

山中 iPS 細胞特別プロジェクト事後評価（最終評価）報告書

【研究総括】

山中 伸弥（京都大学 iPS 細胞研究所／所長）

【評価委員】（五十音順）

相賀 裕美子（国立遺伝学研究所系統生物研究センター／教授）

佐々木 裕之（九州大学生体防御医学研究所／教授）

竹市 雅俊（委員長：理化学研究所発生・再生総合科学研究センター／センター長）

濱田 博司（大阪大学大学院生命機能研究科／教授）

評価の概要

山中 iPS 細胞特別プロジェクトは、ヒト iPS 細胞の樹立を受けて、戦略的創造研究推進事業チーム型研究（CREST）の研究領域「免疫難病・感染症等の先進医療技術」の中の、山中教授を研究代表者とする研究課題「真に臨床応用できる多能性幹細胞の樹立」を発展させ、山中教授を中心とした研究グループの研究活動を強化支援することを目的に設置されたものである。

このような背景のもと、本プロジェクトは、世界標準となる安全なヒト iPS 細胞の作製技術の確立を目指すと同時に、ヒト疾病の原因探索や創薬スクリーニングへの iPS 細胞の利用、大型動物でのヒト iPS 細胞安全性評価系の構築、効率的な分化誘導法の開発など、iPS 細胞の医療応用で必要とされる幅広い技術課題に包括的に取り組み、同研究分野を牽引する役割を果たしてきた。

本プロジェクトの中で、山中グループは、ウイルスベクターを用いない iPS 細胞誘導に成功するなど、真に臨床応用可能な iPS 細胞作製法の確立に向けて、大きな前進となる成果を生み出している。さらに、様々なヒト遺伝性疾患の患者由来 iPS 細胞の樹立によって、細胞レベルでの病態再現を実現しつつ、創薬スクリーニング系の構築へと短期間で効率的に研究を展開していることは、同グループの研究アクティビティおよび研究の質の高さを表していると言える。

その他のグループでは、ヒト iPS 細胞バンクや大型動物モデルの構築など、将来の臨床応用を見据えた課題を分担することで、山中グループと相互補完する関係を構築している。このようなグループ間の連携は、高品質な iPS 細胞樹立を可能とする新たな初期化因子 *Glis1* の発見に繋がるなど、将来の展開を期待させる成果を生み出したと認められる。

本プロジェクトは、山中研究総括が開拓した iPS 細胞研究をさらに発展させ、国際競争の極めて激しい同分野において、世界を先導する役割を果たしてきた。そして、着実に成果を挙げたことにより、同分野をさらに一段高い水準へと押し上げることに成功している。以上の点から、本プロジェクトは戦略目標「細胞リプログラミングに立脚した幹細胞作製・制御による革新的医療基盤技術の創出」に資する十分な成果が得られたと判断する。

1. 研究プロジェクトの構想および運営

1-1. プロジェクトの全体構想

山中伸弥教授によるヒト iPS 細胞樹立の成功により、免疫拒絶反応のない再生医療の可能性が芽生えると同時に、種々のヒト疾病の原因探索や創薬スクリーニングに関する技術革新が期待されることとなった。これらを真に実現するためには、iPS 細胞を効率よく作製する技術の開発、多能性検定法や分化誘導法の開発、安全性の確保など、多くの問題を解決する必要がある。本プロジェクトの構想は、これらの課題のほぼ全体を包括する形で構築されている。国が定めた戦略目標「細胞リプログラミングに立脚した幹細胞作製・制御による革新的医療基盤技術の創出」に直接対応する内容で、iPS 細胞研究の主要なメニューを網羅しており、同分野の今後進むべき方向性を指し示したものと言える。

当初の構想で掲げた研究課題は、(1) レトロウイルスによらない iPS 細胞樹立法の開発、(2) ヒト iPS 細胞と ES 細胞の比較解析、(3) iPS 細胞の安全性の検証、(4) ヒト疾患 iPS 細胞による病態解明と薬剤探索、の 4 課題であったが、最先端研究開発支援プログラム「iPS 細胞再生医療応用プロジェクト」の開始を受けて、2010 年から本構想は一部変更され、(1) 効率よく安全な iPS 細胞を樹立する方法の開発、(2) iPS 細胞の安全性評価、(3) ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた疾患病態解析、(4) ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いての薬剤探索、の 4 課題へと見直しが図られている。

これらの幅広い研究課題へ取り組むために、本プロジェクトでは、山中、鳥居/今村、國貞、花園、五島 (2010 年～) の各氏をリーダーとする 5 つの研究グループが研究課題を分担する体制が採られている。プロジェクトの基幹部分は山中グループが担当し、他のグループは、将来の医療応用に向けた iPS 細胞バンクの作製、ヒトに代わるモデル動物の作製、細胞リプログラミングに関与する遺伝子探索など、山中グループを補完する構成となっている。応用研究分野のグループは、独自には学術的基盤を築きにくい立場にあるが、山中グループと連携することにより大きな相乗効果を生み出すことに成功している。

1-2. プロジェクトの運営

JST の直轄で、京都リサーチパーク (KRP) 内に研究拠点を速やかに設置したことは、本プロジェクトが世界的競争の中、優位に立つ上で効果的な措置であったと評価される。また、研究途上におけるグループの再編成という柔軟性も、本プロジェクトの優れた側面である。ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた薬剤探索という新たな目的が設定されたこと、或いは新たな初期化因子の発見に伴い五島グループを加えて更なる因子の発見に努めていることなど、プロジェクト研究の進捗に伴い、柔軟な運営が行われている点は高く評価できる。

各研究グループ間の連携については、プロジェクト全体の合同会議が毎年開催されるなど、密な連携に努めていることは評価できる。特に一部のグループでは、グループ間の連携が効果的に研究成果へと結び付いていることが認められ、山中研究総括のリーダーシップの高さを指し示していると言える。このような連携は、個々の研究者レベルの日常的な協力関係を生むことで、予備評価後の成果に繋がっていると認められ、プロジェクト終了後もさらに発展していくことが期待される。

[研究プロジェクトの構想および運営] a+ (特に優れて的確かつ効果的であった)

2. 研究成果

2-1. 山中グループ

本グループは、より安全性の高い iPS 細胞作製法の確立を目指して、リプログラミング過程の解析やリプログラミング技術の改良などに取り組んでいる。プロジェクト開始 2 年程で、レトロウイルスによらない iPS 細胞樹立法の開発に成功するなど、激しい競争の中、当初の目標を着実に達成しており、極めて秀逸な成果をあげていると認められる。

五島グループとの共同研究の結果、新たな初期化因子 **Glis1** を発見したことは、特にインパクトのある優れた成果である。この発見は、未知の初期化因子が他にも存在する可能性を示唆するものであり、リプログラミング過程に関する研究のさらなる展開を予感させるものである。共同研究者の京都大学 iPS 細胞研究所 高橋和利講師は、**Glis1** によるリプログラミング促進機序を明らかにしてきたが、体細胞から iPS 細胞へのリプログラミング過程で原条に類似した状態を経ること、さらに **Glis1** はこの原条様の細胞への誘導を促進することを示したことは、謎に包まれていた体細胞初期化プロセスの研究の一つの方向性を示す大きな進展である。さらに、原条様の状態から iPS 細胞になる部分、つまりリプログラミングの後半を強力に促進する因子があり、これが iPS 細胞の樹立効率を 40 倍も上昇させることを発見した意義も大きい。また本グループでは、多能性幹細胞と体細胞で異なる高次構造をもつクロマチン領域を網羅的に同定しつつあり、iPS 細胞へのリプログラミング過程における染色体高次構造の変化を理解するために必須な取り組みと考えられる。

本グループでは、リプログラミング過程で変化する選択的なスプライシングの探索にも取り組み、リプログラミングに伴ってスプライシング・パターンが変化する 1,000 個以上の遺伝子の同定にも成功した。siRNA による網羅的スクリーニングにより多能性幹細胞でのスプライシングに重要な遺伝子を同定し、それらの遺伝子の幾つかが多能性の維持に必要であることを発見している。これらの成果はいずれも予備評価以降になされたものであり、体細胞初期化プロセスを理解し、その遺伝子制御のカスケードを解明する上で非常に重要な成果である。

さらに、本グループでは、**Tet-ON** 遺伝子発現誘導系を用いて、初期化 4 因子を成体の体細胞で一過性に発現させた場合の影響についても検討を加えている。成体内で 4 因子の発現を継続的に ON にした場合に、4 日後に細胞の異型化、7 日目には異型細胞の間質への浸潤、約 1 ヶ月後には一部の臓器で奇形腫が出現した。最初の 1 週間で OFF に戻すと、一過性に 4 因子を発現した細胞の多くは、正常な組織へと組み込まれて消失したが、一部の細胞は 4 因子の発現を失ったにもかかわらず高い増殖活性を示し、腎臓などで異型細胞として増殖・浸潤を続け、**Wilms 腫瘍**に類似した組織像を呈した。このリプログラミング可能マウスは細胞の運命決定のメカニズム解明に有用と考えられる。すなわち、リプログラミング可能マウスで初期化因子を持続的に発現させると多発生に奇形腫を生じるが、誘導期間の違いにより、細胞が正常な状態に戻るフェーズと増殖を続けるフェーズがあることが示された。この違いを規定する因子を同定できれば、細胞の運命決定、特にがん化のメカニズム解明に繋がる可能性がある。

本グループでは、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、脊髄性筋萎縮

症（SMA）などの神経変性疾患患者より iPS 細胞を樹立し、病態解明に役立てると同時に、これらの疾患に対する治療薬を探索する実験系を開発することも行ってきた。アルツハイマー病に関しては、iPS 細胞を大脳皮質神経細胞へ分化させる方法を確立し、それを用いてアミロイドβ産生を抑制する化合物を同定した。SMA に関しては、患者由来の体細胞から iPS 細胞を作製し、原因遺伝子産物 SMN を指標とした創薬スクリーニングの系を立ち上げつつある。遺伝性 ALS 患者由来の iPS 細胞を作製し、運動神経への分化誘導を行い、その原因となる RNA 代謝に関わるタンパク質の蓄積異常と、形態やストレス応答などの細胞生物学的な異常を同定した。この知見をもとに、ALS 患者由来運動神経細胞を用いた薬剤スクリーニングを行ない、細胞生物学的な異常を改善できる薬剤候補化合物を発見している。これは、ALS 患者由来 iPS 細胞が創薬スクリーニング・プラットフォームとして有効であることを示す成果である。また、常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）患者から iPS 細胞を樹立し、正常細胞との比較によって、病態と関連する可能性のある遺伝子の同定も進行中である。さらに、慢性乳児神経皮膚関節炎症候群（CINCA）患者由来の iPS 細胞を単球へと分化させる系を用いて、IL-1βや IL-6 産生を抑制する化合物も同定している。

また、本グループでは、ヒト iPS 細胞の腎細胞への分化誘導系の構築を目的に、そこに至る途中経路に位置する中間中胚葉への分化誘導を試みた。中間中胚葉のマーカー遺伝子 OSR1 に GFP をノックインしたヒト iPS 細胞を樹立し、これを用いて多数の増殖因子や低分子化合物を探索した結果、高い効率で中間中胚葉、さらには尿細管細胞へと分化誘導できる方法の開発に成功している。これに加えて、ヒト iPS 細胞から膵臓外分泌細胞や肝細胞への分化誘導も既に可能となっている。今後は、これらの細胞への分化効率をさらに高める方法の開発が期待される。

以上のように、本グループでは、リプログラミングの機構に関する基礎的な研究から、ヒト iPS 細胞を利用した神経変性疾患や腎臓・膵臓・肝臓疾患を対象とした創薬スクリーニングにいたるまで、総じて順調な進展を見せており、予備評価以降も成果の積み上げに成功していることは評価できる。

2-2. 國貞グループ

本グループは、ヒト歯髄細胞（間葉系幹細胞）コレクションを有しており、これが iPS 細胞のリソースとして有効であることを証明してきた。抜去歯（親知らず）に存在する歯髄細胞に着目した点は画期的であり、医療廃棄物を活用するユニークな着想は注目に値する。

本グループは歯髄細胞に含まれる幹細胞を培養し、そこから iPS 細胞を樹立する方法を確立した。数多くの歯髄細胞を用いて iPS 細胞の樹立効率を比較検討した結果、年齢によって iPS 細胞の誘導効率が大幅に異なるという興味深い知見が得られた。この発見を端緒に、若年齢層で高発現しており、かつ体細胞初期化を促進する作用のある新規因子を、五島グループとの協力により予備評価以降に同定した。この因子が年齢依存的な iPS 細胞誘導効率の原因であるかは不明であるが、今後その機能と作用機序の解明が待たれる。

さらに特筆すべきことは、HLA のタイピングを行い、多くの日本人のハプロタイプをカバーできる細胞（50 種類）の樹立を目指している点である。HLA ハプロタイプホモ多能性幹細胞バンクは高いカバー率を誇り、将来の再生医療に有用なものとなる可能性が高いので、さらなる採取とタイピング進展が望まれる。本グループでは、既に3つの HLA 遺伝子座がホモの細胞を同定しているが、2ローカスホモからの人

工的アリル除去法が確立できれば、さらに多くのハプロタイプホモ細胞株の確立が可能となり、iPS 細胞バンク構築が加速される可能性も期待される。

さらなるバンクの充実に必要な予算確保が課題となっているようであるが、予備評価以降は、ラット脊髄損傷モデルにおいて歯髄細胞をそのまま移植する治療法の有効性を確認するなど、臨床応用へ向けた開発フェーズへの移行を速めようと試みていることは、的確かつ効果的な取り組みであると評価できる。さらに、今村グループとの連携によって大動物の脊髄損傷治療におけるハプロタイプホモ細胞株の有効性を検討しつつあることは、プロジェクト内の有機的な連携が好ましい効果を生み出しているものと認められる。

2-3. 鳥居／今村グループ

本グループでは、類人猿を除いてヒトに最も近い霊長類の一種であるカニクイザルを、人獣共通感染症のない SPF 環境で飼育・繁殖し、iPS 細胞の安全性評価に供するためのシステム構築と発生工学的手法の確立に取り組んでいる。世界各国のカニクイザルの MHC 遺伝子のハプロタイプ分析を行い、既に多数の MHC ホモ個体の特定に成功している。現在その系統の安定的供給を目指して実験室コロニーの確立を試みている。

iPS 細胞の多能性の検定には、個体作成（キメラ形成）能が評価基準として重要視されることから、本グループではカニクイザルのキメラ個体の作製に重点的に取り組んでいる。未だ ES 細胞や iPS 細胞の培養条件や胚移植法等の検討段階にあり、まだクリアすべき問題が山積しているが、カニクイザルを用いた研究は当初より困難が予想されていた課題であり、時間をかけてひとつひとつ解決していくしかないであろう。今後は、カニクイザル iPS 細胞の樹立や培養について同様な取り組みを行っている花園グループとの連携を図ることや、*in vitro* での分化誘導能や分化細胞の検定などを並行して進めて行くことが望まれる。

細胞移植用免疫隔離カプセルの研究については、まだ有効性が証明されていない段階であるが、免疫を回避しながら、細胞分泌物による治療が有効と認められる場合には、将来の実用化展開が予想されるので、今後さらなる研究の蓄積を期待する。

2-4. 花園グループ

本グループでは、ヒト iPS 細胞を有効かつ安全に臨床応用することを目的として、大型動物（サル・ヒツジ・ブタ）を用いた研究を展開している。

多能性幹細胞には初期状態に近いナイーブ型と、少し分化が進んだプライム型があるが、ヒト、サル、ブタから樹立した iPS 細胞はプライム型であるため、培養や遺伝子操作が困難であり、キメラ動物も作成できなかった。本グループでは、種々の条件下でこれらの多能性幹細胞のナイーブ化を行っており、特にブタにおいて胎児キメラの作成に成功している点は高く評価できる。また、大型動物のナイーブ型 iPS 細胞が栄養外胚葉へ寄与するという知見は、新たな技術を拓く可能性を秘めた重要な発見である。

ヒト iPS 細胞の臨床応用を実現する上で、大型動物を用いた移植実験は必要不可欠となる。本グループでは、ヒト iPS 細胞による造血再生をヒツジで試みており、寿命の短いマウスでは不可能な iPS 細胞治療の有効性・安全性評価を可能にする技術として注目される。また、近交系のクラウン系ミニブタ由来 iPS 細胞を用いた同種同系

移植実験により、良好な免疫状態下では奇形腫形成が認められないことを示したことも評価できる。

今後はサル iPS 細胞のキメラ形成能評価、サル同種移植、ヒツジ体内でのヒト造血系分化誘導技術の確立、移植用の免疫不全 SCID ブタの作出などが、マウスからヒトへの橋渡しの上で注目される課題である。総じて活発に研究が展開され、実際に大きな成果が生まれつつあると評価できるが、社会的にインパクトのある研究が進行中であり、今後さらなる展開に期待したい。

2-5. 五島グループ

本グループは、2 万種のヒトタンパク質発現リソースをもとに、ハイスループットのタンパク質合成技術や発現リソースデータベースを活用しつつ、核初期化機構に関わる新規ヒト遺伝子の探索と、同定した新規遺伝子を用いた新規 iPS 細胞樹立方法の研究を行っている。

その中で、1,400 余の転写因子から Klf4 の代替因子を探索した結果、新たな初期化促進因子 Glis1 を発見したことは特筆に値する成果である。Glis1 は Klf4 を含む 4 つの初期化因子と細胞リプログラミングにおいて相乗効果を発揮するが、この転写因子は c-Myc や Klf4 と相互作用することで安定化し、既知の iPS 細胞誘導促進因子の転写を上昇させることが分かってきた。Glis1 の作用機序を明らかにすることは初期化機構を解明する一助となることが期待される。また、Glis1 の発見はさらなる未知因子の存在を予感させ、今後の新規因子探索の新たな展開が注目される。

本グループと山中グループの相互作用は明らかに好ましい効果を生み出しており、その結果、科学技術的にインパクトのある成果を生んだと考えられる。特許出願等も適切に行なわれており、報道において Glis1 は“魔法の遺伝子”として紹介されるなど、社会への発信も十分に行なわれている。今後は、Glis1 の作用機序の解明、さらなる新規初期化促進因子の同定を土台として、初期化因子の組み合わせの最適化など、実用化へ向けた研究がさらに進展するものと期待する。

以上ここまで、山中 iPS 細胞特別プロジェクトの 5 つのグループの研究成果について述べてきた。当初の構想に沿って、ウイルスベクターを用いない iPS 細胞作成法の開発や新規初期化促進因子の同定が行なわれるなど、本プロジェクトは、ほぼ全般的に良好な研究展開を示してきたと言える。Nature、Science 誌を含む学術誌に多数の論文が発表され、その他の外部発表や特許出願等も総じて適切に行われている。最先端分野で起こりやすいことではあるが、諸外国において確実性に欠ける報告も散見される中で、本プロジェクトからは良質で重要度の高い研究成果が生産され続けている。

iPS 作製技術の発見以来、本分野は、生命科学の中で最もホットな研究分野となった。従って、山中教授のパイオニアとしての立場を超えて、本プロジェクトも激しい国際競争に晒される宿命にある。実際、ここ数年来、各国から優れた研究成果が次々と発表される状況にあるが、その中で、山中グループは Glis1 を発見するなど、国際的優位に立つ業績を上げ続けていることは高く評価される。過去、我が国のライフサイエンス分野では、欧米に水をあけられることが多かったが、本プロジェクトに見られるように独自の展開が始まりつつあり、今後に期待が持てる状況である。

ES 細胞を用いた再生医療への期待は、10 年以上前からわき起こったが、ヒト ES 細胞を作製する上での倫理上の問題等、乗り越えるべき課題が山積みしていた。山中教授によるヒト iPS 細胞の樹立成功は、それまでの障壁を一挙に崩し、多能性幹細胞

の医学利用を現実のものとしている。本プロジェクトの成果はまだ実用段階には至っていないが、着々と実用化の方向に進んでいることは疑いない。初期化促進因子の同定、初期化機構の解明、安全性評価、ヒト疾患由来 iPS 細胞を用いた病態解明や薬剤スクリーニング、大型動物の iPS 細胞のナイーブ化・キメラ形成能評価、大型動物への移植実験など幅広い課題において着実な進展が見られ、ライフサイエンス分野の他の研究と比べると、際だって将来の実用化が期待できるプロジェクトと断言することができる。

〔研究活動の状況〕 a (良好な研究展開を示した)

〔研究成果 (科学的側面)〕 a+ (成果として秀逸である)

〔研究成果 (産業・社会的側面)〕 a+ (成果として秀逸である)

3. 総合所見

本プロジェクトは、CREST 研究領域「免疫難病・感染症等の先進医療技術」における研究課題「真に臨床応用できる多能性幹細胞の樹立」を継続・発展させる研究として発足している。iPS 細胞を樹立するための新しい技術開発とその安全性の検証に関しては、山中グループによって、すでに多数の論文が出版され、とりわけ、Glis1 導入による iPS 細胞誘導の高効率化はインパクトの高い発見である。その後の Glis1 の作用機構に関する研究も、未発表であるが順調に進展している。また、安全性を確保するためには、分化抵抗性細胞を除去すればよいことを、ニューロスフェアの脳・脊髄内への移植実験により明らかにしている。これらの成果は、iPS 細胞をより高精度かつ効率よく分離し、また、いかに腫瘍形成を抑制して安全性を確保するかについて、技術革新を行うために極めて重要である。一方、実際の医療応用において、どの方法や技術を選択すればよいかについては、まだまだ試行錯誤の段階で、さらなる研究が必要である。山中グループは、リプログラミング過程の分子機構についての研究も進めており、その成果もこの革新的医療基盤技術の創出に将来貢献することが期待される。

ヒト疾患特異的 iPS 細胞を作製して疾病病態を探る試みには、特定の細胞を分化誘導する技術の開発が必須であるが、腎細胞、膵臓細胞、肝細胞、大脳皮質細胞等、様々な分化誘導法に関する研究も進行中で、腎細胞については尿細管形成にも成功している。また、膵臓、肝細胞の最終分化が特定の化合物によって誘導できるという知見も得られており、興味深い。薬剤探索研究については、SMA 患者等から iPS 細胞が樹立され、薬剤スクリーニング系が構築されつつある。ただし、国際競争が極めて激しい分野であり、今後いかに優位に立ち続けるかが課題であろう。

山中グループ以外のグループも、それぞれ独自の研究を展開している。國貞グループによる、ヒト歯芽細胞の収集と HLA ハプロタイプホモの iPS 細胞バンクの作製という試みは極めてユニークであるが、この系が将来の医療に利用されるためには、それを促すための戦略が必要であろう。鳥居/今村グループは、iPS 研究のための霊長類モデルを確立することを目指し、MHC 遺伝子ホモのカニクイザルを特定すると共に、その皮膚細胞から iPS 細胞を樹立し、そのキメラ能を確認する研究に取り組んでいる。長期に渡る研究になると想定され、本プロジェクトで培った他のグループとの連携を活かした取り組みが今後も望まれる。花園グループによる iPS・ES 細胞の“ナイーブ化”に関する研究はユニークであると同時に、着実な進捗状況が高く評価され

る。一方、ヒツジでのヒト造血系の構築の試みは、この手法がどの程度、将来の医学へ貢献できるかについて未知の部分が多く残されており、今後の取り組みに期待したい。五島グループは、細胞初期化因子の網羅的な探索に取り組み、山中グループ他との共同研究を通じて成果が上がっており、この連携が今後も発展していくと期待したい。

以上の通り、山中 iPS 細胞特別プロジェクトは非常に生産的で、iPS 細胞研究の初期体制構築というミッションについて十分有効な役割を果たしており、極めて優秀な研究水準を示したことは疑うまでもない。一方、本プロジェクトは、iPS 細胞研究のほぼ全領域をカバーしており、これはもはや1プロジェクトに任せておくべき問題ではないとも考えられる。幸いにも山中研究総括は、京都大学 iPS 細胞研究所を率いる立場にあり、この研究所が中核となって、わが国における本研究分野の国際的優位性が維持され続けることを望みたい。最後に、山中研究総括が本プロジェクトの最終年度にノーベル生理学・医学賞に輝いたことは特筆すべきである。山中研究総括に深い敬意を表するとともに、わが国における iPS 細胞研究分野がますます発展できる環境が整ったことは喜ばしい限りである。

〔総合評価〕 A+ (戦略目標に資する十分な成果が得られた)

以上