

- Transduction. *Mol Ther.* 2011 Nov 8. doi: 10.1038/mt.2011.234. [Epub ahead of print]
15. Tashiro K, Kawabata K, Omori M, Yamaguchi T, Sakurai F, Katayama K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction. *Stem Cell Res.* 2011 Sep 16. [Epub ahead of print]
 16. Oyama T, Yodohsi M, Yamane A, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Rapid and sensitive analyses of glycoprotein-derived oligosaccharides by liquid chromatography and laser-induced fluorometric detection capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011 Oct 1;879(27):2928-34.
 17. Saga A, Okura H, Soeda M, Tani J, Fumimoto Y, Komoda H, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Daimon T, Hayakawa T, Matsuyama A. HMG-CoA reductase inhibitor augments the serum total cholesterol-lowering effect of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells in hyperlipidemic homozygous Watanabe rabbits. *Biochem Biophys Res Commun.* 412(1): 50-4 (2011)
 18. Takao HAYAKAWA and Akiko Ishii: Japanese Regulatory Perspective on Immunogenicity. *Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals : Practical and Applied Considerations* (ed. by Michael G. Tovey), John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA, August 2011 (著書)
 19. Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Tashiro K, Katayama K, Sakurai F, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient and directive generation of two distinct endoderm lineages from human ESCs and iPSCs by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One.* 2011;6(7):e21780.
 20. Yamamoto S, Shinohara C, Fukushima E, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Partial-filling affinity capillary electrophoresis of glycoprotein oligosaccharides derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid. *J Chromatogr A.* 2011 Jul 22;1218(29):4772-8.
 21. Yodoshi M, Oyama T, Masaki K, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S.: Affinity entrapment of oligosaccharides and glycopeptides using free lectin solution. *Anal Sci.* , 2011;27(4):395.
 22. Suzuki T, Sasaki T, Yano K, Sakurai F, Kawabata K, Kondoh M, Hayakawa T, Yagi K, Mizuguchi H. Development of a recombinant adenovirus vector production system free of replication-competent adenovirus by utilizing a packaging size limit of the viral genome. *Virus Res.* 2011 Jun;158(1-2):154-60.
 23. Sugio K, Sakurai F, Katayama K, Tashiro K, Ma H, Kawabata K, Kawase A, Iwaki M, Hayakawa T, Fujiwara T, Mizuguchi H. Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences. *Clin Cancer Res.* 2011 May 1;17(9):2807-18.
 24. Kinoshita M, Kakoi N, Matsuno YK, Hayakawa T, Kakehi K. Determination of sulfate ester content in sulfated oligo- and poly-saccharides by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Biomed Chromatogr. Biomed Chromatogr.* 2011 May ;25(5):588-93. (Article first published online: 26 JUL 2010)
 25. Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPSC cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol. Ther., Mol Ther.* 2011 Feb;19(2):400-7.
 26. Okura H, Saga A, Fumimoto Y, Soeda M, Moriyama M, Moriyama H, Nagai K, Lee CM, Yamashita S, Ichinose A, Hayakawa T, Matsuyama A. Transplantation of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011 Feb;17(2):145-54.
 27. Yamada K, Kakehi K. Recent advances in the analysis of carbohydrates for biomedical use. *J Pharm Biomed Anal.* 2011 55(4):702-27.
 28. Yamada K, Kakehi K. One-pot characterization of cancer cells by the analysis of mucin-type glycans and glycosaminoglycans. *Anal. Biochem.* (in press)
 29. 早川堯夫, 水口裕之: i P S細胞と創薬, *Brain and Nerve* 64, (印刷中)
 30. 早川堯夫: 第十六改正日本薬局方について. 日本薬局方試験法ガイド(一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団編), pp.3-13 (2011) じほう, 東京
 31. 早川堯夫: ヒト iPSC (様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する2つの指針案. *医学のあゆみ*, 239, 14 (2011)

32. 木下充弘, 掛樋一晃: 糖タンパク質性バイオ医薬品に求められる分析技術. バイオ医薬品開発における糖鎖技術 (早川堯夫, 掛樋一晃, 平林 淳 監修) pp191-208 (2011), シーエムシー出版, 東京
33. 早川堯夫: 再生医療推進のための規制環境の整備. 医薬ジャーナル, 10 (2011)
34. 早川堯夫: 医薬品製造とウイルス安全性確認の基本的考え方. 医薬品の品質管理とウイルス安全性 (日本医薬品等ウイルス安全性研究会編) 文光堂, 東京, 2011
35. 早川堯夫: 第十六改正日本薬局方について. *Phar.Tech.Japan.*, 27(8), 7-14(2011)

G-2 学会発表

1. Kuramochi T, Satoh M, Atsuki H, Yasuda S, Hayakawa T, Suzuki K, Sato Y. Modes of action of genes facilitating ischemia-induced VEGF secretion in human mesenchymal stem cells. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都 (2012 年 3 月 14-16 日)
2. 佐藤陽治 細胞・組織加工製品の造腫瘍性評価 第 1 回ミニマム・コンセンサス・パッケージ (MCP) 策定会議: 第 1 回再生医療薬事講習会, 神戸 (2012 年 2 月 6 日)
3. 佐藤陽治 細胞治療・再生医療の規制の国際比較 第 12 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム, 東京 (2012 年 2 月 4 日)
4. Sato Y. Update on the Regulation and Development of Cell/Tissue-Based Products in Japan. 2011 International Convention of the Pharmaceutical Society of Korea, 仁川, 韓国 (2011 年 11 月 8 日)
5. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human stem cells. World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany (2011 年 11 月 2-4 日)
6. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human somatic stem cells. World Stem Cell Summit 2011, Pasadena, USA (2011 年 11 月 3-5 日)
7. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human pluripotent stem cells. World Stem Cell Summit 2011, Pasadena, USA (2011 年 11 月 3-5 日)
8. 佐藤陽治 ヒト iPS (様) 細胞を加工して製造される分化細胞の品質 第 1 回レギュラトリーサイエンス学会学術大会, 東京 (2011 年 9 月 3 日)
9. Sato Y, Atsuki H, Satoh M, Tanabe S, Yamaguchi T, Hayakawa T, Suzuki K. Identification of genes that regulate cardiomyogenesis in mouse embryonic cells. The 10th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011 年 6 月 15-18 日)
10. Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y. Genes associated with ischemia-induced VEGF secretion of human bone marrow mesenchymal stem cells. The 10th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011 年 6 月 15-18 日)
11. 早川堯夫: 再生医療の規制制度の現状と今後の展望. (独) 日本学術振興会 (JSPS) 第 9 回「再生医療の実用化」に関する研究開発専門委員会, 東京 (平成 23 年 5 月 26 日)
12. 早川堯夫: 規制環境を再生医療実用化の水先案内, 牽引力, 推進力にするために. JSPS 「再生医療の実用化」に関する研究開発専門委員シンポジウム「オールジャパンで目指す再生医療実用化」, 東京 (平成 23 年 7 月 30 日)
13. 早川堯夫: 再生医療の現状と課題. 兵庫県製薬協会創立 70 周年記念行事, 神戸 (平成 23 年 6 月 10 日)
14. Saga A, Okura H, Soeda M, Tani J, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Tahara S, Hayakawa T and Matsuyama A: Transplantation of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells reduces serum cholesterol and the effects could be augmented by HMG-CoA reductase inhibitor in hyperlipidemic Watanabe rabbits. The 9th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011.6.15-18)
15. Soeda M, Okura H, Saga A, Tani J, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Tahara S, Hayakawa T and Matsuyama A: Transplantation of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells but not adipose tissue-derived stromal/stem cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. The 9th Annual Meeting of the International Society

- for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011.6.15-18)
16. Okura H, Saga A, Soeda M, Tani J, Moriyama M, Moriyama H, Miyagawa S, Sawa Y, Ichinose A, Tahara S, Hayakawa T and Matsuyama A: Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction and survival in a swine chronic myocardial infarction model, The 9th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011.6.15-18)
 17. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human somatic stem cells. World Stem Cell Summit 2011, Pasadena, USA (2011.10.3-5)
 18. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human pluripotent stem cells. World Stem Cell Summit 2011, Pasadena, USA (2011.10.3-5)
 19. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human stem cells. World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany (2011.11.2-4)
 20. Okura H, Saga A, Soeda M, Tani J, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Tahara S, Hayakawa T and Matsuyama A: In situ stem cell therapy using human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells combined with HMG-CoA reductase inhibitor synergistically reduce serum cholesterol level in hyperlipidemic Watanabe rabbits, 84th American Heart Association Scientific Sessions, Orlando, USA (2011.11.12-16)
 21. Okura H, Saga A, Soeda M, Tani J, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Tahara S, Hayakawa T and Matsuyama A: Transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits, 84th American Heart Association Scientific Sessions, Orlando, USA (2011.11.12-16)
 22. 早川堯夫: 規制環境を再生医療実用化の水先案内, 牽引力, 推進力にするために「幹細胞医薬の薬事法下の開発ガイドラインの現状」. バイオフィナンスギルド第10期第5回セミナー「幹細胞は、本当に医薬品になるのか?」, 東京 (平成23年12月16日)
 23. 早川堯夫: ミニマム・コンセンサス・パッケージ (MCP) 策定に向けて. 第1回ミニマム・コンセンサス・パッケージ (MCP) 策定会議: 第1回再生医療薬事講習会- 医療革新のために Scientific Common Sense を -, 神戸 (平成24年1月06日)
 24. Hayakawa T: Some Aspects of Development, Evaluation and Control of Cell/Tissue-Based Products in Japan. International Forum on Challenges and Opportunities Posed by Biopharmaceuticals, KFDA, Seoul, Korea (2012.3.27-29)
 25. 木下充弘, 能登啓介, 奥田茜, 小南有加, 早川堯夫, 掛樋一晃 エイジングマーカーとしての糖鎖の可能性 第30回日本糖質学会年会, 平成23年7月11日, 長岡
 26. 橋本浩志, 仲西暁良, 木下充弘, 鈴木匡, 早川堯夫, 掛樋一晃 細胞外遊離 N-グリコシルノイラミン酸のヒト培養癌細胞への取り込み 第30回日本糖質学会年会, 平成23年7月11日, 長岡
 27. 原沙弥香, 山田佳太, 三ツ井洋輔, 木下充弘, 早川堯夫, 掛樋一晃 ヒト胃癌細胞中高フコシル化糖タンパク質のグライコプロテオーム解析 第30回日本糖質学会年会, 平成23年7月11日, 長岡
 28. 神末和哉, 大河原周平, 山田佳太, 岩塚欣也, 木下充弘, 早川堯夫, 掛樋一晃 ヒト胃癌細胞 MKN45 細胞は糖タンパク質由来の遊離糖鎖を細胞外へ分泌する 第30回日本糖質学会年会, 平成23年7月11日, 長岡
 29. 原沙弥香, 山田佳太, 三ツ井洋輔, 木下充弘, 早川堯夫, 掛樋一晃 ヒト胃癌細胞中の高フコシル化糖タンパク質の探索 第61回日本薬学会近畿支部, 平成23年10月22日, 神戸
 30. 神末和哉, 大河原周平, 山田佳太, 岩塚欣也, 木下充弘, 早川堯夫, 掛樋一晃 ヒト胃癌細胞 MKN45 による糖タンパク質由来遊離糖鎖の細胞外分泌 第61回日本薬学会近畿支部, 平成23年10月22日, 神戸
 31. 中辻佑強, 岸本昌太, 木下充弘, 早川堯夫, 荒井昭博, 中村伸, 掛樋一晃 マイクチップ等電気泳動法によるタンパク質製剤の迅速解析技術の開発 第61回日本薬学会

- 近畿支部，平成 23 年 10 月 22 日，神戸
32. 神末和哉，木下充弘，掛樋一晃 CESI-MS
によるペプチド・タンパク質分析 第 31
回キャピラリー電気泳動シンポジウム，平
成 23 年 11 月 11 日，鶴岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得 なし

H-2. 実用新案登録 なし

H-3. その他 特記事項なし

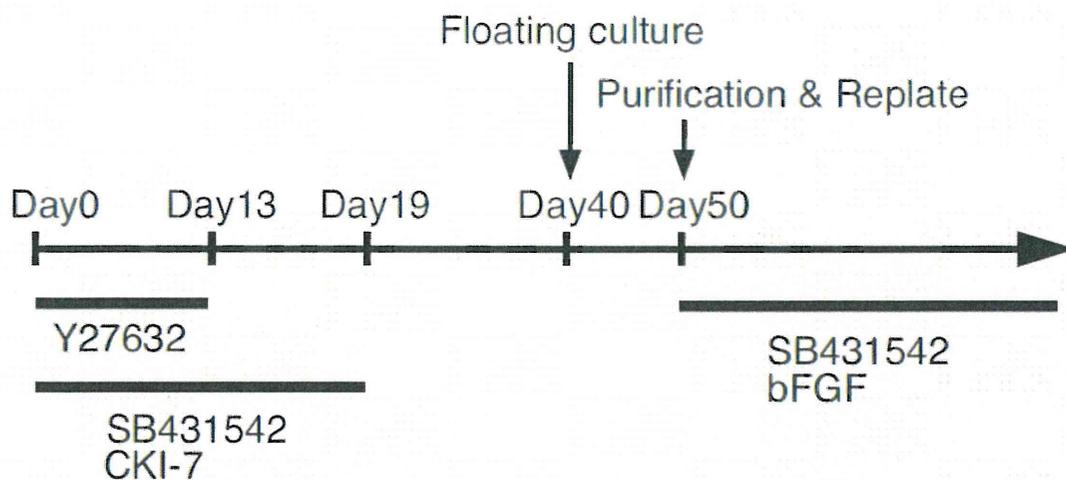


Figure 1 ヒト iPS 細胞から網膜色素上皮細胞への *in vitro* における分化誘導

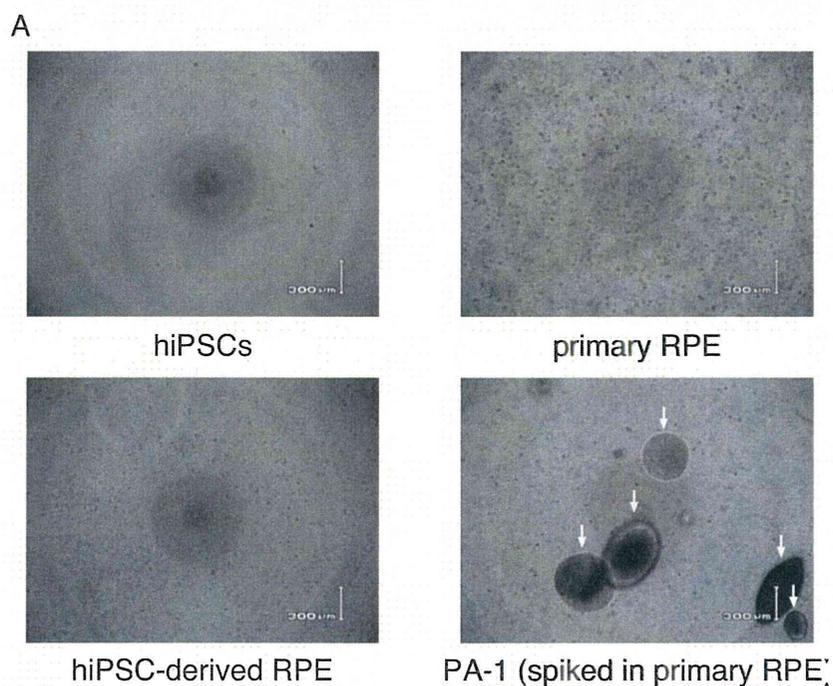


Figure 2 ヒト iPS 細胞およびヒトテラトカルシノーマ細胞株 PA-1 の軟寒天コロニー形成試験
 (A) ヒト iPS 細胞, 初代培養ヒト網膜色素上皮細胞 (RPE), 初代培養ヒト RPE 細胞にスパイクしたヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞および PA-1 細胞 (1%) を軟寒天培地中で 30 日間培養した際の位相差顕微鏡造像.

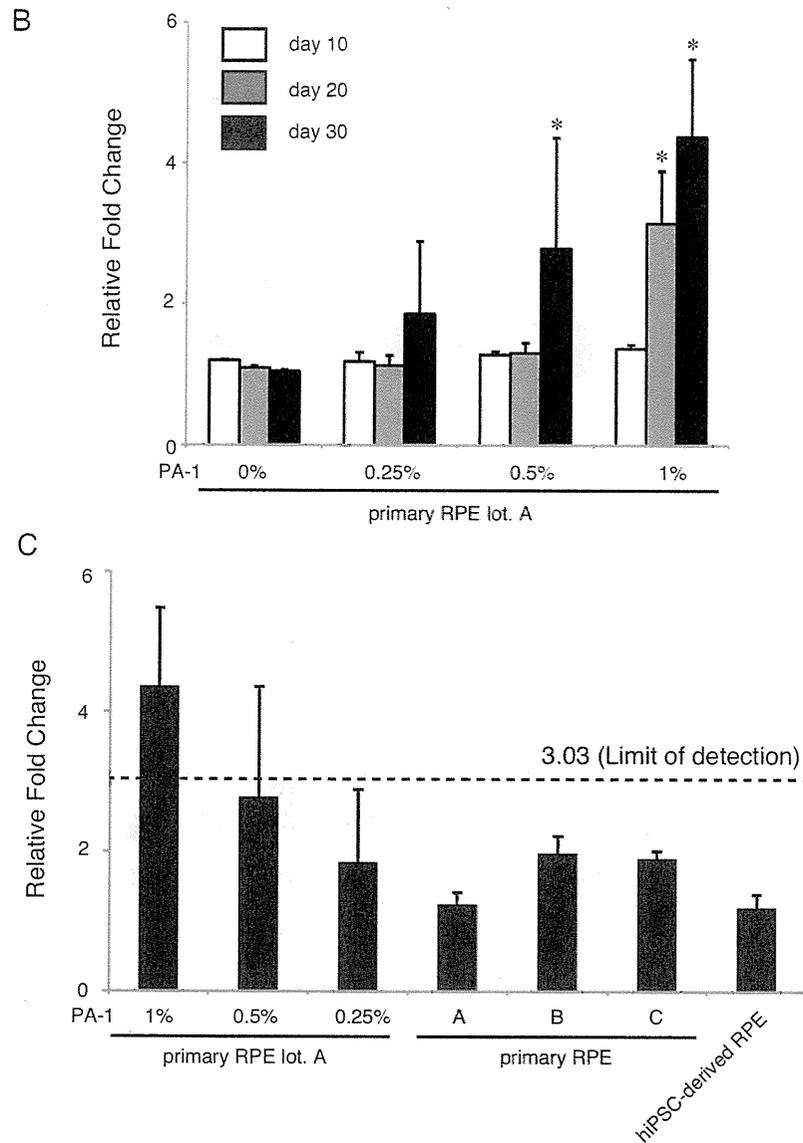


Figure 2 (続き) ヒト iPS 細胞およびヒトテラトカルシノーマ細胞株 PA-1 の軟寒天コロニー形成試験
 (B) PA-1 細胞を 10^4 個のヒト初代培養ヒト RPE 細胞に 1% (100 個), 0.5% (50 個), 0.25% (25 個), および 0% (0 個) の割合でスパイクし, 軟寒天培地中で 10, 20 ないし 30 日間培養した. 細胞数は CytoSelect キットにより定量化し, ブランクの値に対する相対値として表示した. 統計的有意差は, Two-way ANOVA と Bonferroni 多重検定により算出した. (* $P < 0.05$ vs. 0% コントロール) (C) PA-1 細胞をヒト初代培養ヒト RPE 細胞 (ロット A) に一定の割合でスパイクしたもの, 3 ロットのヒト初代培養ヒト RPE 細胞およびヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞を軟寒天培地中で 30 日間培養した. 細胞数は上の (B) と同様に表した. 検出限界は点線で示す. 棒グラフのエラーバーは標準偏差 ($n=3$).

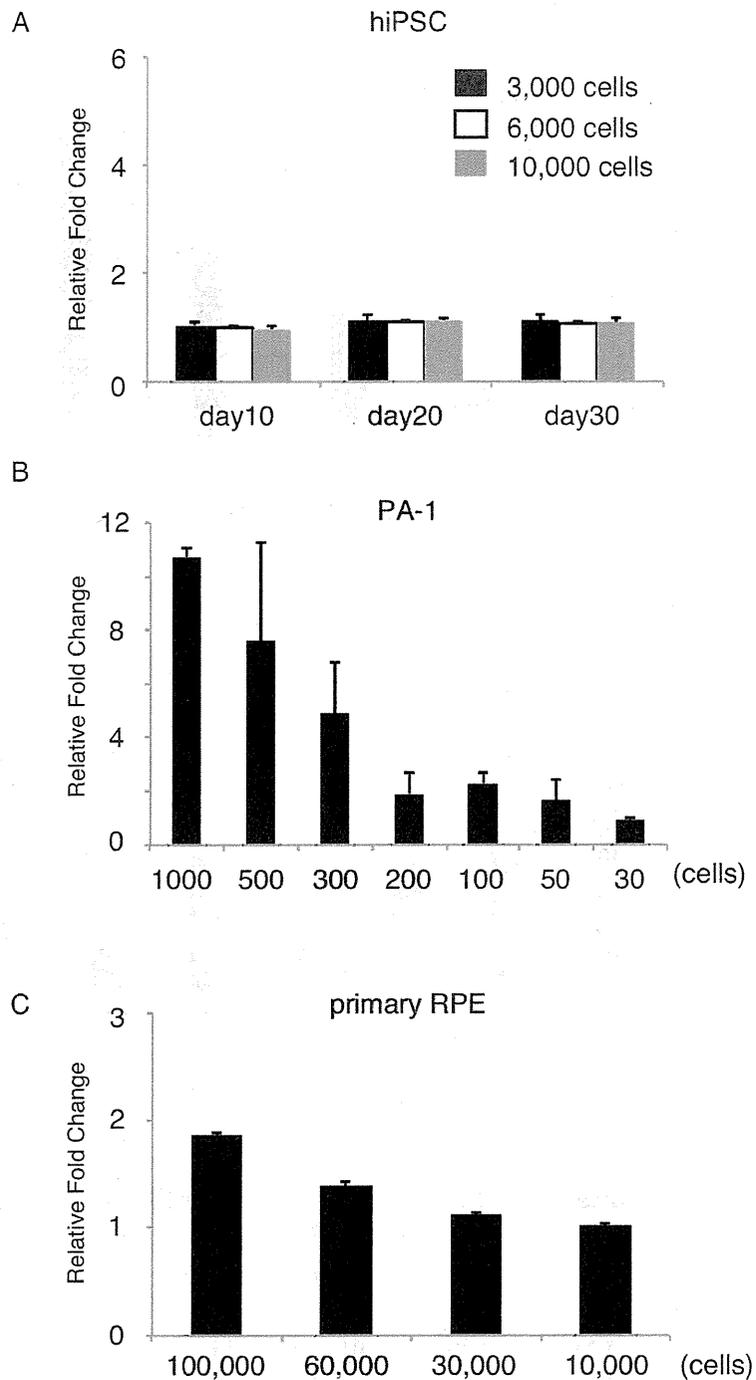
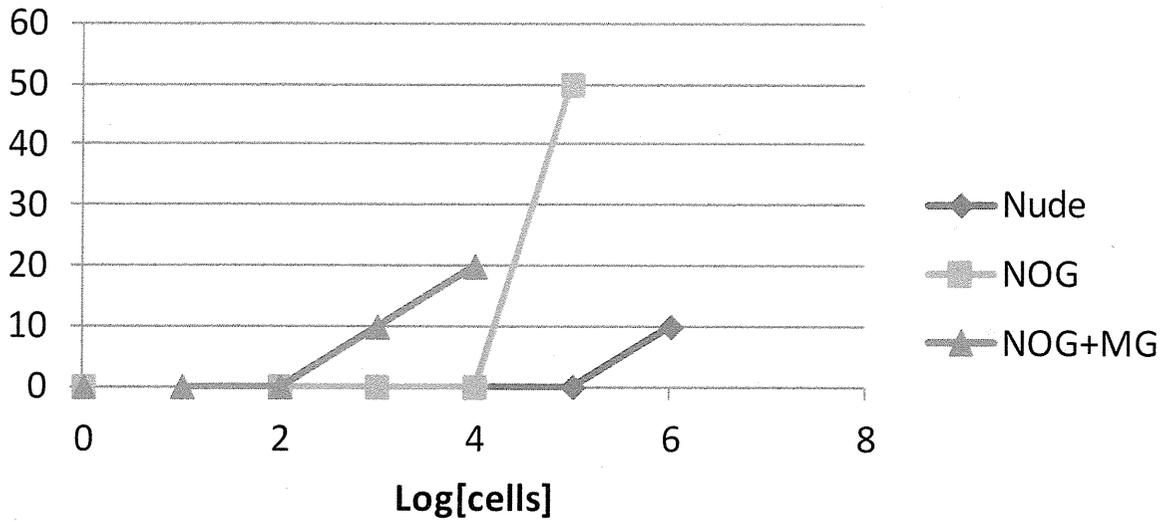


Figure 3 ヒト iPS 細胞, PA-1 細胞および初代培養 RPE 細胞の軟寒天コロニー形成試験

(A) ヒト iPS 細胞 (10,000 個, 6,000 個, 3,000 個/ウェル) を 10 μ M Y-27632 存在下に 10, 20 ないし 30 日間培養した. (B) PA-1 細胞 (1,000~30 個/ウェル) を軟寒天培地中で 20 日間培養した. (C) 初代培養 RPE 細胞 (ロット A: 100,000~10,000 個/ウェル) を軟寒天培地中で 30 日間培養した. (A-C) 細胞数は CytoSelect キットにより定量化し, ブランクの値に対する相対値として表示した. . 棒グラフのエラーバーは標準偏差 (n=3).

Nodule Formation (% Animals) Hela cells, 4 weeks



Nodule Formation (% Animals) Hela cells, 5 weeks

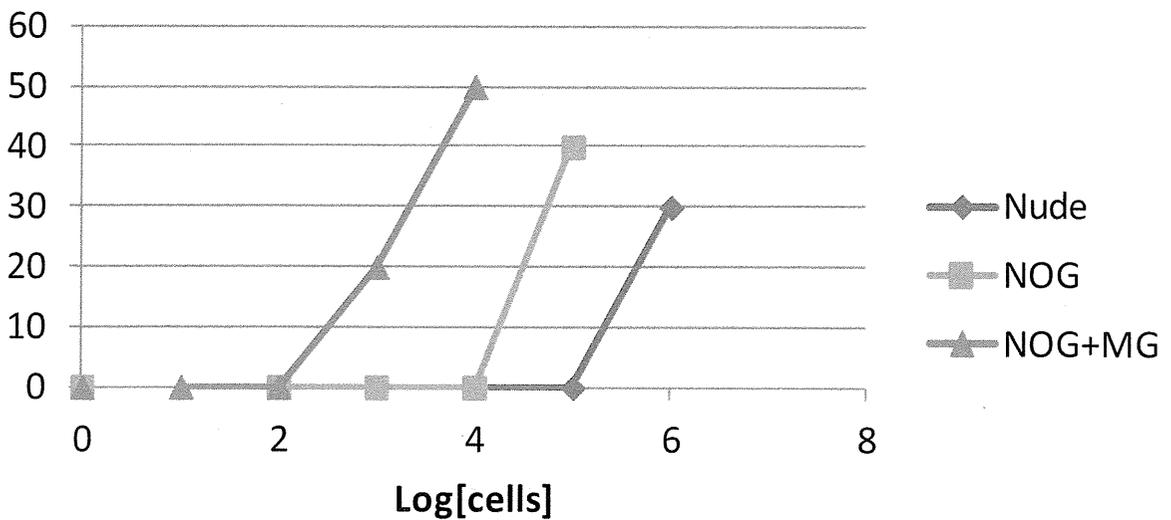


Figure 4 免疫不全マウスへの Hela 細胞の生着とマトリゲルの効果

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明らかな結節形成は認められなかったが、4 週間後からは結節が認められ、5 週間後には結節形成の用量依存性が明らかになった。細胞をマトリゲルに懸濁したうえで投与した NOG マウス (NOG+MG) の群の Hela 細胞生着性はヌードマウスと比較して数百倍～千倍高いことが分かる。

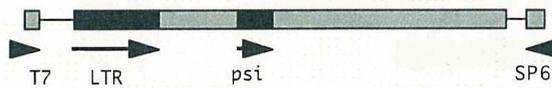


図 5 : モデルレトロウイルス核酸を作製するために利用した鋳型 DNA

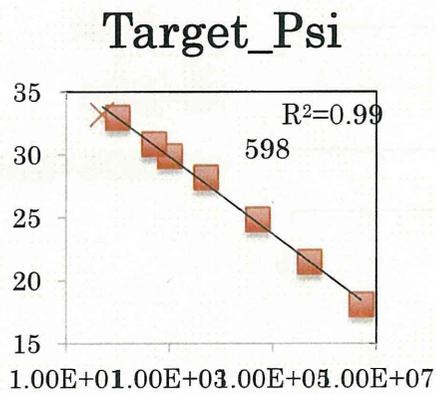


図 6 : 今回の qPCR の直線性テスト. 1×10^2 コピーまでは高い直線性を示している. 縦軸は, Ct 値 (PCR 増幅産物 (Psi 配列) がある一定量 (閾値) に達したときのサイクル数) を示し, 横軸はモデルウイルスゲノム RNA のコピー数を示している.

primer	HIV-1 LTR	HIV-1 psi
陽性数	42 ± 5	46 ± 7
%	平均 28.0	平均 30.7

表 1 : 7400 コピーのモデルレトロウイルス核酸を 150 等分して定量的 PCR をかけたときの陽性検体数

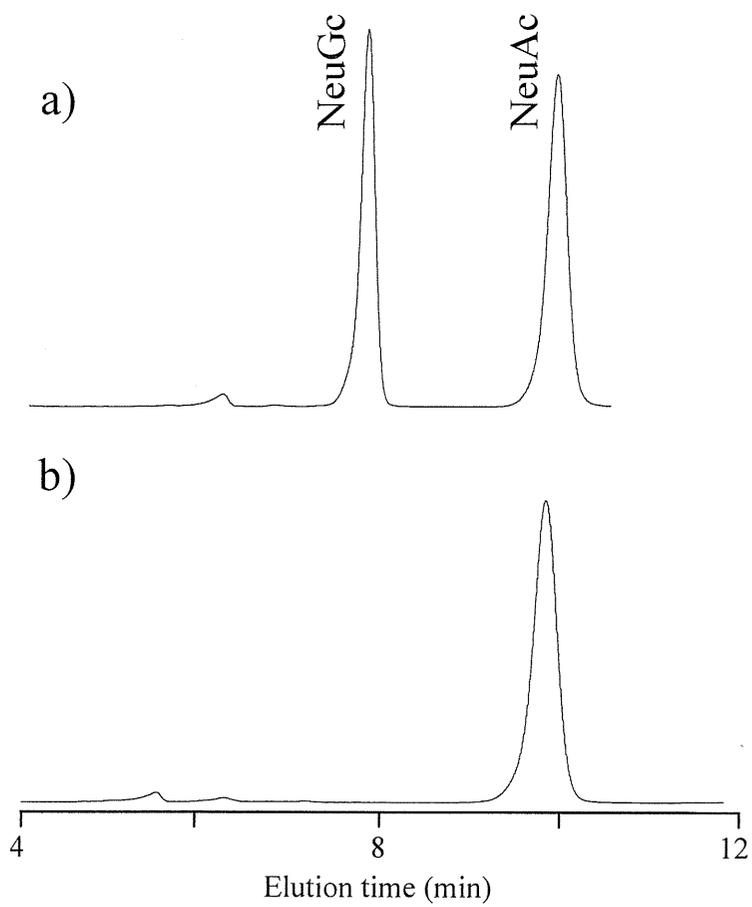


Fig.7 HPLC chromatogram of sialic acid analysis.
Analytical conditions: Column oven: 40 °C, Flow rate: 0.9 mL/min. Detection:
Ex. 375 nm Em. 448 nm, Elution: Acetonitrile:Methanol:Water=2:14:84

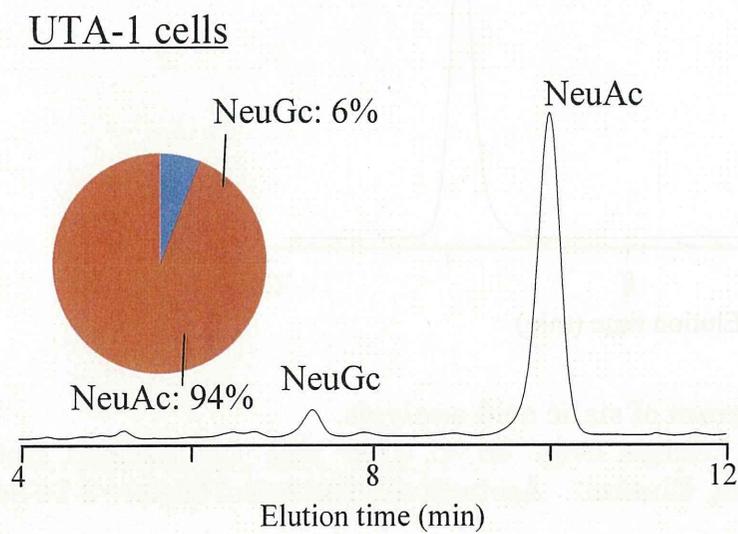
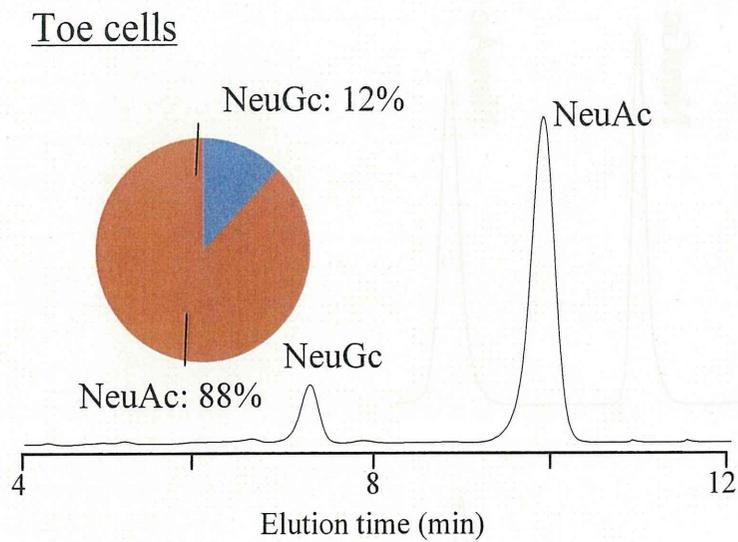


Fig.8 RP-HPLC analysis of sialic acid in two iPS cells.
Analytical conditions are the same as in Fig.7.

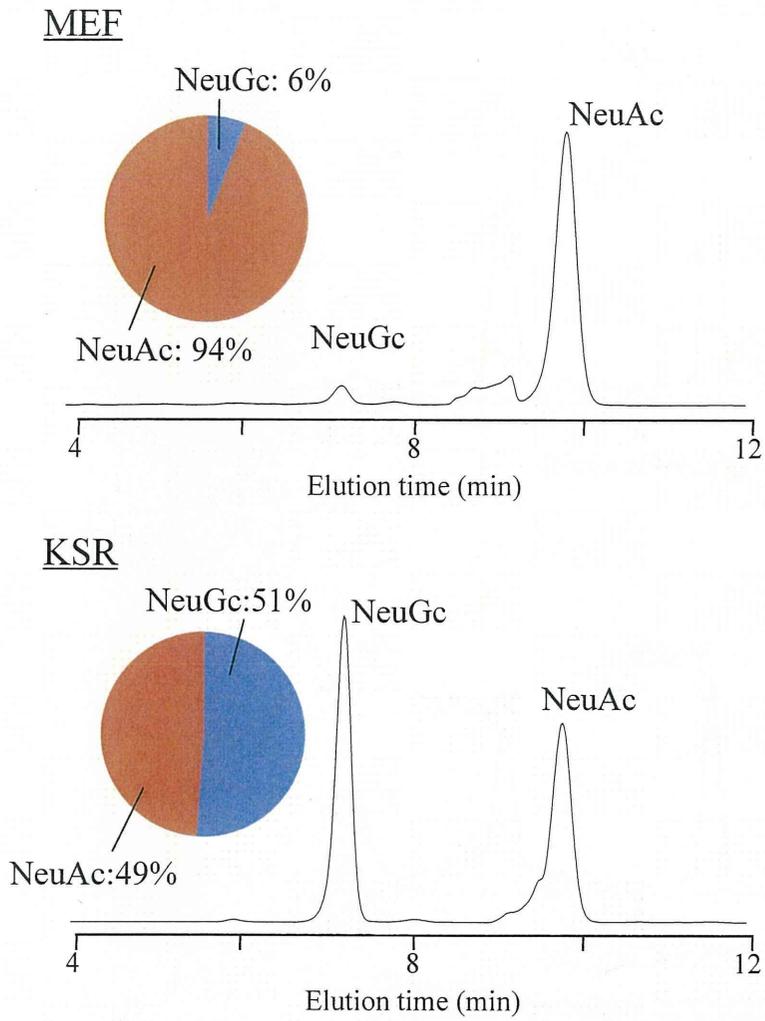
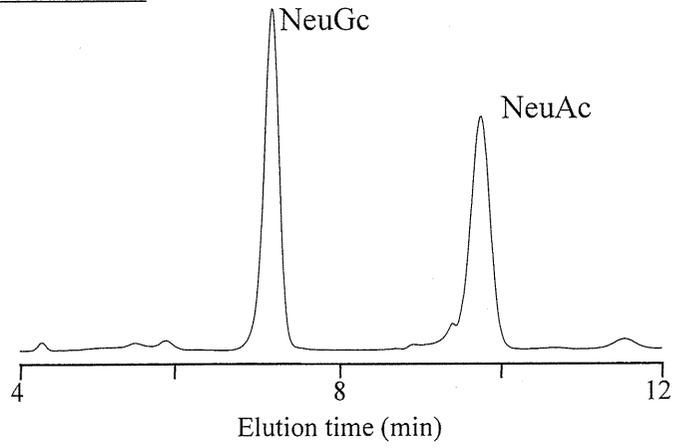


Fig.9 RP-HPLC analysis of sialic acid in MEF and KSR. Analytical conditions are the same as in Fig.7.

MW>3000



MW<3000

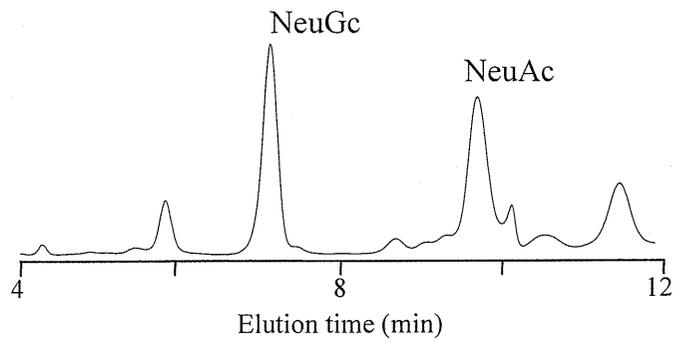


Fig.10 RP-HPLC analysis of sialic acid in KSR.
Analytical conditions are the same as in Fig.7.

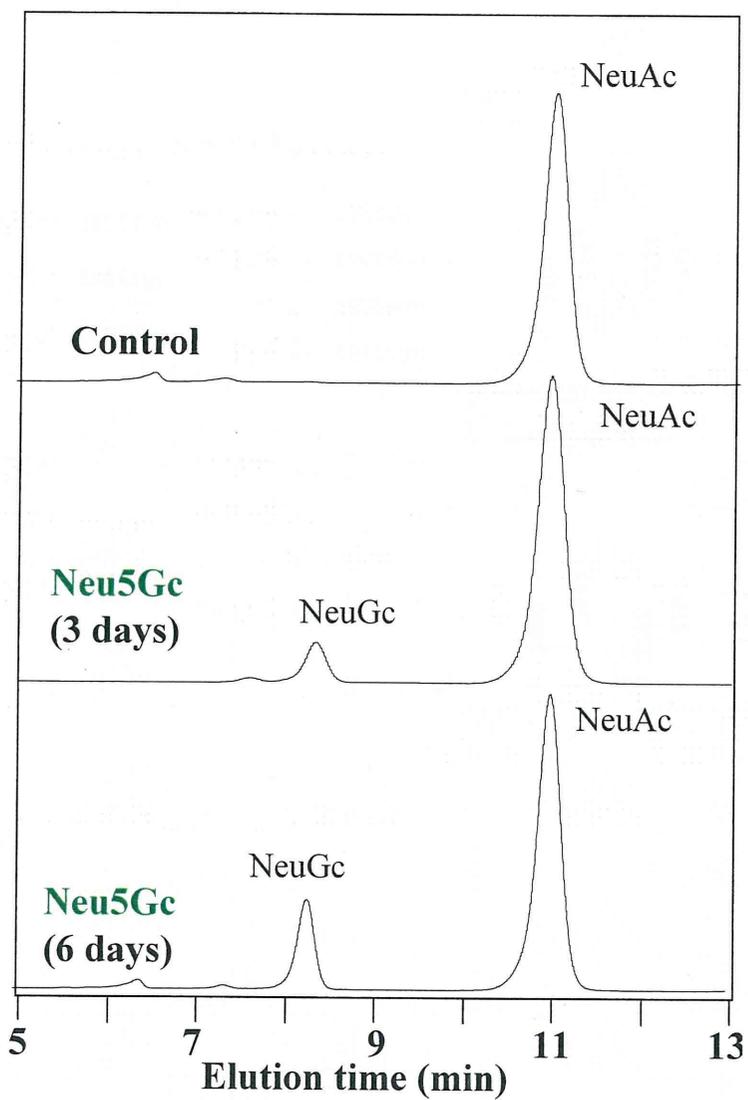


Fig.11 Uptake of Extracellular Free Neu5Gc in Human Gastric Cancer (MKN45). Analytical conditions are the same as in Fig.7.

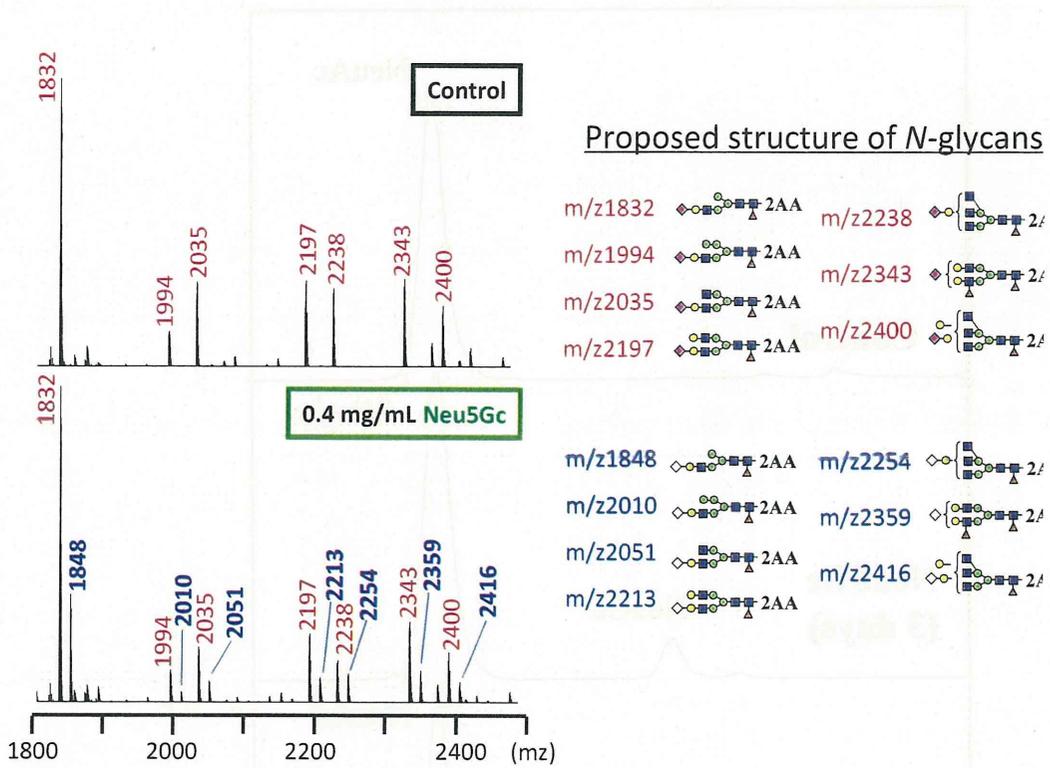


Fig.12 MALDI-TOF MS Analysis of Monosialo-*N*-glycans after uptaking of extracellular Free Neu5Gc

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」
分担研究報告書

細胞・組織加工製品中の造腫瘍性評価・制御法の開発

研究代表兼分担者：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】細胞・組織加工製品（特にヒト多能性幹細胞加工製品）において重要な品質管理上および安全性上の関心事である「造腫瘍性」に焦点を当て、製品中への造腫瘍性細胞の混入を *in vitro* および *in vivo* で高感度に検出する試験系の評価を行った。【方法】*In vitro* の試験系として軟寒天コロニー形成試験の性能とその限界の評価を実施し、*in vivo* の系に関しては国産の重度免疫不全マウスモデル（NOG マウス）の造腫瘍性細胞検出系としての性能評価のための基礎的データを取得した。【結果】軟寒天コロニー形成試験系の性能を評価した結果、ヒト iPS 細胞の検出は不可能であることが明らかとなった。これはおそらくヒト多能性幹細胞特有の分散誘導性アポトーシスによるものと考えられた。また、テラトカルシノーマ細胞株の PA-1 細胞と初代培養ヒト網膜色素上皮細胞（RPE 細胞）を用いた結果より、初代培養ヒト RPE 細胞（接着性正常ヒト分化細胞）中に混入する造腫瘍性細胞の検出限界は、その足場非依存性増殖能力が PA-1 細胞と同等と仮定した場合、約 1%であることが示唆された。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場合、およそ数百~千倍感度が高いことが明らかとなった。【結論】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いうで、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。

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
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

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。

本分担研究では、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し、基本的命題の一つである安全性・品質の確保を図るための、効果的・効率的・合理的な造腫瘍性の評価と抑制に関する汎用性の高い技術開発を目標とする。

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。

「造腫瘍性」(tumorigenicity)とは、動物に移植された細胞集団が増殖することにより悪性または良性の腫瘍を形成する能力を言う。ヒトES細胞株やヒトiPS細胞株を樹立した際には、どのくらい初期胚内の多能性幹細胞の性質を保っているかを確認する必要があるが、その際、細胞の多能性の証明は通常、免疫不全動物に細胞を移植して動物体内でのテラトーマ(teratoma, 奇形腫)の形成を確認し、移植した細胞が内・中・外胚葉系の様々な細胞種に分化することを示すことによってなされている。つまり、ヒト多能性幹細胞は造腫瘍性を元来の特性として保持しており、この点がヒト体細胞・体性幹細胞とは大きく異なる。したがって、ヒト多能性幹細胞を原材料とした医薬品・

医療機器においては、未分化細胞の混入・残留により異所性組織形成や腫瘍形成・がん化が惹起される可能性があり、最終製品の造腫瘍性の評価と管理が重要な課題となる。

本研究では、多能性幹細胞加工製品を中心に、細胞・組織加工製品において重要な品質管理上および安全性上の関心事である造腫瘍性に焦点を当て、製品中への造腫瘍性細胞の混入を *in vitro* および *in vivo* で高感度に評価する方法の有用性に関する評価を行った。具体的には、*in vitro* の試験系として軟寒天コロニー形成試験の性能とその限界の評価を実施し、*in vivo* の系に関しては重度免疫不全マウスモデル (NOG マウス) の造腫瘍性細胞検出系としての性能評価のための基礎的データを取得した。

B. 研究方法

B-1 軟寒天コロニー形成試験の性能評価

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

B-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-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).

(倫理面への配慮)

動物実験を行う際には国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」に基づき, 実験内容の審査と承認をうけた上で実施した. 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, 国立医薬品食品衛生研究所「研究倫理審査委員会規程」を遵守した上で研究を実施した.

C. 研究結果

C-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すると言われている 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 1x10⁴ 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, 1x10⁴ 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)