

E-2 細胞・組織加工製品の感染制御法の開発

RT-ICAN 法を用いたモデルレンチウイルス核酸検出は、感度的にも従来の Cycleave RT-PCR 法と遜色ないポテンシャルを持っていることから、ウイルス否定試験に十分実用可能であると考えられる。今後は、実用性についても立証をより堅固なものにするべく、(1) 現プロトタイプ技術を用いた検体検査 (iPS 細胞, ES 細胞, 体性幹細胞など) の実施例を増やし、その有効性評価の蓄積をすすめる必要がある。また、(2) 本法に対してのリアルタイム蛍光検出技術適用における問題点の改善や、(3) HBV, HCV, HIV-1&2, HTLV-1&2, Parvo19, CMV, EBV 等に代表される他の個別ウイルス検出系の構築、および、(4) それらを組み合わせたマルチプレックスな検出系となる (MFLC-ICAN : Multiplex-Ladder Forming Cycleave ICAN) 法への斬新かつ確実な技術刷新に努める必要がある。総じて、当該年度の研究成果は、これらの (1) ~ (4) に示したウイルス遺伝子の網羅的検出系として終局的形態を提示する途中段階にあることを示唆するものであり、その意義は大きいと結論づけられる。

E-3 細胞・組織加工製品の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を用いて、iPS 細胞中の異種動物抗原糖鎖の混入ならびに混入を防ぐ方策としての完全ヒト化培養法の有効性について調査した。その結果、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。次年度は混入した NeuGc のクリーニング法あるいは混入した NeuGc を継代培養により段階的に低減するためのプロトコルについて検討するとともに、細胞総タンパク質分画中に数%検出された

NeuGc の細胞表面上での発現についても詳細に解析し、細胞移植時におけるリスクについても評価していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Nakaya M, Tajima M, Kosako H, Nakaya T, Hashimoto A, Watari K, Nishihara H, Ohba M, Komiya S, Tani N, Nishida M, Taniguchi H, Sato Y, Matsumoto M, Tsuda M, Kuroda M, Inoue K, Kurose H. GKR6-deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance. *Nat Commun*. 2013;4: 1532.
2. 安田智, 佐藤陽治 安全性評価の総論, 造腫瘍性試験の現状と展望「幹細胞医療の実用化技術と産業展望」(監修: 江上美芽, 水谷学) pp247-255(2013), シーエムシー出版, 東京
3. Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products *Biol Pharm Bull*. 2013;36:189-92.
4. 佐藤陽治, 村岡ひとみ 再生医療分野の関連規制: FDA の動向 「稀少疾患/難病の診断・治療と製品開発」(編集: 技術情報協会) pp330-335 (2012), 技術情報協会, 東京
5. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療における細胞・組織加工製品の治験とレギュレーション *実験医学* 2012; 30(10) 増刊: 1702-7.
6. Nakaya M, Chikura S, Watari K, Mizuno N, Mochinaga K, Mangmool S, Koyanagi S, Ohdo S, Sato Y, Ide T, Nishida M, Kurose H. Induction of cardiac fibrosis by β -blocker in G protein-independent and GRK5/ β -arrestin2-dependent signaling pathways. *J Biol Chem*. 2012; 287:35669-77.
7. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S, Kawamata S, Sato Y. Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One*. 2012;7(5):e37342.
8. Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem cells by lentivirus with tet-off system. *PLoS ONE*. 2013 (in press)
9. Moriyama M, Moriyama H, Ueda A, Nishibata Y, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. Human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells exposed to oxidative stress induce neurite outgrowth in PC12 cells through p38 MAPK signaling. *BMC Cell Biol*. 2012 Aug 7;13:21.
10. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Kishimoto K, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Kanda K, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*. 2013 34(7): 1781-1789
11. Morikawa T, Sueyoshi M, Chaipech S, Matsuda H, Nomura Y, Yabe M, Matsumoto T, Ninomiya K, Yoshikawa M, Pongpiriyadacha Y, Hayakawa T, Muraoka O. Suppressible effects of coumarins from *Mammea siamensis* on inducible nitric oxide synthase expression in RAW264.7 cells. *Bioorg Med Chem*. 2012 Aug 15;20(16):4968-77.
12. Iwatsuka K, Watanabe S, Kinoshita M, Kamisue K, Yamada K, Hayakawa T, Suzuki T, Kakehi K. Free glycans derived from glycoproteins present in human sera. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013 Mar 21;928C:16-21.
13. Mitsui Y, Yamada K, Hara S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K. Comparative studies on glycoproteins expressing poly-lactosamine-type N-glycans in cancer cells. *J Pharm Biomed Anal*. 2012 Nov;70:718-26.
14. Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Sugawara M, Kikuchi K, Higuchi M, Nagamoto Y, Watanabe H, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction. *J Hepatol*. 2012 Sep;57(3):628-36.
15. Nagamoto Y, Tashiro K, Takayama K, Ohashi K, Kawabata K, Sakurai F, Tachibana M, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. The promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials*. 2012 Jun;33(18):4526-34.
16. Fukushima E, Yagi Y, Yamamoto S, Nakatani Y, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Partial filling affinity capillary electrophoresis using large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump for sensitive profiling of glycoprotein-derived oligosaccharides. *J Chromatogr A*. 2012 Jul 13;1246:84-9.
17. Maeda E, Kita S, Kinoshita M, Urakami K, Hayakawa T, Kakehi K. Analysis of nonhuman N-glycans as the minor constituents in recombinant monoclonal antibody pharmaceuticals. *Anal Chem*. 2012

- Mar 6;84(5):2373-9.
- glycosaminoglycans. *Anal Biochem.* 2012 Feb 15;421(2):595-606.
18. Morikawa T, Chaipech S, Matsuda H, Hamao M, Umeda Y, Sato H, Tamura H, Ninomiya K, Yoshikawa M, Pongpiriyadacha Y, Hayakawa T, Muraoka O. Anti-hyperlipidemic constituents from the bark of *Shorea roxburghii*. *J Nat Med.* 2012 Jul; 66(3): 516-24.
 19. Chaipech S, Morikawa T, Ninomiya K, Yoshikawa M, Pongpiriyadacha Y, Hayakawa T, Muraoka O. Structures of two new phenolic glycosides, kaempferiaosides A and B, and hepatoprotective constituents from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2012;60(1):1-8.
 20. Morikawa T, Chaipech S, Matsuda H, Hamao M, Umeda Y, Sato H, Tamura H, Kon'i H, Ninomiya K, Yoshikawa M, Pongpiriyadacha Y, Hayakawa T, Muraoka O. Antidiabetogenic oligostilbenoids and 3-ethyl-4-phenyl-3,4-dihydroisocoumarins from the bark of *Shorea roxburghii*. *Bioorg Med Chem.* 2012 Jan 15;20(2):832-40.
 21. Chaipech S, Morikawa T, Ninomiya K, Yoshikawa M, Pongpiriyadacha Y, Hayakawa T, Muraoka O. New flav-3-en-3-ol glycosides, kaempferiaosides C and D, and acetophenone glycosides, kaempferiaosides E and F, from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. *J Nat Med.* 2012 Jul;66(3):486-92.
 22. Yagi Y, Kakehi K, Hayakawa T, Ohyama Y, Suzuki S: Specific detection of N-glycolylneuraminic acid and Gal α 1-3Gal epitopes of therapeutic antibodies by partial-filling capillary electrophoresis *Analytical Biochemistry*, Volume 431, Issue 2, 15 December 2012, Pages 120-126
 23. 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.*, 2012 Mar;8(2):300-11.
 24. Takayama K, Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.: Efficient Generation of Functional Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells by HNF4 α Transduction. *Mol. Ther.*, 20(1) 127-137 (2012).
 25. Yamada K, Mitsui Y, Kakoi N, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K.:One-pot characterization of cancer cells by the analysis of mucin-type glycans and

G-2 学会発表

1. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. The Final Version of Japanese Guidelines on Ensuring Quality and Safety of Products Derived from Processing of Various Human Stem Cells. World Stem Cell Summit 2012, West Palm Beach, Florida, USA (2012年12月3-5日)
2. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human stem cells—after public consultation—. 3rd TERMIS World Congress 2012, Vienna, Austria (2012年9月5-8日)
3. 佐藤陽治 再生医療／細胞・組織加工製品の安全性評価 第39回日本毒性学会年会 (2012年7月17日)
4. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Suzuki K, Kawamata S, Sato Y. Validation of in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2012年6月13-16日, 横浜)
5. 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 鈴木和博, 川真田伸, 佐藤陽治 ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞中に残存する未分化細胞の in vitro 高感度検出法の開発と評価 第11回日本再生医療学会総会再生医療学会 (2012年6月12日, 横浜)
6. 佐藤陽治 国際協調と日本のあるべき姿 第11回日本再生医療学会総会再生医療学会 (2012年6月13日, 横浜)
7. 佐藤陽治 ヒト多能性幹細胞加工製品の製造における造腫瘍性評価 第11回日本再生医療学会総会再生医療学会 (2012年6月12日, 横浜)
8. Hayakawa T.: Biosimilar Products: Scientific Principles, Challenges, Opportunities, FDA/CASSS CMC Strategy Forum (Invited Panelist) ,San Francisco, USA(2012.1.22)
9. 早川堯夫: バイオ医薬品としての糖タンパク質の我が国でのさらなる発展を目指して.第5回先導技術交流会 (基調講演) ,東京 (2012.1.16)
10. 早川堯夫: 日本における後続タンパク質性医薬品の課題と展望: 日本で考えるバイオ後続品開発の明日. 第14回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ (基調講演) ,東京 (2012.1.25)
11. 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(基調講演), 神戸 (2012.2.06)
12. 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(Invited Speaker), Seoul, Korea (2012.3.29)
13. 早川堯夫: ヒト幹細胞加工製品の品質及び安全性の確保について. 厚生労働省第18回ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会(招聘講演), 東京(2012.5.09)
14. Hayakawa T.: Some Aspects of Development, Evaluation and Control of Cells/tissue-based Products in Japan. International Symposium on Regulatory Perspective on Cell/Tissue-based Products in a Global Framework:The 11th Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine(Invited Speaker and Chair Person), Yokohama (2012.6.14)
15. 早川堯夫: 再生医療の産業化に向けた課題. 再生医療イノベーションフォーラム (FIRM) セミナー (特別講演) , 東京 (2012.8.09)
16. Hayakawa T.: Some Aspects of Development, Evaluation and Control of Biologics in Japan. Japan-Canada Seminar 2012 for Development and Production of Biopharmaceutical(1), Tront, Canada(2012.9.10)
17. Hayakawa T.: Some Aspects of Development, Evaluation and Control of Biologics in Japan. Japan-Canada Seminar 2012 for Development and Production of Biopharmaceutical(2), Montreall, Canada(2012.9.11)
18. 早川堯夫: 再生医療の産業化に向けた課題. BIOJAPAN 2012 (特別講演) , 東京 (2012.10.12)
19. 早川堯夫: 日本における細胞培養技術応用医薬品の開発と評価. 創立90周年記念第64回日本生物工学会大会 (招待講演) , 神戸(2012.10.24)
20. Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko,

- Ueda Ayaka, Nishibata Yusuke, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa Takao. Transplantation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic watanabe rabbits. June 13 – 16, 2012, 10th ISSCR at Yokohama, Japan.
21. 一志春樹, 森山麻里子, 榎木 佳, 大倉華雪, 松山晃文, 森山博由, 早川堯夫. 低酸素下における Notch シグナルによる解糖系調節機構の解明. 第 6 2 回 日本薬学会近畿支部総会・大会
 22. 宇田純輝, 森山麻里子, 北川 綾, 野村昇吾, 松山晃文, 森山博由, 早川堯夫. Bcl2 ファミリー分子 BNIP3 が表皮構築に及ぼす影響. 第 6 2 回 日本薬学会近畿支部総会・大会 (ポスター賞受賞)
 23. 西端勇介, 森山麻里子, 西川彩菜, 深瀬堯哉, 福井承子, 本庄清貴, 上田彩加, 大倉華雪, 松山晃文, 森山博由, 早川堯夫. 酸化ストレスを負荷したヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞を介する神経分化誘導メカニズムの解明. 第 6 2 回 日本薬学会近畿支部総会・大会
 24. 田村暁識, 森山麻里子, 服部直穂, 日浦麻理衣, 細谷有希, 中北和樹, 曾根千晶, 大倉華雪, 松山晃文, 森山博由, 早川堯夫. ヒト脂肪組織由来幹細胞を用いた効率的なインスリン産生細胞への分化誘導系の構築. 第 6 2 回 日本薬学会近畿支部総会・大会
 25. Mariko Moriyama, Junki Uda, Akifumi Matsuyama, Hiroyuki Moriyama, Takao Hayakawa. Indispensable roles of BNIP3, an inducer of autophagy, in both differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. 【Poster】 The 34th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Okinawa, Japan.
 26. Mariko Moriyama, Junki Uda, Akifumi Matsuyama, Hiroyuki Moriyama, Takao Hayakawa. Indispensable roles of BNIP3, an inducer of autophagy, in both differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. 【 Oral presentation】 The 34th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Okinawa, Japan.
 27. Hiroyuki Moriyama, Nomura, Chiaki Sone, Mariko Moriyama, Ayaka Ueda, Ryouyusuke Nishibata, Kouji Fukase, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. Human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells exposed to oxidative stress induce neurite outgrowth in PC12 cells through p38 MAPK signaling. The 34th annual meeting of the molecular biology society of Japan. Fukuoka, Japan.
 28. Haruki Isshi, Mariko Moriyama, Kei Sawaragi, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Hiroyuki Moriyama, Takao Hayakawa. Role of Notch signaling in glycolysis regulation under hypoxic conditions. The 34th annual meeting of the molecular biology society of Japan. Fukuoka, Japan.
 29. Junki Uda, Mariko Moriyama, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Hiroyuki Moriyama, Takao Hayakawa. Indispensable roles of BNIP3, an inducer of autophagy, in both differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. The 34th annual meeting of the molecular biology society of Japan. Fukuoka, Japan.
 30. Kei Sawaragi, Satoshi Tamura, Mariko Moriyama, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Hiroyuki Moriyama, Takao Hayakawa. Development of a single tet-off lentiviral vector system with tightly regulated and homogeneous expression of target genes in human adipose-derived mesenchymal stem cells. The 34th annual meeting of the molecular biology society of Japan. Fukuoka, Japan.
 31. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Haruki Isshi, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. Role of Notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. The 7th Notch meeting. National Institute of Genetics, Mishima, Japan 【Invited oral presentation】
 32. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Haruki Isshi, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. Role of Notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. The 7th Notch meeting. National Institute of Genetics, Mishima, Japan 【Poster】
 33. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 「脂肪組織由来体性幹細胞の製造方法」関西 8 私大新技術開発説明会, JST 本部本館ホール, 東京

34. 森山博由, 森山麻里子, 一志春樹, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫. 低酸素暴露下における脂肪由来間葉系幹細胞のNotchシグナル亢進と解糖系調節機構の解明. 第12回日本再生医療学会 The 12th Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine. 2013.3.21-23. パシフィコ横浜 (会議センター)
35. 再生医療実用化に向けた幹細胞の安全性評価における複合糖質糖鎖の利用. 保村佳孝, 木下充弘, 館山大揮, 古江美保, 森山博由, 早川堯夫, 掛樋一晃, 日本薬学会第132年会 3月, 札幌
36. 消化器系癌細胞に発現するCEA上の高フコシル化糖鎖の比較解析. 原沙弥香, 三ツ井洋輔, 山田佳太, 木下充弘, 早川堯夫, 掛樋一晃, 日本薬学会第132年会 3月, 札幌
37. ヒト胃癌由来MKN45細胞における糖タンパク質由来遊離糖鎖の細胞外分泌. 神末和哉, 大河原周平, 岩塚欣也, 山田佳太, 木下充弘, 早川堯夫, 掛樋一晃, 日本薬学会第132年会 3月, 札幌
38. シースレスCE-ESI-TOF MSによるペプチド・タンパク質の分析. 神末和哉, 木下充弘, 早川堯夫, 掛樋一晃, 日本薬学会第132年会 3月, 札幌
39. PEG修飾タンパク質の分子不均一性評価に関する研究. 岸本昌太, 前田瑛起, 木下充弘, 早川堯夫, 掛樋一晃, 日本薬学会第132年会 3月, 札幌
40. マイクロチップ等電点電気泳動によるタンパク質製剤の迅速解析技術の開発. 中辻佑強, 岸本昌太, 木下充弘, 荒井昭博, 中村伸, 早川堯夫, 掛樋一晃, 日本薬学会第132年会 3月, 札幌
41. キャピラリー/マイクロチップ電気泳動のグライコバイオロジクスへの展開. 木下充弘, 中辻佑強, 北荘一郎, 荒井昭博, 中村伸, 早川堯夫, 掛樋一晃, 第31回日本糖質学会年会 9月, 鹿児島
42. マイクロチップ等電点電気泳動によるタンパク質製剤の迅速解析. 中辻佑強, 岸本昌太, 松村千恵美, 木下充弘, 荒井昭博, 中村伸, 早川堯夫, 掛樋一晃, 第31回日本糖質学会年会 9月, 鹿児島
43. マイクロチップ等電点電気泳動による糖タンパク質性バイオ医薬品の不均一性評価. 中辻佑強, 前田瑛起, 岸本昌太, 松村千恵美, 木下充弘, 早川堯夫, 掛樋一晃, 第32回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 11月, 大阪
44. ウサギ角膜上皮及びSIRC細胞中のN-型糖鎖の比. 岩塚欣也, 岩本裕貴, 木下充弘, 稲田勝弘, 安枝真一, 掛樋一晃 第31回日本糖質学会年会 9月, 鹿児島

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 取得特許

発明の名称：「脂肪組織由来体性幹細胞の製造方法」発明人：森山 博由，森山 麻里子，松山 晃文，早川 堯夫. 平成 24 年 7 月 11 日登録（特願 2012-155584）出願人；近畿大学

H-2 実用新案登録 なし

H-3 その他 なし

1. 政策への提言等

【ヒト幹細胞由来製品の品質及び安全性の確保に関する5つの指針】の草案作成

- 1) 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ついて（平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 2 号）
- 2) 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ついて（平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 3 号）
- 3) 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ついて（平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 4 号）
- 4) 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ついて（平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 5 号）
- 5) ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について（平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 6 号）

【次世代医療機器評価指標策定事業】の草案作成

- 1) 自己 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞に関する評価指標（案）（平成 25 年 3 月 19 日公示，パブリックコメント案件番号 495120405）

【政策提言】

- 1) 厚生科学審議会ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する検討の見直しに関する専門委員会での提言
- 2) 厚生労働省医薬食品局「薬事法改正における再生医療製品の位置づけに関する意見交換会」での提言
- 3) 経済産業省「再生医療の実用化・産業化に関する研究会」での提言（最終報告書は 2 月公表）
- 4) 厚生科学審議会科学技術部会「再生医療の安全性確保と推進に関する専門委員会」での提言

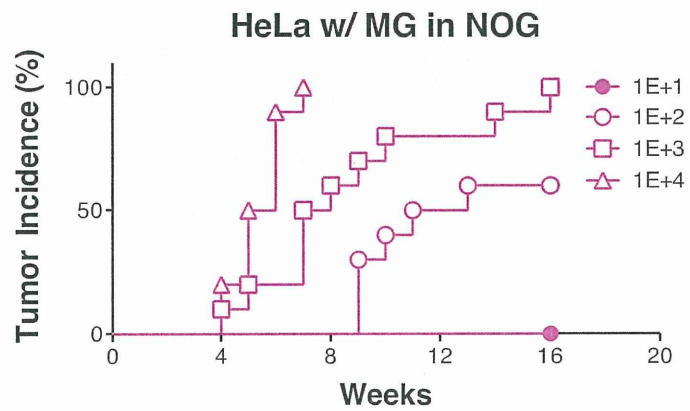
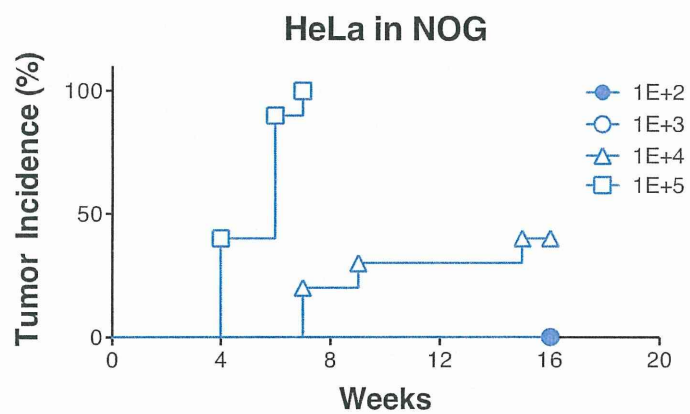
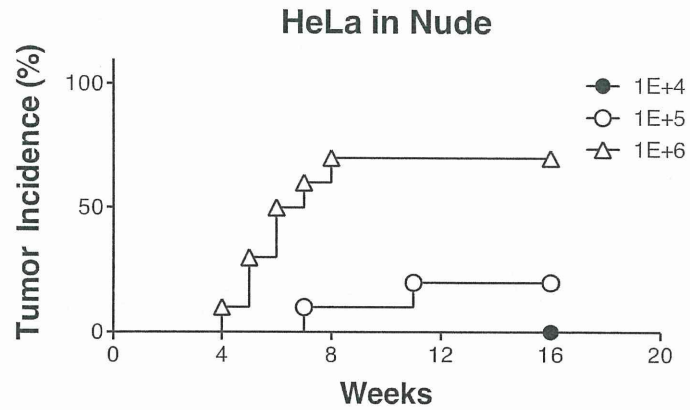


Figure 1-1A 免疫不全マウスへの HeLa 細胞の生着とマトリゲルの効果

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、9 週間後までには結節形成の用量依存性が明らかになった。

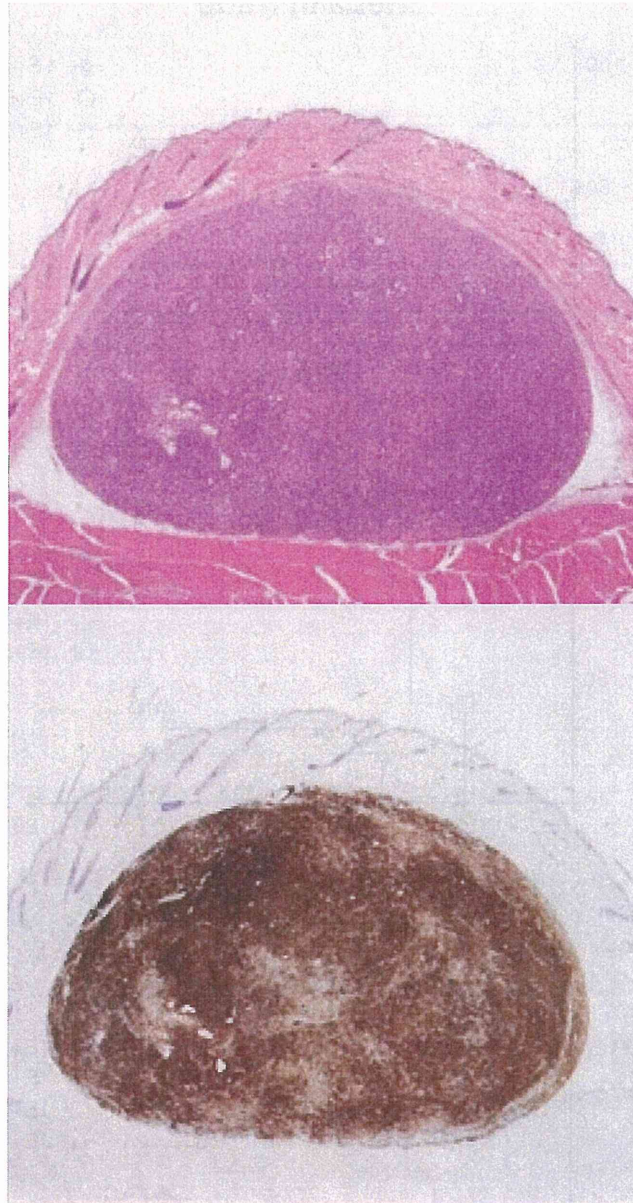


Figure 1-1B 免疫不全マウスへの HeLa 細胞の生着とマトリゲルの効果

HeLa 細胞(10^2 個)をマトリゲルに懸濁したうえで皮下投与した NOG マウスの投与部位における結節(腫瘍)の断面。(上)ヘマトキシリン/エオジン染色,(下)抗ヒト HLA 抗体による染色. 結節はヒト細胞由来の腫瘍であることが分かる.

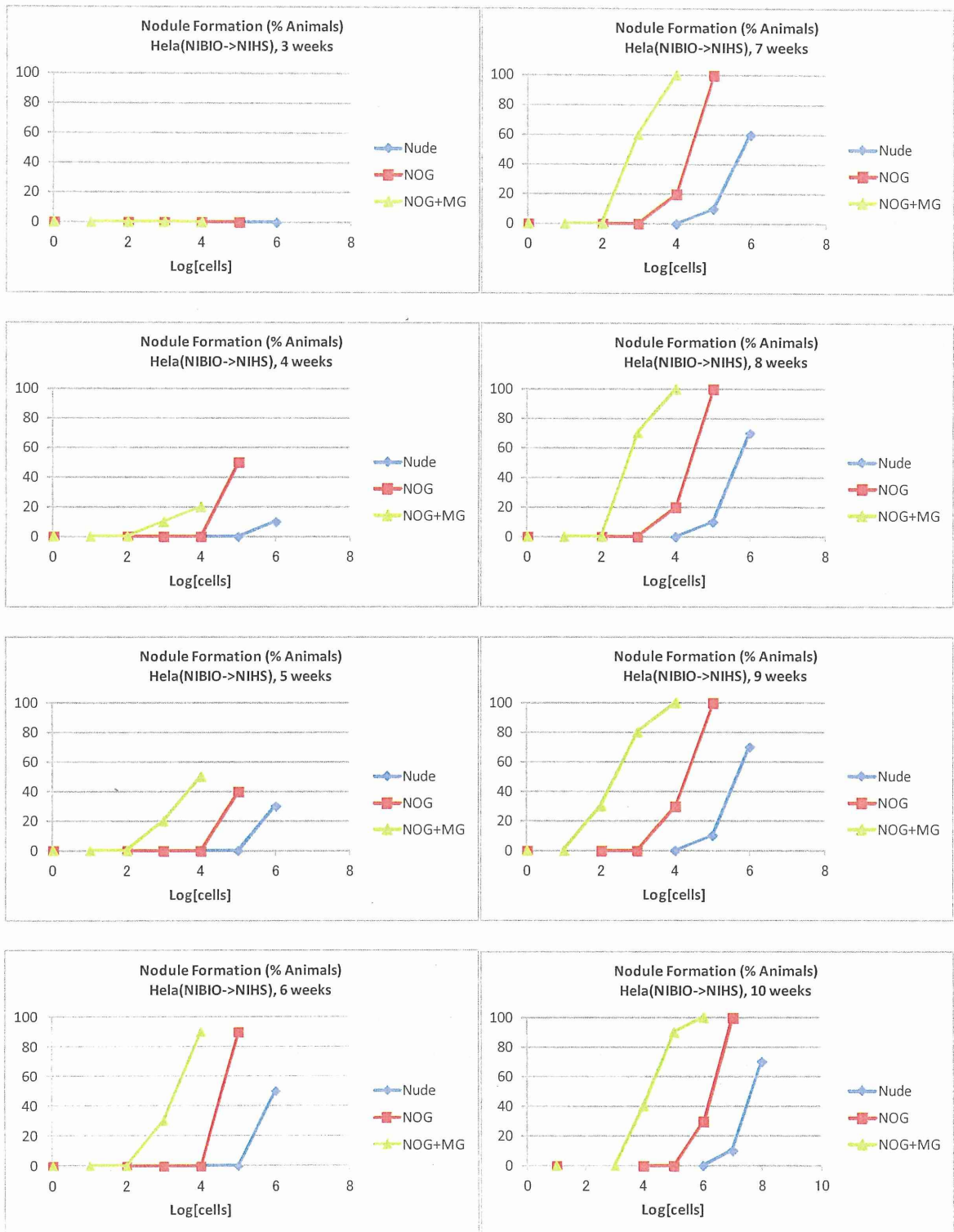


Figure 1-1C 免疫不全マウスへの HeLa 細胞の投与数と結節形成確率の用量 - 作用関係

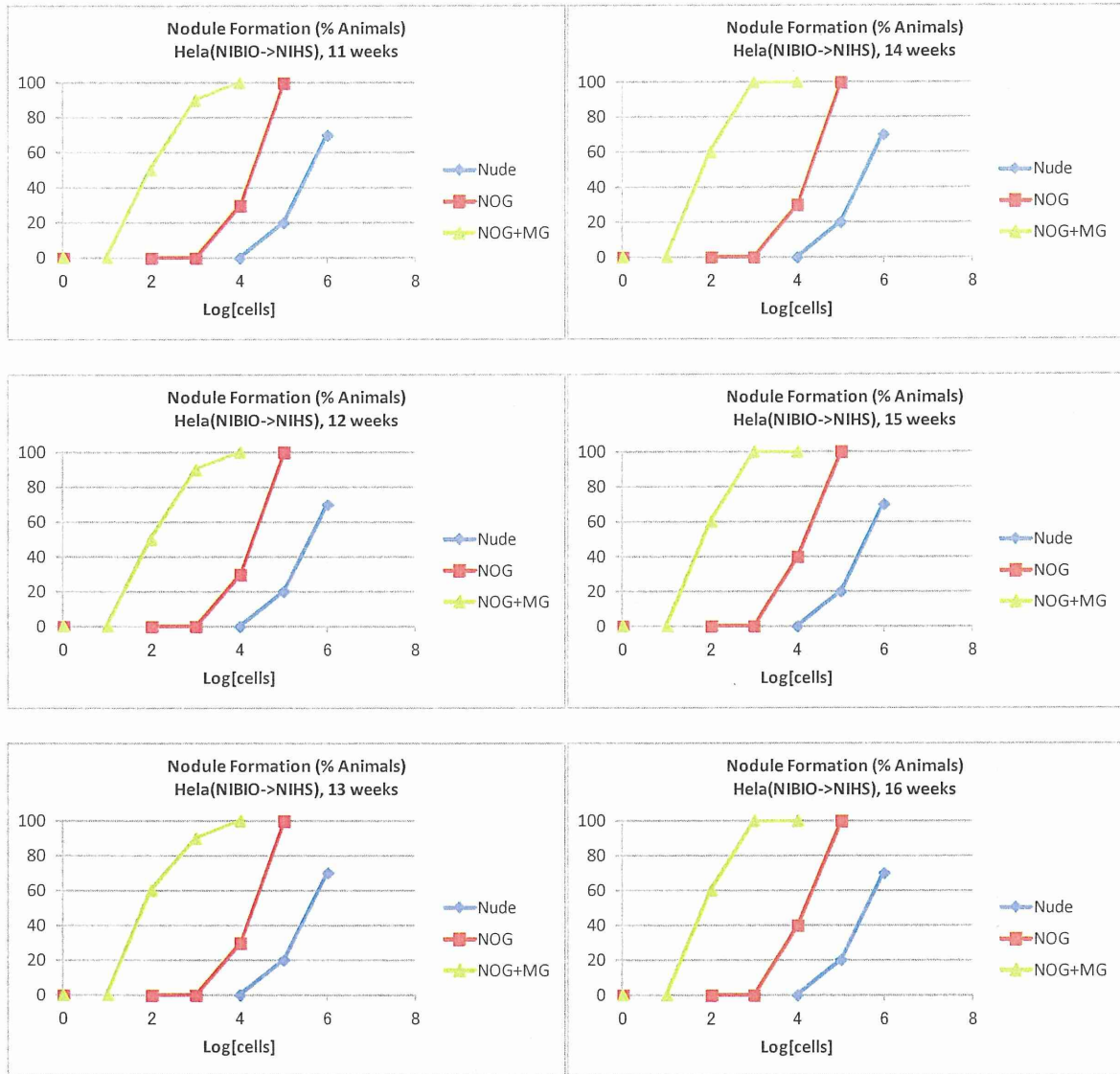


Figure 1-1C 免疫不全マウスへの HeLa 細胞の投与数と結節形成確率の用量 - 作用関係 (続き)
 HeLa 細胞移植後 3 週間後まではいずれの群においても移植細胞由来と推定される明らかな結節形成は認められなかったが、4 週間後からは結節が認められた。Nude : ヌードマウス群, NOG : NOG マウス群, NOG+MG : NOG マウス+マトリゲル群。

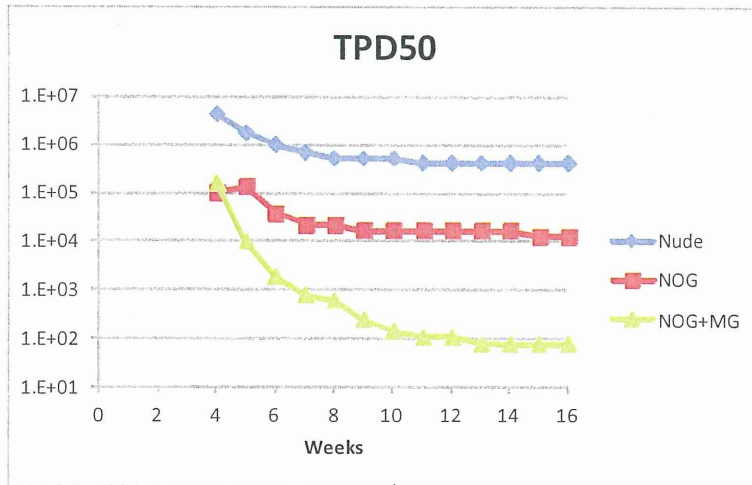


Figure 1-1D 免疫不全マウスへの HeLa 細胞単独投与における TPD₅₀ 値の推移
 ノードマウス群 (Nude) および NOG マウス群 (NOG) では約 12 週目の時点以降で TPD₅₀ 値はほぼ安定した。マトリゲルに懸濁した細胞を NOG マウスに投与した群 (HeLa+MG) ではこれら 2 群よりも若干遅く、TPD₅₀ 値は 13-16 週目の時点ではほぼ安定した。

Table 1-1 HeLa 細胞単独投与後 16 週目における TPD₅₀ 値

	TPD ₅₀	Fold
Nude	4.2×10^5	1
NOG	1.3×10^4	33
NOG+Matrigel	7.8×10^1	5,431

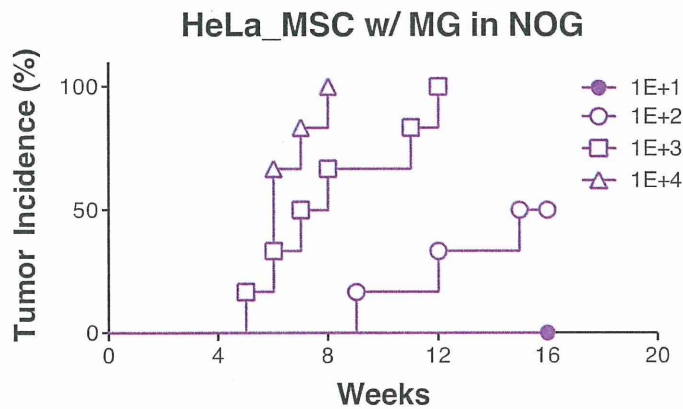


Figure 1-2A hMSC と HeLa 細胞をマトリゲルに混合懸濁し NOG マウスに移植した際の結節形成
 10^6 個の hMSC と一定量 ($10^1 \sim 10^4$ 個) の HeLa 細胞とをマトリゲル中で混合懸濁して NOG マウス背部皮下に移植した際の結節形成率の推移。

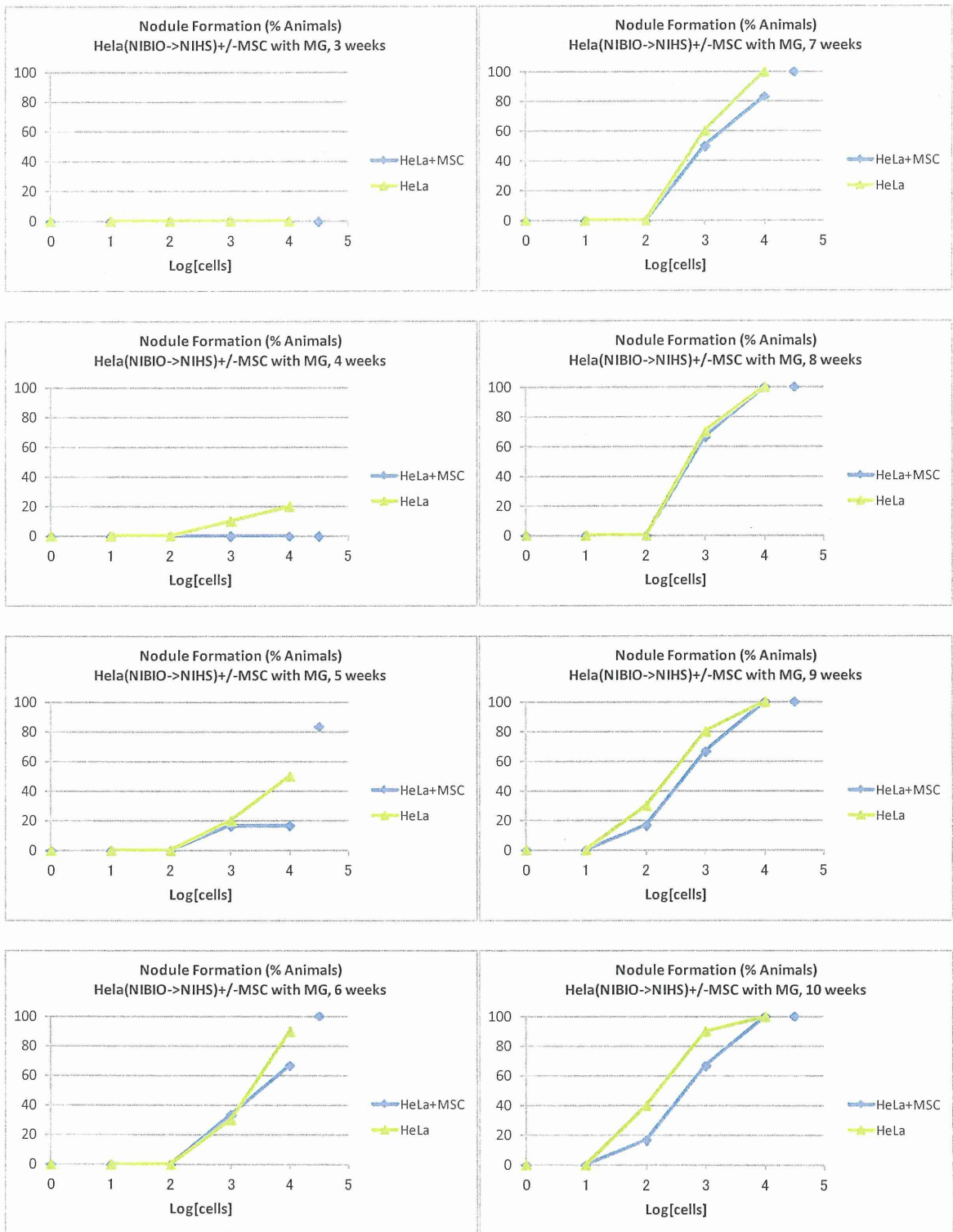


Figure 1-2B hMSC と HeLa 細胞との混合懸濁液の NOG マウスにおける結節形成確率

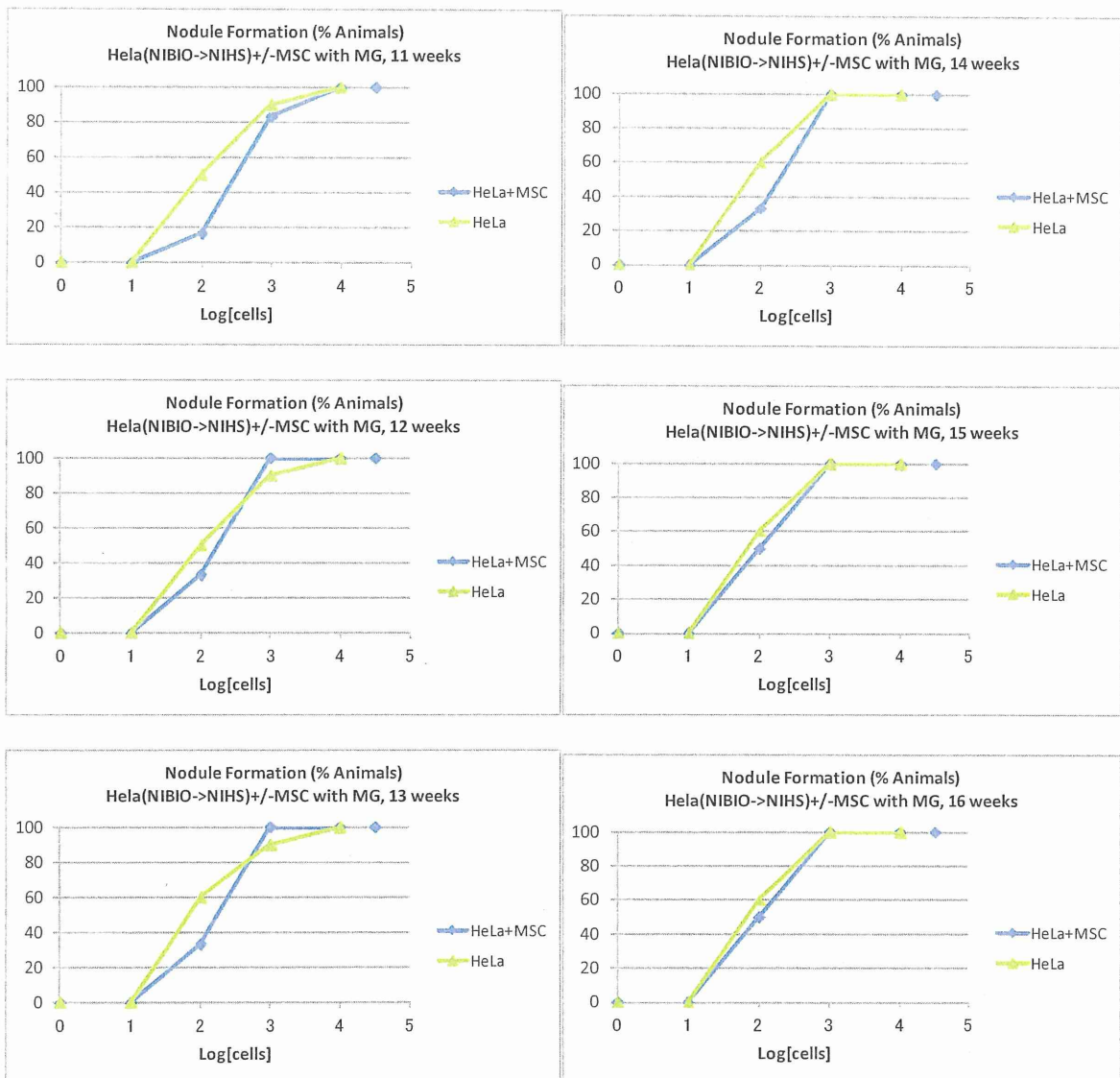


Figure 1-2B hMSC と HeLa 細胞との混合懸濁液の NOG マウスにおける結節形成確率（続き）
hMSC と HeLa 細胞との混合懸濁液を NOG マウス背部皮下に投与した際の、投与 HeLa 細胞数と結節形成確率との用量 - 作用関係. 比較のため、Figure 1-1C に示した HeLa 細胞単独投与の用量作用関係を同時に示す.

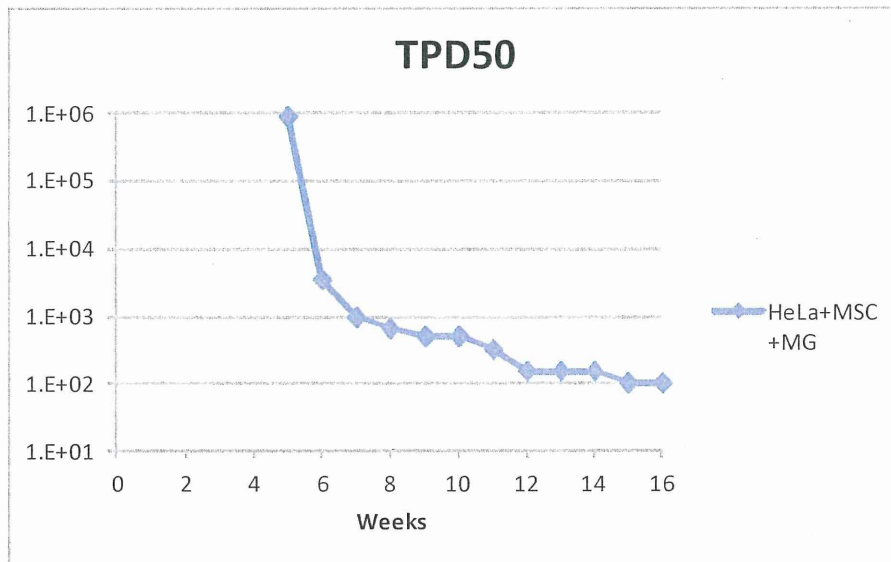


Figure 1-2C hMSC と HeLa 細胞との混合懸濁液の NOG マウスにおける TPD₅₀ 値の推移
 マトリゲルに懸濁した hMSC および HeLa 細胞を NOG マウスに投与した際も、ほぼ HeLa 細胞
 単独をマトリゲルに懸濁して投与した時 (Figure 1-1D) と同様に、TPD₅₀ 値は 12-16 週目の時点
 でほぼ安定した。

Set 1	RT primer ; A12RT379R	GCTAGTCAAATTTTAACCGAATTTTTTCCCAT
	ICANF ; 295FN3	GGAGGCTAGAAGGAGAG(<i>AGA</i>)
	ICANR ; 374RN3	CGAATTTTTTCCCATCG(<i>CGA</i>)
	Probe ; E-326A-F	GCGTC(<i>A</i>)GTATTA
Set 2	RT primer ; A12RT379R	GCTAGTCAAATTTTAACCGAATTTTTTCCCAT
	ICANF ; 295FN3	GGAGGCTAGAAGGAGAG(<i>AGA</i>)
	ICANR ; 374RN3	CGAATTTTTTCCCATCG(<i>CGA</i>)
	Probe ; E-326G-F	GCGTCA(<i>G</i>)TATTA
Set 3	RT primer ; A12RT384R	GCTAGTCAAATTTGGCCTTAACCGAATTTTTT
	ICANF ; 295FN3	GGAGGCTAGAAGGAGAG(<i>AGA</i>)
	ICANR ; 379RN3	TTAACCGAATTTTTTCC(<i>CAU</i>)
	Probe ; E-326G-F	GCGTCA(<i>G</i>)TATTA

表 2-1 : Cycleave RT-ICAN 法で用いた primer 配列. (斜字) は RNA 配列を示す.

Set 1	RT primer ; A12RT379R	GCTAGTCAA A ATTTAACCGAATTTTTTCCCAT
	PCRF ; 295F	GGAGGCTAGAAGGAGAGAGA
	PCRR ; 374R	CGAATTTTTTCCCATCGCGA
	Probe ; E-326A-F	GCGTC(A)GTATTA
Set 2	RT primer ; A12RT379R	GCTAGTCAA A ATTTAACCGAATTTTTTCCCAT
	PCRF ; 295F	GGAGGCTAGAAGGAGAGAGA
	PCRR ; 374R	CGAATTTTTTCCCATCGCGA
	Probe ; E-326G-F	GCGTCA(G)TATTA
Set 3	RT primer ; A12RT384R	GCTAGTCAA A ATTGGCCTTAACCGAATTTTTT
	PCRF ; 295F	GGAGGCTAGAAGGAGAGAGA
	PCRR ; 379R	TTAACCGAATTTTTTCCCAT
	Probe ; E-326G-F	GCGTCA(G)TATTA

表 2-2 : Cycleave RT-PCR 法で用いた primer 配列. (斜字) は RNA 配列を示す.

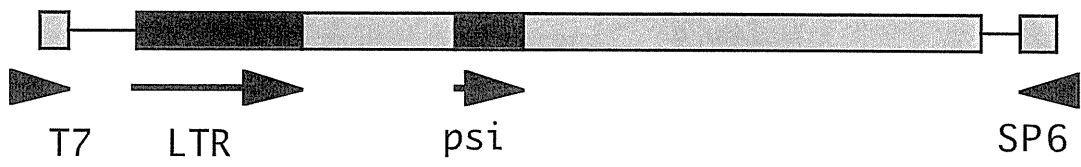


図 2-1 : モデルレトロウイルス核酸を作製するために利用した鋳型 DNA

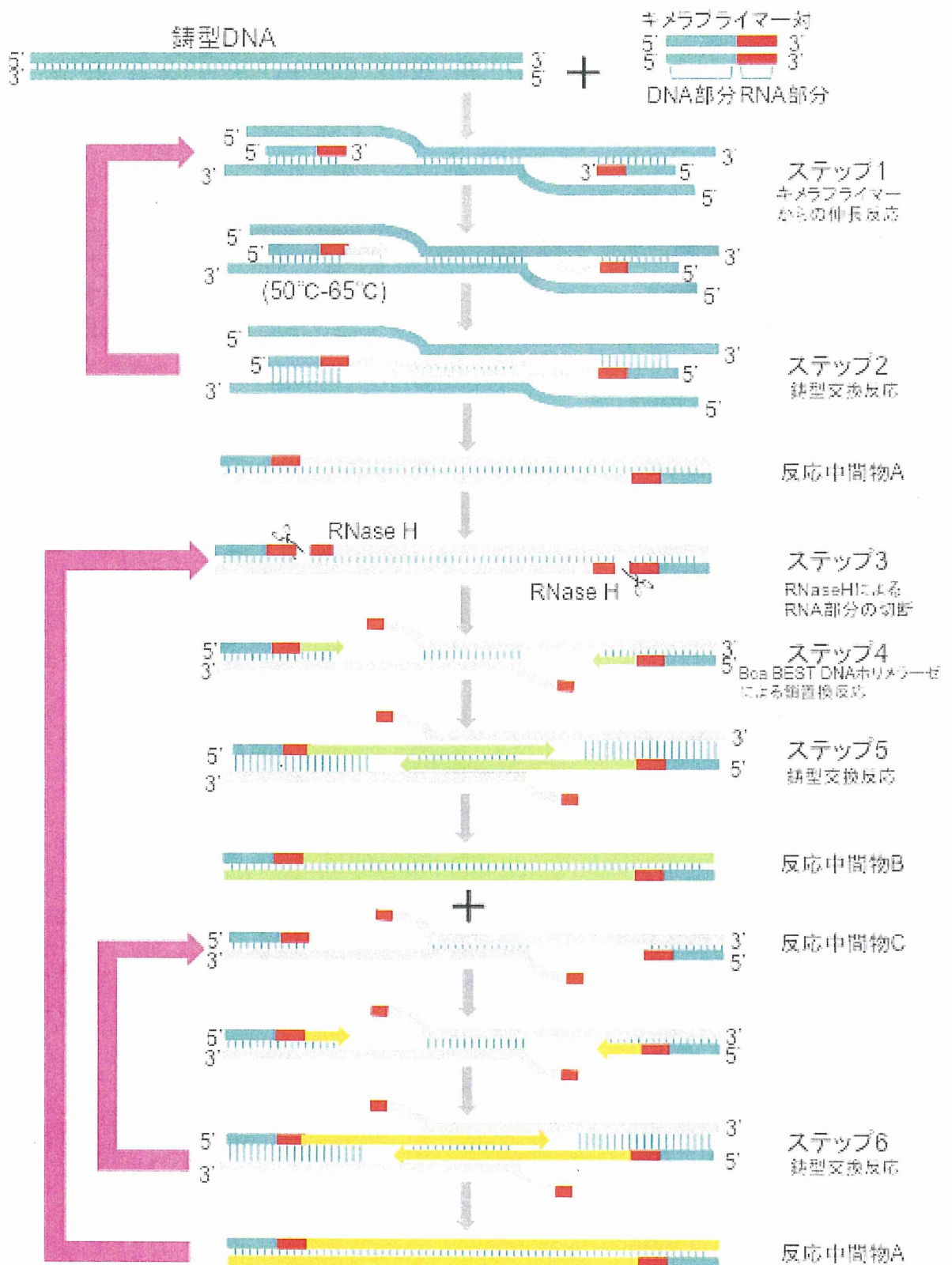


図 2-2 : ICAN 反応の基本原理

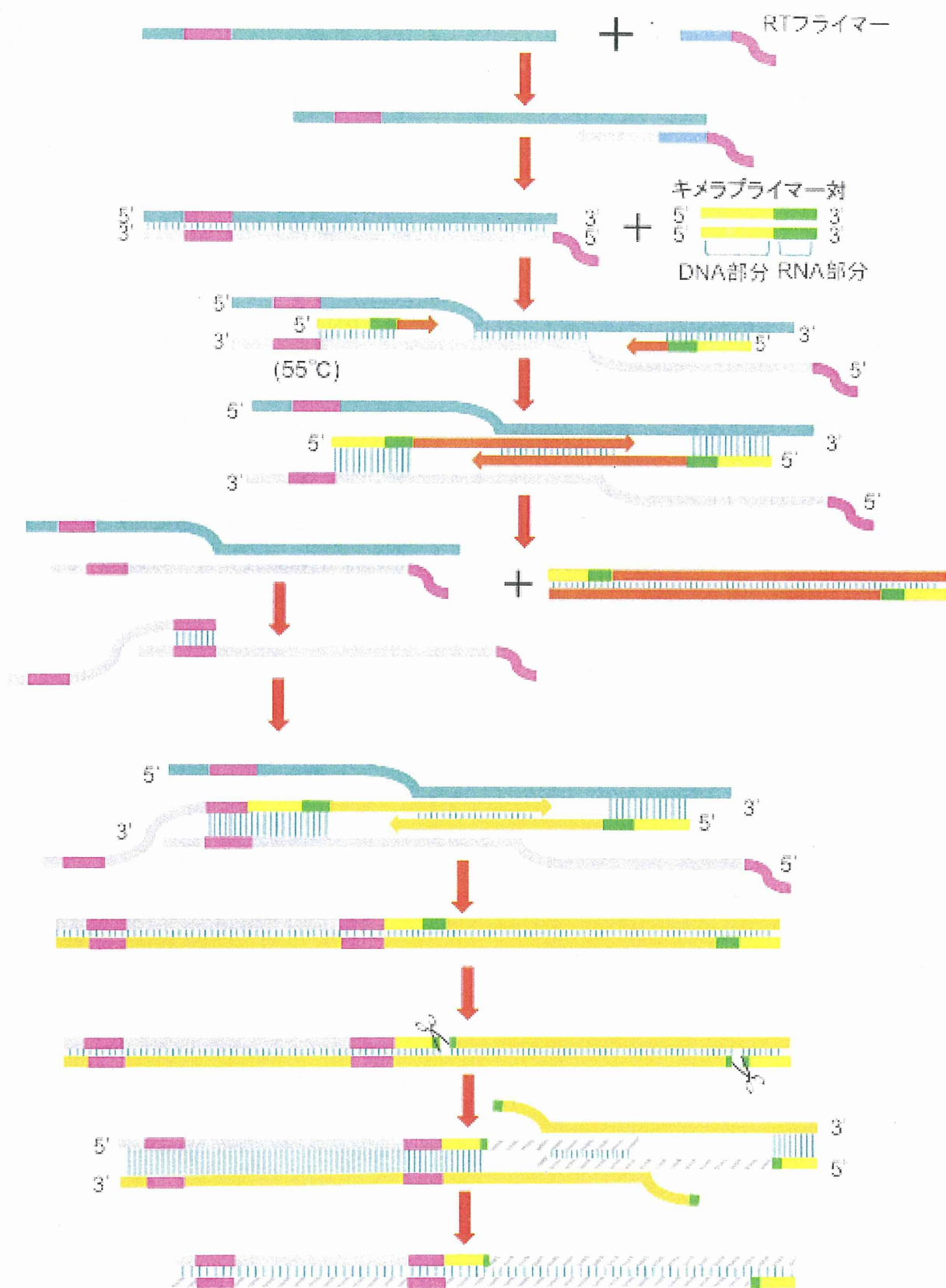


図 2-3 : Ladder Forming ICAN 法の原理