

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

**「iPS細胞等の安定供給と臨床利用のための
基盤整備」に関する研究**

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西田 幸二

平成27（2015）年3月

目 次

I. 班員構成	-----	1
II. 総括研究報告		
iPS細胞等の安定供給と臨床利用のための基盤整備に関する研究	-----	3
西田 幸二		
III. 分担研究報告		
1. iPS細胞等の安定供給と臨床利用のための基盤整備に関する研究	-----	9
西田 幸二		
(参考資料-1) 凍結保存試料の輸送及び保存に関する手順書		
(参考資料-2) 細胞運搬コールドラン		
2. 体性幹細胞、iPS細胞等を用いる臨床研究支援技術開発に関する研究	-----	35
澤 芳樹		
3. iPS細胞からの骨・軟骨系細胞への培養技術を最適化するための基盤整備に関する研究	-----	39
吉川 秀樹		
4. 幹細胞のストック実施と管理に関する研究	-----	43
森 正樹		
5. 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する研究	-----	49
大園 恵一		
6. 移植治療後の慢性期完全脊髄損傷患者のリハビリテーションと脳機能再構成および脊髄再生との関連性についての評価法の開発に関する研究	-----	53
吉峰 俊樹		
7. 間葉系幹細胞移植医療の基盤整備に関する研究	-----	57
玉井 克人		

8. 体性幹細胞、iPS細胞等を用いる 臨床研究実施のための基盤技術に関する研究	59
齋藤 充弘	
9. 幹細胞等の確実な保管および機能解析を 実現するための基盤整備に関する研究	61
高島 成二	
10. 体性幹細胞付帯情報の収集・管理システムの構築に関する研究	63
新谷 歩	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	65
V. 研究成果の別刷	69

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いずれの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も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、コールドドラム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たことが証明された。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ア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日間クライオライ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ライ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的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。

研究分担者の大園は、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

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」

分担研究報告書

「体性幹細胞、iPS細胞等を用いる臨床研究支援技術開発」

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
研究協力者	川崎 諭	大阪大学 眼免疫再生医学共同研究講座	特任准教授
研究協力者	林 竜平	大阪大学 幹細胞応用医学寄附講座	准教授
研究協力者	小林 由紀	大阪大学 脳神経感覚器外科学（眼科）	研究員
研究協力者	本田 愛	大阪大学 脳神経感覚器外科学（眼科）	研究員

【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。

今年度は、実際の運用に向けたシステムの最終調整を行った。その中で、細胞の運搬および保管を円滑に運営するために、凍結保存試料の輸送及び保存に関する標準手順書を作成し、またその手順書に従ってコールドランを実施した。また、取り扱う保管サンプルの臨床データの管理として REDCap ベースのデータベースを構築した。構築したシステムが安定していることを確認したうえで、大阪大学で行っている再生医療臨床研究のサンプルの保管を開始した。来年度中には学外のサンプルについても受け入れが可能となる予定である。

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が危惧される。human error 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実的に難しい。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、厳密に管理することとする。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

1. 細胞保管、細胞運搬および幹細胞付帯情報管理システムの運営に関する標準手順書 (SOP) の作成

体性幹細胞ならびに iPS 細胞等貯蔵を安全かつ確実にこなうために、当機関内に電子錠を備えた専用のストックルームの設置、コンピュータと連動した自動入出庫管理システムを実現する細胞凍結保管庫 (クライオライブラリ) の設置を昨年度までに行った。今年度はこのシステムの運用に伴い、細胞サンプルの送り手側でのサンプル取扱及び大阪大学への送付手順、大阪大学でのサンプル受取から出入庫の運営手順及びサンプルの管理方法に関する標準手順書 (SOP) を作成する。凍結細胞サンプルの受入に際して、エントリーシートを作成し、輸送予定のサンプルについての情報を事前に把握することとした。また、相手側でのサンプルの輸送時において、大阪大学への輸送時でのチェックシートを作成し、輸送前のサンプルの保管状態の確認可能にする。

またシステムの緊急停止や異常時において、作業者の安全確保を考慮した上で、対応可能なクライオライブラリ緊急対応マニュアルも作成した。

2. 標準手順書に基づいて細胞運搬・保管のコールドランの実施

細胞運搬は、東京大学と京都府立医科大学の協力の下、作成した SOP の手順に従事して実施した。

まず大阪大学にて準備した凍結細胞をドライアイス内で梱包した箱及び、細胞とは別に -190 以下に保持した空のドライシッパーを東京大学と京都府立医科大学の 2 大学にそれぞれ郵送し、各大学で凍結細胞を指示通りドライシッパー内へ移動し大阪大学へ再輸送する工程を行った。大阪大学への輸送時には、輸送前チェックシートの記入を依頼した。受取後、サンプル受入の入庫情報をシステムに入力し、連結可能匿名化するバーコードシールをサンプルバイアルに貼付して、4 日間クライオライブラリ内で保管した。4 日後、細胞状態を比較検討するため、大阪大学で輸送した細胞バイアルと同様に凍結したサンプルをコントロールとして、2 大学からのそれぞれの細胞に生存率及び形状に差異はないかを培養によって比較を行った。

3. 幹細胞付帯情報管理データベースの構築

本研究では再生医療臨床研究で用いた幹細胞の安全かつ確実な保存場所を構築するのに平行して、保管する幹細胞に関する臨床および培養情報を入力するためのデータベースの構築も行う。データベースとしては REDcap データベースを用いる。REDcap データベースは米国 Vanderbilt 大学で開発され、世界中で広く利用されているもので、インターネットを介して多施設で on site で入力が可能であり、保管する幹細胞に匿名化することが義務付けられている本研究においては極めて便利なシステムであ

る。

(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

作成した SOP (参考資料-1) に従いコールドランを実施した結果、液体窒素を充填し、各大学に輸送して返却されるまで 3 日経過していたが、どちらのドライシッパーも -190 以下を保てており、生細胞率と細胞形状についてコントロールと大差はなかった。(参考資料-2)

今回協力が得られた 2 大学の実務担当者に輸送前チェックシートの記載を行ってもらったが、記載内容の難しさや疑問点に関しての指摘はなかった。

以上のことから、ドライシッパーによる輸送とクライオライ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。

クライオライブラリの稼動サンプル保管時に、クライオライブラリの誤作動によって緊急停止したが、緊急時対応マニュアルによって、迅速に対応できたことから、作成したマニュアルは緊急時にも対応可能であったと考える。また、緊急連絡体制表に従って、クライオライブラリの製造業者との早急な連絡にも対応可能であった。

移植した幹細胞に関する臨床情報を管理する REDcap データベースの構築を大阪大学臨床統計疫学寄附講座と共同で行った。入力項目を研究班内で議論して決定し、入力時には簡便に入力できるように、ブルダ

ウンメニューとするなどの工夫を凝らした。

D. 考按

京都府立医科大学へ輸送した方は、到着時に保護ケースのフック錠が片方開きかけていた。輸送途中でフック錠のタブが上がってしまったと考えられる。対策として、フック錠のタブにテープを貼り付ける作業を SOP へ追加し、タブに物が当たらないようにすることを検討している。

ドライシッパーの取扱いについては、取扱い説明書を作成して事前に両大学へ送付した。特に取扱いが難しいという意見もなかったため、ドライシッパーを使用したことがなくても、説明書を添付することによって問題なく作業は行い得ると判断する。

今回は、大阪大学からサンプルを各大学に送付してコールドランを行ったため、サンプルの受入時に使用するエントリーシートを用いなかった。よって、このシートの使用に関する問題点がある可能性は否定できず、実際の運用後に修正する可能性もあると考える。

緊急連絡体制表については、業者内での人事異動などがあるため、最新の情報であるかの確認が必要であると考えた。

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、作成した作業手順書に準じて細胞運搬および保管を管理可能であり、またシステムの動作も問題なく稼動し、今後国内で行われる再生医療サンプルを確実に保管・管理するために適した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

なし

2. 学会発表

なし

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

(参考資料-1) 凍結保存試料の輸送及び保存に関する手順書

凍結保存試料の輸送及び保存に関する手順書

制定：2014年6月27日

大阪大学 眼科

改訂履歴表

改訂 番号	年月日	改訂内容	改訂理由
00	2014/6/27	制 定	
01	2014/8/15	5-5-1、5-6-1 項の追加	阪大内部からの 受入れも行うため
	2014/9/26	5-5-2.5 項、テープ 貼り付け作業の追加	輸送途中でタブが 上がらないようにするため
	2014/10/24	5-6-3 項の追加	ドライアイス梱包でサンプルを 輸送する場合を考慮

目 次

1. 目的	1
2. 適応範囲	1
3. 責任体制	1
4. 遵守事項	1
5. 作業手順	1
5-1 サンプル受入前登録	1
5-2 凍結チューブの送付	1
5-3 凍結保存試料搬送容器	1
5-4 ドライシッパーの事前準備	2
5-5 ドライシッパーの輸送準備	2
5-6 クライオライブラリーへの凍結細胞の輸送	3
5-7 凍結細胞の受入	4
5-8 サンプルの出庫	6
5-9 クライオライブラリーと検体ソフトウェアとのデータ同期	7
6. 緊急時の対応	8
添付書類	
1) エントリーシート	10
2) クロネコヤマト宅急便の全国配送日程図	11
3) 輸送前チェックシート	12
4) 仮登録から細胞保存までのフローチャート	13

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 16 頁	

1. 目的

凍結細胞チューブ運搬に使用する凍結保存試料搬送用容器（以下ドライシッパー）の準備に関する手順を記す。

2. 適応範囲

大阪大学内及び他施設から大阪大学医学部眼科学教室への凍結細胞を搬送する全ての工程に適応する。

3. 責任体制

本手順書は iPS ストック事業分担者が作成し、責任者が承認する。

大阪大学内及び他施設から大阪大学医学部眼科学教室への凍結細胞の受取とクライオライブラリー内へ入庫及び出庫作業は、クライオライブラリーに関する十分な知識及び技術を有する研究者が担当する。

4. 遵守事項

クライオライブラリー取扱説明書（ダイジェスト版）

5. 作業手順

5-1 サンプル受入前登録

5-1-1 サンプル送付を希望する施設の担当者にエントリーシートを E メールで送付する。
（添付 1）

5-1-2 返信された記入済のエントリーシートをもとに、仮登録を行う。

5-1-3 仮登録は、大阪大学で作成した登録記録に情報を入力する。

5-2 凍結チューブの送付

5-2-1 エントリーシートで指定された必要本数の凍結チューブを郵送する。

5-2-2 郵送した日付は、登録記録に入力する。

ドライアイス梱包にてサンプルが輸送される場合は、以下 5-3～5-5 の作業は不要。

5-3 凍結保存試料搬送容器

5-3-1 エントリーシートで指定された相手先のサンプル輸送日に合わせて搬送容器を準備する。

5-3-2 準備開始は火曜日のみとする。

5-3-3 大陽日酸株式会社が販売する CXR シリーズ（米国 Taylor-Wharton 社製）CXR100 を使用する。

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 17 頁	

5-4 ドライシッパーの事前準備（本作業は共同研究棟 1 階クライオリブラリー室で行うこととする。作業中は換気に十分注意し、作業は 2 人で行うこと）

5-4-1 液体窒素充填（1 日前）；火曜日

5-4-1.1 充填前にドライシッパーの空重量を測定する。（キャニスターも容器内へ入れておく）

5-4-1.2 容器内部のネックチューブ下端まで液体窒素を充填する。

5-4-1.3 ネックチューブコアを装着し、30 分間放置する。

5-4-1.4 ネックチューブコアを外し、容器内部の吸着材に液体窒素がすべて吸着されていることを確認し、ネックチューブコア下端まで液体窒素を充填する。

5-4-1.5 ネックチューブコアを装着し、1 時間放置する。

5-4-1.6 ネックチューブコアを外し、容器内部の吸着材に液体窒素がすべて吸着されていることを確認し、ネックチューブコア下端まで液体窒素を充填する。

5-4-1.7 ネックチューブコアを装着し、5 時間放置する。

5-4-1.8 ネックチューブコアを外し、吸着して減量した分の液体窒素をネックチューブコア下端まで充填し、ネックチューブコアを装着して 24 時間放置する。

5-4-2 ドライシッパー準備（2 日目）；水曜日

5-4-2.1 ネックチューブコアを外し、容器の底に残っている液体窒素を廃棄する。

5-4-2.2 容器を台秤に乗せ、重量を測定する。空容器の重量に対して、約 3.0kg 増加していることを確認して、充填完了とする。

5-4-2.3 クライオスリーブを装着したケーンをドライシッパー内に設置する。

5-5 ドライシッパーの輸送準備

5-5-1 大阪大学施設内での凍結細胞輸送

5-5-1.1 大阪大学の各部署の細胞保存の担当者と連絡をとり、入庫の日程を調整する。

5-5-1.2 日程調整後、その日に合わせてドライシッパーを準備する。

5-5-1.3 保存日または前日に、ドライシッパーを各部署の細胞保存の担当者まで持っていく。

5-5-2 他施設（大阪大学の外部）での凍結細胞輸送

5-5-2.1 輸送はクロネコヤマト便で、着払いにて行うこととする。

（全国の発送日程；添付 3）

5-5-2.2 クロネコヤマトからの集荷は水曜日 17 時とする。

5-5-2.3 輸送する日の 15 時までにクロネコヤマトに集荷の電話をする。

5-5-2.4 ドライシッパーに南京錠をつけ、容器を専用のハードケースに入れる。

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 18 頁	

- 5-5-2.5 輸送前チェックシートを同封し（添付 2）、しっかりとフック錠をかける。フック錠のタブにはテープを貼り付け、輸送途中でタブがあがらないようにする。
- 5-5-2.6 集荷用（着払い）用紙に必要事項を記入する。
- 5-5-2.7 集荷は、眼科研究室（臨床研究棟 4 階）とする。

5-6 クライオライブラリーへの凍結細胞の輸送

5-6-1 大阪大学施設内の部署からクライオライブラリーまでの凍結細胞輸送

- 5-6-1.1 凍結細胞の輸送は、大阪大学が準備し事前に輸送したドライシッパーを用いて行う。
- 5-6-1.2 輸送の際にチェックシートを記入の上、ドライシッパーを収める専用のハードケース内に同封してもらう。
- 5-6-1.3 大阪大学内の部署の担当者とクライオライブラリー担当者と受取の日時を事前に連絡をして取り決める。
- 5-6-1.4 指定の日時に、クライオライブラリー部屋（共同研究棟 L 階）にドライシッパーを持ち込む。

5-6-2 他施設から大阪大学への凍結細胞の輸送（ドライシッパー使用の場合）

- 5-6-2.1 他施設からの輸送は月曜日か火曜日か水曜日の 3 日に限定して行う。
- 5-6-2.2 凍結細胞の輸送は、大阪大学が準備し事前に輸送したドライシッパーを用いて行う。
- 5-6-2.3 輸送の際にチェックシートを記入の上、ドライシッパーを収める専用のハードケース内に同封してもらう。
- 5-6-2.4 発送する同じ週の木曜日着指定で大阪大学の眼科研究室（臨床研究棟 4 階）に輸送する。

5-6-3 他施設から大阪大学への凍結細胞の輸送（ドライアイス使用の場合）

- 5-6-3.1 緊急での輸送が必要な場合、ドライアイスで凍結細胞を梱包して大阪大学へ輸送する。
- 5-6-3.2 発砲スチロール容器にドライアスを 5kg 程度砕いて入れる。（ドライアイスの量は、容器の大きさや輸送日数によって調整する）
- 5-6-3.3 凍結細胞アンプルをドライアイスの底、または真中に埋めるように梱包する。ドライアイスの上には置かないこと。
- 5-6-3.4 発砲スチロール容器を封じ、冷凍便などを利用して大阪大学の眼科研究室（臨床研究棟 4 階）に輸送する。輸送の際は到着日と時間を指定し、事前に大阪大学の担当者へ連絡をしておく。

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 19 頁	

5-7 凍結細胞の受入

5-7-1 凍結細胞受入の準備（本作業は、クライオライブラリー室内で行う）

- 5-7-1.1 アルミビーズをアルミ容器に入れ、受け入れの 1 日前から-80 冷凍庫に入れておく。
- 5-7-1.2 -80 冷凍庫からアルミビーズ入り容器を取出し、発砲スチロール容器の中へ入れる。
- 5-7-1.3 アルミビーズ入り容器にフタをした状態で、発砲スチロール容器の中へ液体窒素を注ぐ（アルミ容器の中央程度の高さまで注ぐ）。



（イメージ図）

- 5-7-1.4 アルミビーズが十分に冷えるまで、15 分程待つ。液体窒素が減ってきたら追加する。
- 5-7-1.5 クライオライブラリーの電源を ON にし、照明を ON にする。

5-7-2 仮登録（詳細は「検体管理ソフトウェア SampleConductorPro for CryoLibrary 簡易マニュアル」参照）

- 5-7-2.1 PC を起動し、ラベルプリンターBMP51 の電源を ON にする。
- 5-7-2.2 「SampleConductorPro」を立ち上げる。
- 5-7-2.3 サンプル登録ボタンをクリックし、サンプル登録を行う。
- 5-7-2.4 ラベル印刷を行いたいサンプルを選択し、右クリックして「ラベルを印刷」を選択する。
- 5-7-2.5 「印刷」ボタンをクリックし、ラベル印字を実行する。
- 5-7-2.6 ドライシッパー、あるいはドライアイスで梱包された凍結細胞を取出し、サンプルの破損や融解がないかをすばやく確認する。
- 5-7-2.7 発行されたラベルを間違えないように該当チューブ側面に巻きつけて貼る（ラベルは出来るだけチューブの上側に貼ること。右下がりに貼ると貼りやすい。最低 2mm オーバーラップさせること）。
ラベルを貼ったチューブは十分に冷えたアルミビーズの中へ深く差しておく。

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 20 頁	



ラベルを上下逆に貼ったり、下側に貼り付けてバーコードがカップに被ると読み取りができないため適切な位置に貼ること。

- 5-7-2.8 クライオライブラリーに収納したいサンプルを選択し、右クリックして「クライオライブラリー予約」を選択し、クライオライブラリー登録用ワークリストの登録を完了する。
- 5-7-2.9 ワークリスト管理画面タブを開き、希望のリストを選択して「ワークリスト印刷」を選択すると、レシートプリンタから登録用ワークリストが印刷される（印刷初回は印刷ボタンをクリックしてもすぐに印刷されないため、印刷ボタンを何度もクリックせずに待つこと）。
- 5-7-3 サンプル入庫予約（詳細は「クライオライブラリー取扱説明書（ダイジェスト版）」参照）
- 5-7-3.1 PCの電源を入れ、クライオライブラリーソフトウェアを立ち上げる。
- 5-7-3.2 メイン画面から「新規入庫命令予約」を選択し、作業コードを入力して作業確認を選択する。
- 5-7-3.3 新規入庫命令の予約画面が開いたら、バーコードリーダーを使用して印刷したワークリストの作業バーコードを読み取り、「サンプル名」と「ロットNo.」の項目に入力する。
ケーンと段を指定してサンプル入庫を行いたい場合は、予約画面の「新規指定入庫」を選択する（5-7.3.6 項へ進む）
- 5-7-3.4 アンブル数をワークリストの登録サンプル数と同数を入力する。
- 5-7-3.5 「空検索」ボタンをクリックして空きケーン情報を取得し、「命令確定」ボタンをクリックする。
- 5-7-3.6 アンブルID項目にカーソルを移動し、ワークリストのバーコードを1つずつ読み取ってデータを登録し「アンブル登録」をクリックする。
「新規指定入庫」を選択した場合は、入庫したいケーンと段も入力して「アンブル登録」をクリックする。
- 5-7-3.7 すべてのサンプルを登録し終わったら、「予約登録」ボタンをクリックする。
すぐにクライオライブラリーへの収納を実行する場合は「予約実行」をクリックする。（「予約実行」を選択した場合は5-7.4.2 項へ進む）
- 5-7-4 サンプル入庫（詳細は「クライオライブラリー取扱説明書（ダイジェスト版）」参照）

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 21 頁	

- 5-7-4.1 メイン画面から「予約命令の実行開始」を選択し、作業者コードを入力して作業者確認を選択する。
- 5-7-4.2 実行 JOB の選択ウィンドウから JOB を選択する。
- 5-7-4.3 「実行開始」ボタンをクリックし、「実行を操作してください」の表示が出たら、サンプルをアルミビーズの中に入れてそのままクライオライブラリー本体前まで持参する。
- 5-7-4.4 本体液晶パネルの点滅している「実行」ボタンを押す。ロボットが動作し指定されたケーンをパスボックス位置まで移動する。
- 5-7-4.5 ロボットの動きが停止することを確認し、液晶パネルに「作業可能」と表示されたら、パスボックスの扉を開けてサンプルを所定のケーン位置へセットする。
- 5-7-4.6 パスボックスの扉を閉め、液晶パネルの「完了」ボタンを押してから「実行」ボタンを押す。
収納数分だけ、5-7-4.5 と 5-7-4.6 の作業を繰り返す。
- 5-7-4.7 ロボットが目的ケーンを凍結保存容器に入庫する。元の位置にケーンが入庫されたことを確認する。
- 5-7-4.8 一連の操作が正常終了することを確認する。

5-8 サンプルの出庫

5-8-1 出庫の準備（必要時）

- 5-8-1.1 アルミビーズをアルミ容器に入れ、出庫の 1 日前から -80 冷凍庫に入れておく。
- 5-8-1.2 -80 冷凍庫からアルミビーズ入り容器を取出し、発砲スチロール容器の中へ入れる。
- 5-8-1.3 アルミビーズ入り容器にフタをした状態で、発砲スチロール容器の中へ液体窒素を注ぐ（アルミ容器の中央程度の高さまで注ぐ）。
- 5-8-1.4 アルミビーズが十分に冷えるまで、15 分程待つ。液体窒素が減ってきたら追加する。

5-8-2 サンプル出庫予約（詳細は「クライオライブラリー取扱説明書（ダイジェスト版）」参照）

- 5-8-2.1 クライオライブラリーの電源を ON にし、照明を ON にする。
- 5-8-2.2 PC の電源を入れ、クライオライブラリーソフトウェアを立ち上げる。
- 5-8-2.3 メイン画面から「出庫命令の予約」を選択し、作業者コードを入力して作業者確認を選択する。

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 22 頁	

- 5-8-2.4 出庫命令の予約画面が開いたらアンプル ID 項目にカーソルを移動し、ワークリストから出庫したいサンプルのバーコードを読み取ってアンプル ID を入力する
- 5-8-2.5 表示された情報が出庫したいサンプルと一致することを確認し、「出庫登録」ボタンをクリックする。出庫したいサンプルが複数ある場合は、5-8.2.3 と 5-8.2.4 の作業を出庫数分繰り返す。
- 5-8-2.6 すべてのサンプルを登録し終わったら、「予約登録」ボタンをクリックする。すぐに出庫を実行する場合は「予約実行」をクリックする。（「予約実行」を選択した場合は 5-8-3.2 項へ進む）

5-8-3 サンプル出庫（詳細は「クライオライブラリー取扱説明書（ダイジェスト版）」参照）

- 5-8-3.1 メイン画面から「予約命令の実行開始」を選択し、作業コードを入力して作業確認を選択する。
- 5-8-3.2 実行 JOB の選択ウィンドウから JOB を選択する。
- 5-8-3.3 「実行開始」ボタンをクリックし、「実行を操作してください」の表示が出たら、クライオライブラリー本体前まで移動する。
- 5-8-3.4 本体液晶パネルの点滅している「実行」ボタンを押す。ロボットが動作し目的ケーンをパスボックス位置まで移動する。
- 5-8-3.5 ロボットの動きが停止することを確認し、液晶パネルに「作業可能」と表示されたら、パスボックスの扉を開けてサンプルを所定のケーン位置から取り出す。
- 5-8-3.6 パスボックスの扉を閉め、液晶パネルの「完了」ボタンを押してから「実行」ボタンを押す。
出庫数分だけ、5-7.3.5 と 5-7.3.6 の作業を繰り返す。
- 5-8-3.7 ロボットが目的ケーンを凍結保存容器に入庫する。元の位置にケーンが入庫されたことを確認する。
- 5-8-3.8 一連の操作が正常終了することを確認する。

5-9 クライオライブラリーと検体ソフトウェア SampleConductorPro とのデータ同期 起動時自動同期

SampleConductorPro が起動した際に、自動的にクライオライブラリーデータベースに接続し、更新済データを同期する。

手動処理

SampleConductorPro ソフトウェアのボトムエリアにある「クライオライブラリー同期」ボタンをクリックすると、手動でクライオライブラリーデータベースのデータを同期する。

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 23 頁	

6. 緊急時の対応

停電など緊急時の対応については「クライオライブラリー緊急時対応マニュアル」を参照。

緊急時パターン

- 1 ケーンを掴んでいる時にピックアップマシンが止まった時
- 2 ケーンを掴んでいる時にピックアップマシンが止まり、ピックアップマシンが邪魔でケーンが戻せない場合
- 3 アンブルが装置内に落下した場合

また、その他の異常時の対応については、「クライオライブラリー取扱説明書（ダイジェスト版）」の「6.異常時の対処（P.11）」を参照。

・電磁弁稼働異常による、クライオライブラリーへの液体窒素供給エラー時の対応

- 1) 液面監視装置のリセットボタンを押す。画面に何も表示されていない場合は、画面をタッチして表示させる。
- 2) クライオライブラリー本体側のレベルマスターのスイッチを一旦 OFF にし、ON に戻す。
- 3) 自動供給が開始されたことを確認する。(供給が開始するまで 10 分ほどかかる)

対応できない異常については「緊急連絡体制表」の該当場所に連絡する。

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 24 頁	

添付書類

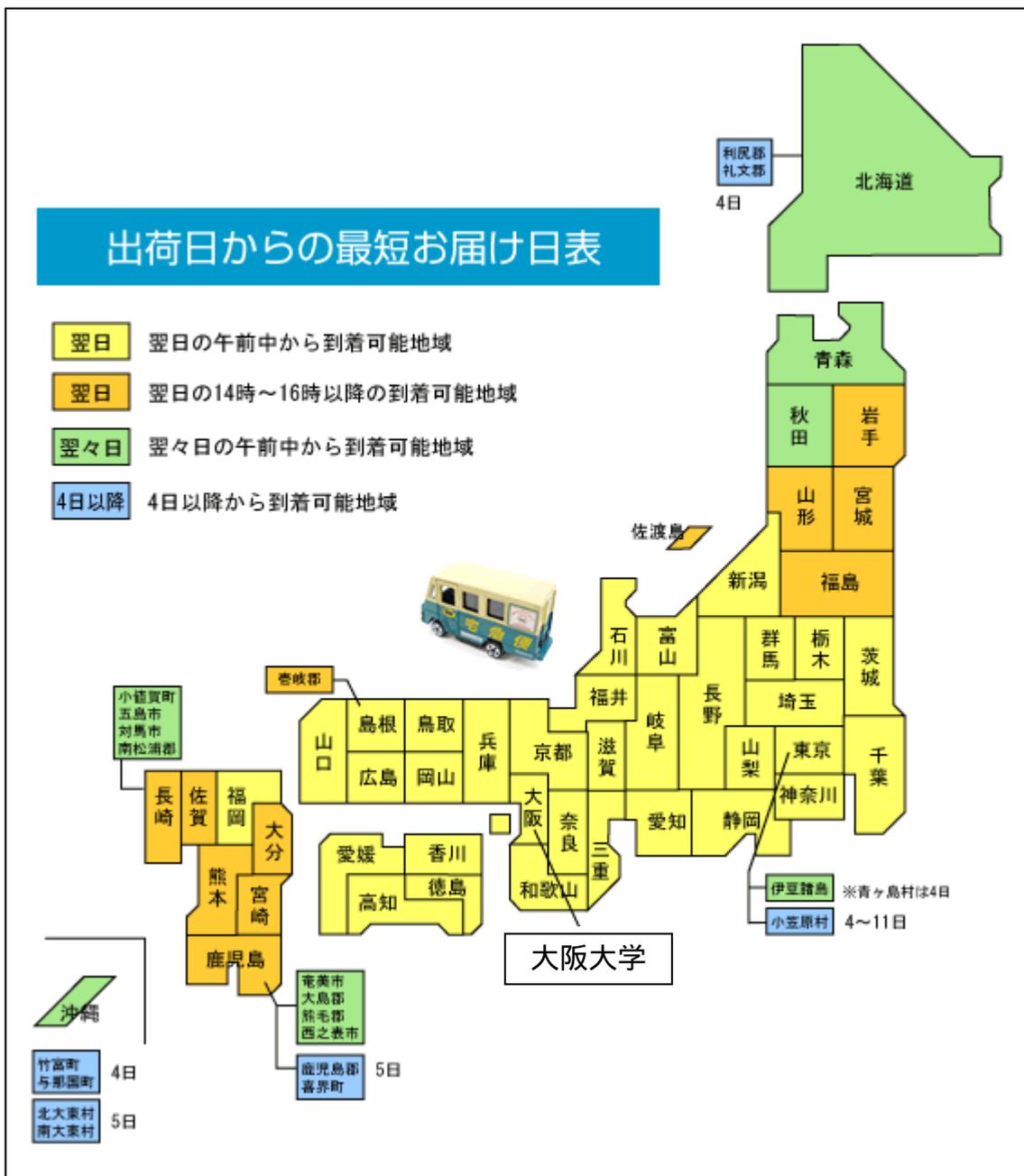
- 1) エントリーシート
- 2) 輸送前チェックシート
- 3) クロネコヤマト宅急便の全国配送日程図
- 4) 仮登録から細胞保存までのフローチャート

	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 25 頁	

再生医療治療に用いる体性幹細胞・iPS細胞ストック登録申請書(仮)					
申請日	年 月 日				
機関名			部署名		
住所			TEL		
担当者			E-mail		
登録サンプルに関する情報			発送予定日	年 月 日	
手術日	年 月 日			阪大記入欄	
匿名化番号 または識別ID			サンプル本数	本	サンプルID
					号機 使用ケーンNo. -
手術日	年 月 日			阪大記入欄	
匿名化番号 または識別ID			サンプル本数	本	サンプルID
					号機 使用ケーンNo. -
手術日	年 月 日			阪大記入欄	
匿名化番号 または識別ID			サンプル本数	本	サンプルID
					号機 使用ケーンNo. -
* ドライシッパーの低温保持限界があるため、大阪大学に木曜日到着必須となっております。よって、同週の 月、火、水曜日 のいずれの日程かで発送完了をお願い致します。					
保存サンプル専用チューブについて					
受取希望日	年 月 日		希望本数	本	<input type="checkbox"/> 同製品を貴施設で準備します。
** クライオライブラリーでのサンプル保存に使用する凍結チューブは、CORNING 2mL internal threaded PP cryogenic vial (cat# 430488) のみを使用し、その他のチューブでの凍結保存登録は受付不可とする。原則、大阪大学より希望本数を事前に郵送致します。					
ドライシッパー(輸送用液体窒素保管容器)の発送について					
受取希望日	年 月 日(金曜日)まで		<input type="checkbox"/> 特に指定しません。		
*** 大阪大学からのドライシッパーの発送は 毎週水曜のみ で翌日(木曜日)または翌々日(金曜日)に到着予定です。					
その他特記事項					
本状の送付先 : 本状を添付の上、以下の3人の担当者 全員 宛に電子メールで申請をお願い致します。					
大阪大学大学院医学系研究科眼科学 〒565-0871 吹田市山田丘2-2 TEL: 06-6210-8388 FAX: 06-6210-8387					
川崎 諭	E-mail: skawasaki@ophthal.med.osaka-u.ac.jp				
本田 愛	E-mail: yuki.kobayashi@ophthal.med.osaka-u.ac.jp				
小林 由紀	E-mail: ai.honda@ophthal.med.osaka-u.ac.jp				
大阪大学記入欄					受領日: 年 月 日
保存担当者			備考		
登録・入庫	年 月 日				
受取状況	凍結サンプル <input type="checkbox"/> 異常なし <input type="checkbox"/> 異常あり				

出荷日からの最短お届け日表

- 翌日 翌日の午前中から到着可能地域
- 翌日 翌日の14時～16時以降の到着可能地域
- 翌々日 翌々日の午前中から到着可能地域
- 4日以降 4日以降から到着可能地域



	凍結細胞保存に関する手順書	改訂番号	01
		13 頁の内 27 頁	

輸送前チェックシート

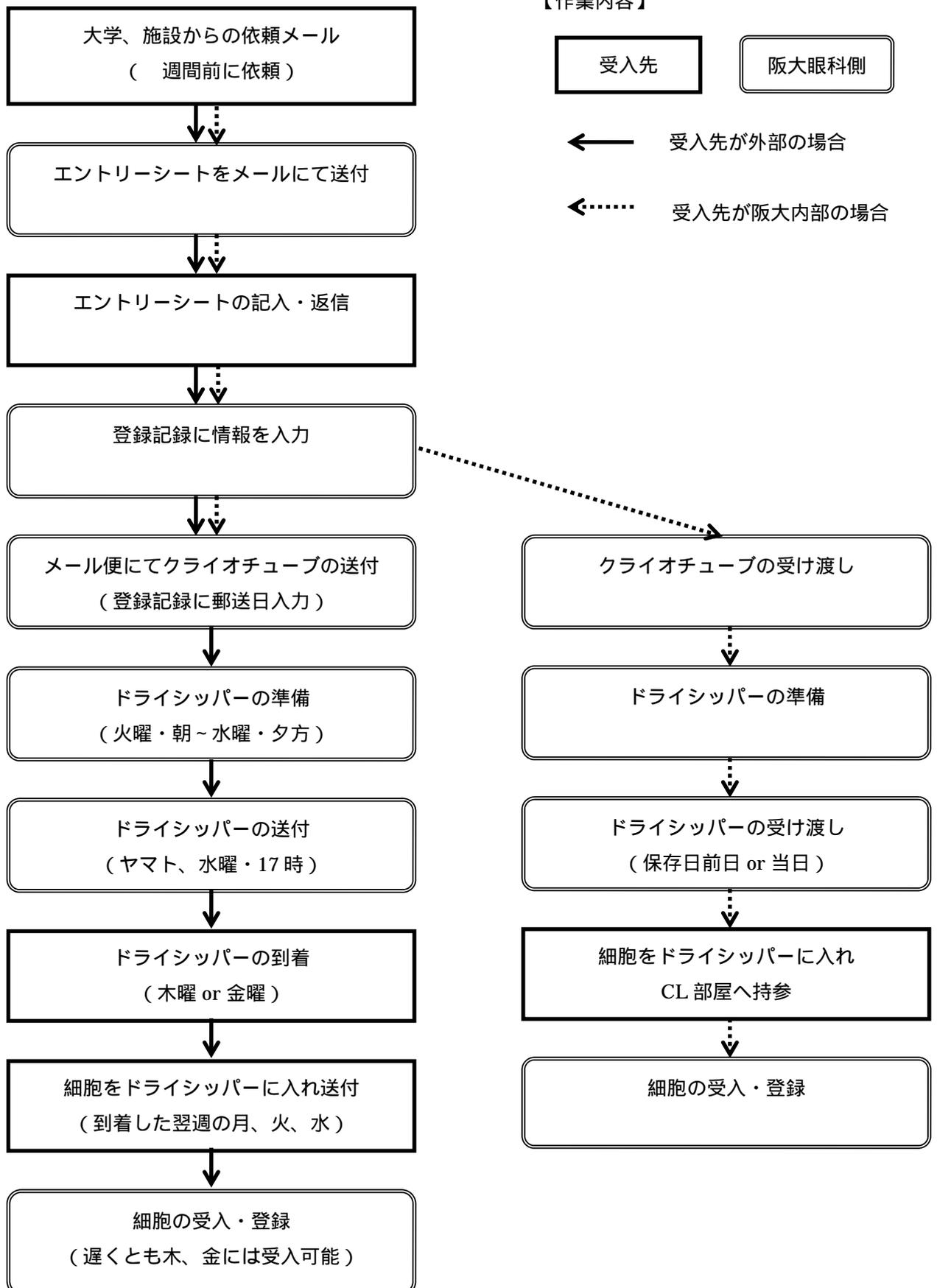
確認者名： _____

	チェック内容	チェック欄
1	チューブは指定のチューブを使用していますか？ (CORNING 2mL internal threaded PP cryogenic vial (cat# 430488))	
2	申請書に記入した匿名化番号（あるいは識別 ID）と、凍結チューブに 記入した内容は一致していますか？	
3	申請書に記入したサンプル本数と一致していますか？	
4	ドライシッパーに鍵はかけましたか？	
5	大阪大学に金曜日までに届きますか？	
6	送り状の内容に間違いはありませんか？	

各項目を確認の上、チェック欄にチェックを入れてください。

すべて確認が終わりましたら、チェックシートをハードケース内に同封して下さい。

クライオライブラリー細胞受入の流れ



細胞運搬コールドラン

【コールドランの流れ】

(大阪大学作業)



ドライシッパーに液体窒素を充填し、使用準備を行う。(準備には2日かかる)



準備終了後、ドライシッパーを保護ケースに入れて各大学へ送る。また、事前に-150で凍結保存しておいた 293T 細胞バイアル 1 本も、ドライアイスにて梱包して送る。



(輸送先作業)



ドライシッパーが到着したら、細胞バイアルを取り出してドライシッパーへ移動する。また、作業記録シートに必要事項を記入する。細胞バイアルが入ったドライシッパーは室温で置いておく。

(大阪大学作業)

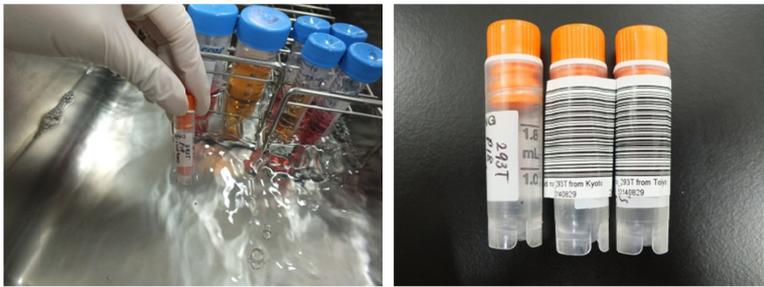


翌日 保護ケース内に記入済みの作業記録シートを入れ、ドライシッパーを大阪大学へ送り返す。



各大学よりドライシッパーが到着したら細胞バイアルを取り出し、クライオライブラリーに入庫登録をして入庫する。

4日後



位相差顕微鏡にて細胞を観察する。

クライオライブラリーより細胞を出庫し、解凍して生細胞率を測定後、T75 フラスコに播種する。コントロールとして、-150 で保存しておいた細胞も同様に解凍、播種する。

【各ドライシッパーの輸送前後の重量】

ドライシッパー 京都府立医科大学
ドライシッパー 東京大学

液体窒素充填後

ドライシッパー 7.74 kg
ドライシッパー 7.62 kg



返送後 (液体窒素充填終了から 3 日経過)

ドライシッパー 7.12 kg (-0.62 kg)
ドライシッパー 7.00 kg (-0.62 kg)

温度測定したところ、両方とも-193 以下だった。

【ヒト胎児腎細胞 HEK293T 生細胞率測定】

解凍した細胞を回収して遠心し、培地 1ml で懸濁してトリパンブルーを加え、血球計算板にて 4 ヶ所カウント。

サンプル	Control	京都府立医科大学	東京大学
生細胞数	96	81	77
死細胞数	1	3	2
生細胞率	99.0%	96.4%	97.5%

コントロールと比較して生細胞率に大差なし。

【293T 細胞形状(位相差)】

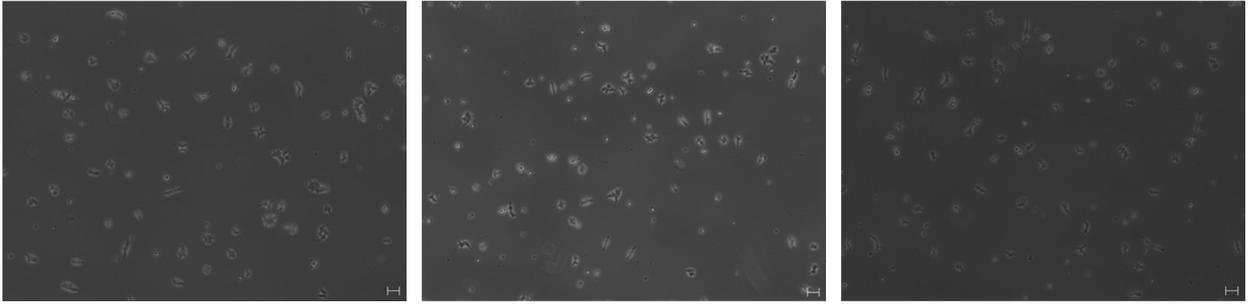
Day1

Control

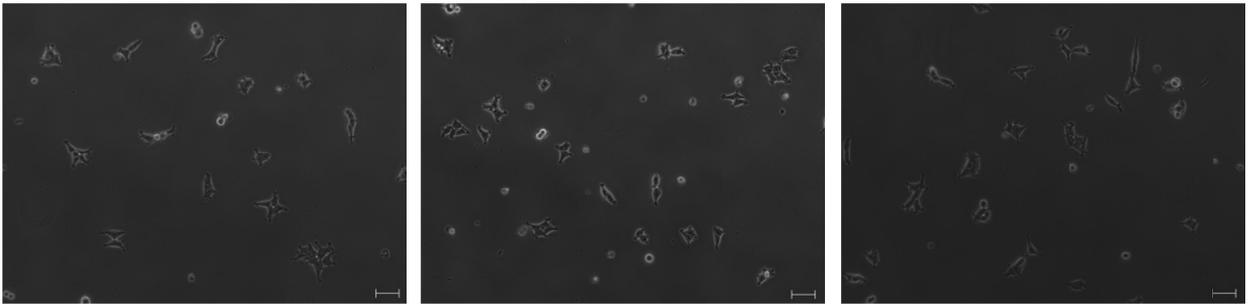
京都府立医科大学

東京大学

×5



×10



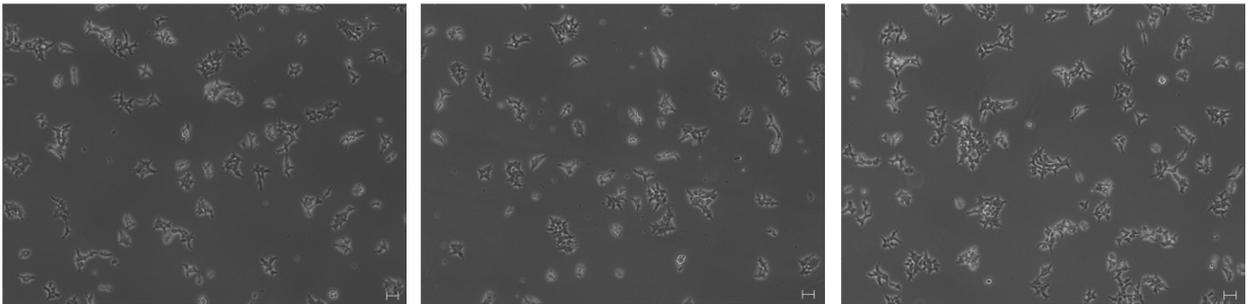
Day2

Control

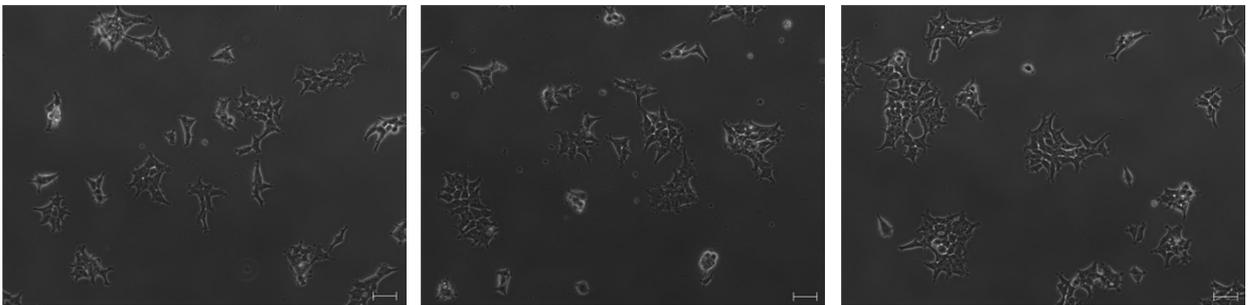
京都府立医科大学

東京大学

×5



×10



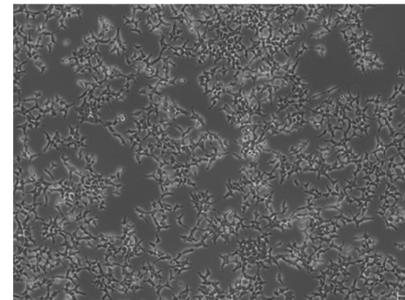
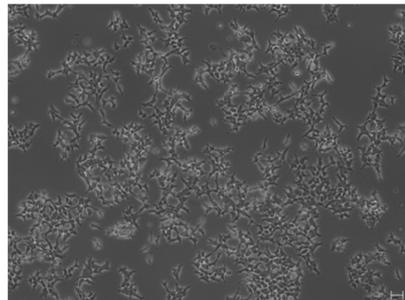
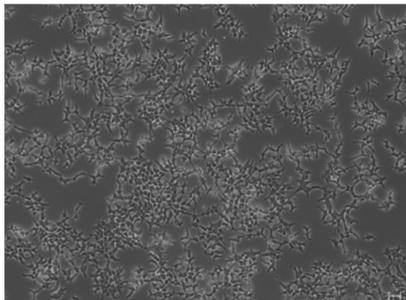
Day3

Control

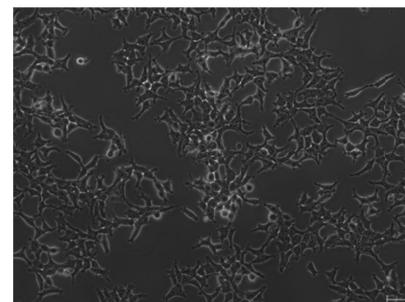
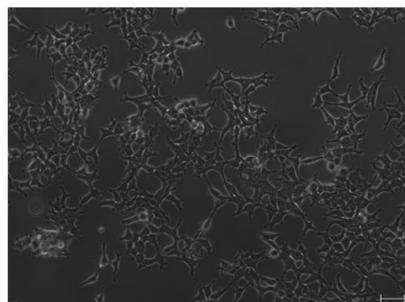
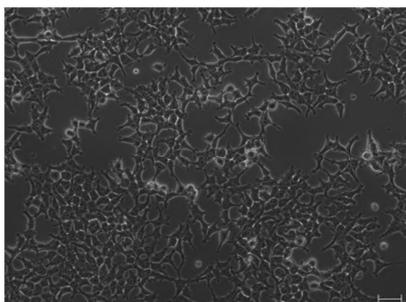
京都府立医科大学

東京大学

× 5



× 10



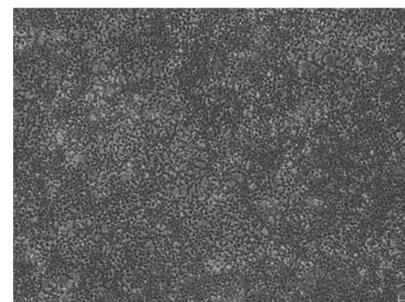
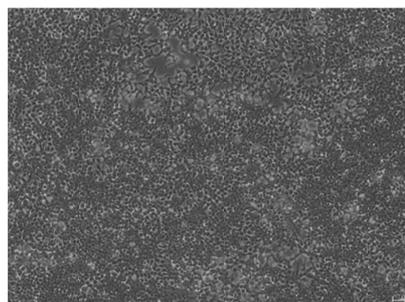
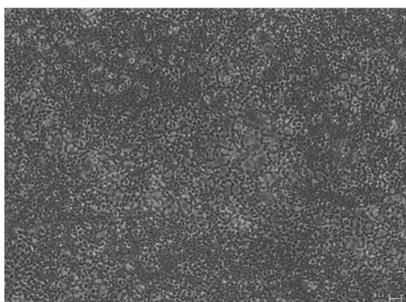
Day5

Control

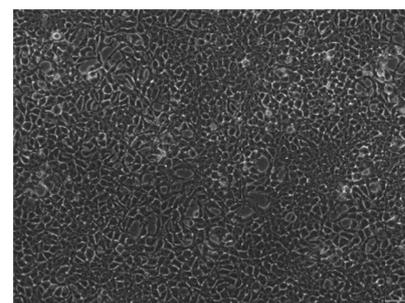
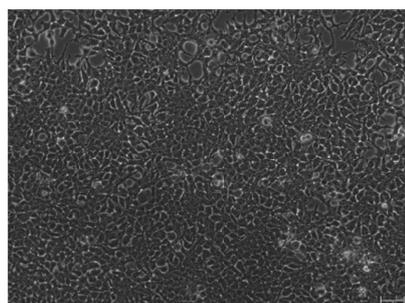
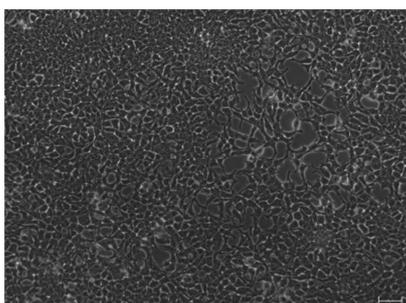
京都府立医科大学

東京大学

× 5



× 10



コントロールと比較して細胞形状に大差なし。

【作業記録シート】

京都府立医科大学

細胞運搬コールドラン作業記録シート

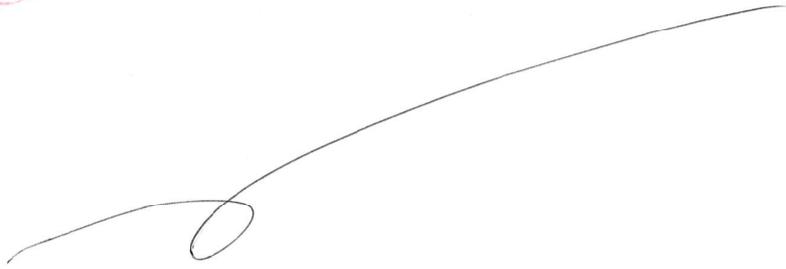
京都府立医科大学 医学部 生理学教室
 記録者名: 坂宮克彦

下記の各項目を順に確認の上、チェック&記入欄にチェック(✓)、もしくは記入をして下さい。すべて確認が終わりましたら、シートをハードケース内に同封して下さい。
 よろしくお願いたします。

	チェック内容	チェック&記入欄
1	ドライシッパー内部、外部に異常はありませんか？	シッパー外部、タグの片方 フックが 90° 回っています。
2	細胞サンプルに異常はありませんか？（溶けているなど）	✓
3	細胞をドライシッパーへ入れた時間	8/27, 13 : 25
4	ドライシッパーのフタはきちんと閉まっていますか？	✓
5	返送用の送り状の内容に間違いはありませんか？	✓

(その他、何かお気づきの点がありましたらご記入ください)

1: フックが 片方 回っていますが シッパーのフタは 閉まっています。
 到着時にこの状態でした。



細胞運搬クールドラ作業記録シート

記録者名: 藤原 誠一

下記の各項目を順に確認の上、チェック&記入欄にチェック(✓)、もしくは記入をして下さい。すべて確認が終わりましたら、シートをハードケース内に同封して下さい。

よろしくお願いいたします。

	チェック内容	チェック&記入欄
1	ドライシッパー内部、外部に異常はありませんか？	OK.
2	細胞サンプルに異常はありませんか？（溶けているなど）	OK.
3	細胞をドライシッパーへ入れた時間	10 : 55
4	ドライシッパーのフタはきちんと閉まっていますか？	OK
5	返送用の送り状の内容に間違いはありませんか？	OK.

(その他、何かお気づきの点がありましたらご記入ください)

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」

分担研究報告書

「体性幹細胞、iPS細胞等を用いる臨床研究支援技術開発」

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	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
研究協力者	宮川 繁	大阪大学 心臓血管外科学	特任准教授

【研究要旨】

iPS細胞由来心筋細胞シートの移植による再生治療は新たな治療法として期待されており、高純度の心筋細胞を得られる分化誘導法の研究が進んでいる。一方、心臓組織では心筋細胞の割合は半分以下とされていることから、心筋細胞シートの形態形成や機能において、心筋細胞純度を検討した結果、至適な iPS 細胞由来心筋細胞の細胞シートにおいて、電気生理学的機能、細胞シート構造、液性因子の産生に優れており、iPS 細胞由来心筋組織移植による再生治療においてより優れた再生効果をもつ可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々は、50例近い心臓移植と200例を超える補助人工心臓治療を経験する国内有数の重症心不全治療の拠点である。しかし、多数の重症心不全患者を目の前に置換型治療の限界と再生型治療の必要性を痛感し、自己骨格筋由来の筋芽細胞シートによる心筋再生治療法を開発することにより補助人工心臓離脱成功例を世界で初めて報告した。さらに20例以上の臨床例の経験から細胞シート移植技術を確立した。しかし筋芽細胞シートの機序はHGF等によるパラクリン効果で、残存心筋細胞が少ない症例に対して有効性は低い。重症心不全例に対しては心筋と電気的に結合し直接心機能を向上しうる心筋細胞の大量補充が根治的治療につながるとわれ、その細胞源としてiPS細胞が最も期待されているが、我々はすで

にヒト iPS 由来心筋細胞の高率分化誘導大量培養法を開発している。一方、Connexin43や収縮タンパク発現など心筋細胞源の能力を最大限に生かす細胞移植技術は重要であり、我々は不全心に対するヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートによる心機能向上のPOCを大動物実験で既に得ている。

iPS細胞由来心筋細胞の臨床応用を見据えた場合、心臓組織では心筋細胞の割合は半分以下とされており、心筋細胞シートの形態形成や機能において適切な心筋細胞純度が存在する事が推測される。そこで、in vitroにおいて、心筋細胞シートの最適な心筋細胞と非心筋細胞の比率を電気生理学的組織学的に検討した。

B. 研究方法

これまで確立した 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た。

(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

微小電極アレイ等により細胞外電位を測定したところ、低純度の細胞シートではシート全体が同期収縮することが確認でき、電位伝播速度は純度依存的に増加していた。一方、高純度の細胞シートの場合、細胞シートの形成が不安定であった。免疫染色、定量 PCR の結果より、高純度の細胞シートではコラーゲン、ラミニンなどの発現が低下しており、中程度の純度の細胞シートでは同発現が有意に高値であった。また、心室型ミオシン軽鎖や VEGF の発現が高い傾向にあった。

D. 考按

iPS 細胞由来心筋細胞シートにおいて、至適な心筋細胞純度が存在し、電気生理学的機能、細胞シート構造、液性因子の産生に優れていた。iPS 細胞由来心筋組織移植による再生治療においてより優れた再生効果をもつ可能性が示唆された。

E. 結論

臨床研究用細胞の培養プロセスにおいては、より単一の細胞を高純度に精製するこ

とが、より高い品質の安定につながる。一方で、心臓も含めて体内の臓器は複数種類の細胞群で構成されている。再生医療等製品においても、より生体内の状態に近い細胞集団を移植することが、高い生着率と高い治療効果をもたらす可能性がある。心筋細胞シート移植による至適細胞純度を明らかにすることで、より高い治療効果が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Functional and Electrical Integration of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Myocardial Infarction Rat Heart. Higuchi T, Miyagawa S, Pearson JT, Fukushima S, Saito A, Tsuchimochi H, Sonobe T, Fujii Y, Yagi N, Astolfo A, Shirai M, Sawa Y. Cell Transplant. 2015, in press

2. N-glycans: phenotypic homology and structural differences between myocardial cells and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, Yoshida A, Kashiya N, Kawamura A, Ito E, Saito A, Maeda A, Eguchi H, Toda K, Lee JK, Miyagawa S, Sawa Y. PLoS One. 2014 Oct 30;9(10):e1111064.

2. 学会発表

なし

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

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」

分担研究報告書

「iPS 細胞からの骨・軟骨系細胞への培養技術を最適化するための基盤整備」

研究分担者	吉川 秀樹	大阪大学 整形外科学教室	教授
研究協力者	名井 陽	大阪大学 整形外科学教室	准教授
研究協力者	宮本 諭	大阪大学 整形外科学教室	大学院生
研究協力者	浜口 智志	大阪大学 アミューズメントデザイン研究センター	教授

【研究要旨】

本研究では、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明らかになった。今後は現在までに行っている骨軟骨再生に関する動物実験、臨床研究と十分な連携を図りながら、新規誘導因子のスクリーニングを行い、より質の高い、臨床に根差した研究の実施を目指す。

本研究は、骨芽細胞系細胞の培養誘導に関わる種々の環境因子に配慮し、ヒト幹細胞を用いる前段階の技術開発を目的としている。

A. 研究目的

外傷や切除により生じた大きな骨欠損を補うためには、インプラントに代表される人工材料が多く用いられているが、生体組織に近い組成を有するハイブリット材料の開発が望まれる。このための細胞源として iPS 細胞は、間葉系幹細胞に並ぶ生体材料として期待されているが、多能性を有するが故に細胞系譜に沿った分化誘導が極めて難しいという問題点を残している。iPS 細胞による臨床応用を目指した培養誘導技術の開発は急務であるが、均一性と安全性を兼ね備えた高効率な誘導法を確立するまでには至っていない。とくに生体内で iPS 細胞が十分な骨形成能を示したという報告はされてない。本研究は、マウス iPS 細胞が

ら EB 形成を経ずに、中胚葉系細胞、間葉系前駆細胞、骨芽細胞系細胞へと高効率に誘導可能な技術開発を目的としている。また、本誘導技術をさらに発展させるため新規誘導因子を含めた分子の探索も同時に実施する。

B. 研究方法

1. 骨芽細胞系細胞培養誘導培地の最適化

無血清下でサイトカインと化合物を組み合わせたカクテル誘導培地の最適化を行った。時間経過に沿った段階的な添加方法の検証を行うために培養誘導は、誘導開始から day3 まで、day4 から day6 まで、day7 から day13 まで、day14 から day21 まで、day22 以降の 5 段階とし、フロー

サイトメトリーおよび遺伝子発現解析により最適化条件を検討した。

2. 低酸素培養と表面加工処理された培養皿の応用

骨芽細胞系細胞を作製するためのさらなる高率化を目指し、段階的な低酸素環境での培養誘導を行った。この際、表面加工処理された培養皿を併用し、最適化のための条件を検討した。

3. 培養皿の表面解析とプラズマ照射の表面改質への応用

培養皿は初期段階の検討用として加工処理された市販品を用いて、コーティング剤を併用した。培養皿の表面改質は、プラズマや熱 CVD などが施されていることが考えられるが、加工処理方法を特定することは難しい。現在、XPS および FT-IR 解析により市販品の表面解析を行い、これらのデータをもとに本学工学部で開発された N₂/H₂ プラズマ照射の表面改質への応用を試みている。

4. 低分子化合物と新規誘導因子のスクリーニング

今後の臨床応用を目指すためにサイトカインフリーの誘導培地の最適化も進めている。各種阻害剤を含めた候補化合物の絞り込みは、本培養誘導系を用いて、マイクロアレイ解析と RNA シーケンスを併用し、網羅的遺伝子解析を行い、有用な新規分子を検討中である。

5. 本培養誘導技術の有用性および安全性の確認

最適化された条件を検証するためにヌードマウスを用いて、動物実験を行い、骨形成能および腫瘍性試験により評価、検討中である。

(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

骨芽細胞系細胞の培養誘導には、数種類のサイトカインと化合物の混合カクテルが必要であり、day21 までに高効率な誘導が可能となる無血清培地を考案した。また、さらなる効率化と均一性を高めるためには、段階的な低酸素培養と培養皿の表面加工処理の併用が欠かせないことも明らかになった。

D. 考按

培養誘導技術の開発には、誘導培地の最適化だけでなく、中胚葉系細胞、間葉系前駆細胞を経て、骨芽細胞系細胞へ誘導することが可能となる段階的分化を遂げるために必要な環境因子を考慮に入れることが重要である。従来から広く用いられている既存の骨形成誘導培地に類似した手法ではなく、臨床応用を見据えた均一性と安全性を兼ね備えた誘導法の検討が必要である。単に種々の培養環境要因を組み合わせるだけでなく、新しい技術導入を視野に入れた解析および評価法による培養技術の開発に努めるべきと考える。

E. 結論

iPS 細胞から高効率に骨芽細胞系細胞を作製することが可能になった。これには段階的な増殖および分化を調節、修飾可能な

環境因子を考慮した培養誘導技術が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Morimoto T, Kaito T, Kashii M, Matsuo Y, Sugiura T, Iwasaki M, Yoshikawa H.: Effect of Intermittent Administration of Teriparatide (Parathyroid Hormone 1-34) on BoneMorphogenetic Protein-Induced Bone Formation in a Rat Model of Spinal Fusion., J Bone Joint Surg Am. 2;96(13), 2014.
2. Kaneshiro, S., Ebina, K., Shi, K., Higuchi, C., Hirao, M., Okamoto, M., Koizumi, K., Morimoto, T., Yoshikawa, H., Hashimoto, J.: IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 32:378-392, 2014.
3. Minegishi, Y., Sakai, Y., Yahara, Y., Akiyama, H., Yoshikawa, H., Hosokawa, K., Tsumaki, N.: Cyp26b1 within the growth plate regulates bone growth in juvenile mice. Biochem Biophys Res Commun, 454:12-18, 2014.
4. Sugiura T, Kashii M, Matsuo Y, Morimoto T, Honda H, Kaito T, Iwasaki M, Yoshikawa H.: Intermittent administration of teriparatide

enhances graft bone healing and accelerates spinal fusion in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis., Spine J. 15(2):298-306, 2015.

2. 学会発表

1. Dai Itsuki, Satoshi Sugimoto, Satoshi Miyamoto, Akira Myoui, Hideki Yoshikawa, Satoshi Hamaguchi: Plasma Surface Modification of Cell Culture Plates, 2nd international symposium on non-equilibrium plasma and complex-system sciences (IS-NPCS), (October 2014, Germanay)
2. 齊宮大,杉本敏司,宮本諭, 名井陽, 吉川秀樹, 浜口 智志: 細胞培養プレートのパラズマ表面処理, 第75回応用物理学会秋季学術講演会(2014年9月, 札幌)
3. Dai Itsuki, Tomoko Ito, Satoshi Sugimoto, Yu Moriguchi, Satoshi Miyamoto, Akira Myoui, Hideki Yoshikawa, Satoshi Hamaguchi: Modification of hydroxyapatite and polystyrene surface for cell culture by low-pressure plasmas, 5th International Conference on Plasma Medicine (ICPM5)(May 2014, Nara, Japan)

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

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」

分担研究報告書

「幹細胞のストック実施と管理」

研究分担者	森 正樹	大阪大学 消化器外科学	教授
研究協力者	石井 秀始	大阪大学 癌創薬プロファイリング学	特任教授
研究協力者	今野 雅允	大阪大学 消化器癌先進化学療法開発寄附講座	助教

【研究要旨】

ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に準拠した形で、確実な保管、情報管理を達成するための基盤技術の開発として、iPS/ES細胞の品質保全に関わる学術的情報を整備する。具体的に高品質のiPS/ES細胞の生殖細胞系列への寄与に関わる高度に保存されたゲノム領域を指標としてエピゲノム制御に基づく転写ネットワークを網羅的に解明し、その下流としてのメカニズムを明らかにした。その機構にはiPS/ES細胞の代謝制御に関わる一連の分子制御が解明され、嫌気性解凍系と酸化的リン酸化の分子メカニズムを明らかにした。ミトコンドリアの質を指標としてiPS/ES細胞の品質を評価するための基盤を構築した。これらの成果は、高品質のiPS/ES細胞の維持と管理に於いて重要な基盤を構築することが出来た。

A. 研究目的

高品質のiPS/ES細胞の構築と管理を目指して研究を進めることは、将来の再生医療の実現に向けて極めて重要である。一方、私達は、特定のゲノム領域に高度されているマイクロRNAがiPS/ES細胞の品質を規定する上で重要である知見を得た。そこで本事業では、マウス及び人の重要なゲノム領域に注目し、ゲノム科学的に普遍性の高い情報に基づく高品質のiPS細胞の管理を目的として、分子論的な究明を実施した。近未来の再生医療分野における医学応用を目指して、基盤を構築するのが目的であり意義である。

B. 研究方法

1. マウスゲノムの解析

私達の従来の研究と合わせて比較的品質の高いiPS/ES細胞のゲノムにおいて保存されている領域の網羅的な解析を進めた。重要ゲノム領域からマイクロRNAを抽出した。前年度に引き続き、比較ゲノム学的手法により、マウスのiPS/ES細胞の生殖細胞系列への寄与に関わる高度に保存されたゲノム領域の抽出と、ヒトの相同領域の抽出を実施し、DNAの一次配列、単塩基置換、発現ユニット情報を統合した。

2. 機能解析

iPS/ES細胞の試験管内での分化誘導の条件下において上記のマイクロRNAを研究し、下流の分子を探索した。マイクロRNA導入

試験による下流分子の探索を発現アレイ解析およびプロテオミクス解析で実施した。得られた結果は、分子細胞生物学的な手法で確認し検討した。

(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. マウスゲノムの解析

マウスと人のゲノム比較によって特定のマイクロ RNA を分子論的に究明した。

2. 機能解析

マイクロ RNA の顆粒の解析の結果、従来知られていなかった新しいパスウェイを明らかにすることができた。それらは既存の遺伝子のスイッチオン・オフに関わる機構であり細胞の代謝制御を通じて iPS/ES 細胞の質の維持に大きく関わることが明らかとなった。特に、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。この技術は iPS/ES 細胞の効率の良い誘導と初期の発生分化誘導の制御にも重要であることが明らかとなった。前年度に引き続いた研究により、胎生期のみで発現するインプリント領域に位置する特定のマイクロ RNA は、その成熟・プロセッシングの過程で Ago に加えて特徴ある蛋白質複合体を形成し、翻訳調節の制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

D. 考按

我々の研究によりゲノムのクロマチン状況から代謝制御にまで至る新しい分子メカニズムとしてマイクロ RNA を軸とした機構を明らかにすることができた。マイクロ RNA は探査の核酸であり人工合成可能であることから創薬展開が大きく期待される。

前年度に引き続いた事業展開により、本研究で明らかにした制御系は人工合成されたマイクロ RNA 分子により細胞生物学および医療に於ける介入(検査、診断、および治療の展望)が可能であることから、近未来の医療として重要なシーズ情報を内包すると期待される。現在、特許整備中である。

E. 結論

幹細胞のストック実施と管理に於いて、開発中の上記の新技术の開発事業を展開し、単細胞ならびに iPS 等の高品質を担保した保存と維持を実現するために基本となる基盤を構築した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koseki, J., Colvin, S. H., Fukusumi, T., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Tsunekuni, K., Matsui, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Mathematical analysis predicts imbalanced IDH1/2 expression associates with 2-HG-inactivating α -ketoacid decarboxylation pathway in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* 46(3):1181-1191. 2015.

2. Hamabe, A., Konno, M., Tanuma, N., Shima, H., Tsunekuni, K., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Mimori, K., Gotho, N., Yamamoto, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* , 111(43):15526-15531, 2014.
3. Yoshioka, Y., Kosaka, N., Konishi, Y., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., Nonaka, R., Yamamoto, H., Ishii, H., Mori, M., Furuta, K., Nakajima, T., Hayashi, H., Sugisaki, H., Higashimoto, H., Kato, T., Takeshita, F., Ochiya, T. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat. Commun.*, 7;5:3591, 2014.
4. Koga, C., Kobayashi, S., Nagano, H., Tomimaru, Y., Hama, N., Wada, H., Kawamoto, K., Eguchi, H., Konno, M., Ishii, H., Umeshita, K., Doki, Y., Mori, M. Reprogramming Using microRNA-302 Improves Drug Sensitivity in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Ann. Surg. Oncol.*, Suppl 4:S591-600, 2014.
5. Fukusumi, T., Ishii, H., Konno, M., Yasui, T., Nakahara, S., Takenaka, Y., Yamamoto, Y., Nishikawa, S., Kano, Y., Ogawa, H., Hasegawa, S., Hamabe, A., Haraguchi, N., Doki, Y., Mori, M., Inohara, H. CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, 111(3):506-514, 2014.
6. Okano, M., Konno, M., Kano, Y., Kim, H., Kawamoto, K., Ohkuma, M., Haraguchi, N., Yokobori, T., Mimori, K., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Human colorectal CD24+ cancer stem cells are susceptible to epithelial-mesenchymal transition. *Int. J. Oncol.*, 45(2):575-580, 2014.
7. Wada, N., Kurokawa, Y., Nishida, T., Takahashi, T., Toyokawa, T., Kusanagi, H., Hirota, S., Tsujinaka, T., Mori, M., Doki, Y. Subgroups of patients with very large gastrointestinal stromal tumors with distinct prognoses: a multicenter study. *J. Surg. Oncol.*, 109(2):67-70. 2014.
8. Hamabe, A., Hirofumi, Y., Konno, M., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Nishida, N., Kawamoto, K., Koseki, J., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Combined evaluation of hexokinase 2 and phosphorylated pyruvate dehydrogenase-E1 in invasive front lesions of colorectal tumors predicts cancer metabolism and patient prognosis. *Cancer Sci.*, 105(9):1100-1108, 2014.
9. Hasegawa, S., Eguchi, H., Nagano, H., Konno, M., Tomimaru, Y., Wada, H., Hama, N., Kawamoto, K., Kobayashi, S., Nishida, N., Koseki, J., Nishimura, T., Gotoh, N., Ohno, S., Yabuta, N., Nojima, H., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. MicroRNA-1246 expression associated with CCNG2-mediated chemoresistance

and stemness in pancreatic cancer. *B. r J. Cancer*, 111(8):1572-1580, 2014.

10. Hayashi, K., Tamari, K., Ishii, H., Konno, M., Nishida, N., Kawamoto, K., Koseki, J., Fukusumi, T., Kano, Y., Nishikawa, S., Miyo, M., Noguchi, K., Ogawa, H., Hamabe, A., Seo, Y., Doki, Y., Mori, M., Ogawa, K. Visualization and characterization of cancer stem-like cells in cervical cancer. *Int. J. Oncol.*, 45(6):2468-2474, 2014.

11. Tamari, K., Hayashi, K., Ishii, H., Kano, Y., Konno, M., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Fukusumi, T., Hasegawa, S., Ogawa, H., Hamabe, A., Miyo, M., Noguchi, K., Seo, Y., Doki, Y., Mori, M., Ogawa, K. Identification of chemoradiation-resistant osteosarcoma stem cells using an imaging system for proteasome activity. *Int. J. Oncol.*, 45(6):2349-2354, 2014.

12. Kawamoto, K., Yabe, S., Konno, M., Ishii, H., Nishida, N., Koseki, J., Fukuda, S., Tomimaru, Y., Hama, N., Wada, H., Kobayashi, S., Eguchi, H., Tanemura, M., Ito, T., Lee, EY., Mukai, E., Miki, T., Doki, Y., Mori, M., Hamazaki, TS., Nagano, H., Okochi, H. NeuroD1 with conditioned medium efficiently induce ASC to insulin-producing cells both in vitro and in vivo. *J. Stem Cell Res. Ther.*, 2014. (in press)

13. Ogawa, H., Nagano, H., Konno, M., Eguchi, H., Koseki, J., Kawamoto, K., Nishida, N., Colvin, S. H., Tomokuni,

A., Tomimaru, Y., Hama, N., Wada, H., Marubashi, S., Kobayashi, S., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. The combination of the expression of hexokinase 2 and pyruvate kinase M2 is a prognostic marker in patients with pancreatic cancer. *Mol. Clin. Oncol.* 2014. (in press)

14. Miyazaki, S., Yamamoto, H., Miyoshi, N., Wu, Xin., Ogawa, H., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Konno, M., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. A Cancer Reprogramming Method Using MicroRNAs as a Novel Therapeutic Approach against Colon Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2014. (in press)

2. 学会発表

1. 森正樹：肝胆膵領域癌におけるマイクロRNA研究の意義、第26回日本肝胆膵外科学会学術集会、2014年6月11日～6月13日、和歌山

2. 森正樹：骨転移の病態と最新治療、第23回日本がん転移学会学術集会・総会、2014年7月10日～7月11日、石川

3. 森正樹：癌幹細胞研究の現状と展望、第52回日本癌治療学会学術集会、2014年8月28日～8月30日、神奈川

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

【発明の名称】多能性幹細胞の品質診断方法及び診断キット、抗がん剤並びに疾患モデル動物

【発明者】石井秀始、森正樹、土岐祐一

郎、今野雅允、川本弘一、西田尚弘、
小関準、新井貴博、佐藤暢彦、近藤礎、
中村眞

【出願人】ユニーク株式会社、株式
会社エバンス、国立大学法人大阪大学

【出願番号】特願 2014-266696

【出願日】平成 26 年(2014 年)12 月 26
日

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

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」

分担研究報告書

「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」

研究分担者 大園 恵一 大阪大学 小児科学教室 教授
研究協力者 北畠 康司 大阪大学 小児科学教室 助教

【研究要旨】

ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）技術の発明により、ヒト難病の病態解析と再生医療への期待はますます高くなりつつある。しかしながらそのリソースとして多くもちいられる皮膚線維芽細胞では皮膚生検が必須であり、その侵襲ストレスは小児では大きな問題となる。また血液の採取については、とくに新生児の場合は容易に貧血を来すため、その適応について慎重な検討が必要となる。したがって新生児・小児において「安全かつ非侵襲的な採取」を可能にする組織・細胞をリソースとした iPS 細胞の樹立法を確立することは、今後 iPS 細胞の安定供給と臨床利用の基盤整備に大きく資するものと思われる。

一方、臍帯血や臍帯・胎盤などは、胎児とおなじゲノム構造を持つ一方で、分娩後は廃棄される組織である。羊膜組織は眼科領域に於ける再生医療で活用され、また臍帯血幹細胞による移植療法も広く行われており、その有用性および安全性が確立している。これら胎児組織をもちいたヒト iPS 細胞の樹立・保管・分化技術を確立することができれば、児へ侵襲を加えることなくリソースを得ることができ、また疾患患者・健常児の検体を豊富に集めることができるであろう。そこで本研究では、これらの胎児組織のうち臍帯血に注目し、胎児組織由来ヒト iPS 細胞を安全に樹立・保管・分化させることのできる系の構築を目指す。これにより iPS 細胞を安定的に供給することが可能となり、小児のみならず成人を対象としたより広い臨床応用が可能になると期待され、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。

A. 研究目的

ヒト人工多能性幹細胞（以下、iPS 細胞）技術の発明は、本格的な再生医療の発達への期待を飛躍的に大きくした。ゲノムを傷つけることなく初期化を引き起こすエピゾーマルベクターならびにセンダイウイルスベクターの開発、血液細胞や神経細胞、心筋細胞などの各細胞系列への分化誘導方法

の確立などによってさらに臨床応用への道が開かれ、昨年はいよいよ加齢黄斑変性症患者に対する自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮シートの移植が世界ではじめて行われた。これからますます臨床応用症例が増えていくと考えられるとともに、そのリソースとしてもちいられる生体の組織・細胞の安定かつ安全な採取が大きな問題となってくる。

とくに小児科領域においては、採血手技や皮膚生検などの処置は大きな侵襲とストレスを加えるため無視できない問題となる。

臍帯血や臍帯・胎盤などは、胎児とおなじゲノム構造を持つ一方で、分娩後は廃棄される組織であり、児に侵襲を加えることなく採取が可能である。そこで我々はこれら胎児組織をもちいたヒト iPS 細胞の樹立・保管・分化技術の確立を目指している。すでに昨年度の研究において、臍帯血検体から効率よくヒト iPS 細胞を作製することができ、分化能・増殖能を保持したまま安定的に保存可能であることを確認した。今年度はさらにこれら臍帯血由来 iPS 細胞が分化誘導能をもっているかどうかについて確認するため、まず造血細胞系列への分化誘導を行い、その確認を行った。

B. 研究方法

樹立されたヒト iPS 細胞は7日ごとに継代を行った。低吸着ディッシュをもちいて作製した胚様体 (Embryoid Body; EB) を血清不含培地 (BPEL) (Ng et al., 2008) ならびにサイトカインをもちいて分化誘導をおこなった (Grigoriadis et al., 2010)。サイトカインとしては BMP4、IL6、VEGF、IL11、SCF、IL3、TPO、EPO をもちいた。分化誘導した細胞については、フローサイトメトリーならびにメチルセルロースアッセイによって評価をおこなった。

(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

大阪大学医学部附属病院・総合周産期母子医療センターにて採取された5名からの臍帯血をもとに持続発現型センダイウイルスベクター SeV-KOSM-302L をもちいてヒト iPS 細胞を樹立した。これらの未分化性および多分化能を確認した後、血液分化誘導を行った。

分化誘導開始から12日目の胚様体 (EB) についてグロビン発現を見たところ、明らかに γ -type のグロビンが他の α 、 β に比較して有意に発現しており、この血球分化誘導が胎児型2次造血を再現していることを確認できた。またフローサイトメトリーにより、KDR 陽性・CD31 陽性の造血前駆細胞ならびに CD235 陽性赤芽球系細胞、CD33 陽性骨髄球系細胞の出現が見られ、さらにメチルセルロースアッセイにより CFU-G/GM/M、E、GEMM の各コロニーの形成も確認することができた。

D. 考按

臍帯・臍帯血・胎盤・羊膜などの胎盤組織は、分娩後は廃棄される組織である。これらを利用することで痛みによる侵襲ストレスを回避することが可能となる。今回の研究により臍帯血から樹立されたヒト iPS 細胞が正常な血球系への分化誘導能を保持していることを確認することができた。今後さらにゲノム編集を行いその特性を詳細に解析することにより、再生医療・病態解析のリソースとしての可能性を調べる予定である。

E. 結論

我々が構築した臍帯血からのヒト iPS 細

胞樹立法により、侵襲ストレスを考慮する必要のある小児においても効率よく iPS 細胞作製が可能であり、かつ造血分化誘導が可能であることを確認することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeyari S, Yamamoto T, Kinoshita Y, Fukumoto S, Glorieux FH, Michigami T, Hasegawa K, Kitaoka T, Kubota T, Imanishi Y, Shimotsuji T, Ozono K.

Hypophosphatemic osteomalacia and bone sclerosis caused by a novel homozygous mutation of the FAM20C gene in an elderly man with a mild variant of Raine syndrome. *Bone*, 67C:56-62, 2014 Jun 27

2. Kubota T, Kitaoka T, Miura K, Fujiwara M, Ohata Y, Miyoshi Y, Yamamoto K, Takeyari S, Yamamoto T, Namba N, Ozono K. Serum fibroblast growth factor 23 is a useful marker to distinguish vitamin D-deficient rickets from hypophosphatemic rickets. *Horm Res Paediatr*, 81(4):251-7, 2014

3. Kitaoka T, Miyoshi Y, Namba N, Miura K, Kubota T, Ohata Y, Fujiwara M, Takagi M, Hasegawa T, Jüppner H, Ozono K. Two Japanese familial cases of Caffey disease with and without the common COL1A1 mutation and normal bone density, and review of the literature. *Eur J Pediatr*, 173(6):799-804, 2014 Jun

4. 大園 恵一 軟骨無形成症 小児科診療, 77 増刊号: 613-615, 2014.

2. 学会発表

1. 北畠 康司、坂野 公彦、平田 克弥、大森 早也佳、荒堀 仁美、松浪 桂、谷口 英俊、和田 和子、大園 恵一: ダウン症候群における病態発症メカニズムの解明、第 117 回日本小児科学会学術集会(2014年4月11日、名古屋)

2. 北畠 康司、坂野 公彦、大森 早也佳、平田 克弥、那波 伸敏、和田 和子、荒堀 仁美、谷口 英俊、大園 恵一: 疾患特異的ヒト iPS 細胞をもちいたダウン症候群の病態解析、第 37 回日本小児遺伝学会学術集会(2014年4月10日、名古屋)

3. 北畠 康司、坂野 公彦、大森 早也佳、平田 克弥、荒堀 仁美、松浪 桂、谷口 英俊、和田 和子、橋井 佳子、大高 真奈美、中西 真人、佐久間 哲史、山本 卓、大園 恵一: Analysis of transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome using gene editing technologies、第 76 回日本血液学会学術集会(2014年10月31日、大阪)

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

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」

分担研究報告書

「移植治療後の慢性期完全脊髄損傷患者のリハビリテーションと脳機能再構成
および脊髄再生との関連性についての評価法の開発」

研究分担者	吉峰 俊樹	大阪大学 脳神経外科講座	教授
研究協力者	岩月 幸一	大阪大学 脳神経外科講座	講師
	大西 諭一郎	大阪大学 脳神経外科講座	助教
	渡邊 嘉之	大阪大学 放射線統合医学講座	講師
	田島 文博	和歌山県立医科大学 リハビリテーション科	教授
	中村 健	和歌山県立医科大学 リハビリテーション科	講師

【研究要旨】

脊髄損傷に対する有効な神経再生療法は未だなく、完全脊髄損傷患者においては残存機能の強化リハビリテーションが唯一の治療法である。当グループは損傷後半年以上経過した慢性期完全脊髄損傷患者に対して自家嗅粘膜移植を行い、一定の機能回復を見ているが、慢性期では下肢筋肉の委縮による神経栄養因子の枯渇から脊髄前角細胞の変性・下位運動神経の不全が起こり、脊髄(上位)神経軸索再生のみでは十分な機能回復は得られないことが示唆される。また効果的なリハビリテーションプログラム開発には、脊髄の組織的再生や脳の神経活動の機能的回復を継時的に評価する必要がある。

本申請では慢性期完全脊損患者に術前・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、より効率的な下肢機能回復を目指すことを目的とする。

A. 研究目的

申請者らはこれまでに慢性期完全脊損患者を対象に嗅粘膜移植を実施し、4例のうち2例で随意的筋電図の発生を認めている。本申請は、移植によって再生した脊髄運動神経の機能を、より効果的に下肢運動機能に反映させるために、術前・術後に強力なリハビリテーションを行い、且つ神経の組織的・機能的再構築を脳 fMRI および脊髄 DTI で評価する系を開発することを目的とする。

慢性期では下肢筋肉の委縮により神経栄養因子が枯渇し、下位運動神経の変性が起こるため、上位神経が再生しても筋収縮しない可能性がある。本申請では移植前リハビリテーションを行い、下肢筋肉の収縮力・筋重量を増加させ、下位運動神経の保持を図る。

これまで DTI では、動物モデルで残存軸策と下肢運動機能の関連が報告されている (Kim et al. Exp Neurol, 2011 in press) が、ヒトでは報告がない。本研究で、移植

手術前後およびリハビリテーション継続中の軸索束の変化をモニターすることにより、脊髄の組織学的再生が三次元的に評価できる。一方、fMRI では健常者と慢性期脊損患者で脳活動パターンの相違が報告されている (Brain, 128, 2941, 2005 Steven C.Cramer et.al) が、下肢運動機能回復による変化は未解明である。本研究では脳の活動パターンと移植後の随意的筋電図・下肢運動機能との関連を明らかにし、機能回復の客観的指標とする。効果的リハビリテーションにフィードバックさせるために、上記画像データの蓄積および解析が必要である。

移植手術後は、正常とは異なるパターンの神経再生から不随意的筋反応が起こる可能性があるため、術後リハビリではバイオフィードバックにより随意筋放電を誘発させる (Clin Rehabil.1998 Feb;12(1):11-22 Bradley L et.al)。長下肢装具の一つとして、導出筋電位をトリガーとしてロボットスーツ HAL を駆動させる歩行訓練も試みる。

慢性期の完全脊髄損傷を対象として大脳皮質から下肢筋肉までをターゲットとした包括的なリハビリテーション・移植医療・イメージングによる評価系は、これまでになかったものであり、より効率的な下肢機能の再建と患者の早期社会復帰が期待される。

B. 研究方法

本研究では機能保存的リハビリテーション・脊髄神経再生・脳神経機能の変化の観点から、下記6つの工程を設ける。

術前に廃用下肢筋のリハビリテーションにより、筋肉由来神経栄養因子の産生と

下位運動神経の維持を図る。自家嗅粘膜移植による脊髄神経軸索の再生。術後のバイオフィードバックを用いた随意的筋放電の誘発。長下肢装具装着による積極的歩行訓練。さらに、これら機能回復のプロセスの客観的指標として、下肢運動指標に加え、新たに DTI(Diffusion Tensor Imaging)で損傷脊髄移植部位の組織的再生を可視化する。脳 fMRI で脳神経活動の再構築を解明する。

(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

2013 年末までに 8 例施行。これら 8 例において有害事象の発生を認めていない。5 例で随意性の筋電図の発現を認めている。うち 2 例で下肢筋において、Motor Evoked Potential (MEP) の発現を認め、電気生理学的に脊髄神経軸索の再構築を証明し得た。慢性期完全脊髄損傷に対する脊髄再生医療において、電気生理学的に脊髄神経軸索の再構築を証明し得たのは国際的にも初めてのことであり、自家嗅粘膜移植の有効性を示し得た。

D. 考按

リハビリテーションを担当している和歌山県立医科大学において、廃用下肢筋のリハビリテーションと筋肉由来神経栄養因子の産生に関するデータが蓄積されてきており、近々報告される予定である。

自家嗅粘膜移植による脊髄神経軸索の再生については、随意性筋電図の発現また MEP の検出に成功しており、またリハビリテーションにおいて、バイオフィードバックを用いた随意的筋放電の誘発に成功している。DTI(Diffusion Tensor Imaging)で損傷脊髄移植部位の組織的再生を可視化は、順次データを蓄積している。また脳 fMRI で脳神経活動の再構築についてもデータを蓄積しているが、統計処理に耐えうる症例数に達していない。完全脊髄損傷慢性期に対する有効な治療法はこれまでに報告されておらず、本法により随意性筋電図、また MEP を検出し得たことは、学術的に大きな壁を破ったと言える。これに伴い、中枢神経系の可塑性、またこれを引き出す有意義なりハビリテーションについての知見が蓄積されつつある。

E. 結論

本法の成功事例を通して、中枢神経系における回復への契機の創出、有効なりハビリテーションへの新しい知見が出されて、脊髄損傷のみならず、脳梗塞等の脳血管障害や脳外傷後の治療にその知見が応用され、患者の ADL の回復に寄与しうるものと考えられる。これによりこれら中枢神経疾患による後遺症が軽減され、要介護人口の減少に寄与することが見込まれる。

この分野における医学研究費は、そのほとんどが幹細胞を中心とした細胞療法に注がれる傾向があるが、慢性期に細胞療法は奏功せず、かつまた患者のほとんどは既に慢性期である。慢性期における治療法の開発は困難と考えられてきたが、本法はそこにひとつの可能性を見いだしたものである。

これによって中枢神経疾患後遺症のリハビリテーションにも新たな展開をもたらしており、学術的行政的意義ともに大きいと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koichi Iwatsuki, Toshiki Yoshimine et al. Cybernetics: Fusion of human, machine and information systems Chapter 6 Regenerative Medicine for Spinal Cord Injury Using Olfactory Mucosa Autografts Cybernetics, Springer Verlag 2014 2/28

2. Koichi Iwatsuki, Toshiki Yoshimine, Yoshiyuki Sankai, Fumihiro Tajima, Masao Umegaki, Yu-Ichiro Ohnishi, Masahiro Ishihara, Koshi Ninomiya, Takashi Moriwaki

Involuntary muscle spasm expressed as motor evoked potential after olfactory mucosa autograft in patients with chronic spinal cord injury and complete paraplegia

J. Biomedical Science and Engineering, 2013, 6, p908-916

3. 岩月幸一：自家嗅粘膜移植による脊髄再生医療．日整会誌(J.Jpn. Orthop. Assoc.) 86:897-902, 2012

4. 岩月幸一；自家嗅粘膜移植による脊髄再生医療 脳神経外科ジャーナル vol.22 No.6 June 2013 p452-458

5. 岩月幸一、吉峰俊樹、大西諭一郎、二

宮貢士、森脇 崇；嗅粘膜移植による脊髄再生医療 Anesthesia 21 century, vol 15, No.3-47, 2013

2. 学会発表

1. 第 72 回日本脳神経外科学会総会
横浜 2013 年 10 月 16 日～19 日
脊髄損傷慢性期に対する自家嗅粘膜移植術

大阪大学脳神経外科 岩月幸一、吉峰俊樹、大西諭一郎、二宮貢士、森脇 崇

2. 第 48 回日本脊髄障害医学会 2013 年 11 月 14-15 日 アクロス福岡

慢性期完全脊髄損傷に対する嗅粘膜移植法大阪大学脳神経外科 岩月幸一、吉峰俊樹、大西諭一郎、二宮貢士、森脇 崇

3. 第 13 回日本再生医療学会総会 2014 年 3/4-6 京都国際会議場

慢性期脊髄損傷に対する自家嗅粘膜移植

大阪大学脳神経外科 岩月幸一、吉峰俊樹、大西諭一郎、二宮貢士、森脇 崇

4. 第 49 回日本脊髄障害医学会 2014 年 9/11-12 旭川

慢性期完全脊髄損傷に対する嗅粘膜移植法：経過報告

大阪大学脳神経外科 岩月幸一、大西諭一郎、二宮貢士、大川都史香

5. 第 73 回日本脳神経外科学会学術総会 2014/10/9-11 品川

学術委員会企画 再生医療と細胞医療

慢性期完全脊髄損傷に対する嗅粘膜移植法

大阪大学脳神経外科 岩月幸一、吉峰俊樹、大西諭一郎、二宮貢士、大川都

史香

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

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」

分担研究報告書

「間葉系幹細胞移植医療の基盤整備」

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
研究協力者	菊池 康	大阪大学 再生誘導医学寄附講座	助教
研究協力者	片山 一朗	大阪大学 皮膚科学教室	教授
研究協力者	金倉 讓	大阪大学 血液・腫瘍内科学教室	教授

【研究要旨】

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。生直後より右足背から足関節部に生じ、以後25年間閉鎖したことの無い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か月後には潰瘍面上の上皮化が観察された。

A. 研究目的

栄養障害型表皮水疱症に対する骨髄由来間葉系幹細胞移植治療を確立する。

B. 研究方法

25歳男性の重症栄養障害型表皮水疱症患者に生直後から一度も閉鎖することなく続いている右足背から足関節部に及ぶ難治性皮膚潰瘍に対して、母親腸骨より採取した20ml 骨髄血を培養して得た骨髄間葉系幹細胞を、2cm間隔で1箇所あたり50万個/250ml 生理食塩水で皮下移植し、以後経時的に潰瘍縮小効果を評価した。

（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

母親の腸骨骨髄血20mlより培養した間葉系幹細胞は、2継代、30日間の培養で約1500万個の間葉系幹細胞を得ることが出来た。移植可能な細胞規格である生存率70%以上、CD105陽性CD34陰性細胞50%以上を満たしたため、生直後から25年間閉鎖していない、右足背から右足関節前面に生じた難治性潰瘍周囲の皮下に2cm間隔で1箇所あたり50万個の間葉系幹細胞を移植した。その結果、それまで閉鎖したことの無い難治性皮膚潰瘍が移植4か月後にはほぼ上皮化を示した。

D. 考按

今回の臨床研究においては、HLA マッチを考慮せず、免疫抑制剤も使用せずに母親由来骨髄間葉系幹細胞を表皮水疱症患者の難治性潰瘍周囲皮下に移植したため、経過と共に移植細胞は拒絶され、移植治療効果

の持続時間は比較的短いと予想していた。しかし、移植後4か月目頃より著明な潰瘍縮小効果が出現し、4か月目の終わりにはほぼ上皮化が完了したことから、他家骨髄間葉系幹細胞移植の治療効果は少なくとも数か月持続することが確認された。しかし、5か月目以降には再び水疱が生じ、以後潰瘍の拡大・縮小を繰り返している。間葉系幹細胞移植前には潰瘍のサイズに著明な変動はなかったことから、潰瘍縮小効果は間葉系幹細胞移植の効果であることはほぼ疑いない。

間葉系幹細胞は損傷部位で増殖しながらTSG-6 (TNF- α gene/protein 6) などの抗炎症分子を放出して局所の炎症反応を抑制的に制御するため、拒絶反応が生じにくいと考えられている。しかし、移植5か月目には水疱形成が再燃していることから、免疫寛容は誘導されていないと思われる。より長期の治療効果を得るためにはmyeloid-abrasion後のドナー由来骨髄細胞移植と併用する、免疫抑制剤を併用するなどの拒絶反応回避法開発が必要である。

E. 結論

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は有効性が確された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iinuma S, Aikawa E, Tamai K, Fujita

R, Kikuchi Y, Chino T, Kikuta J, McGrath J, Ishii M, Iizuka H, Kaneda Y. Transplanted bone marrow-derived circulating PDGFR α + cells restore type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse skin graft. *J Immunol*, 2015 Feb 15;194(4): 1996-2003. doi: 10.4049/jimmunol.1400914. Epub 2015 Jan 19.

2. Fujita R, Tamai K, Aikawa E, Nimura K, Ishino S, Kikuchi Y, Kaneda Y. Stem Cells Endogenous Mesenchymal Stromal Cells in Bone Marrow Are Required to Preserve Muscle Function in mdx Mice. *J Immunol*, 2014; 194(3): 962-975, 2014

3. Moritsugu R, Tamai K, Nakano H, Aizu T, Nakajima K, Yamazaki T, Sawamura D. Functional analysis of the nuclear localization signal of the POU transcription factor Skn-1a in epidermal keratinocytes. *Int J Mol Med*. 2014, 34(2): 539-44.

2. 学会発表

なし

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

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」

分担研究報告書

「体性幹細胞、iPS細胞等を用いる臨床研究実施のための基盤技術」

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	澤 芳樹	大阪大学 心臓血管外科学	教授
研究協力者	宮川 繁	大阪大学 心臓血管外科学	講師

【研究要旨】

大阪大学では重症心筋症患者を対象として、ヒト幹細胞指針に適合した自家骨格筋芽細胞シートの臨床研究を進めている。これまで20名以上の対象患者から採取した筋肉に含まれる骨格筋芽細胞を培養した経験から、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り、患者背景が影響している可能性が考えられた。さらに、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していた。以上のことから、骨格筋芽細胞の培養に影響を与える患者背景を特定することで、より安定的な培養方法につながる可能性が示唆された。

A. 研究目的

大阪大学医学部附属病院未来医療センターでは、基礎研究の早期実用化を目指したトランスレーショナルリサーチ実践の場として、2003年に医学部附属病院の中央診療施設の一部門として開設され、ヒト幹細胞臨床研究や遺伝子治療臨床研究について、審査評価委員会への申請や臨床研究の実施に必要な書類作成から臨床研究終了までの総合的なサポートを行っている。さらに6ユニットの細胞培養調製施設を保有し、国内最多の承認件数を誇るヒト幹細胞臨床研究は国内随一の実施経験で多彩な幹細胞臨床研究の支援を提供できることに加え、GMP対応施設として治験での利用も可能である。さらに、将来予定されているiPS細胞由来細胞加工製品の製造を見据えて、細胞調整ユニットの増設を行うとともに、製

造支援体制の強化を行った。

研究分担者らが進めているヒト幹細胞指針に適合した自家骨格筋芽細胞シートの臨床研究において、対象患者から採取した筋肉に含まれる骨格筋芽細胞を培養した際に、回収細胞数が少ないことや細胞純度が低下したことが原因で、筋肉の再採取及び骨格筋芽細胞の再培養をするケースがあった。これらにはドナーである患者背景が起因している可能性が考えられた。そこで、今回は臨床研究における細胞培養実績から患者背景が骨格筋芽細胞の培養にどのような影響を与えるかを評価した。

B. 研究方法

回収細胞数・細胞生存率や骨格筋芽細胞の特異的なマーカーであるCD56陽性率（純度）を測定し、移植細胞の品質管理を行っ

た。その結果を元に、患者の年齢・体格・心疾患(拡張型心筋症または虚血性心筋症)でグループ分けして倍加時間・回収細胞数・純度を比較した。

(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

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り、患者背景が影響している可能性が考えられた。さらに、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していた。さらに、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が示唆された。

D. 考按

骨格筋芽細胞の培養に影響与える患者背景や因子について、これまで実施した臨床研究の培養データから推察されることが示唆されたので、今後も引き続き蓄積される培養データを精査していく必要がある。

E. 結論

自家細胞移植による再生医療等製品の最大の問題点は、培養プロセスを安定化させることである。患者の病歴、投薬歴、疾患の状態によって変わりうる培養プロセスを精査し、変動因子を明らかにするために、引き続き臨床研究のデータの蓄積をすすめ

る。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Cell-sheet Therapy With Omentopexy Promotes Arteriogenesis and Improves Coronary Circulation Physiology in Failing Heart. Kainuma S, Miyagawa S, Fukushima S, Pearson J, Chen YC, Saito A, Harada A, Shiozaki M, Iseoka H, Watabe T, Watabe H, Horitsugi G, Ishibashi M, Ikeda H, Tsuchimochi H, Sonobe T, Fujii Y, Naito H, Umetani K, Shimizu T, Okano T, Kobayashi E, Daimon T, Ueno T, Kuratani T, Toda K, Takakura N, Hatazawa J, Shirai M, Sawa Y. Mol Ther. 2015 Feb;23(2):374-86.

2. 学会発表

なし

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

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」

分担研究報告書

「幹細胞等の確実な保管および機能解析を実現するための基盤整備」

研究分担者 高島 成二 大阪大学 医化学教室 教授

【研究要旨】

本研究においてはヒト幹細胞の臨床応用に向けた細胞保存設備の整備および、保存される、あるいは保存されている細胞が適切に維持され、安全に再生医療に応用できる施設および細胞解析基盤を構築することを目的とする。本研究分担者は、実際の保存施設の設計および細胞機能評価のためのゲノム・タンパク質解析の基盤構築を行った。本研究においては「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」ほか関連指針等を遵守し、各施設の倫理委員会の承認を経て慎重に研究を進めた。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った。

A. 研究目的

ヒト幹細胞等の適切な保管は、再生医療等の実現に最も必要な事業の一つである。これらの細胞を受け入れ、細胞ストックとして適切な管理を行うためには、保存細胞の性格を正確に把握する必要がある。そのためには微生物感染の有無以外にも、予測しない遺伝子変異による細胞動態の変化や、タンパク質発現変化の動態解析を初期にあるいは定期的に行っていくことが非常に重要である。分担者はこれらが適切に行われるための細胞保存施設の環境整備と、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うことを目的として本事業に参画した。

B. 研究方法

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

体性幹細胞ならびに iPS 細胞等貯蔵をお

こなうために、平成24年度に当機関内に電子錠を備えた専用のストックルームの設置、コンピュータと連動した自動入出庫管理システムを実現する細胞凍結保管庫（クライオライブラリ）の設置および、既存の液体窒素タンクとの配管整備をおこなった。分担者はこの設計に携わり、特にクリーンでセキュリティの高い保存環境を整える設計に従事した。

2. ヒト幹細胞等の遺伝子・タンパク質解析技術の確立

さまざまな種類の細胞等から、効率よく遺伝子・タンパク質を抽出し、超高速シーケンサーや質量分析等を駆使した解析を行い、幹細胞等の迅速で・的確な機能評価を行う系を確立する。また種々の細胞機能解析し手法も用いて幹細胞等の機能評価も合わせて実行した。

（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

分担者が設計した図面に基づき前室を含めた細胞貯蔵室が完成し H25 年 11 月より液体窒素の充填を開始し、運用を開始した。H26 年は実働を開始している。さらに高速シーケンサーを含めた細胞解析環境を整え、Exome 解析の解析パイプラインを完成し、すでに 100 例以上の解析実績を上げた。

D. 考按

幹細胞等はウイルスを含めた遺伝子操作も行われていることが多く単にその保存を行うだけでなく、一つ一つの細胞においてその機能を含めた遺伝子・タンパク質等の発現が常に一定の形質を保っているか正確にモニターしていかなければならない。そのためには保管施設と併設された細胞解析施設においてこれらの解析が的確に行われる環境を作ることの重要性がますます増加すると思われる。幹細胞の機能維持のための細胞機能解析としてどのような系が最も適しているかを今後も追及していくことが再生医療の安全な実現には必須と思われる。今後はさらに遺伝子・タンパク質解析施設を充実させ、iPS 細胞等の品質コントロール系を確立させていく必要がある。

E. 結論

クリーンで安全性の高い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

ムの確立と保存細胞の解析基盤の構築をおこなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

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」

分担研究報告書

「体性幹細胞付帯情報の収集・管理システムの構築」

研究分担者	新谷 歩	大阪大学 臨床統計疫学寄附講座	教授
研究協力者	山田 知美	大阪大学 臨床統計疫学寄附講座	准教授
研究協力者	山本 紘司	大阪大学 臨床統計疫学寄附講座	准教授
研究協力者	関 季子	大阪大学 医学部附属病院 未来医療開発部	特任研究員

【研究要旨】

iPS細胞等の保存および機能解析設備のさらなる整備、維持、管理を進め、体性幹細胞ならびにiPS細胞等の臨床利用の促進を図る本事業においては、幹細胞付帯情報を適切な方法で収集し、統計解析できる状態で管理することが重要となる。本研究の目的は、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省いたもの）を体系的に収集・管理するシステムの構築を行うことである。データはREDCapを用いて収集し、大阪大学内の臨床研究専用のサーバーにて管理する。

A. 研究目的

本研究の目的は、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省いたもの）を体系的に収集・管理するシステムの構築を行うことである。

B. 研究方法

データはREDCapを用いて収集し、大阪大学内の臨床研究専用のサーバーにて管理する。REDCapシステムはインターネットを介して利用するため、サイバー攻撃の対象となる可能性がある。対応策として、アプリケーションレベルでの統合型サーバセキュリティ対策システムを導入する。並行して、今年度は大阪大学眼科領域のデータを対象にREDCapの入力画面を作成する。疾患分類

コードの取り込みや、画像添付などの機能追加も行う。

（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

アプリケーションレベルでの統合型サーバセキュリティ対策システムの導入により、システムが取扱う情報の不正流出やデータの改竄などのリスクが軽減され、安定したシステム運用と臨床研究データの安全性を保つ基盤を整備した。また、眼科領域の20項目について入力画面を作成した。

D. 考按

今年度の予定は概ね順調であった。セキュリティを担保した環境の整備と、眼科領域における REDCap 入力画面を作成したが、実際の運用においては様々な問題が発生することが予想される。運用開始前に SOP の作成と十分なシステムテストを行い、運用開始後は、発生する問題に対処しながら、データの品質を確保するための効率的な運用のノウハウを蓄積する。

E. 結論

セキュリティ対策システムを導入し、安定したシステム運用と臨床研究データの安全性を保つ基盤を整備した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

論文・書籍一覧

英文論文

1. Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, Yoshida A, Kashiyama N, Kawamura A, Ito E, Saito A, Maeda A, Eguchi H, Toda K, Lee JK, Miyagawa S, Sawa Y. N-glycans: phenotypic homology and structural differences between myocardial cells and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One* 2014;9(10):e111064.
2. Morimoto T, Kaito T, Kashii M, Matsuo Y, Sugiura T, Iwasaki M, Yoshikawa H. Effect of Intermittent Administration of Teriparatide (Parathyroid Hormone 1-34) on Bone Morphogenetic Protein-Induced Bone Formation in a Rat Model of Spinal Fusion. *J Bone Joint Surg Am* 2014;96(13):e107.
3. Kaneshiro S, Ebina K, Shi K, Higuchi C, Hirao M, Okamoto M, Koizumi K, Morimoto T, Yoshikawa H, Hashimoto J. IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro. *J Bone Miner Metab* 2014;32(4):378-392.
4. Minegishi Y, Sakai Y, Yahara Y, Akiyama H, Yoshikawa H, Hosokawa K, Tsumaki N. Cyp26b1 within the growth plate regulates bone growth in juvenile mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;454(1):12-18.
5. Sugiura T, Kashii M, Matsuo Y, Morimoto T, Honda H, Kaito T, Iwasaki M, Yoshikawa H. Intermittent administration of teriparatide enhances graft bone healing and accelerates spinal fusion in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis. *Spine J* 2015;15(2):298-306.
6. Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Nonaka R, Yamamoto H, Ishii H, Mori M, Furuta K, Nakajima T, Hayashi H, Sugisaki H, Higashimoto H, Kato T, Takeshita F, Ochiya T. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat Commun* 2014;5:3591.
7. Fukusumi T, Ishii H, Konno M, Yasui T, Nakahara S, Takenaka Y, Yamamoto Y, Nishikawa S, Kano Y, Ogawa H, Hasegawa S, Hamabe A, Haraguchi N, Doki Y, Mori M, Inohara H. CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2014;111(3):506-514.
8. Hasegawa S, Eguchi H, Nagano H, Konno M, Tomimaru Y, Wada H, Hama N, Kawamoto K, Kobayashi S, Nishida N, Koseki J, Nishimura T, Gotoh N, Ohno S, Yabuta N, Nojima H, Mori M, Doki Y, Ishii H. MicroRNA-1246 expression associated with

- CCNG2-mediated chemoresistance and stemness in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2014;111(8):1572-1580.
9. Hamabe A, Konno M, Tanuma N, Shima H, Tsunekuni K, Kawamoto K, Nishida N, Koseki J, Mimori K, Gotoh N, Yamamoto H, Doki Y, Mori M, Ishii H. Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(43):15526-15531.
 10. Hamabe A, Yamamoto H, Konno M, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Nishida N, Kawamoto K, Koseki J, Doki Y, Mori M, Ishii H. Combined evaluation of hexokinase 2 and phosphorylated pyruvate dehydrogenase-E1alpha in invasive front lesions of colorectal tumors predicts cancer metabolism and patient prognosis. *Cancer Sci* 2014;105(9):1100-1108.
 11. Takeyari S, Yamamoto T, Kinoshita Y, Fukumoto S, Glorieux FH, Michigami T, Hasegawa K, Kitaoka T, Kubota T, Imanishi Y, Shimotsuji T, Ozono K. Hypophosphatemic osteomalacia and bone sclerosis caused by a novel homozygous mutation of the FAM20C gene in an elderly man with a mild variant of Raine syndrome. *Bone* 2014;67:56-62.
 12. Kubota T, Kitaoka T, Miura K, Fujiwara M, Ohata Y, Miyoshi Y, Yamamoto K, Takeyari S, Yamamoto T, Namba N, Ozono K. Serum fibroblast growth factor 23 is a useful marker to distinguish vitamin D-deficient rickets from hypophosphatemic rickets. *Horm Res Paediatr* 2014;81(4):251-257.
 13. Kitaoka T, Miyoshi Y, Namba N, Miura K, Kubota T, Ohata Y, Fujiwara M, Takagi M, Hasegawa T, Juppner H, Ozono K. Two Japanese familial cases of Caffey disease with and without the common COL1A1 mutation and normal bone density, and review of the literature. *Eur J Pediatr* 2014;173(6):799-804.
 14. Iwatsuki K, Yoshimine T. Regenerative Medicine for Spinal Cord Injury Using Olfactory Mucosa Autografts. In: Sankai Y, Suzuki K, Hasegawa Y (eds), *Cybernetics*: Springer Japan; 2014:99-108.
 15. Iwatsuki K, Yoshimine T, Sankai Y, Tajima F, Umegaki M, Ohnishi Y-I, Ishihara M, Ninomiya K, Moriwaki T. Involuntary muscle spasm expressed as motor evoked potential after olfactory mucosa autograft in patients with chronic spinal cord injury and complete paraplegia. *J Biomedical Science and Engineering* 2013;908-916.
 16. Iinuma S, Aikawa E, Tamai K, Fujita R, Kikuchi Y, Chino T, Kikuta J, McGrath JA, Uitto J, Ishii M, Iizuka H, Kaneda Y. Transplanted Bone Marrow-Derived Circulating PDGFRalpha+ Cells Restore Type VII Collagen in Recessive

Dystrophic Epidermolysis Bullosa Mouse Skin Graft. *Journal of immunology* 2015;194(4):1996-2003.

17. Fujita R, Tamai K, Aikawa E, Nimura K, Ishino S, Kikuchi Y, Kaneda Y. Endogenous Mesenchymal Stromal Cells in Bone Marrow Are Required to Preserve Muscle Function in mdx Mice. *Stem cells* 2015;33(3):962-975.
18. Moritsugu R, Tamai K, Nakano H, Aizu T, Nakajima K, Yamazaki T, Sawamura D. Functional analysis of the nuclear localization signal of the POU transcription factor Skn1a in epidermal keratinocytes. *Int J Mol Med* 2014;34(2):539-544.

和文論文

1. 岩月幸一. 自家嗅粘膜移植による脊髄再生医療. *脳神経外科ジャーナル* 2013;22(6):452-458.
2. 岩月幸一, 吉峰俊樹, 大西諭一郎, 二宮貢士, 森脇崇. 嗅粘膜移植による脊髄再生医療. *Anesthesia 21 century* 2013;15(3-47):44-49.

書籍

1. 北畠康司. 新しいゲノム編集技術 (TALEN および CRISPR/Cas9 システム) とその可能性. 再生医療シリーズ「脳神経系の再生医学 - 発生と再生の融合的新展開 - 」 2015;155-160.

