

ヒトES細胞をめぐる国内外の動きと再生医療および新薬開発への応用

京都大学再生医科学研究所

中辻憲夫

日本経済新聞
2006.11.24朝刊

イノベーション 日本の「原力」

バイオ◎

バイオ分野における主な技術の
日米競争力比較(経済産業研究所調査)

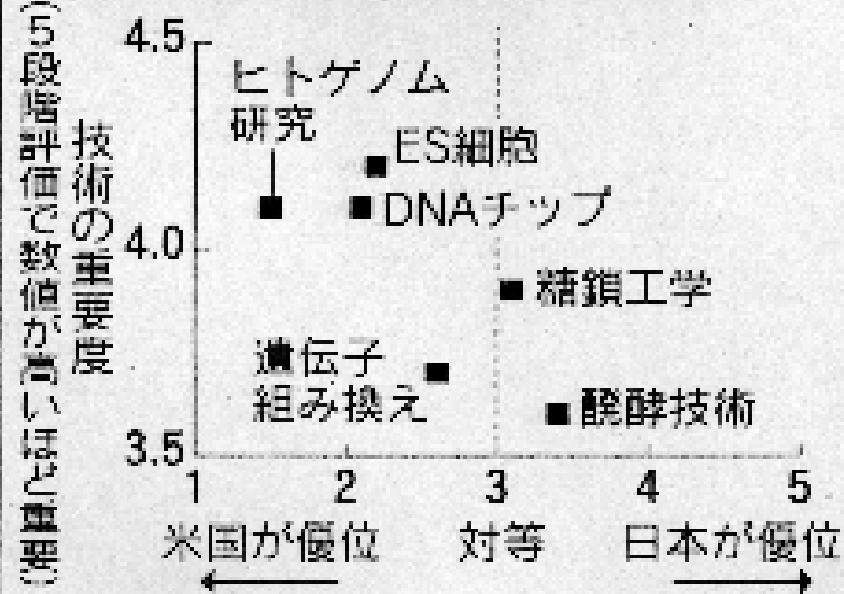
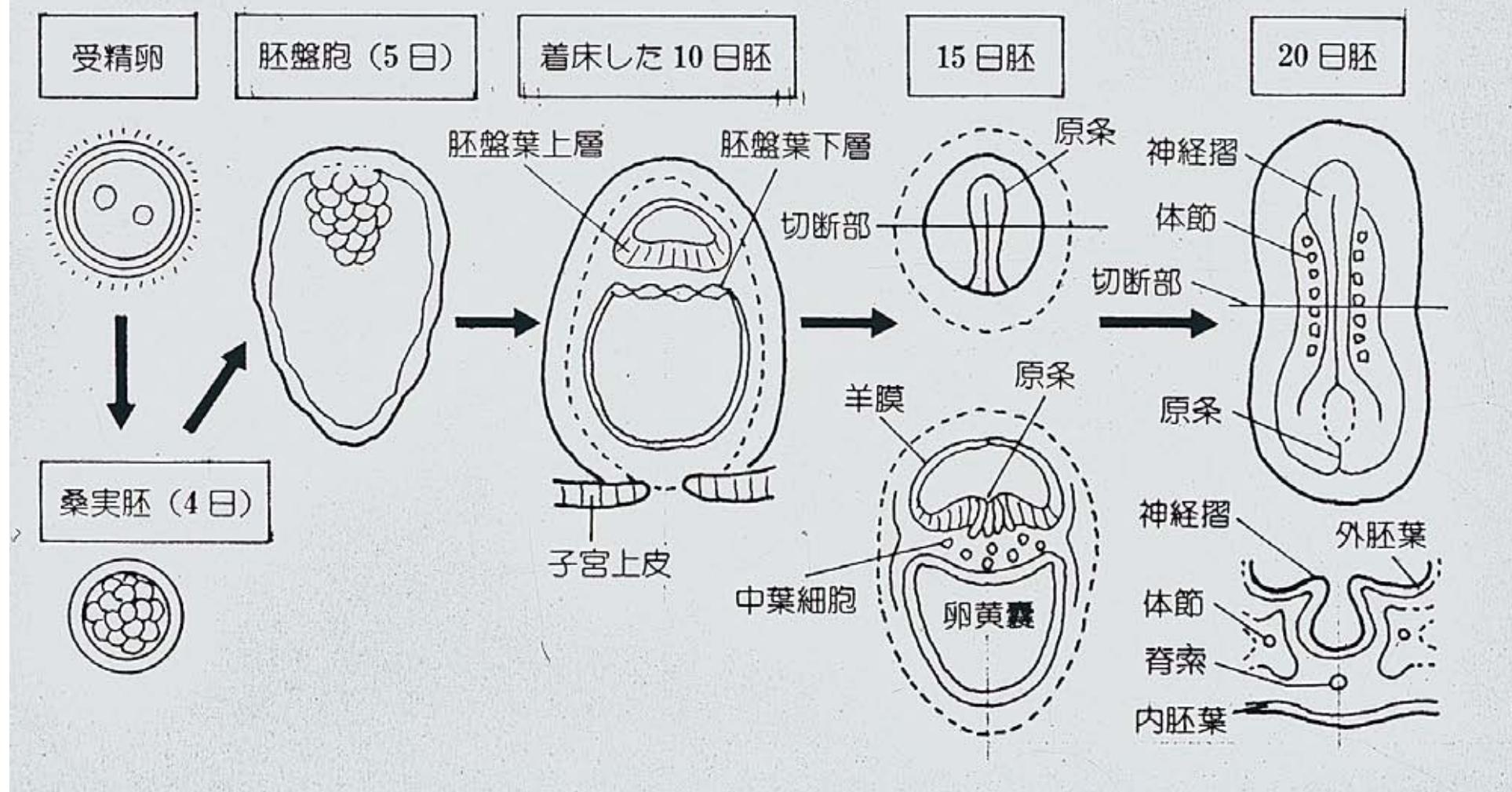


図 2-4 ヒト胚の初期発生



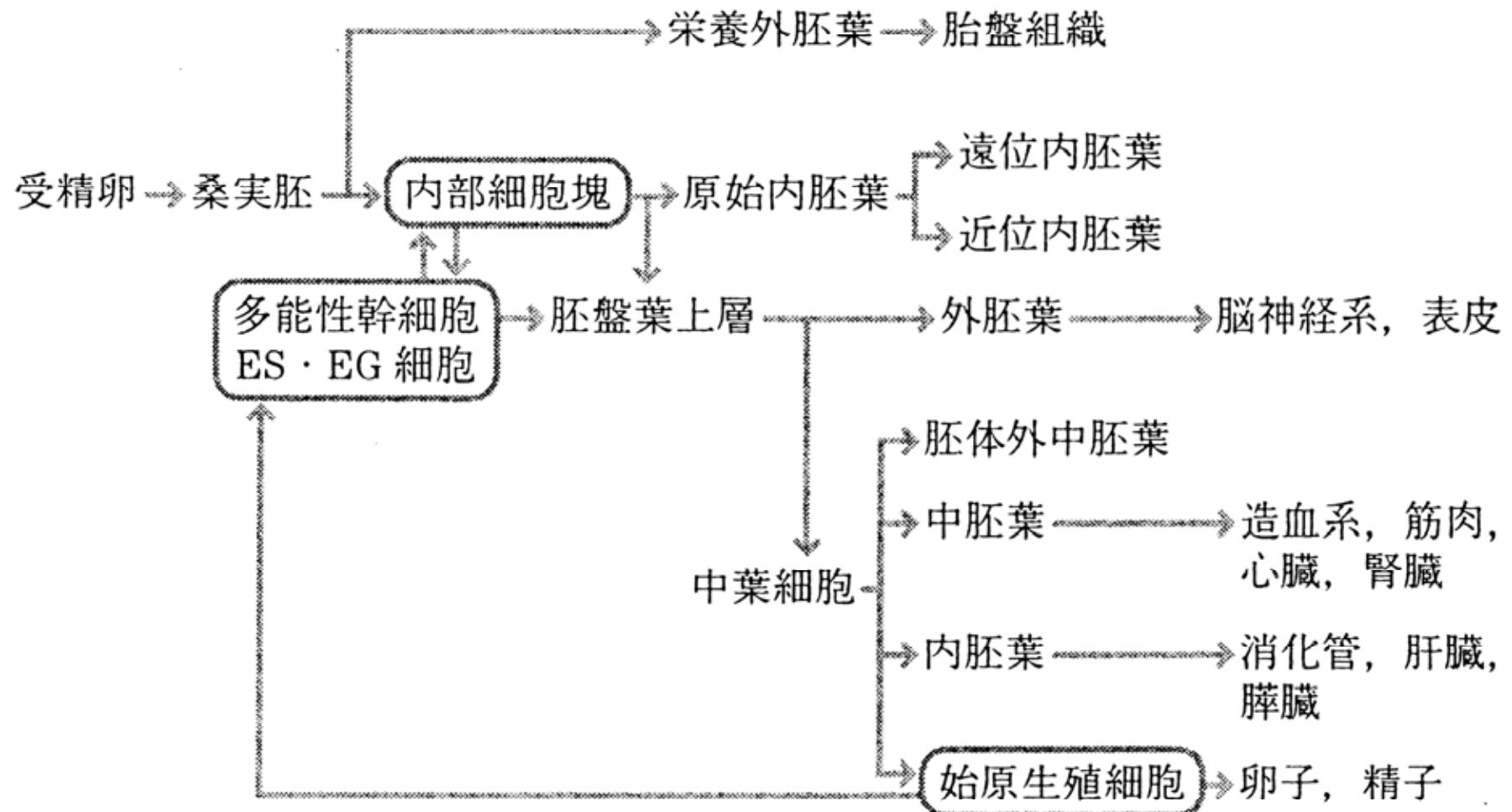


図 8 組織の発生

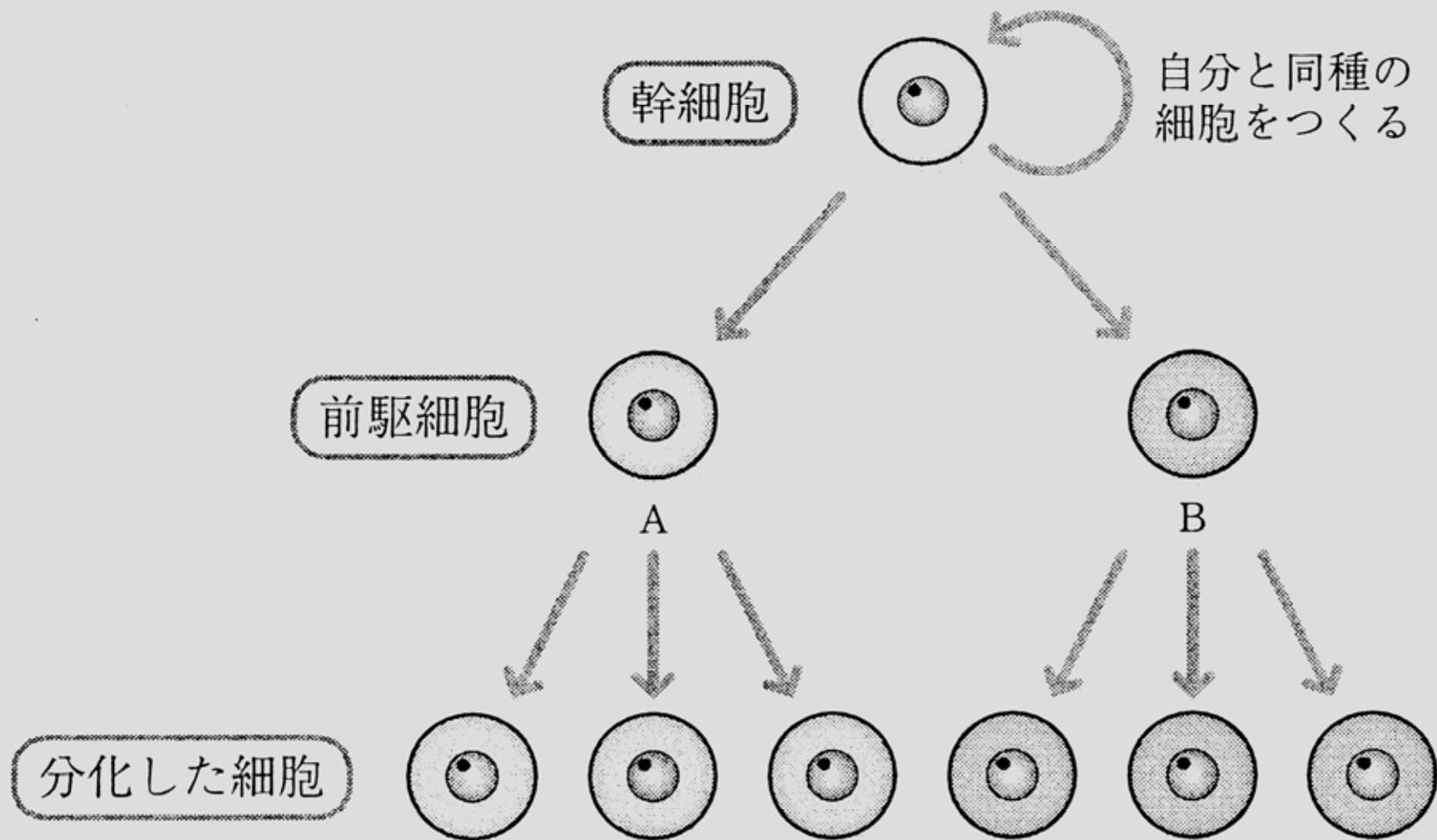


図1 幹細胞からの分化

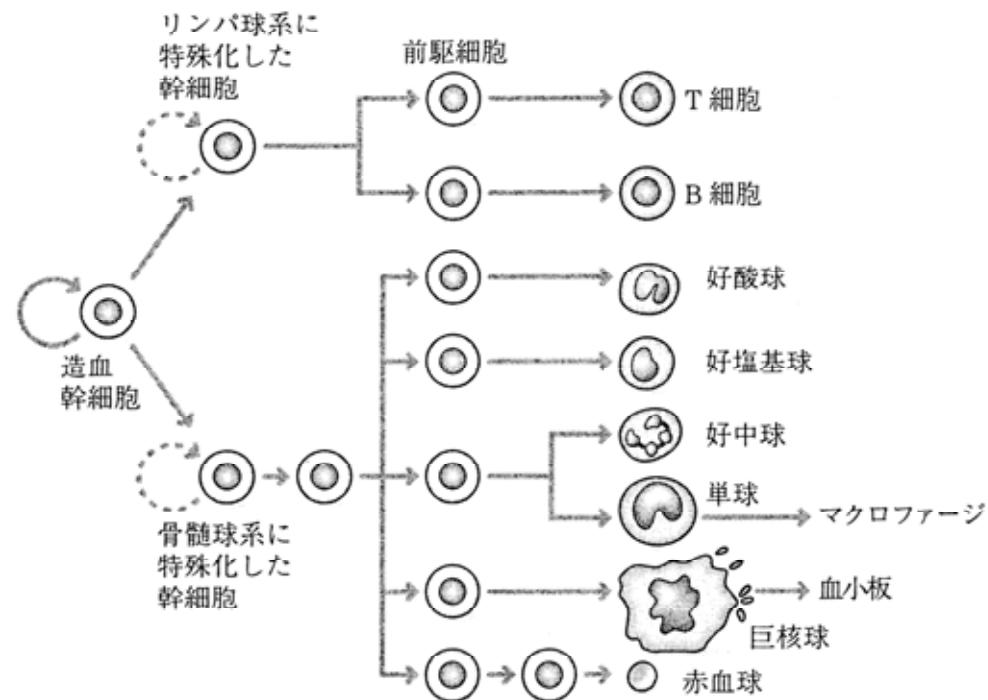
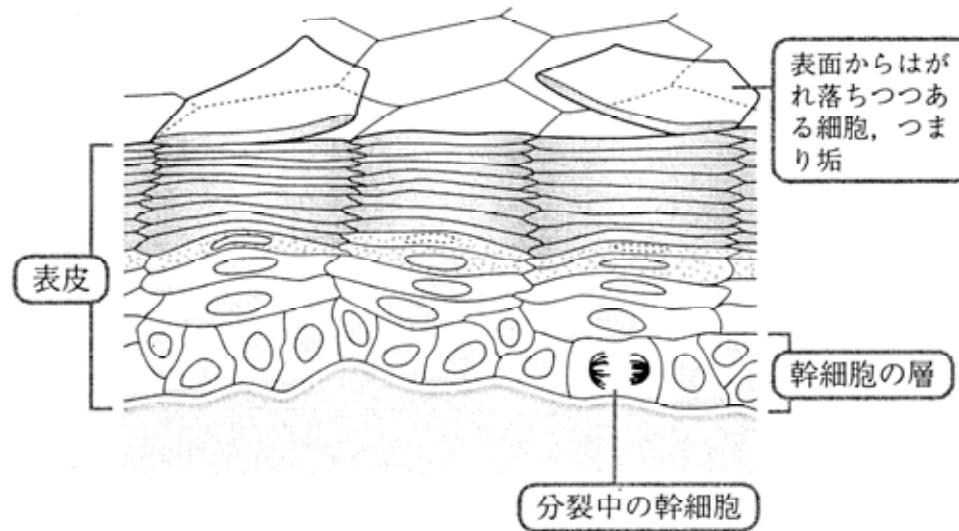


図2 組織幹細胞の例. 皮膚の幹細胞(上)と造血幹細胞(下)

幹細胞の種類と特徴

多能性幹細胞 Pluripotent Stem Cell

- ・ES細胞(胚性幹細胞) Embryonic Stem Cell
初期胚由来 分化能:高 増殖能:無制限
- ・EG細胞 Embryonic Germ Cell
胎児生殖細胞由来 分化能:高 増殖能:無制限
- ・mGS細胞 Multipotent Germ Stem Cell
新生児精巣内生殖細胞由来 分化能:高 增殖能:高 or 無制限
- ・iPS細胞(体細胞を遺伝子導入で再プログラム化した細胞株)

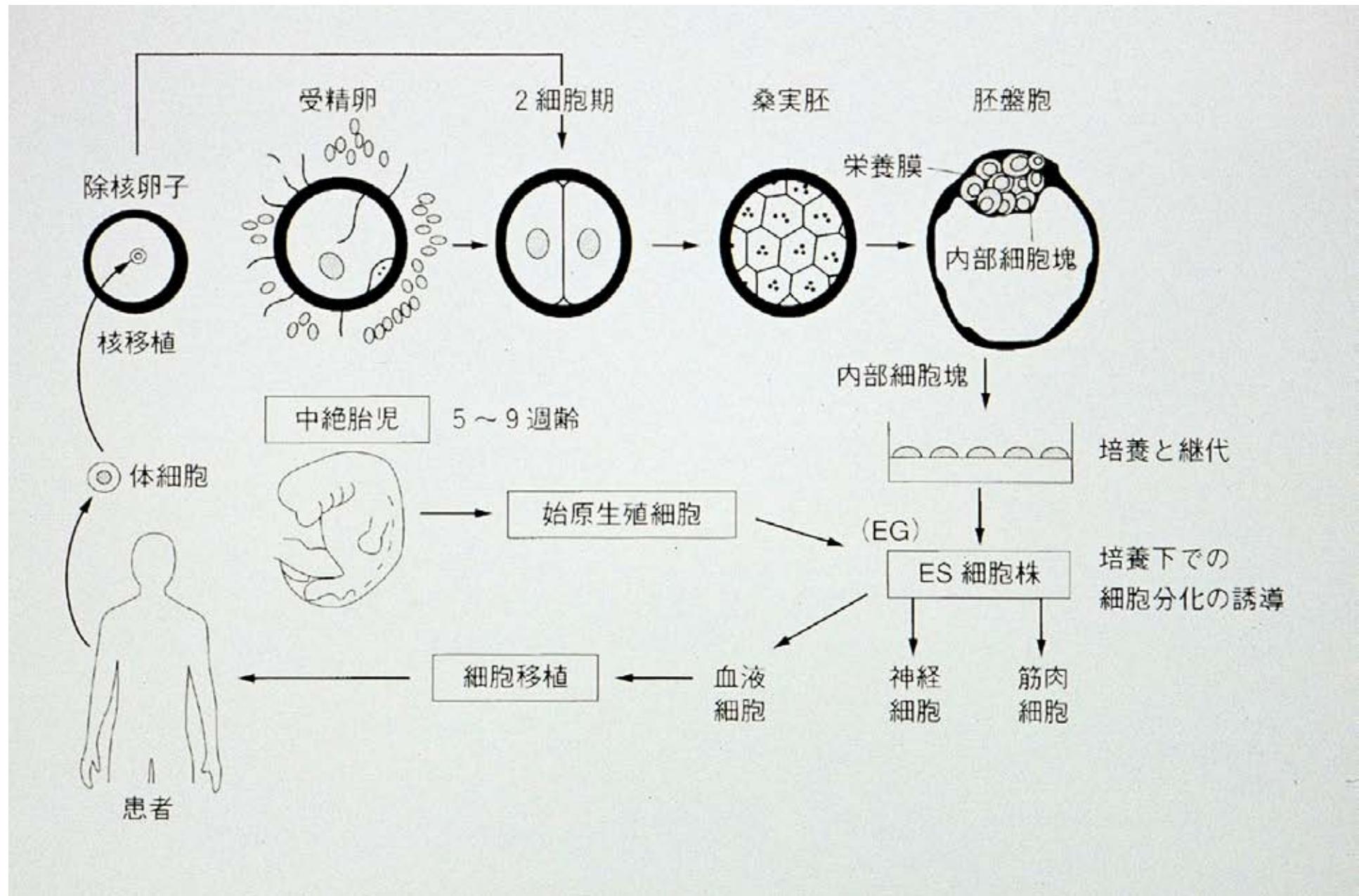
組織幹細胞 Tissue Stem Cell(体性幹細胞 Somatic Stem Cell)

造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞など

- ・(胎児)組織幹細胞
中絶胎児由来 分化能:中 増殖能:中
- ・(成体)組織幹細胞(成体幹細胞 Adult Stem Cell)
成人由来(一部は生体から採取可能)
分化能:低～中 増殖能:低～中

多能性に近い特性をもつ成体組織幹細胞？

成人由来 分化能:高? 増殖能:高?(再現性確認が困難)



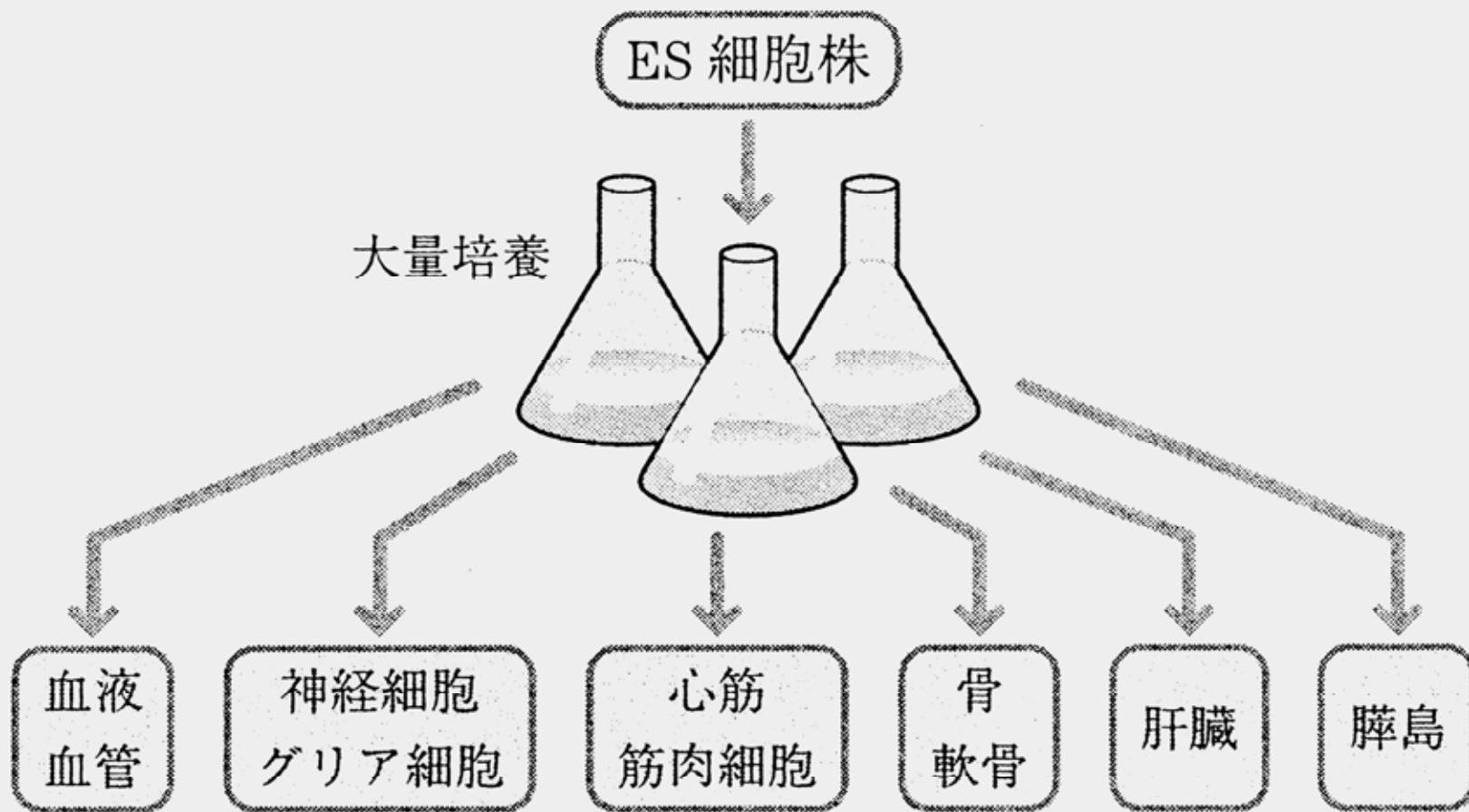


図4 ES 細胞から多種類の細胞を供給する

表2 マウスES細胞から分化させることのできる細胞種

可能な細胞種	対応する疾患
ドーパミン産生ニューロン	パーキンソン病
運動ニューロン	脊髄損傷
心筋細胞	心筋梗塞, 心筋症
グリア細胞	脱髓疾患
インスリン産生細胞	糖尿病
肝細胞	肝代謝障害, 肝硬変
血管内皮細胞	動脈硬化症
骨細胞, 破骨細胞	骨腫瘍, 外傷による骨欠損, 骨粗鬆症
筋芽細胞	筋ジストロフィー症
血液幹細胞	白血病
表皮細胞	熱傷などによる皮膚欠損

ES細胞株の特性

- (1)長期間の細胞増殖を、正常な性質を保持したまま無制限に維持できる細胞株である
- (2)組織・臓器を構成するほぼ全ての種類の細胞に分化できる多能性をもっている

ヒトES細胞株の重要性

- (1) 細胞治療に用いるために必要な機能をもつ細胞の供給
- (2) 組織工学による人工組織・臓器作製のための多種類細胞材料の供給
- (3) 基礎研究や創薬研究に必要なヒト細胞の供給

ES細胞が組織幹細胞に比較して有利な特質 「多分化能」

- 胚と胎児の発生初期に作られる細胞種など、成体内で組織幹細胞や前駆細胞から補充されることがない(起きにくい)細胞へ分化させることが可能である
- 神経細胞の中で初期に分化するもの:ドーパミン神経、運動神経、感覚神経など、細胞治療に必要な神経細胞
- 心筋細胞、インスリン分泌細胞
- 多種類の組織幹細胞を必要なだけ作り出して利用することも可能になる。神経系幹細胞、間葉系幹細胞、造血系幹細胞など増殖能が限られている組織幹細胞を大量に供給することができる

ES細胞だけがもつ優れた特質 「特性変化なしの無限増殖能」

- 速い細胞増殖を長期間(無制限に)維持できるとともに、多分化能などの性質が保持されることによって:
- 多様な遺伝子改変を加えることが可能(目的に応じて安全性や治療効果を高めることができる)
- 同一特性をもつ細胞集団(改良・選択した細胞株のサブラインなど、凍結保存も可能)について、細胞機能や安全性などを十分に検証したのち使用することができる
- 一定の特性と品質をもつ細胞を大量に供給することができる
- 細胞供給を安定標準化することによって、細胞治療という先端医療を一般医療として普及させることができるものになるだろう

ES細胞を使った細胞治療を目指す研究の現状

- パーキンソン病

ヒトやサルES細胞からドーパミン神経への分化誘導

ヒトやサルES細胞からのドパミン神経細胞を疾患モデル動物へ移植する前臨床研究
により病態改善、腫瘍形成なし、など良い結果

- 脊髄損傷

ヒトやサルES細胞から神経幹細胞／前駆細胞、運動神経、グリア細胞などへの分化誘導
グリア細胞や神経前駆細胞の疾患モデル動物への移植による治療効果の報告

- 加齢黄斑変性、網膜色素変性など眼科疾患

ヒトやサルES細胞から網膜細胞への分化誘導

ヒトやサルES細胞からの網膜細胞を疾患モデル動物へ移植して病態改善

- 心筋梗塞

ヒトやサルES細胞から心筋細胞への分化効率を上げる研究が進行中

疾患モデル動物への細胞移植では心筋組織に取り込まれて心筋機能が向上

- 糖尿病

ES細胞からインスリン分泌細胞への分化誘導の研究は進行中

カリフォルニア州のベンチャーがヒトES細胞から膵島細胞への分化に成功(今度は本当らしい)
透過性膜カプセル中に封入して移植すれば免疫拒絶の回避が可能かもしれない

- 肝硬変など

ES細胞から肝細胞への分化誘導の研究は進行中

J. Clin. Invest. 115:102-109 (2005)

Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model

Yasushi Takagi^{1,2}, Jun Takahashi¹, Hidemoto Saiki³, Asuka Morizane¹, Takuya Hayashi⁴, Yo Kishi¹, Hitoshi Fukuda¹, Yo Okamoto¹, Masaomi Koyanagi¹, Makoto Ideguchi¹, Hideki Hayashi¹, Takayuki Imazato¹, Hiroshi Kawasaki⁵, Hirofumi Suemori⁶, Shigeki Omachi⁷, Hidehiko Iida⁴, Nobuyuki Itoh⁷, Norio Nakatsuji⁶, Yoshiki Sasai^{2,5} and Nobuo Hashimoto¹

1 Department of Neurosurgery, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan.

2 Organogenesis and Neurogenesis Group, Center for Developmental Biology, RIKEN, Kobe, Japan.

3 Department of Neurology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan.

4 Department of Experimental Radiology, National Cardiovascular Center, Osaka, Japan.

5 Department of Medical Embryology and Neurobiology and

6 Department of Development and Differentiation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan.

7 Department of Genetic Biochemistry, Kyoto University Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto, Japan.

Address correspondence to: Jun Takahashi, Department of Neurosurgery, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto 606-8507, Japan.

パーキンソン病とは

40歳以後、特に50～60歳代に症状が出始める。

典型的な症状は、振戦（ふるえ）、筋固縮、動作減少、姿勢反射（倒れやすい）など。

人口10万人あたり50～100人（65歳以上では約200人）
現在、日本では約12万人の患者さんがいる。

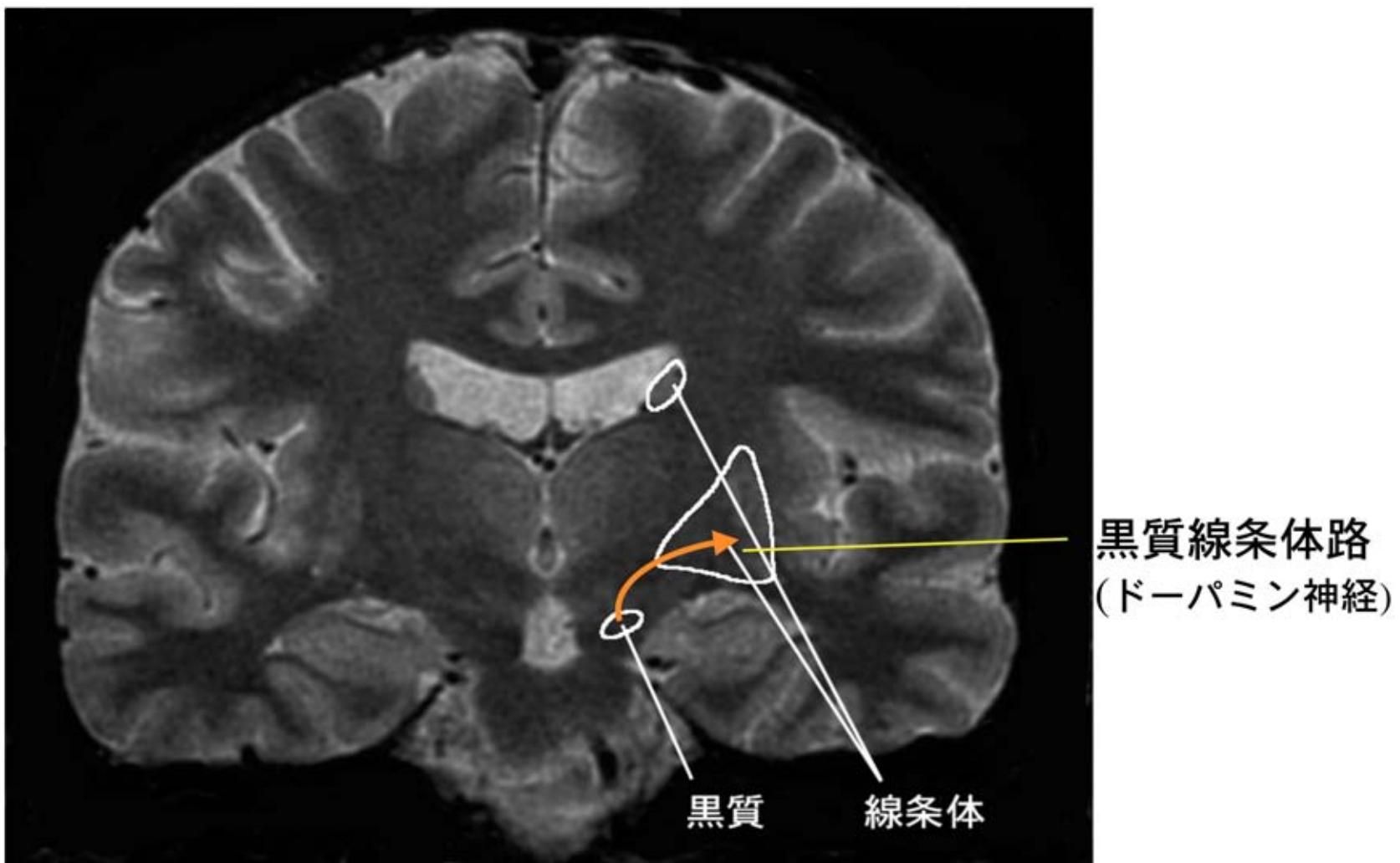
人口10万人あたりの有病率：

糖尿病＝400人、脳血管障害＝280人、
虚血性心疾患＝100人、悪性新生物＝80人

（国立療養所神経筋難病情報サービスより）

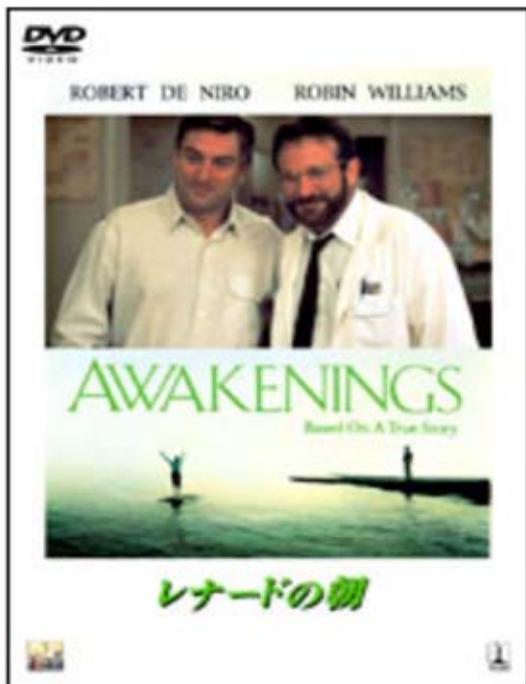
原因

黒質の神経細胞が変性して線状体のドーパミンが減少



パーキンソン病の治療

1) 薬物治療



ドーパミン前駆体 (Lドーパ)
DA受容体刺激薬
DA放出促進薬
中枢性抗コリン薬
ノルアドレナリン前駆体

2) 外科治療

破壊術 (視床、淡蒼球)
脳深部刺激療法 (視床下核)

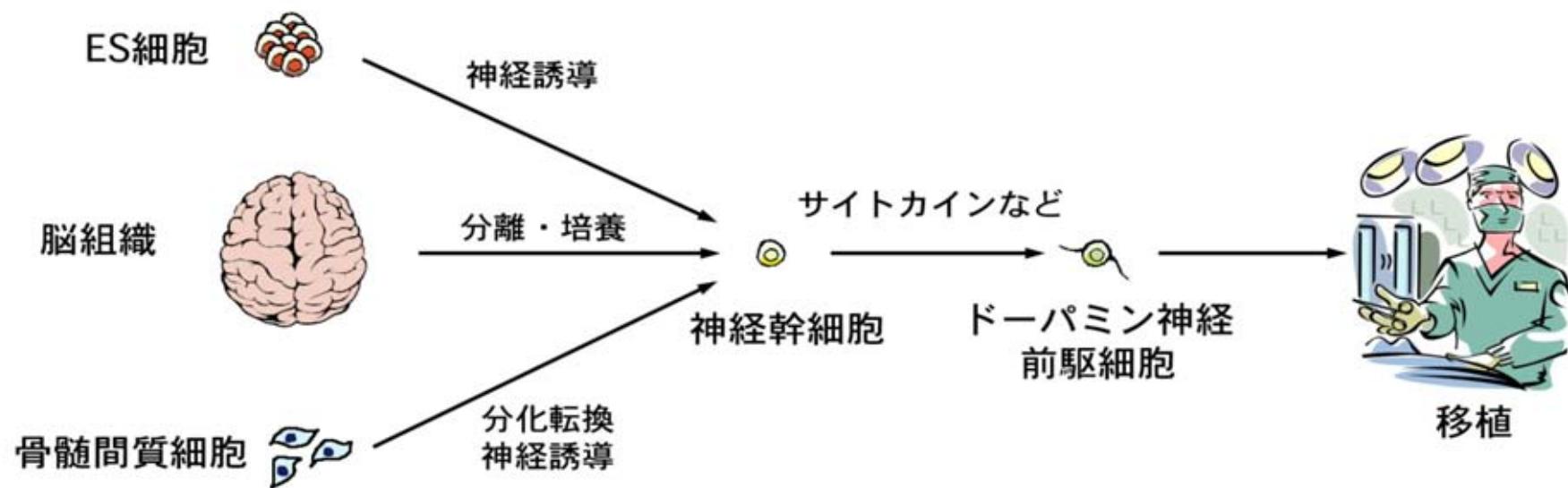
胎児中脳黒質細胞移植

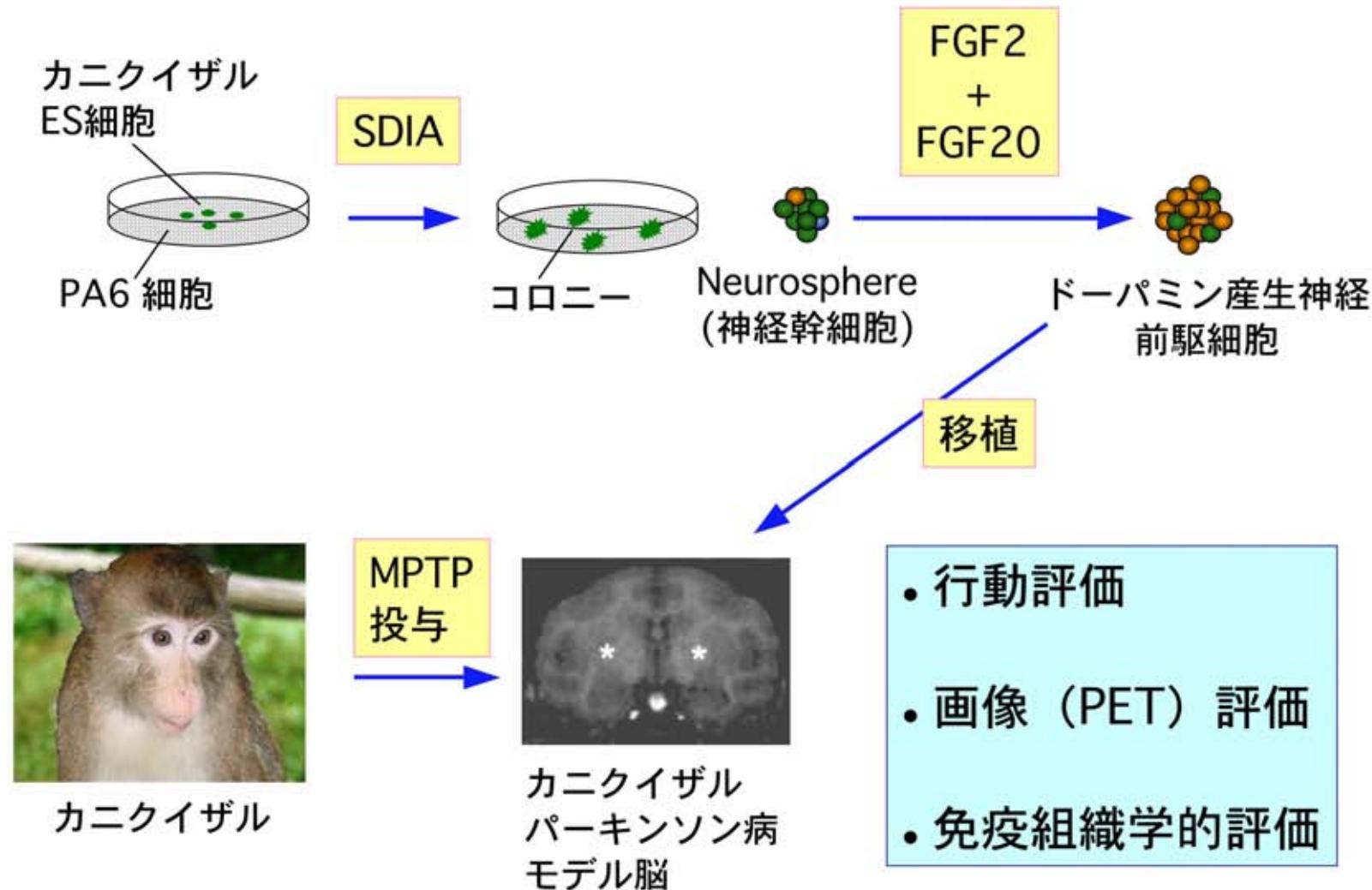
40人（34－75歳）及び34人（30－75歳）
を対象とした二重盲検臨床試験（1－2年）の結果。

- 1) 全体としては、有意な移植効果は認められなかった。
- 2) 中・軽症例に胎児4体分の細胞を移植した場合に
有意な症状の改善がみられた。
- 3) 画像所見、死後脳の検索で、細胞の生着が確認された。
- 4) 15－56%の患者で不随意運動の副作用がみられた。

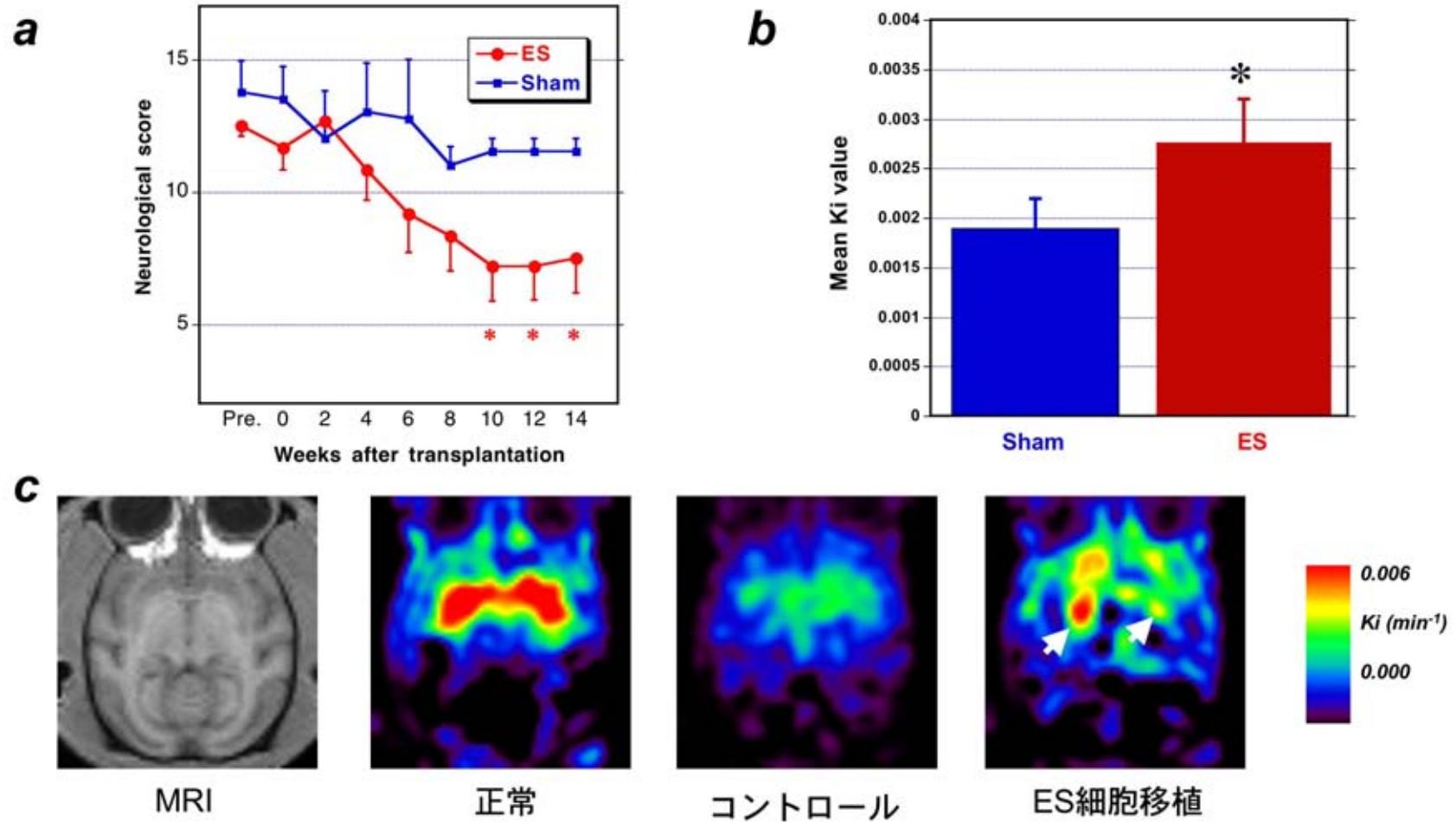
- 1) Freed CR, et al. N Engl J Med 2001; 344 : 710-719.
- 2) Olanow CW, et al. Ann Neurol 2003; 54 : 403-414.

幹細胞移植





移植後約3か月で神経症状の有意な改善と
フルオロドーパの取り込み上昇がみられた



移植細胞数 : 30 - 60 万 / 側

BrdU-陽性細胞数 : 約 8000 / 側

→ 細胞生着率 : $8000/40\text{万} = 2\%$

TH陽性細胞数 : 2120 / 側

神経症状改善は約 3 か月後からみられた

過去の胎児中脳黒質細胞移植の結果:

症状改善に必要な TH 陽性細胞数 = 2.5 - 10 万 / 側

線状体の体積比 = 10:1 → 2500 - 10,000 / 側

神経症状改善は約 4 か月後からみられた

(Freed et al. NEJM 2001)

Establishment and Characterization of Human ES Cell Lines

ヒトES細胞株の樹立と特性解析





ヒト凍結胚の解凍と培養

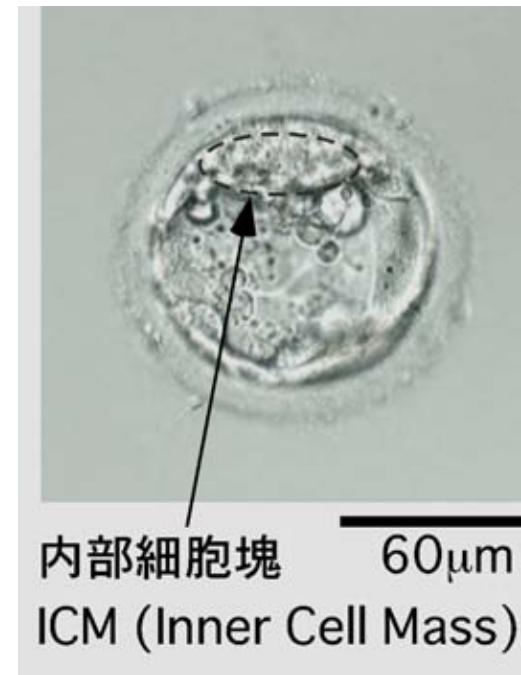
解凍直後



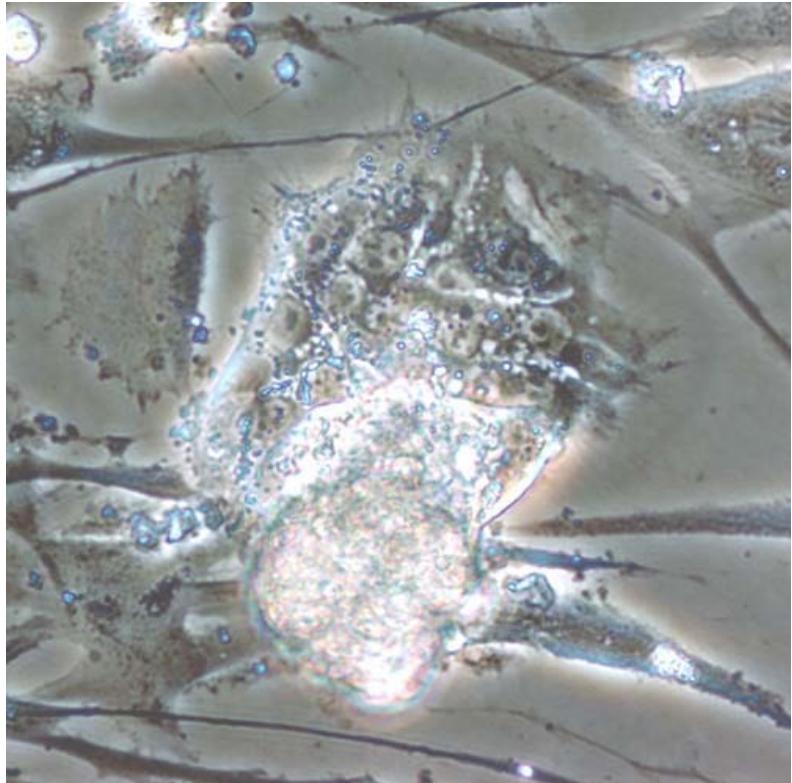
培養 3 日目



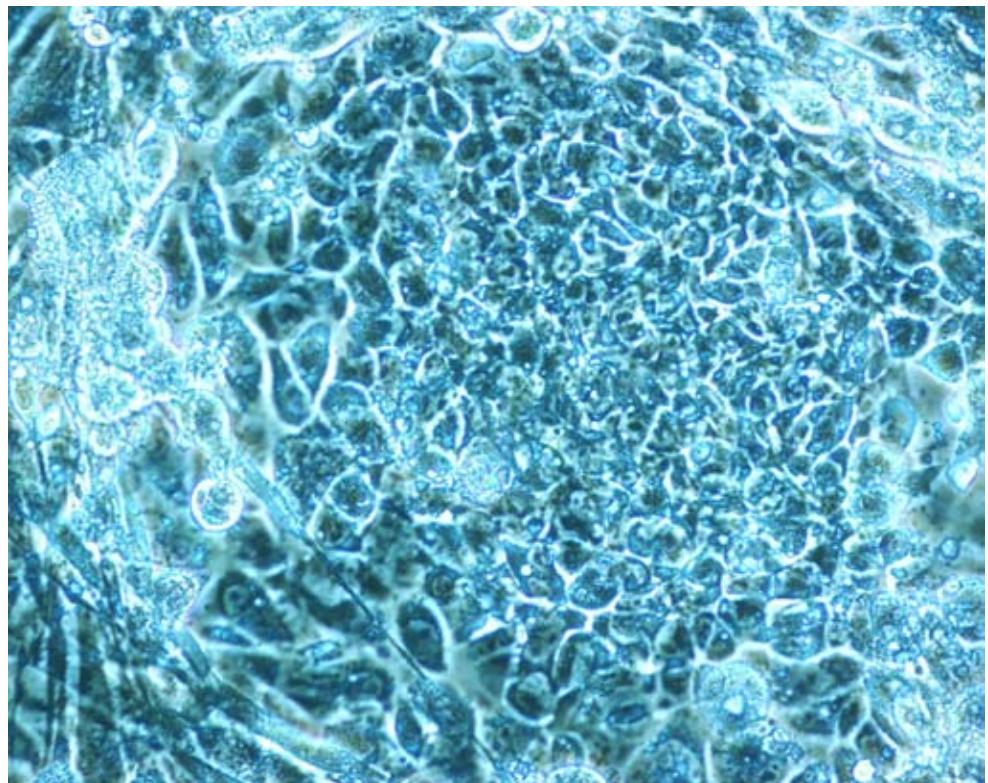
胚盤胞



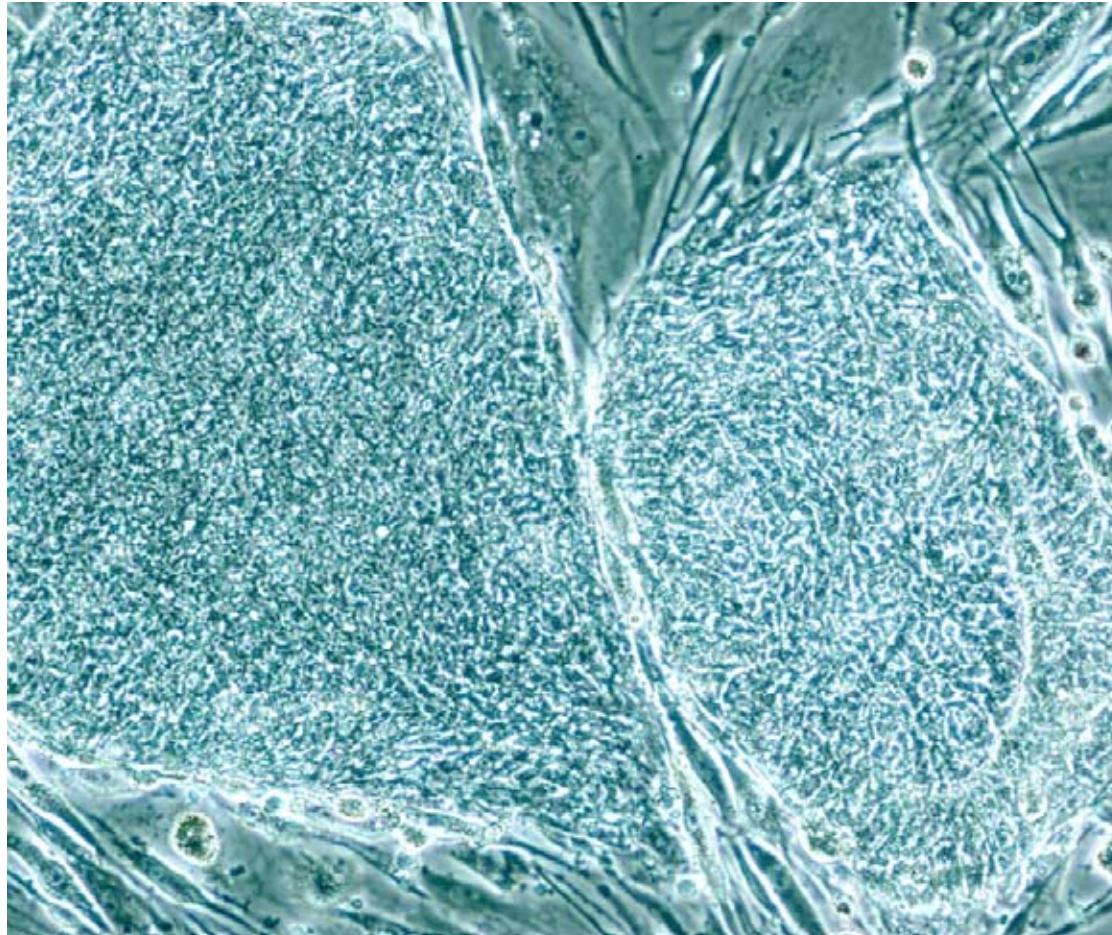
Day 1 ICM
Attachment on Feeder layer



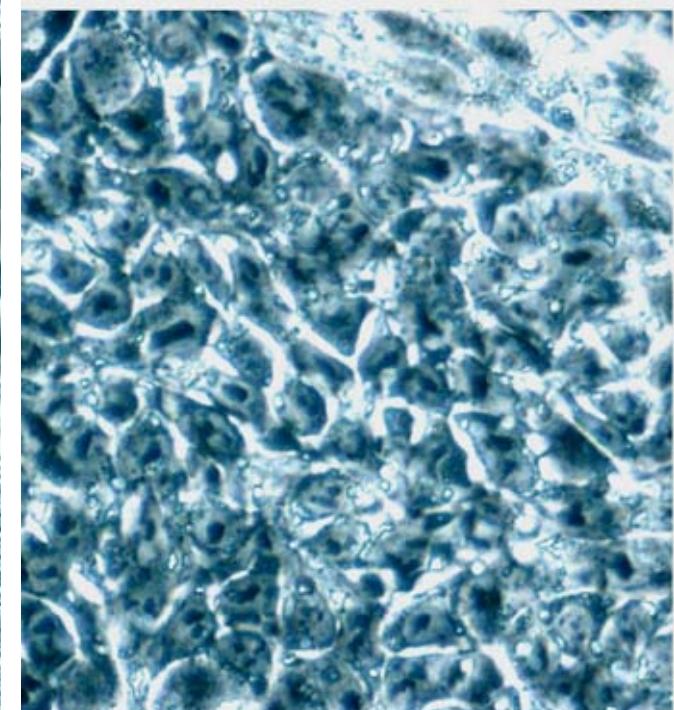
Day 9 ICM
Growing on Feeder layer



2003年5月に、国内で初めて樹立されたヒトES細胞株
KhES-1



275μm

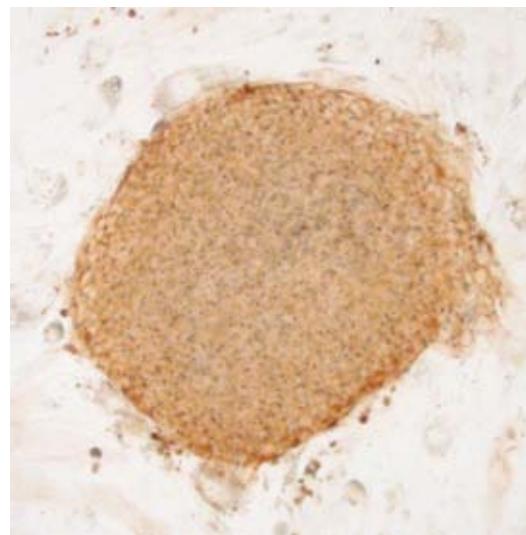


70μm

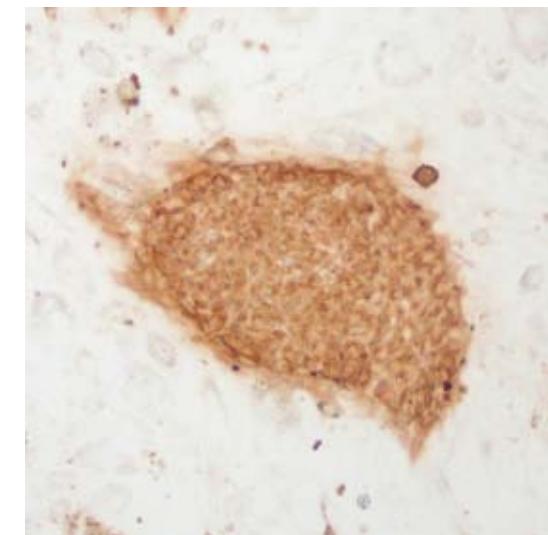
ALP



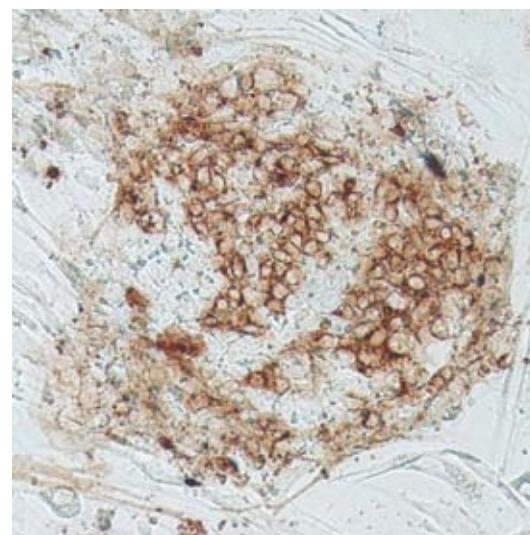
SSEA-4



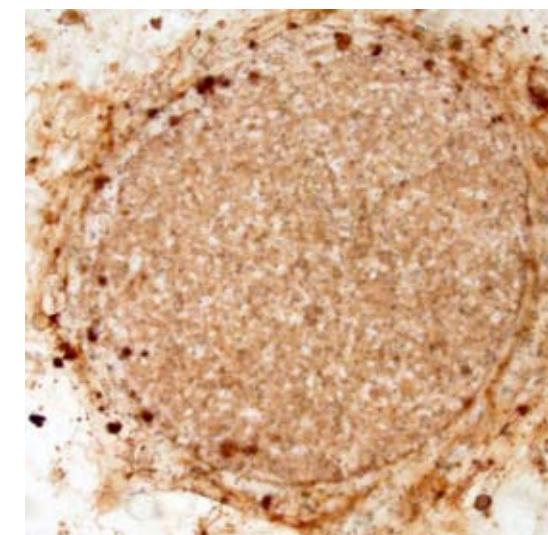
TRA-1-60



SSEA-3

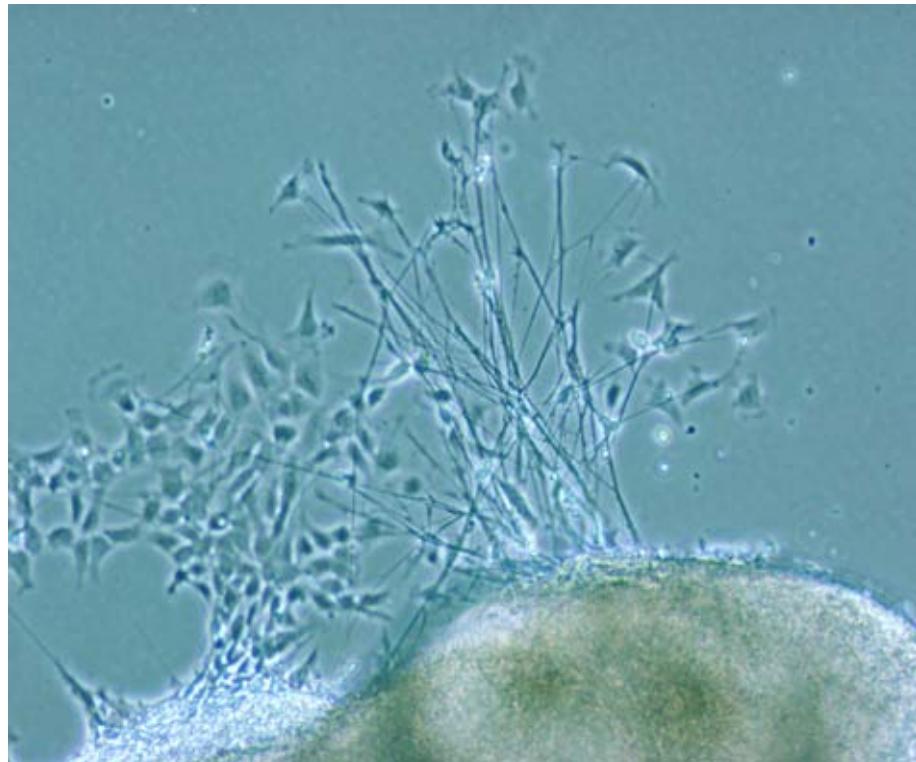


TRA-1-81

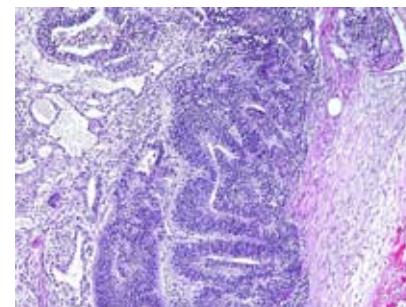
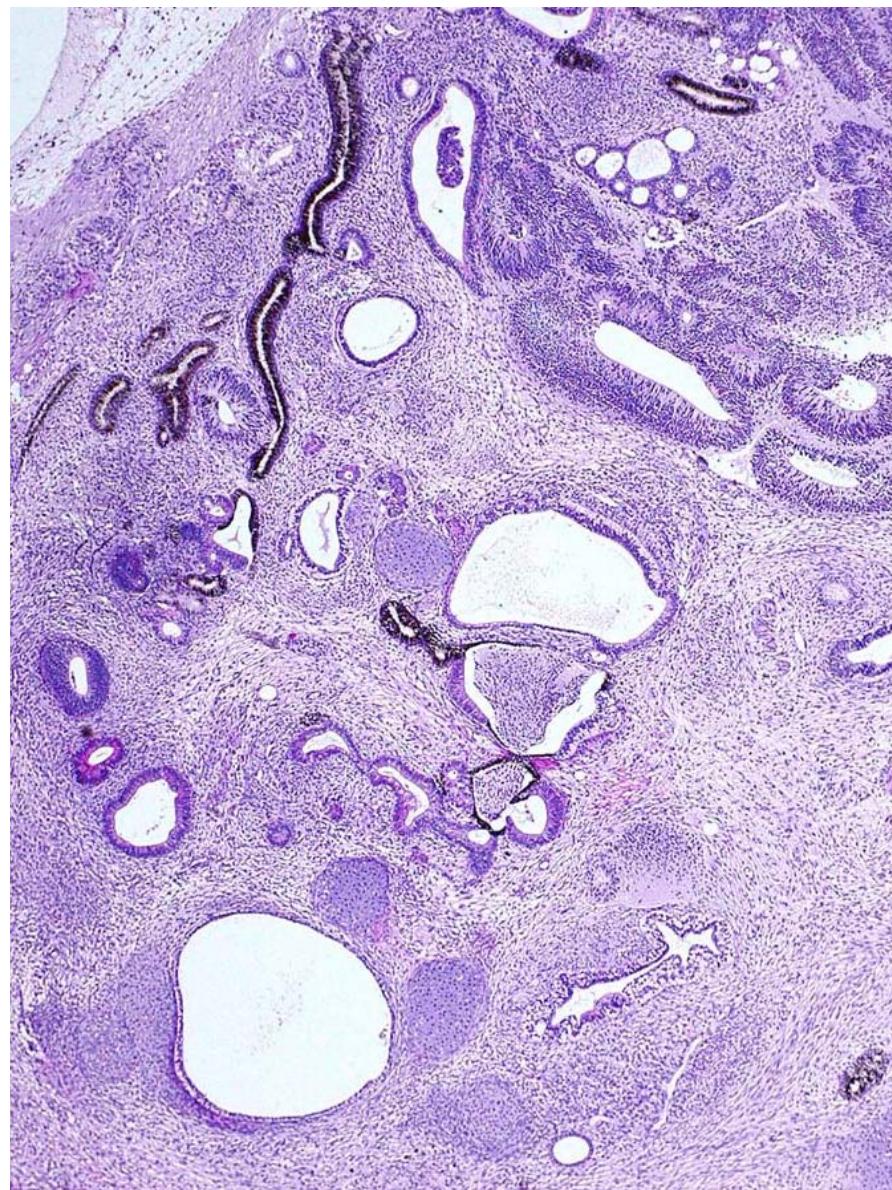


ヒトES細胞における特異的マーカー分子の発現

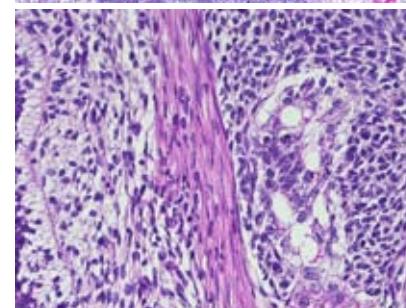
ヒトES細胞を培養下で分化誘導することによって作られた神経細胞



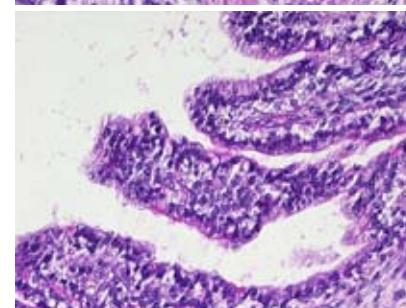
ヒトES細胞をSCIDマウスに移植後、増殖分化して形成した良性腫瘍テラトーマ



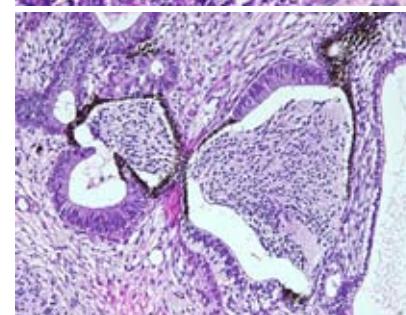
神経上皮



骨格筋

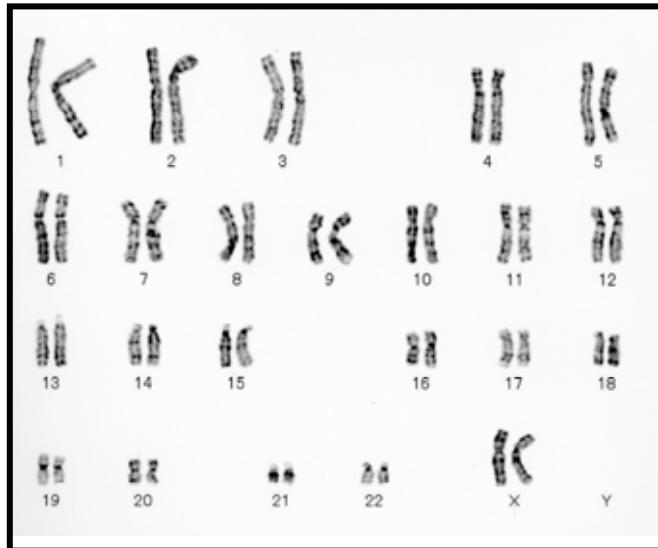


消化管様上皮

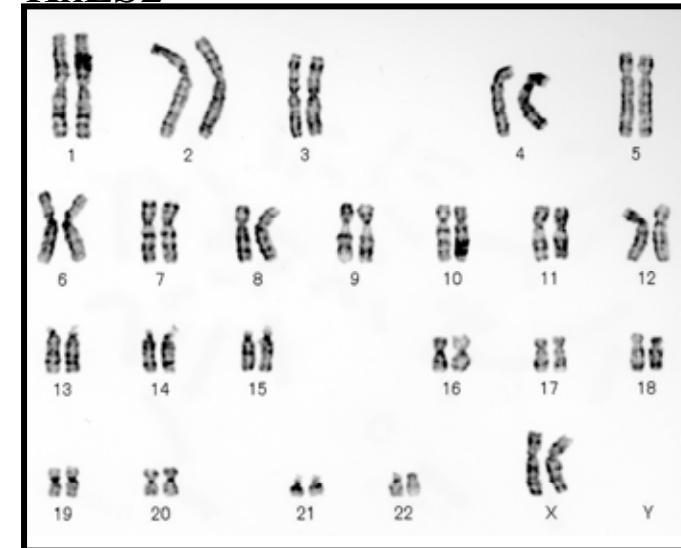


色素細胞

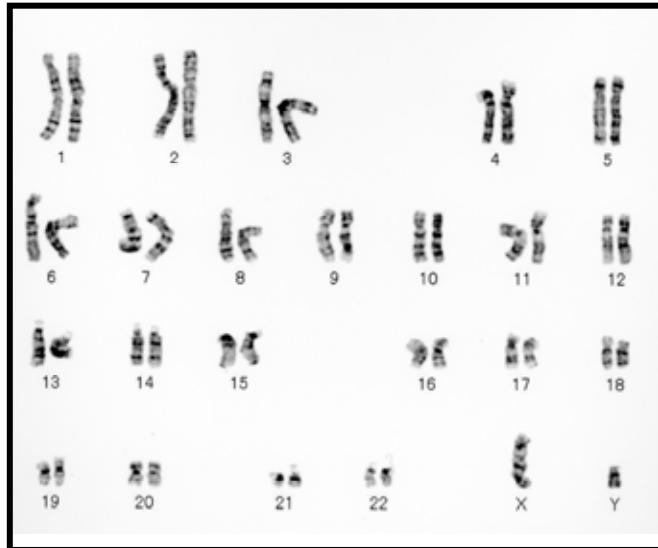
KhES1



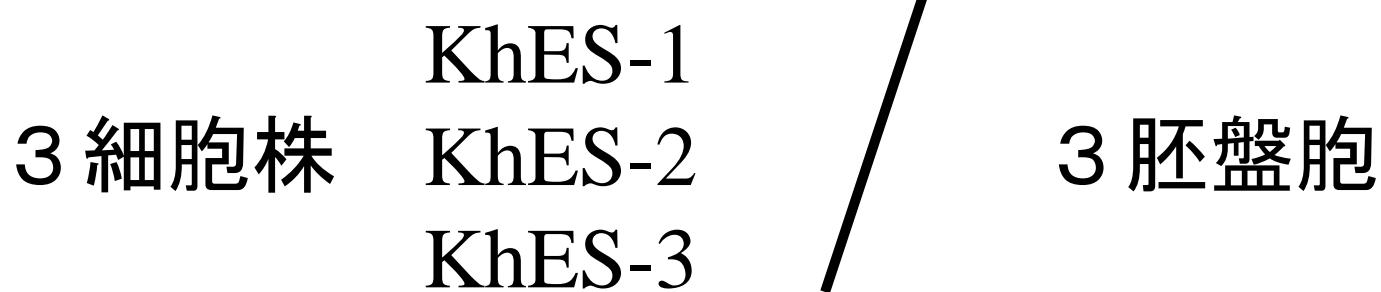
KhES2



KhES3



これまでに樹立したヒトES細胞株



ナショナルプロジェクトのES細胞バイオリソースセンターとして全国の使用機関へのヒトES細胞の分配を行っている

ES細胞のバイオリソース事業

ヒトES細胞株の樹立と特性解析（増殖能・安定性・多分化能・核型など）、凍結保存

- ES細胞の使用機関への分配
- 使用者に対する培養技術の研修
- 培養法（培地、フィーダー細胞）
- 繼代法（細胞解離液）
- 凍結保存法（凍結保護液）

今後加わる内容

- 公的細胞バンクとの連携
- 使用機関などが作成した改変（加工）ES細胞の寄託とバンク事業

ES細胞のバイオリソース事業

ES細胞分配同意書（MTA）の内容

（ヒトES細胞の情報公開HPに掲載）

- ・ 分配されたES細胞を使って得られた研究成果については権利の共有を主張しない
- ・ 使用ルールからの逸脱を防ぐために、細胞自体については所有権移転をしない（加工細胞は共有になる）
- ・ 使用機関が分配を申請するためには、使用計画について文部科学大臣の確認を受けることが必要

ES細胞の臨床応用に必要な樹立培養法の改良

- 無血清培地から完全合成培地へ
 - ・すでに血清添加しない培地で樹立・増殖維持されている
 - ・動物蛋白質などを含まない完全合成培地の開発が進んでいる。動物成分なしの培地で樹立維持に成功したとの論文が複数発表されている
- フィーダー細胞
 - ・すでにヒト細胞を用いた樹立と増殖維持が成功している
 - ・フィーダー細胞を使わない培養維持方法の開発は進行中であるが、樹立維持に成功したとの論文が複数発表されている
- 臨床応用に適合した品質保証
 - ・GMP基準に適合した施設での樹立・増殖維持と供給体制の構築が必要
 - ・品質管理の基準やプロトコルなど品質保証システムの確立が必要
微生物汚染の検査、核型検定(染色体異常の検査)、多分化能の検定、
発現遺伝子などのプロファイリング
 - ・国際的な特性解析と比較検討が進行中 (**International Stem Cell Initiative**)

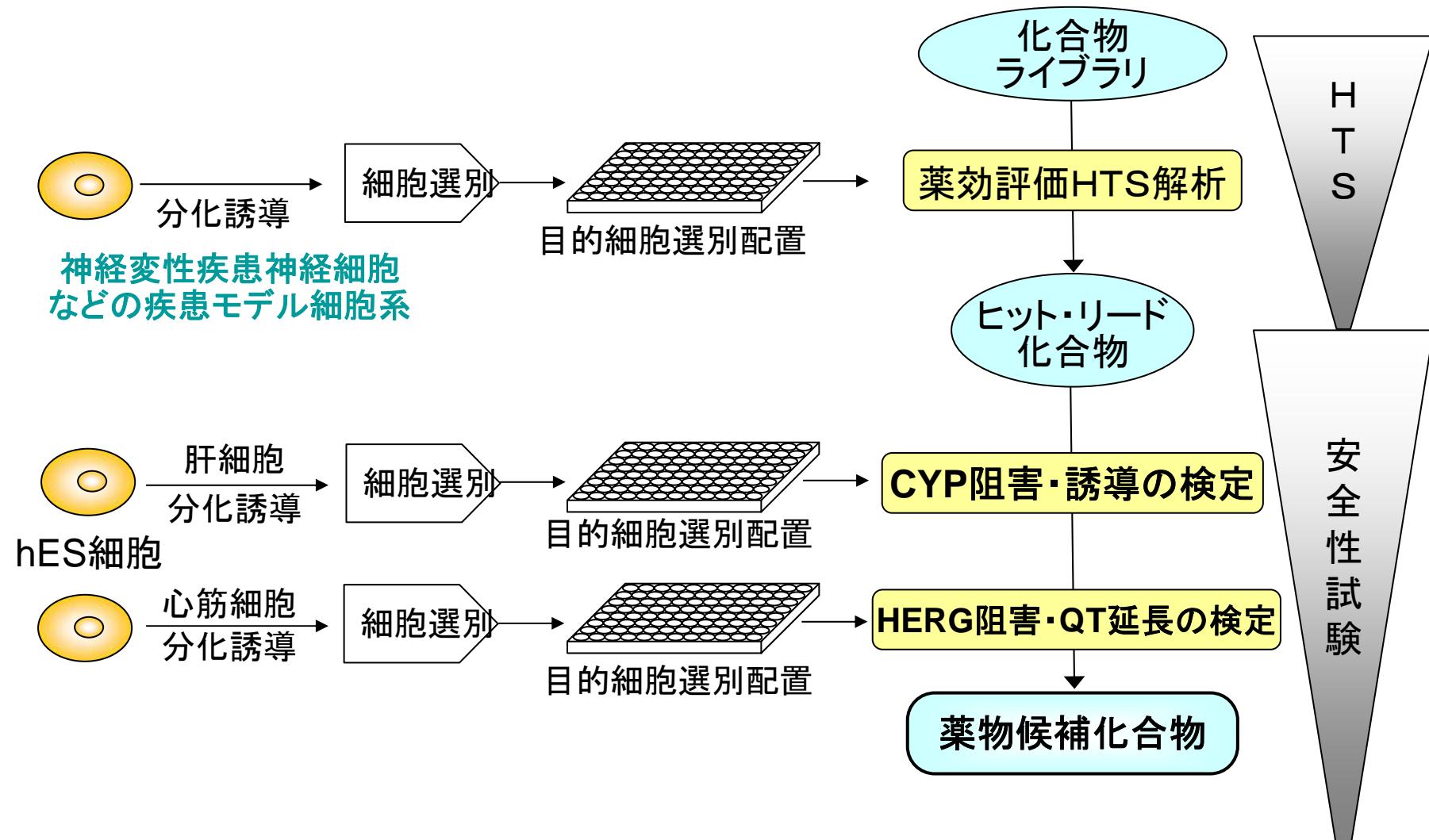
ヒトES細胞株の創薬研究における重要性

創薬研究に必要な多種類ヒト組織細胞の大量供給

- ・均一な特性(ゲノム)をもつヒト細胞
- ・外来遺伝子ベクターを組み込んだヒト細胞
- ・内在遺伝子を改変したヒト細胞(疾患モデルヒト細胞)
- ・各種細胞内活性を検出するレポーター遺伝子導入ヒト細胞
- ・各種ヒトモデル細胞への薬物効果と生理活性のアッセイ系
- ・ヒト細胞(肝細胞や心筋細胞)を使った安全性試験
- ・各種神経細胞、心筋、網膜細胞、皮膚、軟骨、脂肪細胞
- ・肝細胞、膵島細胞

細胞モデルを用いたスクリーニング系

- ・新薬探索(疾患モデル細胞を用いた化合物のハイスループットスクリーニング)
- ・薬物安全性試験(肝細胞・心筋細胞へ分化誘導した細胞を利用)



ヒトES細胞株の遺伝子改変の意義

利用目的に最適となるよう遺伝子改変したヒト細胞の作出と供給

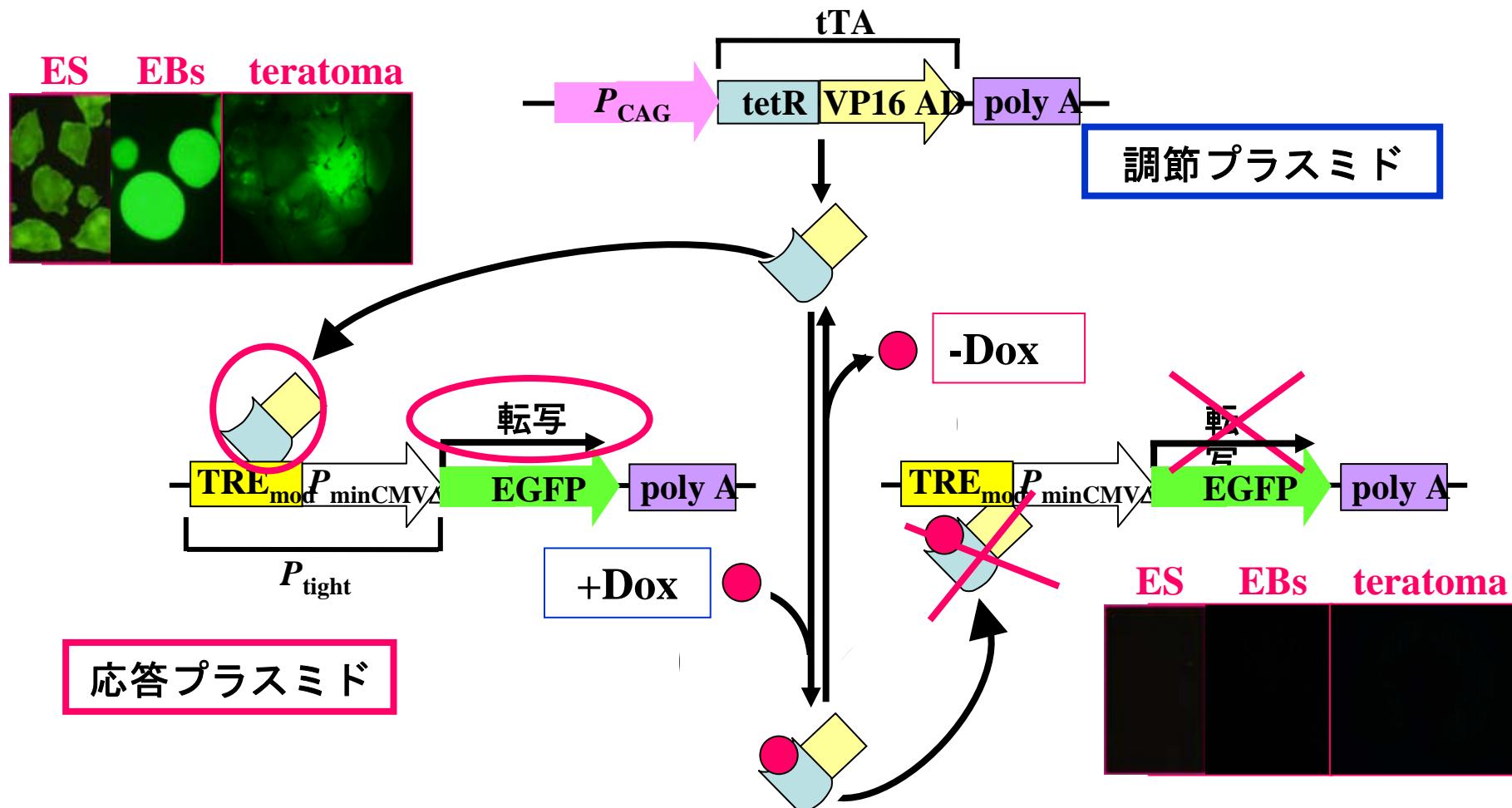
外来遺伝子ベクターを組み込んだヒトES細胞

- ・強制発現ベクター・ドミナントネガティブベクター・RNA干渉ベクターなどによる遺伝子機能の改変や疾患モデル細胞の作成
- ・各種細胞内活性を検出するレポーター遺伝子の組込み
- ・薬物により細胞増殖を制御できる安全装置ベクターの組込み

相同組換えにより内在遺伝子を改変したヒトES細胞

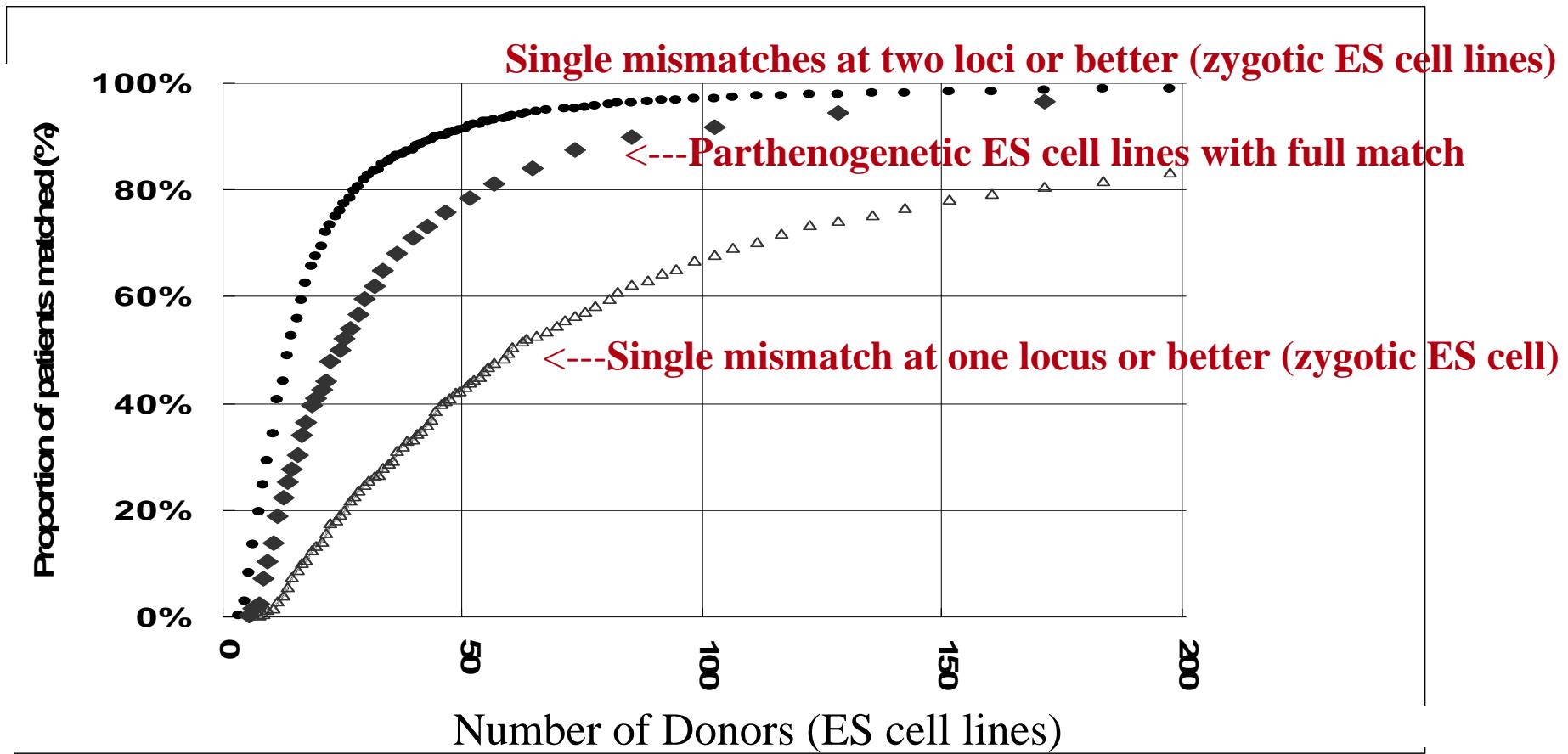
- ・遺伝子ノックアウトによる疾患モデルヒト細胞の作成と創薬スクリーニングへの利用
- ・レポーター遺伝子のノックインによる内在遺伝子の活動モニタリング

カニクイザルES細胞株において、ES細胞の性質を保持したまま、未分化状態ならびに分化誘導後にDoxに反応して遺伝子発現を制御できるTet-Off遺伝子発現制御系が確立できた。



ES細胞を使った移植治療において 免疫拒絶を回避する方法の可能性

- A. ES細胞の遺伝子改変による拒絶反応が弱い細胞株の作成（MHC遺伝子の発現抑制など）
- B. 多様なHLAタイプを揃えたES細胞株バンク
- C. ES細胞株特異的な免疫寛容誘導（制御性T細胞、樹状細胞、造血系マイクロキメリズム、etc）
- D. 再プログラム化による患者の体細胞由来多能性幹細胞作成
 - (1) 患者の体細胞核を除核卵子に移植して作ったクローン胚からES細胞株を樹立
 - (2) ES細胞との細胞融合によって患者の体細胞をES様細胞に再プログラム化
 - (3) 再プログラム化遺伝子導入による体細胞から多能性幹細胞への変換



Cumulative proportion of patients with at least one HLA-matched zygotic or parthenogenetic hES cell line for anticipated cell transplantation therapy. Full or partial matching at HLA-A, -B, and DR loci was calculated in the Japanese population

単為発生胚由来ES細胞から分化した細胞は生体機能を補完できる

- Hematopoietic reconstitution with androgenetic and gynogenetic stem cells

Eckardt, S., Leu, A., Bradley, H. L., Kato, H., Bunting, K. D. and McLaughlin, K. J.

Genes and Development 21, 409-419
(March 2007)

ES細胞を使った移植治療において 免疫拒絶を回避する方法の可能性

- A. ES細胞の遺伝子改変による拒絶反応が弱い細胞株の作成（MHC遺伝子の発現抑制など）
- B. 多様なHLAタイプを揃えたES細胞株バンク
- C. ES細胞株特異的な免疫寛容誘導（制御性T細胞、樹状細胞、造血系マイクロキメリズム、etc）
- D. 再プログラム化による患者の体細胞由来多能性幹細胞作成
 - (1) 患者の体細胞核を除核卵子に移植して作ったクローン胚からES細胞株を樹立
 - (2) ES細胞との細胞融合によって患者の体細胞をES様細胞に再プログラム化
 - (3) 再プログラム化遺伝子導入による体細胞から多能性幹細胞への変換

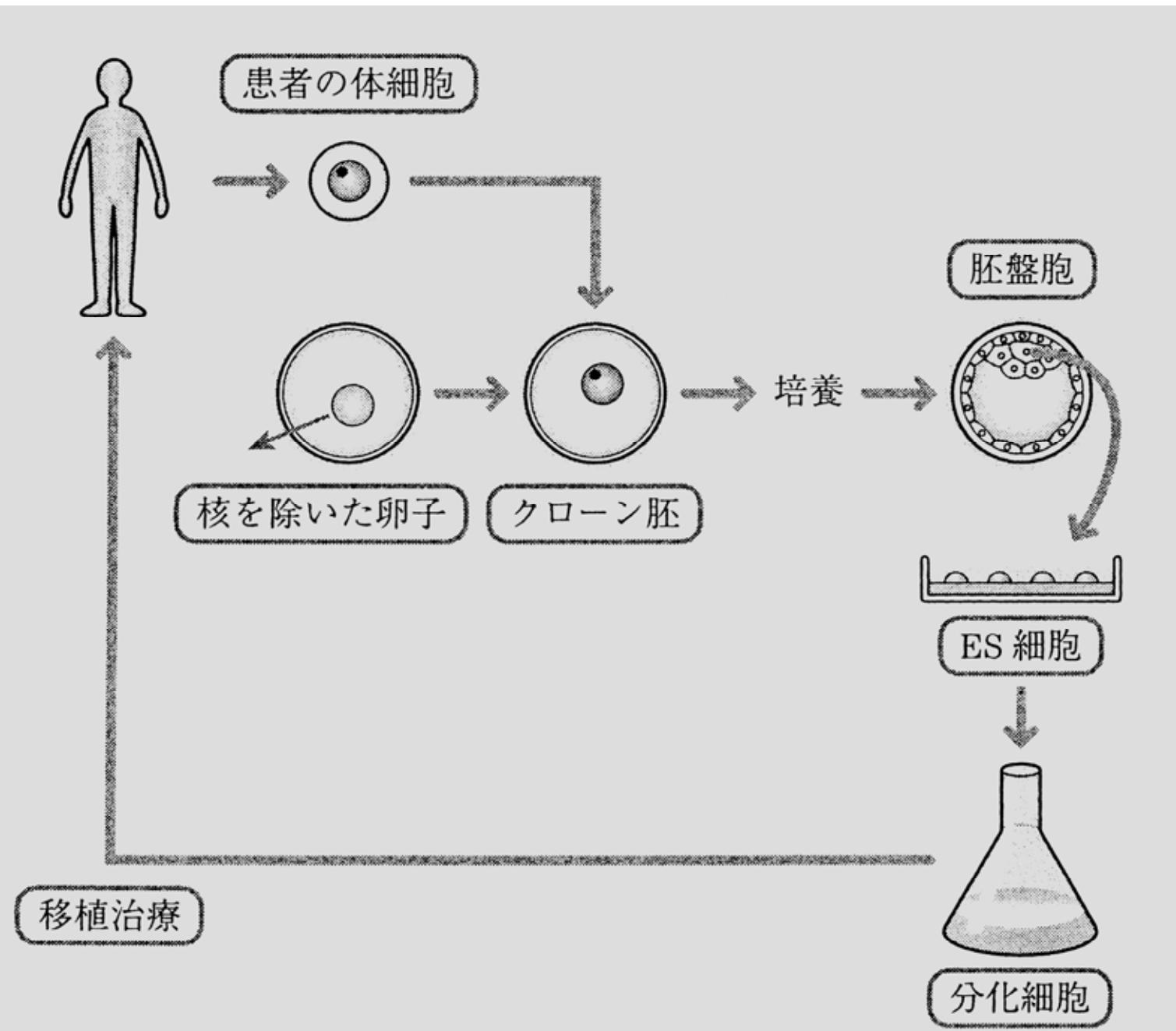
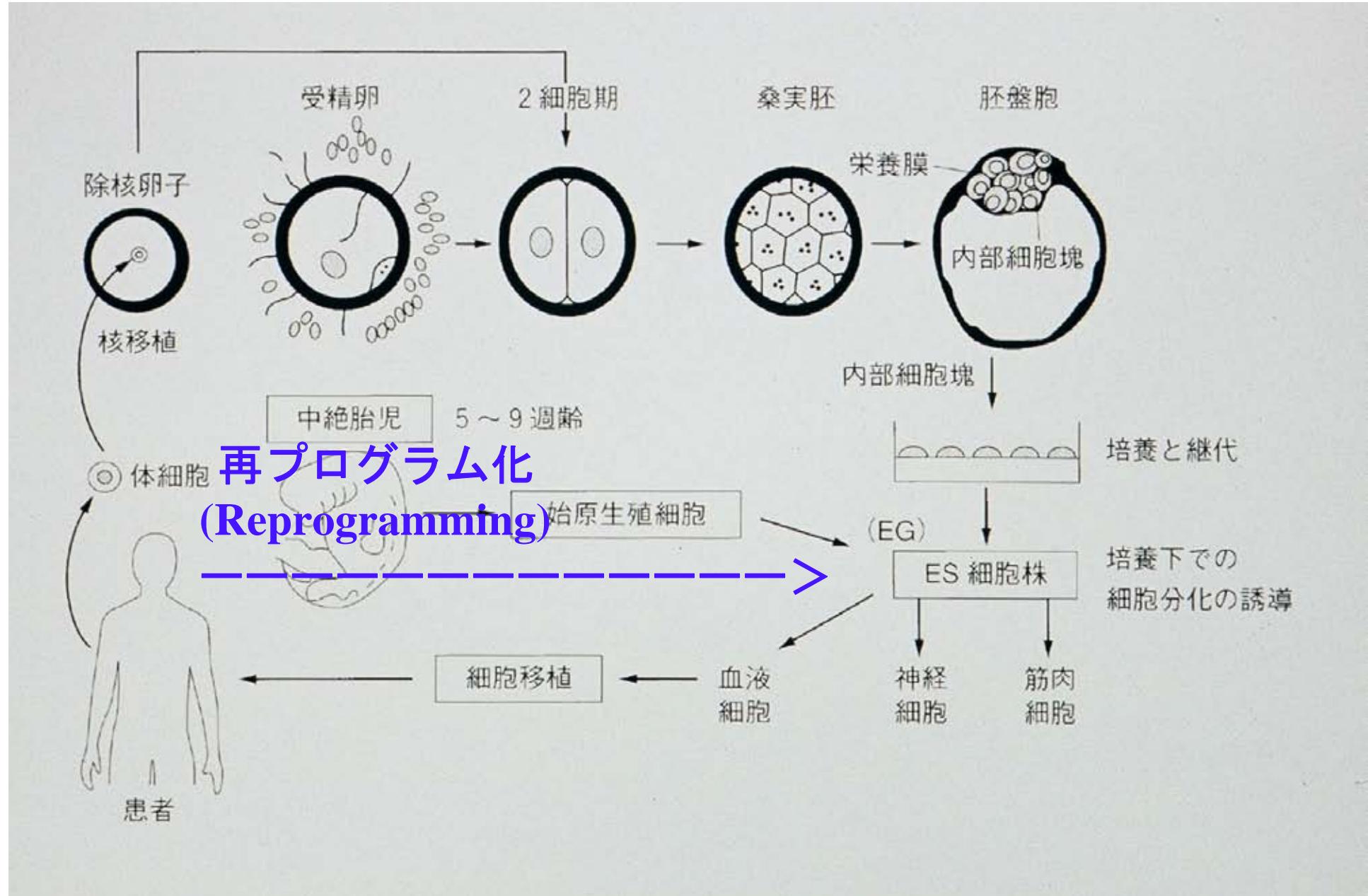


図 15 ヒト クローン胚からの ES 細胞株の樹立と移植治療



ヒトES細胞をもちいた再生医療の将来展望

1. ヒトES細胞株を用いた安定増殖法や分化誘導法などの基礎研究
2. 動物疾患モデルを用いた細胞移植治療の前臨床研究
3. 動物成分不含で完全合成培地による、臨床品質(GMP)ヒトES細胞株の作成
4. 免疫抑制剤を用いた臨床試験開始（急性期脊髄損傷やパーキンソン病から）
5. 拒絶反応の軽減と回避方法の確立
(HLAタイプES細胞株バンク、免疫系細胞並行移植や制御性T細胞による免疫寛容誘導、組織適合抗原の発現抑制、など)
6. ヒト体細胞を試験管内で多能性幹細胞へ再プログラム化する技術の確立
7. 体細胞再プログラム化による多能性幹細胞株の安定性と臨床安全性の保証？
確実に役立つのは、疾患と治療研究のためのモデル細胞としての利用
8. しかしながら、どんな方法を開発しても、患者毎に多能性幹細胞株を樹立して、安定増殖性を確認し、分化誘導条件の再調整をおこない、得られた目的分化細胞の安全性を確認し、これら全てをGMP基準で実施することは、時間的および財政的に実現不可能になる可能性が大きい（富裕層向の医療ビジネスとしては成り立つ可能性があるが、国民医療としては困難）

日本におけるヒトES細胞研究の現状

- 2001年9月 政府指針施行
- 2002年4月 京大再生研の樹立計画承認
- 2003年5月－11月 3株樹立に成功
- 2004年3月 細胞分配を開始

- ヒトES細胞3株(KhES-1, KhES-2, KhES-3) は特性解析を行ったのち、細胞分配を開始している。
- 今回実施した、詳細な特性データの国際比較の結果、標準的な細胞株だった。
- 京大再生研からの細胞分配MTAでは、無償分与、培養方法を教授、研究成果の権利共有も放棄(少なくとも日本国内では)という極めて使いやすい供給体制を確立している。
- 今後少なくとも10株程度の樹立を予定している。
- 京大再生研にES細胞用細胞プロセシングセンターを設置し、GMP基準による臨床応用のための細胞株樹立を計画している。

ヒトES細胞研究の世界の現状

- 世界各国が国家戦略と産業振興を目的に研究を推進、加速している。米国でも消極的な現大統領に反対して、推進する動きがカリフォルニアなど州政府や連邦議会で加速、NIHもヒトES細胞の研究費支出を増加している。
- 知的財産権の観点では、WiCellとGeronが米国のみで確保している基本特許と独占実施権の行方、欧州での特許拒絶など、国際的な特許競争の問題点検討も必要となっている。
- 研究者側は、ヒトES細胞研究の国際的連携とネットワーク作りを進めている
- ISSCI (International Stem Cell Initiative) が各国で樹立された75細胞株の特性解析と比較研究を実施、日本から再生研の3株が参加。
- ISSCR(国際幹細胞学会)が国際委員会を組織して、国際標準的ガイドラインの策定、特性解析等の標準作り、幹細胞バンク間の国際連携、臨床応用のためのGMP基準作り、などを提唱している。

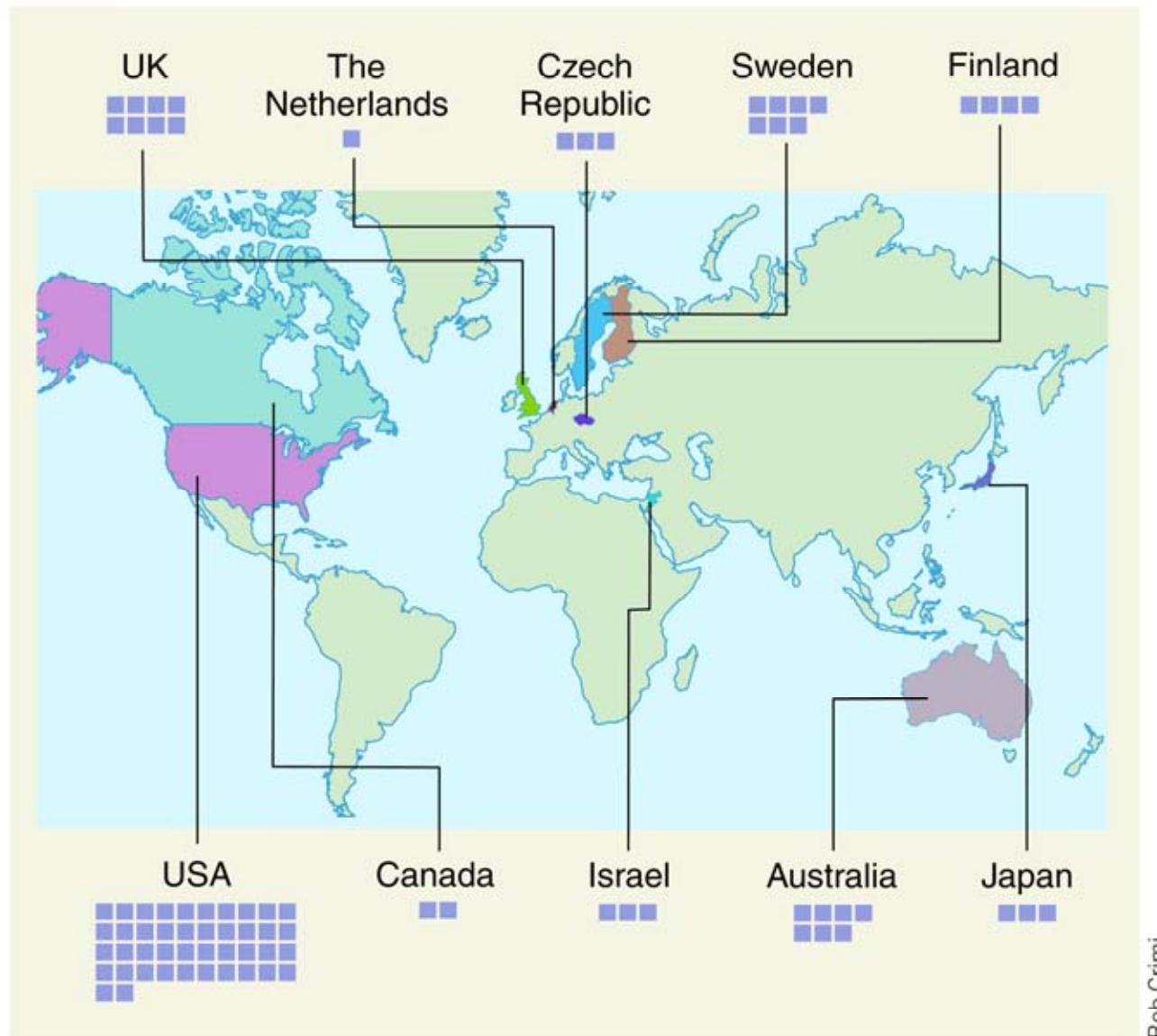
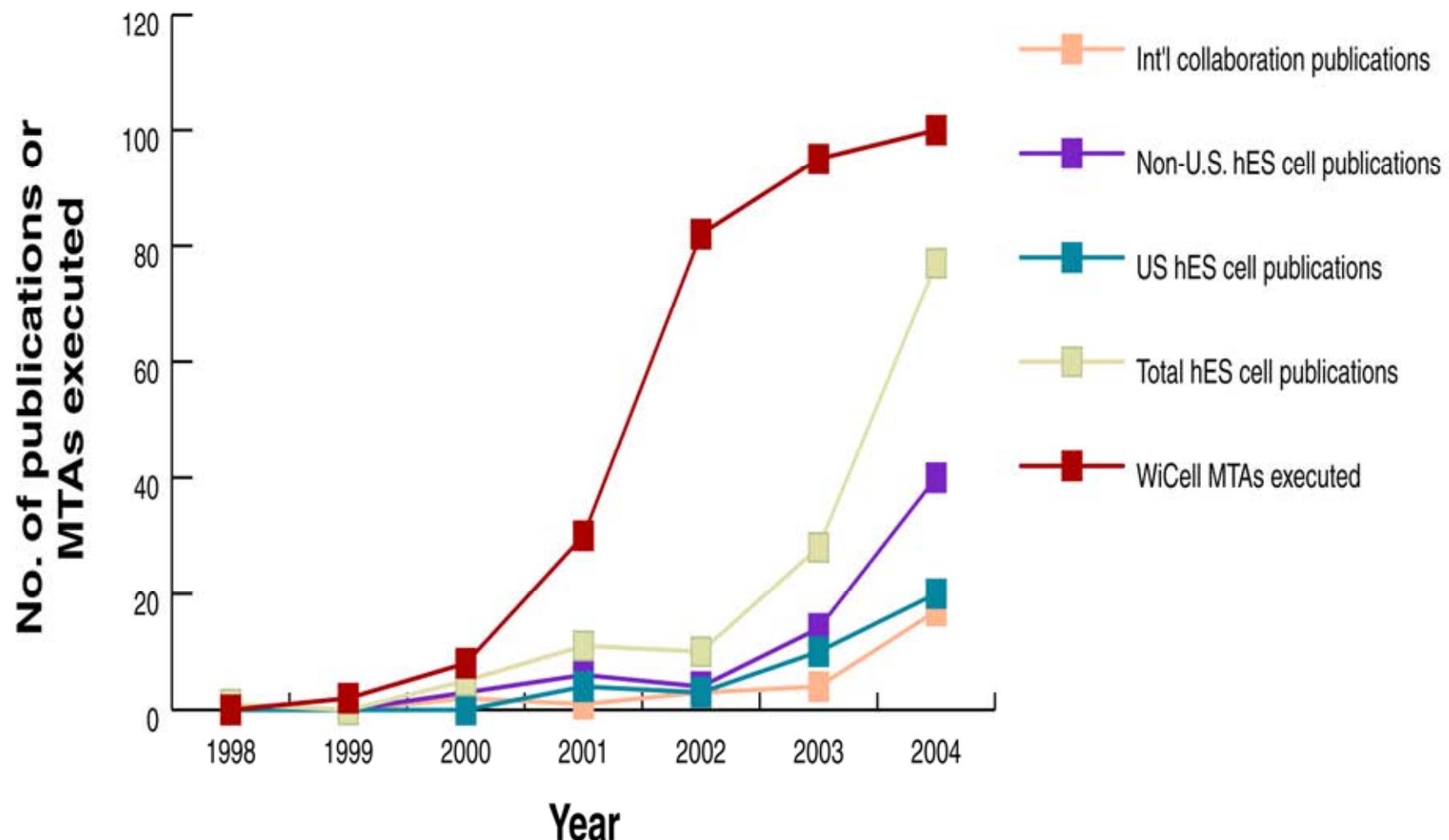


Figure 1 Countries of origin of hES cell lines in the Initiative. Blocks indicate number of hES cell lines contributed by each country.

Jason Owen-Smith & Jennifer McCormick

Nature Biotechnology, April 2006



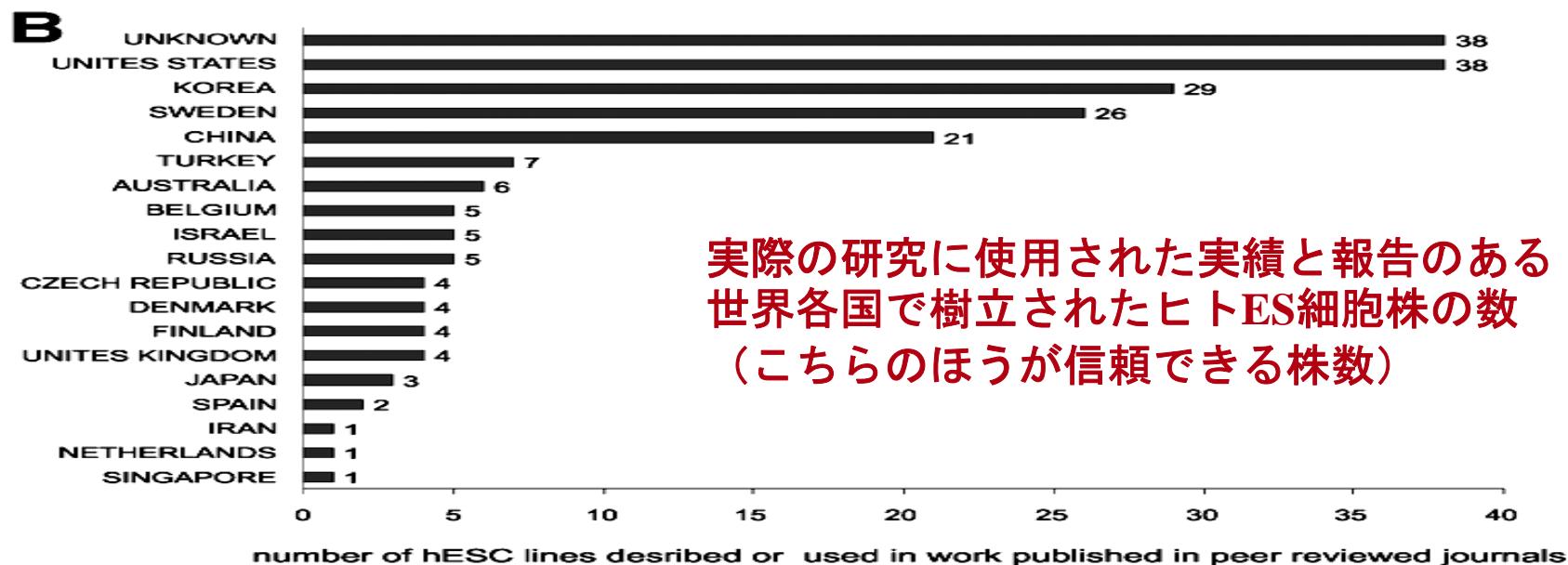
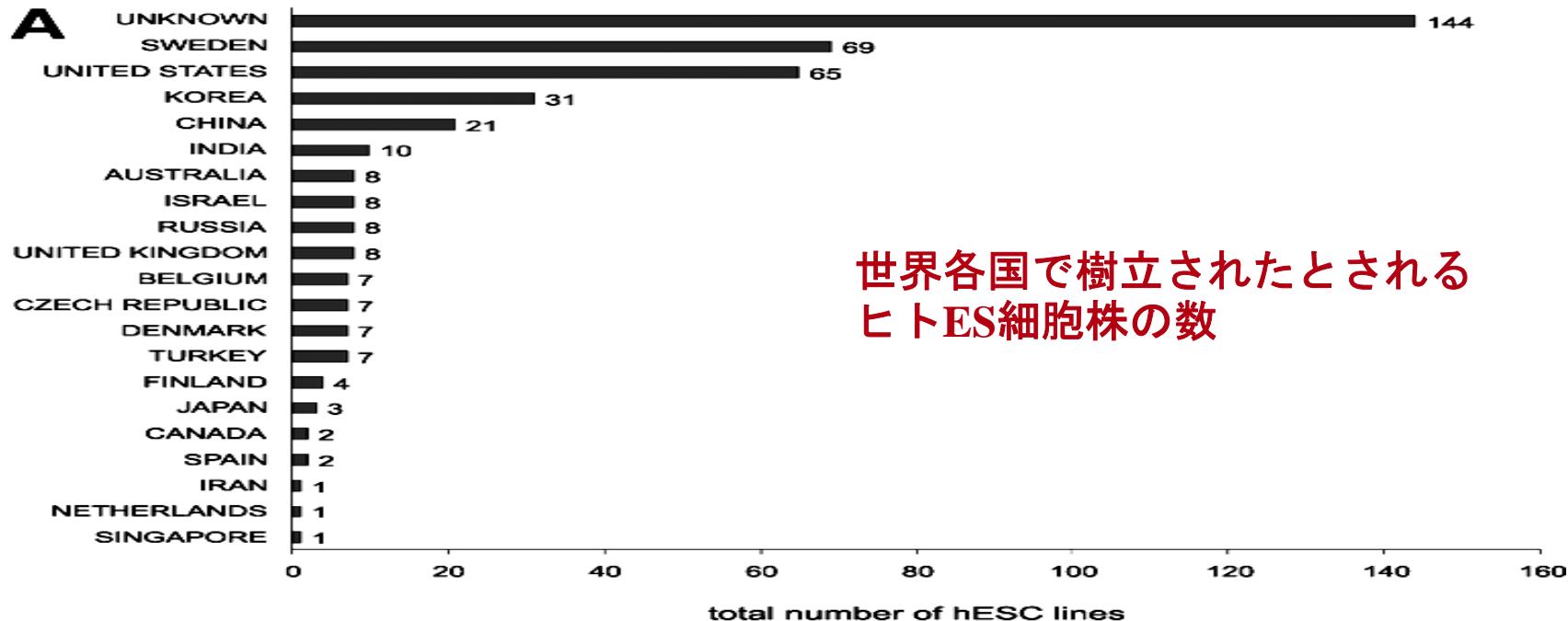
Current State of Human Embryonic Stem Cell Research: An Overview of Cell Lines and Their Use in Experimental Work

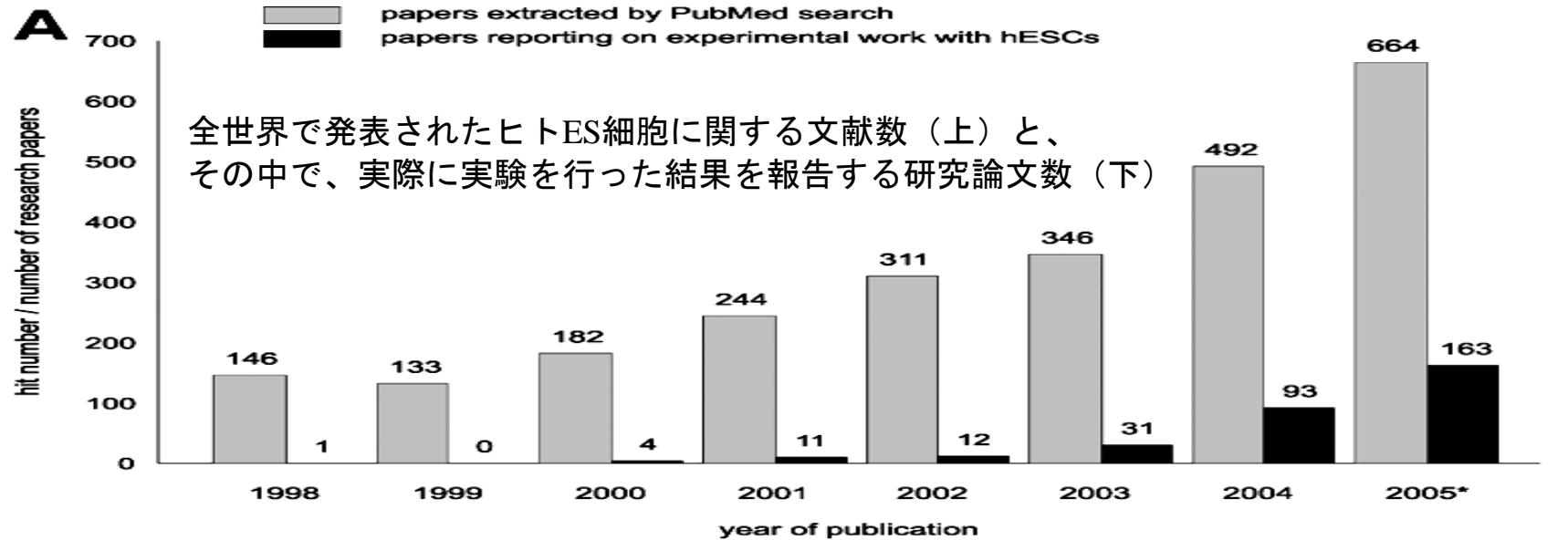
ANKE GUHR, ANDREAS KURTZ, KELLEY FRIEDGEN, PETER L OSER

Robert Koch Institute, Berlin, Germany and
Arnold & Porter, LLP, Washington, DC, USA

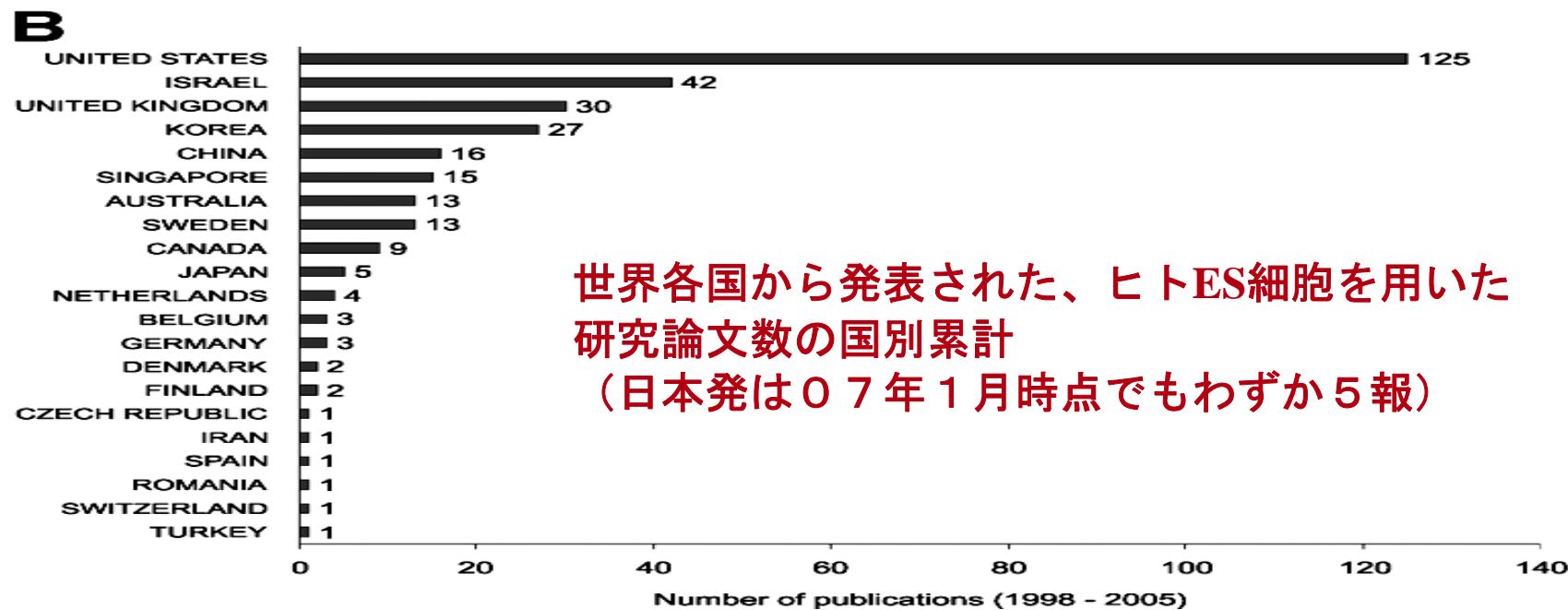
STEM CELLS 2006;24:2187–2191

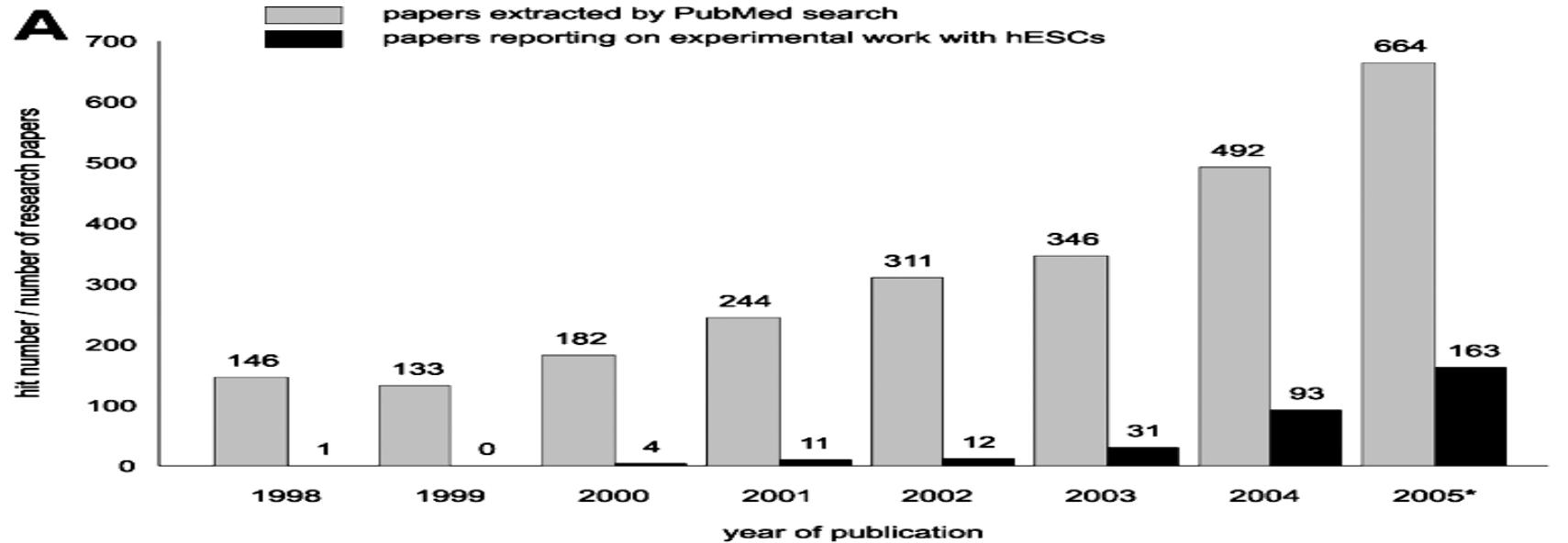
世界各国でのヒトES細胞研究の状況を調査した報告論文
(2006年10月発行のStem Cells誌に掲載された)



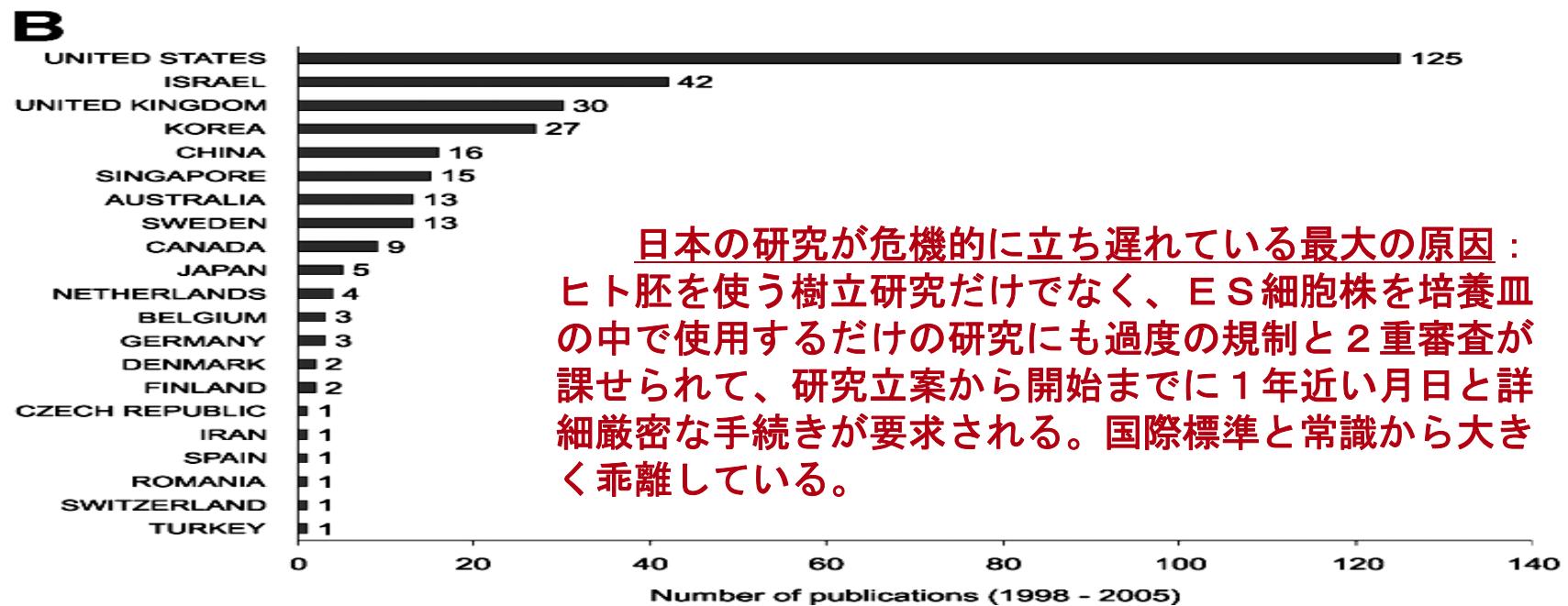


* papers published online ahead of print in 2005 are included





* papers published online ahead of print in 2005 are included



ヒトES細胞研究 国内外の状況と日本における問題点の骨子

京都大学再生医科学研究所 中辻憲夫

1. ヒトES細胞研究は、世界的には飛躍的に発展している

- (1)基礎研究の飛躍的拡大(論文数の指數曲線的増加、年百数十報から増加中)
- (2)臨床応用を目指した問題点の改善と解決(動物成分除去、染色体安定性、フィーダ細胞なしで合成培地による樹立維持)
- (3)臨床試験の準備開始(動物モデルでの治療効果と安全性確認、GMP基準に合致した細胞調製)
- (4)カリフォルニア州をはじめ、各国および米国州政府による研究支援と投資拡大
- (5)各国で樹立されたヒトES細胞株の特性比較、最適な合成培地の比較検討、標準的樹立培養システムの検討、など全世界の樹立研究グループが連携した国際ネットワークの活動が本格化
(ISCI, International Stem Cell Initiative)

2. ヒトES細胞研究において、日本は大きく立ち遅れてしまった現実

- (1)日本発の論文発表数は世界(5百編)の僅か1%(5編)(2006年の調査)
- (2)本格的にヒトES細胞研究に取り組む研究グループは依然として少数

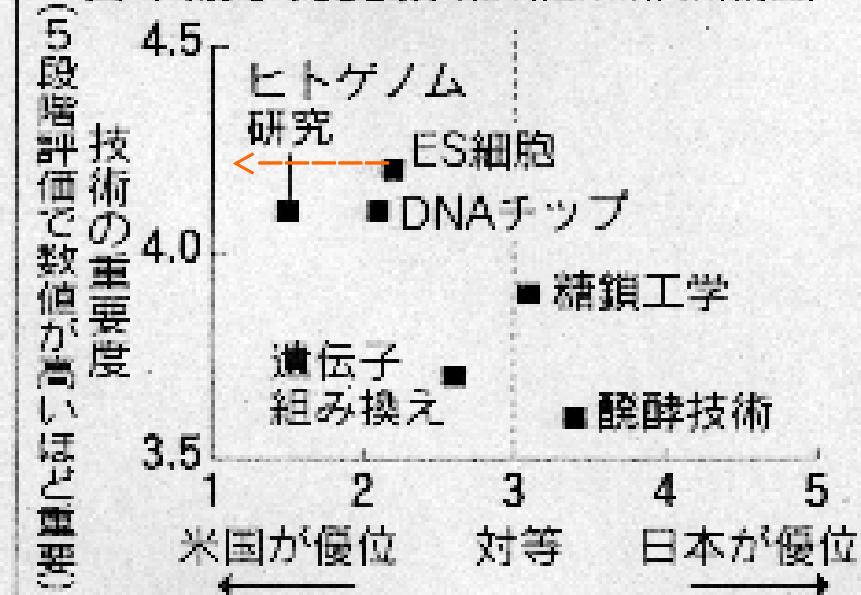
3. 世界標準と常識から乖離した過剰な研究規制(特に使用研究の厳格な2重審査が研究進展を阻害している)

- (1)国際幹細胞学会(ISSCR)の国際標準ガイドライン、米国科学アカデミー指針など、国外の指針では、既に樹立されたヒトES細胞株を実験室内で使用するだけの研究には厳格な審査は不要であると明確に規定
- (2)日本政府指針の改訂があるが、審査手続きの枝葉部分の改善のみであり、抜本的な使用研究審査の簡素化が行われず、問題点は全く解決しない

イバーシヨン 日本の底力

バイオ⑤

バイオ分野における主な技術の
日米競争力比較(経済産業研究所調査)



COLLABORATORS
Department of Development and Differentiation
and Stem Cell Research Center
Institute for Frontier Medical Sciences
Kyoto University

Hirofumi SUEMORI 末盛博文
Eihachiro KAWASE 川瀬栄八郎
Tomoyuki SUMI 角 智行
Kouichi HASEGAWA 長谷川光一

Shinya YASUDA 安田晋也
Keiko ADACHI 安達啓子
Norihiro TSUNEYOSHI 恒吉法尋
Yasuko FUJIMOTO 藤本康子

Kentaro YASUCHIKA 安近健太郎
Takamichi ISHII 石井隆道

Tsuyoshi FUJIOKA 藤岡剛
Masataka FURUYA 古谷正敬