

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム  
(幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)  
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) アSEMBラーとしての癌/非癌幹細胞の機能解明とその制御技術の開発  
(英語) Study on function and control technology of cancer/non-cancer stem cells as assemblers

研究開発担当者 (日本語) 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科  
教授 青井貴之

所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Science, Technology and Innovation,  
Kobe University, Professor Takashi Aoi

実施期間： 平成 28 年 11 月 15 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 幹細胞と幹細胞由来オルガノイドのメタボロミクス  
開発課題名： (英語) Metabolomics of stem cells and organoids derived from stem cells

研究開発分担者 (日本語) 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 教授 蓮沼誠久  
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Science, Technology and Innovation,  
Kobe University, Professor Tomohisa Hasunuma

分担研究 (日本語) 統合オミクス解析と in silico 代謝設計  
開発課題名： (英語) Integrated omics analyses and in silico metabolic design

研究開発分担者 (日本語) 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 特命准教授 荒木通啓  
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Science, Technology and Innovation,  
Kobe University, Project Associate Professor Michihiro Araki

分担研究 (日本語) 臨床検体と *in vitro* 培養系の比較対照  
開発課題名: (英語) Comparison of clinical specimens and *in vitro* culture system

研究開発分担者 (日本語) 神戸大学医学部附属病院再生医療臨床応用実現化人材育成センター  
特命助教 青井三千代  
所属 役職 氏名: (英語) Center for Human Resource development for Regenerative Medicine,  
Kobe University Hospital  
Project Assistant Professor Michiyo Aoi

分担研究 (日本語) イノベーション創出の最大化のための戦略構築  
開発課題名: (英語) Strategy building of maximizing innovations

研究開発分担者 (日本語) 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 教授 山本一彦  
所属 役職 氏名: (英語) Graduate School of Science, Technology and Innovation,  
Kobe University, Professor Kazuhiko Yamamoto

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### 【癌幹細胞のアセンブル機能の in vitro 評価】

アセンブル機能を持つ人工大腸癌幹細胞/人工肺癌細胞と、アセンブル機能を持たない大腸癌/肺癌細胞株を比較する培養・評価系を確立した。

### 【非癌幹細胞のアセンブル機能の in vitro 評価】

ヒト iPS 細胞から複数種類の非癌幹細胞の分化誘導法検討の基盤を確立した。

### 【幹細胞と幹細胞由来オルガノイドのメタボロミクス】

癌幹細胞のメタボロームデータ取得プロトコルを確立するために、人工癌幹細胞の元となっている癌細胞を使って細胞抽出液の前処理方法の検討を行った。人工大腸癌幹細胞のコントロールは SW480 細胞株、人工肺癌幹細胞のコントロールは A549 細胞株を使用した。抽出液中の内標の検討により、CE-TOFMS と LC/MS を同サンプルによって測定が可能で、信頼性と再現性を確保した。これと同様に、癌幹細胞のメタボロミクス解析を行っていく。

### 【統合オミクス解析と in silico 代謝設計】

癌/非癌幹細胞のオミクスデータ（トランスクリプトーム・メタボローム）に基づき、アセンブル機能における重要因子とその制御法の推定を行うことを目的とする。これを達成するため、これまでに独自に開発してきた統合オミクス解析・in silico 代謝設計ツールをもとに、本研究に特化した解析プラットフォームの最適化を行った。具体的には、公共の代謝パスウェイデータベースを利用して、ヒトに関する酵素反応とそれに紐づく基質・生成物の情報の収集、代謝シミュレーションを行うための代謝モデル構築、in silico 代謝設計ツールをもとにした代謝パスウェイ拡張、測定データの解析プラットフォームの開発を行った。

### 【臨床検体と in vitro 培養系の比較対照】

本年度はまず、本研究開発課題において(i)臨床検体を利用するための倫理審査の手続きの完了、確認を行った。神戸大学医学部附属病院の診療科の協力を得て、実施計画審査申請書を神戸大学医学倫理会へ提出し、承認を受けた。これにより、免疫染色や in situ hybridization による、(ii)癌幹細胞や(iii)非癌幹細胞における重要因子に関する臨床検体と培養系の比較実験を開始することができた。

### 【イノベーション創出の最大化のための戦略構築】

平成 28 年度は、本委託研究開発を通じたイノベーション（＝価値の創造）を最大化するための戦略策定に向けて、癌治療関連市場と再生・細胞医療市場について、それぞれの市場規模と、市場に対する事業者の参入状況やユーザーニーズへの対応状況などについて、文献を中心にした調査を行った。

[*in vitro* evaluation of assembly ability in cancer stem cells]

We established systems to compare induced colon/lung cancer stem cells with assembly ability to colon/lung cancer non-stem cells without assembly ability

[*in vitro* evaluation of assembly ability in non-cancer stem cells]

We established basic technologies to optimize conditions of differentiation from human iPS cells into several kinds of non-cancer stem cells.

[Metabolomics of stem cells and organoids derived from stem cells]

To establish the protocol of metabolome analyses for induced cancer stem cells (iCSC), we optimized the method for cell-extract pretreatment using cancer cells, parent cells of iCSC. We used SW480 cell line as a control of iCSC derived from human colon cancer cells and A549 cell line as a control of iCSC derived from human caucasian lung carcinoma. According to the evaluation of internal standard added into the cell extract, we ensured reliability and reproducibility of CE-TOFMS and LC-MS metabolomics. In a similar manner, we will analyze iCSC.

[Integrated omics analyses and in silico metabolic design]

This research aims to estimate important factors and control methods in the assemble function of stem cells based on omics data of cancer / non-cancer stem cells (transcriptome / metabolome). In order to achieve this, we optimized the analysis platform specialized for this research based on integrated omics analysis and in silico metabolic design tool that we have developed independently. Specifically, we use public metabolic pathway databases to collect information on human enzymatic reactions associated with substrates / products, to build up metabolic models for metabolic simulation, to use in silico metabolic design tools for metabolic pathway extension, and to develop an analysis platform for measurement data.

[Comparison of clinical specimens and in vitro culture system]

Last fiscal year, (i) we completed or confirmed the ethical screening procedure for using clinical specimens in this research. With the cooperation of departments of general thoracic surgery and gastrointestinal surgery at Kobe university medical school hospital, we submitted the two application forms to Kobe university medical ethics and received approvals. As a result, we could start comparative experiments between clinical specimens and in vitro culture system concerning important factors in (ii) cancer stem cells and (iii) non-cancer stem cells by immunostaining and in situ hybridization.

[Strategy building of maximizing innovations]

During FY2016, in order to build a strategy of maximizing innovations (value creation) through this research project, I mainly conducted a literature research on respective volumes, market

entries, met needs and unmet needs with regards to oncology, regenerative medicine, and cellular medicine related markets.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 1 件）

1. Ishida R, Kakeji Y, Aoi T. “Current issues on cancer stem cell researches”  
Cytometry Research, 2016, Vol.26(2), Pages7-13
2. Hsu, HH., Araki, M., Mochizuki, M., Hori, Y., Murata, M., Kahar, P., Yoshida, T., Hasunuma, T. and Kondo A. “A Systematic Approach to Time-series Metabolite Profiling and RNA-seq Analysis of Chinese Hamster Ovary Cell Culture” Scientific Reports, 7:43518 (2017).

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. “In vitro construction of lung cancer organoids from induced lung cancer stem like cells.”  
ポスター、Hiroyuki Ogawa, Nahoko Shimizu, Daisuke Hokka, Yugo Tanaka, Michiyo Koyanagi-Aoi, Takashi Aoi, Yoshimasa Maniwa  
The 17<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer、2016/12/7、国外
2. 「ヒト iPS 細胞を用いた ACTH 産生細胞成熟機構の解析と in vitro 腫瘍モデル作成の試み」  
口頭、松本 隆作、須賀 英隆、青井 貴之、福岡 秀規、井口 元三、小武 由紀子、吉田 健一、坂東 弘教、隅田 健太、西沢 衡、小川 渉、高橋 裕、  
第 27 回間脳下垂体腫瘍学会、2017/2/24、国内
3. 「ヒト iPS 細胞由来ホルモン産生 Leydig 細胞の作製」  
口頭、石田貴樹、田中幹人、角井健太、福田輝雄、江夏徳寿、千葉公嗣、松下 経、中野雄造、藤澤正人、青井貴之  
日本生殖再生医学会第 12 回学術集会、2017/3/19、国内
4. 「バイオプロセスデザインプラットフォームの構築」ポスター、牧口 大旭、小川 哲平、荒木通啓、第 39 回日本分子生物学会、2016/12/1、国内
5. "Development of Design Platform for Metabolic Pathways" ポスター、Ogawa, T., Makiguchi, H. and Araki, M.、生命医薬情報学連合大会 2016 年大会、2016/9/29-30、国内
6. 「バイオ医薬生産に向けた CHO 細胞培養情報データ解析システムの構築」ポスター、許漢修、荒木通啓、蓮沼誠久、河野愛子、近藤昭彦、第 68 回日本生物工学会、2016/9/30、国内
7. 「iPS 細胞とがんにおけるヒト内在性レトロウイルスの機能を探る」、口頭、青井(小柳) 三千代、内在性ウイルス様エレメント研究会、2016/12/16、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし