

解析を試みた。

(倫理面への配慮)

研究代表者に各分担研究者から提供されるデータは、それぞれの研究機関で倫理審査を通す必要のないもの(マウス由来のデータや商用のサンプルを購入したもの等)、もしくは倫理審査を通過したものに限定されている。

C. 研究結果

第1のデータ収集方式の検討については、市販の電子ラボノート製品を調査した。うち1社の製品は、完全自社開発ということで、今後必要に応じてカスタマイズが可能である利点があり、別の2社の製品は海外の企業が育て上げてきたもので、世界的にも大きなシェアを誇り、機能的にも充実していた。一方、いずれの製品でも、最低でも既存システムの移行及び既存データの本システムへの変換作業をうまく行うための仕組みが必要であることが判明した。そこで、まずは海外の製品を一つパイロット的に研究分担者のグループで使用していただき、その使用感などをレポートしてもらうこととした。あわせて、従来の紙ベースでの実験ノート記入の延長として、デジタルペンの導入を検討した。すなわち、専用の用紙をたばねたノートに従来のように実験情報を記入してもらう(画像を貼付けたりすることはできない)。すると、記入したデータが電子的な形で自動的にサーバに格納される仕組みである。こちらの方法も得られたデータの文字情報を活用することが難しいなどの問題点があるが、こちらについても、実際に班員に利用していただくこととした。

第2のシステム設計については、まず、初年度中に導入が可能なパイロット用システムを担うハードウェアとして、4社の製品を比較し、拡張性、冗長性が最も優れている日立製作所のサーバシステムを導入した。さらに、本格的な情報基盤システムについては、部品の調達時期などの関係で、予算の繰越を行い、H24年度にわたって仕様策定、

調達、導入等を行った。また、これに伴って、システムを活用するのに役立つソフトウェアの開発も進めている。詳しくは、H23年度の総括報告書および、H24年度の報告書を参照されたい。

第3のデータ解析については、現在3種類のデータの提供を受けている。まず、東京女子医科大学 大和雅之教授からマウスの造血幹細胞と関連する6種類の細胞におけるRNA-Seq法による遺伝子発現データの提供を受け、より詳しく遺伝子発現データの解析をおこなった。具体的には生データのクオリティチェック、マッピングと発現量の異なる遺伝子群のGene Ontology解析などの標準的な解析を行った。造血幹細胞(HSC)とそれが分化誘導して得られた造血前駆細胞(HPC)におけるそれぞれのRNA-Seqデータをもとに、独自開発した手法によって推定した遺伝子ネットワーク(転写因子とそのターゲット遺伝子群)の変化を調べた。これにより、生データの再解析からみえる諸問題の洗い出し、包括的でより深化したデータ解析法、効率的な細胞分化制御のための新たな方法論などのディスカッションを行った上で、現在実験での検証を検討してもらっている。

次に、共同研究者の大阪大学 西田幸二教授が提供した4種類の細胞(iPS細胞、iPS細胞由来神経堤細胞、iPS細胞由来内皮様細胞、培養角膜内皮細胞)から東京女子医科大学 大和雅之教授が抽出したRNA-Seqデータの提供を受けた。こちらでも独自に解析を行ったところ、それぞれの細胞に特異的に発現しているmiRNA群がみつかり、それらがそれぞれの細胞の状態の維持にかかわっている可能性があることがわかった。これらについても、現在大和研において検証実験を計画してもらっているところである。最後に、国立成育医療センターの梅澤教授から、様々な組織由来のiPS細胞におけるDNAのメチル化状態の経時変化を計測したデータを提供された。本データについても、現在独自の解析を進めている。

D. 健康危険情報

該当なし

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) Yamashita R., Sugano S., Suzuki Y.,
Nakai K. DataBase of Transcriptional
Start Sites progress report in 2012.
Nucleic Acids Research. Vol. 40:
D150-D154, 2011.

(2) Park S., Nakai K. A regression analysis
of gene expression in ES cells reveals
two gene classes that are
significantly different in epigenetic
patterns. BMC Bioinformatics.
12(Suppl 1):S50, 2011.

2. 学会発表

特になし

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の臨床実用化研究事業）
分担研究報告書

ヒト体性幹細胞、ES/iPS細胞を用いた分化能の評価法の確立に関する研究

研究分担者

中辻憲夫

京都大学再生医科学研究所 教授

研究要旨

ヒト幹細胞を用いた再生医療技術の早期実用化を図り国民への技術還元を行うことを使命とし、安全性・有効性をより高めるための革新的なヒト幹細胞に関する研究開発を持続的に行う研究開発体制の構築を目指し、研究を実施した。我々が京都大学再生医科学研究所にて実践してきた基礎研究用のヒト ES 細胞株の樹立経験と特性解析にて蓄積してきた培養/解析技術をもとに、臨床用ヒト ES 細胞株を作成・利用する上で必要となるプロセス及び品質管理の各段階で収集されるデータを効率良く活用するため必要となるプロセス及び品質管理の方向性について検討を開始、検査項目・評価基準などの標準化へ向けての作業を進め、作業・分析項目の抽出やデータフォーマットについて検討した。ついで、ES 細胞の臨床利用における安全性保証のための品質管理体制について国際的な枠組みにかかる調査を開始した。

A. 研究目的

ヒト幹細胞を用いた再生医療技術を臨床（治療）、疾患研究、創薬、検査等（以下、「臨床応用」と言う。）に対して早期の実用化を図り国民への技術還元を行うと共に、安全性・有効性をより高めるための革新的なヒト幹細胞に関する研究開発を持続的に行うことができる研究開発体制の構築を目的とする。

段階で収集されるデータを効率良く活用するための検査項目・評価基準などの標準化を行うとともに、正確かつ効率的な実験データの記録方法を確立する。これらの研究から、さらに後工程で生じる問題からのフィードバックに対し、より迅速・適切な対応を可能とするシステムの構築を試みる。

（倫理面への配慮）

B. 研究方法

これまで、基礎研究用のヒト ES 細胞株の樹立と特性解析を行ってきた。そこで蓄積した培養/解析技術をもとに、臨床用ヒト ES 細胞株を作成・利用する上で必要となるプロセス及び品質管理の

ヒト ES 細胞を用いる研究に関しては、文部科学省「ヒト ES 細胞の樹立および分配に関する指針」「ヒト ES 細胞の使用に関する指針」に従い実施された。

C. 研究結果

本分担研究を実施する京都大学再生医科学研究所では、基礎研究用のヒト ES 細胞株の樹立と特性解析を行ってきた。このような研究の過程で蓄積した培養/解析技術をもとに、臨床用ヒト ES 細胞株を作成・利用する上で必要となるプロセス及び品質管理の方向性について検討を行った。臨床用細胞の樹立・培養の各段階で収集されるデータを効率良く活用するため、検査項目・評価基準などの標準化へ向けての作業を進めた。検査結果などを含め、正確かつ効率的に実験データを記録するため、適切なデータフォーマットの検証を進めている。将来的な臨床応用可能な ES 細胞の樹立や特性解析に対応出来るよう分析能力を向上させるとともに、データの効率的な収集・記録を行うことが必要であり、作業・分析項目の抽出やデータフォーマットについて検討した。同時に、ES 細胞の臨床利用における安全性保証のための品質管理体制について国際的な枠組みでの調査を行った。

D. 健康危険情報

該当なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Aizawa, E., Hirabayashi, Y., Iwanaga, Y., Suzuki, K., Sakurai, K., Shimoji, M., Aiba, K., Wada, T., Tooi, N., Kawase, E., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Mitani, K. Efficient and accurate homologous recombination in hESCs and hiPSCs using helper-dependent adenoviral vectors. *Molecular Therapy*, in press.
- (2) Hasegawa, K., Yasuda, S., Teo, J.-L., Nguyen, C., McMillan, M., Hsieh, C.-L., Suemori, H., Nakatsuji, N., Yamamoto, M., Miyabayashi, T., Lutzko, C., Pera, M. F. and Kahn, M. Wnt signaling orchestration with a small molecule DYRK inhibitor provides long-term

xeno-free human pluripotent cell expansion. *Stem Cells Translational Medicine*, 2012;1:18-28 (2012).

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の臨床実用化研究事業）
分担研究報告書

ヒト体性幹細胞、ES/iPS細胞を用いた分化能の評価法の確立に関する研究

研究分担者

中畑龍俊

京都大学iPS細胞研究所 特定拠点教授

研究要旨

ヒト体性幹細胞・ES/iPS細胞を用いた分化能評価法の確立にむけ、分化に伴う遺伝子発現プロファイルやエピゲノムの推移をデータベース化することが肝要である。当該目的の実現のため、本年度においては、ES/iPS細胞の血球系への分化に焦点を当て検討を行った。血球系細胞の発生過程を模倣する形でiPS細胞から中胚葉分化、血液、血管内皮共通の母細胞であるヘマンジオブラストを経て各種血液細胞が産生される系の構築に成功、さらに無血清、フィーダー細胞を用いない培養法を確立した。これら成果をうけ、臍帯血から分離したCD34陽性細胞、単球、更にそれから分化させたマクロファージ、樹状細胞と同一の臍帯血から樹立したiPS細胞から誘導したCD34陽性細胞、単球やマクロファージ、樹状細胞の機能、細胞表面抗原の発現、遺伝子発現プロファイル、エピゲノムなどの比較検討を開始したところである。

A. 研究目的

ヒト体性幹細胞、ES/iPS細胞を用いた分化能の評価法を確立し、広く研究者間の利益に供するよう活用するために、分化に伴う遺伝子発現プロファイルやエピゲノムの推移をデータベース化することを目的とする。分担研究者らは、平成23年度までに、厚生労働省難治性疾患克服事業の研究助成を受けて、様々な疾患を持つ180例以上に及ぶ患者から線維芽細胞株を収集し、これらの細胞資源を用いて疾患/患者特異的iPS細胞を精力的に樹立している。また、これらiPS細胞から様々な細胞系列への分化系を構築中である。これらを生かし、標準的なES細胞、iPS細胞のほか、膨大な患者由来iPS細胞の分化データを集積して集中的に解析することにより、日本人におけるiPS細胞の分化能の基盤となるデータを得るとともに、

それらをもとにバイオインフォマティクス解析を行い、ヒトES/iPS細胞からの標準的な細胞分化法を確定することを目指す。

B. 研究方法

本年度は、ES/iPS細胞から各種細胞系列への分化解析のスタートとして、血球系への分化について検討する。代表的な体性幹細胞である臍帯血CD34陽性細胞分画に含まれる造血幹/前駆細胞とヒトiPS細胞から分化させたCD34陽性細胞を経時的に回収し、それらの遺伝子発現プロファイル、エピゲノム、増殖・分化能などを比較検討する。また、臍帯血およびiPS細胞から誘導したCD34陽性細胞からの各種血球への安定した大量産生法について検討する。特に、高血圧、糖尿病、

痛風、自己炎症症候群など様々な疾患のキープレイヤーである単球/マクロファージ/樹状細胞へ分化させ、臍帯血中の単球から直接誘導した細胞との比較を行う。

(倫理面への配慮)

本研究では個人情報 の 附 帯 し た ヒ ト 由 来 試 料 の 取 り 扱 い は な い 。 組 み 替 え 遺 伝 子 指 針 、 ヒ ト ES 指 針 に 則 っ て 実 験 計 画 を 提 出 し 、 そ れ を 遵 守 し て 研 究 を 行 っ て い る 。

C. 研究結果

発生過程を模倣する形で中胚葉分化、血液、血管内皮共通の母細胞であるヘマンジオブラストを経て各種血液細胞が産生される系を構築できた。さらに従来の OP9 フィーダー細胞を用いた血球分化系を改良し、無血清、フィーダー細胞を用いない培養法を確立した。サイトカインの種類とタイミングを調節することにより、複数の iPS 細胞株から安定して単球を誘導する系を確立することに成功した。この系は Feeder 細胞と血清に依存せず安定した収量の単球を得ることができることから、多数の患者由来の単球を扱う疾患解析に好適であると考えられた。分化した単球は、CD14 陽性で炎症性サイトカインを産生し、ケモアトラクタントに対する遊走能を示した。OVA 抗原取り込み能も保持していた。

また、この単球を樹状細胞・マクロファージへ分化させることができた。分化させた樹状細胞は、成熟に伴って Naive T 細胞への抗原提示能が亢進したため、機能的にも成熟しているものと考えられた。現在、臍帯血から分離した CD34 陽性細胞、単球、更にそれから分化させたマクロファージ、樹状細胞と同一の臍帯血から樹立した iPS 細胞から誘導した CD34 陽性細胞、単球やマクロファージ、樹状細胞の機能、細胞表面抗原の発現、遺伝子発現プロファイル、エピゲノムなどの比較検討を開始している。それらの情報を集積しデータベース化を進める予定である。

D. 健康危険情報 特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Morishima T., Watanabe K., Niwa A., Fujino H., Matsubara H., Adachi S., Suemori H., Nakahata T., Heike T.: Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *J. Cell. Physiol.* 226(5):1283-1291, 2011.
- (2) Heike T., Saito M., Nishikomori R., Yasumi T., Nakahata T.: Autoinflammatory diseases—a new entity of inflammation. *Inflammation and Regeneration* 31:125-136, 2011.
- (3) Yamanaka Y., Kitano A., Takao K., Prasansuklab A., Mushiroad T., Yamazaki K., Kumada T., Shibata M., Takaoka Y., Awaya T., Kato T., Nakahata T., Heike T.: Inactivation of fibroblast growth factor binding protein 3 causes anxiety-related behaviors. *Mol. Cell. Neurosci.* 46:200-212, 2011.
- (4) Kamio T., Ito E., Ohara A., Kosaka Y., Tsuchida M., Yagasaki H., Mugishima H., Yabe H., Morimoto A., Ohga S., Muramatsu H., Hama A., Kaneko T., Nagasawa M., Kikuta A., Osugi Y., Bessho F., Nakahata T., Tsukimoto I., Kojima S.: Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica* 96: 814-819, 2011.
- (5) Wakao S., Kitada M., Kuroda Y., Shigemoto T., Matsuse D., Akashi H., Tanimura Y., Tsuchiyama K., Kikuchi T., Goda M., Nakahata T., Fujiyoshi Y., Dezawa M. : Multilineage-differentiating Stress

- Enduring (Muse) cells are a primary source of iPS cells in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:9875-9880, 2011.
- (6) Yoshida N., Yagasaki H., Hama A., Takahashi Y., Kosaka Y., Kobayashi R., Yabe H., Kaneko T., Tsuchida M., Ohara A., Nakahata T., Kojima S.: Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica* 96: 771-774, 2011.
- (7) Kawagoe S., Higuchi T., Xing-Li M., Shimada Y., Dhimizu H., Fukuda T., Chang H., Nakahata T., Fukada S., Ida H., Ohashi T., Eto Y.: Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells derived from a murine model of Pompe disease and differentiation of Pompe-iPS cells into skeletal muscle cells. *Mol. Genet. Metab.* 104: 123-128, 2011
- (8) Niwa A., Heike T., Umeda K., Oshima K., Kato I., Sakai H., Suemori H., Nakahata T., Saito M.: A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PloS ONE* 2011;6(7):e22261.
- (9) Murata Y., Yasumi T., Shirakawa R., Izawa K., Sakai H., Abe J., Tanaka N., Kawai T., Oshima K., Saito M., Nishikomori R., Ohara O., Ishii E., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.: Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc 13-4 protein. *Blood* 118: 1225-1230, 2011.
- (10) Yahata N., Asai M., Kitaoka S., Takahashi K., Asaka I., Hioki H., Kaneko T., Maruyama K., Saido T.C., Nakahata T., Asada T., Yamanaka S., Iwata N., Inoue H.: Anti-Ab Drug Screening Platform Using Human iPS Cell-Derived Neurons for the Treatment of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 2011;6(9):e25788.
- (11) Kato I, Niwa A, Heike T, Fujino H, Saito MK, Umeda K., Hiramatsu H., Ito M., Morita M., Nishinaka Y., Adachi S., Ishikawa F., Tatsutoshi Nakahata T.: Identification of Hepatic Niche Harboring Human Acute Lymphoblastic Leukemic Cells via the SDF-1/CXCR4 Axis. *PLoS ONE* 2011; 6(11): e27042.
- (12) Tanaka N., Nishikomori R., Saito M., Izawa K., Sakuma M., Morimoto T., Kambe N., Watanabe S., Oshima K., Ohara O., Goldbach-Mansky R., Aksentijevich I., Arostegui J.I., Yague Jm Joost F., van Gijn M.E., SaintBasile G., Pontillo A., Kawai T., Yasumi T., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.: High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome patients; the results of an international multicenter collaborative study. *Arthritis Rheum.* 63:3625-3632, 2011.
- (13) Hiejima E., Komatsu H., Takeda Y., Sogo T., Inui A., Okafuji I., Nishikomori R., Nakahata T., Fujisawa T.: Acute liver failure in young children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis without macrophage activation syndrome: Report of two cases. *J. Pediatr. Child Health* in press.
- (14) Sakai H., Okafuji I., Nishikomori R., Abe J., Izawa K., Kambe N., Yasumi T., Nakahata T., Heike T.: The CD40-CD40L axis and INF-g play critical roles in Langerhans giant cell formation. *Int. Immunol.* in press.

- (15) Izawa K., Hijikata A., Tanaka N., Kawai T., Saito M.K., Goldbach-Mansky R., Aksentijevich I., Yasumi T., Nakahata T., Heike T., Nishikomori R., Ohara O.: Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. DNA Res. in press.
- (16) 中畑龍俊: 疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子治療・個別化医療. 小児科 52 (12): 1743-1749, 2011.
- (17) 中畑龍俊: 再生医療の進歩 (II 再生医療の進歩). 小児科診療 75(1): 57-63, 2012.
2. 学会発表
- (1) 中畑龍俊: 特別講演; iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 60 回日本医学検査学会 2011 年 6 月 5 日 東京国際フォーラム
- (2) 中畑龍俊: 特別講演; 小児疾患における iPS 細胞の応用. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会 2011 年 11 月 25~27 日 (25 日) ベイシア文化ホール (前橋市)
- (3) 中畑龍俊: 教育講演; 疾患特異的 iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 28 回日本医学会総会 2011 年 9 月 17-18 日 (18 日) 東京国際展示場
- (4) 中畑龍俊、伊藤守: 再生医療の基礎研究に有用なヒト化動物. 第 57 回日本実験動物学会総会 シンポジウム 3 (テーマ: 再生医療の幕を開く動物実験) 5 月 12-14 日 (14 日) 京都テルサ
- (5) Tatsutoshi Nakahata: Various clinical applications of human induced pluripotent stem cells. (Keynote Lecture) 2011 International Symposium on Recent Advances in Pluripotent Stem Cells & 7th Annual Meeting of Taiwan Society for Stem Cell Research 2011 年 10 月 1-2 日 (1 日) Taipei Medical University (Taiwan)
- (6) 栗屋智就、加藤竹雄、柴田実、中畑龍俊、平家俊男: ヒト ES/iPS 細胞から骨格筋への分化誘導と筋疾患への応用. 第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 12-14 日 (13 日) (口演) グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
- (7) 田中孝之、斎藤潤、西小森隆太、平家俊男、中畑龍俊: 患者特異的 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群細胞モザイクでの病態の再現と解析. 第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 12-14 日 (14 日) (口演) グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
- (8) 酒井秀政、岡藤郁夫、西小森隆太、阿部純也、八角高裕、中畑龍俊、平家俊男: Langhans 型巨細胞の形成には CD40-CD40L シグナルが必須である. 第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 12-14 日 (13 日) (ポスター) グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
- (9) 田中尚子、井澤和司、斎藤潤、作間未織、大嶋宏一、小原収、西小森隆太、森本剛、中畑龍俊、平家俊男: NLRP3 体細胞モザイクは CINCA 症候群の 25% 以上に認められる. 第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 12-14 日 (13 日) (ポスター) グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
- (10) Daisuke Hasegawa, Xiaojuan Chen, Shinsuke Hirabayashi, Shizuka Watanabe, Yuhji Zaike, Masahiro Tsuchida, Atsuko Masunaga, Ayami Yoshimi, Asahito Hama, Seiji Kojima, Masafumi Ito, Yasushi Ishida, Tatsutoshi Nakahata, Atsushi: Refractory Cytopenia of Childhood (RCC): A prospective study using a central review by the JSPH. 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10

月 14-16 日 (14 日) 名古屋国際会議場

- (11) Miyuki Tsumura, Satoshi Okada, Hidetoshi Sakai, Ryuta Nishikomori, Shin' ichiro Yasunaga, Motoaki Ohtsubo, Toshio Heike, Tatsutoshi Nakahata, Yoshihiro Takihara, Masao Kobayashi: Identification of a novel type of AD-STAT1 deficiency with mutations in the SH2 domain. 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月 14-16 日 (15 日) 名古屋国際会議場

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

発明の名称：多能性幹細胞から樹状細胞
への分化誘導法

出願日：2011/2/23

出願番号：61/445,856

出願国：米国

発明者：中畑龍俊/斎藤潤/丹羽明/柳町昌
克

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morishima T., Watanabe K., Niwa A., Fujino H., Matsubara H., Adachi S., Suemori H., Na kahata T., Heik e T.	Neutrophil differenti on from human-induce d pluripotent stem cell	J. Cell. Physiol.	226	1283-1291	2011
Yamanaka Y., Kitano A., Takas o K., Prasansuk lab A., Mushiro da T., Yamazaki K., Kumada T., Shibata M., Takaoka Y., A waya T., Kato T., Nakahata T., Heike T	Inactivation of fibrobla st growth factor bindi ng protein 3 causes a nxiety-related behavior	Mol. Cell. Neuro sci.	46	200-212	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kamio T., Ito E., Ohara A., K _{osaka} Y., Tsuchida M., Yagasa _{ki} H., Mugishi _{ma} H., Yabe H., Morimoto A., Ohga S., Muramatsu H., Hama A., Kaneko T., Nagasawa M., Kikuta A., Osugi Y., Bessho F., Nakahata T., Tsukimoto I., Kojima S.	Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group.	Haematologica	96	814-819	2011
Wakao S., Kitada M., Kuroda Y., Shigemoto T., Matsuse D., Akashi H., Tals _{nimura} Y., Tsus _{chiyama} K., Kikuchi T., Goda M., Nakahata T., Fujiyoshi Y.,	Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse) cells are a primary source of iPS cells in human fibroblasts.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	108	9875-9880	2011
Yoshida N., Yagasaki H., Hamada A., Takahashi Y., Kosaka Y., Kobayashi R., Yabe H., Kaneko T., Tsuchida M., Ohara A., Nakahata T., Kojima S.	Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia.	Haematologica	96	771-774	2011
Kawagoe S., Higuruchi T., Xing-Li M., Shimada Y., Dhimizu H., Fukuda T., Chang H., Nakahata T., Fukuda S., Ida H., Ohashi T., Eto Y.	Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells derived from a murine model of Pompe disease and differentiation of Pompe-iPS cells into skeletal muscle cells.	Mol. Genet. Metab.	104	123-128	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Niwa A., Heike T., Umeda K., Oshima K., Kato I., Sakai H., Suemori H., Nakahata T., Saito M.	A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors.	PLoS ONE	6	e22261	2011
Murata Y., Yasumi T., Shirakawa R., Izawa K., Sakai H., Abe J., Tanaka N., Kawai T., Oshima K., Saito M., Nishikomori R., Ohara O., Ishii E., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.	Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc 13-4 protein.	Blood	118	1225-1230	2011
Yahata N., Asai M., Kitaoka S., Takahashi K., Asaka I., Heurions H., Kaneko T., Maruyama K., Saido T.C., Nakahata T., Asada T., Yamana S., Iwata N., Inoue H.	Anti-Ab Drug Screening Platform Using Human iPS Cell-Derived Neurons for the Treatment of Alzheimer's Disease.	PLoS ONE	6	e25788	2011
Kato I, Niwa A, Heike T, Fujino H, Saito M, K, Umeda K., Hiramatsu H., Ito M., Morita M., Nishinaka Y., Adachi S., Ishikawa F., Tatsutoshi Nakahata T.	Identification of Hepatic Niche Harboring Human Acute Lymphoblastic Leukemic Cells via the SDF-1/CXCR4 Axis.	PLoS ONE	6	e27042	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tanaka N., Nishikomori R., Saito M., Izawa K., Sakuma M., Morimoto T., Kambe N., Watanabe S., Oshima K., Ohara O., Goldbach-Mansky R., Aksentijevich I., Arostegui J.I., Yague Jm Joost F., van Gijn M.E., Saint-Basile G., Pontillo A., Kawai T., Yasumi T., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.	High incidence of NLR P3 somatic mosaicism in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome patients; the results of an international multicenter collaborative study.	Arthritis Rheum.	63	3625-3632	2011
Hiejima E., Komatsu H., Takeida Y., Sogo T., Inui A., Okafuji I., Nishikomori R., Nakahata T., Fujisawa T.	Acute liver failure in young children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis without macrophage activation syndrome: Report of two cases.	J. Pediatr. Child Health			in press
Sakai H., Okafuji I., Nishikomori R., Abe J., Izawa K., Kambe N., Yasumi T., Nakahata	The CD40-CD40L axis and INF-g play critical roles in Langerhans giant cell formation.	Int. Immunol.			in press
Izawa K., Hijikata A., Tanaka N., Kawai T., Saito M.K., Goldbach-Mansky R., Aksentijevich I., Yasumi T., Nakahata T., Heike T., Nishikomori R., Ohara O.	Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLR P3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing.	DNA Res.			in press

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の臨床実用化研究事業）
分担研究報告書

研究分担者

西田幸二

大阪大学大学院医学系研究科脳神経感覚器外科（眼科学） 教授

研究要旨

培養口腔組織及び口腔粘膜上皮細胞シートの航空機による輸送を可能とする技術開発を行った。さらにこの成果をもとに研究代表者の東京大学医科学研究所中井 謙太 教授と共同して複数施設において輸送技術についての情報共有を行うための研究基盤構築の準備を行った。

A. 研究目的

本研究の全体計画は情報通信技術等を活用することによって、自律（自立）分散した研究機関の連携を図り、研究結果及び成果の効率的活用を可能とする研究開発機関間の Open Innovation 環境を構築することである。これにより、継続的新知見及び新技術創出、具体的研究データに基づく臨床利用のためのヒト幹細胞の品質（製造工程等を含む。）基準等を得て、より安全で有効で倫理面を考慮したヒト幹細胞を用いた再生医療の実用化が可能となる。

再生医療の普及に当たっては組織・細胞採取あるいは保存場所から細胞培養施設への、組織や凍結バンク細胞の搬送、また細胞培養施設から移植施設への再生医療製品の搬送が極めて重要なステップとなる。しかしながら、現在までのところ搬送に関する手順、基準などが確立されていないため、本研究では搬送に関する手順や基準の確立を行い、これに関する情報共有ネットワークの構築を行って、情報を広く活用できる基盤を構築する。

B. 研究方法

まず口腔粘膜組織および培養口腔粘膜上皮細胞シートの航空機による輸送を可能とする技術開発を行った。具体的には口腔粘膜組織及び培養口腔粘膜上皮細胞シート用輸送容器を開発し、空輸試験を行って輸送前後の細胞シート評価を行い、輸送技術についての評価を行った。

さらに東京大学・中井とともに細胞輸送技術についての研究情報を共有するための共通のデータベースに登録できる研究情報基盤構築を行い、再生医療実現化のために輸送に関する研究者間の情報共有システムを構築する準備を行った。

（倫理面への配慮）

「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、「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ついて」、「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

について、「ヒト組織を利用する医療行為の安全性確保・保存・使用に関するガイドライン」、「ヒト由来組織・組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する指針」、「医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について」を遵守して研究を遂行する。

C. 研究結果

まず口腔粘膜上皮組織および培養口腔粘膜上皮細胞シートの輸送中の温度および気圧のモニタリングを行うことが出来、航空機による輸送可能な技術開発を行った。輸送容器の具体的な構造についてだが、3.5 cm の dish の蓋を外した状態で、滅菌した包装容器によって密閉して細菌などによる生物学的汚染の可能性を排除する。さらに空輸時の気圧の低下に対応するために、この包装容器を気密容器に収納する。気密容器は O-ring によって内部の圧を保つことができるようになっている。気密容器の上部には蓄熱材（組織輸送時には融点 6℃ のテトラデカン、細胞シートの輸送時には融点 36℃ の n-エイコサン）を用いて輸送容器内部の保温を図る。輸送容器の外枠は真空による保温部となっており、輸送容器内部の保温が可能となっている。さらに輸送中の温度・圧をモニタリングできるように気密容器内に温度・気圧モニターを入れて測定する。この輸送容器を航空機内では客室内へ持ち込んで、座席へと静置した。

この輸送容器の基本性能として、融点 36℃ の n-エイコサンを用いた場合に外気温 $21 \leq T(^{\circ}\text{C}) \leq 25$ 下で内気温 $34 \leq T(^{\circ}\text{C}) \leq 37$ を 68.6 ± 3.8 時間維持できること、外気温 $3 \leq T(^{\circ}\text{C}) \leq 5$ 下で内気温 $34 \leq T(^{\circ}\text{C}) \leq 37$ を 24.1 ± 1.2 時間維持できることを確認した。融点 6℃ のテトラデカンを用いた場合には、外気温 $16 \leq T(^{\circ}\text{C}) \leq 20$ 下で内気温 $6 \leq T(^{\circ}\text{C}) \leq 8$ を 61.7 ± 3.6 時間維持できることを確認した。また気圧保持性能については外気圧 $650 \leq P(\text{hPa}) \leq 700$ 下で内気圧 $975 \leq P(\text{hPa}) \leq 1,025$ を 24 時間維持できる事を確認した。また無菌性保持性能とし

て包装容器内部の無菌性を外部への細菌 (*Bacillus subtilis*) (1.2×10^5 CFU/ml) 塗布条件下で維持できることを確認した。

まずウサギ口腔粘膜組織の空輸試験を行った。輸送後の組織中の細胞形態正常であること、輸送後組織中の基底部には p63 陽性細胞が存在することを確認した。さらに輸送したウサギ口腔粘膜組織を用いて培養上皮細胞シートの作製が可能であり、K3/76、p63、ZO-1 の発現を確認することが出来た。これらの事から、輸送した組織を用いた細胞シートの作成が可能であると考えられた。

次にヒト口腔粘膜上皮細胞シートは CPC から出荷した日のうちに移植に用いることとし、12 時間以内での移植を想定している。そこで、本輸送容器を用いて培養ヒト口腔粘膜上皮細胞シートを空輸した。なお空港での保安検査では X 線照射による細胞への影響を回避するために事前に細胞輸送を航空会社へ申請し、X 線を回避した。まず輸送中の輸送容器内外の温度および圧変化であるが、容器外の温度変化に関わらず、輸送容器内は安定して 32℃ 以上の温度を保持している。また気圧変化についても上空で気圧低下に関わらず、輸送容器内の気圧は輸送期間全体を通して 1,000 hPa 以上を維持していた。輸送前後において細胞シートの評価を行った。まず位相差顕微鏡によって輸送前後の細胞シートに含まれる細胞の形態を評価したところ、輸送の前後において細胞形態に変化がないことが確認できた。さらに 20℃ 30 分の低温処理によって輸送前および後の細胞シートはシート状の剥離が可能であった。細胞シート中の生細胞率、上皮細胞純度も輸送前後において同等であった。免疫染色での評価では、輸送前後の細胞で K3/76（分化マーカー）、p63（幹細胞マーカー）、ZO-1（タイトジャンクション関連蛋白）、MUC16（眼表面特異的膜貫通型ムチン）の発現のパターンは同様であった。以上の結果より、航空機を用いて輸送した細胞シート

は出荷後12時間以内であれば、移植に用いることができると考えられた。

次に細胞輸送についての研究情報基盤の準備についてだが、我々の細胞輸送に関する研究データ、標準手順書（standard operating procedure: SOP）などを東京大学・中井と共有した。そして輸送容器に必要なとされる規格、輸送中の必要とされるモニタリング情報（輸送容器内部の温度、圧、衝撃など）、細胞の形態（付着、浮遊、凍結など）、輸送前後の評価項目（細胞生存率、マーカーなど）など分析すべきパラメーターについて整理を行い、輸送手順書の必要項目について検討を行った。検討結果をもとに東京大学・中井とともに情報共有システム構築に着手した。来年度はこれらの成果をもとにして情報共有研究基盤構築および収集した情報の解析・評価を進めることとする。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kikuchi M, Hayashi R, Kanakubo S, Ogasawara A, Yamato M, Osumi N, Nishida K. Neural crest-derived multipotent cells in the adult mouse iris stroma. *Genes Cells*. 16:273-281, 2011.
- (2) Sakurai M, Hayashi R, Kageyama T, Yamato M, Nishida K. Induction of putative stratified epithelial progenitor cells in vitro from mouse-induced pluripotent stem cells. *J Artif Organs*. 14:58-66, 2011.
- (3) Kikuchi M, Hayashi R, Kanakubo S, Ogasawara A, Yamato M, Osumi N, Nishida K. Neural crest-derived multipotent cells in the adult mouse iris stroma. *Genes Cells*. 16:273-81, 2011.
- (4) Watanabe R, Hayashi R, Kimura Y, Tanaka Y, Kageyama T, Hara S, Tabata Y, Nishida K. A Novel Gelatin Hydrogel Carrier Sheet for Corneal Endothelial Transplantation. *Tissue Eng Part A*. 2011; 17: 2213-9.

2. 学会発表

- (1) 西田幸二、病態から考える角膜疾患の診療、第20回霧島眼科研鑽会、宮田眼科、宮崎、

2011年5月21日

- (2) Kohji Nishida, Application of stem cell technology to corneal disease, The 10th Qindao international symposium of Ophthalmology、インターコンチネンタル青島、青島、中国、2011年5月28日
- (3) 西田幸二、オキュラーサーフェスの角化メカニズム、箱根ドライアイクラブ、ヒルトン小田原リゾート&スパ、神奈川 2011年6月24日
- (4) 西田幸二、大阪府女医会総会、再生医療の現状と未来、ホテルグランビア大阪、大阪、2011年6月26日
- (5) 西田幸二、お茶の水眼科先進医療セミナー、東京医科歯科大学、東京、2011年7月1日
- (6) 西田幸二、角膜表面上皮幹細胞異常、ウェスティン都ホテル京都、京都、2011年8月6日
- (7) 西田幸二、角膜移植の基本、全層角膜移植、ウェスティン都ホテル京都、京都、2011年8月6日
- (8) 西田幸二、角膜パーツ移植、ウェスティン都ホテル京都、京都、2011年8月6日
- (9) 西田幸二、大阪眼科手術の会、スイスホテル南海大阪、大阪、2011年11月19日
- (10) 西田幸二、角膜関連疾患編、東京国際フォーラム、東京、2011年10月9日

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

- (1) 大家義則、林竜平、西田幸二、野崎貴之、森圭祐 包装容器及びそれを用いた試料観察方法 特願2011-179492
- (2) 大家義則、林竜平、西田幸二、野崎貴之、森圭祐 細胞輸送容器 特願2011-179491

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
大家義則, 西田幸二	組織幹細胞と角膜 再生	井川洋二ら	実験医学	羊土社	東京	2011	3109-3112

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌	巻号	ページ	出版年
辻川元一, 西田幸二	臨床応用の進歩 眼科 角膜領域再生医療	日本臨床	69巻12号	2235-2240	2011
相馬剛至, 西田幸二	ドナー検査と保存法	眼科	53巻12号	1709-1713	2011
相馬剛至, 西田幸二	DSAEKのドナー挿入法	眼科手術	24巻4号	401-403	2011
相馬剛至, 西田幸二	角結膜 培養上皮細胞 シート移植	眼科	53巻10号	1451-1455	2011
桜田一洋, 森山剛, 西田幸二, 畠賢一郎, 中西淳	再生医療の産業化に対 して必要な仕組みとは	再生医療	10巻2号	111-124	2011
林竜平, 西田幸二	幹細胞を用いた角膜再 生医療	再生医療	10巻2号	104-108	2011

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の臨床実用化研究事業）
分担研究報告書

研究分担者

大和 雅之

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 教授

研究要旨

本研究は、各種幹細胞、及びそこから分化した細胞を mRNA-Seq 法を用いて、遺伝子発現を網羅的に解析、それらのデータを研究代表者に提供、各種バイオインフォマティクスの解析を行い、もって幹細胞の評価指標パッケージの構築に資することを目的とする。その目的を達成するため、平成 23 年度において、まずマウスの造血幹細胞と関連する 6 種類の細胞を RNA-seq 法によって遺伝子発現を網羅的に解析し、研究代表者に提供した。その結果、造血幹細胞（HSC）とそれが分化誘導して得られた造血前駆細胞（HPC）との間において、遺伝子ネットワークの変化が確認され、分化誘導を基盤とする分化誘導品質評価に有効である可能性が示された。さらに、研究分担者である西田教授から供与された 4 種類のヒト細胞（iPS 細胞、iPS 細胞由来神経堤細胞、iPS 細胞由来内皮様細胞、培養角膜内皮細胞）においても mRNA-Seq 法による遺伝子発現データを研究代表者に提供、それぞれの細胞に特異的に発現している miRNA 群を見出し、細胞の品質管理に有用である可能性が示された。

A. 研究目的

ヒト幹細胞を用いた再生医療技術を臨床（治療）、疾患研究、創薬、検査等（以下、「臨床応用」と言う。）に対して早期の実用化を図り国民への技術還元を行うと共に、安全性・有効性をより高めるための革新的なヒト幹細胞に関する研究開発を持続的に進めることができる研究開発体制の構築を目的とする。

B. 研究方法

各種幹細胞、及びそこから分化した細胞を mRNA-Seq 法を用いて、遺伝子発現を網羅的に解析した。これらのデータをもとに、東京大学医科学研究所 中井謙太 教授と共同で、各種バイオインフォマティクスの解析を行い幹細胞の解析を行

った。

（倫理面への配慮）

ヒト iPS 細胞は、既にバンクから供給されているものである。また、初代培養に使用した角膜内皮も海外のアイバンクから購入したものである。従って、いずれも匿名化されており、倫理的な問題は非常に少ないと考えられる

C. 研究結果

本年度、我々はマウスの造血幹細胞と関連する 6 種類の細胞を RNA-seq 法によって遺伝子発現を網羅的に解析した。一方で、これらの遺伝子発現データのより詳細な解析（生データのクオリティチェック、マッピングと発現量の異なる遺伝

子群の Gene Ontology 解析など) を東京大学医科学研究所 中井謙太 教授に依頼した。その結果、造血幹細胞 (HSC) とそれが分化誘導して得られた造血前駆細胞 (HPC) との間において、非常に興味深い遺伝子ネットワーク (転写因子とそのターゲット遺伝子群) の変化が確認され、それに基づいていくつかの仮説が考えられた。従って、現在、その仮説の検証を検討している。

さらに、共同研究者の大阪大学 西田幸二 教授から供与された4種類のヒト細胞 (iPS 細胞、iPS 細胞由来神経堤細胞、iPS 細胞由来内皮様細胞、培養角膜内皮細胞) においても mRNA-Seq 法によって遺伝子発現を網羅的に解析した。これらのデータに関しても、東京大学医科学研究所 中井謙太 教授に詳細な解析を依頼した。その結果、それぞれの細胞に特異的に発現している miRNA 群がみつき、それらがそれぞれの細胞の状態の維持にかかわっている可能性が考えられた。従って、現在、これら miRNA とそれぞれの細胞の表現型との関連を検討する実験を計画中である。

D. 健康危険情報
特になし

E. 研究発表
1. 論文発表
特になし
2. 学会発表
特になし

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の臨床実用化研究事業）
分担研究報告書

研究分担者

山中 伸弥

京都大学iPS細胞研究所 所長／教授

研究要旨

再生医療に用いるiPS細胞ストックの製造のためのデータを収集することを目的とし、iPS細胞の品質管理・技術開発における設備の整備に注力する。そのため、平成23年度においては、①検体採取のためのドナーリクルートに向けたiPS細胞外来、②ドナー候補者のHLA解析部門である品質管理技術開発室、③iPS細胞評価プロセスを検討するためのiPS細胞品質管理室へiPS細胞の樹立用機器および解析用機器などの設備整備を実施した。加えて、中核機関と共有すべきデータ情報について、申請者と意見交換を行なった。ドナーリクルートのための同意説明文書、研究計画書等の書類整備を進めた。さらに、iPS細胞製造のための手順書や使用試薬についてGMPに準拠する書類についても整備を進めた。

A. 研究目的

再生医療に用いるiPS細胞ストックの製造のためのデータを収集

B. 研究方法

次の3部門（①検体採取のためのドナーリクルートに向けたiPS細胞外来、②ドナー候補者のHLA解析部門である品質管理技術開発室、③iPS細胞評価プロセスを検討するためのiPS細胞品質管理室）へiPS細胞の樹立用機器および解析用機器などの設備整備を実施する。また、中核機関と共有すべき情報について、意見交換を行う。更に、文部科学省再生医療実現化ハイウエイ課題とも連携し、ドナーリクルートのための同意説明文書、研究計画書等の書類を整備する。

（倫理面への配慮）

iPS細胞の樹立に用いるヒト試料の採取に関しては、京都大学医学部附属病院iPS細胞臨床開発部外来にて担当医師より被験者（提供者）へ、文書による説明を行い、十分理解されたことを確認したうえで、同意取得し、試料採取を行う。尚、説明の際には、事前に京都大学医学部附属病院の倫理委員会にて、承認された研究計画書及び同意説明文書を用いることとする。

C. 研究結果

平成23年度は、iPS細胞の品質管理・技術開発における設備の整備に注力した。特に次の3部門（①検体採取のためのドナーリクルートに向けたiPS細胞外来、②ドナー候補者のHLA解析部門である品質管理技術開発室、③iPS細胞評価プ