

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。

現在のところ、細胞の品質管理をマーカーのみを用いて行うことは不可能である。その理由として、細胞の個体差が大きいことと、それぞれのマーカーの有用性に関する科学的なエビデンスが不足していることがあげられる。本プロジェクトは再生医療を推進するためのデータベース、あるいはデータのプラットフォームを提供することが目的であり、これまでに医科研病院拠点からは骨髄間質細胞（間葉系幹細胞）と臍帯由来間葉系幹細胞に関する網羅的遺伝子発現をおこない、データベースへの登録を行った。さらに、本プロジェクトのユニークな点として、拠点内における他施設より得られた体性幹細胞である歯根膜由来間葉系幹細胞や ES 細胞、iPS 細胞のデータとをバイオインフォマティクスの手法を用いて比較することで、これまでにない情報が得られつつある。解析はまだ途中であるが、これまでの単一施設による解析では困難であった横断的な解析によって、体性幹細胞の共通の品質管理マーカーの抽出や施設間に共通して使用可能な機能マーカーの特定につながることを期待される。

一方、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間を要した。また、拠点間の協力によって得られた知見についても、さらに複数の機関での検証が必要であろう。本プロジェクトにおいて構築された国横断的なデータベースの構築は従来にない新たな試みであり、継続的に運営するとともに、さらに多くの研究者へ開放することで、再生医療の推進に貢献するものと期待される。

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、細胞調製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**

- 32(4):913-25, 2014.
- 2) Ito M, Mitsuhashi K, Igarashi H, Nosho K, Naito T, Yoshii S, Takahashi H, Fujita M, Sukawa Y, Yamamoto E, Takahashi T, Adachi Y, Nojima M, Sasaki Y, Tokino T, Baba Y, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. MicroRNA-31 expression in relation to BRAF mutation, CpG island methylation and colorectal continuum in serrated lesions. **Int J Cancer**. 135(11):2507-15, 2014.
 - 3) 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** 35(2): 973-85, 2014.
 - 4) Yasui H, Ishida T, Imai K. The role of DNA methylation in the genetics and epigenetics of multiple myeloma. In: Steve Holt, editors. Multiple myeloma: risk factors, diagnosis and treatments. :**Series: Cancer Etiology, Diagnosis and Treatments**. Hauppauge NY: Nova Science Publishers. 147-156, 2014.
 - 5) Harada T, Yamamoto E, Yamano H, Nojima M, Maruyama R, Kumegawa K, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Harada E, Takagi R, Tanaka Y, Aoki H, Nishizono M, Nakaoka M, Tuyada A, Niinuma T, Kai M, Shimoda K, Shinomura Y, Sugai T, Imai K, Suzuki H. Analysis of DNA methylation in bowel lavage fluid for detection of colorectal cancer. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)**, 7(10):1002-10, 2014.
 - 6) Imai K. Overview and Future prospect of “Promotion plan for the platform of human resource development for cancer”. **Juntendo Medical Journal**, 60(3): 234-237, 2014.
 - 7) Yamamoto M, Yajima H, Takahashi H, Yokoyama Y, Ishigami K, Shimizu Y, Tabeya T, Suzuki C, Naishiro Y, Takano K, Yamashita K, Hashimoto M, Keira Y, Honda S, Abe T, Suzuki Y, Mukai M, Himi T, Hasegawa T, Imai K, Shinomura Y. Everyday clinical practice in IgG4-related dacryoadenitis and/or sialadenitis: Result from the SMART database. **Modern Rheumatology**. 27:1-6, 2014.
 - 8) Naito T, Nosho K, Ito M, Igarashi H, Mitsuhashi K, Yoshii S, Aoki H, Nomura M, Sukawa Y, Yamamoto E, Adachi Y, Takahashi H, Hosokawa M,

- Fujita M, Takenouchi T, Maruyama R, Suzuki H, Baba Y, Imai K, Yamamoto H, Ogino S, Shinomura Y. IGF2 differentially methylated region hypomethylation in relation to pathological and molecular features of serrated lesions. **World J Gastroenterol** . 20(29): 10050-61, 2014.
- 9) Yamamoto M, Shimizu Y, Takahashi H, Yajima H, Yokoyama Y, Ishigami K, Tabeya T, Suzuki C, Matsui M, Naishiro Y, Imai K, Shinomura Y. CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α)+ M2 macrophages contribute to fibrosis in IgG4-related disease? **Mod Rheumatol**, 2:1-3, 2014.
- 10) Yasui H, Tsurita G, Imai K. DNA synthesis inhibitors for the treatment of gastrointestinal cancer. **Expert Opin Pharmacother**. 15(16):2361-72, 2014.
- 11) 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 Engineering Part B: Reviews**. 20(3): 229-232, 2014.
- 12) Igarashi H, Kurihara H, Mitsuhashi K, Ito M, Okuda H, Kanno S, Naito T, Yoshii S, Takahashi H, Kusumi T, Hasegawa T, Sukawa Y, Adachi Y, Okita K, Hirata K, Imamura Y, Baba Y, Imai K, Suzuki H, Yamamoto H, Nosho K, Shinomura Y. Association of microRNA-31-5p with clinical efficacy of anti-EGFR therapy in patients with metastatic colorectal cancer. **Annals of Surgical Oncology**. [Epub ahead of print], 2014.
- 13) Yamamoto S, Otsu M, Matsuzaka E, Konishi C, Takagi H, Hanada S, Mochizuki S, Nakauchi H, Imai K, Tsuji K, Ebihara Y. Screening of drugs to treat 8p11 myeloproliferative syndrome using patient-derived induced pluripotent stem cells with fusion gene CEP110-FGFR1. **Plos One**, in press, 2015.
- 14) Nosho K, Igarashi H, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, Kanno S, Yoshii S, Mikami M, Takahashi H, Kusumi T, Hosokawa M, Sukawa Y, Adachi Y, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Clinicopathological and molecular characteristics of serrated lesions in

- Japanese elderly patients. **Digestion**. 91(1):57-63. 2015.
- 15) Yamamoto M, Nojima M, Takahashi H, Yokoyama Y, Ishigami K, Yajima H, Shimizu Y, Tabeya T, Matsui M, Suzuki C, Naishiro Y, Takano KI, Himi T, Imai K, Shinomura Y. Identification of relapse predictors in IgG4-related disease using multivariate analysis of clinical data at the first visit and initial treatment. **Rheumatology**. 54(1):45-9, 2015.
- 16) Yamamoto M, Takahashi H, Shimizu Y, Yajima H, Suzuki C, Naishiro Y, Imai K, Shinomura Y. Seasonal allergies and serial changes of serum levels of IgG4 in cases treated with maintenance therapy for IgG4-related disease. **Modern Rheumatology**. 13:1-2. 2015.
- 17) Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability. **Archives of Toxicology**. in press, 2015.
- 18) Mitsunashi K, Noshio K, Sukawa Y, Matsunaga Y, Ito M, Kurihara H, Kanno S, Igarashi H, Naito T, Adachi Y, Tachibana M, Tanuma T, Maguchi H, Shinohara T, Hasegawa T, Imamura M, Kimura Y, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis. **Oncotarget**. in press, 2015.
- 19) Nakagaki S, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Nasuno M, Watanabe S, Idogawa M, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Contextual niche signals towards colorectal tumor progression by mesenchymal stem cell in the mouse xenograft model. **J Gastroenterol**, [Epub ahead of print], 2015.
- 20) Kagami H. The potential use of cell-based therapies in the treatment of oral diseases. **Oral Dis**. 2015 Feb 4. doi: 10.1111/odi.12320. [Epub ahead of print]
- 21) Sumita Y, Asahina I, Tran SD, Agata H, Inoue M, Tojo A, Kagami H. Potential cell-based therapies for irreversibly damaged salivary glands and atrophic alveolar bone. "New Trends in Tissue Engineering and Regenerative Medicine - Official Book of the Japanese Society for Regenerative Medicine", ed. Hibi H, and Ueda M., ISBN 978-953-51-1724-7, September 18, 2014, Intech.
- 22) Kagami H. Optimization of stem cell expansion, storage, and distribution. Chapter 25, in "Stem

- Cell Biology and Tissue engineering in Dental Science”, Eds. Ajaykumar Vishwakarma, Paul Sharpe, Songtao Shi and Murugan Ramalingam. pp. 323-331, 2014 Elsevier.
- 23) Zhang Y, Li X, Chihara T, Mizoguchi T, Hori A, Udagawa N, Nakamura H, Hasegawa H, Taguchi A, Shinohara A, Kagami H. Comparing immunocompetent and immunodeficient mice as animal models for bone tissue engineering. *Oral Diseases*, in press.
- 24) Osanai H, Kuroiwa H, Uchida K, Kagami H, Yamada K, Taguchi A. Sonographic appearances of cervical lymph nodes in healthy young Japanese adults: Association with age, sex, and body mass index. *J Clin Ultrasound*. 2014 Aug 26. doi: 10.1002/jcu.22231. [Epub ahead of print]
- 25) Yamada S, Uchida K, Iwamoto Y, Sugino N, Yoshinari N, Kagami H, Taguchi A. Panoramic radiography measurements, osteoporosis diagnoses and fractures in Japanese men and women. *Oral Dis*. 2014 Aug 18. doi: 10.1111/odi.12282. [Epub ahead of print]
- 26) Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, Kato R.
- 27) Characterization of time-course morphological features for efficient prediction of osteogenic potential in human mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng*. 2014 Jul;111(7):1430-9. doi: 10.1002/bit.25189. Epub 2014 Jan 30.
- 28) 今井浩三. 総説 橋渡し研究の展開と我が国の医療. *東京都病院薬剤師会雑誌* 63(2): 5-8, 2014.
- 29) 湯地晃一郎, 井元清哉, 山口類, 宮野悟, 上昌広, 今井浩三. 人口動態に基づいた日本医療の未来予測—高齢多死社会の到来, 特集「超高齢者に対する外科治療の問題点」*南江堂臨床雑誌「外科」*, 76(5): 457-463, 2014.
- 30) 能正勝彦, 五十嵐央祥, 伊藤美樹, 三橋 慧, 栗原弘義, 菅野伸一, 内藤崇史, 須河安恭敬, 松永康孝, 足立靖, 野島正寛, 今井浩三, 丸山玲緒, 鈴木 拓, 山本博幸, 篠村恭久. 大規模コホートをを用いた大腸癌のノンコーディングRNA発現異常と生活習慣の分子疫学的解析. *日本癌病態治療研究会誌*, 20(1):60-63, 2014.
- 31) 今井浩三. 私とリウマチ学. *分子リウマチ治療*, vol.7 no4, 244-246, 2014.
- 32) 鈴木拓, 今井浩三. がんエピゲノム異常を理解し、応用し、そして制御するために. *実験医学* Vol.32 No.19,

- 3024-3029, 2014.
- 33) 安井寛, 今井浩三. 抗体医薬, DDS 研究 30 年, PHARMA TECH JAPAN 臨時増刊号, 31(2): 94-101, 2015.
- 34) 佐々木茂, 篠村恭久, 今井浩三. 抗体治療 特集「DDS がもたらした新しい臨床の風景」. *Drug Delivery System*, 30(1): 16-24, 2015.
2. 学会発表
- 【国際学会】
1. Kato Y, Hiromi H, Tujisaki M, Matsune T, Sasaki S, Hinoda Y, Shinomura Y, Imai K. A combination of the anti-fibroblast growth factor receptor 1 monoclonal antibody and interferon- α/β suppresses human hepatic cancer cells in vitro and in vivo. 41st Congress of the International Society of Oncology and Biomarkers. 2014, Barcelona.
- 【国内学会】
1. 今井浩三. 東京大学医科学研究所における TR の現状と展望. シンポジウム 2 「我が国におけるトランスレーショナルリサーチの現状とこれからの展望」第 51 回日本臨床分子医学会学術集会, 東京国際フォーラム. 2014, 東京
2. 今井浩三. 招聘講演「東大医科研における橋渡し研究とその発展」第 103 回日本病理学会総会 特別企画, 広島国際会議場フェニックスホール. 2014, 広島
3. 今井浩三. 特別講演「最先端医療の開発と DNA 情報に基づく新たな社会」. 多摩大学寺島実郎監修リレー講座. 2014, 東京
4. 今井浩三. 東京理科大学生命医科学研究所シンポジウム「東京大学医科学研究所における橋渡し研究の現状とその展開」、東京理科大学ヒト疾患モデル研究センター, 2014, 千葉県.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願
- 1) 谷口博昭, 今井浩三、片岡一則、西山伸宏、宮田完二郎、前田芳周、「転写因子 PRDM14 のがん幹細胞診断マーカーへの応用とがん幹細胞を標的とした治療法の開発」発明等の届出書提出日:2014 年 07 月 09 日 (出願番号 2014-141278)
- 2) 辻祥太郎, 今井浩三 「結合体及びその使用」出願日: 2015 年 03 月 05 日 (出願番号 2015-043459)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

研究分担者

藤渕 航

京都大学 iPS 細胞研究所 教授

研究要旨

幹細胞等ヒト細胞ビッグデータからのデータマイニングに関する研究

昨年度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、ヒト細胞データベースの構築と細胞からのビッグデータを利用したデータマイニング法を開発している。今年度は、1) トランスクリプトームやメチローム等の細胞データ間の相互交換を可能とするデータ最小情報スタンダードの開発と、2) iPS細胞などから作成した人工細胞ががん化の特性を持たないかなど品質検査を簡易に行うことが可能な細胞空間マッピングツールの開発を行った。実際に未発表データの細胞マッピングを行ったところ強いがん化特性について細胞を直接観察することなしに推定できることが判明した。

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バイオインフォマティクスを専門とし、未発表の大量細胞実験データを共有し、横断的にデータマイニングして新しい知識発見や推定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

本研究では、異なるトランスクリプトームやメチローム等の細胞データ間の相互交換を可能とするデータ最小情報スタンダード

の開発と iPS 細胞などから作成した人工細胞が持つがん化の特性などを検査することが可能な細胞空間マッピングツールの開発を行った。

1. 細胞データ間の相互交換を可能とするデータ最小情報スタンダードの開発

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)

には公共のシーケンスデータサイト SRA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) から収集したヒト及びマウスのシングルセルトランスクリプトーム及びメチロームデータ

が搭載されている。これらのデータは異なる研究者から発表されたものであり、相互に情報の交換が不可能である場合が殆どである。そこで、国際的に開発が進んでいる最小情報スタンダード (MI standards) を活用した独自のヒト細胞データの最小情報スタンダードの開発を開始した。

2. 細胞空間マッピングツールの開発

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、がん株細胞データ 950 枚、グリオーマデータ 3 枚を論文等から収集し、がん軸、細胞分化軸、細胞種角を分離する特徴遺伝子の抽出を行い、細胞空間表示を行った。この空間を用いて高速に人工細胞の品質解析を可能とするツールを開発し、本研究の分担者の細胞実験から得られたデータを解析した。

(倫理面への配慮)

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。

また、今年度から開始された「倫理審査状況及び利益相反の管理について」の所属機関からの書類を厚生労働大臣宛て提出した。

C. 研究結果

最小情報スタンダード (MI standards) を活用した独自のヒト細胞データの最小情報スタンダードの開発、並びに人工細胞の品質解析を可能とする細胞空間表示ツールの開発を行い、細胞空間表示については、共同研究者らが使用できるように、Web サイトから公開した。

1. 細胞データ間の相互交換を可能とするデータ最小情報スタンダードの開発

まず、ヒト細胞データの明確化に必須とされる情報項目を明らかにするため、SRA より収集したシングルセルトランスクリプトーム及びメチローム解析データとメタデータのキュレーションを行った。その結果、細胞データの最小情報は、3 つのカテゴリの情報 (ソース細胞情報、手法・装置情報、そしてデータ情報) で構成されると考えられた (図 1)。更に図 2 に示す様に、トランスクリプトーム解析やメチローム解析の様な異なる実験に関しても、実際に用いる技術を体系的に分類することで情報交換や統合化のための最小情報フォーマットの作成が可能となった。更に詳細に関しては、既存の最小情報スタンダード (MIAME: Minimum Information About Microarray Experiment, MINSEQE: Minimum Information about a high-throughput Nucleotide Sequencing Experiment, <http://fged.org/projects/> 及び、MIACA: Minimum Information About a Cellular Assay, <http://miaca.sourceforge.net/> など) からの該当項目の統合・再利用や、また新

規にいくつかの項目を追加することで独自の細胞データのための最小情報スタンダードを作成した。現在の SHOGoiN には、この最小情報スタンダードに沿ったシングルセルトランスクリプトーム・メチローム解析データ情報が約 450 件格納されている。

2. 細胞空間マッピングツールの開発

以下の手順により細胞を 3 軸に展開した。

- i. 特徴遺伝子はマハラノビス距離を使用
- ii. がん/非がん軸は 4,312 プローブを Z 軸に射影
- iii. 10 細胞種（外胚葉、中胚葉、内胚葉、間葉系幹細胞、神経、胚盤胞、iPS 細胞、ES 細胞、血液、生殖細胞）から特徴遺伝子 4,973 プローブを抽出
- iv. XY 平明に iPS/ES 細胞中心点（幹細胞中心）を設置
- v. 幹細胞中心からの距離を計算し、同時に 10 細胞種同士の距離が最大になるようデータを円周上に射影

この結果を図 3 に示した。また、この細胞空間の中に新規な細胞データを投影可能とするツールを開発し、実際に、内胚葉細胞種や神経細胞種が近接する同種の細胞グループにマッピングされることを確認した

（図 4）。本ツールを用いて他の分担者グループからの未発表データを検証した結果、がん化していた神経データを発見し、現在、共同研究に発展しつつある。

D. 考察

今回、SHOGoiN では細胞データの最小

情報スタンダードを構築し、異なる研究者によって産生された実験データの共有化のための環境整備を試みた。その結果、現在使用されている実験技術によって産生されるデータ・メタデータ情報項目の統合・形式化が可能となった。しかしながら今回の研究を通して、既存の公共データベースから入手可能なデータ及び情報は、使用語彙の制御がされておらず、また多くの実験情報の詳細が提供されていないため我々の細胞データ最小情報スタンダードにおける 70%程度しか得られない、という問題が明らかになった。そのため今後は、国際協調下において細胞データの最小情報スタンダードを開発しデータベース等へのデータ登録の際の標準形式化の推進、また有識者の監修の元でのオントロジーの開発と、それを用いたデータベース登録語彙の標準化が課題として挙げられる。

また更なる発展として、iPS 細胞由来の人工組織の移植や創薬スクリーニングのための疾患モデリング等、再生医療における細胞の有用性から、その用途に沿った専門的かつ詳細な細胞データや情報の体系的な保存・共有を可能にする最小情報スタンダードの拡張の必要性も考えられる。

細胞マッピングツールにおいては、公共マイクロアレイデータを使用して、人工細胞品質解析を行ったところ、偶然にも他の分担者が関係する iPS 細胞由来の神経細胞であった。これを解析したところ、強いがん化の傾向が示唆され、確認したところ、実際にがん様のフェノタイプを示していた

ことが判明した。今後は本ツールの高性能化を行い、フェノタイプでわかりにくい他の細胞においても品質解析が可能となる様に改良を重ねていくことが課題となった。

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独自のヒト細胞データの最小情報スタンダードの開発、並びに人工細胞の品質解析を可能とする細胞空間表示ツールの開発を行い、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再認識された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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(2): 154-158 (2014).
2. Akiyama H, Ueda Y, Nobumasa H, Ooshima H, Ishizawa Y, Kitahiro K, Miyagawa I, Watanabe K, Nakamura T, Tanaka R, Yamamoto N, Nakae H, Kawase M, Gemma N, Sekiguchi Y, Fujibuchi W, Matoba R. A set of external reference controls/probes that enable quality

assurance between different microarray platforms, *Analytical Biochemistry*, 472: 75-83 (2014).

3. Wong PS, Tanaka M, Sunaga Y, Tanaka M, Taniguchi T, Yoshino T, Tanaka T, Fujibuchi W, Aburatani S. Tracking difference in gene expression in a time-course experiment using gene set enrichment analysis, *PLoS One*, 9(9): e107629 (2014).
4. 加藤有己、桜井都衣、藤渕航「ヒト細胞からのビッグデータの情報管理と情報解析技術」ビッグデータの収集、調査、分析と活用事例 pp.249-254 (2014). (書籍)
5. 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利用の最前線、176-184 (2014). (書籍)

2. 学会発表

1. Junko Yamane, Sachiyo Aburatani, Satoshi Imanishi, Hiromi Akanuma, Reiko Nagano, Tsuyoshi Kato, Hideko Sone, Seiichiroh Ohsako, and Wataru Fujibuchi, Prediction of Developmental Chemical Toxicity by Support Vector Machines with Gene Networks in Human Embryonic Stem Cell Validation System, The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Biocience, 2015,

- January, Osaka.
2. Kunie Sakurai, Junko Yamane, Kenta Kobayashi, Koji Yamanegi, Takeaki Taniguchi, Yuki Kato and Wataru Fujibuchi. Stem Cell Informatics Database: a framework for a new repository on single cell assay data and diverse knowledge of human cells. GIW/ISCB-Asia 2014, December, Tokyo.
 3. Wataru Fujibuchi, SHOGoiN-Human omics database for the generation of iPS and normal cells, poster presentation at Systems Biology: Global Regulation of Gene Expression, Cold Spring Harbor Laboratory, 2014, March, New York.
 4. Junko Yamane, Michihiro Tanaka, Wataru Fujibuchi, Standardization of human iPS and ES cells using single-cell transcriptome analysis, poster presentation at Systems Biology: Global Regulation of Gene Expression, Cold Spring Harbor Laboratory, 2014, March, New York.
 5. Michihiro Tanaka, Junko Yamane, Kenichi Tanaka, Kenta Kobayashi, Wataru Fujibuchi, Bioinformatics resources for cell standardization at single-cell resolution, poster presentation at The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Center for Learning and Innovation (CLI) Takeda Pharmaceutical Company Ltd., 2014, January, Osaka.
 6. Junko Yamane, Sachiyo Aburatani, Satoshi Imanishi, Reiko Nagano, Hideko Sone, Seiichiroh Ohsako, Wataru Fujibuchi, Prediction of Developmental Neurotoxic Effects using Human Pluripotent Stem Cells, poster presentation at The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Center for Learning and Innovation (CLI) Takeda Pharmaceutical Company Ltd., 2014, January, Osaka.
 7. 【依頼講演】 藤渕航、iPS細胞と元素周期表の密接な関係、第296回京都化学者クラブ、京都大学楽友会館、2015年、2月、京都
 8. 【招待講演】 藤渕航、幹細胞インフォマティクス、第6回平成26年度HPCIセミナー「予測する生命科学・医療および創薬基盤」、産業技術総合研究所ゲノム情報研究センター、2014年、11月、東京
 9. 【招待講演】 Wataru Fujibuchi, "SHOGoiN DB: Insights into the new generation of human omics databases", Workshop: Cell-focused data: Integration, organization, and applications, Johannes Gutenberg-Universität Mainz,

Mainz, Germany, Nov. 2014.

10. 【招待講演】 藤渕航、幹細胞と遺伝子ネットワークを活用した化学物質の毒性評価と細胞分化解析への応用、第5回ヒトES細胞使用研究倫理研修会、国立環境研究所、2014年、3月、茨城

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
 1. SHOGoiN データベース (開発中/
<http://stemcellinformatics.org/>)
 2. 細胞クオリティチェッカー (開発継続中/
<http://stemcellinformatics.org/CellMapper/>)

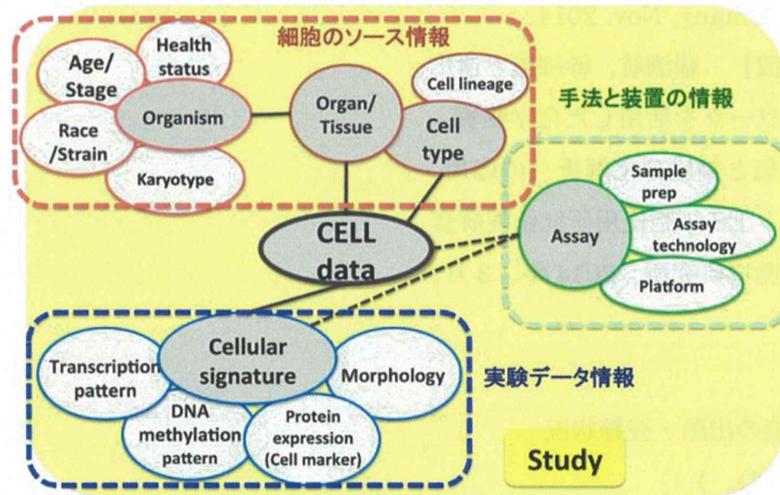


図1 独自のヒト細胞データの最小情報スタンダードの開発の概念図

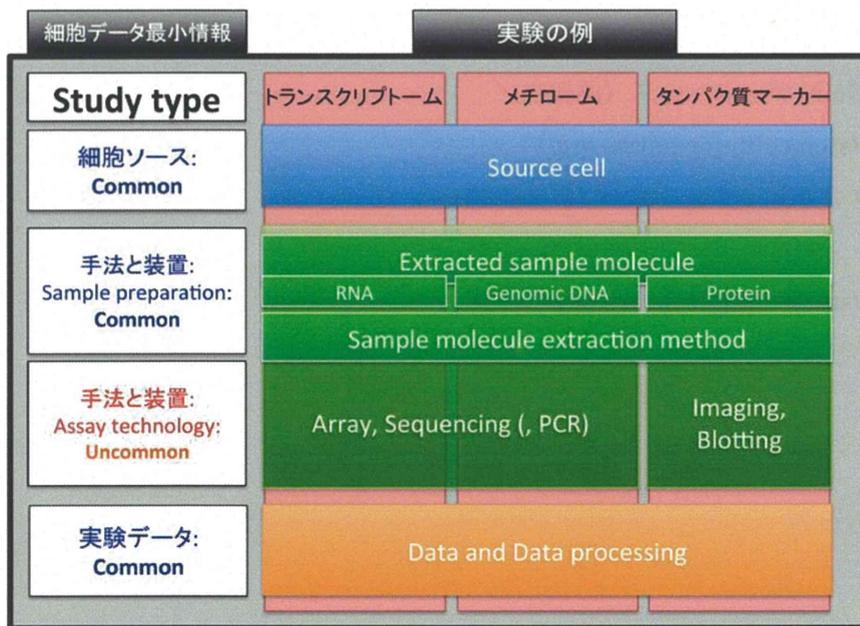


図2 ヒト細胞データ最小情報スタンダードを用いた場合の異なる実験データ間（トランスクリプトーム、メチローム、タンパク質マーカー）での相互情報交換可能性の例。

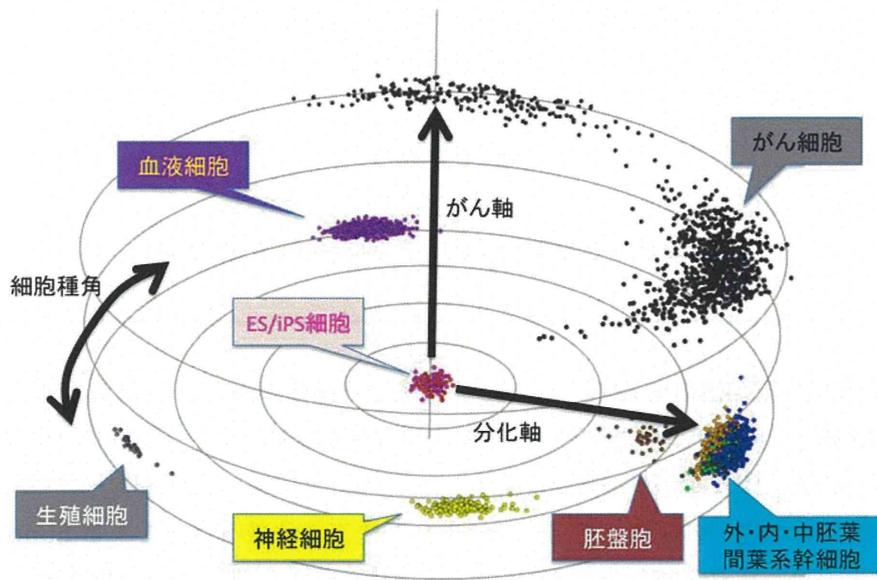


図3 ヒト細胞遺伝子発現データを使用した細胞空間マッピング。がん軸、分化軸、細胞種角について特徴遺伝子を用いて空間への展開を行った。

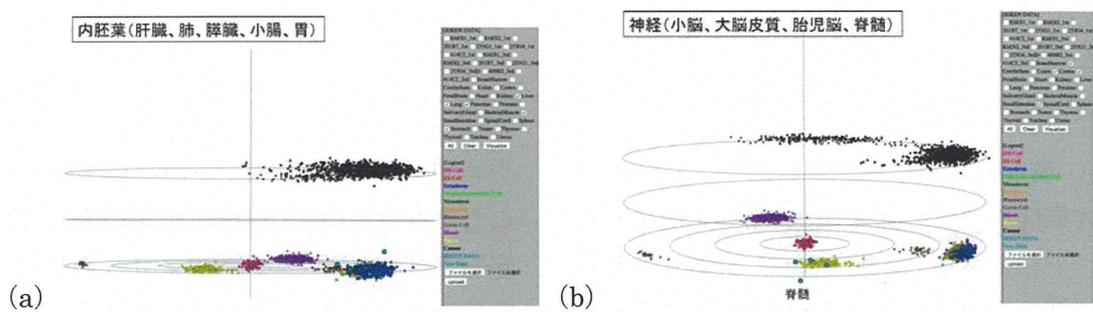


図4 細胞空間マッピングツールを用いて、(a) 内胚葉細胞種及び (b) 神経細胞種をマッピングさせた。それぞれ最近接する細胞種グループが正しく検出されている。

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
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：

「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
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。まれな先天性骨髄不全症である Fanconi 貧血患者の線維芽細胞より iPS 細胞を樹立し、血球・内皮共通前駆細胞へと分化させ、RNA-seq を施行した。先天性の神経筋疾患である脊髄性筋萎縮症患者 2 例の線維芽細胞より iPS 細胞を樹立し、運動ニューロンへと分化させた iPS 細胞の性状評価をマイクロアレイで、バルプロ酸による遺伝子発現プロファイルの変化を RNA-seq によって検討した。RNA-seq 126 データ（約 70 サンプル）、Microarray 24 データ（12 サンプル）をアップロードした。

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

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。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。血球系以外の疾患特異的 iPS 細胞からも分化細胞を得、RNA-seq 等の解析データを寄託する。

(倫理面への配慮)

本研究は、疾患を有する患者さんから検体を頂き iPS 細胞を作成して行う研究であるため、患者さんの同意・協力を必要とする研究である。また、作成する iPS 細胞を用いた疾患解析においては、遺伝子解析が必須であり、個人情報取り扱いの配慮を必要とする研究である。この2点に対して、京都大学医学部医の倫理委員会に、ヒトを対象とした医学の研究および臨床応用実施申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究」およびヒト遺伝子解析申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」の2申請を行った。その後、京都大学医学部医の倫理委員会での審査を頂き、平成20年6月4日付けで、実施に関して承認を頂いた。本研究においては、その内容を忠実に順守して行った。また、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

Fanconi 貧血患者由来 iPS 細胞の解析

まれな先天性骨髄不全症である anconi 貧血患者の線維芽細胞より iPS 細胞を樹立し、血球・内皮共通前駆細胞へと分化させた。血球・内皮共通前駆細胞から血球・内

皮への分化能が低下しており、その原因は血球・内皮共通前駆細胞における分化制御遺伝子の発現低下にあると結論した。

Fanconi 貧血患者由来 iPS 細胞とその遺伝子補充クローンを血球・内皮共通前駆細胞へ分化させ、RNA-seq を施行した。

脊髄性筋萎縮症患者由来 iPS 細胞の解析

先天性の神経筋疾患である脊髄性筋萎縮症患者2例の繊維芽細胞より iPS 細胞を樹立し、運動ニューロンへと分化させた。患者 iPS 細胞由来運動ニューロンをマウス筋細胞と共培養し、神経筋接合部を形成させたところ、患者細胞は対照と比して形成脳が著しく低下していた。バルプロ酸またはアンチセンスオリゴの添加により、形成能は著しく改善した。iPS 細胞の性状評価をマイクロアレイで、バルプロ酸による遺伝子発現プロファイルの変化を RNA-seq によって検討した。

サーバの運用状況について

京都大学 iPS 細胞研究所内のサーバールームに Windows, Linux サーバーを設置した。中核ならびに拠点施設間との連携は、サーバールーム内 Linux サーバーにデータを格納、アップロードしたデータで双方向性通信を可能とし、共同研究に向けた利用の準備を整えた。サーバーアップデートや点検、また計画停電時の対応については委託業者（日立製作所）と中枢情報管理者と協力しメンテナンスを行っている。

寄託状況について、

RNA-seq 126 データ (約 70 サンプル), Microarray 24 データ (12 サンプル) をアップロードし, 中枢 (東京大医化学研究所) とのデータ共用, 解析の委託が可能な状況にある。共同研究の ES 細胞の培養条件検討計画について、KhES1、KhES3 の RNA を採取した。現在、material transfer agreement の準備中である。

電子ノートの準備・使用状況、

4 名の研究者 (本年度 5 名) により iPad/Windows タブレット端末による Accelrys notebook の試運用を開始した。培養室およびオープンラボ実験スペースなど合計 4 箇所に専用端末の使用に制限した無線 LAN を配備し, サーバルーム内 Windows サーバーへのアクセスならびにデータ操作を可能とした。

D. 考察

iPS 細胞からの血球分化・神経分化系を用いた疾患解析系を構築し、得られた細胞を網羅的解析に供した。これらの系で得られた分化細胞は機能的であった。再生医療に用いる iPS 細胞やその分化細胞については、分化効率や安全性などの要素の他に、十分な機能を発揮しうる事が重要である。疾患 iPS 細胞由来の分化細胞は疾患関連の機能異常を再現できることがわかったので、これらの細胞でみられる発現プロファイルの特徴を抽出し、表現型に影響を与える因子を解析し、知見を積みかさねることにより、再生医療に用いる iPS 細胞・分化細胞が十分な機能を発揮しうるかどうかの予測に使用できるのではないかと期待している。

E. 結論

iPS 細胞からの血球分化・神経分化系を用いた疾患解析系を構築し、得られた細胞を網羅的解析に供した。来年度は引き続きデータの寄託を実施するほか、拠点内で共同研究を積極的に進める。

F. 研究発表

論文発表

1. 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
2. Daifu T., Kato I., Kozuki K., Umeda K., Hiramatsu H., Watanabe K., Kamiya I., Taki T., Nakahata T., Heike T., Adachi S.: The clinical utility of genetic testing for t(8;16)(p11;p13) in congenital acute myeloid leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 36(5):e325-7. 2014
Jul doi: 10.1097/MPH.000000000000099.
3. Honda Y., Tsuchida M., Zaike Y., Masunaga A., Yoshimi A., Kojima S., Ito M., Kikuchi A., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic 1 leukemia who developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of

- Pediatric Hematology/Oncology (JSPHO). *Br J Haematol.*165(5):682-7. 2014 Jun, doi: 10.1111/bjh.12796. Epub 2014 Mar 4.
4. Hasegawa D, Chen X, Hirabayashi S, Ishida Y, Watanabe S, Zaïke Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics and treatment outcome in 65 cases with refractory cytopenia of childhood defined according to the WHO 2008 classification. *Br J Haematol.* 166(5):758-66. 2014 Sep . doi: 10.1111/bjh.12955.
 5. Ochi K., Takayama N., Hirose S., Nakahata T., Nakauchi H., Eto K.: Multicolor staining of globin subtypes reveals impaired globin switching during erythropoiesis in human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 3(7):792-800. 2014 Jul, doi: 10.5966/sctm.2013-0216. Epub 2014 May 29.
 6. Sakashita K., Kato I., Daifu T., Saida S., Hiramatsu H., Nishinaka Y., Ebihara Y., Feng M., Matsuda K., Saito S., Hirabayashi K., Kurata T., Le U., Nakazawa Y., Tsuji K., Heike T., Nakahata T., Koike K.: In vitro expansion of CD34+CD38- cells under stimulation with hematopoietic growth factors on AGM-S3 cells in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 08/2014;DOI: 10.1038/leu.2014.239
 7. Nemoto A., Saida S., Kato I., Kikuchi J., Furukawa Y., Maeda Y., Akahane K., Honna-Oshiro H., Goi H., Kagami K., Kimura S., Sato Y., Okabe S., Niwa A., Watanabe K., Nakahata T., Heike T., Sugita K. and Inukai T.: Specific anti-leukemic activity of PD0332991, a CDK4/6 inhibitor, against Philadelphia-chromosome positive lymphoid leukemia. *Cancer Res.* In press.
 8. Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, Nakagawa M, Sekiguchi K, Nagata S, Matsumoto Y, Yamamoto T, Umeda K, Heike T, Okumura N, Koizumi N, Sato T, Nakahata T, Saito M, Otsuka T, Kinoshita S, Ueno M, Ikeya M, Toguchida J.: Derivation of Mesenchymal Stromal Cells from Pluripotent Stem Cells through a Neural Crest Lineage using Small Molecule Compounds with Defined Media. *PLoS One.* 2014 Dec 2:9(12):e112291. doi: 10.1371/journal.pone.0112291.
 9. Moriwaki K., Manabe A., Taketani T., Kikuchi A., Nakahata T., Hayashi Y.: Cytogetics and clinical features of pediatric myelodysplastic syndrome in Japan. *Int. J. Hematol.* 100:478-484,2014.
 10. Suzuki N., Niwa A., Yabe M., Hira A., Okada C., Amano N., Watanabe A., Watanabe K., Heike T., Takata M., Nakahata T., Saito M.: Pluripotent cell models of Fanconi anemia

identify the early pathological defect in human hemoangiogenic progenitors. Stem Cells Translational Medicine in press.

11. Yoshida M., Kitaoka S., Egawa N., Yamane M., Ikeda R., Tsukita K., Amano N., Watanabe A., Morimoto M., Takahashi J., Hosoi H., Nakahata T., Inoue H., Saito M.K.: Modeling the early phenotype at the neuromuscular junction of spinal muscular atrophy using patient-derived iPSCs. Stem Cell Reports in press.
12. 中畑龍俊: iPSC 細胞から HTS に耐える疾患モデル評価系の構築. (特別インタビュー) 国際医薬品情報 通巻第 1026 号: 25-27 2015 年 1 月 26 日
13. 中畑龍俊: iPSC 細胞を用いた難病研究—臨床病態解明と創薬に向けた研究の最新知見: 特集によせて、編集: 中畑龍俊、遺伝子医学 MOOK27: 23-26、2015 年 2 月 5 日 メディカルドゥ発

学会発表

1. 中畑龍俊: 特別講演、iPS 細胞を用いた小児医療の将来. 第 50 回中部日本小児学会会 2014 年 8 月 10 日 信州大学医学部付属病院
2. 中畑龍俊: 特別講演、iPS 細胞時代: 医療はどうかわるか. 日本早期認知症学会 (JSED) 第 15 回学術大会 in 佐倉 2014 年 9 月 12-14 日 (14 日) ウィンストンホテル・ユーカリ (佐倉市)
3. 中畑龍俊: 特別講演、臍帯血中の造血幹細胞発見秘話と最近の iPSC 細胞研究.

第 38 回日本血液事業学会総会 2014 年 10 月 29-31 日 (29 日) 広島国際会議場

4. 中畑龍俊: 招待講演、iPS 細胞が変えるリハビリテーションの未来—臨床応用の可能性—. 第 49 回日本理学療法学会大会 (市民公開講座) 2014 年 5 月 30 日~6 月 1 日 (6/1) パシフィコ横浜
5. 中畑龍俊: iPSC 細胞—臨床への挑戦. 第 3 回不整脈薬物治療サミット~不整脈薬物治療の近未来を考える~ (第 29 回日本不整脈学会学術大会/第 31 回日本心電学会学術集会合同学術大会サテライトシンポジウム) 2014 年 7 月 25 日 ザ・プリンスパークタワー東京
6. 中畑龍俊: iPSC 細胞の小児がん治療への様々な応用. 東京都福祉保健局委託事業小児がん早期診断推進研修会 公開シンポジウム「小児がん治療の現在」 2015 年 2 月 11 日 聖路加国際大学アリス・C・セントジョンメモリアルホール
7. Niwa Akira, Nakahata Tatsutoshi, Saito Megumu: Efficient and less labor-intensive methods for inducing vascular endothelial cells from human pluripotent stem cells. ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center(CANADA) June 18-21, 2014(6/18, poster)
8. Iki Takehiro, Tanaka Michihiro, Saito Megumu, Fijibuchi Wataru, Nakahata Tatsutoshi: Microarray analyses cochlea-derived otospheres

- reveal putative transcription factors which regulate characters of the otospheres. ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center(CANADA) June 18-21,2014(6/20, poster)
9. Shoji Emi, Sakurai Hidetoshi, Heike Toshio, Awaya Tomonari, Nakahata Tatsutoshi, Sehara-Fujisawa Atsuko: Modelling duchenne muscular dystrophy (DMD) with patient derived human induced pluripotent stem cells. ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center(CANADA) June 18-21,2014(6/20, poster)
 10. Suzuki Naoya, Samata Bumpei, Habu Toshiyuki, Watanabe Akira, Nakahata Tatsutoshi, Takahashi Jun, Saito Megumu: Impaired neuronal maturation on seckel syndrome is caused by loss of self-organization and centrosome integrity during early neuronal development. ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center (CANADA) June 18-21,2014(6/20, poster)
 11. Norihiro Nishimoto, Miho Murakami, Mari Ito, Yukari Saito, Megumu Saito, Akira Niwa, Tatsutoshi Nakahata: Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Rheumatoid Arthritis (RA) Patients Reproduce CD14 (+) CD15 (+) Abnormal Myeloid Cells Observed in Bone Marrow of Severe RA Patients. The American College of Rheumatology (ACR) and the Association of Rheumatology Health Professionals (ARHP) annual meeting 2014 November 14 - 19, 2014, Boston Convention and Exhibition Center (USA), 口演
 12. Takashi Taga, Tomoyuki Watanabe, Kazuko Kudo, Daisuke Tomizawa, Kiminori Terui, Hiroshi Moritake, Akitoshi Kinoshita, Shotaro Iwamoto, Hideki Nakayama, Hiroyuki Takahashi, Akira Shimada, Tomohiko Taki, Tsutomu Toki, Etsuro Ito, Hiroaki Goto, Katsuyoshi Koh, Akiko M. Saito, Keizo Horibe, Tatsutoshi Nakahata, Akio Tawa, Souichi Adachi: Risk-Oriented Therapy for Myeloid Leukemia of Down Syndrome: A Nationwide Prospective Study By the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG). 56th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 6-9, 2014, San Francisco (poster).
 13. Hiroyuki Takahashi Tomoyuki Watanabe, Akitoshi Kinoshita, Yuki Yuza, Hiroshi Moritake, Kiminori Terui, Shotaro Iwamoto, Hideki Nakayama, Akira Shimada, Kazuko Kudo, Tomohiko Taki, Miharuru Yabe, Hiromichi Matsushita, Yuka Yamashita, Kazutoshi Koike, Atsushi Ogawa, Yoshiyuki Kosaka, Daisuke Tomizawa, Takashi Taga, Akiko M.