医療用途や創薬スクリーニング用途にかかわらず供給細胞源の確保は、重要な課題となり、継代培養による大量培養技術の構築は、急務を要する技術の一つであり、Archer and Williams (4) は、幹細胞の再生医療への展開には、製造に関するプロセスエンジニアリングの知識が不可欠であることを強調している。

培養工学的観点から鑑みると、現状の iPS 細胞作製は、観察力に長けた熟練オペレータの手作業によるもので、産業規模での生産には不向きとなっている。京都大学 物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センターが提供するプロトコルを参照すると、細胞供給センターにおける大量培養工程は、図 2.4-1 に示すように、解凍、継代培養、凍結、品質評価、発送からなる。

解凍・凍結においては、操作の迅速性を必要とし、特に凍結はガラス化法を採用しているため、秒レベルでの急速冷凍が要求される。一方、品質評価では、明確な評価指標がなく、また、動物実験の併用が不可欠なため煩雑である。継代培養においては、あらかじめ用意されたフィーダー細胞が播種された培養面への iPS 細胞播種、観察、培地交換、回収、継代播種と繰り返される。これらの操作において、図 2.4-2 に示すように、異種細胞混在下でのコロニー観察、煩雑な培地調整、毎日の培地交換、細胞観察、継代時のコロニーの大きさは目視で経験に頼っている、倍加時間は株によって大きく異なる、酵素処理による回収、細胞の単分散が不可能である（凝集性の必要）など、いわゆる、園芸職人的な (green fingers) 培養技術が中心となっている。よって、職人技術体系からの脱却、つまり、エンジニアリング参加型 (engineering-driven) 培養技術への展開（職人技からの脱却、誰でもできるようになる培養技術の構築）が不可欠である。日経 BP バイオテクノロジー ジャパン (2008 年 7 月 22 日) においても、英国における研究動向調査において、培養プロトコルの標準化および培養操作の自動化が重要で、今後の基盤研究であることを述べており、日本においても培養工学的な見地から研究基盤構築が、iPS 細胞の産業用と展開には必須である。

以上のことを踏まえ、本節では、iPS 細胞の大量培養技術に焦点を絞り、培養装置、製造設備、培地・担体の開発動向を報告する。



2.4.1.2 細胞自動培養装置

2.4.1.2.1 継代培養における問題点

iPS 細胞の大量培養を行うにあたって、人材育成、工程管理の簡便化、品質管理の簡便化が不可欠である。特に、工程管理の簡便化に対しては、操作の簡便化（細胞の単分散）、培養環境の改善（フィーダーレス）、道具の重要性（自動化）が、カギを握ると考えられる。ある研究機関の樹立 iPS 細胞に対する実際の作業時間に基づいて労働時間の算出を行ったところ、図 2.4-1 に示すように、1 研究室レベルでは、1 株で培養 5 plates（100 mm ディッシュ）で凍結 15

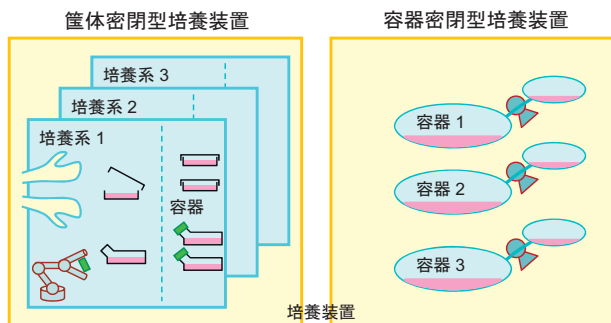


図 2.4-4 培養装置の類別

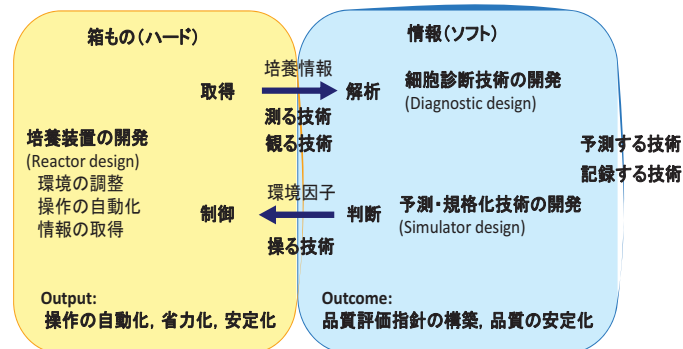


図 2.4-5 培養装置の役割

tubes、継代 1 回を目指すとなると、労働時間が 2,000 h/株 となり、主に、品質管理に時間を要することがわかった。さらに、図 2.4-3 に示すように 1 施設レベルでの作業（1 株（ 10^{10} cells 生産）培養 500 plates（100 mm ディッシュ）凍結 1500tubes、継代 4 回）を仮想したところ、労働時間が 2,400 h/株となり、品質管理と同様、培養工程管理の時間（490 h/株）も増えることが示された。

2.4.1.2.2 培養装置の役割

培養工学的観点から鑑みると、現状のセルプロセッシングは、これまで手技および観察力に長けた熟練オペレータの手作業によるもので、産業規模での生産には大きな課題となっている。培養装置は、作業者が装置外部から培養工程を実施するもので、図 2.4-4 に示すように、主に、容器密閉型培養装置と筐体密閉型培養装置および両者の統合型に類別できる。

装置の役目は、図 2.4-5 に示すように、培養工程を実施するにあたり、ボックススケールでの培養環境の無菌化および調整、操作の自動化、情報の取得が挙げられる。また、人手ではできない操作（周期的加圧など）を実現することができる。本操作により、人体に近い培養環境を実現することができ、より質の高い培養組織を生み出す可能性を有する。さらに、種々の先端技術要素を含む細胞評価技術および予測・規格化技術と統合したハード・ソフト両面からのシステム構築は、オペレータによる観察および予測する能力を含む洞察力を代替あるいは補助することを意味し、アウトプットとして、操作の自動化、省力化、安定化を導くだけでなく、品質評価系の構築、品質の安定化などのアウトカムが得られ、手工業的に生産している培養細胞・組織製品の高品質かつ計画的生産を可能にするものである。

例えば、iPS 細胞を含む足場依存性細胞においては、培養容器内で、接着、馴化、分

裂、分化などの細胞挙動が起こる。細胞分裂とともに、容器内で局所細胞密度の上昇が起こり（空間的不均一性）、接触阻害による増殖低下が生じる。これらの挙動により、1回の培養において、適度な播種密度と到達密度が要求され、足場依存性細胞の増幅には多回の継代培養が不可欠となる（継代操作の必須性）。また、1回の継代培養の境界条件（細胞播種密度と到達密度）の設定は、操作を安定化させるために不可欠であるが、細胞挙動は、細胞株ごとや継代培養を経るごとに異なる（細胞集団的不均一性）。したがって、継代培養では、継代培養の回数、培養中の培地交換時期や継代時期などに関する熟練オペレータの判断が、製造工程や品質の安定化に大きな役割を持つ。

従来のクリーンルーム型 CPC 内における培養装置に対する要求事項は、図 2.4-6 に示すような無菌性、小型化、機械化、解析能、連続性、自律化、保証化が挙げられ、雑菌汚染に対するリスク軽減およびコストの観点から、容器、送液ラインなどのディスプレイサブル化が必要であることや無菌操作の簡略化が要求されてきた。これらの要求を踏まえた、装置開発には、温調、ガス調、滅菌・無菌化、送液、ハンドリング、観察、モニタリング、情報解析、制御、工程管理などの技術の統合が必要となる。さらに今後、培養装置自体が、アイソレータ型 CPC として設計されると、製造における設営コストや工程管理コストの省力化に貢献できる。ここで、培養装置に望まれる技術要素としては、CPC 外部から内部に物資が移送される際の供給方法ならびに移送時の無菌性の担保方法であると考えられる。この技術は、培養装置運転時における容器間や送液チューブ間のジョイント接続にも適用でき、培養により製造される製品の品質担保に重要な技術となる。

2.4.1.2.3 培養装置の現状

一般的な工程の自動化は、図 2.4-6 に示すような対称操作の選択、各操作の機械化、マルチスケール化、機構の多様化、連続化、インテリジェント化、品質向上といった順で達成される。また、組織生産プロセスにおける自動培養装置の意義と方向性につ

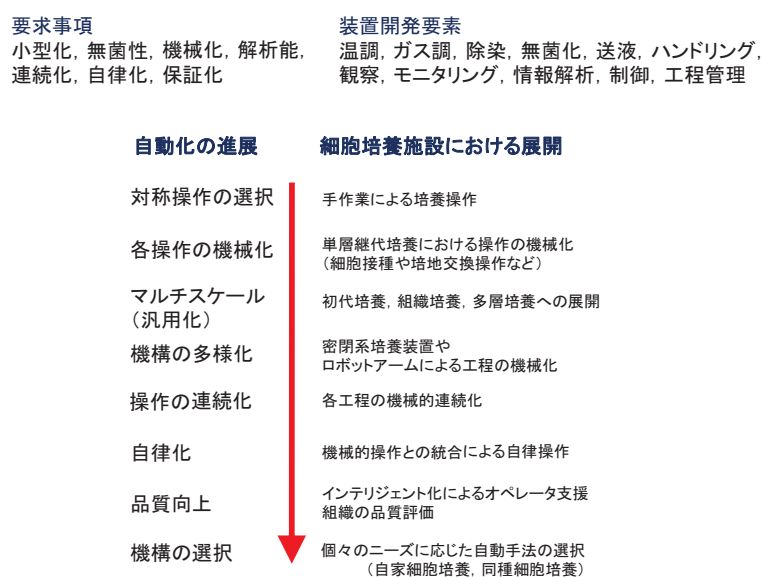


図 2.4-6 培養装置の要求事項、開発要素ならびに自動化の進展過程

いては、雑菌汚染に対するリスク軽減およびコストの観点から 1,000 L までの生産スケールではディスプレイ化が必要であることや無菌操作の簡略化が要求されてきた(4,5)。これまで、国内外において自動的に培養操作を実施できる装置は、種々提案されている。国内においては、iPS 細胞または ES 細胞のための培養装置は構築されていないが、図 2.4-7 に示すように、種々の細胞を用いて、細胞播種、培地交換等の操作について機械的自動化がなされ(6,7)、培養スケールも多岐にわたっている(ハードの構築)。また、自動的な培養操作の環境を実現する小型 CPC などの周辺技術(8)についても開発されてきた。さらに、培養状態の把握は不可欠で、情報取得方法について検討されており、細胞観察が、非襲撃で、経時的に取得可能であることから、有望な手段であると考えられている。現在では、本機能を付加した培養装置にて、継代培養の連続化が達成されている(6)。臨床研究には、三洋電機の筐体密閉型培養装置と高木産業での容器密閉型培養装置のみであるが、他のいずれの装置においても今後臨床研究への展開が期待できる。

一方、海外における研究動向であるが、Thomas ら(9)は、英国 TAP 社(The Automation Partnership)との共同研究にて、ロボットアームを有する筐体密閉型培養装置にて間葉系幹細胞の継代培養に成功しており、今後、ES 細胞や iPS 細胞にも展開できるものと考えられる。また、Aastrom 社においては、容器密閉型培養装置にて、装置培養を伴った臨床研究を進めており、骨の再生では現在 Clinical Phase III となっている(10)。ES 細胞に特化した培養装置では、Terstegge ら(11)が筐体密閉型培養装置を開発し、手作業による培養と同等に安定培養できることを示している。

2.4.1.2.4 おわりに

培養組織の品質を評価するための細胞診断は、一般的には、襲撃的、破壊的な手法に依存している。培養組織の生産工程においては、評価のために原料である細胞を消費することは、生産原理および原料の希少性から避ける必要がある。したがって、培養中細胞接触することなく検査を行うか、一時的な検査の後再び原料としての使用を

筐体密閉型培養装置

企業	三洋電機	澁谷工業	川崎重工業	CellSeed
商標	セルフプロセスングアイソレータ	AIST	Auto culture	CSAX-II
特長	無菌操作環境の設置 装置のモジュール化	無菌操作環境の設置 ハーフスーツ方式	ロボットアーム	シート積層の自動化
培養目的	限定せず	限定せず	限定せず	シート積層
自動操作	O, St	St	Se, I, M, P, H, C, O, R, D, St	I, Ta
装置	Pb, In, Ce, Mi	Pb, In, Ce, Mi	Pb, Pa, Ra, In, Ce, Mi, Re	In

容器密閉型培養装置

企業	メディネット	日立	ツーセル	高木産業
商標	-	-	ゆりかご	PURPOSE Bio Processor
特長	自動スケールアップ バック培養	細胞シート製造	小型化	圧力負荷およびかん流培養
培養目的	浮遊(懸濁)培養	シート組織培養	継代培養	Tissue culture for ECM formation
自動操作	I, M, H, O, D, St	Se, I, M, Ma, O	I, M, P, H, O	I, M, Ms
装置	In, Mi, Re,	Pb, Ra, In, Mp, Ce, Mi, Re	In, Mp, Mi, Re	Pa, In

略号、自動操作: Se; 接種, I; インキュベーション, M; 培地交換または添加, P; 継代(培養容器間輸送), H; 細胞採取, C; 遠心分離, Ma; 培地分析によるモニタリング, O; 観察によるモニタリング, Ta; 組織構築, Ms; 機械的刺激, R; 報告, D; 意志決定(スケジュール, 操作予測), St; 無菌化(熱, エタノール, 過酸化水素). 装置: Pb; パスボックス, Pa; 圧力負荷装置, Ra; ロボットアーム, In; インキュベータ, Mp; 培地調整, Ce; 遠心分離, Mi; 顕微鏡, Re; 冷蔵冷凍庫. LAF; クリーンベンチ.

図 2. 4-7 日本企業における培養装置の現状

可能とするような、細胞を再利用できる細胞診断システムが不可欠である。また、多くの培養は、比較的少量（100 cm³まで）で行われ、複数ラインでの培養が要求されるため、いわば少量多品種での生産様式がとられる。その結果、培養容器としては、小型、単純でかつディスポーサブルなものが多い。しかし、いかなる単純な容器での培養においても、細胞を取り巻く環境を厳密に制御しつつモニタリングを行うことが必要となり、非襲撃かつ非破壊のセンシングツールの開発が望まれている。

今後の課題として、取得した情報による培地交換時期や継代時期などを決定できるシステムの構築（ソフトの構築）による自律操作が可能となるシステムの開発が重要となる。これらの技術は、CPCにおけるオペレータの判断支持（負担軽減）、培養操作の無人化によるコストダウン、培養工程の安定化だけではなく、多種の細胞培養系への展開も期待できる。さらに、将来的には、培養工程時の定量的品質評価への展開が期待できる。

引用文献

1. Skottman, H., Dilber, M. S., and Hovatta, O.: The derivation of clinical-grade human embryonic stem cell lines, *FEBS Lett.*, 580, 2875–2878 (2006).
2. Hentze, H., Graichen, R., and Colman, A.: Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts, *Trends Biotechnol.*, 25, 24-32 (2007).
3. Veraitch, F.S., Scott, R., Wong, J.-W., Lye, G. J., and Mason, C.: The impact of manual processing on the expansion and directed differentiation of embryonic stem cells, *Biotechnol. Bioeng.*, 99, 1216-1229 (2008).
4. Archer, R. and Williams, D. J.: Why tissue engineering needs process engineering. *Nature Biotechnol.*, 23, 1353-1355 (2005).
5. Mason, C. and Hoare, M.: Regenerative medicine bioprocessing: building a conceptual framework based on early studies. *Tissue Eng.*, 13, 301-311 (2007).
6. Kino-oka, M., Ogawa, N, Umegaki, R., and Taya, M.: Bioreactor design for successive culture of anchorage-dependent cells operated in an automated manner. *Tissue Eng.*, 11, 535-545 (2005).
7. Kino-oka M., and Prenosil J.E.: Growth of human keratinocytes on hydrophilic film support and application to bioreactor culture. *J. Chem. Eng. Japan*, 31, 856-859 (1998).
8. 山崎晶夫,中尾敦,佐々木審,平井克也,山本宏他 : 三洋電機グループ技術特集、37、123-133 (2005)
9. Thomas, R.J., Chandra, A., Liu, Y., Hourd, P.C., Conway, P.P., and Williams, D. J.: Manufacture of a human mesenchymal stem cell population using an automated cell culture platform. *Cytotechnol.*, 55, 31-39 (2007).
10. Goltry, K. L., Rowley, J. A., Martin, C. P., and Burchardt, E. R.: Tissue repair cells for the treatment of cardiovascular diseases. *Adv. Mol. Med.*, 3, 5-13 (2007).
11. Terstegge, S., Laufenberg, I., Pochert, J., Schenk, S., Itskovitz-Eldor, J., Endl, E., and Brüstle, O.: Automated maintenance of embryonic stem cell cultures, *Biotechnol. Bioeng.*, 96, 195–201 (2007).

2.4.2 iPS 細胞の培養に関わるマイクロリアクター技術

2.4.2.1 はじめに

本調査研究全体の目標が、産業利用の為の iPS 細胞の培養であるので、本項目においてまずは、a) iPS 細胞の未分化状態を維持しながら培養するためのマイクロリアクター技術の可能性を検討し、b) 付随的に分化誘導を目的としたデバイスや、c) 分化誘導後の細胞の解析を目的としたデバイスについてもその可能性を検討する。iPS 細胞の培養装置はほとんど研究例が無いので、性質の似た ES 細胞や、その集塊(EB: embryoid body)の培養技術についての文献調査などを行い、培養装置や関連技術の現状と問題点を明らかにしたいと考えている。

2.4.2.2 検査用細胞の培養

iPS 細胞の培養後の利用目的として、創薬スクリーニング試験、安全性試験（食品・環境）、ヒトおよび実験動物代替、基礎研究ツール、等の一般試験的な用途を想定した場合には、以下の要件を満たす細胞の供給が必要と考えられる。

増殖能：未分化な細胞を、高い増殖能を保持した状態で細胞を増やすことが望ましい。

分化能：培養条件を変えることにより、高い効率で再現性良く様々な細胞や組織に分化誘導できることが望ましい。

安全性：ヒトに感染性の病原体などを持たないことが必要である。一般には遺伝子の変異や、染色体の異常などを持たない正常細胞であること。一方、疾患遺伝子に関わる変異等を持つ細胞のレパトリーが多種類揃えられれば、検査目的にはむしろ好都合な場合もある。

安定性：継代により細胞の分裂増殖能が減弱したり染色体異常が起きないことが望ましい。

腫瘍形成能：細胞の利用目的により、腫瘍形成能が無いほうが望ましい場合もあり、ある方が望ましい場合もある。

HLA 型：研究目的にもよるが、基本的には移植細胞の生着／拒絶を決める HLA 型の一致についての考慮は不要である。

2.4.2.3 移植用細胞の培養

iPS 細胞の培養後の利用目的として、細胞移植治療や組織工学における利用、等の臨床的治療上の用途を想定した場合には、以下の要件を満たす細胞の供給が必要と考えられる。（前記、2.4.2.2 の場合とは大きく異なることに注意。）

増殖能：分化誘導に用いる細胞の供給源としては未分化な細胞を、高い増殖能を保持した状態で細胞を増やすことが望ましい。細胞移植で体内に移植する場合には、多くの場合特定の細胞種に分化誘導後に移植することが想定される。

分化能：培養条件を変えることにより、高い効率で再現性良く様々な細胞や組織に分化誘導できることが望ましいが、特定の細胞種に分化誘導後に細胞移植する場合には、未分化なまま残存する細胞を腫瘍形成のリスク低減の為に除去する必要が生じることもある。従って、細胞の分化能の維持も、未分化状態を保つ残存細胞の除去も、共に必要な技術である。

安全性：ヒトに感染性の病原体などを持たないこと、遺伝子の変異や、染色体の異常などを持たない正常細胞であることが絶対に必要である。

安定性：継代により細胞の分裂増殖能が減弱しないことが望ましく、染色体異常が起きないことが必要である。

腫瘍形成能：主には、特定の細胞種に分化誘導後に移植に用いられることが想定されるが、移植後に体内で腫瘍形成する危険性を徹底的に否定する必要がある。

HLA 型：移植した細胞が生着して正常に機能するためには HLA 型の一致が必要である。もし不一致の場合には、移植した細胞が拒絶・死滅したり、あるいは移植片対宿主病 (GVHD: graft-versus host disease) を引き起こす危険性が高い。このため、患者自身の細胞を用いて iPS 細胞を作るオーダーメイドでの自己細胞樹立・培養方式と、多種類の同種 iPS 細胞のバンキングによる HLA 型一致を目指す方式、の 2 つを想定できる。将来的にはオーダーメイドが望ましいものの、現状では、臨床応用に関わる各種の規制ルール（法規・申請手続き等）とコストを考慮すると後者の方がより現実的と考えられる。

2.4.2.4 均一系での（準）大量培養（三次元リアクター等）

マウスおよびヒトの ES 細胞については、すでに様々な研究例が報告されている。例えば、回転羽式のバイオリアクターなどを用いた細胞集塊の懸濁攪拌培養の試み (1)、細胞の接着足場となる微粒子担体（マイクロキャリア）を用いた攪拌培養 (2)、等であり、総説にも纏められている (3)。

H. Thomson 等は ES 細胞の培養方法についての総説の中で、以下の様な培養方法の分類を行っている (3)。

- Manual culture（手動の手技による培養）
- Automated tissue culture platform（培養の自動化）
- Suspension bioreactor microcarrier cultivation（マイクロキャリアを用いた懸濁培養）
- Suspension bioreactor embryoid body cultivation（胚様体(EB)を用いた懸濁培養）
- Perfusion bioreactor（灌流培養系）

細胞集塊を用いた懸濁培養の系は、ハイブリッド型のバイオ人工肝臓に用いられる肝実質細胞（hepatocyte）の球状細胞集塊（spheroid）の培養が生体内に近い生理状態を再現した培養方法として比較的詳しく研究されてきたが (4, 5)、その他の細胞種では大量培養や自動化技術など、培養工学的な研究が全体として少ない。ES 細胞、神経幹細胞 (6) など、細胞集塊を形成する性質があり細胞移植治療による再生医療や実験動物代替系において重要な細胞を供給する方法については、もっと培養工学的な研究を進めることが必要のように思われる。

また、ES 細胞や iPS 細胞ではないが、LIF 存在下で浮遊培養すると細胞集塊を形成して増殖することが知られているものに、神経幹細胞があるが、神経幹細胞の集塊（neurosphere）については、最近の研究から内部の細胞が一箇所に留まっているのではなく活発に運動しており、このために集塊の中心部でも細胞の壊死が起りにくくなっている可能性が示唆されている (7,8)。細胞集塊中での各細胞の運動性は、細胞集

塊を対象とした培養技術やリアクターでは酸素や栄養分の供給の可否に関わる問題なので、未分化状態の ES 細胞や iPS 細胞でも同様の運動性が保たれているか否かという点にも興味を持たれる。

2.4.2.5 不均一系での少量培養（細胞アレイ等）

ES 細胞や iPS 細胞を用いたマイクロデバイスを考えるとき、培養して細胞量を増やしたり細胞の選別を行うためのマイクロ流路デバイスと、細胞の生理的状态の網羅的な解析ツールとしての細胞アレイは、互いに深く関連があるとは言えるものの、ひとまず別の技術分野と考えられる。これまでに手動の培養技法に関して知られている知見を基に考える限りにおいて、細胞をバラバラにして、播種・接着したのでは、ES 細胞や iPS 細胞未分化状態を維持するのが困難であるかもしれない。また単一細胞を接着培養系で用いるのであれば、用いられる要素技術は通常の分化した体細胞を用いた細胞アレイとあまり変わらないとも考えられる。

単一細胞を用いた細胞アレイに関しては、細胞の解析を目的としたアレイ(9)や、細胞への遺伝子の導入や発現抑制を目的としたアレイなど(10)、様々なものが開発されている。また、細胞集塊のアレイを作成した報告例もある(11)。すでに多くの総説や概説書がでているので、ここでは ES 細胞や iPS 細胞の培養を考えるにあたり重要と考えられる細胞集塊のアレイ技術に限定して以下に若干の考察を試みてみたい。

まずは、未分化状態の細胞集塊を並べた細胞集塊 array の様なものが考えられる。すぐに想定されるのは分化誘導物質などの生理活性を持つ薬剤を培地に添加するなどしてスクリーニング可能とするような細胞アレイである。R. Langer 等は、極めて多種類の合成高分子を微量合成・固定化した基板上にヒト ES 細胞を培養して、細胞接着基板となる高分子の細胞への影響を網羅的に調べる細胞アレイを提案している(12)。

これまで一般に細胞の生理的状态の網羅的な解析を行う場合には、分化段階に応じて発現が変化する各遺伝子の発現を調節する「指揮棒」の様な役割を演じている転写因子などの発現パターン解析を行ったり、細胞表面の分化抗原(CD 抗原)の発現パターンなどが良く調べられてきた。前者は蛍光蛋白質の発現系等を利用した蛍光顕微鏡観察、後者はこれに加えて流路に流した細胞を解析するフローサイトメトリー技術を用いた FACS(fluorescent activated cell-sorting)法、もしくは固体基板上に接着させた細胞を用いた LSC (laser scanning cytometry)という既存の解析手法を用いてこれまでに蓄積された膨大な実験データと対照できるので、特に広く用いられてきたわけである。

細胞アレイという技術の性質上、最も判り易い評価基準は光学顕微鏡観察下での細胞の形態(外形)の変化であるので、転写因子や細胞の表面抗原と共に、細胞形態を直接に支配する細胞骨格の種類(特に、ネスチン、ビメンチン、ケラチン、ニューロフィラメント等)の中間形フィラメントなどは、細胞の分化段階に依存してタイプが変わるものが多い、(13,14)と配列状態の変化を調べることも重要と思われる。

単一細胞の培養は、計数、形態観察、発現蛋白質や遺伝子の解析とも比較的容易であるが、細胞集塊の場合にはどれも技術的に困難になる。

細胞やその集塊を固定したり閉じ込めるには、基板に接着させる、電界紡糸した高分子の繊維やコラーゲン線維のような細繊維に接着させる、ハイドロゲルに包埋する、マイクロデバイス加工により作成した微小空間に閉じ込める、等の方法が想定される。

また、単一細胞でもなく、大きな細胞集塊でもない、数個～数十個のレベルでの培養にも細胞間相互作用の解析ツールとしてそれなりの意味はあるかもしれない。アレイを作成しても大きな細胞集塊の状態では、一つ一つの構成細胞を追跡してその形態変化を評価することは困難である。一方、単一細胞の培養系では、Cadherin 類や Notch/Delta の様に細胞間相互の直接接触を介する情報伝達系の影響を評価できない欠点がある。

2.4.2.6 マイクロリアクター（小型化・集積化）を用いることの利点と難点

マイクロリアクターに限定すると、ES 細胞の培養技術に関わるこれまでの研究例は多くないようである（15, 16, 17）。これは、ES 細胞が再生医学への利用が期待される重要性の高い細胞種でありながら、培養において細胞集塊を作ったり、feeder layer を必要とする場合が多いなど、取り扱いに注意を要する細胞であることと、ヒト由来の ES 細胞については、初期胚に由来するという倫理的な問題をクリアーして実験試料としてアクセスできる研究者がこれまで比較的限られてきたことなどの原因によると思われる。

既存の研究例を見る限り、ES 細胞に対照を絞って、その培養方法や分化誘導方法にマイクロリアクターやマイクロデバイス技術を用いることを本格的にテーマ研究したというよりも、これらのデバイスを作成した際に、使用対象となる細胞種の一例として ES 細胞にも適用してみたという様な印象を受けるものが多い。

ここで、ES 細胞や iPS 細胞にマイクロリアクターを用いることの利点や欠点について考えてみたい。未分化な状態を維持した iPS 細胞を大量に得ることだけを目的として考えると、通常のバイオリアクターの方が効率が良いと思われ、大きな 3 次元培養においては、特にマイクロリアクターを用いる必要性は無いように思われる。但し、iPS 細胞に生体物質を生産させるのではなく、各種試験用の iPS 細胞自体の供給を目的とするのであれば、大量といっても必要な量には限度がある。

細胞集塊が大きくなると、酸素や培地の供給不足や老廃物の蓄積により内部が壊死する可能性がある。その点では、（デバイス内部（流路や反応槽）の表面積）／（溶液容量）の比が大きなマイクロリアクターの方が、培地中の成分の交換効率が良く培養に適するという可能性も考えられる。また、細胞の生理状態の制御方法として、培地への薬剤の添加など 3 次元空間での培養系での溶液成分変化による制御よりも、細胞接着の足場となる 2 次元固体平面（固体／液体界面）による制御を重視するという視点で研究を行うような場合には、マイクロリアクター技術の優位性が認められる。

大型の細胞培養リアクターについては、流路を流れたり反応器や貯留槽における溶液の攪拌や流体抵抗などについてのパラメーターが、従来の化学工学的な方法論に基づいて流体力学的に計算される。マイクロリアクターやマイクロデバイスでは、流路内での層流の発生、粘性抵抗、界面張力の考慮など、サイズが小さい事に依存して現れる特徴的な現象にも考慮する必要がある可能性がある。

単一細胞を用いたマイクロリアクターでは、細胞のサイズが比較的揃っており、フローサイトメトリーなど既存の分析技術や製品に関連した技術の蓄積もあるので、比較的設計が行い易いと考えられる。これに対して不均一、不定型の細胞集塊を用いる場合には、流路に細胞を流したり、分離するとき目詰まりを起こさない工夫が必要

となる。

マイクロリアクターやマイクロデバイス技術の利用可能な形態の一つに、カセット化が上げられる。通常、細胞は培養を行う機関（細胞供給機関）で培養フラスコ内で培養され、フラスコのまま、もしくはプラスチックチューブなどに入れて必要な場所（細胞利用機関）に輸送されることが多い。カセット式で培養装置本体から脱着可能なマイクロリアクターを作れば、培養した細胞の輸送については、従来の手動培養、もしくは大型バイオリアクターによる細胞の培養後の回収、包装、輸送、の手間と技術的問題点が軽減できる可能性もある。

2.4.2.7 「feeder layer 無しの培養系の発達」はどの程度の可能性か？

マイクロリアクターでの ES 細胞や iPS 細胞の培養を考える際に、feeder layer を必要とするのかどうかにより技術の難易度が大きく異なる。細胞の増殖、未分化状態の維持、だけでなく、安全性、均一性、などを考慮する必要もあるので2種類の細胞を用いるとより複雑な実験系となる。また、マウス胎児繊維芽細胞(MEF: mouse embryonic fibroblast)などを feeder layer として用いる場合には、それ自体が非株化細胞のため、品質が一定しない可能性もあるので、工学的な立場からは、もし可能であれば、feeder layer を用いない培養系を用いることが望ましい。しかし、マウスなどで feeder layer を用いない培養法研究されているが、ヒト iPS 細胞においては、現状では確かな培養方法が確立しているとは言えないように思われる。

マイクロリアクターのみに関わらず、ES 細胞や iPS 細胞の培養技術と品質管理技術全般について言えることではあるが、「feeder layer 代替法」、もしくは、細胞を使うとしても「均質・安定で汎用性のある良い feeder layer」が確立できれば、それ自体が大変にインパクトのある新技术である。

2.4.2.8 マイクロリアクターの構成要素

ここで、本報告書の対象読者には関連分野以外の読者も含まれることを考慮し、マイクロリアクターの基本的な構成要素について概略を述べたい。マイクロリアクターやマイクロ流路デバイスと呼ばれる装置は、微小で自己完結的な化学反応システムであり、化学実験室を1つのチップ上に乗せたという例えによる表現として、しばしば Lab on a Chip という用語も用いられる (18)。

マイクロリアクターを構成する部品としては、1) 反応溶液の流路、2) 原料や生成物の貯蔵庫、3) 送液用のポンプ、4) 化学反応の場である反応器（リアクター）本体、5) 送液を調節したり逆流を防ぐ弁（または栓）、6) 溶液を混ぜる混合器（ミキサー）、7) 溶液や溶液中の成分または微粒子を分取する分離器、8) 液滴を吐出させる液滴ディスペンサー、9) 溶液中の微粒子（細胞を含む）を一次固定する補足器や、移動させる装置（または補足・移動の原理）、10) 検出器(センサー)、等がある。すなわち、極めて小型であるとはいえ化学工学的な反応制御系と測定系の全てを一通り備えていることになる。それでは、マクロなサイズのリアクターをそのまま相似形に小型化すれば機能するかというと、必ずしもそうではなくサイズに応じて適した作動原理や構築技術がある。マイクロリアクターの作成においては、流体力学、個体／液体界面での物質吸着現象、気体／液体界面での表面張力、電極表面で起きる電気化学反応、等の様々な

特性を考慮しながら、様々な工夫がなされている。

上記の構成部品のうちで 1) 反応溶液の流路、2) 原料や生成物の貯蔵庫、等の加工に当たっては、マクロな機械の加工で多く用いられる機械切削加工ではなく、光リソグラフィーやエッチングなどマイクロマシンや電子デバイスなどの作成に用いられてきた方法が多く用いられる。また、5) 弁については、マクロな機械では電磁弁などが多く用いられるのに対して、ハイドロゲルやキャピラリーを用いた弁などが用いられる場合もある。3) ポンプも、モーター式のポンプの他に、電気浸透流ポンプなどが用いられる。

マイクロ流路内では層流と呼ばれる流れが起きるため、乱流が起こらずに異なる溶液が混合しにくい場合があるので、しばしば混合器（ミキサー）が用いられる。流路の中に一定容積の液滴を放出する 8) ディスペンサーや、これらの液滴または微粒子等を、流路の途中で一次補足する 9) 補足器などは、定量的な反応を再現性良く進めるために必要なものであるが、マクロな機械には見当たらずマイクロデバイスに特徴的なデバイスであると言えよう。

細胞培養を目的としたリアクターの場合、最後の 10) 検出器(センサー)については、既存のバイオセンサー技術等が利用できると考えられるが、測定の方法や目的により分類すると、a) 細胞の分取・破壊を伴う生物化学的なセンサー(19)と、b) 非破壊・低侵襲型のセンサーの 2 種類に大別できる。

前者は蛋白質の分析に用いられる電気泳動法、質量分析、遺伝子 DNA や RNA の分析に用いられる hybridization 法、PCR 法などを利用する場合が多く、後者は光学顕微鏡観察と画像処理技術を組み合わせた測定、分光学的測定（吸光度・蛍光・発光・屈折率）、溶液中の成分の局所測定、溶液中成分の粘弾性測定、などが該当する。この局所測定の対象は、栄養分（グルコース、アミノ酸など）、酸素濃度（20）、老廃物濃度（乳酸、アンモニア等）、蛋白質成分の免疫化学的測定（抗体センサー）などである。

一方、検出器をその測定原理により分類すると、各種の電極（anode, cathode による電流、電圧、抵抗、誘電率、等の測定）、光電子増倍管、光ダイオード、水晶振動子（QCM）、表面プラズモン共鳴（SPR）、イオン選択性電界効果トランジスタ（ISFET）、など従来のバイセンサーやバイオチップに用いられてきたものがほぼ全て包含される。これらの主として電気化学的な検出器による検出を画像処理と組み合わせる場合もある（21）。

2.4.2.9 検討すべき要素技術の項目

本項目では、ES 細胞や iPS 細胞の培養に用いるマイクロリアクターを作ること想定した場合、どのような要件が必要とされ则认为られるかを考察してみることにする。

リアクターの設計：どのような目的で培養用のマイクロリアクターを作るのかにより、その設計は全く異なる。概ね、試験用の未分化状態の iPS 細胞を供給することを目的として、細胞集塊状態で基板に接着培養し、ある程度大きくなった段階で集塊を分離して再播種・継代できるような基本設計とすることが想定される。

また、リアクターの「カセット化」を行い、培養機関で一定期間培養した後に、デバイスごと細胞利用機関に輸送することを想定するのであれば、基本的には一回限りの使用（disposable use）と考えて長期間の連続運転や反復使用を想定しない設計とす

ることも可能である。

リアクターに適した材料の選択：既存のマイクロ加工に適した高分子素材（PDMS、その他）を用いる。また、細胞の接着性を制御するために、コラーゲンやフィブロネクチン等の細胞外マトリクス（ECM: extra cellular matrix）成分を被覆または固定化する必要が生じる可能性が高い。

リアクターの加工・作成技術：基本的には既存のマイクロ加工技術を用いて、平板または薄膜状の材料表面上に凹凸上の加工を施し、これを積層することで3次元的な流路を構築する。

リアクターの滅菌・無菌管理：デバイス自体の滅菌方法には、加熱、薬剤洗浄、ガス(EOG: ethyleneoxide gas)、放射線（ γ 線、電子線、紫外線）等の方法があるが、材料の劣化が起きなければ、残留物が出ない加熱もしくは放射線滅菌が安全性の面からは最も望ましい。放射線の到達度には違いがあり、殺菌用の紫外線は基本的には表面しか滅菌できない場合が多い。 γ 線(γ -ray)がもっとも材料内部への浸透性が高いが、数センチ以内の厚さしかもたないマイクロリアクターのデバイスでは電子線(EB: electron beam)でも充分であると考えられる。

酸素・栄養分の供給：マイクロリアクターではマクロなリアクターの場合よりも流路内の溶媒の溶積／表面積の比率が小さくなるので、培地成分の交換は効率よく行える可能性が高い。栄養分や酸素については、細胞の生理状態にとって最も重要な因子であるので、培地成分の濃度変化をセンサーで逐次モニターしながら、デバイス内の流路や透過性膜表面を通して恒常的に供給される必要がある。

老廃物の除去：培地成分の交換については、溶積／表面積の比率は前項目と同様である。但し、先述の **disposable use** のカセットを作る場合には、老廃物を恒常的にデバイス系外に排出しなくても吸着剤を入れておいて培地中から除く方法も可能と思われる。

細胞の播種：細胞集塊の播種操作は、最も自動化が困難な段階であり、手動によらざるを得ない可能性が高い。培養の操作の中で、播種の次にくるのは、基板への細胞接着の確認であり、両者は関係が深い。また、細胞をマイクロ流路内の特定の場所に移動させて、接着させるためには、細胞の自立的な接着能のみに頼ることが出来るかどうかは、判らない。必要に応じて細胞集塊の補足や移動を制御する必要が生じる場合もあるので、先述要素技術の項目で論じたの 3) ポンプや 9) 補足器などデバイスを用いることになる。

細胞の脱離および回収方法（protease 処理 v.s. NIPPAM、その他）：接着、増殖した細胞を基板から剥がす脱理操作は、播種と同じく自動化の困難な段階である。一般的な蛋白質分解酵素処理による細胞の脱離方法以外に、NIPPAM 等の温度感受性高分子、もしくはその他の原理（collagen/collagenase、cellulose/cellulase、calcium alginate/EDTA、等）を用いた細胞シートの層状剥離、等の方法が考えられる。NIPPAM を用いた細胞シートの剥離技術は、様々なマイクロデバイスにも応用されている（22）。

単一の細胞ではなく、単層状態の細胞層でもなく、iPS 細胞の様な細胞の三次元集塊を扱うとなると、基盤との接着面の面積も様々であり、細胞接着に関与している ECM の種類も様々であると予想されるので一律に再現性高く制御するのは大変であろうと予想される。

NIPPAM 利用の温度感受性培養皿を用いたマクロなサイズの自動化培養・積層装置を用いた例として、単層培養状態 (confluent) の細胞層を培養皿表面から剥離して固体基板上に付けて移動させ、積層したとの報告がある(23)。

細胞のシート化技術に関しては、繊維芽細胞 (fibroblast) のシートを作成してから浮遊培養系に移すことで、効率よく細胞集塊 (spheroid) 形成を行った例があるので(24)、別の見方をすると ES 細胞や iPS 細胞に関してもデバイス内の一定の面積に接着させて剥離することで、サイズの揃った集塊を再現性良く作成する事に利用できる可能性もある。

流路内の基板表面の制御：蛋白質の吸着と、細胞の接着について：材料表面への蛋白質の吸着挙動と、その制御方法は、生体材料 (biomaterial) 学の長年のテーマであり、これまでに多くの知見が蓄積されている。一般に多くの培養細胞は疎水性の固体表面に比較的接着し易く、親水性表面には接着しにくい場合が多いが、これは ECM の吸着能の違いによるものと思われる。

マイクロリアクターやマイクロデバイスにおいては、電極を用いて材料表面の電荷などがある程度変化させることが可能である。このため固体表面への蛋白質の吸着状態を改変たり、ひいては細胞の接着にも変化を与えることができる可能性が高い。また、体積変化を伴うマイクロメカニカルデバイスを流路内に装着すれば、細胞に対して物理的な刺激を与えたり、細胞の粘弾性を評価できるデバイスを作ることも可能であるかもしれない。

細胞の粘弾性や電気的特性は、局所的な溶存酸素濃度などと併にその生理状態を反映したパラメーターとして非侵襲的に測定できるものである。しかしながら、工学的な細胞の理解と細胞生物学的な理解の間には未だ距離があるように感じられる。培養細胞への薬剤の影響評価系が遺伝子や蛋白質の発現のレベルで詳しく調べられ、解釈されているのに比べると、培養状態の細胞が持つこれらの物理的パラメーターの変化と、教科書に詳述された ECM・細胞接着因子・細胞骨格・情報伝達系・遺伝子発現調節、という基本スキームとの対応がきちんと付けられていない場合が多いようである。このあたりは、今後の研究開発で期待される領域の一つである。

細胞の観察・測定 (feeder layer/iPS 細胞の識別技術を含む)：先述の「不均一系での少量培養」、および「マイクロリアクターの構成要素」の項で記述したことと重なる部分が多いので詳細については、省略する。マイクロリアクター内の細胞の観察・測定は、侵襲的方法と非侵襲的方法に大別され、それぞれ重要であるが、細胞の物理的特性についての測定と解釈は今後の課題である。

細胞の継代 (iPS：分離→小集塊化→再播種、feeder layer：分離→再播種)：この操作が、従来は実験者の勘と人手による操作に依存しており最も自動化の困難な段階であると考えられる。細胞の脱離技術については先述のとおり。細胞集塊を小さく分けて再播種すると、操作器 (manipulator) のようなものが必要かもしれない。

細胞の保存：細胞の保存は、本稿で議論すべき項目ではないのであるが、カセット化を考えると、マイクロリアクター自体にそのまま保存庫の機能を付ける必要が生じてくる可能性もある。保存庫の機能とは、例えばカセット自体を凍結保存可能な仕様にする、もしくはインキュベーターから外に出した状態でも数時間から数日間程度ならば常温で培地の状態 (O₂、CO₂、pH) をほぼ生理的な状態に保てる様な仕様にする、

などが必要な検討課題になる可能性もある。

その他：ナノテクノロジーの利用について：いわゆるナノテクノロジーと呼ばれる研究領域は、a)ナノ材料（ナノメートル単位で構造を制御した材料）、b)ナノ加工（超微細加工）、c)ナノ操作（1分子操作）、などの領域から成っている。これらの技術領域を各種の幹細胞の培養や分化制御に利用するアイデアは、すでに様々な研究者が考えているようである（25）。しかしながら、マイクロリアクターを用いたES細胞や、iPSの培養について考えると、今後解決しなければならない技術的問題点の多くは、cm以下 μm 以上のスケールでの課題である場合が多い。敢えて言えば、ナノテクノロジーの3つの分野の中でa)およびb)はマイクロリアクターを構築する上での材料の表面加工や分子認識機能の付与に係る領域であり、一方c)はリアクターの構築ではなく培養後の細胞の評価系としては新規な応用が可能になる想定される。

- 1) Magnus Schroeder, Sylvia Niebruegge, Andreas Werner, Elmar Willbold, Monika Burg, Manfred Ruediger, Loren J. Field, Juergen Lehman, Robert Zweigerdt, Differentiation and lineage selection of mouse embryonic stem cells in a stirred bench scale bioreactor with automated process control, (2005) *Biotechnology and Bioengineering*, 92(7), 920-933.
- 2) A.M. Fernandes, T.G. Fernandes, M.M. Diogo, C. Lobato da Silva, D. Henrique, J.M.S. Cabral, Mouse embryonic stem cell expansion in a microcarrier-based stirred culture system (2007) *Journal of Biotechnology*, 132, 227-236.
- 3) Hazel Thomson, Bioprocessing of embryonic stem cells for drug discovery, *Trends in Biotechnology*, (2007) 25(5), 224-230. (総説)
- 4) Scott L. Nyberg, Joseph Hardin, Bruce Amiot, Upendra A. Argikar, Rory P. Remmel, Piero Rinaldo, Rapid, Large-Scale Formation of Porcine Hepatocyte Spheroids in a Novel Spheroid Reservoir Bioartificial Liver, (2005) *Liver Transplantation*, 11(8) 901-910.
- 5) Hiroyuki Ijima, Kohji Nakazawa, Mitsuru Kaneko, Junji Fukuda, Mitsuo Shimada, Yo-ichi Yamashita, Tomonobu Gion, Ken Shirabe, Keizo Sugimachi, Kazumori Funatsu, Development of a hybrid artificial liver support system and preclinical animal experiments, (2000) *J Artif Organs*, 3, 112-116.
- 6) Sharmila Alam, Arindom Sen, Leo A. Behie, Michael S. Kallos, Cell cycle kinetics of expanding populations of neural stem and progenitor cells in vitro, (2004) *Biotechnology and Bioengineering*, 88(3), 332-347.
- 7) H. Mori, T. Fujitani, Y. Kanemura, M. Kino-oka, M. Taya, Observational examination of aggregation and migration during early phase of neurosphere culture of mouse neural stem cells, (2007) *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104 (3), 231-234
- 8) H. Mori, K. Ninomiya, M. Kino-oka, T. Shofuda, M.O. Islam, M. Yamasaki, H. Okano, M. Taya, Y. Kanemura, Effect of neurosphere size on the growth rate of human neural stem/progenitor cells, (2006) *Journal of Neuroscience Research*, 84(8), 1682-1691.
- 9) Yu-suke Torisawa, Hitoshi Shikua, Tomoyuki Yasukawa, Matsuhiko Nishizawa, Tomokazu Matsue, Multi-channel 3-D cell culture device integrated on a silicon chip for anticancer drug sensitivity test, (2005), *Biomaterials* 26, 2165-2172.

- 10) Tomohiro Yoshikawa, Eiichiro Uchimura, Michiko Kishia, Daniel P. Funeriu, Masato Miyake,, Jun Miyake, Transfection microarray of human mesenchymal stem cells and on-chip siRNA gene knockdown, (2004), *Journal of Controlled Release* 96, 227–232.
- 11) Yu-suke Torisawa, Airi Takagi, Yuji Nashimoto, Tomoyuki Yasukawa, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, A multicellular spheroid array to realize spheroid formation, culture, and viability assay on a chip, (2007), *Biomaterials* 28, 559–566.
- 12) Daniel G. Anderson, Shulamit Levenberg, Robert Langer, Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells, *Nature Biotechnology* (2004) 22(7), 863-866.
- 13) Robert D. Goldman, Boris Grin, Melissa G. Merdez, Edward R. Kuczmariski, Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure.
- 14) ルーイン「細胞生物学」(B. Lewin, 他、著、永田和宏、他、訳、東京化学同人、2008) IV-9 「中間径フィラメント」、p. 333-352.
- 15) Yusuke Torisawa, BOr-han Chueh, Dongeun Huh, Poornapriya Ramamurthy, Therese M. Roth, Kate F. Barald, Shinichi Takayama, Efficient formation of uniform-sized embryoid bodies using a compartmentalized microchannel device, (2007) *Lab on a Chip* 7, 770-776.
- 16) Natanel Korin, Avishay Bransky, Uri Dinnar, Shulamit Levenberg, Periodic “flow-stop” perfusion microchannel bioreactors for mammalian and human embryonic stem cell long-term culture (2008) *Biomedical Microdevices*, 10.1007/s10544-008-9212-5
- 17) Yi-Chung Tung, Yusuke Torisawa, Nobuyuki Futai, Shinichi Takayama, Small volume low mechanical stress cytometry using computer-controlled Braille display microfluidics (2007) *Lab on a Chip*, 7, 1497-1503.
- 18) バイオチップとバイオセンサー (高分子学会編、堀池靖浩、宮原祐二、著) 2006年、共立出版
- 19) Hitoshi Shiku, Takeshi Yamakawa, Yuji Nashimoto, Yasufumi Takahashi, Yu-suke Torisawa, Tomoyuki Yasukawa , Takahiro Ito-Sasaki, Masaki Yokoo, Hiroyuki Abe, Hideki Kambara, Tomokazu Matsue, A microfluidic dual capillary probe to collect messenger RNA from adherent cells and spheroids, (2009), *Analytical Biochemistry* 385, 138–142.
- 20) Ching-Chou Wu, Takeshi Saito, Tomoyuki Yasukawa, Hitoshi Shiku, Hiroyuki Abe, Hiroyoshi Hoshi, Tomokazu Matsue, Microfluidic chip integrated with amperometric detector array for in situ estimating oxygen consumption characteristics of single bovine embryos, (2007), *Sensors and Actuators B*, 125, 680–687.
- 21) Yasufumi Takahashi, Yu Hirano, Tomoyuki Yasukawa, Hitoshi Shiku, Hiroshi Yamada, Tomokazu Matsue, Topographic, electrochemical, and optical images captured using standing approach mode scanning electrochemical/optical microscopy, *Langmuir* (2006), 22, 10299-10306.
- 22) Yo Tanaka, Kae Sato, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Takehiko Kitamori, Biological cells on microchips: New technologies and applications, (2007) *Biosensors and Bioelectronics* 23, 449–458.

- 23) 「微細加工技術利用細胞組織製造プロジェクト」事後評価報告書（案）概要
(<http://www.nedo.go.jp/iinkai/kenkyuu/hyouka/18h/13/4-2-10.pdf>)
- 24) Takezawa T, Mori, Y, Yonaha T, Yoshizato K, Characterization of morphology and cellular metabolism during the spheroid formation by fibroblasts, (1993) Experimental Cell Research, 208(2) 430-441.
- 25) Lino Ferreira, Jefferey M. Karp, Luis Nobre, Robert Langer, New opportunities: the use of nanotechnologies to manipulate and track stem cells, (2008) Cell Stem Cell 3(7)136-146.(総説)

2.4.3 iPS 細胞の培養に関わる設備

2.4.3.1 はじめに

培養設備は iPS 細胞の作製から増殖、分化誘導に至るまで細菌汚染や異物混入を防ぎ、計画的に細胞を増殖、分化させる環境を構築するために重要な道具である。細胞の用途に応じた品質の確保や製造コスト・製造規模を考慮して設備設計をしなければならない。本稿では現在再生医療分野で用いられる細胞培養の設備および高い品質の確保が要求される医薬品製造の設備を中心に細胞培養設備の現状について述べる。

2.4.3.2 細胞の品質管理

ヒト iPS 細胞の用途は大別すると表 2. 4-1 に示すように①医薬品・医療機器（移植、静脈注射）②創薬支援（毒性試験、薬剤スクリーニング）③基礎研究の 3 つに分けられる。この細胞用途の違いにより細胞に要求される品質は異なる。①は薬事法により規制されており、②③は研究用途であるため自主管理である。

2.4.3.3 基本的な培養設備の構成

基本的な培養設備 (1) : iPS 細胞は概ね図 2. 4-8 のような製造プロセスで製造されると考えられる。本稿では培養設備に焦点をあてているので、最初の iPS 細胞作製プロセスに関する設備については省略する。細胞を培養するためには基本的な設備として、培養作業に要求される高い清浄度を維持するための安全キャビネット、細胞を適正な温度で培養するための CO₂ インキュベータ、細胞を回収するための遠心機、培養器具を滅菌するためのオートクレーブ、細胞を観察するための倒立顕微鏡、培養に関する試薬、材料を保管するための冷凍庫、冷蔵庫、保管庫、細胞を凍結保存するた

表 2. 4-1 用途による細胞の品質管理に必要な項目

	培養設備	クリーンルーム	無菌試験	マイコプラズマ検査	ウイルス検査	エンドトキシン検査	染色体検査	残留試験	力価試験	作業記録
医薬品・医療機器	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
研究	創薬、試験	○	△	○	○	△	—	△	—	△
	基礎研究	○	—	—	—	—	—	—	—	—

※○要求される、△場合によっては必要、—必須ではない

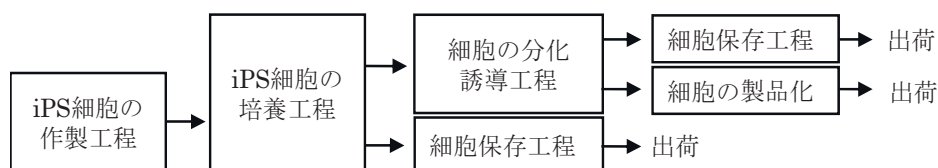


図2. 4-8 iPS細胞製品の製造・加工プロセス

めの液体窒素タンクや-150℃冷凍庫などが必要である。iPS細胞の培養も基本的にはこれらの設備で培養することができる。

細胞の品質を分析するための機器 (1)：細胞を製品として使用するためには、培養工程を経て増殖した iPS 細胞が作製時の性質を維持しているか否かを検査しなければならない。それには、iPS 細胞ができたか否かの判断方法と同様に iPS 細胞のマーカー遺伝子の発現を RT-PCR 法を用いて確認する必要がある。設備としては PCR 装置や電気泳動装置が必要である。また、実際に内、中、外の三胚葉系の細胞への分化能を確認するためには *in vitro* において胚様体 (Embryoid Body:EB) の形成を介した分化誘導実験や免疫不全動物への細胞移植実験を行う。分化誘導した標本や移植実験によって形成されたテラトーマと呼ばれる腫瘍の組織標本を組織化学的手法により染色を行い、三胚葉すべての細胞ができていないか否かを判別する。これらの解析を行うためには組織切片を作製するための凍結マイクロームなどの切片作製装置や蛍光抗体染色像を観察するための蛍光顕微鏡が必要である。

また、分化誘導後の細胞種の分析にはフローサイトメトリーが用いられることが多い。分化マーカーとなる抗原に対する蛍光標識抗体を用いて iPS 細胞から分化誘導した細胞を染色した後、フローサイトメーターと呼ばれる細胞個々の蛍光強度を測定できる機器を用いて分析する。

2.4.3.4 医薬品・医療機器のための培養設備

幹細胞の臨床研究、医薬品、医療機器製造に関する規制 (2,3)：薬事法では医薬品、医薬部外品、化粧品や医療用具の品質、有効性及び安全性を確保するために厚生労働省令の定める基準に適合した構造設備、製造管理方法、品質管理方法を定めている。これらの基準として医薬品および医薬部外品では「医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」(省令第179号：GMP省令)、医療機器や体外診断薬では「医療機器及び体外診断用医薬品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」(省令第169号：QMS省令)が定められている。また、近年再生医療製品開発の高まりを背景として「ヒト(自己)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保に関する指針」(薬食発第0208003号)、「ヒト(同種)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保に関する指針」(薬食発第0912006号)が策定された。製造所の設備を設計するためには「薬局等の構造設備規則」(厚生省令第2号)に記載されている基本的な設備要件だけでなく、先に挙げた省令や指針に準拠した構造設計を考える必要がある。iPS細胞から作製される製品の場合、製品の機能によって医薬品、医療機器の扱いは異なるが、再生医療製品の多くの場合

は医薬品と医療機器の両方の性質を有していると考えられるためにどちらの基準にも対応できることが望ましいと考えられる。

医薬品の製造所 (2): 医薬品の製造所とは実際に医薬品を製造している作業所だけではなく、品質管理施設や材料保管施設といった製造に関わる支援施設を含めた施設全体を指す。特に、研究では材料の保管や細胞の品質管理はあまり考慮されないが、医薬品や医療機器の場合は先に挙げたように省令や指針で品質や安全性の確保が示されており、加工する細胞だけでなく加工に利用される器材や薬品も厳密に管理されなければならない。また、細胞加工製品の最終製品だけでなく製造過程における中間製品や製造過程における環境検査など多くの検査を作業所と同一環境下で実施しなければならない。これらの要件を満たすためには、薬品や材料を保管する保管所や品質検査室を作業所と隣接する区域に設ける必要がある。ただし、これらの部屋は次に述べる空気清浄度区分に関する基準に準拠している必要がある。

無菌医薬品に関わる製品の作業所 (2,4): 無菌医薬品に関わる製品の作業所内では微粒子や微生物のコンタミネーションのリスクを低減するために、高い清浄度を維持する必要がある。そのためにクリーンルームと呼ばれる空気中の微粒子や微生物、温度、湿度、空気圧、気流を人為的に制御し、一定の基準に維持できる部屋が利用される。特に無菌医薬品に関わる製品の作業所内の清浄度の基準として作業区域のグレードに応じた浮遊微粒子および微生物による汚染の限度が明確に定められている。清浄度レベルを表 2. 4-2 に表す。

これらの清浄度区分は製品の無菌性保証に直接関わるために空調や内装区分や作業工程全般の運用区分（例：更衣区分、物の搬入・搬出等）と合わせて設備設計される。各区域の清浄度は定期的にモニタリングする必要があり、特に無菌操作区域内では作業時の微粒子数を測定するため作業区域内にパーティクルカウンターを設置する必要がある。

更に、無菌操作区域では微粒子量だけでなく環境中の浮遊菌量や落下菌量についても作業中を含め定期的に測定する必要がある。空中浮遊菌の測定にはエアサンプラーと呼ばれる一定容積の空気を捕集する装置を使用する。また、このように高い清浄度

表 2. 4-2 清浄区域と浮遊微粒子数

名称		空気清浄度 区分	許容浮遊微粒子数 (個/m ³) [粒径: 0.5 μm 以上]	
			非作業時	作業時
無菌操作区域	重要区域	グレード A	3,520	3,520
	直接支援区域	グレード B	3,520	352,000
その他の支援区域		グレード C	352,000	3,520,000
		グレード D	3,520,000	作業形態による

※ 「無菌製造法による無菌医薬品製造に関する指針」(平成 18 年 7 月 4 日厚生労働省事務連絡)

を保つためには作業後の清掃は必ず行わなければならない、拭取り清掃や HEPA フィルターを装備した発塵のない掃除機を用いて清掃する必要がある。

作業所内に異物混入のリスクだけでなく加工中の製品の採り間違いなどの人為的ミ

スが生じるリスクも有している。GMP ではこれらのリスクを低減するために作業室の進入経路と退出経路を別にする必要がある。また、材料の搬入、搬出経路と人の進入、退出経路も区別する必要がある。1 回の作業中に同一空間内で扱う製品は 1 製品とされており、インキュベータ内で複数の製品の培養を行う場合には製品ごとに明確な区画分けをし、バーコード管理等の採り違い防止策を講じる必要がある。

品質検査に必要な設備 (5-7)：適切な品質を維持するためには原材料から中間製品、最終製品にいたるまで品質検査を行う必要がある。「ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保に関する指針」には原材料や培地などの製造に関わる原料の無菌試験、ウイルスやマイコプラズマ否定試験、培養が長期間になる場合は作業工程中で無菌試験、最終製品の無菌試験及びマイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験、ウイルス否定試験、効能や力価試験、製造過程での残留、混入、生成、分解でできた不純物の試験、細胞の純度試験、同一性の確認試験を実施することが示されている。また、作業環境をモニタリングするための微生物試験も実施する必要がある。これらの試験を行うためには各試験法を実施できる設備を要する品質検査室が必要である。試験中での汚染をなくすために品質検査室も作業所と同じ清浄度である必要がある。

無菌試験には菌を培養するために 25～35℃を維持できるインキュベータや安全キャビネットが必要である。また、エンドトキシン試験には日本薬局方に記載されているゲル化法、比色法、比濁法に対応した機器、マイコプラズマ否定試験には日本薬局方に記載された PCR 法、蛍光染色法、培養法を実施できる PCR 装置や蛍光顕微鏡が必要である。ウイルス否定試験も PCR 法を用いて検出が可能である。最終製品の同一性の確認にも STR 法、VNTR 法といった PCR 装置やリアルタイム PCR 装置を用いることで対応できる。また、不純物の分析には高速液体クロマトグラフィーが必要である。

原材料、資材や製品の保管に必要な設備 (3)：最終的な製品だけでなく、製品の製造に関わった材料を保管する場所も厳密に区画分けをし、品質が劣化しないような環境で保たなければならない。また、管理規則第六条一項には製品、原料、中間製品は有効期間に 10 年間加えた期間保管することを義務づけている。このことから、細胞加工製品を保管するための液体窒素保管庫や超低温冷凍庫 (-180℃) や保存した製品や材料の取り間違い防止する装置が必要である。

医療用 iPS 細胞の製造に必要な構造設備：医療用 iPS 細胞の作製、培養、加工（分化誘導、製品化）を同一施設で行う場合とそれぞれ別施設で行う場合が考えられるが、多くの場合には同一施設内では培養と加工といった複数の製造工程を行うと考えられる。このことを考慮すれば製造工程ごとに iPS 細胞加工製品が作業室を移動するような設計にしたほうがよい。また、原料に使用する試薬が必ずしも滅菌されていないと考えられるので、清浄度を管理された原料を滅菌するための支援室を作業所とは別に設ける必要がある。その他に品質検査室、製品保管室、検査試料保管室、材料の清浄度に応じた資材保管室を設ける必要がある。iPS 細胞の作製から行うのであれば、ウイルスを用いて遺伝子組換えをする可能性があるため「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」に基づいた設計をする必要がある。

2.4.3.5 iPS 細胞の製造に関わる技術

クリーンルームにおける作業支援ツール：クリーンルームの中での作業は、無塵衣を着ているため快適ではない。その上、すべての作業は短時間で正確に行われる事が要求される。近年、再生医工学研究の高まりを受けて様々な作業支援ツールが登場している。細胞を培養する場合、必ず細胞の播種密度を確認する必要があるために、細胞数を計測する必要がある。最近の微細加工技術の進歩に伴って正確な高さの隙間を成型できるようになったために、細胞数を計測するためのディスポーザブル血球計算盤（深江化学株式会社、ワンセル社）が製造販売されるようになった。また、培養装置内をリアルタイムで撮影できる装置（三洋電機株式会社、オリンパス社、アステック社）なども登場している。先に分析機器として紹介したフローサイトメトリーに細胞を分離する機能を兼ね備えたセルソーターでも閉鎖系で使用できるものが登場している。今後、臨床分野で利用されている遠隔操作などが応用される事でクリーンルームの外で作業することが期待されるが、一方で細胞の記録に必要な画像は高精細になればなるほどデータ容量が大きく、計算機上での解析やデータ送受信に時間を要するため、迅速な操作を実行するためには情報量の軽減もしくは高速通信といった最新の情報通信技術を取り入れる必要がある。

アイソレーターについて：これまで医薬品製造所のクリーンルームは設備投資だけでなく清浄度を保つために空調を常に稼働させておくため設備が大きくなればなるほどコストがかかる。そこで最近ではアイソレーターと呼ばれる滅菌可能な密閉式の小型作業室が開発されている。様々なタイプがあり室内に直接人が入るのではなく、室外からグローブボックスなどを解して操作する。室内には遠心機やインキュベータ、顕微鏡を装備でき、室内はガス滅菌することができるため、高い清浄度を維持した状態で作業者に無塵衣を着る負担をかけることなく作業できることが特徴である。また、設備の容積もクリーンルームに比べ小さいので空調にかかるコストを低減することができる。日本の三洋電機株式会社 (<http://www.sanyo-biomedical.jp/>) やフランスの La Calhene 社 (<http://www.lacalhene.com/>) が製造している。

ヒト iPS 細胞を広く利用するために必要と考えられる技術：これまで iPS 細胞の作製にはレトロウイルスを用いていたが、昨年の山中教授らのグループの報告ではリポフェクションでも誘導できる事が明らかになった (8)。この技術的なブレークスルーは臨床応用にとっては非常に有利になったというだけでなく、誰でも iPS 細胞を作製できる時代になる事も意味している。しかし、iPS 細胞を作製するためには iPS 細胞ができたか否かを判断する必要がある、iPS 細胞を多くの市場で活用するには簡便に正常な iPS 細胞か否かを判別する技術の開発が必要である。

創薬スクリーニングや臨床検査に用いる場合、細胞の品質をどのように規定し、どのように制御するかが大きな問題である。細胞培養を自動化することによって細胞の品質を均質化することは以前から考えられているが、iPS 細胞の作製、培養工程は非常に職人的技術要素を多く含んでおり、自動化するのは難しい。これを実現するためには iPS 細胞の培養に関わる生化学的な解析だけでなく、作業者の感覚を機械プロセスに反映する必要がある。また、どのような基準によって同じであるとみなすかは非常に難しい。まず、品質基準を策定するためには多くの iPS 細胞を樹立し、高速シーケンサの技術などを応用し、それぞれ発現プロファイルを解析することが必要になると考えられる。

参考文献

- 1) 改訂培養細胞実験ハンドブック（許南浩、中村幸夫、編、黒木登志夫、監、羊土社、2009）
- 2) 無菌製造法に関する製造指針と品質管理（西原利明、編、川村邦夫、監、じほう、2006）
- 3) 改訂 3 版医薬品および関連分野 GMP 自己点検ノート（GMP 研究会、編、じほう、2002）
- 4) クリーンルームと機器・材料（依田行夫、他、著、シーエムシー、1990）
- 5) 医療機器の滅菌及び滅菌保証（佐々木次雄、編、新太喜治、他、監、日本規格協会、2005）
- 6) ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保に関する指針（薬食発第 0912006 号 平成 20 年 9 月 12 日）
- 7) ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保に関する指針（薬食発第 0208003 号 平成 20 年 2 月 8 日）
- 8) Keisuke Okita, Masato Nakagawa, Hong Hyenjong, Tomoko Ichisaka, Shinya Yamanaka, Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors, (2008) Science 322, 949-953.

2.4.4 iPS 細胞培養のための培地、容器、担体に関する技術

2.4.4.1 はじめに（ヒト多能性幹細胞培養の現状と問題点について）

ヒト多能性幹細胞（ES、iPS）は、培養上の特徴において一般の培養細胞とは異なる点があり、マウス ES 細胞より難度が高いなど、特殊な培養技術が求められる。京都大学山中グループにより発表されている iPS 細胞樹立に関する論文(1)或いは理研 CDB ヒト幹細胞研究支援室が Web 公開している iPS 細胞の培養プロトコール(2)によると、ES 細胞の凍結保存、解凍、継代およびフィーダー細胞の取扱い技術などの培養手法の多くはヒト ES 細胞とヒト iPS 細胞では共通しており、これまでのヒト ES 細胞における知見が参考になる。

一般的な培養条件について具体的には、生存はするが増殖しないように予めガンマ線照射や抗生物質マイトマイシン C によって処理したマウス由来のフィーダー細胞（MEF、STO、SNL76 等）を事前に播種したゼラチンコート培養皿を用い、Doulbecco Modified Eagle's Medium（DMEM）に、ES 細胞用に性能試験済みの牛胎児血清（分化誘導能がなく高濃度での使用でも毒性のないロット）を 15-20% 添加した培地を用いる。その他、増殖補助のための非必須アミノ酸混合液、ピルビン酸ナトリウム、ヌクレオシド混合液、2-メルカプトエタノール等も添加する(3)。更にヒト ES 細胞の増殖に必須の塩基性繊維芽細胞増殖因子（bFGF、FGF-2）の添加が必要である。

FBS には ES 細胞等の幹細胞の分化を促進する因子が存在する。この制御の難しい細胞分化を抑える必要性から、現在は代替血清（Knockout Serum Replacement :KSR）が広く用いられている。KSR は 1998 年に P.プライスらが開発した血清を含有しないサプリメントである（インビトロジェン社(GIBCO)が販売)。FBS から KSR に置換（FBS と同

様 15-20%添加) することにより、大部分の ES 細胞を未分化状態で培養することが可能とされている。しかし KSR は動物由来の成分を含んでおり、この培地で培養した細胞表面にヒトには存在しないシアル酸 N-グリコシルノイラミン酸(Neu5Gc)が確認されたため、安全性の面から臨床応用には使用しないことが望ましい。今後は KSR を必要としない動物由来成分を一切含まない安全性の高い iPS 細胞用無血清培地の開発、あるいは動物由来成分不含の KSR への置換が求められる。再生医療用の培養においては患者自己血清を使用する可能性もあるが、自己血清では十分な増殖を得られないケースもあり、自己血清を使用できない場合にも十分な細胞培養が可能な技術開発は重要である。

また KSR は **chemically-defined** (全組成が明らか) でないため、薬剤スクリーニング評価の際においても支障がある。

ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞の培養には培養に不可欠な各種の成長因子や接着因子を産生供給するマウス由来フィーダー細胞が使用されている。2 種類の細胞を適当な細胞密度を保ちながら培養液を頻繁に交換し、細胞の解離と継代を繰り返すことが必要となることから、多大な労力を要する。またこのような工程は作業者の技術の個人差が生じ易く、高精度かつ高効率に細胞を培養・増殖することは困難であり、コストが高い等の問題がある。またマウス 1 4 ~ 1 5 日胚の線維芽細胞初代培養細胞 (MEF 細胞) ではバッチごとに性能がばらつき易いことも良く知られている。異種動物由来成分を排除置換する目的ではヒト由来のフィーダー細胞の使用も検討されているが、そもそもフィーダー細胞の使用はトランスフェクション効率を低下させる可能性、ダウンストリームにおける解析 (フローサイト解析、核酸精製、細胞ライゼート調製等) において混入の危険性もある。以上よりヒト iPS 細胞を安定的かつスケールアップして培養する場合には培養工程を煩雑化するフィーダー細胞を使用しない培養技術の開発が大変重要と考えられる。

無血清培地が再生医療用途の細胞調製に用いられるためには、医薬品と同様、安全性確保が最優先である。それには全組成の公開と各成分の毒性の有無検討は避けては通れないが、組成の公開されていない培地も少なくない。唯一 2006 年に論文発表された TeSR1 培地は、DMEM/F12 をベースとして各種の成長因子や接着因子が添加されており、組成が完全に公開されている。細胞の分化機構の解明の為の基礎研究や創薬・毒性試験などの非臨床研究への応用においても組成の公開は不可欠と考えられる。

2.4.4.2 無血清培地技術

動物細胞培養に血清を用いない無血清培地技術は 1970 年代後半、Dr.Gordon Sato らにより開発された。1980 年代に入ると早くも工業スケールでの無血清培養技術が確立され、まずは蛋白性のいわゆるバイオ医薬生産に応用されるようになった。更に 1990 年代、BSE 問題により動物由来成分を含まない既知成分のみからなる完全合成 (chemically-defined) 無血清培地が開発され、様々な抗原に対する組換えのヒト化モノクローナル抗体が医薬品として数多く開発、上市されるにつれて 2000 年前半から蛋白医薬生産用の無血清培地の需要は飛躍的に伸びてきている。一方ではヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) に代表される再生医療の基礎研究が 1990 年代から急速に進歩した。更には多能性を有する間葉系幹細胞の同定や山中教授らによる iPS 細胞作成など、ヒト胚

を破壊するという ES 細胞の倫理上の問題を回避可能な幹細胞ソースが利用可能となり、それらを応用した細胞移植および再生医療実現への期待が高まってきた。幹細胞用の完全合成無血清培地も蛋白医薬生産用と同じく動物由来成分の使用を避ける目的で開発が進められている。世界中の幹細胞の研究グループが参加するコンソーシアム (ISSCR) の主導により、再生医療用の無血清培地候補について 10 種類程度について現在スクリーニングを行っており、日本からは京都大再生研中辻教授のグループが参加しているとの情報であるが、培地を用意した企業の情報などの詳細は不明である。

再生医療用細胞の調製は、(A) 幹細胞を未分化状態を維持したまま必要数の細胞を増殖させる培養プロセス、(B) 分化誘導により特定の機能を有する治療用細胞にする加工プロセス、の大きく 2 つに分けられる。現在非臨床 (研究) 用途であるものの、いくつかの幹細胞用の無血清培養用試薬が製品化され利用可能である。(A) については動物由来成分を完全に排除、未分化幹細胞の性質を保持した細胞を維持するためには、STO 細胞株や胎仔から調製した初代繊維芽細胞を使用したフィーダー細胞層が必要とされてきたが、フィーダー細胞から供給される因子は培地に添加することにより、フィーダー細胞も必要としない無血清培地が開発されるなど、産業応用に向けての技術開発に着実な進歩が見られる。再生医療を実現する為にはコストのかかる細胞培養・加工プロセスを如何に低コストにするか重要であり、臨床応用実現に向けてコストを低く抑えつつ、性能 (細胞増殖性、未分化維持能) の両面が向上した無血清培地のニーズは依然として高いと考える。更に、(B) については目的とする治療用細胞により方法は大きく異なること、特定の目的細胞をとっても再現性高い標準化プロトコール等も模索中の基礎研究段階のものが多いと推察され、一部の研究用途を除いて製

表 2. 4-3 ヒト多能性幹細胞用無血清培地に求められる要件まとめ

産業用途/要件	Feeder-free	Serum-free	Defined	Xeno-free
創薬スクリーニング 等非臨床研究応用	○	○	○	×
再生医療等 ヒトへの臨床応用	○	○	○	○

品化されているものは少ない (今回は (A) のみを調査対象とする)。

前述の通り、創薬スクリーニングや再生医療への産業化応用 (安全性、安定性、大量生産) を想定した場合、ヒト多能性幹細胞の培養条件においては以下の項目を満たしていることが望ましい。(表 2.4-3)

2.4.4.3 現在製品化あるいは論文発表されている無血清培養培地等について (表 2.4-4)

(1) KNOCKOUTMSR (インビトロジェン)

KNOCKOUTMSR (Knockout Serum Replacement、略して KSR) は 1998 年に P.プライスらが開発した血清を含有しないサプリメントで、ヒトやマウスの ES 細胞等幹細胞の培養に広く用いられている。FBS から KSR に置換 (FBS と同様 15-20% 添加) することにより、大部分の ES 細胞を未分化状態で培養することが可能とされている。前述の通り、動物由来と思われるヒトには存在しない糖鎖の付加や、成分組成情報が明ら

かでない為、専ら研究用途に限定される。

(2) Xenogeneic-Free KNOCKOUTTMSR (インビトロジェン)

2009年1月発売。KNOCKOUTTM SR XenoFree (Xeno-free KSR) は KNOCKOUTTM SR(KSR)の組成を基本とし、KSR のすべての動物由来成分をヒト由来成分及び化学的に合成された成分へ置換した。CELLstatTM (xeno-free かつ defined な substrate) と KNOCKOUTTM SR XenoFree Growth Factor Cocktail を使用することにより、フィーダーフリー培養も可能である。cGMP 下で製造することにより、ヒト ES 細胞の基礎研究から臨床応用に移行する上で、ギャップを小さくできると考えられる。実際に広く使用されるかは組成の開示が重要なポイントとなる可能性が高い。

(3) StemPro®hESC SFM (インビトロジェン)

ヒト ES 細胞 (Human Embryonic Stem Cells) の増殖のために特別に開発されたフィーダー細胞不要の無血清培地。CELLstatTM をコーティングした培養容器を用いる。StemPro®hESC SFM は様々なヒト ES 細胞株でテスト実施済みで既に次の7つの hESC (BG01、BG02、BG03、H1、H9、BG01V、HUES9) の増殖テストにて形態維持が証明されている。牛血清アルブミンを含む。

(4) ヒト ES 細胞維持用無血清培地 mTeSR (ステムセルテクノロジー)

mTeSRTM1 (エム・ティーザー・ワン) は、modified Teneille Serum Replacer 1 の略で、米国 Wisconsin-Madison 大学の研究ファンドである WiCellTM Research Institute の技術提携のもと、カナダ StemCell Technologies 社と BD Bioscience 社と共同開発により製品化された。ヒト ES 細胞用メンテナンス用培地では Feeder free / Serum free / Defined の3点を世界で始めて達成している。尚 mTeSRTM1 は成分に牛血清アルブミンを含むが(4)、TeSRTM1(5)ではヒト血清アルブミンに置換されており、動物由来成分もフリーであり、組成も全て論文で公開されている。ヒト ES 細胞に最適化された hES Qualified BD マトリゲルまたは CVFL (コラーゲン、ビトロネクチン、ファイブロネクチン、ラミニン) をコートした培養容器を使用する。多種類のヒト ES 細胞株 (HES-2, HES-3, HES-4, HES-5, GB01, GB02, GB03, TE04, H1, H7, H9, H13, H14, KhES-1, KhES-2, KhES-3 等) において培養性能が確認されている(6)。mTeSRTM1 は iPS 細胞の維持培養でも既に使用されている(7)。

WiCellTM Research Institute は幹細胞の研究を専門としており、アカデミア向けに細胞を提供したり、The National Stem Cell Bank も兼ねており、既に iPS 細胞の頒布が始まっており、詳細な培養プロトコールも WEB サイトで公開されている。

(5) 霊長類 ES 細胞用培地 (リプロセル)

京都大学再生医科学研究所の中辻研で開発されたヒト/サル ES 細胞培養技術のライセンスを受けたリプロセルが、2005年に世界で初めてヒト/サル ES 細胞専用の培養製品 (霊長類 ES 細胞培養キット) を発売した。京都大学 iPS 細胞研究センター山中教授のヒト iPS 細胞論文で、iPS 細胞用培地としてリプロセル霊長類 ES 細胞用培地が使用され、ヒト iPS の樹立および培養にも有効であることが確認されている(1)。0.1%ゼラ

チンをコーティングした培養皿に播種したマウスフィーダー細胞の使用が必要。培地は無血清であるが、動物由来蛋白を含有している。ヒト iPS 細胞、ヒト ES 細胞培養時には bFGF 添加 (4-10ng/ml) は必要。組成は公表されていない。

(6) 霊長類 ES 細胞用フィーダーレス培地 (リプロセル)

2008 年 10 月発売。(5) の霊長類 ES 細胞用培地の基本構成を保ちつつ、substrate 添加等の改良を加え、ゼラチンや BD マトリゲルコートした培養皿を用いてフィーダー細胞なしで培養を可能とした。霊長類 ES 細胞用フィーダーレス培地 (ReproFF) は霊長類 ES 細胞用培地と基本構成が同じであるため、オンフィーダー培養とフィーダーレス培養のスイッチも容易であるが、フィーダーレス培養はオンフィーダー培養に比べ、より習熟が必要とのこと。本培地も血清は不含であるが、動物由来成分 (BSA) を含む。京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センターのヒト ES 細胞 (KhES-1, KhES-3) で 8 継代 (約 1 ヶ月) までの未分化維持能を確認、細胞はやや扁平な形態をとるものの正常な ES 細胞としての形態を保持。未分化マーカーの発現を調べたところアルカリフォスファターゼ、Oct-3/4 の発現が認められた。カニクイザル ES 細胞では、30 継代までの未分化維持能を確認された。培地には bFGF は含まれていないので使用時に添加は必要である。

(7) HEScGRO 培地 (ミリポア社)

無血清、動物由来成分フリー、chemically-defined なヒト ES 細胞増殖用培地。フィーダー細胞フリーではない。マトリゲル、0.1%ゼラチン液、ヒトコラーゲンタイプ IV 等をコーティングしたプラスチック培養皿を使用、一般的なマウス由来のフィーダー細胞ではなく、ヒト由来のフィーダー細胞 (Detroit551、HS27、WS1 等) を使用する。bFGF は含有 (20ng/ml) されており、添加不要な Ready-to-use 培地。ヒト ES 細胞株 (MEL-1、MEL-2、MEL-4、H1、H9) を 20 代以上フェノタイプに分化させずにメンテナンス可能な培養実績有り。

(8) ヒト ES 細胞用無血清培地 hESF9 (独立行政法人医薬基盤研究所)

独立行政法人医薬基盤研究所の古江らは英国シェフィールド大学 Andrews 教授 (世界 11 ヶ国におけるヒト ES 細胞の標準化プロジェクト ISCI を推進しているリーダー) との共同研究により、ヘパリンがヒト ES 細胞の増殖を促進し、未分化性を保つ作用があることを発見し、培地に最小限のサプリメントを加えるだけでヒト ES 細胞を培養することが可能な無血清培地 hESF9 を開発した (図 2.4-9)。(8)

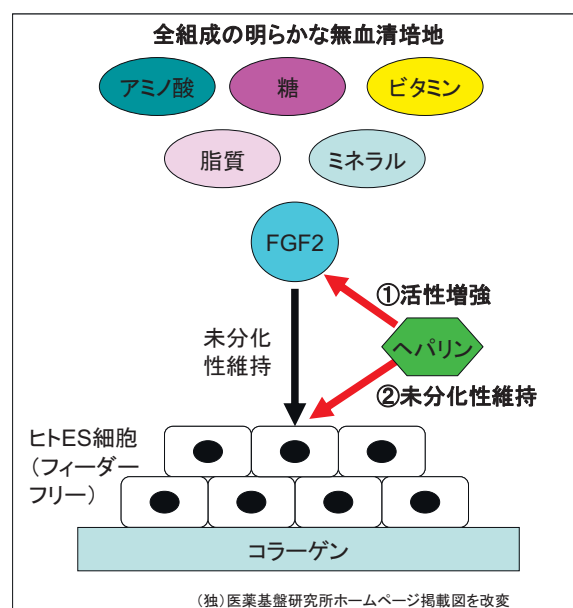


図 2. 4 - 9 hESF9 培地の特性

ヒト ES 細胞の未分化性維持や細胞増殖は FGF-2 の培養液への添加が必須とされるが、ヘパリンに①内在性の FGF-2 の作用を増強させる作用があること、及び②ヘパリンそのものに未分化性維持や細胞増殖を促進する活性を見出した。これらの発見により、培地にヘパリンを添加することにより、別の増殖因子やサプリメントを添加することなく従来よりも低濃度の FGF-2 添加でも、ES 細胞の未分化状態や多分化能を維持して培養が可能な培地を開発した。

hESF9 は製品化されていないが、フィーダー細胞を必要とせず、牛血清あるいは代

表 2. 4-3 ヒト多能性幹細胞用の無血清培地等一覧

番号	発売元	名称	Feeder-free	Serum-free	Defined	Xeno-free	備考
1	インビトロジェン	ノックアウト血清リプレースメント (KSR)	○	○	×	×	FBS に代わるサプリメント、15-20% Knock-out-DMEM 培地に添加
2		KSR Xeno-free	○	○	×	○	KSR の異種動物成分フリー版、15-20% Knock-out-DMEM 培地に添加。CELLstat™ と KNOCKOUT™ SR XenoFree Growth Factor Cocktail 使用で Feeder-free 培養可
3		StemPro hESC SFM	○	○	○	× (BSA)	GlutaMax&Supplement 添加
4	ベリタス	mTeSR1 (TeSR1)	○	○	○	× (TeSR1 は○)	WiCELL Research Institute の技術提携のもと、StemCell Technology 社で開発。BD マトリゲルと共に用いる。
5	コスモバイオ	霊長類 ES 細胞培養培地	×	○	○	× (BSA)	リプロセル(京都大学再生研中辻研よりライセンス)、ヒト iPS にも使用例あり。
6		霊長類 ES 細胞培養培地 ReproFF	○	○	○	× (BSA)	2008 年 10 月発売。
7	ミリポア	HEScGRO	×	○	○	○	CHEMICON(ミリポア社)。bFGF 添加済。
8	-	hESF9	○	○	○	○	引用文献 8 参照

替血清などを使用せず、すべての組成が明らかにされた培地を用いて、ヒト ES 細胞の培養が可能な数少ない培地の一つと考えられる。最小限の因子しか含まれていないことにより、添加因子の影響を、正確に解析することができることが期待され、毒性試験や、創薬におけるスクリーニングの感度が 100 倍近く上がる可能性も期待される。

(9) その他有用な培養ツールの開発：霊長類 ES 細胞用剥離液 (リプロセル)

ヒト iPS 細胞、ヒト ES 細胞、サル ES 細胞のための専用の細胞剥離液。キャピラリーガラスを用いたピペッティングだけの簡単な操作で細胞を解離、高い生存率での継

代が可能。霊長類の ES 細胞やヒト iPS 細胞を継代するときには、アポトーシスを起こし易いことから single cell suspension にせずコロニーを維持したままで行うことが重要である。一般の細胞株を剥離する際に使用されるトリプシン-EDTA などを使用してヒト ES 細胞およびサル ES 細胞を継代した場合、生存率は数パーセントと著しく低下する。霊長類 ES 細胞用剥離液は、添加するだけで継代に適した大きさのコロニーを調製することを可能とし、継代時の細胞の生存率が Trypsin-EDTA 溶液に比べ約 10 倍と高い。カニクイザル ES 細胞やヒト ES 細胞で、細胞にダメージをほとんど与えず、3 年以上と長期の染色体異常が見られない等の培養実績がある。継代時の操作が容易であり、簡便かつ大量に継代作業を行える。特許が公開されており(9)、1mM塩化カルシウム及び 20% KSR を含む 0.25% トリプシン酵素溶液と思われる。

引用文献

- 1) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S.: Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors., *Cell* 131,861-872 (2007).
- 2) 理研 CDB 幹細胞研究支援室、ヒト多能性幹細胞培養実習プロトコール（維持培養を中心とした導入講習用資料 Web 版、2008 年 9 月）。
- 3) Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W. and Kemler, R.: The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium., *J. Embryol. Exp. Morph.* 87, 27-45 (1985).
- 4) Ludwig, T., E., Bergendahl, V., Levenstein, M., E., Yu, J., Probasco, M. D., and Thomson, J. A.: Feeder-independent culture of human embryonic stem cells., *Nature Methods* 3(8), 637-646 (2006).
- 5) Ludwig, T., E., Levenstein, M., E., Jones, J., M., Berggren, W., T., Mitchen, E., R., Frane, J., L., Crandall, L., J., Daigh, C., A., Conard, K., R., Piekarczyk, M., S., Llanas, R., A. and Thomson, J., A.: Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions., *Nature Biotechnology* 24(2), 185-187 (2006).
- 6) Rajala, K., Hakala, H., Panula, S., Aivio, S., Pihlajamäki, H., Suuronen, R., Hovatta, O. and Skottman, H.: Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures., *Hum. Reprod.* 22(5), 1231-8 (2007).
- 7) Yu, J., Vodyanik, M., A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J., L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G., A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I. and Thomson, J. A.: Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells., *Science* 318(5858), 1917-20 (2007).
- 8) Furue, K., M., Na, J., Jackson, J., P., Okamoto, T., Jones, M., Baker, D., Hata, R., Moore, H., Sato, J., D., and Andrews, P., W.: Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium containing FGF-2 as the only growth factor., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(36), 13409-14 (2008).
- 9) 中辻憲夫、末盛博文、日本国公開特許.: 特開 2003 - 116527.

2.4.5 iPS 細胞培養のための細胞凍結保存に関する技術

2.4.5.1 はじめに

iPS 細胞の凍結方法は、これまでにヒト ES 細胞で開発されてきた方法が適用できる。iPS 細胞研究センターでは、京都大学幹細胞医学研究センター 霊長類胚性幹細胞研究分野の末盛博文博士らによって開発された方法にのっとり培養を行っている (1,2)。解凍・凍結操作においては、迅速性を必要とし、特に凍結はガラス化法を採用しているため、秒レベルでの急速冷凍が要求される。よって、操作の自動化等の改善がより細胞品質の確保につながるものと考えられる。

また、細胞保存には、液体窒素凍結保存容器を使用することで、 -196°C に維持されることから、臨床用途への展開の際には、液体窒素の無菌化についても今後検討・議論が不可欠である。

2.4.5.2 細胞凍結保存液

凍結保存液としては、下記のもので市販されている。

(1) 霊長類 ES 細胞用凍結保存液 (リプロセル)

霊長類 ES 細胞株を凍結保存する際に DMSO 等一般的な凍結保存液を用いると生存率は 1 パーセント未満と著しく低下する。ヒト iPS 細胞、ヒト ES 細胞、サル ES 細胞のために開発された凍結保存液で一般的な保存液と比較して著しく高い (10%程度) 生存率で凍結保存が可能で、凍結解凍後の生存率が良好な為、通常 3~4 日後には継代も可能である。細胞は液体窒素で急速凍結可能なため、プログラムフリーザーが不要である。凍結細胞は、 -135°C 以下のフリーザーで長期保存が可能。組成には血清は不含であるが動物由来蛋白を含む。凍結時は細胞ペレットと凍結保存液を混合して 15 秒以内に液体窒素で急速凍結する。使用量は凍結する細胞数にかかわらず $200\mu\text{L}$ 。解凍時は温めた培地で急速解凍し、 37°C ウォーターバスでの解凍は厳禁である。

(2) ROCK 阻害剤 (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細胞分化・器官発生研究グループ) (図 2.4-10)

ヒト ES 細胞の維持培養での植え継ぎでは、フィーダー細胞又は基質から細胞塊を酵素処理又は機械的剥離によって一旦浮遊させ、それをピペッティングにより小塊に分離した後、新しい培養皿に植えるのが一般的である。しかしヒト ES 細胞は、通常の細胞株やマウス ES 細胞に比し、浮遊や分散の過程に弱く、多くの細胞が細胞死を起こすことが知られている。さらに、遺伝子操作 (遺伝子導入

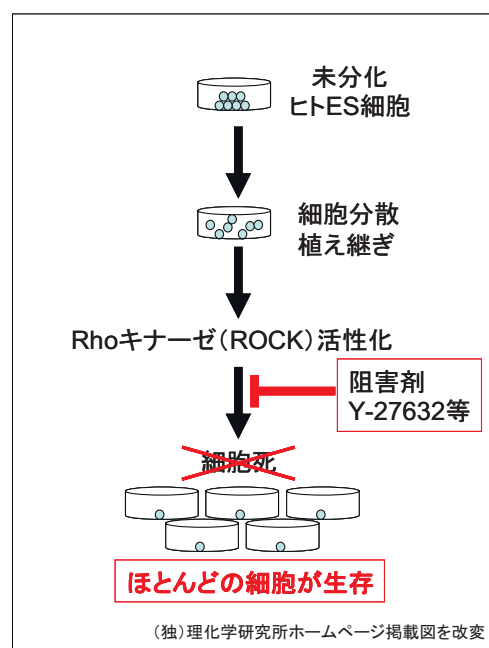


図 2. 4 - 1 0 ROCK インヒビターの効果

や遺伝子改変) などの際には単一細胞からヒトES細胞をクローン化(コロニー形成) する必要があるが、ヒトES細胞を単一細胞に分散させた場合、細胞死や増殖停止が非常に起こりやすくなるため、ヒトES細胞におけるクローン化効率は1%以下とされている。ヒトES細胞を1つずつバラバラにしてから培養する際に必ず起こる細胞死の引き金が、Rhoキナーゼ(ROCK) という細胞内のリン酸化酵素の活性化によることを発見し、その働きを阻害すると細胞死が抑制できることを発表。実際に、ヒトES細胞をROCK阻害剤を含む培養液で育てるとES細胞1個あたりの細胞塊(コロニー) 形成率は約30倍も亢進した。ROCK阻害剤としてはY-27632の他、Fasudil、H-1152等でも良く、Y-27632を用いる場合、約2-20 μ Mの濃度で添加する。(3)

2.4.5.3 凍結細胞の搬送

凍結細胞の搬送においては、ドライシッパーを使用し(図2.4-11)、技術的な問題は解消されていると考えられる。



ドライシッパー
(テイラーワートン社製)
<http://agjapan.co.jp/tw/>

-196°Cでの保存→搬送容器の小型化
(ドライアイスでは死滅)

図2.4-11 凍結細胞の輸送容器

引用文献

- 1) Fujioka, T., Yasuchika, K., Nakamura, Y., Nakatsuji, N. and Suemori, H.: A simple and efficient cryopreservation method for primate embryonic stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 1149-54 (2004).
- 2) Takahashi K., Okita, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature Protoc.* 2, 3081-9 (2007).
- 3) Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K. and Sasai, Y.: A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnol.* 25(6): 681-6 (2007).

2.4.6 総括

現状の iPS 細胞作製は、観察力に長けた熟練オペレータの手作業によるもので、細胞供給センター規模での細胞生産は、培養環境の調整の観点から、依然解決すべき問題が多く残されている。本節では、培養の各工程における装置等のハード面からの検討で、培養装置の重要性を指摘し、細胞環境のソフト面からの検討で、培地、凍結液等での改善の必要性について言及した。園芸職人的な培養技術が中心となっている現状から、エンジニアリング参加型培養技術への展開が、今後、重要な技術推移であり、iPS 細胞の産業用と展開には、バイオプロセスエンジニアリングの貢献が不可欠である。

参考資料

京都大学 物質－細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター

<http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/cira/j/rsch.html#protocol>

ヒト iPS 細胞の改良型樹立方法

マウス iPS 細胞の改良型樹立方法

2.5 iPS 細胞・幹細胞の「細胞分析技術」

2.5.1 概要

iPS 細胞・幹細胞を分析する目的は2つに大別される。第一に、iPS 細胞等幹細胞の作製や分化のメカニズムを解明し、より安全で、効率的な細胞作製プロセスを確立することである。第二に、細胞の大量培養プロセスにおいて、分化や成熟度、がん化等を評価し、細胞の品質を評価することである。iPS 細胞等幹細胞の作製、分化誘導のメカニズム解明においては、ゲノム情報に基づく細胞分析手法を高度化することで解決が図れると予想され、また、フローサイトメーターや分子イメージング等の、細胞内の特定の分子をラベル化することによる従来の細胞分析手法が利用できる。しかしながら、これらの分析手法は、試薬による侵襲や細胞の破壊を伴うため、細胞を最終製品とする「細胞製造」過程での品質評価への応用には適さない。iPS 細胞等幹細胞の医療や産業分野への応用には、増殖した後の細胞を安全に利用することを重視した、非侵襲で非破壊な細胞分析技術が必要となる。従って、細胞の形状、光学的特性、電気的特性あるいは機械的特性などの物理化学計測を駆使して、従来法と同等かそれ以上の信頼性を保障する非破壊な細胞品質検査技術をいかに構築するかが重要な課題である。

現在、幹細胞の分離、精製、同定や分化状態を正確に把握するための指標となる表面マーカーは決定されておらず、例えば、表面マーカーのみで分離したヒト間葉系幹細胞のうちコロニー形成能を有する細胞は数百個から数万個に一個と報告されている(1-6)。物理計測による非破壊な細胞診断は、最終的には、表面マーカーによる細胞診断を上回る分画の精度を超えることが望ましく、非破壊細胞診断がどの程度の精度で細胞を分離できるかも重要な課題である。

本節では、非破壊細胞診断技術への応用が見込まれる、細胞表層の物理化学的特性の分析技術(2.5.2 節)、形態的な分析技術(2.5.3 節)、電磁気学に基づく新規分析技術(2.5.4 節)についてまとめ、iPS 細胞・幹細胞の分析への応用可能性について報告する。さらに、細胞を評価するための計測技術には、正確に細胞を診断するための高い信頼性が要求される。即ち、遺伝子発現解析と比較しながら物理計測手法で細胞を測定し、物理計測手法で得られる細胞の物性値が細胞のどのような状態を反映しているのかを解明する研究が重要である。2.5.5 節でこのような研究に有効な最新の遺伝子診断技術について報告する。

- (1) Simmons, P.J. and Torok-Storb, B.: Blood 78: 55-62 (1991)
- (2) Quirici, N. et al.: Exp. Hematol. 30: 783-791 (2002)
- (3) Gronthos, S. et al.: J. Cell Sci. 116: 1827-1835 (2003)
- (4) Boiret, N. et al.: Exp. Hematol, 33: 219-225 (2005)
- (5) Aslan, H. et al.: Stem Cells, 24: 1728-1737 (2006)
- (6) Gang, E.J. et al.: Blood 109: 1743-1751 (2007)

2.5.2 細胞表層の物理化学的特性分析技術

2.5.2.1 概要

細胞表層の構造を図 2.5-1 に示す。脂質二重膜からできている細胞膜には様々な膜タンパク質が存在し、さらにその外側には糖鎖などが結合している。また、細胞膜の内側をしてみると、細胞膜裏打ちに存在するアクチン線維や細胞膜タンパク質に結合する多種多様なタンパク質複合体が存在する。このように細胞表層の構造は非常に複雑であり、これらの分子が総合的に細胞表層の特性を決定している。

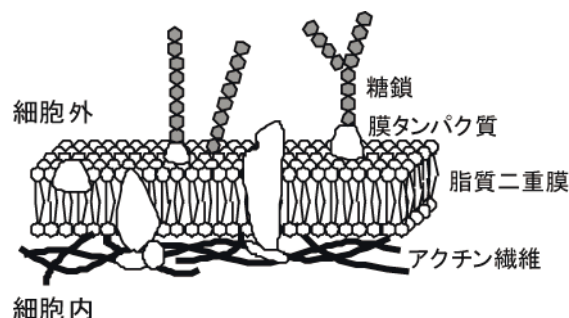


図 2.5-1 細胞表層の構造

現在進められている細胞表層の特性分析の技術を分類すると以下の3つとなる。1) 細胞表層に存在している実際の分子分析、2) 細胞表層の物理的特性分析、3) 細胞表層の電気化学的特性分析。細胞表層の特性を分析する技術の最も大きな利点は細胞に対して非破壊的に分析可能なことである。そのため、本節で報告する細胞表層の物理化学的特性分析技術は細胞に対して非破壊に分析可能である点を考慮した内容になっている。

2.5.2.2 細胞表層分子の物理的検出技術

細胞は細胞膜により内と外の空間を作り出し、それぞれで必要な化学反応等の場を形成している。細胞内では細胞自身の恒常性維持のための生命活動を、細胞外では細胞同士が作り出す多細胞系としての恒常性維持のための物質伝達や構造物形成を行っている。このような細胞膜によって隔てられた空間をつなぐ分子として様々な細胞膜タンパク質や細胞膜タンパク質を修飾している糖鎖がある。発現している膜タンパク質や糖鎖の種類や量は、細胞の種類や状態に応じて異なっている。そのため、細胞表面に存在する細胞膜タンパク質や糖鎖を特異的にかつ高感度で認識することで、どのような細胞なのかを正確に把握することも可能となる。

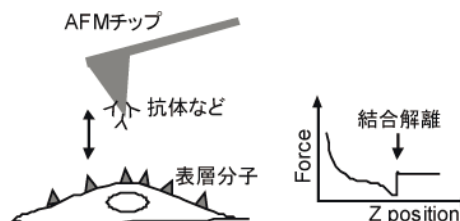


図 2.5-2 AFM による細胞表層分子の認識原理

膜タンパク質や糖鎖を検出する従来の方法は、蛍光ラベルした抗体を用いて抗原・抗体反応を行い、結合した蛍光分子を光学的に計測する免疫蛍光染色法である。その一方で、近年同様の原理を用いているが、抗原・抗体結合の力学的解離を検出する新しい細胞表層分子検出方法の開発が行われている。図 2.5-2 にその原理を示す。抗原・抗体結合の力学的解離を計測するには原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy; AFM)が用いられる。AFMはその検出下限が数 pN であり、抗原・抗体の1分子の結合解離に要する力(50~200 pN)を十分に検出することが可能である。こうした AFM による抗原・抗体反応の検出系は、今までの蛍光に基づく系に比して、高感度でありかつ

高精度となる。また、抗体によっては膜タンパク質の機能をブロッキングしてしまうこともあるが、AFMを用いた方法では最終的に抗体は細胞膜タンパク質からは完全に解離されているため、どのようなものでも使用が可能となる。以下に本技術に関する論文報告を例示する。

GrandboisらはAFMチップの表面をN-acetylgalactosamine (galNAc)に特異的に結合する*Helix pomatia* lectinで修飾し、赤血球表面に存在するgalNAcの認識を行った(1)。また、Almqvistらは血管内皮細胞増殖因子(VEGF)レセプターに対する抗体を用いて細胞表面のVEGFレセプターの検出を行った(2)。さらにVEGFを添加することでVEGFレセプターのクラスターが見えてくることを細胞表面のフォースマッピングで検出している。また、こうした細胞表面のフォースマッピングを高精度で行うことで、Leeらは細胞表面のVEGFレセプターを1分子レベルでマッピングすることに成功した(3)。Yuらは増殖因子であるTransforming growth factor 1(TGF-1)をAFMチップに修飾し、TGF-1の受容体であるTGF-type Iレセプター(TR I)とtype IIレセプター(TR II)への結合の特異性を力学的に評価することで、TRIIへの結合がTRIにより強化されることを見出した(4)。また、PuntheeranurakらはグルコースをAFMチップ表面に修飾することで、細胞表面にあるグルコーストランスポーターの働きを力学的に評価した(5)。Wildlingらはホルモンの一種であるAldosteroneをAFMチップ表面に修飾することで、細胞表層にもホルモンレセプターが存在することを証明した(6)。少し変わった所では、細胞自体をAFMカンチレバーに結合させ、細胞どうしの相互作用を直接力学検出した報告もある(7)。

上記のように、現在では抗体だけでなく、レクチンによる細胞表面糖鎖認識、リガンドを固定化したリガンド-レセプター結合、さらに基質-酵素の結合などと幅広い分子をAFMチップ上に固定化することで細胞表層分子の認識に成功している。また、この技術は細胞表層の分子の有無を調べるだけでなく、フォースマッピングと組み合わせることで、1分子レベルでターゲット分子が細胞膜表面上のどこに位置しているかを認識することまで可能になっている。こうした高感度かつ高精度な力学検出系を利用した細胞表層分子検出技術はiPS細胞表面に存在する分子を検出する上で重要なツールになると考えられる。

(1) M. Grandbois, et al., *J. Histochem. Cytochem.*, 48, 719-724 (2000)

(2) N. Almqvist, et al., *Biophys J.*, 86, 1753-1762 (2004)

(3) S. Lee, et al., *P.N.A.S.*, 104, 9609-9614 (2007)

(4) J. Yu, et al., *J. Phy. Chem. B*, 111, 13619-13625 (2007)

(5) T. Puntheeranurak, et al., *J. Cell Sci.*, 119, 2960-2967 (2006)

(6) L. Wildling, et al., *Pflugers Arch.*, Epub ahead of print (2008)

(7) M. Benoit, et al., *Nat. Cell Biol.*, 2, 313-317 (2000)

2.5.2.3 細胞の物理的特性の分析技術

細胞および細胞膜の物理的特性や強度は、細胞の種類や生理的な状態を反映する細胞の物性値の1つである。細胞あるいは細胞表層の弾性を分析する技術として、マイ

クロピペット吸引法(1,2)、レーザー光ピンセット(3)、AFM (4-16)を用いた方法が報告されている。

マイクロピペット吸引法は細胞を非常に細いピペット先端に吸引し、細胞膜の変形と吸引圧から弾性率を測定する。また、レーザー光ピンセットは抗体で表面を修飾したビーズを細胞表面に接着させ、これをレーザー光で操作して細胞表面の物理的な構造や弾性特性を測定する。原子間力顕微鏡は生きた状態の細胞をイメージングすることが可能であり、非破壊的な手法で機械的な物理特性の検出が可能である。AFMを用いた細胞の粘弾性の検出には、応力-距離曲線法、フォースモジュレーション法、応力緩和法などいくつかの手法が用いられている。

細胞の弾性特性と一概に言っても、用いる測定方法や適用の仕方によって、その測定対象となるものが異なってくる。

レーザー光ピンセットを用いた方法は、細胞の最表層にある細胞膜を測定している。Titushikinらは、ビーズを細胞表面から引っ張り、つまみあげた細胞のテザーの長さを測定し、細胞表層のカベオラの存在を指摘した(3)。また、細胞によってプラズマ膜と細胞骨格の相互関係が異なること、細胞表面からコレステロールを取り除くとテザーの長さが伸長することから、細胞表面強度はプラズマ膜に依存していることを明らかにした。

AFMによる測定はAFMチップを細胞表面に押し付けることで、細胞の物理的特性を解析する。そのため、AFMチップの形状、押しつける際の応力や速度、押しつけ距離によって、細胞表面の数百nmの範囲における物理的特性を測定しているのか、細胞全体の物理的特性を測定しているのか変わってくる。NagayamaらやBremmellらはAFMチップ先端を球状のシリカビーズにすることで、細胞にダメージを与えることなく細胞全体の弾性率を測定した(7,12)。特にBremmellらの報告によると細胞表面は弾性体として扱え、深部では粘弾性体として扱えることが明らかとなった(12)。Obatayaらは直径200~300nmの円柱状に先鋭化したAFMチップを用いることで細胞の弾性率を算出した(10)。AFMを用いた弾性率計測の多くは、細胞表層直下100~300nm程度を測定してヤング率を算出している。この弾性体として扱える細胞表面領域における主要な構造的成分はアクチン線維である(1,2,9)。

こうした細胞骨格によって支持される細胞表層の弾性率は、細胞によって数kPaから数百kPaまでと幅広く、細胞の由来だけでなく、細胞の分化によっても異なることが報告されている(9,13)。

また、腫瘍細胞の弾性率は数kPaと、一般的な細胞よりも低いことが報告されているが(14,15)、転移性の癌細胞はさらに桁ほど低い弾性率となっている(15,16)。これらはガン細胞が基底膜を通り抜けて転移する性質と深い関連があると考えられている。また、Miyakeらのグループでは細胞培養期間中においても細胞の弾性率が変化することを示し、経時的に測定することの重要性を示している。

細胞の振る舞いには分裂・増殖などの細胞周期や運動性だけではなく、老化や分化・脱分化などがあり、いずれの過程でも細胞及び細胞表層の力学的特性の変化を伴うと考えられる。現在のところ、細胞の力学的特性と細胞の生理的变化を様々な研究者がそれぞれ独自の方法で解析しているに過ぎない。そのため今後は、普遍的に細胞の物理的特性と生理的变化を関連づける統一的な方法や指標が求められる。iPS細胞に限ら

ず、統一的な方法で細胞表層あるいは細胞自身の力学的特性を評価する方法の確立を行うことで、様々な細胞の状態および特性を正確な物理量として測定することが可能となるだろう。

表 2.5-1 細胞の力学的特性に関する報告のまとめ

測定手法	細胞の種類	弾性率(kPa)	文献
マイクロピペット 吸引法	ヒト関節軟骨細胞	~1	1,2
レーザー光 ピンセット	ヒト間葉系幹細胞 繊維芽細胞		3
原子間力顕微鏡	繊維芽細胞(NIH3T3)	約 10	5
	繊維芽細胞(NIH3T3)	~数百	8
	臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)	1.27~7.22	6
	ラット動脈 myocytes (3T6)	~60	4
	腎臓尿管上皮細胞	~27	11
	繊維芽細胞(SaOS2)	~20	7
	マウス筋原細胞	~12.8	9
	マウス平滑筋細胞	~49.3	
	ヒト間葉系幹細胞	3.2±1.4	13
	骨分化細胞	1.7±1.0	
	ヒト赤血球	35~300	12
	軟骨肉腫細胞	約 3	14
	前立腺の転移性がん細胞	0.287~2.8	16
転移性がん細胞	0.53±0.10	15	
腫瘍細胞	1.97±0.70		

- (1) F. Guilak *et al.*, *Biophys. J.*, 82, 720-727 (2002)
- (2) W.R. Trickey *et al.*, *J. Orthop. Res.*, 22,131-139 (2004)
- (3) I. Titushkin *et al.*, *Biophys. J.*, 90, 2582-2591 (2006)
- (4) D. Ricci *et al.*, *Microsc. Res. Tech.*, 36, 165-171 (1997)
- (5) 川端和重ら, *生物物理*, 39, 179-181 (1999)
- (6) A.B.Mathur *et al.*, *Biophys. J.* 78, 1725-1735 (2000)
- (7) J. Domke *et al.*, *Colloids and Surfaces B*, 19, 367-379 (2000)
- (8) M. Nagayama *et al.*, *Cell Motil. Cytoskeleton*, 50, 173-179 (2001)
- (9) A.M. Collinsworth *et al.*, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 283, C1219-C1227 (2002)
- (10) I. Obataya *et al.*, *Nano. Lett.*, 5, 27-30 (2005)
- (11) Y. Rabinovich *et al.*, *J. Colloids Interface Sci.*, 285, 125-135 (2005)
- (12) K.E. Bremmell *et al.*, *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 50, 43-48 (2006)
- (13) I. Titushkin *et al.*, *Biophys. J.*, 93, 3693-3702 (2007)

- (14) E.M. Darling *et al.*, Biophys. J., 92, 1784-1791 (2007)
 (15) S.E. Cross *et al.*, Nature Nanotechnol., 2, 780-783 (2007)
 (16) E.C. Faria *et al.*, The Analyst, 133, 1498-1500 (2008)

2.5.2.4 細胞の電荷・ ζ 電位の測定技術

図 2.5-3 に示すように水溶液中に分散させた細胞の表面は帯電している。また、細胞表面のタンパク質や脂質、糖衣などの発現は、細胞内部からのシグナルによって制御されている。従って、細胞表面の帯電の度合いを指標にして細胞の生理的な状態を決定できる可能性がある。

細胞表面の帯電状態を測定する方法として細胞電気泳動法が知られている。電気泳動は粒子の懸濁液に電場を印加した際に、粒子が帯電の度合いに応じた速度で動く現象である。電気泳動による細胞の速度を測定して得られる細胞電気泳動度（細胞 EPM）を用いて、細胞の帯電の尺度である表面電位または表面電荷を推定できる。細胞の電気泳動度を説明するためのモデルとその定式化は Levin らや Ohshima らによって報告されている(1,2)。これらのモデルによると、細胞の EPM は細胞膜構成分子の解離イオン化に由来する表面電位と細胞内外の電荷の移動に由来するドナン電位、さらに高分子電解質の柔軟性によって規定される。特に糖鎖はイオン化しやすいシアル酸などを多く含んでおり、またその柔軟性は変化しやすいため、細胞 EPM はしばしば糖鎖の量や状態を反映するよい指標となる。

細胞 EPM と細胞の状態との関係について調べた報告は少ないが、1970 年代半ばに、細胞 EPM をがん化した細胞の指標にできる可能性を示唆した論文が発表されている。Yamada らは、がん化した細胞の表面負電荷密度の上昇とそれに伴った

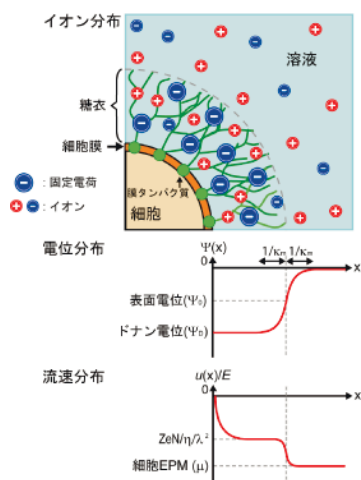


図 2.5-3 細胞表面におけるイオン分布、電位分布および流速分布の模式図

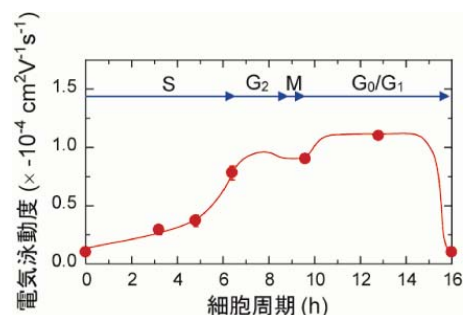


図 2.5-4 細胞周期の進行に伴う細胞電気泳動度の変化

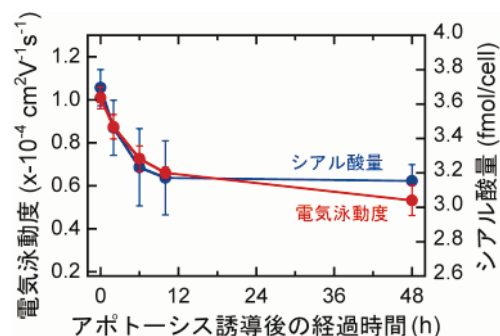


図 2.5-5 アポトーシスの進行に伴う細胞電気泳動度およびシアル酸の変化

EPM 変化を実験的に示した(3)。更に 1980 年代には、Makino らがコロイド物理学を応用して、がん細胞の EPM 変化の要因には表面負電荷密度の上昇だけでなく、糖衣の構造変化も寄与することを報告した(4)。しかし、細胞 EPM の重要性は、細胞 EPM の信頼性の高い測定が困難であるという技術的課題によって、長期間理解されてこなかった。最近、マイクロキャピラリー電気泳動(μ CE)チップを用いた細胞電気泳動システムが開発され、従来の細胞電気泳動装置では困難だった細胞 EPM の高スループットで正確な評価が可能であることが報告されている(5)。Akagi らはこのシステムを用いて、細胞周期(図 2.5-4)やアポトーシス(図 2.5-5)の進行に伴う細胞 EPM の変化を見出し、特に後者においてはシアル酸の減少がそのメカニズムであることを報告した(6,7)。細胞 EPM は細胞の状態を反映する良い指標となる可能性がある。

細胞 EPM を指標にした細胞分析法は CD 抗原などを指標にした従来の細胞分析法と比べて分子特異性が不十分であると考えられるため、そのまま iPS 細胞の分析に応用できる可能性は低い。しかし、他の物理的指標を組み合わせることで、より正確な細胞評価法を構築ができる可能性があり、将来的には iPS 細胞の分析に応用できるものと見込まれる。

- (1) S. Levin, *et al.*, *Biophys. J.*, 42, 127-135 (1983)
- (2) H. Ohshima, *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.*, 130, 281-282 (1989)
- (3) T. Yamada, *et al.*, *Jpn. J. Exp. Med.*, 42, 377-388 (1972)
- (4) K. Makino *et al.*, *Biophys. Chem.*, 47, 261-265 (1993)
- (5) F. Omasu *et al.*, *Electrophoresis*, 26, 1163-1167 (2005)
- (6) T. Akagi *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 45, L1106-1109 (2006)
- (7) T. Akagi *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 39, 2433-2442 (2008)

2.5.2.5 小括

細胞表層の物理化学的特性分析技術は未だ発展途上の技術であるが、抗体やリガンド等の結合という確率論に基づく不確実性の要素が無く、物理量の絶対値計測も可能となる。従って、一度システムが出来てしまえば、どこでも同じ基準で分析することが可能という利点がある。

iPS 細胞等幹細胞の評価に、細胞表層の物理化学的特性分析技術を適応するためには、得られた物理量と生理学的な状態との対応づけが必要となる。従って、今後は積極的に iPS 細胞等、特定の細胞に特化して集中的にデータを蓄積することが、信頼性の高い分析技術として確立するために必要だと考えられる。

細胞表層に存在する分子の情報は、従来細胞の判別に利用されてきた。例えば、iPS 細胞ではアルカリフォスファターゼが細胞表層に存在しているため、その基質あるいは抗体を AFM チップ上に修飾することによって、比較的容易な検出が可能である。この方法論により、iPS 細胞であるかどうか、或いは iPS 細胞から分化が進行しているかの判別ができると思われる。

更に、細胞表層の分析技術はそれぞれ独立した技術であり、お互いに干渉しないため、細胞に関する複数のパラメーターを得ることが可能であり、分析の信頼性を高めることができると考えられる。

2.5.3 iPS 細胞の形態的分析技術

2.5.3.1 概要

従来の細胞分析は、タンパク質等のマーカー分子をラベル化した後で光学的に検出する分子特異的な手法が利用されている。しかし、分子特異的な手法は細胞に影響を及ぼすため、iPS 細胞や ES 細胞を使った治療や薬物スクリーニングには利用できない。最近、細胞の形態から細胞の種類や状態を解析する手法について研究が進んでいる。実際、多くの研究室で、ES 細胞や iPS 細胞の培養を行う際には、目視による形態的なスクリーニングを実施しており、形態解析の自動化の要請は強い。本節では、iPS 細胞の解析に適応可能なイメージング技術について述べる

2.5.3.2 細胞イメージング

iPS 細胞の作製や分化誘導に関する基礎研究において細胞をイメージングする場合には、現行の分析手段の使用が可能である。しかし、iPS 細胞を医療や産業に応用させる場合は、細胞に影響を及ぼさない非侵襲的な手法で分析する必要がある。ここでは、形態画像解析に基づく、細胞の評価技術について述べる。

細胞の形態に関する情報を取得するには、多くの方法がある。X線、MRI、超音波などを用いた方法は侵襲性が低いため、ヒトの臨床画像診断にも用いられている。しかし、これらの手法はマクロ観察には適応できるものの、解像度が低いため、細胞1個のレベルの評価に利用するのは困難である。一方で、光を使った手段は安全であり、分解能も十分で、マウスなどの *in vivo* イメージングから1分子レベルの観察まで、広く利用されている。

光学的手段によって形態情報を得るためには、試料に対してなんらかのコントラストを形成させる必要がある。一般に細胞は可視光領域では無色透明であるため、単に裏面から可視照明光を照射しても、満足のいくコントラストのついた画像を得ることはできない。そこで、細胞内の屈折率の差を強調して画像化するために、位相差法、微分干渉法、モジュレーションコントラスト法などが開発されている。この他には、あまり一般的ではないが、暗視野法、偏光法もある。暗視野法は散乱光を検出するもので、精子鞭毛の観察に使われている。偏光法は生体分子の配向状態を観察できるもので、細胞膜や細胞分裂時の紡錘体が明瞭に観察可能である。偏光法とは原理は異なるが、分子の配向状態を検出できる顕微鏡として第2高調波顕微鏡もある。これらのコントラスト形成法は、いずれも iPS 細胞の画像形成に使用できると考えられる。

細胞生物学研究において最もよく用いられるイメージング手法である蛍光法は、上述したとおり、細胞の染色操作を避けるのであれば使用は限定される。しかし、無染色であっても細胞は自家蛍光を発することが知られており、自家蛍光画像の取得は可能である。

光学的手段の中でも可視光以外を用いるものに、赤外分光法がある。適切な波長の

赤外光を使用すれば、コントラストのある画像を取得できる可能性はある。赤外分光などの、分子振動分光領域に関係するラマン散乱顕微鏡、Coherent anti-Stokes Raman Scattering(CARS)顕微鏡法などの利用も考えられる。

光学的手段以外の画像取得法も考えられる。代表的なものは、AFM に代表される走査プローブ顕微鏡である。走査プローブ顕微鏡の場合、プローブによるサンプルの破壊が問題になるが、これを防ぐ手段があるのであれば、使用できる可能性がある。特に形態情報だけを取得する AFM でなく、走査型イオン伝導率顕微鏡などは、細胞機能を 1 細胞レベルで検査することができる可能性がある。

2.5.3.3 コロニー単位の分析技術

目視観察によるコロニー全体評価法は広く行われており、コロニー単位での画像解析による分析は比較的容易である。コロニー解析の場合は、まず視野の中でフィーダ細胞領域とコロニー細胞領域を分別する必要がある。すでにコロニー単位でヒト ES 細胞において、市販の画像解析システムで位相差画像に基づき、細胞領域全体をフィーダ領域、未分化 ES 細胞領域、分化 ES 細胞領域の 3 つに分け、さらに ES 細胞領域の面積を時系列的に測定して ES 細胞の増殖度を測定している例がある(1)。コロニー内の細胞が均一であるという前提に立てば、コロニー全体を評価すれば十分であり、さらに万全を期す場合には、コロニーの一部の細胞を破壊して生化学的、分子生物学的に検査すればよい。一般的にフィーダ細胞と ES 細胞を分別し評価するのに有効なのは、テキスチャー解析とコロニーの形状解析であるとされている(2)。未分化のコロニーは鮮明で円形の境界を持った、均一でタイトなテキスチャーを持つ。一方、分化したコロニーは、ヘテロジニアスで、内部には、緩くて広い細胞をもち、境界は拡散して、円形が失われている。

(1) S. Narkilahti, BioMedical Engineering Online 6, 11 (2007)

(2) R. Mangoubi, BioForum Europe 7-8, 22-24 (2008)

2.5.3.4 1 細胞分析技術

コロニー単位の分析に比較すると、細胞単位の分析は格段に難しい。コロニーの中の細胞ひとつひとつを認識してその特性を非侵襲で分析することは、現在の顕微鏡観察法では大きな挑戦である。これまで、ほとんどの細胞単位の解析は蛍光染色を実施しフローサイトメーターで行われてきた。細胞が 2 次元に分散している状態であれば、同様な解析がイメージサイトメーターで可能である。さらにコロニー状態であってもコンフォーカル顕微鏡によって 1 細胞レベルの観察を行うことができる。非破壊な検査のアプリケーションとして iPS 細胞と類似しているのは、生殖医療の領域である。体外受精時に卵母細胞の状態を検査する際に、偏光顕微鏡法を用いる方法が提案されている(1)。これは、分裂期の細胞がもつ紡錘体が複屈折性を持つことを利用するものである。紡錘体の複屈折は全ての細胞がもつ性質であるので、分裂期にある iPS 細胞を認識することができ細胞増殖度の検査に適用可能である。医療用途に開発された非侵襲な技術として、2 光子励起法による自家蛍光画像法がある(2)。これは網膜の形態

検査のために開発されたものであるが、細胞 1 個 1 個の内部を観察する能力を持っている。iPS 細胞においてこのような技術が適用された例はまだないが、ヒトの幹細胞において 2 光子励起法を適用した例はある(3)。この論文では同時に第 2 高調波によるイメージングも行われている。これはコラーゲンを可視化したもので 1 個 1 個の細胞の形態を観察することができる。さらに、まったく新しい手法として、Angle-resolved low-coherence interferometry (a/LCI)による核の計測が提案されている(4)。これはサンプルからの散乱光を干渉法で検出するものである。無染色低侵襲として注目される。

(1) David L Keefe, USP 6,879,713 (2005)

(2) Olivier La Schiazza, J. Biomed. Optics 13, 064008 (2008)

(3) Aisada Uchugonovva and Karsten Konig, J Biomed Optics 13, 054068 (2008)

(4) Kevin J. Calut et al. Biophysical J, 94, 4948-4956 (2008)

2.5.3.5 大規模視野細胞観察技術

細胞の状態を知るために、空間的な 2 次元あるいは 3 次元情報を光学的に取得する場合、18 世紀以来、顕微鏡は基本的に用いられるツールであり、さまざまな利用技術が開発されている。開発された技術は主に、今まで検出できなかった物質を検知する技術、解像力の向上を目指す開発、広範囲の部位を瞬時に観察する技術など様々な物理現象に基づく技術と、画像をデジタル化することにより可能になった情報処理技術がある

大規模画像観察技術を扱うこの節では後者の情報処理の分野について中心に述べる。物理現象を利用した技術では大規模撮影では大きな進歩が見られないからであり、むしろ本調査研究では情報技術との融合が今後有用になると考えられるからである。情報処理技術の特質は高速に大量のデータの処理が可能なこと、人間による観察と異なり、観察者の個人差がないことなどがあげられる。一方、人間には容易な処理であってもアルゴリズムとして記述が困難な処理が多いことも特徴である。

近年、CCD や CMOS などの撮像素子の素子数は飛躍的に増加し、今や 1000 万画素クラスのカメラも珍しくはない。高精細で高速度に撮影する場合、ハードディスクに連続して圧縮せずに記録することは困難であるが、iPS 細胞のような ms レベルでは変化の乏しい細胞が対象であるので、速度は問題とはならない。近傍の細胞と全く同時刻の撮影が必須とされない条件下であればスキニングによる撮影がコストパフォーマンスの点から望ましい。レンズや画像のディストーションは本来望ましくないものであるが、撮影対象の幾何学的形状に対して事前に分かっているものであるので補正可能であれば、大きな問題にはならないであろう。

大量に高精細画像を取得する上で最も重要な点はヒトの眼で観察しないことが前提となる場合があるという点にある。これは顕微鏡撮像ではヒトの眼で観察するのか、CCD や CMOS のような電子的に観察するかで、最適なレンズが全く異なり、その結果、視野や処理速度に大きな影響を及ぼすことになる。

取得した画像が膨大になると、人間がすべて観察、評価することが困難になるので、自動評価技術が必要になる。自動評価の目的はコロニーの活性など測定する評価なの

か、不適切細胞のスクリーニングなのか、培養条件の最適化のためなのか等によってアルゴリズムに要求される要件が異なる。品質評価のためのアルゴリズムは科学的な根拠に基づくものでなければ曖昧さが大きいということも事前知識として必要である。

細胞を大量に大規模の視野で観察する技術は画像処理としてリモートセンシングの技術の適用が可能である。リモートセンシングでは分光画像も標準的となってきた。細胞に与える影響を最小限にとどめるためには細胞の照度の低下も視野に入れて、開発を行うべきである。

2.5.3.6 小括

iPS 細胞の産業化の観点から、その品質管理手法の確立が重要であることは言うまでもない。細胞の評価法の中で、細胞の破壊を伴う生化学、分子生物学的な分析手法は有効であるが、貴重な細胞の一部を分析のために消費することに対する抵抗がある。また、コロニー全体を評価する際に、コロニーの中の細胞の一様性が担保されていない場合は、コロニー全体だけの評価は適当ではない。一般的に行われている、未分化細胞特異的な表面マーカーの蛍光染色観察は、洗浄や、細胞への影響が無視できる場合は可能であるが、できれば避けたいと考えるのが普通である

今回記述した非侵襲な手段のなかでもいくつか問題もある。それぞれの手法において、どこまで非侵襲性が証明されているかは疑わしい。たとえば、可視光や近赤外光照明による細胞の長時間の透過光観察は広く行われていて、一般に細胞毒性は少ないとされているが、全ての波長でどんな強度で光を長時間照射しても影響がないとは言い切れず、安全なしきい値を具体的に設定する必要がある。特に細胞自家蛍光の観察については、強力な励起照射光の毒性を十分に考慮しなくてはならない。

コロニー単位で測定する場合は、機械化自動化は比較的容易であるが、コロニー内の細胞が均一であるという前提が必要である。しかし、もしコロニーが不均一であり、中にひとつでも不健全な細胞が混入してはいけなような場合には、その検査は非常に難しくなる。

今回記述したように非侵襲の顕微鏡細胞画像化法には多くの手法がある。しかし、位相差画像法以外は実際には殆ど適用されていない。同じ位相差法でもブライトコントラスト、ダークコントラストに分類され、それぞれコントラストの強弱がある。また、微分干渉像のコントラストは位相差法とは全く異なり、さらにコントラストの付きかたも顕微鏡メーカーごとに微妙に異なることが知られている。これらの画像形成法のうち、どのような手法が iPS 細胞の評価において最良であるかについての議論はまったくされていないため、今後の課題である。

2.5.4 細胞の新規分析技術

2.5.4.1 概要

iPS 細胞や幹細胞の産業応用に要求される細胞分析技術は、これまで重視されていなかった非破壊的な細胞計測手法により構築されることが重要である。前項までに紹介した細胞表層および細胞形態ではない非破壊計測について紹介し、その応用可能性について述べる。

2.5.4.2 表面増強ラマンによる細胞表面タンパク質の分析

iPS 細胞など幹細胞を、ダメージ少なく生きたまま観察・評価を行う手法として、蛍光分析などの分光学的手法が、一般的な低破壊方法として注目される。しかし蛍光標識抗体を用いた標的マーカー分子の検出では、蛍光の消光や退色という大きな問題点がある。強い光照射による細胞へのダメージも無視できない問題である。ラマン散乱分光法では消光現象がない、蛍光標識法に比べて分子の識別能力が高いという利点がある。しかし、その感度は低く細胞表面の測定への適用は非常に困難であった。最近、高感度化のために、ラマン散乱光の強度が最大で 10 桁以上増強する表面増強ラマン散乱 (SERS: Surface Enhanced Raman Scattering) を利用した分光法が提案されている(1,2)。SERS 分光を用いると、低破壊で生体組織や細菌などのタンパク質分子ひとつの識別が可能になると期待され、世界中で研究開発が展開されている。

Sujith らは、SERS 分光法を用いて、生きている細胞の表面にあるタンパク質を、数秒程度で迅速に *in situ* で測定する方法を開発した(3)。SERS 分光法では、金、銀などの表面で分子のラマン散乱光の強度が増大する現象を利用する。伊藤らは酵母細胞表面に銀のナノ粒子を吸着させて SERS 現象を実現し、高感度でラマン散乱の測定することに成功した。生きた酵母細胞の表面に銀ナノ粒子 (平均直径 40 nm) を吸着させてレーザー光を照射したところ、銀ナノ粒子付近に SERS 現象によって増強されたラマン散乱光の輝点が観測された。測定された SERS 光は銀ナノ粒子に吸着した単一タンパク質分子の揺らぎによって生じると推察される点滅現象を示した。顕微鏡を用いて一つの銀ナノ粒子付近からの SERS 光のスペクトル測定を、励起レーザー光 (波長 532nm) の照射強度 15 W/cm^2 で行なったところ、測定時間 1 秒でスペクトル測定が可能であった (図 2.5-6)。従来の細胞のラマン散乱分光の際のレーザー光照射条件 ($\sim 10^5 \text{ W/cm}^2$ 、 $\sim 300 \text{ s}$) に比べて、はるかに微弱かつ短時間の照射であり、細胞にとって穏和な条件である。生きている細胞を測定する際に、細胞への影響を極力抑えることは非常に重要な課題である。金属粒子の除去など細胞への侵襲性という意味で解決すべき課題は残るが、動物細胞、ヒト細胞への応用も期待されるものであり、表面マーカータンパク質の検出法として非常に有用な方法に発展する可能性がある。

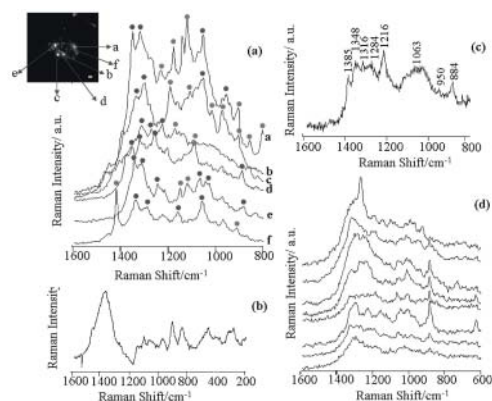


図 2.5-6 銀ナノ粒子を吸着させた酵母の SERS 光画像と SERS スペクトル. スケールバーは $1\mu\text{m}$. スペクトル a から f は、画像中の a から f で示した輝点の SERS スペクトル.

- (1) K. Kneipp, *et al.*, J. Phys.: Condens. Matter, 14, R597-R624 (2002)
- (2) C. Eliasson, *et al.*, Spectrochim. Acta A, 61, 755-760 (2005)
- (3) A. Sujith, *et al.*, Appl. Phys. Lett., 92, 103901 (2008)

2.5.4.3 細胞タンパク質の力学検出

細胞の解析・分析において最も有効と考えられるマーカー分子はタンパク質である。タンパク質の検出には一般的に抗体が利用され、蛍光を用いた細胞の免疫染色法が最も多く用いられる手法である。抗原-抗体分子間の相互作用は機械的に破断することが可能であり、原子間力顕微鏡や光ピンセットを使用し、機械的に1分子の相互作用を破断するのに要する力の測定が多く行われてきた(1,2)。現在では生きた細胞のタンパク質の力学的な検出が可能となってきた。

細胞表面の受容体、あるいはこれに結合するリガンドは細胞の活動において非常に重要であり、細胞の状態、性質を良く表現するマーカー分子である。KimらはAFMを用いてCHO細胞の表面に存在するプロスタグランジン受容体の分布と発現量を解析することに成功している(3)。

最近では米国MITのLeeらが、抗体を修飾したAFM探針を用いたトポグラフィ測定と同時に引カマッピングが可能な機能認識イメージングによって細胞上の個々の受容体の像を撮影することに成功した(図2.5-7)(4)。血管内皮細胞には血管新生に重要な関わりを持つVEGFの受容体であるVEGFR-2を発現していることが知られている。抗VEGFR-2抗体修飾AFM探針を用いて生細胞と固定化細胞上のVEGFR-2の数、分布を解析したところ、細胞あたりの分子数は 1.4×10^5 と見積もられた。VEGFR-2はアクチン繊維に沿って観察されることが多く、血管新生の機能にアクチンが関係していることが示唆された。さらに相互作用破断力を解析した結果、負荷速度11.7 nN/secの時、1個の相互作用を破壊するのに要する力は33 pNであることが示された。また解離速度定数は $k_{off} = 1.05 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ であった。

このように力学的な検出手法では生きた細胞表面のタンパク質の局在性や性質の評価を行うことが可能であり、細胞に特別な標識を行うことなく表面マーカーの同定を行うことが可能になってきている。産総研の中村らのグループでは、マウス繊維芽細胞の骨格筋分化過程において発現するIGF-IIリガンドのIGF-IRへの結合を抗IGF-II抗体修飾AFM探針を用いて力学的に検出することに成功した(図2.5-8)(5)。本方法によって、生きた細胞の分化過程を追跡調査することが可能であり、iPS細胞をはじめとする幹細胞の分化状態、

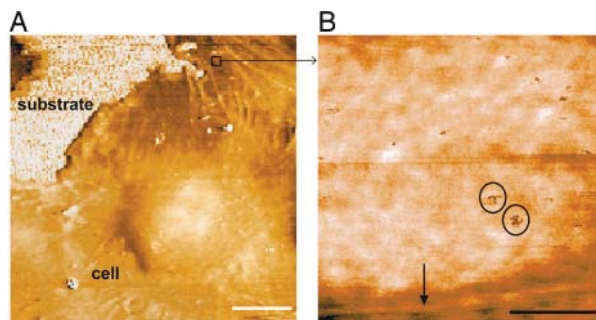


図 2.5-7 生きたヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) 表面の受容体分子のイメージング (A)生きた HUVEC の AFM 位相像 (B)A の□の部位を拡大した機能認識イメージング. 黒く見える箇所が VEGFR-2 の発現部位(スケールバー, A: 10 μm , B: 500 nm)

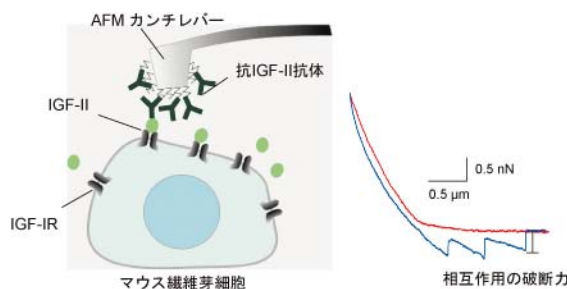


図 2.5-8 骨格筋分化過程における自己分泌シグナルリガンド分子の受容体結合の力学検出の模式図と観察されるフォースカーブ

脱分化状態をリアルタイムに評価出来ることが示されている。

抗原-抗体反応は特異性が高い一方で、その非特異的な吸着を抑える方法が課題となる。AFMを用いた力学的相互作用検出では、プローブの動作速度を変化させることによって、非特異的吸着力との差を増大させることが出来る。また、細胞への分子修飾をせずに細胞を評価することが出来ることから非常に安全な細胞評価方法であると言える。最近では、100 nmのスケールまで先鋭化されたAFM探針を抗体修飾し挿入することによって、細胞を殺さずに細胞内部のタンパク質を力学的に検出する技術も開発されており、細胞の内外を問わず、生きたままタンパク質を力学的に検出することが可能になってきている。

- (1) P. Hinterdorfer, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 93 (8), 3477-3481 (1996)
- (2) F. Schwesinger, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 97, 9972-9977 (2000)
- (3) H. Kim, *et al.*, Ultramicroscopy 106, 652-662 (2006)
- (4) S. Lee, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 9609-9614 (2007)
- (5) S. Han, *et al.*, J. Mol. Recog. (submitted.)

2.5.4.4 ナノファイバーによる細胞内照明技術

ひとつの生細胞内で、ある特定の生体分子やシグナル経路を直接検出することにより、細胞集団全体の平均測定値からは得られない新しい情報を知ることが出来る。Vo-Dinhらは光ファイバーを細胞に挿入し、生体分子を検出する技術の開発を行っている(1)。シリカ製の光ファイバーを引き伸ばして先端の直径が50 nm以下のナノファイバーを作製し、光の漏出を防ぐために側面を銀で被覆する。銀コート後の最終的なプローブの直径は150-250 nmである(図2.5-9)。この微小プローブ表面に抗体や酵素基質などを固定化して細胞へ挿入し、細胞内の生体分子検出を行っており、発ガン性物質

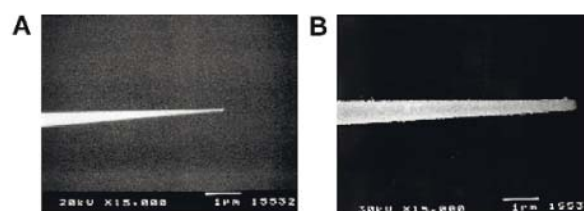


図 2.5-9 ナノファイバーの SEM 像. A: 銀コート前 B: 銀コート後

benzo[a]pyrene (BaP) の代謝物である benzopyrene tetrol (BPT)をターゲットとした検出方法が報告されている。BPT 検出は、BaP の暴露による DNA 損傷をモニターするのに有用な技術である。プローブ表面に BPT 抗体を共有結合により固定化後、ラット肝臓由来の

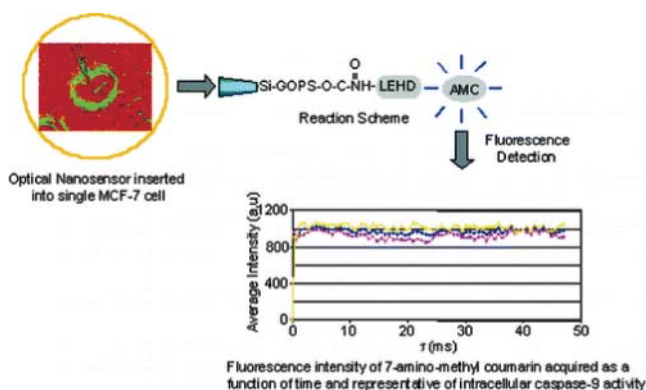


図 2.5-10 細胞内カスパーゼ-9 の活性測定

上皮細胞へ挿入し 5 分間反応させた後、HeCd レーザーにより励起光を照射してプローブ上の抗体に結合した BPT の蛍光検出を行っている。その結果、 $9.6 \pm 0.2 \times 10^{-11}$ M の BPT を検出することに成功しているが、BPT の蛍光測定は細胞からプローブを抜去した後に行っており、細胞内で直接標的分子を検出したものではない。

細胞内で物質検出を行った例としては、プローブ上に酵素基質を固定化し細胞内の酵素反応を検出する方法について報告している(2)。アポトーシスはカスパーゼ-9 が活性化されて引き起こされる。微小プローブを用いて細胞内でのカスパーゼ-9 の活性測定を行うことでアポトーシスの開始を検出している。プローブ表面にはカスパーゼ-9 の基質となるペプチド 4 残基に蛍光物質 AMC を結合させた配列を共有結合により固定化しており、カスパーゼ-9 によりペプチドが切断されて生じる遊離 AMC の蛍光測定を行うことでカスパーゼ-9 活性を測定している (図 2.5-10)。アポトーシス刺激を与えた後のヒト乳ガン細胞 MCF-7 の細胞質にプローブを挿入し、蛍光量の経時変化を測定した結果、1 個の MCF-7 細胞内でのカスパーゼ-9 活性を検出することに成功している。

(1) T. Vo-Dinh *et al.*, Nat. Biotechnol., 18, 764-767 (2000)

(2) P. M. Kasili *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 126, 2799-2806 (2004)

2.5.4.5 1 細胞 NMR

NMR(Nuclear Magnetic Resonance)とは、ある磁場の中に磁気モーメントを有する原子核により標識された物質をおき、共鳴条件を満たす周波数の電磁波を印加したときにおこる共鳴現象を観測するものである。この NMR スペクトルから分子を構成する原子同士のつながりを解析することが出来る。

生体分子の多くは水分を多く含むため固体 NMR 解析ではその解析が不十分なものであった。しかし、溶液 NMR の研究が進み環境ホルモンであるビスフェノール A の膜中での結合モデル解析が報告された(1)。さらに、モデルとしてリン脂質二重膜に取り込まれたビスフェノール A と膜分子の拡散過程の同時解析が報告されている(2)。

現在広く用いられている蛍光プローブ法は感度も高く、操作も容易であり有用なイメージング法ではあるが、蛍光プローブを導入するという問題がある。一方、NMR においては標識プローブの導入は不要であり、非破壊なイメージングが可能となる。そこで in-cell NMR spectroscopy の研究が進んできた。Okamura らは、Jurkat 細胞に取り込ま

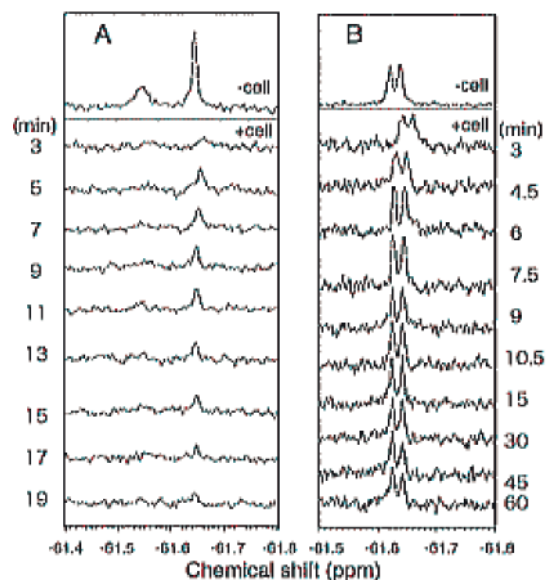


図 2.5-11 蛍光標識 ^{19}F -オクタアルギニン (A) と非標識 ^{19}F -オクタアルギニン (B) のリアルタイム in-cell ^{19}F -NMR スペクトル

れる物質のNMRによるreal-time測定を初めて実現した(図2.5-11)。これは10 μ Mのオーダーにおける1-2分の時間分解能での観測によって可能となった(3)。

NMRの原理を利用した生体分子のイメージング法を特にMRIと呼ぶ。これは、標的となる生体に対してダメージを与えずに、しかも深部まで解析が可能である。Sakaiらは、アフリカツメガエルの卵母細胞に種々のタンパク質を導入し、in-cell HSQC (Hetero-nuclear Single Quantum Coherence)スペクトルを測定することに成功し、細胞内での脱ユビキチン化酵素の活性を検出した(図2.5-12)。これにより、真核細胞内でのタンパク質に対するプロセッシングを解析出来るということが示された(4)。このMRI技術は、さらに幹細胞を用いた細胞医療への応用研究などにも利用されている(5)。

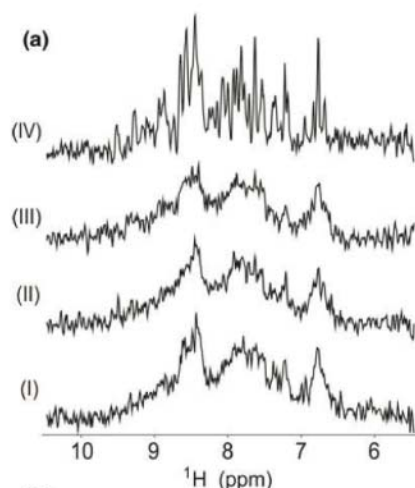


図2.5-12 *Xenopus oocytes*に導入したubiquitin誘導体のHSQCスペクトル

- (1) Okamura E., *et al.*, *Langmuir* 15, 8332-8235 (1999)
- (2) Okamura E., *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, 93, 248101- (2004)
- (3) Okamura E., *et al.*, *Chem. Lett.*, 34, 1064-1065 (2005)
- (4) Sakai T., *et al.*, *J. Biomol. NMR.*, 36, 179-188 (2006)
- (5) Margherita N., *et al.*, *Stem Cells*, 26:505-516(2008)

2.5.4.6 ^{13}C -NMR

蛍光物質を用いた標的物質のトレーシング技術に関する報告は多数なされている。しかし、蛍光物質による標識が代謝に影響を及ぼすという報告がなされている(1)。このような背景から、非破壊な細胞内での動的変化の解析が可能な手法の開発が求められてきた。その一つが、細胞にとって無害な安定同位体 ^{13}C で標識化し、代謝過程をNMR法で追跡する手法である。 ^{13}C -NMR法の利点としては、目的とする物質を幅広く標識し解析出来る点にある。

近年、内因性揮発物質と区別できる安定同位体で例えば ^{13}C 標識化合物を投与し、呼気に排出される標識物質の増減を検出する方法が進展している。これは、胃癌の原因菌とされる*Helicobacter pylori*の尿素呼気テスト(urea breath test, UBT)用の感染診断用剤 ^{13}C -尿素が薬価収載されたことから推測される(2)。同位体効果の小さい ^{13}C を用いた解析手法は、安全かつ有用で、放射線規制がない等の特徴があり今後の展開が期待される。

Chikayamaらは動植物に無害な標識法として ^{13}C を用いてモデルとして無脊椎動物のカイコに適用し、標的となる代謝産物を広範囲にわたり標識することに成功し、50種

類以上の代謝産物の同時検出が可能となった。さらに、異種核多次元NMR計測に発展させることにより、多種多様な代謝産物を同時に計測する手法を開発した(3)。その情報を基に代謝経路レベルでの変動パターンのマップを得ることができ、カイコにおいて蛹への変態前でのアスパラギンなどの代謝産物群の循環および変動が示された(図2.5-13)。

Tianらはこの技術を植物細胞の解析にも応用した(4)。シロイヌナズナの葉緑体を持たないアルビノと野生株との比較を代謝産物レベルで比較したところ、グルタミン酸などのアミノ酸が野生株の5-15倍も多く蓄積されることが示された。また、同時に代謝産物の生成に関わる遺伝子の発現量をDNAアレイにより解析し、その関連性を明らかにした(図2.5-14)。このように、 ^{13}C を用いた多次元NMR測定は動植物を非破壊でその細胞内の動的変化を解析する手法として期待される技術である。



図2.5-13 ^{13}C 標識NMR解析によるカイコの変態前後での代謝経路マップ

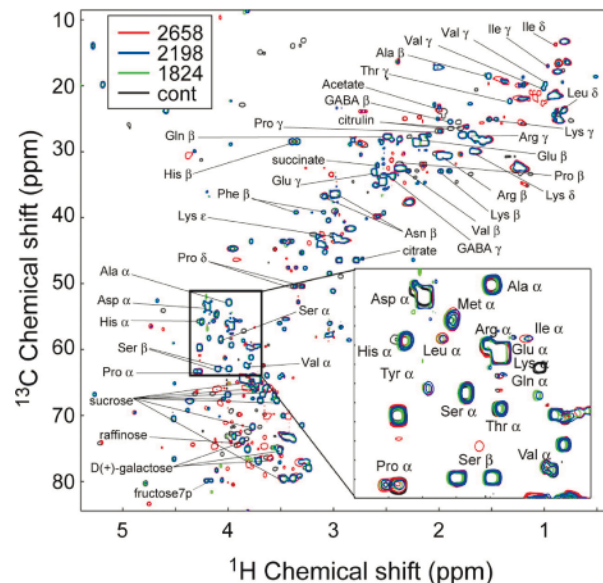


図2.5-14 野生株とアルビノ3株の ^{13}C -HSQCスペクトルの比較

- (1) Okamura E., *et al.*, *Chem. Lett.*, 34, 1064-1065 (2005)
- (2) Kajiwara M., *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 45, 741-743 (1997).
- (3) Chikayama E., *et al.*, *PLoS ONE*, 3(11):e3805 (2008)
- (4) Tian C., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 282(25):18532-4 (2008)

2.5.4.7 小括

本節では、電磁気学的特性による非破壊な細胞分析技術について紹介した。これらの技術は、細胞分析に利用する試みが開始されたばかりであり、細胞機能との関係については殆ど明らかにされていない。更に、大規模の装置を必要とし、複数の細胞を短時間で測定できるような高効率な分析手法ではないため、iPS細胞の評価にすぐには使える技術ではない。しかしながら、今後、装置の発展に伴って使いやすい技術も出てくると思われる。その際には、iPS細胞の評価への応用可能性について検討すべきである。

2.5.5 遺伝子診断技術 (異常染色体・エピジェネティクス分析)

2.5.5.1 概要

iPS細胞を医療や産業分野で実用化するためには、研究段階よりもはるかに高いレベルで安全な細胞作製技術を確認することが重要である。そのためには、iPS細胞の作製プロセスや分化誘導において、そのメカニズムを遺伝子発現プロファイルに基づいて解明し、安全で高効率な細胞作製プロセスを確認することが必要となる。本項では最新の遺伝子診断技術について紹介し、iPS細胞の産業応用に必要な技術的課題について述べる。

2.5.5.2 遺伝子マイクロアレイ

ヒトにおいては、遺伝子数は20000以上と言われる。その中でも疾病に関する遺伝子は、数千種類はありと見積もられ、これらを網羅的にしかも迅速に解析出来る手法が求められている。DNAアレイは、全ゲノム解析が終了する以前から発明され利用されてきた。当初は、ゲノムシーケンスへの応用が期待されたが、その後のシーケンス技術の発展によりシーケンスへの応用は衰退した。しかしながら、簡便に遺伝子発現プロファイルを解析出来ることから今なお中心的な手法の一つである。DNAアレイの欠点の一つにその感度が低いことが挙げられる。具体的には、供試する試料の数%から多くても十数%としかハイブリダイゼーションしないといわれている。そこで、DNAアレイの登場以来今日までその感度向上のための研究が行われている。

Koharaらは、平面基板を用いて作製してきたDNAマイクロアレイをマイクロビーズを用いることによりハイブリダイゼーション効率が向上するか検討した(1)。一方、TojoらはDNAを固定する固相として紐状のファイバーを用いている。このBio-strandと呼ばれるプローブが固定化された糸をさらに中空管に巻き付けてその中に標的のサンプルを流すことにより同様にハイブリ効率の向上を達している(2)。

また、平面基板においても表面処理を行うことによりハイブリ効率の向上を目的とした研究もなされている。バックグラウンドノイズを低減させることによる高感度化が検討されている。Yalconらは、DMA-NAS-MAPSという共重合体をDNAアレイ基板に

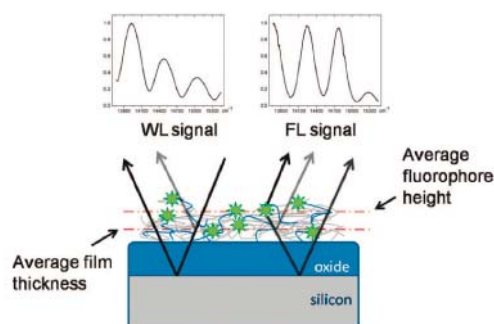


図2.5-15 膨張性コポリマーを用いたアレイ作成の模式図

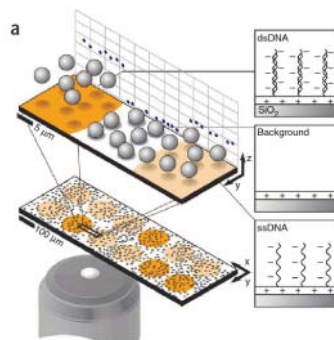


図 2.5-16 荷電粒子を用いた高感度 DNA マイクロアレイの概略図

修飾することにより固定化プローブの結合サイトを7 nm以上の範囲に拡張する手法を開発しDNAのハイブリ効率が向上したことを報告している(図2.5-15)(3)。また、表面処理によるものとしてKinoshitaらは、脂質2重膜を模倣したMPCポリマーを開発しこれをDNAアレイ上に修飾することにより非特異的な吸着を抑制し検出感度を向上させた(4)。さらに、検出するための標識として蛍光ではなく荷電粒子を利用したものなども報告されている(図2.5-16)(5)。このように、DNAアレイは技術の進展がさらに続いているものであり、今後の応用展開が期待される。

(1) Kohara Y, *et al.*, *Nucleic Acids. Res.*, 15;30(16):e87 (2002)

(2) Tojo, R., *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 102:474-477 (2007)

(3) Yalcin A., *et al.*, *Anal. Chem.*, (2008)

(4) Kinoshita K., *et al.*, *Nucleic Acids. Res.*, 35, e3 (2007)

(5) Nathan G. C., *et al.*, *Nat. Biotech.*, (2008)

2.5.5.3 細胞アレイ解析

ポストゲノム時代を迎え、細胞を群としての一団としてではなく1細胞レベルでの解析が求められてきている。このような細胞診断・細胞医療を目的とした細胞解析システムの重要性は益々増大している。1細胞解析は、2000年辺りを始まりとして数多くの報告がなされている。従来の1細胞解析デバイスは、細胞をアレイ上に配列することにより多くの細胞を一度に解析することに重点が置かれていた(1)。しかし、近年では1細胞を解析するに止まらず、その後の経時的な解析あるいはその他への応用のために解析後の細胞を分取したいという要望が高まっている。

このような、1細胞解析とその後のソーティングを可能にした細胞アレイは2002年に報告されている。ソーティングを可能にするためには捕捉力のオン・オフを外部からの作用によって制御出来る必要があ

った。Voldmanらは、誘電泳動力を細胞の捕捉力として応用することによりこれを実現した(2)。しかし、本報告では細胞アレイとはいえ8細胞を同時に捕捉・検出するものであった。アレイの最大の特徴は、多くの細胞を同時に解析出来ることにあるため、その後はアレイの高密度化が進んでいる(3)。2005年には同じVoldmanらによって、誘電泳動を利用した4×4の細胞アレイ、さらにHuntらによって同じ誘電泳動力を用いてIC(Integrated Circuit)とマイクロ流路を組み合わせることで数千個の細胞を対象とした細胞アレイが報告された(4)。

誘電泳動力を利用したデバイスは、

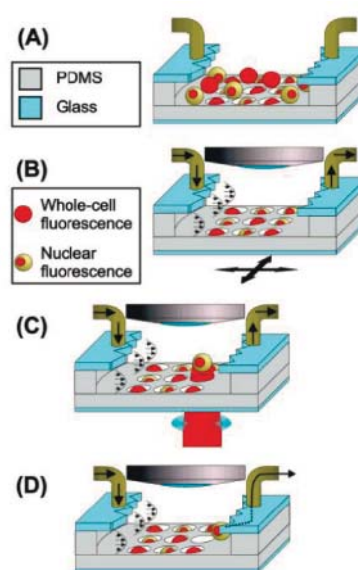


図 2.5-17 赤外レーザーピンセットを利用した細胞アレイのソーティングの概要

その性質上周辺機器が大型になり、さらには接着細胞には不向きであるという欠点が指摘されていた。そこで、Kovacらは誘電泳動に代わるものとしてマイクロウェルと光学システムを応用した細胞アレイを開発している(5)。これによれば、細胞の捕捉力としてはマイクロウェルをソーティングする際には、赤外線レーザーピンセットを応用することでマイクロウェル内に捕捉された細胞を選択的にソーティングすることを可能にしている。また、本デバイスによれば細胞のソーティングに要する時間は数十秒であり従来のマイクロマニピュレーターを用いた方法と比較しても格段にスループット性は向上している。

- (1) Yang M. *et al.*, *Anal. Chem.*, 74: 3991-4001 (2002)
- (2) Voldman J. *et al.*, *Anal. Chem.*, 74:3984-3990 (2002)
- (3) Taff BM, *et al.*, *Anal. Chem.*, 77, 7976-7983 (2005)
- (4) Hunt TP, *et al.*, *Lab Chip*. 8, 81-87 (2008)
- (5) Kovac JR, *et al.*, *Anal. Chem.*, 79, 9321-9330 (2007)

2.5.5.4 ギガ/テラシーケンサーによるエピジェネティクス分析

特定の遺伝子の発現量を指標にして、iPS細胞を選別する手法が研究されている。その際、指標として用いる遺伝子によって異なる表現型の細胞集団に分画されることが知られている。例えば、Nanog発現量が多い細胞群は、Fbx15発現量が多い細胞群と比較して、遺伝子発現パターンやDNAメチル化パターンがES細胞に近く、生殖細胞にも分化可能なiPS細胞が得られる(1)。従来、遺伝子発現量を制御する要因として遺伝子多型によるタンパク質変異が知られていたが、最近、クロマチンへの後天的な修飾により遺伝子発現を制御しているというエピジェネティックな変異の重要性が明らかになってきた。従って、遺伝子発現量を指標にしてiPS細胞を選別する場合、エピジェネティックな要因で制御されている遺伝子発現量の差異を解析することが必要である。

エピジェネティックな要因の解明を目的として遺伝子発現を解析するためには、塩基配列を解読することが重要である。現在発売されているシーケンサーは「ギガシーケンサー」と呼ばれ、

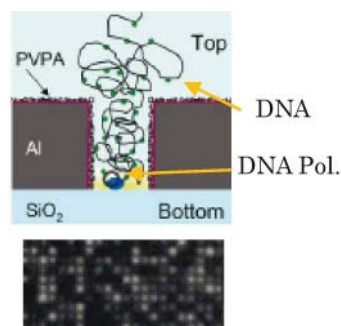


図 2.5-18 ナノ導波路によるシーケンスの模式図と検出画像

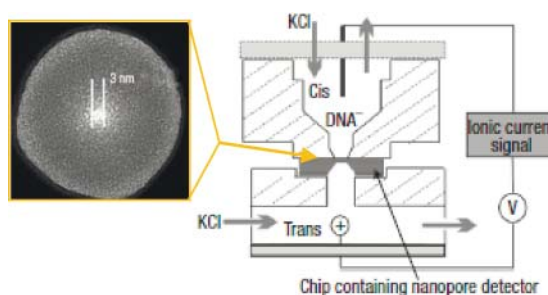


図 2.5-19 ナノポアの電子顕微鏡写真と検出の模式図

最新のものでは1時間に100ギガもの塩基を解読できる。ヒトのゲノムは3ギガ塩基程度なので数分で解読可能であり、将来は「テラシーケンサー」も登場する見込みである(2)。

また、ギガ/テラシーケンサーによる塩基解読と、5' SAGE (5'-end serial analysis of gene expression) 法による転写開始点の探索手法を組み合わせることによって、強力な発現解析ツールとなりうる(3)。5'-SAGE法においてターゲットRNAに付加されるTag配列を、一分子ごとにシーケンスし、配列ごとにカウントすれば、発現プロファイルを正確に得ることが可能となる。

ギガ/テラシーケンサーは既に上市されているもの以外にも、ナノレベルの構造体を応用したものが提案されている。ナノ導波路(4)では、励起光の波長よりも小さい直径のウェル底面にポリメラーゼを固定化する(図2.5-18)(4)。励起光が唯一届く底面近傍において、蛍光標識ヌクレオチドを取り込み、DNAが合成される瞬間にのみ蛍光が観察される。塩基ごとに異なる蛍光分子を用いることでシーケンスを行う。ナノポアでは、DNAの直径と同等の数nmの孔に、DNA1分子のみを通過させ、その際に生じるイオン電流の変化を検出する(図2.5-19)(5)。まだ実用化されていないが、よりハイスループットかつ低コスト化が見込まれており、網羅的な遺伝子発現解析ツールとしての応用も期待される。

(1) K. Okita *et al.*, Nature, 448, 313-318 (2007)

(2) N. Cloonan *et al.*, Nat. Methods., 7, 613-619 (2008)

(3) M. Kasahara *et al.*, Nature, 447,714-719 (2007)

(4) J. Korlach *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A., 105(4),1176-1181 (2008)

(5) J. Li *et al.*, Nature Materials, 2,611-615 (2003)

2.5.5.5 Surface Plasmon Resonance による DNA 解析

Biacoreシステムとは、表面プラズモン共鳴SPR(Surface Plasmon Resonance)の光学現象を応用した、リアルタイムに生体分子の相互作用をモニタリングするシステムである。これに利用されているSPR技術は、センサーチップ表面に固定化されたリガンドに標的となるアナライトが結合した際に生じる微量な質量変化を検出するものである。SPRの特徴としては、従来の蛍光検出とは異なり、標的物質への標識が不要、感度よくリアルタイムにその経時変化をモニタリング可能な点にある。

このSPR技術を応用したDNA解析に関する報告は、DNA-DNAハイブリダイゼーションやDNA結合タンパク質のスクリーニングなど多数ある。Terryらは、SPRを応用することによりRNA-DNA結合を高感度に測定することに成功している(図2.5-20)(1)。これは、基板上に固定化されたRNAに対し、標的となるDNAとともにRNaseHを導入する。これにより、標的DNAが結合した場合にのみ固定化されたRNAが消化される。標的DNAは、消化されずに次のRNAとさらに結合していく。この繰り返しにより、基板上的固定化RNAの重量が減少していき、SPRシグナルが増感されるという手法である。

がんは遺伝子異常の病気であり、がん関連遺伝子の研究は盛んに行われている。中でも、DNAミスマッチ修復(mismatch repair; MMR)機構の異常が発がんのリスクを上げ

ている。特に、MSH2-MSH6heterodimer (MutS α)はG/T ミスマッチや1塩基のループアウト型のみスマッチの修復に非常に重要な働きをしていると考えられている。また、核内増殖抗原である Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)は、DNAポリメラーゼ δ の補助タンパクとして同定され、DNAの複製部位に強く結合することが知られていた。これら MutS α と PCNAの結合に関する状態を SPRにより測定したところ、PCNAの役割として従来の知見と適合する結果が得られるとともに、DNAミスマッチ修復における複製クランプでの他のタンパク質の関与が示唆されるという新たな知見が得られた(図 2.5-21)(2)。従来の SPRセンサはチップ上に標的物質を固定化して用いるため測定対象の自由度が低いものであった。そこでナノ微粒子および光ファイバーを用いた局在型 SPRセンサも開発されている(3)。

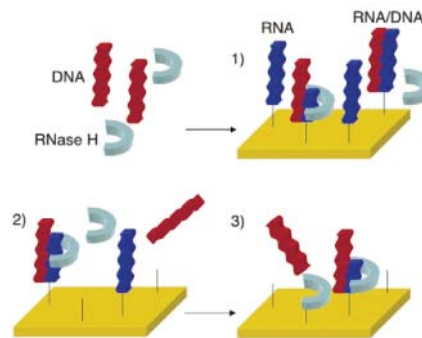


図2.5-20 DNA-RNA結合のSPRと酵素を用いたシグナル増感による検出法の概略

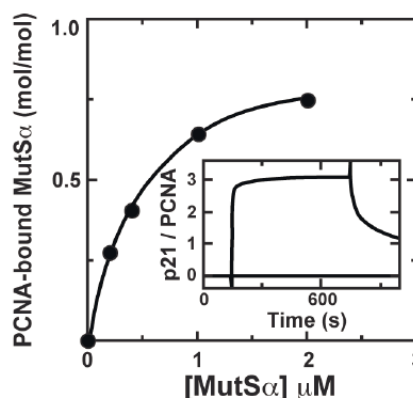


図2.5-21 SPRによる MutS α と PCNA 相互作用測定結果

- (1) Terry T. *et al.*, *Anal. Chem.*, 76, 6173-6178 (2004)
- (2) Ravi R. L., *et al.*, *J Biol Chem.*, 9; 283(19): 13310–13319 (2008)
- (3) Mitsui K., *et al.*, *Appl. Phys. Lett.* 854231- (2004)

2.5.5.6 プロテインチップ技術

プロテオミクス解析はタンパク質の相互作用、量的変化、機能的変化、構造的変化、タンパク質全体のネットワーク解析など広範囲にわたる。そこで、プロテオミクス研究の有用なツールのひとつとして、プロテインチップが注目を浴びている。

従来のプロテインチップは、標的となるタンパク質を DNA アレイと同様に基板上に固定するものであった(1)。しかしながら、このようなプロテインチップでは再現性が乏しいなどの問題点が多く見られた。また、多くのタンパク質は高次構造を形成することによってその機能を獲得するため基板上での機能性維持が問題であった。そこで Kiyonaka らは、超分子のハイドロゲルを用いてのプロテインチップの構築を試みている(2)。これによれば、プロテインチップの欠点である乾燥状態下での反応および観察を回避できるため、乾燥に弱いタンパク質を用いたアレイの構築が可能であることが示唆された。しかし、スポット径は 4 mm と大きく、高密度なアレイ化が課題といえた。

近年、上記のような問題点を克服するために新たなプロテインチップの構築法として無細胞タンパク質合成系を利用した方法が試みられている。本手法は、タンパク質よりも安定なDNAをアレイ化した後に、無細胞タンパク質合成系を用いてアレイ化したDNA由来のタンパク質を基板上で発現させプロテインチップを作製するものである。Ramachandranらは、この無細胞タンパク質合成系を利用したNAPPA(nucleic acid programmable protein array)を報告した。これによれば、目的およびGST-tagの遺伝子を含むプラスミドをビオチン-アビジン反応を介して基板上に固定化する。次に、ウサギ網状赤血球溶血液をスライド上に導入することにより、各々のタンパク質を発現させる。これと同時にタンパク質のGST-tagが基板上の抗GST抗体と結合することによりタンパク質が固定されるものである(3)。これにより、29種類のタンパク質をアレイ化しその相互作用を解析した。その結果、新たに63の相互作用が明らかにされた。さらに、同グループはNAPPAを改変し発現効率を高めたプロテインアレイの構築にも成功している(4)。これによれば、1000種類以上のタンパク質を固定化したアレイの作製に成功し、そのうちの96%のタンパク質が発現していることが確認された(図2.5-22)。

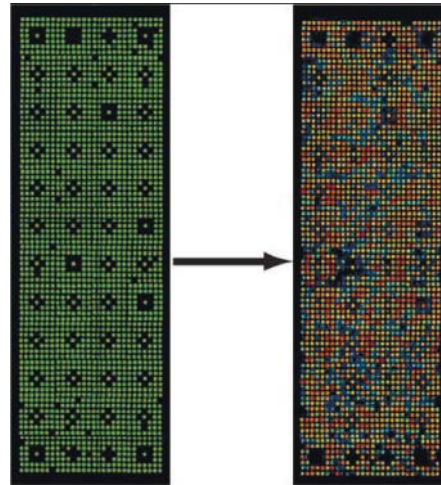


図 2.5-22 1000 種類の DNA をスポットした後に無細胞タンパク質合成系によりタンパク質を発現させたプロテインアレイ

- (1) John W., *et al.*, Clin. Chem. 44 2036-2043 (1998)
- (2) Kiyonaka S., *et al.*, Nat. Materials 3, 58-64 (2004)
- (3) Ramachandran, N., *et al.*, Science 305, 86-90 (2004)
- (4) Ramachandran, N., *et al.*, Nat. Methods 5, 535-538 (2008)

2.5.5.7 トランスポゾンによる脊椎動物の遺伝子機能解析技術

トランスポゾンとは、DNA 上のある部位から他の部位に転移することのできる DNA 塩基配列であり、あらゆる生物種に普遍的に存在する。ただし、脊椎動物ゲノムに現存するトランスポゾン様配列の大部分は転移能が失われている。一方、植物においてはその転移機構や生存に与える影響などの研究が進み遺伝子操作の有力なツールとして発展してきた(1)。しかし、近年、脊椎動物において活性のあるトランスポゾンが報告されたことを始めとして、昆虫由来のトランスポゾン *piggyBac* が種の壁を超えマウス細胞中でも転移することが示された(2,3)。

これらのトランスポゾン研究により、脊椎動物においてもトランスポゾンは遺伝子機能の探索ツールとして用いられるようになった。特にがん遺伝子のスクリーニングに用いられ、多数報告されている(4,5)。

Dupuy らは、Tc1/mariner スーパーファミリーのトランスポゾン Sleeping Beauty (SB) の転移頻度を向上させ、遺伝子破壊による発がん遺伝子のスクリーニングを行った(図 2.5-23)。その結果、マウスにおいて胚段階での死や個体における発がんを誘発させることが可能となった(図 2.5-24)。これらの腫瘍は、遺伝子への SB 挿入に伴う変異によるため、がんの誘導に参与する遺伝子および経路の同定が可能となる。また、SB の転位は制御可能であり、任意の標的組織に変異を導入することができることも分かっている。

上述のトランスポゾン技術はマウスだけでなく、ヒト細胞においても使用可能なので、iPS 細胞の全能性獲得機構の解析や分化誘導に必要な因子のスクリーニングなどに向けた有用なツールとしての応用が期待される。

(1) Itoh, Y. *et al.*, *Mol Gen Genomics*, 269, 49-59 (2003)

(2) Ivics, Z. *et al.*, *Cell*, 91, 501-510 (1997)

(3) Ding, S. *et al.*, *Cell*, 122, 473-483 (2005)

(4) Dupuy, AJ. *et al.*, *Nature*, 436, 221-226 (2005)

(5) Su, Q. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(50),19904-19909 (2008)

2.5.5.8 遺伝子相関解析

ポストゲノム時代として蓄積された遺伝子情報をいかに活用するかが研究の焦点になりつつある。従来は、個々の遺伝子の働きを個別に解析するという研究が主体であった。しかし、単一の遺伝子の発現だけを解析するのでは説明のつかない事象が多く発見されてきた。そこで、関連する遺伝子を網羅的に解析し、その相互の作用を検証する遺伝子相関解析に注目が集まるようになった。これは、従来の分子生物学とコンピューター解析技術を組合わせたシステム生物学という新たな学問を築くまでに至っている。

遺伝子相関解析を用いた研究例の一つに睡眠相後退症候群や季節性情動障害にも関連があると言われている体内時計に関する遺伝子の解析例がある。これまでに、ほ乳類では約20の時計遺伝子候補が報告されている(1)。Matsumotoらは、ショウジョウバエの頭部において時間周期で発現している200遺伝子を同定した。次にRNAi技術を用い

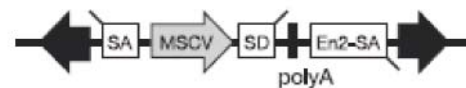


図 2.5-23 トランスポゾンベクター T2/Onc2 の構造. SA: splice acceptor, SD: splice donor, En2: large fragment of the engrailed2, MSCV: murine stem cell virus long terminal repeat.

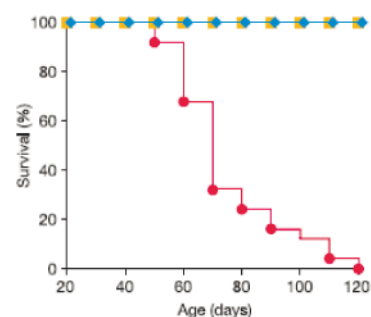


図 2.5-24 トランスポゾン導入マウスの生存曲線. Yellow: RosaSB(positive control), Blue: T2/Onc2(positive control), Red: double-transgenic.

て、各遺伝子の発現を抑制して解析したところ、5つの遺伝子が時計遺伝子の候補となった。さらに、影響が最も大きかった *cwo* 遺伝子を ChIP-on-chip 法を用いて解析した結果、この遺伝子が自身や他の遺伝子を制御していることが明らかになった(図2.5-25)(2)。

24時間という1日単位の変動だけでなく、季節で変動する遺伝子群も遺伝子相関解析により同定されている。*Coturnix japonica*の視床下部内側基底部分における甲状腺ホルモン(TSH)活性化酵素遺伝子発現の誘導である。第一の変化は、長日条件初日の夜明けから約14時間後に脳下垂体隆起部においてみられ、第2の変化はその約4時間後に起こった(図2.5-26)。短日条件下において同ホルモンを脳室内投与すると、性腺の成長と *DIO2* 発現が促進され、それにはTSH受容体-環状AMP(cAMP)シグナル伝達経路が関与していることが明らかになった。これにより、脳下垂体隆起部におけるTSHの増加は、長日によって誘導される季節繁殖の引き金となると考えられた。以上のように、*cwo*遺伝子に相当するヒトの遺伝子や季節変動遺伝子が先の障害と関連するかについては未だ不明であるが障害の診断や治療標的の候補にもなりうる解析結果である。

- (1) Ukai H, *et al*, *Nat Cell Biol.* 9:1327-34 (2007)
- (2) Matsumoto A., *et al*, *Genes Dev.* 21(13):1687-700 (2007)
- (3) Nakao N, *et al*, *Nature* 452, 317-322, (2008)

2.5.5.9 小括

細胞の機能を遺伝子レベルで解明するための遺伝子診断技術について報告した。ヒトゲノム計画以降、遺伝子診断技術は格段に進歩し、高効率で大規模並列的な解析が可能になりつつある。また、解析対象はゲノム配列だけでなく、転写レベル、タンパク質レベル、1細胞レベルと多岐に亘る。更に、システム生物学によるネットワーク

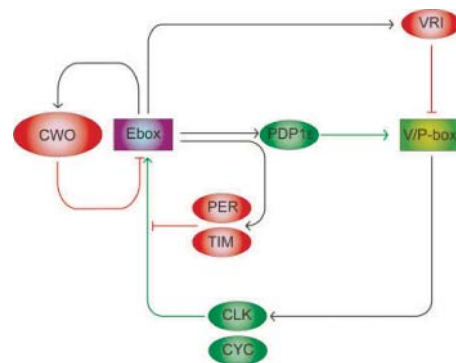


図2.5-25 CWO遺伝子を中心とした時計遺伝子に関する相関解析結果

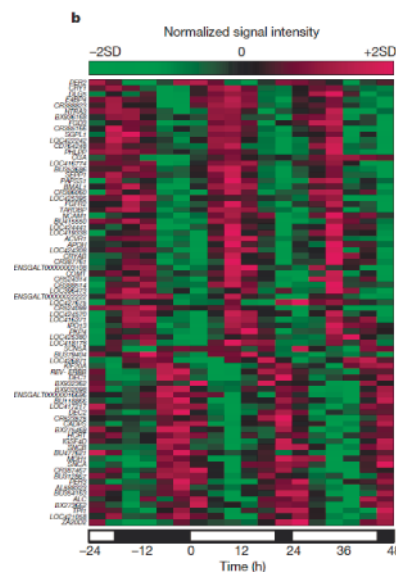


図2.5-26 77遺伝子の時間軸に対するDNAアレイによる発現量比較

解析技術やエピジェネティクス解析技術も着実に成熟しつつある。iPS 細胞や幹細胞の産業応用には、細胞作製や分化誘導を安全で高効率に行うことが必須であり、ゲノム、mRNA、タンパク質を網羅した、1 細胞内における遺伝子発現ネットワークに基づいて iPS 細胞の作製プロセスや分化誘導プロセスを解明することが必須である。現在、各技術はそれぞれ高度化しつつあるが、今後は iPS 細胞のみをターゲットに絞って、ゲノム、転写、タンパク質を網羅的に解析するための融合的な遺伝子プロファイリング技術の構築が必要となるものと思われる。

2.5.6 総括

iPS 細胞・幹細胞の産業応用に要求される細胞分析技術として、非破壊細胞診断のための物理化学的計測技術と、iPS 細胞作製や分化誘導のメカニズム解明のための遺伝子診断技術について報告した。

抗体や蛍光試薬を用いない非侵襲な物理化学的細胞計測はまだ発展途上の技術であり、現在は、分析ツールが開発され、細胞の生理的機能との関係が明らかにされつつある状況である。しかし、これらの技術は抗体やリガンド等の物質による確率論に基づく修飾を要求せず、ハード面が揃えばどのような細胞にでも適応でき、しかもある一定基準の条件下では物理量の絶対値計測も可能となる。一度システムが出来てしまえば、どこでも同じ基準で分析することが可能となる。従って、iPS 細胞等幹細胞に物理化学的計測技術を適応するためには、積極的に iPS 細胞など、特定の細胞に特化して、集中的に分析データを蓄積することが重要である。

また、現在の細胞診断で最もよく利用されている免疫学的方法と比べると、本節で言及したような物理化学的計測のいずれか単独の手法を用いるのみでは、残念ながら状態マーカーとしての特異性において不十分である。しかしながら、iPS 細胞等幹細胞の品質管理には全量検査を実施すべきであり、抗体等を用いた品質管理はコストがかかりすぎるといった懸念もある。物理計測はシステムさえ構築できれば細胞を修飾する必要が無いため、安価で実施可能であり、産業に応用する場合この利点は大きい。また、細胞分析の信頼性については、複数の物理的指標を組み合わせることで計測し、多次元的に評価することによって、より正確な細胞評価法を構築ができるものと考えられ、今後そのような方向で研究開発を行うことが必要である。

iPS 細胞の作製プロセスや分化誘導プロセスを安全にかつ高効率で行うには、そのメカニズムをゲノム情報に基づいて解明することが重要であり、そのための高効率な遺伝子診断技術が必要である。ヒトゲノム計画以降、ゲノム解析技術は格段に進歩しており、高効率で、網羅的な遺伝子発現プロファイル解析が可能となっており、システム生物学による転写ネットワーク解析技術の整備も進んでいる。既に実施されているが、iPS 細胞や幹細胞の作製や分化誘導、がん化などのプロセスを解明するために、ゲノムレベルによるアプローチが必要であると思われる。更に、上述した物理化学的細胞分析技術の実用化には、測定される細胞の物性値がどのようなメカニズムで制御されているか解明することが重要である。従って、物理化学的細胞分析技術と遺伝子診断技術とが密接に連携した研究開発を行うことが望ましいと思われる。

2.6 iPS 細胞・幹細胞の「細胞分離技術」

2.6.1 概要

特定の細胞あるいは細胞群（コロニー）を様々な細胞種が存在する培養状態より分離、分画する工程として、接着性細胞の場合には特に図 2.6-1 に示すように対象細胞あるいは細胞群を「識別」する、容器から「剥がす」、多種の細胞から「選別する」、そして「回収する」という 4 ステップをとり、また、この各ステップの順序としては、二通りの工程を考えることが出来る。識別する方法には、分析、計測に関するものや、対象細胞の特徴を利用して分離のためのタグをつける技術もこれに当たる。また、選別は流れ分画や摘み取る手法があってもよい。現在、各ステップあるいは複数ステップに跨る場合もあるが様々な技術が開発され、装置としてシステム化されているものもある。分離・分画技術の調査においては、現在、細胞あるいは細胞群において実際に使われている技術を明確にすることを目的とした調査を実施し記述した。また、対象細胞の識別については 2.5 節にて報告する分析・計測技術によるところも多くあり、その点は 2.5 節も参照されたい。また、識別し選定する際の細胞目印としてタグをつけることがしばしば用いられるが、この部分は特に重要な技術であるとの認識から、2.6.2 節：細胞マーキング技術として報告する。

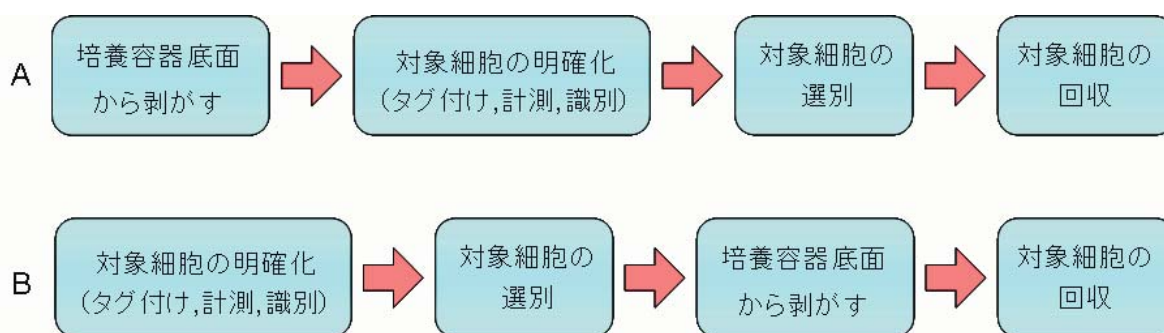


図 2.6-1 細胞分離プロセス

2.6.1.1 マイクロ流路を用いた細胞分離技術

マイクロメートルスケールの細胞分離システムは、流路の大きさが対象となる細胞と同程度であり、流路構造の装置形状を目的に応じて正確に作製できるので、多くの研究者からマイクロ流路を利用した細胞分離システムが提案されている。細胞分離の原理の多くは、誘電泳動、超音波、光ピンセット、磁気等であるが、マイクロ流路で生じる安定な層流系のみを用いて外部からの操作を必要としない細胞分離方法も報告されている。

例えば、ピンチド流路を利用した細胞分離法（PFF 法）が高木らによって報告されている¹。図 2.6-2 に示すように、2つの流路の合流部が部分的に狭くなっており（ピンチ部）、断面が矩形のマイクロ流路を利用する。Inlet 1 からは細胞懸濁液を流し込み、inlet 2 からは溶液のみを導入する。この時、細胞を含まない溶液の流量を、細胞懸濁液の流量よりも大きくすることで、細胞をピンチ部の片側の壁面近傍に整列させて流

すことができる。このときのピンチ部における粒子の通過位置は、大きな粒子と比較して小さな粒子の方が側壁近傍を流れる。次に、ピンチ部の下流の分岐流路では、流れる細胞の位置の僅かな違いを反映して細胞を分離することが可能である。

また、細胞の分離と濃縮を同時に可能とし、さらに複数の流量制御を行う必要のない手法として、水力学的濾過法による細胞分離(HDF法)が山田らによって報告されている²。図2.6-3に示すように、左右に流れる主流路から上下に分岐する支流路が存在すると、分岐点で支流路に流れる

液体の流量をコントロールすることで、支流路に流れ込む細胞を区別することが可能である。図では始めに目的とする細胞のサイズよりも小さい細胞しか流れない支流路を利用して細胞を濃縮し、特定の分岐点のみで細胞を分離することが可能である。この方法は、PFF法のように細胞を含まない溶液を導入する必要がなく、細胞の濃縮が可能であること、そして、細胞よりも大きな流路を用いるので詰まりが起きにくいという特徴がある。

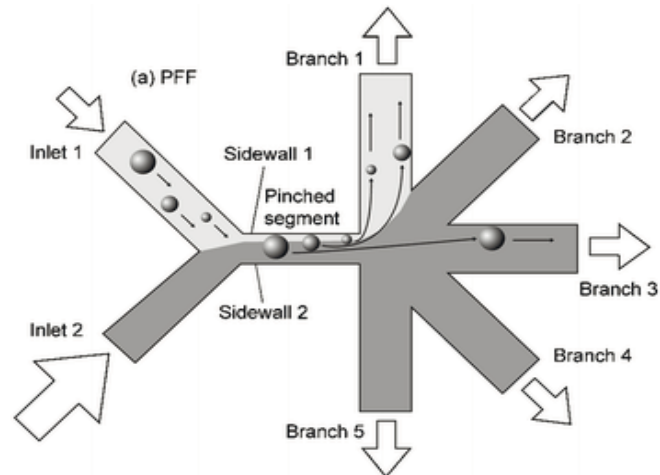


図2.6-2 ピンチド流路を用いた細胞の分離(PFF法) (J Takagi *et al.*, Lab Chip, 5, 778-784 (2005)より)

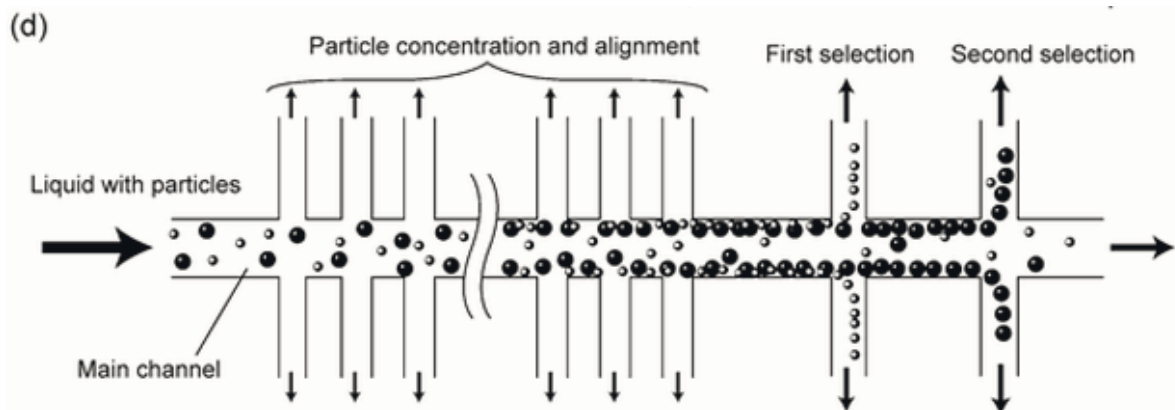


図2.6-3 水力学的濾過法による細胞分離(HDF法) (M Yamada *et al.*, Lab Chip, 5, 1233-1239 (2005)より転載)

(1) J. Takagi *et al.*, Lab Chip, 5, 778-784 (2005)

(2) M. Yamada *et al.*, Lab Chip, 5, 1233-1239 (2005)

2.6.1.2 ポリマーによる細胞剥離制御技術

接着細胞を分離する技術の多くは一度細胞をトリプシンや EDTA など処理することで細胞を培養皿から剥離させ、その後分離するといった工程に入る。しかしながら、接着細胞を培養したまま特定の細胞を選択するためには、目的の接着細胞のみを培養皿から剥離する技術が必要となる。

こうした接着している細胞を培養皿から剥離する方法の一つとして現在取られている方法は、培養皿の改変である。これは培養皿表面の濡れ性を外部からの刺激に応じて変化させることで、特定の接着細胞の剥離を行うものである。

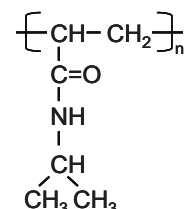


図 2.6-4 PNIPAAmの構造

培養皿表面の濡れ性を変化させる材料として現在用いられているのが、poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)である(図 2.6-4)。

PNIPAAm の下限臨界溶液温度 (Lower Critical Solution

Temperature, LCST)は 32 度であり、この温度以下では水分子がポリマー鎖に結合し親水性を示し、LCST を超えると水と相分離を起こし凝集する¹。さらにこの反応は可逆的であり、再度 PNIPAAm を LCST 以下にすると親水性となる。

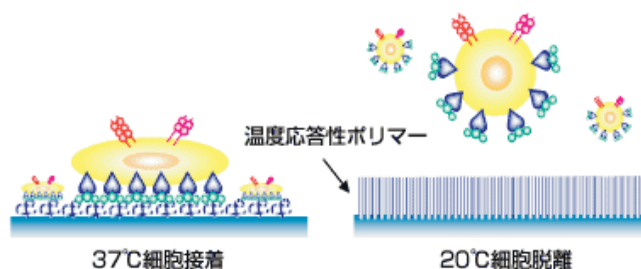


図 2.6-5 PNIPAAmによる細胞接着・脱離制御
(株)セルシード社HPより転載

Okano らのグループはこうした PNIPAAm を培養皿表面にグラフト重合させ、温度制御によって細胞の接着と脱離を行うことが可能であること、細胞の脱離に ATP や細胞内のシグナル伝達、細胞骨格の再構築が必要であることを報告した^{2,3,4}。また、細胞が脱着するにあたり、細胞が沈着した細胞外マトリックスごと培養皿から剥がれることを報告した⁵。このことは、PNIPAAm から細胞を剥離するためには細胞が生存していることが必要であり、かつ細胞外マトリックスを伴って剥離することから、培養皿からの剥離による細胞への侵襲性は極めて低いことを示している(図 2.6-5)。

現在では、培養皿へグラフトする PNIPAAm の厚みの制御により、広範な細胞に対しての接着・脱離を制御することが可能となっている⁶。また、PNIPAAm へ細胞接着ペプチドである RGDS やインシュリンなどの増殖因子を修飾することで、接着・増殖させる細胞を制御する方法が開発されている^{7,8}。さらに、PNIPAAm 表面にビオチンを修飾させることで様々な分子を結合させる方法も開発されている⁹。

また、Kanamori らのグループでは PNIPAAm に光応答性分子を導入することで、温度だけでなく UV によっても表面の濡れ性を変化させることを可能にした^{10,11}。これにより、さらに局所的な場所のみで細胞の接着・脱着の制御を行うことが可能となっている。

このような接着細胞の剥離技術は顕微鏡による細胞観察システムと一体化させることでより高精度にかつ高解像度に接着細胞底面の濡れ性を変化させることで細胞を剥

離させることが可能と考えられる。iPS 細胞およびそこから分化させる細胞の多くが接着細胞であることから、今後はこうした非侵襲的に細胞を剥離する技術によって接着細胞を選別・分離する技術が求められるだろう。

- (1) S. Fujishige, *Polymer J.* 19, 297-300 (1987)
- (2) N. Yamada, *et al.*, *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, 11, 571-576 (1990)
- (3) T. Okano, *et al.*, *Biomaterials*, 16, 297-303 (1995)
- (4) M. Yamato, *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 44, 44-52 (1999)
- (5) A. Kushida, *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 45, 355-362 (1999)
- (6) Y. Akiyama, *et al.*, *Langmuir*, 20, 5506-5511 (2004)
- (7) M. Ebara, *et al.*, *Biomaterials*, 29, 3650-3655 (2008)
- (8) H. Hatakeyama, *et al.*, *Biomaterials*, 26, 5167-5176 (2005)
- (9) M. Nishi, *et al.*, *Biomaterials*, 28, 5471-5476 (2007)
- (10) J. Eda, *et al.*, *Macromolecules*, 6, 970-974 (2005)
- (11) J. Eda, *et al.*, *Biotech. Bioengin.*, Epub ahead of print (2008)

2.6.1.3 フェムト秒レーザーによる細胞剥離制御

iPS 細胞は、細胞誘導に伴って複数の細胞が凝集したコロニーを形成する¹。このコロニー内の特定の iPS 細胞を分離する、或いは iPS 細胞から目的とする細胞を分化誘導した際に目的細胞のみを分離する技術が必要となる。ここでは、フェムト秒レーザー光により単一細胞レベルで細胞を切断し、剥離する技術を紹介し、iPS 細胞の細胞剥離の可能性について述べる。

レーザー光により組織切片の一部を剥離する技術は、レーザーマイクロダイセクション(LMD)法として病理学・がん研究を中心とする研究分野において広く利用されている。レーザー光には短波長の紫外レーザー光源を用いており、蛋白質を光解離することにより、レーザー光の照射領域の細胞全体を破壊することが可能である。しかしながら、紫外線の一光子吸収により加工を行うこの方法では、組織の深部領域の加工、単一細胞レベルの高精度な加工を行うことは難しい。また、紫外光に強い吸収を持つプラスチック製の培養皿を用いることができず、培養実験系に制限が生じる。この問題を解決する技術として、フェムト秒レーザー光を用いた細胞操作技術が近年注目を集めている。

フェムト秒の近赤外レーザーパルス光を対物レンズで集光することにより、多光子吸収を誘起することができる。多光子吸収は焦点近傍でしか起こらないため、焦点以外での光吸収がなく、深部到達性が高いことが利点であることから、細胞のみばかりでなく組織や個体の深部イメージング法として有用性が高い。レーザー光強度を高くすることにより、フェムト秒レーザー光による細胞加工も可能となる。フェムト秒チタンサファイアレーザー(波長: 800 nm、パルス幅: 100 fs、繰り返し周波数: 82 MHz)を神経細胞軸索領域に照射すると、集光点において多光子吸収に基づく数 μm 程度のバブル発生が確認され、軸索が切断される(図2.6-6 (a))。切断箇所以外においても細胞形状の変化が観察され、この変化は細胞内の張力緩和と細胞接着点の破壊によると考え

られる²。さらに、マイクロ電極を配置した基板上に神経細胞を培養し、細胞ネットワークを形成した試料にフェムト秒レーザー光を照射すると、電極や導線を損傷することなく基板上的細胞のみを切断することが可能である（図2.6-6 (b)）。本手法により、単一細胞への遺伝子導入や細胞損傷に関する研究がこれまでに報告されている^{3,4}。レーザー光の集光領域のみの加工を実現できることから、iPS細胞のコロニー内の特定細胞を単一細胞レベルで切断する手法としても有用であると考えられる。

これまでに述べたフェムト秒レーザーによる細胞切断では、1パルスあたりのレーザー光エネルギーがnJ程度であり、接着細胞を剥離する、或いは組織や個体のような厚みのある試料の深部を切断するためには、より高い光強度が望ましい。このため、再生増幅器を利用することにより、レーザー光エネルギーが $\mu\text{J/pulse}$ 程度と非常に高い、高強度フェムト秒レーザーの生体試料への応用が報告されている。高強度フェムト秒レーザーを生体物質に集光すると、多光子吸収により、形態変化、プラズマ発光、キャビテーションバブル、衝撃波などの非線形現象が急激に誘起される。非線形光学効果はピーク強度が高いほど起こりやすく、つまりレーザーパルス幅が短いほど、少ないパルスエネルギーでこれらの現象を誘起できる。これらの現象を積極的に利用することにより、光熱的なダメージの少ない加工が行えることが多数報告されており、それに伴いフェムト秒レーザーの利用も注目を集めている。例えば、再生増幅フェムト秒パルス(800 nm、200 fs、1kHz)を線虫に集光することにより、単一の神経軸索の切断が可能となる。切断された軸索は自発的に再生し、24時間後には再結合し、機能が回復していることが確認されている⁵。周辺の細胞にダメージを与えることなく、照射部位のみを高精度に切断できることから、“nanosurgery”として細胞内でのアクチンファイバーの切断や小器官

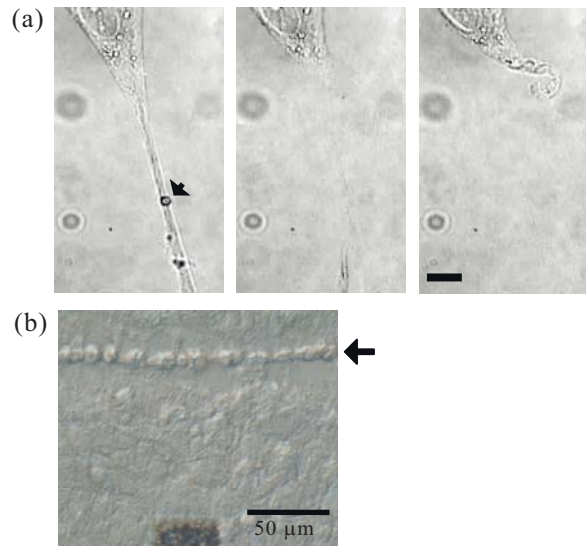


図2.6-6 (a) フェムト秒レーザー光によるラット海馬神経細胞の切断。レーザー光の照射時間 0 秒(左)、8 秒後(中)、およびレーザー照射後 66 秒後(右)。(b)マイクロ電極基板上で培養した神経回路網のレーザー切断。矢印はレーザー光の照射部位。

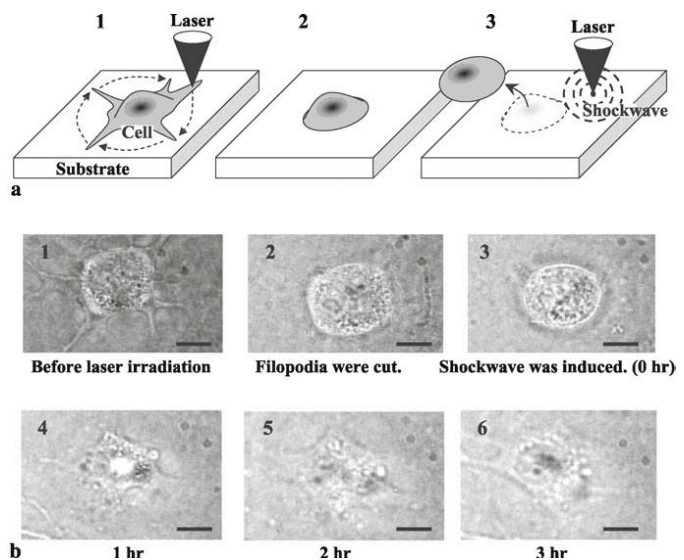


図2.6-7 高強度フェムト秒レーザーによる NIH3T3 細胞の基板からの剥離。(a)模式図 (b)透過顕微鏡像。スケールは 20 μm 。

の加工等に活用されている。さらに、高強度フェムト秒レーザーにより誘起される応力波を利用して、基質に接着した任意の体細胞を生きたまま引きはがすことに成功している⁶。高強度フェムト秒レーザーをNIH3T3細胞の針状仮足に直接照射して切断し、それぞれの仮足を切断していくと、細胞は縮んで球状になる（図2.6-7）。球状になった細胞は、なおも基板に緩く接着している。次に、細胞の横約4 μmにレーザーを集光し、応力波を発生させ、細胞を基板から完全に引き剥がした。このときのレーザー強度は0.26 μJ/pulseであり、4 μm離れた細胞に付加される圧力は1.9 μN/μm²と見積もられる。引き剥がされた細胞にはブラウン運動による揺れが観察され、基板から完全に剥離されたことが確認された。この細胞を透過顕微鏡像により約4分間隔で10時間観察し、剥離後の細胞が再び針状仮足を伸ばして基板に完全に接着することを確認した。これは細胞が生理的にも破壊されることなく、レーザーで剥離されたことを示すものである。この技術を利用して、初代培養した神経細胞ネットワークから細胞を剥離し、他基板に写し取る技術も確立されている^{2,7}。

以上のことから、フェムト秒レーザーを活用することにより、フィーダー細胞上のiPS細胞のコロニーから単一細胞レベルで細胞を剥離することが可能であると考えられる。さらにレーザーを走査することにより、高精度、高速、かつ簡便に目的細胞を剥離することが可能である。現状の問題点としては、レーザー購入および運用に纏わるコストの高さが挙げられるが、光ファイバーオプティクスを利用したフェムト秒レーザー技術が進歩してきており、コストの削減も期待される。

- (1) K. Takahashi *et al.*, *Cell*, 131, 1 (2007)
- (2) C. Hosokawa *et al.*, *Appl. Phys. A*, 93, 57 (2008)
- (3) U.K. Tirlapur *et al.*, *Nature*, 418, 290 (2002)
- (4) T. Shimada *et al.*, *Opt. Exp.*, 346, 9869 (2005)
- (5) M.F. Yanik *et al.*, *Nature*, 432, 822 (2004)
- (6) Y. Hosokawa *et al.*, *Appl. Phys. A*, 79, 795 (2004)
- (7) T. Kaji *et al.*, *Appl. Phys. Lett*, 91, 023904 (2007)

2.6.1.4 電氣的単一細胞操作・解析

電氣的細胞操作技術¹は、レーザーピンセット・レーザーアブレーションなどと並んで歴史も古く研究蓄積も豊富であるが、特にコストの面では優位性を発揮する。近年IC型デバイス上に電極を3200~6500ピクセル程度アレイ化し、迅速かつ並列に細胞を操作する技術が期待できる^{2,3}。高村らは、テーパー型流路と局所電場を組み合わせた細胞破碎と核酸のトラッピングを報告しており、チップ上での一連の1細胞分析工程の集積化が実現しつつある⁴。

電氣的細胞操作に応用可能な現象は、代表的なものとして泳動、誘電泳動、エレクトロウェットティングの3つが挙げられる。電気泳動では電荷を有する微粒子（細胞表面は一般に負電荷を持つ）を逆電荷の電極方向に引付けることができる^{5,6}だけでなく、電気浸透流を発生させることで中性微粒子を移動させることも可能となる。エレクトロウェットティング^{7,8}では液滴の表面張力が電極電位により制御可能であることを利用

する。あらかじめ液滴に1細胞を取り込んでおけば細胞操作も可能である^{9,10}。誘電泳動 (dielectrophoresis, DEP)^{11,12} は、誘電分極により微粒子 (微粒子-溶媒界面) に双極子モーメントが生じ、電場-双極子モーメント相互作用により微粒子が動く現象である。1951年のHerbert A. Pohlの報告以来、細胞操作を含む多くの詳細な研究が知られる。流路デバイスとしては、誘電泳動に基づく1細胞トラッピングを可能とするシングルセルハンドリングシステム (Cytoman) が市販された^{13,14}。また、電極デバイスベースのフローサイトメトリーがAxetris (Leister process technologies 社, スイス) より市販されている¹⁵⁻¹⁷。これらは流路の上下にマイクロバンド電極2対を配置し、細胞が通過する際のインピーダンス変化により、細胞種の判別やアポトーシス過程の追跡を検討している。処理速度は1000細胞/min程度であり、2対電極間のブランク補正や複素インピーダンススペクトル測定を実施することにより精度向上に成功した。細胞種によってインピーダンス特性が異なる根拠として、細胞表面積の違いが膜容量に反映されること、ミトコンドリア量の違いが導電性に反映されることが挙げられている。また誘電泳動力の周波数依存性から細胞種の判別・分離したという報告も頻繁に行われているが、近年、マウス神経幹細胞 (mouse neural stem/precursor cells, NSPCs) とその分化細胞の判別に成功したという報告がある¹⁸。ここで紹介したインピーダンス特性や誘電特性に基づく細胞判別はいずれもラベルフリーで行うことが出来るため大変魅力的ではあるが、今後分子生物学的裏付データの取得も必要と思われる。

その他、針状電極による電場破砕とキャピラリー電気泳動をリレー回路で組み合わせた1細胞分析がAllbrittonのグループにより報告されている¹⁹。末永らは、ITO電極上に播種した細胞を電場破砕法により回収し、Real-time PCRにて1細胞由来のmRNA発現を定量した。電場破砕時に生じる細胞膜および細胞における電場勾配は $>10^6$ V/m程度に到達するが、このような高電場条件下であっても、mRNAはほとんど分解されずほぼ100%の収率で回収されていることが確認できた²⁰。これら方法は接着性細胞を剥離することなく瞬時にサンプリングすることが可能であることに加え、細胞塊や受精卵 (マウス初期胚) の一部を回収することも可能であり、ES細胞やiPS細胞およびそれらの分化誘導過程における細胞試料の均一/不均一性を評価する上で大いに役立つことが期待できる。

- (1) M. Washizu, *J. Electrostatics*, 63, 795-802 (2005)
- (2) A. B. Fuchs et al., *Lab Chip*, 4, 121-126 (2006)
- (3) T. P. Hunt et al., *Lab Chip*, 8, 81-87 (2008)
- (4) Y. Takamura et al., *μTAS 2002*, 317-319 (2002)
- (5) T. Yasukawa et al., *Anal. Chem.* 80, 3722-3727 (2008)
- (6) M. Ozkan et al., *Langmuir* 19, 1532-1538 (2003)
- (7) M. G. Pollack et al., *Appl. Phys. Lett.* 77, 1725-1726 (2000)
- (8) H. Moon et al., *J. Appl. Phys.* 92, 4080-4087 (2002)
- (9) T. Taniguchi et al., *Proceedings of ISMM2001*, 104-105 (2001)
- (10) 東京大学 樋口研究室サイト (http://www.aml.t.u-tokyo.ac.jp/japanese/index_j.html)
- (11) M. Suzuki et al., *Biosens. Bioelectron.* 24, 1043-1047 (2008)
- (12) M. Suzuki et al., *Langmuir* 23, 4088-4094 (2007)

- (13) T. Muller *et al.*, *Biosens. Bioelectron.* 14, 247-256 (1999)
- (14) 日本クワンタムデザイン株式会社 (<http://www.qd-japan.com/news/?year=2004>)
- (15) G. Schade-Kampmann *et al.*, *Cell Prolif.* 41, 830-840(2008)
- (16) S. Gawad *et al.*, *Lab Chip* 4, 241-251 (2004)
- (17) Leister 社フローサイトメトリー製品サイト
(http://www.leister.com/axetris/biomems_products.htm)
- (18) L. A. Flanagan *et al.*, *Stem Cells* 26, 656-665 (2008).
- (19) F. Han *et al.*, *Anal. Chem.* 75, 3688-3696 (2003).
- (20) Y. Nashimoto *et al.*, *Anal. Chem.* 79, 6823-6830 (2007).

2.6.1.5 単一細胞単離培養ツール

iPS 細胞は ES 細胞と同様、単一分散状態での細胞培養が困難であるため、コロニー形成を伴う培養法を採用せざるを得ない。集団状態の細胞の分析は非常に難しく、細胞の状態を正しく評価する上で不利である。この問題を解決するために ES 細胞を単一細胞レベルで培養する技術が開発されている。赤池らは細胞接着分子 E-カドヘリンを介して ES 細胞同士が接着することから、E-カドヘリンの細胞外ドメインと IgG の Fc 領域のキメラタンパク質 (E-cad-Fc) を作製し、これを培養基質として用いることでマウス ES 細胞の単一細胞レベルでの培養に成功した¹。ゼラチン上で培養したマウス ES 細胞はコロニーを形成するのに対し、E-cad-Fc 上で培養した場合、細胞はコロニーを形成せず分散した状態で存在し、LIF 存

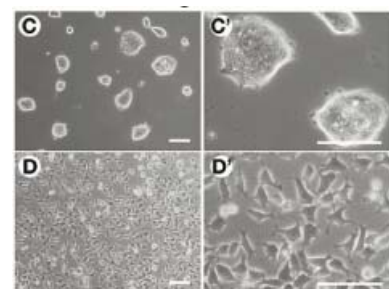


図2. 6-8ゼラチン上及び E-cad-Fc 上で培養した ES 細胞の形態
上段：ゼラチン
下段：E-cad-Fc
スケールバーは 100 μ m

在下で ES 細胞が未分化状態で維持されていることが確認された (図 2.6-8)。また E-cad-Fc 上で培養した細胞から外胚葉、中胚葉、内胚葉への分化が確認され、多分化能も保持されていることが示された。更に、E-cad-Fc 上で培養した場合、ゼラチン上での培養に比べて増殖能が高く、添加する LIF は低量で未分化状態が維持され、形質転換効率も高いことが示された。更に LIF と Fc 領域のキメラタンパク質 (LIF-Fc) を作製し、LIF-Fc 上で培養を行った結果、LIF の添加なしで ES 細胞の未分化状態を維持可能であることが報告されている²。E-cad-Fc と LIF-Fc の共固定化表面上で ES 細胞を培養したところ、コロニーを形成せずに単一状態で培養することが可能であり、LIF を添加せずとも ES 細胞の未分化能が維持され、また多分化能も保持されていることが示されている。現在、ヒト由来の ES 細胞及び iPS 細胞のフィーダーレス単一細胞培養への応用を検討しており、未分化維持に関わる可能性があると思われる bFGF、Wnt、activin-A、IGF 等のキメラタンパク質と E-cad-Fc を培養基質とした培養条件の最適化が行われているところである。

ヒト由来の iPS 細胞や ES 細胞は外部からの刺激に非常に弱く、特に細胞の継代を行う際の酵素処理等によって細胞を単一分散するとアポトーシスを引き起こし高率に死滅する。培養の過程で容易にアポトーシスを起こすために十分な細胞数を確保するた

めに多くの時間を必要とし、非効率的な培養操作を行わざるを得なかった。笹井らは運動神経細胞など一部の特殊な細胞死に関わることが示唆される Rho キナーゼ(ROCK)がヒト ES 細胞のアポトーシスに関わっていることを突き止め、ROCK 阻害剤を

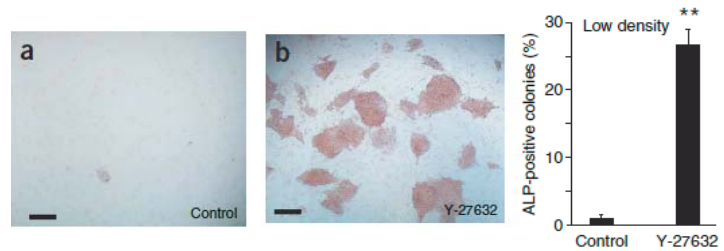


図2. 6-9 ROCK 阻害剤 Y-27632 添加によるヒト ES 細胞の分散培養

添加することによってアポトーシスを抑制できることを報告した³ (図 2.6-9)。細胞同士をバラバラにして分散させると、直ぐに Rho タンパク質の活性化とそれに続く ROCK の活性化が起こり、アポトーシスが誘導される。そこで、ROCK の選択的阻害剤である Y-27632 を培地に添加して培養を行うと、ヒト ES 細胞の分散による細胞死が強く抑制され、1 個の細胞からのコロニー形成率は約 30 倍に上昇した (図 2.6-10)。ROCK 阻害剤の投与が多分化能に影響を与えないことを未分化マーカーの検出及び奇形腫形成により確認した。アポトーシスの抑制作用は分散後 12 時間 ROCK 阻害剤添加培地で培養することで十分な効果が得られ、その後自己複製能や多能性を保ったまま培養する維持培養が可能であった。さらにマトリゲル上での培養も可能であり、フィーダーレスでの培養が可能となった。アポトーシス抑制作用は

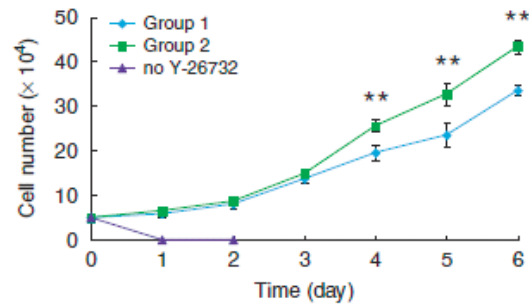


図2. 6-10 Y-27632 添加時間の異なるヒト ES 細胞の増殖曲線

Y-27632 含有培地での培養時間
Group 1: 12 時間、Group 2: 6 日間、
No Y-27632 : 添加なし

Fasudil など Y-27632 以外の ROCK 阻害剤を添加することでも同様の効果が得られた。分散培養が可能になったことで単一細胞からのコロニーの選別が可能になり、外来遺伝子恒常発現株の作製効率を飛躍的に改善させることができた。

この研究成果により ROCK 阻害剤を添加するだけという非常に簡単な操作で、ヒト ES 細胞及び iPS 細胞の取り扱いがマウス ES 細胞の培養と同等程度に容易になった。これにより細胞死によって不可能となっていた技術的な問題が解消され、これまでに報告されたマウス ES 細胞を用いた分化誘導技術をヒト iPS 細胞に応用することが可能と考えられる。また、ヒト iPS 細胞の単一細胞から性質が均一な細胞を大量に培養することが可能になったことで、クローニングによる品質管理が大幅に容易になると考えられる。ROCK 阻害剤はすでに血管拡張剤などとして臨床応用されており、ヒトに対して安全性の高い薬剤であることはすでに証明されているために実用化への障壁はない。ヒト iPS 細胞がなぜ高頻度に細胞死を引き起こすのか、なぜカスパーゼ等の一般的な細胞死因子とは異なる ROCK が機能するのかは今後詳細なメカニズムの解明が待たれるところである。

(1) M. Nagaoka *et al.*, PloS ONE, 1, e15 (2006)

(2) M. Nagaoka *et al.*, J. Biol. Chem., 283, 26468-26476 (2008)

(3) K. Watanabe *et al.*, Nat. Biotechnol., 25, 681-686 (2007)

2.6.1.6 セルソーター

細胞集団から、ある特定の性質を持った細胞を分離する装置は、セルソーターと呼ばれる。一般には細胞の分離・利用のため、微小な液滴毎に細胞を入れ、液滴を制御することで細胞を選別する装置を指す。細胞を含む液滴は微小なノズルから断続的に滴下され、液滴の落下方向を静電的に制御することで細胞を分離するものがほとんどである。なお細胞の滴下と計測に特化した分析装置はフローサイトメーターと呼ばれる。その他にセルソーターに類似の機能を持つものとして、アレイ状に細胞を配置し、細胞を計測の上で、選別・回収する装置の開発も進んでいる。

セルソーターは粒子分離装置や液滴解析装置を起源とし、30年ほどの歴史があるバイオ機器である¹。主要なメーカーはベクトンディッキンソン²、ベックマンコールター³（共に米国）であり、日本ではベイバイオサイエンス⁴、古河電気工業⁵が生産している。また、アレイ状に配列した細胞を対象とした分離装置は、エスシーワールド⁶が発売している他、アズワン⁷から発売が予定されている。これらは日本製である。

セルソーターでの分離の根拠となる細胞の特性は、短時間に計測出来るもの、実態としては光学計測に限られる。一般にはレーザー光を細胞に照射、光軸から僅かにずれた前方散乱光が細胞の大きさを反映し、光軸に直角な側方散乱光が細胞内の構造を反映するという、2つのデータから細胞を選別するが、これだけで十分な選別が行えるケースは少ない。より高度な細胞選別が必要な場合、例えば特定の膜タンパクを発現している細胞を選別する場合は、細胞を蛍光抗体で標識するといった事前の作業が必要である。このような標識処理は、選別後の細胞の利用には支障となる。

以上に加えて、液滴に細胞を封入して落下させるというセルソーターの基本プロセスにおいては、細胞に対し超音波や電界、圧力といった複数の強いストレスが加わる。これは分離後の細胞の変質、生存率の低下といった問題の主要な原因とされている。また、機械製品としてのセルソーターは複雑な装置であり、価格も数千万円と高額である。加えて、取り扱いや調整に高度な技能が要求される点も課題である。

今後のセルソーターの進化としては、低価格化、処理細胞数の増加、選別誤差の減少、操作の簡便化など、現行技

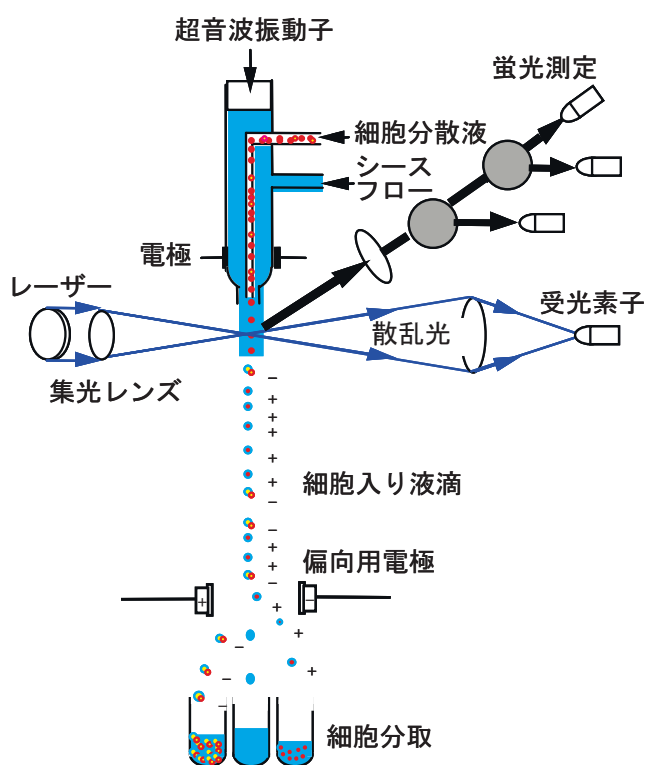


図2.6-11 セルソーター基本概念

術の延長線上での改良が続くと予想される。細胞傷害の抑制という点では、古河電気工業の装置が優れた可能性を示している。同社装置の特徴は、細胞を含む液を機械的に直接選別する機構を採用した点にあり、発展が期待される。なお分離後の細胞利用のため、細胞を標識しない細胞計測法の開発も進められており、それらについては2.5節を参考されたい。

個々の細胞の特性を計測し、分離するプロセスは、様々な細胞からの iPS 細胞の作成、そしてその逆に iPS 細胞からの様々な細胞の作成にも、重要な役割を果たす。現在、iPS 細胞の作成効率は好適な条件下でも数パーセント以下に留まることに加え、プラスミドベクターによる安全な iPS 化法では更に2桁低下するとされる。このような現状で適切に iPS 細胞のみを分離するためには、iPS 細胞の特徴を短時間で識別し、それらに対応した高感度な検出系と、確実な選別機構を開発しなくてはならない。その他様々な細胞の分離においても、必要な技術は同じである。これらは認識用ソフトウェア、検出用センサ、分離用メカトロニクスの高度な組み合わせが必要な一種のロボットであり、日本企業の得意とする分野と考えられる。今後、学術機関と企業との連携を一層促進することで、セルソーターを活用した細胞関連産業の拡大が期待される。

(1) 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター セルソーター解説

http://www.cdb.riken.jp/jp/millennium/print/technology_cell.html

(2) BD(Becton Dickinson), 製品情報 <http://www.bdj.co.jp/flow/index.html>

(3) Beckman Coulter, Inc., 製品解説

http://www.beckmancoulter.co.jp/product/product01/cyto_index.html

(4) ベイバイオサイエンス (株)「JSAN セルソーター」製品解説

<http://baybio.co.jp/japanese/jsan/jsan.html>

(5)新製品紹介「ダメージレス細胞ソーティングシステム」 古河電工時報第120号(平成19年12月), pp.115-116.

(6)エスシーワールド (株) 細胞自動回収装置「Cellporter」製品解説

http://www.scworld.co.jp/industry/index4_1.html

(7)「One Cell ピッキング装置を用いた高効率 scFv 抗体スクリーニング法」中村佳介他,第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学大会合同大会, 4P-1304, 2008.12.9-12,神戸市

2.6.1.7 小括

iPS 細胞等幹細胞の調製、増殖、作り変え(分化)の各工程における分離・分画工程においては、分離・分画それ自身が最終目的ではなく、その後取り出した細胞あるいは細胞群を活用するために行なうことを目的とする。そのため分離工程内の各ステップに使用される技術は利用的には対象細胞に対してダメージが無いかあるいは低いことが要求される。ここが、これまで細胞の分離について培われてきた様々な技術との異なる点といえる。

iPS 細胞等幹細胞に対しての分離工程内の各ステップについて要求される技術と既存技術について比較すると課題が明確になり、そしてそれ自身が開発要件、開発課題

として浮き上がってくることとなる。

たとえば、分離工程において図 2.6-1 の A 工程についてみた場合、セルソーターをはじめとする流れ分画技術を利用する工程をイメージできるが、その場合、識別ステップにて如何にダメージを与えないか、そして選別ステップにおいては、単細胞のみの操作から大きさのまちまちな細胞塊を対象とする技術開発の必要性が見えてくる。B 工程についてみてもダメージの少ない特定領域剥離技術が大きく要求されることが明確である。それぞれのステップにて適する技術の開発も重要であり、一方、識別ステップと選別ステップ、剥離ステップの相互連携を進めた技術の開発も期待される。

2.6.2 1 細胞マーキング技術の概要

ヘテロな細胞集団から目的とする細胞のみを分離するために、特定の細胞にマーキングして適切な外力を加え、回収または廃棄する技術が利用されている。iPS 細胞を分化誘導した細胞集団から目的の細胞のみを回収する場合には、目的の細胞には非侵襲であることが重要であるため、目的外の細胞をマーキングして廃棄する方法が重要になると考えられる。本節では、蛍光、CD 抗原と細胞の電位、磁性粒子を用いた細胞マーキングの従来技術について紹介し、iPS 細胞の産業応用に向けた技術的課題について報告する。

2.6.2.1 蛍光による細胞マーキング

iPS 細胞の誘導プロセスでは、SSEA-1 を指標とした蛍光標識抗体マーキング、Oct4、Nanog の GFP によるモニタリングなど蛍光プローブによるマーキングがなされている。これまで蛍光分子は、サイトメトリーで利用される He-Ne(633 nm, 543 nm)、Kr レーザ(590nm)、Ar レーザ(488 nm)、UV レーザに対応した有機・無機系蛍光色素が各種開発されてきた(図 2.6-12)。近年では、生細胞を *in vivo* イメージングするための、新たな機能性蛍光色素、機能性蛍光タンパク質が開発されており、以下これらについて述べる。

既存のフルオレセイン系、ローダミン系、シアニン系、クマリン系などとは全く異なる骨格を有する有機系蛍光色素が見出されている¹。タンパク質との複合体形成により蛍光を示すことから、

2次元電気泳動の染色色素としての利用が進められている他、新たな細胞イメージング材料の候補といえる。無機系蛍光色素としては、量子ドットの他に、Upconversion を利用した色素開発が進められている²。Upconversion では、980 nm の赤外波長の励起光で、より低波

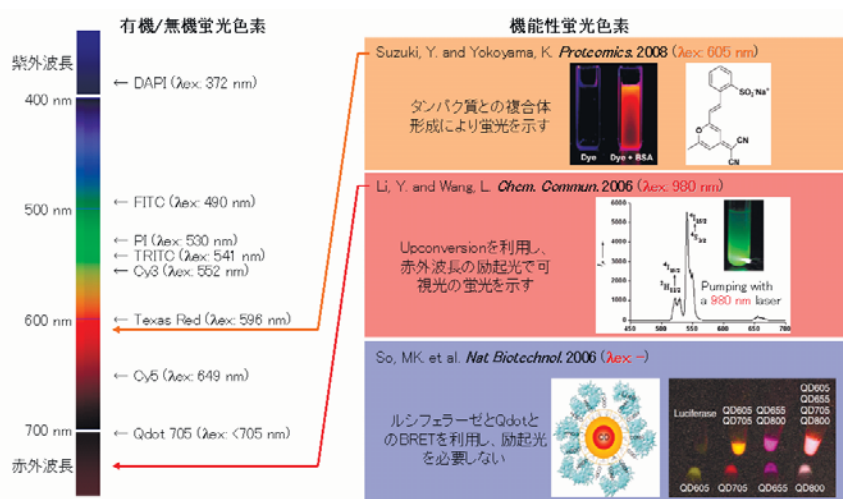


図2.6-12 機能性蛍光色素

長の 500~550nm 付近の蛍光を示すことから、細胞に対する障害性のほとんどない蛍光イメージング技術として注目される。また、ルシフェラーゼと量子ドットとの **Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)** を利用した励起光を必要としない(正確には生物発光を励起光とした)イメージング技術も提案されている³。ただし、ルシフェラーゼ発光のための基質等を必要とすることから、細胞への障害性という観点では、必ずしも低侵襲なアプローチとは言えないのが現状である。

一方、レポータータンパク質についての機能性が近年盛んに研究されている。宮脇らのグループは、GFP を基本として、その発光団の改変により **Kaede**⁴、**Dronpa**⁵、**Keima**⁶ という各種機能性蛍光タンパク質を提案している(図 2.6-13)。**Kaede** は GFP と同じ緑色タンパク質であるが、紫外光照射により構造変化し、長波長側に蛍光波長がシフトするという特徴を有する。これを利用し、顕微鏡下での細胞間の動態を蛍光識別して観察することを実現している。**Dronpa** は光照射により On/Off することができる蛍光タンパク質であり、Off 状態の細胞に対し、局所的に On 状態にすることで、細胞内でのタンパク質拡散、MAP キナーゼの核内移行等の分子動態イメージングを可能としている。**Keima** は GFP-like タンパク質としては、最も広いストークスシフトを有し、**Keima** を含めて、1 励起波長で細胞内の 6 蛍光タンパク質の同時イメージングが実現されている。

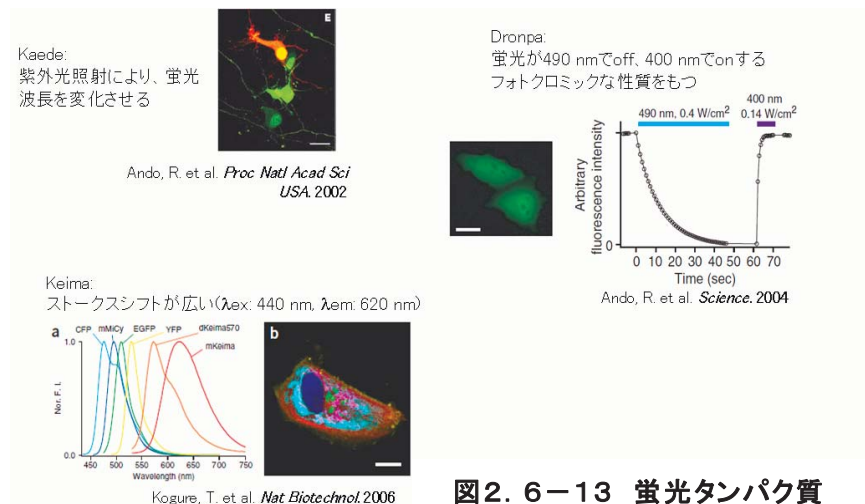


図2.6-13 蛍光タンパク質

- (1) Y. Suzuki and K. Yokoyama, *Proteomics*, 8, 2785-2790 (2008)
- (2) L. Wang and Y. Li, *Chem. Commun. (Camb)* 2557-2559 (2006)
- (3) M. K. So *et al.* *J. Nat. Biotechnol.* 24, 339-343 (2006)
- (4) R. Ando *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 12651-12656 (2002)
- (5) R. Ando *et al.*, *Science* 306, 1370-1373 (2004)
- (6) T. Kogure *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 24, 577-581 (2006)

2.6.2.2 CD 抗原と細胞の膜電位を利用した細胞マーキング

細胞の膜電位(表面電位)は細胞表面の電気的な状態を反映する細胞の物性値である。細胞電気泳動法で測定される細胞の移動速度によって得られる細胞電気泳動度(細胞 EPM) から、細胞の膜電位を推定することが可能である。本項では、特定の細胞の膜電位を変化させ、細胞電気泳動時の細胞移動速度の変化により検出する細胞マーキング技術について述べる。

免疫細胞電気泳動法は、細胞電気泳動法と従来の免疫電気泳動法とを融合させた細胞分析手法であり、細胞表面の免疫性を高速で評価できる手法である。図 2.6-14 には一木らが報告した、マイクロ流体デバイスを用いたキャピラリー細胞免疫電気泳動法の概要を示す¹。電気泳動中の細胞と免疫グロブリンは反対方向に移動しているため、泳動中の細胞は免疫グロブリンと反応する。免疫グロブリン分子と結合した細胞の電位が変化し、移動速度が減少するので、速度変化から細胞の免疫性を判定できる。IgG の濃度を変化させた際の、羊赤血球の電気泳動速度の変化を図 2.6-15 に示す。

この方法は、蛍光ラベルを修飾した抗体が必要ないため安価に行うことができる。更に、細胞の免疫性を一細胞レベルで検出することが可能である。本手法は血液やリンパ液に含まれる免疫細胞の診断への利用が見込まれ、感染症に対する薬物の開発に応用できる可能性がある。

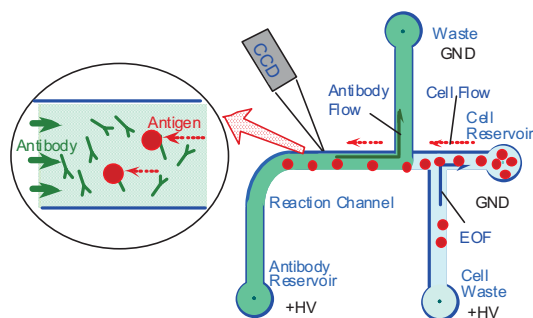


図 2.6-14 オンチップ細胞免疫電気泳動法

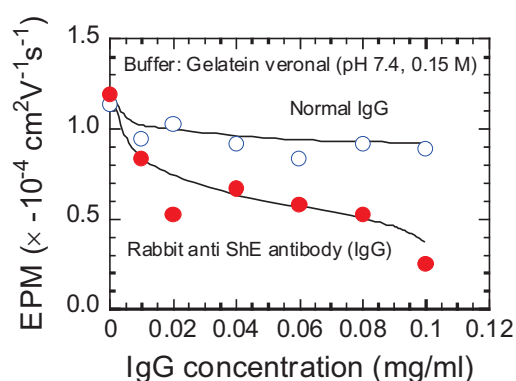


図 2.6-15 IgG 濃度に対する羊赤血球細胞の細胞電気泳動度

(1) T.Ichiki *et al.*, *Electrophoresis*, 23, 2029-2034 (2002)

2.6.2.3 磁性粒子を用いた細胞マーキング

iPS 細胞の作製プロセスにおける細胞評価として、FACS 解析を利用した表面マーカーの検出、タンパク質発現解析が行われている。一方で、一般的な細胞解析では FACS と比較される技術として磁気細胞分離システム (Magnetic-Activated Cell Sorting system : MACS) が汎用的に利用されている。FACS が蛍光シグナルを指標として細胞を分取・分析するのに対し、MACS は抗体を固定化した磁性粒子を用いて、外部磁場により特異的な細胞を分取する技術である。分析機能は無いが、分取のスループットの高さが利点として挙げられる。近年、磁性粒子を生体分子のキャリアとして利用するだけでなく、磁気シグナルを指標にしたプローブとしての利用も研究されており、将来的には MACS にも分析機能を付与する可能性が示唆される。ただし、磁性粒子の利用に当たっては細胞為害性を考慮する必要がある。

磁気細胞分離システムは、1990 年の Miltenyi らによる報告後¹、Miltenyi Biotec 社から上市され、現在最も汎用的に利用されるに至っている。直径約 50 nm の抗体固定化超常磁性ナノ粒子を用いて目的細胞を磁気標識後、スチールウールを充填した磁気カラムにより磁気標識細胞を分離するものである。近年では、Miltenyi Biotec 社の他、い

くつかの企業により磁気細胞分離システムが市販化されている(表 2.6-1)^{2,3}。

これまで、磁気細胞分離システムに用いられる磁性粒子のサイズとして、マイクロメートルサイズとサブマイクロメートルサイズのものが開発されてきた。後者は一

般に常磁性体であり、磁石により容易に分離が可能である。しかし、細胞表面に結合した粒子が物理的に細胞の増殖や代謝に影響を与えることが報告されている⁴。これに対し、前者つまりナノメートルサイズの磁性粒子を用いた場合、正常に増殖・分化し、細胞の機能を保持していることが確認されている^{5,6}。これらの背景から、現行では主にナノサイズの磁性粒子が利用される傾向にある。以下、ナノサイズの磁性粒子(磁性ナノ粒子)に焦点を絞り、細胞為害性を考える上で重要な磁性ナノ粒子の細胞による取り込みと代謝に関する知見をまとめる。

磁性ナノ粒子と培養細胞(GLC-28：ヒト小細胞肺癌細胞, CG-4：ラットオリゴデンドロサイト前駆細胞, C2C12：マウス筋前駆細胞)を共培養した後、Prussian Blueにより鉄染色を行なった結果、細胞種に関係なく磁性ナノ粒子が細胞内に取り込まれたことが確認された⁷。また、磁性ナノ粒子は核には存在せず細胞質に局在していた。透過型電子顕微鏡⁸による観察では、細胞内に取り込まれた磁性ナノ粒子は細胞質にて小胞内に存在していることが観察された⁹。これより、磁性ナノ粒子はエンドサイトーシス経路にて細胞内に取り込まれるものと考えられた。通常、エンドサイトーシスは、エンドソームに対象の物質が取り込まれることで起こる。エンドソーム内は酸性に保たれているため(pH 6.0-6.5)、受容体の構造変化が起き、受容体と対象間の結合は解離する。その後、エンドソームは加水分解酵素を含むリソソームと融合することで対象の分解が行なわれる(pH 4.5-5.0)。磁性ナノ粒子を取り込んだ細胞のTEM観察結果、磁性ナノ粒子に関しても細胞内にて上記と同様の作用を受けていることが示唆された¹⁰。細胞と共培養した磁性ナノ粒子は、3時間後にはエンドソーム内に取り込まれ、3日後にはリソソームとの融合が観察された。5日後の観察では、リソソーム内部の磁性ナノ粒子が確認しづらくなっていたため、溶解が起こっているものと考えられた。しかし、全てのエンドソームにおいてこの様な変化は観察されていない。ここで、リソソームの内部環境が磁性ナノ粒子に及ぼす影響を評価するため、クエン酸を含んだ pH 4.5-5.5の buffer に磁性ナノ粒子を加えた実験が行なわれている^{11,12}。リソソームから細胞質への鉄の輸送は、鉄がクエン酸などの低分子物質や膜貫通タンパク質によりキレートされることで起こるとされていることから、磁性ナノ粒子の溶解についてもクエン酸が関与している可能性があると考えられた。クエン酸ナトリウムを含む溶液に磁性ナノ粒子を懸濁することにより上清中に三価鉄イオンの溶出が確認されている。このことから細胞内に取り込まれた磁性ナノ粒子はリソソーム内で分解され、その結果、磁性ナノ粒子の構成成分である三価鉄イオンが細胞質に溶出する可能性が示唆された。

一方、細胞内に取り込まれた磁性ナノ粒子が、エキソサイトーシスにより細胞外に放出される機構の存在も示唆されている^{9,12}。磁性ナノ粒子と共培養した Hela 細胞に

表2.6-1 市販の細胞磁気分離システム

	粒子サイズ(μm)	販売
MACS	0.05	Miltenyi Biotec
StemSep	0.02	Stemcell Technologies
EasySep	0.15	Stemcell Technologies
IMag	0.1-0.45	BD Bioscience
Therma-Max	0.1	Magnabeat
Dynabeads	4.5	Dynal Biotech
MagnaBind	1~4	PIERCE

ついて、細胞内に含まれている鉄量と培地中に含まれている鉄イオン濃度の経時変化を調べた結果、7日目において細胞内鉄量の急激な減少と培地内鉄イオン濃度の急激な上昇が測定された。細胞の生存率はほぼ100%であったことから、培地内の鉄イオン濃度の上昇は死細胞からの放出によるものではなく、エキソサイトーシスにより細胞内から鉄の放出が起こったためと考えられた。しかしその詳細はまだ解明されていない。

過剰な鉄イオンの存在は、活性酸素種の産生を促進し、DNAの損傷や細胞機能障害、アルツハイマーやパーキンソン病の原因となることで知られている¹³。磁性ナノ粒子を取り込んだ細胞について、細胞内の活性酸素種量を測定した結果、コントロール細胞と比較し活性酸素種量の増加が確認された⁶¹。しかし、発生した活性酸素種に由来すると考えられる細胞のアポトーシスは確認されなかった。その他、磁性ナノ粒子の投与により、磁性ナノ粒子の構成鉄を含むヘモグロビンの産生や、貧血モデルラットの回復が確認されている¹⁴。

- (1) S.Miltenyi *et al.* Cytometry 11, 231-8 (1990)
- (2) Y.J. Jung *et al.*, J. Exp. Med. 201, 1915-24 (2005)
- (3) C. E. Peters *et al.*, Methods Mol. Biol. 302, 95-116 (2005)
- (4) A.Tiwari *et al.*, Cell Biol. Toxicol. 19, 265-72 (2003)
- (5) H.Bartz *et al.*, J. Immunol. Methods 275, 137-48 (2003)
- (6) Y.Imai *et al.*, Bone Marrow Transplant 35, 479-87 (2005)
- (7) J. W. Bulte *et al.*, Nat. Biotechnol. 19, 1141-7 (2001)
- (8) S.Rutella *et al.*, Eur. J. Immunol. 34, 1291-302 (2004)
- (9) R.Sun *et al.*, Invest Radiol 40, 504-13 (2005)
- (10) A. S. Arbab *et al.*, NMR Biomed. 18, 383-9 (2005)
- (11) T. Skotland *et al.*, J. Pharm. Biomed. Anal. 28, 323-9 (2002)
- (12) A. S. Arbab *et al.*, Radiology 229, 838-46 (2003)
- (13) T. Kurz *et al.*, FEBS J. 273, 3106-17 (2006)
- (14) R. Weissleder *et al.*, Am. J. Roentgenol. 152, 167-73 (1989)

2.6.2.4 1細胞マーキング技術の小括

上述のように、蛍光、細胞の膜電位、磁性粒子を用いた細胞マーキングの従来技術について紹介した。細胞マーキング技術をiPS細胞に応用するには、目的の細胞には影響を与えずに、目的外の細胞に特異的に発現しているCD抗原等の細胞表面タンパク質に、蛍光、磁気、電荷等でラベルした抗体を結合させマーキングした後、FACSやMACS、免疫細胞電気泳動法によって廃棄することが重要である。この方法は高効率で大量のサンプルを扱うことが可能である。しかしながら、現在、分化等を正確に区別できる細胞表面タンパク質は明らかになっておらず、複数のタンパク質や糖鎖などを組み合わせて分化マーカーやがん化マーカーとして探索する研究が進められている。今後、1細胞マーキング技術をiPS細胞に応用するには、分化前後やがん化によって異なる細胞表面タンパク質等の探索を継続することが重要である。適切なタンパ

ク質等が見つからなかった場合は、標識によらない物理化学的な手法で分離する技術の開発が必要になると思われる。

2.6.3 総括

「iPS 細胞による再生医療」という最終目標を鑑みると、患者由来の細胞を《摘出→体外培養→reprogramming のための遺伝子導入→選択培養・選抜→分化誘導培養→患者に移植》という一連の操作の中で、エピジェネティック/ゲノム/発現の各レベルで細胞の均一性確保・品質管理が必要となる。本来、生体の発生プロセスにおいては細胞の自己組織化能力により、細胞集団がシステム、すなわち組織や臓器として機能するよう、適切な分化が自動的に誘導される。再生医療においても、あたかも計算機上でプログラムを実行するように、必要な処置を最初に細胞に施すだけで、自動的に自己組織化的な臓器構築が行えるのが理想ではある。しかしながらそのような高度な自己組織化誘導には技術的な目処が立っておらず、その不足部分については人為的に細胞の分離・再構築を行う必要がある。

膨大な数の細胞を 1 細胞ごとに分析・分離する装置としては、セルソーターは理想的な分離装置の一つであろう。また一細胞対象技術に限らず、様々な処理で組織化した細胞群を、そのまま剥離して使用する分離プロセスも、併せて重要になって行くであろう。これらを含む本節で解説してきた様々な分離要素技術は、任意の細胞を、精度良く、かつ大量に分離処理する方向で発展し続けている。今後、細胞誘導技術・細胞分析技術とも連携することにより、組織再構築のための要素部品として、各種細胞を自在に提供可能となる日も近いと思われる。なお、そのような細胞分離装置は、要素技術の摺り合わせにより達成される高度科学機器になると考えられる。これは正に日本企業の強い分野であり、産業界との連携が特に期待される。

第3章 ロードマップ、将来展望および提言

3.1 緒言

iPS 細胞を医療・産業応用に繋げるためには、培養技術、分析技術、分離技術などの工学技術を統合し、新しい細胞応用の工学体系を作り上げる必要がある。そのために、関連諸技術の現状、可能性、発展方向について、時系列的な解析が必要である。今回の調査研究によって、研究開発の効率化と目標が明確になることを願う。

3.2 作成方法

調査研究によって得られた技術動向を分野ごとに整理・統合し、時系列にまとめた。また、iPS 細胞技術に関する可能性、医学上の要請、希望なども考慮して、実用化時期についても推量した。

3.3 ロードマップ

iPS 細胞誘導技術、培養技術、分析技術、分離技術などについて、2015 年までの技術の発展推移についてまとめた（添付資料 1）。また、その時点を超えて、2020 年頃を想定した実用化の可能性を検討した。多くの技術が連携・統合されて、細胞技術にかかわる新規技術が形成され、日本が世界をリードする技術分野の可能性が開けるところが明らかになったと思われる。

添付資料 1	1 A.	iPS 細胞研究のロードマップ
	1 B.	iPS 細胞実用化のための技術ロードマップ

3.4 将来展望および提言

iPS 細胞の産業応用に必要な多くの技術開発が体系的に進められることが必要である。医療・創薬などを中心にした利用応用方法の確立、細胞創製、検査・分離精製、輸送・保管などの技術の開発と製造から利用までのシステムの整備も求められる。細胞関連の装置・システム開発において、我が国が国際的にも重要な位置を占めることにつながる、重要な新しい細胞技術の形成が可能となりつつある状況と考えられる。

おわりに

iPS 細胞研究は、日本において生まれ、世界に発展しようとしている大きな技術分野である。再生医療・ヒト細胞研究の発展の中において新規・高度な技術として期待が集まっている。

古来、個々人間を扱ってきた医学にあって、その一部である細胞を取り出して応用する再生医療は、歴史的なエポックと考えられる。人体を対象とする限り、個体の生存を優先するために制限があったものが、それを越えて、細胞レベルでの工学的な取り扱いが可能になったためである。iPS 細胞の出現は、化学技術のように様々なものを作り出す、即ち、一つの細胞から多種多様な細胞種を作り出すことの可能性が開けたと言える。

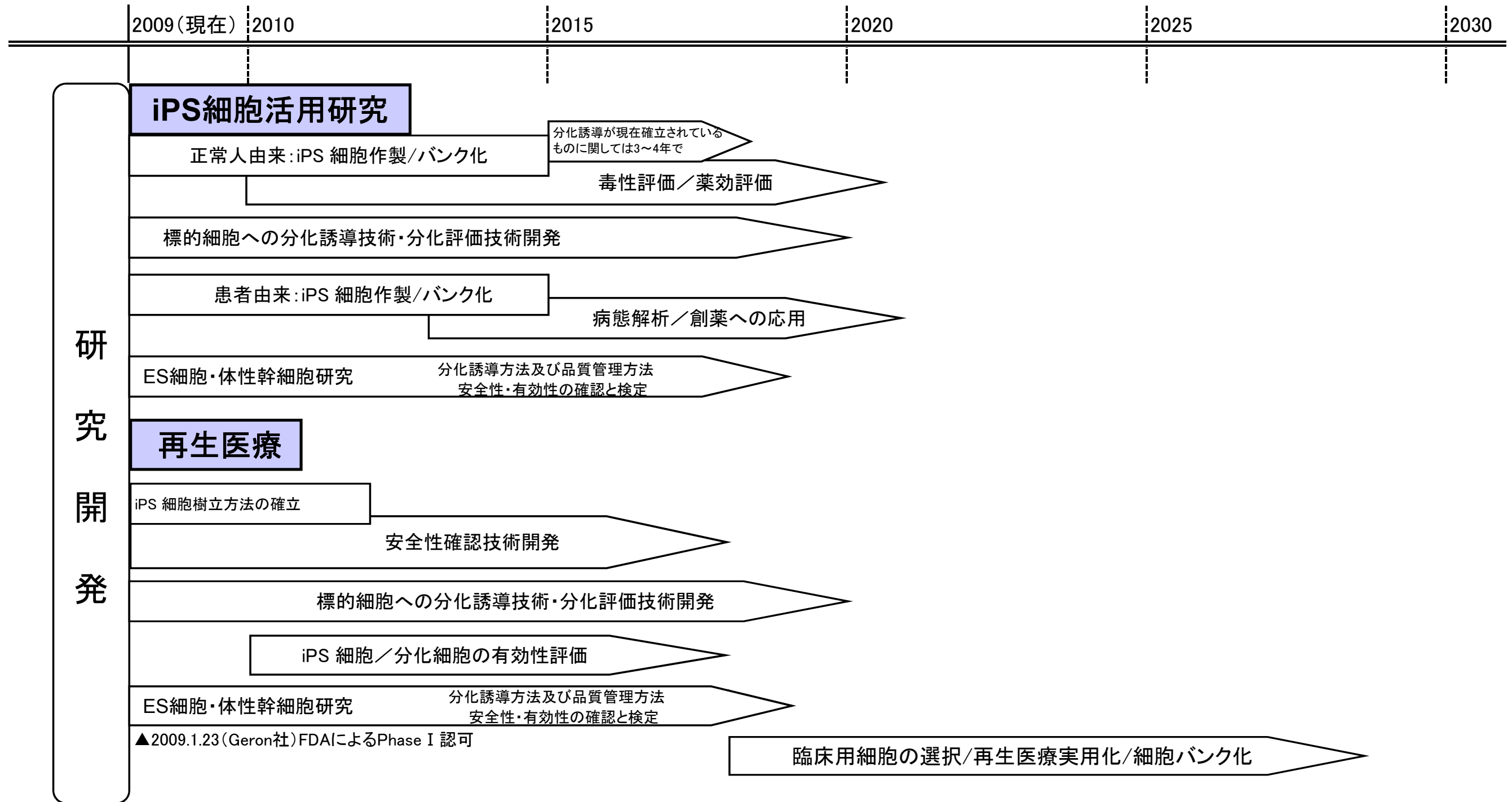
化学技術もそうであるように、ものを大量・均質に作るには、その製造にかかわる高度複雑な技術体系・システムが必要である。計測技術、分別技術などの発展とともに、かかる工業システムが生まれたと考えられる。

細胞技術に関しても、高度な分析技術、微細加工・ナノテクノロジーを利用することで、大量に、短時間で、正確に目的細胞を誘導・採取・分析することが可能となると考えられる。幹細胞の実用化において、この種の新規技術が重要な要素となることが期待されている。また、先端的な工学技術と医学・バイオ研究が融合する新たな産業分野が形成できれば、我が国が世界をリードする基盤となりうると考えられる。

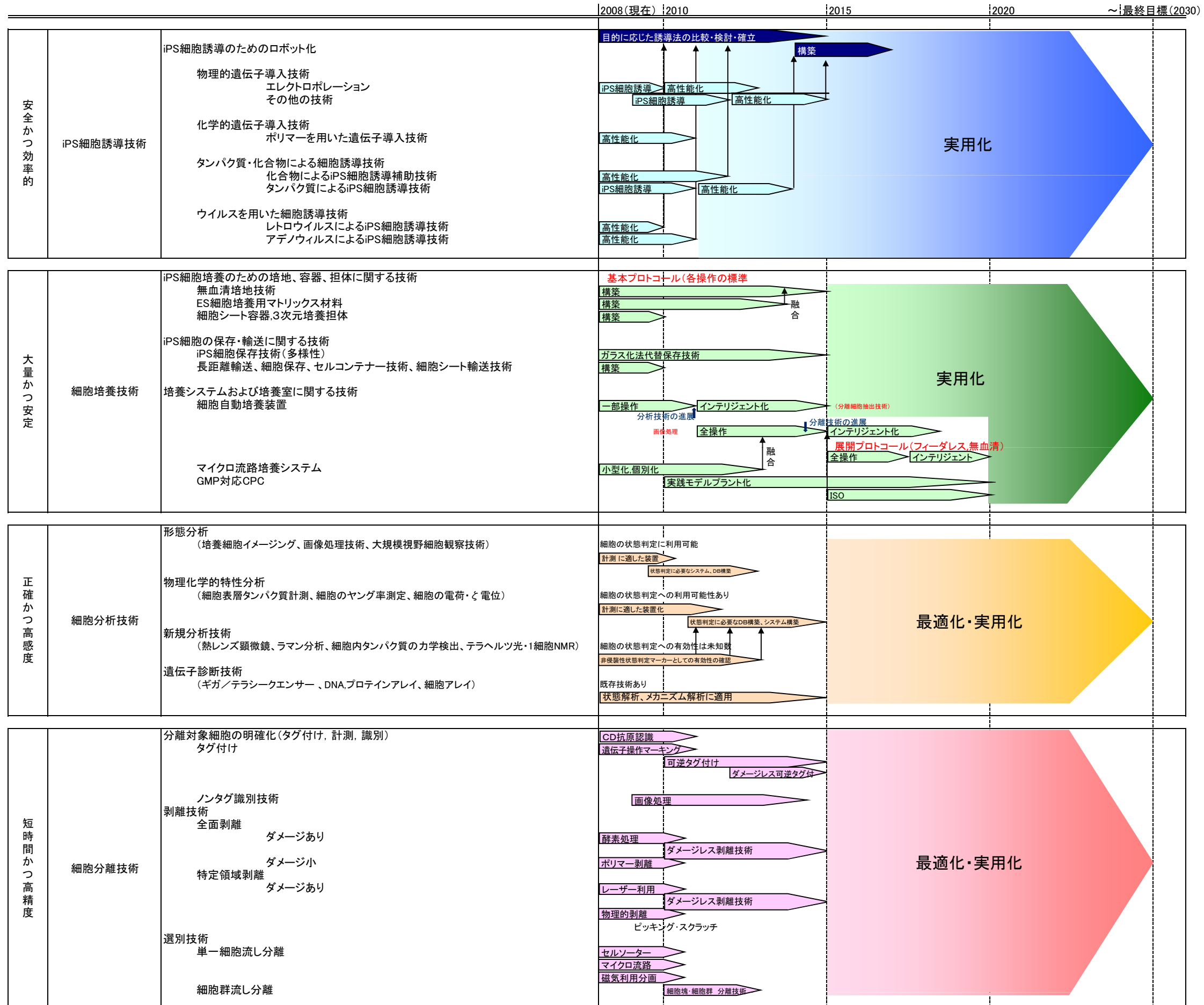
冒頭に記したように、iPS 細胞等幹細胞を産業的に応用するのに求められる各要素技術の探索・体系化が進んでいない。本調査では、単なるシーズの寄せ集めではなく、アウトプットを意識した要素技術ならびにそれら実現可能性について調査し、新たな産業に至る道程をロードマップとして提示することを目的とした。本調査の結果、日本の優れた微細加工技術、分析技術、ソフト技術などを統合することで、新規高度な技術分野の創成方向を俯瞰することが容易になったと考える。2015年頃を目途として、新規技術の大きな発展に期待できると思われる。

願わくば、ここに見いだされた技術発展が効率よく進み、次世代の大きな産業分野の期間を成すであろう細胞工学の新たな流れを日本が主導して行えるよう、国レベルの政策、支援を期待したい。

添付資料1 1A. iPS細胞研究のロードマップ



添付資料1 1B. iPS細胞実用化のための技術ロードマップ



添付資料 2

「医療、製薬、化学産業等におけるiPS細胞等幹細胞の実用化の実態・可能性調査」
(ニーズ調査)

1. 国内調査結果の集約

大学・公的機関 10研究室(8機関)、製薬企業 8社、製薬以外の企業 21社
計39件

質問1. iPS細胞を用いて先生・御社が開発/実現したい再生医療・産業技術についてお聞かせください。iPS細胞でなく他の幹細胞についてお答えいただけるなら、その幹細胞の種類(ES細胞や体性幹細胞等)をお聞かせください。

大学、公的機関

01. iPS細胞は再生医療の他に、ドラッグスクリーニング、病因解明用に使われる。病因解明用としては、ALSであれば、神経がらみなので神経の細胞を誘導しておいて何が起きているか解明して、それに対する治療法を開発するのに使う。ドラッグスクリーニング用としては、ほとんどの薬が心毒性でドロップするが、そう簡単にヒトの心筋細胞は手に入らないこと、セルラインで良いのが無いこと、他の種だとチャンネル、リセプターのアミノ酸配列が違っており、他の種だと毒性が出ないが、人間では出ることがあり、最終的には人間で調べなければならず、その段階でドロップするものが出てくる。また、ヒトの肝臓で代謝されると毒性がでるもの、逆に薬効が出るものもある。ヒトiPSから心筋細胞、肝細胞が出来ればこうしたことは早期に判断できる。組織は米国から組織が買えるものもあり、角膜(臨床用では30万円/1眼程度、研究用では数万円)などはかなり日本に入っていると思われるが、倫理的には国内でiPS細胞から作るのが望ましい。
02. ヒトES細胞/iPS細胞より分化誘導した細胞を細胞治療としての再生医療に用いることを考えている。対象疾患としては小児の先天性疾患である小児の先天性代謝異常症、尿素サイクル異常症、メチルマロン酸血症、筋ジストロフィー、小児心不全などを想定している。筋ジストロフィーの新規患者は日本で毎年3千人である。代謝異常症では欠損酵素を分泌する幹細胞や分化細胞、尿素サイクル異常症・メチルマロン酸血症では肝細胞、筋ジストロフィーでは骨格筋の筋芽細胞、心不全では心筋細胞に分化させて患者に移植する。
気になるのは免疫拒絶反応であるが、骨髄移植と異なり免疫担当細胞を移入しないので、約200~300種類の組織適合抗原のレパートリーを用意しておけば日本人の8割はカバーできると考えられている。ES細胞とiPS細胞の比較においては、ヒトES細胞はすでに10年の歴史があり、染色体核型が正常であり、xenograftで癌になったことはなく、分化誘導の研究も進んでいる。
03. 目的は人工的に赤血球をつくることである。ES細胞(サル)から赤血球ができること、また、試験管の中の培養系で脱核した赤血球ができることが判明した。最近、ヒトでもこうした脱核した赤血球がES細胞からできることが報告されている。ES細胞から脱核した赤血球が作れるのは判明した。まだ、効率が低く輸血に使えるような大量に出来る段階には至っていないが、コストを度外視すればES細胞から赤血球をつくるのが可能となった。
臍帯血より得られる血液幹細胞1個(CD34陽性細胞)から100万個近い赤血球が作れるようになった。これは理論的には1人の赤ちゃんの臍帯血があれば200mlから400mLの輸血用血液が得られることを意味する。しかも最終的に20日で作った血液の8割位が脱核赤血球であった。臍帯血があ

れば輸血用の血液が得られることが判明した。しかし、サイトカインが使われており、パテントの関係で高いので血液が高価になってしまう。次にマウスES細胞から赤血球の前駆細胞株を樹立した。成人型のヘモグロビンを合成するタイプの株が3種類得られた。これらは試験管の中の分化誘導で脱核赤血球をつくることがわかった。理論的には赤血球の前駆細胞株から脱核赤血球を人工的に大量に得られる可能性があることがわかった。

現在はヒトES細胞から赤血球の前駆細胞株をつくる研究を行っている。脱核赤血球は核が無いので腫瘍化の心配がない。前駆細胞株に染色体に異常があっても、遺伝子変異が入っていても、最終的に脱核赤血球が出来れば臨床応用が可能である。また、脱核赤血球だけ分離する方法もあり、赤血球(8 μ)は小さいのでサイズセレクションでフィルター(10 μ 程度)をかけて赤血球を選別できるし、たまに混在してくる有核細胞は放射線放射で殺せる。いずれも既に臨床で応用されている技術である。こうした技術を使うことにより脱核赤血球は臨床に使用可能であろう。しかし、現段階ではヒトES細胞からは、未だ長期培養できる細胞株が得られていない。iPS細胞に関しては再現性良く作れるようになった。また、iPS細胞からも血球系細胞を形成することがわかった。

04. 培養と抗体による細胞選択が同じパッケージで行える自動培養装置を開発中。これにより、複雑な培養、選択、培養というサイクルを自動化できる。全く新しい幹細胞マーカーを探索中。血液幹細胞については一つのマーカーで500倍濃縮するマーカーを開発した。
05. 脂肪由来間葉系幹細胞やiPS細胞から心筋への分化誘導を行い、移植を目指した再生医療用途ならびに疾患の解析や創薬スクリーニングへの展開を目指す。
06. iPS細胞から角膜上皮細胞および神経堤細胞(角膜内皮細胞)へ分化させ、再生医療用途としての移植を目指す。さらに、角膜上皮だけではなく、他の上皮系への展開や神経堤細胞からの網膜神経系の細胞分化を目指す。疾患患者からのiPS細胞誘導により、分化過程における病態解析を行うことで創薬への展開を試みている。
07. ヒトES細胞、iPS細胞を用いてヒト心筋細胞を誘導作成し、近い将来には薬剤の心毒性の検出系構築、将来的には心不全に対する再生医療を開発したい。現在までに、骨髄幹細胞、ES細胞、iPS細胞より心筋細胞の分化誘導、分化後の増殖技術、純化分離技術、移植技術開発に成功している。また、今後、当大学に設置される予定のiPSセンターで積極的に正常人・患者由来iPS細胞の作製を行い、安全性試験、創薬、再生医療に貢献したい。

企業(製薬)

08. 社の意見ではなく個人の意見であるが、ヒトiPS細胞から分化した細胞を用いた薬剤開発(創薬)のスクリーニングに利用したい。ただし、具体化はしていない。他の幹細胞、特にヒトES細胞は倫理的に使いにくい。患者由来の細胞を使って薬剤を探すことはまだ興味の段階であるが可能性はあると思う。

iPS細胞の利用は細胞診に使うなど臨床への応用の方が早い。安全性の面からみてもこの方がハードルは低い。可能な限り早期にやりたいが、実際にはこの臨床への応用にしても中・長期の目標である。

開発した薬のチェッカーとして使いたい。しかし、分化誘導された系が確立されてさえいれば、1、2年でアッセイ系が組めるという意見もあるが、例えば心筋については3、4年というのはロードマップとして早い利用法に属するであろう。

創薬スクリーニングに応用できるのは中長期の目標と思うが、その理由は実際に薬物をテストするためには、iPS細胞を分化能を有した状態で大量に維持できること、一定の条件で大量かつ

安定に分化させられることが必要となるからである。このような細胞が市販されるようになれば、同じ土俵上・プラットフォーム上でテストをすることが必要な、安全性研究などに利用できるだろう。それ以外の評価材料として使うには、iPS細胞に自分なりの何か一工夫をして使用したいと思う。

細胞を分化させて使用する場合、検出したい分化形質があればそれで良い。分化誘導までした細胞を必要とするか否かは、研究者ごとに異なり、大きく二分される。すなわち、疾患治療と薬のスクリーニングに対応して二分される。現状で医薬のスクリーニング系に使用できるのは神経系、心筋、程度か。まだ肝臓まで効率よく分化させる系が確立していない。創薬に使うとしても、まだターゲットは絞っていない。

患者由来のiPS細胞を使用する研究は、最初、先天的に遺伝子異常のある疾患しか研究対象にならないと考えていたが、疾患の発症をたどるといような全く新しい何か別のアプローチになる可能性があるのではないかという指摘もある。

米国のベンチャーに特許、細胞ともに抑えられてしまう可能性があり、自分たちはiPSを購入する立場になる。

09. パーキンソン病など各種脳疾患に対してヒトES細胞の移植による神経細胞補充療法の確立を目指している。また、ヒトES細胞から血管前駆細胞を分化誘導し、難治性潰瘍などでの細胞移植による血管新生療法も拒絶の問題がクリアされれば、比較的早い時期に実用化の可能性があるとされる。

企業（製薬以外）

10. 表皮／真皮の構成細胞に関してはヒトprimaryの細胞も入手しやすく、十分に増殖する。皮膚モデル作製に対する幹細胞の潜在的なニーズはあると思うが、入手可能な分化した細胞を使用することで対応できている。

皮膚の体性幹細胞は比較的研究が進んでいる分野であり、体性幹細胞を分化させて使用することも将来的には可能と考えられる。iPS細胞についても興味は持っているが、現段階ですぐに扱う予定はない。ヒトES細胞については、倫理的問題から使用はさらに難しいと思う。

例えば、安全性試験の代替法を業界全体で開発する場合を仮定すると、増殖が良いiPS細胞からロット差のない均一な細胞を大量に得られれば利点となる。この場合、iPS細胞の皮膚細胞への分化誘導方法確立が前提となる。また、ハードル（樹立、分化誘導、病態の再現など）は高いが、ドライスキン、過敏症、アトピー性皮膚炎等の患者さんより作製されたiPS細胞を用いた病態モデルが出来れば、より有用と考えられる。

11. マウスES細胞を用いて、発生毒性／催奇形性のアッセイ系（ECVAM法、EST）を改良すべく、レポーター遺伝子導入ES細胞を作製し、薬剤添加前後のマーカー遺伝子発現を解析することでハイスループットな安全性評価系を構築することを行っている。今後、ヒトES細胞の利用も検討していきたいと考えている。

現行の化学物質の登録における安全性試験では最終的には動物を用いた試験を行わねばならず、上記ハイスループットアッセイ系が安全性試験すべてを置き換えるものではない。しかし、ハイスループットアッセイ系により薬剤の安全性一次スクリーニングによる成功確立の向上や優先順位の設定に使用でき、かつ、期間を短縮できるメリットは大きく、また、アッセイに必要な物質量が少ないのも魅力的である。

12. iPS細胞の産業利用として、創薬スクリーニング&毒性試験の実用化を考えています。創薬開発でニーズの高い心筋、肝臓、神経、すい臓などが有望です。弊社では、サルES細胞を用いた心筋毒性試験のビジネスを既に始めていますので、サルES細胞をiPS細胞に置き換えることで、早期

のビジネス化が可能と考えています。当然ながら、ES細胞、iPS細胞ともに同じビジネスが可能になりますので、弊社としては、両方の細胞を同時に進めています。

13. iPS細胞の自動維持培養装置、自動樹立装置、目的の細胞への分化のための培養条件を自動で維持管理できる装置（培養条件を開発するのではなく、指定された培養条件を実現する）。
14. 1) iPS細胞（及び間葉系幹細胞）を安全・効率的に操作・培養・保存するシステム、2) iPS細胞バンクビジネスにおける技術の供給
15. iPS細胞は未分化の状態から、薬剤などにより、目的とする細胞（心筋細胞など）へ分化させる必要がある。この際、薬剤を加えても100%の細胞が目的とする細胞に分化するわけではないので、目的としている細胞へ正しく分化しているか、どの程度の割合の細胞が分化したか、を評価する必要がある。さらに目的の細胞のみを選別する必要がある。また、分化させた細胞は基本的に生きた状態で実験に使用するので、選別・評価の操作中、細胞を生きたままの状態を保つ必要がある。したがって、細胞を生かした状態で、自動で高速に、目的とする分化が誘導された細胞のみを選別・評価する産業技術を開発したい。
16. iPS細胞を作成、分化誘導し、安全な細胞を効率よく、正確に、短期間で樹立することを可能とする装置の開発。たとえば細胞観察とマイクロダイセクションの組み合わせなど、従来技術の融合によってさらに自動化を進めた装置。
17. 弊社は液体窒素式凍結保存システムのメーカーです。再生医療に用いる細胞源の一時的また長期的保存の必要性を重要視し自動化細胞凍結保存システムを開発中です。
18. 心筋再生、血球再生
19. 弊社はiPSおよび幹細胞の計測・分析という観点からは、非あるいは低侵襲的非破壊計測・分析が非常に有益なものという認識があり、これを実現するのに、光学イメージング技術と画像処理技術を複合させたアプローチが非常に重要と考え、このようなコンセプトの装置を開発し、提供するよう努めております。iPS細胞調製条件検討、そして幹細胞の培養、分化誘導の過程の製造管理、品質管理に役立つ計測・分析装置を開発し提供したいと考えております。
20. 弊社は、培養容器製造メーカーである為、iPS細胞や幹細胞を閉鎖系容器内で培養する為のキット製品を開発検討したいと考えております。
21. iPS細胞・ES細胞を細胞培養器(中空糸型細胞培養器等)内で、培養・回収する技術。バイオ人工臓器や創薬開発用代謝試験用細胞培養器と各種細胞の応用。産学連携による開発
22. iPSやES細胞の実用化への橋渡しとして、再生医療への産業向けにてすぐにでも実用可能なのは、体性幹細胞ある皮下脂肪組織由来幹細胞であると思います。皮下脂肪組織由来幹細胞を使用して、軟骨組織や椎間板などが再生されています。まずは、体性幹細胞にて要素技術を確認し、iPSやES細胞へ応用できる環境を整えることが必須かと思われまます。
ヒトES細胞（iPS）の応用として、造血幹細胞などニッチな微少環境での培養技術に興味があります。又臍臓など臓器など器官培養技術の確立を考えています。
23. 骨髓液からの骨髓間葉系幹細胞（MSC）の分離デバイス

24. 羊膜幹細胞、皮膚幹細胞、肝幹細胞等の体細胞由来幹細胞の単離、大量培養技術の開発。公的ヒト正常幹細胞バンクの設立。幹細胞由来の細胞を用いた化粧品、医薬品用安全性試験キット、薬効試験キット製品化。上記技術を用いた各種同種移植による再生医療の確立。
25. 未来におけるiPS細胞の一般的な利用は、創薬分野では開発品の評価系、再生医療では細胞ソース、と想定されます。この何れにおいても用手法から脱却するための培養システムが必要とされることに加えて、培地を含めた培養条件の最適化が必要であると考えられます。弊社は、種々の用途毎に最適化した総合的な培養系を提供することによって、これらの分野に貢献したいと願っています。
26. 骨髄に含まれる幹細胞を増殖させ、脳梗塞治療に用いる治療方法を開発しています。

質問2. 質問1で実現したい再生医療・産業技術に幹細胞を用いる（用いたい）理由について教えてください。特に、現在の医療・再生医療・技術との比較をお聞かせください。

大学、公的機関

01. 患者自身の細胞で治療できるため拒絶反応が起きず永久生着できる。Stevens-Johnson症候群のような免疫亢進が起きる患者の他家角膜移植では、拒絶反応が起りやすく3～4回移植を繰り返す患者もいる。また、他家の組織なので、免疫抑制剤の使用が必要となり、その管理が難しいことがあり、また、免疫抑制剤を定常的に使用していると癌が高頻度に発生することが知られている。免疫抑制の研究の大幅な進歩や、もっと良い免疫抑制剤が開発されないかぎり、永久生着が望まれる組織には患者本人の細胞を使用するのが良い。
allogeneicなMSCを子供のGVHD患者に移植するとGVHDが寛解するということがFDAの承認がとれた。また、allogeneicなMSCは免疫、炎症を弱めることが知られており、創傷治癒など一過的に使うのは良いと思う。皮膚などは一過的に補修すればその他の部分の皮膚が広がってくるのでallogeneicな細胞で良い。
02. 筋ジストロフィーには有効な治療法がなく、また、症例によっては慢性で長期間に渡り苦しむ。先天性代謝異常症のうち治療法である酵素補充療法が現存するのは6疾患のみであり、しかも2千万円/年・患者の費用と週に一回の通院を必要とする。
03. 輸血は現在献血に依存しているが、少子高齢化で輸血を必要とする人は増えるが献血する人は減っていくことになるので、将来的に供給不足が問題となる。また、献血を使用することにより、今でもウイルスやプリオンの感染症が問題となっており、これらは検査しても感染の初期には100%検出できないので、感染のリスクを完全には回避することが出来ない。もう一つは血液中の抗体によってtransfusion related acute lung injuryという輸血を原因とした急性呼吸不全を起こして死に至ることが多いことが知られるようになってきた。完全には原因が分かっておらず、抗体が原因なので洗浄赤血球を使用すれば良いと思われるが、医療経済上難しい。こうした問題を解決するためには赤血球幹細胞、ES細胞やiPS細胞など安全性を確認した細胞から人工的に成熟した赤血球が作れると非常に良い。
04. iPS細胞から角膜上皮細胞および神経堤細胞（角膜内皮細胞）への分化が可能であり、再生医療、創薬スクリーニングへの展開が見込まれるため。また、内皮においては、患者自身からの細胞を

得ることができないので、幹細胞からの分化が不可欠。

05. 現在心不全に対する根本的治療としては心臓移植しかないが、一億円近い費用と一生免疫抑制剤の生活になる。将来的に比較的安い費用で有効な再生医療が可能になれば、救える患者数は飛躍的に増大し、また医療経済的価値も大きい。

また、現在、心毒性検査はHERG遺伝子を発現させた培養細胞で行っているが明らかに不完全であり、後期臨床試験で薬剤が不適となる理由の3割は心毒性である。分化誘導したヒト心筋細胞で検査ができれば薬剤の安全性を早期に判定できる。また、複数の薬剤の組み合わせにより起こる心毒性については現在は全く検討されていないが、そういう検査も可能になる。

一方、遺伝性のQT延長症候群患者由来心筋細胞を創薬に用いることで新たな治療法開発につながることを期待される。

企業（製薬）

06. 現在はスクリーニングに用いるヒト株化細胞はほとんど癌細胞であり、それ以外にヒトの primary細胞の系もあるが、高価でロット差もあり使用しにくい。脳神経系ではライン化されたヒト細胞すらないのが現状であり、iPS細胞から分化させて使えばメリットは大きい。iPSは最初からヒトの材料を使えるのがメリットである。

07. パーキンソン病を例に挙げると、投薬治療は有効性に限界があり、時間を追いかけてみると次第に効かなくなってしまうことが多い。根本的な治療法が求められている。一方、神経細胞はヒト成人から採取する訳にはいかず、胎児脳細胞移植では、十分な数の生着細胞を得るために現状では1人の患者の治療に際し4~5人の人工流産を行う必要があり、倫理的な問題に加えドナー不足が問題になっている。そこで、胎児細胞に代わる移植用細胞として、無制限に増殖し、神経細胞に分化する能力を持つ、ヒトES細胞やヒトiPS細胞に注目した。中枢神経系に移植することを想定しているので、Blood Brain Barrier があり、組織的合成抗原の問題は少ないはずと考えている。

ヒトES細胞とヒトiPS細胞の比較においては、iPS細胞は体細胞を人為的にリプログラミングした細胞であり、その観点からはES細胞に勝るはずはないと考える。iPS細胞を用いた細胞治療は遺伝子治療になるということを含め、ヒトES細胞を用いた細胞治療が時期的には先になると考える。

また、単なる細胞治療だけではなく、投薬との複合治療も考えている。

企業（製薬以外）

08. 化粧品の安全性評価に関して、ヨーロッパでは動物実験への規制が強化されており、今後2年くらいの間には他の試験法に置き換える必要のある試験法もある。そのため、培養細胞を用いた皮膚モデルが積極的に利用される可能性があると考えている。

09. 薬剤の発生毒性／催奇形性を調べる手段として、発生初期段階の細胞であるES細胞を用いることが適当であると考えている。また、ES細胞を心筋、肝臓、神経等に分化させた細胞を安全性試験へ利用することも重要なテーマの一つと考えている。

10. 現在、創薬スクリーニングでは特定の遺伝子をトランスフェクションした細胞株が広く用いられています。細胞株の場合、増殖が容易であるため、大量の細胞を供給することが可能になり、創薬スクリーニングには最適です。しかしながら、細胞株はガン化した細胞であり、また、目的とする種類の細胞でもありません。このため、正常な細胞の機能を見ることはできません。

一方、初代培養細胞（ラットなど）も一部用いられています。この場合、細胞株に比べ、細胞

の正常な機能を見ることはできますが、ロット差が大きいこと、調製に手間がかかり大量供給に向かないというデメリットがあります。

iPS細胞/ES細胞の場合、in-vitroで無限に増殖が可能であるため大量供給が容易です。しかも、目的とする細胞種に分化させることが可能であるため、細胞の正常な働きを見ることが可能です。つまり、iPS細胞/ES細胞は細胞株と初代培養細胞の良い面を併せ持っており、創薬スクリーニングには理想的な細胞と言えます。さらに、ヒト細胞を用いる点も種間差の問題を克服できる点で魅力的です。

11. 失われた組織や器官を再生し、臓器移植のドナー不足や人口臓器の耐久性の問題などを解決するためには、幹細胞を用いた再生医療の実現が不可欠であり、まずは臨床試験で実際に用いられている間葉系幹細胞による再生医療の産業化を実現し、将来的にはiPS細胞による再生医療へと発展させていくべきと考える。
12. 現在、創薬の分野において使用されている細胞株、初代培養細胞には以下のような長所・短所がある。
 - イ) 細胞株の長所：大量に調整することが可能。
 - ロ) 細胞株の短所：実際の生体の細胞と性質が異なる部分があり、生体内で起こる反応と異なる反応を示すケースが見受けられる。
 - ハ) 初代培養細胞の長所：生体から得られた細胞であり、得られるデータの信頼性が高い。
 - ニ) 初代培養細胞の短所：創薬のためのスクリーニングに用いるほど、大量に調整することが困難である。iPS細胞は両者の長所である、「分化誘導後、目的とする実際の生体の細胞に近い性質を有するため、得られるデータの信頼性が高い」および「大量調整が可能である」という点を有することからiPS細胞が創薬スクリーニングや毒性試験の現場に利用できるようになれば、創薬の現場に大きなインパクトがあると考えられる。そのためには、細胞を選別・評価する技術が必要となる。
13. 化学物質の毒性スクリーニングや創薬における細胞ベースのアッセイなど、従来は乳類細胞を用いてきた研究手法にiPS細胞から誘導されたヒト細胞が適していると考えていることが理由。この分野でノウハウを蓄積して将来的に再生医療分野へ応用したいと考えている。
14. 心筋再生：梗塞部位の補強（リモデリング抑制）や心筋再生を目的に骨格筋芽細胞やES細胞の研究が進められているが、機能面、倫理面からiPS細胞を用いるのがベターと考えます。血球再生：リポソームを用いた人工赤血球の開発を行っておりますが、iPS細胞を用いて血液型別の血球バンクが出来ればベスト。特に血小板に関しては、保存期間が短く、献血者からの感染のリスクがあることから、再生医療による代替が強く望まれる。
15. 研究レベルの細胞培養では、主にシャーレやフラスコ等を使用していますが、常にコンタミネーションのリスクを伴いますので、ディスポーザブル閉鎖系容器等を用いたシステム開発が必要と考え、検討したいと考えております。
16. 各種細胞培養を密閉式システムで簡易的に細胞培養器とシステムが少ない。安価な細胞培養研究用システムの構築の必要性が高いので開発中。
17. （質問1の23関連）フィコール法より短時間、高収率、無菌的にMSCを回収できる。
18. （質問1の24関連）iPSと比較してパテントを回避し易い。臨床応用する場合、iPSと比較して、安全性に拘わる問題が少ない。

19. (質問1の25関連) 弊社のスタンスではiPS細胞と幹細胞は同列です。
20. 幹細胞が損傷を受けた部位に遊走して修復する能力をそのまま活用するプロトコールを考えています。現在の治療方法には発症後3時間以内にtPAを投与する方法がありますが、使用が限定されるため、幅広く適用が可能な骨髄(自己)を採用しました。

質問3. 幹細胞を用いた1の再生医療・産業技術における現在の問題点について教えてください。
(どのような問題がクリアされれば実用化できるか)

- 3 A. 技術的問題点：幹細胞作製方法（効率、元になる細胞、遺伝子導入以外、培地や動物血清など）、幹細胞からの分化誘導方法、幹細胞を用いた細胞治療における安全性の担保（CPC、発癌防止など）など
-

大学、公的機関

01. 幹細胞作成方法：効率は皮膚だと0.01%位だが、効率はどこの細胞を使うかで異なる。また、ウイルスによるiPS細胞作成以外ではプラスミドで成功している。さらに薬で遺伝子の数を減らすこともできている。ただ、遺伝子を入れるケースで良いのはウイルスの場合、サイレントになることが分子レベルで分かることで、薬の場合はpathwayが全て分かっている訳ではないので、ここをつぶしても、他のところがどうかかわからないところがある。

遺伝子を使う場合は遺伝子治療のガイドラインにマッチさせ、なおかつ再生医療に使う場合には、再生医療の幹細胞指針にもマッチさせなければいけないので、ハードルが2倍になる。

培地はマウスでは良いが、ヒトは増殖が非常に悪いので、現状の培地では何か足りないのではないと思う。フィーダーレイヤーを除く系も報告されているが、我々はフィーダーレイヤーの系しか行っていないのでどうなのかわからない。

血清は患者血清を使っている。患者血清を使う場合の問題点は例えば70歳以上の患者になると、何かの薬を飲んでいる可能性があり、その影響が培養している細胞に出ないとはいえないこと、また、500から1000mlといった大量の血液が必要なことがあることである。その一方で品質の保証が可能であり、大量に確保できるウシ胎児血清を推進している人たちもいる。このあたりをはっきりさせるのは医薬品医療機器総合機構（PMDA）マターであろうと思う。

幹細胞からの分化誘導方法：まだ、全然できていない。生体には二百数十種類の分化細胞があると言われていたが、このうち分化誘導が確立しているのは数種類しかない。もっと、徹底的にやらなければならない。ただ、個体発生の初期に出てくる細胞は比較的作り易いが、後期に出てくる細胞はなかなかうまくいかない。

ある程度分化すると増殖しなくなる。その1個手前の前駆細胞で増やせるかということ、その辺の技術が確立されていない。そこのあたりは、非常に重要なところであるが、分化誘導の研究のための、今までとはそもそもまったく異なったシステムを用いた超効率的なハイスループット・スクリーニングが出来る装置なり方法が出来てこないと思われる。

幹細胞を用いた細胞治療の安全性の担保：導入遺伝子がゲノムのどこにインテグレートされたかわからないというのには、ゲノムのシーケンスを全部読むのが良いだろう。市販されている最も早いシーケンサーでは1ランで40億ベース読める。ヒトのDNAは30億ベースペアなので、数ラン回せばオーバーラップで全部読める。

発癌性については、人間の癌細胞をヌードマウスやより高度な免疫不全マウスに移植しても殆んど生着して癌組織を作らないという問題がある。これは免疫拒絶の他にヒトとマウスの細胞成長因子とその受容体などのアミノ酸配列が異なっているためと考えられる。関連遺伝子をすべて人間化して、ゲノムレベルでヒトに近いtransgenic mouseを作成し、そこに癌細胞を移植すればもっと高率で癌が形成されるのではないかと考えられている。そうしたトランスジェニックマウスで発癌性を調べる方向に行くと思う。それ以外にはチェックする方法が今の所ない。こうしたトランスジェニックマウスは既にだれかパテントを持っていると思うが、これに類したものを作るプロジェクトを推進するのは意味があると思う。

02. 長期培養細胞（不死化細胞）またはそれに由来する細胞を臨床応用することの最大の問題点は、腫瘍化である。しかし、核のない段階まで分化した赤血球は腫瘍化の心配はなく安全な細胞である。従って、核のない赤血球をつくるためには元の細胞に遺伝子導入しても良いので検討を始めている。分化誘導技術、細胞の不死化技術のどちらにおいても、遺伝子導入は有効である可能性が高いが、現在はそうした目的に適した遺伝子を探索している段階である。
03. システミックなアプローチが日本では進んでいない。個別についてはよい技術もあるが、結局国際競争力がない。すでに欧米では、この分野に絞って大手が活発に活動を始めている。
04. スモールスケール培養技術（iPS細胞の誘導から選抜までの一貫した培養は、比較的小さな容器にて行うことより、操作者を支援するような技術構築が不可欠である）。
未分化細胞除去技術（心筋細胞への分化誘導を伴った培養の際に、未分化細胞の除去する技術が不可欠である。特に、 10^8 cellsオーダーの全細胞から 10^3 cellsオーダーの未分化細胞の除去ならびに、移植の際にはこの細胞数の安全基準を定める技術が不可欠である。）
分離細胞の安全基準評価技術（移植を前提とした場合の未分化細胞の混在に対する安全基準）
⇒対象細胞の抽出、非対象細胞の除去技術。
05. 細胞の純化技術（抽出）：分化誘導におけるバリデーションのための分化マーカーの信頼が不十分。移植後のモニタリング技術（幹細胞を利用する際に移植後の異常性判断が不可欠）。iPS細胞使用のための規定の確立（ES細胞とは異なる規則が必要、技術の進歩と伴に変化できるような柔軟性が不可欠、倫理的要素と危険性を区別した議論）。
遺伝子組み換え技術の利用：遺伝子治療の範疇であるため、ウイルスフリーへの展開。iPS細胞から分化誘導の際に未分化細胞を判定する技術が不完全。
06. ES細胞、iPS細胞の大量培養技術。

企業（製薬）

07. まずクリアすべきは、安定した効率の良い分化誘導法およびiPS細胞が未分化で安定した状態で維持培養および保存可能であることである。この点がボトルネックであるかもしれない。研究開発上の問題点は研究者の問題と培地が高価なことである。意外にコストがかかる。また、iPS細胞を使用する場合、その特許の問題も気になる。
気になることは、理研等細胞バンクよりiPS細胞を入手して使用する場合に京大との間で特許問題が生じるのではないかと危惧する。特許をどうするか京大の方針が明確には決まっていないようだ。一部の企業には300万円/年で細胞株を提供しており、京大から何社かが入手しているようだ。また、アッセイ系を確立した時の対価が不明である。iPS細胞の作製法の特許なのでライセンスの仕方が問題になるであろう）基本的な特許をどう考えるかにもよる。
iPS使用対象として具体的には遺伝子多型の検査がある。しかし、先天性遺伝子異常は比較的

疾患数は少ない。この検査は大事であり、また治療法の開発もすべきだが、企業では採算がとれず実施は困難であろう。国立成育センター等の公的病院・研究機関での治療法の研究開発が必要である。患者由来のiPS細胞を使用対象にするのは先天性疾患だけではなく後天性表現型はゲノムに問題があるので対象になる。患者由来のiPS細胞を創薬研究に用いる場合には、疾患により向き、不向きがあると思う。

08. ヒトiPS細胞は標準化が出来ておらず、標準化のための指標すら現時点で明らかでない。また、現状のように遺伝子導入により作製された場合、iPS細胞を用いる細胞治療は遺伝子治療にも相当し、より厚生労働省の規制を受ける。ヒトES細胞でもiPS細胞でも、高効率な分化誘導方法の確立は重要である。ヒトES細胞では細胞バンクを設立し、一定数のヒトES細胞が利用可能な状態にする必要がある。

ヒトES細胞に関しては研究のためでも社内に倫理委員会を設立して審議することが要求され、多くの会社では対応できない。iPS細胞に関してはその問題はない。逆に、もし現時点でヒトES細胞が使用できているのであれば、あえてiPS細胞を用いる必要はない。また、ヒトES細胞の国内での樹立に関しては文部科学省の指針があり、会社レベルでは事実上対応不可能であるが、iPS細胞に関してはこのような問題はない。一方、ヒトES細胞を臨床に用いることは前記文部科学省の指針で禁止されており、また、厚生労働省の幹細胞指針からも除外されている。従って、日本国内では現時点でヒトES細胞を治療に用いることができる可能性はほとんどない。この点はiPS細胞も同じである。治療に結びつけるためには動物実験等での著しい有効性と、安全性が必要である。

企業（製薬以外）

09. 表皮細胞、真皮細胞、色素細胞への効率的な分化誘導技術。但し、増殖性を保持したまま終末分化の手前に留めておくことが可能な技術。均一な細胞を得るための大量培養技術。疾患由来のiPS細胞や遺伝子多型を反映した多種のiPS細胞の使用が可能になった場合、企業でも使える細胞の供給体制。
10. 利用可能なヒトES細胞のクローン数が少ないこと。企業で受精卵よりヒトES細胞を作製できる状況にはないことから、何らかの国等の機関でヒトES細胞をある程度の数樹立してクローン数を増やし、また、企業への供給体制を整えてもらいたい。
11. 創薬スクリーニングは再生医療に比べ、技術的ハードルはかなり低くなると考えられます。たとえば、再生医療では最大のネックとなる安全性に関する問題がなくなるので、再生医療より実現はかなり早いと言えます。分化誘導に関して言えば、目的とする細胞種によって、まだまだ難しいものが多くあります。特に、肝臓やすい臓への分化誘導に関しては、世界中で研究がなされていますが、まだ創薬スクリーニングで使用できるレベルには達していないと思います。今後は、各種細胞への分化誘導方法の開発が鍵になってくると思います。
12. 分化された細胞の識別法、分離法
13. 未分化のiPS細胞は、積極的に品質を維持しなければならないことが問題である。再生医療に用いるためには、目的の細胞に分化誘導する技術の開発とともに、癌化しないように制御する技術や、未分化のわずかなiPS細胞を検出・抽出する観察技術などが必要と思われる。
14. 一般論として、細胞を移植する場合は、ガン化の危険性の問題、無血清培地を使用しなければいけない点、がある。

15. 技術的課題としては、製造コスト・ランニングコスト低減です。
16. (質問2の14関連) 分化誘導方法を進化させ、実用に見合う製造コストの実現、目的細胞以外に分化した細胞・未分化細胞の除去による安全性の確保が必要である。また、現在直面している問題点としては、臨床試験方法の確立がある。
17. バイオ人工肝臓等を長年研究開発している。多くの細胞を培養する技術と大量細胞培養した細胞の回収技術および保管技術。細胞培養技術のシステム化が困難(不死化誘導技術の確立)。細胞培養用機材のコスト高騰
18. 操作・製造設備に関する技術障害(自動化の実現範囲、製造設備メンテナンス費用、人材育成など)、幹細胞作製方法(効率、元になる細胞、遺伝子導入以外、培地や動物血清など)、幹細胞からの分化誘導方法、幹細胞を用いた細胞治療における安全性の担保(CPC、発癌防止など)など。

ヒトES細胞(iPS)の応用として、膵臓組織、肝臓組織、又は造血細胞など様々な可能性が示唆されている。しかし例え分化に成功しても器官培養技術が確立されておらず未熟な状態で断念せざるを得ない。すなわち再生医療・産業技術を発展するための要素技術である器官培養技術の確立は不可欠である。
19. 各幹細胞の原料となる組織の供給体制が整っていない。実質的な公的バンク(コーディネート、加工、保管、発送等)の設立が必要。
20. 細胞および細胞から構築した組織の品質の指標が定まっていない。現時点では、「こうすればこうなった」というチャンピオンデータの結果が提示されているだけである。作製方法・分化誘導方法とも関連するが、品質を制御するための明確な指標を確立することが事業性を検討する上でも重要であると考え。
21.
 - 1) 細胞調製を行うための生産設備について具体的な施設基準が整備されていない。(現在のcGMPでは実態に即していないので、細胞調製に係るGMPについての議論を深める必要がある)
 - 2) 生産設備のプロセスバリデーションを行うための、標準となる細胞ソース、血清などの原料についての基準が必要である。
 - 3) 細胞治療や再生医療の目的のために骨髄や末梢血(血清)を採取する公認の施設が必要(大学病院と関係する以外、現状は米国から輸入した原料で実験せざるを得なく、フレッシュな原料を入手することが困難である)
 - 4) 施設基準の一部となるが、生産設備で複数の細胞をシリーズで処理する際に不可欠な滅菌システムについての統一した考え方が無い。
 - 5) FBS(Fetal Bovine Serum)の使用についての条件が曖昧である。(商業化に当たってはコスト低減の可能なFBS採用は不可欠となってくる。BSEなどの危険を排除しながらも採用して良い条件を明確にすべきと考える)
 - 6) 細胞調製を専門とする施設の建設・運営に国が積極的な役割をすべきである。(細胞調製施設、Cell Processing Center、の運営には特殊な知識と経験が必要である。集約化により安全で品質の高い細胞調製を請け負うビジネスも可能となり、コストダウンにも寄与する)
 - 7) 細胞調製に関与する作業員(オペレーター)の技術レベルを向上させる教育機関が必要(良質な手技と基礎知識を持ったオペレータ数が限定されている。将来に備えて専門教育機関の設置と認定システムが必要である)
 - 8) 自動培養システム開発を国家プロジェクトとしてスタートさせ、国内の需要への対応と同

時に、新しい輸出可能な技術として育成すべきである)

質問3.

3B. 非技術的問題点：倫理的問題、規制（遺伝子治療他）、コスト対策

大学、公的機関

01. 倫理的問題点については自分の細胞を持ってきたときは問題無いが、他家のものを持ってきたときは問題がある。ドラッグスクリーニングや病因解明で患者細胞をもらって使用するときには問題となる。これは患者が特に拒否するのでなければ細胞を研究や産業応用に使っても構わないというような法律を決めた方が良い。

規制については、遺伝子治療のガイドライン、再生医療の幹細胞指針をcompromiseしないと、大学の研究者には厳しくて臨床研究もままならないのが現実である。

コストについては、スーパー特区でやるような初期のヒト臨床では国が全額出し、その代わりに、得られたデータは全て提供するようなことが出来ないか。最大でも5年間で100例位しか行えないのでそれほど費用はかからない。

02. 発癌性/テラトーマの危険性に関してはゼロリスクでないことの説明とリスクベネフィットのバランスの判断が重要。細胞を用意する施設は、おそらくiPS細胞/ES細胞樹立の段階からGMP準拠である必要がある。

規制に関して、有効性、安全性、倫理性の検討が必要とされる。有効性の検証に関しては、動物などのモデル系で有効性が実証できれば良い。ただし、そのような系が無いときは、モデル系の作製、あるいは、他のシステムの外挿が必要。安全性の検証に関しては、xenograftで検証すれば良いとFDAも認めている。倫理面に関しては、ヒトES細胞はともかく、ヒトiPS細胞はあまり問題が無いのではないかと考える。

03. ヒトの脱核赤血球ができてガイドライン（規制）が無いと臨床に使えない。長期培養した細胞材料の臨床応用に関する指針が全くない。

倫理的問題はこの研究に関しては特にはない。コストに関してはサイトカインを使うと高いが、例えばマウスのES細胞からの赤血球株の維持にはSCFまたはエリスロポエチンが必要なのだが、エリスロポエチンは特許が切れていて非常に安いので、エリスロポエチン依存性であれば大量培養は何の問題もない。ただ、この株は、まだ試験管の中での脱核赤血球への分化効率が悪いので、いま、試験管の中での脱核効率を上げる検討をしている。出来た細胞株から効率よく、半分程度が脱核赤血球になるような技術が開発できれば、ビジネスモデルになると思う。

04. 倫理的な問題、規制等は軽減されるに越したことはないが、自助努力で済むことではない。基本的には、コストの安いシステムを作るしかない。

企業（製薬以外）

05. in vitroの使用を想定しており、遺伝子組換えに関する問題はないと考えている。動物実験全体のコストから考えると、iPSの導入で代替試験法の開発が大幅に促進にされれば、コスト面で見合う可能性はある

06. ヒトES細胞を扱うには社内に倫理委員会を立ち上げて審議した上で文部科学省の承認を取らねばならない。海外の多くは機関承認のみで取り扱いが可能と聞いているので、日本でもその様になれば研究が進むことが期待される。
07. ヒトES細胞に関しては、我が国において過度の規制がなされており、それが研究および事業化の遅れにつながっています。iPS細胞に関しては過度の規制を行うことなく研究および事業化を推進できる体制を作っていただきたいと思っています。また、ES細胞とiPS細胞は表裏一体であるため、ヒトES細胞の研究をやらずにヒトiPS細胞の研究のみが進められるかということ、実質的に難しいところがあります。弊社はサルES細胞とヒトiPS細胞の両者を平行して進めておりますが、やはり、ヒトESとヒトiPSを平行して行うことが必要だと感じています。
08. 「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」（いわゆるヒト幹指針）や「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（いわゆる医薬発1314号）などの規制により、再生医療の臨床試験が進みにくい状況であることが問題である。このような再生医療の進展を阻害する規制を緩和するような措置を取ってほしい（医師法の柔軟性、薬事法の安全性を兼ね備えた規制への展開）。臨床試験をスムーズに行うための人材育成も不可欠。
09. 一般論として、マスコミなどの報道により、あたかもiPS細胞から作り出された臓器の移植などがすぐにでも実用化されるといった誤解が、世間にひろまってしまう可能性がある。その結果として、将来、大変有望な技術であるにもかかわらず、数年間、結果が出ないことによって、過度な期待を裏切る結果となり、芽をつまれてしまう可能性がある。
10. スクリーニングアッセイにヒト由来iPS細胞を応用することに限定すれば、細胞ソースの信頼性の確保、アッセイ方法の標準化などのガイドライン作り、国際標準のガイドライン作りに関して海外とのパイプを持っている研究者の参加などが必要。
11. 医療機器としての認定取得
12. 幹細胞の計測・分析に大きな興味があります。この場合、何を見るか、何を測定するか、それ自体が大きな課題であると認識しています。生命、細胞の多様性について、何をどのように、どのパラメータをどのくらいの時間・範囲にて、どの程度の精度にて測定・分析すれば、細胞に関わる情報を得ることが出来るか、この点が明確になっていないと認識しております。また、一方で、目的となる計測を実現する計測・分析ツール自体も揃っていないのが現状かと思えます。鶏と卵なんかもかもしれませんが、しかし、測定対象の検討の進展を期待しつつ、分析・計測手法・ツールの開発を、弊社としては、地道に構築・開発していくことを考えています。
13. ヒトES細胞については、国がマスター細胞の管理を行い誰でも低コストで供給できる体制が必要と思う。
14. 医療機器と理化学機器との規制の差が大きいと推測される。
15. 規制当局がビジネス側に求める品質管理に対する基準が不明確であるために、薬事申請のコストを見積もることが困難となっている。これは規制当局だけの課題ではなく、倫理面を含めた『医療にどこまで求めるか、どこまで研究を許すか』の議論が不十分であるためであろうと思われる。
16. 1) 法律的整備が遅れている。(一般の医薬品と異なるジャンルであるにも拘わらず、医薬品や医療機器の基準を下敷きにして物事が進んでいる。「細胞治療・再生医療基本法」といったよう

な新しい法体系の下に統一して考えるべきである)

2) 特許化への対応が遅れている。(治療方法についても特許化が必要。また、この分野の特許専門化が海外に比べて貧弱で、その結果として特許審査が遅れている)

3) 細胞治療、再生医療に関する情報が一元化されていないため、国全体として非効率的な研究開発が行われている。(特に、細胞調製施設に関する技術的課題、運営面での問題などインフラとなる部分についての問題が多い)

4) 許認可手続きの推進(医薬品・医療機器総合機構の大幅増員と研修強化が必要)

5) 臨床研究段階でcGMP準拠を求めている「ヒト幹細胞を用いた臨床研究GL」を実態に即した内容に変更すべき。

質問4. 質問1で実現したい再生医療・産業技術が可能になった場合どのようなbenefitが得られると考えておられるか教えてください。

- ・再生医療：治療可能患疾患名(可能なら患者数、それにより節約できる医療費)など
- ・産業技術：経済効果、周辺技術開発など

大学、公的機関

01. 自分の細胞移植で治療できれば、免疫抑制剤が不要になる利点がある。例えば他家の腎臓を移植した場合には、免疫抑制剤が必要になるが、量が少ないと拒絶反応で取れてしまうし、量が多いと腎臓が弱ってくる。そのため、非常に狭い領域でコントロールしなければならないので、免疫抑制剤の費用だけでなく治療コストがかかる。

治らない病気が治るという利点がある。Stevens-Johnson症候群の患者など角膜移植が必要で、かつ、他家の角膜をrejectするような患者は生涯目が見えないが、患者自身の口腔粘膜から作った細胞を移植すると、視力は上手くいけば1以上出るようになる。患者のQOLが上がるし、介護の手間がなくなる。節約できる医療費ではなく、トータルの社会的コストというような考え方であれば、失明すれば、介護などの手間がかかり、治癒すれば産業に参加できるので価値は大きい。

02. 間葉系幹細胞を使用した再生医療が広く実現した場合、周辺技術も含め日本で3千億円/年、世界で3兆円/年の産業及び医療経済効果がある。

03. 献血の変わりに人工赤血球を使う。赤血球株から大量に出来るようになればコストパフォーマンスもよくなるのではないか。最終的にはO型Rhマイナスの赤血球が出来れば、抗原が何も無いし、試験管の中での培養なので抗体を作らないし、ウイルスなども最初に検査しておけば心配がないので、O型Rhマイナス株が1株あればごく特殊な抗原を欠損した人以外、世の中の99.9%以上の人に輸血が可能な赤血球が供給できるようになる。

04. (質問1の04関連)誰でもが簡単に複雑な培養工程を実現できること。また、出来るだけ少ない抗体で幹細胞を濃縮することは画期的なことだと考えている。

05. 「心筋細胞への分化工程がほぼ確立している」なか移植素材としての細胞が前駆細胞又は分化細胞のどちらが良いかを現在検討中である。

この状況下で、iPS細胞由来の心筋前駆細胞または分化細胞は、移植素材として有効となり、外科的処置によって重度の患者に対して治療の確立が成立する。また、創薬スクリーニングへの展開は、心疾患解明の促進ならびに新薬探索へ貢献し、内科的治療へと応用でき、さらには、予防

医学への展開が考えられるような、QOLの向上が見込まれる。

06. (質問1の06関連) 上皮：スティーブンス・ジョンソン症候群； 内皮：水疱性角膜症。
内皮細胞は、海外のアイバンクからのソース供給（他家）に頼っている。1眼あたり、シート5～10枚程度作成可能であるが、不十分。この細胞ソースの問題に対して、解決できる。
07. (質問1の07関連) 心筋梗塞などによる心不全。一万件/年。

企業（製薬）

08. 従来にないアッセイ系が組めることになり、新しい薬剤ができる可能性がある。
09. (質問1の09関連) パーキンソン病の患者数は、日本で170,000人、米国では、100万人以上で、開発途上国の毎年の発生率は800,000人となり、2020年の患者数は、世界で300万人近くになると言われています。この内、5-10%が細胞移植対象者になると思われます。細胞移植治療の場合、1回の治療で数年から10数年の効果が期待でき、薬物代、入院代の抑制につながる。

企業（製薬以外）

10. 安全性試験の代替試験法開発に利点がある可能性はある。例えば、疾患由来のiPS細胞が入手／分化誘導が実現できれば、反応性の違いを調べることが可能になる。また、病態や人種等の違いでパターン分けできれば、オーダーメイド化に繋がるかもしれない。iPS細胞は必須ではなく患者さん由来primary細胞でも可能と思うが、供給源が限定され、大量生産には向かないため。未分化状態のiPS細胞の大量培養技術が確立できればメリットが大きいと考える。
11. iPS細胞 / ES細胞が創薬スクリーニングに本格的に利用された場合、創薬の開発期間およびコストの大幅削減が可能になりますので、そのインパクトは非常に大きいと考えられます。一般的に1つの新薬を開発するのに10～15年、数百億円のコストがかかると言われています。実際、製薬メーカーの売上の10～15%が新薬の開発に投入されています。
iPS細胞 / ES細胞による創薬スクリーニングでは、ヒトの機能性細胞を大量に供給することを特徴としていますので、創薬前期で大量の候補化合物をスクリーニングして、その薬効および毒性を正確に測定することが可能になります。このように有効な化合物を早期で正確に絞り込むことで、開発期間および費用を大幅に短縮できると考えています。
12. 1) 体性幹細胞（主に間葉系幹細胞）による、骨・軟骨・心筋・角膜などの再生医療において2015年頃までには臨床試験データの蓄積が完了し、保険適用が承認されるものも出てくると思われる。→産業化の成立。 2) 再生医療産業の創出により、細胞を操作・培養・保存するためのシステム事業が新規事業として成長し、さらには細胞バンクビジネス（医療用バンク、細胞保存、供給）が新たな産業として立ち上がっていると思われる。
13. iPS細胞から分化した細胞を、自動で高速に選別・評価する技術が開発されれば、その細胞が創薬スクリーニング、毒性試験に利用され、新薬開発の効率化が期待できる、
14. ヒト由来iPS細胞をスクリーニングアッセイに用いることで、化学物質の毒性、動態研究の信頼性が格段に上がり、ヒトへの影響が十分理解されないまま使用されている数万と言われる化学物質のスクリーニングアッセイの実現可能性が高くなる。

15. 本システムはヒューマンエラー防止、細胞調整に関する無人化によるコスト低減を目的とし、将来的に自動培養装置と連動させ細胞ハンドリングを完全無人化すべきと考えています。
16. 心筋再生：心筋梗塞、拡張型心筋症。
血球再生：代替輸血（血液自体は献血のため原材料コストはないが、血球分離作業、細菌・ウイルス除去、採血場所→製剤場所→病院への輸送などのコスト削減が期待出来る。また、世界的には献血が進んでない、アジア・南米地区を中心に、献血に頼らない血液製剤の確保が出来る。）
17. 弊社は装置メーカーであるため、第一に、ある装置の売り上げアップ
18. 細胞を用いた医療行為の標準化。培養関連製品に関する医療機器化。
19. バイオ人工肝臓・人工すい臓への応用。人工臓器による対症療法にかわり、臓器再生と合併症の治療への応用。
20. 無菌的にMSCが回収でき、全骨髄播種法、フィコール法による培養より培養期間が短縮できる。
21. 化粧品・医薬品の試験キットの製品化に数億円の利益。試験キットによる動物実験代替法法制化により医薬品開発の低コスト・迅速化。再生医療を同種移植で実現することにより大規模な産業化が可能になる。
22. 創薬の評価系への利用が実現すれば、より作用機構が明確な薬剤をデザインし効果検証することが可能となります。当然のことながら創薬コスト全般に対して圧縮効果が期待できます。再生医療においては、製造材料（培地）の品質が向上することによって高いレベルの品質保証が実現されます。これは再生医療ビジネス全般を拡大する機動力になると期待されます。
23. 脳梗塞発症後の本人および家族の負担を大幅に低減し、本人の社会復帰を促進することでQOLを高める。脳梗塞の三大病型のうち2つ（ラクナ梗塞、アテローム血栓性梗塞）が適応となった場合、対象患者数は年間14.7万人に上り、リハビリで節約可能な費用は約360億円（脳梗塞による所得損失の回避等も含めると約7千億円）と推定する。

質問5. 質問1で実現したい再生医療・産業技術について、お考えになっているタイムスケジュールあるいはロードマップをお教えてください。

・早期（数年以内）： ・中長期（～10年）： ・将来（10年～）：

大学、公的機関

01. 一部の研究者の間では、世界で3～5年以内に誰かがiPS細胞を臨床に使用するだろうと考えている。我々も加齢黄斑変性症で出来れば3年以内にヒト臨床を行いたいと思っている。この疾患は欧米では失明の第1因である。網膜色素上皮細胞（RPE）は分化すると黒くなる細胞なので、分離が容易で、シャーレ上で黒い細胞だけ集めると純度100%で得られる。このため、未分化の細胞を移植したときに起こるテラトーマ（奇形腫）が防げ、そういった面では安全な症例になるであろう。また、患者の細胞採取から治療に使えるまでにするのに3～4ヶ月かかるが、加齢性で患者の視力は急激に変化するものではないのでiPS細胞作成に時間がかかっても適応可能である。

02. (早期) 高度先進医療により3年程度で、先天性代謝疾患に対する細胞治療、おそらく皮下注による、を目指す。動物実験において有効性を示した結果あり。
(中長期) 筋ジストロフィー患者に対し、筋肉、特に呼吸筋に対する筋芽細胞移植療法を5〜6年のタイムスケジュールで考えたい。これも動物実験で有効性が謳われている。
03. ヒト赤血球株：2〜3年以内。それから先、効率を上げる研究が進んで、試験管の中で赤血球を作って応用出来そうになれば、10年位で臨床応用が現実味を帯びているのではないか。
04. (早期) 自動培養装置、バイオマーカーは3年以内で上梓しないと意味がない。
05. (早期) 移植への見通し、大動物実験、来年。(中期) ヒトへの移植、年数ではなく倫理的背景と勇気。(将来) 創薬スクリーニングによる内科的治療薬の開発および予防医学への展開。
06. (早期) 動物実験。(中期) ヒトへの移植(安全性確保、腫瘍化の解明の後)。
07. (早期) 大量培養のめどを2、3年でつけたい。薬剤の安全性試験は数年で可能か。(中長期) 実際にヒトで再生医療を開始したい。ES細胞が先行。iPS細胞は安全性が確認されてからになる。

企業(製薬)

08. アッセイ系の確立について、中長期(10年以内)が目標だと思う。夢の薬ができることに期待はするが、そう簡単ではない。これまでの医薬開発には昔10年、今15年と言われている。アッセイ系には1年でよいが、医薬開発、治験に7、8年かかる。これらを同時進行させても10年では無理であろう。それはiPS細胞以外の幹細胞でも同じであろう。
再生医療になると当初は10年と思っていたがそうはいかないと考えるようになった。少なくとも安全性問題を考慮し、さらに他の技術的問題を解決しないと10年では困難である。他社も恐らく興味を持っているが、そんなに進んでいるとは思わない。やればいいものが出てくるとは言うが。
海外のベンチャーが作成したiPS細胞が輸入されてくるだろう。弊社も研究体制がグローバル化され、日本製のものだけという意識はなくなっている。iPS細胞に関しては、この関係から日本のiPS細胞というものの位置づけを国がどう考えているのか疑問であるし、私達もそれにどのように協力したらよいかかわからない。
規制の問題。規制が厳しいから研究をしていないのではなく、iPS細胞を使おうとすれば、自分たちが手をつけなくても、比較的入手しやすく、使いやすいためであろう。
iPS細胞とES細胞とを比べると、ES細胞の方が10年間の蓄積があり、分化誘導もES細胞でやっていたので、ES細胞の方がベターである。しかし、規制や倫理上の問題がある。ES細胞に関して規制緩和の必要性はあるが、種差の問題があるので、ヒト細胞を使うという立場ならば使用のニーズはある。
09. (早期) 前臨床試験まで数年で到達することを目指している。(中長期) 実際に臨床で使えるようになるまで、10年弱を見込む。

企業(製薬以外)

10. (早期) 安全性試験の代替試験法開発について言えば、業界内の体制作りを含め2年くらいで研究がスタートできる体制が整えられれば理想的と考える。iPS細胞等の幹細胞の使用は、分化誘

導方法の確立や実際に細胞を使用できるかなどに依存する。基礎研究を含めて単独でこれらの技術を開発するのは難しいため、アライアンスなどで対応することになると思う。(中長期)皮膚の研究者は世界中に多いので、iPS細胞から皮膚構成細胞への分化誘導の方法の確立は比較的早期に達成できることも考えられる

11. (早期) 約2年でハイスループットの検査系を構築。(中長期) 約5年で多くの指標を用いた検出系としての有効性・有用性を評価し、OECDガイドライン化を目指したい。
12. (早期) 2009年ヒトiPS細胞を用いた心筋毒性試験ビジネススタート。(中長期) iPS/ES細胞から神経、心筋、肝臓、すい臓など、様々な細胞種を作製し創薬スクリーニングで使用する状況になる。また、国際的なガイドラインでも本手法が標準と認定されるようになる。
13. (早期) 創薬対応、非臨床研究用途(iPS細胞)、(中長期) 臨床研究用途(iPS細胞)、(将来) 医療用途(iPS細胞)
14. (早期) 2015年には、体性幹細胞(主に間葉系幹細胞)による骨・軟骨・心筋・角膜などの再生医療の臨床試験が各方面で行われていると思われる。筐体密閉型培養装置(アイソレーターなどを含む)が汎用機として用いられ始める。
(中長期) 2015~2020年には、薬事承認を得た体性幹細胞(主に間葉系幹細胞)による再生医療が広がっていると思われる。汎用性のあるプロトコールにおいては一部自動化が進む。
(将来) iPS細胞は、2025年頃には安全性や分化誘導技術などの基礎データが蓄積され、臨床試験に着手され、本格的な再生医療の幕開けとなるであろう。
15. (早期) 試験的な、細胞の自動高速選別・評価装置の開発の完了。(中長期) 製品版としての細胞の自動高速選別・評価装置の開発の完了。(将来) 技術の普及による一般化。
16. (早期) 現行の毒性試験手法の自動化、ハイスループット化。(中長期) 上記手法へのヒト由来iPS細胞の適用。(将来) 上記の開発で得たノウハウを再生医療分野へ応用。
17. (中長期) 自動培養装置連動型の自動化細胞凍結保存システムの上市
18. 心筋再生については10年以下、血球再生については10年以上が必要と考えています。
19. (早期) 細胞評価手段の一般化。半自動ハンドリングツール、計測ツールの提案。(中長期) 細胞評価手段のブラッシュアップ。無人(自動)ハンドリング装置、計測装置の登場。(将来) 産業的細胞創製の時代到来。
20. (中長期) 閉鎖系細胞培養キットの開発
21. (早期) 研究用及び創薬開発の代謝試験用として応用とて3から5年。(中長期) バイオ人工臓器(肝臓・すい臓)・樹状細胞ワクチンの応用として、5年から10年。
22. (早期) 来年9月に理化学機器として上市予定
23. (早期) 公的バンクによる体細胞由来幹細胞のバンキング。試験キット製品化。(中長期) 再生医療(特に抗がん治療、美容整形等)。
24. 幹細胞・iPS細胞を利用した評価系の開発は既に多数の研究機関・企業で進められており、これ

らに同調して弊社も培地の開発・製造を展開していく予定です。

25. (早期) 臨床治験。(中長期) 商業化(日本、米国)。(将来) 全国展開(1万人規模細胞調製施設10箇所建設)。

質問6. 質問3で挙げていただいた問題点解決のために、国、産業界、医学界、研究者、マスコミなどに対する要望がございましたらお願いします。

大学、公的機関

01. 医療産業は今でも年率10%以上の成長している。日本はこれまで車で外貨を稼いでいたが、今後は医療業界で稼げるようになるのが望ましい。そのためには、研究者の裾野を広げて高さもあげる必要があり、マスコミに協力してもらって、例えば、「山中伸弥物語」などを作って、この分野の魅力を小中学生にPRするようなことが必要だと思う。
02. 細胞治療用の細胞の安全性を低分子化合物の安全性と同じ基準で考えるのは本質を外している。細胞と低分子化合物は全く異なったものであるので認可に関しては同じ基準で物事を判断して欲しくない。
細胞治療/再生医療のための研究費・(安定した)マンパワーが圧倒的に足りない。これを国、あるいは、産業界から出すしくみが欲しい。臨床研究に医師が参加するのが困難。再生医療クスターのような仕組みが必要。
iPS細胞含め、何かnegativeなことが起こった場合のマスコミ・社会の反応が脅威。リスクとベネフィットのバランスを評価して欲しい。
ES細胞に関しては、単にES指針の問題ではなく、研究者のやる気の問題。臨床応用については厚生労働省が議論を始めている。
03. 厚労省がES細胞の臨床応用におけるガイドラインを早く整備して欲しい。海外はすでに臨床グレードのヒトES細胞を作製してバンク化する研究を始めている。韓国の某私立大学1カ所だけで30~40株のヒトES細胞を作製している。
04. 先駆的な研究に対する投資：2次的、3次的中核機関への対応が依然として規模が小さい。迅速性重視するならば、1次の中核施設ではなく、すでに運営可能な機関へ積極的に投資してほしい。また、工学的技術の活用についての議論が少なく、工学的技術への投資が不可欠である。
05. プロジェクト化。実務的安全性指標の確立。制度、薬事法と医師法の関係、自家の場合のビジネスモデルのビジョンの明確化。
06. 再生医療産業化のための見込みのあるベンチャーへの支援。

企業(製薬)

07. 懸念は京都大学を含めた知財関連の問題である。社内でiPSの話になると、必ず知財面の懸念を指摘される。研究者としては知財関係がすっきりした状況でiPS細胞を使いたい。どこかでまとまって対処してほしい。また、遺伝子を導入しない方法で将来iPS細胞ができた場合でも、再

生医療に関しては京大問題が残るかもしれないが、医薬の場合には無関係であるのか等があり、ともかく特許問題をクリアにしてほしい。情報の公開と整理が不可欠である（製薬協等がまとまって問題を提起することが必要か）。iPS細胞関連特許の調査も業界でまとめてやればよいし、専門の技術調査会社に依頼すればよい。各社でやるのは無駄である。ES細胞の方が特許上の面倒は少ないかもしれない。

iPS細胞がオープンになったら現在の安全性試験に置き換わる可能性がある。

社として再生医療に取り組むかどうかはともかく、個人としては興味がある。細胞治療が出来やすい環境設定が必要である。この立場からiPS細胞に対して産業界がアプローチし易い状況を作ってくれることを希望する。ES細胞の指針からiPSは除かれている。ES細胞は医者であれば自分で取り扱えるが（現実には多忙であり自分一人で培養などできない）、産業界は不可能である。患者以外からiPS細胞を確立するのは、弊社が開発することになる。これをどのように利用するか戦略が必要になる。

別の方法としては、iPS細胞バンクの設立が必要になる。例えば、性質の多様性、多種の細胞等患者以外の細胞バンク、また逆に汎用化された細胞も維持・保管し提供する。

文部科学省には種々のプロジェクトがあり、また、京大などの特区もある。産業経済省ではNEDOのプロジェクトがある。厚生労働省にもあろう。これらの交通整理ができないか。一企業では1から10まで全てやることはできないし、税金を効率よく生かすためにも、この部分はこのプロジェクト、という分担がよいのではないか。そうであれば、自分たちが関わりたいと思うプロジェクトを選ぶことができる。

分化誘導のところも対応が分かれている。すなわち、自社で開発する企業、方法まで含めて大学などアカデミックでという企業の2通りある。自分としては、アッセイ系さえ構築すればよい。分化誘導もどこでもよいから作ってもらいたい。

08. ヒトES細胞に関わる規制の緩和。

企業（製薬以外）

09. 規制が自由な産業化を阻んでいる側面はあると思う。例えば、化粧品で訴求できることと、消費者が化粧品に期待することのギャップが大きくなっていると感じる。また、国からの技術開発に関して言えば、継続的サポートが望ましい。
10. ヒトES細胞の供給体制構築。また、各界がセンセーショナルな対応をせず、いろいろな事柄のリスクとベネフィットをきちんと把握して対応することを望む。
11. ヒトES細胞の「使用」の自由化が急務だと思います。早期にUKやシンガポールと同じレベルにしていただければと思います。ヒトES細胞の「樹立」に関しては受精卵を滅失する工程を含みますが、「使用」に関しては全くその工程がありません。「樹立」と「使用」を切り離して倫理問題を取り扱い、「使用」に関しては自由化していただければと思います。

特に、再生医療に関しては、技術的ハードルを考えると、ES細胞がiPS細胞に先行して実現すると思います。逆に考えると、ES細胞を先行させて臨床応用し、有効性および安全性を確認した後で、iPS細胞の臨床応用を進めた方が、Step-by-stepでリーズナブルだと思います。その意味でも、ES細胞の研究を加速させる政策が必要だと思います。
12. 多大な開発費を要し、成功の目処や事業展望が立てにくい。装置がどこまで完成度が高ければよいのか、規格をどうするのか。開発費の支援、研究成果の移転、規制の明示（何をクリアすれば認められるか）、開発費回収が可能となる医療費の仕組みの改善。
13. 装置間のインターフェース、ドッキング可能な他社との共通規格（デファクト）化が必要。

1) 国に対しては、幹細胞を扱う際の各種規制を緩和していただきたい。また、iPS細胞など再生医療分野は日本が世界をリードできる可能性のある分野であるため、欧米諸国に引けを取らない研究予算を大学や研究機関に配布して欲しい。

2) 産業界に対しては、製薬企業に再生医療の推進に積極的に取り組んでいただきたい。

3) 医学界に関しては、臨床研究の推進を奨励して、新しい医療技術の臨床応用に取り組む医師の数を増やすよう取り組んでいただきたい。規制の柔軟性による臨床研究推進。研究機関内でサポートできる人材の育成。

4) 研究者に対しては、iPS細胞の特性を早期に解明して、安全で適切な培養技術や分化誘導技術を世界に先駆けて開発していただきたい。

5) マスコミに対しては、iPS細胞の現状の技術レベルや再生医療展開の問題点などを国民に正しく伝え、過剰な期待をさせることなく、しかし日本発の優れた技術であることを広く伝えていただきたい。

14. マスコミには、iPS細胞から作り出された臓器の移植などは、将来、大変有望な技術であるが、すぐにも実用化可能な技術ではないことも付け加えて報道してもらいたい。
15. 国際標準のガイドライン作りへの積極的な参加
16. 1月にスーパー特区の採択事業が発表されましたが、臨床試験及び、承認後の保険適用に関しては国(厚労省)及び学会の後押しがなければ、実現化は非常に厳しい(特に、日本が海外をリードしていくためには)と考えます。
17. 医療認可制度等の改革。海外との共同研究による補助金支援。
18. 規制においては患者の安全が確保される事が最優先されるべきであるが、不必要に規制が強化されては産業界の参入は難しくなると思われる。
19. 国による補助金の充実。国・マスコミによるヒト組織利用に関する啓蒙。
20. 品質制御の指標を確立するためには、先行(あるいは並行)して細胞培養技術を標準化することが必要です。現行の手法だけでは均一性・生産性に限界があることは容易に予想されますから、早い段階で培養システムを以下のような段階をもって導入することが必要であろうと考えます：
 - Step 1 標準化のための第1世代〔最小限の機能、標準化項目の洗出しに用いる〕の構築。
 - Step 2 第1世代システムによる標準化項目数値の設定・検証。
 - Step 3 不足箇所を補った第2世代の構築。Step 4 ステップ1・2と同様に繰り返す。これらの作業には高い技術汎用性が求められ、かつ資金的な困難が伴うことから、複数のメーカーが参画するコンソーシアム的な組織で実施することが望ましいと思われます。国と公的研究機関には、このような動きを促す場の提供と資金の支援をお願いします。
21. 個別には上記に記載。総括的に言える事は、次の世代に向けた一種の医療分野におけるルネッサンスとして、きっちりとした青写真を国・産業界・医学界が描き、それを実行・フォローするための仕組みを作ることです。この分野で国民に福音を与えるとともに世界をリードすることを確認することだと思えます。

特に、既存の薬品会社がこの分野に積極的な支援をする(税制的に国が支援することで目を向けさせることでも良い)ことが重要だと思えます。

質問 7. ご自身・御社の研究とは別に、iPS細胞・幹細胞を用いることで可能になると考えられる再生医療・産業技術があればお聞かせいただければ幸いです。

・ 早期（数年以内）： ・ 中長期（～10年）： ・ 将来（10年～）：

大学、公的機関

01. 網膜は加齢黄斑変性症で3年以内に臨床試験をしたいと考えているが、それ以外はわからない。早期にできる可能性があると思う疾患にパーキンソン病がある。欧州でパーキンソン病の治療に中絶胎児の脳の1部をとってきて、注射で打ちこむと治るという症例報告（60～100例）がある。角膜もそうであるが、conventionalな方法で治療できることが示されている疾患では臨床試験をやりやすいと思う。赤血球、血小板についてはコストを考えなければ出来ると思う。

02. 糖尿病(I型、II型とも)治療用の膵臓ラ氏島beta細胞の移植。ただし、ES細胞、iPS細胞より分化誘導がまだきちんとできておらず、最終的なタイムテーブルは何とも言えない。神経系の難病や、角膜についても可能性あり。

03. 血小板の前駆細胞を作って血小板を作ること。数年以内（赤血球と同程度）に可能性あり。もっと興味を持っているのは好中球。好中球輸血は最も欲せられている輸血である。ないからしていない。骨髄移植、臍帯血移植で骨髄抑制かけたときに困るのは、白血球の減少であり、白血球が1000/ μ L以下になると重篤な細菌感染症になるので無菌治療室が必要になる。好中球が十分に輸血できたらそんなに厳しく無菌操作しなくても良い。輸血できる好中球が無いわけではなく、急場をしのぐときは親族からもらって、leukopheresisといって好中球だけとって戻すのだが、そうしてとって、好中球は入れて2～3時間しかもたない。本当に急場のぎにしかならないので現実的にはほとんど行われぬ。病気としては好中球がもともと少ない先天性の疾患の人や好中球の能力が低い病気の人がいて、慢性的に好中球輸血を必要としている。好中球は分化誘導をかけても、本当にmatureな好中球はMHCをもっていないが、多分、MHCを発現してしまうので、実際の応用のときには本人由来の好中球が良い。好中球が慢性的に必要な人には、本人由来のiPS細胞から好中球をつくるのが可能になれば非常に良い。そうでなくても、何百種類もそろえてその中で好中球が簡単に作れれば、骨髄移植などで必要になった場合、1週間位入れ続けることで、今それで命を落としている人が救われる。好中球は献血に頼れないのでやりたいことである。技術的には有核細胞を入れることになるので赤血球、血小板より難しい。

ES細胞から好中球は作れるが効率が悪いので高価である。前駆細胞から安く出来るようになればよい。技術的(特に安全面)で難しいので臨床応用には10年以上かかると思われる。

04. ターゲット細胞の細胞分離技術

05. (早期) 一時的皮膚カバー細胞シート、角膜。(将来) すい臓B細胞、肝臓など。

企業 (製薬)

06. 再生医療の実用化には期待するし、実現すればそのインパクトは大きい。臓器としては、糖尿病、網膜、パーキンソン病等の神経系疾患があるが、夢として聞かれるなら腎臓の再生医療が実現したらインパクトがあるだろうと思う。今、腎不全の患者を治癒するには腎移植しかなく、透析にも高額な医療費を費やしている。

スクリーニング、安全性試験には体性幹細胞、primary cultureも魅力である。しかし、ヒトiPS

細胞が市販されれば利用すると思う。スクリーニングに使う際は完全に分化したものでなくても所望の現象が見られれば充分かもしれない。ベンチャーは海外のベンチャーと提携しているし、別のベンチャーから所望の細胞を買うのがベターである。

07. (早期) 独自の創薬アッセイ系が可能になるかもしれない。

企業 (製薬以外)

08. 培養表皮などの代用皮膚の今後を考えると、患者数の限られる熱傷治療より、床ずれや糖尿病などによる難治性潰瘍の治療に適用されて始めて産業化が達成されると言えるかもしれない。そのためには、汗腺や毛髪などの皮膚付属器を組み込むような技術の開発が必要になってくる。

09. iPS細胞に関しては、ES細胞とどれほど近いのか実際には不明である。また、各iPS細胞間でもvariationが進んでおらず、統一見解が現時点では無いように見受けられる。分化誘導などの研究をするにはiPSの基準であるES細胞の方がより適当だと考えられる。各個人由来の細胞を作製できる点はiPS細胞が優れており、例えば、薬物にかぶれやすい人由来の細胞で安全性試験をするといったことには興味がある。

また、個体数を増やすのがESに比べ簡単なのもメリットで、安全性試験において必ず必要な個体差の検討につながれば良い。ただし、ES細胞をクローン数そろえられれば同じことかもしれない。

10. (早期) 創薬スクリーニング、(中長期) テーラーメイド医療(iPS)、(将来) 再生医療

11. (早期) 2012年頃には、多くの製薬メーカーにおいて創薬スクリーニングにiPS細胞が活用されていると思われる。

(中長期) 2020年頃には、幹細胞による神経系疾患(パーキンソン病、ハンチントン病、など)、循環器系疾患(虚血性疾患など)、網膜疾患、などの再生医療が臨床応用されていると思われる。

(将来) 2025年頃には、幹細胞からの臓器を作成するための基礎技術が確立されていると思われる(但し、完全な臓器作成はまだ困難と思われる)。

12. (早期) iPS細胞の安全性の確認、分化誘導技術の確立、細胞の安定供給の確立。(中長期) 試験的なiPS細胞由来の細胞を使用した細胞移植の実施。(将来) 本格的なiPS細胞由来の細胞を使用した細胞移植の実施? iPS細胞から再生させた組織、臓器レベルでの移植。

13. (早期) 患者からのiPS細胞が樹立、病態解析が加速度的に進む。(中長期) 上記成果を利用した新薬の開発期間が大幅に短縮。(将来) 遺伝子導入によるゲノムの不安定化が解消、再生医療へ応用。

14. 抗がん剤などの薬剤効果の確認(スクリーニング)などは、数年で実用化できるのではないのでしょうか。

15. (中長期) 自己細胞を用いた治療の確立

16. (早期) 膝軟骨再生、歯、毛髪。(中長期) 血液。(将来) 肝臓、膵臓。

17. 幹細胞・iPS細胞の利用は既に開発が進んでおり、数年内に実用化(評価系への利用)され、それ以降も利用範囲は拡大され続けると予想されます。しかしながら、再生医療での展開は、国内においては臨床研究にとどまり、ビジネスの活性化には10年間以上を要すると思われる。

質問 8. 質問 7 でお答えいただいた内容について、達成された場合のインパクトについてお聞かせください。

- ・再生医療：治療可能疾患名（可能なら患者数、それにより節約できる医療費）など
- ・産業技術：経済効果、周辺技術開発など

大学、公的機関

01. 半導体、ロボット、ファクトリーオートメーションの進歩に期待している。iPSで当面大きいのは、病気の解明とドラッグスクリーニングのコストダウンで、医療開発にはずれが少なくなることにより開発コストが低減できることである。
02. 好中球ができれば移植医療にはすごい恩恵である。あらゆる抗がん剤治療などで好中球が減少したときに入れられれば患者が助かる。
03. 分化誘導の際に確実に未分化の細胞の除去が可能となれば基盤技術となる。

企業（製薬以外）

04. テーラーメイド医療：個人のiPS細胞を作成して、そこから各種の分化細胞を作成し、様々な薬がその個人に適合するかどうか判定を行うというサービスが想定されます。本来、薬の副作用が出る確率は非常に低いものであり、それが個々人で投与前に判定できれば、副作用による事故を大幅に削減できる可能性があります。また、肝臓の代謝酵素は個人により異なるため、個々人に対する特定薬剤の代謝能が予めわかれば、投与量の調整にもつながる可能性があります。また、抗生物質など日常的に処方される薬剤に対する適・不適のデータベースを個々人で作成することも有効になるかもしれません。将来的には、健康人も含め相当数のマーケットポテンシャルがあると考えられます。
05. 生活習慣病は、心臓病を代表とする重篤な循環器系疾患や、脳卒中を代表とする難治性中枢神経系疾患を併発するケースが多く、今後の患者数の急速な増加が危惧されている。重症循環器系疾患や難治性中枢神経系疾患は、発症後すぐに迅速な処置を取らなかった場合、生命が助かったとしても多くの患者に社会生活が困難となるほどの機能障害等の後遺症を残し、患者のQOLを大きく損なう疾患であると同時に、後遺症を有する患者が社会に復帰するまでに膨大な治療費を必要とする。また、高齢者に限らずQOLを大きく低下させる疾病として、歯周病や角膜疾患による視力障害などがある。歯周病患者は国内に約3,700万人、そのうち重度の歯周病患者は約30万人であり、角膜疾患による視力障害患者は約3万5千人である。これらのような治療が困難な疾患に対して、再生医療は、これまでの医療では治療が難しいとされていた難病や生活習慣病に対する新しい有望な治療法として広く普及し、人々の健康を促進するとともに、疾患による後遺症の治療に費やされる医療費の大幅削減などが期待される。
06. 神経細胞の移植による、パーキンソン病の治療。心筋細胞の移植による、心臓の機能回復。軟骨の移植による、関節の機能回復。すい臓β細胞の移植による、糖尿病の治療、などが考えられる。
07. iPS細胞作成から各種細胞への分化誘導に関して、細胞の観察技術、細胞の選別技術、ゲノムの

操作技術に関する周辺機器開発が期待できる。再生医療に先立ち、薬物動態や疾患モデルのためのiPS細胞の用途開発が急速に立ち上がり、医療や支援機器などのバイオ関連分野での経済効果が期待できる。

短期的には、これまでの再生医療の発展と同じく、骨軟骨、皮膚などの整形外科分野での応用から、心臓、神経など生命に関わる疾患への応用が進むと考えられる。モデル動物の作成が困難、あるいは先天性で致死的な遺伝子疾患に対する病態の理解が進み、長期的には治療不可能だった疾患分野へ広がることが期待できる。

08. 再生医療の非臨床にも応用可能であり、再生医療分野全体に対する影響は大と考えます。
09. 多くの肝不全患者や糖尿病の合併症への応用により治療効果の増進。肝臓移植の軽減等も含め新治療が可能。
10. 医療において組織の再生が実現された場合の効果の大きさは、論じるまでもないと思われます。ただし、コストの問題から「何処までやるか」が決められていなければ貧富による医療格差を増大させることも覚悟しておく必要があると思います。

質問9. 化学産業はその応用分野が広いことからiPS細胞に対する様々な実用可能性が見出されることが期待されます。例えば、化粧品、特殊な化学物質や食品・添加物など、あるいは他の細胞のための化学物質開発などに資することが考えられます。

そこで、今後のiPS細胞の実用化像についてご意見をお願いします。

大学、公的機関

01. 無限にある。どれほどイマジネーションがあるかによる。

企業（製薬以外）

02. iPS細胞を新薬の初期スクリーニングに活用することで、創薬研究を飛躍的に発展させることができる可能性がある。この時、iPS細胞ラインの均一性をどのように確保することができるかが重要となると思われる。
03. 化粧品やアレルギーの感作性試験のための皮膚細胞、発がん試験のための繊維芽細胞、催奇形性試験のための幹細胞など動物実験代替法へヒト由来iPS細胞を利用することが考えられる。これによってよりヒトの生体に近い検査を行うことが出来る。
04. 創薬支援の分野にて 薬効効果見出しや毒性評価（代謝評価）系の確立が早期に行なわれるものと考えます。ただ、他の分野として発展するには、多様性のある細胞が（どのレベルかがむずかしいですが）、均一系的な系として扱うことが出来れば、有用物質の生産に使用できるのかとも思います。多様性をどのように均一化して扱うかが鍵かと思っています。また、検査系に使用するのも逆に面白いのかとも思います。バイオディフェンスの検査系・毒物検査系の素材として創れると面白いかと想像します。
05. リンパ球やDC細胞を用いた免疫治療での活用が早いものと考えています。

06. 医薬品だけでなく化粧品・食品における効能・安全性の試験に使われることが予想されます。企業が社内技術として評価系を保有するだけでなく、評価サービスなどの事業性も拡大すると思われます。

質問10. また、実用化分野が広いということはその求めるiPS細胞の品質・供給量も様々であることが想定されます。どういったiPS細胞の供給システムが必要になってくるか、その実用化モデルについてご意見ををお願いします。

大学、公的機関

01. すでに、ES細胞ではそこから分化した神経細胞を薬剤スクリーニングのように提供している会社も既にカリフォルニアにはある。日本には、この分野に投資される資本はほとんどないと思われるので、今後も動きは遅い。

企業（製薬以外）

02. （創薬対応）製薬会社、研究機関、細胞バンクへの設置。（非臨床研究用途）研究機関、細胞バンクへの設置。（臨床研究用途）研究機関、細胞バンクへの設置。（医療用途：自家）拠点病院、細胞培養事業者への設置。（医療用途：他家）細胞バンクへの設置。
03. iPS細胞は、作成・培養・分化誘導に長期間を要することが欠点であり、再生医療への応用のためには、iPS細胞バンクを事業化することが必須と考える。この時、他家（アロ）による移植を行うことが前提となるため、iPS細胞そのものの安全性の検証と同時に、どの程度の細胞バリエーションを準備すれば拒絶反応のないiPS細胞の他家移植の供給体制が実現できるのかも検証する必要があると思われる。
04. 再生医療の初期普及段階では、自己細胞を使った治療が主流となると予想され、また、幹細胞バンクの充実と免疫系の問題が解決すれば、他家細胞も徐々に使われ出すと予想しています。
05. 細胞間のクロスコンタミを生じない完全な閉鎖系培養容器やそのシステムが必要であると考えています。
06. iPSおよびES細胞からの肝臓およびすい臓への分化誘導技術への確立
07. 供給システムに求められる事項は、氏素性と品質の保証であると考えます。ソースと品質検査記録を保証するトレーサビリティ手段について、その規制的要求性を明確にすることによって、公的機関だけでなく企業が供給元となり得る形が望ましいと考えます。

その他の意見

01. 現在のセルソーターは流路の洗浄が不十分で細胞分離には良くないので、フルディスポーザブルな流路をもち、ミストが飛ばない臨床用のセルソーターが望まれる。
コストを下げるためには支援機器が必要であるが、従来の装置を根本的に変えるためにはバイオロジスト、ロボット屋さん、突拍子も無いアイデアを出せるエンジニアの3者共同で無ければできない。そのためにも、医療業界の裾野を広げて高さも上げなければいけない。
iPSの供給、規格については、「護送船団方式」では時間がかかる。医療のような専門性の高い領域では、どこか先行する会社がデファクトスタンダードを決めて行く方が良いのではないか。
永久生着させるのが望ましくかつ、患者の細胞採取から治療に使えるまでの期間が待てる場合はautologousな細胞移植を考えるべきである。allogeneicな細胞からのiPSは創傷治癒など一過的に炎症、免疫を抑えるのに使うと良い。
allogeneicな細胞で全ての治療をするためには、免疫抑制の研究の大幅な進歩や、もっと良い免疫抑制剤が開発される必要がある。またこれからは、特に再生医療という技術を直接的に使うだけでなく、MSC注入による炎症反応の抑制といった間接的な利用も含めて考えていくことで、出口や可能性が広がっていくのではないだろうか。
02. 医療分野・製薬分野に関する研究を行っている訳ではなく、また、iPS細胞そのものの研究を行っている訳でもない。ただ、核移植によるクローン胚の研究者として、ヒトで疾患の治療等に使用するためにヒトES細胞に患者個人の体細胞核を移植して作製するクローン胚の利用には反対である。動物で成体にする場合でも成功率が非常に低く、また、安全性（生まれてくる仔が正常かどうか）に問題があるからである。（ヒトES細胞を作製して研究等に使用することに関しては、不妊治療の現場で卵が捨てられている現状を鑑み、反対はしない。）クローンES細胞に比較するとiPS細胞の方が個人に合わせた細胞治療用医療ソースとして優れている可能性が高い。ただし、iPS細胞の場合も今はわかっていない問題点があるかもしれないので気をつける必要がある。
iPS細胞が利用可能であれば、核移植のin vitroの研究に限定してであるが、iPS細胞を核のソースとして用いた核移植の効率・安全性に関して調べてみたい。しかし、核移植卵あるいはキメラ胚から成体を作製することにはいろいろな問題が考えられる。
03. 中枢神経系、循環器系、感覚器、造血系などにおいて、iPS細胞/ES細胞/体性幹細胞等を用いた再生医療、疾患発症メカニズムの解明に強い意欲を持って取り組んでいる。
自身の取り組みとして、iPS細胞に関しては、遺伝子のポリモルフィズム（遺伝子異常）を有する30種類の神経疾患（家族制パーキンソン病、統合失調症、網膜色素変成症など）の患者由来のiPS細胞を樹立する計画である。遺伝的背景を有するパーキンソン病やALSなどの神経疾患由来のiPS細胞より神経細胞を分化させ、疾患の発症原因究明や、製薬会社と共同で治療薬の開発等に取り組んでいる。疾患特異的iPS樹立に当たっては民間企業も創薬などのステップで共同研究として利用できるように患者のインフォームドコンセントを取っている。ただ、患者由来iPS細胞樹立やバンク設立には多額の費用と人手が必要であり、より多くの研究費が必要である。
ただし、最近の結果で、iPS細胞はES細胞に較べて動物体内で悪性腫瘍を形成しやすいことが明らかになってきた。これはおそらくc-myc遺伝子や組み込まれたウイルス遺伝子が原因ではなく、iPS細胞の中途半端な分化度によるものではないかと考えている。神経幹細胞を実験動物に移植しても癌は出来ないが、それを分化誘導した細胞では癌が発生する現象のアナロジーからそう考える。iPS細胞がES細胞より癌化の危険性が大きい可能性があることは京大の山中先生も否定していない。
実現したい再生医療に関しては、脊髄損傷や神経変成疾患の細胞治療を中長期（〜10年）に行えるよう努力したい。このためには細胞腫瘍化の制御、効率的な分化誘導技術の開発、GMPレベルでの細胞調整等が必要である。一方、5年をめぐりに、iPSに代わるヒト多能性幹細胞の開発を行

いたい。

また、体性幹細胞である間葉系幹細胞に関してもマーカーを開発しており、品質管理した上での臨床応用を目指している。

国にはES細胞の樹立・研究・臨床応用の規制緩和と、研究費に目標設定をしてしぼりをいれるのを無くしていただける様要望する。また、神経疾患患者由来のiPS細胞を作製しているが、作製した細胞より神経細胞を分化させて解析する研究には研究費がついていない。一連の研究に対して、ぶつ切りではない何らかの研究費のサポートが欲しい。

産業界に対しては、ES細胞iPS細胞などの幹細胞技術にはやく慣れてこの領域に入ってきて欲しい。自らの研究以外では、adipocyteへの分化系を用いたメタボローム解析などが有意義なのではないか。また、疾患モデル系の作製に幹細胞リサーチが寄与する。前臨床試験に使えば有意義である。

04. 1) ES、iPS細胞の提供について

マウスのiPSは京都大学の寄託なので、京都大学との契約が必要。マウスESは全く規制がない。取り扱い、マウスESの維持培養ができる技術がないと無理である。細胞の提供は取り扱いなどのトレーニングとのセットにはなっていない。

ヒトiPSも京都大学の寄託なので、京都大学との契約があれば問題は無い。ヒトESの研究は文部科学省の使用許可が必要。使用許可を受けた後、バイオリソースセンターのESの技術研修会(4ヶ月に1度を予定)もしくは、神戸研究所のiPSの技術講習会のどちらかを受けなければならない。応募が多いので1ラボから1人程度。責任者がヒトESの経験があれば、責任者が従事者に教育するという対応で使用して良い。ヒトのiPSで研究して論文を書いているならば、申請すればES研究は可能である。

マウスiPS、ヒトiPSは理化学研究所、京大で増やして配布する。営利機関へは京大が直接提供している。非営利機関に関しては理研から提供している(営利機関へは理研からは提供できない)。提供された細胞の第三者への提供は不可。共同研究者への提供は、場所が離れていても良い。ヒトiPSのシードストックは10本で1本あたりの細胞数は 10^6 個。1本から培養して40本を製造し第2ロットとする。ただし、1ロット40本のうち5、6本は検査に必要で、実際に配布できるのは35本前後である。

各ロットの検査項目は、細胞増殖(viability)、マイコプラズマチェック、STR、細胞形態、新しいシードストックについてはOct3/4発現などのマーカー解析、テラトーマ形成などのin vivo 3胚葉分化、in vitroの3胚葉分化、核型解析まで評価しようと思っている。

正常細胞に由来するヒトiPS細胞は、理研BRCにも独自に樹立した株が30株ほどあるが、標準株が5~10株あれば基礎研究には十分かと思う

2) ヒトiPSの標準化について

重要な問題ではあるが、なかなか簡単ではない。当面は、例えば、「心筋への分化に使える細胞」というように目的を絞った形の標準化は可能性がある。

3) 疾患特異的iPSについて

様々な疾患の原因究明研究や創薬研究への応用が期待されており、今後急増するものと思われる。従って、これらの細胞を取り扱うバンク事業が重要だと思われる。

4) 搬送

ヒトESやiPSは、通常の緩慢冷却法での凍結保存では保存効率が悪く、簡易ガラス化法(急速冷却法)を用いている。こうした細胞も、ドライアイス梱包での搬送は可能ではあるが、使用者が簡易ガラス化法に慣れてもらう必要がある。海外に関してはドライシッパーでの搬送も考慮する必要があるかもしれない。

5) 培養技術、保存技術

基本的には、寄託者の培養法を踏襲している。継代培養がうまくいっているかどうかは、基本的には形態を見ればだいたいわかる。凍結保存に関しては、簡易ガラス化法（急速冷却法）を推奨したい。

6) ESやiPSなどの多能性幹細胞のバンク事業

1000株程度をバンク事業の対象とするのは、年間数十億円レベルで可能であると思う。

7) 幹細胞の臨床応用

イギリス、スウェーデン、ドイツ、アメリカ、韓国、台湾、中国、シンガポール、オーストラリア など世界的にはES細胞の標準化に動いており、臨床グレードのESバンクを作ることを視野に入れている。

05. これまでの自動培養装置は、ヒトの手をロボット化したといったもので、将来性はない。全てのプロセスを見直したパッケージと、セルソーターや磁気ビーズなど既存の細胞選択装置にとらわれないアイデアが必要である。複雑な細胞培養工程をどの病院でも安価に実現することが目的。幹細胞マーカーについては当たり前の方向であるが、進歩が遅い。我々はアレーデータより丹念にマーカーを探し、ついに最強の造血幹細胞マーカーを発見した。
06. iPS 細胞に関する特許は京都大学が権利者となって特許出願を行っていたが、この度iPS 細胞の作製方法に関する特許が日本で成立した。成立した特許の特許請求の範囲は以下のとおり。「体細胞から誘導多能性幹細胞を製造する方法であって、下記の4 種の遺伝子：Oct3/4、Klf4、c-Myc、及びSox2 を体細胞に導入する工程を含む方法。」：京都大学は国際出願（PCT/JP2006/324881、国際公開WO2007/69666、国際出願日2006年12月6日）から日本国に移行手続きをした特許出願（特願2007-550210号、親出願）をもとに本年5月20日に分割した特許出願（特願2008-131577号、分割出願）を行った。今回の特許はこの分割された特許出願に対して付与された。特許庁からこの特許出願について本年8月21日付けで特許査定を受領し、9月2日に特許料（設定登録料）を納付している。この特願2008-131577号については分割出願と同時に早期審査請求を行ったところ、速やかに審査がなされ、出願審査請求から約3ヶ月で特許されるに至った。この分割出願については未だ出願公開をされてないが、特許法の規定により、今後特許公報が発行される。今回成立した特許の内容は、簡単に言えば、4つの遺伝子を体細胞（例えば皮膚細胞）に導入する工程によりiPS細胞を製造する方法に関するものであり、特許法の規定により、この方法で製造された細胞にもその権利が及ぶ。本件は日本以外の国にも出願しているが、日本で最初に権利登録されることとなった。権利期間は親出願である特願2007-550210号の出願日（国際出願日に相当＝2006年12月6日）から20年間。
07. 人材についての議論として、新規な分野へは従来の学としての研究に対する人材育成が5年では短い。ポストドクではなく正規のポストを用意するか、7年くらいのポストドクとしての雇用も必要である。「活発な研究を行うための基盤づくり（人材から人財へ）」例としては7年間の雇用＝1年（スタートアップ）＋5年（主要研究）＋1年（他への展開期間）
08. 海外との競争の中でのES細胞の規制による弊害。例として、海外での神経性疾患への適用が早かった。

企業（製薬）

09. iPS細胞を生産者と利用者の立場で使用していくので、それぞれの観点からご意見を伺った。研究者・専門家としての観点から述べるものであり、社の方針と合致したものではない。製薬企

業がiPS細胞をどう考えているかの参考として聞いてほしい。

1) iPS細胞を利用者としての考え方

10年前にES細胞が出現した時点では、弊社では免疫抑制剤を機軸とした「移植」を中心に考えており再生医療は時期尚早と判断していた。ES細胞が、「ES→分化→再生医療」と片道であるのに対して、iPS細胞はそれに加えて「分化した細胞→多能性細胞→再分化→」と、分化の過程を戻して再分化を可能にしたところが大きな違いである。

iPS細胞を単に創薬スクリーニングに利用するために作るだけではなく、リプログラミングを操作することを通じて「創薬のパラダイムシフトを起こす」可能性を秘めていることに大きな意義がある。

疾患、発生、分化といった現象において、遺伝子に変異がある場合でも、加齢や環境によるエピジェネティックな変化により発症が調節されていると思われる。ましてその発症にエピジェネティックな変化が大きく寄与する認知症・生活習慣病などでは個体差は多様であり、それを理解し制御する気にさせるのがiPS細胞ではないか。患者由来のiPS細胞を作製する過程で、エピジェネティックな変化を詳細に解析することにより病気の進展として捉えることができれば、抑制する薬剤の開発にもつながる。時間を越えて過去（発症前）に戻れる可能性に注目する。

現在は標的orientedな創薬が行われているが、そういうものではなく、エピジェネティックな変化を動かしたり抑制したり、チューニングできる薬剤の開発を可能にするのではないか。

iPS細胞によりエピジェネティックに変化をもたらす薬剤をスクリーニングできると思われるが、こうした薬剤は催奇性などの問題が発生する可能性がある。毒性変化を調べるのに長期間（発がん性で3～4年）を要するかという点では、未分化細胞が残っているとテラトーマ（奇形腫）を生じる可能性があり、iPSを遺伝子・化合物で誘導したとき、それによる変異原性についてはどこまで調べれば安全であるか、SCIDマウスレベルでよいのか、など課題はある。スーパー特区などの取り組みできちんと決める必要があるだろう。薬剤で誘導するなら、なるべく少量にする、変異した細胞を殺す、など、まずやってみることが必要である。

2) iPS細胞を提供する考え方

iPS細胞を使って、エピジェネティック変化を含めて目的臓器に誘導するような場合、製薬企業であれば各社が独自のものを作製すると思われ、規格化されたものはベンチャーなどが扱うものである。iPSによりHLAのバンクを揃え、注射器等に細胞をつめて、細胞を保護する薬剤とキットにして提供するようなことも考えられるが採算性を考えると難しいか？

また、弊社は、免疫抑制剤を扱っているが、移植臓器を扱っているわけではない。製薬企業が自ら組織・臓器を扱う必要はなく、これまで通り化合物医薬品を提供し、臓器・組織を作るのは専門の会社という医療は有り得るかもしれない。

細胞を投与すると考えると医薬品となり、臨床試験を考えるとベンチャーではやれないのでは？という疑問については、ベンチャーは、細胞、組織、臓器の提供だけで、臨床試験は別に大手製薬企業が行なうような形態が考えられる。

再生医療に使うには発がん性などが問題であるが、創薬に使うには目的細胞に分化していればよいのでハードルが低いと思われがちである。これまで得られなかった細胞を創薬に使うという発想だけでは、これまでの手法に新しい細胞が加わっただけにすぎない。これでは創薬のパラダイムシフトは起こらず、創薬のレベルは上がらない。

病巣から採取した細胞を使えることに対して、期待は大きいですが、iPS細胞にしてから誘導をかけた段階で初期化されているので病巣ではなくなっている。患者の細胞を採ってiPS細胞を作る意義はテーラーメイド医療につながらないといけない。長い期間を経て病気になる場合を再現できるのかどうか分からない。遺伝子治療や再生医療には使えそうである。疾患モデルができるかどうかは今後検討すべき課題である。エピジェネティクスをリセットした後、どれだけ短期間で再現できるかが興味深い。

患者由来のiPS細胞はリセットされているので病態を反映するものではない。メリットをみつけるなら、若年発症疾患（環境の影響を受けていない）の患者由来の細胞なら意味があるかもしれない。しかし、多くの疾病がそうであるように、加齢・環境が影響するエピジェネティクスが多様な患者の場合、個々の患者を反映した組織をつくるのは難しいであろう。

それよりは、患者組織を使うことで、これを使って、エピジェネティクス変化を逆にたどることでエピジェネティック変化の前の段階に戻ることにより病気の進展を止めたり発症を遅らせたりできる薬剤の開発につながるかもしれない。

第1世代はスクリーニング用、第2世代は究極の目標を目指すといったことについては、製薬企業であれば第2世代を今から目指すべきである。スクリーニング用に脾、肝などの細胞を作るにはベンチャーからの供給で十分である。製薬企業が本腰を入れて取り組むつもりなら、次世代の創薬技術につながるものを大学などの他者との連携で行うべきであろう。

3) iPS細胞の標準化・規格、安全性についての考え方

ES、iPS細胞ともに多能性幹細胞であるが、ES細胞は規格化された多能性幹細胞という特徴を持ち、iPS細胞は個々の個別の性質を反映した多能性幹細胞を生産できるのが特徴である。iPS細胞を規格化してしまうと、こうした多様性といった特徴が失われるのではないかと。多能性幹細胞の規格を作るならES細胞であり、iPS細胞は多様性を特徴にすべきである。ES細胞と同じである必要はない。

提供する際の基準や安全性の考え方、ウイルスベクターなど作製方法にも安全という視点が必要だ、という質問に対しては、細胞に外来遺伝子を入れる時点で既に安全性には疑問を生じる。たとえプラスミドによる遺伝子導入でも同じである。ウイルスならさらに問題ということでウイルスを使わない方法が求められていると思うが、遺伝子を極力減らして薬剤やタンパク性因子で対応するというのが良いと思う。

ESで規格を作るとして、エピジェネティックなプロファイルがわかっているということと、安全とは別物である。

化合物探索を続けてきた経験からいうと、化合物だけで多能性幹細胞を誘導するのが最終目標である。それであれば、iPS細胞の安全性＝化合物の安全性により担保できる。miRNAやsiRNAも可能性がある。効率的に組み合わせるのが良いであろう。miRNAは遺伝子コントロールに効いているのでおもしろいアプローチだと思う。

治療目的と異なり、創薬スクリーニングに使うなら安全性は不要ではないかという質問に対しては、導入遺伝子が細胞に影響を与えていないかどうかかわからないため、iPS細胞で誘導したものをヒト細胞株といって良いか注意が必要である。スクリーニング、毒性試験に使うときの品質としては、これだけで試験をするわけではないのである程度の機能、例えば、代謝酵素の誘導等、があれば十分である。

バリデーション試験なら標準株が必要になるが、その場合の品質の検定については、に対しては、品質検定法よりもきちんと維持できる技術の方が重要である。培養しているうちに変わってしまうといけない。標準プロトコルを定める必要がある。毒性試験に使う細胞であれば、どこかがまずスタンダードとなるであろう。当局がどういうものであることが必要というかによる。どこがスタンダードになるか次第である。

一般のスクリーニングに使うにはそれぞれの企業が目的とする機能がきちんとしている細胞であればそれでよい。例えば、たくさんの細胞をもったバンクがあり目的に応じて使えばよい。スクリーニングに規格化は不要。バリデーション試験の場合は、きちんとしたもので評価するため、規格化された分化されたものを入れることになる。

4) 国等への要望など

エピジェノミックなものを評価するという手法は、どこでコミットするのか、国を巻き込んでやるのか？という質問に対しては、これは国と大学が一緒にやるべきテーマであり、製薬企業1

社でやるものではない。企業は従来の創薬（ポストゲノム、標的oriented、ハイスループットなど）のインフラを既に整えているので、新しいことには進み難い。新しいやり方については大学との連携や国の支援を得て、今やらないと、欧米に負けてしまう。

NEDOプロジェクトでiPS細胞の評価、分離をやるのであれば、社として参加する可能性もある。iPS細胞が出てきて再生医療を具体的に進展させなければいけない時期であるが、製薬企業は目先のことに追われて動けない。国の指導が必要である。

期間としては5年後くらいになるであろう。スーパー特区が終わって1年後には再生医療を基盤とした医療のあり方を実現できるモデルを作製する必要がある。

従来のNEDOやJSTは大学の先生のシーズをどれだけニーズに近づけるかという形で予算を出している。ニーズにお金を出し、企業の研究者が主担となりその下に大学の先生がつくような、企業が本気でやる気になるような形で予算をつけてほしい。

研究に際して、ライセンスの問題が企業の研究をやりづらいものになっている。ライセンス交渉などに時間がかかりすぎる。もう少しシンプルな契約にして研究をやりやすくしてほしい。

みんなでつかって検証しないと使い物にならない。欧米では100種ものiPS細胞を配っている。安定的供給ビジネスとしてみると日本は既に遅れているかもしれない。

5) 治療のターゲット

膵島移植、脊椎損傷などである。膵島はNovocell（米）がES細胞でやろうとしている。膵島移植は機能としてはまだわからないが、そんなに先の話ではないと思う。移植にはかなりの細胞数が必要になり、将来的には実現可能であろう。最も実現に近い疾患ではないか。

6) その他の技術

化合物（誘導用）だけでなく、培地、基質などの組み合わせも重要である。微生物生産の経験から考えて、培地、培養法の工夫によりエピジェネティックな変化が起こっていることもある。細かく工夫することでファインな分化誘導の制御が可能になる。ナノテクの貢献の余地もある。培養環境や体内に戻すときの抗原性のない形態、パッケージング、基質など、さらに基板を加工する技術など細胞の接着面が分化誘導に重要な役割を果たしている。

10. 1) iPS細胞の生産者としての考え方

iPS細胞生産者として細胞そのものをビジネスとして提供していくとなると、細胞ソースの確保、インフォームドコンセント、病院と直結した地域性の必要性、管理・輸送（治療と別の場所でiPS細胞を作製し、運搬する規制上の問題）、利益性・コスト、CPC等の施設の建設など、克服すべき課題が多く、製薬企業一社で推進することは困難と考えている。ビジネス面から考えると、ICを取得して収集した細胞からiPS細胞を樹立し、再生医療に必要な細胞まで作っても、その時点になってドナーがやはり気が変わって再生医療に使用してほしくないとの意思を表明するリスクも背負うのは大変と感じる。さらに、自己のiPS細胞を用いる時間的余裕のある疾患であればよいが、そうではなく、他人のiPS細胞を用いる場合には、HLA適合性の問題があり、相当なドナー（200余名以上）からiPS細胞バンクを作る必要がある。このようなビジネスは収益を上げるのは難しいのではないかと推察している。

再生医療に使用できる安全なiPS細胞作製技術を開発・提供・ライセンスするというビジネスは成立しうるが、現時点でiPS細胞の定義が明確ではなく、標準化もできていないので、再生医療に供するのにどのような要件が必要かは明確になっていない。iPS細胞の標準化を早急に推進する必要がある。細胞の分化全能性と安全性を反映するエピジェネティックな細胞状態の定義と標準化の課題である。

細胞を生産する上での課題は、安全性をどこまで高めるかが最も重要な課題と考えている。安全な細胞とは何か？ 安全な細胞の提供にはまず癌化の懸念を排除することが最も重要である。その為には、第一にウイルスフリーで生産する手法の確立が必要である。作製法にはプラスミド

などを用いた遺伝子組換え、miRNA導入、低分子化合物を用いた方法等が考えられるがどれも長・短両側面がある。プラスミドDNAなどネイキッドDNAによる生産では、発癌誘導リスクは少ないが導入効率が低い。miRNAもウイルスよりも安全性は高いと思われるが、効力や選択性の問題が解決されていない。薬剤を併用し発癌に関与する遺伝子を用いずにiPS作製を効率化する手法も開発されているが、使用する薬剤が、どのような安全性基準をパスする必要があるのか、医薬品承認の同等の基準なのか、もっと軽くてよいのか、あるいは逆にもっと厳しくあるべきか、基準の確立も必要と思われる（特に、まだ医薬品になっていない化合物の場合）。

品質管理の方法としては、全品検査は理想的ではあるが現状技術では難しい。可能であったとしても検査後、細胞に変化を与える手法であってはならない。サンプリング検査の場合は他の細胞が様な特性を有していることを保証できる方法でなければならない。利用者の立場から考えても生産量は安定な増殖方法が保証されていれば大きな問題ではなく、 $10^4 \sim 10^5$ 個あれば十分である。

2) iPS細胞の利用者としての考え方

健常者のiPS細胞自身の必要性は現時点ではそれほど高くない。理由としては、分化技術が成熟していないため、使い道がないことがあげられる。製薬企業としては、臨床予測性のある創薬評価モデル細胞、安全性評価モデルとしての活用が最も現実的な使い方と思われる。薬理的には、患者体細胞から樹立されたiPS細胞に最も興味があるが、どの機関からいつから供給されそうかは不透明である。薬理モデルとしては、たとえ疾患患者から作製したiPS細胞を用いて目的の組織細胞に分化させてもすぐに疾患を反映する細胞になっているかは、エピジェネティックな修飾の問題もあるので、案外難しいかもしれない。

単一細胞系、セルラインでの創薬スクリーニングが、近年の創薬における新薬開発失敗の大きな原因の一つであった。抗ガン剤スクリーニングでは、ヌードマウス移植ヒト腫瘍 (xenograft) モデルまでは効くが、臨床まで来て患者に効かないという例が多数ある。In vitroでは、単一の細胞で臨床予測性の高いモデルにはならないので、理想的には標的疾患に関連する複数種の細胞を用いたアッセイ法、BioMax™のようなアッセイ系の構築が必要と考えている。前臨床試験におけるiPS細胞による新しい創薬スクリーニング法には薬効予測性向上の点で期待。本来は患者初代培養細胞を使用したアッセイが最も有用と考えられるが、入手の困難、増殖性などに問題がある。現状では、iPS細胞はES細胞同様、分化誘導の効率の低さ、不完全性に問題があり、心筋細胞、神経細胞など一部の組織モデルに限定される。分化誘導法の開発は大きな課題である。肝細胞は薬剤の安全性や代謝の予測においても非常に重要であるが、生体内の肝機能と比較して十分な機能を有する肝細胞をiPS細胞から作製するにはまだまだ大きな壁があるのではないかと推察している。肝幹細胞からの分化のほうの実用化に近いように思われる。従って、組織の種類によっては、体性幹細胞の利用も視野に入れるべきで、細胞バンクもそのような体性幹細胞も取り揃えた体制を考えてみる必要があるのではないだろうか。

iPS細胞から分化させた心筋細胞を用いた毒性評価系については、(京大中辻先生らのグループ→リプロセルで) ES細胞でもQT延長の評価系が開発されているが、(医科歯科大が開発中の) PS細胞系では、期外収縮まで評価できそうである。その一方で、前者はすでに海外で多くの研究機関で評価されている長所もある。海外に先駆けて、グローバルスタンダードを狙うなら、前者を考えるべきである。安全性評価担当者は、申請に使えるアッセイでないと興味がない。逆に、申請用資料として使えるためのバリデーションのためのコンソであれば参画したいとの希望もある。従って、厚生労働省とNEDOプロジェクトとは密接に連携体制を取って頂きたい。厚生労働省からは、NEDOプロジェクトでアッセイ系が出来上がったなら徐々に参画して行くとのコメントを以前に頂いている。少なくともコミュニケーションはよく取って頂き、省庁間の迅速な連携を期待したい。また、申請用のデータとして用いるのは、どちらのアッセイになるかは複雑である。前者のアッセイは、すでに海外でも多くの研究機関に評価されている。早い時期にグローバルスタンダードを考えるのであれば、むしろこちらの方が良い可能性もある。特に厚労省の役割に期

待したい。

3) 期待するロードマップ

細胞バンクに関すること：iPS細胞の定義、標準化およびクライテリアの設定 2～3年。製薬企業が使えるバンクの体制の確立 ～2年。

再生医療に関すること：再生医療に使用可能な、ウイルスフリーな技術によるiPS作製技術 2～3年。再生医療に必要なiPS細胞の安定供給技術・体制の整備 5～6年。

創薬への応用に関すること：提供されるiPS細胞を用いた薬剤スクリーニングはすぐにも開始される。疾患を反映しうる細胞の分化技術 5～6年。次世代シーケンサー、オミックス・システムバイオロジーを活用したリプログラミングおよび細胞分化のプログラミングの解明 10年（次世代シーケンサー、オミックス、システムバイオロジーの進化に依存する）。

11. iPS細胞を研究領域にどう生かしていくかについては社内で考えている段階である。低分子薬物での創薬を基本としており、高分子や蛋白・抗体薬にも取り組んでいるが、再生医療や細胞治療は標的外と考えている。

弊社では、大学と共同で心筋の再生を目指した基礎研究を続けている。従来よりES細胞を用いて分化誘導研究を行っており、iPS細胞でも上手く行きそうとの感触を得ている。iPS細胞の応用範囲としては、心筋細胞を始めとする毒性評価系とヒト細胞による薬剤スクリーニング評価等である。正常細胞由来で構わない。心毒性評価系の樹立を目指すNEDO-PJには興味を持っている。Toxicogenomics-PJにも参画しており、肝・腎・心に分化したものが得られれば遺伝子発現を含めて安全性のチェックをする計画。分化誘導したヒト細胞系の開発は共同研究先で担当予定。

ヒトの初代培養肝細胞は外来入手が可能だが、ロット差があるのが問題。iPS細胞から分化させると均一性、再現性のある肝細胞が使えると期待する。分化誘導方法に関しては技術的課題が残されているが。

ヒト細胞としての薬効スクリーニングでは、例えば現在ヒト評価系が得られない膵β細胞等に期待する。ただ、ES細胞から分化した場合にはインスリンの分泌量のオーダーが違う（桁違いに低い？）とも言われているので、難しさはあるだろう。

どの位の細胞数が必要かについては、実際に実験している立場ではないのでわからないが、分化していない元のiPS細胞を入手して増殖させて使うのが理想と思うので、培養可能な数があれば何とかなるのではないか。（増殖させるにも技術的に熟練した技が必要であり、培養におけるfeeder細胞をどうするかとか細かいknowhowがあるので、継代維持するだけでも難しさはある）

iPS細胞を樹立することは考えていない。均一の形質でcharacterizeされたものが供給されるのであればそれを使いたい。バンク化は必要だが、三省（経産省・文科省・厚労省）で率先してやるという雰囲気はなさそうだ。当面は京大（山中先生）の有償分譲に頼ることになりそうだが、種類の数から言ってもバンクとしての要件を満たしているとは言えない。理研がバンク化するという話もあるが、明確なところはわからない。

まずは正常人由来細胞を使えばよく、将来的には疾患由来のものが供給されれば使う。数については、HLAタイプ等を考慮して50～60種位あれば日本人のポピュレーションはカバーできるの中辻先生のお話もあるが、実際のところ遺伝的な背景情報等がないとどの位必要かの見当がつかない。正常人由来とはいえ、遺伝的欠陥もあり個体差もあるので、遺伝子発現プロファイルや様々なフェノタイプなどの情報付きでバンク化されるのが望ましい。

ES細胞に一番近いプロファイルを示すiPS細胞が欲しいが、規制緩和が進んで状況が整えばむしろES細胞の利用を進めるかという、倫理的な問題は依然として残るのですぐにESに流れるということはないだろう。社会的なコンセンサスが取れば、という条件付になる。ES細胞はiPS細胞に比して遺伝子操作が加わっていない点で安全性の観点で問題がないという利点はあるが、iPS細胞は上記の倫理的なハードルは低いので使いやすい。

タイムテーブル：実用化にはまだ時間が必要という印象。創薬スクリーニングにおいても、評

価系のバリデーション（ヒト細胞としての相同性、薬物反応性の検証等）に2～3年はかかるのではないかと。安全性試験においては、アッセイ系の確立に心筋でも今後3～5年、肝臓では5年以上要すると思われる。ルーチンとして回るまでには数年では難しく、中長期レベルの年数（5～10年？）が必要。

標準化についてはES細胞でさえコンセンサスが取れていない状況であり、具体的なコメントは難しい。ヒト組織との比較の上で、分化マーカーが明確に同定されていることは最低限必要。当面社内ではin vitroのスクリーニングに使うには問題はないが、申請・認可を想定すると標準化への取り組みは必要で、製薬協の研究開発委員会でも話し合いは始めている。

標準化（iPS細胞の調製法、分化誘導法、スクリーニング系としてのProcedureなど）に関する米国での動き（が先行して進む懸念）については、個々の研究レベルの各論では問題ないが、例えば各試験が特定されてこのやり方でないとFDAの認可がおりない、といったようにスクリーニング系Procedureが厳格に標準化されることには注意が必要であろう。FDAの認可を取得するためには、そのProcedureの特許を押えた企業からライセンスを受け、特許料を支払わなければならない。米国Izumi社などは、スクリーニング系の標準化を念頭に置いてiPS関連の特許出願を行っているらしい。米国も（人的・経済的に）それなりの努力をしているはずなので、日本も国としての取り組みをすべき。製薬協の頑張りもあるが、厚労省のバックアップが是非とも必要。

iPS細胞関連技術の経済効果としては、iPS細胞を分化させた細胞による薬剤のin vitro安全性試験によりヒト細胞に副作用の強い薬剤を除くことでphase 2以降におけるドロップ率が減らせれば数年単位の時間のセーブと共に、何十億～数百億の価値があるだろう。

再生医療については現時点で取り組むつもりはないが、調査はしている。今後有望な領域としては、薬物治療ができない疾患、例えば臓器移植や人工透析が必要な重症疾患や脊髄損傷等がある。臓器移植の費用は、1例に数千万円から数億円、透析は500万円／年／人と考えられる。再生医療のコストは大きく、汎用技術とならないが、社会全体の費用対効果の視点からすれば、QOL・医療満足度の低い疾患に対する治療法のオプションとなりうる可能性があるのではないだろうか。

（個人的見解との前提で）癌に関しては特にGo期の細胞が薬でたたくけないとの印象があり、体性幹細胞やES細胞の研究も含めて進めていかなければいけないとの観点からも、癌性幹細胞の研究は重要ではないかと思う。正常組織のものも含め、体性幹細胞についても国としてもっとfocusして研究費をかけても良いだろう。

12. 1) (問) iPS細胞の医療応用への到達点として、例えば患者由来の細胞をiPS化して神経や心筋に分化させ、創薬や安全性試験に利用したり、さらにハードルはかなり高いが、再生医療に適用してテーラーメイド治療を実現化する等が考えられる。製薬産業から見た現実的な可能性や魅力について：

患者細胞の応用の前に、健常人由来のiPS細胞に高い可能性がある。ヒトの各組織の細胞が均一な品質で安定的に供給されるということになれば、それを生かした創薬スクリーニングや毒性試験の予測性が質的に大きく変わるので、期待している。理論上はヒトES細胞でも同じことができるが、申請手続等が複雑で現状で積極的に使えていない。今後法律は緩くなる可能性があるが、倫理的問題からの抵抗感もあり、利潤を求めるビジネスにはそぐわない。

次に患者由来細胞での病態研究、毒性研究での可能性を期待する。実際の創薬研究に使うまでには（細胞の入手等も含めて）問題は多々あるが、まず自分で触ってみて、創薬現場に使えるところを見せるのが我々の役目と考えている。

疾患特異的なiPS細胞を用いた研究で重要なことは、iPS細胞から分化させた細胞で疾患の病態を反映するフェノタイプをいかに発現させるかという点である。培養条件や刺激などを工夫する必要があり、細胞のphenotypeと病理的变化の対応が確認できることが前提となる。

研究が進めば、これまで市場が小さかったり、モデル動物がなかったりして手を出せなかったような疾患、例えば難治性の疾患やマイナーな疾患等の注目していなかった疾患も創薬のターゲッ

トに入ってくると期待する。また、例えば家族性アルツハイマー病等の疾患特異的iPS細胞を使って調べることによりその原因が分かってくれば、さらに市場の大きい弧発性の疾患にも応用できる可能性が出てくる。癌に関しても可能性があると思うが、単に細胞を初期化して再分化することがその病態解明に繋がるかどうかは疑問である。癌研究にiPS細胞の研究を具体的にどう使うか難しいところがある。

2) (問) iPS細胞の標準化に関して (ES細胞との相同性の観点で) :

ヒトの場合はよくわからないが、ES細胞といってもクローン毎に違っており、iPS細胞は正に多様であると考えられる。ただ、創薬スクリーニングに関しては細胞を治療に用いるわけではないので、ES細胞と同じという証明がなくとも使える。それよりツールとして役立つかが問題であり、分化した後に創薬に用いられる有用な形質があり、アッセイの指標を設定できれば使用できる。一方、iPS細胞を毒性試験に用いる場合は申請に使えることが条件になるので、標準化が必要となる。これは各社の協力の下に実施するしかない。

3) (問) iPS細胞を使う場合に何処から始めるか :

iPS細胞として入手してそこから研究を始める。樹立することは今のところ考えていない。弊社研究所では入手したiPS細胞を分化させて創薬に応用するステップの研究を行いたいと考えている。分化した細胞の入手に関しては、例えば神経細胞などではかなりよくわかってきたようだが、分化させるまでに時間がかかり、全ての細胞が同様に分化している訳ではない。また、供給先で供給元と同じシステムで維持できるかどうかの問題もある。分化した細胞の機能が検証できるレベルにメカニズムが解明される必要がある。

例えば神経細胞について言えば、どの位の日数と効率でどの程度の分化が起こり、そのpurityがどの位か等の品質をまずチェックしなければならない。その基準が使用目的に合致していればOKである。

4) (問) どの位の細胞数が必要か :

化合物を用いるハイスループットスクリーニングでは数十万以上の検体分に耐え得る量が必要であるが、細胞アッセイの場合は数万程度の中～小規模のスクリーニングのほうがより現実的かもしれない。スクリーニング系のスループットにもよるが、その場で増殖分化させて、大量に供給できるシステムも必要になるだろう。細胞をリーズナブルな価格で供給してくれるベンチャー等が出てくれば、企業における利用も進むと思われる。

5) (問) 培地に関して :

現時点で特にヒト細胞に用いる培地が高価なのはビジネスが成立していないからであり、企業レベルでどんどん使うようになれば変わってくる。例えばfeeder lessでの培養もマウスでは出来ているので、ヒトでそれが可能になれば産業化は有望。

6) (問) 患者由来のiPS細胞の使用について :

現時点では供給先との共同研究が必要と考える。バンク化の話もあり、将来的には使えるようになるかもしれないが、すぐには企業への配布は難しいと思われる。各大学等で個別に進めている感があり、夫々がどう進むか、これらがまとまっていくのかどうかは疑問。

遺伝的phenotypeに応じた創薬についても、何百種類もの多様な細胞を1企業で持つことは無理であり、バンクのようなものができれば可能になる。

7) (問) 細胞治療への参入に関して :

再生医療はお金にならないというこれまでの経験もあり、今はあまり考えていないが、将来的な可能性は否定できない。特に海外大手製薬メーカーの動向は見守る必要がある。

8) (問) 規制等 :

iPS細胞に関してはそれほど規制の問題はないと思われ、まず指針を作ることから始める必要がある。ただウイルスを用いた研究は社内で規制があり、ウイルスを用いて作製した細胞の位置づけを考える必要がある。(弊社ではウイルスを用いて作製した細胞はすべてウイルス実験として扱うという規定があるため、現状ではiPS細胞を用いた実験はウイルス実験エリアで行なっている。これは現実的ではないので今後はiPS細胞に関しては社内規定を変更する可能性があります。)

一方、上記各種iPS細胞のバンク化に関しては国の関与を望む。医療機関と提携する必要や、一企業では対応できないことなどが理由。

むしろ、ライセンス等に係わる問題が懸念され、その細胞の使用権に留まらず、できた化合物にまでロイヤリティがかかったりすると、研究が全く進まなくなる。

9) (問) ロードマップに関して :

標準的な創薬スクリーニングに使えるかどうかの検証は、各企業レベルで1年以内にはできると思われる。疾患特異的なiPS細胞に関しては、入手の困難さに加え、ヒト疾患の病理像をどこまで再現できるか(病態再現)を検証する必要があり、簡単ではないと思われる。スーパー特区での取り組みも5年を目処としていることから、そのあたりで何らかの進歩があるだろう。

10) その他 :

正常人由来iPS細胞の薬剤スクリーニング系への応用は1年程度で始められると述べたが、これはアッセイ系の構築の話であり、製薬企業としてはそのアッセイ系を用いて薬剤をスクリーニングして有用な薬剤を開発することが目的である。iPS細胞を用いたアッセイ系がたとえ一年で構築できても、スクリーニングして得られた薬剤を安全性試験・治験を経て上市するには通常の薬剤と同様10年近くの年月がかかる。薬剤の上市が最終的なゴールであるという意味では、細胞治療による再生医療に比べて相対的に早く進むという訳では決してない。

分化に関する探索的研究成果については、企業内で得られた結果であっても全て自分で完結できないこともあり、また、本来の目的とは合わない結果であったりしたものは、積極的に外に出して新しい研究の方向性で展ばしてもらいたいことも考える必要がある。

前駆細胞/組織幹細胞まで分化させたものを維持、凍結できれば成熟細胞を上手く早く供給するシステムができるだろう。そうすれば意味がある。前駆細胞をキャラクタライズして段階的に分化させ、最後まで分化させずに増殖性を維持してスクリーニングに用いる、等。

個人的意見として、いままでアプローチの方法のなかった疾患でも、患者由来細胞が入手可能になれば対応が変わってくるかもしれない。ややマイナーな疾患であって、疾患病態研究が行われておらず、治療法がないような疾患が対象になる。

13. ヒトES細胞に関する情報は常にフォローして入手しているが、倫理上の問題でハードルが高いと判断しており、今のところ使う予定はない。iPS細胞は性状はES細胞と同じと考えられ、創薬における薬効・安全性のin vitroヒト評価系としての価値は高い。組織stem cellはまず入手の問題があり、入手後の増殖もうまくいかないのが、iPS細胞を優先して使いたいと考えている。

造血系stem cellは既に販売もされており、実現可能性はある。弊社での方向性としては、安全性研究、例えば骨髄毒性評価系としての使用を考えている。

iPS細胞の入手に関しては、肝臓、心臓などの臓器細胞に分化したものが欲しいが、分化法の確定には相当時間がかかると思われる。当面は元のiPS細胞として入手して、催奇形性の評価にそのまま使用する等が考えられる。

京大で有償で提供されるということなので、契約を交わして、本年度内には使う予定にしている。まずは報告通りに分化させられるかどうかであり、publication等を見ながら分化の同定、

判定法の確立から始める必要がある。

京大株にしても現時点では情報が少なく、入手する株の種類や数については選択の余地はないであろう。クローン毎に臓器へのなりやすさが違ったり、遺伝的背景が異なると違う結果が出てくる可能性が考えられる。代謝多型等もあり、できるだけ多くのヒトからの樹立株が必要である。

Time schedule（ロードマップ）としては、アカデミアにおける分化や遺伝子発現の検討は数年以内でできると思われるが、企業がこれをスクリーニングに使うには、共同研究等で技術導入をした上でアッセイに持っていく基礎検討をする必要があり、実用化は数年以内では難しいだろう。まずは分化の状態をしっかり掴まないと先に進めないで、分化マーカー等の検討にも時間を要する。例えば肝毒性の評価系の確立は、標準化も含めて10年くらいかかると思われる。

京大との契約にはトレーニングも含まれており、継代維持や凍結融解に係わるワザについても習得できると考えている。人が足りないこともあり、当面は社内で分化誘導の新しい技術を開発することは考えていない。

iPS細胞を自前で樹立、生産することも今のところ考えていない。

毒性研究のターゲットは心臓・肝臓である。心臓に関してはある程度確立されつつあるが、肝臓はいまだ基礎研究が必要である。研究の母体となるコンソーシアムがあると有難い。

研究が進んでヒトiPSクローンがcharacterizeされてくると、分化の方法論も確立され、再現性、均一性の高い細胞が自分のところで必要な時に調達できるようになる。ES細胞では倫理的ハードルが高いことが、iPS細胞が欲しい一番の理由である。従って、ES細胞に係わる規制がたとえ緩くなったとしても、すぐに使おうということにはならない。

標準化の指標として何を見ればよいかを細部まで述べるのは現状では難しいが、ヒトiPS細胞自体の性質として、均一性、分化していないこと、増殖性等は必要であろう。

現状の問題点としては、分化誘導方法のブラッシュアップが何より必要である。安全性に関してはin vitroで使用するには特に問題はなく、遺伝子導入されていても構わない。ES細胞に比べれば倫理的問題もなさそうである。分化させた後はES細胞と同様の扱いになると考えられるので、生殖細胞に分化させない、ヒトキメラを作らない、等の制約はあるだろう。

バンク化に関しては、薬物動態アッセイを想定すると、まずは正常人細胞で代謝系やMHC関連遺伝子が明らかな、100種以上の多様性のある細胞が揃うとよい。患者由来細胞については出てくれば使うが、今これがないと、というクリティカルなものはない。心毒性についても、遺伝的背景の関与は多くないと考えられる（ので、患者由来でないと進まない訳ではない）。遺伝的背景ではなくエピジェネティックスの研究であれば10種類ぐらいでいいかもしれない。

バンクについては是非アカデミアで作ってもらいたい。iPS細胞自体のcharacterizeされたクローンをできるだけたくさん作り、分化方法の標準化や判定方法のテクノロジーを確立して欲しい。基盤研、慶大、京大等の話があるらしいがどこが中心となってやるのか、特にどのタイムスケジュールで大手機関の供給が始まるのかについて、情報があったら教えて欲しい。

ライセンス料は例えば100クローンまとめて支払う、というような形は可能かと思うが、あくまでスクリーニングの材料として使いたいので、商品化までくると1クローンで何億とかの数字を出されると研究自体ができなくなる。特許面での対応については早く明確化してもらいたい。

医薬品開発においては、ヒトでどのような反応をするかが早期に見られて、絞込みが早い段階（前臨床で）でできることを期待している。実現すれば開発コストの大幅な削減が実現するので、その経済効果は数十億～数百億となるかもしれない。ヒトの臓器（機能）がin vitroで構築できるようになれば、大きなブレークスルーである。

細胞治療への参入は現時点で考えていない。分化誘導を行っても発癌しない技術および分化誘導技術が確立されれば再生医療は大きく進むと思われる。移植に際してはHLAタイプに応じた細胞バンクも必要となる。

アカデミアと産業界の横のコーディネーションが不足している。これまでも話し合いの場はあったが、その後の展開をどうしていくのか。京大を中心とするアカデミアの動きをどう産業界が利用できるのかが余り明確ではない。コーディネーション機能が実行していれば、もっと早い

段階から細胞提供ができたのではないかと思う。

14. 薬理ではヒト評価系としての落とし込みをどうするか、ということが永遠の課題であるが、iPS細胞を使うことによりより正確にヒトを外挿できる可能性がある。ES細胞は規制の問題もあり、iPS細胞であればより実現性は高い。まずは基礎的技術を習得し、これが応用できるように取り掛かったところである。

安全性では既に12-3年前に動物だけで安全性を見る限界から、特に早期の毒性スクリーニングとしてヒト細胞でみようというPJを立ち上げたが、平面培養系では特殊な蛋白が発現したり、発現するものがしなかったりと、本来の機能が反映されないことが分かってきている。平面でない培養系として扱えるものであれば、より生体に近い反応が得られるかもしれない。動物細胞ではコラーゲンスポンジ等を用いた3次元培養技術も開発されている。

自社で樹立するための研究にリソースはかけられないので、バンク等の設立を期待する。現実的には正常人由来でMHCや肝薬物代謝酵素の多型等を考慮して200~300種くらいあればと思う。薬理試験で利用する場合、元のiPS細胞を供給してもらえば分化誘導、評価系作成は独自で行える。ただし、分化誘導技術の開発はアカデミックにお願いしたい。バンク等から供給される体制が整えば、患者由来のiPS細胞にも興味がある。

安全性でのiPS細胞の利用では、心筋の研究が最も進んでおり、心室筋細胞に分化するものが得られればHERG試験に置換わるであろう。神経細胞に関しては早期スクリーニングは可能だが、*vivo*と*vitro*がどこまでリンクするのか、具体的にはまだ見えていない。生殖発生毒性に関しては、iPS細胞の分化過程に薬を加えて影響を見ることで評価できそうである。

代謝試験でヒトの肝細胞を使うが、ロット間差（個体差）が大きく、iPS細胞から分化させた肝細胞で均一性、再現性が整ったものを提供してもらうことに期待は大きい。まずは正常人由来の細胞だが、肝薬物代謝酵素には遺伝子多型もあり、多型・スニップ等に対応してパネル化されるとなおよい。バンク化の早期実現が望まれる。

（申請用毒性試験等を想定した）標準化への取り組みに参画するという事は今のところ考えていない、標準化までにはまだ大きな距離があると思われ、当面早期スクリーニングでの評価に用いることを考えている。何を持って標準化されたとするかについては、一般的に認めてもらえるに足る十分なバックグラウンドデータがあり、品質が保障されていること等が含まれると思われるが、明確なイメージはない。薬理スクリーニングに応用するのであれば、科学的な安全性と倫理面での同意が得られていれば、標準化は問題にならない。

患者由来のiPS細胞が使えるようになると、先天性異常に基づく疾患への創薬が考えられるが、患者数は多くはない。がんとは異なり、ヒト疾患由来の組織の入手、疾患モデル化が出来ていない良性的増殖性疾患、例えば前立腺肥大や子宮内膜症等の研究に応用可能となれば大きなインパクトがある。肺線維症や肝硬変などの線維化疾患も動物での再現が難しく、有望と思われる。癌は後天性に遺伝子異常が生じる疾患なのでiPS細胞が役に立つかどうかの判断が難しい。後発性因子だけでは癌にならないことから、遺伝的背景因子を持った上で後から遺伝子を導入する方がより患者細胞に近づく可能性はある。細胞系ではなく組織に近い形で薬効評価できるとより可能性が広がる。

細胞の入手に関しては、公的機関が中に入らないと難しいと思う。理研の細胞バンクや医薬基盤研究所等が拡充されることを望む。疾患由来細胞のバンク化に必要な数は100種（人）/1疾患程度と思うが、とりあえず1種でも入手できればありがたい。

分化研究においては、心筋、肝、膵β細胞において進捗すると思われる。細胞治療（移植）に関しては、パーキンソン病はES細胞でも実績が出ており、応用は早く進むだろう。1型糖尿病に対する膵β細胞移入にも期待する。安全性、安定した分化誘導法の確立が必要である。また拒絶に関しては200種程度のパネルがあればMHCにも対応できると考えられる。

申請を見据えた安全性試験や代謝試験への応用に関する標準化に関しては、基礎研究が相当進む必要もあり、中長期的なみつめとなるだろう。早期毒性、薬理スクリーニングへの応用は、標

準化された分化細胞が入手できるのが理想ではあるが、細胞が入手できるとなれば独自に評価系の構築を進められる部分もあり、月単位で進むと思われる。(iPS細胞技術を応用して)ヒトの臓器を持った動物が作製されればすぐにでも使用してみたい。

細胞の樹立や分化誘導技術に関する権利については、企業にとっても使いやすい仕組みで運用されることを望む。整理して一括した窓口ができるとよい。バンク事業に関しても、国家レベルでの運営を希望する。

マスコミは冷静に報道してもらいたい。組み換え食品の扱い等、過去にはややヒステリックな対応も見られる。

経済効果としては、薬効・薬物動態・安全性を含めてヒトへの予測性が高まることにより、開発における無駄が減らせるという意味で100億単位の価値があるのではないか。

今動物実験で評価できるシステムがない為に薬がない領域に、新たな評価系ができるという点において、(iPS細胞技術が製薬産業界に与える)インパクトは大きい。本来ヒトES細胞でも同様のことができるが、規制があるので実際には使えない。ES細胞が規制があまりなく使えるのであれば嬉しい。

企業の若い研究者が2~3年トレーニングを受けて技術を共有できるような施設があればよいと思う。

企業 (製薬以外)

15. 1) iPS細胞関連で大きく分けて二つの取り組みをしている。

A) 研究者向けのiPS細胞作製支援技術開発: 自社の有する技術・マテリアルを元に、研究者がiPS細胞を作製するためのツール開発を念頭に置いたものである。弊社は、遺伝子クローニング・合成、レトロウイルスベクター作製、レトロネクチンを用いたレトロウイルスベクターの導入支援、導入細胞、PCRなどの遺伝子発現解析技術、抗体等の技術/商品等を有している。さらに、最近、レトロネクチンを用いたレトロウイルスベクターの導入促進によりiPS細胞作製効率を10~30倍増強することに成功している。

これらの情報を1年以内に研究者向け情報として公表して、レトロネクチン、レトロウイルスベクター等の研究用試薬をiPS細胞作製用に販売促進・新規販売することを目指している。また、iPS細胞作製用試薬についてもキット化を図るなどして新規販売することも視野に入れている。

B) 蛋白質導入によるiPS細胞作製技術開発: 自社の有するリコンビナント蛋白質作製技術・蛋白質精製技術を用いて、蛋白質導入によるiPS細胞作製技術を開発することを目指すものである。現行のiPS作製技術は遺伝子導入によるものであり、iPS細胞由来細胞による細胞治療等を考えると遺伝子治療ということになる。遺伝子導入なしにiPSが作製できれば遺伝子治療に伴う問題をクリアできる。必要な蛋白質の作製・精製には成功しており、iPS細胞作製のための条件検討をしているとのことであった。タイムテーブルとして2、3年以内をめどに知見を得たいと考えている。

A) およびB) 共通の問題点として、特許権関係の調整がある。

2) iPS細胞応用に関する見通し

上記研究にかかわる詳細なマーケティング等を行っておらず、iPS細胞関連でどの程度の産業応用があるか把握していない。ただ、iPS細胞を用いた再生医療に関しては技術的問題・規制などにより、現状では商業化には高いハードルがあると考えている。

3) 遺伝子治療などその他の先端医療への取り組み

弊社は国内外で遺伝子治療の実現を目指したプロジェクトに参画している。いずれも、患者から取り出したTリンパ球などにレトロウイルスで遺伝子を導入して患者に戻す細胞治療である。最近、国立機関と共同で再発白血病に対する遺伝子治療の治験を開始している。

遺伝子治療に関して2つの規制上の問題点がある。一つは遺伝子治療の治験開始のための認可に非常に時間がかかることであり、もう一つは遺伝子治療の対象である血液細胞の取り扱いである。今回の治験の認可には4年ほどかかっており、企業マインドとしては厳しいものがある。もっとも、この期間内に医薬品医療機器総合機構の審査体制は改善されたようで、途中から審査の迅速化が行われた。厚生労働省が審査する臨床研究についても迅速化を期待している。また、上記遺伝子治療に関して社としてはウイルスベクターを薬剤として販売することを目指している。ただ、現行法制下で、実際にこのベクターを使用するには細胞調製室（CPC）併設の医療機関で医師がベクターによる遺伝子導入を行う必要がある。患者より採取した血液細胞を外部機関で遺伝子導入等を行い患者に戻すことを可能にする規制緩和が行われれば遺伝子治療に弾みがつくと考えられる。

16. 直接iPS細胞の生産を行うことはなく、またそれを利用する立場でもない。セルソーターを販売する立場から、今後のiPS細胞の研究開発に有効な機器開発およびiPS細胞に対する考えをお聞きした。

1) iPS研究開発・生産への寄与に関する考え方

ライフサイエンス関連機器の研究開発・生産販売を行っている。本iPS細胞の研究開発に最も関係するのはセルソーターであり、産総研および東京大学の指導を受けながら開発した。この装置は幹細胞に適用可能であることを目標に開発し、幹細胞に対してダメージレスでソーティングできることを特徴としている。20~30万個の中から目的のごく少量の細胞の発現状態を見て採取することが可能である。主に蛍光情報によって選別している。

会社としては、iPS細胞に適用可能なセルソーターの研究開発を社内の経営資源を活用し、これから外部との連携により、実施する可能性がある。これは社会貢献の意味も考慮しての開発テーマである。

セルソーターにおいて、生細胞に与える損傷の原因のうち大きな要因は、水圧、超音波、電圧である。高水圧と超音波により液滴を形成し、高電圧を付加してソーティングするが、これらの要因が生細胞に損傷やストレスを与える。生細胞を含む水滴が高圧力で飛ばされるときウエルの壁に衝突し、生細胞に損傷を与える可能性があり、これらと深さの半分ほど水を蓄えたウエル内に直接入った生細胞とを全く異なるソーティング方式である。また、水滴表面に付着した生細胞に電圧をかけると、細胞の分化・誘導に影響を与える可能性があり、電圧の影響を無視できない。電圧付加の問題は定量的には不明であるが影響が大きいことは確かである。従来型のセルソーターを使用することにより、大量の損傷を被った幹細胞、iPS細胞を分別・採取するのではなく、少量でも生きていた幹細胞、iPS細胞を採取可能な装置を作る必要がある。

現在、上記方針のもと、生細胞に損傷・ストレスを与えないセルソーターを開発中である。東京大学と共同研究している。現在はiPS細胞ではなくES細胞で使っているので装置だけではなく細胞の方にも問題があるのかもしれない。繊維芽細胞等でも検討すればよいと考えている。セルソーターのシースフロー（sheath flow）を利用するのでせん断応力が問題となる。バクテリアでもグラム陽性、陰性によらず、このせん断応力が損傷の原因として問題になっている。シースフローの場合サンプルフローの5~10倍の圧力をかけるのでせん断応力が大きくなり上記の問題が起こる。細胞は圧力で押されるよりは引っ張られた方が、損傷が大きい。

2) iPS細胞の利用者としての考え方

iPS細胞は試験サンプルとして使用するのみであり、共同研究先から提供を受ける。

3) 期待するロードマップ

iPS細胞研究開発により最終的な目的である再生医療を患者に施すためには、iPS細胞のがん化の問題をクリアする必要がある。

臨床の立場からみれば、例えば患者の寿命が半年ならば、iPS細胞を導入することによりたとえ「がん」が発生したとしても、研究の促進に寄与し、寿命が2、3年延びれば医療行為としても十分な効果があるのではないかと思う。また、iPSの多分化能の評価に関しても、必ずしも遺伝子操作のないES細胞のような多分化能を求めるのではなく、ある数種類の目標組織の再生ができれば、早く試行錯誤的に応用することが研究・医療の促進につながると考える。例えばアルツハイマー症のような重い認知症の患者さんのQOLの改善に大胆に導入すること。

そのためには法律の問題がある。これをクリヤしないと研究の加速はできない。たとえ法律が制定されたとしても遅いと、外国、特に医学の進歩、成果の先取りに関して大胆にやる米国、中国には結果的には負けてしまう。日本の製薬会社でも、医薬の臨床試験は現実に中国で実施している例もある。同じ轍を踏むべきではない。

iPS細胞の培養レベルの段階でリスクが出て、法的に認可された上で体内に導入し、その結果がどうなるかの研究を行う必要がある。iPS細胞は体外にあるときと体内に入れたときとは、人間の体内の種々な因子の影響で細胞の様子が異なる。実際にiPS細胞を使用するためには、この問題を解決しないと患者に適用できない。iPS細胞の再生医療を目指す研究を実施するには、安全性、医の倫理等の問題を国の方針として明確化し、法律化し、さらに国民のコンセンサスを得ることが必須である。

京都大学を中心としての研究で、iPS細胞の機能をコントロール可能にすることはできるが、真の解明には、早急に（1年後にでも）法整備を行うことが先決である。これは研究者のモチベーションの問題にも係ってくる。

法が成立しない場合でも、国は10年間の明確な計画を設定し、研究途中で90%の専門家が失敗だと認めたとしても、当初の10年間の予算を与え研究を続けるような気長に見守るべきである。ただし、その間、海外の研究方向も見定めて、研究グループごとに予算を変えてもよい。注意すべきはiPS細胞ブームに便乗した研究である。

10年間、研究者が安心して研究できるようにしたい。その研究に対するフォローを確実にを行い、正確な評価を続けながら、研究続行か否かを定めるべきである。例えば、政権が自民党から民主党に変わってもこの方針で行うことが必要である。政府が干渉せずに研究させること。

研究において仲良しクラブは有害であり、京大、阪大仲間ではなく、例えば京大内でも山中教授にも「研究の方向性に異なる意見」と言えるような環境が必要である。

以上の問題点が克服出来た場合、iPS細胞に損傷を与えず、その細胞を評価できる装置・機器の開発も可能となる。それは10年後ではなくiPS細胞研究自体を加速させる装置であることが要求される。それは、最初の細胞から、分化・誘導のセルサイクルの各段階における細胞を破壊せずにタイムスケールで評価できるシステムが必要である。

iPS細胞の研究には、初期の細胞選別から、遺伝子導入、分化・誘導等の一連の複雑なプロセスが理屈で解明しようとするとは極めて困難であり、例えば機械工学でも良く使用される品質工学の実験手法によって、最適な条件を必要最小限の実験で見つけることが求められる。当然なことにバイオの研究者からどのような条件が重要であるのご助言が不可欠です。従って、最初の3～5年で研究者らが例え80%程度に満足できる装置の完成が研究の促進に必要です。これを達成しないとiPS細胞研究は10年経っても期待できるほどの成果が出ない可能性がある。

これは機械系、バイオ系その他の分野の研究者が協力して可能となる。他の研究同様異分野の交流・協力が不可欠である。この点はゲノム・プロジェクトと似ており、良いシーケンス解析装置ができたからこそ短時間で成功した。しかし、その後シーケンサーのマーケットが飽和状態になり、採算がとれない。経営者は当然、個人的にも、これでは企業としては困るので、このような装置の開発には国からの委託事業として国の資金で行うのが妥当ではないかと思う。

会社として、個人としてライフサイエンス貢献したい。これには会社としては優秀な人材を充てる。会社にとってiPS細胞関連装置の開発は絶好のPRにもなる。

17. 安全性の評価にiPS細胞を使用するという観点から意見を聴取した。

1) iPS細胞の使用及び将来の使用計画について

弊社では数万頭の実験動物を使用している。動物愛護等の動きもあり、大型動物は代替法に変更する趨勢にあるが、出来るだけヒトのモデルになるような外挿性の高い系が必要である。

弊社ではヒトモデル細胞を用いた評価手法は将来的に必要なと考え、4-5年前から研究として取り組んでいる。現在使用しているのは動物のES細胞である。ヒトES細胞は国内の規制が厳しいが、基本的技術としては変わらないiPS細胞が出来て、産業化へのハードルが低くなると期待している。将来はサルやイヌについてiPS細胞が出来れば使用して、ヒトとの違いを見たいと思う。iPS細胞が実験動物とヒトとの相同性を探るツールとして利用できないかについては、現在マウス、サルのES細胞を用いて基礎検討中である。

iPS細胞は評価系の細胞として使用する計画だが、当面は基礎研究で、まだビジネスの段階ではない。基礎研究に多くの資源を割けないので、iPS細胞の作製等はアカデミアとの共同、連携に積極的に参加することを考えている。またビジネスではライセンスが極めて重要で、慎重かつ迅速に対応できないといけない。

2) 細胞を使った薬の評価について

In vitroの評価には初代培養や株化細胞等種々の細胞を使用するが、これらは限られた条件でしか使えず、intactな組織との乖離があることが問題である。ES/iPS細胞から分化した細胞をヒトのモデルとして使用することはこのような観点から期待できる。動物試験では同じstrainを使えるが、治験ではこれは不可能で、どうしても動物で予測できないことが起きる。また市販後では、低い確率で起こる事象が顕在化してくる。早期段階で安全性の判断ができれば治験に入ってからドロップアウトするリスクを少なく出来るので、弊社としては細胞レベルに試験に積極的に取り組みたいと考えている。

ヒトの個体差に対応した多様なクローンを揃えられるかという点で、ES細胞では利用できる胚の数は限られ、多種の細胞を使うことは困難であるが、iPS細胞ではinformed consentを取れば使うことが出来るので、多種のiPS細胞を作ってin vitroの評価に使うことが出来る。また最近ではSNPや遺伝子塩基配列等の情報も増えているので、それを考慮したiPS細胞を作ることも可能になる。更に毒性ではHLA多型との関連があるケースも多く、50~100種位の細胞があればカバーできるという見方もあり、可能性は高いと思う。

3) 標準化細胞について

iPS細胞は起源細胞の差や作製法の差でcharacterが異なる。またES細胞もクローン間で差があるといわれている。創薬に使用する場合は、細胞の標準化は大きな問題ではないと思うが、申請を見据えた安全性試験では標準の細胞が今後必要になる。しかしヒト由来のK+チャンネルタンパク質遺伝子をトランスフェクトさせたhERG-HEK細胞が心毒性(QT延長に有効な)評価系としてガイドラインに取り入れられた経緯では、論文発表からガイドラインとして当局が取り入れるのに10年程度の時間がかかっている。iPS細胞の標準化においても、少なくともこの程度の時間はかかると思われる。その方法が評価法のガイドラインに取り入れられるためには、その有効性が高いこと、細胞の定義が明確であることも必要である。日本発でやろうとすれば厚労省との連携がないと難しいだろう。

4) iPS細胞による評価法

regulationの関係では新しい試験法が開発されると試験項目が1つ増えることになる。

「iPS細胞を利用した試験法がガイドラインに取り入れられるとすれば、どのようなところになるか？」との質問に対し： 既存法の代替法というよりも試験数を減らせるメリットがあるのでスクリーニング段階における毒性試験のような形で初期に利用される可能性がある。創薬ベンチャー等では主に探索からP1あたりを自社で行うが、全てを自社で出来ないこの部分を外部に

委託する可能性があると考えている。Regulationのみを考えるとiPS細胞による試験法の導入は難しいが、ガイドラインに沿ったものでなくても使われる可能性はあると思う。

5) iPS細胞が満たすべき品質・要件

iPS細胞の遺伝的な性質やiPS細胞化された時の条件が重要であり、安全性の面からウイルス等のがん原性のないトランスフェクト剤が望ましいが、化学物質で誘導したからといって安全とはいえないので基準を決める必要がある。受託試験を行う立場からはGMPを考慮するので、作製法、細胞の性質、評価試験での再現性が求められる。

「iPS細胞が提供される場合は、完成品が良いか、またはその前段階までの試料で、プロトコルを付けて渡した方がよいか？」との質問に対し： 今すぐビジネス化するのであればprematureな段階で供給される方が良い。iPS細胞やES細胞から誘導される細胞は多分fetal typeと思われ、経過日数によって性質が変わってくる場合が多いと思う。また輸送期間中に細胞のviabilityが変化することも多く、期間限定で性質を保障するようなことも考えるべきである。弊社ではES細胞ではなく、分化した組織幹細胞の方が使用しやすいと思っている。

6) 受託試験に使用されるiPS細胞由来の分化細胞

「受託試験においてはiPS細胞をどのような細胞に分化させて使用するか？」との質問に対し： 心筋、肝臓、神経細胞等に分化させて使われる可能性が高いと思う。心筋細胞はfetal typeでは拍動するが、adult typeでは自律拍動能はなく、心筋細胞の定義が問題となる。また心筋細胞は保存が難しい。肝臓細胞はfetal typeとadult typeでは発現されるCytP450のタイプが異なり、薬の評価にfetal typeを使うのは正確ではないと思う。現在は広島大発のベンチャーがヒト型肝臓を移植した免疫不全マウスを使い、肝臓の再生能を利用してin vivoでadult typeを作っているのを利用している。ヒトでの副作用を高い確度で外挿する場合にはadult typeを使用することが必要であると思う。

7) ES細胞・iPS細胞に対する外国の取り組み

受託試験に使用する細胞は標準的な手法で作成されたもので、一定の範囲に入るものでないと使用できない。弊社で使用しているES細胞もクローンごとに性質は異なっている。スウェーデンのセラチス社のES細胞は欧州のメガファーマに供給されていると聞いている。同社はES細胞製造技術も特許も持っているが、iPS細胞は当面考えていないようだ。欧州では動物実験代替法の開発に対する5~6億円/年のファンドがある。またドイツでは人種の異なるiPS細胞10種ほど作っているという話があるが、まだcommercial baseではないようだ。欧州では国により取り組みが異なる。英国やスウェーデンは生殖医療の発祥の地であり、受精卵を扱いやすい。一方ドイツでは規制がある。

弊社はES細胞やiPS細胞について研究は出来てもビジネスにはまだ距離があるので、ヒトES細胞使用の認可申請を出していない。また具体的なビジネスの段階ではないので米国とはコンタクトしていない。

8) ES細胞とiPS細胞

iPS細胞は上述したように、容易に多種の細胞が得られるので利用しやすいが、実用化を進めるためにはES細胞とiPS細胞の両方を同じシステムで比較・評価し、両者の特徴をしっかりと把握することが必要である。ヒト以外の他種細胞を用いて技術の確立を同時並行で進める必要がある。これらの評価には医工連携による装置の開発が必要になると思う。

9) iPS細胞実用化のために必要な要素技術

開発すべき技術としては次のようなものが挙げられる。

A) 培養の連続モニタリングシステム：現在ガラス容器内で行っているような培養を、多数を同時並行でモニターできるシステム（各種パラメータの設定と調節、薬物注入や形態観察、蛍光測定等の機能が必要である。）～5年後までに実用化したい。

B) チップ化技術：多数の生きた細胞を封入したカセット化されたセットで、各種の評価試験を行うことが出来るようにしたい。iPS細胞による評価が実用化する時には出来ている必要がある。微量分析装置の高精度化と合わせて5～10年後までに実用化したい。

C) 細胞を凍結せずに維持できる技術：心筋細胞等細胞によっては保存中、輸送中に死滅したり性質が変わってしまう細胞を一定の性質で維持する技術が必要である。誘導因子が解明されてくれば出来る可能性がある。

D) pre-matureレベルでの細胞のhandling技術確立：誘導因子による調節、プレートの基材の最適化など。例えばhepatocyteでは酸素濃度が細胞の状態を保持するのに重要であり、酸素透過度の高い素材が下にあると良い、という研究結果もある。～5年後までに実用化したい。

10) 要望

大学が独立行政法人化されて以後、民間との共同研究や特許、ライセンスのシステムが大学ごとに異なり、従来よりもやり難くなった。もっとやり易いシステムにしてほしい。また民間としては実施権の保障が必要である。特に外国企業相手の時は問題になる。

国のプロジェクトに参加しているが、産業振興の経済産業省、regulationの厚生労働省の間で、お互いの橋渡しがうまくいっているとは思えない。国際的なregulationでもOECDとICEがありお互いに異なる。国として両省の間でシームレスな関係を作してほしい。

日本が一体となってプロジェクトを推進しているが、過大な期待は禁物、海外の進展は早い。また欧米と連携も必要である。少なくとも安全性評価での標準化においては細胞やデバイスの問題で外国と組まなくては進まない。

18. 弊社は遺伝子関連機器のバイオベンチャーであり、iPS細胞の生産者でも利用者でもない。DNA抽出装置等の製品をiPS細胞周辺の研究・開発・生産者側に提供する立場である。しかし、機器等の提供者側ではあるが、その開発のためにバイオ技術、情報を世界的視野で捕えている。

1) iPS研究開発・生産への寄与に関する自社の考え方

従来から、要素技術として磁性微粒子を利用し、免疫測定等の臨床検査機器等に注力しており、主製品のひとつはDNA抽出装置である。最近、従来法では困難であった遺伝子の抽出から解析までの一連の工程の全自動化を可能にした。

iPS細胞はじめES細胞、体性幹細胞そのものに関して、弊社は研究・開発を実施しないので、iPS等の研究機関、研究者からの注文、指導、共同研究を通して弊社の得意技術を踏まえて高精度、高効率の独自の機器を提供することは可能である。

例えば、細胞への遺伝子導入に電気注入法を用いる場合電極間に約1,000ボルトの高電圧をかけるが、細胞の穿孔部が損傷する。そこで低電圧での電気注入法として、磁性体微粒子を細胞表面に付け（ダイナル社製、Dyna、ノルウェー）、その上にDNAを付着させ電気注入を行うと細胞を損傷することなくDNAを注入できる。要するに、磁気効果により細胞を高密度化（細胞塊とする）しておく数10ボルトの低電圧で穿孔が可能となる。この場合、弊社の分注チップ内で操作すると磁性体への電圧をコントロールでき、最的条件下での電気注入が可能となる。これはiPS細胞への遺伝子導入への一つの技術になる可能性がある。

以上は電気注入と磁性体との結合技術になるが、このような弊社にとって未知の分野と海外の企業を含め他機関、研究者との得意分野の連携により、例えばiPS研究・開発に対して充分寄与できると考える。Invitrogenでも鮭の卵や細菌でも高密度化したのち、低電圧で遺伝子の電気注入をマイルドな方法で行っているデータがある。弊社の分注チップを用い、磁性・電極制御技術により高密度化iPS生成装置が可能かどうか？

細胞識別のため抗体チップを作成しようとしている。データとしてはまだ不十分だが、DNAチップ同様に良いデータが得られるよう研究中である。数1,000の抗体との相互作用系であり、細胞として有するタンパク質が抗体とどのように結合するかを見たい。その次には抗体とタンパク質の結合が可能になれば抗体チップになる。これらの研究開発には、DNAはA先生、RNAはB先生、タンパク質はC先生というように各分野の諸先生との連携が必要である。

また、微量の試料ではタンパク質の発現量が少ないと思っていたが細胞数が1,000程度であれば定量性は良くなる。チップ技術の一つであり、iPS研究の周辺技術開発として進めたい。

2) iPSを使う立場としては、量と質とが問題であるが、iPSを提供する立場（精製・分離等の関連機器を提供する）からは使い方を如何に考えるか：

弊社との連携から生まれたダイナル社の磁性微粒子はビーズ・コアが一様に分布した磁性物質を有し、親水性のポリマーで被覆されている。その滑らかな表面に抗体あるいは他の分子を結合することができ、磁石を用いることにより物質あるいは細胞を効率的に分離できる。これを用いて生体幹細胞の分離の検討を行っている。

抗体開発はiPS研究にも重要であり、造血系の体性幹細胞で検討している。10、20年前から幹細胞を細胞中から分離したいと考えていた。弊社は強力な磁場発生装置を有しているので分離はできた。しかし、幹細胞の培養は容易ではなかったが、特殊な抗体を用いて可能となった。抗原・抗体反応の応用である。磁性体表面、プローブ、抗体の結合法などを検討すれば、幹細胞、iPS細胞の分離も可能であろう。しかし、培養は相当困難であろう。iPS細胞をシャーレ上で培養してできた平たい細胞塊をはがすとき破壊される。この従来の方法から、例えば浮遊細胞培養系等に弊社は貢献したい。弊社には経験がある研究者が多く、腫瘍マーカーを細胞中から分離、分析できる。その発展系として培養技術も必要である。その際、バイオ基材として感光性樹脂、感熱性樹脂の利用も面白い。同一ステージ上で全工程を自動化するロボティックス的な方法である。細胞内で発現しているタンパク質のチェックも可能としたい。

磁性粒子は細胞を殺すことがある。これを応用すると一度に不必要な細胞を殺す方法になる可能性がある。

細胞の標準化が大切であるが、ゲノム段階かまたは発現段階で行うのか検討が必要だが、細胞解析の方法として興味がある。

3) 期待するロードマップ

海外のiSP細胞の研究・開発状況に関しては大騒ぎしている様子は見受けられない。米国ではiPS細胞を各研究機関に配布しており自由度が高い。まだ先のものとしてみているようだ。わが国では良い研究の種子を持っていないので、これを良い種子として研究者のみではなく社会全体も騒いでいる。ロードマップを作るテーマであり、5年、10年でやらないと負けになると製薬会社等の意見であるが、5年、10年でできる問題ではないと考えている。

弊社としては、磁気微粒子、細胞の少量ハンドリング、分析を要素技術として、それを中心としたバイオ機器を他機関との提携の上開発し、iPS等の研究者、機関に貢献したい。

2. 海外調査結果の集約
計2件

Hunter College of City Univ. NY

01. 最近の米国科学研究費の動向に関して

米国の科学技術研究費予算についての近年の動向については、サブプライム、リーマンショック以来、景気の落ち込みが反映され、エネルギー環境分野への予算重点化の傾向にあり、iPS細胞を含めて先端医療・ライフサイエンス分野に対する予算が拡充される傾向ではない。また日本のようにiPS細胞が特に取りざたされて社会的にも注目されているという傾向もない。

02. iPS細胞の非侵襲的評価技術に関して

iPS細胞を実用化するために細胞の非侵襲的な分析手法が必要であるならば、教授自身の開発した電極のナノギャップ構造を用いて、細胞のマクロな構造変化を解析できる可能性がある。抗体を固定化したペプチドナノチューブをナノギャップに配置し、抗体へのウイルス結合をインピーダンス/キャパシタンスの変化から定量的に評価することに成功している (Angew. Chem. 47, 9752-9755, 2008)。ギャップ構造の大きさを細胞レベルに変化させれば、細胞の形態、あるいは内容物の変化に応答した信号変化を得ることが出来る。細胞にとって交流電界の影響は未知であるが、侵襲性は低いと考えられる。

NIH

01. NIHの幹細胞研究に関する予算

NIHの予算規模は、2008FY (括弧内は2007FY) で、ヒトES細胞関連で88M\$ (74M\$)、ES以外のヒト幹細胞で297M\$ (226M\$)、iPS関連はES以外のヒト幹細胞に含まれる位置づけであり、iPS細胞という分野に分割して計算することは困難である。ヒト以外の動物予算は別途計上されており、動物のES細胞関連で150M\$ (126M\$)、動物の幹細胞で497M\$ (400M\$) である。ES細胞関連は19%の伸び率であるのに対して、ES以外の幹細胞研究予算の伸び率がヒト31%、動物で24.5%と高いことが分かる。2009FYは景気後退の影響を受けることが予想されるが、民主党への政権交代によって研究予算の拡充が期待されている。

02. National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI)

NHLBIでは、iPS細胞技術に関する研究予算を組んでおり、NHLBI Progenitor Cell Biology Consortium (前駆細胞生物学コンソーシアム) がiPS細胞の樹立と利用に関する技術の開発に関する主要なプログラムの代表となっている。該コンソーシアムは、24のグループの多岐にわたる専門分野の研究者が協力することによってバーチャル研究ハブを構成し、循環器系疾患における前駆細胞の応用を推進する。

ハブごとの連携はadministrative coordinating center (ACC)によって調整され、試験研究、共同研究、研究コアに対して研究費の分配を行う。該コンソーシアムは7年間で、100M\$ + α の予算を計上している。予算配分プロセスは、まず2008年12月に開始されたRFA HL-08-012 NHLBI Progenitor Cell Biology Planning Awards (R03) で計画会議に参加する。RFA HL-09-004 NHLBI Progenitor Cell Biology Research Hubs (U01) でバーチャル研究ハブを形成する。ACCがそれぞれのRFAに対して予算を配分する。という3段階を経る。

実行例としては

- ・肺、心臓、血管、血球の系列に特異的な体細胞を再プログラムするための新技術
- ・特殊な遺伝子型の患者からの iPS 細胞の樹立、分化およびキャラクタリゼーション
- ・発生、未分化維持、分化における遺伝子ネットワークの解明のための、iPSおよびhES細胞の遺伝情報およびエピジェネティック情報の比較
- ・心臓、肺および血管の前駆細胞系列の同定、単離、追跡、自己再生と直接的分化

- ・前駆細胞の移植に伴う免疫（拒絶、監視、寛容）に関する研究
- ・マイクロ流体などのナノテクノロジー、バイオエンジニアリング、ティッシュエンジニアリングのツールを用いた機能評価のための新しい手法

等が挙げられる。細胞の表現型データベースを構築することも重要な研究の一つである。

03. National Institute of Mental Health (NIMH)

NIMHは、認知、感情および社会的行動等に関する脳障害を研究対象としている。精神障害では細胞治療と関係が薄いので、iPS細胞などの細胞分野への参入は遅れている。疾患研究におけるリバース・エンジニアリング、患者から細胞を採取し、精神障害疾患を再構築するために、幹細胞を用いることは魅力的なアイデアである。

NIMHでは1.3B\$の予算が利用可能であるが、iPS細胞研究には全く利用できなかった。iPS細胞はNHLBIの課題であって、NIMHの課題ではないからである。しかし、最近になってNIMHはiPS細胞関連の研究を開始することを決定し、健常者からのコントロールiPS細胞、精神障害者のiPS細胞を取得するための研究のために年間225M\$の予算が利用可能になった。分化させ解析を行うためのiPS細胞の樹立効率の改善を目的とした研究で11月から募集が行われており、申込み期限は2月27日である。

04. iPS細胞研究の方向性について

iPS細胞において2つの目標が考えられている。一つは基礎細胞生物学への貢献であり、一つはウイルスを用いないiPS樹立の新技术の開発である。

05. iPS細胞の作成法、標準化、iPSマーカーに関して

標準化すべきである。研究室ごとの手法の比較により、誘導試薬、方法を共有する必要がある。細胞マーカーでキャラクタライズされた特定のシード細胞あるいは細胞系統のためのプロトコルの共有を可能にするべきである。

マーカーは重大な問題である。iPS細胞の定義に関しては、多くの人々は答えることができない。hESの研究においてさえ、幹細胞マーカーが使われているが、それほど明確なものではない。そこでマーカーを評価するための更なる機能的な評価法が必要である。リポータータンパク質を導入したモデルがあるが、それは臨床研究には適さない。純度の高いiPS細胞および分化した細胞の為の品質管理法が必要である。

06. iPS細胞の臨床応用に関して

1年か2年で可能になるであろうが、非ウイルスの方法論の確立次第である。心血管分野では、キャラクタリゼーションが不十分な細胞が臨床適用されて5～6年になる。iPS細胞から分化誘導が出来て、そして非ウイルスの方法が開発されれば、すぐにでも臨床に用いられと考えられる。

07. iPS誘導のためのDNA、タンパク質、化学物質の可能性に関して

アデノウイルスのシステムはランダムなインテグレーションが起きない代わりに、発現が短い。副次的な影響はゼロに出来ないので、ウイルスの使用は好ましくない。

タンパク質は半減期が短いので、どのくらいの期間、活性である必要があるかについては不明である。多量のタンパク質注入のためには、細胞の透過性上昇等の方法を用いる方法も考えられる。注入されるタンパク質は多くないので、直接の注入は困難かもしれない。

化学物質の使用は有力であるが、あらゆる化合物を試験する必要がある。

08. iPSの創薬への利用に関して

創薬のためのハイスループットスクリーニングでは、細胞の安全性は問題にならない。動物実験のような安全性の配慮が必要ないので、これらの応用はより早く進む可能性がある。

09. 細胞の評価方法に関して

研究の多くはヘテロな細胞集団を扱っており、特異的な成長因子を用いても100%の細胞培養は出来ない。よって、依然としてバルクの評価が行われてしかるべきである。単一細胞で評価を行なうことは難しい。どのように単一細胞を調製するか判断して始めることが重要である。Geron社の方法を参考にすべきである。なぜなら、hESの研究のための彼らの方法はFDAによって認可

されている。安全性の基準があるはずであるが、公開された情報は少ない。FDAが情報を発表するかどうか分からない。Geron社を直接調査すべきである。

10. 医療および製薬以外でのiPS細胞の利用の可能性

正常細胞と疾患細胞の間の、分化プロセスにおける差異のモデルとしてより潜在的な需要がある。iPS細胞は精神病患者と正常な患者の間の分化過程を識別する研究に使うことができる。

創薬における貢献はやはり大きいと考えられる。iPS細胞を用いた疾患の研究を、患者個人を対象に行うこともできるがコストがかかる。iPS細胞は患者のグループを識別する方法として、および細胞がどのように薬物に反応するかを知る方法として使用されるべきである。患者は薬物に対して異なる反応を示すので、iPS細胞の利用は合理的な方法である。患者をグルーピングする適切なバイオマーカーが同定されれば、有効な薬剤の開発が進むと考えられる。

11. エピジェネティクス解析に関して

iPS細胞の評価において、エピジェネティクス解析は一般的であるが、サンプリングの破壊試験でしか評価出来ない。非破壊でエピジェネティクスを評価する手法に関して、試みがあるという情報は無い。

資料 NIH Stem Cell and induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) Overview

I. NIH Stem Cell Information

NIH Stem Cell website、<http://stemcells.nih.gov>では、NIHのヒト多能性幹細胞の記録や、資金調達
の機会、方針、訓練、教育資源などを含むNIHの幹細胞研究の取り組みに関する情報が記載され
ている。

II. NIH Human Pluripotent Stem Cell Registry

NIHのヒト多能性幹細胞に関する記録は、<http://stemcells.nih.gov/research/registry>にあり、連邦政
府の補助金に適合したヒト多能性幹細胞の誘導に関する情報が掲載されている。

III. FY 2008 NIH Stem Cell Research Funding

米国連邦政府は、現在どのような幹細胞研究も補助している。NIHは、動物と人間の細胞を使用
した、胚性、非胚性（成人、胎児、羊水、臍帯血を含む）の両方の幹細胞研究にとって、連邦
政府の補助金の主要な供給源である。2008年度において、NIHはヒト胚性幹細胞の研究プロジェ
クト88M\$の資金を提供した。NIHは、また、同年度において、ヒト非胚性幹細胞の研究におい
ても297M\$の補助を行っている。今のところ、NIH幹細胞研究では財政的に何の制限もない。むしろ、NIHの補助金による援助は、科学専門家による評価プロセスにおけるそのスコアにより決定
されている。

NIH幹細胞研究の2008年会計年度における財源の詳細については、
<http://report.nih.gov/rcdc/categories>に記載されている。

2007年会計年度のNIHの機関やセンターの調査によると、NIHは、細胞の再プログラミングに
関する人間、動物両方の研究プロジェクトに\$3,366,386の予算が使用されている。

IV. Program Announcements (PAs) for Human Pluripotent Stem Cells from Non-Embryonic Sources

2007年12月13日、ブッシュ大統領の行政命令#13435に従い、非胚性の細胞原料を使用したヒト
多能性幹細胞研究-R01,R21と題した二つのPAを発行した。

1. PA-08-043: Human Pluripotent Stem Cell (hPSC) Research Using Non-Embryonic Sources (R01),
<http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-08-043.html>
2. PA-08-044 Human Pluripotent Stem Cell (hPSC) Research Using Non-Embryonic Sources (R21),
<http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-08-044.html>

V. International Stem Cell Forum (ISCF)

国際幹細胞フォーラム<http://www.stemcellforum.org/>は、国際協力と世界中の医療研究におけるヒト幹細胞の使用において良い実践が促進されるよう後押しするべく設けられている。

VI. NIH-Supported Science Advances using iPS cells (From Most Recent to Least Recent)

人工多能性幹細胞—病気の兆候を示している運動ニューロンからの樹立

研究者は、病気の原因をより理解出来るように、またある場合には、新治療法を発見するために、iPS細胞から細胞や組織を作製することに期待し、iPS細胞を、遺伝疾患を持った個体から誘導することに取り組んでいる。しかしながら、研究者は、細胞や組織から誘導されたiPS細胞が、病気の特徴を示すかどうか分かっていない。NIHがサポートしている研究者は、脊髄性筋萎縮症 (SMA) の子供と、SMAでないその子の母親からiPS細胞系統を作製している。SMAは、幼児や子供の腕や脚の随意筋の虚弱や消耗を引き起こす遺伝疾患の一群である。この病気は、運動神経細胞に必須タンパク質の合成に関与する遺伝子SMN1の異常、または欠損によって起こる。研究者は、SMAに冒された子供から分離したiPS細胞から誘導した運動神経細胞が、培養液の中で一ヶ月後に死ぬ一方で、子供の母親のiPS細胞から誘導した運動ニューロンは生き続けることを発見した。SMA-iPS細胞由来の運動神経細胞の死は、罹患児に何が起きているかを反映し、細胞が少なくとも一つのSMAの特徴を示すことを示唆している。SMA-iPS細胞由来の運動神経細胞はまた、欠如した運動神経細胞タンパク質の生成を増加すると知られている医薬品での治療に対して効果を示している。これらのSMA-iPS細胞由来の運動神経細胞は、SMAの重要な新しいインビトロモデルを提供する。そして、研究者は、それらを使ってSMAのための新薬を試験する事ができ、SMAがいつどうやって発生するのか解析することが出来る。

Nature, laboratory of C. Svendsen. 2008 Dec 21.

より安全なヒト細胞の再プログラミング

2007年、研究者は、成人の皮膚の繊維芽細胞からiPS細胞を作製した。独自の技術の二つの特性が、これらの細胞が人間の移植のための細胞を誘導するのに使用されるといふ思いも寄らない結果を生んだ。ひとつは、再プログラミング因子が癌促進遺伝子を含んでいるということである。二つめは、要因が、宿主DNAに無作為に組み込まれた、不活性化ウイルスを使用して成人の細胞に運び込まれたということである。これは、ウイルスが、重大な遺伝子の発現を阻害もしくは破壊する可能性を示している。研究者は、最近いくつかの新しい代替iPS細胞作製方法を構築した。それぞれの新手法で作製されたiPS細胞は、初めの手法で作製されたiPS細胞と酷似している。それぞれの新手法は、初めの手法と比べてそれぞれに得失があり、それぞれが、研究者が、臨床試験に安全に使用出来るiPS細胞をどのように作製出来るかについて情報を提供している。

プライベートファンドのハーバード大学の研究者は、強力な化学薬品とバルプロ酸を、培養液の中で新生児ヒト肌細胞（繊維芽細胞）に添加した。この処理は、DNAをほぐして、遺伝子にアクセスしやすくする。研究者は、これによって、従来iPS細胞再プログラミングに必要なだった4つの因子から、たった2つの因子を添加するだけでよくなった。除外された2つの因子は、強力な癌生成遺伝子、c-Myc とKlf4である。この技術では、成人ではなく新生児の細胞を使用しており、有害であろうウイルスの使用の問題は解決されていない。しかし、研究者はいつか薬剤だけで再プログラミングが可能になることを期待している。

Nature, laboratory of D. Melton. 2008 Oct 12.

NIHがサポートしているハーバード大学の研究者はアデノウイルスで再プログラミング因子を新生児マウスの皮膚細胞と成体マウスの肝細胞に導入した。アデノウイルスはゲノムDNAに挿入

されないので、重要な遺伝子の破壊の問題を避けられる。ウイルスは再プログラミングを完了するのに必要な短い時間（数日）発現すればよい。しかしながら、この手法はレトロウイルスに比べて非常に効率が悪い、癌遺伝子の使用も避けられないし、低い確率ながら宿主のゲノムDNAへの挿入も起こる。この研究者は現在ヒト細胞からの樹立に取り組んでいる。

Science, laboratory of K. Hochedlinger. 2008 Sep 25

3番目のグループはウイルスを使用せずにiPS細胞の樹立に成功した。日本の研究者らはネイキッドのプラスミドDNAしか用いずにマウスの細胞から再プログラミングすることに成功した。彼らは、トランスフェクションによってマウス胚性皮膚細胞にプラスミドを導入した。この時に依然としてc-Mycの使用は避けられない。そして効率は低く、成体マウス皮膚細胞と比較してより再プログラミングしやすいマウス胚性皮膚細胞に対して誘導をかけている。

Science, laboratory of S. Yamanaka. 2008 Oct 9.

10のヒト疾患に関連する成人の幹細胞株の作製

プライベートファンドの研究者の筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者から樹立したiPS細胞に関する報告の1週間後、NIHファンドの研究者がさらに10の疾患に関連してiPS細胞株を樹立したと発表した。デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、若年性I型糖尿病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、ダウン症、ADA欠損重症複合免疫不全症、Shwachman-Bodian-Diamond症候群、ゴーシェ病、レッシュ・ナイハン症候群の患者からそれぞれiPS細胞が樹立された。以前同様、研究者は疾患の症状を現す細胞株から関連性のある細胞型が得られているかどうかを確定しなければならない。例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者から樹立されたiPS細胞株は、患者細胞のように振る舞うかどうか。樹立された細胞株は長期間再生し、疾患プロセスの研究のためやヒト細胞を用いた薬剤の試験のために永久的な細胞供給を実現する。研究者は、同じ疾患を持つが、異なる症状を発症している個々の患者のiPS細胞を樹立し、比較することが出来る。これによって遺伝的な要因によるものか環境から来る要因によるものかを見極めることが出来る。

Cell, laboratories of C. Cowan, K. Hochedlinger, G. Daley. 2008 August 6.

再プログラムされた成体マウス皮膚細胞から誘導された神経細胞によってパーキンソン病モデルラットの病状が改善される

研究者はいつかパーキンソン病患者の失われたドーパミン産生ニューロンを幹細胞から誘導したニューロンで代替することを目指している。以前、研究者はヒトES細胞がドーパミン産生ニューロンになると言っていた。NIHファンドを受けた研究者のチームはマウスiPS細胞からのドーパミン産生ニューロンの作製を報告した。誘導したドーパミン産生ニューロンのパーキンソン病モデルラットの脳への注入の効果を試験した。試験されたラットは病状回復が認められた。この結果は、動物のiPS細胞は失われた細胞に置き換わる能力を有し、モデル動物の疾患を改善することを示している。研究者らはヒトへの応用と成功を期待している。

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 105(15):5856-5861, laboratory of R. Jaenisch. 2008 April 15.

どの分子の変化が再プログラミングを実現するのか？

研究者らは成体のマウス、ヒトの細胞を再プログラミングし、ES細胞のように振る舞う細胞を作ることに成功した。これら成体由来の細胞はiPS細胞として知られている。iPS細胞はES細胞と似た多くの特徴を有するが、研究者らはどの分子の変化が再プログラミングを実現するか特定するに至っていない。この問題に取り組むために、NIHファンドを受けた研究者は、Oct4, Sox2, c-Myc, and Klf4の発現の開始と停止を行うことが出来る特別なウイルスを作製した。彼らは、このオンオフスイッチを使って、再プログラミングに必要な最小の発現量と発現時間を決定した。彼らは

また再プログラミングの過程の中で異なるステージで起こる遺伝子発現レベルの変化や遺伝子発現亢進と抑制のような特異的なイベントを同定した。彼らは、現在、この情報によって再プログラミングされた細胞とそうでない細胞をより分けることが出来る。また彼らは再プログラミングのステージと暴露時間を知ることによって、発ガンリスクを排除した新しい再プログラミング手法を開発する。

Cell Stem Cell 2(3):230–240, laboratory of K. Hochedlinger. 2008 March 6.

再プログラムされたマウス皮膚細胞でマウス鎌状赤血球貧血を治療する

鎌状赤血球貧血の患者は、ヘモグロビン遺伝子の欠損を遺伝的に引き継いでおり、赤血球が鎌状になる。鎌状赤血球は凝集し血流を遮ることによって痛みや組織の損傷を起こす。NIHファンドを受けた研究者は、ヘモグロビンを欠損したマウスからiPS細胞を樹立した。相同組み換えによって欠損ヘモグロビン遺伝子を修復し、血球系幹細胞に誘導した。血球系幹細胞は骨髄にあり、体内で全ての血球系細胞を作り出す。彼らは、修復した血球系幹細胞を、骨髄を破壊し自身の欠損した血球を生産出来ないようにした鎌状赤血球貧血マウスに移植した。移植した細胞はマウスの造血系で再生し、鎌状よりも正常の赤血球の生産が多く見られた。この研究の進展は再プログラムした成体のマウスの細胞はマウス個体内で疾患を治療する細胞を生産する能力があることを示した。しかし、この研究ではc-Mycが使用されており、ヒトの治療に用いることは出来ない。

Science 318:1920–23, laboratory of R. Jaenisch. 2007 Dec 6.

ヒトの皮膚細胞の再プログラミング

2006年日本の研究者らは成体マウスの皮膚細胞を再プログラミングし、ES細胞のように振る舞う細胞を作ることに成功した。この再プログラム細胞は卵子、精子（配偶子）の生産は出来ないものであった。彼らはこの細胞にiPS細胞と名付けた。2007年、その日本人研究者らはiPS細胞から配偶子を作製することに成功し、他の多くのラボでその結果は検証された。今、その日本の研究者らとNIHファンドを受けた研究者らのヒトiPS細胞に関する報告が同時に発表された。日本のチームはOct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycの4遺伝子を、NIHファンドを受けた研究者らはOCT4、SOX2、NANOG、LIN28の4遺伝子を用いた。

Cell 131:861–72, laboratory of S. Yamanaka, 2007 Nov 30; Science 318:1917–1920, laboratory of J. Thomson, 2007 Dec 21.