

201335001A (1/2)

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中井 謙太

平成 26 (2014) 年 3 月

1 / 2 冊

# 目 次

(1 / 2 冊)

## 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 ..... 11

中井 謙太

2. 臨床情報提供 ..... 15

今井 浩三

3. 情報システム・情報解析 ..... 21

藤渕 航

4. 分化誘導 ..... 26

中畑 龍俊

5. 臨床用ヒトES細胞株の樹立 ..... 31

中辻 憲夫

6. iPS等分化誘導 ..... 35

岡野 栄之

7. ES細胞のマニピレーション ..... 43

梅澤 明弘

8. 輸送 ..... 46

西田 幸二

9. 移植、分化誘導 ..... 51

高橋 政代

10. 体性幹分化誘導 ..... 54

大和 雅之

III 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 63

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 81

# 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）

総括研究報告書

研究代表者

中井 謙太

東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

今、国民の間で大きく期待が高まっている再生医療の安全性・有効性を高めるために、再生医療の基礎から臨床応用研究をカバーする、情報通信技術を基盤とした研究開発支援体制を構築することによって、我が国の研究能力を結集した体制を確立し、再生医療技術の早期の臨床実用化を目指している。今年度はその3年目にあたり、全ての拠点研究機関と中核機関・データセンターを結ぶ計算機ネットワークシステムは、ハード面についてはおおむね整備できた。また、電子ラボノートシステム等の活用による生データや標準手順書等の電子化を進めるとともに、現場のニーズを踏まえ、効率的なデータ収集・活用を行なうためのソフトウェア群も開発した。さらに、研究機関同士で知財・倫理・セキュリティ面等のトラブルが無くデータ共有を進めるための専門家の委員会を設置し、そこでデータ共有・公開を行う上でのルールを策定した。本プロジェクト参加者全員からこのルールに従う旨の誓約書を取り、各拠点機関の産学連携本部等とも連絡を取りあった。次世代シーケンサーを活用した研究の支援を通して、ビッグデータも受入れてきた。拠点機関同士のデータ共有をより積極的に進めるための第一歩として、研究内容の関連性の高い機関同士での共同実験を企画し、また幹細胞の培養環境の違いなどによる性質の違いを共同で調べる研究を行った。

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、オールジャパンともいべき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。これにより、途中で断念された研究など、これまで活用されなかった研究情報に関しても再生医療実用化のために活用したり、臨機応変にコンソーシアム的研究を立ち上げたりできる環境を実現する。たとえば、臨床応用を目指していた幹細胞

が造腫瘍性を示したために、研究対象から外されてしまっていた場合でも、本研究の枠組みで、その細胞の特徴を詳しく調べ、その結果を共有できれば、同じ失敗を繰り返すことが避けられるだけでなく、予め造腫瘍性を示すリスクの高い細胞を選別するための道が開ける可能性がある。また、幹細胞やその誘導細胞を様々な条件で培養したときの性質の安定性などに関する知識やコンセンサスのとれたプロトコルを創出し、国内外の研究者に積極的に発信できれば、我が国の再生医療研究の競争力向上に大き

く貢献できる。

なお、本研究のアプローチ自体は、他の多くの厚生労働行政課題（がん研究や感染症研究のネットワーク等）にも応用可能である。

## B. 研究方法

### 1. 情報基盤システムの拠点機関への導入：

前年度までに導入ができなかった3拠点（京大 iPS 研、京大再生研、理研 CDB）と今年度加わった拠点（東大医科研病院）へのシステムの導入を行った。

### 2. システム利用規則の制定：

システムの利用を円滑化するために、生命倫理・知財・情報セキュリティ等の専門家による ELSI 委員会を本格的に開催し、研究データの共有と公開に関するルールを制定した。

### 3. 班員からの意見聴取に基づくソフトウェア開発：

データ共有を促進させるために、各拠点に配置した専任作業員等を対象とするシステム（ハード、ソフト、ルール、運用）の利用説明会をこれまでに5回開催し、各拠点におけるシステムの活用状況や課題を聴取した結果に基づいて、今年度のソフト開発課題の仕様5件をまとめ、発注した。

### 4. 班員によるデータ提供と活用：

班員からのデータ登録については、まず各拠点内での実験ノートの電子化に取り組んだ。また、データ提供を加速するために、中核機関で研究協力者の協力を得て、次世代シーケンシングとそのデータ解析の受託サービスを行ったほか、研究内容が近い拠点間での共同実験を企画したり、拠点をまたぐ共同実験で、幹細胞の性質の違いな

どの特徴付けを行ったりした。

備考：平成 25 年度計画の変更点（研究費補助金交付申請時の計画からの）：

1)：班員一名が研究の継続が困難になったため、別の研究者（京都大学藤渕教授）に変更した。

2)：当初は、研究の進捗状況の評価や、研究の方向性などに関する相談事は、研究運営委員会を組織して対応する予定でいたが、新たに Project Director/Officers が決まったこともあり、研究運営委員会の組織は取りやめた。ただし、中核機関内での研究のバックアップ体制は確立した。

（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低いと考えられるが、本研究に従事する者全員が従う旨の誓約書を提出することになっているデータ共有・公開に関するルールで以下のように定めている。

（データ共有時において、情報共有システムの）情報管理者は、国の研究倫理指針の対象となるデータが共有又は公開される場合、情報システムへの提供前に、データ提供者の所属機関の倫理審査委員会において審査を受け、承認されていることを確認しなければならない。

また、本研究では、研究倫理等に関する専門家を含む専門委員会（ELSI 委員会）を擁しており、研究上のさまざまな問題に関して助言を受けることができる体制にある。

## C. 研究結果

### 1. 情報基盤システムの拠点機関への導入：

前年度に今回の3拠点で導入が遅れた主な原因は、設置スペースがとれないことであつたため、各拠点の事情と先行導入拠点での活用状況などを勘案して、必要なシステム要件を再設定した。また、昨年度設置した機関におけるシステムの安定稼働についても、継続的にノウハウを蓄積した。今回の導入により、当初の計画によるハード面での整備はほぼ終わったが、今後は、DMZ (DeMilitarized Zone) を整備することで、より安全にデータを外部に公開する仕組みを整え、またシステムの利用実態を反映させた、システム構成の最適化を行う予定である。

### 2. システム利用規則の制定：

システムの利用を円滑化するために、ELSI 委員会を3回開催し、メール審議も行った上で、研究データの共有と公開に関するルールを制定した。プロジェクト関係者全員からルールを遵守する旨の誓約書を取り、各拠点の産学連携組織による確認もほぼ終了した。情報セキュリティに関しても、専門業者等と共にシステム運用の基本方針と基本規定の第一稿を完成させた。次年度はこれらを磨き上げていくのと同時に、さらに詳細なシステム運用・管理規定を制定する計画で、万が一情報漏洩が起こった際でも、被害を最小にとどめるべく、あらかじめ対応策をまとめておく。

### 3. 班員からの意見聴取に基づくソフトウェア開発：

各拠点の IT 担当者を主な対象としたシステムの利用説明会を5回開催し、それらを通して聴取した各拠点の要望などをもとに、

今年度のソフト開発課題を以下のようにまとめ、発注した。

- (1) 実験データの共有と利用促進のための統合システムの設計及び、プロトタイプ作成
- (2) iPS 細胞、ES 細胞、体性幹細胞の解析ツールへの機能追加
- (3) デジタルペン入力機能の拡張
- (4) タブレットペン入力機能
- (5) タブレットを用いた再生医療に関する標準作業手順書登録・閲覧・入力システムの開発

また、膝詰め会談形式の班会議や本音ベースの懇話会を企画して、班員からの要望の聴取に努めた。

### 4. 班員によるデータ提供と活用：

現在のところ、集積されたデータは 1) デジタルペンなどを用いた実験ノートの電子化情報、2) 次世代シーケンサーを用いた、幹細胞等の遺伝子発現情報とクロマチン修飾情報、3) その他、に分けられる。容量的には 2) の情報量が圧倒的に大きく、拠点によっては、すでに導入したハードディスクの領域設定を見直さなければならない状況である（もちろん、容量だけでデータの価値を判断することは不可能であるが）。次世代シーケンサーを介した幹細胞等の特徴付けは、研究協力者（東大新領域の鈴木教授）のご助力により、各拠点から受け取った RNA サンプルなどをシーケンシングやデータ解析などを受託するサービスを行った成果が大部分である。3) のその他は、大阪大学から提供された幹細胞の輸送に伴う品質データと、国立成育医療研究センターから提供された幹細胞のテラトーマ形成に関する画像データや、情報シス

テムの管理に伴うログデータとなっている。この画像データは、今後大きな規模のデータベースに成長させるべく準備中である。データベース化にあたっては、中核機関のスタッフが協力して、適切な注釈付けを行うことで、検索効率などの価値が格段に向上することが期待される。

## 5 その他

本プロジェクトに対する理解を、現班員以外の再生医療研究者にも深めていただくため、また幹細胞研究や臨床応用におけるIT技術の効率的利用を推進していくために、幹細胞を研究する若手研究者有志を集めて、クローズドの「情報共有研究会」を開催し、プロジェクト関係者を含め、13名で一日熱い議論を行った。

### D. 考察

本研究で情報共有のためのシステムを構築することで、具体的に再生医療の臨床応用の実用化にどう役立つのかを実証していくために、本来想定している自発的なデータの提供を待つ受け身のスタイルとは別に、今後は以下の研究を中心に積極的に仕掛けていく。

すなわち、幹細胞（およびその誘導細胞）の安全性管理、品質管理にかかわる情報、たとえばES細胞（iPS細胞も）が、共通の株由来のものを扱っていても、培養条件の違いなどによって、品質に様々なばらつきを生じることが経験的に知られているので、それを様々な方法で定量化して、共有する。画像データに関しては、班員である国立成育医療研究センター 梅澤再生医療センター長からテラトーマ形成による幹細胞の全能性検査に関わるものを大量に提供してい

ただ。これらのデータは、一般公開されれば、レファレンスとして、多くの関係者にとって有用であるはずである。また、平成25年度後半から新たに加わっていただいた藤渕教授には、たとえば機械学習法を利用した画像からのパターン認識研究のご経験をいかして、提供されたデータの横断的情報解析による新たな知識発見に取り組んでいただく。この他、現在、中井のグループは、自分が調べたい細胞の遺伝子発現プロファイルデータに対して、既存のデータベースにあるどの細胞の遺伝子発現プロファイルが似ているかを検索するシステムを開発しているが、このシステムを使えば、将来的には、本情報システムに蓄えられた情報を外部から検索することもできる。たとえば、ある研究室で分化誘導して作った細胞の遺伝子発現パターンは、中畑研究室でつくった血球細胞のパターンと良く似ているとか、これこれの遺伝子群を中心にずれているといったことが分かることになる。

平成26年度からは、基礎的研究データの共有にとどまらず、実際に再生医療を臨床応用していくステップを直接的に支援する新次元の試みも行うべきであろう。すなわち規制科学に関する知識の共有である。iPS細胞の臨床応用に世界で一番乗りされて有名になった高橋チームリーダーからはこれまでの手続きの体験と関連資料を提供していただけることになっている。また、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）のご協力を得て、たとえば臨床試験を行う前に専門官からコンサルティングを受ける準備をするときに役立つ知識（どのような資料を揃えるべきかなどのFAQ）を共有できないか、現在検討している。これらの分

野は、従来、医学生物学が専門の研究者が苦手に行っている分野なので、この分野の見解が容易に入手できるようになれば、臨床応用の実用化に要する時間は、大きく短縮できる可能性がある。

### 3.その他

(各班員の報告を参照されたい)

## 健康危険情報

特になし

## E. 結論

今年度を含めた過去3年間の努力により、情報共有システムのあるべき形はほぼ姿が見えてきた状態であるので、今後は実際の活用を通して、より安全でかつ使い易いシステムとなるように改良を重ねていく。さらに、このシステムを使った班員同士のデータ共有の促進を一層はかり、本システムが再生医療の臨床応用加速に実際に役立つサクセスストーリーを積み上げていく。もちろんこれらの目標の実現は容易なことではないが、そのための準備は十分整えられたと結論できる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(各班員の報告を参照されたい)

### 2. 学会発表

(各班員の報告を参照されたい)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

(各班員の報告を参照されたい)

### 2. 実用新案登録

(各班員の報告を参照されたい)



## 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

研究代表者として行った主な活動は、総括研究報告書に記した。それ以外の活動を研究分担者としての活動とすると、それらは、システム管理に伴う諸々の懸案事項の解決、情報の共有ルールに基づくデータ提供から注釈付けを経て共有可能状態に至るまでの具体的手順の策定、ヒトゲノム倫理問題に関する対応、一部のデポジットデータの解析などである。データ解析に関連して、次世代シーケンズデータ処理の独自パイプラインの整備も行った。これらの努力により、情報共有システムのハード・ソフト両面にわたり、ゴールの姿が見えてきた。また、情報共有を通じた成果の創出に向けて、研究班全体がうまくまとまった体制を築くことができた。

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、オールジャパンともいえるべき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

0. 中核拠点におけるスタッフ

中核拠点における研究を主に担ったスタッフは以下の通り（五十音順）：

足立美保子（研究倫理・データキュレーション・研究担当）

池田恵美（システム管理担当）

黒澤 隆（契約関係・ソフトウェア担当、情報管理者）

齊藤友紀（事務・報告書担当）

鈴木 穰（シーケンシング担当）

朴 聖俊（研究担当）

福岡良忠（アドバイザー・関西拠点对応担

当）

この他、中核機関に所属する多くの関係者、特に武藤香織教授、神里彩子特任准教授から多大なご支援をいただいた。

1. システムの運用管理

システム運用管理に伴う懸案事項の解決、セキュリティ対策を行うため、確かな情報の収集と迅速な対応のための体制を構築し、毎週の定期的な進捗会議を行い、プロジェクトの安定した遂行に寄与した。

より専門的な知識と作業を必要とするハードウェア保守と運用および一部の管理支援業務は外部委託とし、定期的な打ち合わせを重ねて安定運用に努めた。また、プロジェクトメンバむけに年五回のシステム説明会の実施や、基盤システムのポータルサイトの設置によりシステムの利用を促進した。

2. 情報共有の具体的手順策定

ELSI 委員会の承認を得た「データ共有・公開に関するルール」に準拠した、拠点か

らのデータ提供から共有に至る具体的手順を策定した。この作業は、日本電気(株)に委託したソフト開発の中で行った。

### 3. 倫理問題対応体制の構築

同じく、「データ共有・公開に関するルール」に準拠した、共有を目指すデータに関しての対応体制を、東京大学医科学研究所研究倫理支援室の協力を得て、構築した。

### 4. データ解析

以前から行ってきた次世代シーケンサーを用いたシーケンシングの受託業務に伴って、いくつかのデータ解析に携わった。そのために、ルーチン的なデータ解析を行うためのパイプラインを構築した。また、そこに用いる DNA 断片配列をゲノムにマッピングするためのソフトウェアツールの性能評価を行った。実際のデータ解析は、主に東京女子医大からのデータと、大阪大学からのデータに対して行った。

(倫理面への配慮)

上述のように、倫理面への配慮は、中核機関と拠点機関におけるそれぞれの倫理委員会と、密接に連携をとって行われた。どのような解析に対してどのような審査が必要かという点について、双方の委員会での意見が異なる場合もあり、必要な調整を行った。

## C. 研究結果

### 1. システムの運用管理

今年度は幸いにも大きな障害は発生しなかったが、JPCERT やベンダから報告される OS やソフト等のセキュリティの脆弱性

に対する本システムへの対応や、システム設定内容のチューニングなどが高頻度で必要であった。また、研究を遂行する上での利便性とセキュリティとのバランスの調整の必然性が再認識された。

### 2. 情報共有の具体的手順策定

データ提供者、提供者が所属する拠点の責任者、中核拠点のキュレーターと情報管理者の4名の間の手順を定め、この作業を実行するためのソフトウェアのプロトタイプングを行った。特に、提供されたデータに付加する注釈情報の内容を具体的に定めることで、キュレーターの果たす役割が再認識された。

### 3. 倫理問題対応体制の構築

今年度は、ゲノム指針への対応が必要となるケースのみを経験した(ES細胞は公開頒布されているもので、またそのゲノム解析も行わなかった)。多くの場合は、各拠点機関で既に承認済みの計画に、こちらでの解析を行うむねの修正を依頼し、その後、中核機関でも承認を受ける形をとることができた。今後の課題は、双方の機関の倫理審査への準備作業をできるだけ定型化することと、可能であれば、中核機関において、個別のケースをいちいち審査してもらのではなく、包括的に承認を受けられるようにすることである。

### 4. データ解析

中核機関で、RNA-seq 解析や ChIP-seq 解析、エクソーム解析などを受託することが多いので、それらの作業を定型化(一連

のソフトウェアツールを流れ作業的にかけていくパイプライン化)した。

また、そこで用いられるソフトウェアツールのうちで、基本となる、リード配列のゲノムへのマッピングを行うものに対して、シーケンシングエラーや、ゲノムの多形・繰り返し配列の存在頻度などに対する影響を組織的に調べた。

データ解析の例としては、東京女子医大から委託をうけた、長期型及び短期型の造血幹細胞における発現遺伝子の違いを調べ、各遺伝子上流に存在するシスエレメントモチーフのパターンをもとに、プロモーター構造のモデリングを行った。その結果、24種類の重要転写因子を同定したほか、それらの制御ネットワークには、それら発現に差異のある遺伝子群だけでなく、定常的もしくは発現量の少ない転写因子も重要な役割を果たしていることが示唆された。

また、大阪大学から受託された解析で、不死化口腔上皮細胞、iPS細胞、角膜上皮細胞などのサンプルにおいて、それぞれの状態の類似点、相違点などをRNA-seq, ChIP-seqデータなどに基づき特徴付けしている。

#### D. 考察

本研究に対して繰り返される疑念は、複数の拠点間で未発表の実験データを共有することは「研究者の本能に反する」のではないか、という本研究の根幹に関わるものなので、ここで再度本研究の理念について考察してみたい。たしかに、競争的研究資金の獲得を競わなければならない立場の研究者の間で、すべての秘密を共有するよう

に強要することは現実的ではない。そこで、本研究では、1) どのデータを提供するのかは、そのデータの持ち主が決めることを原則にし、2) 個々の研究者にとって、本当に守りたいノウハウの提供までを必ずしも求めるのではなく、共通基盤的、あるいはプレコンペティティブな知識や情報を、まずは信頼できる研究者間で共有することで、互いにメリットが生まれるという点を納得していただく努力をしている。たとえば、細胞培養培地に関する詳細な情報や、幹細胞の品質管理に関する情報、臨床応用を行う準備段階で必要になる様々な申請手続きなどの情報などである。また、3) 本研究基盤は、知財面などでの縛りが厳しくなっている状況で、異なる研究機関間の共同研究を機動的に産み出す装置となり得ると考えられる。海外でも、いわゆるコンソーシアム型の大型共同研究スタイルが増えているが、本研究の枠組みを使えば、比較的容易に、かつ効率的にその種の研究を計画実行し、サンプル数を稼いで、論文の説得力を強化することが可能である。4) 死蔵データの再活用という点に関しては、必ずしも研究者に即時のデータ提供を強要しなくても、できることは多い。たとえば、最近では別の方法に取って代わられつつある、マイクロアレイのデータなどで死蔵されているものがかなりある。これらを最新のデータと組み合わせて利用することで、新しい知見が得られる可能性は大きいはずである。また、5) 本研究で取り組んでいる実験ノートやデータの電子化は、昨今話題になることの多い、データの取り違えやねつ造疑惑のようなケースが発生したときに、容易に元データの信頼性を検証することができる利点

がある。いずれにせよ、本研究の実効性は、今後2年間で産み出される成果により証明していかなければならない。

#### E. 結論

今年度を含む過去3年間の努力により、情報共有システムのハード・ソフト（いわゆるソフトウェアだけでなく、規則や体制の整備も含む）両面にわたり、ようやくゴールの姿が見えてきた。また、情報共有を通じた成果の創出に向けて、研究班全体がうまくまとまった体制を築くことができた。今後2年間のがんばりで、再生医療の臨床応用実現を加速する成果を積み上げていきたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sung-Joon Park, Terumasa Umemoto, Mihoko Saito-Adachi, Yoshiko Shiratsuchi, Masayuki Yamato, and Kenta Nakai: Computational promoter modeling identifies the modes of transcriptional regulation in hematopoietic stem cells, *PLoS One*, in press.

##### 2. 学会発表

- 1) Sung-Joon Park, Terumasa Umemoto, Mihoko Saito-Adachi, Masayuki Yamato, Kenta Nakai: Analysis of differential regulatory network dynamics in hematopoietic stem and progenitor cells. Annual Conference of Japanese Society for Bioinformatics, Poster 48, 2013
- 2) Sung-Joon Park, Terumasa

Umemoto, Masayuki Yamato, Kenta Nakai: Inferring gene regulatory network from RNA-seq data of mouse hematopoietic stem and progenitor cells. The 8th International Symposium of the Institute Network, Poster 1, June 27-28, June 27-28, 2013, Shiran Kaikan, Kyoto, Japan

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し
3. その他  
無し

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

今井 浩三

東京大学医科学研究所 特任教授

研究要旨

東大医科研病院拠点では、「歯槽骨再生プロジェクト」と「血友病の関節に対する再生医療の基盤研究」を実施した。前者については、改良されたプロトコルを用いた第2世代歯槽骨再生臨床研究を実施中であり、本年度第I相15症例全例への細胞移植が終了した。これまでのところ安全性に関する問題はなく、評価を行なった9例全例で安定した骨再生が得られている。また、間葉系幹細胞の品質管理に関する新たな基準を作成するため、遺伝子発現とゲノム解析に関する研究を計画した。本年度東大医科研倫理委員会およびヒトゲノム倫理審査委員会にて承認を受け、現在ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いた研究を実施中である。本年度中に医科研病院拠点にサーバを含む情報機器が設置されるため、今後本端末を介して間葉系幹細胞に関する遺伝子発現、ゲノム情報を集積し、品質管理に有用な遺伝子群を抽出する。また、再生医療の臨床研究および実用化を支援する技術として、iLabber等の新規開発ソフトウェアを用いた細胞調製施設（CPC）内作業手順および承認作業に関するペーパーレス化の検討を行なった。後者についても、厚労省への申請と質疑への対応を実施中である。（研究協力者：各務秀明特任准教授、竹谷英之講師、海老原康博助教）

A. 研究目的

歯槽骨再生プロジェクトでは、体性幹細胞を用いた基礎・臨床研究を通じて、高い安全性、有効性および品質を有するヒト幹細胞の研究開発を行なう。また、再生医療実用化支援技術として、治療用細胞の品質管理基準作成のため、網羅的遺伝子発現に関するデータベースを構築する。さらに、細胞調製作業を細胞調製施設内でペーパーレスで行なうためのソフトウェアの開発支援を行なう。以上の研究を通じて、再生医療の臨床研究および早期実用化を促進する。

B. 研究方法

1) 臨床研究

医科研拠点では、これまで自家骨髄間質細胞（間葉系幹細胞）を用いた歯槽骨再生治療の基礎および臨床研究を行なってきた。平成16年から21年までに第1世代となるプロトコルを用いた第I相臨床研究を行っており、平成23年からは、第1世代プロトコルの問題点を解消し、安定した骨再生の実現を目指した改良型の第2世代プロトコルによる新たな臨床研究を、ヒト幹細胞指針に基づいて実施している。本臨床研究は、高度の歯槽骨萎縮症患者を対象とし、顆粒

状の担体に対して最適化された自家骨髄間質細胞の培養、分化誘導条件を用いて、「培養骨」の安全性と歯槽骨再生能を評価するものである。第 I 相試験における主要エンドポイントは安全性、副次エンドポイントは骨生検における骨形態計測量である。

## 2) 網羅的遺伝子発現解析、ゲノム解析による骨髄間質細胞（間葉系幹細胞）の新たな品質管理手法の開発

再生医療において必要となる細胞機能や分化能（骨分化能）については、現在品質管理上有用な指標に乏しい。網羅的遺伝子発現およびゲノム解析により細胞の個体差の原因を探るとともに、骨髄間質細胞に共通した品質管理マーカーの選択を試みる。

## 3) 細胞調製施設（CPC）内作業手順および承認作業に関するペーパーレス化の検討

細胞調製施設（CPC）内における作業には標準手順書が必要となり、また GMP 基準に準拠して行なうため、作業員以外の第三者による確認手順、および責任者による承認のステップが必要となる。これまでは印刷物を用いた確認作業や承認が行なわれていたが、細胞調製施設内への紙の持ち込みは好ましくなく、またバージョン管理も複雑になるなどの問題があった。本プロジェクトのために開発されたソフトウェアを用いて、既存の作業手順および承認手順をペーパーレス化するための検討を行なう。

### （倫理面への配慮）

動物実験を行なう際には、動物に苦痛やストレスを与えないように細心の注意を払い動物に対する尊厳を重んじて実験に供する。前提として Russell と Burch の 3R 思想を念頭に計画し実行する。

- (1) Replacement（代替）：動物個体を使わず培養細胞を用いることで代替できるものは、細胞培養法を用いて結果を出すよう努力する。
- (2) Reduction（縮小）：適切な実験動物数で実験を行う。
- (3) Refinement（洗練）：人道的に適切な実験手技や麻酔法を用い実験動物に苦痛やストレスを与えないようにする。

動物実験に関しては、「研究機関等における動物実験等に関する基本指針」（平成 18 年告示）に基づいて、「東京大学医科学研究所実験動物委員会」による承認済みである。

ボランティア由来の細胞を用いた実験に関しては、東京大学医科学研究所倫理審査委員会および東京大学医科学研究所ゲノム倫理審査委員会にて承認済みである。

臨床研究については、ヘルシンキ宣言、臨床研究に関する倫理指針、およびヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針を遵守し、被験者の尊厳と人権を尊重し、被験者の不利益が利益を越えることがないように十分に配慮して実施される。東大医科研ヒト幹細胞臨床研究審査委員会および厚生労働省にて承認済みであり、現在遺伝子発現解析に関する説明事項を現行の説明同意文書と実施計画書に加え、変更についての申請準備中である。被験者には、事前に、研究責任者又は研究分担者から、本研究の意義、目的、方法、予期される危険、いつでも同意を撤回できること等を平易な用語で説明し、自由意志に基づいて被験者となることを、文書により同意を受ける。

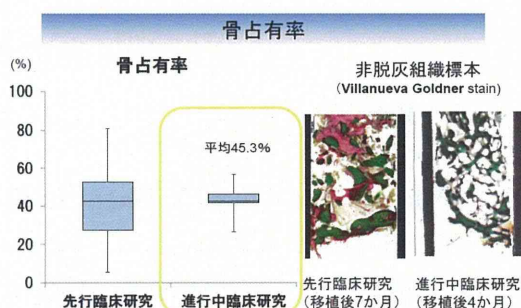
被験者の個人情報、個人情報管理者を

置き、鍵のかかるロッカー等で厳重に保管される。

## C. 研究結果

### 1) 歯槽骨再生プロジェクト

これまでに再生骨の骨生検による評価を行なった9例では、移植後4ヶ月と比較的早期に自家骨移植と同程度の安定した骨再生が得られており、一定の有効性と安全性が示されている。



#### 第2世代歯槽骨再生プロトコル

- ・先行臨床研究と比較して約3か月の待機期間の短縮
- ・骨占有率のばらつきが少なく、安定した骨再生

### 2) 網羅的遺伝子発現解析、ゲノム解析による骨髄間質細胞（間葉系幹細胞）の新たな品質管理手法の開発

また、骨髄間葉系幹細胞および骨芽細胞様細胞(培養骨)に関する新たな品質管理基準の作成を目指して、ヒト細胞に関する遺伝子発現とゲノム解析に関する研究の申請を行なった。倫理委員会は平成25年9月29日、ゲノム倫理審査委員会は平成25年12月12日にそれぞれ承認が得られたため。現在ヒト骨髄由来細胞を入手し、解析中である

### 3) 細胞調製施設 (CPC) 内作業手順および承認作業に関するペーパーレス化の検討

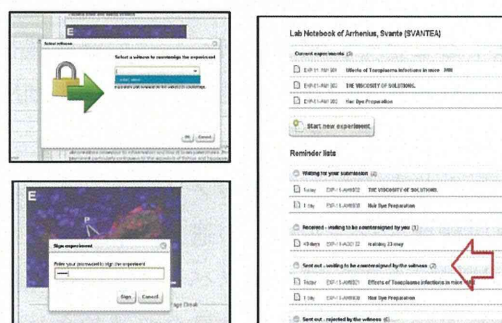
- ・ソフトウェアの選択

使用可能なソフトウェアの中で、今回の目的対応したものとして iLabber を選択し

た。iLabber は、ソフトウェアとして、様々な電子データに対応可能であり、Word、Excel、画像等、あらゆる電子ファイルを添付できる。また、定型のフォームをテンプレートとして保存・活用できる、作成済の電子ノートから簡単作成可能、過去の電子ノートをコピーして、新しい電子ノートを作成できる、記録の保護とアクセスログの設定機能などがあげられる。

具体的にペーパーレス化に必要なとされる機能の例として、①手順確認者は行った行為をチェックリストに手入力できるなど紙と同様のユーザビリティがあること、②患者個別データ管理の一元化によって細胞培養ステップの承認、検査結果も含め、統一のデータベースに移行可能であること、および③管理責任者による承認機能が必要であり、検討を行なった。

### 承認申請画面



本年度の検討から、以下の課題が明らかとなり、現在改善に向けた検討中である。

- ・PDF化したSOPへのチェック、保存、承認操作の改善
- ・タブレット端末におけるパフォーマンス
- ・表示可能なページ数と添付ファイルの上限
- ・データの長期管理への対応
- ・書類としての長期保管(10年間)への対応



・SOPのペーパーレス化に向けた電子実験ノート導入のためのスタッフへの教育

#### D. 考察

われわれのプロジェクトは、自己骨髄間質細胞(間葉系幹細胞)を用いた骨再生治療を基盤しており、これまでのところ改良版の第2世代プロトコルでは高い安全性と安定した治療効果が示されている。その理由として、先行臨床研究である第1世代のプロトコルで問題となった細胞に関する個体差を極力解消したことが考えられる。これまで細胞の品質と治療効果との関連を示す証拠は限られているが、われわれの研究結果からは高い品質の細胞を治療に用いることの重要性が示唆された。

一方、ヒト細胞の品質管理を行なう方法論は限られており、科学的なエビデンスも不足している。ヒト間葉系幹細胞、および培養骨の品質管理基準についての情報を蓄積することで、実際に安定した治療成績を得られるための新たな品質管理基準が創出可能と考えている。

しかしながら、今回のプロジェクトには臨床研究サンプルからの遺伝子解析やゲノム解析、さらにはデータベースへの情報提供など、これまで各種委員会で議論されていない新たな試みが含まれている。実際にヒト細胞を用いた実験の承認までに長期感を要した。現在臨床研究サンプルの使用に関する申請作業中であるが、さまざまな議論がでることが予測される。本プロジェクトにて研究—実用化への新たな道筋を作ることで、今後の再生医療研究、および実用化が促進されることが望まれる。

#### E. 結論

第2世代歯槽骨再生臨床研究の結果からは、培養細胞の品質が治療効果に大きな影響を与える可能性が示唆された。今後再生医療研究と実用化を促進するためには、細胞の品質管理に関する的確な指標を早期に導入するとともに、細胞調制作業に関するソフトウェアの提供など様々なサポート技術を開発・提供する意義は大きいと考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nasuno M, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nakagaki S, Watanabe S, Idogawa M, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, **Imai K**, Shinomura Y. Mesenchymal stem cells cancel azoxymethane-induced tumor initiation. **STEM CELLS** n/a–n/a DOI: 10.1002/stem.1594, 2013.
- 2) Suzuki R, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Niinuma T, Sato A, Noshō K, Yamamoto H, Kai M, Sugai T, **Imai K**, Suzuki H, Shinomura Y. Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk. **J Gastroenterol** [Epub ahead of print], 2013.
- 3) Shimizu T, Suzuki H, Nojima M, Kitamura H, Yamamoto E, Maruyama

- R, Ashida M, Hatahira T, Kai M, Masumori N, Tokino T, **Imai K**, Tsukamoto T, Toyota M. Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer. **Eur Urol** 63:1091-1100, 2013.
- 4) Sawada T, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Shioi Y, Akasaka R, Kamimae S, Harada T, Ashida M, Kai M, Adachi Y, Yamamoto H, **Imai K**, Toyota M, Itoh F, Sugai T. Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization. **Genes Chromosomes Cancer** 52:140-149, 2013.
- 5) Kato N, Yamamoto H, Adachi Y, Ohashi H, Taniguchi H, Suzuki H, Nakazawa M, Kaneto H, Sasaki S, **Imai K**, Shinomura Y. Cancer detection by ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 methylation in pancreatobiliary fluids. **World J Gastroenterol** 19:1718-1727, 2013.
- 6) Adachi Y, Ohashi H, Imsumran A, Yamamoto H, Matsunaga Y, Taniguchi H, Nosho K, Suzuki H, Sasaki Y, Arimura Y, Carbone DP, **Imai K**, Shinomura Y. The effect of IGF-I receptor blockade for human esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. **Tumor Biol** [Epub ahead of print] 2013.
- 7) Kagami H, Agata H, Inoue M, Asahina I, Tojo A, Yamashita N. Imai K. The use of bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. **Tissue Eng. Part B.** in press.
- 8) Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, Kato R. Characterization of time-course morphological features for efficient prediction of osteogenic potential in human mesenchymal stem cells. **Biotechnol Bioeng.** 2014 Jan 14. doi: 10.1002/bit.25189. [Epub ahead of print]
- 9) Xia D, Sumita Y, Liu Y, Tai Y, Wang J, Uehara M, Agata H, Kagami H, Fan Z, Asahina I, Wang S, Tran SD. GDFs promote tenogenic characteristics on human periodontal ligament-derived cells in culture at late passages. **Growth Factors.** 2013 Oct;31(5):165-73. doi: 10.3109/08977194.2013.830611.
- 10) Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, Kato R. Morphology-based prediction of osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells. **PLoS One.** 2013;8(2):e55082. doi: 10.1371/journal.pone.0055082. Epub 2013 Feb 21.
- 11) Agata A, Sumita Y, Asahina I, Tojo

A, Kagami H, Ischemic culture of dental pulp-derived cells is a useful model in which to investigate mechanisms of post-ischemic tissue recovery. *Histol Histopathol.* 2013 Aug;28(8):985-91. Epub 2013 Apr 30.

- 12) Ebihara Y, Ishikawa K, Mochizuki S, Tanaka R, Manabe A, Iseki T, Maekawa T, Tsuji K. Allogeneic stem cell transplantation for patients with acute myeloid leukemia developing from severe congenital neutropenia. *Br J Haematol.* 164: 459-461, 2014.
- 13) Nagamachi A, Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Ebihara Y, Tsuji K, Honda Z, Takubo K, Suda T, Oda H, Inaba T, Honda H. Acquired deficiency of A20 results in rapid apoptosis, systemic inflammation, and abnormal hematopoietic stem cell function. *PLoS One.* 31: e87425, 2014.

## 2. 学会発表

- 1) Kagami H. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. Biobridge. Generation regeneration conference. September 24, 2013, Venice, Italy.
- 2) Kagami H. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation.

Thursday, February 28, 2013

15:00-15:30 Potential Applications of Mesenchymal Multipotent Stromal Cells. The 16th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference, NIDCR, NIH

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

研究分担者

藤渕 航

京都大学 iPS 細胞研究所 教授

研究要旨：幹細胞混沌データからのデータマイニング環境の構築に関する研究

今年度10月より参画し、実験グループから得られる幹細胞を中心とした細胞オミックスデータの統合データマイニングを行うため、初年度として、まずは必要なデータベースの充実とそこからデータマイニングを行うツールの整備を行った。ヒト公共マイクロアレイデータ 2,919枚を搭載したSHOGoiNデータベースを構築し、そこから順位相関係数に基づく高速類似細胞検索システムであるCellMontage2を公開した。さらに、全ての細胞の組み合わせから共通の遺伝子発現セットをマイニングするSAMURAIを用いてヒト細胞の遺伝子モジュール辞書を作成した。

#### A. 研究目的

本研究では再生医療の臨床実用化を加速する情報システムの構築をすることを目的としており、我々のグループにおいては、未発表の実験データを共有し、横断的にマイニングして新しい発見を行うための情報技術を開発することが目的である。

#### B. 研究方法

本研究でヒト細胞の知識バンクとして必要となるヒト細胞データベースの構築、並びに解析ツール群の整備を行った。

##### 1. ヒト細胞データベースの設計

ヒト細胞を材料にした公共のマイクロアレイデータ 2,919枚を論文から収集し、当研究室のヒト細胞データベース (SHOGoiN, Human Omics Database for the Generation of iPS and Normal cells) に搭載し、既存の細胞分類、細胞画像、文献デ

ータ等とリンクを結んだ統合環境を作成して公開した (図1)。

##### 2. 高速類似細胞検索ツールの整備

既存の順位相関係数に基づく類似遺伝子発現プロファイル検索システム

CellMontage (Fujibuchi et al, 2007) に上述した公共マイクロアレイデータ 2,919枚を搭載し、今後、本研究で細胞実験から得られるデータと照合し、高速にヒト細胞の類似検索を可能とするツールを公開した (図2)。

##### 3. 高性能遺伝子モジュール辞書の作成

上述の 2,919 マイクロアレイデータから、既報の高性能遺伝子モジュールマイニングシステム SAMURAI (Fujibuchi et al, 2009) 用いて、それぞれ1つずつのアレイデータを質問データとした場合の全ての遺伝子モジュール辞書を作成した (図3)。

(倫理面への配慮)