

201242001A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

(再生医療関係研究分野)

ヒト幹細胞を用いた再生医療の
臨床実用化のための基盤構築に関する研究

平成24年度 総括・分担研究 [REDACTED] 報告書

研究代表者 中井 謙太

平成25(2013)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

ヒト幹細胞を用いた再生医療の臨床実用化のための基盤構築に関する研究 中井 謙太	3
--	---

II. 分担研究報告

1. 統括・情報基盤に関する研究 中井 謙太	9
2. 情報システム・情報解析に関する研究 秋山 昌範	12
3. iPS樹立に関する研究 山中 伸弥	16
4. 分化誘導に関する研究 中畑 龍俊	18
5. 臨床用ヒトES細胞株の樹立に関する研究 中辻 憲夫	25
6. iPS分化誘導に関する研究 岡野 栄之	28
7. ES細胞のマニピュレーションに関する研究 梅澤 明弘	40
8. 輸送に関する研究 西田 幸二	42
9. 移植、分化誘導に関する研究 高橋 政代	46
10. 体性幹分化誘導に関する研究 大和 雅之	48

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	55
---------------------	----

IV. 資料

1. 研究班会議資料	79
2. 導入したシステムの概要	95
3. 開発ソフト	
1) 開発ソフトのキャプチャー画面	97
2) iPS細胞、ES細胞、体性幹細胞の解析ツール	105
3) 実験データ管理システム	157
4) iPS細胞、ES細胞、体性幹細胞の情報の可視化システム	215
4. ELSI委員会 準備会資料	261

I . 総括研究報告

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）

分担研究年度終了報告書

研究分担者

中井 謙太

東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

各拠点機関において、再生医療におけるそれぞれの分担内容の研究を進めるとともに、それらの研究から得られた生データをなるべく現場の研究者に受け入れ易い形で収集し、共有を図ることで、再生医療研究の臨床応用を加速することを目的とした情報システムの構築を進めている。平成24年度には、前年度の繰越予算を用いて、先行する4つの拠点機関とデータセンターにそのような機器を設置し、必要なソフト類を開発した。また、次世代シーケンサーを用いた解析を中核機関で受託し、情報共有のルール作りのための準備作業を行った。その結果、徐々にデータが集まり始め、中核機関と拠点機関との共同研究も広がりを見せ始めた。本プロジェクトの専用ウェブページも拡充した。

研究分担者

秋山昌範	東京大学政策ビジョンセンター 教授
山中伸弥	京都大学 iPS 細胞研究所 所長
中畑龍俊	京都大学 iPS 細胞研究所 特定拠点教授
中辻憲夫	京都大学再生医科学研究所 教授
岡野栄之	慶應義塾大学医学部生理学 教授
梅澤明弘	国立成育医療研究センター 再生医療センター センター長
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
高橋政代	独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センタ ー網膜再生医療研究チーム チームリーダー
大和雅之	東京女子医科大学 教授

A. 研究目的

ヒト等の幹細胞を用いた再生医療技術の早期実用化に向け、再生医療に関わる我が国の研究機関が情報共有を図ることによって、All JAPAN 体制で研究を加速させるための情報基盤の構築を目的とする。

B. 研究方法

研究分担者が所属する各拠点機関に情報収集用の計算機を設置し、それぞれの実験・臨床研究現場から産出される生データをリアルタイムで収集する。収集したデータは、各拠点機関で指定した共有条件（中核機関のみ、プロジェクト内部のみでの閲覧等）を付加し、暗号化した形で、データセンターに設置したサーバーに転送する。中核機関では、閲覧を許可されたデータをデータマイニングの手法等を用いて分析し、新知見等が得られ

た場合は、その内容や条件に応じてデータ提供者や国民に向けてフィードバックする。特に、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基準等の確立を目指し、より安全・有効で倫理面を考慮した再生医療の実用化を行う。

過去2年間において、各分担研究者には、実験・研究の工程ごとに担当内容を設定したが、本研究の最大の課題は、自立的に研究を行っている研究機関に対していかに貴重なデータの提出を促し、共有を進めていくかであるため、実際のデータ収集では担当内容に限定せず、提出データの内容を自由に決めてもらった。具体的には、主に以下の取組を行った。

- 1) 4つの拠点機関と中核機関、データセンターを安全に結ぶ、セキュリティー面に十分に配慮したコンピュータシステム（情報基盤）を構築。
- 2) 実験室内での情報を電子化するため、また収集されたデータを総合的に活用するためのソフトウェア（収集データの相互関係の可視化等）を試作。
- 3) 現場の情報入力負担を考慮しながら、実験室の情報を電子化するための、デジタルペンによる実験ノート記載や電子ラボノートシステムの利用を促進。
- 4) 一部の分担研究者と研究代表者の間で、研究代表者の専門をいかした共同研究を展開。
- 5) 研究協力者に DNA シークエンシングの専門家を加え、分担研究者から提供を受けたサンプルを配列決定ならびに解析し、その結果をフィードバック。
- 6) データ提供や公開に伴う不利益を最小限にするため、公開可能なデータ内容に関する倫理面での基準や、知的所有権に関するルール作り等を進める ELSI 委員会の設立準備。
- 7) プロジェクトを一般国民や再生医療関係者に広く知ってもらうための広報活動。今年度は特にウェブサイトを拡充した。

（倫理面への配慮）

本研究においては、個別研究における数値情報、評価情報等を取り扱うことから、個人情報等の利用が研究遂行上で必須になる可能性は少ないと考えられるが、研究者等の個人情報や、ヒト細胞提供を行っていただいた方の情報が含まれることがあることから被調査対象者等に対しては、口頭及び書面による研究の趣旨等に関してインフォームドコンセントを行ったうえ、書面による同意を得た者のみを調査の対象とする。また、研究においての個人情報にかかわる情報については調査票及びデータ等に関する管理を厳重に行い、漏洩等不測の事態に備えるものとする。尚、本研究においての個人情報を含む調査等に関しては、それぞれの研究者の所属する機関の倫理審査委員会等の承認を得た上で実施するものとする。

さらに本研究で得られた成果を一般公開する時には、公開可能な範囲（内容・対象等）を、専門の委員会（ELSI 委員会）において検討する予定である。

C. 研究結果

1) 情報基盤の構築

詳しい報告は、H23 年度の繰越予算に関する報告にゆずるが、研究評価委員からのアドバイスもあり、また H24 年度から情報システムにも造詣の深い秋山教授を分担者に迎えたことから、H24 年度になってから、導入すべきシステムの仕様を全面的に見直した。そのためもあり、今年度は全拠点にシステムを導入することはできなかったが、今年度の経験と来年度の予算額をにらみながら、来年度には全拠点へのシステム導入を完了する。

2) ソフトウェアの開発

これも H23 年度からの繰越予算で開発したものであるが、班員へのインタビューに基づいて、現場のニーズや導入の容易さ等を検討し、3種類のソフトウェアを開発した。すなわち、次項で述べるデジタルペンなどによる実験データを管理し、煩雑になりがちな実験手順書（SOP）を電子化す

るための実験データ管理システム、新たに得られた幹細胞の遺伝子発現データを、公共データベースに収められた幹細胞などの発現データと比較するための幹細胞遺伝子発現情報解析ツール、そしてこれら二つのソフトと連携して、取り込んだデータ間の関係や、細胞間の遺伝子発現パターンの類似性を可視化するための幹細胞情報の可視化システムである。

3) 実験室情報の電子化

拠点機関毎に程度の差はあれ、総じて実験ノートの電子化に対する関心は高かった。今回、情報システム導入拠点には、iPadなどのスレート端末を配布するとともに、デジタルペンを用いて、通常の紙のノートをとるのとほぼ同じ感覚で情報を電子的に保存できる仕組みと、市販の電子ラボノートシステムの両方を導入してみた。特に東京女子医大の大和研究室からは先行して使用感等をレポートしていただいた。

4) 中核機関と拠点機関の間の共同研究

前年度から行ってきた大和研究室との共同研究に加えて、次項との関連で、中井研究室と西田研究室、岡野研究室との共同研究をそれぞれ進行させている（分担者としての中井の報告を参照）。また、梅澤研究室からもデータを預かって、今後の共同研究の方向性を検討中である。

5) 次世代シーケンシングと解析の受託

6) ELSI 準備委員会の開催

これら2項については、分担者としての中井の報告を参照されたい。

7) 広報活動

一般国民の支持を得ながら臨床応用研究を促進するためには、国民に研究の状況を広く知ってもらう必要がある。また、情報を発信することによりプロジェクトを周知し、プロジェクト参画者を増やしていくことも目指していくべきである。そこで、今年度は前年度に用意した本プロジェクトのウェブサイトの拡充に努めた。研究評価委員会やELSI準備委員会の議事要旨をウェブ上で公開するとともに、再生医療の実用化研究の現状につ

いて調査し、調査内容の一部を掲載した。この情報は、本プロジェクトの今後の方向性を考える上での基礎資料となる。すなわち、いわゆる先端研究だけでなく、我が国の再生医療研究の全体像を総覧することで、これらの研究を加速させていく上で何が必要なのかを検討するために有用と考えられる。

8) その他

これまで述べてきたように、秋山教授を除く、それぞれの分担研究者は皆、我が国をリードする再生医療研究者であり、着実に分担研究を進めている。その一方で、過去2年の間では、それら分担研究者の全員からデータの提供を受けられたわけではないことも事実である。これについては代表研究者がシステム導入などに忙殺されて、そこまで手が回らなかったのが第一の要因であり、来年度以降の課題である。しかし、データ提供にまでには至っていない研究者からもいろいろ有益な助言や示唆はいただいている。たとえば、高橋チームリーダーは我が国初のiPS細胞の臨床応用を行うための治験でいろいろ苦勞をされているが、そこで得られた経験から、後に続く研究者にとって有益な情報が必ず得られるはずである。また、中辻研究室で実施しているES細胞の品質検査基準と山中研究室で実施しているiPS細胞の品質基準を、そのデータも含めて比較することは、今後の品質基準のスタンダードをつくっていく上で大変有用であろうと考えられる。次年度以降にそのような情報の共有を目指していきたい。

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

1) 中井謙太「再生医療本格化のためのゲノム情報解析」、日本人類遺伝学会大会シンポジウム「未来の医学：再生医療とゲノム医療」、

2012年10月26日、東京

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

II. 分担研究報告

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）

分担研究年度終了報告書

研究分担者

中井 謙太

東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

拠点機関の分担研究者との討議を重ね、本プロジェクトの目的を達成するのにふさわしいシステムの再設計を行った。その結果に基づき、前年度からの繰越予算を用いて、必要なハードとソフトを導入・開発した。さらに、今年度はデータ提供の呼び水として、次世代シーケンサーを駆使した実験（RNA-seq, ChIP-seq 等）とそのデータ解析の受託を開始した。その結果、中核機関内の研究協力者を含め5つの研究グループからの依頼を受けた。特に大阪大学の西田教授のグループからは、倫理審査中のものを含め、3種類のサンプルを預かって、共同研究を展開している。また、前年度から引き続き、東京女子医大の大和教授のデータに関しては、中井研究室で開発中の方法を用いた先端的な解析を行い、そこから得られた予測結果の実験的検証を試みている。この他、データ共有のルール作りなどを来年度から本格的に行うための ELSI 準備委員会を設置して、準備作業を行った。

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。

B. 研究方法

前年度に引き続き、拠点機関の研究者へのインタビューと討議を行い、いわゆる現場のニーズや情報共有に際しての不安の有無やその内容の把握に努めた。今後再生医療の臨床情報の収集にも力を入れたいと考えている関係で、今年度は特に中

核機関の附属病院の所属研究者や、医療情報システム関係者との面談も行った。

次に、今後再生医療の研究現場でその重要性がますます高まっていくことが予想される、次世代シーケンサーを用いた細胞情報（RNA-seq 法による遺伝子発現情報や ChIP-seq 法によるエピジェネティック情報など）の収集を加速させるため、研究協力者の鈴木穰准教授（東大新領域）の協力を得て、シーケンシングの受託を始めた。当初は専用のシーケンサーを本研究費で購入する予定であったが、どの程度の利用希望があるかわからないという意見が、研究評価委員会が出たため、まずは鈴木研究室所有の機器を使わせていただくこととした。

また、本研究で目指している情報共有を推進し

ていくにあたっては、中核・拠点両機関において倫理審査を受ける必要があり、その手続きを円滑かつ迅速に行うためにできることを検討したり、共有されたデータを用いて新たな研究を行ったときの知的財産権の問題を取り扱ったりする ELSI (Ethical, Legal, and Social Issues) 委員会の設置を検討した。手続き的な理由から、今年度においては準備委員会を設置して、来年度以降の準備を行うこととした。

(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、まずはそれぞれの拠点機関のルールに従い、必要な倫理審査等を通じたものに限られ、完全に匿名化されている。

C. 研究結果

1) 拠点機関研究者等との面談

ここでは個々の面談内容を詳しく報告することはしないが、主に関東圏の拠点機関の分担研究者と面談して、導入予定のシステムの使用等について討議した。また、拠点によってはすでに独自の取り組みを開始しているところもあるが、どの研究機関でも実験ノートの電子化には関心が高いこと、まず実現すれば有用と感じられる課題として、実験手順書 (SOP) の電子化があることがわかった。また、医療現場でのニーズとしては、たとえば臍帯や臍帯血のトレーサビリティ情報管理があることを確認した。

2) 次世代シーケンシングと解析の受託等

方法のセクションでも述べた通り、拠点機関からのデータ提供を加速させるために、代表研究者が得意としている次世代シーケンサーを用いた解析の受託を行った。すなわち、シーケンシング用のサンプルの提供を受けると、研究協力者のところでシーケンシングを行い (費用は中核機関で負担)、そこから得られたデータを中核機関の中井研究室で解析して、結果をお返しし、必要に応じて議論を行う。得られたシーケンシングデータ

は本研究で構築したシステムに登録していただくという仕組みである。これまでのところ、阪大西田研究室、東京女子医大和研究室、慶応大岡野研究室、東大渡辺研究室 (研究協力者)、東大中内・大津研究室 (研究協力者) から依頼を受けており、大和研究室と大津研究室からは、すでにサンプルが鈴木研に送付済みであり、西田研のサンプルに関しては、すでに一部はデータ解析も終わっている。すなわち、西田研のマウス口腔上皮細胞および内皮細胞の RNA-seq データからはすでに各細胞の発現マーカー遺伝子の候補が得られ、その結果は関係者間で共有している。現在、ヒト口腔不死化細胞などのサンプルもシーケンシング中もしくは倫理審査中である。

また、前年度より大和研究室と共同研究を行っているマウスの造血幹細胞および造血前駆細胞の RNA-seq データの解析では、本研究費で雇用している朴研究員が開発した独自の方法で、それぞれの細胞を特徴づける転写制御ネットワークの推定を行っている。月 1 回ペースで討議を重ね、方法論を改良したり結果の一部を実験で検証したりした。その結果、二種類の細胞を区別する転写因子の候補の一つである PPARgamma の関与を強制発現実験によって、ある程度裏付けることができた (Park et al. 投稿準備中)。

3) ELSI 準備委員会活動

上智大学町野朔教授に委員長をお願いし、総勢 6 名のメンバーに委員を委嘱した (うち 1 名はその後辞退されたので、現在別の委員を選考中)。1 月 30 日と 2 月 27 日に会議を行い、議事要旨を本プロジェクトのホームページ上で公開した。主な討議内容は、ELSI 委員会でどのような問題を扱うべきかという点や、その位置づけ、さらにそれらに基づく設置要綱案のとりまとめである。その中で、研究者間でのデータ共有の試みは過去にもいくつかあったが、はかばかしい成果をあげたとは言いがたく、研究者の抵抗は相当大きいので、再度じっくり事前調査を行う必要があるのではないかと

など、活発な議論が交わされた。

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

- 1) 中井謙太「再生医療本格化のためのゲノム情報解析」、日本人類遺伝学会大会シンポジウム「未来の医学：再生医療とゲノム医療」、2012年10月26日、東京

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）
分担研究年度終了報告書

研究分担者

秋山 昌範

東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

日本の医学研究には死の谷（デスバレー）と言われる、研究の非連携が存在する。本来であれば、基礎研究（非臨床、前臨床）、さらに実用化に向けた臨床研究が、一連の流れで行われることが望ましく、またそれらの全体像をマネジメントするシステムが必要であるが、現在はそれぞれが分断してしまっており、つながりのある状態でマネジメントされていない。非連携のために問題となるのは、未知なる副作用や想定していなかった新たな問題が起こった場合に対応が困難となることである。このような研究の非連携が、まさに、我が国が現在抱えている iPS 細胞を利用した再生医療研究の問題点である。死の谷をなくし研究をスムーズに行うためには、サプライチェーン全体をモニタリングすることのできるコードが必要である。今後の再生医療の発展のためにはこのようなコードとモニタリングシステムが必要不可欠であると考えます。

また、超高齢化社会や医療財政の逼迫を抱え医療の場が在宅へと移行しつつある日本では、薬剤の副作用や患者の変化を在宅でモニタリングをしなくてはならない。その記録や報告は、医療従事者だけではなく、ヘルパーや患者家族（特に高齢者）が行えるよう簡易的な仕組みにする必要があり、システム構築のための実証実験が必要である。

しかし、日本においては個人情報保護に対する意識が高く、過剰に防衛的となりがちであり、実証実験を行うことは難しい。個人情報保護に対する過剰な防衛反応が起きない発展途上国において、日本に役立つような実証実験が実施可能かどうか検証した。

また、海外や WHO における再生医療実用化に影響を与えると思われる組織コードの標準化動向や知財動向を調査した。

さらに、カルテによる臨床効果や有害事象の解析に役立つテキストマイニングの手法を開発し、有用であることを実証した。

A. 研究目的

今後の日本の医療提供システムの中で、再生医療技術を活用するには、サプライチェーン全体をモニタリングする必要があり、1) 追跡可能な標準コードと、2) 在宅で誰でも容易に記録できるモニ

タリングシステムの 2 点が必須となる。

この 2 点についての実証実験を行うには、発展途上国の方が制度的制約は小さい。

そこで、その一例として、国際協力機構：JICA と世界保健機関：WHO が連携して医療協力を行

っているタンザニアにおいて実施可能かどうか検証する。

さらに、カルテによる臨床効果や有害事象の解析に役立つテキストマイニングの手法を開発する。

B. 研究方法

医薬品や医療機器・医療材料のサプライチェーン全体の標準コードの整備が未熟で、入院日数の短い中での医療提供となっているタンザニアで、いかに 1) 追跡可能な標準コードと、2) 在宅で誰でも容易に記録できるモニタリングシステムを構築できるかを検討する。現場視察および関係者とのディスカッションを通じて、タンザニアが想定しているフィールドとして適切であるかを検証する。

また、海外や WHO における再生医療実用化に影響を与えると思われる組織コードの標準化動向や知財動向を調査した。

さらに、カルテによる臨床効果や有害事象の解析に役立つテキストマイニングの手法を開発し、有用であることを実証した。

(倫理面への配慮)

タンザニアがフィールドとして適切であるかどうか検証するために、当該年度は現場視察および関係者とのディスカッションを主な研究方法としており、倫理面の問題はないと考える。

C. 研究結果

途上国においてはカルテを始めとする患者記録が不十分であることが実証事業を行う際のハードルとなり得るが、タンザニアのいくつかの病院では、患者はユニーク ID で管理されているため、患者の追跡が可能であることを確認した。また、5年間にわたる JICA のプロジェクトで 5S・カイゼン事業が行われており、記録をすることに対する現場の意識が十分高まっていることを現地で確認した。

さらに、州立病院院長、看護部長を含めた病院

スタッフとのディスカッションの結果、当システムの実証実験に対して、現地の医療スタッフの関心が大きいかを確認できた。

また、WHO では、昨年 12 月より、血液や人体組織のコードの標準化を検討する会議が開始され、主として米国で用いられている血液コードをベースにした標準化の検討が始まっている。この標準化は血液や血液製剤だけに留まらず、移植等に用いられる臓器等も検討されることになっている。

また、それを支える IT 基盤が必要となるが、それを我が国で実用化するに当たっての国際的知財動向を調査したところ、先行事例がわずかながらみられることが判明した。

さらに、カルテによる臨床効果や有害事象の解析に役立つテキストマイニングの手法を開発するために、自治医科大学でのカルテ情報を分析し、情報工学的手法である自然言語処理とネットワーク分析を利用して、未知情報の発見に有用であることを実証した。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 秋山昌範、佐藤慶浩、鈴木正朝、中安一幸. 番号制度下における医療情報の活用と保護に関する検討. 医療情報学 32(Suppl.):108-111, 2012
- 2) 金英子、藤田桂英、松尾豊、○秋山昌範. 医療事故情報の構造化における重要語抽出としきい値設定問題の再考—自治医科大学の事故情報マイニング. 32(Suppl.):1094-1097, 2012.
- 3) ウォン・スイ、○秋山昌範. 医療事故分類の優先順位に関する予備的検討. 32(Suppl.): 1098-1101, 2012.
- 4) 藤田桂英、○秋山昌範、金英子、遠山信幸、亀森康子. 患者安全のためのネットワーク解析に基づく医療インシデントレポートカテゴ

り分類の提案. 医療情報学
32(Suppl.):1106-1109, 2012

2. 学会発表

- 1) 秋山昌範. ランチョンセミナー「最新の解析手法を用いた新しい臨床研究～WHO 国際共同研究における全数解析」. 第21回日本腎泌尿器疾患予防医学研究会. 高知県. 7月. 2012年. 平成24年7月13日(金)
- 2) 秋山昌範. 医療ITを病院経営やマネジメントに活かす. 医師経営塾. 平成24年9月8日(土).
- 3) 秋山昌範. 国際シンポジウム: 立場や価値観の違いを超えて患者の安全のための「合意形成」を考える～情報モデルを活用した課題解決のための合意形成手法について. 東京都. 平成24年9月12日(水).
- 4) 秋山昌範. 国際シンポジウム: 立場や価値観の違いを超えて患者の安全のための「合意形成」を考える～パネルディスカッション. 東京都. 平成24年9月12日(水).
- 5) 秋山昌範. 在宅医療を中心とした医療のIT化推進の必要性について. 市民が主役の地域情報化推進協議会 Citizen-Centered Local Information Conference (略称 CLIC). 平成24年10月30日(火)
- 6) 秋山昌範. 教育講演. テキストマイニングを用いた最新研究手法の臨床研究への応用～WHO 国際共同研究における全数解析～. 第64回日本泌尿器科学会西日本総会. 徳島県. 平成24年11月9日(金)
- 7) ○ Masanori Akiyama, Reporting system improvement from Japan: Lunchtime Briefing, World Health Organization 3rd Reporting, Sharing and Learning Meeting. Effective Learning and Knowledge Discovery using Processed Medical Incident Reports, Thursday, October 25, 2012, WHO, Geneva
- 8) ○ Masanori Akiyama. Efficient Reuse of the Incident Reports to Increase Patient Safety, WHO meeting, Tokyo, September 11, 2012.
- 9) ○ Masanori Akiyama. NFC in Japan: National Project of Telehealth in Home Healthcare at Ministry of Internal Affairs and Communications, Danish Regions, Aug 31, 2012 Copenhagen, Denmark.
- 10) Fujita K, ○Akiyama M, Park K, Yamaguchi E, Furukawa H. Linguistic Analysis of Large-Scale Medical Incident Reports for Patient Safety. the 24th European Medical Informatics Conference - MIE2012 (Quality of Life through Quality of Information), Pisa, Italy, August 26th -29th, 2012.
- 11) Sakata I., Akiyama M. Knowledge structuring tools for Technology Management: An overview and three cases of citation based approach. PICMET2012, August, 2012, Vancouver, Canada. (Technology Management for Emerging Technologies (PICMET), 2012 Proceedings of PICMET '12, 2354 - 2358, 2012.)
- 12) Fujita K, ○Akiyama M, Park K, Yamaguchi E, Furukawa H, Sakata I, Kajikawa Y. Detecting effective categories of medical incident reports for patient safety management. PICMET2012, August, 2012, Vancouver, Canada. (Technology Management for Emerging Technologies (PICMET), 2012 Proceedings of PICMET '12, : 3073 - 3082, 2012.)
- 13) Kaneyasu, F., Akiyama, M. System requirements for an electronic health record system using smartphones for homecare. PICMET2012, August, 2012, Vancouver, Canada. (Technology Management for Emerging Technologies (PICMET), 2012 Proceedings of PICMET '12, 3059 - 3066, 2012.)
- 14) Fujita K, ○Akiyama M, Sakata I., Linguistic Analysis of Large-Scale Medical Incident Reports, (IAMOT 2012), THE 21st INTERNATIONAL CONFERENCE ON MANAGEMENT OF

TECHNOLOGY, TAIWAN ”Managing
Technology-Service Convergences in the
Post-Industrialized Society” Hsinchu, Taiwan,
March 18-22, 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）
分担研究年度終了報告書

研究分担者
山中 伸弥
iPS 細胞研究所 所長

研究要旨

iPS 細胞の樹立および維持方法を各種指針との整合性を確認して適宜選択し、臨床用 iPS 細胞として分配できるようプロトコルを確立した。ただし、生物由来原料基準への適合性については確保できていない。一方、iPS 細胞の樹立に付随して得られる情報の中から真に必要なと思われる情報を厳選し、これらの情報が得られるようプラットフォームを整備した。

A. 研究目的

細胞移植治療の原材料として用いることができるヒト iPS 細胞の樹立方法を検討し、樹立された iPS 細胞の品質管理・評価の実施基盤を確立することを目的とする。また、ここで得られた情報のうち中核拠点と共有可能なデータについて検討を行う。

B. 研究方法

これまでに報告されたヒト iPS 細胞の製造を通じて臨床用の iPS 細胞に適した製造方法を検討する。具体的には、iPS 細胞の製造に使用する試薬や由来の体細胞を生物由来原料基準をできる限り満たす試薬および方法を選択しプロトコルを作成し、そのプロトコルでの iPS 細胞の製造の可否について検討する。さらに、品質の評価法を確立するため、従来法または新たに確立した方法で作製した iPS 細胞に対して、これまで行った評価を適用し評価することで、臨床使用の条件を満たす iPS 細胞が選択できるかに検討する。

また、新たな評価方法として、エキソーム解析

を取り入れるため、iPS 細胞の製造工程において由来となった細胞へと遺伝子変異が起きるか否かを検討し、エキソーム解析を利用した iPS 細胞の評価方法について検討を行う。

（倫理面への配慮）

iPS 細胞のエキソーム解析についてはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に適合するよう本学医学研究科内の倫理審査である医の倫理委員会の審査を経て行っている。また、本研究内において、ヒトへ細胞移植を行うことはないが、ドナー適応性等の関連する部分については、関連する次の指針「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」、「生物由来原料基準」、および「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」を参照し、適宜、その適格性を検討した上で行った。

C. 研究結果

iPS 細胞の樹立時の培養液等の条件の与える影響が不明であるため、臨床用 iPS 細胞の製造にお

いて、2種類の方法を提案した。1つは、マウスより樹立された細胞株である SNL 細胞をフィーダー細胞として用い、血清等を含む汎用された試薬を用いる方法であり、もう一方は、フィーダー細胞および血清を用いず、全て内容物が確定された試薬を用いる方法である。このとき用いる試薬については、生物由来原料基準を満たすか否かを規制当局と検討したが、現時点ではその結論を得ていない。

また、iPS 細胞のドナーの適格性については、各指針等と照らし合わせ、B 型肝炎(HBV)、C 型肝炎(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症、成人 T 細胞白血病(HTLV)、パルボウイルス B19 感染症、ウエストナイルウイルスおよび梅毒トレポネーマを検査し、陰性であることでその適格性とする基準を設け、規制当局と調整を行った。議論は進行中であるが、おおよそのコンセンサスを得ている状況である。

続いて、iPS 細胞については、移植時の免疫抑制を考慮して、組織適合性抗原の一つである HLA の情報を付随させることが重要と考えており、この HLA を測定する方法、設備および体制を確立した。

最後に、樹立された iPS 細胞の評価項目を暫定的に次の9つとして、iPS 細胞への付随情報とすることと決定した。細胞の形態(目視)、多能性マーカーの表面抗原、分化抵抗性遺伝子マーカーの確認、神経分化後の多能性細胞の残存の確認、樹立時に用いたプラスミドの残存確認、核型解析、製造工程に関連する各種感染(マイコプラズマ、各種ウイルス等)およびエンドトキシンの検査および変異解析である。ここで、変異解析については iPS 細胞に特有する検査であるためこれまでの実績がないことから、樹立した多数の iPS 細胞(約 300 株)を対象として、由来となった細胞と樹立した iPS 細胞の間において変異(コピー数多型を含む)が起こるか否かについて次世代シーケンサー(イルミナ社 HiSeq2000)を用いて解析を行

った。その結果、平均 10 箇所程度の変異が検出されたが、タンパク質のアミノ酸変化を伴わない iPS 細胞クローンも得られることが確認された。以上の結果より、iPS 細胞の評価方法の確立し、これらの評価が可能となる設備の整備を行った。

D. 健康危険情報

(本研究では製造した iPS 細胞をヒトへ投与することはないので、感染等の拡散の危険性はない。一方、iPS 細胞の樹立時の実施研究者への感染については、ドナー適格性により最小限の安全を担保することが可能と考えている。)

E. 研究発表

1. 論文発表
特になし

2. 学会発表

1) 第 35 回 日本分子生物学会年会

Establishment of human iPS cells under feeder-free conditions for clinical application

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）

分担研究年度終了報告書

研究分担者

中畑 龍俊

京都大学 iPS 細胞研究所 副所長・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の評価法を確立し、広く研究者間の利益に供するため、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して以下の研究を行った。iPS 細胞から中胚葉、へマンジオブラストを経て赤血球、好中球、単球、巨核球などの各種血液細胞が産生される系、機能的な単球・樹状細胞・マクロファージを産生する系を開発した。無血清、フィーダー細胞を用いない培養法を確立した。臍帯血 CD34 陽性細胞から iPS 細胞の樹立に成功した。これらの iPS 細胞とこれらから分化させた血液細胞、対応する CD34 陽性臍帯血幹細胞から分化させた血液細胞のマイクロアレイデータについては、順次取得中であり、こちらもデータベースへの寄託を進める予定である。

A. 研究目的

本研究班では、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を行う。

分担研究者らは、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。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ックス解析を行い、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。特に、血球分化と多数の疾患 iPS 細胞の分化データに重点を置き、データの集積に努める。

B. 研究方法

前年度に引き続き、iPS 細胞からの血球分化系の開発に注力し、機能的な赤血球、白血球、巨核球・血小板の産生系を構築する。特に今年度は、単球・樹状細胞・マクロファージを産生する系を開発する。この系で分化させた細胞について、複数の疾患特異的 iPS 細胞から、マイクロアレイデータを取得する。また、臍帯血 CD34 陽性細胞から iPS 細胞の樹立を行っており、これらの iPS 細胞とこれらから分化させた血球細胞、及び対応す

る CD34 陽性臍帯血幹細胞及びこれらから分化させた細胞の静謐を様々な角度から比較するとともに、マイクロアレイデータを順次取得し、こちらもデータベースへの寄託を進める。

(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

本年度は、前年度に引き続き、iPS 細胞からの血球分化系の開発に注力し、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赤血球、好中球、単球、巨核球などの各種血液細胞が産生される系を構築できた。また、機能的な単球・樹状細胞・マクロファージを産生する系を開発した。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。この系で分化させた細胞について、複数の疾患特異的 iPS 細胞から、マイクロアレイデータを取得した。これらについては、論文発表などが済んだものから随時データベースへの寄託を開始する予定である。また、臍帯血 CD34 陽性細胞から iPS 細胞の樹立を行っており、10 クローン以上の iPS 細胞クローンの樹立に成功した。これらの iPS 細胞と分化させた血球細胞、及び対応する

CD34 陽性臍帯血幹細胞のマイクロアレイデータについては、順次取得中であり、こちらもデータベースへの寄託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) 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.* 24(1):5-15,2012.
- 2) 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.* 19(2):143-152,2012..
- 3) Morishima T., Nomura A., Saida S., Watanabe K., Yagi H., Matsumoto M., Fujimura Y., Heike T., Nakahata T., Adachi S.: Pediatric idiopathic TTP diagnosed with decreased ADAMTS13 activity. *Pediatr. Int.* 54(3):422-3, 2012.
- 4) Tsuchiya A., Imai M., Kamimura H., Takamura M., Yamagiwa S., Sugiyama T., Nomoto M., Heike T., Nagasawa T., Nakahata T., Aoyagi Y.: Increased susceptibility to severe chronic liver damage in CXCR4 conditional knock-out mice. *Dig. Dis. Sci.* 57(11):2892-2900, 2012. DOI 10.1007/s10620-012-2239-8, 2012.
- 5) Kawai T., Nishikomori R., Izawa K., Murata Y., Tanaka N., Sakai H., Saito M., Yasumi T., Takaoka Y., Nakahata T., Mizukami T., Nunoi H., Kiyohara Y., Yoden A., Mutara T., Sasaki S., Ito

- E., Akutagawa H., Kawai T., Imai C., Okada S., Kobayashi M., Heike T.: Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency. *Blood* 119(23):5458-66,2012.
- 6) Tanaka T., Takahashi K., Yamane M., Tomida S., Nakamura S., Oshima K., Niwa A., Nishikomori R., Kambe N., Hara H., Mitsuyama M., Morone N., Heuse J.E., Yamamoto T., Watanabe A., Sato-Otsubo A., Ozawa S., Asaka I., Heike T., Yamanaka S., Nakahata T., Saito M.K.: Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood* 120(6):1299-308,2012.
- 7) Egawa N., Kitaoka S., Tsukita K., Naitoh M., Takahashi K., Yamamoto T., Adachi F., Kondo T., Okita K., Asaka I., Aoi T., Watanabe A., Yamada Y., Morizane A., Takahashi J., Ayaki T., Ito H., Yoshikawa K., Yamawaki S., Suzuki S., Watanabe D., Hioki H., Kaneko T., Makioka K., Okamoto K., Takuma H., Tamaoka A., Hasegawa K., Nonaka T., Hasegawa M., Kawata A., Yoshida M., Nakahata T., Takahashi R., Marchetto M.C., Gage F.H., Yamanaka S., Inoue H.: Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med.* 4(145):145ra104, 2012.
- 8) Kawai T., Saito M., Nishikomori R., Yasumi T., Izawa K., Murakami T., Okamoto N., Mori Y., Nakagawa N., Imai K., Nonoyama S., Wada T., Yatie A., Oomori K., Nakahata T., Heike T.: Multiple reversions of an IL2RG mutation restore combined immunodeficiency patient. *J. Clin. Immunol.* 32(4):690-7, 2012.
- 9) Awaya T., Kato T., Mizuno Y., Chang H., Niwa A., Umeda K., Nakahata T., Heike T.: Selective development of myogenic mesenchymal cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE.* 01/2012; 7(12):e51638. DOI:10.1371/journal.pone.0051638
- 10) Nakazawa Y., Saito S., Yanagisawa R., Suzuki T., Toshiro Ito T., Ishida F., Muramatsu H., Matsumoto K., Kato K., Ishida H., Umeda K., Souichi Adachi S., Nakahata T., Koike K.: Recipient seropositivity for adenovirus type 11 is highly predictive of the development of hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* in press.
- 11) Kondo T., Asai M., Tsukita K., Kutoku Y., Ohsawa Y., Sunada Y., Imamura K., Egawa N., Yahata N., Okita K., Takahashi K., Asaka I., Aoi T., Watanabe A., Watanabe K., Kadoya C., Nakano R., Watanabe D., Maruyama K., Hori O., Hibino S., Choshi T., Nakahata T. Hioki H., Kaneko T., Naitoh M., Yoshikawa K., Yamawaki S., Suzuki S., Hata R., Ueno S., Seki T., Kobayashi K., Toda T., Murakami K., Irie K., Klein W.K., Mori H., Asada T., Takahashi R., Iwata N., Yamanaka S., Inoue H.: Modeling Alzheimer's disease using iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* in press.
- 12) Saida S., Watanabe K., Sato-Otsubo A., Terui K., Yoshida K., Okuno Y., Toki T., Wang RN., Shiraishi Y., Miyano S., Kato I., Morishima T., Fujino H., Umeda K., Hiramatsu H., Adachi S., Ito E., Ogawa S., Ito M., Nakahata T., Heike T.: Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood* in press.
- 13) 中畑龍俊：白血病治療の進歩と今後の展望. 日本小児血液・がん学会雑誌 (第 49 巻 1・2 号、