

201206007A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 陽治

平成 25 (2013) 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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 陽 治

平成 25 (2013) 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	51
佐藤 陽治	
2. 細胞・組織加工製品の感染制御法の開発	70
早川 堯夫	
3. 細胞・組織加工製品の免疫原性制御法の開発	97
掛樋 一晃	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	106
IV. 研究成果の刊行物・別刷	111

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・部長

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。本研究は、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・製造法の開発を行い、わが国から世界に向けて先導的に提示する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、④均一性・同等性の確保に関する技術開発を展開した。【結果】①細胞・組織加工製品の製造工程における造腫瘍性細胞の混入の検出を目的とした試験系として、国産の重度免疫不全マウスモデル（NOG マウス）への細胞移植試験の性能評価を実施した。細胞・組織加工製品のモデルケースとしてヒト骨髄間葉系幹細胞（hMSC）を用い、陽性対照として HeLa 細胞を一定量スパイクした hMSC を用いて、試験系の検出感度を評価した。その結果、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、2 千倍以上感度が高かった。また、同試験系を用いることにより、 10^6 個の hMSC に混入する HeLa 細胞は、その下限として 10^2 個までが検出可能であった。従って、培養ヒト骨髄由来間葉系幹細胞において、NOG マウスおよびマトリゲルを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験系を用いた試験が「陰性」であることの意味は、「造腫瘍性細胞の混入は、仮にその造腫瘍性が HeLa 細胞と同程度だとした場合、0.01%未満である」ということであることが明らかとなった。②ウイルス遺伝子特異的等温増幅法（Ladder forming RT-ICAN 法）のプロトタイプ（HIV 遺伝子検出を可能とする Ladder forming RT-ICAN 法）の開発に成功した。また、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞と無血清・フィーダー細胞フリーで樹立した iPS 細胞株を対象にウイルス由来遺伝子否定試験を実施し、本技術が有効に機能することを検証した。③iPS 細胞の培養時の異種動物由来成分の混入原因として、未分化性の維持に用いる KSR と MEF を明らかにした。また、異種動物由来成分を用いて樹立され、KSR と MEF を用いて未分化性を維持した iPS 細胞であっても、完全ヒト化培養条件での継代培養により、異種動物由来成分の混入を低減できることを明らかにした。④同一 iPS 細胞であっても培養条件の違いが糖鎖プロファイルに影響を与えること、すなわち細胞の均質性・同質性に影響することを明らかにした。【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 近畿大学薬学部 生物情報薬学研究室・薬学総合研究所 教授

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
郷 正博 (公財)先端医療振興財団 クラスター推進センター 再生医療支援グループ 専門役
西川 伸一 (公財)先端医療振興財団 副理事長
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 第2室 室長
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
森山 麻里子 近畿大学 薬学総合研究所 先端バイオ医薬研究室 研究員
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 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室 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、a)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、b)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、早ければ2014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。

これらの成果を受けて平成 24 年度は、① NOG マウスを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験系について、造腫瘍性細胞としての HeLa 細胞の生着性の定量的検討を行ったとともに、細胞・組織加工製品のモデルケースとしてヒト骨髄間葉系幹細胞 (hMSC) を取り上げ、hMSC 中に HeLa 細胞が混入していることを想定し、本研究で開発した方法における造腫瘍性細胞 (HeLa 細胞) の検出感度と検討した。また、② ICAN 法の技術改良に必要な細胞系が既存に見当たらないことから、微量のモデルウイルス核酸をスパイクさせた細胞を用いたウイルス検出モデル系の構築を行うとともに、このモデル系を用いたウイルス遺伝子特異的等温増幅法(Ladderforming RT-ICAN 法)の基盤技術の開発、ならびにその実証性を評価することを目的に研究を遂行した。さらに、③ ヒト iPS 細胞への培養工程からの異種動物由来成分の混入について、異種動物由来成分の混入を防ぐ方策としての完全ヒト化培養法の効果について糖鎖レベルで評価した。

B. 研究方法

B-1 細胞・組織加工製品中の造腫瘍性評価・制御法の開発

B-1-1 使用動物

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 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 中にて培養・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 16 週間観察した：
① NOG (細胞懸濁培地投与) : 細胞用量 5 点 (0, 10², 10³, 10⁴, 10⁵; 各 10 例), ② NOG (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-1-2 hMSC 中に混入する HeLa 細胞の検出能力の検討

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。hMSC は LONZA 社より入手し、同社推奨のプロトコールに従って、同社の間葉系幹細胞専用増殖培地を用い、培養・継代した。hMSC 10⁶ 個に対し、HeLa を 0%, 0.001%, 0.01%, 0.1%, 1% (0, 10¹, 10², 10³, 10⁴ cell) の割合でスパイクし、HeLa 細胞用培地 (MEM+10%ウシ胎児血清+ペニシリン/ストレプトマイシン) に懸濁した

状態でマトリゲルと混合し、その 100 μ L (細胞総数 10⁶個/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 (HeLa 細胞の各用量あたり 6 例ずつ)。投与後の結節形成は 16 週間観察した。

B-1-3 統計処理

TPD₅₀ 値 (50% の動物において腫瘍形成が認められる細胞の用量) は、投与細胞数と腫瘍形成確率との間の用量作用曲線を、統計計算ソフトウェア ORIGIN 8.6 (OriginLab Corporation) または GraphPad Prism (GraphPad Software を用いてロジスティック曲線に当てはめることにより算出した。

B-1-4 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。

B-2 細胞・組織加工製品の感染制御法の開発

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 (ϕ) 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 2-1 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 ICAN 反応に用いたプライマーとプローブの設計

モデルウイルス核酸の領域中で、80 bp 増幅領域を 10 塩基間隔で設定し、Mfold software

(<http://mfold.rutgers.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>) を用いて一般的な ICAN 法の条件下 (反応温度 55 $^{\circ}$ C, ナトリウムイオン濃度 100 mM, マグネシウムイオン濃度 5 mM) における増幅領域の自由エネルギー (ΔG) を算出し、 $\Delta G > -1.0$ を今回の検出可能領域とした。

B-2-3 Ladder Forming RT-ICAN 法

モデルレトロウイルス核酸 (10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹, 10⁰ コピー相当分) に RNA プライマー, Primer Script Reverse Transcriptase (TaKaRa Bio, 京都, 日本), RT バッファーを加え、45 $^{\circ}$ C, 10 分間反応させて逆転写反応を行った。この反応産物 10 μ L を用い、BcaBEST DNA ポリメラーゼ (11 unites), Tli RNaseH (7.5, 5, 2.5, 1, 0.5 unites) を含む ICAN 反応液中、55 $^{\circ}$ C, 60 分の条件で遺伝子等温増幅反応を行った。その際に用いたプライマー及びプローブのセットは表 2-1 に記載した。また、ICAN 法の基本原理を図 2-2 に、Ladder Forming RT-ICAN 法の原理を図 3 に示した。

B-2-4 Cycleave PCR 法

上記逆転写反応産物を 2.5 μ L 用い、25 μ L の系で Cycleave PCR 法を行った。方法は TaKaRa Bio のプロトコールに準拠した。その際に用いたプライマー及びプローブのセットは表 2-2 に記載した。Cycleave PCR 法の原理は図 2-4 に示した。

B-2-5 細胞

ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor stem cells: hADMPC) は先端医療振興財団の松山晃文先生よりご供与いただいた。hADMPC の維持培地には、60% DMEM-低グルコース, 40% MCDB-201 (Sigma Aldrich, MO, USA), 1× insulin-transferrin-selenium (HS, GIBCO, NY, USA), 100 mM Ascorbic Acid 2-phosphate (和光純薬, 大阪, 日本), 1 nM Dexamethazone (Sigma Aldrich), 1×抗菌・抗真菌剤 (nacalai tesque, 京都, 日本), 5% ウシ胎児血清 (Cell culture Bioscience, 東京, 日本), 10 ng/mL Epidermal growth factor (Pepro Tec, NJ, USA) 含有培地を供した。ヒト iPS 細胞は、国立生育医療センター研究所の梅澤明弘博士の樹立した Tic 細胞を無血清・フィーダー細胞フリーで培養したものを、独立行政法人医薬基盤研究所の古江・楠田美保博士より提供を受けた。

B-2-6 細胞からの total RNA 抽出

hADMPC と iPS 細胞からの Total RNA は、約 5×10^6 細胞より, RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出した。方法は Qiagen 社のプロトコールに準拠した。

B-2-7 倫理面への配慮

本研究は、近畿大学薬学総合研究所の動物実験指針, 研究倫理審査委員会規程等にある倫理面の審査・承認に係る一切の研究項目に該当しないものである。また、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞及びヒト iPS 細胞 (Tic) はヒト由来検体等であるが、提供元での倫理委員会で認められているものであり、今回の用途から考えて、それ以上、特段に倫理面への配慮に該当するような事項はないと考えられる。

B-3 細胞・組織加工製品の免疫原性制御法の開発

B-3-1 iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞 (Tic) はマイトマイシン C 処理したマウスフィーダー細胞 (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もの (KSR/MEF), 遺伝子組み換えヒトフィブロネクチンをコートした培養ディッシュ上で血清代替物 (KSR) を含む培養液を用いて培養したもの (KSR/FN), 遺伝子組み換えヒトフィブロネクチンをコートした培養ディッシュ上で完全ヒト化培養液 (FX) を用いて培養したもの (FX/FN), マイトマイシン C 処理したマウスフィーダー細胞 (MEF) を播種した培養ディッシュ上で完全ヒト化培養液 (FX) を用いて培養したもの (FX/MEF) の 4 種類とした。培養後の細胞は 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 PBS (-) 10mL 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-3-2 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-3-3 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 時間加熱した. 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-3-4 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-3-5 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-3-6 順相分配 HPLC による N 結合型糖鎖の分析

カラムには Shodex NH2P-50 4E (4.6 mm x 250 mm, 昭和電工) ならびに TSKgel Amide-80 (4.6 mm x 250 mm, TOSOH) を用い, 溶離液 A を 2% CH₃COOH/CH₃CN, 溶離液 B に 5% CH₃COOH, 3% Triethylamine/H₂O を用いた. 溶出は 70%の溶離液 A によりカラムを平衡化した後, 80 分で溶離液 B が 95%となるように直線グラジエント溶出を行った. また, 蛍光検出は励起波長 350 nm, 蛍光波長 425 nm で行った.

B-3-7 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.

C. 研究結果

C-1 細胞・組織加工製品中の造腫瘍性評価・制御法の開発

C-1-1 HeLa 細胞単回投与造腫瘍性試験

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。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。それ以降 16 週目までの結果を含め、Figure 1-1A に示した。腫瘍部位のヘマトキシリン/エオジン染色および抗ヒト HLA 抗体による染色により、形成された腫瘍がヒト細胞由来であることが確認された (Figure 1-1B)。

各週における投与細胞数と腫瘍形成確率との間の用量作用曲線は Figure 1-1C の通り。TPD₅₀ 値の変化をみると、ヌードマウス群 (HeLa in Nude) および NOG マウス群 (HeLa in NOG) では約 12 週目の時点以降でほぼ安定すること、マトリゲルに懸濁した細胞を NOG マウスに投与した群 (HeLa w/ MG in NOG 群) ではこれら 2 群よりも若干遅く、13-16 週目の時点でほぼ安定することが明らかとなった (Figure 1-1D)。ロジスティック曲線へのフィッティングにより計算された TPD₅₀ 値は 16 週目にはヌードマウス群、NOG マウス群、NOG+マトリゲル群でそれぞれ 4.2×10^5 、 1.3×10^4 、 7.8×10^1 であった。

C-1-2 hMSC 中に混入する HeLa 細胞の検出能力の検討

HeLa 細胞をマトリゲルに封入した状態で NOG マウスに移植した場合 (NOG+マトリゲル群) の HeLa 細胞の生着性は、前項で示した通り、培地に懸濁した場合に比べて非常に高かった。そこで、この方法を利用して、hMSC 中に混入する HeLa 細胞の検出を試みた。 10^6 個の hMSC に一定量の HeLa 細胞をスパイクし、マトリゲルに懸濁した状態で NOG マウスの背部皮下に移植した後、腫瘍形成を観察した結果、細胞移植後 3 週間後までは HeLa 細胞 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 個混入の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、5 週間後において、 10^3 および 10^4 個混入群では結節の形成が認められ、 10^2 群でも 9 週目において結節の形成が認められた。それ以降 16 週目までの結果を含め、Figure 1-2A に示した。各週における投与細胞数と腫瘍形成確率との間の用量作用曲線は Figure 1-2B の通り。TPD₅₀ 値の変化をみると、前項でのマトリゲルに懸濁した細胞を NOG マウスに投与した群 (HeLa w/ MG in NOG 群) と同様に、16 週目の時点ではほぼ安定することが明らかとなった (Figure 1-2C)。ロジスティック曲線へのフィッティングにより計算された TPD₅₀ 値は 16 週目には 1.0×10^2 で、HeLa 細胞単独投与の場合と同等であった。

C-2 細胞・組織加工製品の感染制御法の開発

C-2-1 Cycleave RT-ICAN 反応におけるモデルレンチウイルス配列増幅可能領域の選定

前年度までに、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。図 2-1 に示す鋳型 DNA を用い、T7RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 逆転写反応によって、モデルレンチウイルスゲノム RNA を作成した。この RNA 配列が RT-ICAN 反応中にどのような 2 次構造を取るかを予測するために、Mfold software で解析した。今回は、モデルレンチウイルス配列番号 211 から 380 の領域に絞り、80bp 増幅領域を 10 塩基間隔で設定して解析したところ、図 2-5 に示すとおり、291-370、296-375、300-380 の 3 つの領域において、ギブスの自由エネルギー ΔG が -1.0 以下となった。よって、291-380 までの領域が、ICAN 法で増幅可能であると予測された。

C-2-2 Cycleave RT-ICAN 反応におけるモデルレンチウイルス配列に対するプライマー、プローブ設計

上記解析によって決定した増幅可能領域において、タカラバイオ独自のアルゴリズムにより、Cycleave RT-ICAN 反応のプライマー、プローブ配列を設計した。3 種類のプライマー、プローブ配列セットを表 2 に示した。

C-2-3 Cycleave RT-ICAN 法による増幅確認

モデルレトロウイルス核酸を 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 コピー相当分使用し、各種プライマー、プローブセットによる Cycleave RT-ICAN 反応を実施した。その結果、いずれのプライマー、プローブセットにおいても、Cycleave ICAN 法で時に問題となる自己分解によるバックグラウンドは見られず、セット 1 では 10^3 コピー (図 2-6-A)、セット 2、3 においては 10^4 コピー (図 2-6-B, C) まで検出することが可能であった。

C-2-4 Cycleave RT-ICAN 法の改善

より感度の高い Cycleave RT-ICAN を行う

ため、RNaseH の濃度を 5 段階 (7.5, 5, 2.5, 1, 0.5 units/反応) に振って反応を行った。その結果、Cycleave RT-ICAN 反応を行い、リアルタイム蛍光検出法において増幅を検出出来る Tli RNaseH 濃度は 1 反応系あたり 5 ユニットであることが判明した (図 2-7)。しかし、そのときの検出感度は 10^4 コピーであり、感度向上には至らなかった (図 2-7-A, C)。一方、この反応産物をアガロースゲル電気泳動法にて確認してみたところ、低濃度の RNaseH では Cycleave プローブを切断できないために蛍光検出には至らないものの、1 反応あたり 2.5 ユニットの RNaseH を用いた反応系では 10^2 コピー (図 2-7-E, F)、1 反応あたり 1 ユニット、もしくは 0.5 ユニットの RNaseH を用いた反応系では 10^1 コピー (図 2-7-G-J) まで検出可能であることが示された。

C-2-5 Cycleave RT-PCR 法による検出感度の検討

Cycleave RT-ICAN 法と従来の Cycleave RT-PCR 法における検出感度の比較を行った。ただし、Cycleave RT-ICAN 法では逆転写反応を行ったすべての反応液を ICAN 反応に持ち込めるのに対し、Cycleave RT-PCR 法では逆転写反応を行った 1/4 量しか Cycleave PCR 反応に持ち込むことは出来ない (データ非掲載、逆転写反応溶液中に PCR 法を阻害する物質が入っているため)。図 2-8 に示すとおり、プライマー、プローブセット 1 による Cycleave RT-PCR 法では 10^2 コピー (図 2-8-A)、プライマー、プローブセット 2、3 による Cycleave RT-PCR 法では 10^1 コピー (図 2-8-B, C) のモデルレンチウイルス核酸を検出可能であることが示された。これは、RT-ICAN をアガロースゲル電気泳動法で検出するときの感度と同じである。

C-2-6 SYBR Green 検出法による RT-ICAN 反応の条件検討

RT-ICAN 法が Cycleave RT-PCR 法と同等の感度でモデルレンチウイルス核酸を検出出来ることが分かったものの、Cycleave 系を用いたリアルタイム蛍光検出が出来ないことが問題となった。そこで、Cycleave 法ではなく、SYBR Green 法による RT-ICAN 反応の検討を試みた。図 2-9 に示すとおり、RNaseH を 1 反応あたり 1, 0.1, 0.05 ユニット使用した場合、モデルレンチウイルス核酸を 10^2 コピーまで検出可能であることが判明した (図 2-9-D, F, H)。しかし、SYBR Green によるリアルタイム蛍光検出法では、非特異的増殖と特異的増殖を区別することが出来ず、 10^1 , 10^0 コピーともに見かけ上検出されてしまった (図 2-9-C, E, G)。そこで、非特異的増殖と特異的増殖を融解曲線で識別出来ないかと考え、融解曲線の解析を行った。すると、アガロースゲル電気泳動法で RT-ICAN 反応産物が確認できなかった 10^1 , 10^0 コピーでの融解曲線は、特異的増幅を示す 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 コピーでの融解曲線とは明らかに異なり、SYBR Green 検出法を用いた RT-ICAN 反応は、融解曲線解析を併用することにより、 10^2 コピーまで検出可能であることが示された (図 2-10)。

C-2-7 SYBR Green 検出法による RT-ICAN 反応の反応液量検討

次に、SYBR Green 検出法による RT-ICAN 反応の反応液量を増大させることによって検出感度が変わるのか、検討を行った。図 2-11 に示すとおり、反応液量 25 μ L における感度は反応あたり 10^2 コピー、反応液量 200 μ L における感度は 8×10^2 コピーとなり、検出感度は鑄型濃度に依存することが示された。また、反応を quadruplicate (4 重) で行ったところ、反応液量 25 μ L, 200 μ L いずれにおいても、特異的増幅すべき鑄型濃度において、融解曲線から判断すると、非特異的増幅となってしまうものが生じた (図 2-11-F の 10^5 コピー-A2 ウェル, 10^4 コピー-B4 ウェル, 図 2-11-L の 8×10^5

コピー-A12 ウェル, 8×10^3 コピー-C11 ウェル)。しかし、実際にアガロースゲル電気泳動法では特異的増幅が起こっており (データ非掲載)、Ladder Forming 法での増幅過程でターゲット領域の連結パターンに変化が生じたため、融解温度もそれに伴い変化したためと考えられた。

C-2-8 Cycleave RT-ICAN 法を用いたウイルス否定試験実施例

実際に、hADMPC, iPS 細胞より RNA を抽出し、Cycleave RT-ICAN 法を用いたウイルス否定試験を実施した。図 2-12 に示すとおり、各細胞とも、1 μ g (約 1×10^5 細胞), 0.1 μ g (約 1×10^4 細胞), 0.01 μ g (約 1×10^3 細胞) の RNA より陽性反応は生じなかった (図 2-12-B, D)。また、これらの RNA に、モデルウイルス核酸を 10^4 コピー混入させて Cycleave RT-ICAN を行ったところ、すべてが正しく陽性反応となった (図 2-12-A, C)。

C-3 細胞・組織加工製品の免疫原性制御法の開発

C-3-1 異種動物由来成分の混入の低減のための培養液により培養された iPS 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、糖鎖生合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 について、4 種類の培養法にて培養された iPS 細胞 (Tic) 中の NeuGc の定量分析を実施した。

細胞中の NeuGc を検出する方法として、NeuGc を特異的に検出するため複合糖質糖鎖を含む試料を塩酸加水分解し、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を用いた。培養方法の異なる 4 種類の iPS 細胞についてシアル酸の分子種分析を行った結果を Fig. 3-1 に示す。ヒト iPS 細胞 (Tic) を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もの (KSR/MEF) については、7.5 分付近に NeuGc が観察され、また約 10 分に NeuAc のピークが観察され、総シアル酸に占める NeuGc の相対比は 14.5% であった。次に、遺伝子組み換えヒトフィブロネクチンをコートした培養ディッシュ上で血清代替物 (KSR) を含む培養液を用いて培養したもの (KSR/FN) についても NeuGc, NeuAc とともに観察されたが、NeuGc の相対比は 6.3% であり、MEF を使用する場合と比べ 50% 以下に低下した。ヒトフィブロネクチンをコートした培養ディッシュ上で完全ヒト化培養液 (FX) を用いて培養した細胞 (FX/FN) については、NeuGc の相対比は 3.9% であり、4 種類のうち最も NeuGc の相対含量が低かった。さらに、MEF を播種した培養ディッシュ上で FX を用いて培養した細胞 (FX/MEF) では NeuGc の相対比は 4.1% であり、完全ヒト化培養条件 (FX/FN と同等の NeuGc) しか検出されなかった。以上、KSR と MEF を用いて培養された iPS 細胞は NeuGc の混入が高く、完全ヒト化培養条件により培養された iPS 細胞は NeuGc 含量が最も低かった。昨年度の本研究課題において、KSR は高い相対比で NeuGc を含むことから、KSR/MEF において観察される NeuGc は KSR に由来すると考えられた。また、非ヒト成分を含まない完全ヒト化培養液を用いた培養法で

は、最も低い NeuGc 含量であったことから、FX/FN 培養系は異種動物由来成分の混入を防ぐ方策として有効であることがわかった。

C-3-2 異種動物由来成分の混入の低減のための培養液により培養された iPS 細胞の N-型糖鎖分析

前項の実験により異種動物由来成分の混入の低減のための培養液により培養された iPS 細胞では非ヒト型シアル酸である NeuGc の混入を低減できることを示した。一方、培養液の組成は細胞内代謝に影響し結果として、糖鎖生成にも影響することが考えられる。さらに、KSR や MEF 由来の糖鎖の混入についても留意しなければならない。本項ではヒト iPS 細胞

(Tic) をマウスフィダー細胞 (MEF) 上、血清代替物 (KSR) を含む培養液を用いて培養したもの (KSR/MEF) ならびに遺伝子組み換えフィブロネクチンと完全ヒト化培養液 (FX) を用いて培養したもの (FX/FN) の 2 種類について、細胞総タンパク質分画より N-結合型糖鎖を調製し、セロトニンアフィニティクロマトグラフィを用いてシアル酸残基数に従い分画後、順相分配型アミドカラムと質量分析法を組合わせて糖鎖構造を解析した。

セロトニンアフィニティクロマトグラフィを用いて、総 N-型糖鎖を分画後シアリダーゼ処理しアシアロ糖鎖としたものを順相分配型アミドカラムにより分離し各ピークを MALDI-QIT-MS を用いて解析した結果を Fig. 3-2 および Fig. 3-3 に示す。KSR/MEF ではアシアロ糖鎖分画にマンノース残基 5~9 残基からなる高マンノース型糖鎖が豊富に観察され、2 本鎖糖鎖にフコースが 1 あるいは 2 残基付加した複合型糖鎖も観察された。モノシアロ分画は、アシアロ糖鎖分画に比べ複雑なプロファイルを示し、2 本鎖糖鎖にフコースが 0~2 残基付加した複合型糖鎖ならびに 3 本鎖糖鎖にフコースが 1 残基付加した複合型糖鎖が観察された。ジシアロ分画では、複合型 2 本鎖糖鎖お

よび複合型 2 本鎖糖鎖にフコースが 1 残基付加した糖鎖がジシアロ分面の 95%以上を占める糖鎖であった。トリシアロ分面については、フコースを持たない 2 本鎖糖鎖, 3 本鎖糖鎖, 4 本鎖糖鎖にフコースが 1 残基付加した糖鎖が主として観察された。また, 複合型 4 本鎖糖鎖の非還元末端に N-アセチルラクトサミンを 1 および 2 残基有するポリラクトサミン型糖鎖も観察された。

同様に FX/FN について分析した結果を Fig. 3-3 に示す。アジアロ糖鎖分面については KSR/MEF の場合と同様に, マンノース残基 5 ~9 残基からなる高マンノース型糖鎖が豊富に観察され, 2 本鎖糖鎖にフコースが 1 あるいは 2 残基付加した複合型糖鎖も観察された。モノシアロ分面は, アシアロ糖鎖分面に比べ複雑なプロファイルを示し, 2 本鎖糖鎖にフコースが 0~2 残基付加した複合型糖鎖ならびに 3 本鎖糖鎖にフコースが 1 残基付加した複合型糖鎖の含量が, KSR/MEF の場合に比べ高いことが分かる。ジシアロ分面については, 複合型 2 本鎖糖鎖および複合型 3 本鎖糖鎖にフコースが 1~2 残基付加した糖鎖が多く発現しており, KSR/MEF の場合に比べ複雑なプロファイルを示した。トリシアロ分面については, フコースを 1 残基持つ 3 本鎖糖鎖が主として観察され, フコース 1 または 2 残基有する複合型 4 本鎖糖も観察された。以上のように KSR を含む培養液 (KSR/MEF) ならびにフィブロネクチンと完全ヒト培養液 (FX) を用いて培養した (FX/FN) 場合では, 複合型糖鎖分面 (モノシアロ, ジシアロ, トリシアロ分面) で観察される糖鎖が異なっていた。両培養法において観察される糖鎖プロファイルの違いが, 非ヒト成分に由来するものであるか, また培養法の違いによる iPS 細胞の糖鎖生合成の変化によるものであるか不明であり, 今後の解決すべき課題であると言える。

D. 考察

D-1 細胞・組織加工製品中の造腫瘍性評価・制御法の開発

D-1-1 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言われている。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 107 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。また、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 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 TPD₅₀ 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/slides/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-1-3 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 γ Cnull (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) を限界希釈し、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/IL2 γ KO 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 5,000 倍高い感度を実現することができることが明

らかとなった。

D-1-4 「NOG+マトリゲル」の試験の体細胞・体性幹細胞製造における品質試験としての性能評価

一般に、ヒト体細胞・体性幹細胞には造腫瘍性はないと考えられている。ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品は相同的使用、非相同的使用ともに、世界各地で臨床応用が進んでいるが、製品の投与を原因とする腫瘍形成の報告はほとんど存在せず、これまでに科学論文として報告されたものは、ヒト胎児由来神経幹細胞を用いた移植治療により脳腫瘍が形成されたとするもの1件しかない (Amariglio N *et al.*, 2009)。ヒト成人由来体細胞・体性幹細胞の投与による腫瘍形成の報告はされていない。過去にヒト間葉系幹細胞の培養時の自発的な悪性形質転換が4件報告されているが、このうち2件(Rubio D *et al.*, 2005; Røslund GV *et al.*, 2009)はがん細胞株のクロスコンタミネーションによるものであることが後に判明している。また、残りの2件(Wang Y *et al.*, 2005; Tang DQ *et al.*, 2012)では培養時に不死化した細胞が検出されている。これらのことは、製品への悪性腫瘍細胞のクロスコンタミネーション防止および検出が重要であること、および細胞増殖特性の把握が重要であることを示している。

そこで、本研究では細胞組織加工製品への悪性腫瘍細胞のクロスコンタミネーションの検出法としての、NOG マウスとマトリゲルを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験の性能を、hMSC への HeLa 細胞の混入をモデルにして検討した。hMSC を選択した理由は、すでに再生医療・細胞治療の原材料および最終製品として広く利用されているためである。また、スパイク用造腫瘍性細胞として HeLa 細胞を用いたのは、すでに本研究で単独投与による腫瘍形成を確認しているためだけでなく、世界で汎用されて

いる分、各地の細胞保管施設においてクロスコンタミネーションが多いとされる細胞株だからである。

本研究で検討した結果、NOG マウスとマトリゲルを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験系において、hMSC に混入した HeLa 細胞の TPD₅₀ 値は HeLa 細胞単独投与時とほぼ同じであり、1万個の hMSC 中に混入した1個 (0.01%) の割合で混入した HeLa 細胞を検出することが可能であることが明らかとなった。

今後は、「NOG マウス+マトリゲル」の手法をより高感度な方法とするための試験法の改良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 細胞・組織加工製品の感染制御法の開発

今回、我々は感染検体に含有される全核酸を網羅的に解析でき、かつ高感度なウイルス由来核酸検査法として、等温遺伝子増幅法(ICAN法)の改良に着手し、ウイルス遺伝子特異的等温増幅法(Ladder forming RT-ICAN法)のプロトタイプの開発に成功した。また、本プロトタイプによるヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)ならびに樹立 iPS 細胞株中の特定ウイルス由来遺伝子否定試験を実施した。

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。

この問題を克服するため、我々は核酸増幅法を用いつつも、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な方法である。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、Cycleleave ICAN 法という方法が開発されている。この Cycleleave ICAN 法は現在のところ、キクわい化病原ウィロイド、ポテトスピンドルチューバーウィロイド、トマトクロロティックドワーフウィロイド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。そこで本年度は高感度なウイルス由来核酸検査法として ICAN 法を改良したウイルス遺伝子特異的等温増幅法(Ladder forming RT-ICAN 法)のプロトタイプの開発に着手した。

通常、Ladder Forming Cycleleave RT-ICAN 系構築には、鋳型形状（増幅産物の 2 次構造）を考慮する必要がある。また、プライマー配列、プローブ配列、フォワードプライマー上流配列に共通配列が必要である。さらに、プローブの自己分解を起こさないプライマーとプローブの設計を要する。本検討では、増幅領域を Mfold software で構造解析し、プライマー、プローブの設計を行ったが、核酸構造の関係上、増幅領域にパッケージングシグナル(ϕ) 44 bp を完全に包括することは出来ず、 ϕ の 3'側 19 bp と、その下流の領域を増幅ターゲットと決定した。この領域を BLAST によりシークエン

スアライメントしたところ、インタクトな HIV-1 ゲノムとの相同性も確認できたため、このターゲット領域は HIV-1 ならびに HIV-1 由来レンチウイルスベクター両方を増幅しうることが確認された。

今回我々が開発した Cycleleave RT-ICAN での検出感度は、リアルタイム蛍光観察法を用いると 10^4 コピーであったが、蛍光検出出来ない低濃度 Tli RNaseH における増幅感度は 10 コピーであり、PCR における感度に遜色ない結果となった (図 2-6, 7, 8)。しかし、今回はアガロースゲル電気泳動法を用いているため、非常に反応性が高い ICAN 産物を実験室に拡散させてしまう危険性がある。その場合、その後のすべての ICAN 反応が正確に判定できない場合があるため、実用的とは言えない。そこで、プローブを使用しない SYBR Green 法を用いた RT-ICAN を行ったが、SYBR Green が ICAN 反応を阻害するのか、感度が一桁劣ってしまい、 10^2 コピーまでしか検出出来なかった (図 2-9)。また、非特異的増幅と特異的増幅を増殖曲線のみでは判別出来ないという問題があった。しかし、融解曲線分析を併用することにより、それらは明確に区別出来ることを示すことができた (図 2-10)。SYBR Green 法を用いた RT-ICAN 反応は、 10^2 コピー以上のレンチウイルス核酸の汚染においては、15 分以内で迅速に検出出来るという特性・利点があるため、ある一定以上の検出系としては利用できる可能性がある。しかし、微量な汚染においては、やはり蛍光検出プローブを併用した RT-ICAN を実施する必要があるだろう。今後は、Cycleleave 法を用いず、たとえば TaqMan プローブのような RNaseH 不要のプローブ使用を考えていく必要があると思われる。

また、反応液量を増やして、持ち込み核酸量を増やすことが可能なのか、RT-ICAN 法の反応液量についても検討したが、検出感度は鋳型濃度に依存するということが判明した (図 2-11)。つまり、反応液量を 8 倍にすると、検

出感度限界も8倍になるということである。ただし、今回はモデルレンチウイルス核酸のみを鋳型として検討したため、正常細胞からのRNAにスパイクさせた形で行うと、違う結果になる可能性もある。

最後に、hADMPCと樹立iPS細胞TicよりRNAを抽出し、モデルレンチウイルス核酸をスパイクしたもの、していないものでウイルス否定試験を行ったが、使用した幹細胞由来RNAの量にかかわらず、モデルレンチウイルス核酸をスパイクしたものではすべて陽性という結果、スパイクしていないものではすべて陰性という結果を得た(図2-12)。この結果は、プロトタイプの本法が検出方法として有用な新技術であることを示すとともに、モデルレンチウイルスタイプに特化した検出系としての実用性が高いことを示唆するものであると言える。

今後は、ウイルス否定試験の実用性を高めるべく、リアルタイム蛍光検出法の改善や、HBVやHCV等他の個別ウイルス検出系の検討、また、それらを一括にワンチューブ検出することを可能とするマルチプレックスな検出法への開発を目指す。この技術が確立できた暁には、幹細胞をはじめとする再生医療用の細胞資材の安全性を担保する、我が国発の高効率、高感度、かつトータルコストの大幅削減を可能とせしめるウイルス否定試験技術が創出されることになる。また、これにより再生医療の実用化の加速に貢献できることのみにとどまらず、遺伝子検出をよりどころとする様々な安全性評価技術として、汎用的に寄与できる可能性を秘めた真に有用な基盤技術の礎となることが期待できるものと信じている。

D-3 細胞・組織加工製品の免疫原性制御法の開発

本年度は異種動物由来成分の混入を防ぐ方策としての完全ヒト化培養法の効果について糖鎖レベルで評価した。その結果、KSRなどの異種動

物抗原糖鎖を含む培養条件下、培養されたiPS細胞はNeuGcが混入すること、完全ヒト化培養液(FX)とフィブロネクチン(FN)を用いる培養法により、iPS細胞へのNeuGcの混入を低減できることを明らかにした。また、異なる培養法で培養されたiPSのN-結合型糖鎖プロファイルが異なることを明らかにした。

E. 結論

E-1 細胞・組織加工製品中の造腫瘍性評価・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らないし混入する未分化造腫瘍性細胞および悪性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、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5千倍感度が高いことが明らかとなった。また、細胞組織加工製品の製造工程評価(品質評価)への応用時を考えた場合、培養hMSCにおいて本試験が「陰性」であることの意味は「造腫瘍性細胞の混入は、仮にその造腫瘍性はHeLa細胞と同程度だとした場合、0.01%未満である」ということである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。