

201306005A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤陽治

平成26(2014)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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 陽 治

平成 26 (2014) 年 3 月

# 目 次

<b>I. 総括研究報告書</b>	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	
<b>II. 分担研究報告書</b>	
1. 細胞・組織加工製品中の造腫瘍性評価・制御法の開発 . . . . .	41
佐藤 陽治	
2. 細胞・組織加工製品の感染制御法の開発（及び免疫原性制御法の開発／均質性・ 同等性確保の方策の検討） . . . . .	57
早川 堯夫	
3. 細胞・組織加工製品の免疫原性制御法の開発 . . . . .	76
掛樋 一晃	
<b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .</b>	<b>84</b>
<b>IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . .</b>	<b>88</b>

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、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を軟寒天コロニー形成試験と比較した。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、NOG マウス *in vivo* 試験系の検出感度を評価したところ、 $10^7$  個の hMSC に混入する HeLa 細胞は、下限として 10 個 (混入率 0.0001%) が、17% の確率で検出された。一方、軟寒天コロニー形成試験の検出の下限は、 $10^4$  個の hMSC に混入する HeLa 細胞として 10 個 (混入率 0.1%) であった。これらの結果より、 $10^7$  個の培養ヒト骨髄由来間葉系幹細胞をマトリゲルに懸濁して NOG マウスに移植する試験において、例えば 10 匹の試験がすべて「陰性」である場合、「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、0.0001% (100 万個に 1 個) 未満である」ということを示唆するものであることが明らかとなった。②等温遺伝子増幅法 (ICAN) 法を改良した HIV 遺伝子検出のための遺伝子特異的等温増幅法 (Ladder forming RT-ICAN 法) を開発し、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞や無血清・フィーダー細胞フリーで樹立した iPS 細胞株における HIV ウイルス由来遺伝子残存否定試験を実施し、本検出系の有用性を実証した。今年度は測定対象とできるウイルス種の拡充を図り、感染検体に含有される全核酸を対象とした、ヒト B 型肝炎ウイルスおよびヒト C 型肝炎ウイルスの網羅的ウイルスゲノム検出を可能とするウイルス特異的等温増幅法 (Ladder forming RT-ICAN 法) を開発した。③「細胞・組織加工製品の免疫原性制御法の開発」に繋がる周辺基盤技術として、iPS 細胞への異種動物由来成分の混入の原因追究について検証した。糖鎖を指標とする iPS 細胞とその起源細胞の特性評価の実行可能性について検証するため、異なる 3 種類の iPS 細胞について糖鎖解析を行うとともに、本研究で使用した iPS 細胞の起源細胞であるヒト肺繊維芽細胞 (MRC-5) について糖鎖解析を行った。また、iPS 細胞と MRC-5 を糖鎖プロファイルに基づいて識別する方法についても提案した。**【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）

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  
黒田 拓也 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 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  
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4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 (公財) 先端医療振興財団 再生医療開発研究部門 主任研究員  
上森 隆司 (株) タカラバイオ ドラゴンジェノミクスセンター 副センター長  
橋爪 克仁 (株) タカラバイオ 事業開発部部長  
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・致命的ないし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。実際に、米国では既に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行われている。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、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。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。

これまでの研究成果として、①がん化の抑制技術については、*in vitro*の試験系として軟寒天コロニー形成試験の性能とその限界の評価を、ヒトiPS細胞由来の網膜色素上皮細胞をモデルとして実施した。また、*in vivo*の系に関しては重度免疫不全マウスモデル（NOGマウス）の造腫瘍性細胞検出系としての性能評価のための基礎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、安全で高感度な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、ヒト免疫不全ウイルス（HIVウイルス）遺伝子特異的等温増幅法（Ladderforming RT-ICAN法）の基盤技術の開発に至り、その実用性を証明した。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。

平成25年度は、①*in vivo*の系について、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、NOG マウスの造腫瘍性細胞検出系と比較する目的で、hMSC 中に HeLa 細胞を微量に混入させた試料を用い、軟寒天コロニー形成試験における造腫瘍性細胞の検出性能を再評価した。

②検出対象のウイルス種域の拡充を図るべく、主にヒトに持続感染するウイルスおよび血液により伝播するウイルス種の中から、肝実質細胞や血液、体液中にて潜伏するヒト肝炎ウイルスの否定試験を目指した。この種のウイルスのうち、ヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) およびヒト C 型肝炎ウイルス (HCV) が、成人陽性率 1~2% と高く、ひとたび感染が確認された場合、重篤な症状へと進行することが懸念される。それ故、HIV に引き続き、HBV および HCV 由来遺伝子の検出を可能とする Ladder forming RT-ICAN 法の開発に着手した。さらに、③「細胞・組織加工製品の免疫原性制御法の開発」に繋がる周辺基盤技術として、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、異なる 3 種類の iPS 細胞について糖鎖解析を行うとともに、本研究で使用した iPS 細胞の起源細胞であるヒト肺繊維芽細胞 (MRC-5) について糖鎖解析を行った。また、iPS 細胞と MRC-5 を糖鎖プロファイルに基づいて識別する方法についても提案する。

## 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) 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。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-1-2 *in vivo* 造腫瘍性試験における 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  $10^7$  個に対し、HeLa 細胞を 0%, 0.0001%, 0.001% ( $0, 10^1, 10^2$  cells) 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 $\mu$ L (細胞総数  $10^7$  個/100uL) 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 軟寒天コロニー形成試験

軟寒天コロニー形成試験は CytoSelect 96-well Cell Transformation Assay Kit (Cell Biolab 社)を用い、メーカーのプロトコールに若干の改変を加えた上で実施した。20%FBS を含む 25  $\mu$ l の 2x DMEM を予め加温し、1.2%寒天水溶液 25  $\mu$ l と混合した後、これを 96 穴プレートに分注し、底部の寒天を固化させるためにプレートを 4°C で 30.分間加冷した。DMEM で懸濁した hMSC に DMEM で懸濁し

た HeLa 細胞を一定量添加することにより調製された細胞懸濁液 25  $\mu$ l と、20%FBS を含む 25  $\mu$ l の 2x DMEM および 25  $\mu$ l の 1.2% 寒天水溶液を混合し、これを上で作成したプレート底部寒天層上に添加した。重力による底部寒天層上への細胞の堆積とそれによる擬陽性の発生を防ぐ目的で、4°C で 10 分間放置し、上部寒天層を急速に固化させた。100  $\mu$ l の 10% FBS 含有 DMEM を各ウェルに添加し、プレートを 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下、20 日間インキュベートした。培地は 2-3 日ごとに交換した。形成された細胞コロニーを溶解し、CyQuant GR 色素を用いて細胞数を定量した。CyQuant GR の蛍光は 485/520nm のフィルターを用い、Wallac 1420 ARV0sx multilabel counter (パーキンエルマー) を用いて測定した。

#### B-1-4 統計処理

TPD<sub>50</sub> 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) 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-1-5 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 ヒト肝炎ウイルス核酸の選定

検出対象となるヒト肝炎ウイルスのうち、DNA ウイルスであるヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) ゲノム核酸については、HB 抗原陽性の感染患者より得られクローニングされ ATCC に登録されている AM6 [EC-AM6, pAM6] purified plasmid DNA を用いた。また、RNA ウイルスであるヒト C 型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム核酸については、典型的な HCV ウイルスゲノム RNA から得られた DNA プラスミドクローンである pCMV-3010 (RIKEN DNA DATA Bank clone ID: RDB\_02966) を入手し、それをダイレクトに鋳型として PCR 反応を行うことで標的遺伝子領域を増幅した。そのうえ、シーケンシングにて塩基配列確認を Genbank と比較精査したものを研究に供した。

なお、いずれのウイルスゲノム調製においても、遺伝子組換え実験等は一切行っていない。また、当該研究全般をも含む遺伝子実験研究計画については、本学の定める審査を経て、許可され、法令に準じて厳格に実施した。

#### B-2-2 ICAN 反応に用いたプライマーとプローブの設計

HBV および HCV ウイルスゲノムにおいて、各モデルウイルス核酸の全ゲノム領域中を対象とした *in silico* 解析に Mfold software (<http://mfold.rit.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>) を用いることで、安定的な配列を数カ所算定したうえ、ICAN 法の至適条件下 (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 ( $\Delta G$ ) を算出し、 $\Delta G > -1.0$  を相乗し、検出可能領域を設定した。

#### B-2-3 Ladder Forming RT-ICAN 法



モデルレトロウイルス核酸 ( $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$  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,  $45^{\circ}\text{C}$ , 10 分間反応させて逆転写反応を行った. この反応産物  $10\ \mu\text{L}$  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,  $55^{\circ}\text{C}$ , 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-2-4 Cycleave PCR 法

上記逆転写反応産物を  $2.5\ \mu\text{L}$  用い,  $25\ \mu\text{L}$  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-2-5 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. また, ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞及びヒト脂肪由来 iPS 細胞は, ヒト検体より得られるが, 検体提供元での倫理委員会にて近畿大学薬学総合研究所との共同研究を明記した倫理審査で研究が認められている. また, 今回の研究実施用途から考えて, 上述以上, 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, Toe, UTA-1) はマイトマイシン C 処理した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. 培養後の細胞は PBS (-) で 3 回洗浄後, PBS/1 mM-EDTA を加え  $37^{\circ}\text{C}$  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 MRC-5 細胞の培養

1%の非必須アミノ酸, 1%ペニシリン・ストレプトマイシン, 10%ウシ胎児血清を含む DMEM を用いて培養した. 培養後の細胞は PBS (-) で 3 回洗浄後, PBS/1 mM-EDTA を加え  $37^{\circ}\text{C}$  で 5 分間静置後, 培養ディッシュから細胞を剥離させた. 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 (-) 10 mL 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-3-3 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-3-4 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 NaBH<sub>3</sub>CN 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  $\mu$ l 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-3-5 シアル酸の分子種分析

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  $\mu$ l と 0.2 M HCl (10  $\mu$ l)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  $\mu$ l)加え, 50 °C で 150 分間誘導体化反応を行った。反応後, 10  $\mu$ l 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-3-6 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-3-7 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% CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>CN, 溶離液 B に 5% CH<sub>3</sub>COOH, 3% Triethylamine/H<sub>2</sub>O 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-3-8 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 *in vivo* 造腫瘍性試験における hMSC 中に混入する HeLa 細胞の検出能力の検討

本研究では、重度免疫不全動物モデルである NOG マウス (T 細胞, B 細胞および NK 細胞欠損) にヒト由来細胞をマトリゲルに封入した状態で移植した群 (NOG+マトリゲル群) の不死化細胞の生着性を検討した。各群で雄性 6 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。

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、平成 24 年度報告書で示した通り、培地に懸濁した場合に比べて非常に高かった。平成 24 年度は  $10^6$  個の hMSC 中に混入する HeLa 細胞の検出能力について検討を行ったが、本年度はさらに感度を上昇させた系を確立する目的で、 $10^7$  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。

その結果、細胞移植後 7 週間後までは HeLa 細胞  $10^1$ ,  $10^2$  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、8 週間後において、 $10^2$  個混入群では結節の形成が認められ、 $10^1$  群でも 10 週目において結節の形成が認められた (Figures 1-1 & 1-2)。TPD<sub>50</sub> 値は、16 週目までにはほぼ安定した (Figure 1-3)。16 週目における TPD<sub>50</sub> を、 $10^4$  個 HeLa 細胞のスパイクで 100% というダミー変数を仮定して計算すると、その値は  $1.8 \times 10^2$  で、HeLa 細胞単独投与ないし  $10^6$  個の hMSC と HeLa 細胞の同時投与の場合 (平成 24 年度報告書) とほぼ同等であった (Table 1-1)。

### C-1-2 軟寒天コロニー形成試験

軟寒天コロニー形成試験は、足場非依存性増

殖能を示す悪性形質転換細胞の検出に適した試験として良く知られている。軟寒天中に封入された HeLa 細胞からはコロニー形成が認められるが、 $10^4$  個の hMSC を軟寒天中に封入しても、20 日間の観察期間中、コロニー形成は全く認められなかった (Figure 1-4)。次に、 $10^4$  個の hMSC に HeLa 細胞を一定量添加し、軟寒天中においてコロニーを形成するのに最低限必要な HeLa 細胞数を求めた。検出限界をブランクの平均値+3.3x 標準偏差として計算した。その結果、0.2%以上の比率で混合した場合には 10 日以内でコロニーが有意に検出された。0.1%の比率で混合した場合においても 20 日までの間に有意なコロニーが検出された。

## 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 HBV ウイルスゲノム DNA 配列増幅可能領域の選定

HBV ウイルスは全長約 3.2kb の DNA ウィルスであり、その DNA は完全な二本鎖ではなくプラス鎖のほうが一部欠けていて短い特徴を持つ環状不完全 2 重鎖をなしている。その DNA 構造は、S 抗原遺伝子、C 抗原遺伝子、X 抗原遺伝子、P 抗原遺伝子に対応する読み枠 (Open Reading Frame (ORF)) が存在する。プロウイルスにおけるウイルスゲノムの安定性は、比較的が高い。また、HBV は自身の賛成する DNA ポリメラーゼを介して環状不完全 2 重鎖となった後、マイナス鎖 DNA を鋳型として読み枠をずらしながら 4 種類の RNA を産生する特徴をもつ。これらの特性を勘案し、マイナス鎖遺伝子とプラス鎖遺伝子部位にてオーバーラップする領域をベースに図 2-1 の HBV ウイルスゲノム DNA 配列増幅可能領域を選定した。なお、その選定領域は GeneBank に登録されている HBV プロウイルス遺伝子データベースとも照合している。図 1 は、そのアクセス No: NC\_003977.1 と比較し完全マッチ

した配列であることも示している。

### C-2-2 Cycleleave RT-ICAN 反応に用いるモデルレンチウイルス配列に対するプライマー、プローブマッチング

上記解析によって決定した増幅可能領域において、HIV 遺伝子特異的等温増幅法 (HIV-detective Ladder forming RT-ICAN 法) でも使用した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。そのプライマー、プローブ配列セット情報を図 2-1 および図 2-2 に示した。

### C-2-3 Cycleleave RT-ICAN 法に用いるプライマー、プローブの選定とバリデーション

HBV ゲノム核酸を  $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$  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 qPCR 反応試験を実施した (図 2-3)。その結果、HBV ウイルスゲノム検出用に構築した新規アルゴリズムにて設計した “Primer, Probe set1” および “Primer, Probe set2” では、Cycleleave RT-ICAN 反応系での添加が必須となる RNaseH のユニット数を変容させた至適化を行っても検出には至らなかった (図 2-4)。

一方、HIV-detective Ladder forming RT-ICAN 法にて Probe 設計に成功したアルゴリズムをベースに設定した “Primer, Probe set3”、“Primer, Probe set4” では、前者では検出不能であったものの、後者に於いては、RNaseH が 3.75 ユニットの至適条件にて、 $10^3$  コピーの鋳型を検出できる感度を有する検出系が構築できることがわかった (図 2-5)。

### C-2-4 Cycleleave RT-ICAN 法による HBV ウイルスゲノムの増幅確認

感度の高い Cycleleave RT-ICAN を行うため、

RNaseH の濃度を 3.75U/reaction とし、また鋳型となる HBV ゲノム DNA の濃度を 8 段階 ( $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$  コピー相当分) に振り、高感度に検出できる Probe を 2 種比較することで、最適な反応系の構築を図った。この実験の条件を図 2-6 に示す。

その結果、Probe 2 を用いた時に、至適反応条件濃度である RNaseH (3.75U/reaction) に対し、最も高い切断効率で、Cycleleave ICAN 反応感度 10 コピーという非常に高い検出感度系を構築するに至った (図 2-7)。

### C-2-5 Cycleleave RT-ICAN 反応に用いる HCV ウイルスゲノム DNA 配列増幅可能領域の選定

HCV ウイルスは全長約 9.5kb の一本鎖 RNA ウイルスである。これまでに、10 種類を超える遺伝子型が報告されており、アメリカでは 1a 型が、ヨーロッパでは 1a 型と 3a 型が、日本では 1b 型が 70% ほどを占めるとされ、続いて 2a 型 2b 型の割合が多いとされている。HCV がひとたび感染すると持続的に宿主細胞に潜伏することが多く、慢性肝炎、肝硬変を引き起こす。プロウイルスにおけるウイルス RNA ゲノムの安定性はやや高いとされているが、エンベロープコード領域の変異率は高く、一方、ゲノムの末端の 5', 3' 非翻訳領域 (UTR) は最も変異率が低いとされている。これらの特性を勘案し、ゲノムの末端領域をベースに図 8 の HCV ウイルスゲノム DNA 配列増幅可能領域を選定した。なお、その選定領域は GeneBank に登録されている HCV プロウイルス遺伝子データベースとも照合している。図 2-1 は、そのアクセス No: NC\_004102.1 と比較し完全マッチした配列であることも示している。

### C-2-6 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、プローブマッチング

上記解析によって決定した増幅可能領域において、HIV 遺伝子特異的等温増幅法 (HIV-detective Ladder forming RT-ICAN 法) でも使用した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。そのプライマー、プローブ配列セット情報を図 2-8 および図 2-9 に示した。

### C-2-7 Cycleave RT-ICAN 法に用いるプライマー、プローブの選定とバリデーション

HCV ゲノム核酸を  $10^7$  ,  $10^6$  ,  $10^5$  ,  $10^4$  ,  $10^3$  ,  $10^2$  ,  $10^1$  ,  $10^0$  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 qPCR 反応試験を実施した (図 2-10-1)。その結果、HCV ウイルスゲノム検出用に構築した新規アルゴリズムにて設計した“Primer, Probe set1” および “Primer, Probe set2” では、Cycleave RT-ICAN 反応系での添加が必須となる RNaseH のユニット数を変容させた最適化を行っても検出には至らなかった (図 2-10-2)。そこで、HBV のケースで有用であった HIV-detective Ladder forming RT-ICAN 法にて Probe 設計に成功したアルゴリズムをベースに設定した “Primer, Probe set3”, “Primer, Probe set4” を試行した。しかしながら、こちらのアルゴリズムベースでも検出が難しいという結果となった (図 2-11)。このことは Primer の再設定は勿論のこと、*In silico* ベースの新たな Probe 設定アルゴリズム構築が必要であり、それは HIV や HBV で成功しているパラメータ条件を廃した設定変数を設けるべき (そこから構築できる可能性が高いもの) であると考えられる。

### C-2-8 現行の Primer と Probe セットによる

## Cycleave RT-ICAN 法による HCV ウイルスゲノムの増幅確認への試行

Cycleave RT-ICAN 法では、Primer とマッチングする Probe の設定が肝要であり、かつ非常に緻密な設計を要する。そのため、事前確認を行うバリデーション実験でその確証を高めるのであるが、まれにその検定を漏れたものでも感度よく検出に成功するケースもある。そこで、ここまで HIV-detective Ladder forming RT-ICAN 法にて Probe 設計に成功したアルゴリズムをベースに設定した Primer, Probe セットを用いて、至適な反応系をシミュレート (図 2-12) し、HCV ウイルスゲノム検出試行実験を行った。

シミュレートでは、Cycleave RT-ICAN を行う RNaseH の濃度を 3.75U/reaction にて行うことが望ましいと想定された。この酵素濃度を固定し、鋳型となる HCV ゲノム DNA の濃度を 8 段階 ( $10^7$  ,  $10^6$  ,  $10^5$  ,  $10^4$  ,  $10^3$  ,  $10^2$  ,  $10^1$  ,  $10^0$  コピー相当分) に振り、念のため Probe を 2 種比較することで、検出にいたるかを試行してみた。精緻な経時的モニタリングの結果、やはり、検出を示すピークを得ることはできなかった。次に、シミュレート上最も有用な Primer を用いて既存の SYBR Green PCR 法を用いて Primer 側の検証実験を行ったところ、Primer 間の増幅感度にゆらぎとバラツキが生じる結果を得た (図 2-13)。このことは、HCV ゲノム RNA 逆転写による DNA ベースでの Cycleave RT-ICAN 法用プライマー設定 (DNA-RNA Hybrid) の設定誤差を修正した *in silico* での primer 設定精度改善に有用な基礎データが提供されたことを示唆した。

### C-3 細胞・組織加工製品の免疫原性制御法の開発

#### C-3-1 iPS 細胞と起源細胞のシアル酸分子種分析

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  $\alpha$  Gal エピトープ (Gal $\alpha$ 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危険性が知られている。特に、NeuGc についてはヒト以外の動物種に広く分布し、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、3 種類 iPS 細胞の中の NeuGc の定量分析を実施した。

iPS 細胞由来総タンパク質を塩酸加水分解し、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 を用いて分析した。シアル酸の分子種分析を行った結果を Fig. 3-1 に示す。Tic, UTA-1 および Toe のいずれの細胞も 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た。総シアル酸に占める NeuGc の相対比は Tic が 14.6%、UTA-1 が 8.6%、Toe が 12.0% であった。一方、10% ウシ胎児血清を含む培養液を用いて培養された iPS 細胞の起源細胞である MRC-5 の総シアル酸に占める NeuGc の相対比は 3.7% であった。ウシ胎児血清には KSR と同様に NeuGc が多く含まれるが、細胞への混入は低い結果であった。本研究課題初年度 (平成 23 年度) の研究結果より、KSR は分子量 3000 以下の低分子量分画中に大量の KSR を含むことから、遊離の NeuGc あるいは NeuGc を含む糖鎖や糖ペプチドが受動的に細胞内に取り込まれた結果である可能性が示唆された。また、昨年度の研究において KSR を用いないヒト化培養条件では、NeuGc が検出限界以下であることから、KSR/MEF を用いて培養された Tic において観察される NeuGc は KSR に由来すると考えられた。以上の結果か

ら、iPS 細胞への NeuGc の混入を防ぐためには、KSR を使用しない培養条件が望ましいと考えられた。

### C-3-2 iPS 細胞および起源細胞の N-結合型糖鎖分析

我々はこれまでに組織由来、分化度などが異なるヒト培養癌細胞の網羅的解析を行い、糖鎖がその特性評価に有効であることを示してきた。一方、iPS 細胞への異種動物糖鎖の混入経路は、前項の NeuGc のように細胞が持つ生合成経路が利用されるものだけでなく、非特異的な吸着などもその原因となりうる。これらは、遺伝子やタンパク質の発現レベルでは検出することができないため、個々に解析が必要となる。本項では 3 種類のヒト iPS 細胞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、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み合わせる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 Table 3-1 に示す。いずれの細胞においてもアシアロ糖鎖としてマンノース残基 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が共通して観察された。一方、複合型糖鎖として複合型 2 本鎖糖鎖に  $\alpha$  ガラクトース残基 1 あるいは 2 残基した糖鎖複合型 2 本鎖糖鎖にシアル酸が 3 あるいは 4 残基付加したシアル酸過付加糖鎖が観察された。 $\alpha$  ガラクトース残基を持つ糖鎖は、ヒトではそれらの

合成酵素がないため発現していない。また、シアル酸過付加糖鎖については、マウスやラットなどの齧歯類に多く発現することが知られているが、ヒト細胞内では合成されない。よって、 $\alpha$ ガラクトース残基を持つ糖鎖、シアル酸過付加糖鎖は KSR と MEF を用いる培養条件下、非特異的に iPS 細胞に混入したものと考えられた。

次に iPS 細胞の起源細胞である MRC-5 の N-型糖鎖を分析した結果を Fig.3-2 に示す。アシアロ分画からはハイマンノース型糖鎖、モノシアロ、ジシアロ分画では複合型 2 本鎖糖鎖、この糖鎖にフコースが 1 残基付加した糖鎖、さらに、複合型 4 本鎖糖鎖に Gal-GlcNAc ユニットから成るラクトサミン構造が伸長したポリラクトサミン型糖鎖が観察された。トリシアロ分画では、複合型 3 本鎖糖鎖、ポリラクトサミン型糖鎖、テトラシアロ分画では、4 本鎖糖鎖が主に観察された。MRC-5 の培養は異種動物成分であるウシ血清を含む培養条件下で行っているものの、iPS 細胞で観察された  $\alpha$ ガラクトース残基やシアル酸過付加糖鎖は観察されなかった。以上の結果、iPS 細胞において観察された異種動物糖鎖は、起源細胞由来でなく、iPS 細胞の培養環境、特に KSR や MEF などに由来すると考えられる。次に 3 種類の iPS 細胞と MRC-5 の N-型糖鎖について、発現する糖鎖の種類ごとに比較解析した (Fig.3-3)。iPS 細胞 3 種類ではハイマンノース型糖鎖が 74.2~86.5% と高い相対比を示すのに対し、MRC-5 ではハイマンノース型糖鎖が 60.8%、複合型糖鎖は 39.2% であった。さらに、複合型糖鎖に占めるフコシル化糖鎖の相対比を比較すると、iPS 細胞ではフコシル化糖鎖は 20% 以下であったのに対し、MRC-5 細胞では 36.4% であった。iPS 細胞 3 種類は何れも類似した糖鎖プロファイルを示したが、その起源細胞

とは明らかに異なる糖鎖プロファイルを示すことがわかった。

以上、KSR と MEF を用いる培養条件では、非ヒト由来糖鎖である  $\alpha$ ガラクトース残基を持つ糖鎖やシアル酸過付加糖鎖が観察されること、iPS 細胞とその起源細胞の糖鎖プロファイルは大きく異なることがわかった。

## 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されている。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  $10^7$  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 TPD<sub>50</sub> 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TPD<sub>50</sub>値はそれぞれ10, 3 x 10<sup>3</sup>, 3 x 10<sup>4</sup>, 3 x 10<sup>6</sup>程度と言われており([http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/slides/5-4188S1\\_2\\_files/frame.htm](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「10<sup>7</sup>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(=TPD<sub>50</sub>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10<sup>7</sup>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、10<sup>7</sup>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。

ヒト細胞・組織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TPD<sub>50</sub>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 10<sup>8</sup>, 3 x 10<sup>10</sup>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(10<sup>7</sup>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 $\gamma$ 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/IL2ryKO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).

平成 24 年度、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にしている。

#### 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、本研究ではこれまでに、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てきた。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。

平成 24 年度に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 TPD<sub>50</sub> 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。

平成 25 年度は、「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を行った。その結果、10<sup>7</sup> 個の hMSC に混入する HeLa 細胞は、下限として 10 個 (混入率 0.0001%) が、17% の確率で検出された。この時の、TPD<sub>50</sub> 値 (50% の確率で腫瘍形成が認められる細胞数) は、添加 HeLa 細胞の数にして、180 個 (混入率 0.002%) であった。これらの結果は、10<sup>7</sup> 個の培養ヒト骨髄由来間葉系幹細胞をマトリゲルに懸濁して NOG マウスに移植する試験において、例えば 10 匹の試験がすべて「陰性」である場合、「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、0.0001% (100 万個に 1 個) 未満である」ということを示唆するものである。

軟寒天コロニー形成試験は足場非依存的増殖性という悪性形質転換細胞の特徴を生かした試験系であり、悪性形質転換細胞検出の特異性は非常に高い。本研究において hMSC の品質管理という視点から、国内外の試験研究機関で汎用される HeLa 細胞の混入を想定した場合の混入の検出感度を検討した結果、軟寒天コロニー形成試験では少なくとも混入率 0.1% 以上であるならば 20 日間で検出することが可能であることが明らかとなった。

HeLa 細胞の混入量と生細胞の検出シグナルとの間の用量作用関係および検出シグナルのバックグラウンド値およびその標準偏差から算出される検出限界は、HeLa 細胞の混入量に換算して 0.02% であった。これは平成 23 年度に PA-1 細胞及びヒト網膜色素上皮細胞を用いて検討した検出限界よりも約 50 倍低い。スパイクに用いた細胞種およびバックグラウンドとなる正常細胞の種類により、検出限界が大きく変わり得ること、および製品の品目ごとに、試験系の性能評価および適切なコントロール細胞の選定をすることが、評価品目の品質・安全性の議論をするうえで重要であると考えられる。

軟寒天コロニー形成試験は簡便で安価、かつ *in vivo* 造腫瘍性試験よりも短時間で結果が得られる点で有利である。しかし、NOG マウスとマトリゲルを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験よりも感度が低い(即ち検出限界が高い)ことと、悪性度の低い造腫瘍性細胞(足場非依存的増殖性を示さない、良性の造腫瘍性細胞)は検出されない可能性があることなど、その性能に限界もある。それぞれの造腫瘍性関連試験の性能と限界を理解した上で、対象となる製品の特性、態様および投与方法などを勘案し、適切な評価方法を選択することが重要であると考えられる。

## 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、HIV ウイルスゲノム特異的等温遺伝子増幅法(ICAN 法)に引き続き、ヒト肝炎ウイルス特異的な改良に着手し、ウイルス遺伝子特異的等温遺伝子増幅法(ICAN 法)、中でも HBV 特異的 Ladder forming RT-ICAN 法の開発に成功した。同時に、検体に含まれる核酸全てを対象に、簡便で大量に精度良く HIV と HBV 由来ゲノムを検出できる検出法樹立に大きく近づく基盤技術を提示するに至ったと言える。

これまで、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った。今回の Ladder forming RT-ICAN 法では、反応容量の許容量の拡大(大容量の反応調製溶液にて検出が可能であり、持ち込む鋳型 DNA 総量の多量化が可能)を可能とするため、この懸念が払拭できうるのである。また、操作性が簡便である(一定温度にて核酸増幅できるので、特別な機器を必要としない)ため、広く普及させる技術としても魅力的である。ただし、課題として、検出すべきウイルス種の適応拡大と、それらに対応するアルゴリズムの開発である。今年度の研究結果では、HBV の検出を可能としたものの、HCV に於いては、*in silico* での Primer 設定法に不完全さが生じることがわかった(図 10~15)。このことは、RNA もしくは DNA ウイルスの特定領域に対する Primer 設定に各々特有のパラメータ設定を施すことで大きく改善することが可能と考える。今年度の結果は、それを提供できたと言う点で前進したとも考えられる。これらの観点は、今

後この斬新で有用な大容量検出反応系である Ladder forming RT-ICAN 法が、複数のウイルス種を 1 チューブにて同時検出する反応系へと発展するためにもたいへん重要な観点、早期修正点である。実際、本法の精度を規定する要因の殆どは、DNA-RNA Hybrid Primer の設定と Probe のマッチングである。これらが、特定のウイルスに確実に設定されることで、再現性はほぼ担保される。つまり、この方法で検出対象となるウイルス種をさらに広げれば、上述のような理想型となる多種ウイルス同時検出（マルチプレックス）の多種ウイルス由来ゲノムの網羅的検出法が創製できると考えられる。

一方、今後の発展系として、多種ウイルスマルチプレックス検出法への適用を目指す Cycleave RT-ICAN 法に、高感度蛍光プローブを適用することで、呈色反応のみで簡便にウイルスゲノム検出を可能とすることも可能と考えられる。

今後これらの改善が適正成されることで、裾野の広い再生医療実用化における安全性評価の隘路となっている問題解消に貢献できるものとする。

### D-3 細胞・組織加工製品の免疫原性制御法の開発

iPS 細胞はその種類にかかわらず、KSR と MEF を用いた培養系では、異種動物由来成分の iPS 細胞への混入は不可避的であること、同じ起源由来の iPS 細胞は類似した N-結合型糖鎖プロファイルを示すのに対し、起源細胞と iPS 細胞の糖鎖プロファイルは大きく異なることから、細胞の iPS 化に伴い細胞の glycosylation machinery は変化することが示唆された。iPS 細胞に観察される異種動物糖鎖のうち、NeuGc は細胞外の培養液より取り込まれ、細胞の生合成に利用されるに対し、 $\alpha$  ガラクトー

ス残基を持つ糖鎖やシアル酸過付加糖鎖は培養過程において、非特異的に混入したものと考えられた。

## 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

ヒト体細胞ないしヒト体性幹細胞に由来する細胞・組織加工製品は、ヒト多能性幹細胞加工製品に先行して国内外で開発されている。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・性能評価に関しては、これまでほとんど注意が払われておらず、既存の WHO の方法が無批判に転用するなど、科学的妥当性の低い方法がとられることがほとんどであった。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は、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、著しく高く、細胞・組織加工製品への造腫瘍性細胞の混入の検出を目的とした場合の有用性が、ヌードマウスよりも高いという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 において本試験を例えば 10 例実施しすべてが「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、0.0001%未満である」という具体的な解釈方法が明らかとなった。

軟寒天コロニー形成試験は、簡便、安価かつ短時間に悪性形質転換細胞を検出できる系であるが、感度の面で NOG マウスおよびマトリゲルを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験系よりも劣っていた。しかしながら、試験系の検出方法を現代の最新技術を駆使しながら改良することなどにより、軟寒天コロニー形成試験の感度の