

研究課題名	がんの再発・転移を治療する多機能な分子設計抗体の実用化
中心研究者名	児玉 龍彦
研究支援担当機関名	分子動力学抗体創薬技術研究組合

## <研究課題からの報告>

### 1. 研究課題の目的及び意義

再発や転移を含む進行がんは、我が国における最多の死因であり、原病の疼痛や多臓器不全での負担に加え、治療時の手術の負担、放射線や化学療法の副作用での負担も極めて大きい。一方、進行がん治療に期待が持たれている、副作用が少ない抗体医薬品は、奏功率が低く、有用性が限定的で治癒や緩解になりにくく、コストが高いといった課題がある。

このため、本研究課題は、分子動力学（molecular dynamics : MD）計算に基づいた分子設計手法により、がんの再発・転移を治療する多機能抗体の創成を目指して研究開発を実施した。

具体的な研究目標として、当初、

- ① 消化器と呼吸器の進行がんの原発巣と転移巣のデータを収集し、特異的な細胞表面分子を探索し、高い親和性で認識するモノクローナル抗体（単一の抗体産生細胞に由来するクローンから得られた抗体）を系統的に作成する技術を確立する。
- ② 抗体と抗原の X 線結晶構造と熱力学的解析を基に、高い親和性を持つヒト化 scFV（single chain variable fragment）抗体を設計する MD による高速シミュレーションシステムを確立する。
- ③ ヒト型化（低免疫原性）ストレプトアビジンを用いたプレターゲットング法による 2mm 径のがん塊を検出できる PET（positron emission tomography : ポジトロン断層法）イメージングの診断技術と、それに対する RIT（radio-immunotherapy : 放射免疫療法）を確立する。

を設定し、研究の進捗に応じ、最終的に

- ① スーパーコンピュータを用いて、がん標的分子により高い親和性（ $10^{-10}$  レベル）を有する抗体を設計するための、MD 学計算手法の技術開発及びそれを基に設計されたがんの再発・転移を治療する多機能な有用な人工抗体の開発を行う。
- ② ヒト体内で副作用が少なく、より有効ながんの診断、治療法である新規プレターゲットング法の技術開発を行う。

を設定した。

### 2. 研究成果の概要

## ・ MD 計算手法の技術開発及び有用な人工抗体の開発

スーパーコンピュータの進化により性能が著しく向上し、MD 計算を基盤技術とした抗体と抗原複合体の結晶構造解析データ及び抗体分子の動的な振る舞いを調べることが可能となったことを受け、独自に開発した FUJI 力場モデルを用いて、精度の高い MD シミュレーション技術を開発し、改変抗体の分子設計における先駆的な成果が得られた。

肝臓がんの代表的な抗原 (ROBO1) の改変分子設計抗体を開発し、小細胞肺癌担がんマウスを用いたプレターゲティング法によって、治療実験での高い抗腫瘍効果 (図 1) 及び PET イメージングへの応用技術を確立した (図 2)。また、大腸がんとすい臓がんの治療が期待される抗エピレグリン抗体についても、高活性なヒト型化改変抗体を開発し、結晶化を進めている。

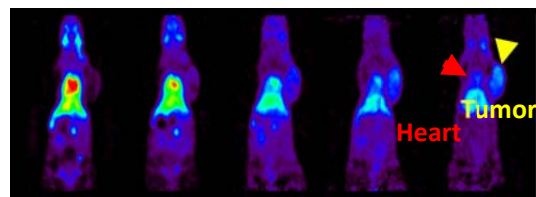


図 1.  $^{64}\text{Cu}$  抗 ROBO1 抗体を用いた肺小細胞癌マウスの PET Imaging

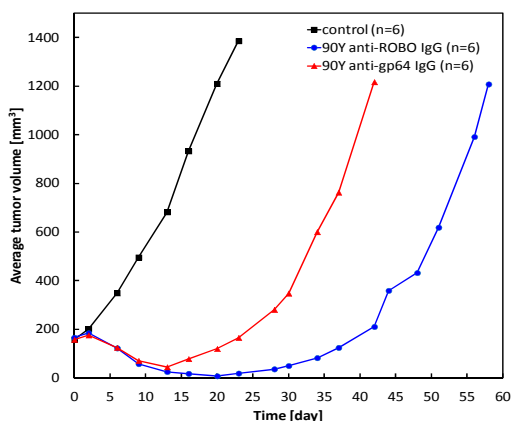


図 2.  $^{90}\text{Y}$  抗 ROBO1 抗体を用いた肺小細胞癌マウスへの RIT

## ・ 新規プレターゲティング法の技術開発

ストレプトアビジンとビオチンの骨格を基に、人体で使える低免疫原性の改変ストレプトアビジンである「Cupid」と、野生型のビオチンノイズを回避できる人工改変ビオチンの「Psyche」を設計・合成し、 $10^{-10}$ レベルのプレターゲティング法の基盤技術を確立した (図 3)。さらに、実用化へ向け、4 量体 scFv-Cupid の分子設計抗体作成技術を確立した。この 4 量体 scFv-Cupid は、 $10^{-10}$ レベルの親和性を達成し、目標レベルに到達している。

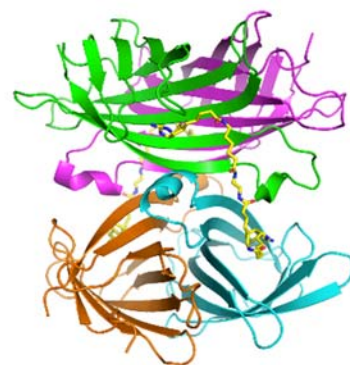


図 3. Cupid-Psyche 複合体の結晶構造。  
リボン構造 : Cupid, スティック構造 : Psyche

これらの確立された Cupid と Psyche の基本技術は、FIRST 事業期間終了とともに、技術研究組合から立ち上げたベンチャー企業に譲渡し、実用化を目指して

いる。また、Cupid の基本骨格の低免疫原性はサルでの試験で証明され、実用化への準備が整っている。

また、関連する成果として、スーパーコンピュータ「京」にアセンブラ言語レベルで最適化した GROMACS (MD シミュレーションのソフトウェアパッケージ) を導入することで、MD 演算速度を倍加させる大きな成果が得られ、MD による医薬品設計技術を画期的に向上させることができた。

さらに、MD による医薬品設計計算を実用化のためには、適切な結晶構造の取得が鍵であり、熱力学的測定を基にエントロピー効果の計算が重要であることを示した。

## <評価小委員会による所見>

### 1. 研究目標の達成状況

本研究課題では、MD 計算を基盤技術として、抗体と抗原の複合体の結晶構造解析データ及び抗体分子の動的挙動を調べ、精度の高い MD シミュレーション技術を開発し、改変抗体の分子設計における先駆的な成果を得ることに挑んだ結果、実際に、肝がんの代表的な抗原 (ROBO1) の改変分子設計抗体を開発し、担がんマウスを用いた治療実験での抗腫瘍効果を実証した。また、大腸がんとすい臓がんの治療が期待される抗エピレギュリン抗体についても、ヒト型化改変抗体の開発し、構造解析を進めている。

さらに、ヒト体内で副作用が少なく、より有効ながんの診断、治療法に応用できる新規プレターゲティング法の技術開発に挑み、免疫原性の低い改変ストレプトアビジンの Cupid と、生体内の野生型ビオチンのノイズを回避できる人工改変ビオチンの Psyche を設計・合成し、目標である  $10^{-10}$  レベルのプレターゲティング法の基盤技術を確立した。また、実用化へ向け、4 量体 scFv-Cupid の分子設計抗体作成技術も確立した。

得られた基本技術の前提となる低免疫原性ストレプトアビジンの特許と、ヒト体内でのビオチンノイズを克服した Cupid と Psyche の基本特許は、国内・海外において順次特許化が進められている。

このように、個々の研究開発においては、一定の成果が得られており、分子設計抗体の実用化に向け、着実に進展したと判断される。

ただし、開発した抗 ROBO1 抗体や抗エピレギュリン抗体については、現段階では、まだ臨床応用できる段階ではなく、また、新規プレターゲティング法である Cupid と Psyche の結合は、 $10^{-10}$  レベルと、目標には達しているものの、一般的なストレプトアビジン-ビオチンシステムの結合の強さ (解離定数  $K_d=10^{-15}M$ ) と比べて  $10^4\sim 10^5$  程度弱いといった課題もあり、統合的な成果を導くまでには至っていないことから、今後、実用化に向け、更なる改良が期待される。

## 2. 研究推進・支援体制の状況

サブテーマごとに基礎的な技術開発を行うとともに、中心研究者の指示の下、集中的な実用化開発を行う体制を構築した。特に、新規プレターゲティング法の実用化へ向けて、設計、合成、結晶化、性能評価、次の設計と、集学的研究サイクルが進み、それを技術研究組合が知財を一括管理する体制で支えたことが本研究課題の特色であり、この点は評価できる。

知的財産権に関する取組については、Cupid と Psyche のプレターゲティング法の中心的な特許権は、創設したベンチャー企業に譲渡され、製薬企業がワンストップでライセンスを受けられる体制が整備されている。

若手研究者の育成状況については、FIRST 事業期間後半において、若手研究者の自発性、自立性、独創性を育てることを目的として、組織横断の若手タスクフォースを形成して研究開発を実施し、この取組がデータの創出につながっている。ただし、特許出願を優先する余り、論文という研究成果につながっていないことは、若手研究者の育成という観点からは課題があったと言わざるを得ない。今後、早急に論文として成果をまとめていくことが期待される。

## 3. 研究成果の今後の展開

本研究課題で得られた Cupid と Psyche による新規プレターゲティング法の中心的な特許権は、技術研究組合から、設立されたベンチャー企業に譲渡されており、一括管理する体制が整ったことは、評価できる。

しかし、現段階でのコンピュータの処理能力や、結晶構造が取れなかった場合の MD 計算の結果と現実とのギャップを考えると、本研究開発の成果を早期に臨床に活用するためには、更なる研究開発が必要と考えられる。より複雑な MD 計算の必要性やコンピュータの処理能力の向上等の周辺要素を含めて、今後の研究計画・構想を具体化した上で研究展開していくことを期待する。

## 4. 総合所見

本研究課題は、がんの再発・転移等の治療のために、スーパーコンピュータを用いた MD 計算による多機能抗体の創成を目的として研究開発を実施した。

その結果、実際に肝がんの代表的な抗原 (ROBO1) に対する抗体や抗エピレギュリン抗体などを分子設計により開発し、有用性の高いものが確認されている。また、新規プレターゲティング法である Cupid と Psyche を開発し、基本特許も出願さ

れている。先端的な研究課題であり、困難なことが想定される中で、改変抗体の実用化の可能性を示したことは、一定の評価ができる。

しかし、上述のとおり、分子設計抗体の実用化という観点においては、現時点では検証が不十分であり、計算科学と抗体医薬の新局面を切り拓くような成果までには至っていない。

スーパーコンピュータの産業や科学への応用が大きく進んでいること、また、創薬の局面で抗体医薬が大きな進展を遂げていることを考慮すると、本研究課題で取り組んだテーマは、現代医学の最先端を切り拓くことが期待される分野である。今後、目標達成のためのマイルストーンや工程管理等の修正を行いながら、更なる研究開発を進め、実用化のために加速していくことを期待する。

研究課題名	高次精神活動の分子基盤解明とその制御法の開発
中心研究者名	柳沢 正史
研究支援担当機関名	筑波大学

## ＜研究課題からの報告＞

### 1. 研究課題の目的及び意義

睡眠覚醒の障害は、単独でも現代社会における主要な問題であるのみならず、生活習慣病・メタボリック症候群や、抑うつなどの精神疾患のリスクファクターとしても近年注目されている。中心研究者らは、平成10年に新規の視床下部ペプチド「オレキシン」を同定し、この単一のペプチド性伝達物質の欠損が深刻な睡眠覚醒障害であるナルコレプシーを惹き起こすことを突き止めた。現在では、オレキシンが睡眠・覚醒のスイッチングに直接関与し、生理的な覚醒状態を惹起する脳内因子であることが確立している

このため、本研究課題では、睡眠／覚醒、エネルギー代謝やストレス・感情の制御などの高次中枢機能の制御メカニズムを、脳内リガンドとその受容体の機能解析から明らかにするとともに、高次精神活動の制御法開発基盤を確立することを目指して研究開発を実施した。

研究課題全体としては、当初、サブテーマとして「睡眠覚醒の根本的なメカニズムの解明」を設定し、(1)マウス脳波・筋電図の大規模測定系を確立し、睡眠覚醒の定量的パラメータに異常を来す突然変異家系を検索、(2)「眠気」の生化学的信号を最新のプロテオミクス・リポミクス手法を用いた探索、(3)睡眠覚醒（眠気）の制御に直接の因果関係を持つ遺伝子を複数同定し、その機能の解析の検討を進めていたが、(2)については、統計学的にロバストなデータを得ることが困難であったことから、以下のように小テーマを構成し直して研究開発を実施した。

- ① エチルニトロソウレア（ENU）によるランダム変異体の睡眠覚醒スクリーニング
- ② オレキシン受容体選択的作動物質の医薬化学的最適化
- ③ 睡眠覚醒制御機構の可視化と制御

なお、中間評価において、「改善事項としてFIRSTプログラム期間中に最終的に達成する成果目標を明確にした上で、その達成に向けて研究開発を加速するために研究計画の見直しを求める。」との指摘を受け、基盤技術開発の研究リソース配分を見直すとともに、外部委託をしていた外部の医薬化学グループを学内に誘致し、連携体制の強化を行った。

### 2. 研究成果の概要

## ① ENU ランダム変異マウスの睡眠覚醒スクリーニング

目標であった 5,000 匹のランダム変異マウスのスクリーニングを達成し、FIRST 事業期間終了時点で 7,000 匹を超えた。睡眠覚醒異常マウス家系を 10 家系同定し、睡眠異常原因遺伝子の染色体マッピングは 8 家系で成功した。

本研究課題の大きな成果は顕著な睡眠覚醒異常をヘテロ接合体で引き起こす優性の遺伝子変異を複数同定できたことである。哺乳類でこのような強い睡眠覚醒異常をもたらす遺伝子変異は知られておらず、新規性・重要性の極めて高い発見である。

顕著な覚醒時間の短縮を示す *Sleepy* 遺伝子の変異マウス (図 1) 及びレム睡眠異常を示す *Dreamless* 遺伝子の変異マウス (図 2) について、それぞれの変異家系の約 60 個体から抽出した染色体 DNA を用いた連鎖解析による遺伝子マッピングを実施した。また、変異個体の染色体 DNA のエクソーム解析により、原因遺伝子及びその変異部位を同定することに成功し、*Sleepy* 及び *Dreamless* 遺伝子は、それぞれ、細胞内シグナル伝達及びイオン透過性に関するタンパク質をコードしていることが判明した。

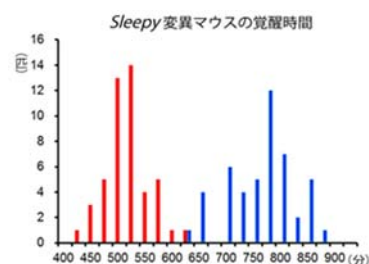


図 1. *Sleepy* 遺伝子変異を有する集団(赤)と有しない集団(青)の覚醒時間の分布

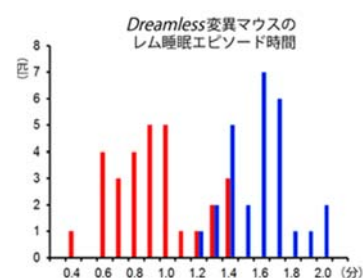


図 2. *Dreamless* 遺伝子変異を有する集団(赤)と有しない集団(青)のレム睡眠エピソード時間

## ② オレキシン受容体選択的作動物質の医薬化学的最適化

オレキシンの欠乏が引き起こす睡眠疾患であるナルコレプシーを標的とした薬物開発へフォーカスし、最終年度までに nM オーダーでオレキシン受容体を作動させる薬物の設計・合成に成功した。さらに、マウスを用いた *in vivo* 薬理試験において、覚醒誘導が可能であることを証明した。

オレキシン受容体作動物質探索は、25 万種を超えるケミカルライブラリーから、オレキシン 2 型受容体選択的作動薬の初期リードとして適した YN-1055 ( $EC_{50}=23nM$ ,  $OX1R/OX2R=70\sim 206$ ) を見出した。しかし、YN-1055 の溶解性は極めて低く薬理評価が困難であったため、溶解性向上のための最適化

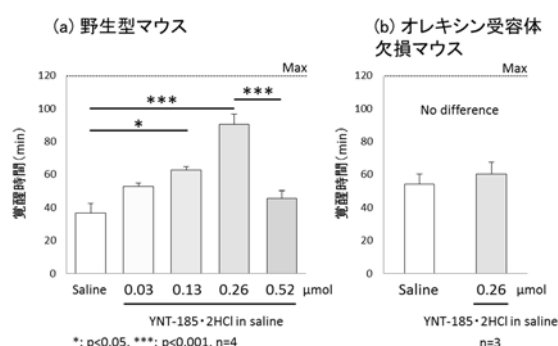


図 3. YNT-185 塩酸塩脳室内投与による野生型マウスの覚醒への影響とオレキシン受容体欠損マウスに対する影響

研究へと展開し、生理食塩水に対し 1.3M という高い水溶性を示す YNT-185 塩酸塩 ( $EC_{50}=48\text{nM}$ ,  $OX1R/OX2R=58\sim 96$ ) を見出した (図 3)。オレキシン受容体作動薬は、平成 25 年 12 月に化合物特許出願を完了した。

YNT-185 塩酸塩の薬理評価では、明期後期 (睡眠中) における野生型マウス脳室内投与において、vehicle 投与では明期終了まで睡眠が継続されていたのに対し、YNT-185 塩酸塩及びオレキシン A 投与では、顕著な覚醒の誘発と 1~1.5 時間程度の覚醒維持が観測された。また、オレキシン受容体欠損マウスで同様の試験を行ったところ、覚醒効果は見られなかった。さらに、野生型マウスの脳切片を用いた YNT-185 の電気生理学実験 (パッチクランプ法) も行い、オレキシン 2 型受容体が発現する結節乳頭体核に YNT-185 を作用させると、オレキシンと同様にオレキシン 2 型受容体を介して膜電位を上昇させることを確認した。これらの結果から、YNT-185 塩酸塩によってオレキシン 2 型受容体を刺激することで覚醒を誘発できる、すなわちオレキシン作動薬の設計・合成・コンセプト検証に世界に先駆けて成功した。

### ③ 睡眠覚醒機構の可視化と制御

睡眠と覚醒という脳の状態をより深く理解するために、それに伴う神経活動の変化を捉え、さらに新たに発見された睡眠覚醒制御遺伝子の機能解析を行うため、蛍光イメージングと電気生理学を基軸とする方法を開発した。

2 光子顕微鏡及びファイバー束顕微内視鏡によるイメージング技術と遺伝子工学を組み合わせ、大脳皮質の神経活動をセルタイプ毎に光学計測することに成功し、睡眠から覚醒への状態遷移時に異なる活動パターンを示すことを見出した。これらのイメージング法は電気生理では不可能な細胞の種類を同定した状態での記録や非電氣的活動を捉えることが可能であり、睡眠の神経科学を大きく発展させる。

睡眠がどのように脳全体を支配するかを追求するため、多点電極を大脳皮質の複数の箇所置き、同時記録を行ったところ、睡眠中神経活動の局所的差異を発見し、そのメカニズムの解明を継続中である (図 4)。このアプローチはラット等のより大型の哺乳動物で実施されてきたものだが、マウス用に改良・転用することで遺伝子改変マウスにも応用可能になった。上述の成果と組み合わせることにより、詳細な分子メカニズム解明への道筋をつけることが期待される。

また、睡眠を制御する新規ニューロン群及び新規神経回路の探索も実施した。遺伝子改変マウスと薬理遺伝学的神経活動制御法を駆使し、延髄被蓋部にその発火によって睡眠と覚醒を切り替えるニューロンを発見した。ウイルスベクターに

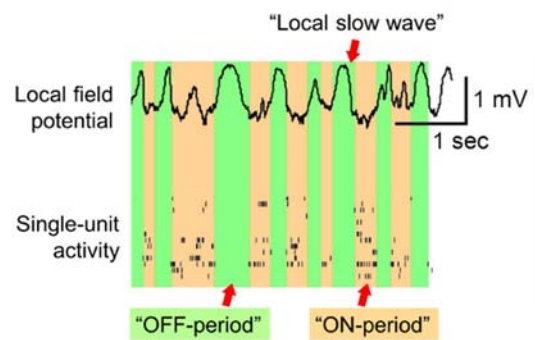


図 4. 自由行動下マウスの睡眠覚醒神経活動の多点記録



よる局所的遺伝子操作とパッチクランプ法によって、視床下部オレキシンニューロンと橋青斑核間の新しい情報伝達とその機能的意義を見出した。これらの発見は、現在提案されているいくつかの睡眠制御モデルでは想定されていないものであり、睡眠の制御機構の解明を大きく前進させる。

## <評価小委員会による所見>

### 1. 研究目標の達成状況

ランダム変異マウスの睡眠覚醒スクリーニングで同定された 3 つの遺伝子 (*Sleepy1*、*Sleepy2*、*Dreamless*) については、細胞内シグナル伝達及びイオン透過性に関与するタンパク質をコードしており、興味深い分子である可能性が高い。分子機能解析が進められているが、現段階では、睡眠覚醒領域への特異性が不明であり、引き続き研究を進める必要がある。

オレキシン受容体選択的アゴニストの最適化については、nM オーダーでオレキシン受容体を作動できる化合物の設計・合成に成功し、in vivo で薬理活性を確認した。オレキシン受容体のアゴニストは、オレキシン受容体の発見以来、世界中の製薬メーカーが研究に取り組んでいるが、未だ見出されておらず、成功すれば、社会へのインパクトは高いものである。ただし、レポーター系のスクリーニングで、化合物が直接標的分子（受容体）に結合しているところを確認できていないため、結合証明を早急に進める必要がある。

睡眠覚醒機構の可視化と制御については、マウス脳の機能解析用のデバイスが作成され、今後の活用が期待される優れた機器開発であると評価される。

### 2. 研究推進・支援体制の状況

中心研究者が 8 割以上（事業期間終盤は 9 割以上）筑波大学に常駐することで、研究に集中する体制が整うとともに、サブテーマの見直しによりサブテーマを構成する四つの小テーマ間の人員配置と予算配分等の研究リソースが効果的に再配分した。全ての機能を中心研究者の直轄下に置いて、トップダウンで円滑かつ有機的に研究活動の推進が図られたことは評価される。

研究支援体制については、筑波大学内に総務・会計支援チームを常設するとともに、知財確保・管理の面から支援する知財管理班及び利益相反等の面から支援する利益相反・安全保障輸出管理班を、産学連携本部に常設するなど、中心研究者が研究開発に専念できる環境が整備されており、支援機関として適切に機能していたと判断される。

若手研究者の育成状況については、複数の研究者が研究指導教員認定を受けて学生の研究指導を通して学生たちの積極的な研究活動への参画を促したことは評価

される。一方、研究の規模から考えると、期間中に発表した論文の数が少なく、学生、特に大学院生のキャリアパス支援という観点からは課題があったと言わざるを得ない。

### 3. 研究成果の今後の展開

睡眠生物学の分野は、重要課題でありながらアプローチ法も限られており、新規関連遺伝子の同定が必須な状況であった。課題側より発表されたデータが乏しいため、断言することは難しいが、睡眠に関わる遺伝子群（パスウェイ）が複数明らかになったとすれば、本分野における影響は大きく、学問的にインパクトを与えるものとなる。

本研究課題の成果は、文部科学省の「世界トップレベル研究拠点プログラム(WPI)」などに継承され、睡眠覚醒機構の解明に向け、研究を進めることとしている。また、オレキシン受容体アゴニストのリード化合物の最適化に向け、製薬会社との連携も進められており、成果の創出に向けた取組が行われている。

ただし、特許戦略として、創薬につながる候補物質の最終化合物まで、アカデミア単独で特許を確保することを予定しているが、創薬研究においては、アカデミアの研究資金やマンパワーを考えると困難な面もある。また、リード化合物の特許申請が行われているが、データが不足している面があり、更なる研究が必要な状況である。リード化合物の発見以降は、製薬企業と協力して、そのノウハウを活用した方が成功に結びつく可能性も高く、治療薬実現に向け、戦略的に進めていくことを期待する。

### 4. 総合所見

本研究課題は、睡眠覚醒の根本的なメカニズムの解明と制御法の開発基盤の確立を目的として研究開発を実施した。その結果、睡眠覚醒異常に関わる複数の新規遺伝子の分離に成功していることや、オレキシン受容体アゴニストの候補物質を作成して特許出願するなど、高次機能の解明につながる研究成果が得られている。まだ論文化されてはいないが、哺乳類の睡眠研究分野において、重要な成果が上がりつつあり、更なるデータを集めて、発表することにより、世界的にも注目されることが期待される。

以上のことから、本研究課題は目標を達成しており、世界をリードする世界トップ水準の研究成果が得られたと判断される。

今後、本研究課題の成果を基に、WPIにおいて更なる研究開発を進めていくこととしているが、新規の遺伝子については、創薬といった短期的な価値だけでなく、睡眠覚醒メカニズムの解明という学術的な価値も高い。早期に公開することにより、

学術面での更なる機能解明につながることも期待されることから、成果を早急にまとめ、論文として公表していくことを期待する。

研究課題名	iPS 細胞再生医療応用プロジェクト
中心研究者名	山中 伸弥
研究支援担当機関名	京都大学

## <研究課題からの報告>

### 1. 研究課題の目的及び意義

中心研究者が iPS 細胞の作製を発表して以来、世界各国で iPS 細胞を作るための技術開発競争が加速した。iPS 細胞作製技術が乱立する中、iPS 細胞を再生医療に活用するためには、作製した細胞の品質を一定に保つ必要があり、「iPS 細胞樹立技術の標準化」を行うことが必須である。

このため、本研究課題では、iPS 細胞に立脚した再生医療の社会実装に向けた応用研究を推進するため、1) 乱立している iPS 細胞樹立技術の標準化を国際的な規模で行うこと、2) 体細胞や作製法の異なる iPS 細胞の多能性や移植安全性の評価を行い、世界標準と呼べるヒト iPS 細胞を見出すこと、さらに、3) この標準技術を臨床応用に向けて、GMP

(「医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準」)に準拠した調製システムとして完成させることを目標として研究開発を実施した。

具体的な研究課題としては、上記目標に沿って、①iPS 樹立方法の比較解析、②細胞特性の把握、③GMP 準拠細胞調製を設定した (図 1)。

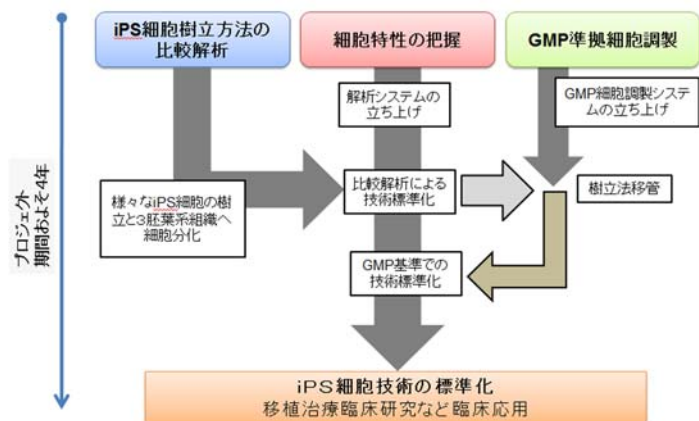


図 1. 研究課題の概要

### 2. 研究成果の概要

#### ① 安全かつ高効率な iPS 細胞樹立技術の確立

iPS 細胞樹立に際しての初期化因子の導入方法として、当初用いたレトロウイルスの他、アデノウイルス、センダイウイルス、プラスミド、トランスポゾン等のベクターによる遺伝子導入や、組換えタンパク質、合成 mRNA を用いる方法等を比較検討した。その結果、ゲノムへの挿入がない遺伝子導入方法としてエピソーマルプラスミドを用いて、線維芽細胞へ導入する初期化因子を至適化することにより、従来の樹立法よりも安全かつ高効率な iPS 細胞の樹立系の構築を実現した。また、末梢血及び臍帯血でも同様の手法を用いることで、既報の方法より有意に高い効率の iPS 細胞樹立にも成功した。すなわち、臨床用 iPS 細胞の作製

時において、健常者あるいは患者から細胞検体を採取する際、より低い侵襲の条件下で安全かつ高効率な樹立を実現できる方法を世界に先駆けて開発した（図2）。

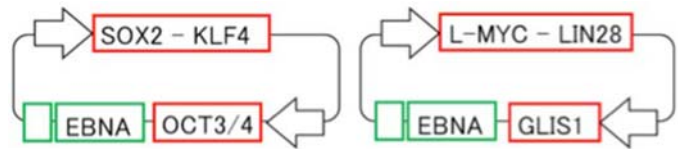


図2. 至適な初期化因子のエピソーマルプラスミド法による導入

また、初期化因子そのものも、より安全かつ高効率な iPS 細胞の樹立を目指し、従来の中 4 因子（OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC）以外に、原がん性がないと考えられる L-MYC 遺伝子及び受精卵で特異的に発現している GLIS1 遺伝子を発見した。これらによって、初期化因子として、OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、GLIS1 を選抜し、高効率かつ安全性の高い iPS 細胞樹立方法を提案した。さらに、特許の調査等も進め、特許に抵触せず実用上十分な効率を持つ、より多くの人が使いやすいベクターを開発した。

## ② iPS 細胞の特性評価系の構築

ES 細胞及び iPS 細胞の三胚葉系へ分化能力を比較評価する過程で見つかった分化抵抗性株において、有意に高く発現する遺伝子群を同定し、分化抵抗性細胞株の判別が可能となった。また、分化抵抗性細胞における残存未分化細胞の検出に有用な細胞表面抗原マーカーを見出した。さらに、ES 細胞及び iPS 細胞を神経前駆細胞からドーパミン産生細胞へと分化させ、免疫不全マウスの線条体に移植した結果、適切なクローンの選別により、iPS 細胞が ES 細胞と同等の安全性を確保できることを示唆する結果を得た。

これらの解析を基に、医療用 iPS 細胞の評価方法の開発及び検証を行い、細胞の形態や核型が正常であることや、表面抗原、多能性マーカーの発現及び分化抵抗性クローンで有意に高発現していた遺伝子の発現を評価基準とする系を確立した。

## ③ GMP 準拠の iPS 細胞調整技術の開発

iPS 細胞の樹立・維持培養方法の GMP 化においては、フィーダー細胞や異種生物由来の成分・材料の利用を避ける（ゼノフリー）ことが望ましく、ラミニンをベースとする培養基材及び培地を共同で開発（図3）し、ゼノフリー及びフィーダーフリー条件下での、線維芽細胞及び末梢血からの iPS 細胞の樹立・維持培養プロトコールを iPS 細胞用に最適化することに成功した。これより、iPS 細胞用培地に関し、国内での安定した供給体制に道筋を付けるとともに、維持培養におけるコストの圧縮にも貢献した。臨床応用向けの iPS 細胞製造プロセスの構築にも取り組み、標準化されたプロトコールの下で臨床用 iPS 細胞を作製するため、GMP グレード細胞調製施設が稼働可能であることを確認した上で、ボランティアドナーからの血液検体を用いて iPS 細胞を樹立し、凍結ストックを作製した。

また、京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) の細胞調製施設 (Facility for iPS Cell Therapy) において、GMP 対応の設備、文書体系を検討し、PMDA (独立行政法人医薬品医療機器総合機構) の簡易相談において得た指摘事項を改善した。また、血球細胞への遺伝子導入から iPS 細胞の樹立に至るプロセスの検証と標準作業手順書 (Standard Operating Procedure : SOP) の確立に向けた諸実験の結果、血球細胞から iPS 細胞ストックを作製するための SOP を完成させた。

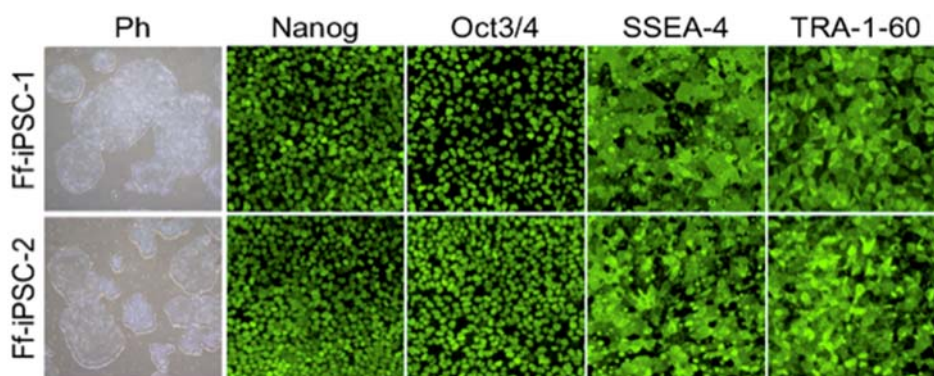


図3. ゼノフリー及びフィーダーフリー条件での iPS 細胞の樹立・維持培養 (核内(Nanog, Oct3/4) 及び細胞表面(SSEA-4,TRA-1-60)での多能性マーカーの発現を確認)

## <評価小委員会による所見>

### 1. 研究目標の達成状況

本研究課題では、臨床応用に使用できる iPS 細胞樹立技術の標準化に向け、世界をリードする研究開発を一貫して展開した。具体的には、臨床応用において必須となる各要素技術の GMP 化を視野に入れ、世界標準となり得る iPS 細胞樹立技術を開発した。また、臨床応用に使用可能な iPS 細胞の高品質化、その評価系の構築、選別技術の確立を行うとともに、GMP 準拠の iPS 細胞樹立、維持培養、分化細胞調製のための SOP を作成し、臨床応用に使用できる細胞選別技術を構築した。

中心研究者の適切なリーダーシップの下、再生医療において効率的かつ安全性の高い iPS 細胞樹立技術、大量培養、品質管理などの様々な課題を乗り越えて、結果的に iPS 細胞を用いた臨床試験にもつながっていることは特筆すべき成果であり、高く評価される。また、創薬研究においては疾病 iPS 細胞の活用が重要であるが、既にドラッグリポジショニング (既存の医薬品や開発中止した化合物の新たな薬理作用を発見し、新しい疾患治療薬として開発すること) において一定の成果が出つつあり、日本を代表するノーベル賞研究にふさわしい成果を上げている。

なお、iPS 細胞の研究は、臨床応用に向けた研究が重要であることはもちろんであるが、細胞分化の本質を理解する上でも重要な研究である。細胞記憶に係る DNA メチル化の影響や、分化前後の細胞の体細胞変異の影響やエピゲノム比較なども考慮しつつ、生物学の根本原理の解明にも長期的観点で取り組んでいくことを期待す

る。

## 2. 研究推進・支援体制の状況

プロジェクトの研究担当者等による研究進捗報告会（毎週1回）を開催し、常に問題意識の共有に努めるとともに、外部有識者の参加を募った「再生医療推進プログレスセミナー」の開催や、産業利用の出口である創薬研究において「創薬プログレスミーティング」を開催するなど、その時々の研究の進捗状況に応じてiPS細胞の再生医療応用や創薬化に向けた諸課題を議論する場を設けている。これら一連の活動を通じ、中心研究者が全研究活動を把握し、かつ進捗に応じたタイムリーな助言を与える体制が整備されており、進捗管理と研究競争力の維持・強化が図られている。

支援体制については、研究者と専門性の高い密なコミュニケーションを取れるよう、博士号所得者を中心に専門知識やスキルを有する人員をそろえている。また、研究マネジメント業務のサポート体制の拡充のため専任の担当者集団が組織されており、有効に機能したと評価される。

若手研究者の育成状況については、ポストドクター等、若手の研究人材の育成や、国際的な活躍・発展を促すような取組が積極的に行われたと評価される。

## 3. 研究成果の今後の展開

平成25年度から、独立行政法人科学技術振興機構（JST）の再生医療実現拠点ネットワーク「再生医療用iPS細胞ストック開発拠点」を開始し、本研究課題の成果を活用して、高品質で安全な再生医療用iPS細胞ストックを構築し、臨床応用を目指す機関への供給体制の整備を進めている。また、企業との共同研究も進んでおり、再生医療実現化の推進と関連産業の育成に大きく貢献することが期待される。

知的財産権に関する取組については、CiRA、京都大学産学連携本部及びiPSアカデミアジャパンの3者で管理運用が行われた。定期的な特許動向調査も行われており、プロジェクト参画者だけでなく、研究者コミュニティが安心してiPS細胞技術の研究開発が行える環境整備が行われたと判断される。なお、技術の普及に制限が掛かったという面もあり、他社の特許化を防ぐ早期公表という観点も考慮しつつ、引き続き、戦略的に進めていくことを期待する。

## 4. 総合所見

本研究課題は、iPS細胞に立脚した再生医療の社会実装に向けた応用研究を推進

するため、iPS 細胞樹立技術の標準化を国際的な規模で行い、世界標準と呼べるヒト iPS 細胞を見出し、また GMP に準拠した調製システムを完成させることを目的として研究開発を実施した。その結果、より安全かつ高効率な iPS 細胞の樹立を実現できる方法を世界に先駆けて開発するとともに、医療用 iPS 細胞の評価方法を構築し、さらに臨床試験にまで到達していることは特筆すべき成果であり、高く評価される。

また、ノーベル生理学・医学賞受賞の榮譽にも輝いた中心研究者の下で、参加研究者・支援者らが一丸となり、最先端の研究開発分野である iPS 細胞技術の標準化をリードする成果が創出されている。また、これらの研究成果が iPS 細胞の臨床研究につながっていることは、国民が大きく期待するところであり、人類に大きな貢献をもたらすことが十分に期待される。

以上のことから、本研究課題は目標を達成しており、世界をリードする世界トップ水準の研究成果が得られたと判断される。

今後は、JST のプロジェクトなどに引き継がれ、臨床応用に向けて更なる研究開発を進めることとしているが、iPS 細胞の研究は世界規模で熾烈な競争が繰り広げられている。iPS 細胞は基礎的な研究から臨床研究まで、幅広い研究に有用であることから、様々な分野の研究者との対話や共同研究を進め、オールジャパン体制で研究を推進していくことを期待する。