

第15回岐阜大学大学院医学系研究科ヒトES細胞に関する倫理審査委員会議事録

1. 日 時 平成28年9月7日(水) 15:00~16:00

2. 場 所 医学部本館1階入札室

3. 出席者 塚田委員長, 森重委員, 田辺委員, 丹羽委員, 矢島委員, 住浜委員

4. 議 題

- (1) 岐阜大学大学院医学系研究科ヒトES細胞使用に関する規程の一部改正について
- (2) 岐阜大学大学院医学系研究科ヒトES細胞に関する倫理審査委員会細則の一部改正について
- (3) 「ヒトES細胞由来ルブリシン発現細胞を用いた軟骨および腱鞘の再生医療」について
- (4) その他

5. 議 事

【塚田委員長】 それでは時間が参りましたので、第15回のヒトES細胞に関する倫理審査委員会を開催します。

まず、議題でございますけども、指針等の改正等もありましたので、資料1、当研究科のヒトES細胞使用に関する規程を見直しました。国の指針に合わせたものに整理させていただきました。赤字にかかれたところが追加、または削除のものでございます。特段、指針以上、指針を超えるような、また指針に定めていないことは追加するようなことはしておりませんよろしいですか。

(発言なし)

では委員会としては新しい規程、それから資料2のそれに基づく細則をお認めいただくということで記録に残します。ではこの新しい規程、細則にのっとなって、審議を進めていくということでございます。

次に、議題にはありませんが、机上配布をいたしました、ヒトES細胞使用の進行状況の調査ということで、毎年、実験室等の立ち入り調査、それから主任研究者からの報告を受けております。8月24日に行いましたので、その内容を研究科長にはすでに指針の求めに応じて報告を上げておりますが、一応この委員会にもご報告をいたします。1枚めくっていただきたいのでありますが、私、それから住浜委員、それから事務2名を入れて立ち入り調査をいたしました。例年のごとく、鍵の保管、ヒトES細胞の保管している部屋のセキュリティ、細胞の保管状況、各実験機器、大体例年通りとおなじ環境下で使用・保管されておりました。また入退室やセキュリティ関係も例年通り遺漏なく管理されていることが確認できました。1ページ目に戻っていただきますが、國貞教授から、今後もヒトES細胞を用いた研究、それからiPS研究に対するコントロールとして使用していくと

ということで、継続して使用・保管をしていきたい、それから他の研究分野とも共同研究が広がっていくわけでありませうけれども、そういう体制も維持していきたいという風に前向きのご報告がございました。いかがでしょうか。もう研究科長には正式な報告書は上げておりますが、委員会として何かありますか。よろしゅうございますか。

(発言なし)

ありがとうございます。進捗状況についての報告をいたしました。

では、今日の本題であります、資料3ですね、ヒト ES 細胞の使用の計画申請がございましたので、その審議に入ります。

(河村研究者・佐竹研究者 入室)

研究計画の説明をお願いいたします。

【研究者（佐竹）】整形外科の大学院生、佐竹といいます。計画書に沿って説明しますが、計画名はヒト ES 細胞由来ルブリシン発現細胞を用いた軟骨および腱鞘の再生医療ということになります。ページの研究の背景ですが、高齢者人口の増加に伴い、軟骨の摩耗と変性を主因とする変形性関節症が急増しています。変形性関節症には、現在、人工関節置換術が多く行われていますが、近年では軟骨を温存・再生する治療への変化の兆しがみられます。運動器の疼痛を訴える患者さんのうち、実に約30%が腱疾患、腱炎や、腱鞘炎に起因すると報告されていますし、またテニス肘やアキレス腱炎などでは、通常保存的な治療が適応されますが、難治例に対する有効的な薬物治療は存在せず、また確立された手術方法もないのが現状です。そこで今回の研究上の目的としまして、関節軟骨および腱が正常に機能するためには、低摩擦かつ円滑な滑走を維持することが不可欠となってきます。軟骨摩耗や腱鞘炎は主に摩擦抵抗の増加に起因するものです。関節軟骨や腱-腱鞘の円滑な滑走には、粘弾性を供する様々な糖タンパクによりもたらされますが、その中でも PRG4 という遺伝子にコードされるルブリシンというたんぱく質が重要な働きを有することが知られています。分子量 345KDa の高分子量のタンパク質であり、主に関節軟骨の表層細胞、また腱細胞、腱鞘滑膜細胞から分泌されています。そのルブリシンを使用した軟骨疾患治療が注目されていますが、分子量が大きいこともあり、組み換え型ルブリシンの生成が難しいため、局所注射などの実用化は現在されておりません。

そこでヒト ES 細胞を用いて分化誘導を行い、関節軟骨および腱に潤滑性を与えるルブリシンを分泌する細胞を作製し、それらを動物実験に移植することにより、有効性、安全性の確認することを研究の目的としております。その下の必要性に関しては、同様の研究はマウスの ES 細胞の方で現在すでに行っています。将来的に再生医療に資するために、ヒト ES 細胞で用いた場合でも同様の成果が得られるか再現性の確認を行う必要があると考えます。それらの結果を踏まえて、より高効率な分化誘導法を開発することになります

方法としましては、ヒト ES 細胞の培養・維持が一番にきまして、マウスフィーダー細胞を用いて、ヒト ES 細胞を培養・維持する。それで、専用の培養液を用いてインキュベーター内で ES 細胞は培養・維持を行います。続いて、ルブリシン発現細胞への分化を進めていきますが、添付資料2のところ簡単な図がありますが、独自に開発した分化用培地を用いて培養を行い、効率的な分化

誘導等を模索していきます。簡単には、ES 細胞をまず中胚葉へと分化誘導させるための培養液を作成し、インキュベーター内で培養を行います。続いて中胚葉へ誘導された細胞に対してルブリシン発現細胞への分化誘導させるための培養液を作成、インキュベーター内で培養を行っていきます。次に3番としまして、遺伝子発現解析を行っていきます。分化過程における遺伝子発現ルブリシンを高度する PRG4 の変化を定量的に解析します。分化誘導を行ったルブリシン発現細胞から RNA 及びタンパク質を抽出し、解析を行います。また、4番としまして、マウスへ分化細胞の注射実験を行い、当該細胞がマウス固体内で短期間着生し、ルブリシンを発現するかを解析します。これに関しては、病理組織標本を作成、解析を行います。

使用機関の基準に関する説明に関しては、研究に関する実際の実験室の状態は添付資料1にありますが、こちらは整形外科の実験室になりますので、その右上のところ、実験室Cのところが実際の研究室になります。インキュベーター、クリーンベンチがそこにありまして、そのほかに遺伝子解析を行うための RealtimePCR や、病理組織標本を見るための光学顕微鏡などは、添付資料1の左側の方に設置されています。ヒト ES 細胞の保管庫に関しては、実験室Cのところがありまして、施錠する事ができ、無断で持ち出しができないような管理体制をとります。また、ヒト ES 細胞の取り扱いに係る講習会は先日受講しましたが、そちらの方を受けまして、ヒト ES 細胞の取り扱いに関する倫理や、最新の研究成果の周知を図っております。

役割分担者としては、使用責任者が秋山教授で、実際の研究者としまして、河村先生と私、佐竹になります。

あと、似たような研究の流れを示せるものということでしたので、添付資料3が骨芽細胞の方の分化誘導を行った研究になるんですが、それを添付させていただきました。こちらは骨芽細胞の方をマウスの iPS と ES 細胞を使って、骨芽細胞にもっていく分化誘導のプロトコルを作りまして、それをヒトの、これは ES を使っていないのですが、ヒトの iPS でも同様のプロトコルを用いて分化誘導が確立されているかどうかを、確認を進めていったというタイプの論文の資料になります。ですので、内容は異なってきますけども、例えば figure.1 の1番下のDのところにあるような Day0、Day5、Day19 のこの流れのような形で、私たちの研究の場合も途中で分化誘導を進めるためのサイトカインを加えた培養液を作りまして、順番に、最後は Osteoblast ではなくて、ルブリシン発現細胞という形でもっていきます。

～類似研究論文の説明 中略～

現在のところ、私たちの研究所では、マウスの ES 細胞のプロトコルを確立しているところですので、そちらと同じ流れをヒトの ES 細胞のところと同様に研究を進めたいと考えております。このコンコーサ染色で、個々で誘導を確認しているといったような作業、また免疫染色で確認している作業のところを、実験動物マウスのほうへ細胞注射をしまして、そこでの病理組織標本で免疫染色を確認していくことで、実際に接着したかどうかの確認というふうに我々の研究の場合はなってきます。

【塚田委員長】はい。確認であります。今回の研究に使うヒト ES 細胞というのは、この研究計画書にあります、國貞研から提供してもらうということですね。

【研究者（佐竹）】はい。

【塚田委員長】それからですね、実験の体制であります、8ページのところに整形外科の実験室、4階N02室と書いてあるわけですが、この図面通りに準備ができていますか。

【研究者（佐竹）】この図面が書かれたとおりになっています。

【塚田委員長】いま、ある。現状。

【研究者（佐竹）】あります。

【塚田委員長】新規の研究なので、この後、委員全員で4階へ行って、現場の見取り図の通りであることの確認をします。あと、実験の内容等について、委員からの質疑応答をお願いします。

【A委員】確認ですが、今のお話だと、このルブリシン発現細胞への分化誘導というのは、まだマウスES細胞において、方法の確立中であるということか。

【研究者（佐竹）】いや、マウスの方ではできていると考えます。

【A委員】それをヒトESでやる。

【研究者（佐竹）】はい。ヒトのESで。

【A委員】こういう質問をするのは当委員会でも適切かどうか分かりませんが、なぜヒトESを使うのですか。iPSではなく。

【研究者（佐竹）】iPSの方でも同等の研究を行いますが、この添付資料を見ても、iPSとESを比べるとどうしても、効率が少し落ちるといえるか、そういう傾向もあつたりしますので、ESできちんとできたことをiPSでできるかということ、両方で比較を行いたいということと、あとはiPSのコントロール対象として、やはりESで同じことがちゃんとできるかということこのコントロールとして用いたいという思いがありまして、iPSでも同様に行いますけども、ES細胞も用いて研究を考えました。

【A委員】後で部屋の確認に行くという話ですが、実験室Cの部分を実際にES細胞の培養に使うと。鍵とかの管理、どの部分を施錠するとかいうのは。

【塚田委員長】それは、現場で確認しましょう。

【B 委員】 この実験室 4N02 という部屋は、ES 細胞のみを扱う部屋ですか。

【研究者（佐竹）】 いや、整形外科の研究室が 4N02 全体なので。

【B 委員】 この実験室 C は ES のみを扱う。

【研究者（佐竹）】 そのように考えています。

【B 委員】 他の細胞とかは使わない。専用に使っておられるのが実験室 C になるのですね。

【研究者（佐竹）】 今の段階では、実際のところはマウスの ES 細胞であったり iPS 細胞であったりという形になりますが、なので、基本的には実験室 C で幹細胞系の研究は行っています。

【B 委員】 わからないので質問したいのですが、実験室 C とかで、こういった ES 細胞は、もちろんシャーレの中で保管しているのでしょうか、ほかの細胞とか、セルライン（細胞株）とかそういうものを別にやることは、倫理上とか、あるいはセキュリティ上の問題というのではないのでしょうか。

【塚田委員長】 交差しないのかということ。

【研究者（河村）】 確かにクロスコンタミネーション等をしないよう十分配慮は必要かと思います。当科では初めてこういったヒト幹細胞を導入しようと考えていますので、もし必要がございましたら、先ほど佐竹が申しましたように、こちらを幹細胞専門、もしそれもヒト・マウスの種を分けてということであれば、種も分けて使用するような専門の部屋にしたいと考えております。実際私、iPS 細胞研究所に派遣いただいて 4 年間いましたが、そちらの部屋ではマウス実験、ヒト実験双方を一つのラボでやっているところ複数ありまして、実際、ベンチもマウス・ヒト混合して使っておりました。ただ、マウス・ヒトの細胞を同時に一緒に持ち込むようなことはありませんでしたし、インキュベーターで管理するときも、コンタミネーションしないように、別のところでは管理はされておりましたけれども。その間は、使用の時にはしっかり消毒をして、コンタミネーションを起こらないようには配慮されておりました。なので、必要ありましたら、しっかりヒト用、しかも幹細胞用というふうに分けるようには検討させていただきたいと思います。

【B 委員】 いや、僕が聞いたかったのは、京都大学の iPS 研究所とかそういうところでやっておられる実験自体がそのように厳密に分けておられるのか、分けないことによる、なにか問題点が生じたりということはないのかっていうことを、教えていただきたいと思ったための確認です。

【A 委員】 今の点、確認ですけど、iPS 研究所で使っているものは iPS ですよね。ES ではなく。

【研究者（河村）】ES細胞を使っている研究室もございましたけど、しっかりは把握してないです。

【A委員】それは、ESを多分そういう形で使っているケースというのは無いと思いますが。

【研究者（河村）】はい。

【塚田委員長】ですから、ES細胞の取り扱いときというのは独立して使っていないといけないですね。

【A委員】だいたい、それが原則で、そこがiPSと、レギュレーションの上で違う点ですね。

【塚田委員長】そういうところはしっかり分離してくということを実原則にさせていただかないといけない。

【研究者（河村）】わかりました。

【塚田委員長】ほかに。

【B委員】確認ですけども、こういったものを、全てin vitroで行う実験だけと考えるといいですか。つまり、例えばこういったES細胞を、マウスに埋えるとかですね、マウスのin vivoにもっていくとか、そういう話っていうのは、それは考えておられないし、そういうことは許さるものかどうか、その辺はいかがでしょうか。まずin vitroだけで行う実験なのか。将来的には、今後どう考えておられるのか。

【研究者（佐竹）】今、考えていたのは、ルブリシンの細胞をマウスに注射して、生着することによって、はじめてその関節軟骨であったり、そこに生着してそこでルブリシンを出すことによってはじめてルブリシン発現細胞というところの確認ができるのかなと考えておりましたので、ヒトのES細胞であったりiPS細胞であったりというところをマウスに注射して、それを病理組織標本で確認するという風に今のところは考えています。そこまでです。それ以上のことは考えておりません。

【研究者（河村）】基本的に今回のES細胞は、iPS細胞のコントロール、in vitroの実験、分化誘導のコントロール位置づけておりますので、iPS細胞でうまくいっているものであれば、ヒトの場合でもマウスに接種して病理学的解析を行うものはiPS細胞だけで十分かなというふうに、今考えております。ヒトのES細胞を動物に接種というところまでは、原則行わなくてもいいのかなと、その予定で考えております。

【塚田委員長】 A 委員どうですか。

【A 委員】 今、岐阜大学では、例えば、國貞先生のところは移植実験というのはされているのでしょうか。

【塚田委員長】 してないです。

【A 委員】 するとすれば、この申請の中に、移植する動物を飼育する場所を特定して、それをいわば管理できているかという扱いにする必要が出てくるはずですね。

最初から、そういう移植実験を一応考慮するというのであれば、申請の時点で、そういう飼育区域に関する記載もされておいた方がいいのでは。もちろんそれは、しなければいけない、使わなければ使わないでもいいのですが、計画されているということであれば、今の段階で ES 細胞を移植する動物を飼育する場所ですね。

【研究者（河村）】 万が一の可能性ということでも。

【A 委員】 はい。別に移植実験はオクケーなんです。というのは、もう既にいろんなところでそういう実験は実際にはされています。ただ、これも iPS の場合と違って、移植する動物の飼育場所というのは、培養の場合と同じで、ちゃんと特定される必要がある。

【研究者（河村）】 知識がなくて申し訳なく、ご質問ですが、それは部屋を隔離する必要という話でしょうか。

【A 委員】 隔離までいらなと思いますけれども、この部屋を使うという特定は必要。

【研究者（河村）】 特定が必要だということ。ありがとうございます。

【研究者（佐竹）】 部屋の場所を限定しておくとか、わかるようにしておくとか。

【塚田委員長】 今の A 委員の指摘は重要でありまして、今の研究者の申請内容からいうと、いわゆる、追加の記載等して、当大学では隣の建物に動物実験施設がありますから、そういう意味では実験の遂行できますから、その部分を追加をしていただくことで、理解したいと思いますが。では実験室追加の記載をお願いします。また、それを委員会に提出いただいて、それで委員全員でまた点検しましょう。方針としては確認できましたので、お願いをしておきます。

他にどうでしょうか。

それでは、今、指摘ありました、その実験室のセキュリティを含めた実験の区域確認をしたいと思っておりますので、4階へ上がりましょうか。またそこで細かい質疑応答しましょう。

< 4階へ移動 >

【塚田委員長】まず最初に、ヒト ES 細胞はどこから持ち込むのかという組織・器官形成分野実験室の入り口だけご案内します。

< 組織・器官形成分野実験室 4S28 前廊下 >

【塚田委員長】立ち入り調査のこの写真もお見せしていますが、この施設されている 4S28 でヒト ES 細胞の保管、実験をしています。今回計画書の整形外科への提供元ということです。じゃあ整形外科の方に。

< 整形外科学実験室 4N02 >

【塚田委員長】はい、入りましたので、ちょっと場所を案内してください。

※実験室 B・C を確認 ※施設できることを確認

【A 委員】組織・器官形成分野実験室の培養室を使う方が一番いいんじゃないですか。たまたま同じフロアですし。その方が現実的な気がします。

【塚田委員長】iPS なんかはこっちでも。

【研究者（佐竹）】ES に関しては組織・器官形成分野実験室のところで。

【塚田委員長】その方がいいですね。

【A 委員】ここで、これを区切っちゃおうと…。

【塚田委員長】他のことができなくなっちゃう。それだったら先ほどの組織・器官形成分野実験室のところに全部。

【A 委員】そんな実験操作時間が長いわけではないですから、二つの研究実施が並行して普通に可能なはずですが。

【塚田委員長】はい、そうですね、わかりました。

この実験室 C は iPS だけの実験等はできると思いますが、ヒト ES 細胞を使った場合の研究の場合には先ほどお見せしました組織・器官形成分野のヒト ES 細胞の実験室がありますから、そこでやっていただいた方が、交差等の問題もないですし、きれいな状態で研究が。

【A 委員】レギュレーションとしてはその方が適切ですね。

【塚田委員長】委員会からの指摘としては、ヒト ES 細胞の専用の実験室は組織・器官形成分野実

験室のところで行うということで。

【A 委員】それを我々が勝手に決めていいのかどうか。組織・器官形成分野が。

【塚田委員長】了解は得ますが、一応委員会からの指摘事項とし、調整をしましょう。今ちょっと状態を見ると、つらいですね。

【A 委員】あれだけをこの研究のためだけに割いてしまうと、多分、研究室自体の運営としてもよくないでしょうし。

【塚田委員長】いろいろ使うでしょう。

【研究者（佐竹）】手前があるといえはありますが、引き続きになってしまうので。

【塚田委員長】そうになってしまうと、実際として、うまく細胞の管理ができていますかと、コンタミがありませんとか、施錠とかしていかないと。マウスが持ち込まれたりとかするわけだから。そうなってくると、ちょっと難しいかなと。

【研究者（佐竹）】はい、わかりました。

【塚田委員長】委員会としては、お願いはするということで。研究者にも理解をいただいたので、あとは組織・器官形成分野との調整をしていただくということにしましょう。

【研究者（佐竹）】はい。

【塚田委員長】では、1階に戻りましょう。

< 1階委員会開催場所 >

【塚田委員長】はい、研究室を確認いたしましたけども、委員からの指摘がありましたように、やはりヒト ES 細胞を取り扱う区域ということは、やはり独立したもので行きたいと思いますので、今後、組織・器官形成分野とも相談をいたしますけれども、委員からの重要な指摘でありますし、レギュレーションをちゃんと確実なものにしていくということについては必須のことと、委員会としては判断したいと思います。ですので、実験場所の追加等を加えるということで。実験の手順のところですね、実験の使用の方法というところに、実験場所の区別等含めた、それから ES 細胞の移植マウスのこともございましたので、そのことも含めた動物実験等を使っていきますので、そのことについてもわかりやすくしていただくというように、加筆訂正をお願いするということ、委員会から申請者に対して要請をいたします。それ以外にお気づきの点は。

【A 委員】ヒト ES 細胞の入手先として、組織・器官形成分野のところを記載するということが自体は適切なのでしょうか。もともと京都大学再生医科学研究所の方から khES1 の分配事業を行っています。再分配を法的に認めていなかったように記憶しているのですが、そのあたりレギュレーションを確認したうえで、仮に再分配を認めていたとしても、おそらく供与先である再生研の許可を必要になってくるかなというふうに思います。

【塚田委員長】はい、わかりました。これは確認します。
それでもし、再分配のところに触れるのであれば、京大の方と折衝して、譲り受けていただくということも含めて、もう一度調べてみます。

【塚田委員長】ほか、気づいたところがございますでしょうか。

(発言なし)

では、今指摘されたところを踏まえて、確認していきます。それで訂正したものを出していただいて、それをまた確認して、計画書を完成していけるようにします。まだ作業が続きますけれども、次回は書面で確認したという形での委員会の記録を作っていくということになります。ですので、先ほども申しましたように、再分配の問題、新しい実験室の追加ということで、書類の体裁がだいぶ変わっていきますので、ご理解ください。

じゃあ、ということで、今日の委員会は継続審査ということにいたします。
ありがとうございました。