

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））

「iPS 細胞等の安定供給と臨床利用のための基盤整備」

総括研究報告書

研究代表者	西田幸二	大阪大学 脳神経感覚器外科学（眼科）	教授
研究分担者	澤 芳樹	大阪大学 心臓血管外科学教室	教授
研究分担者	吉川 秀樹	大阪大学 整形外科学教室	教授
研究分担者	森 正樹	大阪大学 消化器外科学教室	教授
研究分担者	大藺 恵一	大阪大学 情報統合医学小児科学教室	教授
研究分担者	吉峰 俊樹	大阪大学 脳神経外科学教室	教授
研究分担者	玉井 克人	大阪大学 再生誘導医学寄附講座	教授
研究分担者	齋藤 充弘	大阪大学 未来細胞医療学共同研究講座	特任准教授
研究分担者	高島 成二	大阪大学 医化学教室	教授
研究分担者	新谷 歩	大阪大学 臨床統計疫学寄附講座	教授

【研究要旨】

ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針において、移植を受ける被験者等が感染症を発症した場合等の原因究明のために、採取したヒト幹細胞又はヒト分化細胞の一部等の適当な試料について、適切な期間保存しなければならないと定められている。しかしながら、移植した細胞の保管や情報管理を各臨床施設に任せただけの場合、不確実な保管や情報の損失の可能性が危惧され、再生医療の発展の障壁となりうる。本研究では確実な保管・情報管理を達成するための基盤整備として、移植された体性幹細胞を統合的に管理・保存するシステムを構築することとする。

今後再生医療が日本で発展することを想定すると、これらの再生医療用材料を確実に保管するための保管施設は必須のインフラと言える。しかしながら各大学や臨床施設毎に保管設備を設置するというのは、施設の運営予算や施設の設備などを考慮すると現実的とは言えない。設備、予算的に余裕のある、ある程度限られた範囲の施設において質の高い管理を行うというのはすぐれた解決法であると言える。

本研究では、本研究の実施に必要な設備の整備として、1、体性幹細胞ならびに iPS 細胞等の細胞凍結保存装置細胞ストックルームの整備、2、細胞保存のためのセキュリティシステムの整備、3、細胞運搬における安全でセキュリティの高いシステムの構築、4、幹細胞に付帯する情報を管理するデータベースの構築を行うこととする。また本研究がクリアすべき倫理的事項について議論を行い、現在までに行っている臨床研究と密接な連携を行うことでより質の高い、臨床に根差した研究を実施する。

今年度に倫理委員会の承認を得て、細胞受け入れのための SOP を確立した。今後、日本全国から細胞を受け入れが可能となるようさらなる手順の改善を継続していく。

A. 研究目的

ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針において、移植を受ける被験者等が感染症を発症した場合等の原因究明のために、採取したヒト幹細胞又はヒト分化細胞の一部等の適当な試料やそれに付帯する情報について、適切な期間保存しなければならないと定められている。今年度から施行開始となる再生医療等の安全性の確保等に関する法律（再生医療新法）でも同様の制度となっている。しかしながら液体窒素保管庫における出納管理は通常人の手で行っており、human error による管理ミスの発生や偶発的な液体窒素枯渇による資料損失など様々な危険性が想定される。また幹細胞に付帯する情報についても、管理するコンピュータの物理的破損や個人情報の漏洩、管理者の人事異動に伴うデータ損失など、様々な危険性が想定される。そのような危険性を減らすための対策としては、高額なコンピュータ管理の液体窒素保管庫を専任のオペレータにより管理運営することやサーバでの情報管理などが考えられるが、初期設備投資や年間の人件費、ランニングコストなどを考慮すると全国の各大学に設置することは現状では難しい。そこで本研究ではコンピュータ管理の液体窒素保管庫を専任のオペレータとともに大阪大学に設置して、全国から再生医療に使用した体性幹細胞ならびに iPS 細胞を受け入れ、法律順守のために厳密に管理することとする。情報管理については REDCap データベースを用いて管理することで、偶発的なデータ損失や管理者の変更にとまなう問題等を解決する。本研究により再生医療の品質管理や追跡に関する体制が整備できれば今後の再

生医療の発展に大きく寄与するものと考えられる。

B. 研究方法

研究代表者の西田は、体性幹細胞ならびに iPS 細胞等の確実な保管を実現するための基盤整備としてクライオライブラリの運用開始に向けた様々の検討を昨年度より行っている。体性幹細胞ならびに iPS 細胞等の細胞凍結保存装置細胞ストックルームの整備、細胞保存のためのセキュリティシステムの整備については昨年度に終了した。細胞運搬における安全でセキュリティの高いシステムの構築については、コールドドラッグが昨年度に完了できなかったため、今年度に行う。幹細胞に付帯する情報の管理については、研究分担者である新谷歩教授とともに、REDCap データベースを構築する。また実際に再生医療臨床研究で用いたヒトの幹細胞を保管する。

1. 細胞運搬における安全でセキュリティの高いシステムの構築

全国の体性幹細胞ならびに iPS 細胞の保管が本研究の目的であるが、確実な運搬システムの構築は確実な保管システムの構築とともに本研究達成のための重要な要素である。運搬には液体窒素を吸収する担体が保管容器内部に仕込まれているドライシッパーと呼ばれる専用の液体窒素保管容器を用いる。ドライシッパーはたとえ転倒しても液体窒素がこぼれる心配はなく、運搬業者に対して安全性を担保できる。また容器の大きさがある程度以上のものにすれば最大で2週間程度の保管が可能であり、たとえ自然災害等で細胞の到着が遅れたとしてもほとんどのケースで問題が発生しないと

言える。また細胞の由来元の個人情報の漏洩防止策として、細胞保存チューブにはバーコードシールを貼り、バーコード情報と個人をリンクする対応表は鍵のかかる保管庫で保管することとする。今年度の上半期に他大学（京都府立医大・眼科学教室、東京大学・眼科学教室）の協力のもとに運搬システムのコールドランを行った。

2. 幹細胞に付帯する情報データベース（REDCap データベース）の構築

再生医療新法では、再生医療臨床研究において、試料（採取細胞、特定細胞加工物）の保管とともに1. 再生医療等に関する記録及び保存と2. 特定細胞加工物製造事業者における記録の管理（製造管理）を義務づけている。そのため1および2に関する情報をいかに安全に保管するかについても重要なテーマとなる。本研究では前向き研究で頻用されているウェブベースのデータベース REDCap を用いて1および2の情報管理を行うこととする。

3. 大阪大学倫理委員会への研究計画書提出

幹細胞はヒト由来の試料であるため、実際の運用開始に対しては大阪大学の倫理審査を受け、承認される必要がある。大阪大学の自主臨床研究申請システムにて「iPS 細胞等の安定供給と臨床利用のための基盤整備」の課題名にて申請書を作成した。

4. 体性幹細胞を用いた臨床研究の推進ならびに iPS 細胞からの誘導法の確立や最適化

研究分担者が臨床研究で用いる体性幹細胞ならびに iPS 細胞から特定の組織細胞に分化誘導させたものについては、運用開始後に適宜クライオライブラリで実際に保存していくこととする。iPS 細胞からの誘導法の確立が未だのものや前臨床試験が終了

していないものについては、引き続き iPS 細胞からの誘導法の確立や最適化、前臨床試験について行っていく。

（倫理面への配慮）

本研究においては関連指針等を遵守し、大阪大学倫理委員会の承認を経て慎重に研究を進める。常に人権を尊重した研究を実行し、患者の不利益とならないよう最大限の配慮を行うこととする。

C. 研究結果

1. 細胞運搬における安全でセキュリティの高いシステムの構築

また購入したドライシッパーの機器固有の問題の可能性の検討等は昨年度に終了していたが、他施設に細胞試料を送り、再度送り返してもらったのちに細胞の生存性を見る運搬のコールドランについては昨年度に完了できなかったために今年度に行った。結果の詳細は分担報告書に譲るが、今回のコールドランでは細胞生存性には影響なく、問題ない運搬ができていることが証明された。運搬にあたって見出された問題点を考慮して SOP の作成を行った。（SOP については分担報告書の参考資料を参照。）

2. 幹細胞に付帯する情報データベース

（REDCap データベース）の構築

研究分担者の新谷歩とともに REDCap データベースソフトウェアを用いて幹細胞付帯情報データベースを構築した。結果の詳細は分担報告書に譲るが、このデータベースを用いてサンプルデータ 10 件を入力したが、特に問題は認めなかった。このデータベースはサーバエンドクライアント型にて運用可能である。また、ローカル PC にて情報保管する場合などにありがちな人事異動によ

るデータ損失の可能性も皆無である。

またドライシッパーで3日間保管し、その後8日間クライオリブラリで保管した後に細胞を融解して培養することによる影響を調べた。その結果、これらの操作による細胞生存率は90%前後と良好で、また細胞形態、細胞増殖能、コロニー形成能、遺伝子発現には影響は見られなかった。以上のことから、ドライシッパーによる輸送とクライオリブラリでの保管による細胞への影響はないものと考えられた。

研究分担者の澤はiPS細胞から心筋細胞への大量培養系において、iPS細胞から心筋細胞へ分化誘導した細胞集団から心筋細胞を精製し、心筋細胞の純度が異なる細胞シートを作製して、電気生理学的および組織学的に細胞シート移植における至適細胞純度を明らかにし、至適条件で作成した心筋細胞シートが電気生理学的機能、細胞シート構造、液性因子の産生において優れていることを明らかにした。

研究分担者の吉川はマウス多能性幹細胞から骨芽細胞系細胞を作製するための培養条件の最適化を行なった。時間経過および分化に沿った段階的な誘導法を検討した結果、種々のサイトカインと化合物を用いた誘導培地の最適化だけでなく、低酸素培養と表面処理された培養皿の併用効果が重要であることが明らかになった。

研究分担者の森はiPS/ES細胞の品質保全に関係する因子について検討し、マイクロRNAによって制御される酸化リン酸化の鍵酵素がミトコンドリアの機能を介してiPS/ES細胞の維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究分担者の大藺は、昨年度から継続し

て行っている小児科領域におけるヒトiPS細胞をもちいた再生医療を実現化するための技術基盤の確立に関して、臍帯血由来iPS細胞が分化誘導能をもっているかどうかについて検討し、臍帯血由来iPS細胞が造血分化誘導が可能であることを明らかにした。

研究分担者の吉峰は慢性期完全脊髄損傷患者に術前・術後に積極的リハビリテーションを導入したうえで嗅粘膜移植を行い、電気生理学的に脊髄神経軸索の再構築を世界で初めて明らかにした。

研究分担者の玉井は重症栄養障害型表皮水疱症患者に対し、母親由来骨髄間葉系幹細胞移植を実施した。生直後から25年間閉鎖を得られなかった難治性皮膚潰瘍周囲の皮下に培養間葉系幹細胞を移植した結果、移植4か月後には潰瘍面の上皮化が得られ、重症表皮水疱症患者の難治性潰瘍に対する健常家族ドナー由来間葉系幹細胞移植の有効性を明らかにした。

研究分担者の斎藤は重症心筋症患者を対象とした自家骨格筋芽細胞シートの臨床研究の品質管理において、65歳以上の患者群で筋肉から単離された初代培養細胞数が低い傾向があること、また初代培養細胞数が低いと継代培養後の骨格筋芽細胞の数や純度が低下すること、特定の薬剤の投薬歴が筋肉内の筋芽細胞数に影響を与えている可能性を見出した。

研究分担者の高島はヒト幹細胞等の保存施設の環境整備と、その品質管理を目的として細胞からの遺伝子情報・タンパク質情報の解析基盤の構築を行った。

研究分担者の新谷は幹細胞に付帯する情報（培養情報、移植患者関連情報、手術関連情報など個人情報情報を省いたもの）を体系

的に収集・管理するシステムの構築を REDCap データベースを用いて行った。

今年度に2回クライオライブラリが異常停止する事態が発生した。2回ともに迅速に対処することができ液体窒素枯れには至らなかったが、夏場には3日程度で液体窒素枯れが発生する可能性があり、連休などに発生した場合には致命的な結果を産む可能性がある。2回ともに、液体窒素配給ラインにバルブの開栓要求をクライオライブラリが出した時に、たまたまもう一方の液体窒素保管ラインの方にも開栓要求が出されている場合に液体窒素の充填がなされなかったのであるが、その状況下である一定時間内に液体窒素の液量が一定量を越えないとシステムが停止してしまうというクライオライブラリの本来の仕様が原因であることがわかった。クライオライブラリのメーカーである大陽日酸には、この仕様そのものが大阪大学の液体窒素配給システムに向いていないとして、早急にアルゴリズムの変更をするように要求しているが修正可能かどうかは現時点で明らかでない。代替案として、警報発生時にメールにて警報が携帯端末等に送られるシステムの構築を検討している。

D. 考按

国内で行われる再生医療治療のサンプルを保管するシステムとして、我々の構築したシステムが必要かつ十分な剛健性をもつ

ことが今回の検討で確認できた。しかし人が介在するポイントは随所にあると考えられ、human error による管理ミスの可能性を完全に払拭するためには今後も不断的な努力が必要と言える。

E. 結論

我々が構築した細胞輸送システムとクライオライブラリによる保管システムは問題なく動作しており、今後国内で行われた再生医療サンプルを確実に保管・管理するのに必要かつ十分な剛健性をもつシステムであると言える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
巻末研究成果一覧表参照
2. 学会発表
各分担者の項を参照

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特許
なし
3. その他
なし

