

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 細胞の品質変動と実用化を目指した培養技術の標準化に関する研究
(英語) Research for quality variability and good cell culture practice of hiPSCs

研究開発担当者 (日本語) ヒト幹細胞応用開発室 招へいリーダー 古江 美保
所属 役職 氏名：(英語) Laboratory of Stem Cell Cultures, Visiting Project Leader, Miho K Furue

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) hiPS 細胞の未分化状態における品質変動の要因の検証ならびに培養による品質変動の自発分化能による評価

開発課題名：(英語) Verification of factors of quality variation in undifferentiated state of hiPS cells and evaluation of quality fluctuation during hiPS cells culture by spontaneous differentiation

研究開発分担者 (日本語) 長岡技術科学大学 技学研究院 技術科学イノベーション専攻・生物機能工学専攻(兼任)・准教授 大沼清

所属 役職 氏名：(英語) Kiyoshi Ohnuma, Associate professor, Department of Science of Technology Innovation, Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, Nagaoka University of Technology

分担研究 (日本語) ヒト iPS 細胞の樹立 ならびに ヒト iPS 細胞の培養による品質変動の遺伝子解析による評価

開発課題名：(英語) Establishment of human iPS cells and gene expression analysis of human iPS cells cultured with different manipulation techniques

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所創薬基盤研究部門 幹細胞工学研究グループ 上級主任研究員 栗崎 晃

所属 役職 氏名: (英 語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Biotechnology Research Institute For Drug Discovery, Senior Researcher, Akira Kurisaki

分担研究 (日本語) 種々の iPS 細胞を用いた中胚葉系細胞への分化効率の検証

開発課題名: (英 語) Evaluation of differentiation efficiency to mesodermal cells from various iPS cells

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 幹細胞制御プロジェクト プロジェクトリーダー 川端健二

所属 役職 氏名: (英 語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Laboratory of Stem Cell Regulation, Project Leader, Kenji Kawabata

分担研究 (日本語) hiPS 細胞から内胚葉への分化誘導法の標準化ならびに hiPS 細胞由来肝細胞様細胞の品質評価

開発課題名: (英 語) Standardization of definitive endoderm differentiation method / characterization of human iPS cell-derived hepatocytes

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院薬学研究科 准教授 櫻井文教

所属 役職 氏名: (英 語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Associate Professor, Fuminori Sakurai

分担研究 (日本語) iPS 細胞由来分化細胞の品質の検証

開発課題名: (英 語) Analysis of quality in hiPSC-derived differentiated cells

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所, トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト, プロジェクトリーダー, 山田 弘

所属 役職 氏名: (英 語) Toxicogenomics Informatics Project, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Project Leader, Hiroshi Yamada

分担研究 (日本語) 培養細胞を用いた薬効・安全性評価系構築のためのガイダンスの作成

開発課題名: (英 語) Good Cell Culture Practice for the use in basic research and drug developmental research

研究開発分担者 (日本語) 国立成育医療研究センター研究所薬剤治療研究部実験薬理研究室 中村和昭

所属 役職 氏名: (英 語) Kazuaki Nakamura, Division of Experimental Pharmacology, Department of Pharmacology, National Research Institute for Child Health and Development

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 古江リーダー（医薬基盤健康栄研）は、他の AMED の再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業「再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システムの開発/ヒト多能性幹細胞由来の再生医療製品製造システムの開発」において開発した形態評価法を用いて、品質が異常となったヒト iPS 細胞の形態を評価できることを確認し、論文発表した(Scientific Reports 6, Article number: 34009 (2016))。
- ・ 栗崎教授（元・産総研/現・奈良先端研）は、京大 CiRA により樹立された日本人由来 iPS 細胞株 iPS-TIG114-4f1 と同じドナー線維芽細胞 TIG-114 より、ゲノムインテグレーションフリーのセンダイウイルスを用いた樹立方法でヒト iPS 細胞株を複数樹立し、特に比較的良質な 2 株について解析を進め、Q-band 法と CHG アレイを用いて染色体異常が無いことを検証した。
- ・ 大沼清准教授（長岡技術科学大学工学部）らは、金森敏幸グループリーダー（産業総合研究所）らのグループと共に、ヒト iPS 細胞の細胞塊を培養するマイクロ流体培養器を開発し、効率的な分化能評価法の開発を完了した。また、コート材を変えることにより、接着、浮遊の両方培養が可能となり、様々な細胞の分化プロトコルに利用できることが示された。更に、細胞塊は個別のマイクロウェルに入るため、分化する過程を時間を追って観察することも可能となった。このシステムを用い、ヒト iPS 細胞の塊の大きさが異なると、分化も異なる事が示された(J Biosci Bioeng. 2017 pii: 1389-1723(16)30706-X.)
- ・ 古江リーダーは、国内外で発表されている神経系細胞への分化プロトコルを収集し情報の整理を完了した。これらの情報について AMED 後援・医薬基盤健康栄研主催シンポジウム 培養神経細胞の可能性「医薬品開発への応用を目指したモデル細胞の構築とその応用」の開催を行い、国内の iPS 細胞由来神経細胞を用いた研究の情報収集、意見交換を行った。
- ・ 古江リーダーは、EU 研究プロジェクトの薬剤安全性評価用神経幹細胞分化プロトコル UKN1 の検証実験を行い、その手順書を作成し、医薬基盤・健康・栄養研究所ウェブページに掲載を完了した。また、川端リーダー（医薬基盤健康栄研）ならびに櫻井准教授（大阪大学）は、国内外で発表されている中胚葉、内胚葉への分化誘導プロトコルを収集し、情報の整理を完了した。その中で実施可能な分化誘導プロトコルについて手順書を策定し、上記と同様にウェブページに掲載を完了した。
- ・ 櫻井准教授は、品質低下したヒト iPS 細胞を肝細胞へと分化誘導し、肝分化能再現性の検証を完了し、論文発表を行った(Stem Cells and Development, in press)。
- ・ 古江リーダー、関野教授、中村室長は、培養細胞を用いた薬効・安全性評価系構築のためのガイダンスのドラフトを作成することを目標として専門家によるワーキンググループ (WG) を立ち上げ、WG を開催した。まず、基礎研究、開発研究、応用研究を行う上で、細胞培養を用いる際に共通に重要だと考えられる基本的な考え方を「細胞培養における基本原則」案を作成し、論文投稿を行い、H29 年 4 月にアクセプトされ、H29 年度中にウェブ掲載される予定である。

We have developed a morphology analysis system which can non-invasively evaluate the quality of human pluripotent stem cells (hPSCs). We found that this analysis system could recognize the quality of hPSCs which has become poor by prolonged culture period.

We have established human iPS cell lines from human fibroblast TIG-114 using genome integration-free Sendai virus, which has been used to establish iPS-TIG114-4f1 by retroviral gene transfer method. We have confirmed that there was no aberration in chromosomes in these iPS cell

lines by Q-band method and CGH array. We also observed that manipulation of iPS cells affects the quality of these stem cells in vitro.

We have developed a microfluidic perfusion culture system for culturing aggregates of human iPS cells and completed developing an effective differentiation assay system. The system enabled both adhesion and floating culture by changing the coating matrix, suggesting that the system could be applied to various differentiation protocols. Furthermore, since the cell aggregates were loaded into compartmentalized micro wells, the system allowed to trace the differentiation process. We also demonstrated that the differentiation depended on the size of the human iPS cell aggregates. (J Biosci Bioeng. 2017 pii: 1389-1723 (16) 30706-X.)

We have collected the neural differentiation protocols which were reported previously. Then, these protocols in details were sorted out to be understood for researchers who are unfamiliar with stem cell research. Based on these information, we have proposed the suitable platform for pharmaceutical research using hPSCs in the symposium held by this AMED project. Further, the mesoderm and endoderm differentiation protocols were also collected and sorted out. These protocol lists and a standard procedure have been provided on the website of National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japan.

We performed hepatocyte differentiation of two human iPS cell lines (19-9-7T and 19-9-7Tab) with poor quality. The reproducibility of hepatocyte differentiation of these human iPS cell lines was examined, and obtained results were published in the scientific journal "Stem Cells and Development".

We have formed the working group of experts in cell biology or pharmacology to propose a guidance for development of assay system which can evaluate drug efficacy and safety using iPS cell culture system. Before that, with an aim of sharing the basic concepts for cell culture by researchers in Japan, the working group have proposed a guidance, "Fundamental principles of cell culture". The working group submitted this guidance as a review paper and now it was accepted by Tissue Culture Research Communications on April 2017. This "Fundamental principles of cell culture" will be appeared in WEB site within 2017.

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 3 件、国際誌 15 件)

海外

1. SUGA M, HAYASHI Y, FURUE M K. In Vitro Models of Cranial Neural Crest Development toward Toxicity Tests: 2016 Frog, Mouse and Human. Oral Dis. doi: 10.1111/odi.12523.
2. SUGA M, TACHIKAWA S, TATEYAMA D, OHNUMA K, FURUE M K. Imaging-cytometry revealed spatial heterogeneities of marker expression in undifferentiated human pluripotent stem cells. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 2016, 53(1): 83-91
3. HAYASHI Y, FURUE M K. Biological Effects of Culture Substrates on Human Pluripotent Stem Cells. Stem

4. KATO R, MATSUMOTO M, SASAKI H, JOTO R, OKADA M, IKEDA Y, KANIE K, SUGA M, KINEHARA M, YANAGIHARA K, LIU Y, YAMADA KU, FUKUDA T, KII H, UOZUMI T, HONDA H, KIYOTA Y, FURUE M K. Parametric analysis of colony morphology of non-labelled live human pluripotent stem cells for cell quality control. *Scientific Reports*.2016 doi:10.1038/srep34009
5. YANAGIHARA K, LIU Y, KANIE K, OKAMURA M, HIRATA M, FUKUDA T, SUGA M, NIKAWA H, KATO R, FURUE M K. Prediction of differentiation tendency toward hepatocytes from gene expression in undifferentiated human pluripotent stem cells. *Stem cells and development*. 2016 25(24):1884-1897.
6. FUKUDA T, TAKAYAMA K, HIRATA M, LIU Y, YANAGIHARA K, SUGA M, MIZUGUCHI H, FURUE M K. Isolation and Expansion of Human Pluripotent Stem Cell-derived Hepatic Progenitor-like Cells by Growth Factor Defined Serum-free Culture Conditions. 2017 *Exp Cell Res*. 15;352(2):333-345
7. KONDO, Y, HATTORI K, TASHIRO S, NAKATANI E, YOSHIMITSU R, SATOH T, SUGIURA S, KANAMORI T, OHNUMA K. "Compartmentalized microfluidic perfusion system to culture human induced pluripotent stem cell aggregates." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. (Accepted)
8. SUGIURA S, NAKAZAWA K, KANAMORI T, OHNUMA K. Application of Microfluidics in Stem Cell Culture, 2016, Chapter 03, Page 67-90, Book edited by: Dr. Xiao-Ying Yu, *Applications of Microfluidics*, InTech, Rijeka, Croatia, ISBN 978-953-51-2786-4, Print ISBN 978-953-51-2785-7, 420 pages,
9. NISHIMURA K, AIZAWA S, NUGROHO FL, SHIOMITSU E, TRAN YT, BUI PL, BORISOVA E, SAKURAGI Y, TAKADA H, KURISAKI A, HAYASHI Y, FUKUDA A, NAKANISHI M, HISATAKE K. A. Role for KLF4 in Promoting the Metabolic Shift via TCL1 during Induced Pluripotent Stem Cell Generation. *Stem Cell Reports*. 2017, 8(3): 787-801.
10. NOGUCHI TK, KURISAKI A. Formation of Stomach Tissue by Organoid Culture Using Mouse Embryonic Stem Cells. *Methods Mol Biol*. 2017; 1597: 217-228.
11. KOKUBU Y, YAMAGUCHI T, KAWABATA K. In vitro model of cerebral ischemia by using brain microvascular endothelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2017, 486, 577-83.
12. HANAWA M., TAKAYAMA K., SAKURAI F, TACHIBANA M, MIZUGUCHI H. Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha Promotes Definitive Endoderm Differentiation From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Reviews & Reports*, in press.
14. IMAGAWA K, TAKAYAMA K, ISOYAMA S, TANIKAWA K, SHINKAI M, HARADA K, TACHIBANA M, SAKURAI F, NOGUCHI E, HIRATA K, KAGE M, KAWABATA K., SUMAZAKI R., MIZUGUCHI H. Generation of a bile salt export pump deficiency model using patient-specific induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Scientific Reports* 2017 Feb 2;7:41806. ¹equally contributed
15. NAKAMURA K, AIZAWA K, AUNG KH, YAMAUCHI J, TANOUE A. Zebularine upregulates expression of CYP genes through inhibition of DNMT1 and PKR in HepG2 cells. *Sci Rep*. 2017 Jan 23;7:41093.

国内

1. 諫田泰成、中村和昭、山崎大樹、片岡健、青井貴之、中川誠人、藤井万紀子、阿久津英憲、末盛博文、浅香勲、中村幸夫、小島肇、関野祐子、古江-楠田 美保。
「細胞培養における基本原則」の提案 Tissue Culture Research Communications 組織培養研究 Vol. 36 (2017) No. 2 p. 13-19
2. マウス ES 細胞から胃組織の作製 野口隆明、栗崎 晃，実験医学 2016, 34(1):74-77.
3. 栗崎 晃，胃オルガノイド，実験医学増刊 2016, 34(17)，2899-2907.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

・AMED 後援シンポジウム 培養神経細胞の可能性「医薬品開発への応用を目指したモデル細胞の構築とその応用」を主催した。(平成 28 年 5 月 27 日 千里ライフサイエンスセンター)

古江美保 (医薬基盤・健康・栄養研究所・研究リーダー)

川端 健二 (医薬基盤・健康・栄養研究所・プロジェクトリーダー)

関野祐子 (国衛研・薬理部 部長)

詳細については、下記に個別記載。

・日本組織培養学会 シンポジウム「iPS 細胞の品質変動と実用化を目指した培養技術の標準化」
AMED 再生医療実用化研究事業 成果発表を主催した。(平成 28 年 5 月 25 日 千里ライフサイエンスセンター)

大沼 清 (長岡技術科学大学・准教授)

栗崎 晃 (産業技術総合研究所・上級主任研究員)

川端 健二 (医薬基盤・健康・栄養研究所・プロジェクトリーダー)

詳細については、下記に個別記載。

【国内学会：招待講演】

1. 「安全性薬理試験法への応用を目指したヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞の無血清培地開発」AMED 後援シンポジウム 培養神経細胞の可能性「医薬品開発への応用を目指したモデル細胞の構築とその応用」 口頭、古江-楠田美保、千里ライフサイエンスセンター (大阪)，2016/5/27，国内
2. Development and application of morphological evaluation for human pluripotent stem cells ヒト多能性幹細胞の形態評価測定法開発とその利用、口頭、古江-楠田美保、シンポジウム「培養細胞の形態を評価する」、日本組織培養学会第 89 回大会 千里ライフサイエンスセンター (大阪)、2016/5/25-26、国内
3. 教育研究システム委員会主催 細胞培養指導士講習会
片岡 健、古江-楠田美保、藤井 万紀子、上田 忠佳、鈴木 崇彦、浅香 勲、中村 和昭、その他、口頭、日本組織培養学会 第 89 回大会 千里ライフサイエンスセンター (大阪)、2016/5/25-26、国内

【国内学会：一般講演】

1. Development of a new cell-based-assay using human ES/iPS cell derived neural stem cells for developmental neurotoxicity testing. 口頭、SUGA M、KII H、UOZUMI T、KIYOTA

- Y、FURUE MK. 日本組織培養学会第 89 回大会 千里ライフサイエンスセンター（大阪）、2016/5/25-26、国内
2. ヒト ES/iPS 細胞の培養維持における染色体検査の重要性. ポスター、若林真理、上田直子、菅三佳、古江-楠田美保 ヒト ES/iPS 細胞の培養維持における染色体検査の重要性.” 日本組織培養学会第 89 回大会 千里ライフサイエンスセンター（大阪）、2016/5/25-26、国内
 3. ヒト iPS 細胞のフィーダーフリー／ゼノフリー培養、口頭、庄司信一郎、柳原佳奈、古江-楠田美保、塚原正義 日本組織培養学会第 89 回大会 千里ライフサイエンスセンター（大阪）、2016/5/25-26、国内
 4. iPS 細胞コロニーの画像情報解析を用いた培養手技の定量評価.、ポスター、長坂理沙子、蟹江慧、清田泰次郎、古江-楠田美保、本多裕之、加藤竜司 日本組織培養学会第 89 回大会 千里ライフサイエンスセンター（大阪）、2016/5/25-26、国内
 5. ヒト iPS 細胞の培養における増殖因子の生理活性測定法の開発 福田隆之、菅三佳、劉有容、平井雅子、末盛博文、古江-楠田美保、ポスター、日本組織培養学会第 89 回大会 千里ライフサイエンスセンター（大阪）、2016/5/25-26、国内
 10. 低密度培養における hiPS 細胞からの心筋細胞分化、ポスター、Minh Le、丸山 兼四朗、大沼 清、第 16 回日本再生医療学会総会、東北大学大学院医学系研究科、2017/3/7、国内
 6. ヒト iPS 細胞を用いたヒト原腸形成期における細胞運動の解析、ポスター、宮崎 翔太、中園 孝平、丸山 兼四朗、山本 悠太、藤井 修治、大沼 清、第 16 回日本再生医療学会総会、日本再生医療学会（仙台）、2017/3/7、国内
 7. ヒト iPS 細胞細胞分泌物の影響の評価」、ポスター、中谷 衣里、田代 将大、日馬 優太、佐藤 琢、杉浦 慎治、金森 敏幸、大沼 清、シンポジウム 細胞アッセイ技術の現状と将来、細胞アッセイ研究会（東京）、2017/1/31、国内
 13. ヒト体軸の in f l u i d 再構築：マイクロ流路による幹細胞分化制御因子の移動制御」、口頭、大沼 清、第 2 回ダブル・ピークの会、筑波山ホテル青木屋（茨城県）、2017/1/28、国内
 8. Effect of thalidomide toxicity on the development of human embryos using human iPSCs 「ヒト iPS 細胞を用いたヒト胎児の発達におけるサリドマイドの影響についての解析」、ポスター、TACHIKAWA S、OHNUMA K、国際会議 STI-Gigaku 2017、International conference of “Science of Technology Innovation” 2017、長岡技術科学大学（長岡）、2017/1/5、国内
 9. 蛍光タンパク質によるヒト iPS 細胞の運動解析、ポスター、丸山 兼四朗、中園 孝平、太刀川 彩保子、宮崎翔太、山本 悠太、大沼 清、第 5 回北陸信越若手研究発表会、日本バイオマテリアル学会（長岡）、2016/12/9、国内
 10. マイクロ灌流培養器によるヒト iPS 細胞の灌流培養、ポスター、中谷 衣里、近藤 祐樹、吉満 亮介、服部 浩二、佐藤 琢、杉浦 慎治、金森 敏幸、大沼 清、第 3 回ナノバイオセラミックスによる細胞機能制御テクノロジー、日本セラミックス協会 ナノバイオセラミックスによる細胞機能テクノロジー研究会（長岡）、2016/12/8、国内
 11. ヒトの原腸形成時の細胞運動を in vitro で一細胞解析、ポスター、宮崎 翔太、丸山 兼四朗、” Single cell tracking of migration during human gastrulation in vitro”、2016 年日本生物物理学会第 54 回年会、一般社団法人 日本生物物理学会（つくば）、2016/11/25、国内

12. Single Cell Tracking Of Migration During Human Gastrulation In Vitro 、ポスター、MIYAZAKI S, YAMAMOTO Y, NAKAZONO K, TUYET L M N, FUJII S, OHNUMA K, International Conference on Single Cell Research 2016, The University of Tokyo (Tokyo), 2016 年 11 月 16 日, 国内
13. ROCK inhibitor and insulin enhance cell proliferation in heart cell generation from human iPS cell at low density、ポスター、MINH L, OHNUMA K、第 5 回国際技学カンファレンス in 長岡、長岡技術科学大学、2016/10/7 国内
14. ヒト iPS 細胞の細胞分泌物の影響と評価 、ポスター、日馬 優太、田代 将太、佐藤 琢、杉浦 慎治、金森 敏幸、大沼 清、化学とマイクロ・ナノシステム学会第 34 回、化学とマイクロ・ナノシステム学会 (千葉)、2016/9/7 国内
15. サリドマイドがヒト iPS 細胞の分化に及ぼす影響についての解析、ポスター、太刀川 彩保子、大沼 清、第 57 回新潟生化学懇話会、新潟大学医歯学総合研究科分子遺伝学分野 (第一生化)、2016/6/2、国内
16. ヒトの原腸形成期の細胞運動の定量、ポスター、山本 悠太、加納 歩、宮崎 翔太、中園 孝平、藤井 修治、大沼 清、第 23 回 HAB 研究機構 学術年会 (つくば産業技術総合研究所、つくば)、2016/5/27、国内
17. ヒト多能性幹細胞の継代作業における酵素処理の影響、ポスター、大沼 清、日本組織培養学会第 89 回大会、シンポジウム 2 「iPS 細胞の品質変動と実用化を目指した培養技術の標準化」、千里ライフサイエンスセンター (大阪)、28/5/25、国内
18. ミニ胃組織オーガノイドを用いた創薬応用、口頭、栗崎 晃、バイオジャパン (横浜)、2016/10/12、国内
19. 樹立法の違いによるヒト iPS 細胞の品質と分化への影響、口頭、栗崎 晃、山川哲生、久保陽子、大高真奈美、中西真人、第 89 回 日本組織培養学会総会 シンポジウム (大阪)、2016/5/26、国内
20. ヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞を利用した in vitro 熱中症モデルの構築、ポスター、山口 朋子、國分 康博、西島 美妙江、清水 健太郎、小倉 裕司、川端 健二、日本薬学会第 137 年会、仙台、2017/3/24-27、国内
21. In vitro 血液脳関門モデルの作製に向けた脳特異的ペリサイト分化誘導法の開発、ポスター、國分 康博、山口 朋子、西島 美妙江、川端健二、第 16 回日本再生医療学会総会、仙台、2017/3/7-9、国内
22. 組成が明らかな培養条件でのヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製とその品質評価、高山 和雄、萩原 康子、関口 清俊、櫻井 文教、水口 裕之、ポスター、第 23 回肝細胞研究会、大阪、2016/7/7-8、国内
23. ラミニンアイソフォームを駆使したヒト iPS 細胞から肝細胞および胆管上皮細胞への分化誘導、ポスター、高山 和雄、萩原 康子、関口 清俊、櫻井 文教、水口 裕之、第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016/11/30-12/2
24. 雌性ラットにおける遺伝子発現プロファイルの解析、ポスター、中津 則之、五十嵐 芳暢、山田 弘、第 43 回日本毒性学会学術年会、2016/6/29、国内。
25. 大規模トキシコゲノミクスデータベースを用いた免疫抑制化合物予測モデルの構築、ポスター、五十嵐 芳暢、中津 則之、山田 弘、第 43 回日本毒性学会学術年会、2016/6/29、国内。
26. 末梢血ヒト化マウスを用いたインフルエンザワクチン・アジュバントの新規安全性評価法開発の試み、口頭、佐々木 永太、水上 拓郎、百瀬 暖佳、古畑 啓子、高井 麻海子、蒲池 一成、山田 弘、石

井 健、濱口 功、第 43 回日本毒性学会学術年会、2016/6/30、国内。

27. トキシコゲノミクスを応用した次世代経鼻粘膜投与インフルエンザワクチンおよびアジュバントの安全性評価法の開発、口頭、水上 拓郎、佐々木 永太、百瀬 暖佳、倉光 球、高井 麻海子、古畑 啓子、蒲地 一成、山田 弘、石井 健、浜口 功、第 43 回日本毒性学会学術年会、2016/6/30、国内。
28. 毒性オミクス・バイオマーカー、山田 弘、口頭、第 19 回日本毒性学会基礎教育講習会、2016/8/5、国内。
29. 創薬・疾患研究への活用に向けたデータベース連携、ポスター、坂手 龍一、深川 明子、水口 賢司、山田 弘、塩谷 恭子、松田 潤一郎、宮本 恵宏、梅垣 敬三、小原 有弘、松山 晃文、トーゴの日シンポジウム 2016、2016/10/5、国内。
30. トキシコゲノミクスデータの統合化を目指した Open TG-GATEs の再 RDF 化について、ポスター、五十嵐 芳暢、伊藤 真和吏、川島 秀一、山田 弘、水口 賢司、トーゴの日シンポジウム 2016、2016/10/6、国内。
31. 肝毒性予測のためのインフォマティクスシステム構築に関する研究、口頭、山田 弘、CBI 学会年大会、2016/10/27、国内。
32. トキシコゲノミクスによるアジュバント安全性バイオマーカーの開発、口頭、山田 弘、五十嵐 芳暢、中津 則之、第 10 回次世代アジュバント研究会、2017/1/24、国内。
33. トキシコゲノミクスによるアジュバント安全性バイオマーカーの開発、ポスター、五十嵐 芳暢、中津 則之、山田 弘、第 10 回次世代アジュバント研究会、2017/1/24、国内。
34. 教育研究システム委員会主催 細胞培養指導士講習会 Program for cell culturists and the instructors for cell culturing organized by the JTCA education & research committee、口頭、片岡 健、古江-楠田美保、藤井 万紀子、上田 忠佳、鈴木 崇彦、浅香 勲、中村 和昭、その他、日本組織培養学会第 89 回大会 千里ライフサイエンスセンター (大阪)、2016/5/26、国内
35. 高機能肝細胞培養系の検討と毒性評価系開発の試み、口頭、中村 和昭、日本組織培養学会第 89 回大会 千里ライフサイエンスセンター (大阪)、2016/5/26、国内

【国際学会：一般講演】

1. Development of a New Cell-based Assay Using Human ES/iPS Cell-derived Neural Stem Cells for Developmental Neurotoxicity (DNT) Testing.、口頭、SUGA M., KII H., UOZUMI T., KIYOTA Y, FURUE M K.、World Congress on In Vitro Biology 2016, San Diego, California, USA、2016.06.11-1、国外
2. A Predictive Modeling Of Hepatic Differentiation Propensity In Human Pluripotent Stem Cells ISSCR 2016 ANNUAL MEETING SAN FRANCISCO CALIFORNIA USA、ポスター、FUKUDA T. 2016.06.22-25、国外
3. The Role Of The Signaling Factors On Differentiation Of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Crest Stem Cells、ポスター、SUGA M, MIMURA S, OKADA K, KINEHARA M, NIKAWA H, FURUE M K.、ISSCR 2016 ANNUAL MEETING SAN FRANCISCO CALIFORNIA USA 2016.06.22-25、国外
4. Xeno-Free Suspension Culture of Human Induced Pluripotent Stem Cells、ポスター、SHOJI S., YANAGIHARA K., FURUE M K. TSUKAHARA M, ISSCR 2016 ANNUAL MEETING SAN FRANCISCO CALIFORNIA USA. 2016.06.22-25、国外

5. Development of Xeno-Free medium for Human iPS cell culture systems ポスター YANAGIHARA K, SHOJI S, FURUE M K, TSUKAHARA M. ISSCR 2016 ANNUAL MEETING SAN FRANCISCO CALIFORNIA USA 2016.06.22-25、国外
6. Image-based Real-time Monitoring Method for Evaluating Undifferentiation Status of Induced Pluripotent Stem Cells Culture. ポスター、YOSHIDA K., NAGASAKA R., KANIE K., KIYOTA Y., FURUE MK, HONDA H., SHIMIZU K., KATO R, TERMIS-AP 2016 Fullon Hotel Tamsui Fishermen's Wharf Taiwan (R.O.C) 2016.09.04、国外
8. MIMICKING HEAD-TAIL FORMATION OF THE HUMAN EMBRYO IN AN ELONGATED MICROPERFUSION CULTURE SYSTEM 、ポスター、TASHIRO S, KUSAMA Y, NAKATANI E, SATO T, SUGIURA S, KANAMORI T, OHNUMA K、国際会議 MicroTAS 2016、MicroTAS 2016 Conference、2016/10/9 アイルランド(ダブリン) 、国外
9. Maturation of human iPS cell-derived brain microvascular endothelial cells for in vitro blood brain barrier model. ポスター、YAMAGUCHI T, NISHIJIMA M, KAWABATA K. International Society for Stem Cell Research 14th Annual Meeting, San Francisco, U.S.A., June, 2016, 国外
10. Regulation of Cell Death and Cell-specific Functions by Inhibition of DNA Methylation、口頭、NAKAMURA K, TANOUE A、The 2016 World Congress on In Vitro Biology、2016/6/12、国外

【学会以外のセミナー、講演会等】

1. 古江一楠田美保

“化学物質の発生神経毒性の検出を目標とするヒト iPS 細胞を利用した非侵襲的 in vitro 評価系の開発”、22 世紀先端研究セミナー クロスオフィス内幸町(東京)、2016/10/21

2. 古江一楠田美保

“創薬応用に向けた iPS 細胞の品質管理と培養技術向上の必要性” 治療・創薬応用に向けた幹細胞の品質評価と安定的培養技術、神戸臨床研究情報センター (兵庫)、2016/12/5

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「iPS 細胞を見てみよう」 古江 美保、医薬基盤研究所一般公開、2016/11/19、国内
2. 「ヒト iPS 細胞 と アインシュタイン の 関係式」、大沼 清、夢ナビライブ 2016 講義ライブ、東京ビックサイト (東京) 2016/7/9、国内
3. 「ヒト iPS 細胞 と アインシュタイン の 関係式」、大沼 清、夢ナビライブ 2016 夢ナビ TALK、東京ビックサイト (東京) 2016/7/9、国内
4. 「いろいろな細胞に変化する“幹細胞”って何だろう?」、川端 健二、医薬基盤研究所一般公開、2016/11/19、国内

(4) 特許出願

なし

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
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
補助事業課題名：（日本語）hiPS 細胞由来神経系細胞の薬効・安全性評価系への応用を目指した基盤整備

（英 語）Infrastructure development for safety pharmacology using
human iPSC-derived neurons

補助事業担当者 （日本語）現所属 東京大学薬学部 特任教授 関野祐子
旧所属 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部部長

所属 役職 氏名：（英 語）Present: Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University
of Tokyo

Previous: National Institute of Health Sciences, Visiting Scientist
Yuko Sekino

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要

・古江研究リーダー（医薬基盤健康研）、中村室長（成育医療センター）らとともに、細胞培養、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞に精通した専門家・有識者を委員としたワーキンググループを組織し、「細胞培養の基本原則」案をまとめ、投稿原稿を完了した。

・基本原則（案）をまとめるにあたり、培養細胞等を用いた in vitro 試験法に関する海外のガイダンス Good Cell Culture Practice に関して国際動向を調査した。

・hiPS 細胞由来神経幹細胞を用いた薬効・安全性評価に必要なプラットフォームの想定を行い、古江研究リーダーが主催したシンポジウムにて発表を行い、国内関連研究者と意見交換を行った。

・The steering committee led by Dr. Furue has established a working group to publish a guide for 'The Principles for Good Cell Culture Practice' (GCCP) with Japanese stakeholders consisting of relevant Japanese academic societies, AMED as the funding agency, and the relevant ministries of the Japanese government. Such GCCP principles are necessary for the improvement of the cell culture

technique of the researchers and technicians, and for increasing the reproducibility and robustness of in vitro test methods, not only in basic studies, but also for toxicity test.

・ Prior to our committee's first draft of the proposal, we investigated recent international developments related to in vitro toxicology testing using cell cultures. We found that there have been attempts to revise the GCCP to include new technologies in stem cell research. Based on these developments, we will commit our principles to the international society for international standardization. We have summarized these basic principles for the treatment of cultures cells and completed a draft to submit.

・ Furthermore, we have reviewed our technology using human iPSC derived cardiomyocytes and neurons for pharmacological studies for efficacy and safety, and gave a talk at the symposium held by Dr. Furue where we exchanged opinions and information to establish principles for the next step..

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 2 件、国際誌 4 件)

国内誌

1. 井出吉紀, 山崎大樹, 諫田泰成, 関野祐子. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の活動電位イメージングの測定装置と実験プロトコルの開発. 国立医薬品食品衛生研究所報告特論. 2016, 134, 9-16.
2. Kanda Y, Yamazaki D, Sekino Y. Development of new pharmacological test methods using human iPS cell-derived cardiomyocytes. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2017, 149, 110-114.

国際誌

1. Colatsky T, Fermini B, Gintant G, Pierson JB, Sager P, Sekino Y, Strauss DG, Stockbridge N. The Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) initiative - Update on progress. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016 Sep-Oct;81:15-20.
2. Kanda Y, Yamazaki D, Kurokawa J, Inutsuka T, Sekino Y. Points to consider for a validation study of iPS cell-derived cardiomyocytes using a multi-electrode array system. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016 Sep-Oct;81:196-200.
3. Pamies D, Bal-Price A, Simeonov A, Tagle D, Allen D, Gerhold D, Yin D, Pistollato F, Inutsuka T, Sullivan K, Stacey G, Salem H, Leist M, Daneshian M, Vemuri MC, McFarland R, Coecke S, Fitzpatrick SC, Lakshmipathy U, Mack A, Wang WB, Yamazaki D, Sekino Y, Kanda Y, Smirnova L, Hartung T. Good Cell Culture Practice for stem cells and stem-cell-derived models. *ALTEX*. 2017;34(1):95-132.
4. Shirao T, Hanamura K, Koganezawa N, Ishizuka Y, Yamazaki H, Sekino Y. The role of drebrin in neurons. *J Neurochem*. 2017 Feb 15. doi: 10.1111/jnc.13988. [Epub ahead of print] Review.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

国内学会

1. Development of high-efficient differentiation protocols from human iPS cells to glutamatergic or GABAergic neural progenitor cells ポスター 久保祐亮, 山田茂, 犬塚隆志, 諫田泰成, 関野祐子, 第14回幹細胞シンポジウム、2016年5月20日、兵庫
2. ヒト iPS 心筋細胞を利用した不整脈性リスク評価と ICHS7B 改訂に関する国際動向について, 関野祐子, 諫田泰成, 第43回日本毒性学会学術年会、2016/6, 国内
3. ヒト iPS 心筋と MEA システムによる新規薬剤誘発性 TdP リスク評価, 口頭, 山崎大樹、諫田泰成、関野祐子, 筋生理の集い、2016/12, 国内

国際学会

1. Cardiac Safety Assessment Methods for Human iPSC-Derived Cardiomyocytes: A Voltage Sensitive Dye Imaging with a High-speed CMOS Sensor and a Non-staining Imaging with Polarizers (ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた心臓安全性評価法: 高速 CMOS センサーによる膜電位感受性色素イメージングと偏光板による無染色イメージング), ポスター, Yoshinori Ide, Michinori Ichikawa, Mariko Kobayashi, Kenji Tsubokura, Daiju Yamazaki, Yasunari Kanda, Yuko Sekino, The 2016 SPS/CSPT/JSPS Joint Meeting, 2016/9/19-20, 国外
2. Toward a proposal of the revised ICH S7B: Update of the activities of Japan iPS cardiac safety assessment (JiCSA) and CiPA, 口頭, Yasunari Kanda and Yuko Sekino, 5th Chinese Safety Pharmacology Symposium, 2016/5/25-28, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

・本研究の応用としての「iPS 細胞を用いた in vitro 試験法」に関して、その有用性についてのシンポジウム講演を行った。

1. 培養神経細胞を使った薬理試験法開発と公定化のストラテジー、シンポジウム 培養神経細胞の可能性「医薬品開発への応用を目指したモデル細胞の構築とその応用 AMED 後援シンポジウム 千里ライフサイエンスセンター (2016.05.27) 大阪
2. ICH ガイドライン S7B/E14 の改訂に向けた国際協調、「ヒト iPS 分化細胞技術を活用した医薬品の次世代毒性・安全性評価試験系の開発と国際標準化に関する研究」研究班／第4回 心臓安全性に関するシンクタンクミーティング 2017 合同公開シンポジウム 東京大学弥生講堂一条ホール (2017.02.09) 東京
3. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞と神経細胞をもちいた薬理試験法開発の最近の動向 北里大学第38回白金シンポジウム「創薬と薬効・安全性評価における iPS 細胞活用の最前線」(2017.02.28)

・海外において、日本の当該研究の取り組みを紹介した。

1. Sekino, Y.: Assessment of Concentration-Dependent Drug-Induced Repolarization Delay and Arrhythmias in an iPS Cell-Derived Cardiomyocytes Model. The Use of Cardiomyocytes

for the Assessment of Proarrhythmic Risk, Society of Toxicology (2016.10.25-26) Virginia USA

2. Sekino, Y.: Activity of Japan iPS Cardiac Safety Assessment (JiCSA) Toward the New Strategy of the Safety Pharmacology. 4th Cardio Symposium (2016.09.16-17) Vancouver, Canada

- ・日本安全性薬理研究会学術年会（平成 27 年 2 月 10 日 11 日に開催）の前日に開催された、「ヒト iPS 分化細胞技術を活用した医薬品の次世代毒性・安全性評価試験系の開発と国際標準化に関する研究」研究班／第 4 回 心臓安全性に関するシンクタンクミーティング 2017 合同公開シンポジウムのプログラム作成委員として、「ヒト iPS 細胞由来神経細胞を利用した研究の紹介」を提案し、国民に対して標本作製技術の最新動向を紹介するとともに新たな薬効薬理試験法の開発の可能性に関する議論の機会を提供した。

- ・製薬関係技術に関する読者を抱える、技術情報協会出版の本に執筆を行い、品質の評価の大切さについて述べた。

関野祐子「医薬品の安全性評価法へのヒト iPS 細胞由来分化細胞の利用」iPS 細胞の 安全・高品質な作製技術 技術情報協会出版 pp. 101-109 (2016)

- ・新聞社のインタビューに対応し、本研究課題をふくみ、iPS 細胞の創薬利用の重要性と、国プロジェクトの研究目的について国民への説明を行った。 日本経済新聞社、共同通信社、日本工業新聞社

（４）特許出願 なし