

201106016A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

再生医療早期実現化促進及び汎用性向上のための
周辺基盤技術開発

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤陽治

平成 24 (2012) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

再生医療早期実用化促進及び汎用性向上のための

周辺基盤技術開発

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 陽治

平成 24 (2012) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	頁
再生医療早期実用化促進及び汎用性向上のための周辺基盤技術開発	1
佐藤 陽治	
II. 分担研究報告書	
1. 細胞・組織加工製品中の造腫瘍性評価・制御法の開発	33
佐藤 陽治	
2. 細胞・組織加工製品の感染制御法の開発	48
早川 堯夫	
3. 細胞・組織加工製品の免疫原性制御法の開発	57
掛樋 一晃	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	70
IV. 研究成果の刊行物・別刷	74

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
「再生医療早期実用化促進及び汎用性向上のための周辺基盤技術開発」
総括研究報告書

研究代表者：佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部・第2室・室長

研究要旨

【目的】ヒトの細胞や組織を培養・加工した「細胞・組織加工製品」を用いた再生医療は、治療法に乏しく、重篤・致命的または QOL を著しく損なう疾病・損傷に対して有効な治療法になると期待されている。難治性疾患等の患者にいち早く有効な再生医療を届けるため、および国際的な再生医療の開発・ビジネス競争でわが国が主導的地位を得るために、将来の開発動向を見据えつつ、細胞・組織加工製品の品質・安全性に関して新規かつ汎用性の高い評価技術・製造法を開発を行い、わが国から世界に向けて先導的に提示していくことを最終目的とする。【方法】細胞・組織加工製品の安全性・品質の確保を図るための、効果的・効率的・合理的な①がん化の抑制、②感染リスク・汚染の排除、③免疫原性の低減、に関する技術開発を展開した。【結果】①がん化の抑制技術については、*in vitro* 造腫瘍性細胞検出系としての軟寒天コロニー形成試験の性能と限界を評価すると同時に、国産の重度免疫不全マウスモデル（NOG マウス）の *in vivo* 造腫瘍性細胞検出系としての性能評価・標準化のための基盤的データを取得した。②感染リスク・汚染の排除技術として、既存の定量的 PCR 法と比較した場合、感染細胞検体に含有される全核酸中のウイルス核酸をもれなく解析でき、かつ高感度、高精度、簡便な検出法として等温遺伝子増幅法（ICAN 法）が有用である可能性を示した。③免疫原性の低減に繋がる周辺基盤技術として、各種幹細胞の培養工程からの異種動物由来成分の混入を、糖鎖を指標として明らかにする方法の開発ならびに異種動物由来成分の混入原因を調査した。【結論】本研究の成果は、多くの細胞・組織加工製品に適用可能な基盤技術となり、国内で製品開発を目指す関係者に大いに活用されるとともに、わが国が国際的に先導的立場に立つ上でも意義深いと考えられる。

研究分担者（順不同）

早川 堯夫 近畿大学 薬学総合研究所 所長・特任教授
掛樋 一晃 近畿大学 薬学部・薬学総合研究所 学部長・教授・副学長

研究協力者（順不同）

黒田 拓也 (公財)先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 研究員
草川 森士 (公財)先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 研究員
川真田 伸 (公財)先端医療振興財団 再生医療基盤研究グループ グループリーダー
西川 伸一 (公財)先端医療振興財団 副理事長
高橋 政代 (公財)理化学研究所 網膜再生医療研究開発プロジェクト プロジェクトリーダー
伊藤 守 (公財)実験動物中央研究所 実験動物研究部 部長
町田 一彦 (公財)実験動物中央研究所 試験事業部

研究協力者（続き）

堤 秀樹	(公財)実験動物中央研究所 試験事業部 部長
澤田 留美	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第3室 室長
安田 智	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 主任研究官
森山 博由	近畿大学 薬学総合研究所 先端バイオ医薬研究室 准教授
木下 充弘	近畿大学 薬学部 生物情報薬学研究室 講師
古江一楠田 美保	(独)医薬基盤研究所 培養資源研究室 研究リーダー

A. 研究目的

細胞・組織加工製品を用いた再生医療は、治療法に乏しく、重篤・致死的ないしQOLを著しく損なう疾病・損傷に対して極めて有効な治療法になると期待されており、細胞・組織加工製品の開発は世界的にも熾烈な競争が展開している。難治性疾患等の患者にいち早く有効な再生医療を届けるためにも、国際的な再生医療の開発・ビジネス競争でわが国が主導的地位を得るためにも、将来の開発動向を見据えつつ、細胞・組織加工製品の品質・安全性に関して新規かつ汎用性の高い評価技術・製造法の開発を行い、わが国から世界に向けて先導的に提示していくとともに、より高品質で安全性及び有効性の高い製品の開発・実用化を国内で適正に推進することが急務である。

細胞・組織加工製品の細胞ソースとしては、患者自身または他人由来の体細胞の他に、ヒトES細胞（胚性幹細胞）や最近開発されたヒトiPS細胞（人工多能性幹細胞）といった、いわゆる「多能性幹細胞」が近年特に有望視されている。その理由としては、①これら多能性幹細胞は、その幅広い多能性ゆえに、いままで入手が困難であった各種細胞を作製することのできる素材となることが期待されること、および、②無限の自己複製能ゆえに、ひとたび目的細胞への効率的分化誘導方法が確立すれば、細胞・組織加工製品の原材料として利用できる細胞を大量かつ安定的に供給することが可能とな

ることが期待されることが挙げられる。既に2011年1月に米国では、ヒトES細胞を加工した医薬品の再生医療における活用例として、世界初の治験（脊髄損傷治療）が開始され、2011年7月には同じく米国で網膜疾患治療を目的としたヒトES細胞加工製品の治験が開始されている（ただし、前者の治験は2011年11月に経済的理由により中断）。また、2007年に山中らによって世界初のヒトiPS細胞が樹立されたことを契機に、細胞のプログラミングを人為的に操作、制御できる時代が到来し、新規細胞基材、新規製造関連資材、新規製造方法、新規適用法等、新たなイノベーションを推進し、再生医療・細胞治療へ応用しようとする研究展開が国内外できわめて活発化している。この中に実用化に有望と考えられるシーズも数多くあり、例えば、近年中にはわが国においてiPS細胞を加工して作製した網膜色素上皮細胞を加齢黄斑変性の患者らに対して臨床応用することが開始されると期待されている。このような、一昔前には実現が想定されていなかった製品（多能性幹細胞加工製品）の開発には、多能性幹細胞に関するイノベーションの進展と共に登場してくるリスクの評価法や、多能性幹細胞加工製品に特有の品質・安全性確保のための基盤技術が必須である。

こうした背景から本研究では、再生医療早期実現化を促進し、汎用性を向上させるための周辺基盤技術開発を最終目的とする。具体的には、

基本的命題である安全性・品質の確保を図るための、効果的・効率的・合理的な①がん化の抑制，②感染リスク・汚染の排除，③免疫原性の低減，④均一性・同等性の確保に関する汎用性の高い技術開発を目標とする。

平成 23 年度は，①がん化の抑制技術については，*in vitro* 造腫瘍性細胞検出系としての軟寒天コロニー形成試験の性能と限界を評価すると同時に，国産の重度免疫不全マウスモデル（NOG マウス）の *in vivo* 造腫瘍性細胞検出系としての性能評価・標準化のための基盤的データを取得した。②感染リスク・汚染の排除技術として，感染細胞検体に含有される全核酸中のウイルス核酸をもれなく解析でき，かつ高感度，高精度，簡便な検出法という観点から，既存の定量的 PCR 法と等温遺伝子増幅法（ICAN 法）との性能を比較した。また，③免疫原性の低減に繋がる周辺基盤技術として，各種幹細胞の培養工程からの異種動物由来成分の混入を，糖鎖を指標として明らかにする方法の開発ならびに異種動物由来成分の混入原因を調査した。

B. 研究方法

B-1 造腫瘍性評価・制御法の開発

B-1-1 軟寒天コロニー形成試験の性能評価

B-1-1-1 細胞培養

Oct3/4, Sox2, Klf4 および c-Myc の遺伝子を導入して作成されたヒト由来 iPS 細胞株 201B7 は，理研バイオリソースセンターより入手した。未分化なヒト iPS 細胞は，マイトマイシン C 処理した SNL 細胞（マウス線維芽細胞 STO 株にネオマイシン耐性遺伝子および LIF を発現させた細胞）上において，4ng/ml ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF；和光純薬）を添加したヒト ES 細胞培地（リプロセル）中にて培養した。未分化な細胞コロニーは，CTK 溶液（リプロセル）および STEMPRO

EZPassage（インビトロジェン）を用い，5-6 日ごとに小さな細胞塊（クランプ）として継代した。正常体細胞のモデルケースとして使用した初代培養ヒト網膜色素上皮細胞（RPE）細胞は，Lonza 社および ScienCell Research Laboratories 社から入手した。初代培養ヒト RPE 細胞は，添加剤（L-グルタミン，GA-1000，bFGF；Lonza 社）を添加した網膜色素上皮細胞基本培地（Lonza 社）中で維持培養した。ヒト卵巣テラトカルシノーマ由来 PA-1 細胞（ATCC）は，10%ウシ胎児血清（FBS；Gibco）を含む MEM イーグル培地（シグマ-アルドリッチ）中で維持培養した。全ての細胞株および分化細胞は 5%CO₂-95%大気，37°C の条件で培養した。

B-1-1-2 ヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞の調製

ヒト iPS 細胞から RPE 細胞への分化は Osakada ら（2009）の方法に従った。その概略を Figure 1 に示す。ヒト iPS 細胞の細胞クランプをまず，ポリ L リジン／ゼラチンでコートしたディッシュに播き，10 μM Y-27632（和光純薬），5 μM SB431542（シグマ-アルドリッチ）および 3 μM CKI-7（シグマ-アルドリッチ）を添加したヒト ES 細胞培地中で 1 日間，培養した。次に細胞を，20% Knockout Serum Replacement（KSR；インビトロジェン）を含む分化培地（グラスゴー MEM [GMGM；インビトロジェン]，0.1mM 非必須アミノ酸，1mM ピルビン酸ナトリウム，0.1mM 2-メルカプトエタノール）中で 4 日間培養した。さらに，15% KSR 含有分化培地で 6 日間培養し，最後に 10% KSR 含有分化培地で 11-30 日間培養した。分化誘導時から 13 日目までは培地に Y-27632（10 μM），SB431542（5 μM），CKI-7（3 μM）を添加し，14-19 日は SB431542（5 μM）と CKI-7（3 μM）だけを添加した。分化の途中にある細胞を CTK 溶液で剥

し、非接着性ディッシュ(コーニング)上にて、RPE 維持培地 (B-27 サプリメント [インビトロジェン] および 2mM グルタミン [インビトロジェン] を添加した DMEM:F12 [7:3]) 中で 10 日間培養した。得られた細胞凝集塊を単離し、Cellstart (インビトロジェン) でコートしたディッシュ上にて、0.5 μ M SB431542 と 10ng/ml bFGF を添加した RPE 維持培地中で培養した。この段階を継代数 1 と定義した。培地は 2-3 日ごとに交換した。

細胞の形態、RPE 細胞特異的なマーカータンパク質の発現と細胞内分布、および RPE 細胞特異的マーカー遺伝子の発現を初代培養 RPE 細胞と比較することにより、得られたヒト iPS 細胞由来の分化細胞は RPE 細胞であることを確認した。

B-1-1-2 軟寒天コロニー形成試験

軟寒天コロニー形成試験は CytoSelect 96-well Cell Transformation Assay Kit (Cell Biolab 社)を用い、メーカーのプロトコールに若干の変更を加えた上で実施した。20%FBS を含む 25 μ l の 2x DMEM を予め加温し、1.2%寒天水溶液 25 μ l と混合した後、これを 96 穴プレートに分注し、底部の寒天を固化させるためにプレートを 4°C で 30 分間加冷した。分散細胞懸濁液は次のように調製した: 201B7 細胞は CTK 溶液でクランプとして剥離し、フィーダー細胞を除く目的で、ゼラチンコートディッシュ上において ROCK 阻害剤の Y-27632 (10 μ M)存在下、37°C で 1 時間のインキュベーションを行った。細胞を遠心分離した後、細胞ペレットをアキュターゼ (ミリポア) により単一細胞にまで分散させた。初代培養 RPE 細胞、ヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞、および PA-1 細胞は、0.25%トリプシン - EDTA 溶液で処理して分散させた。分散させた細胞は 40 μ m のナイロン製セルストレーナーを通した。

一定数の細胞を含む 25 μ l の細胞懸濁液と、20%FBS を含む 25 μ l の 2x DMEM および 25 μ l の 1.2%寒天水溶液を混合し、これを上で作成したプレート底部寒天層上に添加した。重力による底部寒天層上への細胞の堆積とそれによる擬陽性の発生を防ぐ目的で、4°C で 10 分間放置し、上部寒天層を急速に固化させた。100 μ l の 10%FBS 含有 DMEM を各ウェルに添加し、プレートを 37°C、5%CO₂ の条件下、10、20 ないし 30 日間インキュベートした。培地は 2-3 日ごとに交換した。形成された細胞コロニーを溶解し、CyQuant GR 色素を用いて細胞数を定量した。CyQuant GR の蛍光は 485/520nm のフィルターを用い、Wallac ARVOSx multilabel counter (パーキンエルマー) を用いて測定した。

B-1-2 NOG マウスを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験の性能評価

B-1-2-1 使用動物と細胞

本実験に用いた SPF の NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic (NOG マウス) および BALB/cAJcl-nu/nu (ヌードマウス) は日本クレアから入手し、公益財団法人 実験動物中央研究所のバリア区域内の専用飼育室内で飼育した。2 系統ともに 6~8 週齢の雄を搬入し 1 週間の馴化期間の後に細胞の投与を行った。ケージはマウス Hi-TPX ケージ (日本クレア, 155 × 245 × 148mm) を使用し、ケージ内動物数は最高 3 匹、ケージ交換回数は週 1 回、給餌方法は自由摂取とした。

B-1-2-2 Hela 細胞単回投与造腫瘍性試験

マウスに接種した Hela 細胞 (JCRB9004, Lot:24222006, 継代数: 114) は (財) ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンクから入手し、研究資源バンク推奨のプロトコールに従って、培地 10%FBS およびペニシリン/ストレプトマイ

シンを添加した MEM 中に手培養・継代した。細胞は培地 (MEM+10%ウシ胎児血清+ペニシリン/ストレプトマイシン) またはマトリゲルに懸濁し, その 100 μ L を無麻酔で保定した状態のマウスの後背部皮下に, 25G の注射針を付けたシリンジで投与した。以下の 14 群について投与後の結節形成を観察した: ①NOG (細胞懸濁培地投与): 細胞用量 5 点 (0, 10², 10³, 10⁴, 10⁵; 各 10 例), ②NOG (細胞懸濁マトリゲル投与): 細胞用量 5 点 (0, 10, 10², 10³, 10⁴; 各 10 例), ③ヌードマウス (細胞懸濁培地投与): 細胞用量 4 点 (0, 10⁴, 10⁵, 10⁶; 各 10 例)。

B-2 感染制御法の開発

B-2-1 モデルレトロウイルス核酸の作製

HIV-1 ならびに第 3 世代 HIV-1 由来レンチウイルスベクター共通に含まれる配列である 5'LTR の一部とパッケージングシグナル (ψ) を含む配列を, pSPT19 ベクターに組み込んだ。得られたプラスミドを SP6, T7 プライマーを用い, PCR にて増幅し, モデルレンチウイルス核酸を作製するための鋳型を作製した。得られた PCR 産物を鋳型にし, T7 RNA ポリメラーゼを用い, *in vitro* transcription を行った。*in vitro* transcription 法にて得られた RNA は DNaseI 処理を十分に行うことで鋳型 DNA を除去した後, Qiagen RNeasy Mini Kit で精製を行い, 図 5 に示したモデルレトロウイルス核酸 (single strand RNA) を作製した。

B-2-2 モデルレトロウイルス核酸の定量的 PCR 法を用いた解析

正常ヒト繊維芽細胞由来の total RNA (1 \times 10⁷細胞分に相当) にモデルレトロウイルス核酸 (680 base) を 7400 コピー (2.84 \times 10⁻⁹ μ g) となるように添加した。この混合 RNA を 1 μ g ずつ分注し, Qiagen QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit を用いて One Step qRT-PCR を行った。標的とする増幅配列は, 5'LTR の部分と, ψ (psi) 領域に設定することとし, 今回のモ

デル系に至適なプライマー配列やプライマー長を精査, 検討したうえで, 最終的に以下のプライマー配列の決定に至った。

HIV-1 LTR (F)

5'- CCACTGCTAGAGATTTTCCAC -3'

HIV-1 LTR (R)

5'- TGAGTGCTTCAAGTAGTGTG -3'

HIV-1 psi (F)

5'- CCCGCTTAATACTGACGCTCT -3'

HIV-1 psi (R)

5'- CGACTGGTGAGTACGCCAA -3'

また, 同様に定量的 PCR の反応条件も詳細に検討し, 今回 Bio-Rad 社製 CFX96 thermal cyclers を用いた場合の反応サイクル等の至適条件は, 以下の通りに確定した。

50 $^{\circ}$ C 20 分

95 $^{\circ}$ C 15 分

94 $^{\circ}$ C 15] 45 サイクル	秒
60 $^{\circ}$ C 1		

+ 解離曲線

B-3 免疫原性制御法の開発

B-3-1 ヒト培養癌細胞の培養

ヒト培養胃腺癌細胞 MKN45 は 10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培養液を用いて培養した。細胞は PBS で 3 回洗浄後, 0.025%トリプシン/PBS 液を加え 37 $^{\circ}$ C で 5 分間静置後, 培養ディッシュ全体を水平方向に叩きながら, 細胞を剥離させ, 15mL チューブに回収した。5 分間遠心分離 (800 rpm) して細胞を回収した。上清を捨て新たに PBS10mL を加えて細胞を分散させながら洗浄し, 5 分間遠心分離 (800 rpm) し, 上清の PBS を捨て細胞を回収した。

B-3-2 iPS 細胞の培養

2 種類の iPS 細胞 (Toe, UTA-1) はマイトマイシン C 処理したマウスフィダー細胞 (MEF, Reprocell) を播種した培養ディッシュ上で血清代替物 (Knockout Serum Replacment: KSR) を含む培養液を用いて培

養した。細胞は PBS で 3 回洗浄後、PBS/1 mM-EDTA を加え 37°C で 5 分間静置後、培養ディッシュ全体を水平方向に叩きながら、コロニーを形成する細胞のみを剥離させた。剥離させた細胞は 15mL チューブに回収した。5 分間遠心(800 rpm)し細胞を回収した。上清を捨て新たに PBS10mL を加えて細胞を分散させながら洗浄し、5 分間遠心(800 rpm)した。遠心分離後、上清の PBS を捨て細胞を回収した。

B-3-3 ヒト培養癌細胞による NeuGc の細胞内取り込み

ヒト培養胃腺癌細胞 MKN45 は 10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培養液を用いて 50%コンフルエント状態まで培養した後、PBS で 3 回洗浄し、血清を含む培養液を除いた。次に NeuGc を 0.4mg/mL の濃度で含む DMEM 培養液を用いて培養した。培養後、PBS で 3 回洗浄後、0.025%トリプシン/PBS 液を加え 37°C で 5 分間静置後、培養ディッシュ全体を水平方向に叩きながら、細胞を剥離させた。剥離させた細胞は 15mL チューブに回収した。5 分間遠心(800 rpm)し細胞を回収した。上清を捨て新たに PBS10mL を加えて細胞を分散させながら洗浄し、5 分間遠心(800 rpm)した。遠心分離後、上清の PBS を捨て細胞を回収した。

B-3-4 細胞総タンパク質分画の調製

培養細胞を 1 M EDTA を含む PBS 中に懸濁し、2 M Thiourea および 5 M Urea 水溶液、1 M DTT および Benzonase 溶液を加え室温でインキュベート後、12000 g、15 分間遠心分離後の上清を回収した。回収した上清に 5%酢酸、5%水、5%トリエチルアミンを含むアセトン溶液を加え、沈殿したタンパク質を遠心分離し回収した。得られた沈殿は 75%エタノールにて洗浄し細胞総タンパク質とした。

B-3-5 N-結合型糖鎖の遊離と蛍光標識

総タンパク質分画を SDS、2-メルカプトエ

タノール、NP-40 を 1%ずつ含むリン酸緩衝液 (pH 7.5) で懸濁した後、N-glycanase F (2 unit) を加え、37°C で 12 時間酵素反応を行った。反応後、冷エタノールを加え 12000 g で 15 分間遠心分離し上清を濃縮乾固し、N-結合型糖鎖として回収した。糖鎖を含む試料に 2 アミノ安息香酸および NaBH₃CN をそれぞれ 3%含む 2%ホウ酸/4%酢酸ナトリウム/メタノール溶液を 100 μl 加えて 80°C で 1 時間加温した。反応後 SephadexLH-20 のゲルろ過クロマトグラフィーにより最初に溶出される蛍光性画分を回収し細胞タンパク質由来糖鎖とした。

B-3-6 iPS 細胞のシアル酸分析

細胞あるいは培養細胞より回収した N-結合型糖鎖混合物の凍結乾燥物に水に 10 μL と 0.2 M HCl (10 μL)を加え、80 °C で 40 分間加水分解を行った。加水分解後、室温まで冷却後、0.7 M DMB 試薬(80 μL)加え、50 °C で 150 分間誘導体化反応を行った。反応後、10 μL を HPLC に注入し、シアル酸分析を行った。ポンプには Shimadzu LC10-ADVP、検出器には Waters 2475 型蛍光検出器を使用し、流速は 0.9 ml/min とした。カラムは逆相分配(ODS)カラム(COSMOSIL 5C18-AR-II; 4.6 x 150 mm)を用い、検出波長は励起波長 375 nm、蛍光波長 448 nm とした。溶出は 2 %MeCN/14 %MeOH 溶液を用い、アイソクラティック溶出にて行った。

B-3-7 セロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる糖タンパク質糖鎖の分析

ポンプには Shimadzu LC10-ADVP、検出器には Waters 2475 型蛍光検出器を使用し、流速 0.5 mL/ min で分析した。カラムは LA-Serotonin (Japan Oil Mills, 4.6 x 150 mm)を用い、カラム温度は 25 °C とした。検出は励起波長(Ex) 350 nm、蛍光波長(Em) 425 nm により行った。移動相の溶液 A には水、溶液 B には 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液を用

いた。グラジエント条件は、試料注入後 2 分間溶出液 B 5 %とし、溶出液 B が 37 分後に 75 %となるように直線グラジエント溶出を行い、その後 10 分間で溶出液 B が 100 %となるようにした。

B-3-8 MALDI-TOF MS

装置には AXIMA-Resonance (Shimadzu 製) を用い、リニア-ネガティブイオンモードにより測定した。試料は DHB/メタノール溶液と等量混合し試料プレート上で風乾させた。

(倫理面への配慮)

動物実験を行う際には、動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施した。また、ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で研究を実施した。

C. 研究結果

C-1 造腫瘍性評価・制御法の開発

C-1-1 軟寒天コロニー形成試験の性能評価

軟寒天コロニー形成試験は細胞の足場非依存的増殖を検出するための一般的な方法として知られている。場非依存的増殖を示す形質転換細胞を定量的に測定するために、CytoSelect 96-well Cell Transformation Assay を用いた。ヒト多能性幹細胞は酵素的に単一細胞に分散するとアポトーシスを起こすことが知られているが、細胞のクランプ残存や寒天中での凝集による足場依存的細胞増殖を防ぐためには単一細胞への分散が重要である。

まずヒト iPS 細胞が軟寒天培地中で増殖するかどうかについて検討したところ、単一細胞に分散したヒト iPS 細胞は軟寒天培地中では

増殖しないことが明らかとなった。ヒト多能性幹細胞の分散誘導性アポトーシスを抑制されている ROCK 阻害剤 Y-27632 存在下で検討した場合も、軟寒天培地中での増殖は認められなかった (Figure 2A, Figure 3A)。これらの結果から、軟寒天コロニー形成試験は未分化なヒト iPS 細胞を検出する目的には適さないということが示唆される。

本研究の試験系が機能していない可能性を否定する目的、および正常細胞中への悪性形質転換細胞の混入に関する検出限界を検討する目的で、軟寒天培地中でのヒト卵巣テラトカルシノーマ細胞 PA-1 のコロニー形成を評価した。PA-1 細胞を選択した理由は、ヒト iPS 細胞の悪性形質転換を想定した場合に細胞は PA-1 細胞に近似した表現型を示す可能性が高いからである。PA-1 細胞は、播種した細胞数が多くなるに伴って検出されたコロニー形成細胞の数も多くなっていた (Figure 3B)。一方、初代培養 RPE 細胞は、ウェルあたり 1×10^4 個の細胞を播種しても 30 日の間にコロニーは認められなかった (Figure 3C)。次に今回の軟寒天コロニー形成試験系における PA-1 細胞の検出感度を評価した。即ち、試験系の検出限界を求める目的で、 1×10^4 個の初代培養 RPE 細胞に 100 個 (1%)、50 個 (0.5%)、25 個 (0.25%) の PA-1 細胞を添加するスパイク実験を実施した。100 個 (1%) の PA-1 細胞を添加することにより、20 日の間にコロニー形成が認められたが、50 個 (0.5%) ないし 25 個 (0.25%) の PA-1 細胞の添加では、コロニー形成が検出されるまでに 30 日を要した (Figure 2B)。試験系の蛍光測定値の検出限界は、ネガティブコントロール (初代培養 RPE 細胞のみ) の平均値と標準偏差の 3.3 倍の和として求めた。3 ロットの初代培養 RPE 細胞由来の蛍光測定値 (バックグラウンド測定値の 1.70 ± 0.40 倍) から、蛍光測定値の検出限界は 3.03 と算出された

(Figure 2C). Figure 2 に示した結果より、軟寒天コロニー形成試験系を用いて初代培養 RPE 細胞中に混入する PA-1 細胞を蛍光測定により検出するには、PA-1 細胞の数が RPE 細胞の数の 1% (蛍光測定値: 4.4 ± 1.1) 以上必要であることが示唆された。Figure 2C に示したように、ヒト iPS 細胞由来の RPE 細胞はコロニーを形成せず、蛍光測定値 (1.21 ± 0.19) も検出限界未満であった。従って、ヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞に混入する未分化細胞ないし異常形質転換細胞は、その足場非依存性が PA-1 細胞と同等だとした場合、1%未満であることが示唆された。

C-1-2 NOG マウスを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験の性能評価

本研究では、免疫不全の度合いの違う 2 系統のマウス、すなわちヌードマウス (T 細胞欠損) と NOG マウス (T 細胞, B 細胞および NK 細胞欠損) の不死化細胞の生着性を比較するだけでなく、移植細胞をマトリゲルに封入した状態で NOG マウスに移植した群 (NOG+マトリゲル群) の不死化細胞の生着性も検討した。各群で雄性 10 匹ずつを用い、移植する不死化細胞としては、生物薬品の細胞基材の品質評価のための造腫瘍性試験のための国際ガイドライン WHO TRS878 でポジティブコントロールとして推奨されている Hela 細胞を使用した。その結果、Hela 細胞移植後 3 週間後まではいずれの群においても移植細胞由来と推定される結節の形成は認められなかったが、4 週間後において、ヌードマウス群では 10^6 個移植群の 1 匹に結節の形成が認められ、NOG マウス群では 10^5 個移植群の 5 匹に結節形成が認められた。また、NOG+マトリゲル群では、 10^4 個移植群の 2 匹および 10^3 個移植群の 1 匹に結節が観察された (Figure 4)。5 週間後においては、ヌードマウス群では 10^6 個移植群の 3 匹

に結節の形成が認められ、NOG マウス群では 10^5 個移植群の 4 匹に結節形成が認められた (4 週目で結節が認められた 5 匹のうち、1 匹の結節が小型化し測定不能となっていた)。また、NOG+マトリゲル群では、 10^4 個移植群の 5 匹および 10^3 個移植群の 2 匹に結節が観察された。

C-2 感染制御法の開発

モデルレトロウイルス核酸として、レンチウイルスである HIV-1 ならびに HIV-1 由来レンチウイルスベクター共通に含まれる配列である 5'LTR の一部とパッケージングシグナル (ψ) を含む配列を選定した。この配列は、レトロウイルスがウイルスゲノムをウイルス粒子中にパッケージングする際に必須のものであり、つまりは増殖可能な感染性ウイルスのゲノム RNA には必ず包含される必須配列である。

今回、この配列を持つ RNA を試験管内で合成することにより、モデルレトロウイルスゲノム RNA の一部を得た。このモデルレトロウイルスゲノム RNA を段階希釈し、従来の定量的 PCR 法を用いて、一つの反応系中での検出限界を求めたところ、反応系あたり最小 50 コピーのモデルレトロウイルス核酸を検出することが可能であると判明した。また、汎用的な定量的 PCR 法では、 1×10^2 コピーから 5×10^7 コピーの範囲で高い直線性を示すことが分かった (図 6)。

そこで、検出感度の限界値付近における検出反応系ごとのばらつき (各々の PCR 反応ウェル間での検出差違) を確かめるために、7400 コピーのモデルレトロウイルスゲノム RNA を 1×10^7 個の細胞より得た RNA 150 μg と混合し、十分に攪拌・混合処理した後、この混合 RNA を反応系あたり 1 μg ずつ 150 等分 (150 ウェル反応系分) した。その結果、理論上は十分に攪拌され等分散した鋳型モデルレトロウイルスゲノム RNA が、1 反応液あたり 49.3 コピー混入している計算となる。しかし、実際にはおそらく反応系 (各ウェル) によって \pm 数コピ

一〜十数コピーのばらつきが生じるものと考えられる。これは、現状の汎用的な定量的 PCR 法を用いるときに不可避免的に生じる各反応系調製作業の鑄型持ち込み量のゆらぎが想定されるからである。そこで実態を調べるために、このように設定された反応系を、それぞれ定量的 PCR 法を用いた検出に供した。その代表的な実験結果を表 1 にまとめた。150 検体中、LTR プライマーを用いた検出系では平均 42 検体、psi プライマーを用いた検出系では平均 46 検体のみがウイルス由来核酸が陽性と判断され、残りの検体は陰性（検出限界以下）という結果となった。

このことは、段階希釈された上記検出限界レベル近辺のレンチウイルスベクターを用いてスパイクさせた細胞から、ウイルス由来核酸を検出しようとしても、汎用されている定量的 PCR 法を用いた場合では、一つの反応系容量の限界（1 ウェルの反応量に持ち込まれるウイルス由来核酸持ち込みの確率論的限界）からウイルス由来核酸を含む細胞の一部しか検出されず、感染・非感染の科学的立証が不完全に終わることを意味している。つまりは、特定の反応系のみをもってして感染の是非を決定することに問題がある。すなわち、安全性を担保すべき検査がきわめて不確実なものであることを意味している。

この問題を汎用的な定量的 PCR 法のみで解決しようとする場合、評価系に供される細胞全てから抽出した核酸（鑄型となりうるゲノム総量）の全てがなくなるまで PCR 反応系を調製することにより検出を完全なものにしなければならない。上述のモデル系の場合でも、150 ウェル分の PCR 反応系が必要になることを勘案すると、実際は相当量の反応系の調製が必須となる。このことは、時間的、労力的に多大な負担となるのみならず、検出系のコストの問題にも大きくのしかかることとなる。

そこでこの問題を解決すべく、感染細胞検体に含有される全核酸中のウイルス核酸をも

れなく測定でき、かつ高感度、簡便な検出法の検討と探索を行った。その結果、検出反応系が大きく、またある程度の容量の可変増大も可能であり、それゆえ比較的多量の核酸を一度に一つの大容量反応系（チューブ単位での検出系）で検査することが可能である等温遺伝子増幅法(ICAN 法)を改良することが最も有用であるという見解に至った。現在までに ICAN 法を用いてのウイルス検出への応用はあまりなされておらず、ICAN 法改良型のウイルス検出系は、確実で、高感度、高精度、簡便な新規感染性ウイルス検出法となる可能性を秘めている。

現在のところ、ICAN 法をウイルス検出系に適用せしめるべく、ICAN 法の開発者・研究者（タカラバイオ株式会社）より情報の入手と技術協力を行い、諸条件の設定と基礎的な実験準備に着手しているところである。

C-3 免疫原性制御法の開発

C-3-1 ヒト培養細胞のシアル酸分析

ヒト体内において免疫原性を示す異種動物抗原糖鎖としては、N-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) や α Gal エピトープ (Gal α 1-3Gal) が知られており、血清中の抗体との反応により炎症状態の惹起や拒絶反応を引き起こすことが知られている。特に、NeuGc についてはヒト以外の動物種に広く分布していること、細胞膜表面への非特異的吸着だけでなく、単糖として細胞内に取り込まれ、糖鎖生成に利用される可能性があることが報告されている。本項では異種動物抗原糖鎖として NeuGc に着目し、細胞中の NeuGc を定量的に検出する方法について検討した。

細胞中の NeuGc を検出する方法としては簡便で特異的かつ高感度な方法が望まれる。細胞中の NeuGc を特異的に検出する方法としては、複合糖質糖鎖を含む試料を塩酸あるいは酢酸加水分解し、遊離したシアル酸を

1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene

(DMB) により蛍光標識化し、HPLC を用い

て分析する方法が挙げられる。NeuAc および NeuGc 標品を DMB で蛍光標識化し逆相 HPLC を用いて分析した結果を Fig.7a に示す。NeuGc が約 7.5 分、NeuAc が約 10 分に観察され、両シアル酸分子種を完全に分離し定量することが可能であった。一方、10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培養液を用いて培養したヒト培養胃腺癌細胞 MKN45 細胞の (1×10^6 cell) の凍結乾燥物に水に 10 μ L と 0.2 M HCl (10 μ L) を加え、80 °C で 40 分間加水分解を行い、DMB により蛍光標識化し分析した。結果を Fig.7b に示す。細胞のシアル酸を直接分析する場合、細胞に含まれるタンパク質等の妨害等が考えられるが、約 10 分に NeuAc のピークのみ観察され、特異的に細胞中のシアル酸を分析できることがわかった。また、MKN45 は NeuGc を豊富に含むウシ胎児血清を 10% 含む DMEM 培養液で培養されているにもかかわらず、NeuGc は検出限界以下であった。

C-3-2 iPS 細胞のシアル酸分析と NeuGc 混入原因の追跡

現在、iPS 細胞の培養では培養液および添加物を含め完全ヒト化への流れが主流となりつつあり、免疫原性を示す異種動物抗原糖鎖の混入も低減すると考えられる。しかしながら、iPS 細胞の初期培養でマウス胎児繊維芽細胞由来のフィーダー細胞 (MEF)、異種動物成分を多く含む血清代替物 (KSR) 等を用いて培養された細胞に関しては、培養環境の完全ヒト化への以降後でも異種動物抗原糖鎖を含む可能性を否定できない。本項では前項に引き続き異種動物抗原糖鎖として NeuGc に着目し、培養過程において、MEF と KSR を用いて培養されたヒト iPS 細胞 (Toe, UTA-1) のシアル酸分析を行い、NeuGc 混入の有無について調査した。

Toe と UTA-1 のシアル酸分析の結果を Fig.8 に示す。Toe では総シアル酸に占める NeuGc の存在比は 12%、UTA-1 は 6%であった。ウ

シ胎児血清を含む培養液で培養され MKN45 中の NeuGc 含量が検出限界以下であったことを考えると、2 種類の iPS 細胞で NeuGc 比率の高さは iPS 細胞の培養環境に起因すると考えられた。

次に iPS 細胞への NeuGc の主たる混入原因と考えられる MEF と KSR についてシアル酸分析を行った。結果を Fig.9 に示す。MEF では総シアル酸に占める NeuGc の存在比は 6%であったが KSR は 51%であり、NeuGc を多く含むことがわかった。KSR 中の NeuGc の存在形態については、糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質糖鎖の非還元末端にグリコシド結合を介し存在する場合と遊離の NeuGc として存在することが考えられる。そこで、KSR を分子量により分画できるフィルターを用いて、分子量 3000 以上と 3000 以下に分画し、両分画について同様にシアル酸分析を行った。結果を Fig.10 に示す。分子量 3000 以上と 3000 以下のいずれの分画でも総シアル酸に占める NeuGc の存在比は 50%以上であり、NeuGc が糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質糖鎖の非還元末端に存在する場合と遊離の NeuGc、遊離オリゴ糖などとして存在すると考えられた。培養環境からの NeuGc の混入経路としては、NeuGc を持つ糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質の細胞表面への吸着あるいは細胞内への取り込み、遊離 NeuGc あるいは複合糖質として取り込まれた NeuGc が細胞内での生合成に利用された可能性が考えられる。

C-3-3 ヒト培養細胞の遊離シアル酸の細胞内取り込み

哺乳類の細胞内における NeuGc は、シアル酸転移酵素の基質ドナーとして合成された CMP-NeuAc が CMP-NeuAc 水酸化酵素により水酸化され CMP-NeuGc が産生される。この CMP-NeuGc はシアル酸転移酵素により利

用され種々の複合糖質糖鎖末端に付加される。一方、ヒト細胞内では CMP-NeuAc 水酸化酵素が不活化され機能しておらず、CMP-NeuGc が合成できないため、NeuGc を持つ複合糖質は観察されない。しかし、CMP-NeuGc は遊離 NeuGc と CMP 合成酵素の作用により合成されること、シアル酸転移酵素は CMP-NeuGc を基質として認識することが知られている。すなわち、細胞外から取り込まれた遊離 NeuGc あるいは細胞内で NeuGc を持つ複合糖質から生じた NeuGc から CMP-NeuGc を生合成し、種々の複合糖質糖鎖末端に付加する可能性が考えられる。すなわち、iPS 細胞中に観察された NeuGc の混入経路として、細胞外から NeuGc あるいは NeuGc を持つ複合糖質を取り込み、それらを生合成に利用することが考えられるが、それらの経路の可能性については殆ど解析されていない。本項では、ヒト胃腺癌細胞 MKN45 をモデルに用い、NeuGc を含む培養液を用いて細胞培養を行い、細胞内への NeuGc の取り込みの有無について解析した。

培養液に 0.4mg/mL の NeuGc を含む培養液を用いてヒト胃腺癌細胞 MKN45 を 0, 3, 6 日間培養し、細胞内シアル酸量を定量した。結果を Fig.11 に示す。培養 0 日目では Fig.7 の結果と同様に NeuGc は検出限界以下であった。一方、培養 3 日目では総シアル酸の約 8%、6 日目では総シアル酸の 18%が NeuGc として検出された。このように、細胞外に遊離 NeuGc が存在する場合、NeuGc が培養期間依存的に細胞内に取り込まれることがわかった。

次に、細胞内に取り込まれた NeuGc が糖タンパク質糖鎖の生合成に利用されるかについて調べた。培養液に 0.4mg/mL の NeuGc を含む培養液を用いてヒト胃腺癌細胞 MKN45 を 6 日間培養後、細胞総タンパク質分画を調製し、総タンパク質分画中の N-結合型糖鎖の解析を行った。N-結合型糖鎖をセロトニンアフィニ

ティクロマトグラフィーにより分画し得られたモノシアル分画について MALDI-TOFMS にて解析した結果を Fig.12 に示す。NeuGc を含まない培養液を用いて培養した MKN45 では、 m/z 1832, 1994, 2035, 2197, 2238, 2343, 2400 が主たるモノシアル糖鎖として観察され、何れも非還元末端に N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) を 1 残基のみ持つ複合型糖鎖であった。一方、培養液に NeuGc を含む培養液を用いて培養した細胞では、NeuGc を含まない培養液を用いて培養した細胞で観察された NeuAc を 1 残基のみ持つ複合型糖鎖のシグナルより $\Delta m/z$ 16 大きな m/z 1848, 2010, 2051, 2213, 2254, 2359, 2416 のシグナルが観察された。これらのシグナルは何れも非還元末端に N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) を 1 残基のみ持つ複合型糖鎖であった。以上の結果から、細胞内に取り込まれた NeuGc は細胞内での糖鎖生合成に利用されることがわかった。

現在、KSR 中に遊離 NeuGc が存在するかどうかは明らかではないが、NeuGc を豊富に含むウシ胎児血清を含む培養液で培養された細胞では NeuGc が検出限界以下であるのに対し、KSR を用いて培養された iPS 細胞には数%以上もの NeuGc が観察されたことから、KSR 中の NeuGc はウシ胎児血清中の糖タンパク質に比べ効率よく糖鎖生合成に利用されると考えられる。

D. 考察

D-1 造腫瘍性評価・制御法の開発

D-1-1 軟寒天コロニー形成試験の性能評価

細胞・組織加工製品の臨床応用において、最終製品の有効性と安全性の確保は本出的な問題である。特に、ヒト多能性幹細胞加工製品の場合は、安全性に関する大きなハードルの一つとして、最終製品に混入する未分化な多能性幹細胞に起因する腫瘍形成のリスクが挙げられる。ヒト多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性に

については、細胞株の樹立方法、あるいは残存未分化細胞の除去法の開発などに工夫をこらす試みがなされてきた。しかしながら、最終製品への未分化細胞・造腫瘍性形質転換細胞の混入を評価する試験系の性能とその限界に関するバリデーションはほとんどなされてこなかった。

足場非依存的な増殖は細胞の腫瘍性獲得の指標となることが知られており、悪性形質転換を検出するための *in vitro* アッセイ系としては最も正確な系だとされている。足場非依存的な細胞増殖を検出する方法として、軟寒天コロニー形成試験法がこれまで一般的に用いられてきた。軟寒天コロニー形成試験の利点としては、①ヌードマウス移植試験ほどは長期間を要しない（半年以上 *vs.* 1ヶ月程度）、②ヌードマウス移植試験よりも安価、③培養条件を変化させることで様々な環境下で細胞の特性評価が可能、などが挙げられる。逆に欠点としては、①実験の手間が煩雑、②通常 80-100mm ディッシュを用いるため多検体に向かない、③コロニーの計数・コロニーサイズのカットオフ値等に主観が入り、実験者間で結果がばらつく、④ *in vivo* 試験系の結果と整合しないことがある、などが挙げられる。また、軟寒天コロニー形成試験は非常に古典的な試験法だが、新種の製品群である細胞・組織加工製品の造腫瘍性評価における有用性・妥当性を裏付けるデータが不十分である点も問題である。つまり、正常細胞中に混入した微量な悪性細胞の検出を目的としたバリデーションが不十分であった。

本研究で検討した結果、軟寒天コロニー形成試験は、ヒト iPS 細胞加工製品中に残存するヒト iPS 細胞を検出するには適当な方法ではないことが明らかになった。その理由は、おそらく、ヒト iPS 細胞特有の分散誘導性アポトーシスによるものだと考えられる。また、PA-1 細胞と RPE 細胞を用いた結果より、軟寒

天コロニー形成試験系を用いて初代培養 RPE 細胞中に混入する PA-1 細胞の検出限界は約 1%であることが示された。

D-1-2 NOG マウスを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験の性能評価

D-1-2-1 造腫瘍性試験の国際ガイドライン

現在、細胞の造腫瘍性試験に関する国際的なガイドラインとして唯一存在するのは、世界保健機関（WHO）の生物薬品標準化専門委員会第 47 次報告（1998）（Technical Report Series No. 878, TRS 878）にある Annex I 「生物薬品製造用の *in vitro* 基材としての動物細胞の使用の要件」である。日米欧医薬品規制調和国際会議（ICH）のガイドライン「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）製造用細胞基材の由来、調製及び特性解析」（ICH Q5D, 医薬審 873 号, 平成 12 年 7 月 14 日）も、このガイドラインに記載された方法を援用している。

注：WHO TRS 878 Annex I の細胞基材に関する部分は最近改訂作業が行われており、平成 24 年 3 月現在の段階での最新のものは、平成 22 年（2010 年）10 月に公表された WHO 生物製剤標準化委員会最終案である。この最終案はまだ公式な TRS にはなっていないものの、TRS として発出されるまでに内容の変更が加わることはないとされている。従って本稿においては、上記最終案の内容を最新の WHO TRS 878 の内容として説明する。

WHO TRS 878 にある造腫瘍性試験の内容は、極めて大雑把に言えば「ヌードマウス等の動物 10 匹に 10^7 個の細胞を投与して 16 週間観察する。陽性対照としては Hela 細胞などを用いる。」というものであるが、注意しなければならないのはその適用対象と目的である。

WHO TRS 878 の造腫瘍性試験の適用対象は、あくまでワクチンやタンパク質製剤など、

ヒトを対象に *in vivo* 又は *ex vivo* で投与される生物薬品を製造する際に *in vitro* 基材として用いられるヒト又は動物由来の細胞株である。細胞種別に見た場合には、対象となる細胞種としては①正常 2 倍体細胞株、②幹細胞株、③連続継代性細胞株が挙げられている。また、セル・バンク別に見た場合には、①製品製造終了時（終了後）の細胞、②所定の継代数以上にわたって培養したマスター・セル・バンク、③最初に樹立したワーキング・セル・バンクが対象とされている。注意すべきは、「患者に移植する細胞」および「治療を目的に患者に移植する細胞株の原料となる細胞」は WHO TRS 878 の対象外とされていることで、その特性解析においては規制当局等との議論が必要とされている。

WHO TRS 878 における造腫瘍性試験の目的は、生物薬品用細胞基材となるセル・バンクの造腫瘍性の程度又は有無を正確に把握することにある。造腫瘍性の程度の大幅な変化又はその有無に変化が生じた場合、細胞特性に何らかの異常が起こったという指標となる。つまり、既知あるいは未知のウイルス感染、変異原性物質やストレスによる遺伝子変異・発がん遺伝子活性化など、原因はいずれにせよ、セル・バンクの安定性上の異常が発生したことを検出するための方策として、セル・バンクの造腫瘍性を細胞特性指標の一つとして評価し、品質管理に活用することが必要とされるわけである。生物薬品の製造には通常、二段式の細胞基材のセル・バンキングシステム、すなわちマスター・セル・バンクおよびワーキング・セル・バンクの確立が必要であるが、WHO TRS 878 では上で述べた目的に則した形で、造腫瘍性試験は製品製造終了時やマスター・セル・バンクの細胞を所定の継代数以上にわたって培養した時、あるいはワーキング・セル・バンクを樹立した時に実施しすることが求められている。翻って

みれば、WHO TRS 878 は患者に移植するヒト又は動物に由来する生細胞、すなわち再生医療や細胞治療においてヒトに投与される細胞・組織加工製品は対象とはしていない。

WHO TRS 878 における「造腫瘍性」とは、具体的に言えば「動物モデルに移植された細胞集団が、移植部位および（または）離れた転移部位で増殖することにより腫瘍を形成する能力」のことであって、ヒトにおけるリスクの直接的指標、すなわち「ヒトに移植された細胞集団が腫瘍を形成する能力」ではない。

D-1-2-2 WHO TRS 878 の造腫瘍性試験における検出限界

細胞・組織加工製品の安全性上のリスクの一つとして、「最終製品をヒトに投与した際に製品中の細胞が腫瘍を形成する可能性」がある。すなわち、ヒト多能性幹細胞を分化誘導せずにそのまま患者に投与するような特殊なケースを除いた多くの場合、最終製品に存在する僅かな未分化細胞・異常細胞に起因する造腫瘍性を評価しなければならない。その場合には「造腫瘍性」とは言っても、WHO TRS 878 にあるようなセル・バンク（均一集団）の造腫瘍性とは区別して理解する必要がある。しかしながら現実には前述のように、造腫瘍性試験のガイドラインは WHO TRS 878 しか存在しない。目的が違う WHO TRS 878 の試験を適用することは妥当なのか、という問題を考える前に、WHO TRS 878 の方法、すなわち「ヌードマウス等の動物に 10^7 個の細胞を投与」の根拠について触れる。

造腫瘍性の単位としては TPD_{50} というものが使われる。これは“tumor producing dose at the 50% endpoint”の略で、動物に移植した際に 50%の確率で腫瘍を形成するのに必要な細胞数のことである。米国 FDA/CBER の Andrew Lewis のデータによれば、例えば

Endo-CA(ヒト子宮内膜がん細胞由来), A549(ヒト肺がん細胞由来), HeLa (ヒト子宮頸がん細胞由来), 293 (ヒト胎児腎細胞由来) のヌードマウスでの TPD₅₀ 値はそれぞれ 10, 3 x 10³, 3 x 10⁴, 3 x 10⁶ 程度と言われており (http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/sli des/5-4188S1_2_files/frame.htm), 一言に「造腫瘍性」と言っても細胞株によってその強さは大きく異なる。WHO TRS 878 における「10⁷ 個」の根拠は、293 細胞のようにヌードマウスにおける造腫瘍性が低い (=TPD₅₀ 値の高い) 連続継代性細胞株の場合には、少なくとも 10 匹中数匹のヌードマウスにおいて腫瘍形成を検出するには 10⁷ 程度は接種する必要があるということにある。なお、HeLa 細胞程度の造腫瘍性細胞ならば、10⁷ 個投与すればすべてのマウスで腫瘍を形成するはずで、広く使用されている株でもあるため、陽性対照として利用できることになる。

ヒト多能性幹細胞加工製品としてヒト多能性幹細胞由来分化細胞をヒトに投与する場合、最も少ない細胞数で治療可能と考えられている網膜疾患治療用の網膜色素上皮細胞でも 1 回の移植に数万個は必要とされ、脊髄損傷治療に用いる神経細胞や心不全治療に用いる心筋細胞ではこれよりも何桁も多くの細胞数が必要だと言われている。例えばここで、ヒト細胞・組織加工製品の最終製品中の細胞の 1 万分の 1 が HeLa 細胞並み、または 293 細胞並みの造腫瘍性を持っていると仮定し、上述の TPD₅₀ 値を考慮すれば、半数のヌードマウスで腫瘍を形成させるためには単純計算でそれぞれ 3 x 10⁸, 3 x 10¹⁰ 程度の細胞が必要とされることになる。つまり、WHO TRS 878 にある方法 (10⁷ 個接種) では、ヒト細胞・組織加工製品に僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない可能性が高い。言い換えれば、WHO TRS 878 にある既存の方法では、結果はすべて偽陰性にな

ってしまう恐れがある。

D-1-2-3 重度免疫不全マウスとマトリゲル

ヒト細胞・組織加工製品中に僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出するためには、より高感度な動物を用いるという選択肢がある。その有力な候補の一つとして、わが国で開発された重度免疫不全マウス系統 NOD/SCID/γCnull (NOG) が挙げられる。NOG マウスは T 細胞, B 細胞および NK 細胞を欠失しており、ヌードマウスなどの従来の免疫不全マウスと比べてヒトの細胞や組織の生着性が高く、ヒトがん細胞を非常に高い効率で生着させることが可能と言われている。NOG マウスを利用することにより、ヒト細胞・組織加工製品中に残留・混入する僅かな造腫瘍性細胞を検出することが可能となる可能性は高い。ただし、まだその方法は未確立であり、科学的リスク評価のためには細胞・組織加工製品の造腫瘍性の定量化の方策の検討と、その標準化が必要とされてきた。

2008 年に米国ミシガン大学の Sean Morrison は、がん生物学における根本的な問題の 1 つ「ヒトのがんの中で、造腫瘍性をもつ細胞は一般的なものなのか、それともまれなのか」という問いに答えるための研究方法として、患者由来の任意のメラノーマ細胞 (直接患者から採取した原発性および転移メラノーマ由来の細胞) を段階希釈し、これをマトリゲルに懸濁したものを、NOG マウスに類似した重度免疫不全 NOD/SCID/IL2ryKO マウス (NSG) に投与することにより、マトリゲルに懸濁しなかった場合よりもメラノーマ細胞を高感度で検出できるようになることを示している (Quintana *et al.*, *Nature*. 2008;456:593-8)。本研究では、HeLa 細胞の希釈系列をマトリゲルに懸濁し、NOG マウスに投与することにより、WHO TRS 878 の方法と比較した場合にどの程度の感度になるのかを検討した。その結

果、既存のガイドラインにあるヌードマウスを用いた方法と比較した場合、およそ数百倍~千倍感度が高いことが明らかとなった。今後は、「NOG マウス+マトリゲル」の手法が TRS 878 の高感度な代替法となり得るのかを検討するとともに、細胞・組織加工製品の品質試験および非臨床安全性試験としての有用性、位置づけを見極めるための検討が必要と考えられる。

D-2 感染制御法の開発

多量の細胞中及びそれより調製した核酸中に分散分布し、かつ相対量比が低いウイルス核酸の検出にあたって、従来の定量的 PCR 法を適用すると、反応系の容量制限により細胞由来核酸の一部のみしか反応に供することが出来ないため偽陰性が生じる可能性がある。実際、今回我々が行った研究では、 1×10^7 個の細胞から抽出した total RNA 150 μg に、モデルレトロウイルスゲノム RNA を 7400 コピー (2.84×10^{-9} μg) 添加し、その混合 RNA を 1 μg ずつ 150 等分したところ、そのうちの約 29.4% のみがウイルス由来核酸陽性と判定される結果となった。つまり、従前より汎用的に利用されてきた定量的 PCR 法を用いて検査を行うと、約 70.6% の確率でウイルス由来核酸が陰性（検出限界以下）もしくは擬陽性（極微量低感度として捉えられ閾値を引くのが難しい）と誤って判断されてしまう可能性があるということになる。

この問題を克服するために考えられる改善策のひとつは現行の核酸増幅法の感度をさらに高めることである。今回は SYBR Green 法を使用した。別法として汎用的に用いられる TaqMan Probe 法（Cobas taqman）を利用すれば今回の結果よりいくらか感度向上は見込まれると予想されるものの、根本的な問題点は変わらない。また、検出機器の技術的な観点から考察すると、現段階で定量的 PCR 機器の検出感度はほぼ限界まで向上しており、これ以上

の大幅な感度向上は、エポックメイキングな機械的技術革新を待たねばならず、一朝一夕には解決できないと考えられる。そこで我々は、核酸増幅法を用いるという概念は踏襲しつつも、検出反応系を見直すことに着眼した。そこで、反応系に持ち込むことの出来る検体核酸量を増やすこと、すなわち反応系にウイルス核酸を（可能な限り）全て持ち込み、増幅し検出することで、総体的に感度、精度及び簡便性の向上を図るという創案に至った。ここで鍵となるのが、感染細胞検体由来の全核酸（ひいては全ウイルス核酸）を検出対象とでき、もれなく反応系に持ち込める基礎技術である。このような反応系を既存の RT-PCR 技術を基盤に改良を加えて創出すべく試行錯誤を繰り返したが目的を果たせなかった。そこで、改めて目的に叶う基盤検出法を探索したところ、等温遺伝子増幅法（ICAN 法）が有用であるという見解に至った。ICAN 法は DNA と RNA のキメラプライマーを用いて等温で遺伝子を増幅させることができるという特徴を持ち、反応系を大容量にすることで、持ち込む核酸の量を増やすことが可能である。また、最近では、この ICAN 法に検出特異性が非常に高いサイクリングプローブ法を組み合わせた、Cycleave ICAN 法という方法が開発されている。この Cycleave ICAN 法は現在のところ、キクワイ化病原ウイルス、ポテトスピンドルチューバーウイルス、トマトクロロティックドワーフウイルスなどの検出にも利用されており、ヒトウイルスゲノムの検出にも十分利用可能ではないかと考えられる。

D-3 免疫原性制御法の開発

異種動物抗原糖鎖を含む培養条件下、培養された iPS 細胞中に N-グリコシルノイラミン酸（NeuGc）や α Gal エピトープなどの通常ヒトでは観察されない異種動物糖鎖が観察された。一方、iPS 細胞の培養に用いる血清代替物（KSR）中には大量の NeuGc が観察され、

KSR 中の NeuGc は遊離 NeuGc, オリゴ糖, 糖ペプチド等の低分子の形で存在し, 細胞内に取り込まれた後, 糖鎖生合成に利用されると考えられた. 一方, ヒト培養癌細胞に遊離 NeuGc を与えると, 遊離 NeuGc が細胞内に取り込まれるとともに, 糖タンパク質糖鎖の非還元末端に NeuGc を持つ糖鎖が観察された. 以上の結果から, iPS 細胞で観察された NeuGc は, KSR などの異種動物抗原糖鎖を含む培養条件下, 細胞内に混入し, 取り込まれた NeuGc は CMP-NeuAc 合成酵素の働きにより CMP-NeuGc へと変換されたのち, シアル酸転移酵素により糖鎖非還元末端に付加されたと考えられた.

E. 結論

E-1 造腫瘍性評価・制御法の開発

ヒト iPS 細胞加工製品をはじめとする多くの細胞・組織加工製品の開発が, 国内外で精力的に進められている. しかし, その最終製品中に残存ないし混入する未分化造腫瘍性細胞ないし異常形質転換細胞を検出する方法の開発に関しては, これまでほとんど注意が払われてこなかった. 本研究によって, *in vitro* 造腫瘍性試験としての軟寒天コロニー形成試験系の性能を評価した結果, その能力と限界(すなわち試験系の検出限界やヒト多能性幹細胞への適用可能性など)を明らかにすることができた. また, NOG マウスおよびマトリゲルを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験系に関しては, HeLa 細胞の検出能力について, 既存のガイドラインにあるヌードマウスを用いた方法と比較した結果, およそ数百倍~千倍感度が高いことが明らかとなった.

これらの結果をもとに, 更に各種の造腫瘍性試験系のバリデーションを進め, それらの能力と限界を見極めたうえで, 一段と高性能な造腫瘍性試験の開発を行うと同時に, 試験法の標準化をすすめることにより, 細胞・組織加工製

品の品質評価・工程評価および安全性評価を容易にし, 細胞・組織加工製品ならびに再生医療・細胞治療の実用化が促進されることが期待される.

E-2 感染制御法の開発

細胞由来の多量の検体核酸に微量のウイルスゲノム核酸が混入していた場合, 従来の遺伝子増幅法では反応系容量の限界により, ウイルス由来核酸陽性と検出されない可能性が高くなる. もちろん, 何重にも検査することにより, 偽陰性と判定される危険性は下がるものの, かかるコストや操作の煩雑さを考えると, より簡便で操作数が少なく, かつ高感度な検出法である ICAN 法等の新規技術の有用性を今後検証する必要がある.

E-3 免疫原性制御法の開発

本研究ではヒト細胞中の異種動物抗原糖鎖を検出する方法の開発ならびに開発した方法を用いて, iPS 細胞中の異種動物抗原糖鎖の混入の有無について調査した. また, 異種動物抗原糖鎖の混入原因を調査した. その結果, 異種動物抗原糖鎖を含む培養条件下, 特に遊離 NeuGc を含む培養液等を用いて培養された細胞は, 細胞内に遊離 NeuGc を取り込むこと, 取り込んだ NeuGc を細胞内での糖鎖生合成に利用し, NeuGc を含む糖タンパク質糖鎖を合成しうることがわかった. ヒト細胞表面における NeuGc の発現は, 血清中の抗 NeuGc 抗体により認識され, 炎症状態を惹起することで癌細胞等の増殖に遊離な環境を与える要因になるとも考えられていることから, iPS 細胞の安全性を考えた場合, NeuGc 混入のない培養条件の確立, 混入した NeuGc のクリーニング法などについての方策についても今後検討する必要があると言える.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. 佐藤陽治, 黒田拓也 ヒト多能性幹細胞を使った再生医療・細胞治療における造腫瘍性試験の現状 *医学のあゆみ* 2011; 239:1460-5.
2. Nishioka K, Nishida M, Ariyoshi M, Jian Z, Saiki S, Hirano M, Nakaya M, Sato Y, Kita S, Iwamoto T, Hirano K, Inoue R, Kurose H. Cilostazol Suppresses Angiotensin II-induced Vasoconstriction via Protein Kinase A-mediated phosphorylation of TRPC6 channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31:2278-86.
3. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する指針整備と主なポイント *再生医療* 2011; 10:206-10.
4. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案) — 総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について — *再生医療* 2011; 10:211-8.
5. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案) — 総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について — *再生医療* 2011; 10:219-26.
6. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト(自己) iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案) — 総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について — *再生医療* 2011; 10:227-37.
7. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト(同種) iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案) — 総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について — *再生医療* 2011; 10:238-48.
8. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案) — 総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について — *再生医療* 2011; 10:249-60.
9. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案) — ヒト体性幹細胞, iPS(様)細胞又は ES 細胞を加工して製造される医薬品等(ヒト幹細胞加工医薬品等)の最終製品の品質管理 — *再生医療* 2011; 10:261-6.
10. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案) — ヒト体性幹細胞, iPS(様)細胞又は ES 細胞を加工して製造される医薬品等(ヒト幹細胞加工医薬品等)の非臨床試験及び臨床試験について — *再生医療* 2011; 10:267-72.
11. Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Watanabe K, Ono K, Shimizu S, Hayakawa T, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y. AW551984: a novel regulator of cardiomyogenesis from pluripotent embryonic cells. *Biochem J.* 2011;437:345-55.
12. Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, Sato Y, Kiyonaka S, Hoshijima M, Ikeda Y, Nakaya M, Ide T, Mori Y, Kurose H, Nishida M. TRPC3-mediated Ca^{2+} influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;409:108-13.
13. Yagi Y, Yamamoto S, Kakehi K, Hayakawa T, Ohyama Y, Suzuki S. Application of partial-filling capillary electrophoresis using lectins and glycosidases for the characterization of oligosaccharides in a therapeutic antibody. *Electrophoresis.* 2011 Nov;32(21):2979-85
14. Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Katayama K, Higuchi M, Tashiro K, Nonaka A, Sakurai F, Hayakawa T, Kusuda Furue M, Mizuguchi H. Efficient Generation of Functional Hepatocytes From Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells by HNF4 α