

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) 再生医療実用化研究事業
(英語) Research Project for Practical Application of Regenerative medicine
- 研究開発課題名： (日本語) 臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した保存体制の確立
(英語) Establishment of a preserving system with the stability and safety of iPS cells to be applied for clinical research
- 研究開発担当者 所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人 熊本大学発生医学研究所幹細胞誘導分野・教授・江良 柾実
(英語) Department of Cell Modulation, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University・Professor・Takumi Era
- 実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日
- 分担研究 開発課題名： (日本語) iPS 細胞の保存と分化誘導
(英語) Storage of iPS cells and its influence on differentiation potency
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名： (日本語) 東京工業大学 生命理工学院 教授 桑 昭苑
(英語) School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Professor, Shoen Kume
- 分担研究 開発課題名： (日本語) 安全性の高い iPS 細胞のエピジェネティック解析
(英語) Epigenetic analysis of highly safe iPS cells
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名： (日本語) 熊本大学発生医学研究所細胞医学分野・准教授・斉藤 典子
(英語) Noriko Saitoh, Associate Professor, Department of Medical Cell Biology, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University

分担研究 (日本語) 安全な保存方法確立を目指した安全性の高い iPS 細胞の検討と解析
開発課題名: (英語) Examination and analysis of induced pluripotent stem cells aiming at establishment of a highly safe preservation method.

研究開発分担者 (日本語) 白木伸明 東京工業大学 生命理工学院 准教授
所属 役職 氏名: (英語) Nobuaki Shiraki, Tokyo Institute of Technology, School of Life Science and Technology, Associate Professor

分担研究 (日本語) 臨床研究に用いる iPS 細胞の収集と保存、第 3 種細胞の寄託を見据えた書類等の整備、主に小児期を中心とした安定性・安全性を保持した保存体制の確立

開発課題名: (英語) Information management, sampling and storing iPCSs for clinical trial. Preparing for ethical application according to a bill for ensuring safety of regenerative medicine. To provide a system for constructing a storing system for pediatrics.

研究開発分担者 (日本語) 熊本大学・小児科 (熊本大学医学部附属病院) 松本 志郎
所属 役職 氏名: (英語) Shirou Matsumoto, Associate Professor, Department of Pediatrics, Kumamoto University Hospital, Kumamoto University.

II. 成果の概要 (総括研究報告)

・ 研究開発代表者による報告の場合

臨床研究に使われている iPS 細胞保存を継続している。別の研究に使った書類を参考にして必要書類の作成を行った。腫瘍化形成能のメカニズムでは、候補分子を絞り込みその機能解析を行った。

研究分担者である糸は、必須アミノ酸であるメチオニンがヒト ES/iPS 細胞の未分化性維持および分化を制御することを明らかにしている (Shiraki et al., *Cell Metabolism* 2014)。さらに、ヒト iPS 細胞から成熟した膵臓 β 細胞への分化誘導方法を動物成分不含の系で構築している (Shahjalal et al., *J. Mol. Cell Biol.* 2014)。H27 年度では、分化時に DMSO を利用する新規分化誘導方法を構築し、内胚葉分化因子である Activin の添加量を大幅に削減することに成功した (Ogaki et al., *Sci. Rep.*, 2015)。H28 年度は、分化誘導技術の多施設間での利用を促進するための基盤技術開発を行った。

研究分担者である齊藤らは、機械学習を用いた画像解析とエピゲノム解析により、iPS 細胞のリプログラミングの分子機序の解析を行った。

研究分担者である白木らは必須アミノ酸であるメチオニンがヒト iPS 細胞の未分化性維持および分化を制御することを明らかにし、メチオニン除去培地を用いた効率的な内胚葉分化誘導方法については SOP 化の一環として詳細なプロトコールを報告した (Tsuyama et al., *Methods Mol Biol.*, 2016)。本年度は、網羅的遺伝子発現解析・メタボローム解析・リン酸化プロテオミクス解析により、メチオニンが iPS 細胞の分化に与える影響を評価した。

研究分担者である松本らは、小児に対して国内で iPS 細胞を用いた臨床試験は行われず、保管対象

となる細胞はなかった。再生医療等安全確保法の第2種を対象として使用可能な採取・運搬・保管に関する情報を骨髄、末梢血幹細胞など実際に運用されている資料を収集して、書類準備を行った。

We continued to preserve the iPS cells used in clinical studies. We prepared the proper documents referring to the documents used for another study. To elucidate the molecular mechanism of tumor formation for human iPS cells, candidate molecules were narrowed down and its function was analyzed.

Dr. Kume and her colleague have succeeded in establishing a xeno free pancreatic differentiation procedure (Shahjalal et al., J. Mol. Cell Biol. 2014), and a method utilizing methionine deprived media to enhance differentiation (Shiraki et al, 2014). We also developed a cost effective differentiation procedure for deriving endodermal tissues from human iPS cells. We previously developed ELISA system to evaluate endodermal differentiation from pluripotent stem cells using cell culture supernatant. With the above mentioned techniques, we tried to develop differentiation procedures that could be easily performed by other research groups and with good reproducibility.

Dr. Saitoh and her colleague investigated molecular mechanisms for reprogramming of a variety of iPS cells using epigenomic and machine-learning image analyses.

Dr. Shiraki and his colleague made clear that methionine which is essential amino acid controlled the differentiation of human induced pluripotent stem cells (iPSC), and reported detailed protocol about the effective endoderm differentiation method using the methionine deprived culture medium (Tsuyama et al., Methods Mol Biol., 2016) . In this year, we evaluated the effect of methionine on iPSC differentiation performing multiomics analysis such as microarray analysis, metabolome analysis and phosphorylation proteomics analysis.

There was no clinical trial with iPSC for child from April 2016 to May 2017. In order to establish ethics application and protocol, Dr. Matsumoto and his colleague collected management protocols for bone marrow transplantation and peripheral blood stem cell transplantation

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

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 件、国際誌 件)

1. Khodeer S and Era T. Identifying the Biphasic Role of Calcineurin/NFAT Signaling Enables Replacement of Sox2 in Somatic Cell Reprogramming. *Stem Cells in press*.
2. Masaki H, Kato-Itoh M, Takahashi Y, Umino A, Sato H, Ito K, Yanagida A, Nishimura T, Yamaguchi T, Hirabayashi M, Era T, Loh KM, Wu SM, Weissman IL, Nakauchi H. Inhibition of Apoptosis Overcomes Stage-Related Compatibility Barriers to Chimera Formation in Mouse Embryos. *Cell Stem Cell*. 19:587-592, 2016.
3. Omori H, Ogaki S, Sakano D, Sato M, Umeda K, , Nakagata N, Kume S. Changes in expression of C2cd4c in pancreatic endocrine cells during pancreatic development. *FEBS Lett* 590, 2584-93, 2016.
4. Ogaki S, Omori H, Morooka M, Shiraki N, Ishida S, Kume S. Late stage definitive endodermal

- differentiation can be defined by Daf1 expression. *BMC Dev Biol.* 16:19, 2016.
5. 白木伸明 糸昭苑「iPS 細胞と肝胆膵疾患—膵臓・肝臓への分化—」GI Research 第 24 巻 2 号 30-36, 2016 年(4 月号)
 6. Wang, X., Liang, S., Sun, Y., Li, H., Endo, F., Nakao, M., Saitoh, N. and Wu, L. Analysis of estrogen receptor beta gene methylation in autistic males in a Chinese Han population. *Metab Brain Dis*, 2017, doi: 10.1007/s11011-017-9990-7.
 7. Tanaka, H., Takebayashi, S.I, Sakamoto, A., Igata, T., Nakatsu, Y., Saitoh, N., Hino, S., Nakao, M. The SETD8/PR-Set7 Methyltransferase Functions as a Barrier to Prevent Senescence-Associated Metabolic Remodeling. *Cell Rep*, 2017, 18:2148-2161. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.021.
 8. Tomita, S., Abdalla, M. O. A., Fujiwara, S., Yamamoto, T., Iwase, H., Nakao, M., and Saitoh, N. Roles of long non-coding RNAs in chromosome domains. *WIREs RNA*, 2016, doi: 10.1002/wrna.1384.
 9. Nakayama, T., Saitoh, N., Morotomi-Yano, K., Yano, K.I., Nakao, M, Saitoh, H. Nuclear extrusion precedes discharge of genomic DNA fibers during tunicamycin-induced neutrophil extracellular trap-osis (NETosis)-like cell death in cultured human leukemia cells. *Cell Biol Int*, 2016, 40:597-602, doi: 10.1002/cbin.10594.
 10. Matsumoto, A., Sakamoto, C., Matsumori, H., Katahira, J., Yasuda, Y., Yoshidome, K., Tsujimoto, M., Goldberg, I. G., Matsuura, N., Nakao, M., Saitoh, N., Hieda, M. Loss of the integral nuclear envelope protein SUN1 induces alteration of nucleoli, *Nucleus*, 2016, 7: 68-83, doi: 10.1080/19491034.2016.1149664.
 11. 山本達郎、中尾光善、斎藤典子. クロマチンから核構造へ、東京化学同人 「基礎分子生物学 II: 遺伝子発現制御機構」田村隆明・浦聖恵編 編, 2017 p231-242.
 12. Sakano D., Choi S, Kataoka M, Shiraki N., Uesugi M, Kume K, Kume S. Dopamine D2 receptor-mediated regulation of beta cell mass. *Stem Cell Report* 7, 95-109, 2016.
 13. Kaitsuka T, Kobayashi K, Otsuka W, Kubo T, Hakim F, Wei FY, Shiraki N. Kume S and Tomizawa K. Erythropoietin facilitates definitive endodermal differentiation of mouse embryonic stem cells via activation of ERK signaling. *Am. J. of Physiology - Cell Physiology*, 2017 Mar 15. ajpcell.00071.2016. doi: 10.1152/ajpcell.00071.2016.
 14. Koga T, Shiraki N. Yano S, Suico MA, Morino-Koga S, Sato T, Shuto T, Kume S. Kai H. Mild electrical stimulation with heat shock guides differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing cells within the definitive endoderm. *BMC Biotechnology* 17(1), 14. Doi:10.1186/s12896-017-0331-z Feb 15, 2017.
 15. Sakamoto R, Nakamura K, Kido J, Matsumoto S. Mitsubuchi H, Inomata Y, Endo F. Improvement in the prognosis and development of patients with methylmalonic acidemia after living donor liver transplant. *Pediatr Transplant.* 2016 Dec;20(8):1081-1086.
 16. Kido J, Matsumoto S. Momosaki K, Sakamoto R, Mitsubuchi H, Inomata Y, Endo F, Nakamura K. Plasma exchange and chelator therapy rescues acute liver failure in Wilson disease without liver transplantation. *Hepatol Res.* 2017 Mar;47(4):359-363.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 江良 択実 リプログラミングを活用した疾患研究 第 16 回日本再生医療学会総会シンポジウム リプログラミングと多能性獲得の分子メカニズム 口頭 2017年3月9日 仙台市
2. Khodder S and Era T. Identifying the biphasic role of Calcineurin/NFAT signaling pathway enables successfully to replace sox2 in somatic cell reprogramming. 第14回幹細胞シンポジウム 口頭 2016年5月21日 淡路島
3. 「多能性幹細胞の分化制御における培地組成の重要性～メチオニン除去培地を利用した分化制御～」口頭 糸 昭苑 再生医療学会ランチセミナー仙台 2017年3月8日 国内
4. 「多能性幹細胞から膵臓β細胞を創る」口頭 糸 昭苑 「細胞をデザインする」セッション「細胞を創る」研究会 9.0 東京 11月21日 国内
5. Shoen Kume, “Generation of insulin-producing β-like cells from human iPS cells.” 10th International Conference on Cell Therapy (IRICT) Seoul, Korea Sep 29, 2016 国外
6. 「多能性幹細胞の分化制御と代謝；The link between metabolic states and differentiation of Pluripotent Stem Cells」口頭 糸昭苑 細胞生物学会 京都 平成 28 年 6 月 17 日 国内
7. Nuclear structures for gene regulation: the nucleolus and RNA clouds. 口頭, Saitoh, N. NIA/NIH seminar, (Maryland, USA) 2016/5/9, 国外
8. Machine learning image analysis reveals structural roles of ribosomal proteins in the nucleolus and Diamond-Blackfan anemia. ポスター, Matsumori, H., Osakada, H., Haraguchi, T., Ito, E., Goldberg, I.G., Nakao, M., and Saitoh, N. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting; Nuclear organization & function (Cold Spring Harbor, NY, USA), 2016/5/5, 国外
9. 乳がんにおいて非コード RNA 群が規定する活性染色体ドメイン, 口頭, 斉藤典子、モハメドオサマアブダラ、藤原沙織、山本達郎、富田さおり、前原一満、大川恭行、中尾光善. 口頭, 第 39 回日本分子生物学会年会 シンポジウム 1AS13 「1AS13」(神奈川県 横浜市 パシフィコ横浜), 2016/11/30, 国内
10. 非コード RNA により規定されるクロマチンドメイン, 口頭, 斉藤典子、モハメドオサマアブダラ、藤原沙織、山本達郎、富田さおり、前原一満、大川恭行、中尾光善. 口頭, 遺伝研研究会 「クロマチン・細胞核の動的構造変換とエピジェネティック制御」(静岡県 三島市 遺伝学研究所), 2016/10/27, 国内
11. 再発乳がんに関わる核内非コード RNA エレノア, 斉藤典子、山本達郎、安田洋子、富田さおり、モハメドオサマアブダラ、藤原沙織、坂本智代美、中尾光善. 口頭, 熊本大学 2016 学内研究交流会 生命科学系 (熊本県 熊本市 熊本大学理学部), 2016/10/7, 国内
12. 乳がんの治療耐性獲得に関わる核内非コード RNA エレノア, 口頭, 斉藤典子、モハメドオサマアブダラ、藤原沙織、山本達郎、富田さおり、前原一満、大川恭行、中尾光善. 口頭, 第 89 回日本生化学会大会 シンポジウム 1S15 「疾患における細胞核・クロマチンの動態変動」(宮城県 仙台市 東北大学川内北キャンパス), 2016/9/25, 国内
13. siRNA ハイコンテントスクリーニングによる細胞核構築の解析, 口頭, 斉藤典子、松森はるか、安田洋子、坂本智代美、檜枝美紀、Ilya G Goldberg、中尾光善. 口頭, バイオイメージ・インフ

オーマティクス ワークショップ 2016 (大阪大学 吹田キャンパス 銀杏会館), 2016/6/23,
国内

14. 白木伸明 「アミノ酸代謝制御による幹細胞の未分化性維持と分化促進」JBA "未来へのバイオ技術" 勉強会「幹細胞の創薬利用と産学連携」2016年5月25日(東京) 口頭発表 国内
15. 白木伸明 「多能性幹細胞におけるメチオニン代謝の役割」第4回がんと代謝研究会 2016年7月7日(鹿児島) 口頭発表 国内
16. 白木伸明 「幹細胞の維持および分化におけるメチオニン代謝の役割」日本農芸化学会平成28年度関西支部大会 2016年9月16日(滋賀) 口頭発表 国内
17. 白木伸明 「多能性幹細胞から膵臓β細胞への分化誘導」幹細胞の培養法・培養工学のためのコンソーシアム第一回シンポジウム 2016年10月15日(大阪) 口頭発表 国内
18. 白木伸明 「幹細胞におけるアミノ酸代謝の役割」第37回日本トリプトファン研究会学術集会 2016年12月11日(東京) 口頭発表 国内
19. 白木伸明 「多能性幹細胞から膵臓β細胞への分化誘導」第16回日本再生医療学会総会 2016年3月9日(仙台) 口頭発表 国内
20. 神戸梓沙、白木伸明、木村宏、糸昭苑 「ヒトiPS細胞におけるメチオニン代謝とヒストン就職の役割」第39回日本分子生物学会年会 2016年12月1日(横浜) ポスター発表 国内
21. 古田奈央、荒川哲大、岩畑大悟、白木伸明、糸昭苑 「未分化iPS細胞および分化過程における亜鉛の役割」第39回日本分子生物学会年会 2016年12月2日(横浜) ポスター発表 国内
22. メチルマロン酸血症の疾患特異的iPS細胞を用いた病態解明、口頭、松本志郎、江良択実、遠藤文夫、日本先天代謝異常学会、2016/10/28、国内(東京)
23. メチルマロン酸血症に対する疾患特異的iPS細胞を用いた新規治療薬開発、口演、松本志郎、沼川忠広、江良 択実、第39回日本分子生物学会年会シンポジウム、2016/11/30、国内(横浜)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. ブースを出し、来訪者へ事業を説明。第16回日本再生医療学会総会 2017年3月7日～9日 仙台市
2. 「iPS細胞と再生医療」について口頭 糸昭苑 地元自治会と懇談会 横浜市 平成28年8月25日 国内
3. 臨床の現場から「iPS細胞を用いた創薬研究」、松本志郎、江良択実、遠藤文夫、先天代謝異常症患者交流会「くまもと交流会」、2017/3/11、国内

(4) 特許出願 特になし。