

- 2015.1.24 *2015.1.24 (虎ノ門ヒルズ、東京)
39. 岡野栄之：iPS 細胞技術と遺伝子改変霊長類を用いた中枢神経系の再生と疾患研究：「再生医療実現拠点ネットワークプログラム (NWP)」新技術説明会、2015.1.27 *2015.1.27 (独立行政法人科学技術振興機構 東京別館(K's 五番町ビル) 1階ホール、東京)
40. 岡野栄之：iPS 細胞技術を用いた再生医療と脳科学:理数フロンティア事業講演会、2015.1.28 *2015.1.28 (東京都立西高等学校、東京)
41. 岡野栄之：iPS 細胞の臨床応用について：豊島区医師会学術講演会、2015.2.18 *2015.2.18 (豊島区医師会館、東京)
42. 岡野栄之：iPS 細胞を用いた神経系の再生・疾患研究：第3回生活習慣病の分子細胞病態学研究会・特別講演、2015.3.21 *2015.3.21 (ホテルグランパシフィック LE DAIBA、東京)
43. 岡野栄之：iPS 細胞と遺伝子改変霊長類を用いた神経疾患の病態解明と創薬研究：第88回日本薬理学会年会・特別講演、2015.3.18 *2015.3.18-20 (名古屋国際会議場、名古屋)
44. 岡野栄之：iPS 細胞を用いた脊髄損傷の再生医療について～京浜臨海部ライフノベーション国際戦略総合特区の取組みから～：第14回日本再生医療学会総会ランチョンセミナー、2015.3.19 *2015.3.19-21 (パシフィコ横浜、横浜)
45. 岡野栄之：iPS 細胞技術を用いた医療革命：第14回日本再生医療学会総会・会長講演、2015.3.20 *2015.3.19-21 (パシフィコ横浜、横浜)
46. 岡野栄之：iPS 細胞を用いた神経系の再生・疾患・創薬研究：株式会社技術情報協会セミナー、2015.3.24 *2015.3.24 (株式会社技術情報協会・セミナールーム、東京)
47. 岡野栄之：iPS 細胞技術を用いた医療革命：第14回日本再生医療学会総会・会長講演、2015.3.20 *2015.3.19-21 (パシフィコ横浜、横浜)
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得(出願)
(発明の名称)内耳細胞誘導方法
(出願番号)特願 2014-100017
(出願日)2014/5/13
(出願人名)学校法人 慶應義塾
(発明者)細谷誠、岡野栄之、藤岡正人
(内容)ヒト iPS 細胞から内耳感覚上皮誘

導の効率化、内耳繊維細胞誘導法の確立、
薬剤毒性スクリーニング法の開発

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

梅澤明弘

独) 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

研究要旨

社会の期待が大きい再生医療では、安全性・有効性を高めるための研究開発を進めていく必要がある。そのため臨床応用への実用化に向けた共通課題に対する各研究機関の連携が重要となる。こうした再生医療研究における基礎～臨床応用研究をカバーするビッグデータの集積は、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につながっていく。本研究では、ヒトES加工医薬品を対象としたマニピレーション（幹細胞機能維持・分化制御）に関して、製造工程などを含む品質管理のデータベース構築をすすめ、品質管理基準の選定を行っている。昨年度に引き続き、ヒトES細胞におけるin vivo分化能評価で得られるテラトーマ組織像の集積と検証を進めた。またヒトES加工医薬品の原材料として用いるES細胞樹立時および維持・培養時等に取得したデータの記録し、さらにそれらを検証した上で手順書へ反映させた。

A. 研究目的

ヒト幹細胞を用いた再生医療の臨床応用にあたって開発される技術の早期実用化をはかり、国民に還元すると共に、安全性・有効性をより高めていく研究の継続性が必要である。そのための革新的な研究開発を持続的に行うことができる体制の構築にあたり、本研究ではES細胞のマニピレーションに関する情報提供を行う。

B. 研究方法

1) 細胞製造工程の電子化

ヒトES加工医薬品を対象としたマニピレーション（幹細胞機能維持・分化制御）に関して、製造工程などを含む品質管理についてデータベース構築をおこなう。特にヒトES加工医薬品製造にあたりES細胞の維持・培養時等の記録データの電子化を進めて、それに基づく手順書の見直し、従事者への教育訓練の実施をおこなう。

2) 多能性評価としてのテラトーマ組織画像のデータベース化

ES 細胞品質評価の一つとして in vivo での多分化能検定で得られたテラトーマの切片画像の集積を進めていく。

(倫理面への配慮)

国立成育医療研究センターでは「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づきヒト ES 細胞に関する医学研究が適性に行われるよう、ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会が組織されている。ヒト ES 細胞研究に関する各種規程（「ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会規程」、「ヒト ES 細胞樹立に関する規程」、「ヒト ES 細胞分配に関する規程」、「ヒト ES 細胞使用に関する規程」）も整備され、機関全体として生命倫理及び医の倫理に基づき適切に行う。申請者らは、当該センターが定期的（年 2 回以上）に開催している生命倫理に関する講演を受講し、適切な生命倫理観を身につけ常に配慮し研究を実施する。国立成育医療研究センター研究所（機関内番号 ES 倫 2）文部科学大臣確認番号:18 諸文科振第 832 号

C. 研究結果

1) 細胞製造工程の電子化

ヒト ES 細胞製造の作業工程で得られる一次情報（作業記録、細胞情報、解析生データ等）の電子化を進めた。さらに作業実施者に対する教育訓練を行い、作業行程、データ取得とその管理体制の統一的な基準を

設定し、電子化の有用性を活かした共有化をはかった。主任研究者から提供された SOP の共有システムの検証を行った。

2) 多能性評価としてのテラトーマ組織画像のデータベース化

ヒト ES 細胞評価においては、細胞特性評価の一つである in vivo 多能性試験（テラトーマ形成能）で得られる組織画像のデータベース化を進めた。具体的には移植日、組織採取日、腫瘍の大きさ（画像を含む）等の情報に加え、組織切片の HE 染色像の取り込みを行った。その一部においては、組織像から得られる三胚葉分化の割合の定量化を進めた。これらのデータに関する公開データベースを構築し、公開した。

D. 考察

作業工程記録の電子化、教育訓練の徹底を進めた結果、細胞培養に集中できるなどで効率的な運用が可能となり、作業者の意識の共有化も図られた。細胞評価においては、ヒト ES 細胞の in vivo 多分化能性検定での組織画像のデータベース化は、iPS 細胞や造腫瘍性試験における検証につながる基盤となると考えられ、今後さらにデータ活用に向けた改善を進めていくことが求められる。

E. 結論

ヒト ES 細胞製造過程における安全性担保に重要となる作業工程の効率的運用を可能となる体制が整ってきた。共通のプラットフォームによる SOP の標準化に

向けた取り組みを今後も継続していく。

テラトーマ画像のデータベース化に向けた基盤が構築でき、一部のデータに関して公開した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Akutsu H, Machida M, Kanzaki S, Sugawara T, Ohkura T, Nakamura N, Yamazaki-Inoue M, Miura T, Vemuri MC, Rao MS, Miyado K, Umezawa A. Xenogeneic-free defined conditions for derivation and expansion of human embryonic stem cells with mesenchymal stem cells. *Regenerative Therapy*. 1:18-29, 2015.

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

西田幸二

大阪大学医学系研究科 脳神経感覚器外科（眼科学） 教授

研究要旨

医療用 iPS 細胞ストックの輸送技術開発を行った。専用輸送容器を作製して、凍結 iPS 細胞の空輸を行い、輸送前後で細胞の品質に変化がないことを確認した。また、複数施設における再生医療技術についての情報共有に対する基盤として、各拠点を結ぶネットワークシステムを導入した。このシステムを用いて本システムを用いて中核機関（東京大学）や他拠点との間で、次世代シーケンサーを用いた角膜上皮細胞や培養上皮細胞の RNA-seq など大容量の再生医療関連データやそれらのデータ解析の迅速な交換を行い、今後の情報公開の準備を進めた。

A. 研究目的

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

再生医療の普及に当たっては組織・細胞採取あるいは保存場所から細胞培養施設への、組織や凍結バンク細胞の搬送、また細胞培養施設から移植施設への再生医療

製品の搬送が極めて重要なステップとなる。しかしながら、現在までのところ搬送に関する手順、基準などが確立されていないため、本研究では搬送に関する手順や基準の確立を行い、これに関する情報共有ネットワークの構築を行って、情報を広く活用できる基盤を構築する。

B. 研究方法

①凍結 iPS 細胞ストックの輸送技術開発

医療用凍結 iPS 細胞ストックを用いる臨床試験では、ストックしている施設から CPC を持つ治療実施施設へ凍結 iPS 細胞ストックを輸送する必要がある。我々が現在までに培養口腔粘膜上皮細胞シートについて開発した輸送技術を応用して、凍結

iPS 細胞ストック用の輸送技術を京都大学 iPS 細胞研究所と共同で開発を行った。

本年度はプロトタイプの凍結 iPS 細胞ストック専用の輸送容器を作製し、基本性能（温度試験や落下試験など）を確認した。更に大阪大学にて作製した凍結 iPS 細胞を大阪一沖縄間で空輸し、その輸送前後の iPS 細胞の品質評価を行った。

②細胞輸送技術に関する情報共有のためのシステム構築

細胞輸送技術に関する情報共有のために中核機関（東京大学）との間で、日立製作所（株）製の情報共有ネットワークシステムを導入した。

本システムを用いて中核機関（東京大学）や他拠点との間で、次世代シーケンサーを用いた角膜上皮細胞や培養上皮細胞の RNA-seq、iPS 細胞のエキソーム解析など大容量の再生医療関連データやそれらのデータ解析の迅速な交換を行った。

（倫理面への配慮）

「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、「ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」、「ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」、「ヒト組織を利用する医療行為の安全性確保・保存・使用に

関するガイドライン」、「ヒト由来組織・組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する指針」、「医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「疫学研究に関する倫理指針」、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」を遵守して研究を遂行する。

C. 研究結果

①凍結 iPS 細胞ストックの輸送技術開発
設定した輸送前後の評価実験（核型、幹細胞マーカー発現、神経分化能など）を行った結果、G バンド解析では輸送前後の細胞で正常核型を示した。表面抗原マーカー発現では、TRA1-60 が輸送前 $94.8 \pm 2.9\%$ 、輸送後 $96.4 \pm 2.5\%$ 、SSEA4 が輸送前 $99.5 \pm 0.4\%$ 、輸送後 $99.7 \pm 0.2\%$ 、TRA-2-49/6E が輸送前 $99.8 \pm 0.1\%$ 、輸送後 $99.8 \pm 0.3\%$ と輸送前後で判定基準以上の陽性率を示した。SFEBq 法を用いた神経分化能評価では、TRA-1-60（幹細胞マーカー）が輸送前 $0.4 \pm 0.3\%$ 、輸送後 $0.3 \pm 0.2\%$ 、PSA-NCAM（神経分化マーカー）が輸送前 $95.8 \pm 0.4\%$ 、輸送後 $97.0 \pm 1.0\%$ と表面抗原マーカー発現と同様に判定基準以上の分化効率を示した。

②細胞輸送技術に関する情報共有のためのシステム構築

口腔粘膜上皮組織および上皮細胞シートの輸送 SOP、これらの評価項目、それらを輸送して取得したデータをまとめたスライド、

表化データを中核機関と共有した。さらに他施設から収集した輸送技術に関する研究データを加えたものも中核機関（東京大学）と共有した。

また上述の凍結 iPS 細胞ストックの輸送技術開発についての実験データは、本システムを利用して保管しており、デジタルペーデータ数は 260 程度、輸送試験の評価データも約 100 試験分となっている。輸送に関連した情報の公開に向けたデータの集積を行った。

D. 考察

医療用凍結 iPS 細胞の輸送技術開発を進めた。今後は、大阪大学で作製した凍結細胞ストックの空輸試験および輸送前後での凍結細胞の評価を行う完了する予定である。本空輸試験で輸送前後の細胞の品質に変化がないことを検証したのちに、京都大学の医療用 iPS 細胞ストックを空輸して、評価を進める予定である。

また今後、情報共有ネットワークを用いて、中核機関や他拠点機関と再生医療技術の共有、共同解析をさらに進める予定である。

E. 結論

本研究によって医療用凍結 iPS 細胞ストック輸送技術の開発を進め、専用輸送容器の作製および iPS 細胞の輸送前後での評価を行った。また、複数施設における再生医療技術についての情報共有に対する基盤として、各拠点を結ぶネットワークシステムを

導入し、このシステムを用いて再生医療における輸送関連情報の共有準備を進めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Oie Y, Nishida K. Translational research on ocular surface reconstruction using oral mucosal epithelial cell sheets. *Cornea*. 2014;33 Suppl 11:S47-52.
2. Soma T, Hayashi R, Sugiyama H, Tsujikawa M, Kanayama S, Oie Y, Nishida K. Maintenance and distribution of epithelial stem/progenitor cells after corneal reconstruction using oral mucosal epithelial cell sheets. *PLoS One*. 2014;9(10):e110987.
3. Sugiyama H, Yamato M, Nishida K, Okano T. Evidence of the survival of ectopically transplanted oral mucosal epithelial stem cells after repeated wounding of cornea. *Mol Ther*. 2014;22(8):1544-55.
4. Oie Y, Nozaki T, Takayanagi H, Hara S, Hayashi R, Takeda S, Mori K, Moriya N, Soma T, Tsujikawa M, Saito K, Nishida K. Development of a cell sheet transportation technique for regenerative medicine. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014;20(5):373-82.
5. より安全有効な治療用コンタクトレン

- ズを目指して(解説) 西田 幸二, 前田直之, 辻川 元一, 高 静花, 相馬 剛至, 大家 義則, 日本コンタクトレンズ学会誌 (0374-9851) 56 巻 3 号 Page188-192 (2014.09)
6. 【再生医療の最新の進歩(後篇) 組織工学とその臨床応用】セルシートエンジニアリング 角膜再生医療(解説/特集)大家 義則, 西田 幸二, 最新医学 (0370-8241)69 巻 7 月 増刊 Page1488-1496(2014.07)
 7. 眼表面再建後の治療用コンタクトレンズ脱落に及ぼす因子の検討(原著論文) 相馬 剛至, 前田 直之, 渡辺 真矢, 佐々本 弦, 藤本 久貴, 大家 義則, 高静花, 洲崎 朝樹, 辻川 元一, 西田 幸二, 日本コンタクトレンズ学会誌 (0374-9851) 56 巻 2 号 Page101-107(2014.06)
2. 学会発表
 1. 大家義則、相馬剛至、高柳泰、林竜平、三田村勇人、辻川元一、川崎諭、前田直之、西田幸二. 自己脂肪由来細胞を用いて作製した自己培養口腔粘膜上皮細胞シート移植の術後長期成績. 角膜カンファ 2015 2015年2月13日 高知県 口演
 2. Yoshinori Oie, Yuki Kobayashi, Noriyasu Hashida, Ai Honda, Hisataka Fujimoto, Takeshi Soma, Takashi Nakao, Motokazu Tsujikawa, Kohji Nishida. Development of telemedicine system with slit lamp 3D transmission system. ARVO (the association for research in vision and ophthalmology) annual meeting. 2014年5月7日. Orland (アメリカ合衆国). ポスター
 3. Yoshinori Oie. Ocular surface reconstruction: clinical study to market. ARVO (the association for research in vision and ophthalmology) annual meeting SIG (Translational Research: Drug or Regenerative Medicine) 2014年5月7日. Orland (アメリカ合衆国). 口演
 4. Yoshinori Oie, Satoru Andojo, Hiroshi Takayanagi, Ryuhei Hayashi, Takayuki Nozaki, Shizu Takeda, Takeshi Soma, Motokazu Tsujikawa, Kohji Nishida. Transportation of oral mucosal tissue and oral mucosal epithelial cell sheets for clinical trial. World Ophthalmology Congress 2014 2014年4月2日～6日. 東京都 ポスター
- 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

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

高橋 政代

独立行政法人理化学研究所 多細胞システム形成研究センター

網膜再生医療研究開発プロジェクト プロジェクトリーダー

研究要旨

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求められている。

現在の国内でのヒト幹細胞に関する研究体制の多くは研究機関単位で自立（自律）的に研究開発が行われており、臨床研究として患者に技術提供が行われてきた。しかし、自立（自律）性が優先された結果、個々の研究機関が研究開発活動や情報収集において孤立し、研究結果等の共有が学会や論文を介して行われることが多くなった。即ち、論文に繋がらずに共有されなかったデータは多数存在し、十分な分析等が行われていないと予想される。そこで、目的とする早期実用化と持続的研究開発能力を確保するには、自立（自律）分散した研究機関の連携を図り孤立化を防ぐことによって、研究結果及び成果を効率的に活用することが必要不可欠と考えられる。即ち、研究開発機関同士によるOpen Innovation環境を構築し、早期の臨床応用と持続的な研究開発を可能とするAll JAPAN体制を確立する。

ヒト幹細胞を用いた再生医療技術の早期の臨床実用化には、具体的な実験結果に基づく品質基準を策定する必要がある。この目標のために、我々はヒトiPS細胞から網膜色素上皮細胞へ分化・誘導し、安全な移植治療技術確立のため集積した研究情報を他施設間と連携・協力しながら広く共有・活用する。最終的には新知見、新技術の継続的な創出が可能となる再生医療研究開発環境の確立を目指す。

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）、疾患研究に対して早期の実用化

を図り、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構

策を目指す。ヒト iPS 細胞から網膜色素上皮細胞へ分化・誘導し、安全な移植治療技術確立のために得られた研究情報を広く活用することで、多施設間の連携・協力を促進し、研究開発支援体制の強化と再生医療実用化に必要な環境の整備を促進する。

B. 研究方法

研究分担者である我々の施設に情報収集用のサーバーを設置し、蓄積されたデータは指定した共有条件の下、データセンターに設置されたサーバーに転送する。公開可能なデータについて、本研究に参画する他機関と共に分析し、内容の検討を図る。

集積するデータは、加齢黄斑変性患者の皮膚線維芽細胞から作製した iPS 細胞より作製した網膜色素上皮細胞の移植手術に際しての研究計画と、施行に至るまでの議論内容の記録である。加えて、ヒト幹細胞を用いた動物実験（移植前後の網膜断層図や網膜電図、行動解析結果など）など、ヒト幹細胞を用いた臨床研究及び医師主導治験に必要な実験データである。これらのデータは他機関と共有することで相互に利益をもたらし、また、研究を推進することを目的として共有条件を設定するものである。

（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方々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、研究における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、本研究における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。

また、使用する iPS 細胞は患者由来皮膚細胞を用いるが、すでに患者 iPS 細胞作製研究は先端医療センター病院、理化学研究所のそれぞれの倫理委員会の承認を受けており、iPS 細胞作製のために提供された患者皮膚細胞は遺伝カウンセラーと研究分担者が先端医療センター病院において説明し、インフォームドコンセントを得た後、採取、連結可能匿名化され研究に携わる人員は個人情報を知り得ないしくみになっている。

C. 研究結果

昨年度に施設内に設置したサーバーに、実験結果及び臨床データの集積を行った。まず、網膜再生研究の中で培養した細胞の移植を行う動物実験データを集積した。具体的には細胞移植前後の網膜の断層図や網膜電図、行動解析結果などである。このように、最適な移植条件の裏付けに必要なデータの集積を行った。

また、我々は2014年9月に加齢黄斑変性患者の皮膚線維芽細胞から作製したiPS細胞由来網膜色素上皮細胞を患者自身の網膜下に移植する手術を施行した。これはiPS細胞を用いた初めての臨床応用であり、研究計画の承認から実施に至るまでに分化組織の科学的基準・倫理的妥当性など様々な面からの議論・検討が重ねられた。これら、「ヒト幹細胞臨床研究実施計画書」やヒト幹細胞臨床研究審査委員会による審議の記録をサーバーに集積した。

D. 考察

iPS細胞由来網膜色素上皮細胞の移植手術は、iPS細胞を用いた世界初の臨床応用であり、細胞移植を行う動物の実験データは今後行うヒトへの臨床応用において、基礎データとなるだけでなく、移植条件の検討や移植技術の確立・安全性の評価など、様々な場面で必要となる。また、培養条件の検討・確立にも有用であることから、網膜細胞のみならず、他の細胞種の培養条件検討にも利用可能と考える。また、網膜細胞特有の機能を解析したデータなどは、最適な分化誘導法の確立、効率の良い条件を検討する上で結果を裏付けるデータであり、臨床実用化につながるものである。さらに、移植手術の研究計画承認から実施に至るまでの記録は、ヒト幹細胞を用いた様々な再生医療技術の品質基準の策定に有用と考えられる。

E. 結論

網膜細胞特有の機能を解析したデータなどは、最適な分化誘導法の確立、効率の良い条件を検討する上で結果を裏付ける重要なデータとなるだけでなく、他の細胞種と比較検討することで、より高い培養技術の開発、さらにヒト幹細胞の実用化の道を開拓することにつながると考えられる。

また、iPS細胞を用いた臨床応用はこれまでに前例が無かったため、今回査定された基準については術後の経過観察を踏まえたフィードバックが必須であり、再生医療の臨床実用化には移植組織に応じて基準を調整する必要があると考えられる。今後、提携研究室との情報交換を介して、臨床応用研究の効率化・迅速化を図りたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

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

大和 雅之

東京女子医科大学大学院医学研究科 再生医工学分野 教授

研究要旨

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。

本研究では、体性幹細胞を対象として、幹細胞機能維持・分化制御の双方に関して、製造工程などを含む品質管理についてデータベース構築をおこない、品質管理基準を策定する。一連の研究を通じて、安全かつ有効なヒト幹細胞を用いた再生医療の実用化を促進する。

A. 研究目的

本研究は、ヒト体性幹細胞に関する培養条件、培養法、前臨床試験データ、臨床研究データ等の各種情報を蓄積し、データマイニングに供することを目的としている。

（倫理面への配慮）

各種指針を遵守する。ヒトデータの取得、臨床研究に関しては院内倫理委員会の承認を得る。

B. 研究方法

ヒト体性幹細胞の組織取得時、幹細胞単離時、培養時等に取得したデータを用いてデータベースの構築をおこなう。別途、細胞生物学的手法、実験動物への移植、可能であればヒト臨床研究により取得したデータとの相関を検討し、品質管理基準の策定のための材料とする。

C. 研究結果

昨年度までに、データベース構築の一環として、市販の電子ペン（アノト社製、ボールペン付き）と Evernote を用いて、実験ノート、生データ、数値等を纏めたデータ（Excel等）、論文等に使用する図表等をリンクさせるシステムを考案し、従来の手書きノートに代わる実験記録の入力・管理方法を確立した。さらに、本年度は本研究所全体にこのシステムを導入し、より効

率的なデータベース構築のための仕組み作りを行った。一方、昨年度、女子医大の次世代シーケンサーと本プロジェクトのサーバーシステムをリンクさせ、次世代シーケンサーのデータをスムーズに本プロジェクトで共有できるシステムを構築したことにより、今年度は本研究所で解析された体性幹細胞の mRNA-Seq のデータ（60 samples 以上）を全て基盤システム用のサーバーに提供した。

さらに、今年度より東京大学医科学研究所の各務教授らと、①ヒト間葉系幹細胞の凍結融解条件の決定、②移植を有効に実施できる継代数の探索、③継代による遺伝子発現の変動から品質管理マーカーの探索についての共同研究も開始し、現在、ヒト間葉系幹細胞のデータ（mRNA-Seq等）を本プロジェクトの基盤システムを用いて、データ共有している。その結果、血清有り無し細胞凍結液それぞれを用いた短期凍結（1ヶ月）・長期凍結（1年）の四群間の細胞生存率には有意差は見られなかった。また、凍結融解後に一回～五回継代したサンプルにおいて、その細胞生存率・増殖能・多分化能ならびに現在自家細胞移植で実施されている出荷時試験を実施したところ、骨芽細胞分化能は1年凍結したものでは有意に高かったが、それ以外の項目では有意差が見られなかった。さらに、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析の結果から、継代数による遺伝子発現の変化が観察され、品質管理マーカーの候補遺伝子が同定された。

D. 考察

本研究で確立した実験ノート・デジタルデータ管理システムを本研究所全体に導入することによって、データベースの構築がより推進されることが期待される。しかしながら、一般的なクラウドサービス（Evernote）を使用しているため、セキュリティの面での課題により、本プロジェクトのサーバーとの直接的なリンクが不可能となってしまうことは、今後、解決すべき大きな問題の一つと考えられる。また昨年度同様に、電子ペンは依然 Mac OS に対応しておらず、Macユーザーの利便性を損なうものとなっているため、より早期の Max OS への対応が望まれる。

また、プロジェクト専用サーバーの設置により、シーケンサーデータの円滑な共有・バックアップが可能となり、新しい共同研究を立ち上げるきっかけとなった。従って、シーケンスデータ以外のデータ、情報等の共有もさらなる研究の推進、並びに新規プロジェクトの立ち上げ等に大きく貢献すると期待される。よって、過去のデジタルデータのサーバーへのアップロードをはじめ、本サーバーシステムにデータを提供する研究者数を拡大が、より一層望まれる。

E. 結論

本年度までに、本プロジェクト内において、本研究で蓄積してきたデータベースによって、ヒト間葉系幹細胞の品質管理基準

を策定に寄与する可能性が強く示唆された。今後は本プロジェクト内での共同研究をさらに推進し、最終的にはヒト間葉系幹細胞の品質管理基準を策定する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto K, Hama T, Yamato M, Uchimizu H, Sugiyama H, Takagi R, Yaguchi Y, Okano T, Kojima H, “The effect of transplantation of nasal mucosal epithelial cell sheets after middle ear surgery in a rabbit model”, *Biomaterials*, 2015 Feb;42:87-93.
- 2) Kameishi S, Sugiyama H, Yamato M, Sado Y, Namiki H, Kato T, Okano T, “Remodeling of epithelial cells and basement membranes in a corneal deficiency model with long-term follow-up”, *Lab Invest*, 2015 Feb;95(2):168-79.
- 3) Nagase K, Hatakeyama Y, Shimizu T, Matsuura K, Yamato M, Takeda N, Okano T, “Thermoresponsive Copolymer Brushes for Mesenchymal Stem Cell Separation”, *Biomacromolecules*, 2015 Jan 9. (in press)
- 4) Matsumine H, Sasaki R, Takeuchi Y, Watanabe Y, Niimi Y, Sakurai H, Miyata M, Yamato M. Unilateral Multiple Facial Nerve Branch Reconstruction Using "End-to-side Loop Graft" Supercharged by Hypoglossal Nerve”, *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 2014 Nov 7;2(10):e240.
- 5) Shimizu R, Kamei N, Adachi N, Hamanishi M, Kamei G, Mahmoud EE, Nakano T, Iwata T, Yamato M, Okano T, Ochi M. Repair Mechanism of Osteochondral Defect Promoted by Bioengineered Chondrocyte Sheet. *Tissue Eng Part A*. 2014 Nov 14. (in press)
- 6) Kobayashi S, Kanai N, Ohki T, Takagi R, Yamaguchi N, Isomoto H, Kasai Y, Hosoi T, Nakao K, Eguchi S, Yamamoto M, Yamato M, Okano T, “Prevention of esophageal strictures after endoscopic submucosal dissection”, *World J Gastroenterol*, 2014 Nov 7;20(41):15098-109.
- 7) Matsumine H, Takeuchi Y, Sasaki R, Kazama T, Kano K, Matsumoto T, Sakurai H, Miyata M, Yamato M,

- “Adipocyte-derived and dedifferentiated fat cells promoting facial nerve regeneration in a rat model”, *Plast Reconstr Surg*, 2014 Oct;134(4):686-97.
- 8) Sasaki R, Matsumine H, Watanabe Y, Takeuchi Y, Yamato M, Okano T, Miyata M, Ando T, “Electrophysiologic and functional evaluations of regenerated facial nerve defects with a tube containing dental pulp cells in rats”, *Plast Reconstr Surg*, 2014 Nov;134(5):970-8.
- 9) Nakagawa K, Harper-Lovelady H, Tanaka Y, Tanaka M, Yamato M, Asahi T, “A high-accuracy universal polarimeter study of optical anisotropy and optical activity in laminated collagen membranes”, *Chem Commun (Camb)*, 2014 Dec 11;50(95):15086-9.
- 10) Yoshida T, Iwata T, Takai Y, Birchmeier W, Yamato M, Okano T, “Afadin requirement for cytokine expressions in keratinocytes during chemically induced inflammation in mice. *Genes Cells*, 2014 Nov;19(11):842-52.
- 11) Sakuma M, Kumashiro Y, Nakayama M, Tanaka N, Umemura K, Yamato M, Okano T, “Thermoresponsive nanostructured surfaces generated by the Langmuir-Schaefer method are suitable for cell sheet fabrication”, *Biomacromolecules*, 2014 Nov 10;15(11):4160-7.
- 12) Tanaka N, Ota H, Fukumori K, Miyake J, Yamato M, Okano T, “Micro-patterned cell-sheets fabricated with stamping-force-controlled micro-contact printing”, *Biomaterials*, 2014 Dec;35(37):9802-10.
- 13) Kumashiro Y, Ishihara J, Umemoto T, Itoga K, Kobayashi J, Shimizu T, Yamato M, Okano T, “Stripe-Patterned Thermo-responsive Cell Culture Dish for Cell Separation without Cell Labeling”, *Small*, 2015 Feb;11(6):681-7.
- 14) Suzuki R, Aruga A, Kobayashi H, Yamato M, Yamamoto M, “Development of a novel in vivo cancer model using cell sheet

- engineering”, *Anticancer Res*, 2014 Sep;34(9):4747-54.
- 15) Kawanishi K, Nitta K, Yamato M, Okano T, “Therapeutic applications of mesothelial cell sheets”, *Ther Apher Dial*, 2015 Feb;19(1):1-7.
- 16) Ohki T, Yamato M, Ota M, Takagi R, Kondo M, Kanai N, Okano T, Yamamoto M, “Application of regenerative medical technology using tissue-engineered cell sheets for endoscopic submucosal dissection of esophageal neoplasms”, *Dig Endosc*, 2015 Jan;27(2):182-8.
- 17) Takahashi H, Shimizu T, Nakayama M, Yamato M, Okano T, “Anisotropic Cellular Network Formation in Engineered Muscle Tissue through the Self-Organization of Neurons and Endothelial Cells”, *Adv Healthc Mater*, 2014 Aug 21.(in press)
- 18) Haraguchi Y, Shimizu T, Matsuura K, Sekine H, Tanaka N, Tadakuma K, Yamato M, Kaneko M, Okano T, “Cell sheet technology for cardiac tissue engineering”, *Methods Mol Biol*, 2014;1181:139-55.
- 19) Owaki T, Shimizu T, Yamato M, Okano T, “Cell sheet engineering for regenerative medicine: current challenges and strategies”, *Biotechnol J*, 2014 Jul;9(7):904-14.
- 20) Watanabe Y, Sasaki R, Matsumine H, Yamato M, Okano T, “Undifferentiated and differentiated adipose-derived stem cells improve nerve regeneration in a rat model of facial nerve defect”, *J Tissue Eng Regen Med*, 2014 Jun 1.(in press)
- 21) Enoki Y, Sato T, Tanaka S, Iwata T, Usui M, Takeda S, Kokabu S, Matsumoto M, Okubo M, Nakashima K, Yamato M, Okano T, Fukuda T, Chida D, Imai Y, Yasuda H, Nishihara T, Akita M, Oda H, Okazaki Y, Suda T, Yoda T, “Netrin-4 derived from murine vascular endothelial cells inhibits osteoclast differentiation in vitro and prevents bone loss in vivo”, *FEBS Lett*, 2014 Jun 27;588(14):2262-9.
- 22) Sugiyama H, Yamato M, Nishida K, Okano T, “Evidence of the survival of ectopically transplanted oral mucosal epithelial stem cells after

- repeated wounding of cornea”, *Mol Ther*, 2014 Aug;22(8):1544-55.
- 23) Matsumine H, Sasaki R, Tabata Y, Matsui M, Yamato M, Okano T, Sakurai H, “Facial nerve regeneration using basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres in a rat model”, *J Tissue Eng Regen Med*, 2014 Apr 16. (in press)
- 24) Park SJ, Umemoto T, Saito-Adachi M, Shiratsuchi Y, Yamato M, Nakai K, “Computational promoter modeling identifies the modes of transcriptional regulation in hematopoietic stem cells”, *PLoS One*, 2014 Apr 7;9(4):e93853.
- 25) Pirraco RP, Iwata T, Yoshida T, Marques AP, Yamato M, Reis RL, Okano T, “Endothelial cells enhance the in vivo bone-forming ability of osteogenic cell Sheets”, *Lab Invest*, 2014 Jun;94(6):663-73.
- 26) Iwayama D, Yamato M, Tsubokura T, Takahashi M, Okano T, “Cell/tissue processing information system for regenerative medicine”, *J Tissue Eng Regen Med*, 2014 Apr 3. (in press)
- 27) Sasaki R, Matsumine H, Watanabe Y, Yamato M, Ando T, “Surgical anatomy of the hypoglossal nerve for facial nerve reconstruction research in Swine, *J Reconstr Microsurg*, 2014 Oct;30(8):585-8.
- 28) Akiyama Y, Kikuchi A, Yamato M, Okano T, “Accelerated cell-sheet recovery from a surface successively grafted with polyacrylamide and poly(N-isopropylacrylamide)”, *Acta Biomater*, 2014 Aug;10(8):3398-408.
- 29) Sasagawa T, Shimizu T, Yamato M, Okano T, “Endothelial colony-forming cells for preparing prevascular three-dimensional cell-dense tissues using cell-sheet engineering”, *J Tissue Eng Regen Med*, 2013 Dec 26. (in press)
- 30) Akimoto J, Takagi S, Nakayama M, Arauchi A, Yamato M, Okano T, “Transplantation of cancerous cell sheets effectively generates tumour-bearing model mice”, *J Tissue Eng Regen Med*, 2013 Nov 6. (in press)

- 31) Akimoto J, Arauchi A, Nakayama M, Kanaya R, Iwase Y, Takagi S, Yamato M, Okano T, “Facile cell sheet manipulation and transplantation by using in situ gelation method”, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2014 Nov;102(8):1659-68.
- 32) Takagi S, Shimizu T, Kuramoto G, Ishitani K, Matsui H, Yamato M, Okano T, “Reconstruction of functional endometrium-like tissue in vitro and in vivo using cell sheet engineering”, *Biochem Biophys Res Commun*, 2014 Mar 28;446(1):335-40.
- 33) Ishihara J, Umemoto T, Yamato M, Shiratsuchi Y, Takaki S, Petrich BG, Nakauchi H, Eto K, Kitamura T, Okano T, “Nov/CCN3 regulates long-term repopulating activity of murine hematopoietic stem cells via integrin $\alpha v \beta 3$ ”, *Int J Hematol*, 2014 Apr;99(4):393-406.
- 34) Takeuchi R, Kuruma Y, Sekine H, Dobashi I, Yamato M, Umezu M, Shimizu T,
- 35) Okano T, “In vivo vascularization of cell sheets provided better long-term tissue survival than injection of cell suspension”, *J Tissue Eng Regen Med*, 2014 Jan 28. (in press)
- 36) Suphanantachat S, Iwata T, Ishihara J, Yamato M, Okano T, Izumi Y, “A role for c-Kit in the maintenance of undifferentiated human mesenchymal stromal cells”, *Biomaterials*, 2014 Apr;35(11):3618-26.
2. 学会発表
なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表