

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及び適切なウイルス否定試験の実施である。現在、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、一般に動物由来の血清やフィーダー細胞など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。

本研究分担課題では、これまでに、従来から汎用されている定量的 PCR 法におけるウイルス由来核酸の検出系の問題点が反応系容量の限界にあることを示し、それ故、ウイルス核酸の存在の否定試験を、検体全ての細胞集団を対象とするような形で満たすことが難しいことを明らかとした。そこで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。これをもとに、本年度は、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。

B. 研究方法

B-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. 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 (ΔG) を算出し、 $\Delta G > -1.0$ を相乗し、検出可能領域を設定した。

B-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°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。

(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。

C. 研究結果

C-1. Cycleleave 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 ウイルスであり、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 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. 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 1 および図 2 に示した。

C-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 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 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 5)。

C-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 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を構築するに至った (図 7)。

C-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 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-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、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 8 および図 9 に示した。

C-7. 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

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 10)。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、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 10)。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 11)。このことは Promer 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-8. 現行の Primer と Probe セットによる Cycleleave RT-ICAN 法による HCV ウイルスゲノムの増幅確認への試行

Cycleleave RT-ICAN 法では、Primer とマッチングする Probe の設定が肝要で有り、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 1 4) 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 1 5)。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。

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、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 1 0 ~ 1 5)。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。

E. 結論

Cycleave RT-ICAN 法を用いた HBV ウイルスゲノム核酸検出は、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、その有用性評価データ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) HCV, HIV-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開発に努める必要がある。本年度の研究成果は、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の完成にまた一歩前進した画期的な基盤技術を築いたという点で、その意義は大きいと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

- 1) Moriyama M, Moriyama, Uda J, Matsuyama A, Osawa M and Hayakawa T.: BNIP3 Plays Crucial Roles in the Differentiation and Maintenance of Epidermal Keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2014 134(6): 1627-35.
- 2) 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 Jun 12;8(6):e66274.
- 3) Takayama K, Nagamoto Y, Mimura N, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Hayakawa T., Kawabata K, Mizuguchi H.: Long-Term Self-Renewal of Human ES/iPS-Derived Hepatoblast-like Cells on Human Laminin 111-Coated Dishes. *Stem Cell Reports.* 2013 Oct 3;1(4):322-335.
- 4) Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Inamura M, Ohashi K, Okuno H, Yamaguchi T, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T., Okano T, Furue MK, Mizuguchi H.: CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF β receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision. *Development.* 2014 Jan;141(1):91-100.
- 5) 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 Feb;34(7):1781-9.X
- 6) Kinoshita M, Nakatsuji Y, Suzuki S, Hayakawa T., Kakehi K.: Quality assurance of monoclonal antibody pharmaceuticals based on their charge variants using microchip isoelectric focusing method. *J Chromatogr A.* 2013 Sep 27;1309:76-83.
- 7) 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 Jun 1;928:16-21.
- 8) Yodoshi M, Iikeda N, Yamaguchi N, Nagata M, Nishida N, Kakehi K, Hayakawa T., Suzuki S.: A novel condition for capillary electrophoretic analysis of reductively aminated saccharides without removal of excess reagents, *Electrophoresis*, 2013 Dec; 34(22-23), 3198–3205.
- 9) Kinoshita M, Mitsui Y, Kakoi N, Yamada K, Hayakawa T., Kakehi K.: Common Glycoproteins Expressing Polylectosamine-Type Glycans on Matched Patient Primary and Metastatic Melanoma Cells Show Different Glycan Profiles. *J Proteome Res.* 2014 Feb 7;13(2):1021-33.
- 10) Moriyama H, Moriyama M, Isshi H, Ishihara S, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A and Hayakawa T.: Role of Notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *STEM CELLS & DEV* (2014) in press.
- 11) 森山博由, 森山麻里子, 早川堯夫. 『ヒト脂肪由来間葉系幹細胞における効率的かつ厳密に発現制御可能なレンチウイルス発現システムの構築』 Sept, 18, 2013. BioMed circus).

G-2 学会発表

- 1) 早川堯夫：再生医療製品・遺伝子治療薬等の品質評価の上での科学的妥当性とは。第10回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム（基調講演），東京（2013.12.12）
- 2) 木下充弘、三ツ井洋介、原沙也香、山田佳太、早川堯夫、掛樋一晃：ヒトメラノーマ細胞のグライコフォームフォーカストプロテオミクス, 2013年8月 第32回日本糖質学会年会（2013.8.）
- 3) 神末和哉、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃：シーレスインターフェースを備えたCE-ESI-MSによる糖タンパク質分析とその応用. 2013年11月 第33回キャピラリー電気泳動シンポジウム（2013.11.）
- 4) 木下充弘、鈴木茂生、早川堯夫、掛樋一晃：レーザー回折法を用いる Sub-visible 領域タンパク質凝集体の解析. 第134年回日本薬学会年会（2014.3.）
- 5) 岩本裕貴、安井裕太郎、岩塚欣也、鈴木茂生、早川堯夫、掛樋一晃:ウサギ角膜上皮細胞の糖鎖生合成に対する外的物理的ストレスの影響（2014.3.）
- 6) Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. Role of Notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. The 7th Notch meeting. Feb. 14-15, 2013. National Institute of Genetics, Mishima.
- 7) Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 「脂肪組織由来体性幹細胞の製造方法」 関西8私大新技術開発説明会, Mar, 1, 2013. JST本部本館ホール, 東京.
- 8) 森山麻里子, 宇田純輝, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. Notch シグナルが皮膚を正しく構築する仕組み. 皮膚の会 (総会), Mar, 16-17, 下呂, 岐阜.
- 9) Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露下における脂肪由来間葉系幹細胞の Notch シグナル亢進と解糖系調節機構の解明. Mar, 21-23, 2013. 第12回日本再生医療学会総会.
- 10) Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Uda Junki, Matsuyama Akifumi, Osawa Masatake, Hayakawa Takao. INDISPENSABLE ROLES OF BNIP3, AN INDUCER OF AUTOPHAGY, IN BOTH DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. May 8–11, 2013, 2013 International Investigative Dermatology Meeting, Edinburgh International Conference Center, Edinburgh, Scotland
- 11) Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko, Ueda Ayaka, Nishibata Yusuke, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa Takao. ROLE OF NOTCH SIGNALING IN THE MAINTENANCE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER HYPOXIC CONDITIONS. June 12–15, 2013, 11th ISSCR at BOSTON, U.S.A.
- 12) Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Uda Junki, Matsuyama Akifumi, Osawa Masatake, Hayakawa Takao. INDISPENSABLE ROLES OF BNIP3, AN INDUCER OF AUTOPHAGY, IN BOTH DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. June 12–15, 2013, 11th ISSCR at BOSTON, U.S.A.
- 13) Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko, Ueda Ayaka, Nishibata Yusuke, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa Takao. ROLE OF NOTCH SIGNALING IN THE MAINTENANCE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER HYPOXIC CONDITIONS. June 13, 2013, CBRC, Harvard Medical School, Boston, U.S.A.
- 14) 野村昇吾, 森山麻里子, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「表皮分化過程における Forkhead box タンパク質の関与」 June 12–15, 2013, 第4回生命機能研究会, 滋賀.

- 15) 曾根千晶, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMP) を用いたインスリン産生細胞の作製」 June 12-15, 2013, 第 4 回生命機能研究会, 滋賀.
- 16) 大森重成, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMP) を用いた効率的なドパミン産生細胞作製」 June 12-15, 2013, 第 4 回生命機能研究会, 滋賀.
- 17) 石原 慎, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「低酸素培養における Notch シグナルを介した解糖系調節機能の解明」 June 12-15, 2013, 第 4 回生命機能研究会, 滋賀.
- 18) 森山麻里子, ○宇田純輝, 北川綾弓, 野村昇吾, 早川堯夫, 森山博由. Bcl-2 ファミリー分子 BNIP3 が表皮構築に及ぼす影響. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
- 19) 古谷圭史, 村上健太, 雨宮有佑, 北野亮介, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床段階における指針について. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
- 20) 村上健太, 古谷圭史, 雨宮有佑, 北野亮介, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. ヒト幹細胞加工医薬品開発をめざしたヒト体性幹細胞樹立のための基準. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
- 21) 北川綾弓, 森山麻里子, 宇田純輝, 野村昇吾, 早川堯夫, 森山博由. Bcl-2 ファミリー分子 BNIP3 が表皮構築に及ぼす影響. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
- 22) Junki Uda, Mariko Moriyama, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama. Indispensable roles of BNIP3, an inducer of autophagy, in both differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. The 35th annual meeting of the molecular biology society of Japan. Dec 3-6, Kobe, Japan.
- 23) Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露を介する脂肪由来間葉系幹細胞のドパミン産生細胞分化. Mar, 4-6, 2013. 第 13 回日本再生医療学会総会. 京都.
- 24) Mariko Moriyama, Hiroyuki Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露下における脂肪由来間葉系幹細胞の Notch 進と解糖系調節機構の解明. Mar, 4-6, 2013. 第 13 回日本再生医療学会総会. 京都.
- 25) Takao Hayakawa. Overview on core technical element for early product development, evaluation and control of cell-based product, IABS-JST Joint Workshop on “Challenges towards sound scientific regulation of cell therapy products”, March 7-8, 2014, Kyoto, Japan.

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

【政策への提言】

- 1) 厚生労働省医薬食品局「再生医療等製品原料基準」のあり方に関する検討」での提言
- 2) 経済産業省「グローバル認証基盤整備事業再生医療等基準検討委員会」での提言
- 3) ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について（平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 2 号）
- 4) ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について（平成 24 年 9

月 7 日薬食発 0907 第 3 号)

- 5) ヒト (自己) iPS (様) 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について (平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 4 号)
- 6) ヒト (同種) iPS (様) 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について (平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 5 号)
- 7) ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について (平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 6 号) (URL) <http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/sec2/sispsec/html/regulation.html>
- 8) 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 (2012-2013 年)
- 9) 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 (2012-2013 年)
- 10) 経済産業省 「再生医療の実用化・産業化に関する研究会」での提言 (2012-2013 年)
- 11) 経済産業省 「再生医療等基準検討委員会」での提言 (2013-2014 年)
- 12) 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

Primer、Probeの設計_HBV

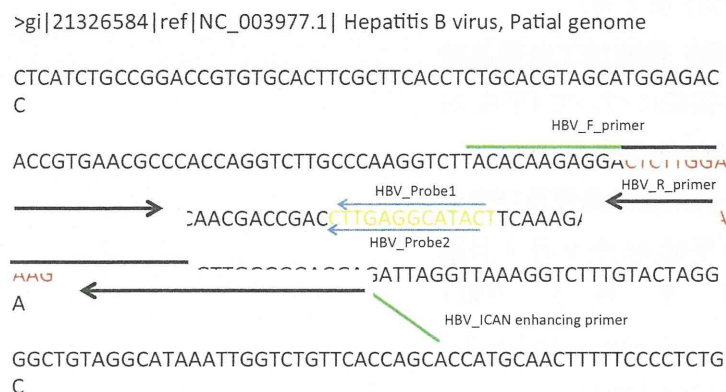


図 1： HBV ウイルスゲノム DNA 配列増幅可能領域および Cycleave RT-ICAN 法で用いた primer の設定領域

Primer、Probeの反応確認_HBV

Primer, Probe set 1

ICANF ; HBV_F
CTCTTGGACTCTCAGCA(AUG)
ICANR ; HBV_R
TCCTCCCAGTCTTTAAACA(MAC)
Probe ; HBV_probe1
Eclips-AGT(A)TGCCTCAA-Cy5

Primer, Probe set 2

ICANF ; HBV_F
CTCTTGGACTCTCAGCA(AUG)
ICANR ; HBV_R
TCCTCCCAGTCTTTAAACA(MAC)
Probe ; HBV_probe2
Eclips-GT(A)TGCCTCAAG-Cy5

(斜字)はRNA

Primer, Probe set 3

HBV_ICAN enhancing primer
tcctcttgtaCTCCTCCCCAACTCCTCCC
ICANF ; HBV_F
CTCTTGGACTCTCAGCA(AUG)
ICANR ; HBV_R
TCCTCCCAGTCTTTAAACA(MAC)
Probe ; HBV_probe1
Eclips-AGT(A)TGCCTCAA-Cy5

Primer, Probe set 4

HBV_ICAN enhancing primer
tcctcttgtaCTCCTCCCCAACTCCTCCC
ICANF ; HBV_F
CTCTTGGACTCTCAGCA(AUG)
ICANR ; HBV_R
TCCTCCCAGTCTTTAAACA(MAC)
Probe ; HBV_probe2
Eclips-GT(A)TGCCTCAAG-Cy5

図 2： HBV ウイルスゲノム DNA 検出用 Cycleave RT-ICAN 法で用いた primer 配列情報

Primer、Probeの反応確認_HBV

ICAN反応

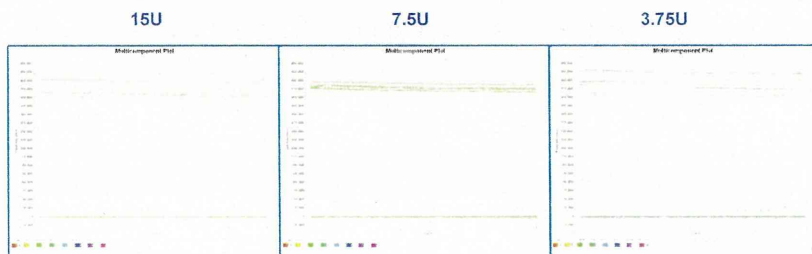
HBV plasmid DNA (ATCC45020D) 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , NTC
ICAN buffer
ICAN F primer(1uM)
ICAN R primer (1uM)
ICAN enhancing primer(0 or 0.04uM)
Cycling probe (0.2uM)
BcaBEST DNA Pol. 11U
Tli RNaseH 3.75U 7.5U 15U/25ul
55C, 90min

図 3 : HBV ウイルスゲノム DNA 検出用 Cycleave RT-ICAN 法の確認反応条件

Primer、Probeの反応確認_HBV

Primer, Probe
set 1

Probeによる
検出されず。



Primer, Probe
set 2

Probeによる
検出されず。

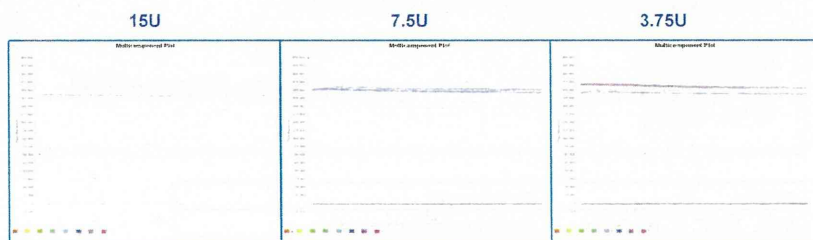
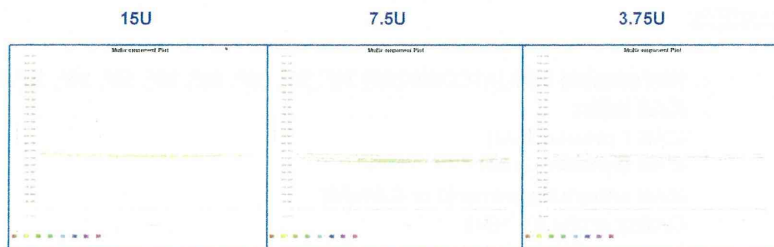


図 4 : HBV ウイルスゲノム DNA 検出用新規アルゴリズムにより設計した Primer,Probe ペアを用いた Probe 発色検出による qPCR 試験

Primer、Probeの反応確認_HBV

Primer, Probe set 3

Probeによる検出されず。



Primer, Probe set 4

10³ copyのtemplateを検出

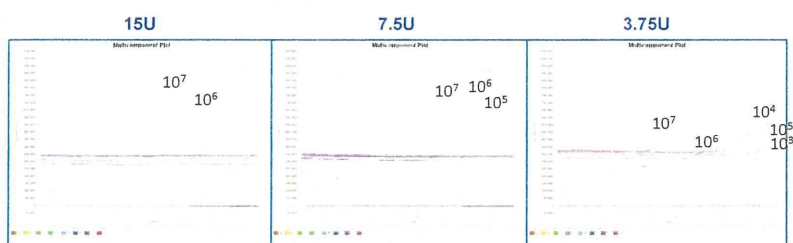


図5 : HIV-detective Ladder forming RT-ICAN 法にて Primer, Probe 設計に成功したアルゴリズムをベースに設計した Primer,Probe を用いた Probe 発色検出による qPCR 試験

Cycleave PCRによるHBVの検出

PCR

HBV plasmid DNA (ATCC45020D) 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹, 10⁰, NTC
 Cycleave PCR Reaction Mix
 PCR F primer(0.2uM)
 PCR R primer (0.2uM)
 HBV_Probe1_FAM or HBV Probe2_FAM (0.2uM)

95 °C, 30sec
 95 °C, 5sec
 55 °C, 10sec
 72 °C, 20sec } 45 cycles 3.75U/reaction Tli RNaseH濃度

Name	Sequence
PCR HBV F primer	ctcttggactctcagca
PCR HBV R primer	tcctcccagtcctttaaca
HBV_Probe1_FAM	Eclips-AGT ^a TGCCTCAA-FAM
HBV_Probe2_FAM	Eclips-GT ^a TGCCTCAAG-FAM

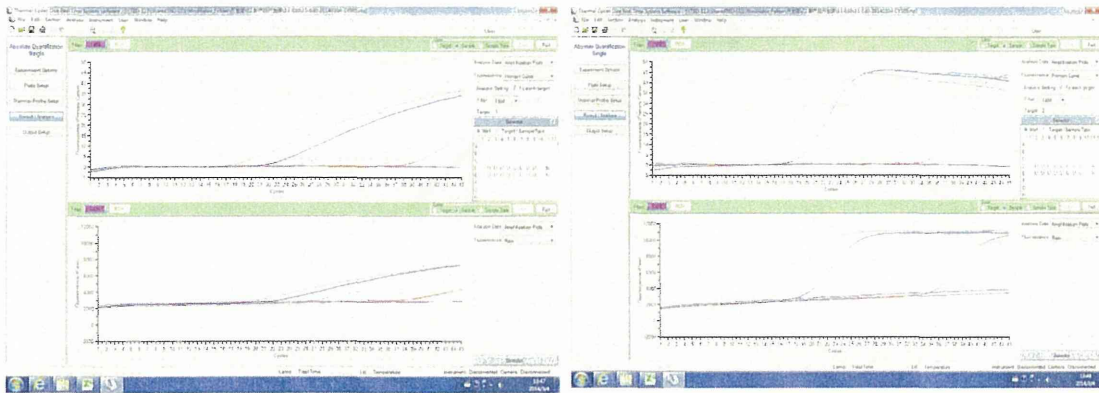
図6 : Cycleave-ICAN 法による HBV ウイルスゲノム DNA 検出のための反応条件

Cycleave PCRによるHBVの検出

DNA プライマー

HBV_Probe1_FAM

HBV_Probe2_FAM



Cycleave PCRによる検出感度は10 copy
HBV_Probe2の方が切断効率が良い。

図7： Cycleave-ICAN 法による HBV ウイルスゲノム DNA 検出

Primer、Probeの設計 _ HCV

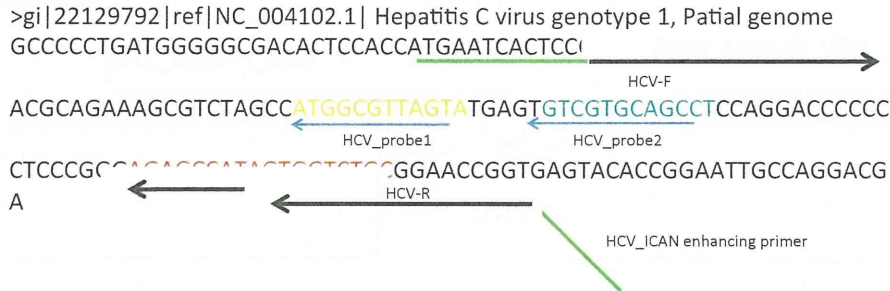


図 8 : HCV ウイルスゲノム DNA 配列増幅可能領域および Cycleave RT-ICAN 法で用いた primer の設定領域

Primer、Probeの反応確認_HCV

Primer, Probe set 1

ICANF ; HCV_F
CTGTGAGGAACTACTGTC(UUC)
ICANR ; HCV_R
GCAGACCACTATGGC(UCU)
Probe ; HCV_probe1
Eclips-TACT(A)ACGCCAT-Rox

Primer, Probe set 2

ICANF ; HCV_F
CTGTGAGGAACTACTGTC(UUC)
ICANR ; HCV_R
GCAGACCACTATGGC(UCU)
Probe ; HCV_probe2
Eclips-AG(G)CTGCACGAC-Rox

(斜字)はRNA

Primer, Probe set 3

HCV_ICAN enhancing primer
gggagtgattcaCTCACCGTTCCGACACCA
ICANF ; HCV_F
CTGTGAGGAACTACTGTC(UUC)
ICANR ; HCV_R
GCAGACCACTATGGC(UCU)
Probe ; HCV_probe1
Eclips-TACT(A)ACGCCAT-Rox

Primer, Probe set 4

HCV_ICAN enhancing primer
gggagtgattcaCTCACCGTTCCGACACCA
ICANF ; HCV_F
CTGTGAGGAACTACTGTC(UUC)
ICANR ; HCV_R
GCAGACCACTATGGC(UCU)
Probe ; HCV_probe2
Eclips-AG(G)CTGCACGAC-Rox

図 9 : HCV ウイルスゲノム DNA 検出用 Cycleave RT-ICAN 法で用いた primer 配列情報

Primer、Probeの反応確認_HCV

ICAN反応

HCV plasmid DNA (pCMV-3010) 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , NTC
ICAN buffer
ICAN F primer(1uM)
ICAN R primer (1uM)
ICAN enhancing primer(0 or 0.04uM)
Cycling probe (0.2uM)
BcaBEST DNA Pol. 11U
Tli RNaseH 3.75U 7.5U 15U/25ul
55C, 90min

図 1 1 : HCV ウイルスゲノム DNA 検出用 Cycleave RT-ICAN 法の確認反応条件

Primer、Probeの反応確認_HCV

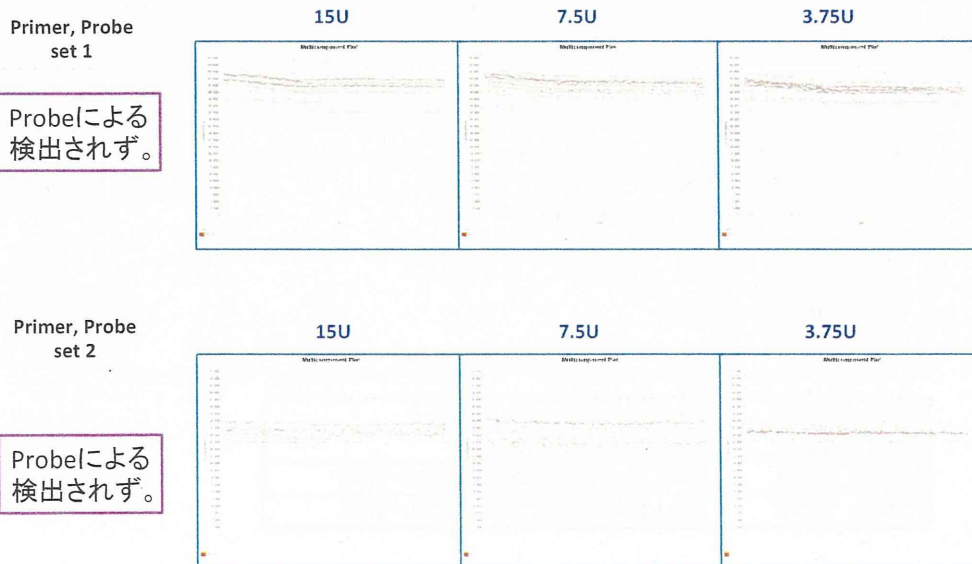


図 1 2 : HCV ウイルスゲノム DNA 検出用新規アルゴリズムにより設計した Primer,Probe ペアを用いた Probe 発色検出による qPCR 試験

Primer、Probeの反応確認_HCV

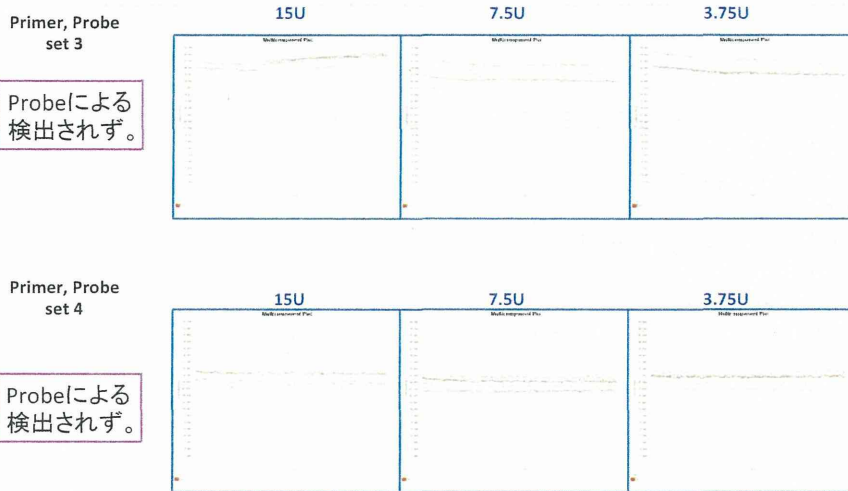


図 1 3 : HIV-detective Ladder forming RT-ICAN 法にて Primer, Probe 設計に成功したアルゴリズムをベースに設計した Primer, Probe を用いた Probe 発色検出による qPCR 試験

Cycleave PCRによるHCVの検出

PCR

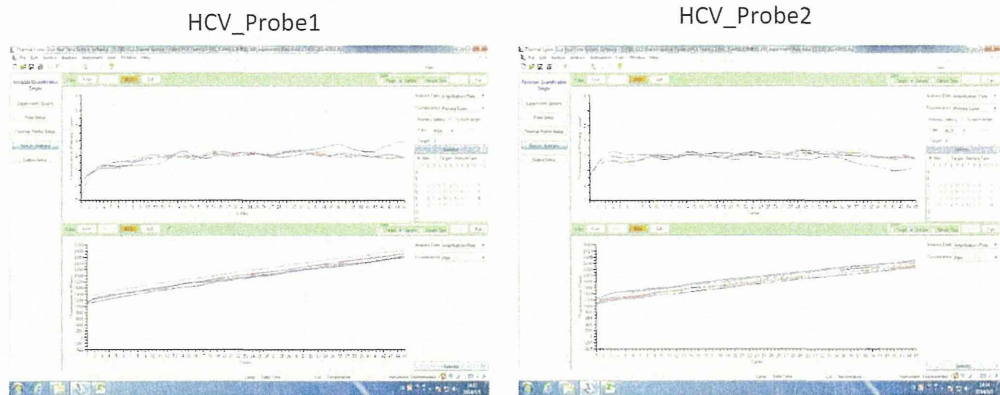
HCV plasmid DNA (pCMV-3010) 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , NTC
 Cycleave PCR Reaction Mix
 PCR F primer(0.2uM)
 PCR R primer (0.2uM)
 HCV_Probe1 or HCV Probe2 (0.2uM)

95 °C, 30sec
 95 °C, 5sec
 55 °C, 10sec
 72 °C, 20sec } 45 cycles

PCR_HCV-F	ctgtgaggaactactgtc
PCR_HCV-R	gcagaccactatggc
Probe_HCV1	Eclips-TACTaACGCCAT-ROX
Probe_HCV2	Eclips-AGgCTGCACGAC-ROX

図 1 4 : Cycleave-ICAN 法による HBV ウイルスゲノム DNA 検出のための反応条件

Cycleave PCRによるHCVの検出



Probe設定精度を上げててもCycleave PCRにおいてHCVの検出が難しい。

図 1 5 : Cycleave-ICAN 法による HBV ウイルスゲノム DNA 検出

SYBR PCRによるHCVの検出

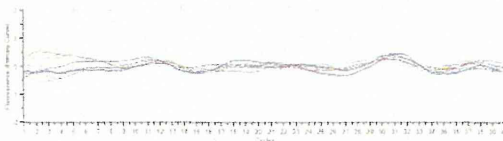
方法

HCV plasmid DNA (pCMV-3010) 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , NTC
 SYBR Premix ExTaq (Tli RNaseH Plus)
 PCR F primer(0.2uM)
 PCR R primer (0.2uM)

PCR HCV-F_long	actccctgtgaggaactactgtc
PCR HCV-R_long	accggtlccgcagaccactatggc

95 °C, 30sec
 95 °C, 5sec } 40 cycles
 60 °C, 30sec }

結果



本Primer setにおいて、PCR増幅が確認できない。

図 1 6 : Cycleave-ICAN 法による HBV ウイルスゲノム DNA 検出

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

（分担研究課題名）細胞・組織加工製品の免疫原性制御法の開発

研究分担者 掛樋一晃 近畿大学薬学部・薬学総合研究所

研究要旨：細胞・組織加工製品を用いた再生医療は、有効な治療法に乏しい疾病・損傷に対する有効な治療法として期待され、世界的にも研究・開発競争が熾烈となっている。一方、再生医療の開発競争においてわが国が主導的地位を得るためには、細胞・組織加工製品の品質と安全性に関する汎用性の高い評価技術の開発を行い、高品質で安全性及び有効性の高い製品を開発するための周辺基盤技術の開発が急務となっている。

細胞・組織加工製品の安全性と品質の確保を図る上で、各種幹細胞の樹立時や未分化能維持の目的で異種動物由来成分を使用する場合においては、最終製品においても異種動物由来成分混入の有無を確認することと、混入しうる異種動物由来成分とその原因を明らかにしておく必要がある。これらの周辺基盤技術は、細胞・組織加工製品の汎評価技術・製造法の開発にも繋がり、高品質で安全性及び有効性の高い製品の開発・実用化を国内で推進し、我が国における再生医療早期実用化を促進する基盤となりうる。平成25年度研究では「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加え、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した結果について報告する。

A. 研究目的

治療効果を有する細胞を直接あるいは増殖、薬剤処理、遺伝子改変を行い治療目的のための細胞を作製し体内に移植する「再生医療」分野で、その技術の実用化に向けた研究が活発となっている。一方、「再生医療」の実用化に向けては、製品の品質や安全性等を確保する上で、原材料としての細胞、中間製品としての細胞、最終製品としての特定の細胞、あるいは混在する可能性がある細胞や成分の特性を把握し、細胞の品質を管理する方法論の確立が急務となりつつある。

iPS細胞などの各種幹細胞の臨床応用に向けては細胞治療材料としての有用性だけでなく、異種動物由来成分等の混入による免疫原性などの安全性の面において、解決すべき問題も残されている。我々は、前年度までに、異種動物由来成分を含む培養環境下、培養された幹細胞

に、ヒトでは発現が認められないN-グリコシルノイラミン酸（NeuGc）や α Galエピトープ（Gal α 1-3Gal）が観察されることを明らかにした。また、その混入原因が培養液添加物として使用する血清代替物（Knockout Serum Replacement:KSR）あるいはマイトマイシンC処理したMouse Embryonic Stem Cell（MEF）である可能性を示した。一方、iPS細胞は起源細胞より樹立されることから、起源細胞のiPS化に伴うglycosylation machineryの変化、起源細胞からの異種動物糖鎖の持ち込みについても考慮が必要である。このように異種動物抗原糖鎖は、細胞培養工程で使用される異種動物由来の血清やその他に起因すると考えられ、混入原因については不明な点が多い。幹細胞製品がヒト体内に移植されることを考えた場合、免疫原性を示しうる異種動物抗原糖鎖を検出する方法を開発するとともに、現行の方法で製造さ

れた各種幹細胞への異種動物抗原糖鎖混入の有無を確認しそれらの混入原因を明らかにしておくことは、安全性の高い細胞加工製品の開発・実用化を国内で推進するための基盤として重要である。

以上のような背景の下、本年度は異なる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結果について報告する。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

B1. 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°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。

B2. 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°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。

B3. 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。

B4. 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NaBH₃CN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 μl加えて80°Cで1時間加温した。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。

B5. 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 μLと0.2 M HCl (10 μL)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 μL)加え、50°Cで150分間誘導体化反応を行った。反応後、10 μL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。

B6. セロトニンアフィニティークロマトグラ