

## 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。

## B7. 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。

## B8. 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

### C1. 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 を用い分析した。シアル酸の分子種分析を行った結果を Fig. 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。

### C2. 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 細胞をマウスフィーダー細胞 (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て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 1 に示す。いずれの細胞においても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、ヒト細胞内では生合成されない。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.2 に示す。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)。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

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

本研究では糖鎖を指標として、ヒト細胞中の異種動物抗原糖鎖の混入ならびに混入原因について調査するとともに、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。糖鎖は動物種特異的であり、ヒト以外の動物種でのみ発現する幾つかの糖鎖は、iPS 細胞への異種動物成分混入を評価する指標として有用性が高いと言える。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Iwatsuka K, Iwamoto H, Kinoshita M, Inada K, Yasueda SI, Kakehi K.

Comparative Studies of N-Glycans and Glycosaminoglycans Present in SIRC (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea) Cells and Corneal Epithelial Cells from Rabbit Eyes. Curr. Eye Res. 2014 in press.

Kinoshita M, Mitsui Y, Kakoi N, Yamada K, Hayakawa T, Kakehi K.

Common glycoproteins expressing poly-lactosamine-type glycans on matched patient primary and metastatic melanoma cells show different glycan profiles.

J. Proteome Res. 2014 **13**(2), 1021-1033.

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 **1309**, 76-83.

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 **928**, 16-21.

### 2. 学会発表

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

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

2013年8月 第32回日本糖質学会年会

ヒトロタウィルス感染機構の解明に向けたグライコミクス解析

山田佳太、栢原春奈、稲垣瑞穂、金丸義敬、矢部富雄、鈴木徹、中込治、中込とよ子、木下充弘、掛樋一晃

2013年8月 第32回日本糖質学会年会

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

神末和哉、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

2013年11月 第33回キャピラリー電気泳動シンポジウム

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

木下充弘、鈴木茂生、早川堯夫、掛樋一晃

2014年3月 第134年回日本薬学会年会

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

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

2014年3月 第134年回日本薬学会年会

## 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

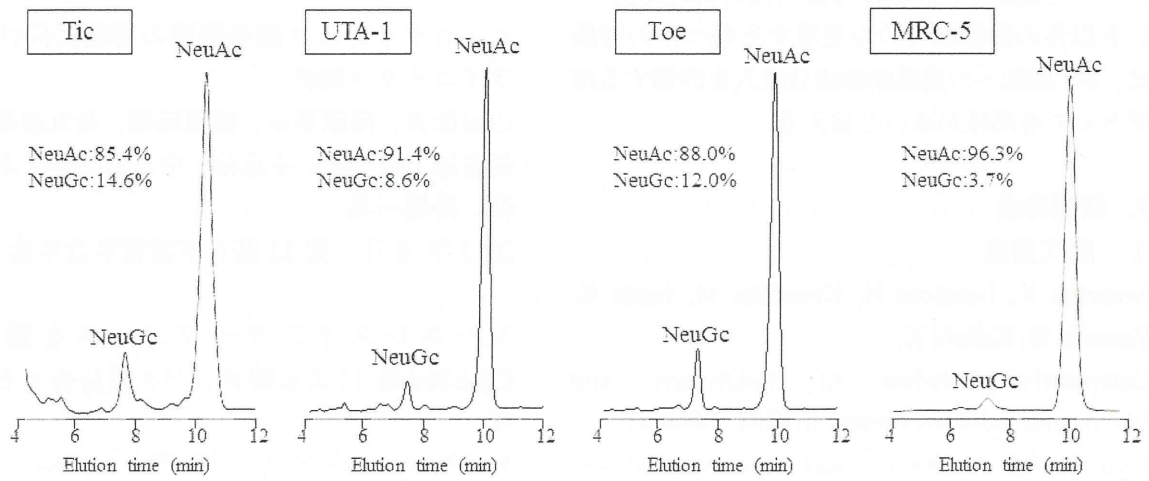


Fig.1. HPLC chromatogram of sialic acid analysis.

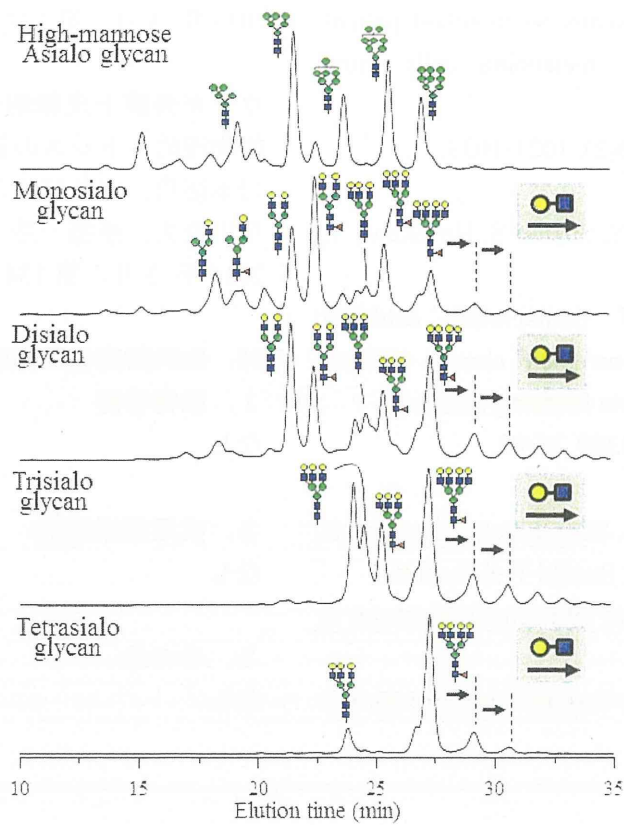
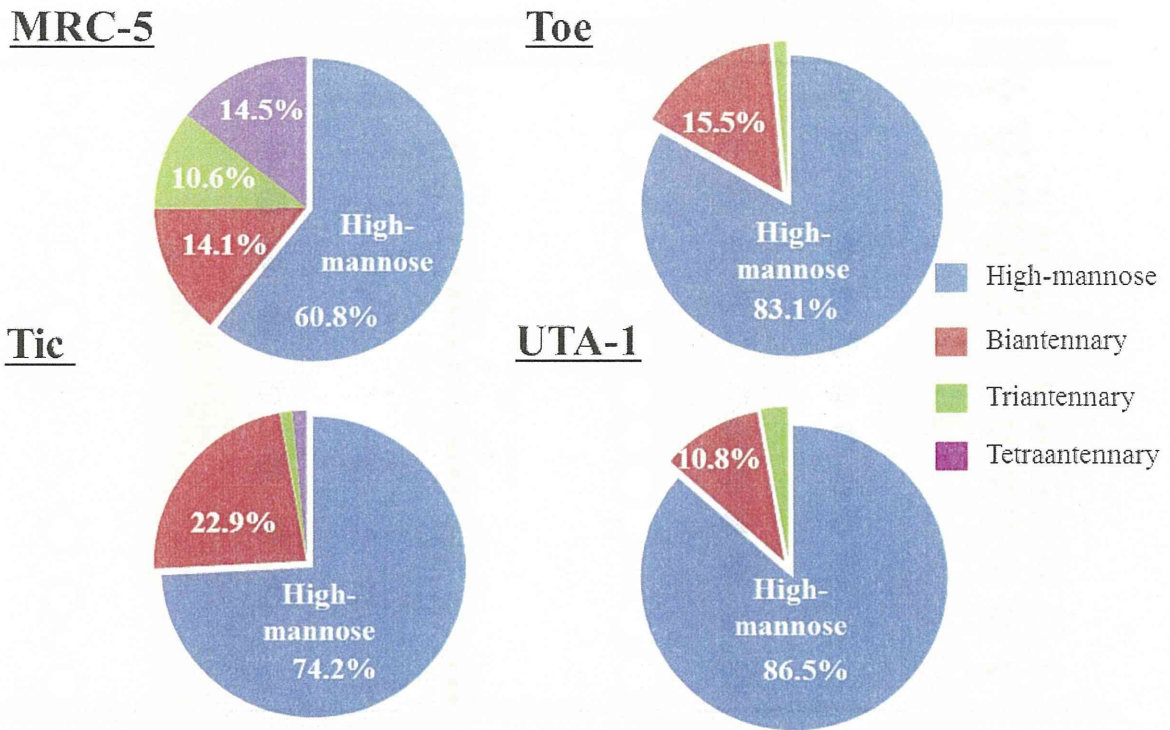


Fig.2. NP-HPLC analysis N-glycans expressed in MRC-5 cells

a) Relative abundances of high-mannose-type and complex-type N-glycans



b) Relative abundances of fucosylated and nonfucosylated glycans in complex-type N-glycans

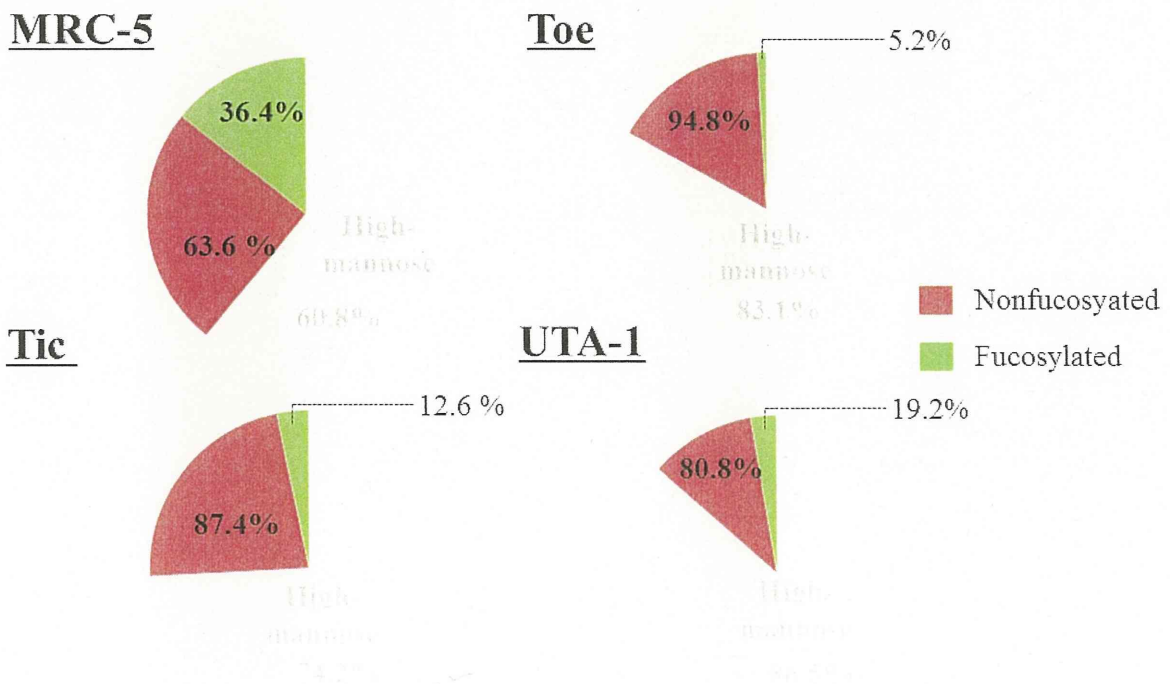


Fig.3. Characteristics of N-glycans expressed in three iPS and MRC-5 cells

Table 1. Expression of N-glycans in three iPS cells cultured with nonhumanized conditions

Structure	Tic	Toe	UTA-1	Structure	Tic	Toe	UTA-1
	●	●	●		●	●	●
	●	●	●		●	-	●
	●	●	●		●	-	-
	●	●	●		●	●	●
	●	●	●		●	-	●
	●	●	●		●	-	●
	●	●	●		●	-	-
	●	●	●		●	-	-
	●	●	●		●	-	●
	●	●	●		●	-	●
	●	●	●		●	-	●
	●	●	●		●	-	●
	●	●	●		●	-	●
	●	●	●		●	-	●
	●	●	●		●	-	●
	-	●	●		-	-	●
	-	●	●		-	-	●

## 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
中島啓行, 安田智, <u>佐藤陽治</u>	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	2013	61-68
田埜慶子, 草川森士, <u>佐藤陽治</u>	細胞・組織加工製品の製造における造腫瘍性評価	技術情報協会	再生医療における臨床研究と製品開発	技術情報協会	東京	2013	印刷中
安田智, <u>佐藤陽治</u>	再生医療製品の品質関連規制と対応の留意点	技術情報協会	動物細胞の培養を成功させる条件設定集	技術情報協会	東京		印刷中
Kuroda T, Yasuda S, <u>Sato Y.</u>	In vitro detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells.	Kioussi C.	<i>Methods in Stem Cells and Tissue Repair</i>	Springer			In press
<u>佐藤陽治</u>	再生医療／細胞治療における細胞培養に関する規制	紀ノ岡正博	再生医療の細胞培養技術開発と応用展開	シーエムシー出版	東京		印刷中
佐藤大作, <u>佐藤陽治</u>	規制関連	日本再生医療学会	再生医療用語集	メディカルトリビューン	東京		印刷中

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
<u>Sato Y</u> , Tsutsumi H, Sawada R, Suzuki T, Yasuda S.	Regulatory science research to facilitate the development of cell/tissue-proceed products.	<i>Bull Natl Inst Health Sci</i>	131	16-19	2013
五十嵐友香, <u>佐藤陽治</u>	再生医療製品の造腫瘍性・悪性腫瘍形成能の評価	<i>医学のあゆみ</i>	246	1069-70	2013
田埜慶子, <u>佐藤陽治</u>	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	<i>レギュラトリーサイエンス学会誌</i>	4	71-7	2014
Kanemura H, Go MJ, Nishishita N, Sakai N, Kamao H, <u>Sato Y</u> , Takahashi M, Kawamata S.	Pigment epithelium-derived factor secreted from retinal pigment epithelium facilitates apoptotic cell death of iPSC.	<i>Sci Rep</i>	3	2334	2013
<u>佐藤陽治</u>	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 <i>in vitro</i> 造腫瘍性評価系の開発	<i>薬学雑誌</i>	133	1381-8	2013
村岡ひとみ, <u>佐藤陽治</u>	再生医療・細胞治療の臨床研究から実用化までの道のり	<i>老年医学</i>	52(3)	237-239	2014
草川森士, <u>佐藤陽治</u>	再生医療製品の造腫瘍性評価	<i>最新医学</i>			印刷中
<u>佐藤陽治</u>	ヒト iPS 細胞由来移植細胞の製造管理のための <i>in vitro</i> 造腫瘍性評価系の開発	<i>Cytometry Research</i>			印刷中
Moriyama M, Moriyama H, Uda J, Matsuyama A, Osawa M, <u>Hayakawa T</u> .	BNIP3 Plays Crucial Roles in the Differentiation and Maintenance of Epidermal Keratinocytes.	<i>J Invest Dermatol</i>			Epub ahead of print
Moriyama H, Moriyama M, Isshi H, Ishihara S, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, <u>Hayakawa T</u> .	Role of Notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions.	<i>STEM CELLS &amp; DEV</i>			In press



Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, <u>Hayakawa T</u>	Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem cells by lentivirus with tet-off system.	<i>PLoS ONE</i>	8(6)	e66274	2013
Takayama K, Nagamoto Y, Mimura N, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, <u>Hayakawa T</u> , Kawabata K, Mizuguchi H	Long-Term Self-Renewal of Human ES/iPS-Derived Hepatoblast-like Cells on Human Laminin 111-Coated Dishes.	<i>Stem Cell Reports.</i>	3;1(4)	322-335	2013
Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Inamura M, Ohashi K, Okuno H, Yamaguchi T, Tashiro K, Sakurai F, <u>Hayakawa T</u> , Okano T, Furue MK, Mizuguchi H	CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF $\beta$ receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision.	<i>Development</i>			Epub ahead of print
Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Kishimoto K, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Kanda K, <u>Hayakawa T</u> , Furue MK, Mizuguchi H.	3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing.	<i>Biomaterials</i>	34(7)	1781-9	2013
Kinoshita M, Nakatsuji Y, Suzuki S, <u>Hayakawa T</u> , <u>Takehi K</u> .	Quality assurance of monoclonal antibody pharmaceuticals based on their charge variants using microchip isoelectric focusing method.	<i>J Chromatogr A</i>	27;1309	76-83	2013
Iwatsuka K, Watanabe S, Kinoshita M, Kamisue K, Yamada K, <u>Hayakawa T</u> , Suzuki T, <u>Takehi K</u> .	Free glycans derived from glycoproteins present in human sera.	<i>J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.</i>	1;928	16-21	2013
Yodoshi M, Iikeda N, Yamaguchi N, Nagata M, Nishida N, <u>Takehi K</u> , <u>Hayakawa T</u> , Suzuki S	A novel condition for capillary electrophoretic analysis of reductively aminated saccharides without removal of excess reagents.	<i>Electrophoresis</i>	34	3198–3205	2013
Kinoshita M, Mitsui Y, Kakoi N, Yamada K, <u>Hayakawa T</u> , <u>Takehi K</u> .	Common Glycoproteins Expressing Polylactosamine-Type Glycans on Matched Patient Primary and Metastatic Melanoma Cells Show Different Glycan Profiles.	<i>J Proteome Res.</i>		[Epub ahead of print]	2013

<p>森山博由, 森山麻里子, <u>早川堯夫</u>.</p>	<p>『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</p>	<p><i>BioMed circus</i></p>	<p>Sept</p>	<p>18</p>	<p>2013</p>
<p>Iwatsuka K, Iwamoto H, Kinoshita M, Inada K, Yasueda SI, <u>Kakehi K</u>.</p>	<p>Comparative Studies of N-Glycans and Glycosaminoglycans Present in SIRC (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea) Cells and Corneal Epithelial Cells from Rabbit Eyes.</p>	<p><i>Curr. Eye Res.</i></p>			<p>In press</p>



## 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。このうち、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を「細胞加工製品」とも呼ばれる。

**造腫瘍性** 動物に移植された細胞が増殖することにより、宿主または患者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積極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>4)</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>1)</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 「ネードマウスなどの動物10匹に10<sup>6</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

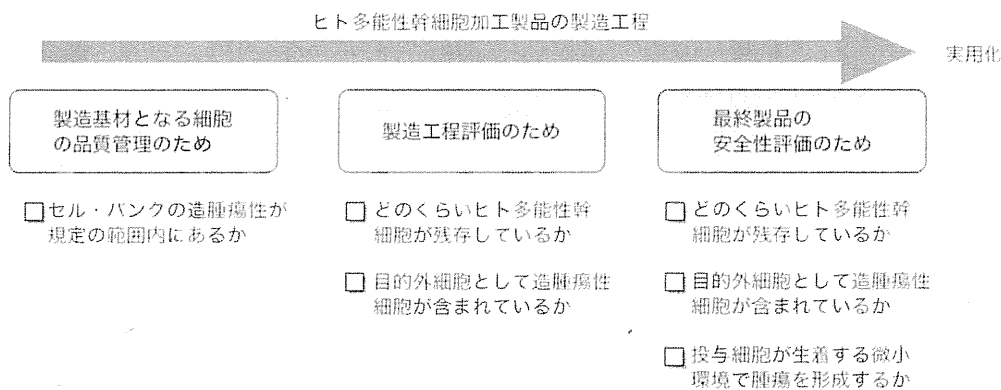


図 造腫瘍性試験が必要な3つの目的と各段階での懸念事項

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ーや定量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、われ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ーでは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 膵がん、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が検出できない(=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が検出できない(=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>1)</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>0/0</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ーム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のような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・製造基材や製品特性・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, E. 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, E. 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

## 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

佐藤陽治<sup>#</sup>, 堤秀樹<sup>\*</sup>, 澤田留美, 鈴木孝昌, 安田智

## Regulatory science research to facilitate the development of cell/tissue-processed products

Yoji Sato<sup>#</sup>, Hideki Tsutsumi<sup>\*</sup>, Rumi Sawada, Takayoshi Suzuki, Satoshi Yasuda

Regenerative medicine is regarded as innovative therapy for severe diseases and damages caused by tissue loss and functional impairment. In Japan, regenerative medicine is one of the most important subjects issued by Council for Science and Technology Policy and also referred to in Medical Innovation of New Growth Strategy. Cell/tissue-processed products are living cells, which have been manipulated or processed for the purpose of regenerative medicine, and are extensively developing. Human somatic cells, somatic stem cells, embryonic stem cells, and induced pluripotent stem cells are cell sources used for regenerative medicine. Since we lack in experiences with cell/tissue-processed products, technical development of safety and quality assessment is urgently needed. National Institute of Health Sciences has carried out a mission of Regulatory Science and worked on safety assessment of pharmaceuticals and medical devices and their guideline development. The objective of our study is to develop safety and quality assessment methods for cell/tissue-processed products derived from stem cells, based on recent progresses in life science. We are currently developing methods to evaluate products as follows; a) useful and quantitative tumorigenicity tests to detect contamination of undifferentiated and/or abnormal cells in products, b) quality assessment by gene expression analysis and detection of genetic stability in a manufacturing process, and c) analysis of quality attributes associated with propensity of undifferentiated cells to set acceptable criteria of cell banks. We will be able to provide indicators to control the quality, efficacy and safety of stem cell-processed products and support efficient and economical promotion of the products. Especially, this study would help translate stem cell science into therapeutic products to patients with severe and life-threatening diseases, consequently contributing to administrative policy of Ministry of Health, Labor and Welfare.

Keywords: cell/tissue-processed products, induced pluripotent stem (iPS) cells, regenerative medicine

## 研究目的

再生医療は、身体の一部の機能不全や欠損による重篤な疾患や障害を治療できる革新的な方法として注目されており、総合科学技術会議の提言や「新成長戦略」のメディカルイノベーションなどにおいても最重要課題とさ

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed:

Yoji Sato; Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501; Tel: +81-3-3700-9373; Fax: +81-3-3700-9373; E-mail: yoji@nihs.go.jp

<sup>\*</sup> Testing Services Department, Central Institute for Experimental Animals

れている。平成25年1月11日閣議決定の『日本経済再生に向けた緊急経済対策』でも、iPS細胞等を用いた再生医療等に係る研究開発・実用化を支援する環境整備に取り組むことが明記されている。平成25年2月には再生医療等の新規医療産業の国際競争力を高める司令塔機能として、内閣官房に『健康・医療戦略室』が設置された。また、平成25年4月26日成立の『再生医療推進法』には、再生医療の迅速かつ安全な研究開発及び提供並びに普及の促進に関する施策を総合的に策定及び実施する責務を国が有することが示されている。

再生医療（や細胞治療）に使用することを目的に生きた細胞を加工して製造される製品は細胞・組織加工製品と呼ばれ、国内外で活発に研究・開発が行われている。

細胞ソースとしてはヒト体細胞に加え、近年ではヒト体性幹細胞、胚性幹細胞（ES細胞）などの幹細胞が対象とされてきている。また最近、生命倫理的な問題や免疫学的な拒絶をクリアできると考えられる人工多能性幹細胞（iPS細胞）が登場し、再生医療が社会的に大きな期待を集めている。しかしながら細胞・組織加工製品は、臨床使用経験が少ないために知見の蓄積も乏しく、国内指針やICH、WHOなどの生物製剤製造国際ガイドライン等にある従来の品質・安全性評価法が役立つないケースが頻出しており、新たに適切な評価技術を樹立することが火急の課題となっている。本研究では、新たなガイドライン作成に資する細胞・組織加工製品、特に幹細胞加工製品の品質・安全性評価法の開発を行うことを最終目的とする。具体的には、幹細胞の加工過程における未分化細胞／異常細胞の混入は、幹細胞加工製品においてがん化を引き起こすとして最も懸念される。最終製品に含まれるこれらの細胞の高感度かつ定量的な測定方法は開発が遅れている。そこで、本研究では汎用性・定量性のある幹細胞加工製品の造腫瘍性試験法の開発を目指した実験研究を展開する。また細胞の培養・加工過程での細胞の形質安定性も考慮に入れる必要があることから、培養工程での遺伝子発現の動態解析による品質評価および遺伝子安定性評価法の開発に関する研究を行う。さらに安全性上の懸念として、ヒト多能性幹細胞株間での各種目的細胞への分化のし易さ（分化プロベンシティ）のバラツキがある。原材料の細胞の分化プロベンシティの情報は細胞株の選択に必要な不可欠であり、その評価系は最終製品を見据えた細胞バンクの構築に必要である。未分化細胞において分化プロベンシティの評価系を含んだ細胞特性解析法を確立することにより、幹細胞由来加工製品の品質の一定性・有効性・安全性のさらなる確保に繋がることを期待される。

#### 行政への貢献

本研究の成果により幹細胞加工製品の有効性・安全性に関する品質評価に必要な指標・試験法が示され、製品の迅速かつ経済的な開発を推進することが可能になることにより、特に治療困難な重篤な疾患に対して期待の大きい再生医療・細胞治療が実用化され普及することに貢献できる。国民に安全かつ有用性の高い再生医療・細胞治療をいち早く提供するという厚生労働行政の施策に大きく寄与するものと考えられる。具体的には、以下のことが挙げられる。1) 幹細胞加工製品の合理的な製法、工程管理に必要な要件、品質評価方法の確立に貢献できる。2) 均一性・再現性を確保するための原材料（幹細胞株／バンク）のあり方において、より合理的な規格の設定が可能となり、適切な開発が推進される。3) 生命

科学の進歩に見合ったガイドラインや基準の策定及び改訂に役に立つ。4) 幹細胞加工製品の科学的規制に関する国際調和に貢献できる。5) 幹細胞加工製品の先進性、有用性に関する理解が深められる。

#### 研究の進捗状況

平成24年度の研究としては、1. 「汎用性・定量性のある幹細胞加工製品の造腫瘍性試験法の開発を目指した実験研究」として、新規免疫不全動物NOGヘアレスマウスを用いた造腫瘍性試験法の開発にむけた動物コロニーの拡大、および試験方法の条件検討を行った。2. 「培養工程での遺伝子発現の動態解析に基づく品質・安全性評価指標の開発に関する研究」として、幹細胞の*in vitro*培養工程における遺伝子発現の動態解析による品質評価技術の開発を行い、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞のがん化と相関すると予想される遺伝子に関する機能解析を行った。3. 「製造工程における遺伝子安定性評価法の開発に関する研究」として次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析の性能評価を行った。また、4. 「幹細胞（未分化細胞）における分化プロベンシティの評価系の開発に関する研究」として、ヒト多能性幹細胞の分化プロベンシティを予測するための指標の同定の基盤となるデータの収集を行った。

#### 1. 新規免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験法の開発

我々は、重度免疫不全動物であるNOGマウスとヌードマウスにおけるHeLa細胞単独、あるいはマトリゲルとの混合物のTPD<sub>50</sub>（投与した動物の半数で腫瘍を形成するために必要な細胞数）を検討し、マトリゲルに検体細胞を懸濁してNOGマウスに投与することにより、ヌードマウスを用いた従来の国際ガイドラインにある方法より数千倍高感度で腫瘍細胞を検出することが可能であることを示すデータを得ている。実験動物中央研究所では、このNOGマウスをヘアレス化した系統を樹立しており、NOGマウスと同様の条件において造腫瘍性細胞の検出能力の検討を行った（その際の動物は、体外受精させた胚を仮親に移植して大量生産する手法を用いて作出した80匹以上の同一週齢雄動物を用いた）。雄NOGヘアレスマウスにおけるHeLa細胞のTPD<sub>50</sub>は、ヌードマウスの1/11 ( $3.7 \times 10^4 / 4.2 \times 10^5$ )、マトリゲルを混合した場合は1/2000 ( $2.1 \times 10^2 / 4.2 \times 10^5$ )であり、NOGマウスにおけるそれらよりも高値であった。これは、導入したヘアレス遺伝子がBalb/cマウス由来であり、免疫不全度が僅かながら低下したことによると推測された。NOGヘアレスマウスはNOGマウスと比較し、目視・触診による腫瘍形成の検出が容易であり、造腫瘍性試験の効率化が期待される。