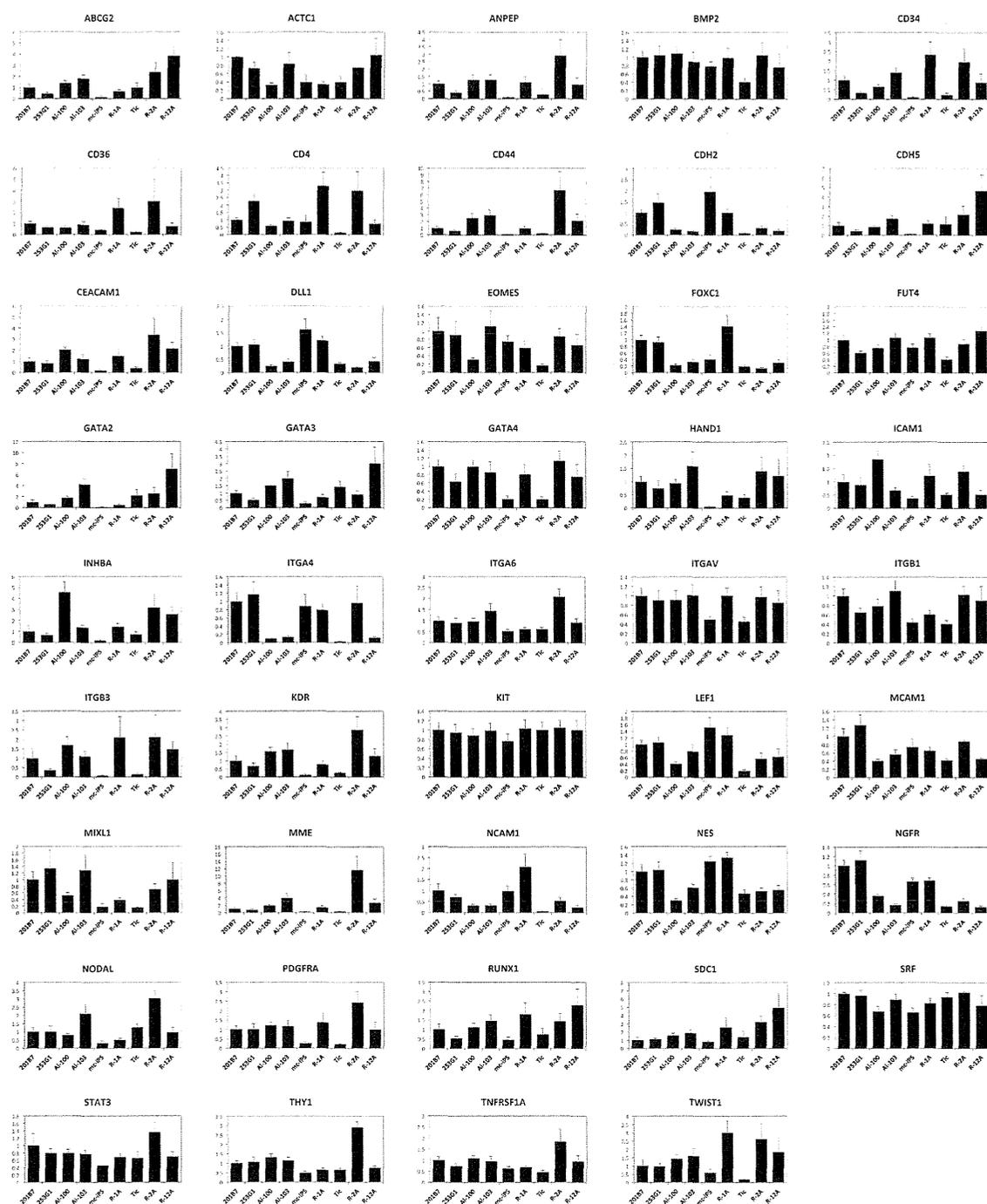


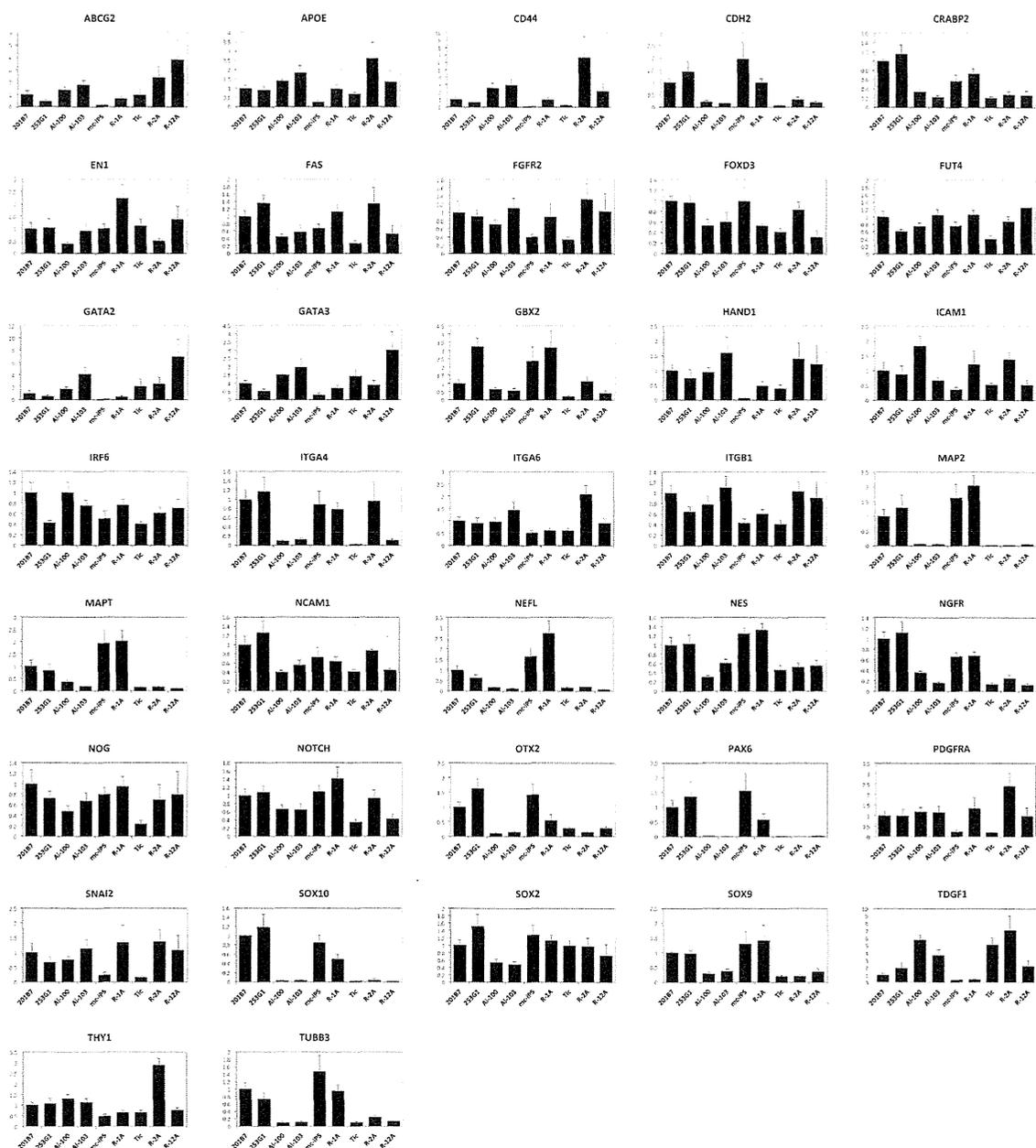
**Fig. 1** ヒト iPS 細胞株由来胚葉体の内胚葉マーカー遺伝子発現量

フィーダー細胞上で培養したヒト iPS 細胞 9 株を、分化培地を用いて超低接着プレート上で 37°C , 16 日間培養し、胚葉体を形成させた。胚葉体から RNA を抽出し、cDNA を合成し、上記の内胚葉マーカー遺伝子の定量 PCR を行った。発現量は GAPDH 量で補正した。縦軸は相対的な発現量、横軸はヒト iPS 細胞株を示している。棒グラフは、 $\text{平均値} \pm \text{SEM}$  (n=6)。



**Fig. 2** ヒト iPS 細胞株由来胚葉体の中胚葉マーカー遺伝子発現量

フィーダー細胞上で培養したヒト iPS 細胞 9 株を、分化培地を用いて超低接着プレート上で 37°C, 16 日間培養し、胚葉体を形成させた。胚葉体から RNA を抽出し、cDNA を合成し、上記の中胚葉マーカー遺伝子の定量 PCR を行った。発現量は GAPDH 量で補正した。縦軸は相対的な発現量、横軸はヒト iPS 細胞株を示している。棒グラフは、 $\text{平均値} \pm \text{SEM}$  (n=6)。



**Fig. 3** ヒト iPS 細胞株由来胚葉体の外胚葉マーカー遺伝子発現量

フィーダー細胞上で培養したヒト iPS 細胞 9 株を、分化培地を用いて超低接着プレート上で 37°C, 16 日間培養し、胚葉体を形成させた。胚葉体から RNA を抽出し、cDNA を合成し、上記の外胚葉マーカー遺伝子の定量 PCR を行った。発現量は GAPDH 量で補正した。縦軸は相対的な発現量、横軸はヒト iPS 細胞株を示している。棒グラフは、 $\text{平均値} \pm \text{SEM}$  (n=6)。



Table 3 第1主成分, 第2主成分および第3主成分

遺伝子名	第1主成分
APOE	0.973
KDR	0.938
ANPEP	0.917
CD44	0.916
CEACAM1	0.869
HAND1	0.86
MME	0.84
GATA6	0.837
TNFRSF1A	0.83
NODAL	0.81
ITGA6	0.808
THY1	0.794
CDH5	0.787
ITGB1	0.757
PDGFRA	0.757
TDGF1	0.755
SDC1	0.742
INHBA	0.712
FGFR2	0.704
GATA2	0.704
STAT3	0.7
ITGB3	0.695
ABCG2	0.671
RUNX1	0.608
CD34	0.581
GATA4	0.58
ITGAV	0.568
CD36	0.565
TWIST1	0.514
ICAM1	0.5
KIT	0.487
SNAI2	0.463
SRF	0.397
SST	0.394
CDX2	0.365
SOX7	0.363
ACTC1	0.32
MIXL1	0.296
FUT4	0.286
BMP2	0.262
GATA3	0.238
CD4	0.212
CTNNB1	0.195
EOMES	0.146
IRF6	0.105
FAS	0.082
FOXA2	0.077
SOX10	0.055
SOX17	0.039
HNF1B	-0.065
MCAM	-0.163
NOG	-0.192
MNX1	-0.239
LEF1	-0.249
ITGA4	-0.268
FOXD3	-0.293
SOX9	-0.31
NOTCH1	-0.317
NCAM1	-0.353
FOXC1	-0.426
EN1	-0.47
NGFR	-0.482
CRABP2	-0.531
GBX2	-0.531
NEFL	-0.556
ISL1	-0.561
SOX2	-0.584
TUBB3	-0.655
NES	-0.666
MAPT	-0.701
SYP	-0.718
MAP2	-0.719
OTX2	-0.773
CDH2	-0.778
PAX6	-0.799
DLL1	-0.833

遺伝子名	第2主成分
NOTCH1	0.92
NOG	0.909
FAS	0.858
CD4	0.834
ITGA4	0.817
NCAM1	0.768
SOX17	0.751
BMP2	0.709
GBX2	0.698
FOXC1	0.69
CTNNB1	0.684
TWIST1	0.677
FUT4	0.675
CD36	0.673
NES	0.666
MAP2	0.651
CRABP2	0.634
FGFR2	0.633
MCAM	0.629
NEFL	0.619
HNF1B	0.617
EOMES	0.603
CD34	0.598
SST	0.59
ITGAV	0.589
PDGFRA	0.564
MAPT	0.561
FOXD3	0.526
NGFR	0.5
CDH2	0.497
ITGB3	0.482
SYP	0.478
DLL1	0.476
MNX1	0.46
TUBB3	0.45
GATA6	0.447
PAX6	0.439
EN1	0.427
OTX2	0.385
STAT3	0.373
SOX2	0.343
TNFRSF1A	0.331
CEACAM1	0.327
ANPEP	0.319
SOX7	0.317
ITGB1	0.313
MIXL1	0.306
RUNX1	0.285
ICAM1	0.278
SNAI2	0.275
SDC1	0.268
MME	0.262
THY1	0.252
LEF1	0.247
ITGA6	0.244
KDR	0.236
GATA4	0.216
SOX9	0.213
SRF	0.211
ISL1	0.209
CD44	0.192
ACTC1	0.191
APOE	0.159
FOXA2	0.152
HAND1	0.105
KIT	0.063
NODAL	0.04
CDH5	-0.034
INHBA	-0.074
CDX2	-0.081
SOX10	-0.112
IRF6	-0.15
ABCG2	-0.155
GATA3	-0.282
GATA2	-0.421
TDGF1	-0.436

遺伝子名	第3主成分
FOXA2	0.956
SOX10	0.931
IRF6	0.931
GATA3	0.904
SOX9	0.898
CDX2	0.898
LEF1	0.86
SNAI2	0.836
MNX1	0.755
KIT	0.725
GATA4	0.707
ABCG2	0.672
RUNX1	0.585
CDH5	0.526
ACTC1	0.484
NGFR	0.443
TUBB3	0.426
GATA2	0.391
SOX7	0.369
SDC1	0.359
FOXC1	0.352
NCAM1	0.335
SYP	0.328
ITGAV	0.312
HNF1B	0.27
SOX2	0.242
CD34	0.24
DLL1	0.147
MIXL1	0.123
EN1	0.117
HAND1	0.099
ITGB3	0.091
NEFL	0.072
FUT4	0.069
ISL1	0.062
NOG	0.061
NOTCH1	0.052
ANPEP	0.036
APOE	0.021
MCAM	0.019
EOMES	-0.004
TWIST1	-0.006
CD36	-0.016
SOX17	-0.02
ITGB1	-0.031
CDH2	-0.04
SRF	-0.055
INHBA	-0.056
MAP2	-0.057
GBX2	-0.063
GATA6	-0.066
CD4	-0.085
MAPT	-0.099
CEACAM1	-0.104
FGFR2	-0.106
PAX6	-0.11
KDR	-0.182
CD44	-0.182
NES	-0.209
TNFRSF1A	-0.212
CRABP2	-0.216
SST	-0.228
MME	-0.239
OTX2	-0.241
PDGFRA	-0.279
ITGA4	-0.289
ICAM1	-0.317
BMP2	-0.346
FAS	-0.357
CTNNB1	-0.385
NODAL	-0.392
TDGF1	-0.403
THY1	-0.439
ITGA6	-0.464
STAT3	-0.485
FOXD3	-0.61

**Table 4** iPS 細胞株の第 1 主成分得点, 第 2 主成分得点および第 3 主成分得点

細胞株	第 1 主成分得点	細胞株	第 2 主成分得点	細胞株	第 3 主成分得点
R-2A	48.26	R-1A	25.09	R-12A	33.17
Ai-103	21.54	201B7	13.79	R-1A	7.11
Ai-100	14.27	R-2A	13.27	Ai-103	-2.08
R-12A	7.37	253G1	11.02	201B7	-3.12
201B7	-7.20	mc-iPS	-0.60	Ai-100	-5.65
Tic	-10.00	Ai-103	-6.41	253G1	-6.23
R-1A	-11.24	R-12A	-7.21	mc-iPS	-6.24
253G1	-20.41	Ai-100	-14.74	Tic	-6.26
mc-iPS	-42.59	Tic	-34.21	R-2A	-10.71

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	頁
<u>澤田留美</u>	再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の安全性評価の実際	岩田博夫, 松岡厚子, 岸田晶夫	再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み	シーエムシー出版	東京	2012	28-37
松岡厚子, <u>澤田留美</u> , 加藤玲子	次世代医療機器評価指標作成事業—再生医療分野—	岩田博夫, 松岡厚子, 岸田晶夫	再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み	シーエムシー出版	東京	2012	38-46
草川森士, <u>佐藤陽治</u>	再生医療・細胞治療の規制と開発支援に関する国際比較	岩田博夫, 松岡厚子, 岸田晶夫	再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み	シーエムシー出版	東京	2012	20-27
<u>安田智</u> , <u>佐藤陽治</u>	安全性評価の総論、造腫瘍性試験の現状と展望	江上美芽, 水谷学	幹細胞医療の実用化技術と産業展望	シーエムシー出版	東京	2013	247-255
<u>佐藤陽治</u> , 村岡ひとみ	再生医療分野の関連規制：FDAの動向	技術情報協会	稀少疾患／難病の診断・治療と製品開発	技術情報協会	東京	2012	330-335
<u>安田智</u> , <u>佐藤陽治</u>	再生医療に対する規制・制度等について：欧米の動向	堀友繁, 田中正躬	幹細胞技術の標準化—再生医療への期待	日本規格協会	東京	2012	206-214

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
Sawada R., Kono K., Isama K., Haishima Y., Matsuoka A.	Calcium-incorporated titanium surfaces influence the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.	<i>J. Biomed. Mater. Res. A</i>			in press
Wu Y, Qi X, Gong L, Xing G, Chen M, Miao L, Yao J, Suzuki T, Furihata C, Luan Y, Ren J	Identification of BC005512 as a DNA damage responsive murine endogenous retrovirus of GLN family involved in cell growth regulation.	<i>PLoS ONE.</i>	7	e35010	2012
Watanabe T, Suzuki T, Natsume M, Nakajima M, Narumi K, Hamada S, Sakuma T, Koeda A, Oshida K, Miyamoto Y, Maeda A, Hirayama M, Sanada H, Honda H, Ohyama W, Okada E, Fujiishi Y, Sutou S, Tadakuma A, Ishikawa Y, Kido M, Minamiguchi R, Hanahara I, Furihata C.	Discrimination of genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens by statistical analysis based on gene expression profiling in the mouse liver as determined by quantitative real-time PCR.	<i>Mutat Res.</i>	747	164-175	2012
Suenaga K, Takasawa H, Watanabe T, Wako Y, Suzuki T, Hamada S, Furihata C.	Differential gene expression profiling between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in young rat liver determined by quantitative real-time PCR and principal component analysis.	<i>Mutat Res.</i>	751	73-83	2013
安田智	再生医療における細胞・組織加工製品の品質・安全性の評価	<i>PHARMSTAGE</i>	12(7)	1-2	2012
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	<i>実験医学</i>	30(10)増刊	1702-7	2012

Nakaya M, Tajima M, Kosako H, Nakaya T, Hashimoto A, Watari K, Nishihara H, Ohba M, Komiya S, Tani N, Nishida M, Taniguchi H, <u>Sato Y</u> , Matsumoto M, Tsuda M, Kuroda M, Inoue K, Kurose H.	GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance.	<i>Nat Commun.</i>	4	Article number:1532	2013
Kuroda T, Yasuda S, <u>Sato Y</u> .	Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products.	<i>Biol Pharm Bull.</i>	36	189-92	2013
Nakaya M, Chikura S, Watari K, Mizuno N, Mochinaga K, Mangmool S, Koyanagi S, Ohdo S, <u>Sato Y</u> , Ide T, Nishida M, Kurose H.	Induction of cardiac fibrosis by $\beta$ -blocker in G protein-independent and GRK5/ $\beta$ -arrestin2-dependent signaling pathways.	<i>J Biol Chem.</i>	287	35669-77	2012
Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S, Kawamata S, <u>Sato Y</u> .	Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells.	<i>PLoS ONE.</i>	7	e37342	2012

## 指針草案作成

草案作成者	文書名	発出元	文書番号	発出日
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について	厚生労働省	薬食発0907第2号	平成24年9月7日
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について	厚生労働省	薬食発0907第3号	平成24年9月7日
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について	厚生労働省	薬食発0907第4号	平成24年9月7日
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について	厚生労働省	薬食発0907第5号	平成24年9月7日
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について	厚生労働省	薬食発0907第6号	平成24年9月7日
西田幸一, 飯田知弘, 梅澤明弘, 小沢洋子, 瓶井資弘, 平形明人, 万代道子, 大和雅之, 森永千佳子, 佐藤陽治	次世代医療機器評価指標策定事業 再生医療審査WG報告書「自己iPS細胞由来網膜色素上皮細胞に関する評価指標(案)」	厚生労働省	パブリックコメント 案件番号 495120405	平成25年3月19日 (案の公示日)

## 政策提言

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(佐藤陽治)
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(佐藤陽治)
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(佐藤陽治)

新材料・新素材シリーズ

# 再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み

Regulation of Regenerative Medicine Products and  
New Approaches of Tissue Regeneration

監修：岩田博夫，松岡厚子，岸田晶夫  
Supervisor : Hiroo Iwata, Atsuko Matsuoka, Akio Kishida

HIGH TECHNOLOGY

INFORMATION

シーエムシー出版

## 4 再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の安全性評価の実際

澤田留美\*

### 4.1 はじめに

様々な原因により機能を失った組織の修復や再生を目指す「再生医療」は、これまで治療法がないとされていた多くの難病をも救うことができる新たな治療法となり得ると大きな期待が寄せられている。その実現化、実用化に向けて我が国でも現在、産・官・学が手を結び、また官も省庁の枠を超えて国を挙げての様々な取り組みがなされている。

再生医療製品とは、本人または他人の細胞や組織に培養などの加工を施して製品とし治療に用いられるものであり、製品の形態としては、細胞のみを用いたものだけでなく細胞と足場材料とのコンビネーション製品も考えられるが、その中で幹細胞は再生医療製品において重要な役割を担うと考えられる。現在、研究などで用いられている幹細胞には、①体性幹細胞、②胚性幹 (ES) 細胞、③人工多能性幹 (iPS) 細胞が挙げられる。体性幹細胞とは、あらゆる組織や臓器に存在する多能性幹細胞であり、現在様々な分野での臨床研究なども進み、上記3種類の幹細胞の中で最も再生医療製品への応用が現実的な幹細胞であろう。ちなみに、2010年に東北大学の出澤教授らのグループが発見したヒト多能性幹細胞である Muse 細胞 (Multilineage-differentiating Stress Enduring Cell)<sup>1)</sup>は、体性幹細胞の一部と考えられている。一方、ES 細胞は初期胚から人工的に作製された幹細胞であるため、体を構成するあらゆる種類の細胞を作り出す能力があり万能細胞とも呼ばれる。しかしながら、受精卵を用いることから倫理的な問題があり、実用化に向けては大きな壁となっている。さらに、2007年に京都大学の山中教授らのグループがその開発技術を発見し世界中の注目を集めた iPS 細胞<sup>2)</sup>は、細胞をいくつかの方法により初期化することによって得られる、ES 細胞と同様にあらゆる細胞へ分化する能力を持つ万能細胞であり、現在では様々な体細胞から作製できることが報告されている。iPS 細胞は、ES 細胞のような倫理的問題がなく、さらに再生医療分野における有効性については体性幹細胞よりも大きな可能性を秘めているが、現時点では、iPS 細胞作製段階での安定性など検討課題もいくつか残されており、今後の研究の発展に期待したい。

再生医療の実用化に向けて、再生医療製品の安全性評価法の確立は最優先されるべき検討事項であろう。そこで本節では、特に、再生医療製品に使用される幹細胞、その中で臨床応用がすでになされ現時点では実用化に最も近いと思われる体性幹細胞について、その安全性の評価法の確立のために我々がこれまでに取り組んできた研究内容についていくつか紹介したい。

### 4.2 *in vitro* 培養期間中の間葉系幹細胞の変化について

間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪、筋肉などへの分化能を持つ細胞であり<sup>3-7)</sup>、さらに神経細胞<sup>5)</sup>や肝細胞<sup>3,8)</sup>、心筋<sup>9,10)</sup>、皮膚など胚葉を越えた分化も可能なため幅広い医療分野での臨床研

---

\* Rumi Sawada 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第三室 室長

## 第1章 再生医療製品の許認可について

究がすでに行われている。現在、骨髄、脂肪組織、臍帯血由来の間葉系幹細胞が、その採取技術および *in vitro* での培養技術も確立されており、それぞれの由来によって分化能を含む細胞の性質の違いなども示されてきている<sup>11)</sup>。幹細胞は多分化能と同時に自己複製能を持つ細胞である<sup>12)</sup>ため、正常細胞でありながら増殖能力を持つ。幹細胞を再生医療製品に利用するためには、細胞を生体内から取り出して *in vitro* で培養して増殖させるという工程を経る場合が多い。しかし、この *in vitro* 培養中の自己複製能（細胞増殖能）が正常に制御されていないとがん化のような望まない変化が起きる可能性も否定できない。実際、2005年に脂肪細胞由来のヒト間葉系幹細胞を長期間（4～5ヶ月）*in vitro* で培養すると自然に形質転換（がん化）する細胞が確認されたという報告<sup>13)</sup>がなされた際には注目されたが、2010年にその報告は取り下げられている<sup>14)</sup>。しかしながら一方で、別のグループによって骨髄由来間葉系幹細胞について同様の報告<sup>15)</sup>もされているため、幹細胞を用いた再生医療製品の実用化に向けて、幹細胞の *in vitro* 培養中の性質の変化について観察し、その特性を知ることは重要であろう。

我々はこれまでに、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（hMSC）を用いて *in vitro* 培養期間中の変化について、特に遺伝子発現の変化に着目して検討を行ってきた。hMSC を *in vitro* で継代培養を続けていくと、通常は徐々にその増殖能力が低下していく。図1に7ドナー分のhMSCの増殖曲線を示した。それぞれのドナーによる増殖能の違いは見られるものの、そのほとんどが培養期間50日程度で増殖能は低下し始め、100日を越えるとほとんど増殖しなくなってくる。また図2に示すように、細胞の形態は培養期間28日頃まではあまり変化がみられないが、50日辺りでは細胞が少し広がり扁平化しているのが観察された。さらに、増殖能が低下したhMSCには、Senescence associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) stainingによって老化している細胞が含まれていることも確認している<sup>16)</sup>。このように、hMSCは通常はがん細胞のように無限増殖能を有するわけではなく、*in vitro* で培養し続けるとその増殖能力は低下し老化を伴う変化が生じる。その際の遺伝子発現の変化を調べたところ、hMSCを *in vitro* での培養を続けることによって、TGF $\beta$ シグナル伝達系、p16などの細胞周期制御因子の遺伝子発現の変化（上昇）を伴って細胞

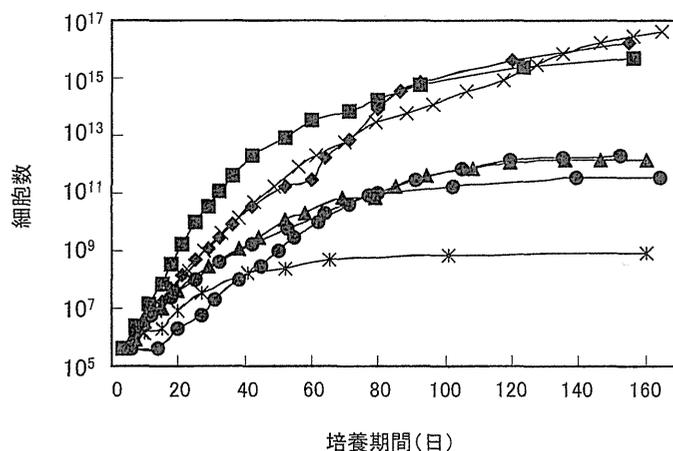


図1 hMSCの増殖曲線

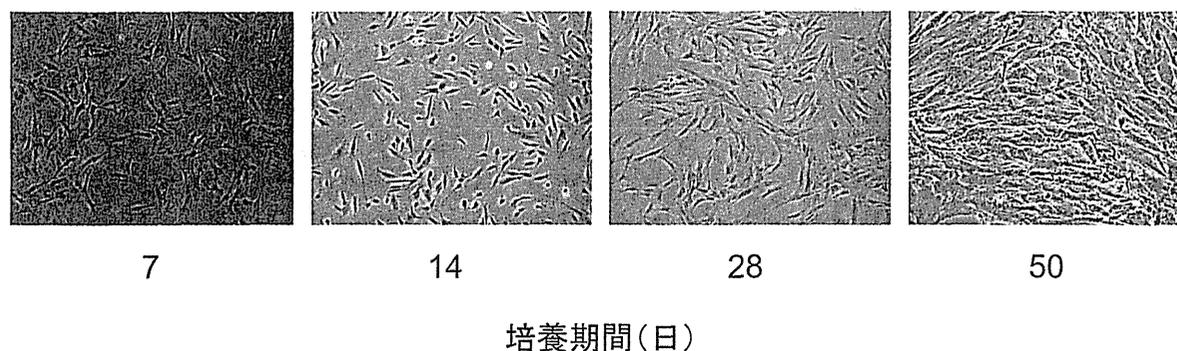


図2 *in vitro* 培養中における hMSC の形態の変化

周期が停止する方向へ変化することが判明した<sup>16)</sup>。hMSC の *in vitro* 培養中の p16 遺伝子発現の変化は顕著なものであった。さらに、FGF-2 が *in vitro* 培養時に hMSC の TGF $\beta$ 2 や p16 などの細胞周期制御因子の発現を抑えることにより TGF $\beta$  シグナル伝達系を介した細胞周期や細胞老化を制御している可能性を見出した<sup>16)</sup>。

#### 4.3 *in vitro* 培養期間中の間葉系幹細胞の品質評価について

再生医療製品は、患者本人または他人から細胞または組織を取り出し培養などの加工を施すが、患者に使用される際の細胞などの安全性を担保する方法の確立は最重要課題の1つである。前述のように、hMSC は *in vitro* 培養中に老化などの変化を示すが、培養前後での細胞の変化について正しく把握し、再生医療製品としての使用に妥当かどうかについて判断しなければならない。

##### 4.3.1 *in vitro* 培養中の遺伝子発現の変化

hMSC の *in vitro* 培養中の p16 遺伝子発現の変化は顕著なものであり、無限増殖能を持つがん細胞ではほとんど発現が認められないため、がん化の1つの指標となり得るのではと着目した。しかしながら、がん細胞の中にはヒト子宮頸がん由来株化細胞である HeLa S3 のように無限増殖能を持ちながらも p16 が高発現している細胞も存在するため、p16 単独での発現解析によって幹細胞の異常な変化（がん化）を判断することには限界があると考えられる。一方、Shibata ら<sup>17)</sup>により、p16 遺伝子が hMSC の老化に大きく関わり、そのプロモーター領域のメチル化によってその機能（発現増加による細胞老化）が制御されていることも明らかにされている。

我々はさらに、複数のドナー由来の hMSC を用いて *in vitro* 培養期間中の遺伝子発現の変化について網羅的な検討を行ってきた。培養期間としては、実際に再生医療製品の材料として hMSC を用いる場合を想定し、妥当な期間内（多少長めに設定し50日程度）で検討した。ちなみに、間葉系幹細胞を *in vitro* で培養すると自然に形質転換（がん化）する細胞が確認されたという報告<sup>15)</sup>においても、その形質転換は全て培養50日以上で確認されている。培養期間3日、20日、50日で発現レベルに変化が認められなかった遺伝子を抽出し、さらに全てのドナーでの共通性から絞り込んだところ、幹細胞の自己複製制御や発がん制御に関与する c-myc, Bmi-1,

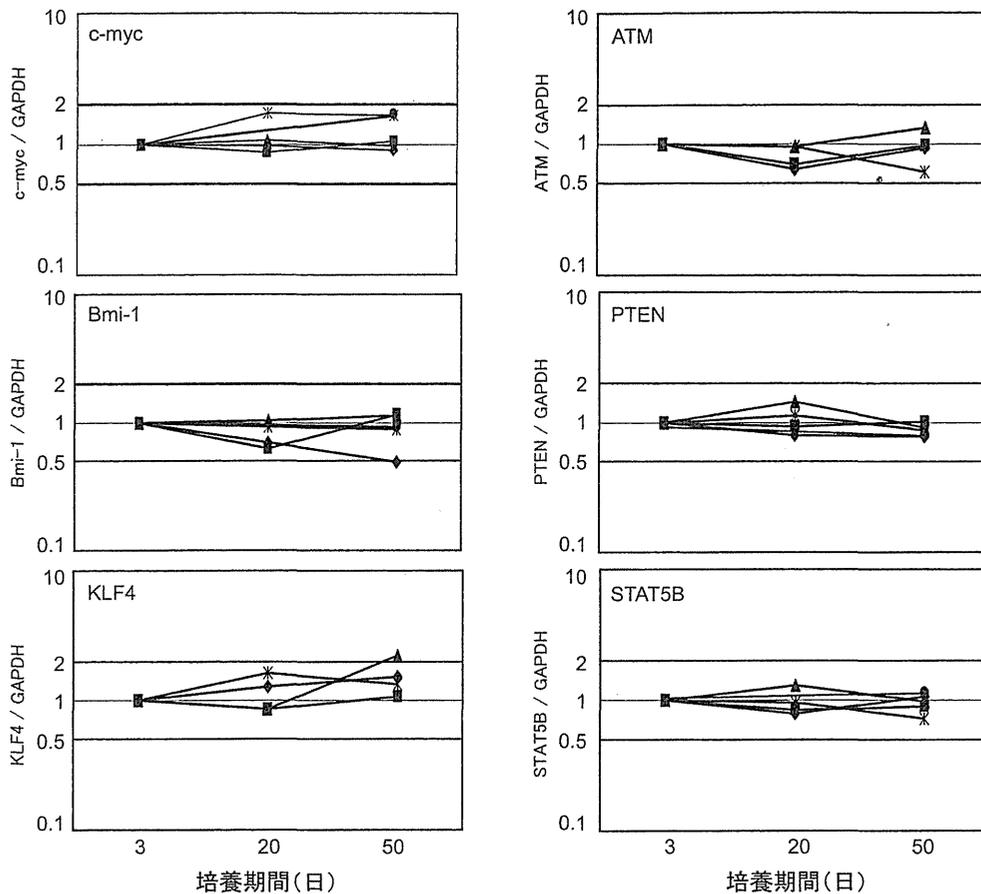


図3 hMSCの*in vitro*培養中におけるc-myc, Bmi-1, KLF4, ATM, PTEN, STAT5Bの遺伝子発現の変化  
3日間培養時を1として

KLF4, ATM, PTEN, STAT5B などが見出された。定量的リアルタイム PCRにて発現レベルを測定したところ、いずれも複数のドナーに共通して培養期間50日内の発現レベルにほとんど変化がないことが確認された(図3)。このことから、上記の遺伝子の mRNA 発現レベルは50日間の培養の前後において通常は有意な変化が見られないと考えられ、もしも培養前後において発現レベルに大きな差が見られた場合には細胞の培養中に何か変化が起こった可能性が示唆される。以上の結果から、*in vitro* 培養前後における上記遺伝子の発現を確認することは、培養中の細胞の変化を探る1つの判断基準となり得るかもしれない。幹細胞の培養過程における安全性について、遺伝子発現の確認など簡便に評価できる系の確立をめざして、現在もさらなる検討を続けている。

#### 4.3.2 FISHによる染色体異常解析

hMSCの*in vitro*での培養中における染色体異常解析について検討するために、c-mycをターゲットとして遺伝子発現解析と同時にFISHによるコピー数異常解析を行った<sup>18)</sup>。図4に5ドナー由来のhMSC(hMSC-A~E)を用いてc-mycのmRNA発現レベルと染色体レベルでの変化について検討した結果を示した。hMSC-A~Dでは、培養50日以内におけるc-mycのmRNA

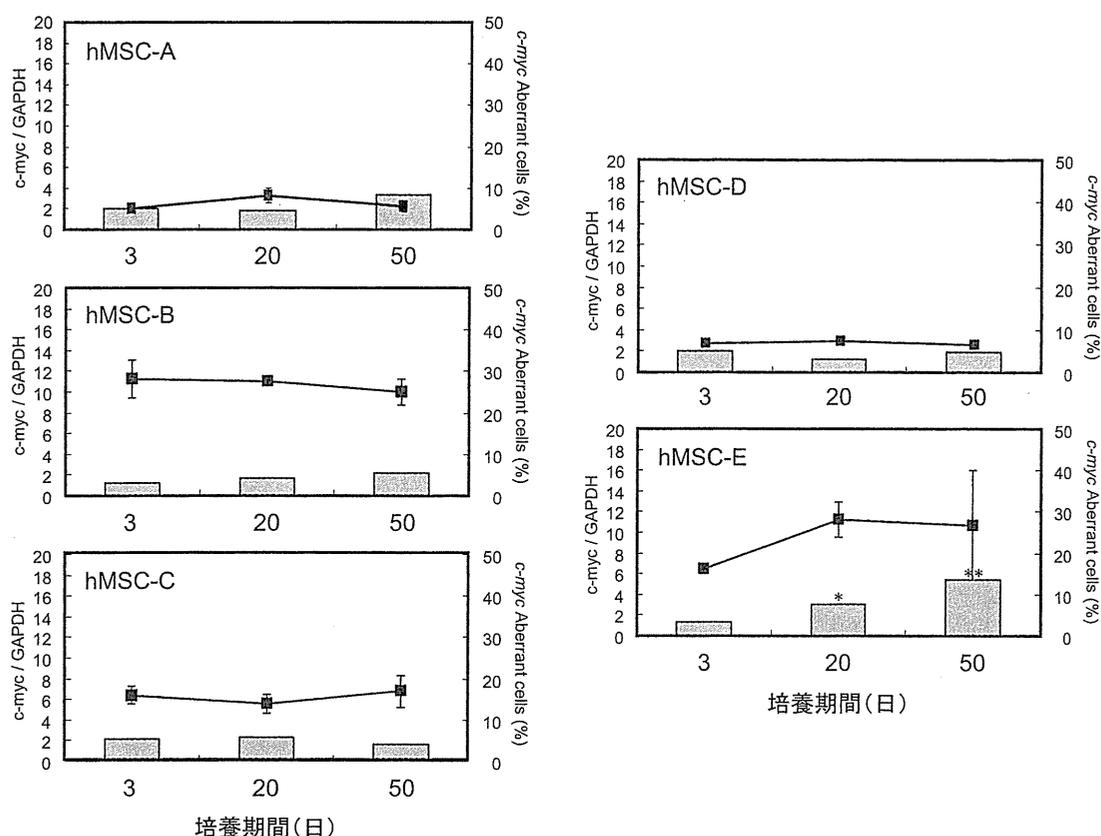


図4 hMSCの *in vitro* 培養中における c-myc の遺伝子発現レベルと染色体レベルでの変化<sup>18)</sup>

\*\*p < 0.01, \*p < 0.05: 3日間培養と比較して

発現レベルとコピー数には有意な変化は認められなかった。一方、hMSC-Eにおいては、c-myc コピー数異常細胞率が培養日数の経過に伴い有意に増加していたが、mRNA レベルについては増加傾向が見られるものの統計学的には有意な差は認められなかった。このことから、染色体レベルでの異常細胞率が15%程度（つまり正常細胞が85%程度と数としては異常細胞よりかなり多く含まれている状態）の細胞では、mRNA 発現レベルにおいて有意な変化を検出するのは難しい可能性が示される一方で、hMSC の培養中の変化についての観察の手法として FISH による染色体異常解析の有用性が示された。

#### 4.3.3 様々な培養条件が細胞に与える影響

*in vitro* での様々な細胞培養条件は、幹細胞の性質に影響を及ぼす。用いる培養液の種類もその1つであろう。再生医療製品に用いるための間葉系幹細胞の培養には一般的に牛血清または自家ヒト血清が培地に添加されるが、牛血清使用による病原性ウイルスやプリオンなどの混入の危険性やヒト血清使用のための患者への身体的負担などの回避のために無血清培地を用いる方法も検討されており、間葉系幹細胞の増殖培養に適した無血清培地も研究開発されている<sup>19,20)</sup>。そこで我々は、間葉系幹細胞の増殖培養用に開発された無血清培地 STK2を用いて hMSC に与える影響について検討したところ、牛胎児血清を用いた従来の培地2種と比較して STK2を用いた培養によって hMSC の増殖能が高まることを確認した<sup>21)</sup>。さらに、培養50日以内の hMSC の遺伝

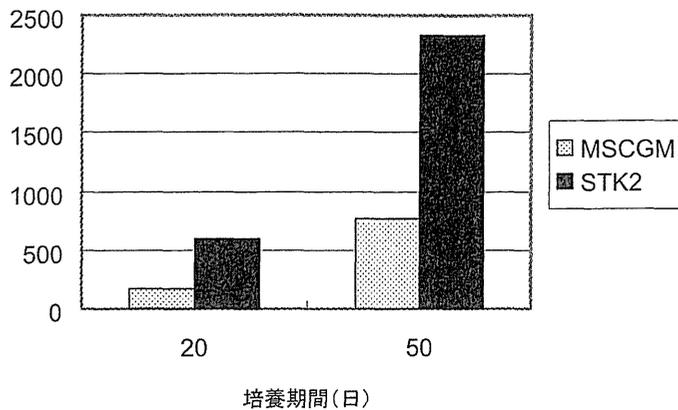


図5 hMSCの*in vitro*培養開始時における遺伝子発現レベルと比較して有意に変化した遺伝子数

MSCGM：牛胎児血清を10%含むhMSC増殖用培地

STK2：hMSC増殖用無血清培地

子発現の変化について網羅的に解析した。培養開始時と比較して20日後と50日後の遺伝子発現が有意に変化した遺伝子数は、培養20日および50日ともにSTK2の方が多く、培養50日では2,000以上の遺伝子の発現レベルが培養開始時と比較して有意に変化した(図5)。有意に発現が変化した遺伝子について解析したところ、IGF-1, FGF, TGF- $\beta$ , EGF, HGF, PDGF, MYC, JUN, SMAD3, TP53など、様々な成長因子や細胞増殖または細胞周期などに関わる遺伝子の発現が変化しており、多くのシグナル伝達系がSTK2培養によって変化していた<sup>22)</sup>。無血清培地STK2は、短期間で多くのhMSCを得られるという利点はあるが、より多くの細胞を得るために培養期間を延長した場合には細胞の性質が変化する可能性についても注意を払う必要がある。

細胞培養条件の1つとして、酸素濃度にも着目した。通常の培養条件では大気中の酸素濃度と同様に20%であるが、生体内における酸素濃度は2~5%であると言われている。そのため、通常の培養条件では酸化ストレスを受けている可能性も否定できず、その影響で培養期間が長くなるにつれて増殖能が低下し細胞が老化するのかもしれない。そこで、hMSCを通常の培養条件(20% O<sub>2</sub>)下と生体内環境に近い培養条件(5% O<sub>2</sub>)下でそれぞれ50日程度培養し、増殖や老化および細胞周期制御に関わる遺伝子の発現レベルなどを比較した。hMSCの増殖、DNA複製能、老化については、50日程度の培養期間中において培養中の酸素濃度による有意な違いは認められなかった。一方で、細胞周期制御に関わるp16, p21, TGF  $\beta$ 1, TGF  $\beta$ 2の遺伝子発現レベルは、20% O<sub>2</sub>条件下においては、培養初期と比べて50日培養後にはいずれも上昇したが、5% O<sub>2</sub>条件下においてはp21, TGF  $\beta$ 1, TGF  $\beta$ 2の発現上昇が有意に抑えられ、p16も同様の傾向が見られた(図6)。また、Jinら<sup>23)</sup>がhMSCを1% O<sub>2</sub>条件下で長期培養し20% O<sub>2</sub>条件下と比較した結果、20% O<sub>2</sub>条件下では100日以上培養で細胞老化が認められたが、1% O<sub>2</sub>条件下ではp16の遺伝子発現の上昇が抑えられ細胞老化を防ぐことを見出している。また、ヒトやマウスのiPS細胞の樹立の際に5% O<sub>2</sub>条件下で行うことでその効率が改善されることも報告されている<sup>24)</sup>。このことから、培養中の酸素濃度は様々な幹細胞の品質に影響を及ぼす重要な要素の1つ

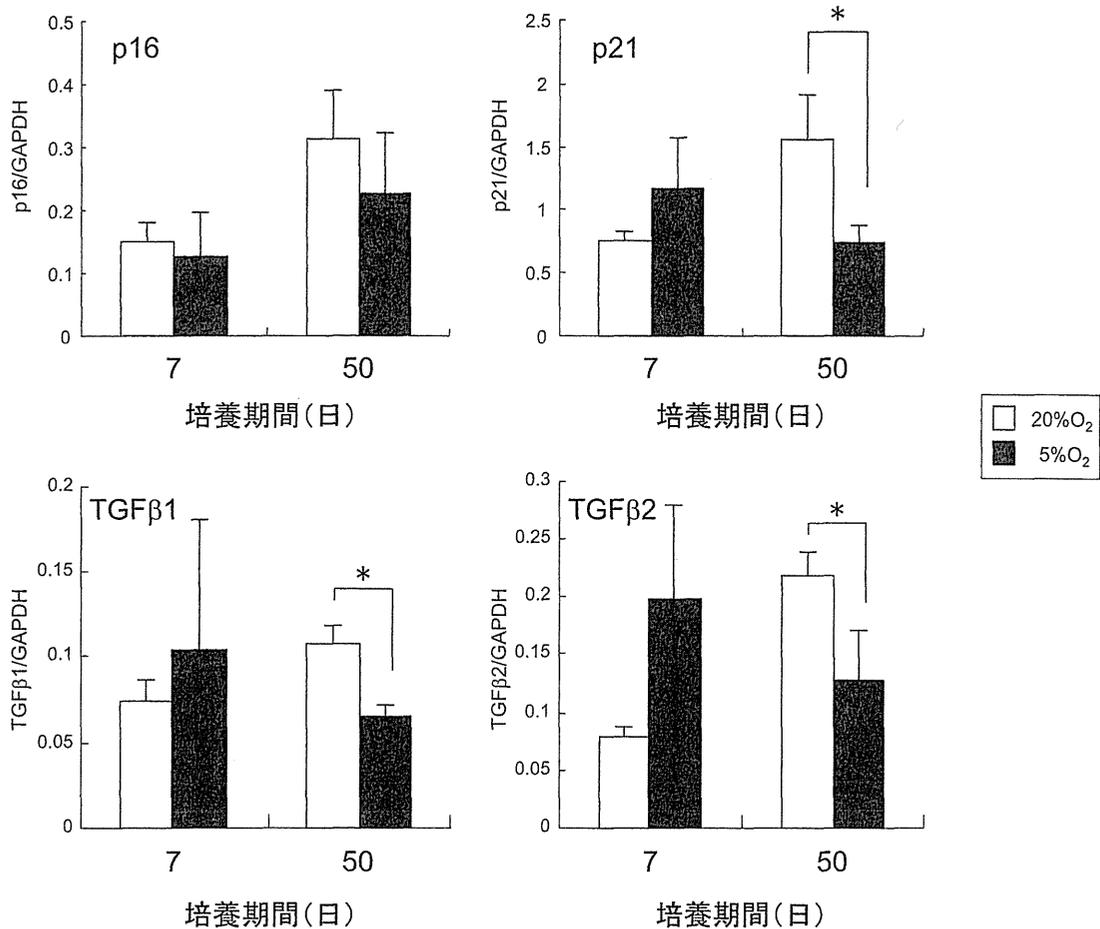


図6 hMSCのp16, p21, TGFβ1, TGFβ2のmRNA発現に及ぼす酸素濃度の影響

であると考えられる。

その他、幹細胞を再生医療製品として用いるために行う過程として凍結保存が挙げられる。特に細胞のバンク化などを目指す場合には、その凍結保存技術の安定性は細胞の品質評価に関わる重要な課題となってくる。現在は、凍結保存前後における細胞の生存率による評価が一般的であるが、今後は増殖能や分化能などを含めた細胞の品質について総合的に評価できる試験系の開発が必要となってくるであろう。

#### 4.4 免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験への取り組み

造腫瘍性試験のガイドラインとして、ICH-Q5D（生物薬品製造用細胞基材の由来、調製および特性解析についてのガイドライン）やWHO-TRS878が参考とされる場合が多いが、WHO-TRS878の2010年7月の改正案では、患者に移植する動物由来生細胞および細胞・組織利用製品の原料となる細胞は「対象外」とであるとされ、現段階では、再生医療製品を対象とした造腫瘍試験のガイドラインは実質存在しないと考えられる。それをふまえた上で、我々がこれまでに免疫不全動物を用いて行った皮下移植試験について以下に紹介する。

4.4.1 ヌードマウスを用いた hMSC 皮下移植試験

雄性のヌードマウスを用いて背部皮下に hMSC を  $3 \times 10^6$  細胞移植し、移植部位の腫瘍形成について16週間観察した。ポジティブコントロールとしてヒト子宮頸がん由来の HeLa S3 を用いて比較検討した。それぞれの細胞を移植して1週間後に、HeLa S3群では全てのマウスに腫瘍形成が認められたが、hMSC 群では腫瘍形成は認められなかった。さらに16週間後まで hMSC 移植群での腫瘍形成は認められなかった。

4.4.2 3種類の免疫不全マウスを用いた皮下移植による腫瘍形成の比較<sup>25)</sup>

3種類の免疫不全マウス：ヌードマウス (T 細胞欠損), NOD/Shi-*scid* (SCID) マウス (T および B 細胞欠損), NOD/Shi-*scid* ILsRg<sup>null</sup> (NOG) マウス (T, B および NK 細胞欠損) それぞれ雄性5匹, 雌性5匹, 計10匹を用いて、背部皮下に HeLa S3 をそれぞれ  $1 \times 10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  移植し、 $1 \times 10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  移植群は22日間,  $1 \times 10^2$  移植群は43日間観察した。その結果を表1に示す。細胞移植後22日後において、ヌードマウスは、 $1 \times 10^5$  移植群でのみ腫瘍形成が認められたが、その形成率は10匹中8匹で80%であった。また、SCID マウスは、 $1 \times 10^4$  移植群での腫瘍形成が認められたが20%であり、 $1 \times 10^5$  移植群で90%であった。一方、NOG マウスでは $1 \times 10^4$  移植群では100%で、 $1 \times 10^3$  移植群でも60%であった。そして、移植後43日後までに、 $1 \times 10^2$  移植群でも60%のマウスで腫瘍形成が認められた。さらに、 $10^1$  移植群でも78日後までに5/10 (50%) の腫瘍形成が確認されている<sup>25)</sup>。このように、NOG マウスはがん細胞の皮下移植による腫瘍形成について他の免疫不全マウスよりも感受性が高いことがわかり、より少ない細胞数、観察期間

表1 ヌードマウス, SCID, NOG マウスに HeLa S3 を移植した際の腫瘍形成について<sup>25)</sup>

\*p < 0.05 : SCID マウスと比較して, \*\*p < 0.01 : ヌードマウスと比較して, #p < 0.05 : ヌードマウスおよび SCID マウスと比較して, ##p < 0.01 : ヌードマウスおよび SCID マウスと比較して

細胞数	性	腫瘍形成が認められたマウス数 (%)		
		ヌードマウス	SCID	NOG
$1 \times 10^2$	雄	—	0/ 5 ( 0%)	3/ 5 ( 60%)
	雌	—	0/ 5 ( 0%)	3/ 5 ( 60%)
	全	—	0/10 ( 0%)	6/10 ( 60%)*
$1 \times 10^3$	雄	0/ 5 ( 0%)	0/ 5 ( 0%)	3/ 5 ( 60%)
	雌	0/ 5 ( 0%)	0/ 5 ( 0%)	3/ 5 ( 60%)
	全	0/10 ( 0%)	0/10 ( 0%)	6/10 ( 60%)#
$1 \times 10^4$	雄	0/ 5 ( 0%)	2/ 5 ( 40%)	5/ 5 (100%)**
	雌	0/ 5 ( 0%)	0/ 5 ( 0%)	5/ 5 (100%)##
	全	0/10 ( 0%)	2/10 ( 20%)	10/10 (100%)##
$1 \times 10^5$	雄	5/ 5 (100%)	5/ 5 (100%)	—
	雌	3/ 5 ( 60%)	4/ 5 ( 80%)	—
	全	8/10 ( 80%)	9/10 ( 90%)	—

で試験を行うことができる可能性が示された。

#### 4.5 おわりに

2007年の iPS 細胞をはじめ2010年の Muse 細胞など、世界初で「日本発」の新しい技術が次々と開発され、その再生医療への応用が大いに期待されている。しかしながら、その新しさ故にその評価法が未だ定まっていない部分もあることも否定できない。特に、生きた細胞を治療に用いる際にはその安全性の担保が必須となってくる。本節では、再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の安全性評価法の確立に向けての我々の取り組みについていくつか紹介した。

ヒト由来の細胞・組織を加工した医薬品または医療機器の品質および安全性を確保するための基本的な技術要件は、平成20年2月8日付け薬食機発第0208003号厚生労働省医薬食品局長通知および平成20年9月12日付け薬食機発第0912006号厚生労働省医薬食品局長通知に定められており、両通知を含めた現在の我が国における規制については前節までを参照されたい。また、ヒト間葉系幹細胞を加工した医薬品または医療機器について対象疾患別に作成された評価指標の内容については、次節にてその詳細が紹介されているので参考にして頂きたい。

## 文 献

- 1) Y. Kurokawa, M. Kitada, S. Wakao, K. Nishikawa, Y. Tanimura, H. Makinoshima, M. Goda, H. Akashi, A. Inutsuka, A. Niwa, T. Shigemoto, Y. Nabeshima, T. Nakahata, Y. Nabeshima, Y. Fujiyoshi and M. Dezawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 8639 (2010)
- 2) K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, *Cell*, **131**, 1 (2007)
- 3) Y. Jiang, B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada and C. M. Verfaillie, *Nature*, **418**, 41 (2002)
- 4) N. Rosenthal, *N. Engl. J. Med.*, **349**, 267 (2003)
- 5) M. Korbling and Z. Estrov, *N. Engl. J. Med.*, **349**, 570 (2003)
- 6) K. Hishikawa, S. Miura, T. Marumo, H. Yoshioka, Y. Mori, T. Takato and T. Fujita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 1103 (2004)
- 7) E. M. Horwitz, P. L. Gordon, W. K. Koo, J. C. Marx, M. D. Neel, R. Y. McNall, L. Muul and T. Hofmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8932 (2002)
- 8) B. E. Petersen, W. C. Bowen, K. D. Patrene, W. N. Mars, A. K. Sullivan, N. Murase, S. S. Boggs and J. S. Greenberger, *Science*, **284**, 1168 (1999)
- 9) A. A. Mangi, N. Noiseux, D. Kong, H. He, M. Rezvani, J. S. Ingwall and V. J. Dzau, *Nat. Med.*, **9**, 1195 (2003)