

ヒトES細胞等の研究と応用 現状と展望

京都大学

物質—細胞統合システム拠点 拠点長

再生医科学研究所 教授

中 辻 憲 夫

当配布資料の無断転用を禁じます

1. 多能性幹細胞株とは何か：特徴と大きな可能性
2. ES細胞の研究と応用：世界の現状
3. 真の実用化を目指すために必要な多段階技術
4. ES細胞とiPS細胞：研究と応用で相補的關係
5. (参考資料)ES細胞の生命倫理：問題の程度と対応

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 増殖能: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)

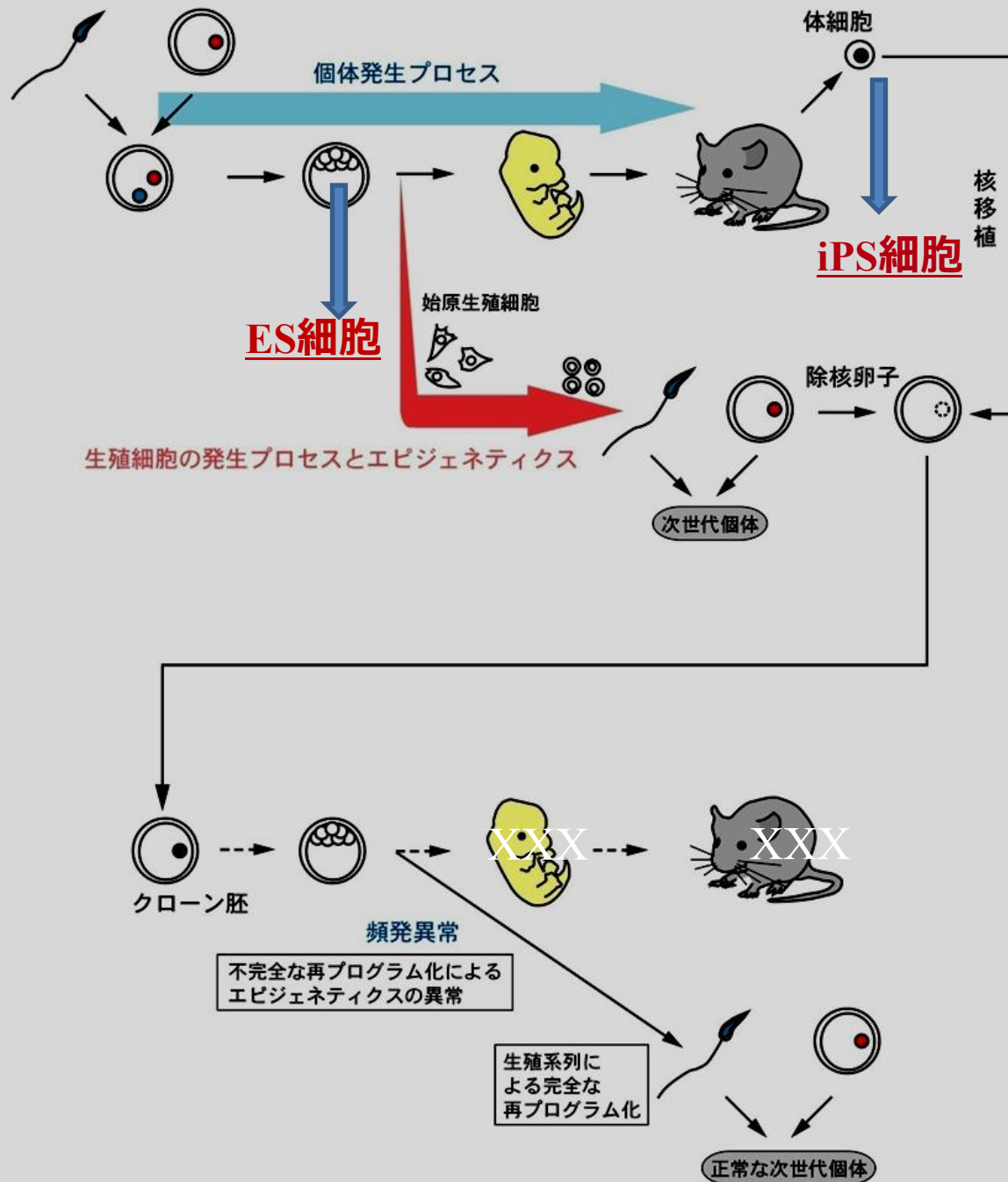
組織幹細胞 Tissue Stem Cell(体性幹細胞 Somatic Stem Cell)

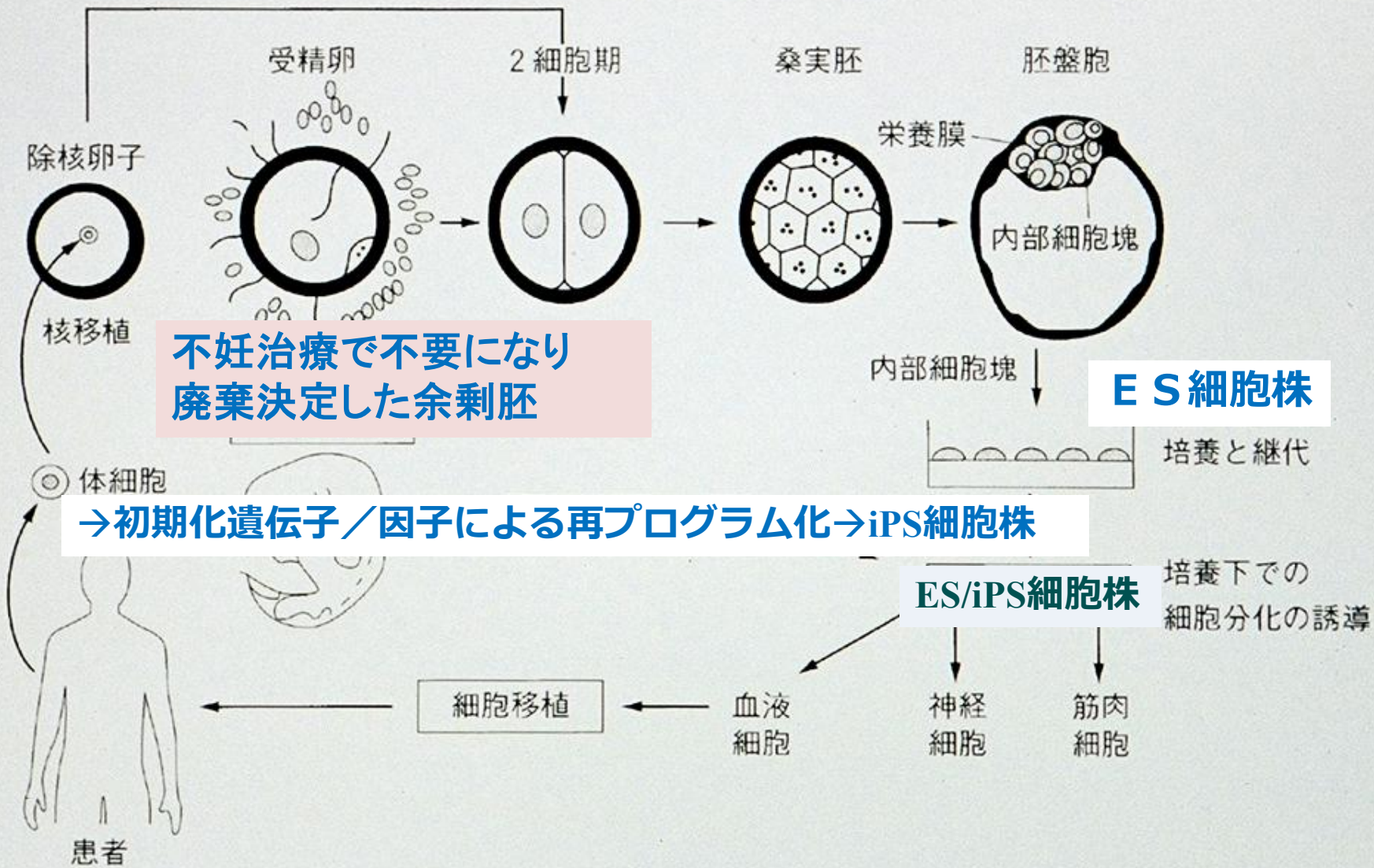
造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞など

- ・(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

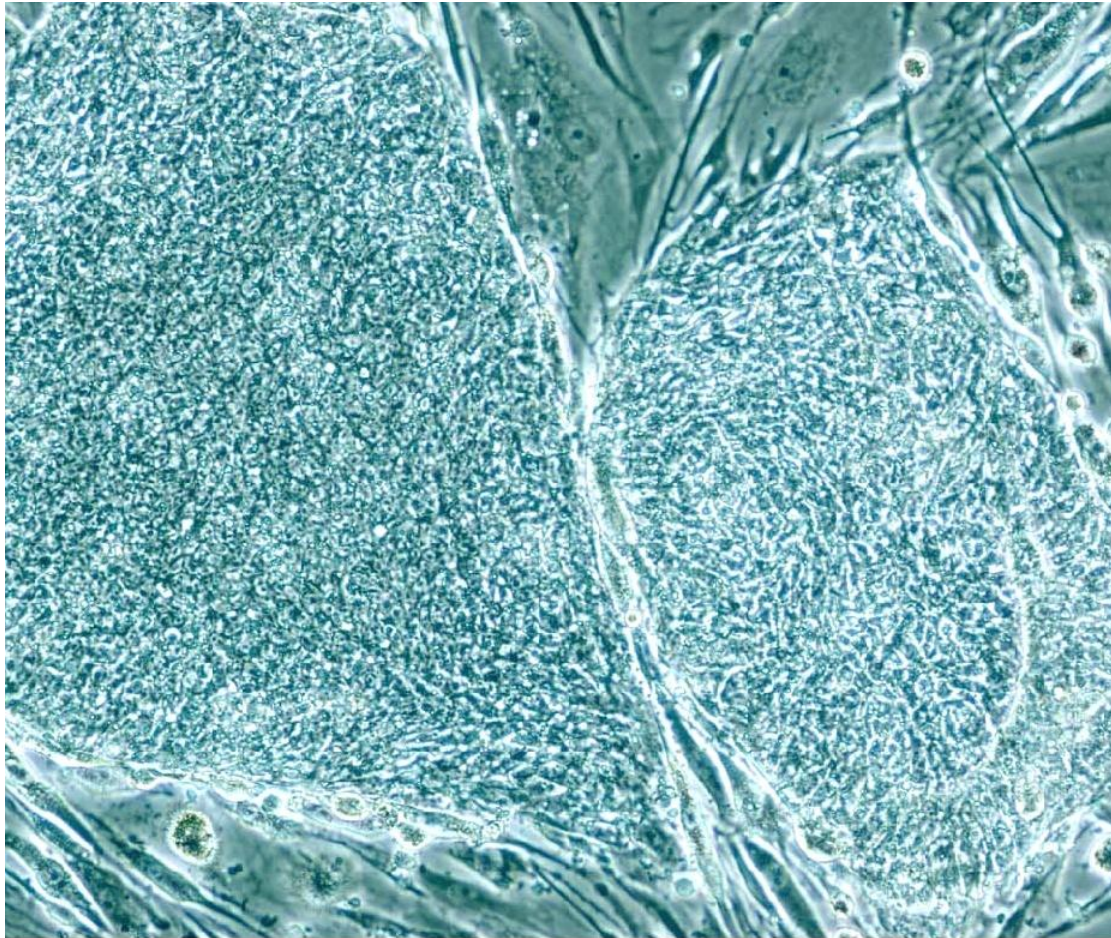
多能性に近い特性をもつ成体組織幹細胞?

成人由来 分化能:高? 増殖能:高?(再現性確認が困難)

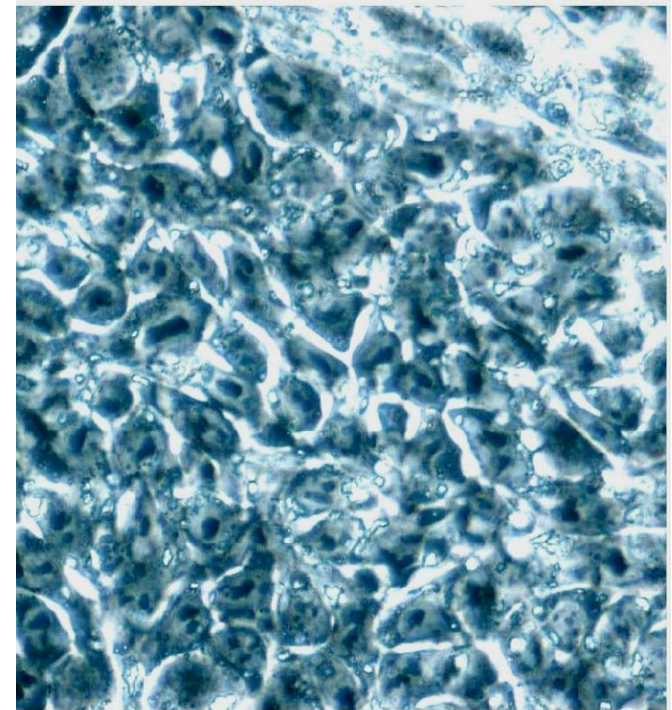




2003年5月に、国内で初めて樹立されたヒトES細胞株
KhES-1



275 μm



70 μm

これまでに樹立したヒトES細胞株

	KhES-1	
3細胞株	KhES-2	2003年
	KhES-3	

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

**2008年12月に新たな2株を追加樹立
(KhES-4, KhES-5株)**

The International Stem Cell Initiative

Nature Biotechnology: advance online publication on 27 Nov 2011

Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage

多能性幹細胞株の特性

- (1) 長期間の細胞増殖を、最適な培養条件下ではほぼ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

今年(2011年)発表されたES/iPS細胞株のゲノムとエピゲノムの変異／異常化リスクに関する重要論文 各細胞株の品質評価と選別の重要性

- ① ES/iPS細胞株の長期継代培養においては、特に最適ではない培養条件下では、やや不利な条件下でも増殖を有利にするような、がん遺伝子増幅などの変異を起こした細胞が細胞集団を乗っ取る可能性が高まる。

Cell Stem Cell 7 October 2010, Cell Stem Cell 8 January 2011

→ したがって、このような変異細胞株を選別排除する必要がある。

- ② iPS細胞株を樹立する初期化過程では高度の細胞選別が起きることから、iPS細胞株では樹立初期から多くの変異が起きている可能性があり、癌抑制遺伝子など特徴的な遺伝子の欠損が見られた。

Cell Stem Cell 7 October 2010, Cell Stem Cell 8 January 2011

→ したがって、これら安全性において重要変異をもつ細胞株を選別排除する必要がある。

- ③ iPS細胞作成時の初期化が不完全な場合があることが複数論文によって報告されてきたが、最近の論文で、エピジェネティクス初期化が特に起きにくいクロマチン部位の特定が始まっている。

Nature ARTICLE February 2011

→ したがって、エピゲノム初期化の程度を判別することがiPS細胞株の評価にとって重要である。

The International Stem Cell Initiative

Nature Biotechnology: advance online publication on 27 Nov 2011

Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage

The International Stem Cell Initiative analyzed 125 human embryonic stem (ES) cell lines and 11 induced pluripotent stem (iPS) cell lines, from 38 laboratories worldwide, for genetic changes occurring during culture. Most lines were analyzed at an early and late passage. Single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis revealed that they included representatives of most major ethnic groups. Most lines remained karyotypically normal, but there was a progressive tendency to acquire changes on prolonged culture, commonly affecting chromosomes 1, 12, 17 and 20. DNA methylation patterns changed haphazardly with no link to time in culture. Structural variants, determined from the SNP arrays, also appeared sporadically. No common variants related to culture were observed on chromosomes 1, 12 and 17, but a minimal amplicon in chromosome 20q11.21, including three genes expressed in human ES cells, *ID1*, *BCL2L1* and *HM13*, occurred in >20% of the lines. Of these genes, *BCL2L1* is a strong candidate for driving culture adaptation of ES cells.

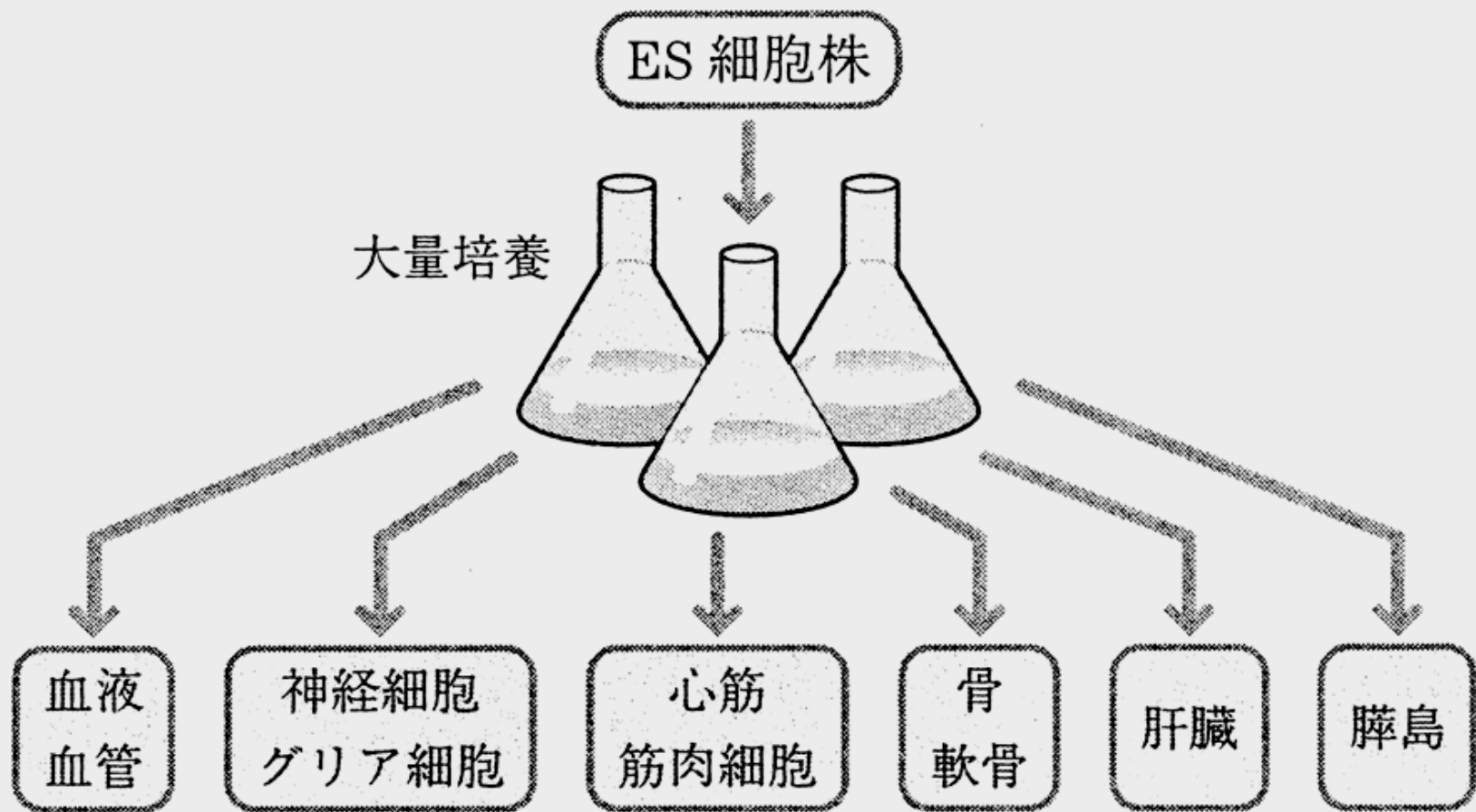


図4 ES細胞から多種類の細胞を供給する

ヒト多能性幹細胞株の応用と実用化

- (1) 細胞移植治療、組織工学による治療用人工組織などに用いる、各種ヒト組織細胞の高品質大量生産と供給
- (2) 新薬スクリーニングや安全性試験など、創薬研究開発に必要な各種ヒト組織細胞の均一品質を確保した大量生産と供給

1. 多能性幹細胞株とは何か：特徴と大きな可能性
2. ES細胞の研究と応用：世界の現状
3. 真の実用化を目指すために必要な多段階技術
4. ES細胞とiPS細胞：研究と応用で相補的關係
5. (参考資料)ES細胞の生命倫理：問題の程度と対応

Federal policy and the use of pluripotent stem cells

| **NATURE METHODS** | VOL.7 NO.11, 866 | NOVEMBER 2010

米国Wisconsinで樹立されたヒトES細胞株（H9, H1, H7）
が世界各国の研究に使われて、標準株的な地位を獲得している。

多能性幹細胞を使った細胞治療を目指す研究の現状

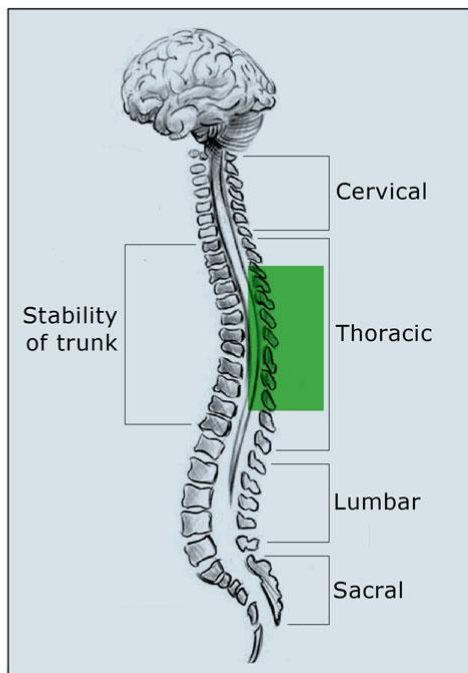
- パーキンソン病
ヒトやサルES細胞からドーパミン神経への分化誘導
ヒトやサルES細胞からのドーパミン神経細胞を疾患モデル動物へ移植する前臨床研究
により病態改善、腫瘍形成なし、など良い結果
- 脊髄損傷
ヒトやサルES細胞から神経幹細胞／前駆細胞、運動神経、グリア細胞などへの分化誘導
グリア細胞や神経前駆細胞の疾患モデル動物への移植による治療効果の報告
米国で臨床試験開始：ES細胞由来グリア前駆細胞移植による急性期脊髄損傷の治療
- 加齢黄斑変性、網膜色素変性など眼科疾患
ヒトやサルES細胞からの網膜色素細胞を疾患モデル動物へ移植して病態改善
米国と英国で臨床試験開始：ES細胞由来網膜色素細胞移植による網膜変性疾患の治療
- 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、**米国で臨床試験を計画**
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



2010年10月 - ヒト胚性幹細胞に基づいた治療薬・治療法を開発しているGeron社(米国カリフォルニア州Menlo Park市)が、米国FDAに提出していた急性期脊髄損傷の治療候補薬GRNOPC1の臨床試験開始、現在までに4例の治療を実施。

GRNOPC1 Phase 1 Multi-Center Spinal Cord Injury Trial

- **Open Label Trial**
- **Subacute, Functionally Complete Spinal Cord Injury with a Neurological Level of T3 to T10**
- **2x10⁶ Cells**
- **Transplant 7-14 Days Post Injury**
- **Temporary Immunosuppression with Low Dose Tacrolimus**
- **Primary Endpoint: Safety**
 - Neurological
 - Overall
- **Secondary Endpoint: Efficacy**
 - ASIA Sensory Score
 - Lower Extremity Motor Score



Geron's Fully Qualified and Licensed GMP Manufacturing Suite



Frozen GRNOPC1 Manufactured Product



Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report

Steven D Schwartz, Jean-Pierre Hubschman, Gad Heilwell, Valentina Franco-Cardenas, Carolyn K Pan, Rosaleen M Ostrick, Edmund Mickunas, Roger Gay, Irina Klimanskaya, Robert Lanza

Funding: Advanced Cell Technology

Background: It has been 13 years since the discovery of human embryonic stem cells (hESCs). Our report provides the first description of hESC-derived cells transplanted into human patients.

Interpretation: The hESC-derived RPE cells showed no signs of hyperproliferation, tumorigenicity, ectopic tissue formation, or apparent rejection after 4 months. The future therapeutic goal will be to treat patients earlier in the disease processes, potentially increasing the likelihood of photoreceptor and central visual rescue.

ヒト多能性幹細胞株の 疾患発症機構と創薬研究における重要性

発症メカニズムと創薬研究に必要な
疾患・健常モデルヒト組織細胞の大量供給

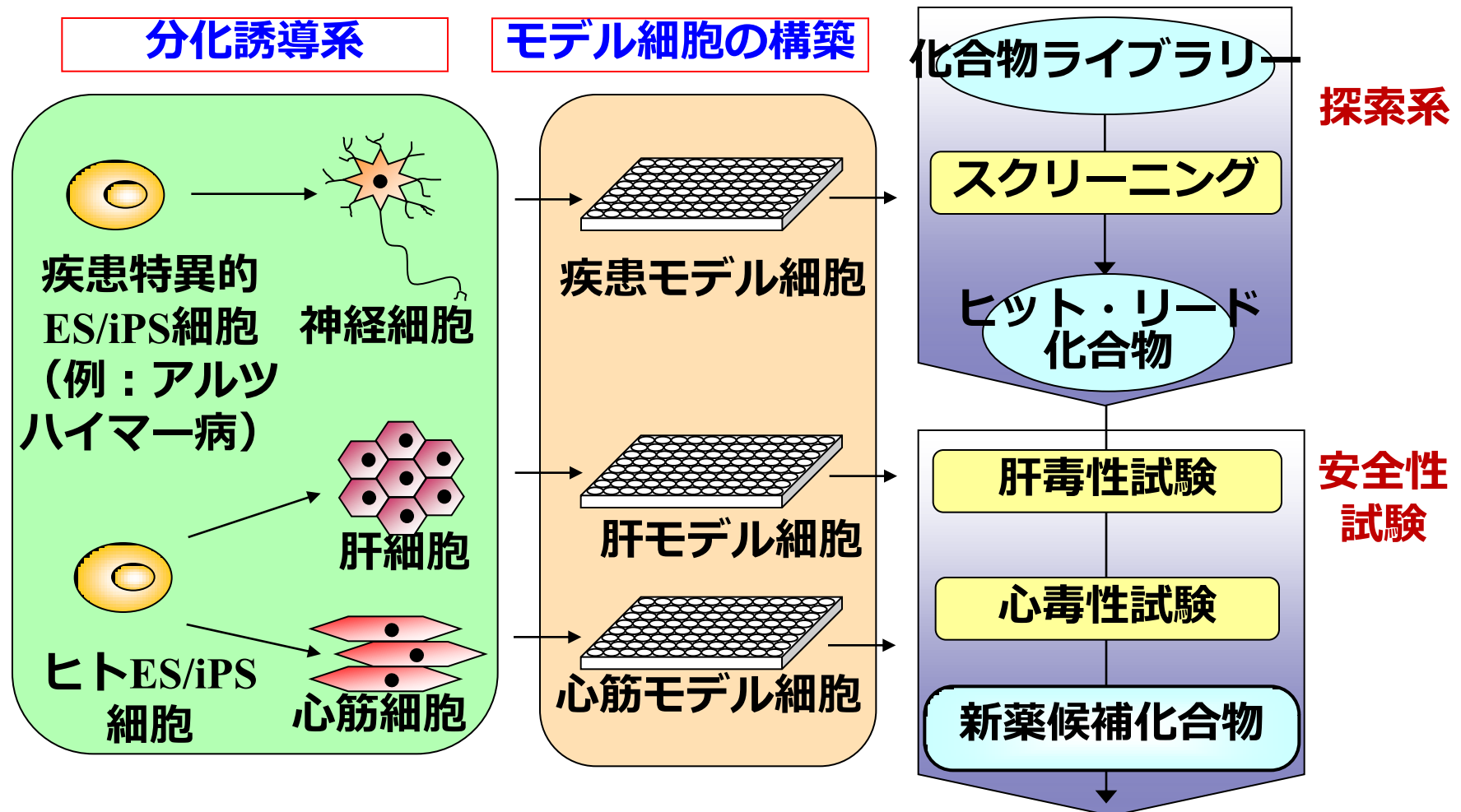
- ・均一な特性(ゲノム)をもつヒト細胞
- ・外来遺伝子ベクターを組み込んだヒト細胞
- ・内在遺伝子を改変したヒト細胞(疾患モデルヒト細胞)
- ・各種細胞内活性を検出するレポーター遺伝子導入ヒト細胞

- ・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

創薬応用を目指したヒトES/iPS細胞由来のモデル細胞作成

- **探索系** (疾患モデル細胞を用いたハイスループットスクリーニング)
- **安全性試験** (心筋モデル細胞などを用いた試験)



患者由来iPS細胞株への期待、但しGEヘルスケアのMinger氏はES細胞株を使用する方針

1. 多能性幹細胞株とは何か：特徴と大きな可能性
2. ES細胞の研究と応用：世界の現状
3. 真の実用化を目指すために必要な多段階技術
4. ES細胞とiPS細胞：研究と応用で相補的關係
5. (参考資料)ES細胞の生命倫理：問題の程度と対応

幹細胞の実用化には 多段階で多面的な 数多くの要素技術開発が必要

1. ES/iPS細胞株の樹立

ES細胞株: 初期胚細胞からの樹立方法

iPS細胞株: 体細胞からの初期化(Reprogramming)方法

2. 培養増殖

安定品質低コスト合成培地の開発

安定品質低コスト培養基質・器材の開発

3. 幹細胞株の大量培養、品質管理

安定高品質の大量培養生産技術の開発

細胞株のゲノム・エピゲノム変異の評価と品質管理

リスク管理された生産供給システム開発

4. 分化誘導、目的細胞選択選別、大量生産

高度のRobust性と低コストの高率分化誘導方法の開発

分化した組織幹細胞、前駆細胞、未成熟細胞、成熟細胞の最適段階の選択

目的細胞種を回収選別するシステムの開発

腫瘍形成リスクをもつ未分化および異常細胞の除去

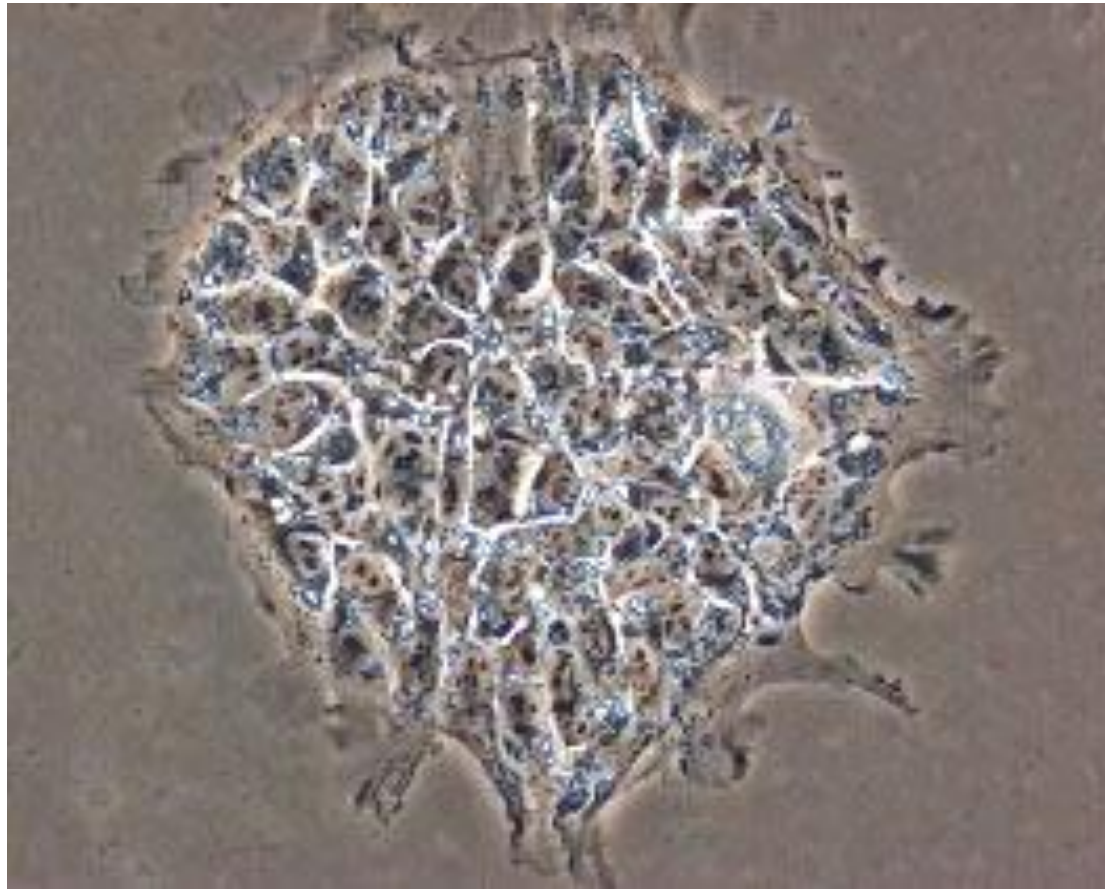
安定高品質分化細胞の大量培養生産技術の開発

5. 実用段階での利用技術

実用最終段階での調製細胞の品質評価と品質管理

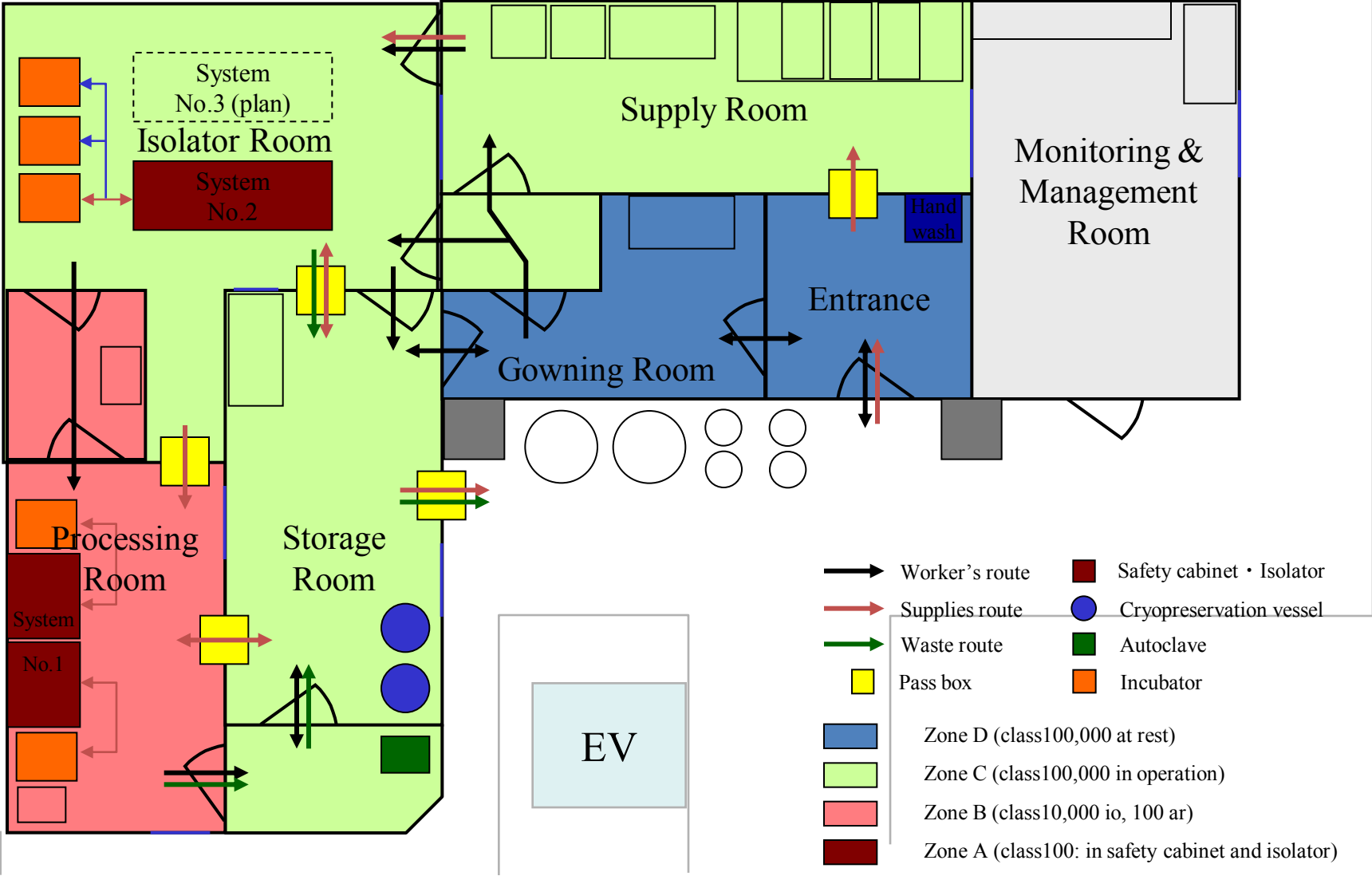
利用技術: 細胞移植法、創薬アッセイ法、など目的に適した多面的技術システム

Human ES cell colony cultured without feeder cells
フィーダー細胞なしで培養されたヒトES細胞コロニー



Human ES/iPS cell lines can be maintained without feeder cells: on the ECM molecules-coated substratum and in defined media

Stem Cell Research Center Cell Processing Center 再生研付属幹細胞医学研究センターに設置された ヒトES細胞用 細胞プロセッシングセンター



Stem Cell Research Center Cell Processing Center



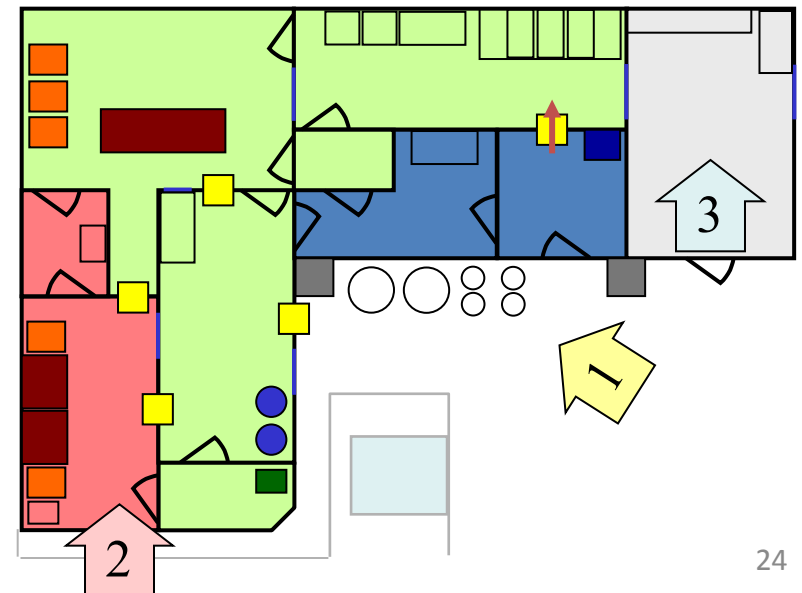
1. Entrance and Over view



2. Cell Processing Room



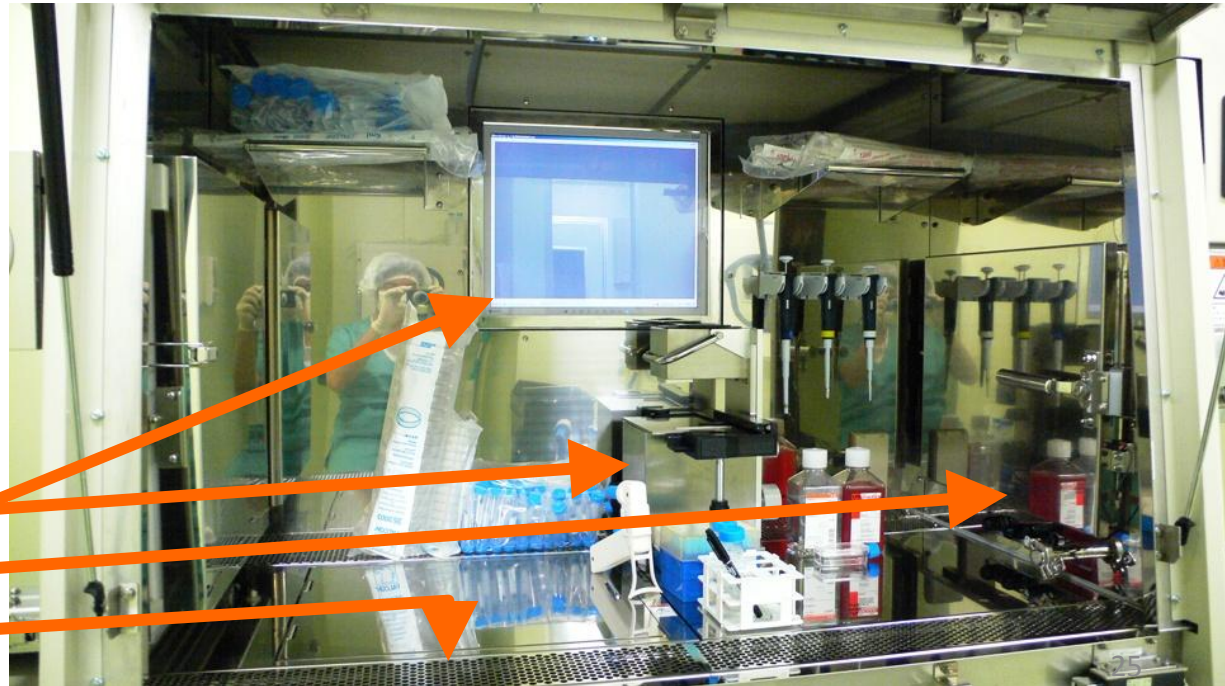
3. Monitoring & Management Room



Isolator System



Over view
Multi gas incubator



Work space inside view
Microscope and monitor
Pass box
Centrifuge

NATURE / NEWS

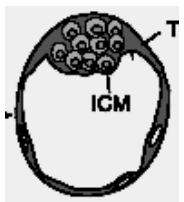
Stem cells that are pure enough for the clinic

High-quality human embryonic stem cells derived without the use of animal products.

06 December 2011

Human embryonic stem cells that are potentially pure enough to be used in therapies have been deposited into the UK Stem Cell Bank, and will soon be available across Europe.

Chemical Compound Tools for ES/iPS Cell Research



Embryo

ES (embryonic stem) Cells

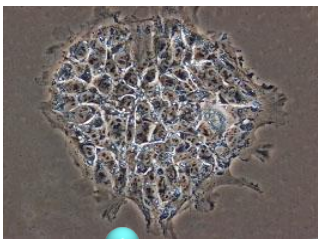
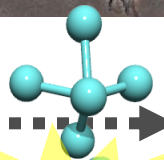
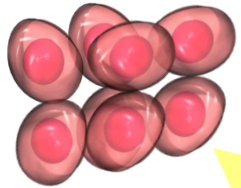
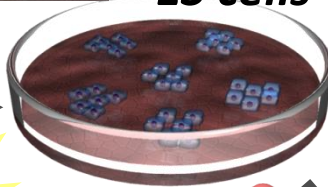


Illustration by Uesugi Group

Primary Cell Culture

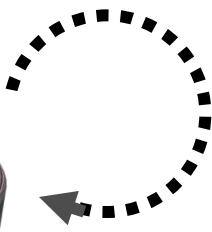


Reprogramming



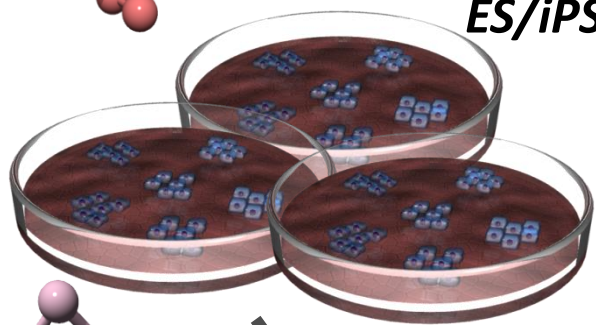
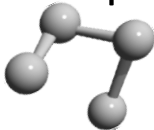
ES cells

iPS cells



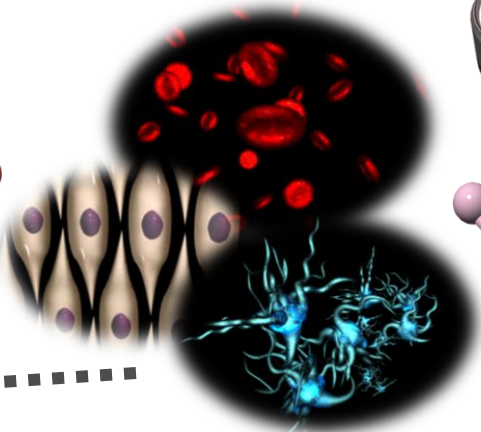
Manipulation

Growth/Expansion

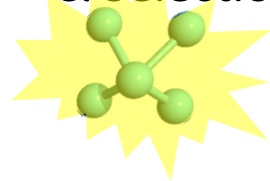


ES/iPS Cells

Transplantation Cell Therapy

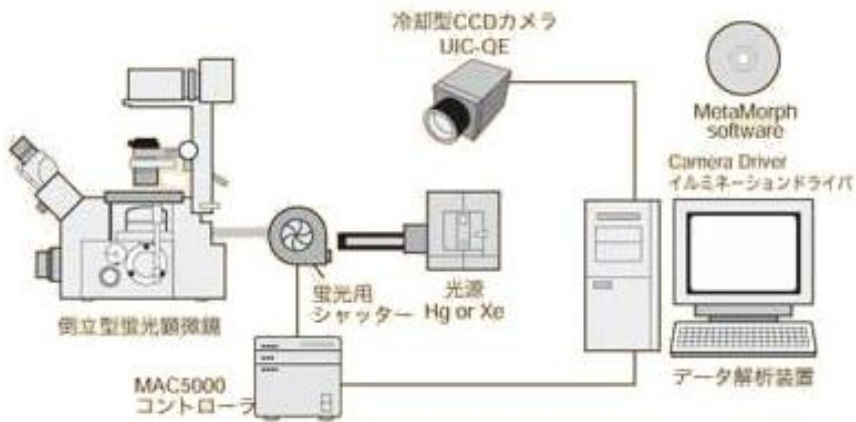


Differentiation & Selection

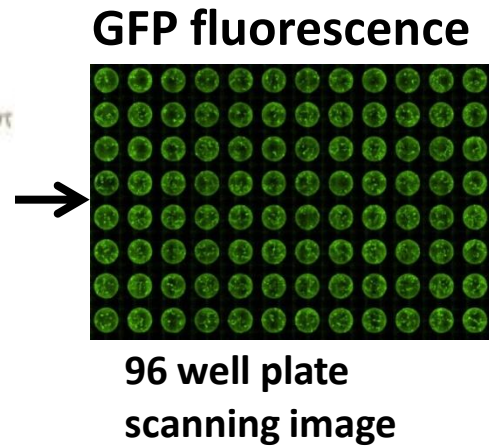


Creation of Disease Model Cells for Disease Mechanism and Drug Discovery Research

Screening system with a reporter GFP gene for cardiomyocyte differentiation, and detection of a chemical compound X

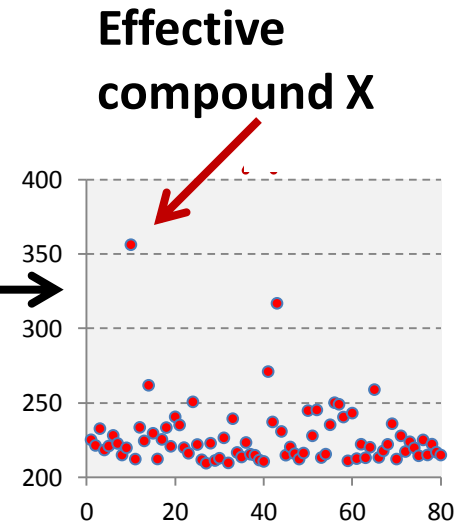


Molecular device/ MetaMorph imaging system



GFP fluorescence

96 well plate scanning image



Effective compound X

Analysis of GFP fluorescence

1. 多能性幹細胞株とは何か：特徴と大きな可能性
2. ES細胞の研究と応用：世界の現状
3. 真の実用化を目指すために必要な多段階技術
4. ES細胞とiPS細胞：研究と応用で相補的關係
5. (参考資料)ES細胞の生命倫理：問題の程度と対応

Democracy Derived? New Trajectories in Pluripotent Stem Cell Research

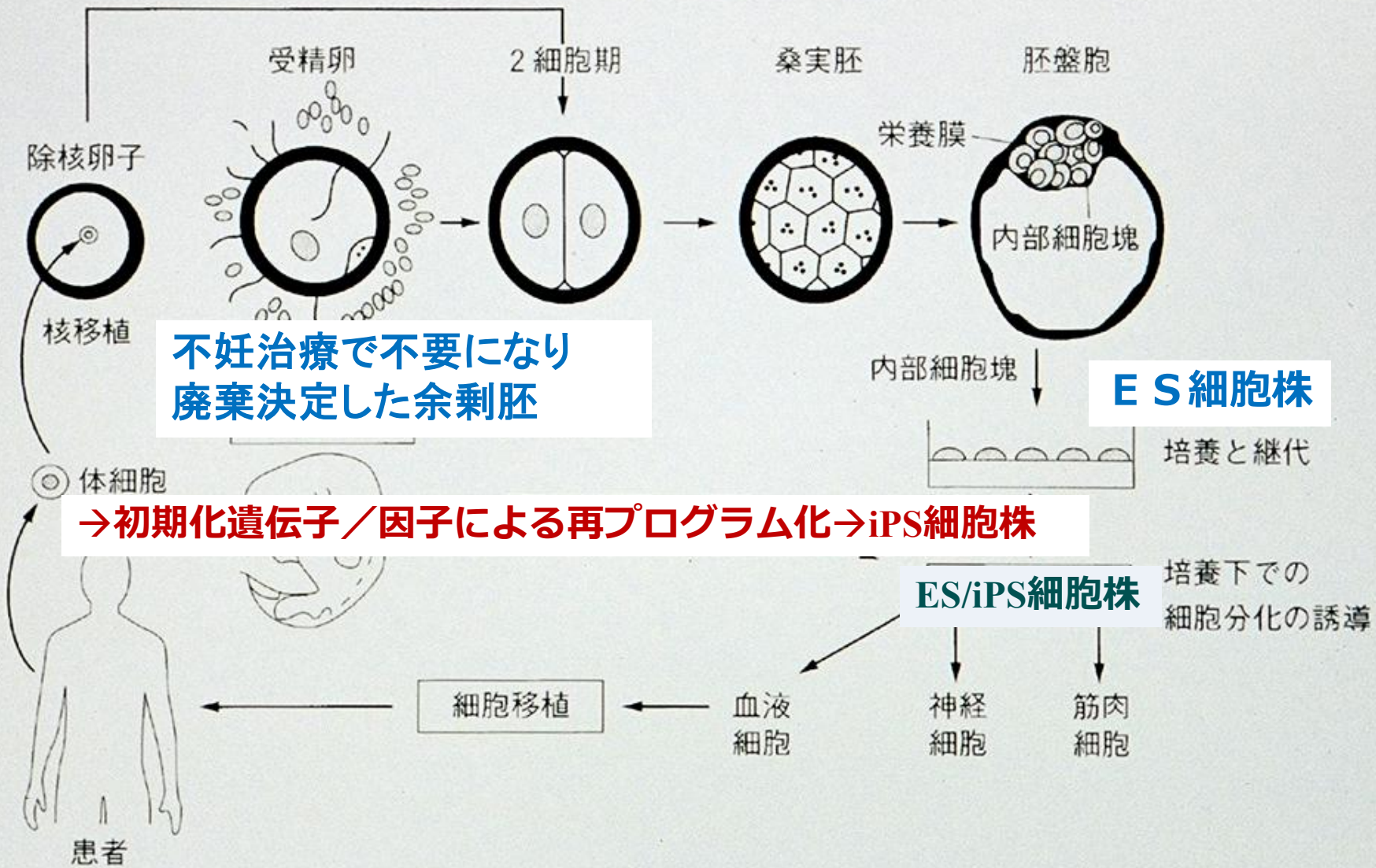
Christopher Thomas Scott, Jennifer B. McCormick, Mindy C. DeRouen,
Jason Owen-Smith

Cell 145, June 10, 2011

How has the development of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) modified the trajectory of stem cell research? Here, coauthorship networks of stem cell research articles and analysis of cell lines used in stem cell research indicate that **hiPSCs are not replacing human embryonic stem cells, but instead, the two cell types are complementary, interdependent research tools.**

Thus, we conclude that a ban on funding for embryonic stem cell research could have unexpected negative ramifications on the nascent field of hiPSCs.

1. 多能性幹細胞株とは何か：特徴と大きな可能性
2. ES細胞の研究と応用：世界の現状
3. 真の実用化を目指すために必要な多段階技術
4. ES細胞とiPS細胞：研究と応用で相補的關係
5. (参考資料)ES細胞の生命倫理：問題の程度と対応



Stem cell support cuts across party lines

NATURE MEDICINE VOLUME 16 | NUMBER 11 | NOVEMBER 2010

米国民の大部分は、ある程度の倫理問題があっても、医学などへの貢献と比べれば、ヒトES細胞研究を推進するべきと考えている。

ACT Secures Patent to Generate Embryonic Stem Cells **Without Embryo Destruction**

IP Coverage for Proprietary Single-Blastomere Technology Could Facilitate Licensing Deals and Partnerships

MARLBOROUGH, Mass. – Feb. 23, 2011. Advanced Cell Technology, Inc. (“ACT”; OTCBB: ACTC), a leader in the field of regenerative medicine, announced today that it has been issued a patent on its “single-blastomere” technique. Patent Number 7,893,315 broadly covers ACT’s proprietary single-blastomere technology that provides a non-destructive alternative for deriving human embryonic stem cell (hESC) lines.

“Of the more than 150 patents and patent applications related to stem cell therapy and regenerative medicine that ACT owns or licenses, this is one of the most significant,” stated Gary Rabin, ACT’s CEO. “This patent covers our progress on a number of fronts, including deriving stem cells from blastomeres under the standards of the European Medicines Agency and the U.S. Food and Drug Administration. We are currently developing a clinical trial in Europe using our proprietary technique and are currently developing a partnership with the United Kingdom’s Wellcome Trust to help facilitate a future partnership that we believe will be mutually beneficial.”

The single-blastomere technology provides a non-destructive alternative to the current method of deriving hESC lines from embryos. This technology is used in preimplantation genetic diagnosis (PGD), which is widely used to screen embryos for genetic disorders. The single-blastomere technique allows for the derivation of hESC lines from embryos that are healthy, completely normal, and differentiate into all cell types, including neurons, insulin-producing cells, blood cells, beating heart cells, and other specialized cell types. The safety record for single-blastomere technology is excellent, with over 100,000 procedures performed routinely as part of IVF processes around the world. ACT’s “embryo-safe” technique has been published in peer-reviewed journals such as *Nature* and *Cell Stem Cell*.



German science organizations slam European court over stem-cell ruling
European Court of Justice had no right to impose moral judgement on science,
says influential group.

08 December 2011

- Alliance of German Scientific Organizations has now publicly criticized an 18 October ruling from the European Court of Justice that bans patenting of inventions involving human embryonic stem (ES) cells.
- The alliance says that the wording of the judgement stretches far beyond the intellectual-property protection issue the court had been asked to consider.
- The Alliance of German Scientific Organizations includes all university rectors and seven research organizations, including the heavyweight Max Planck Society — as well as the Wissenschaftsrat, the government advisory body for science policy, and the DFG, Germany's main science-funding agency.
- It demands that the sentiments expressed in the court's judgement not influence the right of German organizations to fund human ES cell research in Germany, which it says is carried out to the highest ethical standards.