

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。

E. 結論

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。

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.
1. K 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 取得特許	なし
H-2 実用新案登録	なし
H-3 その他	なし

G-2 学会発表

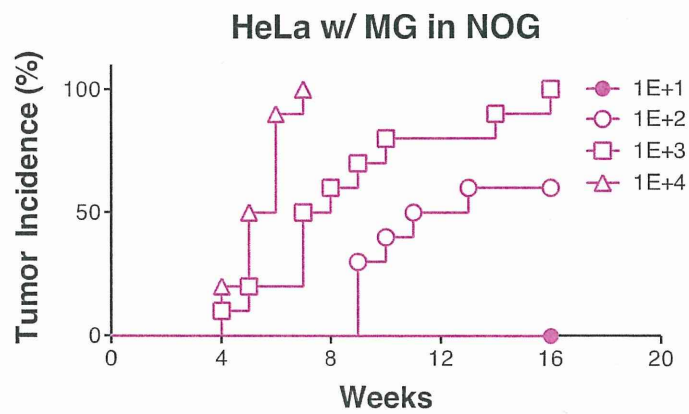
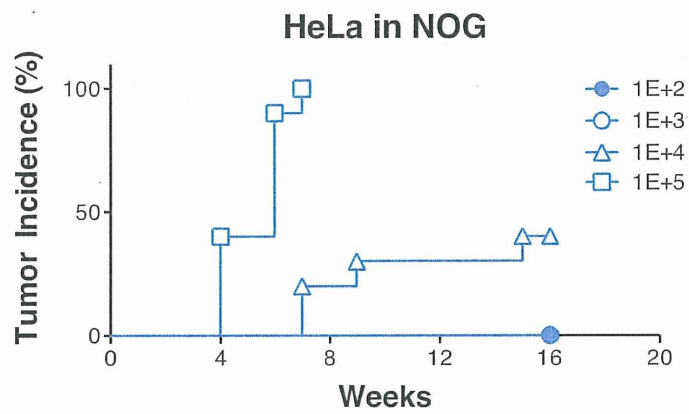
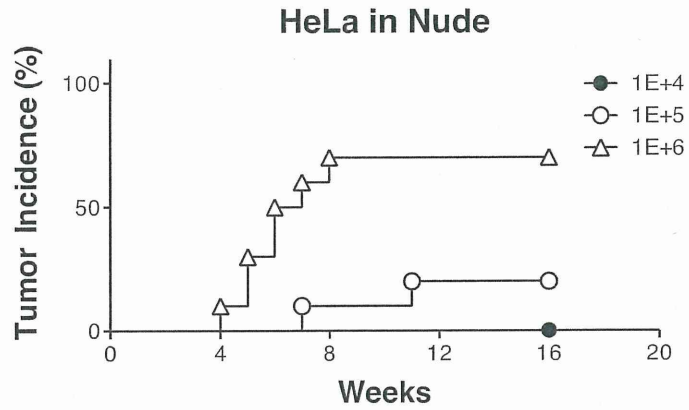


Figure 1A 免疫不全マウスへの HeLa 細胞の生着とマトリゲルの効果

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。

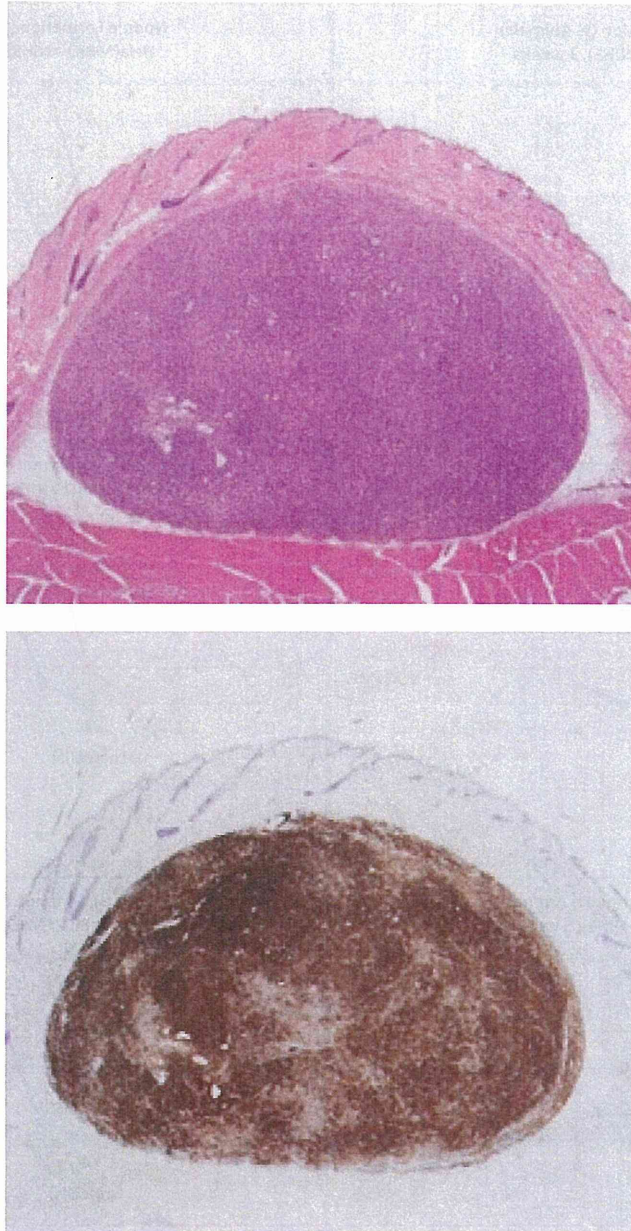


Figure 1B 免疫不全マウスへの HeLa 細胞の生着とマトリゲルの効果

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。

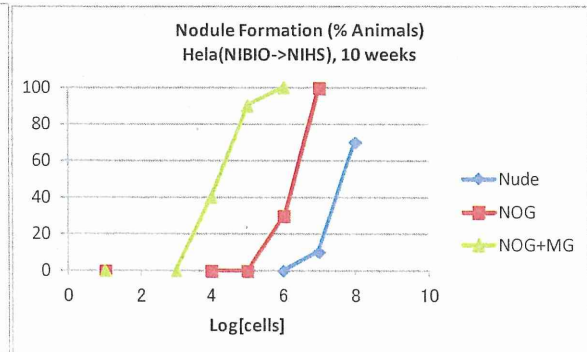
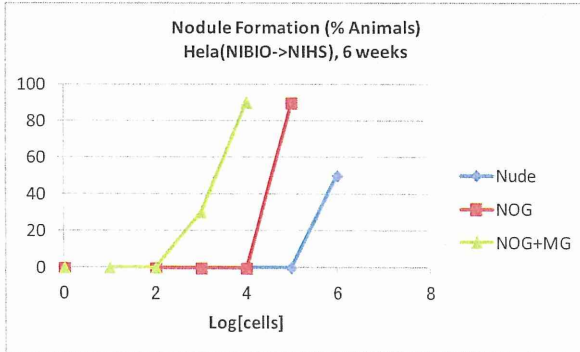
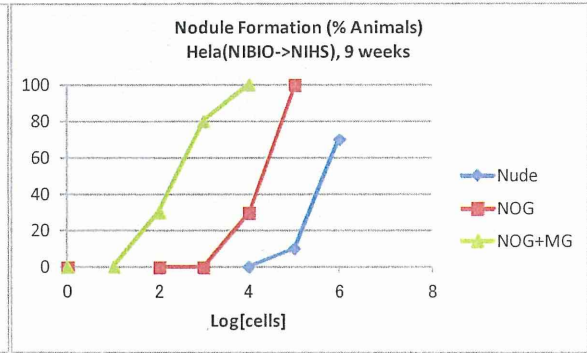
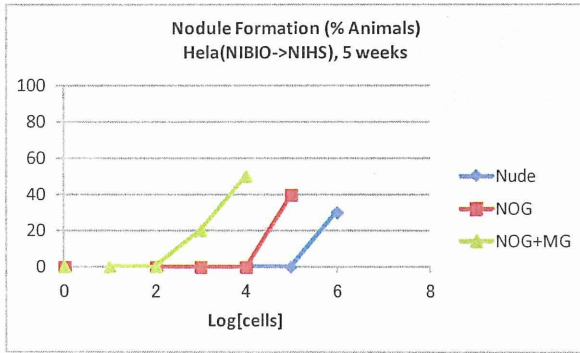
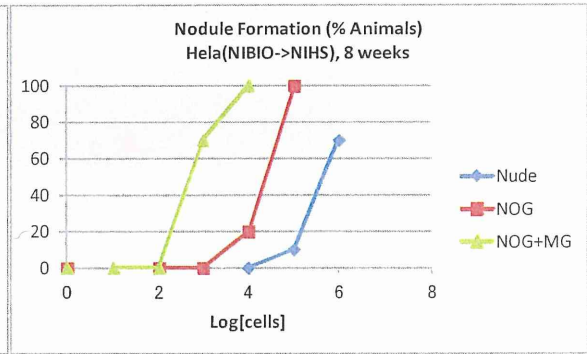
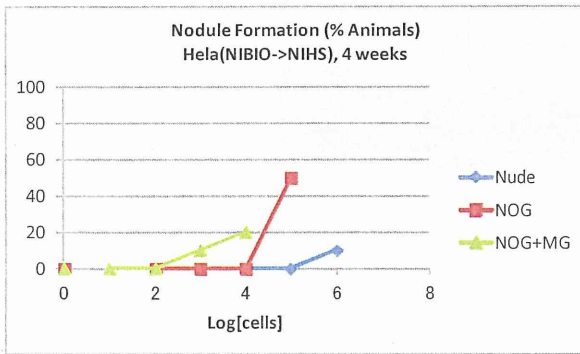
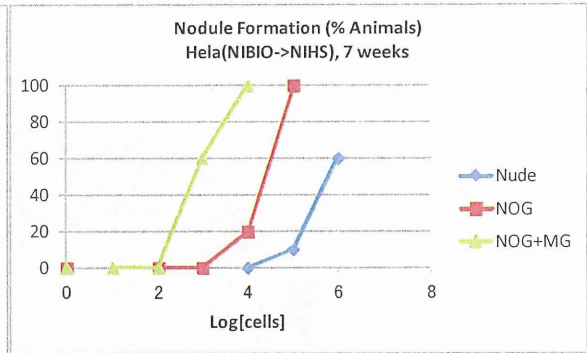
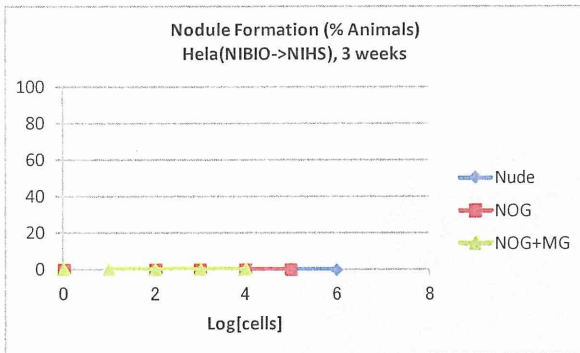


Figure 1C 免疫不全マウスへの HeLa 細胞の投与数と結節形成確率の用量 - 作用関係

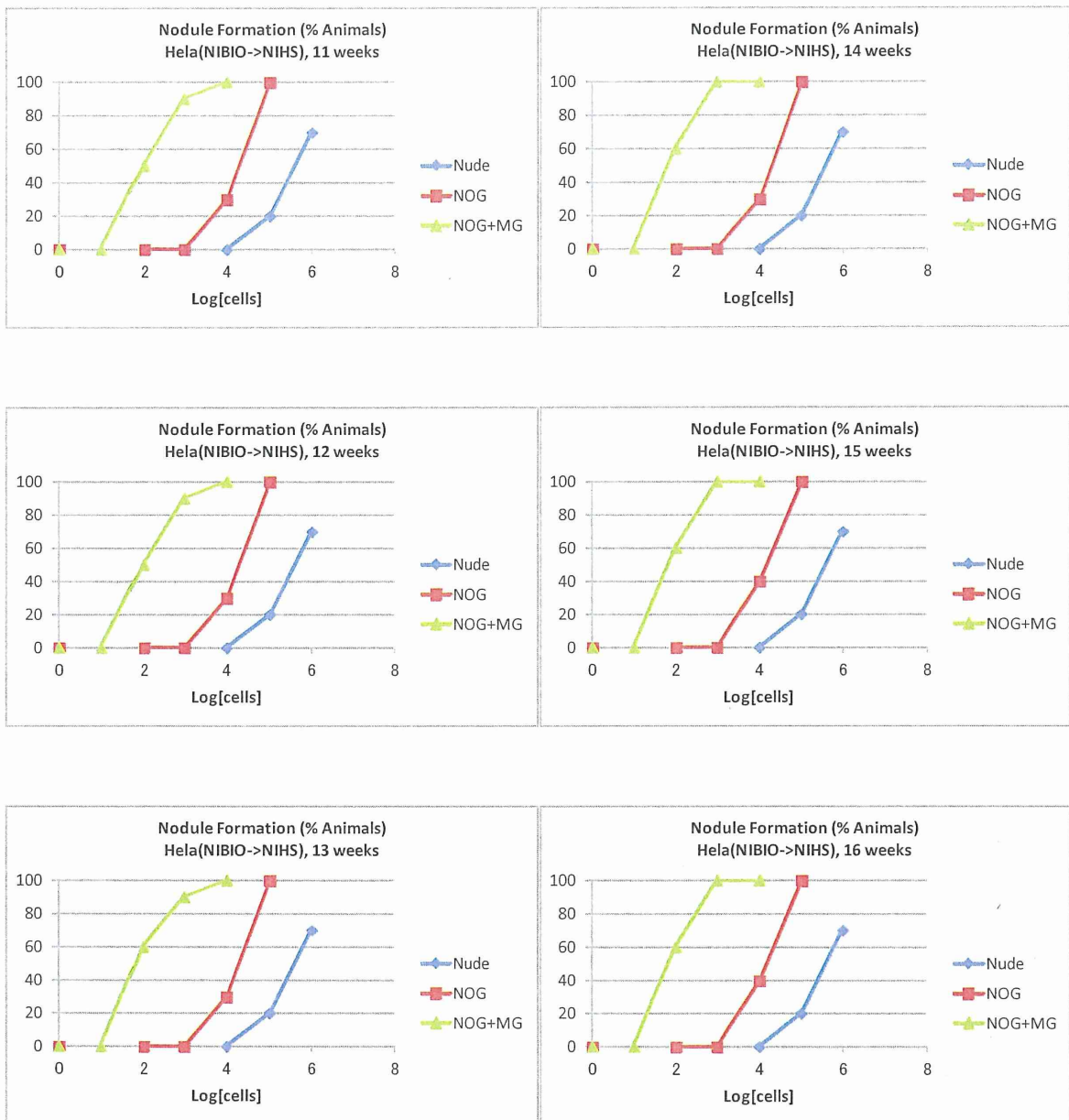


Figure 1C 免疫不全マウスへの HeLa 細胞の投与数と結節形成確率の用量 - 作用関係 (続き)
 HeLa 細胞移植後 3 週間後まではいずれの群においても移植細胞由来と推定される明らかな結節形成は認められなかったが、4 週間後からは結節が認められた。Nude : スードマウス群、NOG : NOG マウス群、NOG+MG : NOG マウス+マトリゲル群。

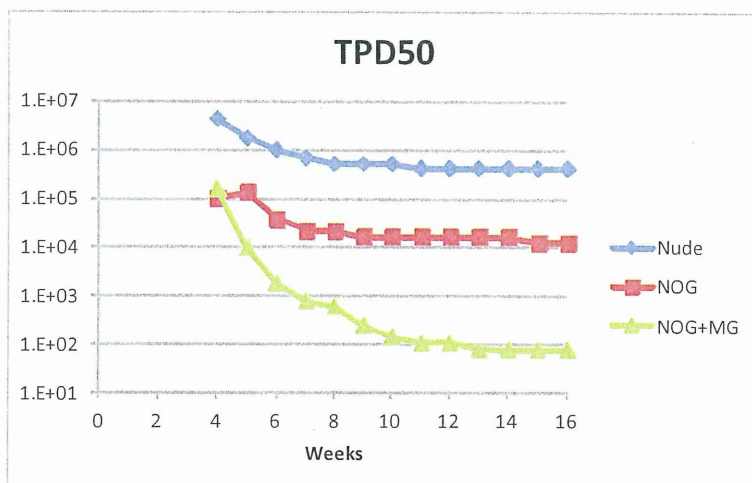


Figure 1D 免疫不全マウスへの HeLa 細胞単独投与における TPD₅₀ 値の推移

ヌードマウス群 (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 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	5,431

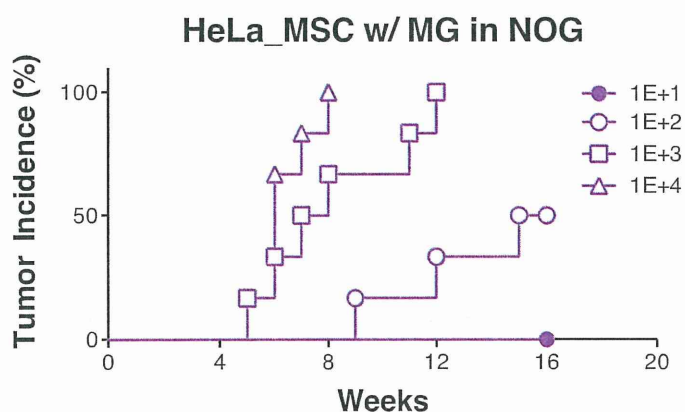


Figure 2A hMSC と HeLa 細胞をマトリゲルに混合懸濁し NOG マウスに移植した際の結節形成
 10^6 個の hMSC と一定量 ($10^1 \sim 10^4$ 個) の HeLa 細胞とをマトリゲル中で混合懸濁して NOG マ

ウス背部皮下に移植した際の結節形成率の推移。

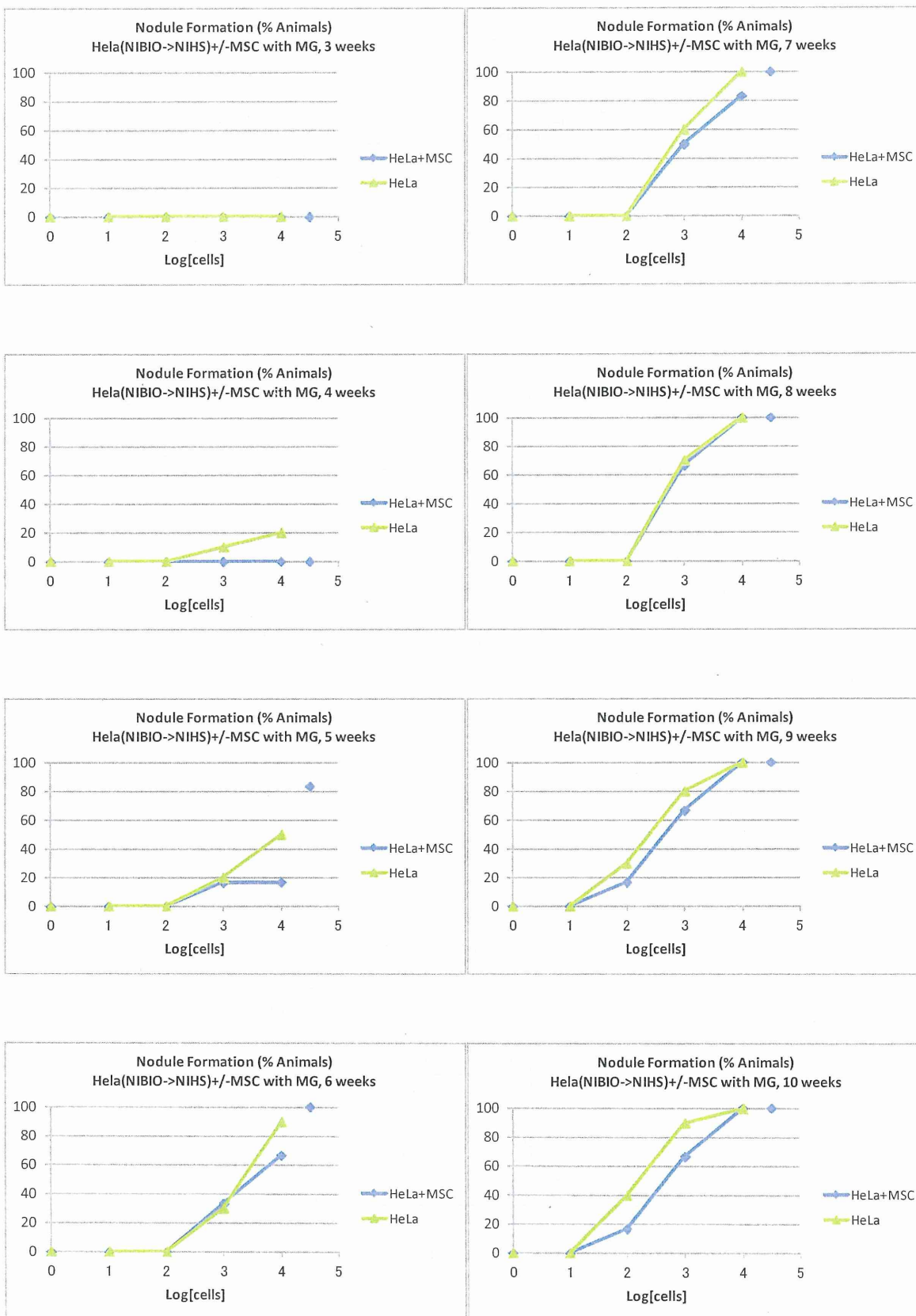


Figure 2B hMSC と HeLa 細胞との混合懸濁液の NOG マウスにおける結節形成確率

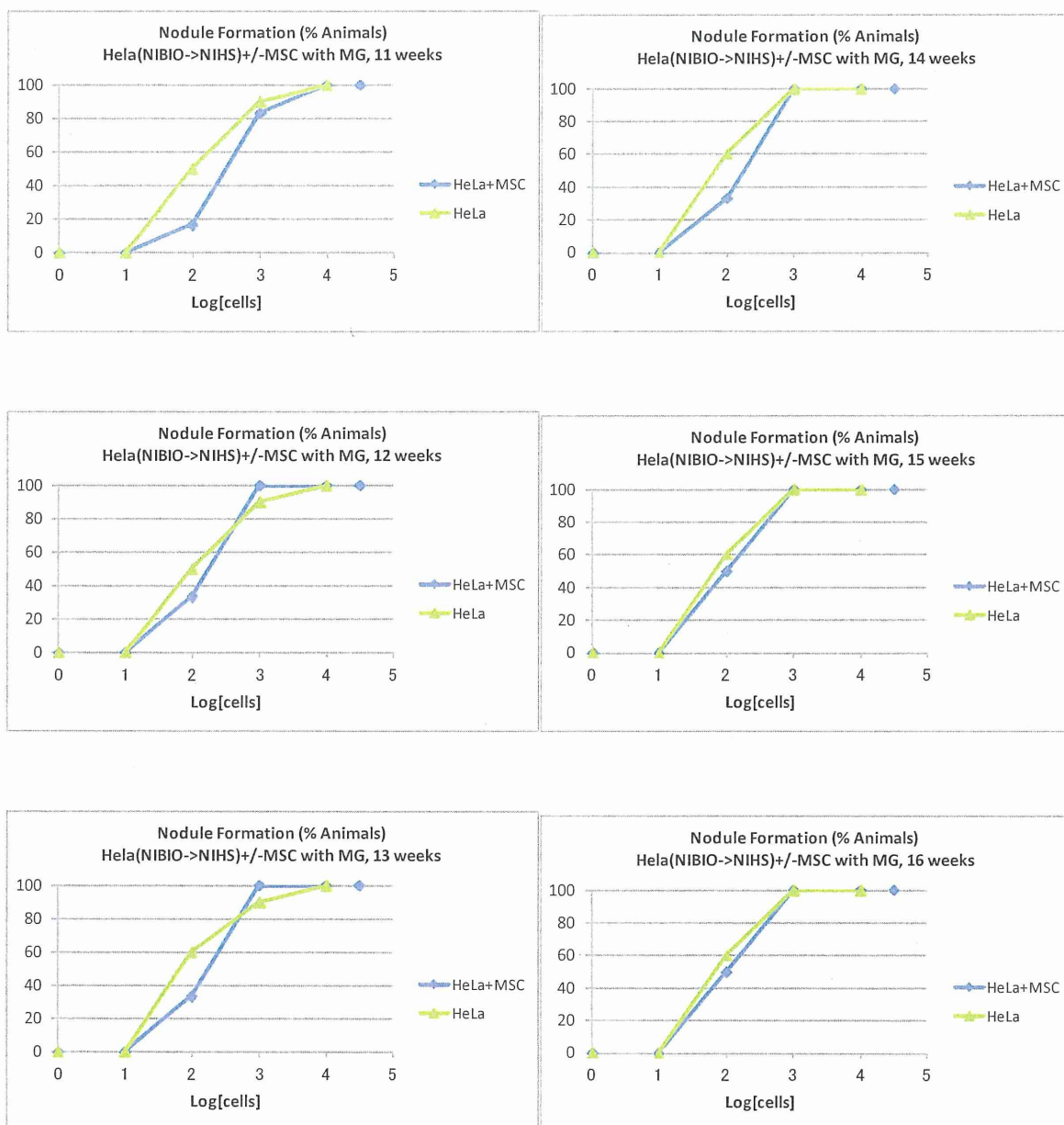


Figure 2B hMSC と HeLa 細胞との混合懸濁液の NOG マウスにおける結節形成確率（続き）

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 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。

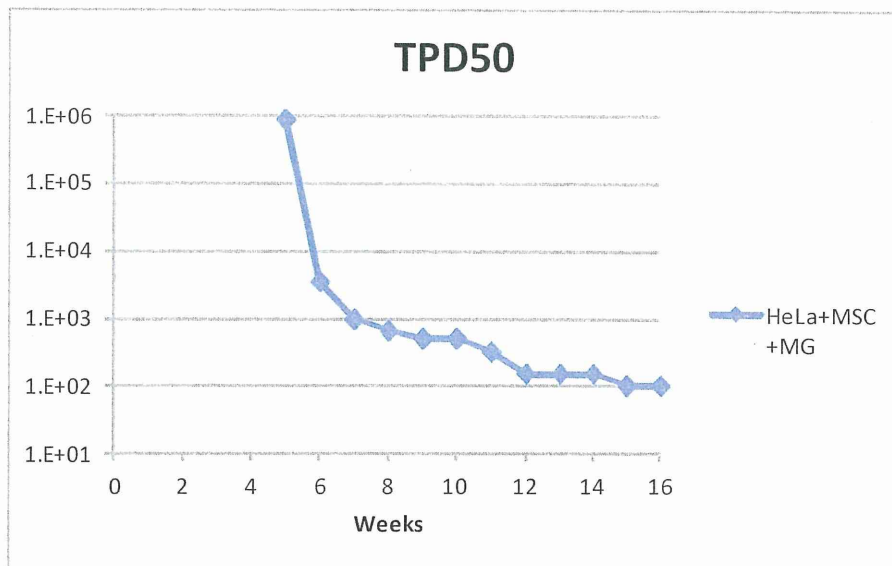


Figure 2C hMSC と HeLa 細胞との混合懸濁液の NOG マウスにおける TPD₅₀ 値の推移
 マトリゲルに懸濁した hMSC および HeLa 細胞を NOG マウスに投与した際も、ほぼ HeLa 細胞
 単独をマトリゲルに懸濁して投与した時 (Figure 1D) と同様に、TPD₅₀ 値は 12-16 週目の時点
 でほぼ安定した。

分担研究課題 細胞・組織加工製品の感染制御法の開発

研究分担者 氏名 早川 堯夫 所属 近畿大学 薬学総合研究所

研究要旨：製品の感染リスク・汚染の排除の最も基本的な方策は、原料としての細胞の感染制御と製品製造過程での動物由来物質の排除と適切なウイルス否定試験の実施である。我々の分担研究課題では、これまでに感染リスク排除対策として無血清・フィーダー細胞フリーでiPS細胞株を樹立し、維持できることの汎用性を確認している。一方、これまで汎用されている定量的PCR法ではウイルス由来核酸を含む細胞の一部しか検出できない問題が未解決であることを示してきた。そこで、その抜本的解決を図るべく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の等温遺伝子増幅法(ICAN法)の改良に着手した。その結果、微量のモデルウイルス核酸をスパイクさせた細胞からの核酸回収法と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(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、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と無血清・フィーダー細胞フリーで樹立したiPS細胞株におけるウイルス由来遺伝子否定試験を実施し、双方の細胞株におけるウイルス由来遺伝子の混入が認められないことを示すとともに、本検出系の有用性を実証するに至った。

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・組織加工製品の安全性上の問題としてウイルス汚染の可能性があげられる。これには

細胞基材に起因するものと製造工程中のウイルスの迷入に起因するものがある。細胞基材へのウイルス混入の可能性としては、感染したヒト（動物）からの細胞株の入手や、細胞株樹立を目的としたウイルス使用などが考えられる。製造工程での外来ウイルス混入経路としては、培養等に使用する血清成分のような動物由来の試薬が汚染していることや、特定のタンパク質を発現させるためのウイルスベクター使用などが考えられる。したがって、製品の感染リスク・汚染の排除の最も基本的な方策は、原料としての細胞基材の感染制御と製品製造過程での動物由来物質の排除と適切なウイルス否定試験の実施である。一般に現段階で人工多能性幹細胞（iPS（様）細胞）を含む各種幹細胞の培養には、動物由来の血清やフィーダー細胞などをを用いることが多い。そこで本研究では、動物由来物質を排除することを目的とした無

血清・フィーダー細胞非存在下でiPS細胞株が樹立・維持が可能であるかの検討を開始し、当該年度までに、iPS細胞樹立と維持系の汎用性の確認を行い、その一般化に至っている。

一方、ウイルス汚染の危険性を可能な限り排除するとしても、それだけでは細胞基材そのものの汚染や、細胞および培養液取扱い中の汚染などの人的作業に関わる汚染等を完全に排除したとは科学的に必ずしもいえない。科学的に実証するには、汚染の有無を的確に検出できる検査により汚染ウイルスの存在を否定することが必須となる。またそのために、細胞原料や製品に関するより高感度で高精度、かつ簡便なウイルス否定試験法が必要であり、再生医療の実用化加速に資する重要な技術要件としてその開発が望まれている。

現在までにさまざまなウイルス否定試験法が用いられている。その一つである核酸増幅法は特定のウイルス塩基配列を検出する方法である。この試験法は、生きた増殖性の感染ウイルスそのものの有無を検出するものではないが、高感度で迅速にウイルス由来核酸の有無に関する情報を得られるという利点がある。しかし、従来から汎用されている定量的PCR法を用いた場合、反応系容量の限界があるため、ウイルス由来核酸が細胞に存在していたとしても、必ずそれが検出できるとは限らない。たとえば 1×10^7 個の細胞に1粒子のウイルスが汚染していた場合、理論値のPCR法の検出限界が反応系あたり1コピーであったとしても、 1×10^7 個の細胞にランダムに局在しているウイルス核酸、まして細胞から抽出した細胞由来核酸を含む全核酸中に分散局在するウイルス核酸をもちとなく一つのPCR反応系で検出することは、反応容量の限界から不可能である。全細胞から得た全核酸中からサンプリングした一部の核酸のみを鋳型にした核酸増幅検査で陰性になっても、それは全ての細胞集団において、ウイルス核酸の存在を否定出来たことにはならない。それを、反応系の数を増やすことで補うとなれば、被験サンプル数に乗じて膨大な数

の反応系を調製しなければならない。

そこで我々は、従来から汎用されている定量的PCR法(汎用的qPCR法)の問題点を明らかにすべく、その実際の検出感度(限界値)を確認したところ、汎用的qPCR法の一般的な反応系に当たる1反応($15 \sim 25 \mu\text{l/well}$)分においては、50コピー以上のウイルス由来核酸がないと再現性よく確実に増幅反応がなされないとの結果、いわゆる実質的な限界点が存在すること(≒ 検出限界50-100コピー/1反応ボリューム)が明らかになった。また、高感度のqPCR(TaqMan probe法)を用いたとしても、全てのウイルス由来核酸を取りこぼし無く検出するには、多数の反応well分(数十~数百well)が必要となることが避けては通れない技術的限界であることが判明した。また、このような操作はウイルス由来核酸の飛散等を招くおそれがあり安全性面からも問題であるといえる。加えて、上述のqPCRベースの検出方法では、ウイルス検出までに2~3時間を要することが必須であり、多検体を効率的に迅速に処理する上でも障壁となることがデータとして示された。

今回我々は、これらの問題を解決すべく、感染検体に含有される全核酸を網羅的に解析でき、かつ、安全で高感度高効率の検出法のベース技術として、等温遺伝子増幅法(ICAN法)の有用性に着目し、その改良に着手した。当該年度は、技術改良に必要な不可欠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。

B. 研究方法

B-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. 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°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-3. Ladder Forming RT-ICAN法

モデルレトロウイルス核酸(10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 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°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°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1に記載した。また、ICAN法の基本原理を図2に、Ladder Forming RT-ICAN法の原理を図3に示した。

B-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に記載した。Cycleave PCR法の原理は図4に示した。

B-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 \times 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 \times 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-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。

(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。

C. 研究結果

C-1. Cycleleave 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 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 反応中にもこのような 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 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. Cycleleave 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、Cycleleave 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-3. Cycleleave 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 Cycleleave

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、Cycleleave 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 6-A)、セット 2、3 においては 10^4 コピー (図 6-B, C) まで検出することが可能であった。

C-4. Cycleleave RT-ICAN 法の改善

より感度の高い Cycleleave 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、Cycleleave 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 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 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 Cycleleave 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 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 7-G-J) まで検出可能であることが示された。

C-5. Cycleleave RT-PCR 法による検出感度の検討

Cycleleave RT-ICAN 法と従来の Cycleleave RT-PCR 法における検出感度の比較を行った。ただし、Cycleleave 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、Cycleleave RT-PCR 法では逆転写反応を行った 1/4 量しか Cycleleave 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 8 に示すとおり、プライマー、プローブセット 1 による Cycleleave RT-PCR 法では 10^2 コピー (図 8-A)、プライマー、プローブセット 2、3 による Cycleleave RT-PCR 法で

は 10^1 コピー (図 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-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 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 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 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つた 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 10)。

C-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 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、検出感度は鋳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、特異的増幅すべき鋳型濃度において、融解曲線から判断すると、非特異的増幅となってしまふものが生じた (図 11-F の 10^5 コピー-A2 ウェル、 10^4 コピー-B4 ウェル、図 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-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 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つた (図 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 12-A, C)。

D. 考察

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ながらも、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、総合的に感度、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、キクワイ化病原因ウイルス、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。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 Cycleave 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(ψ) 44 bp を完全に包括することは出来ず、 ψ 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事が確認された。

今回我々が開発した Cycleave 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 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 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 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。今後は、Cycleave 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 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 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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) 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.
- 3) 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
- 4) Morikawa T, Sueyoshi M, Chaipech S, Matsuda H, Nomura Y, Yabe M, Matsumoto T, Ninomiya K, Yoshikawa M, Pongpiriyadacha Y, Hayakawa T, Muraoka O. Suppressive 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.
 - 5) 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. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.03.010. [Epub ahead of print] PMID: 23584042 [PubMed - as supplied by publisher]
 - 6) Mitsui Y, Yamada K, Hara S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K. Comparative studies on glycoproteins expressing polylectosamine-type N-glycans in cancer cells. *J Pharm Biomed Anal*. 2012 Nov;70:718-26.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) Chaipech S, Morikawa T, Ninomiya K, Yoshikawa M, Pongpiriyadacha Y, Hayakawa T, Muraoka O. New flav-3-en-3-ol glycosides, kaempferiaosides