

201306005B

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23～25年度 総合研究報告書

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 23～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 佐藤 陽治

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

	頁
I. 総合研究報告書	
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
研究代表者 佐藤 陽治	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	85
III. 研究成果の刊行物・別刷	97

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 23-25 年度 総合研究報告書

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。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、陽性対照として HeLa 細胞を用い、各試験系を評価した。NOG マウスに対しマトリゲルに懸濁した状態で HeLa 細胞を移植した場合、既存の国際ガイドライン（WHO TRS 878）推奨のヌードマウスを用いた方法と比べ、およそ 5 千倍検出感度が高かった。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、hMSC 中に混入した HeLa 細胞の検出能力を検討したところ、 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。この時の、 TPD_{50} 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。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。なお、iPS 細胞由来ヒト網膜色素上皮細胞（RPE）への軟寒天コロニー形成試験の適用可能性に関し検討したところ、RPE に混入する造腫瘍性細胞の検出限界は、その足場非依存性増殖能力がテラトカルシノーマ由来 PA-1 細胞と同等と仮定した場合、混入率にして約 1%であることが明らかとなった。②感染リスク排除対策として、無血清・フィーダー細胞フリーで iPS 細胞株を樹立し、維持できることの汎用性を確認した。次に、汎用されている定量的 PCR 法ではウイルス由来核酸を含む細胞の一部しか検出できない問題が未解決であることから、その抜本的解決を目指し、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を可能とする等温遺伝子増幅法(ICAN 法)の改良を行った。その結果、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)の開発に成功した。この方法により、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。さらに、検出対象とできるウイルス種の拡充を図るため、ヒト肝炎ウイルス（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）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。その結果、HCVについては、全ウイルスゲノム情報における Ladder forming RT-ICAN 法の特異的プライマー設定アルゴリズムの絞り込みに至った。一方、HBVについては、Ladder forming RT-ICAN 法の開発に成功し、 $10^3\sim 10^7$ コピーの感度までの検出効率を達成するに至った。これらの研究成果により、感染検体に含有される全核酸を対象とした、ヒト免疫不全ウイルス、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)の開発に成功した。③免疫原性となりうる iPS 細胞中の異種動物糖鎖の解析およびそれらの混入を低減するための方策、複数種の iPS 細胞ならびにその起源細胞の糖鎖プロファイルに基づいた細胞の均質性・同等性評価の実行可能性について検証した。【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
西川 伸一	(公財) 先端医療振興財団 副理事長
高橋 政代	(公財) 理化学研究所 網膜再生医療研究開発プロジェクト プロジェクトリーダー
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。

①がん化の抑制技術－「造腫瘍性」(tumorigenicity)とは、動物に移植された細胞集団が増殖することにより悪性または良性の腫瘍を形成する能力を言う。本研究では、ヒト幹細胞加工製品を中心に、細胞・組織加工製品において重要な品質管理上および安全性上の関心事である造腫瘍性に焦点を当て、製品中への造腫瘍性細胞の混入を *in vitro* および *in vivo* で高感度に評価する方法の有用性に関する評価を行ってきた。具体的には、*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として、造腫瘍性細胞としてのHeLa細胞のNOGマウスにおける生着性を、国際的な造腫瘍性試験のガイドラインであるWHO TRS 878で推奨される方法（ヌードマウスを用いた方法）と比較検討した。また、細胞・組織加工製品のモデルケースとしてヒト骨髓間葉系幹細胞（hMSC）を取り上げ、hMSC中に造腫瘍性細胞が混入していることを想定

し、本研究で開発した NOG マウスを用いた方法における造腫瘍性細胞 (HeLa 細胞) の検出感度を検討した。 *In vitro* の造腫瘍性細胞検出系としては、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検出の性能評価を行うとともに、iPS 細胞由来ヒト網膜色素上皮細胞 (RPE) への軟寒天コロニー形成試験の適用可能性を検討した。

②感染リスク・汚染の排除技術—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挙げられる。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。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にて iPS 細胞株が樹立・維持が可能であるかを検討し、iPS 細胞樹立と維持系の汎用性を確認し、一般化するに至った。

また現在までにさまざまなウイルス否定試験法が用いられているが、従来から汎用されている定量的 PCR 法 (汎用的 qPCR 法) の問題を明らかにすべく、その実際の検出感度 (限界値) を確認したところ、汎用的 qPCR 法の一般的な反応系に当たる 1 反応分においては、50 コピー以上のウイルス由来核酸がないと再現性よく確実に増幅反応がなされないことが明らかになった。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、その改良に着手した。平成 24 年度には微量のモデルウイルス核酸をスパイクさせた細胞からの核酸回収法と ICAN 法を改良したウイルス遺伝子特異的等温増幅法 (Ladder forming RT-ICAN 法) のプロトタイプ (HIV 遺伝子検出を可能とする Ladder forming RT-ICAN 法) の開発に成功した。平成 25 年度には 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、HBV に

ついては、Ladder forming RT-ICAN 法の開発に成功し、10 コピーの感度までの検出効率を達成するに至った。

③免疫原性の低減に繋がる周辺基盤技術—iPS 細胞などの各種幹細胞の樹立段階さらに未分化能を維持するために、異種動物由来成分を含む培養環境下で培養されるが、それらの成分が幹細胞に混入し、抗原性を示すとともに、移植された細胞周辺において炎症状態を惹起する危険性がある。再生医療に用いる各種幹細胞の培養時に混入し、ヒトにおいて免疫原性を示しうる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 α Gal エピトープ (Gal α 1-3Gal) が知られている。いずれもヒト細胞内にこれらの生合成にかかわる酵素がないにも関わらず、細胞を基材として用いて生産される糖タンパク質性バイオ医薬品中に散見される。このような異種動物抗原糖鎖の存在は、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るものの、混入原因や混入経路については不明な点が多い。我々は以下の点に的を絞り、再生医療早期実用化促進及び安全性向上のための基盤研究を実施した。すなわち、i) iPS 細胞の培養基材中の異種動物抗原糖鎖の解析、ii) iPS 細胞への異種動物抗原糖鎖の混入低減のための方策、iii) 糖鎖発現情報に基づく細胞の特性解析について研究を行った。

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) および BALB/cAJcl-nu/nu (ヌードマウス) 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。2 系統ともに 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 HeLa 細胞単回投与造腫瘍性試験

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 中にて培養・継代した。細胞は培地 (MEM+10%ウシ胎児血清+ペニシリン/ストレプトマイシン) またはマトリゲルに懸濁し, その 100 μ L 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。以下の 14 群について投与後の結節形成を 16 週間観察した: ①NOG (細胞懸濁培地投与): 細胞用量 5 点 (0, 10², 10³, 10⁴, 10⁵; 各 10 例), ②NOG (細胞懸濁マトリゲル投与): 細胞用量 5 点 (0, 10, 10², 10³, 10⁴; 各 10 例), ③ヌードマウス (細胞懸濁培地投与): 細胞用量 4 点 (0, 10⁴, 10⁵, 10⁶; 各 10 例)。

B-1-3 hMSC 中に混入する HeLa 細胞の NOG マウスによる検出

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 10⁶個に

対し, HeLa を 0%, 0.001%, 0.01%, 0.1%, 1% (0, 10¹, 10², 10³, 10⁴ cell) 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 μ L (細胞総数 10⁶個/100 μ L) 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)。また, hMSC 10⁷個に対し, HeLa 細胞を 0%, 0.0001%, 0.001% (0, 10¹, 10² 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 μ L (細胞総数 10⁷個/100 μ L) 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-1-4 hMSC の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 μ l の 2x DMEM を予め加温し, 1.2%寒天水溶液 25 μ 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 $^{\circ}$ 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 μ l と, 20%FBS を含む 25 μ l の 2x DMEM および 25 μ 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 $^{\circ}$ C で 10 分間放置し, 上部寒天層を急速に固化させた。100 μ l の 10% FBS 含有 DMEM を各ウェルに添加し, プレ

ートを 37°C, 5%CO₂ 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-1-5 iPS 細胞由来分化細胞の軟寒天コロニー形成試験

B-1-5-1 細胞培養

Oct3/4, Sox2, Klf4 および c-Myc の遺伝子を導入して作成されたヒト由来 iPS 細胞株 201B7 は, 理研バイオリソースセンターより入手した. 未分化なヒト iPS 細胞は, マイトマイシン C 処理した SNL 細胞 (マウス線維芽細胞 STO 株にネオマイシン耐性遺伝子および LIF を発現させた細胞) 上において, 4ng/ml ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF; 和光純薬) を添加したヒト ES 細胞培地 (リプロセル) 中にて培養した. 未分化な細胞コロニーは, CTK 溶液 (リプロセル) および STEMPRO EZPassage (インビトロジェン) を用い, 5-6 日ごとに小さな細胞塊 (クランプ) として継代した. 正常体細胞のモデルケースとして使用した初代培養ヒト網膜色素上皮細胞 (RPE) 細胞は, Lonza 社および ScienCell Research Laboratories 社から入手した. 初代培養ヒト RPE 細胞は, 添加剤 (L-グルタミン, GA-1000, bFGF; Lonza 社) を添加した網膜色素上皮細胞基本培地 (Lonza 社) 中で維持培養した. ヒト卵巣テラトカルシノーマ由来 PA-1 細胞 (ATCC) は, 10%ウシ胎児血清 (FBS; Gibco) を含む MEM イーグル培地 (シグマ-アルドリッチ) 中で維持培養した. 全ての細胞株および分化細胞は 5%CO₂-95%大気, 37°C の条件で培養した.

B-1-5-2 ヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞の調製

ヒト iPS 細胞から RPE 細胞への分化は Osakada ら (2009) の方法に従った. その概略を Figure 1-9 に示す. ヒト iPS 細胞の細胞クランプをまず, ポリ L リジン/ゼラチンでコートしたディッシュに播き, 10 μM Y-27632 (和光純薬), 5 μM SB431542 (シグマ-アルドリッチ) および 3 μM CKI-7 (シグマ-アルドリッチ) を添加したヒト ES 細胞培地中で 1 日間, 培養した. 次に細胞を, 20% Knockout Serum Replacement (KSR; インビトロジェン) を含む分化培地 (グラスゴー MEM [GMGM; インビトロジェン], 0.1mM 非必須アミノ酸, 1mM ピルビン酸ナトリウム, 0.1mM 2-メルカプトエタノール) 中で 4 日間培養した. さらに, 15% KSR 含有分化培地で 6 日間培養し, 最後に 10% KSR 含有分化培地で 11-30 日間培養した. 分化誘導時から 13 日目までは培地に Y-27632 (10 μM), SB431542 (5 μM), CKI-7 (3 μM) を添加し, 14-19 日は SB431542 (5 μM) と CKI-7 (3 μM) だけを添加した. 分化の途中にある細胞を CTK 溶液で剥し, 非接着性ディッシュ (コーニング) 上にて, RPE 維持培地 (B-27 サプリメント [インビトロジェン] および 2mM グルタミン [インビトロジェン] を添加した DMEM:F12 [7:3]) 中で 10 日間培養した. 得られた細胞凝集塊を単離し, Cellstart (インビトロジェン) でコートしたディッシュ上にて, 0.5 μM SB431542 と 10ng/ml bFGF を添加した RPE 維持培地中で培養した. この段階を継代数 1 と定義した. 培地は 2-3 日ごとに交換した.

細胞の形態, RPE 細胞特異的なマーカータンパク質の発現と細胞内分布, および RPE 細胞特異的マーカー遺伝子の発現を初代培養 RPE 細胞と比較することにより, 得られたヒト iPS 細胞由来の分化細胞は RPE 細胞であることを確認した.

B-1-5-3 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 μ l の 2x DMEM を予め加温し、1.2%寒天水溶液 25 μ 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。分散細胞懸濁液は次のように調製した: 201B7 細胞は CTK 溶液でクランプとして剥離し、フィーダー細胞を除く目的で、ゼラチンコートディッシュ上において ROCK 阻害剤の Y-27632 (10 μ M)存在下、37°C で 1 時間のインキュベーションを行った。細胞を遠心分離した後、細胞ペレットをアキュターゼ (ミリポア) により単一細胞にまで分散させた。初代培養 RPE 細胞、ヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞、および PA-1 細胞は、0.25%トリプシン - EDTA 溶液で処理して分散させた。分散させた細胞は 40 μ m のナイロン製セルストレーナーを通した。

一定数の細胞を含む 25 μ l の細胞懸濁液と、20%FBS を含む 25 μ l の 2x DMEM および 25 μ 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 μ l の 10%FBS 含有 DMEM を各ウェルに添加し、プレートを 37°C、5%CO₂ の条件下、10、20 ないし 30 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 ARVosx multilabel counter (パーキンエルマー) を用いて測定した。

B-1-6 統計処理

TPD₅₀ 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-1-7 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 モデルレトロウイルス核酸の作製

HIV-1 ならびに第 3 世代 HIV-1 由来レンチウイルスベクター共通に含まれる配列である 5'LTR の一部とパッケージングシグナル (ψ) を含む配列を、pSPT19 ベクターに組み込んだ。得られたプラスミドを SP6, T7 プライマーを用い、PCR にて増幅し、モデルレンチウイルス核酸を作製するための鋳型を作製した。得られた PCR 産物を鋳型にし、T7 RNA ポリメラーゼを用い、in vitro transcription を行った。in vitro transcription 法にて得られた RNA は DNaseI 処理を十分に行うことで鋳型 DNA を除去した後、Qiagen RNeasy Mini Kit で精製を行い、図 1 に示したモデルレトロウイルス核酸 (single strand RNA) を作製した。

B-2-2 モデルレトロウイルス核酸の定量的 PCR 法を用いた解析

正常ヒト繊維芽細胞由来の total RNA (1×10⁷ 細胞分に相当) にモデルレトロウイルス核酸 (680 base) を 7400 コピー (2.84×10⁻⁹μg) となるように添加した. この混合 RNA を 1 μg ずつ分注し, Qiagen QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit を用いて One Step qRT-PCR を行った. 標的とする増幅配列は, 5'LTR の部分と, φ (psi) 領域に設定することとし, 今回のモデル系に至適なプライマー配列やプライマー長を精査, 検討したうえで, 最終的に以下のプライマー配列の決定に至った.

HIV-1 LTR (F)

5'- CCACTGCTAGAGATTTTCCAC -3'

HIV-1 LTR (R)

5'- TGAGTGCTTCAAGTAGTGTG -3'

HIV-1 psi (F)

5'- CCCGCTTAATACTGACGCTCT -3'

HIV-1 psi (R)

5'- CGACTGGTGAGTACGCCAA -3'

また, 同様に定量的 PCR の反応条件も詳細に検討し, 今回 Bio-Rad 社製 CFX96 thermal cycler を用いた場合の反応サイクル等の至適条件は, 以下の通りに確定した.

50°C 20分	} 45 サイクル
95°C 15分	
94°C 15秒	
60°C 1分	
+ 解離曲線	

B-2-3 ICAN 反応に用いたプライマーとプローブの設計

モデルウイルス核酸の領域中で, 80 bp 増幅領域を 10 塩基間隔で設定し, Mfold software (<http://mfold.rit.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>) を用いて一般的な ICAN 法の条件下 (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, ΔG>-1.0 を今回の検出可能領域とした.

G)を算出し, ΔG>-1.0 を今回の検出可能領域とした.

B-2-4 Ladder Forming RT-ICAN 法

モデルレトロウイルス核酸 (10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹, 10⁰ 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 μL 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 2-1 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-2-5 Cycleave PCR 法

上記逆転写反応産物を 2.5 μL 用い, 25 μL 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 2-2 に記載した. Cycleave PCR 法の原理は図 4 に示した.

B-2-6 細胞

ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor stem cells: hADMPC) は先端医療振興財団の松山晃文先生よりご供与いただいた. hADMPC の維持培地には, 60% DMEM-低グルコース, 40% MCDB-201 (Sigma Aldrich, MO, USA), 1× insulin-transferrin-selenium (HS, GIBCO, NY, USA), 100 mM Ascorbic Acid 2-phosphate (和光純薬, 大阪, 日本), 1 nM

Dexamethazone (Sigma Aldrich), 1×抗菌・抗真菌剤 (nacalai tesque, 京都, 日本), 5% ウシ胎児血清 (Cell culture Bioscience, 東京, 日本), 10 ng/mL Epidermal growth factor (Pepro Tec, NJ, USA) 含有培地を供した。ヒト iPS 細胞は, 国立成育医療センター研究所の梅澤明弘博士の樹立した Tic 細胞を無血清・フィーダー細胞フリーで培養したものを, 独立行政法人医薬基盤研究所の古江・楠田美保博士より提供を受けた。

B-2-7 細胞からの total RNA 抽出

hADMPC と iPS 細胞からの Total RNA は, 約 5×10^6 細胞より, RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出した。方法は Qiagen 社のプロトコールに準拠した。

B-2-8 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, シークエ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-2-9 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ものである。また, ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞及びヒト iPS 細胞 (Tic) はヒト由来検体等であるが, 提供元での倫理委員会で認められているものであり, 今回の用途から考えて, それ以上, 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ーダー細胞 (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。また, iPS 細胞への異種動物抗原糖鎖の混入低減のための方策として, 遺伝子組み換えヒトフィブロネクチン (FN) をコートした培養ディッシュ上で, hESF-GRO (FX) 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。

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°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

各種細胞を 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 血清代替物総タンパク質分画の調製

血清代替物 (Knockout serum replacement: KSR) 25 μ L を限外濾過フィルタ (MWCO 3000) を用いて 12000 g で遠心後, 上清を回収して KSR 総タンパク質とした後, 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総タンパク質とした.

B-3-5 MEF 総タンパク質分画の調製

マウス由来フィブラー細胞 (Mouse embryonic fibroblast: MEF) 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%エタノールで洗浄し総タンパク質とした.

B-3-6 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 μ l 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.

B-3-7 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 μ L と 0.2 M HCl (10 μ 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 μ L)加え, 50°C で 150 分間誘導体化反応を行った. 反応後, 10 μ 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-3-8 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-3-9 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% CH₃COOH/CH₃CN, 溶離液 B に 5% CH₃COOH, 3% Triethylamine/H₂O 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-3-10 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 HeLa 細胞単回投与造腫瘍性試験

本研究では, 免疫不全の度合いの違う 2 系統のマウス, すなわちヌードマウス (T細胞欠損) と NOG マウス (T細胞, B細胞およびNK細胞欠損) の不死化細胞の生着性を比較するだけでなく, 移植細胞をマトリゲルに封入した状態で NOG マウスに移植した群 (NOG+マトリゲル群) の不死化細胞の生着性も検討した. 各群で雄性 10 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. その結果, HeLa 細胞移植後 3 週間後までは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, 4 週間後において, ヌードマウス群では 10⁶ 個移植群の 1 匹に結節の形成が認められ, NOG マウス群では 10⁵ 個移植群の 5 匹に結節形成が認められた. また, NOG+マトリゲル群では, 10⁴ 個移植群の 2 匹および 10³ 個移植群の 1 匹に結節が観察された. 5 週間後においては, ヌードマウス群では 10⁶ 個移植群の 3 匹に結節の形成が認められ, NOG マウス群では 10⁵ 個移植群の 4 匹に結節形成が認められた (4 週目で結節が認められた 5 匹のうち, 1 匹の結節が小型化し測定不能となっていた). また, NOG+マトリゲル群では, 10⁴ 個移植群の 5 匹および 10³ 個移植群の 2 匹に結節が観察された. それ以降 16 週目までの結果を含め, Figure 1-1 に示した. 腫瘍部位のヘマトキシリン/エオジン染色および抗ヒト HLA 抗体による染色により, 形成された腫瘍がヒト細胞由来であることが確認された (Figure 1-2).

各週における投与細胞数と腫瘍形成確率との間の用量作用曲線は Figure 1-3 の通り. TPD₅₀ 値の変化をみると, ヌードマウス群 (HeLa in Nude) および NOG マウス群

(HeLa in NOG) では約 12 週目の時点以降でほぼ安定すること、マトリゲルに懸濁した細胞を NOG マウスに投与した群 (HeLa w/ MG in NOG 群) ではこれら 2 群よりも若干遅く、13-16 週目の時点でほぼ安定することが明らかとなった (Figure 1-4). ロジスティック曲線へのフィッティングにより計算された TPD₅₀ 値は 16 週目にはヌードマウス群, NOG マウス群, NOG+マトリゲル群でそれぞれ 4.2×10^5 , 1.3×10^4 , 7.8×10^1 であった.

C-1-2 hMSC 中に混入する HeLa 細胞の検出能力の検討

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、前項で示した通り、培地に懸濁した場合に比べて非常に高かった。そこで、この方法を利用して、hMSC 中に混入する HeLa 細胞の検出を試みた。10⁶ 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結果、細胞移植後 3 週間後までは HeLa 細胞 10¹, 10², 10³, 10⁴ 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、5 週間後において、10³ および 10⁴ 個混入群では結節の形成が認められた。それ以降 16 週目までの結果を含め、Figure 1-5A に示した。各週における投与細胞数と腫瘍形成確率との間の用量作用曲線は Figure 1-6 の通り。TPD₅₀ 値の変化をみると、前項でのマトリゲルに懸濁した細胞を NOG マウスに投与した群 (HeLa w/ MG in NOG 群) と同様に、16 週目の時点でほぼ安定することが明らかとなった (Figure 1-7)。ロジスティック曲線へのフィッティングにより計算された TPD₅₀ 値は 16 週目において 1.0×10^2

で、HeLa 細胞単独投与の場合と同等であった。

次に、10⁷ 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 10¹, 10² 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、10² 個混入群では結節の形成が認められ、10¹ 群でも 10 週目において結節の形成が認められた (Figure 1-5)。TPD₅₀ 値は、16 週目までにほぼ安定した (Figure 1-7)。16 週目における TPD₅₀ を、10⁴ 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 1.8×10^2 で、HeLa 細胞単独投与ないし 10⁶ 個の hMSC と HeLa 細胞の同時投与の場合とほぼ同等であった (Table 1-2)。

C-1-3 hMSC の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、10⁴ 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 1-8)。次に、10⁴ 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-1-4 iPS 細胞由来分化細胞の軟寒天コロニー形成試験

軟寒天コロニー形成試験は細胞の足場非依

存的増殖を検出するための一般的な方法として知られている。場非依存的増殖を示す形質転換細胞を定量的に測定するために、CytoSelect 96-well Cell Transformation Assay を用いた。ヒト多能性幹細胞は酵素的に単一細胞に分散するとアポトーシスを起こすことが知られているが、細胞のクランプ残存や寒天中での凝集による足場依存的細胞増殖を防ぐためには単一細胞への分散が重要である。

まずヒト iPS 細胞が軟寒天培地中で増殖するかどうかについて検討したところ、単一細胞に分散したヒト iPS 細胞は軟寒天培地中では増殖しないことが明らかとなった。ヒト多能性幹細胞の分散誘導性アポトーシスを抑制すると言われている ROCK 阻害剤 Y-27632 存在下で検討した場合も、軟寒天培地中での増殖は認められなかった (Figures 1-10A and 1-11A)。これらの結果から、軟寒天コロニー形成試験は未分化なヒト iPS 細胞を検出する目的には適さないということが示唆される。

本研究の試験系が機能していない可能性を否定する目的、および正常細胞中への悪性形質転換細胞の混入に関する検出限界を検討する目的で、軟寒天培地中でのヒト卵巣テラトカルシノーマ細胞 PA-1 のコロニー形成を評価した。PA-1 細胞を選択した理由は、ヒト iPS 細胞の悪性形質転換を想定した場合に細胞は PA-1 細胞に近似した表現型を示す可能性が高いからである。PA-1 細胞は、播種した細胞数が多くなるに伴って検出されたコロニー形成細胞の数も多くなっていた (Figure 1-10B)。一方、初代培養 RPE 細胞は、ウェルあたり 1×10^4 個の細胞を播種しても 30 日の間にコロニーは認められなかった (Figure 1-11C)。次に今回の軟寒天コロニー形成試験系における PA-1 細胞の検出感度を評価した。即ち、試験系の検出限界を求める目的で、 1×10^4 個の初代培養 RPE 細胞に 100 個 (1%)、50 個 (0.5%)、25 個

(0.25%) の PA-1 細胞を添加するスパイク実験を実施した。100 個 (1%) の PA-1 細胞を添加することにより、20 日の間にコロニー形成が認められたが、50 個 (0.5%) ないし 25 個 (0.25%) の PA-1 細胞の添加では、コロニー形成が検出されるまでに 30 日を要した (Figure 1-10B)。試験系の蛍光測定値の検出限界は、ネガティブコントロール (初代培養 RPE 細胞のみ) の平均値と標準偏差の 3.3 倍の和として求めた。3 ロットの初代培養 RPE 細胞由来の蛍光測定値 (バックグラウンド測定値の 1.70 ± 0.40 倍) から、蛍光測定値の検出限界は 3.03 と算出された (Figure 1-10C)。Figure 1-10 に示した結果より、軟寒天コロニー形成試験系を用いて初代培養 RPE 細胞中に混入する PA-1 細胞を蛍光測定により検出するには、PA-1 細胞の数が RPE 細胞の数の 1% (蛍光測定値: 4.4 ± 1.1) 以上必要であることが示唆された。Figure 1-10C に示したように、ヒト iPS 細胞由来の RPE 細胞はコロニーを形成せず、蛍光測定値 (1.21 ± 0.19) も検出限界未満であった。従って、ヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞に混入する未分化細胞ないし異常形質転換細胞は、その足場非依存性が PA-1 細胞と同等だとした場合、1%未満であることが示唆された。

C-2 細胞・組織加工製品の感染制御法の開発

C-2-1 汎用的定量的 PCR 反応におけるモデルレンチウイルス配列増幅の問題提起

平成 23 年度には、汎用的定量的 PCR 反応によるレンチウイルス検出の問題点提起のため、以下に示す研究を行った。モデルレトロウイルス核酸として、レンチウイルスである HIV-1 ならびに HIV-1 由来レンチウイルスベクター共通に含まれる配列である 5'LTR の一部とパッケージングシグナル(ψ)を含む配列を選定した。この配列は、レトロウイルスがウ

ウイルスゲノムをウイルス粒子中にパッケージングする際に必須のものであり、つまりは増殖可能な感染性ウイルスのゲノム RNA には必ず包含される必須配列である。

今回、この配列を持つ RNA を試験管内で合成することにより、モデルレトロウイルスゲノム RNA の一部を得た。このモデルレトロウイルスゲノム RNA を段階希釈し、従来の定量的 PCR 法を用いて、一つの反応系中での検出限界を求めたところ、反応系あたり最小 50 コピーのモデルレトロウイルス核酸を検出することが可能であると判明した。また、汎用的な定量的 PCR 法では、 1×10^2 コピーから 5×10^7 コピーの範囲で高い直線性を示すことがわかった (図 2-5)。

そこで、検出感度の限界値付近における検出反応系ごとのばらつき (各々の PCR 反応ウェル間での検出差違) を確かめるために、7400 コピーのモデルレトロウイルスゲノム RNA を 1×10^7 個の細胞より得た RNA 150 μg と混合し、十分に攪拌・混合処理した後、この混合 RNA を反応系あたり 1 μg ずつ 150 等分 (150 ウェル反応系分) した。その結果、理論上は十分に攪拌され等分散した鋳型モデルレトロウイルスゲノム RNA が、1 反応液あたり 49.3 コピー混入している計算となる。しかし、実際にはおそらく反応系 (各ウェル) によって±数コピー〜十数コピーのばらつきが生じるものと考えられる。これは、現状の汎用的な定量的 PCR 法を用いるときに不可避免的に生じる各反応系調製作業の鋳型持ち込み量のゆらぎが想定されるからである。そこで実態を調べるために、このように設定された反応系を、それぞれ定量的 PCR 法を用いた検出に供した。その代表的な実験結果を表 3-2 にまとめた。150 検体中、LTR プライマーを用いた検出系では平均 42 検体、psi プライマーを用いた検出系では平均 46 検体のみがウイルス由来核酸が陽性と判

断され、残りの検体は陰性 (検出限界以下) という結果となった。

このことは、段階希釈された上記検出限界レベル近辺のレンチウイルスベクターを用いてスパイクさせた細胞から、ウイルス由来核酸を検出しようとしても、汎用されている定量的 PCR 法を用いた場合では、一つの反応系容量の限界 (1 ウェルの反応量に持ち込まれるウイルス由来核酸持ち込みの確率論的限界) からウイルス由来核酸を含む細胞の一部しか検出されず、感染・非感染の科学的立証が不完全に終わることを意味している。つまりは、特定の反応系のみをもってして感染の是非を決定することに問題があり、すなわち、安全性を担保すべき検査がきわめて不確実なものであることを意味している。

この問題を汎用的な定量的 PCR 法のみで解決しようとする場合、評価系に供される細胞全てから抽出した核酸 (鋳型となりうるゲノム総量) の全てがなくなるまで PCR 反応系を調製することにより検出を完全なものにしなければならない。上述のモデル系の場合でも、150 ウェル分の PCR 反応系が必要になることを勘案すると、実際は相当量の反応系の調製が必須となる。このことは、時間的、労力的に多大な負担となるのみならず、検出系のコストの問題にも大きくのしかかることとなる。

そこでこの問題を解決すべく、感染細胞検体に含有される全核酸中のウイルス核酸をもれなく測定でき、かつ高感度、簡便な検出法の検討と探索を行った。その結果、検出反応系が大きく、またある程度の容量の可変増大も可能であり、それゆえ比較的少量の核酸を一度に一つの大容量反応系 (チューブ単位での検出系) で検査することが可能である等温遺伝子増幅法 (ICAN 法) を改良することが最も有用であるという見解に至った。現在までに ICAN 法を用いてのウイルス検出への応用は全くなされて

おらず、ICAN 法改良型のウイルス検出系は、確実で、高感度、高精度、簡便な新規感染性ウイルス検出法となる可能性を秘めている。

C-2-2 ICAN 反応を用いたレンチウイルス検出方法の開発

平成 24 年度は、ICAN 反応を利用したレンチウイルス検出方法の開発を行った。

C-2-2-1 Cycleave RT-ICAN 反応におけるモデルレンチウイルス配列増幅可能領域の選定

モデルレトロウイルス核酸として、レンチウイルスである HIV-1 ならびに HIV-1 由来レンチウイルスベクター共通に含まれる配列である 5'LTR の一部とパッケージングシグナル(ψ)を含む配列を選定した。この配列は、レトロウイルスがウイルスゲノムをウイルス粒子中にパッケージングする際に必須のものであり、つまりは増殖可能な感染性ウイルスのゲノム RNA には必ず包含される必須配列である。図 2-1 に示す鋳型 DNA を用い、T7RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 逆転写反応によって、モデルレンチウイルスゲノム RNA を作成した。この RNA 配列が RT-ICAN 反応中にごのような 2 次構造をとるか予測するために、Mfold software で解析した。今回は、モデルレンチウイルス配列番号 211 から 380 の領域に絞り、80bp 増幅領域を 10 塩基間隔で設定して解析したところ、図 2-6 に示すとおり、291-370、296-375、300-380 の 3 つの領域において、ギブスの自由エネルギー ΔG が -1.0 以下となった。よって、291-380 までの領域が、ICAN 法で増幅可能であると予測された。

C-2-2-2 Cycleave 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、プローブ設計

上記解析によって決定した増幅可能領域に

おいて、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。3 種類のプライマー、プローブ配列セットを表 2-1 に示した。

C-2-2-3 Cycleave RT-ICAN 法による増幅確認

モデルレトロウイルス核酸を 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 Cycleave RT-ICAN 反応を実施した。その結果、いずれのプライマー、プローブセットにおいても、Cycleave ICAN 法で時に問題となる自己分解によるバックグラウンドは見られず、セット 1 では 10^3 コピー (図 2-7-A)、セット 2、3 においては 10^4 コピー (図 2-7-B, C) まで検出することが可能であった。

C-2-2-4 Cycleave RT-ICAN 法の改善

より感度の高い Cycleave RT-ICAN を行うため、RNaseH の濃度を 5 段階 (7.5, 5, 2.5, 1, 0.5 units/反応) に振って反応を行った。その結果、Cycleave RT-ICAN 反応を行い、リアルタイム蛍光検出法において増幅を検出出来る Tli RNaseH 濃度は 1 反応系あたり 5 ユニットであることが判明した (図 2-8)。しかし、そのときの検出感度は 10^4 コピーであり、感度向上には至らなかった (図 2-8-A, C)。一方、この反応産物をアガロースゲル電気泳動法にて確認してみたところ、低濃度の RNaseH では Cycleave プローブを切断できないために蛍光検出には至らないものの、1 反応あたり 2.5 ユニットの RNaseH を用いた反応系では 10^2 コピー (図 2-8-E, F)、1 反応あたり 1 ユニット、もしくは 0.5 ユニットの RNaseH を用いた反応系では 10^1 コピー (図 2-8-G-J) まで検出可能であることが示された。

C-2-2-5 Cycleave RT-PCR 法による検出感度

の検討

Cycleave RT-ICAN 法と従来の Cycleave RT-PCR 法における検出感度の比較を行った。ただし、Cycleave RT-ICAN 法では逆転写反応を行ったすべての反応液を ICAN 反応に持ち込めるのに対し、Cycleave RT-PCR 法では逆転写反応を行った 1/4 量しか Cycleave PCR 反応に持ち込むことは出来ない（データ非掲載、逆転写反応溶液中に PCR 法を阻害する物質が入っているため）。図 2-9 に示すとおり、プライマー、プローブセット 1 による Cycleave RT-PCR 法では 10^2 コピー（図 2-9-A）、プライマー、プローブセット 2, 3 による Cycleave RT-PCR 法では 10^1 コピー（図 2-9-B, C）のモデルレンチウイルス核酸を検出可能であることが示された。これは、RT-ICAN をアガロースゲル電気泳動法で検出するときの感度と同じである。

C-2-2-6 SYBR Green 検出法による RT-ICAN 反応の条件検討

RT-ICAN 法が Cycleave RT-PCR 法と同等の感度でモデルレンチウイルス核酸を検出出来ることが分かったものの、Cycleave 系を用いたリアルタイム蛍光検出が出来ないことが問題となった。そこで、Cycleave 法ではなく、SYBR Green 法による RT-ICAN 反応の検討を試みた。図 2-10 に示すとおり、RNaseH を 1 反応あたり 1, 0.1, 0.05 ユニット使用した場合、モデルレンチウイルス核酸を 10^2 コピーまで検出可能であることが判明した（図 2-10-D, F, H）。しかし、SYBR Green によるリアルタイム蛍光検出法では、非特異的増殖と特異的増殖を区別することが出来ず、 10^1 , 10^0 コピーともに見かけ上検出されてしまった（図 2-10-C, E, G）。そこで、非特異的増殖と特異的増殖を融解曲線で識別出来ないかと考え、融解曲線の解析を行った。すると、アガロースゲル電気泳

動法で RT-ICAN 反応産物が確認できなかった 10^1 , 10^0 コピーでの融解曲線は、特異的増幅を示す 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 コピーでの融解曲線とは明らかに異なり、SYBR Green 検出法を用いた RT-ICAN 反応は、融解曲線解析を併用することにより、 10^2 コピーまで検出可能であることが示された（図 2-11）。

C-2-2-7 SYBR Green 検出法による RT-ICAN 反応の反応液量検討

次に、SYBR Green 検出法による RT-ICAN 反応の反応液量を増大させることによって検出感度が変わるのか、検討を行った。図 2-12 に示すとおり、反応液量 25 μ L における感度は反応あたり 10^2 コピー、反応液量 200 μ L における感度は 8×10^2 コピーとなり、検出感度は鋳型濃度に依存することが示された。また、反応を quadruplicate (4 重) で行ったところ、反応液量 25 μ L, 200 μ L いずれにおいても、特異的増幅すべき鋳型濃度において、融解曲線から判断すると、非特異的増幅となってしまうものが生じた（図 2-12-F の 10^5 コピー A2 ウェル, 10^4 コピー B4 ウェル, 図 2-12-L の 8×10^5 コピー A12 ウェル, 8×10^3 コピー C11 ウェル）。しかし、実際にアガロースゲル電気泳動法では特異的増幅が起こっており（データ非掲載）、Ladder Forming 法での増幅過程でターゲット領域の連結パターンに変化が生じたため、融解温度もそれに伴い変化したためと考えられた。

C-2-2-8 Cycleave RT-ICAN 法を用いたウイルス否定試験実施例

実際に、hADMPC, iPS 細胞より RNA を抽出し、Cycleave RT-ICAN 法を用いたウイルス否定試験を実施した。図 2-13 に示すとおり、各細胞とも、1 μ g (約 1×10^5 細胞), 0.1 μ g (約 1×10^4 細胞), 0.01 μ g (約 1×10^3 細胞) の RNA

より陽性反応は生じなかった(図 2-13-B, D).
また, これらの RNA に, モデルウイルス核酸
を 10^4 コピー混入させて Cycleave RT-ICAN
を行ったところ, すべてが正しく陽性反応とな
った(図 2-13-A, C).

C-2-3 ICAN 反応を用いたヒト肝炎ウイルス検 出方法の開発

ヒト肝炎ウイルスのうち, 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, 平成 25
年度には 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.

C-2-3-1 ICAN 反応を用いた HBV 検出方法の 開発

C-2-3-1-1 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 は自身の産
生する 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 2-14 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 2-14 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-2-3-1-2 Cycleave 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, 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 2-14 および図
2-15 に示した.

C-2-3-1-3 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

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 2-16). 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, 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至適化を
行っても検出には至らなかった(図 2-17).

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 2-18).