

201406025A

厚生労働科学研究費補助金
(再生医療実用化研究事業)

ES 細胞等を用いた臨床研究に対する安全基盤の確立

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 梅澤 明弘

平成27(2015)年3月

目 次

I. 総括研究報告書	
ES 細胞等を用いた臨床研究に対する安全基盤の確立	3
梅澤 明弘	
II. 分担研究報告書	
1. 長期細胞保存施設の管理項目の設定と臨床情報の収集	9
松原 洋一	
2. エピゲノム変化に着目した細胞長期保存後における ES 細胞等を用いた臨床研究に対する 安全基盤の確立に関する研究	13
豊田 雅士	
3. エピゲノム変化に着目した細胞長期保存後における エピゲノム変化に着目した細胞長期保存後における 細胞特性の解析に関する研究	15
西野 光一郎	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
VI. 研究成果の刊行物・別刷	23

I. 総括研究報告書

ES 細胞等を用いた臨床研究に対する安全基盤の確立 (H25－実用化（再生）－指定－013)

研究代表者：梅澤 明弘

独立行政法人国立成育医療研究センター 再生医療センター長

研究要旨：本研究の目的は、移植に用いたヒト ES 細胞を保管・保存用タンクに保管し、移植から時間が経過した後に、移植に用いたヒト ES 細胞を遡って検証が可能となる体制を構築することである。1. 移植に用いたヒト ES 細胞の長期的保管体制、2. 他の医療機関等と連携し、ヒト ES 細胞をはじめとする各種細胞を受入する体制、3. 移植から時間が経過した後に移植に用いたヒト ES 細胞を検証する体制の 3 本柱を構築する。本研究では高アンモニア血症を生じる小児先天性代謝異常症に対する細胞治療に用いるヒト ES 細胞および ES 由来肝細胞について、保管・保存に関する検討を行う。エンドポイントにおける有効性を鑑みた上で、原材料及び製造関連物質の保管・保存、加工した細胞の保管・保存、最終製品の保管・保存を行う。

研究分担者

松原洋一（(独)国立成育医療研究センター
研究所長）

豊田雅士（(地独)東京都健康長寿医療センター
研究副部長）

西野光一郎（宮崎大学・准教授）

管・保存技術を確認する。ヒトES細胞の分化能検定システムについては、細胞培養系での分化誘導法の決定と免疫不全動物への移植による生着、機能発揮、組織構築能に関する検討を開始する。

（倫理面への配慮）

1. ES 細胞に関する倫理

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正に行われるよう、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（国立成育医療センターヒトES細胞研究倫理審査委員会：<http://www.ncchd.go.jp/essaibou/es.htm>）。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

2. ヒト細胞を用いることに対する倫理的配慮

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を

A. 研究目的

本研究の目的は、移植に用いたヒトES細胞を保管・保存用タンクに保管し、移植から時間が経過した後に、移植に用いたヒトES細胞を遡って検証が可能となる体制を構築することである。1. 移植に用いたヒトES細胞の長期的保管体制、2. 他の医療機関等と連携し、ヒトES細胞をはじめとする各種細胞を受入する体制、3. 移植から時間が経過した後に移植に用いたヒトES細胞を検証する体制の3本柱を構築する。エンドポイントにおける有効性を鑑みた上で、原材料及び製造関連物質の保管・保存、加工した細胞の保管・保存、最終製品の保管・保存を行う。

B. 研究方法

細胞・組織加工医薬品等の有効性を損なわない保管・保存技術の確立

ヒトES細胞の分化能検定システムの開発ならびに分化形質発現システムを通じた情報収集を行い、有効性を損なわないヒトES細胞の保

用いた研究が予定されている。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療研究センターにおいては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療研究センター受付番号49、平成15年10月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認、受付番号197、平成18年6月承認、受付番号201、237、238、平成19年6月承認）。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う予定である。

3. 実験動物を用いることに対する倫理的配慮

実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号2003-002,2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

a) 成育医療研究センターにおける ES 細胞の培養と保存について

現在までにモデルとなる小児先天性代謝異常症の細胞治療の材料となるヒト ES 細胞に関する培養、保管が順調に推移している。安全性試験を行ったフィーダー細胞バンク、マスターセルバンク（MCB）、ワーキングセルバンク（WCB）の構築を終了し、その手順の明確化を行った。現在までにフィーダー細胞バンク 450 本、MCB112 本、WCB74 本のストックが完了している。

b) 他施設の細胞の受け入れについて

京都大学における ES 細胞の KhES 細胞シリーズの受け入れ体制の構築を行った。平成 26 年 11 月 25 日施行された再生医療等の安全性の確保に関する法律および平成 26 年 9 月 15 日に改訂となった生物原材料基準に則つ

た細胞バンクの構築が可能となった。

c) 細胞・組織加工医薬品等の有効性を損なわない保管、保存技術の確立について

ヒト ES 細胞の分化能検定システムの開発ならびに分化形質発現システムを通じた情報収集を行い、有効性を担保する原材料、ストックないしは、原材料のもととなる細胞としてのヒト ES 細胞の保管・保存技術を確立した。ヒト ES 細胞の分化能検定システムについては、細胞培養系での分化誘導法の決定と免疫不全動物への移植による生着、機能発揮、組織構築能に関する検討を行った。

D. 考察

今回実施した細胞の保管並びに特性解析は、細胞医療の実用化に向けた細胞の規格設定のみならず、有害事象発生があった場合のトレース時に示されるべき基本情報となる。本研究を実施することで、検体の保存技術の確保、特性解析を通じたトレーサビリティ体制のモデルケースを示すことになる。

E. 結論

本研究は細胞医療・再生医療のために整備された法律・指針を踏まえ、ES細胞の保管・保存に特化して研究を推進している。ES細胞はその増殖能、多分化能より、将来的に期待されており、最適のドナー細胞の選択肢となりつつある。また、iPS細胞の臨床応用を先導することができ再生医療技術となる。ヒトES細胞をはじめとする未分化性の非常に高いヒト細胞は、再生医療での重要な細胞ソースとなるばかりでなくその培養システムでは発生分化研究等のヒト発生メカニズム探求や創薬開発研究の基盤となる。

F. 健康機器情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeuchi M, Higashino A, Takeuchi K, Hori Y, Koshiba-Takeuchi K, Makino H, Monobe Y, Kishida M, Adachi J, Takeuchi J, Tomonaga T, Umezawa A, Kameoka Y, Akagi K. Transcriptional Dynamics of Immortalized Human Mesenchymal Stem Cells during Transformation. *PLoS One*. 10(5):e0126562, 2015.
2. 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.
3. Watada Y, Yamashita D, Toyoda M, Tsuchiya K, Hida N, Tanimoto A, Ogawa K, Kanzaki S, Umezawa A. Magnetic resonance monitoring of superparamagnetic iron oxide (SPIO)-labeled stem cells transplanted into the inner ear. *Neurosci Res* 95:21-26, 2015.
4. Mizutani T, Kawabe S, Ishikane S, Imamichi Y, Umezawa A, Miyamoto K. Identification of novel steroidogenic factor 1 (SF-1)-target genes and components of the SF-1 nuclear complex. *Mol Cell Endocrinol*. 408:133-137, 2015.
5. Lu S, Kanekura K, Hara T, Mahadevan J, Spears LD, Osowski CM, Martinez R, Yamazaki-Inoue M, Toyoda M, Neilson A, Blanner P, Brown CM, Semenkovich CF, Marshall BA, Hershey T, Umezawa A, Greer PA, Urano F. A calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(49):E5292-301, 2014.
6. Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggan K, Akutsu H, Umezawa A. The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice. *Nat Commun*. 5: 5464, 2014.
7. Higuchi A, Ling QD, Kumar SS, Munusamy MA, Alarfaj AA, Chang Y, Kao SH, Lin KC, Wang HC, Umezawa A. Generation of pluripotent stem cells without the use of genetic material. *Lab Invest*. 95(1):26-42, 2015.
8. Inoue T, Umezawa A, Takenaka T, Suzuki H, Okada H. The contribution of epithelial-mesenchymal transition to renal fibrosis differs among kidney disease models. *Kidney Int*. 87(1):233-238, 2015.
9. Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y. A novel in vitro method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system. *PLoS One*. 9(10):e110496, 2014.
10. Ninomiya E, Hattori T, Toyoda M, Umezawa A, Hamazaki T, Shintaku H. Glucocorticoids promote neural progenitor cell proliferation derived from human induced pluripotent stem cells. *Springerplus*. 3:527, 2014.
11. Nishi M, Akutsu H, Kudoh A, Kimura H, Yamamoto N, Umezawa A, Lee SW, Ryo A. Induced cancer stem-like cells as a model for biological screening and discovery of agents targeting phenotypic traits of cancer stem cell. *Oncotarget*. 5(18):8665-8680, 2014.
12. Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, Umezawa A, Terada N. A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples. *Lab Invest*. 95(1):4-13, 2014.
13. Okamoto N, Aoto T, Uhara H, Yamazaki S, Akutsu H, Umezawa A, Nakauchi H, Miyachi Y, Saida T, Nishimura EK. A melanocyte--melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin. *Pigment Cell Melanoma Res*. 27(6):1039-1050, 2014.
14. Izumi Y, Suzuki E, Kanzaki S, Yatsuga S, Kinjo S, Igarashi M, Maruyama T, Sano S, Horikawa R, Sato N, Nakabayashi K, Hata K, Umezawa A, Ogata T, Yoshimura Y, Fukami M. Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril*. 102(4):1130-1136.e3, 2014.
15. Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Katayama I, Takeda J. Removal of reprogramming transgenes improves the tissue reconstitution potential of keratinocytes generated from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 3(9):992-1001, 2014.
16. Fukawatase Y, Toyoda M, Okamura K, Nakamura K, Nakabayashi K, Takada S, Yamazaki-Inoue M, Masuda A, Nasu M, Hata K, Hanaoka K, Higuchi A, Takubo K, Umezawa A. Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability. *Sci Rep*. 4:5421, 2014.
17. Ichida JK, TCW J, Williams LA, Carter AC, Shi Y, Moura MT, Ziller M, Singh S, Amabile G, Bock C, Umezawa A, Rubin LL, Bradner JE, Akutsu H, Meissner A, Eggan K. Notch inhibition allows oncogene-independent generation of iPS cells. *Nat Chem Biol*. 10(8):632-639, 2014.
18. Toyoda M, Umezawa A. Stem cells bond

- our organs/tissues and engineering products. *Circ J*. 78(7):1582-1583, 2014.
19. Migita O, Maehara K, Kamura H, Miyakoshi K, Tanaka M, Morokuma S, Fukushima K, Shimamoto T, Saito S, Sago H, Nishihama K, Abe K, Nakabayashi K, **Umezawa A**, Okamura K, Hata K. Compilation of copy number variants identified in phenotypically normal and parous Japanese women. *J Hum Genet*. 59(6):326-331, 2014.
 20. Yazawa T, Imamichi Y, Miyamoto K, **Umezawa A**, Taniguchi T. Differentiation of mesenchymal stem cells into gonad and adrenal steroidogenic cells. *World J Stem Cells*. 6(2):203-212, 2014.
 21. Kawano N, Miyado K, Yoshii N, Kanai S, Saito H, Miyado M, Inagaki N, Odawara Y, Hamatani T, **Umezawa A**. Absence of CD9 reduces endometrial VEGF secretion and impairs uterine repair after parturition. *Sci Rep*. 4:4701, 2014.
 22. Sugawara K, Hamatani T, Yamada M, Ogawa S, Kamijo S, Kuji N, Akutsu H, Miyado K, Yoshimura Y, **Umezawa A**. Derivation of human decidua-like cells from amnion and menstrual blood. *Sci Rep*. 4:4599, 2014.
 23. Kami D, Kitani T, Kishida T, Mazda O, Toyoda M, Tomitaka A, Ota S, Ishii R, Takemura Y, Watanabe M, **Umezawa A**, Gojo S. Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer. *Nanomedicine*. 10(6):1165-1174, 2014.
 24. Kawano N, Araki N, Yoshida K, Hibino T, Ohnami N, Makino M, Kanai S, Hasuwa H, Yoshida M, Miyado K, **Umezawa A**. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(11):4145-4150, 2014.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告書

長期細胞保存施設の管理項目の設定と臨床情報の収集

研究分担者：松原洋一

独立行政法人国立成育医療研究センター 研究所長

研究要旨：長期細胞保存施設の管理項目の設定と臨床情報を収集する。特に、高アンモニア血症を生じる小児先天性代謝異常症に対する細胞治療に用いるヒト ES 細胞および ES 由来肝細胞について、保管・保存に関する検討を行う。エンドポイントにおける有効性を鑑みた上で、原材料及び製造関連物質の保管・保存、加工した細胞の保管・保存、最終製品の保管・保存を行う。移植に用いたヒト ES 細胞を遡って検証が可能となる体制を構築する。

A. 研究目的

本研究の目的は、移植に用いたヒト ES 細胞を保管・保存用タンクに保管し、移植から時間が経過した後に、移植に用いたヒト ES 細胞を遡って検証が可能となる体制を構築することである。1. 移植に用いたヒト ES 細胞の長期的保管体制、2. 他の医療機関等と連携し、ヒト ES 細胞をはじめとする各種細胞を受入する体制、3. 移植から時間が経過した後に移植に用いたヒト ES 細胞を検証する体制の 3 本柱を構築する。本研究では高アンモニア血症を生じる小児先天性代謝異常症に対する細胞治療に用いるヒト ES 細胞および ES 由来肝細胞について、保管・保存に関する検討を行う。エンドポイントにおける有効性を鑑みた上で、原材料及び製造関連物質の保管・保存、加工した細胞の保管・保存、最終製品の保管・保存を行う。

B. 研究方法

細胞・組織加工医薬品等の有効性を損なわない保管・保存技術の確立

ヒト ES 細胞の分化能検定システムの開発ならびに分化形質発現システムを通じた情報収集を行い、有効性を損なわないヒト ES 細胞の保管・保存技術を確認する。ヒト ES 細胞の分化能検定システムについては、細胞培養系での分化誘導法の決定と免疫不全動物への移植による生着、機能発揮、組織構築能に関する検討を開始する。

（倫理面への配慮）

1. ヒト ES 細胞に関する倫理

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正に行われるよう、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（国立成育医療センターヒト ES 細胞研究倫理審査委員会：<http://www.ncchd.go.jp/essaibou/es.htm>）。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

2. 実験動物を用いることに対する倫理的配慮

実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号 2003-002, 2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

今回実施した特性解析項目は、形態/増殖観察、奇形腫形成試験、核型分析、CGH 解析、メチル化アレイ（Agilent メチル化解析チップ・Bisulfite sequence）、糖鎖アレイ（レクチン解析チ

ップ)、未分化マーカータンパク発現解析(組織学的)、未分化マーカー遺伝子発現解析(mRNA)、胚様体形成試験(in vitro)、hTERT 遺伝子発現解析、遺伝子発現チップ解析、エキソーム解析、DNA fingerprinting(STR)を設定し、凍結前、凍結後の比較検討を実施した。細胞純度試験として、無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ試験、ウイルス試験を実施し、凍結前 ES 細胞と凍結後 ES 細胞の違いを測定した。顕微鏡による形態観察及びギムザ染色等により定量を行った。

D. 考察

今回実施した特性解析項目は、細胞医療の実用化がなされた際に、有害事象発生があった場合のトレース時に示されるべき基本情報となる。本研究を実施することで、検体の保存技術の確保、特性解析を通じたトレーサビリティ体制のモデルケースを示すことになる。

E. 結論

再生医療における細胞の供給源として、胚性幹細胞 (ES 細胞)、体性幹細胞、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) があげられる。これらの原料細胞は、従来まで同じ指針のもとで運用されてきたが、細胞性状が多岐に渡るため、個別の指針として運用することが現実的であるという提言がなされ、現在、我が国の研究開発がその方向で進みつつある。本研究はそれらの指針を踏まえ、ES 細胞の保管・保存に特化して研究を推進する。ES 細胞はその増殖能、多分化能より、将来的に期待されており、最適のドナー細胞の選択肢となりつつある。また、iPS 細胞の臨床応用を先導することができる再生医療技術となりうる。ヒト ES 細胞をはじめとする未分化性の非常に高いヒト細胞は、再生医療での重要な細胞ソースとなるばかりでなくその培養システムでは発生分化研究等のヒト発生メカニズム探求や創薬開発研究の基盤となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Ogata T, Niihori T, Tanaka N, Kawai M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakashima S, Kato F, Fukami M, Aoki Y, **Matsubara Y**. TBX1 mutation identified by exome sequencing in a Japanese family with 22q11.2 deletion syndrome-like craniofacial features and hypocalcemia. *PLoS One*. 9(3):e91598, 2014.
- Dragneva S, Szyska-Niagolov M, Ivanova

A, Mateva L, Izumi R, Aoki Y, **Matsubara Y**. Seven Novel Mutations in Bulgarian Patients with Acute Hepatic Porphyrrias (AHP). *JIMD Rep*. 16:57-64, 2014.

- Inoue S, Moriya M, Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Niihori T, Oba D, Ono M, Kure S, Ogura T, **Matsubara Y**, Aoki Y. New BRAF knockin mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Hum Mol Genet*. 23(24):6553-6566, 2014.
- Izumi R, Niihori T, Suzuki N, Sasahara Y, Rikiishi T, Nishiyama A, Nishiyama S, Endo K, Kato M, Warita H, Konno H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Kure S, **Matsubara Y**, Aoki Y, Aoki M. GNE myopathy associated with congenital thrombocytopenia: a report of two siblings. *Neuromuscul Disord*. 24(12):1068-1072, 2014.
- Nakano E, Masamune A, Niihori T, Kume K, Hamada S, Aoki Y, **Matsubara Y**, Shimosegawa T. Targeted next-generation sequencing effectively analyzed the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 60(5):1297-1307, 2015.
- Nishi E, Mizuno S, Nanjo Y, Niihori T, Fukushima Y, **Matsubara Y**, Aoki Y, Kosho T. A novel heterozygous MAP2K1 mutation in a patient with Noonan syndrome with multiple lentigines. *Am J Med Genet A*. 167A(2):407-411, 2015.
- Kon M, Suzuki E, Dung VC, Hasegawa Y, Mitsui T, Muroya K, Ueoka K, Igarashi N, Nagasaki K, Oto Y, Hamajima T, Yoshino K, Igarashi M, Kato-Fukui Y, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, **Matsubara Y**, Moriya K, Ogata T, Nonomura K, Fukami M. Molecular basis of non-syndromic hypospadias: systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients. *Hum Reprod*. 30(3):499-506, 2015.

2. 学会発表

- 松原洋一. RAS-MAPK症候群 (RASopathies)をめぐる～希少疾患研究の展望. 第18回小児内分泌研究会特別講演. 2014年7月5日.
- 松原洋一. 小児疾患の遺伝子解析～最近の進歩～. 第15回熊本内分泌代謝フォーラム. 2014年9月12日.
- 松原洋一. 小児慢性特定疾患と遺伝子診

断. 第48回日本小児内分泌学会学術集会
シンポジウム. 2014年9月27日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ES細胞等を用いた臨床研究に対する安全基盤の確立に関する研究

研究分担者 豊田 雅士

地方独立行政法人 東京都健康長寿医療センター研究所 研究副部長

研究要旨：ヒト ES 細胞等幹細胞移植医療としての再生医療が国内外で臨床研究が行われる中、幹細胞の安全性は移植後の中長期的な視点からも考えていく必要性が高まっている。そのため移植に用いた幹細胞を安全性検証として保管し、時間経過に関わらず検証可能なシステムの構築が求められる。そこで本研究では臨床研究を前提とした再生医療製品の原材料および最終製品における長期保存のための品質評価の一つとして細胞表層糖鎖解析によるプロファイリングの収集と長期保存による影響の検討を進めている。移植後の安全性や治療効果の判定に有用となる検証システムとして還元していくことを目的とする。本年度は、ヒト幹細胞等の糖鎖プロファイリングを集積するとともに、幹細胞の老化指標としてのテロメア長について検証をした。

A. 研究目的

臨床研究を前提として製造されたヒト幹細胞を保管し、移植後の時間経過に関わらず移植した幹細胞の検証が可能となる体制を構築することは、移植後の安全性や治療効果の判定に有用となる。そこで本研究では、幹細胞における特性評価として様々な検証がある中で、細胞表層糖鎖による糖鎖プロファイリング解析を行い、その情報に基づいた適切な幹細胞の長期保管体制構築へ還元していくことにある。

B. 研究方法

1) ヒト幹細胞糖鎖プロファイリング

ヒト ES 細胞（国立成育医療研究センター樹立株）や iPS 細胞、組織幹細胞に加え、各細胞から分化誘導した細胞（一部は臨床応用を前提とした分化誘導プロトコール）においてレクチンマイクロアレイ技術による糖鎖解析を行う。さらに得られたデータをバイオインフォマティクスによるプロファイリング解析を行う。

2) 幹細胞の老化指標としてのテロメア長

方法はテロメア特異的プローブを用いた定量的 FISH 法を用いて、初代培養株（親細胞）のテロメアと親細胞から樹立した iPS 細胞の一つの細胞ごとに各染色体別、長腕、短腕別にテロメアを定量した。前回の第 13 回日本再生医療学会総会において、

（倫理面への配慮）

1) ヒト細胞を用いることに対する倫理的配慮

本研究では、ヒト検体由来組織細胞を使用するが、すでに機関の外部委員を含めた倫理審査

委員会へ申請し承認されている。またバイオハザード取り扱いについては研究機関への実験計画の申請ならびに年度毎に実施報告を、研究機関が設置しているバイオハザード委員会に行い、研究が適切に実施されているかを管理できる体制にある。

2) 実験動物を用いることに対する倫理的配慮

実験動物を用いる研究については、東京都健康長寿医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う

C. 研究結果

1) ヒト幹細胞糖鎖プロファイリング

種々の組織由来の幹細胞の糖鎖プロファイリングを得るとともに、それら細胞の分化特性を調べた。その結果細胞が有する増殖能／分化能と相関するレクチンが複数あることがわかった。またヒト ES 細胞の肝分化誘導過程における糖鎖プロファイルの取得を進めた。

2) 幹細胞の老化指標としてのテロメア長

初代培養株（親細胞）のテロメアと親細胞から樹立した iPS 細胞のテロメアを比較し、リプログラミングによってテロメアは有為に伸長することを明らかにした。このテロメアの伸長、短縮を各染色体別、長腕、短腕別に解析したと

ころ、ランダムであることが明らかになった。

D. 考察

再生医療のソースとして期待される幹細胞であるが、その評価法は明確には定まっていない。細胞表層糖鎖解析は評価法の一つとして期待されているが、その情報はまだ十分とはいえない。糖鎖プロファイリング技術の確立にあたって、今回幹細胞老化指標となる染色体テロメア長を実際に測定した。iPS 細胞のクローンによってテロメア伸長に差がみられるものの維持されることを示したが、染色体毎で解析するとその伸長度はランダムであった。これは多能性幹細胞の安定性と関連があることが示唆され、また分化指向性との相関も考えられる。糖鎖情報とともに、将来的に多能性幹細胞の実際的な応用にむけた、データの蓄積と解析が必要と考えられる。

E. 結論

多能性幹細胞による将来的な移植医療において細胞株の選択は安全性や有効性の面から非常に重要となる。糖鎖プロファイリングとともに安定性評価の一つとして幹細胞のテロメア長の測定は有効であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

(原著論文)

1. Fukawatase Y, **Toyoda M**, Okamura K, Nakamura K, Nakabayashi K, Takada S, Yamazaki-Inoue M, Masuda A, Nasu M, Hata K, Hanaoka K, Takubo K, Umezawa A. Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability. *Sci. Rep.*, 4, 5421, 2014.
2. Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Arai T, **Toyoda M**, Nakamura KI, Takubo K. Arm-specific telomere dynamics of each individual chromosome in induced pluripotent stem cells revealed by quantitative fluorescence in situ hybridization. *Tissue cell*, 46(6): 470-476, 2014.

(総説)

1. 豊田雅士、梅澤明弘. 組織幹細胞と糖鎖. 脾島の再生医療-脾β細胞の発生と再生をめぐる新展開-(井村裕夫、清野進監修、石井秀始編集)、診断と治療社、pp86-90, 2015.

2. 学会発表

1. 西野光一郎、豊田雅士、山崎-井上麻由、阿久津英憲、梅澤明弘; ヒト ES 細胞の DNA メチル化バリエーション. 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会, 東京, 2014.5.25-27.
2. Itakura Y, Toyoda M; Analysis of the glycan profile change leading to senescence indicator. 第 37 回日本基礎老化学会大会, 大府, 2014.6.26-27.
3. 小沼泰子、館野浩章、豊田雅士、阿久津英憲、梅澤明弘、平林淳、伊藤弓弦; rBC2LCN レクチンによるヒト ES/iPS 細胞の特異的検出とその応用. 第 33 回日本糖質学会年会, 名古屋, 2014.8.10-12.
4. 西野光一郎、豊田雅士、山崎-井上麻由、阿久津英憲、梅澤明弘; ヒト ES 細胞株間における異常 DNA メチル化領域の解析. 第 107 回日本繁殖生物学会学術集会, 帯広, 2014.8.21-24.
5. 豊田雅士; 高齢者にやさしい医療のための再生医療・組織工学とは. 第 52 回日本人工臓器学会大会, 札幌, 2014.10.17-19
6. 阿久津英憲、伊藤弓弦、豊田雅士. 再生医療用間葉系幹細胞製品の供給システムにおける品質評価技術開発. 第 14 回日本再生医療学会総会. 横浜. 2015.3.19-21.
7. 寺井政憲、仲村賢一、泉山-下村七生貴、石川直、豊田雅士、相田順子、田久保海誉. iPS 細胞のテロメアの伸長、短縮は染色体によって異なる. 第 14 回日本再生医療学会総会. 横浜. 2015.3.19-21.

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

エピゲノム変化に着目した細胞長期保存後における 細胞特性の解析に関する研究

研究分担者：西野 光一郎
宮崎大学准教授

研究要旨：網羅的エピゲノム解析を基盤としたヒト多能性幹細胞の移動および保管のバリデーション技術の確立をめざし、ES 細胞、iPS 細胞の網羅的 DNA メチル化情報を用いて、ヒト ES 細胞の株間における DNA メチル化のバリエーションに関わる DNA メチル化可変領域と iPS 細胞における異常メチル化領域の同定を行った。

A. 研究目的

ヒト ES 細胞等を用いた臨床研究に対する安全基盤の確立の分担研究として、ヒト多能性幹細胞の移動および保管のバリデーション技術の確立を進める。特に本研究では初年度として DNA メチル化解析を基盤とした ES 細胞、iPS 細胞の網羅的 DNA メチル化情報の取得と解析を行い、バリデーション技術としての検証を行う。

B. 研究方法

網羅的 DNA メチル化解析にはイルミナ社の Humanmethylation450K bead chip を用いた解析を基盤としてヒト ES 細胞および iPS 細胞の DNA メチル化情報を取得する。本解析方法は、ゲノム上 45 万カ所のシングルベースリゾリューションを可能とし、さらに高い定量性を有する。解析する多能性幹細胞は、ES 細胞及び iPS 細胞を用い、継代数、移動方法、保存方法、保存期間の異なるサンプルについて解析を行い、バリデーションを行う。H26 年度は、前年度に取得した網羅的 DNA メチル化情報を用いて in silico 解析を行い、ヒト ES 細胞の株間のバリエーションとヒト iPS 細胞における異常メチル化領域の同定の検討を行った。

（倫理面への配慮）

研究総括と綿密に連絡、連携し「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。実験動物を用いる研究については、宮崎大学動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。

C. 研究結果

前年度に取得したヒト ES 細胞 4 株、iPS 細胞 22 株の網羅的 DNA メチル化情報を基に、これらのビックデータをバイオインフォマティクスにより比較解析し、ヒト ES 細胞の株間におけるバリエーションに関わる DNA メチル

化可変領域の同定とヒト iPS 細胞における異常メチル化領域の同定に成功した。

D. 考察

ヒト ES 細胞の株間の網羅的 DNA メチル化情報の比較横断的解析が可能であり、多能性幹細胞特異的 DNA メチル化可変領域が ES 細胞のバリデーションを可能にするエピジェネティックマーカーとして利用可能であることが示唆された。今回同定されたヒト ES 細胞のバリエーションに関わる DNA メチル化可変領域がどの様に ES 細胞株の分化指向性に関わっているか、どの様に ES 細胞の品質に関わっているか、どの様に未分化維持機構に関わっているかを継代数、移動方法、保存方法、保存期間の異なるサンプルやヒト iPS 細胞との比較解析を通して検証する必要がある。

E. 結論

網羅的 DNA メチル化情報が ES 細胞のバリデーションに有効であることが示された。今後、実用化に向けたより効率的なバリデーション方法の確立を目指し、ヒト ES 細胞のバリエーションに関わる DNA メチル化可変領域のうち、ES 細胞の品質に関わる領域を特定し、実用に則したサンプルの解析および解析方法の効率化を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

西野光一郎・豊田雅士・山崎-井上麻由・阿久津英憲・梅澤明弘「ヒト iPS 細胞の異常メチル化領域の解析」第 14 回 日本再生医療学会総会（2015/3/19-20、横浜）

西野光一郎・豊田雅士・山崎-井上麻由・
阿久津英憲・梅澤明弘「ヒト ES 細胞株
間における異常 DNA メチル化領域の解
析」第 107 回 日本繁殖生物学会大会
(2014/8/21-24 帯広市)

三木卓也・脇谷晶一・阿久津英憲・梅澤
明弘・西野光一郎「ヒト iPS 細胞の状態
遷移における DNA メチル化可変領域の
解析」第 8 回 日本エピジェネティクス
研究会年会 (2014/5/25-27、東京)

西野光一郎・豊田雅士・山崎-井上麻由・
阿久津英憲・梅澤明弘「ヒト ES 細胞の
DNA メチル化バリエーション」第 8 回
日本エピジェネティクス研究会年会
(2014/5/25-27、東京)

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
豊田雅士, 梅澤明弘	組織幹細胞と糖鎖	井村裕夫、清 野進監修、石 井秀始編集	再生医療シ リーズ 舘 島の再生医 療	診断と治 療社	東京	2015	86-90

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takeuchi M, Higashino A, Takeuchi K, Hori Y, Koshiba-Takeuchi K, Makino H, Monobe Y, Kishida M, Adachi J, Takeuchi J, Tomonaga T, Umezawa A, Kameoka Y, Akagi K.	Transcriptional Dynamics of Immortalized Human Mesenchymal Stem Cells during Transformation.	PLoS One	10(5)	e0126562	2015
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
Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggan K, Akutsu H, Umezawa A.	The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice.	Nat Commun	5	5464	2014
Higuchi A, Ling QD, Kumar SS, Munusamy MA, Alarfaj AA, Chang Y, Kao SH, Lin KC, Wang HC, Umezawa A.	Generation of pluripotent stem cells without the use of genetic material.	Lab Invest	95(1)	26-42	2015
Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y.	A novel in vitro method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system.	PLoS One	9(10)	e110496	2014
Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, Umezawa A, Terada N.	A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples.	Lab Invest	95(1)	4-13	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Toyoda M, Umezawa A.	Stem cells bond our organs/tissues and engineering products.	Circ J	78(7)	1582-1583	2014
Yazawa T, Imamichi Y, Miyamoto K, Umezawa A, Taniguchi T.	Differentiation of mesenchymal stem cells into gonad and adrenal steroidogenic cells.	World J Stem Cells	6(2)	203-212	2014
Sugawara K, Hamatani T, Yamada M, Ogawa S, Kamijo S, Kuji N, Akutsu H, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A.	Derivation of human decidua-like cells from amnion and menstrual blood.	Sci Rep	4	4599	2014
Kami D, Kitani T, Kishida T, Mazda O, Toyoda M, Tomitaka A, Ota S, Ishii R, Takemura Y, Watanabe M, Umezawa A, Gojo S.	Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer.	Nanomedicine	10(6)	1165-1174	2014
Kawano N, Araki N, Yoshida K, Hibino T, Ohnami N, Makino M, Kanai S, Hasuwa H, Yoshida M, Miyado K, Umezawa A.	Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus.	Proc Natl Acad Sci USA	111(11)	4145-4150	2014
Ogata T, Niihori T, Tanaka N, Kawai M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakashima S, Kato F, Fukami M, Aoki Y, Matsubara Y.	TBX1 mutation identified by exome sequencing in a Japanese family with 22q11.2 deletion syndrome-like craniofacial features and hypocalcemia.	PLoS One	9(3)	e91598	2014
Dragneva S, Szyszkka-Niagolov M, Ivanova A, Mateva L, Izumi R, Aoki Y, Matsubara Y.	Seven Novel Mutations in Bulgarian Patients with Acute Hepatic Porphyrias (AHP).	JIMD Rep	16	57-64	2014
Inoue S, Moriya M, Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Niihori T, Oba D, Ono M, Kure S, Ogura T, Matsubara Y, Aoki Y.	New BRAF knockin mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in cardio-facio-cutaneous syndrome.	Hum Mol Genet	23(24)	6553-6566	2014
Nishi E, Mizuno S, Nanjo Y, Niihori T, Fukushima Y, Matsubara Y, Aoki Y, Kosho T.	A novel heterozygous MAP2K1 mutation in a patient with Noonan syndrome with multiple lentigines.	Am J Med Genet A	167A(2)	407-411	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kon M, Suzuki E, Dung VC, Hasegawa Y, Mitsui T, Muroya K, Ueoka K, Igarashi N, Nagasaki K, Oto Y, Hamajima T, Yoshino K, Igarashi M, Kato-Fukui Y, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Matsubara Y, Moriya K, Ogata T, Nonomura K, Fukami M.	Molecular basis of non-syndromic hypospadias: systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients.	Hum Reprod	30(3)	499-506	2015
Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Arai T, Toyoda M, Nakamura K, Takubo K.	Arm-specific telomere dynamics of each individual chromosome in induced pluripotent stem cells revealed by quantitative fluorescence in situ hybridization.	Tissue Cell	46(6)	470-476	2014

IV. 研究成果の刊行物・別刷