

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 Applications of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) iPS細胞等の安定供給と臨床利用のための基盤整備
(英語) Infrastructure development for stable supply and clinical use of iPS cells

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 大学院医学系研究科眼科学 教授 西田 幸二
所属 役職 氏名： (英語) Kohji Nishida, M.D., Ph.D.
Professor and Chairman
Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 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
開発課題名： (英語) Infrastructure development for secure storage of somatic stem cells
and iPS cells

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院 医学系研究科 心臓血管外科学 教授 澤 芳樹
所属 役職 氏名： (英語) Department of Cardiovascular surgery, Osaka University Graduate School
of Medicine Professor Yoshiki Sawa

分担研究 (日本語) 細胞治療普及のための細胞凍結技術の開発
開発課題名： (英語) Development of Cryopreservation technology for cell therapy

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院 医学系研究科 消化器外科学 教授 森 正樹
所属 役職 氏名： (英語) Stock implementation and management of stem cells

- 分担研究 (日本語) 幹細胞のストック実施と管理
 開発課題名: (英語) Departments of Surgery, Osaka University School of Medicine
 Professor, Masaki, Mori
- 研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院 医学系研究科 未来細胞医療学共同研究講座
 特任准教授(常勤) 齋藤 充弘
 所属 役職 氏名: (英語) Department of Translational Cell Therapy, Osaka University Graduate
 School of Medicine Associate Professor Atsuhiko Saito
- 分担研究 (日本語) 細胞治療普及のための細胞凍結技術の開発
 開発課題名: (英語) Development of Cryopreservation technology for cell therapy
- 研究開発分担者 (日本語) 大阪市立大学 大学院医学研究科 消化器内科学 特命教授 新谷 歩
 所属 役職 氏名: (英語) Ayumi Shintani, Ph.D., MPH Professor
 Department of Medical Statistics
 Osaka City University Graduate School of Medicine
- 分担研究 (日本語) 幹細胞付帯情報の収集・管理システムの構築
 開発課題名: (英語) Construction of the Electronic Data Management System for Stem Cell

II. 成果の概要 (総括研究報告)

「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」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為、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が、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。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等が考えられるが、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、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。

本研究では管理ミスのない細胞管理システムを構築するもので、全国の再生医療の支援を行うものである。このようなシステムは将来的な再生医療の発展には必須であると言えるが、現時点で各大学に設置することが困難であるため本研究で実施するものである。平成 28 年度は、システムの運営・維持をしながらトラブル管理などに対応した。学内で受け入れた細胞については引き続き問題なく保管を継続し、学外からの受け入れに関しては 6 拠点会議にて保管対象の細胞や期

間などの検討を行い、今後の運営について話し合いを進めた。また、昨年度と同様に再生医療学会において6拠点全体でのブースにおける宣伝活動を行った。細胞のゲノムおよびエピゲノム解析を行うプラットフォームの整備については、昨年度に導入したゲノムワークステーションにゲノム解析に必要なソフトとRNAシーケンズ解析に必要なソフトをインストールした。クオリティーコントロールに必要なソフトのインストールも行った。既存のデータを用いてFastqファイルのクオリティーコントロール、マッピング、多型抽出、アノテーションが行えることを確認し、ゲノムおよびエピゲノム解析の1つであるRNAシーケンズ解析方法について解析方法のプラットフォーム構築を完成した。

It is strictly defined to store appropriate samples (e.g. collected human stem cells or collected differentiated human cells) for appropriate duration by the raw to guarantee the safety of regenerative medicine in order to identify the cause of pathological situation such as infection when it appears in the patient. However, there seems to be a possibility of human error in the storage processes because its management is usually done manually not by sophisticated computerized system. To prevent such possibility, management of the storage by full-time operators under a computerized liquid nitrogen storage system is an easy solution. However, it seems not practical to set up such costly system in all institutions of Japan where regeneration medicine is performed because of its huge initial and running cost. Therefore, we plan to set-up a computerized liquid nitrogen storage system as well as full-time operators in our Osaka university and to store somatic stem cells and iPS cells used clinically for the regenerative medicine which we receive from other institutions in Japan. We expect that this research will contribute to the enhancement of the regenerative medicine if we can achieve the establishment of the system for the quality control and the traceability of cells used in the regenerative medicine.

This research is intended for the construction of the cell storage system of no human error and to support the regenerative medicine in Japan. We suppose that our proposing cell storage system is indispensable for the future development of the regenerative medicine. However, at this point, it is apparently difficult to set-up such system in all of the universities in Japan. Therefore, we propose here to set up our proposing cell storage system in our Osaka university, and receive and store cells used in the regenerative medicine performed in Japan. During FY2016, we continued to manage our cell storage system and handled with potential troubles which may occur in the future. We kept the storage of the cells which we received previously and discussed about the management of this research in the future as well as about the types of cells and the duration to store. We propagandized our activity to enhance the receiving of the cells from other institutions in the regenerative medicine conference as we did in this conference last year.

As for the establishment of the platform to perform genomic and epigenomic analyses, we installed softwares for DNA and RNA sequence analysis to the workstation which we set up last year. We also installed software for the quality control of sequencing data. We examined

the quality control, mapping, variant calling, variant annotation, counting transcription reqds using existing data and completed the construction of the platform for the DNA and RNA sequencing analyses.

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 4 件、国際誌 27 件）

1. 宮川繁. 心不全における iPS 細胞由来心筋細胞シート開発の現状と展望. 日本臨床. 2016, 74, 667-70
2. 宮川繁. 細胞シートを用いた心筋再生治療の現状と展望. 日薬理誌. 2016, 147, 269-271
3. 澤 芳樹. 心臓血管外科における再生医療と分子生物学. 胸部外科 2017, 70, 9 – 13
4. 齋藤充弘、宮川繁、澤芳樹. 再生医療・細胞治療のための細胞加工物評価技術 治療部位・疾患別の評価技術. シーエムシー出版. 2016
5. Miyagawa S, Domae K, Yoshikawa Y, Fukushima S, Nakamura T, Saito A, Sakata Y, Hamada S, Toda K, Pak K, Takeuchi M, Sawa Y. Phase I Clinical Trial of Autologous Stem Cell-Sheet Transplantation Therapy for Treating Cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc*. 2017 Apr 5;6(4). pii: e003918.
6. Masuda S, Miyagawa S, Nakamura T, Khurram MA, Sawa Y. Brentuximab vedotin for CD30-positive tumours. *Lancet Oncol*. 2016 Sep;17(9):e371.
7. Masuda S, Miyagawa S, Fukushima S, Nakamura T, Khurram MA, Ishikawa T, Saito A, Sawa Y. Expandable progenitors from induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cardiol*. 2016 Oct;13(10):574.
8. Yamamoto, H., Murata, K., Fukunaga, M., Ohnishi, T., Noura, S., Miyake, Y., Kato, T., Ohtsuka, M., Nakamura, Y., Takemasa, I., Mizushima, T., Ikeda, M., Ohue, M., Sekimoto, M., Nezu, R., Matsuura, N., Monden, M., Doki, Y., Mori, M. Micrometastasis Volume in Lymph Nodes Determines Disease Recurrence Rate of Stage II Colorectal Cancer: A Prospective Multicenter Trial. *Clin. Cancer, Res.*, 22(13):3201-3208, 2016.
9. Mikamori, M., Miyamoto, A., Asaoka, T., Maeda, S., Hama, N., Yamamoto, K., Hirao, M., Ikeda, M., Sekimoto, M., Doki, Y., Mori, M, Nakamori, S. Postoperative Changes in Body Composition After Pancreaticoduodenectomy Using Multifrequency Bioelectrical Impedance Analysis. *J. Gastrointest. Surg.* 20(3):611-618, 2016.
10. Yamamoto, H., Oshiro, R., Ohtsuka, M., Uemura, M., Haraguchi, N., Nishimura, J., Takemasa, I., Mizushima, T., Doki, Y., Mori, M. [Corrigendum] Distinct expression of C4.4A in colorectal cancer detected by different antibodies. *Int. J. Oncol.*, 49(5):2186, 2016.
11. Yamamoto, H., Mori, M. MicroRNAs as Therapeutic Targets and Colorectal Cancer Therapeutics. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 937:239-2347, 2016.
12. Wada, H., Eguchi, H., Noda, T., Ogawa, H., Yamada, D., Tomimaru, Y., Tomokuni, A., Asaoka, T., Kawamoto, K., Gotoh, K., Marubashi, S., Umeshita, K., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M. Selection criteria for hepatic resection in intermediate-stage (BCLC stage B) multiple hepatocellular carcinoma. *Surgery.*,

160(5):1227-1235, 2016.

13. Akita, H., Ritchie, SA., Takemasa, I., Eguchi, H., Pastural, E., Jin, W., Yamazaki, Y., Goodenowe, DB., Nagano, H., Monden, M., Mori, M., Doki, Y. Serum Metabolite Profiling for the Detection of Pancreatic Cancer: Results of a Large Independent Validation Study. *Pancreas*. 45(10):1418-1423, 2016.
14. Tanaka, K., Miyata, H., Sugimura, K., Kanemura, T., Hamada-Uematsu, M., Mizote, Y., Yamasaki, M., Wada, H., Nakajima, K., Takiguchi, S., Mori, M., Doki, Y., Tahara, H. Negative influence of programmed death-1-ligands on the survival of esophageal cancer patients treated with chemotherapy. *Cancer, Sci.*, 107(6):726-733, 2016.
15. Uemura, M., Kim, HM., Hata, T., Sakata, K., Okuyama, M., Takemoto, H., Fujii, H., Fukuzaki, T., Morita, T., Hata, T., Takemasa, I., Satoh, T., Mizushima, T., Doki, Y., Mori, M. First-line cetuximab-based chemotherapies for patients with advanced or metastatic KRAS wild-type colorectal cancer. *Mol. Clin. Oncol.*, 5(2):375-379, 2016.
16. Takahashi, H., Suzuki, Y., Nishimura, J., Haraguchi, N., Ohtsuka, M., Miyazaki, S., Uemura, M., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Yamamoto, H., Doki, Y., Mori, M. Characteristics of carbonic anhydrase 9 expressing cells in human intestinal crypt base. *Int. J. Oncol.*, 48(1):115-122, 2016.
17. Osawa, H., Takahashi, H., Nishimura, J., Ohta, K., Haraguchi, N., Hata, T., Yamamoto, H., Mizushima, T., Takemasa, I., Doki, Y., Mori, M. Full-length LGR5-positive cells have chemoresistant characteristics in colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, 114(11):1251-1260, 2016.
18. Ohtsuka, M., Ling, H., Ivan, C., Pichler, M., Matsushita, D., Goblirsch, M., Stiegelbauer, V., Shigeyasu, K., Zhang, X., Chen, M., Vidhu, F., Bartholomeusz, GA., Toiyama, Y., Kusunoki, M., Doki, Y., Mori, M., Song, S., Gunther, JR., Krishnan, S., Slaby, O., Goel, A., Ajani, JA., Radovich, M., Calin, GA. H19 Noncoding RNA, an Independent Prognostic Factor, Regulates Essential Rb-E2F and CDK8- β -Catenin Signaling in Colorectal Cancer. *EBioMedicine*. 13:113-124, 2016.
19. Mikami, J., Kurokawa, Y., Takahashi, T., Miyazaki, Y., Yamasaki, M., Miyata, H., Nakajima, K., Takiguchi, S., Mori, M., Doki, Y. Antitumor effect of antiplatelet agents in gastric cancer cells: an in vivo and in vitro study. *Gastric, Cancer*, 19(3):817-826, 2016.
20. Saito, T., Nishikawa, H., Wada, H., Nagano, Y., Sugiyama, D., Atarashi, K., Maeda, Y., Hamaguchi, M., Ohkura, N., Sato, E., Nagase, H., Nishimura, J., Yamamoto, H., Takiguchi, S., Tanoue, T., Suda, W., Morita, H., Hattori, M., Honda, K., Mori, M., Doki, Y., Sakaguchi, S. Two FOXP3(+)/CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat. Med.*, 22(6):679-684, 2016.
21. Sawada, G., Niida, A., Uchi, R., Hirata, H., Shimamura, T., Suzuki, Y., Shiraishi, Y., Chiba, K., Imoto, S., Takahashi, Y., Iwaya, T., Sudo, T., Hayashi, T., Takai, H., Kawasaki, Y., Matsukawa, T., Eguchi, H., Sugimachi, K., Tanaka, F., Suzuki, H., Yamamoto, K., Ishii, H., Shimizu, M., Yamazaki, H., Yamazaki, M., Tachimori, Y., Kajiyama, Y., Natsugoe, S., Fujita, H., Mafune, K., Tanaka, Y., Kelsell, DP., Scott, CA., Tsuji, S., Yachida, S., Shibata, T., Sugano, S., Doki, Y., Akiyama, T., Aburatani, H., Ogawa, S., Miyano, S., Mori, M., Mimori, K. Genomic Landscape of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a Japanese Population. *Gastroenterology*, 150(5):1171-1182, 2016.
22. Mokutani, Y., Uemura, M., Munakata, K., Okuzaki, D., Haraguchi, N., Takahashi, H., Nishimura, J., Hata, T., Murata, K., Takemasa, I., Mizushima, T., Doki, Y., Mori, M., Yamamoto H4,5. Down-Regulation of microRNA-132 is Associated with Poor Prognosis of Colorectal Cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 23(Suppl

- 5):599-608, 2016.
23. Munakata, K., Uemura, M., Tanaka, S., Kawai, K., Kitahara, T., Miyo, M., Kano, Y., Nishikawa, S., Fukusumi, T., Takahashi, Y., Hata, T., Nishimura, J., Takemasa, I., Mizushima, T., Ikenaga, M., Kato, T., Murata, K., Carethers, JM., Yamamoto, H., Doki, Y., Mori, M. Cancer Stem-like Properties in Colorectal Cancer Cells with Low Proteasome Activity. *Clin. Cancer Res.*, 22(21):5277-5286, 2016.
 24. Nakahara, Y., Yamasaki, M., Sawada, G., Miyazaki, Y., Makino, T., Takahashi, T., Kurokawa, Y., Nakajima, K., Takiguchi, S., Mimori, K., Mori, M., Doki, Y. Downregulation of SIRT4 Expression Is Associated with Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncology.*, 90(6):347-355, 2016.
 25. Hara, H., Takahashi, T., Serada, S., Fujimoto, M., Ohkawara, T., Nakatsuka, R., Harada, E., Nishigaki, T., Takahashi, Y., Nojima, S., Miyazaki, Y., Makino, T., Kurokawa, Y., Yamasaki, M., Miyata, H., Nakajima, K., Takiguchi, S., Morii, E., Mori, M., Doki, Y., Naka, T. Overexpression of glypican-1 implicates poor prognosis and their chemoresistance in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer.* 115(1):66-75, 2016.
 26. Miyo, M., Konno, M., Nishida, N. Sueda, T., Noguchi, K., Matsui, H., Colvin, H., Kawamoto, K., Koseki, J., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Gotoh, N., Mastuda, F., Saatoh, T., Mizushima, T., Shimizu, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Metabolic adaptation to nutritional stress in human colorectal cancer. *Sci Rep.*, 6:38415, 2016.
 27. Sakamoto, T., Kobayashi, S., Yamada, D., Nagano, H., Tomokuni, A., Tomimaru, Y., Noda, T., Gotoh, K., Asaoka, T., Wada, H., Kawamoto, K., Marubashi, S., Eguchi, H., Doki, Y., Mori, M. A Histone Deacetylase Inhibitor Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition and Attenuates Chemoresistance in Biliary Tract Cancer. *PLoS One.* 11(1):e0145985, 2016.
 28. Komatsu, H., Iguchi, T., Ueda, M., Nambara, S., Saito, T., Hirata, H., Sakimura, S., Takano, Y., Uchi, R., Shinden, Y., Eguchi, H., Masuda, T., Sugimachi, K., Eguchi, H., Doki, Y., Mori, M., Mimori, K. Clinical and biological significance of transcription termination factor, RNA polymerase I in human liver hepatocellular carcinoma. *Oncol, Rep.*, 35(4):2073-2080,2016
 29. Ueda, M., Iguchi, T., Masuda, T., Nakahara, Y., Hirata, H., Uchi, R., Niida, A., Momose, K., Sakimura, S., Chiba, K., Eguchi, H., Ito, S., Sugimachi, K., Yamasaki, M., Suzuki, Y., Miyano, S., Doki, Y., Mori, M., Mimori, K. Somatic mutations in plasma cell-free DNA are diagnostic markers for esophageal squamous cell carcinoma recurrence. *Oncotarget.*, 7(38):62280-62291, 2016.
 30. Wada, N., Kurokawa, Y., Takahashi, T., Hamakawa, T., Hirota, S., Naka, T., Miyazaki, Y., Makino, T., Yamasaki, M., Nakajima, K., Takiguchi, S., Mori, M., Doki, Y. Detecting Secondary C-KIT Mutations in the Peripheral Blood of Patients with Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumor. *Oncology.*, 90(2):112-117, 2016.
 31. Komatsu, H., Iguchi, T., Masuda, T., Ueda, M., Kidogami, S., Ogawa, Y., Nambara, S., Sato, K., Hu, Q., Saito, T., Hirata, H., Sakimura, S., Uchi, R., Hayashi, N., Ito, S., Eguchi, H., Sugimachi, K., Eguchi, H., Doki, Y., Mori, M., Mimori, K. HOXB7 Expression is a Novel Biomarker for Long-term Prognosis After Resection of Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer. Res.*, 36(6):2767-2773, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Translational research of Cell sheet-based myocardial regeneration therapy, symposium Miyagawa S, Sawa Y. The 24th Annual Meeting of Asian Society of Cardiovascular and Thoracic Surgery, 2016/4/6 国外
2. An Effective Practical Freezing Method of Human Induced Pluripotent Stem Cells Derived Cardiomyocytes Toward a Clinical Application, Poster, Ohashi F, Miyagawa S, Fukushima S, Imanishi Y, Yoshida S, Saito A, Masuda S, Iseoka H, Ito E, Sameshima T, Sato Y, Sawa Y. American Heart Association Scientific Sessions, 2016/11/14 国外
3. The development of cryo-ventrification method in human myoblast cell sheet for propagation of myocardial regeneration therapy, Poster, Ohkawara H, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Toda K, Nagashima H, Sawa Y. American Heart Association Scientific Sessions, 2016/11/14 国外
4. 心筋再生医療の現状と展望, 口頭(特別講演), 澤 芳樹, 第 199 回近畿外科学会, 2016/5/14, 国内
5. 外科領域における再生医療, 口頭(特別講演), 澤 芳樹, 第 41 回日本外科系連合学会学術集, 2016/6/16, 国内
6. 重症心不全に対する心筋再生治療の現状と展望, 口演, 澤 芳樹, 第 63 回麻酔科学会, 2016/5/26-28, 国内
7. 再生医療に鼓動を, 口演(特別講演), 澤 芳樹, 第 70 回日本食道学会, 2016/7/4-6, 国内
8. 再生医療の普遍的発展を目指して, 口演, 澤 芳樹, 第 16 回日本再生医療学会, 2017/3/8, 国内
9. 重症心不全に対する再生治療の現状と展望, 口演, 宮川 繁, 第 20 回日本心不全学会, 2016/10/7-9, 国内
10. 心不全外科学における再生医学の現状と展望～再生医学は心不全治療に変革をもたらすか?～, 口演, 宮川 繁, 第 116 回日本外科学会, 2016/4/14-16, 国内
11. 重症心不全に対する再生治療の現状と展望, 口演, 宮川 繁, 第 21 回日本冠動脈外科学会, 2016/7/14-15, 国内
12. 重症心不全における再生治療の現状と展望, 口演, 宮川 繁, 第 35 回日本移植学会, 2016/9/29-10/1, 国内
13. 臨床応用に向けたヒト iPS 細胞由来心筋細胞の凍結保存法の開発, ポスター, 大橋文哉, 宮川繁, 吉田昇平, 齋藤充弘, 福嶋五月, 増田茂夫, 伊東絵望子, 伊勢岡弘子, 石川烈, 鮫島正, 佐藤陽治, 澤芳樹, 第 16 回日本再生医療学会, 2017/3/7, 国内
14. iPS 細胞由来心筋細胞の臨床応用に向けた腫瘍原生 iPS 細胞の除去方法の検討, ポスター, 伊東絵望子, 宮川 繁, 福嶋五月, 武田真季, 皆巳和賢, 乾翔輝, 原田明希摩, 齋藤充弘, 澤芳樹, 第 16 回日本再生医療学会, 2017/3/7, 国内
15. 低毒性の糖脂質型界面活性剤を用いた凍結保護材の再生医療への応用, ポスター, 大河原弘達, 野上明日香, 石井七瀬, 龍見宗樹, 齋藤充弘, 竜瑞之, 平田善彦, 宮川繁, 澤芳樹, 第 16 回日本再生医療学会, 2017/3/7, 国内
16. ガラス化凍結法を用いた骨格筋筋が細胞シート長時間保存の検討, 口演, 大河原弘達, 宮川繁, 福嶋五月, 矢嶋真心, 齋藤充弘, 長嶋比呂志, 澤芳樹, 第 16 回日本再生医療学会, 2017/3/8, 国内

内

17. 未来へつなぐ消化器病学—消化器外科の立場から—, 特別発言, 森正樹, 京王プラザホテル, 第102回日本消化器病学会総会, 2016/4/21~23, 国内
18. JSGS-SSO International Symposium2016, 司会, Mori M, Seto Y, あわぎんホール, 第71回日本消化器外科学会総会, 2016/7/14~16, 国内
19. 消化器癌領域における指針の医療研究開発, 座長, 森正樹, 石岡千加史, パシフィコ横浜, 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/6~8, 国内
20. リキッドバイオプシー 最近の動向, モーニングレクチャー, 森正樹, パシフィコ横浜, 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/6~8, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

該当なし