

Shin-ichi Sato, Shin Ando, Young-Tae Chang,  
Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Kazumitsu  
Ueda, Shinya Yamanaka, Motonari Uesugi  
8th AFMC International Medicinal Chemistry  
Symposium (11/29-12/2 Tokyo)

SnoN represses mesendodermal genes in human  
ES cells

Norihiro Tsuneyoshi, Tomoyuki Sumi, Akila  
Sadasivam, Jennica Tan Ee Kim, Norio Nakatsuji,  
Hirofumi Suemori, Norris Ray Dunn  
Stem Cell Society Singapore (SCSS) Symposium  
2011 (11/17 - 18, Singapore)

ヒトES細胞の未分化性維持因子の探索を目的  
としたhigh content analysis(HCA)

熊谷英明、末盛博文、上杉志成、中辻憲夫、川  
瀬栄八郎

第34回日本分子生物学会年会 (12/13-16、横  
浜)

ヒトES細胞からdefinitive endodermへの高率な  
誘導方法の構築

武内大輝、中辻憲夫、末盛博文

第34回日本分子生物学会年会 (12/13-16、横  
浜)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 取得特許

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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	ページ
中島啓行, 安田智, 佐藤陽治	ヒト ES/iPS 細胞に由来する再生医療製品の造腫瘍性をどう見るか?	中辻憲夫, 末盛博文	ES・iPS 細胞実験スタンダード	羊土社	東京	2014	61-68
平井雅子, 末盛博文	ES・iPS 細胞の特性解析と品質管理	中辻憲夫, 末盛博文	ES・iPS 細胞実験スタンダード	羊土社	東京	2012	115-131

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K, Kume S.	A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells.	J Cell Sci	126(Pt 23)	5391-5399	2013
Terai M, Izumiya-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Poon SS, Arai T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Nakamura K, Takubo K.	Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence in situ hybridization.	Tissue Cell	45(6)	407-413	2013
Kami D, Watakabe K, Yamazaki-Inoue M, Minami K, Kitani T, Itakura Y, Toyoda M, Sakurai T, Umezawa A, Gojo S.	Large-scale cell production of stem cells for clinical application using the automated cell processing machine.	BMC Biotechnol.	13	102	2013
Yugawa T, Nishino K, Ohno S, Nakahara T, Fujita M, Goshima N, Umezawa A, Kiyono T.	Noncanonical NOTCH signaling limits self-renewal of human epithelial and induced pluripotent stem cells through ROCK activation.	Mol Cell Biol	33(22)	4434-4447	2013
Nakamura H, Liao H, Minami K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Imadome K, Inoue N, Fujiwara S.	Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress.	Herpesviridae	4(1)	2	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishimine H, Yamakawa N, Sasao M, Tadokoro M, Kami D, Komazaki S, Tokuhara M, Takada H, Ito Y, Kuno S, Yoshimura K, Umezawa A, Ohgushi H, Asashima M, Kurisaki A.	N-Cadherin is a prospective cell surface marker of human mesenchymal stem cells that have high ability for cardiomyocyte differentiation.	Biochem Biophys Res Commun	438(4)	753-759	2013
Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T.	Differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional enterocyte-like cells using a simple method.	Drug Metab Pharmacokin	29(1)	44-51	2014
Okumura N, Akutsu H, Sugawara T, Miura T, Takezawa Y, Hosoda A, Yoshida K, Ichida JK, Yamada M, Hamatani T, Kuji N, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A.	$\beta$ -catenin functions pleiotropically in differentiation and tumorigenesis in mouse embryo-derived stem cells.	PLoS One	8(5)	e63265	2013
Higuchi A, Ling QD, Chang Y, Hsu ST, Umezawa A.	Physical cues of biomaterials guide stem cell differentiation fate.	Chem Rev	113(5)	3297-3328	2013
Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, Arima T.	Stability of genomic imprinting in human induced pluripotent stem cells.	BMC Genet	14	32	2013
Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi M, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Asashima M, Hirabayashi J.	Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN.	Stem Cells Transl Med	2(4)	265-273	2013
Shiozaki Y, Kitajima T, Mazaki T, Yoshida A, Tanaka M, Umezawa A, Nakamura M, Yoshida Y, Ito Y, Ozaki T, Matsukawa A.	Enhanced in vivo osteogenesis by nanocarrier-fused bone morphogenetic protein-4.	Int J Nanomedicine	8	1349-1360	2013
Sekine W, Haraguchi Y, Shimizu T, Yamato M, Umezawa A, Okano T.	Chondrocyte differentiation of human endometrial gland-derived MSCs in layered cell sheets.	Scientific World Journal	2013	359109	2013
田埜慶子, 佐藤陽治.	再生医療製品の素材としての多能性幹細胞(ES/iPS細胞)の品質	RSMP	4(1)	71-77	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kanemura H, Go MJ, Nishishita N, Sakai N, Kamao H, Sato Y, Takahashi M, Kawamata S.	Pigment epithelium-derived factor secreted from retinal pigment epithelium facilitates apoptotic cell death of iPSC.	Sci Rep	3	2334	2013
五十嵐友香, 佐藤陽治.	再生医療製品の造腫瘍性・悪性腫瘍形成能の評価	医学のあゆみ	246(12)	1069-1070	2013
佐藤陽治, 堤秀樹, 澤田留美, 鈴木孝昌, 安田智.	細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究	国立医薬品食品衛生研究所報告	131	16-19	2013
斎藤嘉朗, 前川京子, 齊藤公亮, 佐藤陽治, 鈴木孝昌.	タンパク質・内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化にむけて	国立医薬品食品衛生研究所報告	131	20-24	2013
佐藤陽治.	ヒト人工多能性幹細胞由来移植細胞の製造管理のための in vitro 造腫瘍性評価系の開発	薬学雑誌	133(12)	1381-1388	2013
村岡ひとみ, 佐藤陽治	再生医療・細胞治療の臨床研究から実用化までの道のり	老年医学	52(3)	237-239	2014
Miyazaki T, Nakatsuji N, Suemori H.	Optimization of slow cooling cryopreservation for human pluripotent stem cells.	Genesis.	52(1)	49-55	2014
Kumagai H, Suemori H, Uesugi M, Nakatsuji N, Kawase E.	Identification of small molecules that promote human embryonic stem cell self-renewal.	Biophys Res Commun.	434(4)	710-716	2013
Miyazaki T, Futaki S, Suemori H, Taniguchi Y, Yamada M, Kawasaki M, Hayashi M, Kumagai H, Nakatsuji N, Sekiguchi K, Kawase E.	Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells.	Nat Commun.	4;3	1236	2012
Tsuneyoshi N, Tan EK, Sadasivam A, Poobalan Y, Sumi T, Nakatsuji N, Suemori H, Dunn NR.	The SMAD2/3 corepressor SNON maintains pluripotency through selective repression of mesendodermal genes in human ES cells.	Genes Dev.	26(22)	2471-6	2012

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷



## ヒト ES・iPS 細胞に由来する再生医療製品の造腫瘍性をどう見るか？

中島啓行, 安田 智, 佐藤陽治

ヒト多能性幹細胞を加工して製造される再生医療製品（ヒト多能性幹細胞加工製品）は、従来の方法では治療困難な疾病・損傷に対するブレイクスルーとして期待を集めている。その開発においては想定されるリスク評価や品質・安全性確保に対する方策が求められる。特に造腫瘍性の評価が重要な課題であるが、ヒト多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性試験のガイドラインは今のところ存在しない。ヒト多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性試験は製造工程上の目的別に3つに分けられ、その目的に応じて各種造腫瘍性関連試験法を選択する必要がある。本項では、製品の品質・安全性評価における造腫瘍性関連試験の考え方とその適用について概説する。

### はじめに

ヒト多能性幹細胞に分化誘導などの加工を施した**再生医療製品**は、従来の方法では治療が困難な疾病・損傷に対するブレイクスルーとして期待されており、国内外で研究開発が盛んに行われている。このような、一昔前には想定されていなかった全く新しい製品の開発においては、想定されるリスクの評価法や品質・安全性確保のための基盤技術の整備が必須である。ヒト由来の胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）といった多能性幹細胞は**造腫瘍性**をもっていることから、多能性幹細胞を用いて製造される製品においては造腫瘍性の評価と品質管理が重要な課題となっている。しかしながら、移植による治療目的で患者に投与するヒト由来の生細胞を対象にした造腫瘍性試験のガイドラインは、今のところ存在しない。本項では、ヒト多能性幹細胞を用いた再生医療の実現において不可避である造腫瘍性評価の現状と課題について概説する。

### ヒト多能性幹細胞の造腫瘍性

多能性幹細胞は無限の自己複製能とあらゆる種類の細胞へと分化できる分化多能性によって定義される。その能力は、免疫不全マウスに移植した場合にテラトーマ（奇形腫）と呼ばれる腫瘍を形成することによって確認されるが、これは同時に、ヒト多能性幹細胞を製造基材とする再生医療製品（ヒト多能性幹細胞加工製品）は、未分化なヒト多能性幹細胞

**再生医療製品**：再生医療・細胞治療に使用されることが目的とされている物のうち、ヒトまたは動物の細胞に培養その他の加工を施したもの、細胞・組織加工製品とも呼ばれる。  
**造腫瘍性**：動物に移植された細胞集団が増殖することにより、良性または悪性の腫瘍を形成する能力。

表1 多能性幹細胞に由来する再生医療製品の造腫瘍性に影響を及ぼす要因の例

多能性幹細胞に起因する要因	その他の要因
<ul style="list-style-type: none"> <li>・目的細胞への分化の難しさ</li> <li>・原材料となる体細胞の種類*</li> <li>・初期化の方法*</li> <li>・初期化因子の残存*</li> <li>・細胞増殖の条件（培地・添加物など）</li> <li>・ゲノムの安定性およびインテグリティ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・投与部位</li> <li>・投与細胞数</li> <li>・目的細胞の種類（特定の液性因子の分泌など）</li> <li>・製造工程における処理（分化誘導・純化など）</li> <li>・患者の免疫状態</li> <li>・共時投与物（マトリゲルなど）の有無</li> </ul>

\*iPS細胞の場合のみ

の残留・混入により腫瘍を形成する可能性があることを示している。ヒトES細胞を用いた研究では、線維芽細胞と懸濁したわずか数百個のES細胞の投与によって免疫不全マウス（SCIDマウス）に腫瘍が形成されることが報告されている<sup>1)</sup>。

現在、高効率の分化誘導法や残存する多能性幹細胞の除去法などが精力的に研究されているが、100%の純度で目的細胞を調製・製造することは非常に困難である。したがって、製品にどれくらい未分化な多能性幹細胞が残存しているのか、最終製品は投与部位で造腫瘍性をもつのか、といった点を適切な試験系を用いて評価することが、実用化に向けての必須事項である。

## 1. 造腫瘍性の2つのリスク

「造腫瘍性のリスク」は、安全性上の視点から大きく2つ、すなわち「腫瘍による物理的障害のリスク」と「悪性腫瘍形成のリスク」に分けられる。「腫瘍による物理的障害」とは、腫瘍形成により周辺組織が圧迫などを受けることによる障害で、関節再生・脊髄損傷再生などのケースで問題となる。この場合はたとえ良性であっても腫瘍自体がリスクファクターとなる。一方、「悪性腫瘍形成」は、腫瘍の悪性度がリスクファクターとなる。

実は、ヒトES/iPS細胞が免疫不全マウス内で増殖分化して形成される奇形腫は多くの場合、良性であり、正常2倍体のヒトES細胞を免疫不全マウスに移植して悪性腫瘍が発生したという報告はない。しかしながら、ヒト由来iPS細胞に関しては、免疫不全マウスに投与した場合に悪性腫瘍が形成されたという報告が存在する<sup>2)</sup>。再生医療製品の製造基材としてのヒト多能性幹細胞に内在する奇形腫悪性化にかかわる因子・機序の詳細は明らかではないが、iPS細胞樹立時の細胞初期化過程は、悪性形質転換の研究で従来用いられてきた発がんフォーカス形成試験（*in vitro*での遺伝子導入による悪性肉腫形成試験）との類似性が指摘され、共通の機序の存在が提唱されている<sup>3)</sup>。

## 2. 造腫瘍性に影響を及ぼす要因

ヒト多能性幹細胞由来の再生医療製品の中に残存する未分化細胞の造腫瘍性には、さまざまな要素、すなわち、目的細胞への分化の難しさのほか、ヒトiPS細胞の場合には、原材料となる体細胞の種類や初期化因子残存の有無<sup>2)</sup>など製造基材としての多能性幹細胞に付随する要因と、投与部位、投与細胞数、製造工程における処理、患者の免疫状態、マトリゲルなどの共時投与物の有無といった要因とが影響しうる（表1）。したがって、最終製品



の造腫瘍性に影響する製造基材（多能性幹細胞）の品質特性プロファイルは目的とする最終製品ごとに異なり、不適格な製造基材をどのような評価法で事前に排除するか、その方策も最終製品ごとに明らかにする必要がある。

## 造腫瘍性試験国際ガイドライン

前述の通り、多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性評価は、再生医療の実現における重要な課題であるが、現在、再生医療製品を対象とした造腫瘍性試験ガイドラインは存在しない。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」<sup>4)5)</sup>である（以下、WHO TRS 878とする）。

**WHO TRS 878にある造腫瘍性試験**の目的は、セル・バンクの造腫瘍性の程度を品質特性指標として把握し、その変化を細胞特性上の異常発生の検知のために利用することにある。ただし、ここで注意しなければならないのは、この試験の適用対象は生物薬品（ワクチンやタンパク質製剤など）を製造する際に用いられる動物由来細胞株であり、ヒトに投与される再生医療製品およびその製造基材は対象としていない点である。WHO TRS 878の試験は、あくまで細胞株のセル・バンクという均一な細胞集団の造腫瘍性評価を対象にしているため、ごくわずかに混入する未分化・造腫瘍性細胞に起因する再生医療製品の造腫瘍性の評価を目的とした場合、そのまま転用することには感度などの面で無理がある。混入するごく少数の未分化・造腫瘍性細胞に起因する再生医療製品の造腫瘍性を評価するにはWHO TRS 878よりも感度を上げるなど、目的に応じた適切な評価系の開発が必要となる。

## ヒト多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の製造における造腫瘍性試験は、目的別に次の3つが存在しうる（図）。

- ①製造基材となる細胞の品質管理のための造腫瘍性試験
- ②製造工程（中間製品）評価のための造腫瘍性試験
- ③最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験

①および②は品質試験、③は非臨床安全性試験という位置づけとなる。

細胞集団の造腫瘍性あるいは細胞集団中の造腫瘍性細胞の検出には、表2に示す*in vitro*/*in vivo* 試験法が知られており、これらを組み合わせることで、それぞれの目的に応じた評価が可能であると考えられる。次に、上記3種の造腫瘍性試験の特徴と方法について、WHO

WHO TRS 878にある造腫瘍試験の概要：「ヌードマウスなどの動物10匹に10<sup>7</sup>個の細胞を投与して16週間（1998年版では12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。

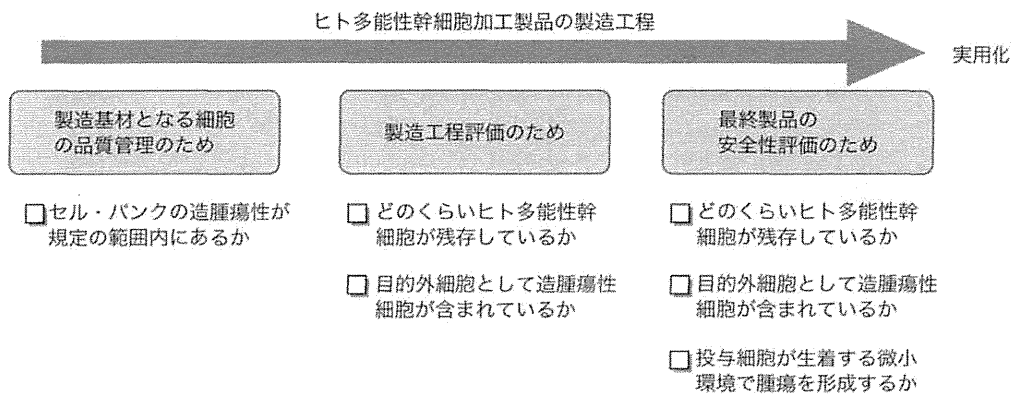


図 造腫瘍性試験が必要な3つの目的と各段階での懸念事項

TRS 878 との関連も含めて述べる。

## 1. 製造基材となる細胞の品質管理のための造腫瘍性試験

製造基材となる多能性幹細胞の品質管理のための造腫瘍性における懸念事項は、「セル・バンクの造腫瘍性が規定の範囲内にあるか」という点にある。多能性幹細胞加工製品の製造基材であるヒトES・iPS細胞バンクの造腫瘍性の程度に大幅な変化が生じた場合、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、細胞特性に何らかの異常が起こったということが示唆される。つまり、ヒトES・iPS細胞バンクの造腫瘍性を細胞特性指標の1つとして評価すれば、ヒトES・iPS細胞バンクの異常を検出し、品質管理に活用することができる。その評価方法については、セル・バンクという均一な細胞集団を対象とするため、WHO TRS 878の方法を準用することが可能であると考えられる。

## 2. 製造工程（中間製品）評価のための造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の中間製品となる細胞集団には、「目的細胞」、「目的細胞の前駆細胞」、「残存多能性幹細胞」および「その他の目的外細胞」の4種類が含まれている可能性がある。したがって、

- ①どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか
- ②目的外細胞として造腫瘍性細胞が含まれているか

という2点が、製造工程（中間製品）評価における造腫瘍性の懸念事項となる。

### 1) どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか

①については、未分化多能性幹細胞特異的なマーカーを指標としたフローサイトメトリや定量RT-PCRによる評価が可能である。この評価法の利点は感度が高い点にあり、かわれは初代培養ヒト体細胞中にヒトiPS細胞を添加して評価した結果、フローサイトメトリでは0.1%、定量RT-PCRの場合には0.002%の存在比のヒトiPS細胞を検出すること

表2 主な造腫瘍性関連試験の能力と限界

*in vivo* 試験法

試験法	測定事項	目的	利点	欠点
ヌードマウスへの移植			定量化の方策が整備 (WHO TRS 878)	時間 (数週間～数カ月)・費用がかかる 肺がん、乳がん、グリア細胞腫、リンパ腫、白血病細胞に由来する細胞株は腫瘍を形成しない わずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
NOD-SCID マウスへの移植	腫瘍形成	造腫瘍性細胞の検出	ヌードマウスよりも高感度	時間 (数週間～数カ月)・費用がかかる 定量化の方策が未整備 胸腺腫を自然発症
NOG/NSG マウスへの移植			INOD-SCID よりも高感度 / 胸腺腫なし	時間 (数週間～数カ月)・費用がかかる 定量化の方策が未整備

*in vitro* 試験法

試験法	測定事項	目的	利点	欠点
細胞増殖特性解析 (所定培養期間を超えた培養)	細胞増殖速度	不死化細胞の検出	簡便・安価 ときにはヌードマウスよりも高感度 (不死化していても腫瘍形成のないケース)	わずかな不死化細胞の混入の検出には時間がかかる
フローサイトメトリー	細胞マーカータンパク質発現	造腫瘍性細胞・未分化細胞の検出	短時間 (~1日)・簡便 ときには軟寒天コロニー試験よりも高感度 細胞を識別・分離・回収できる	特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない (=マーカー (-) の造腫瘍性細胞を見逃すおそれ) ゲートの掛け方で結果がばらつく
qRT-PCR	細胞マーカー遺伝子発現		短時間 (~1日)・簡便 ときにはフローサイトメトリーよりも高感度	特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない (=マーカー (-) の造腫瘍性細胞を見逃すおそれ)
軟寒天コロニー形成試験	コロニー形成	足場非依存的増殖の検出	<i>in vivo</i> 試験より短時間 (数週間～1カ月程度) 安価 ときにはヌードマウスよりも高感度	浮遊系細胞に使用できない わずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない ヒトES/iPS細胞は検出不能 (分散誘導性細胞死)
核型分析	染色体の数・サイズ・形			
染色体CGHおよびアレイCGH	ゲノムDNAのコピー数異常	染色体異常の検出	技術的に確立	相関性の問題 (染色体異常⇔造腫瘍性) わずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション (FISH) 分析	特定遺伝子の位置・コピー数			

ができることを明らかにしている<sup>6)</sup>。

2) 目的外細胞として造腫瘍性細胞が含まれているか

一方、②を検出するための試験系としては、細胞増殖特性解析 (増殖曲線による不死化細胞の検出) や、軟寒天コロニー形成試験による足場非依存性増殖細胞の検出が挙げられる。われわれは軟寒天コロニー形成試験において、ヒトテラトカルシノーマ細胞を1%の検出限界で検出可能であることを報告している。しかしながら、ヒト多能性幹細胞はシングルセルにまで分散させるとアポトーシスを起こすという特異な性質をもつため、残存するヒト多能性幹細胞の検出 (①) に、軟寒天コロニー形成試験は不向きである<sup>4)</sup>。

また、②の評価に *in vivo* の方法を活用することも可能である。しかしながら、均一な細

胞集団を対象としたWHO TRS 878にある造腫瘍性試験では、正常細胞中にわずかに混入する未分化・造腫瘍性細胞を検出するには感度が低く、結果が偽陰性になってしまう恐れが高いため、より感度の高い系を用いる必要がある。そこで有力な選択肢として挙げられるのが、Rag2- $\gamma$ C double-knockout (DKO)<sup>7)</sup>、NOD/SCID/ $\gamma$ C<sup>mln</sup> (NOG)<sup>8)</sup>、NOD/SCID/IL2rgKO (NSG)<sup>9)</sup>などの重度免疫不全マウス系統を利用する検出系である。これらのマウスは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いわれている<sup>10)11)</sup>。われわれがNOGマウスにマトリゲルと懸濁したHeLa細胞を皮下投与し、腫瘍形成に必要な細胞数を検討した結果、WHO TRS 878にある造腫瘍性試験に比べ、2,000倍以上の感度の上昇が認められた(投稿準備中)。重度免疫不全マウス系統を利用した試験系開発における課題としては、a) 試験系の検出限界・感度・精度、b) 陽性・陰性コントロールのあり方、c) 投与細胞数、d) 観察期間、e) 投与経路、f) 投与方法、g) ヌードマウスとの比較、などを検討していく必要がある。

### 3. 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の最終製品には、中間製品と同じく、「目的細胞」、「目的細胞の前駆細胞」、「残存多能性幹細胞」、および「その他の目的外細胞」の4種類が含まれている可能性がある。ただし中間製品の場合とは異なり、最終製品の造腫瘍性試験においては、生着部位での腫瘍形成能を考察できることが要求される。そのため、

- ①どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか
- ②目的外細胞として造腫瘍性細胞が含まれているか
- ③投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか

ということが最終製品における造腫瘍性の懸念事項となる。①、②については、中間製品評価の場合と同様、多能性幹細胞のマーカータンパク質/マーカー遺伝子の検出(①)、不死化細胞の検出や足場非依存性増殖細胞の検出(②)などでそれぞれ評価が可能であると考えられる。

一方、③については、*in vivo*造腫瘍性試験による評価が必要となる。その場合に考慮すべき点として、a) 試験系の検出限界、b) 陽性・陰性コントロールのあり方、c) 投与細胞数、d) 観察期間、e) 投与部位、f) 例数などが挙げられる。特に、投与部位に関しては、生着部位の違いによって腫瘍形成能や、腫瘍のタイプが異なる恐れがあるため、可能な限りヒトでの投与部位に相当する部位にするべきである(表2, 図)。

### 4. 新技術による造腫瘍性評価の可能性

ヒト多能性幹細胞は、細胞株と培養条件によっては遺伝子・染色体に異常が生じることが報告されている<sup>12)13)</sup>。そのため、ヒト多能性幹細胞加工製品および製造基材であるヒトES・iPS細胞の造腫瘍性評価に次世代シーケンサーを使えないかという議論がある。

## 1) 次世代シーケンサーによる造腫瘍性評価

全ゲノムシーケンスや全エクソンシーケンスのデータを用いて遺伝子変異を網羅的に検出し、造腫瘍性細胞の混入を検知する、というのがその狙いである。しかしながら、こうしたアプローチは現実的にはあまり用をなさない。主な理由は、ヒト多能性幹細胞加工製品の安全性との因果関係が明瞭な遺伝子変異の具体例は乏しく、個々の最終製品の安全性の指標としてどのような変異の検出が有用なのか明らかではないからである。感度面でも、次世代シーケンサーでは細胞集団中の1%未満のみが保持しているようなマイナーな変異を検出するのは難しく、充分とはいえない。

また、ヒトES・iPS細胞由来製品の造腫瘍性を評価するうえで、「製造基材となる幹細胞の造腫瘍性と最終製品の造腫瘍性との相関・因果関係は未解明である」という点に最大の注意が必要である。すなわち、臨床適用に際しては、原材料や製造基材ではなくあくまで最終製品としてのヒトES・iPS細胞由来製品の造腫瘍性評価が最も重要であることに常に留意しなければならない。したがって、製造基材としての多能性幹細胞のシーケンスデータ中のどの遺伝子を確認対象にするかによっては、最終製品による腫瘍形成への寄与がきわめて低い遺伝子変異しか含まないような多能性幹細胞までも不適切として排除してしまうことになり、合理性が失われる恐れもある。

## 2) 先端技術による評価における注意点

この例のように、新しい技術が開発されても、「先端的技術だから」という理由のみでは、それをただちに製品の品質・安全性評価に適用することはできない。その技術による試験の結果を受けた後に、製品開発、製造および臨床の場において具体的にどういう判断が可能なのか明らかでなければ、「手元にある当該製品の安全対策」としては意味をなさないということに注意が必要である。つまり現状では、遺伝子変異を指標にして造腫瘍性細胞の混入を検知しようとするならば、発がんリスクと非常に高い相関があることが既知である特定の遺伝子変異に限定し、より高感度かつ高精度で検出する方法を開発する方がむしろ有用である。

なお、再生医療製品の開発における次世代シーケンサーの可能性としては他に例えば、製造基材であるES・iPS細胞の同一性評価を目的とした利用（STRなどの代替としての利用）や、製造基材ES・iPS細胞および製品中の細胞のゲノム不安定性の評価を目的とした利用（CGHなどの代替としての利用）が考えられる。それぞれにおける有用性を議論するためには、レギュラトリー・サイエンス研究、すなわち、各目的に応じた試験系の性能と限界についての科学的な理解が必須である。

## おわりに

ヒト多能性幹細胞加工製品を含む再生医療製品を対象にした造腫瘍性試験ガイドラインはいまだに存在しない。現時点では、再生医療製品の中でも特に造腫瘍性に関して懸念の強い製品について、本項で挙げたタイプの異なる試験を複数実施し、総合的に判断すべき

であると考えられる。なお、個別の製品で示すべき具体的評価事項は、原材料・製造基材や製品の特徴・対象疾患・リスクマネジメントプランなどを勘案して製品ごとに判断されるものである。適切な試験を組み合わせた結果・評価についても、ヒトでの結果を完全に保証するものではなく、各試験法の能力と限界を理解したうえで、リスク評価・リスクマネジメント立案およびインフォームド・コンセントの受領を行うことが重要である。

◆ 文献

- 1) Hentze, H. et al. : Stem Cell Res., 2: 198-210, 2009
- 2) Griscelli, F. et al. : Am. J. Pathol., 180: 2084-2096, 2012
- 3) Riggs, W. et al. : Stem Cells Dev., 22: 37-50, 2013
- 4) WHO Expert Committee on Biological Standardization, 47th Report, 1998 (Technical Report Series No. 878)
- 5) World Health Organization : Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. Proposed replacement of TRS 878, Annex 1, 2010  
([http://www.who.int/biologicals/Cell\\_Substrates\\_clean\\_version\\_18\\_April.pdf](http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf))
- 6) Kuroda, T. et al. : PLoS One, 7: e37342, 2012
- 7) Garcia, S. et al. : Immunity, 11: 163-171, 1999
- 8) Ito, M. et al. : Blood, 100: 3175-3182, 2002
- 9) Ishikawa, F. et al. : Blood, 106: 1565-1573, 2005
- 10) Machida, K. et al. : J. Toxicol. Sci., 34: 123-127, 2009
- 11) Quintana, E. et al. : Nature, 456: 593-598, 2008
- 12) Ben-David, U. & Benvenisty, N. : Nat. Rev. Cancer, 11: 268-277, 2011
- 13) The International Stem cell Initiative : Nat. Biotechnol., 29: 1132-1144, 2011

# 5 ES・iPS細胞の 特性解析と品質管理

平井雅子, 末盛博文

## 未分化状態の判定

アルカリホス ファターゼ染色	フローサイトメトリー による測定	免疫染色	PCR による測定	胚様体の 形成確認	テラトーマ アッセイ
-------------------	---------------------	------	--------------	--------------	---------------

## 染色体異常のチェック

核型解析
------

## 感染性因子の制御

マイコプラズマ 否定試験	酵素法	リアルタイム PCR による検出法
-----------------	-----	----------------------

## はじめに

無制限に増殖する未分化細胞から必要な細胞をつくり出し移植医療に用いる。このような多能性幹細胞の再生医療での活用という技術的側面から考えた場合、ES細胞とiPS細胞は同じように扱うことができると考えてよい。両者はそれぞれ由来が異なるものの、いったん作製された後は、その増殖から分化誘導に至るまで同じ技術を適用できる。ES/iPS細胞を再生医療に用いるうえで重要なことは、未分化細胞として一定の性質を保持しつつ、安全性を保証することである。移植組織を医薬品と考えた場合、その安全性・有効性は最終製品である移植組織において最も厳格に検査されることになるが、ここでは原材料となる未分化細胞を安定的に供給するための細胞バンクを構築するという観点からその特性や品質管理の考え方や手法について示す。

ES・iPS細胞の細胞バンクにおける解析は主に2つの観点から行われる。第一には、多能性幹細胞として有すべき性質を適切に保持しているかどうか、第二に細胞を医薬品として使用するうえで求められる安全性基準を満たしているか、である。ここでは前者を**特性**、後者を**品質**と呼ぶことにする。これらは厳密に分けられているというわけではないがヒトES細胞とiPS細胞の特性の解析方法と品質管理について本研究室が行っている基本的な技術を紹介する。

## A. 未分化性維持と多分化能の調べ方

再生医療への利用において、ES細胞とiPS細胞がもつ優位性はその高い増殖能とどのような細胞にも分化できる多能性にあり、両者を併せもつような細胞株は他に知られていないといつてよい。これらは多能性幹細胞株が有すべき性質であり特性とされる。一般に、ES・iPS細胞は未分化にあるときに高い増殖能を示し、細胞分化が進行するにつれて増殖させることが困難になる場合が多い。これらの性質は細胞の継代や凍結/解凍などのプロセスを経ても一定に保たれるべきものである。細胞の増殖能は細胞株/クローンごとに多少異なるが、倍加時間は24時間前後から30時間程度の間であることが多いようである。倍加時間の増加や減少は細胞に何らかの変異が生じたことを示唆するが、どの程度の変化をもって異常と見なすかの基準の設定は困難である。他の解析とあわせて判断することになるだろう。増殖速度が増した場合には、しばしば核型やCNV (copy number variation) などのゲノム異常がしばしば観察される。

### 1. 未分化状態の判定

未分化状態の判定には一般にマーカーの発現解析が用いられる。マーカーとしては細胞表面マーカーと未分化状態特異的遺伝子のmRNAの検出が利用される。いずれも多様な分子が用いられるが、単一のマーカー発現で未分化状態を確定することは困難であり、複数のマーカー発現の解析を行う。

細胞表面マーカーの解析ではアルカリ性ホスファターゼの酵素活性を利用した染色が簡便な方法として利用される。しかし、培養している細胞集団の詳細な特性解析にはフローサイトメトリーによる解析が有効であり、SSEA3, SSEA4, TRA1-60などに対する抗体を用いた免疫染色が用いられる。また、NANOGやPOU5F1 (OCT3/4) に対する抗体を用いた核染色でのフローサイトメトリーもよい方法である。アイソタイプ抗体による染色を陰性対照として陽性細胞の割合を決定する。これが70%以上であることがISCBIのガイドラインでは推奨されている。

未分化状態において高発現し細胞分化とともに比較的急速に発現が低下する遺伝子が未分化マーカー遺伝子として用いられる。NANOG, OCT3/4, SOX2のような初期化遺伝子はその代表的なものである。このほかTDGF, DNMT3B, ZFP42などのmRNAの検出を行うが、これにはリアルタイムPCRを行うべきであり、RT-PCRによるバンドの検出は信頼性に欠ける。これは例えば集団内の半分の細胞が分化していても、残りの未分化細胞に由来するシグナルが検出されるためポジティブと判定されうるためである。これを避けるためには未分化マーカーと同時に初期分化マーカーである、GATA6, Brachyury, EOMESなどが検出されない(低い)ことを確認するなどが必要になる。mRNAの解析は細胞集団全体の状態をみるのに適している。



## 2. 多能性の判定

ES・iPS細胞の多能性は実際に分化誘導を行って解析することになる。多能性証明のための分化誘導には比較的ランダムな細胞分化が起こるとされる胚様体形成やテラトーマ形成法が用いられる。これらの方法により分化誘導後形成された組織で内胚葉、中胚葉、外胚葉の三胚葉性の細胞分化がみられることで、多能性の証明とする。

### A-1. アルカリホスファターゼ染色

当研究室では、Alkaline Phosphatase Substrate Kit III (Vector社, #SK-5300) を使用している。

#### 結果の判定

染色終了後、顕微鏡にてフラスコ中のコロニーが染色されていることを確認し、染色されているコロニーと染色されていないコロニーを選別する。未分化細胞は青く染まり、分化細胞は染まらない。未分化コロニーの中でも、分化が進んでいる部分だけ白く染まるので、コロニーが未分化状態を維持しているかのスクリーニングに有用である。染色時間をきちんと守ることが重要であり、染色時間が長くなるとすべて陽性色に染まってしまうので注意が必要である (図1)。

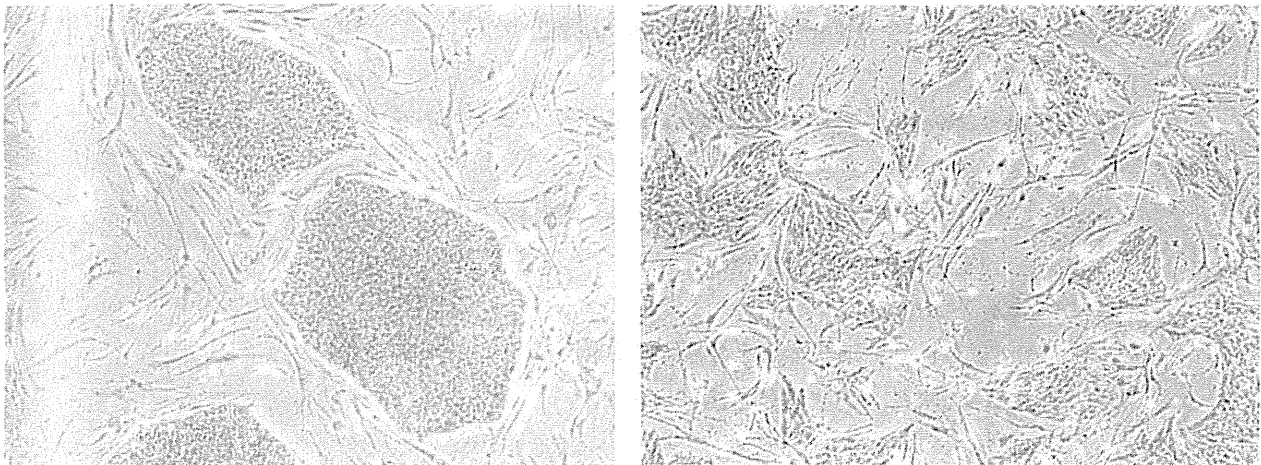


図1 アルカリホスファターゼ染色

### A-2. フローサイトメトリーによる測定

蛍光色素と結合しているモノクローナル抗体を用いて細胞に特異的な抗原を検出する方法が広く使われている。バリデーションされたキットも市販されており当研究室ではHuman Pluripotent Stem Cell Transcription Factor Analysis Kit (日本BD社, #560589) を使

用し, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, NANOG, OCT3/4, SOX2について測定している。

## A-3. 免疫染色

### 準備

#### 試薬調製

ブロッキング試薬

stock solution : 10 % BSA / PBS を 8 mL ずつ分注し,  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存する。

使用液 : stock solution に goat serum 1.2 mL, PBS 30.8 mL を加える。

0.2 % Triton-X100 / PBS

PBS 50mL に Triton-X100 を 100  $\mu\text{L}$  加える。室温保存。

3 % Formaldehyde / PBS

30 % Formaldehyde を PBS で 10 倍希釈する。用事調製。

0.3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  / PBS

30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  を PBS で 100 倍希釈する。用事調製。

発色試薬

DAB (3,3-Diaminobenzidine tablet sets) (シグマ・アルドリッチ社, #D4168)

10 mL の Mill Q に 2 種類の錠剤を溶かす。容器にアルミホイルを巻いて, 24 時間以内に使用する。

一次抗体, 二次抗体

ともにブロッキング試薬で以下の条件で希釈する。当研究室で使用している一次抗体, 二次抗体を表 1 に示す。

表 1 免疫染色抗体リスト

一次抗体	希釈倍率 (位)	カタログ番号	二次抗体	希釈倍率 (位)	カタログ番号
SSEA-1	100	Chemicon : MAB 4301	Mouse IgM	200	BD Pharmingen : 550588
TRA-1-60	100	Chemicon : MAB 4360			
SSEA-3	100	Chemicon : MAB 4303	Rat IgM	200	BD Pharmingen : 554017
SSEA-4	100	Chemicon : MAB 4304	Mouse IgG	200	Santa Cruz : sc-2055
Oct 3/4	200	Santa Cruz : sc-5279			

表面抗原の染色方法 (SSEA-1,3,4, TRA-1-60) \*1

12.5 cm<sup>2</sup> フラスコを使用した場合.

- ① 細胞培養中のフラスコから上清を捨て、PBSで洗浄する
- ② 3% Formaldehyde/PBSを2 mL添加し室温に15分間置く
- ③ PBSで3回洗浄する\*2
- ④ 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /PBSを2mL添加後、室温に10分間置く
- ⑤ 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /PBSを取り除き、PBSで3回洗浄する
- ⑥ ブロッキング試薬を2 mL添加し、室温に30～60分間置く
- ⑦ ブロッキング試薬を取り除いた後、一次抗体を添加し室温に30～60分間置く
- ⑧ PBSで3回洗浄する
- ⑨ 適応した二次抗体を添加し、室温に60分間置く
- ⑩ PBSで3回洗浄する
- ⑪ 発色試薬を2 mL添加し、遮光して5～10分間室温に置く
- ⑫ 顕微鏡でときどき発色の状態を確認する
- ⑬ 十分な発色が確認されたら、発色液を取り除きPBSで3回洗浄する
- ⑭ PBSを2 mL添加し、4℃で保存する

\*1 本法では洗浄のステップが大切。特に最後の洗浄は丁寧に行うと発色がよい。

\*2 膜の可溶化が必要な場合 (OCT3/4, NANOGなど) は、③の後に以下のステップを加える。

③\* 0.2% Triton-X100 / PBSを2 mL添加し、室温で10分間インキュベートする。

③\* 0.2% TritonX100 / PBSを取り除き、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / PBSを2mL添加後室温にて10分間インキュベートする。

## 結果の判定

染色終了後、顕微鏡にてフラスコ中のコロニーが染色されていることを確認する。未分化細胞は茶褐色に染まり、分化細胞は染まらない。

## A-4. PCRによる測定

当研究室ではOmniscript Revers Transcription kit (キアゲン社, #205110) および Random Primer (9mer) (東洋紡績社, #FSK-301) を使用してRNA抽出を行っている。マーカーはNANOG, OCT3/4, DNMT 3B, TDGF, GABRB3, GDF3, GATA6, Brachyury, EOMESについて測定を行っている。

## A-5. 胚様体形成確認

### 準備

- ペトリディッシュ 60 mm, 100 mm
- 細胞解離液  
CTK, Disperse など。
- 培地  
KSR base hES 培地。

### 手順

- ① 60 mm プレートにコンフルエント状態のES・iPS細胞を解離液で解離する。15 mLチューブに回収する
- ② 培地を加え10分間室温に静置し、ES・iPS細胞が沈んだら上清を除去する
- ③ 適量の培地を入れ懸濁し、ペトリディッシュ100 mmに総量10 mLになるように播種する
- ④ 以降、2日ごとに培地交換を繰り返し、14～20日間培養する

### 培地交換の方法

培養している溶液を15 mL tubeに移し、10分間室温に静置する。10分後細胞は下に沈んでいるので、その上清を除去し新し