

京都大学医学系研究科では「医の倫理委員会」を通してその倫理面の審査を行っている。共同研究者から得られる遺伝子発現データの情報解析については、倫理委員会で承認の必要がないと判断され、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

ヒト細胞データベースの構築、並びに高速類似細胞検索ツールの整備、高性能遺伝子モジュール辞書の作成を行い、それぞれを効率良く利用できるため、相互リンクを張って公開した。

1. ヒト細胞データベース SHOGoiN

ヒト細胞のマイクロアレイデータ 2,919 枚に加えて、分化細胞と幹細胞にそれぞれ、

- ・ 細胞分類キー 2,722 と 68 件
- ・ 細胞画像 638 と 37 件
- ・ 関連文献 336 と 86 件
- ・ OBO 細胞オントロジー 229 と 48 件

を搭載した。また、新たに SOM (自己組織化マップ) を 2 回繰り返した SOM of SOM により、ヒト細胞間の関係を 20x10 の 2 次元地図上にヒートマップで表すことに成功した。

2. 高速類似細胞検索ツール

CellMontage2

ヒト細胞のマイクロアレイデータ 2,919 枚を搭載し、さらに、入力データ形式にできるだけ依存しない様に Unigene、RefSeq、Entrez gene、Affymetrix probe ID、Agilent probe ID など様々な形式に対応した。例として骨格筋を検索に用いると多数の骨格筋が上位に検索され、また、データベースには胃が含まれていないため、外部からの胃のデータを用いて検索すると、期待通り膵

臓が類似細胞として上位にリストされた。

3. 高性能遺伝子モジュール辞書

計算資源の問題があるため、差のあった遺伝子を遺伝子毎にそれぞれ上位下位それぞれ 0.5% のみに限定し、2,919 枚もの大規模なモジュール辞書を作成することに成功した。また、転写因子と判明している遺伝子については情報を付加して候補となるマーカーを選択しやすい様にした結果を作成した。

D. 考察

今回 SHOGoiN データベース開発で作成した SOM of SOM 地図を考察することにより、ヒト細胞の根源である三胚葉生物の進化を反映する手がかりが存在していることが示唆された。また、大きな組織群の分かれる箇所に幹細胞が生まれているのではないかという結果が得られた。また、CellMontage2 では機会学習を含めることで幹細胞の「多分化能」や「増殖能」を測定できる可能性を含むことが示唆された。SAMURAI システムで得られた遺伝子モジュールについては、i) 先に差のある遺伝子を取り出すことでバイアスや遺伝子に漏れが生じている可能性があり改善できること、ii) 得られた遺伝子モジュールの統計的な有意性を付加してユーザに提供する重要性が見いだされた。

E. 結論

今後の再生医療の臨床実用化を加速する情報システムの構築で重要となる基盤データベース及びツールの整備を行い、横断的に細胞データマイニングを進める上で得られる成果や問題点の一端を明らかにした。また、一般的にヒト細胞オミックス情報の

統合化を進める上で重要なことは、現在、曖昧であるヒト細胞の分類体系の精密化・緻密化が必要であり、科学的な細胞分類方法の構築が喫緊の課題であることが認識された。

F. 研究発表

1. 論文発表

・藤渕 航「iPS 細胞からのビッグデータの情報セキュリティと創薬、医療への活用」、生命のビッグデータデータ利用の最前線、CMC 出版、2014（印刷中）。

・山根順子、丸山徹、藤渕航「単細胞技術に基づく iPS 細胞の標準化」、生体の科学 65 巻 2 号 2014 年（印刷中）。

2. 学会発表

なし。

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

・ SHOGoiN データベース :

<http://shogoindb.cira.kyoto-u.ac.jp>

・ CellMontage2 データベース :

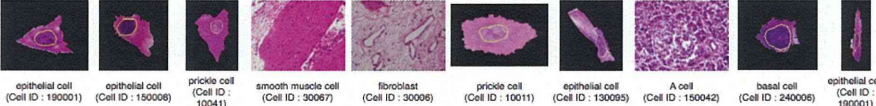
<http://cellmontage2.cira.kyoto-u.ac.jp>

SHOGoin
Human Omics database for the Generation of IPS and Normal Cells

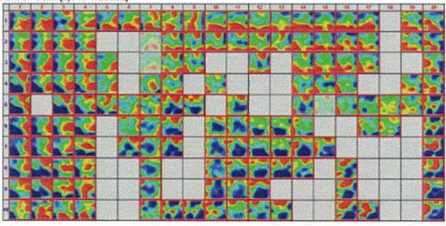
Keyword Search
Search target: Human Cell Taxonomy : Keyword: submit

APRIL 2014 Differentiated Stem

Examples of Human Differentiated Cell



SOM of SOM (2,919 Tissues)



What's New
 • 2014/2/1 Data updated.
 • Differentiated cell: 2722 cell taxonomy key, 638 images, 229 OBO terms are linked.
 • Stem cell: 66 cell taxonomy key, 37 images, 48 OBO terms are linked.

Release Notes

Stored Information

Human Differentiated Cell Taxonomy(2722 cells)	
Cell Images	638
Journal Articles (existing images only)	336
Gene Expressions	1063
Total	2037

Cell Analysis Tools
 • Cellmontage Profile Matching
 • Cellmontage Profile Retrieval
 • SAMURAI Biclustering
 • SAMURAI Gene Modules

Copyright (C) 2013 Center for IPS Cell Research and Application. All right reserved. Powered by Mizuho Research Institute, Inc.

図1 ヒト細胞データベース SHOGoin と搭載した遺伝子発現データの SOM 図

CELL MONTAGE CM Profile Matcher

CELL MONTAGE is a system for searching gene expression databases for similar cells or tissues to the query gene expression profile. Please enter your profile in the blank space or try sample queries. [Example Results]

Database settings

Specify database (databases are constructed by platform):
 CMDB * SHOGoin CELLPEDIA GEO ArrayExpress
 Subset * Affymetrix HG U133 Plus 2.0 UniGene RefSeq
 (GPL570 Homo sapiens (2919 samples))

Specify genes used to search:
 * Selected by GO term (for Human/Mouse/Rat/Fly only):
 all genes
 * Upload file: ファイルを選択 / アップロードを選択 format

Query settings

Specify query:
 Example query: human kidney(GPL10;UniGene) or Get profile
 * Paste Query (enter a set of unigene ids or supported probe ids with values in CM format):

Upload CM file: ファイルを選択 / アップロードを選択
 Upload output file of a listed software:
 Affymetrix CHP HG-U133A (MASS.0 or GCOS1.0)
 ファイルを選択 / アップロードを選択
 * Query ID conversion (mandatory)
 Select your query ID: UniGene
 Query IDs are converted into IDs of the database specified above (Affymetrix HG U133 Plus 2.0).

Parameter settings


Optional parameters:
 E R(abs) Top
 0.01 0.0 100

Advanced options:

Data [archives]
 Data Downloading [CMformatted GEO data]
 CM DB & software downloads

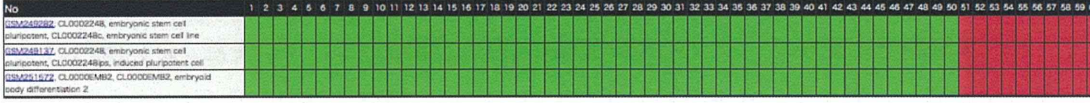
CELL MONTAGE CM Profile Matcher Search Results Scan 1000 profiles in one second!

Query > GSM1738 skeletal muscle A-AFFY-1 single . (total 2672 genes)
 Platform: GPL570(2919 entries), sampling genes: 2672(GC-bound: all), Probability: 0.01, Correlation: 0.0
 Found: 100 entries. Start: Mon Jan 20 13:44:31 2014. End: Mon Jan 20 13:44:35 2014.



Top100	Sample	DataSet	Platform	Type	Channel	Organism	Description	Probability(Correlation,#Genes)	Detail
1	GSM333449	GSE13205	GPL570	single	VALUE	Homo sapiens	骨格筋	2.53368e-173(0.55,2173)	
2	GSM333453	GSE13205	GPL570	single	VALUE	Homo sapiens	骨格筋	5.10356e-171(0.55,2173)	
3	GSM333451	GSE13205	GPL570	single	VALUE	Homo sapiens	骨格筋	1.99185e-170(0.55,2173)	
4	GSM333456	GSE13205	GPL570	single	VALUE	Homo sapiens	骨格筋	1.96427e-167(0.54,2173)	
5	GSM333450	GSE13205	GPL570	single	VALUE	Homo sapiens	骨格筋	2.51827e-167(0.54,2173)	
6	GSM333455	GSE13205	GPL570	single	VALUE	Homo sapiens	骨格筋	1.54563e-164(0.54,2173)	
7	GSM333454	GSE13205	GPL570	single	VALUE	Homo sapiens	骨格筋	4.71107e-164(0.54,2173)	
8	GSM377467	GSE15090	GPL570	single	VALUE	Homo sapiens	骨格筋	5.2231e-161(0.53,2173)	
9	GSM333452	GSE13205	GPL570	single	VALUE	Homo sapiens	骨格筋	7.14531e-160(0.53,2173)	
10	GSM269610	GSE10685	GPL570	single	VALUE	Homo sapiens	骨格筋	4.52185e-159(0.53,2173)	
11	GSM1738	GSE1110	GPL570	single	VALUE	Homo sapiens	skeletal muscle	9.02461e-158(0.53,2173)	

図2 ヒト類似細胞検索システム CellMontage2 のホームページ (上) と骨格筋を質問データとした時の検索画面例 (下)。



Gene Symbol	Name	Locus
POU5F1	POU class 5 homeobox 1	6p22.3
LIN28A	lin28 homolog A (Drosophila)	1p36.11
WDR68	WDR family member 68	10q27-q28
EPSC1	erythrocyte stem cell-related (non-protein coding)	2p14.3/3p14.3
POU5F2	POU class 5 homeobox 2	2q33
MSP-2	muscle homeobox 2	10q21
ZNF146	zinc finger protein 146	19q13.3
GLDNG	glidin 6	16p13.3
POU5F10	POU class 5 homeobox 10	6q23.31
POU5F11	POU class 5 homeobox 11	16q24.2
SLC7A5	solute carrier family 7 (sodium/cationic amino acid transporter), member 5	17p12
ZNF146	zinc finger protein 146	19q13.3
POU5F1	POU class 5 homeobox 1	6p22.3
POU5F12	POU class 5 homeobox 12	10q21.31
POU5F13	POU class 5 homeobox 13	17q13.31
POU5F14	POU class 5 homeobox 14	8q22
POU5F15	POU class 5 homeobox 15	8q22.11
ZNF138	zinc finger protein 138	7q11.21
ZNF294	zinc finger protein 294	16p13.3
ZNF384	zinc finger protein 384	17q21.32
ZNF385	zinc finger protein 385	8q24.3
ZNF386	zinc finger protein 386	17q11.2
ZNF387	zinc finger protein 387	17q11.2
ZNF388	zinc finger protein 388	16p13.3
ZNF389	zinc finger protein 389	16p13.2
ZNF390	zinc finger protein 390	17q21.31
ZNF391	zinc finger protein 391	15q18-q25
ZNF392	zinc finger protein 392	16p23.31

図3 ヒト細胞遺伝子発現データを使用した遺伝子モジュールマイニングの結果例。iPS細胞を質問としたところ、POU5F1、LIN28Aなどが正しく検出されている。

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

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。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を行い、多分化能を制御している遺伝的背景を明らかにし、データベース化する。本年度は新たな血球分化系として、コラーゲンスポンジの上での血球分化法を開発し、神経細胞、神経堤細胞の分化法を確立した。多能性幹細胞から作製した造血幹/前駆細胞について、体性幹細胞との発現プロファイルの比較の検討を開始している。また、研究所内のサーバ環境を確立し、来年度から本格的な連携を行うための体制を構築した。

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。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

分担研究者らは、ヒト多能性幹細胞を含む様々なヒト幹細胞の分化能の評価を行い、多分化能を制御している遺伝的背景を明らかにし、データベース化する。ヒト iPS 細胞の樹立方法の違いによる転写プロファイルの相違を検討する。過去 2 年間で確立したヒト iPS 細胞からの血球分化系を用いて様々な iPS 細胞クローンからの

血球分化能を比較し、それに関与する遺伝的要因を明らかにする。ヒト iPS/ES 細胞から神経堤細胞、神経幹細胞、神経前駆細胞への誘導法を確立し、そこで得られる情報をデータベース化する。各種難病患者から作成した疾患特異的 iPS 細胞を用いても同様な検討を行う。また、ヒト iPS/ES 細胞から得られた神経堤細胞、神経幹細胞から分化した各種神経細胞などの細胞への分化法も確立し、これらの実験で得られる情報をデータベース化する。多数の疾患特異的 iPS 細胞を用いて同様の解析を行い、正常 iPS 細胞との分化の違いを明らかにするとともに、分化させた細胞の疾患関連のプロファイルを集積する。

(倫理面への配慮)

- 1.患者の遺伝子情報の取り扱いに際しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針及び文部科学省研究振興局長通知に定める細則に沿って、京都大学倫理審査委員会の審査承認を受けているが、人権及び利益の保護について、十分配慮しながら実験を行う。
- 2.組み換え DNA 実験については、“組み換え DNA 実験指針”に基づき、研究計画が同指針に示されている基準に適合することを確認したうえで、計画の申請を京都大学に対して行い、承認を受けた後、規定されている封じ込め手段を適切に行う。
- 3.疾患関連 iPS 細胞作製にあたり、臨床研究に関する倫理指針に基づいて「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究」について、京都大学医学部倫理委員会の承認を頂いている。今後は、その内容を忠実に順守し、患者さん

の同意・協力を得て行う。

4.ES 細胞の使用については、ヒト ES 細胞使用指針に準じて計画書を作成し、これを遵守して行う。

C. 研究結果

iPS 細胞の樹立・培養法の違いによる樹立効率の検討を行った。フィーダーフリー・ラミニン 511E8 フラグメントを用いた方法により末梢血単核球を用いて iPS 細胞の樹立を行った。血球細胞の培養条件を検討することにより、樹立効率が改善した。また、EB ウイルスを用いた不死化 B 細胞株からの樹立に関する検討も同様に言い、フィーダーフリー・ラミニン 511E8 フラグメント法によって著しく樹立効率が改善した。これらの条件で樹立した iPS 細胞について、RNA を抽出し、発現解析用の試料とした。また、血球分化系の改善として、従来より開発している二次元の無血清、フィーダー細胞を用いない血球分化法を拡張し、新たなスキャフォールドを用いた 3 次元培養法を確立した。PET 線維で補強したコラーゲンスポンジを基材として用いることにより、従来の血球系と異なり、細胞クラスターでなく単一細胞を播種して血球分化を開始することが可能となった。また、この系には、長期間の培養が可能になり、電子顕微鏡による解析では、ニッシュ細胞と血球細胞が 3 次元スキャフォールド上でニッシュを構築していることが明らかになった。この系からも同様に発現解析用のサンプルを採取予定である。

さらに、既存の系を応用し、神経細胞への分化系及び、神経堤細胞への分化系を確立

した。

また、これらの系の構築は対照多能性幹細胞（すなわち ES 細胞および iPS 細胞）を用いて可能となった。

以上のように、今年度は順調にサンプル及びデータを収集した。下記のサーバー連携が開始しだい、寄託を開始する予定である。

研究班サーバーの設置について

所属機関の情報管理室との折衝を進め、本研究に使用するサーバーを導入した。

VLAN 設置許可を取得し、情報コンセント工事を行った。現在所内 Wifi 設置許可申請中であり、次年度早々にネットワーク構築を済ませ、本格的に中枢拠点との連携を開始する予定である。

D. 考察

上記のように、当初の計画に従って、分化系の構築とそれに伴うサンプル収集を行っている。我々が開発している血球分化系は、フィーダー細胞および血清フリーであり、安定した血球分化をステップワイズに行うことが可能である。また、神経細胞や神経堤細胞への分化系も同様に、defined factors で行うことが可能であり、それぞれの分化系での発現解析が安定して行えることが期待される。我々は疾患特異的 iPS 細胞の樹立を進めているので、これらの細胞を各種分化系を用いて分化させ、データ収集を行いたい。

E. 結論

本年度は各種分化系の構築と最適化を行った。サーバが本格的に稼働し次第、中核拠点との連携を進めたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yanagimachi MD., Niwa A., Tanaka T., Honda-Ozaki F., Nishimoto S., Murata Y., Yasumi T., Ito J., Tomida S., Oshima K., Asaka I., Goto H., Heike T., Nakahata T., Saito MK.: Robust and Highly-Efficient Differentiation of Functional Monocytic Cells from Human Pluripotent Stem Cells under Serum- and Feeder Cell-Free Conditions. PLOS One 8(4); e59243, April 2013 doi : 10.1371 / journal.pone. 0059243
- 2) Saida S, Watanabe KI, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, 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.; 121(21):4377-87. 2013 May 23; doi: 10.1182/blood-2012-12-474387.
- 3) 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 WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H.: Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular A β and Differential Drug Responsiveness. Cell Stem Cell. 12(4):487-96. 2013 Apr 4; doi: 10.1016/j.stem.2013.01.009.
- 4) Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T.: Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. Haematologica. ; 99(1):19-27. 2014 Jan doi: 10.3324/haematol.2013.083873.
- 5) 斎藤潤、中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞. 再生医療 12(1):19-29,2013.
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の可能性. 平成 25 年度神奈川県内科医学会総会 2013 年 5 月 25 日 神奈川県総合医療会館
- 2) 横山宏司、西小森隆太、池谷真、那須輝、田中孝之、斎藤潤、梅田雄嗣、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男：罹患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の分子機構の解明. 第 34 回日本炎症・再生医学会 2013 年 7 月 2-3 日 (ポスター) 国立京都国際会館
- 3) 中畑龍俊：基調講演、iPS 細胞を用いた今後の医療の可能性. 日本製薬医学会第 4 回年次大会 2013 年 7 月 19 日 エーザイ株式会社本社 5 階ホール
- 4) 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞研究が切り開く未来の医療. 日本学会議公開学術講演会「未来社会を築く生命科学と医療のフロンティア」 2013 年 8 月 3 日 京都大学薬学部記念講堂
- 5) 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞を用いた今後の小児科医療. 第 84 回日本小児科学会高知地方会 2013 年 9 月 22 日 高知医療センターくろしおホール
- 6) 中畑龍俊：さい帯血造血幹細胞発見秘話と iPS 細胞ストックの臍帯血活用の未来像. さい帯血移植 1 万例突破記念事業「さらなる飛躍へのステップ」記念講演会 2013 年 9 月 28 日 TKP 田町カンファレンスセンター
- 7) 中畑龍俊：基調講演、iPS 細胞を活用した医療の可能性と倫理. 第 10 回 STS フォーラム「科学技術が拓く人間の未来」公開シンポジウム 2013 年 10 月 5 日 京都商工会議所ビル講堂
- 8) 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 10 回 HBS 公開シンポジウム-再生医学研究の現状と臨床応用への課題 - 2013 年 11 月 12 日 徳島大学長井記念ホール(徳島大学大学院口腔科学教育部)
9. 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞の小

児医療への応用. 第 38 回東日本小児科
学会 2013 年 11 月 23 日 大宮ソニッ
クシティ

10. 中畑龍俊: 教育講演、iPS 細胞の臨
床応用. 第 55 回日本小児血液・がん学
会学術集会. 2013 年 11 月 29 日-12 月
1 日 (30 日) ヒルトン福岡シーホー
ク

G. 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

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の安全性・有効性を高める研究開発体制の構築を目的として、ヒト ES 細胞の臨床利用のために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正確かつ効率的に収集し、詳細なインフォマティクス分析に供する。24年度は臨床用細胞バンク構築の工程管理システムを用い、臨床用バンク作製の実証実験を行いその過程で収集される解析結果やデータフォーマット分析をおこなった。今後、他機関との連携を進めることにより、工程や品質管理の標準化、安全性の向上に寄与することが出来ると考えられる。

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。本分担研究では、分担研究者が長年取り組んできたヒトES細胞研究の経験と成果をもとに現在構築を行っている臨床用ヒトES細胞バンクについて、そこでの工程管理、品質管理の手技やデータを中核機関において保存を行うとともに、分析技術の標準化について他の参加機関と連携して、標準化等をすすめる。その成果をもって、厚生労働省が推進する再生医療の実現に向けた基盤技術の構築に寄与することを目的とする。

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各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。こられの研究から、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。

これまでに我々は臨床用ヒトES細胞を、これを利用しようとする研究機関、医療機関に分配するため、大学の基盤的経費も用いながら細胞バンク構築を進めている。この過程で品質管理基準や標準作業手順書な

どの整備を進めている。これらを用いて本研究では、分析法や評価方法の標準化のために必要となるプロトコルを他の参加機関と共有しデータを比較することで幹細胞の品質評価の信頼性を向上させる。あわせてデータ収集の電子化を行う。

(倫理面への配慮)

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細胞バンク構築のプロセス及び品質管理の文書化を行っている。細胞バンク構築のモデルとしてまず、既存の細胞株を利用し、動物由来成分を含まない合成培地を用いるなど臨床用に近い培養システムでの実証実験を進めている(図1)。24年度に引き続き、設定した培養条件下で実際の利用形態に近いと考えられるバンク構築の予備検討を行い、約100バイアルのマスターバンクに相当するストックを構築した。この凍結保存時の細胞について、細胞表面抗原や未分化特異的遺伝子の発現、核型品質管理に必要な分析を実施した。

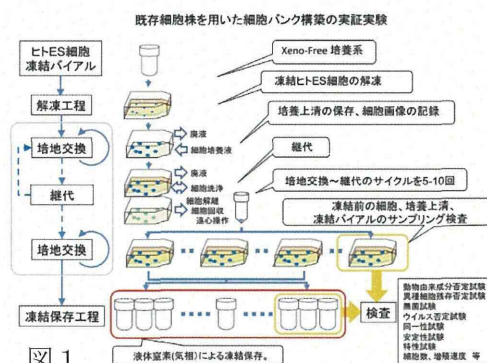


図 1

凍結保存サンプルを解冻後一定期間培養した後同様の試験を実施し、期待される特性が維持されていることが確認された。これらの試験は再生医療製品の安定した製造を行う上で必須のものであり、今後用いたプロトコルとともに検査結果を中核機関でバックアップを行う。

これらの作業に必要な工程管理システムは、ES細胞バンクのマスターファイル登録を前提とした文書体系の構築がほぼ完成しておりこれらについて、提供/共有の仕組みをどのように構築するか検討を進めた。

また、同様の臨床用細胞バンクの構築を目指す他機関の担当者との連携を含め、バンク構築の標準化について国際的な進行状況を含めて調査を進めている。そのため2013年6月に開催された International Stem cell Bank Initiative会議に参加し、情報交換を行った。この結果はガイドラインとして2014年には公開される予定である。

D. 考察

ヒトES細胞の培養技術そのものに関しては今後ともさらなる改良/改善が見込まれるものの、現時点で期待される水準の範囲では臨床応用に要求されるレベルをほぼ達成

している。この臨床用バンク構築の過程で多くの品質管理、工程管理データが蓄積されており、この本事業での活用を目指した基盤技術開発を行ってきた。

特性解析に関しては解析技術のSOP化がおおよそ完了しているが、これを一般に応用可能な様式に変更していく必要がある。しかし、プロセス管理のデータに関しては、データ収集の方法の一般化が困難であり、またデータ自体もそのままでは再利用性に乏しいと考えられさらなる検討が必要である。

特性解析に関するデータは、株間での同等性や、バンク構築の過程でのロット内の均一性を保証するうえで重要であり、今後もデータの集積を継続することにより、標準化を行うことが必要である。そのために、検査項目・評価基準などについて、十分な妥当性をもつ標準的データベースの構築のあり方について検討し、他機関での検証を行うためのスキームの提案を行った。次年度以降にこれらの成果を元にした、幹細胞管理技術の標準化に向けて、中核機関にデータを集約、分析を行なうことで本計画の全体目標が達成されると考えられる。

E. 結論

これまでに構築した臨床用ヒトES細胞バンクの工程管理や品質管理に関わるシステムから収集されるデータは有用であるが、単回試験の結果であり、その安定性や一貫性についてはより詳細な検討分析が必要である。今後、共通のプロトコールに基づいた多機関解析により、多くの事例について

データを収集し分析を行うことにより、工程や品質管理の標準化、安全性の向上に寄与すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watatani, K., Xie, Z., Nakatsuji, N. and Sengoku, S. Global competencies from regional stem cell research: Bibliometrics for investigating and forecasting research trends. *Regen. Med.* 8, 659-668 (2013).
- 2) Kumagai, H., Suemori, H., Uesugi, M., Nakatsuji, N., Kawase, E. Identification of small molecules that promote human embryonic stem cell self-renewal. *Biochem Biophys Res Commun.* 434, 710-716 (2013).
- 3) Uosaki, H., Magadum, A., Seo, K., Fukushima, H., Takeuchi, A., Nakagawa, Y., Moyes, K.W., Narazaki, G., Kuwahara, K., Laflamme, M., Matsuoka, ., Nakatsuji, N., Nakao, K., Kwon, C., Kass, D.A., Engel, F.B., Yamashita, J.K. Identification of Chemicals Inducing Cardiomyocyte Proliferation in Developmental Stage-Specific Manner with Pluripotent Stem Cells. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 6, 624-633 (2013).
- 4) Miyazaki T., Nakatsuji, N., Suemori, H. Optimization of slow cooling cryopreservation for human pluripotent stem cells. *Genesis* 2014 Jan;52(1): 49-55.

2.学会発表

- 1) 中辻憲夫. 化合物や機能性マテリアルを用いたヒト多能性幹細胞 (ES/iPS細胞) の学際研究. 第62回高分子学会年次大会 (2013.5.29-31 京都)

- 2) Nakatsuji, N. Novel culture system of human pluripotent stem cells for large-scale production and chemical control of cardiac differentiation. International Conference on Regenerative Biomedical Materials (2013.6.2-6 Wuhan)

- 3) Nakatsuji, N. Stem Cell Open Innovation in Japan: Industry-academia collaboration on stem cell large-scale production and quality control. World Stem Cell Summit 2013 (2013.12.4-6 San Diego)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

研究分担者

岡野 栄之

慶應義塾大学医学部生理学教室 教授

研究要旨

本分担研究では体細胞からiPS細胞を経てもしくは直接に様々な神経系細胞を短期間で効率的かつ均一に誘導するシステムを確立し、神経系に分化誘導された細胞の性質（安全性、有効性）を詳細に解析してそのデータを共有することにより再生医療の実現の加速に貢献する。本年度は、マーマセツ線維芽細胞からニューロンを直接誘導することに成功し、その生理機能を確認した。またヒトiPS細胞から運動ニューロン、オリゴデンドロサイト、ドパミン作動性ニューロンをさらに効率よく短期間に誘導する方法を確立した。さらに、移植治療応用にむけた安全性評価の参考となるES/iPS細胞の発現解析・塩基配列解析データを円滑に共有するため、本研究班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の運用を開始した。

A. 研究目的

再生医療の実用化において、iPS細胞は極めて有用なツールとして期待されている。患者自身の細胞からiPS細胞を経て神経系の細胞を誘導することにより、その細胞を患者本人へと移植を行う細胞移植治療と、誘導された細胞を正常対照細胞と比較することによる疾患研究、創薬研究が発展することが期待されている。しかしながら、ヒト多能性幹細胞(ES細胞/iPS細胞)は概して培養皿中での分化速度が極めて遅く、成体に存在する体細胞へと分化させるためには数ヶ月の培養期間を有する場合もあり、急性疾患に対する細胞移植においては移植細胞の準備を待つ間に病態が慢性化し細胞移植が無効となるケースがあり得る。例えば我々はこれまで脊髄損傷に対して細胞移植が有効であるかを検討

してきたが、齧歯類モデルにおいては受傷後10日を過ぎると細胞移植の効果が次第に減少し無効となる。さらに、我々のこれまでの研究で、iPS細胞はクローンごとの分化能および腫瘍形成能に大きな差があり、安全で効率よく目的細胞に分化するiPS細胞のクローンを選択するためにはかなりの時間を要することが明らかになっている。これらの点で現状のiPS細胞樹立と分化誘導システムを用いた自家細胞移植治療は、細胞を調整するための期間が極めて長く、病状が変化しうる疾患に対応させることが困難である。この問題点は同様に疾患iPS細胞を用いた研究においても律速段階となっている。本分担研究では体細胞からiPS細胞を経てもしくは直接に様々な神経系細胞を短期間で効率的かつ均一に誘導するシステムを確立し、神経

系に分化誘導された細胞の性質（安全性、有効性）を詳細に解析してそのデータを共有することにより再生医療の実現の加速に貢献する。

具体的には患者から採取することが比較的容易な細胞から目的の体性幹細胞あるいは体細胞へと直接に分化誘導を行うために、特定の組み合わせの転写因子群を細胞の用途に応じた適切な遺伝子導入法を用いて患者から採取した体細胞に遺伝子導入し、標的細胞の転写/翻訳ネットワークを直接的に制御することで目的細胞への分化誘導を迅速にかつ効率的に行う技術を確立する。誘導する細胞として高いニーズが予想される神経系細胞は、パーキンソン病で特異的に障害されるドパミン作動性ニューロン、筋繊維軸索硬化症や脊髄損傷の治療に有用性が高いと期待される運動ニューロン、脊髄小脳変性症の病変部位である小脳プルキンエ細胞であると考え、これらの細胞への迅速な誘導法を開発する。一方、中枢神経系での神経再生においては、グリア細胞が神経細胞伝達を積極的に制御し重要な機能を担っていると考えられていることから、オリゴデンドロサイトへの直接的な誘導についても開発を行う。本研究で確立される体細胞から目的細胞への直接誘導法の一部は、すでに樹立されたヒト多能性幹細胞（ES/iPS細胞）から同種の目的細胞への分化誘導技術にも応用可能であることが予想されるため、再生医療に向けた細胞調整の技術が大幅に進歩することが期待される。

また、一部の遺伝病に対する自家細胞移植治療には、ゲノム編集等による遺伝子治療が必要と考えられるが、ゲノム編集にお

けるオフターゲット効果の問題については未だ十分な知見がないことからこれについても解析を行う。

一方、プロジェクト全体の共通な目的として、上記の研究で得られたデータを4つ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への供与を行う。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を導入する。再生医療の臨床応用実用化に役立つ情報を積極的に収集し、公開するための準備を進める。

B. 研究方法

1. 転写因子を用いた線維芽細胞からのニューロンの直接誘導

①ヒト体細胞からのニューロンの直接誘導：ASCL1・BRN2・MYT1Lの3因子を発現するセンダイウイルスを用いて誘導されたヒト線維芽細胞の誘導効率を高めるための検討を行い、線維芽細胞以外の体細胞からの誘導を試みた。

②マーマセット線維芽細胞からのニューロンの直接誘導：4つの転写因子（ASCL1・BRN2・MYT1L・NEUROD1）を用いてマーマセット線維芽細胞から直接誘導した神経細胞（iN）細胞について様々な神経サブタイプマーカーによる免疫染色と電気生理学的解析による機能評価を行った。

2. ヒトiPS細胞から運動ニューロンへの誘導

昨年度までに確立した運動ニューロンへの誘導法をさらに効率化し、疾患患者由来iPS細胞株を含む様々な株で再現性を

確認するとともにレポーターとして HB9-GFP を発現するアデノウイルスベクターを利用し評価した。

3. ヒト iPS 細胞からのオリゴデンドロサイトの誘導

昨年度までに確立した方法でヒト iPS 細胞から誘導されたオリゴデンドロサイトが生理的な機能を有することを髄鞘の形成能を電子顕微鏡レベルで解析を行った。

4. ヒト iPS 細胞からのドパミン作動性ニューロンの誘導

昨年度までに確立したドパミン作動性ニューロンへの誘導法をさらに効率化し、疾患患者由来 iPS 細胞株を含む様々な株での再現性を評価した。

5. 転写因子を用いたヒト iPS 細胞からの小脳プルキンエ細胞の誘導

ヒト iPS 細胞から迅速に小脳プルキンエ細胞を誘導するため、小脳発生に関する転写因子群をレンチウイルスベクターを用いて導入し、プルキンエ細胞特異的マーカーの発現によって評価した。

6. ゲノム編集によるオフターゲット効果の評価

ゲノム編集によるゲノム変化のリスクを評価するモデルケースとして、ゲノム編集を施した iPS 細胞について操作前後のゲノム解析結果を比較した。

7. 上記の知見を共有するためのネットワーク構築と基幹サーバへのデータの供与

昨年度に設置された拠点サーバが未稼働の問題を、設置スペースの防音と空調工事によって解決する。無線 LAN アクセスポイントを含めて拠点内のネットワーク運用を開始し、電子ノートの運用に取り組む。データ供与としては、移植治療研究に用いたヒト iPS 細胞の発現解析データを用意するとともに、新たにゲノム解析を連携機関に解析を委託し、参考データの蓄積を図る。

(倫理面への配慮)

本研究の開始にあたり、まず疾患患者由来 iPS 細胞を樹立し分化誘導を行うことについては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り慶應義塾大学医学部倫理委員会に「神経疾患患者からの iPS 細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究」との表題で倫理申請を行い、承認を得た（承認番号:20080016）。また個別の疾患患者より iPS 細胞株を樹立する場合には、患者との窓口となる医療機関において、インフォームド・コンセン同意を行い、iPS 細胞株の樹立と研究応用についての承諾を得ている。さらに iPS 細胞を移植治療研究に用いることについては、「ヒト人工多能性幹細胞由来神経幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学に関する基礎研究」との表題で倫理申請を行い、承認を待ちである。iPS 細胞をモデル動物に移植する実験に関しては、「脊髄損傷に対する神経幹/前駆細胞移植の有効性の検討」という表題で動物実験計画申請を行い、慶應義塾動物実験委員会より承認を得た（承認番号: 13020-(0)）。

C. 研究結果

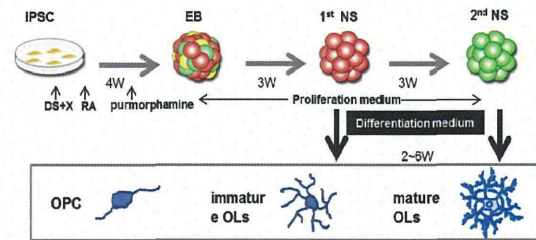
1. ①ASCL1・BRN2・MYT1Lの3因子を発現するセンダイウイルスによるヒト線維芽細胞の誘導効率を高めるため、遺伝子導入のタイミングなどの最適化などを検討したが、効率は1-2%程度であった。末梢血単核球細胞からも同様に誘導を行ったが、導入遺伝子の発現は見られたものの、神経系マーカーの発現を認めなかった。

②マモセットiN細胞についてGABA作動性ニューロンやグルタミン酸作動性ニューロンへの分化を免疫染色で確認した。また、電気生理学的解析によって機能的神経細胞に分化できていることを確認した。

2. 今年度において改良した最新の誘導法によって転写因子を用いなくてもhiPS細胞から約34日でHB9陽性の運動ニューロンへの分化が行えることを確認した。その効率は分化誘導された神経細胞あたり20~30%であった。一方HB9-GFPを付けたレポーターアデノウイルスベクターは、機能したものの感染効率が低いためにソーティングによる濃縮などへの応用には改良が必要であった。

3. 昨年度までに確立した転写因子を用いない方法でヒトiPS細胞から誘導されたオリゴデンドロサイトを誘導した場合、*in vitro*でも髄鞘の形成が行われることを電子顕微鏡観察によって確認した。またこのオリゴデンドロサイトを移植治療実験に用いるため、様々な方法で検出可能なレポーターを導入した。一方転写因子を用いた場合は約25日でオリゴデンドロサイト前駆細胞マーカーであるO4の発現が確認さ

れたが、髄鞘の形成などについては未確認である。



4. 今年度において改良した最新のドーパミン作動性ニューロン誘導法では、転写因子を用いなくてもhiPS細胞から約22日でTH陽性のドーパミン作動性ニューロンへの分化が行えることを確認した。平行してラットTHプロモーターを持ったレポーターの濃縮を試みたが、使用したTHプロモーターの発現特異性に問題があり、用いるTHプロモーターの構造を検討している。

5. ドーパミン作動性ニューロンへの分化誘導と同様の方法でニューロスフェアを形成させつつ、適度な後方化シグナルを与えることで、後脳の領域特性を持つ神経幹細胞を誘導することに成功した。今後は転写因子を強制発現させることでプルキンエ細胞のマーカーであるCalbindin陽性の神経細胞を誘導することを目指す。

6. TALENを用いたゲノム編集によって変異遺伝子の修復を行ったいくつかの疾患患者由来のiPS細胞に対して修復によるオフターゲットの影響を検討するため、変異導入前後の細胞について、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析のためのサンプルを準備した。本年度内に本研究班中核機関において解析を行う予定である。

7.拠点サーバ稼働時の騒音・廃熱などの問題があったため、設置スペースに防音・空調工事を行った。タブレット端末の可動のための無線LANアクセスポイントを含めて拠点内のネットワーク構築について大学のITセンターに申請を行った。年度内には学内ネットワークの本格運用を開始できる見込みである。中核機関サーバへのデータ供与としては、これまで本研究グループが脊髄損傷に対する前臨床研究に用いたヒトiPS細胞の発現解析データを供与するとともに、それらの細胞から誘導した神経系細胞に関して連携機関より次世代シーケンス解析を行って同様にデータを取得し供与する予定である。

D. 考察

1. マーモセットはヒトと同じ霊長類のモデル生物であり、我々はすでに脊髄損傷治療モデルや遺伝子改変モデルとして利用できることを示している。今回、マーモセットにおいて直接誘導で短期間に神経細胞への分化誘導が可能になったことで、霊長類における直接誘導を介した短時間での自家細胞の調整と自家移植の可能性をモデル動物で検討することができる。

2. 運動ニューロンへの分化誘導効率をさらに進めるためには転写因子を用いた直接誘導法を再度検証する必要がある。レポーターに関しては、より感染効率の高いベクターの使用を検討する。

3. ヒトiPS細胞から分化誘導したオリゴデンドロサイトが髄鞘形成能を持つことか

ら、移植治療などに用いることで運動機能などの改善が期待される。ただし転写因子を用いない方法ではオリゴデンドロサイトの誘導に約3ヶ月かかることから、約1ヶ月で誘導が可能な転写因子を用いる方法によっても同様に機能的なオリゴデンドロサイトが誘導できているかを検証する必要がある。

5. ヒトiPS細胞から小脳プルキンエ細胞へ将来的に分化する後脳の領域特性を持つ神経幹細胞を誘導することに成功した。今後は複数の転写因子を用いることによってプルキンエ細胞の誘導を目指す。またマーカーの発現だけではなく、電気生理学的手法によってその機能も評価する必要がある。

6. 次世代シーケンスの結果が待たれるとともに、遺伝子変異を修復したことで疾患の病態が改善されたことを示す必要がある。また今回ノックイン時の選抜マーカーCre/loxPの部位特異的組換えで抜く前の段階の株について解析を依頼しているが、マーカーを抜いた後の株についても同様に解析が必要と考えられる。

7. 拠点サーバの運用が開始されれば、さらに他拠点とのデータの共有を開始し、本プロジェクトの最大の目的である効率的なデータ集積とその活用のために必要なソフトウェアの運用を開始する。また、他拠点の実績を参考にしながら、慶應拠点のCPC施設においてもデジタルペンやiPadなどを端末に用いた電子ノートシステムを導入してペーパーレス化を図っていく。

E. 結論

転写因子を用いないヒト iPS 細胞からの運動ニューロン、オリゴデンドロサイト、ドパミン作動性ニューロンなどの分化誘導法は、ほぼ確立してきたが、体細胞からの直接誘導については、線維芽細胞からの iN 細胞以外まだ十分な検討ができていないため、今後は導入する転写因子などをさらに検証して進めていく。特に線維芽細胞以外の細胞からの直接誘導は大きな課題である。

拠点サーバの本格的な運用開始に伴い、来年度からは本研究で取得されたデータに関して連携機関との共同研究を活用してさらに多くのデータの蓄積と供与を行い、安全性評価の基準など再生医療の加速への貢献を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okano H, Nakamura M, Yoshida K, Okada Y, Tsuji O, Nori S, Ikeda E, Yamanaka S, Miura K.: Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. **Circulation Research** 112(3):523-533, 2013.
- 2) Nishimoto Y, Nakagawa S, Hirose T, Okano HJ, Takao M, Shibata S, Suyama S, Kuwako K, Imai T, Murayama S, Suzuki N, Okano H: The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the early phase of amyotrophic lateral sclerosis. **Mol. Brain**, 6(1):31, 2013.
- 3) Iwanami A, Gini B, Zanca C, Assuncao A, Nael A, Dang J, Yang H, Zhu S, Kohyama J, Kitabayashi I, Cavenee WK, Cloughesy TF, Furnari TF, Nakamura M, Toyama Y, Okano H, Mischel P.: PML mediates Glioblastoma resistance to mTOR-targeted therapies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 110(11): 4339-4344, 2013.
- 4) Fukuda T, Takeda S, Xu R, Sato T, Bando W, Ochi H, Sunamura S, Fujita K, Shinomiya K, Okano H, Kimura A, Enomoto M, Okawa A, Itoh H.: Sema3A regulates bone mass accrual through sensory innervations. **Nature** 497(7450): 490-493, 2013.
- 5) Takeuchi K, Yoshioka N, Higa Onaga S, Watanabe Y, Miyata S, Wada Y, Kudo C, Okada M, Ohko K, Oda K, Sato T, Yokoyama M, Matsushita N, Nakamura M, Okano H, Sakimura K, Kawano H, Kitagawa H, Igarashi M. Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. **Nat. Commun.** 4: 2740, 2013.
- 6) Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A,

- Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T, Kato T, and Iwamoto K: Increased L1 Retrotransposition in the neuronal genome in Schizophrenia. **Neuron** 81(2):306-313,, 2014.
- 7) Imaizumi Y, Okano H.: Modeling human neurological disorders with induced pluripotent stem cells. **J. Neurochem.** 2013 Nov 29. doi: 10.1111/jnc.12625.
- 8) Naka-Kaneda H, Nakamura S, Igarashi M, Aoi H, Kanki H, Tsutsumi S, Aburatani H, Shimazaki T and Okano H: The miR-17/ 106-p38 axis is a key regulator of the neurogenic-to-gliogenic competence transition in developing neural stem/progenitor cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 111(4):1604-1609, 2014.
2. 学会発表
【国外】
- 1) Hideyuki Okano: Brain Science Using iPScell Technology and Transgenic Non-human Primates: 2013 Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry and American Society for Neurochemistry (ISN/ASN)./ Plenary Lecture, 2013.4.20 *2013.4.20-2013.4.24 (Cancun Convention Centre, Cancun, Mexico)
- 2) Hideyuki Okano: Brain Science using iPS cell technology and Transgenic Non-Human Primates: Seminner at The University of Edinburgh, 2013.5.8 *2013.5.8 (The University of Edinburgh , Edinburgh, UK)
- 3) Hideyuki Okano: iPS technologies for CNS-regeneration & disorders : IID 2013 (International Investigative Dermatology 2013) / Guest Lecture, 2013.5.9 *2013.5.8-5.13 (Queen Anne & Jacobite Rooms, Edinburgh Castle, Edinburgh, UK)
- 4) Hideyuki Okano: The iPS cells-based CNS regeneration and investigation of neurological disorders: Tissue Repair & Regeneration, Gordon Research Seminar –Keynote Lecture, 2013.6.15 *2013.6.15-16 (Colby-Sawyer College New London, NH, USA)
- 5) Hideyuki Okano: iPS cell Technology and Transgenic non-human Primates to study Brain Science: The 61st NIBB Conference, Cellular Community in Mammalian Embryogenesis, 2013.7.11 *2013.7.10-12 (Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan)