

C-2-3-1-4 Cycleave RT-ICAN 法による HBV ウイルスゲノムの増幅確認

感度の高い Cycleave 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 ゲノム核酸の濃度を 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 2-19 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、Cycleave 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 2-20)。

C-2-3-2 ICAN 反応を用いた HCV 検出方法の開発

C-2-3-2-1 Cycleave 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 2-21 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 2-21 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-2-3-2-2 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 2-21 および図 2-22 に示した。

C-2-3-2-3 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

HCV ウイルスゲノム核酸を 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 2-23)。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至適化を行っても検出には至らなかった (図 2-24)。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、これ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 2-25)。このことは Primer, Probe 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-2-3-2-4 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 2-26) 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(図 2-27)。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 2-28)。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得ら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 細胞及び起源細胞のシアル酸分析

ヒト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) と α Gal エピトープ (Gal α 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可能性が示唆されている。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、糖鎖生成に利用されることが報告されている。iPS 細胞の中の NeuGc を定量分析した結果を 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 NeuGc 相対比は 3.7%であり、KSR や MEF を用いて培養された iPS 細胞に比べ低かった。

次に KSR や MEF などの非ヒト成分を用いず、遺伝子組み換えヒトフィブロネクチン (FN) 上、KSR を含まない hESF-GRO (FX) を培養液として用いて Tic 細胞を培養し同様にシアル酸分析を行った。結果を Fig.3-2 に示す。FN/FX 培養系での NeuGc の相対比は 3.9%であり、KSR と MEF を用いて培養された Tic 細胞に比べ、NeuGc の相対含量が顕著に低下した。このように、KSR と MEF などの非ヒト成分を含まないヒト化培養液を用いた培養法により、iPS 細胞への NeuGc の混入を

回避できることがわかった。

C-3-2 iPS 細胞培養基材のシアル酸分析

iPS 細胞への NeuGc の主たる混入原因と考えられる MEF と KSR についてシアル酸分析を行った。結果を Fig.3-3 に示す。MEF では総シアル酸に占める NeuGc の存在比は 6%であったが、KSR は 51%であり、NeuGc を多く含むことがわかった。KSR 中の NeuGc の存在形態については、糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質糖鎖の非還元末端にグリコシド結合を介し存在する場合と遊離の NeuGc として存在することが考えられる。そこで、KSR を限外濾過フィルターを用いて分子量 3000 以上と 3000 以下に分画し、両分画についてシアル酸分析を行った。結果を Fig.3-4 に示す。分子量 3000 以上と 3000 以下のいずれの分画でも総シアル酸に占める NeuGc の存在比は 50%以上であり、NeuGc が糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質糖鎖の非還元末端に存在する場合と遊離の NeuGc、遊離オリゴ糖などとしても存在すると考えられた。培養環境からの NeuGc の混入経路としては、NeuGc を持つ糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質の細胞表面への吸着あるいは細胞内への取り込みだけでなく、遊離 NeuGc あるいは複合糖質として取り込まれた NeuGc が細胞内でのサルベージ経路での生合成にも利用されると考えられた。

C-3-3 iPS 細胞および起源細胞の N-結合型糖鎖分析

我々は糖鎖が細胞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ー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、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ーを用いて、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 α 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。 α 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、 α 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、FN/FX 培養系により培養した iPS 細胞について N-結合型糖鎖を分析した結果を Fig.3-5 に示す。アシアロ糖鎖分画については KSR/MEF の場合と同様に、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豊富に観察され、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も観察された。モ

ノシアロ分画は、アシアロ糖鎖分画に比べ複雑なプロファイルを示し、2本鎖糖鎖にフコースが0~2残基付加した複合型糖鎖ならびに3本鎖糖鎖にフコースが1残基付加した複合型糖鎖の含量が、KSR/MEFを用いた場合に比べ高い。ジシアロ分画については、複合型2本鎖糖鎖および複合型3本鎖糖鎖にフコースが1~2残基付加した糖鎖が多く発現しており、KSRとMEFを用いた場合に比べ多くの糖鎖が観察された。トリシアロ分画については、フコースを1残基持つ3本鎖糖鎖が主として観察され、フコース1または2残基有する複合型4本鎖糖も観察された。以上のように、ヒト化培養液を用いて培養したTic細胞は、複合型糖鎖が著しく異なっており、観察される糖鎖プロファイルの違いは、主として培養環境に起因すると考えられるが、培養法の違いがiPS細胞の糖鎖生合成の変化によるものであるかは不明である。

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.3-6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 α 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.3-7)。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 α 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している。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107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*で投与される生物製剤を製造する際に*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、生物製剤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。造腫瘍性の程度的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。生物製剤の製造には通常、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 TPD₅₀ 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 TPD₅₀ 値はそれぞれ 10 , 3×10^3 , 3×10^4 , 3×10^6 程度と言われており (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「 10^7 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 (=TPD₅₀ 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 10^7 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、 10^7 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。

ヒト多能性幹細胞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 TPD₅₀ 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 3×10^8 , 3×10^{10} 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 (10^7 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 γ 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/IL2 γ KO 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).

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となった。

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。

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、 10^6 個の hMSC に混入した HeLa 細胞の TPD₅₀ 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。

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、TPD₅₀ 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、 10^7 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。

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。これは本研究における、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-1-5 iPS 細胞由来分化細胞の軟寒天コロニー形成試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の臨床応用において、最終製品の有効性と安全性の確保は本出的な問題である。ヒト多能性幹細胞加工製品の安全性に関する大きなハードルの一つとして、最終製品に混入する未分化な多能性幹細胞に起因する腫瘍形成のリスクが挙げられる。ヒト多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性については、細胞株の樹立方法、あるいは残存未分化細胞の除去法の開発などに工夫をこらす試みがなされてきた。しかしながら、最終製品への未分化細胞・造腫瘍性形質転換細胞の混入を評価する試験系の性能とその限界に関するバリデーションはほとんどなされてこなかった。

足場非依存的な増殖は細胞の腫瘍性獲得の指標となることが知られており、悪性形質転換を検出するための *in vitro* アッセイ系としては最も正確な系だとされている。足場非依存的な細胞増殖を検出する方法として、軟寒天コロニー形成試験法がこれまで一般的に用いられてきた。軟寒天コロニー形成試験の利点としては、①ヌードマウス移植試験ほどは長期間を要しない(半年以上 *vs.* 1ヶ月程度)、②ヌードマウス移植試験よりも安価、③培養条件を変化させることで様々な環境下で細胞の特性評価が可能、などが挙げられる。逆に欠点としては、①実験の手間が煩雑、②通常 80・100mm ディッシュを用いるため多検体に向かない、③コロニーの計数・コロニーサイズのカットオフ値等に主観が入り、実験者間で結果がばらつく、④ *in vivo* 試験系の結果と整合しないことがある、などが挙げられる。また、軟寒天コロニー形成試験は非常に古典的な試験法だが、新種の製品群である細胞組織製品の造腫瘍性評価におけ

る有用性・妥当性を裏付けるデータが不十分である点も問題である。つまり、正常細胞中に混入した微量な悪性細胞の検出を目的としたバリデーションが不十分であった。

本研究で検討した結果、軟寒天コロニー形成試験は、ヒト iPS 細胞加工製品中に残存するヒト iPS 細胞を検出するには適当な方法ではないことが明らかになった。その理由は、おそらく、ヒト iPS 細胞特有の分散誘導性アポトーシスによるものだと考えられる。また、PA-1 細胞と RPE 細胞を用いた結果より、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 細胞の検出限界は約 1%であることが示唆された。

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、等温遺伝子増幅法(ICAN 法)の改良に着手し、ウイルス遺伝子特異的等温増幅法(Ladder forming RT-ICAN 法)のプロトタイプの開発に成功した。また、本プロトタイプによるヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMP) ならびに樹立 iPS 細胞株中の特定ウイルス由来遺伝子否定試験を実施した。

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る。

この問題を克服するため、我々は核酸増幅法を用いつつも、検出反応系を見直すことに着眼した。そこで、反応系に持ち込むことの出来る検体核酸量を増やすこと、すなわち反応系にウイルス核酸を(可能な限り)全て持ち込み、増幅し検出することで、総体的に感度、精度及び簡便性の向上を図るという考えに至った。ここ

で鍵となるのが、感染細胞検体由来の全核酸(ひいては全ウイルス核酸)を検出対象とでき、もれなく反応系に持ち込める基礎技術である。このような反応系を既存の RT-PCR 技術を基盤に改良を加えて創出すべく試行錯誤を繰り返したが目的を果たせなかった。そこで、改めて目的に叶う基盤検出法を探索したところ、等温遺伝子増幅法(ICAN 法)が有用であるという見解に至った。ICAN 法は DNA と RNA のキメラプライマーを用いて等温で遺伝子を増幅させることができるという特徴を持ち、反応系を大容量にすることで、持ち込む核酸の量を増やすことが可能な方法である。また、最近では、この ICAN 法に検出特異性が非常に高いサイクリングプローブ法を組み合わせた、Cycleave ICAN 法という方法が開発されている。この Cycleave ICAN 法は現在のところ、キクワイ化病原原因ウイルス、ポテトスピンドルチューバーウイルス、トマトクロロティックドワーフウイルスなどの検出にも利用されており、ヒトウイルスゲノムの検出にも十分利用可能ではないかと考えられる。そこで高感度なウイルス由来核酸検査法として 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)のプロトタイプの開発に着手した。

通常、Ladder Forming Cycleave RT-ICAN 系構築には、鋳型形状(増幅産物の 2 次構造)を考慮する必要がある。また、プライマー配列、プローブ配列、フォワードプライマー上流配列に共通配列が必要である。さらに、プローブの自己分解を起こさないプライマーとプローブの設計を要する。本検討では、増幅領域を Mfold software で構造解析し、プライマー、プローブの設計を行ったが、核酸構造の関係上、増幅領域にパッケージングシグナル(ϕ) 44 bp を完全に包括することは出来ず、 ϕ の 3'側 19 bp と、その下流の領域を増幅ターゲットと決

定した. この領域を BLAST によりシークエンスアライメントしたところ, インタクトな HIV-1 ゲノムとの相同性も確認できたため, このターゲット領域は HIV-1 ならびに HIV-1 由来レンチウイルスベクター両方を増幅しうることが確認された.

今回我々が開発した Cycleave RT-ICAN での検出感度は, リアルタイム蛍光観察法を用いると 10^4 コピーであったが, 蛍光検出出来ない低濃度 Tli RNaseH における増幅感度は 10 コピーであり, PCR における感度に遜色ない結果となった (図 2-7, 8, 9). しかし, 今回はアガロースゲル電気泳動法を用いているため, 非常に反応性が高い ICAN 産物を実験室に拡散させてしまう危険性がある. その場合, その後のすべての ICAN 反応が正確に判定できない場合があるため, 実用的とは言えない. そこで, プローブを使用しない SYBR Green 法を用いた RT-ICAN を行ったが, SYBR Green が ICAN 反応を阻害するのか, 感度が一桁劣ってしまい, 10^2 コピーまでしか検出出来なかった (図 2-10). また, 非特異的増幅と特異的増幅を増殖曲線のみでは判別出来ないという問題があった. しかし, 融解曲線分析を併用することにより, それらは明確に区別出来ることを示すことができた (図 2-11). SYBR Green 法を用いた RT-ICAN 反応は, 10^2 コピー以上のレンチウイルス核酸の汚染においては, 15 分以内で迅速に検出出来るという特性・利点があるため, ある一定以上の検出系としては利用できる可能性がある. しかし, 微量な汚染においては, やはり蛍光検出プローブを併用した RT-ICAN を実施する必要があるだろう. 今後は, Cycleave 法を用いず, たとえば TaqMan プローブのような RNaseH 不要のプローブ使用を考えていく必要があると思われる.

また, 反応液量を増やして, 持ち込み核酸量を増やすことが可能なのか, RT-ICAN 法の反

応液量についても検討したが, 検出感度は鋳型濃度に依存するということが判明した (図 2-12). つまり, 反応液量を 8 倍にすると, 検出感度限界も 8 倍になるということである. ただし, 今回はモデルレンチウイルス核酸のみを鋳型として検討したため, 正常細胞からの RNA にスパイクさせた形で行うと, 違う結果になる可能性もある.

最後に, hADMPC と樹立 iPS 細胞 Tic より RNA を抽出し, モデルレンチウイルス核酸をスパイクしたもの, していないものでウイルス否定試験を行ったが, 使用した幹細胞由来 RNA の量にかかわらず, モデルレンチウイルス核酸をスパイクしたものではすべて陽性という結果, スパイクしていないものではすべて陰性という結果を得た (図 2-13). この結果は, プロトタイプの本法が検出方法として有用な新技術であることを示すとともに, モデルレンチウイルスタイプに特化した検出系としての実用性が高いことを示唆するものである.

また, ウイルス否定試験の実用性を高めるべく, HBV や HCV 等他の個別ウイルス検出系の検討を行った. HBV の検出を可能としたものの, HCV においては, *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 2-14~28). 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. 本研究における結果は, このような解決の糸口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非常に重要な観点, 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に成されることで、裾野の広い再生医療実用化における安全性評価の律速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

糖鎖発現情報を活用し、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、iPS 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果、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。

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り、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、 α 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、既存のガイドライン (WHO TRS 878) 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 千倍感度が高く、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問題は今後改善される可能性がある。

ヒト体細胞ないしヒト体性幹細胞に由来する細胞・組織加工製品だけでなく、ヒト多能性幹細胞加工製品の開発も、国内外で精力的に進められている。しかし、その最終製品中に残ら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に関しては、これまでほとんど注意が払われてこなかった。本研究によって、*in vitro* 造腫瘍性試験としての軟寒天コロニー形成試験系の性能を評価した結果、その能力(検出限界)と限界(ヒト多能性幹細胞への適用可能性)を明らかにすることができた。

本研究で得られた結果をもとに、更に各種の造腫瘍性試験系のバリデーションを進め、それらの能力と限界を見極めたうえで、一段と高性能な造腫瘍性試験の開発を行うと同時に、試験法の標準化をすすめることにより、細胞・組織加工製品の品質評価・工程評価および安全性評価を容易にし、細胞・組織加工製品ならびに再生医療・細胞治療の実用化が促進されることが期待される。

E-2 細胞・組織加工製品の感染制御法の開発

細胞由来の多量の検体核酸に微量のウイルスゲノム核酸が混入していた場合、従来の遺伝子増幅法では反応系容量の限界により、ウイルス由来核酸陽性と検出されない可能性が高くなる。もちろん、何重にも検査することにより、偽陰性と判定される危険性は下がるものの、かかるコストや操作の煩雑さを考えると、より簡便で操作数が少なく、かつ高感度な検出法である ICAN 法の利用が望ましい。

Cycleave RT-ICAN 法を用いた HIV, HBV ウイルスゲノム核酸検出は、感度的にも従来の

Cycleave RT-PCR 法と遜色ないポテンシャルを持っていることから、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。今回の研究成果は、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。

E-3 細胞・組織加工製品の免疫原性制御法の開発

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糖鎖の発現は、遺伝子やタンパク質レベルでは検出することができない 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. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y. A novel *in vitro* method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system. *PLoS One* (submitted)
2. Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Okura H, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y. Characterization of *in vivo* tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2R γ^{null} mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *PLoS One* (submitted)
3. 佐藤陽治 再生医療／細胞治療における細胞培養に関する規制 『再生医療の細胞培養技術開発と応用展開』株式会社シーエムシー出版 (印刷中)
4. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療製品の造腫瘍性評価 最新医学 (印刷中)
5. 佐藤大作, 佐藤陽治 規制関連 『再生医療用語集』 (印刷中)
6. 村岡ひとみ, 佐藤陽治 再生医療・細胞治療の臨床研究から実用化までの道のり 老年医学 (印刷中)
7. 佐藤陽治 ヒト iPS 細胞由来移植細胞中に混入する造腫瘍性細胞／未分化細胞の *in vitro* 検出法 *Cytometry Research* (印刷中)
8. 安田智, 佐藤陽治 再生医療製品の品質関連規制と対応の留意点 『動物細胞の培養を成功させる条件設定集』技術情報協会 (印刷中)
9. 田埜慶子, 草川森士, 佐藤陽治 「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 (印刷中)
10. 田埜慶子, 佐藤陽治 再生医療製品の素材としての多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) の品質 レギュラトリーサイエンス学会誌 2014;4:71-77.
11. 中島啓行, 安田智, 佐藤陽治 ヒトES・iPS 細胞に由来する再生医療製品の造腫瘍性をどう見るか? 実験医学別冊ES・iPS 細胞実験スタンダード 羊土社, 東京 (2014), pp. 61-69
12. 佐藤陽治 ヒト人工多能性幹細胞由来移植細胞の製造管理のための *in vitro* 造腫瘍性評価系の開発 薬学雑誌 2013;133:1381-8.
13. Kanemura H, Go MJ, Nishishita N, Sakai N, Kamao H, Sato Y, Takahashi M, Kawamata S. Pigment Epithelium-Derived Factor Secreted from Retinal Pigment Epithelium Facilitates Apoptotic Cell Death of iPSC. *Sci Rep.* 2013;3:2334.
14. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療・細胞治療のレギュレーション—日米欧三極の比較— 再生医療 2013;12(2):145-149.
15. Sato Y, Tsutsumi H, Sawada R, Suzuki T, Yasuda S. Regulatory science research to facilitate the development of cell/tissue-processed products. *Bull Natl Inst Health Sci.* 2013;131:16-19.
16. Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. *In vitro* detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Methods in Stem Cells and Tissue Repair*, in press.
17. 五十嵐友香, 佐藤陽治 再生医療製品の造腫瘍性・悪性腫瘍形成能の評価 医学のあゆみ. 2013; 246: 1069-70.
18. Nakaya M, Tajima M, Kosako H, Nakaya T, Hashimoto A, Watari K, Nishihara H, Ohba M, Komiya S, Tani N, Nishida M, Taniguchi H, Sato Y, Matsumoto M, Tsuda M, Kuroda M, Inoue K, Kurose H. GKR6-deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance. *Nat Commun.* 2013;4: 1532.
19. 安田智, 佐藤陽治 安全性評価の総論, 造腫瘍性試験の現状と展望「幹細胞医療の実用化技術と産業展望」(監修: 江上美芽, 水谷学) pp247-255(2013), シーエムシー出版, 東京

20. Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products *Biol Pharm Bull*. 2013;36:189-92.
21. 佐藤陽治, 村岡ひとみ 再生医療分野の関連規制：FDA の動向 「稀少疾患／難病の診断・治療と製品開発」(編集：技術情報協会) pp330-335 (2012) , 技術情報協会, 東京
22. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療における細胞・組織加工製品の治験とレギュレーション *実験医学* 2012; 30(10) 増刊: 1702-7.
23. Nakaya M, Chikura S, Watari K, Mizuno N, Mochinaga K, Mangmool S, Koyanagi S, Ohdo S, Sato Y, Ide T, Nishida M, Kurose H. Induction of cardiac fibrosis by β -blocker in G protein-independent and GRK5/ β -arrestin2-dependent signaling pathways. *J Biol Chem*. 2012; 287:35669-77.
24. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S, Kawamata S, Sato Y. Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One*. 2012;7(5):e37342.
25. 佐藤陽治, 黒田拓也 ヒト多能性幹細胞を使った再生医療・細胞治療における造腫瘍性試験の現状 *医学のあゆみ* 2011; 239:1460-5.
26. Nishioka K, Nishida M, Ariyoshi M, Jian Z, Saiki S, Hirano M, Nakaya M, Sato Y, Kita S, Iwamoto T, Hirano K, Inoue R, Kurose H. Cilostazol Suppresses Angiotensin II-induced Vasoconstriction via Protein Kinase A-mediated phosphorylation of TRPC6 channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31:2278-86.
27. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥：ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する指針整備と主なポイント *再生医療* 2011; 10:206-10.
28. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥：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関する指針(案)一総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について一 *再生医療* 2011; 10:211-8.
29. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥：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関する指針(案)一総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について一 *再生医療* 2011; 10:219-26.
30. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥：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関する指針(案)一総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について一 *再生医療* 2011; 10:227-37.
31. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥：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関する指針(案)一総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について一 *再生医療* 2011; 10:238-48.
32. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥：ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)一総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について一 *再生医療* 2011; 10:249-60.
33. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥：ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)一ヒト体性幹細胞, iPS (様)細胞又は ES 細胞を加工して製造される医薬品等(ヒト幹細胞加工医薬品等)の最終

- 製品の品質管理— 再生医療 2011; 10:261-6.
34. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)—ヒト体性幹細胞, iPS(様)細胞又はES細胞を加工して製造される医薬品等(ヒト幹細胞加工医薬品等)の非臨床試験及び臨床試験について— 再生医療 2011; 10:267-72.
 35. Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Watanabe K, Ono K, Shimizu S, Hayakawa T, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y. AW551984: a novel regulator of cardiomyogenesis from pluripotent embryonic cells. *Biochem J*. 2011;437:345-55.
 36. Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, Sato Y, Kiyonaka S, Hoshijima M, Ikeda Y, Nakaya M, Ide T, Mori Y, Kurose H, Nishida M. TRPC3-mediated Ca^{2+} influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;409:108-13.
 37. Moriyama M, Moriyama, Uda J, Matsuyama A, Osawa M, Hayakawa T. BNIP3 Plays Crucial Roles in the Differentiation and Maintenance of Epidermal Keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2014;134(6): 1627-35.
 38. 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;8(6):e66274.
 39. 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;1(4):322-335.
 40. 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;141(1):91-100.
 41. 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;34(7):1781-9.X
 42. 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.
 43. 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.
 44. 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; 34(22-23), 3198–3205.
 45. Kinoshita M, Mitsui Y, Kakoi N, Yamada K, Hayakawa T, Kakehi K. Common Glycoproteins Expressing Polylactosamine-Type Glycans on Matched Patient Primary and Metastatic Melanoma Cells Show Different Glycan Profiles. *J Proteome Res*. 2014;13(2):1021-33.
 46. Moriyama H, Moriyama M, Isshi H, Ishihara S, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. Role of Notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *Stem Cells & Dev* (2014) in press.
 47. 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*.
 48. Yagi Y, Yamamoto S, Kakehi K, Hayakawa T, Ohyama Y, Suzuki S. Application of

- partial-filling capillary electrophoresis using lectins and glycosidases for the characterization of oligosaccharides in a therapeutic antibody. *Electrophoresis*. 2011 Nov;32(21):2979-85.
49. Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Katayama K, Higuchi M, Tashiro K, Nonaka A, Sakurai F, Hayakawa T, Kusuda Furue M, Mizuguchi H. Efficient Generation of Functional Hepatocytes From Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells by HNF4 α Transduction. *Mol Ther*. 2012 Jan;20(1):127-37.
 50. Tashiro K, Kawabata K, Omori M, Yamaguchi T, Sakurai F, Katayama K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction. *Stem Cell Res*. 2012 Mar;8(2):300-11.
 51. Saga A, Okura H, Soeda M, Tani J, Fumimoto Y, Komoda H, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Daimon T, Hayakawa T, Matsuyama A. HMG-CoA reductase inhibitor augments the serum total cholesterol-lowering effect of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells in hyperlipidemic homozygous Watanabe rabbits. *Biochem Biophys Res Commun*. 412(1): 50-4 (2011).
 52. Takao Hayakawa and Akiko Ishii: Japanese Regulatory Perspective on Immunogenicity. *Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals : Practical and Applied Considerations* (ed. by Michael G. Tovey), John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA, August 2011 (著書)
 53. Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Tashiro K, Katayama K, Sakurai F, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient and directive generation of two distinct endoderm lineages from human ESCs and iPSCs by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One*. 2011;6(7):e21780.
 54. Suzuki T, Sasaki T, Yano K, Sakurai F, Kawabata K, Kondoh M, Hayakawa T, Yagi K, Mizuguchi H. Development of a recombinant adenovirus vector production system free of replication-competent adenovirus by utilizing a packaging size limit of the viral genome. *Virus Res*. 2011 Jun;158(1-2):154-60.
 55. Sugio K, Sakurai F, Katayama K, Tashiro K, Ma H, Kawabata K, Kawase A, Iwaki M, Hayakawa T, Fujiwara T, Mizuguchi H. Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences. *Clin Cancer Res*. 2011 May 1;17(9):2807-18.
 56. Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPSCs by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol Ther*. 2011 Feb;19(2):400-7.
 57. Okura H, Saga A, Fumimoto Y, Soeda M, Moriyama M, Moriyama H, Nagai K, Lee CM, Yamashita S, Ichinose A, Hayakawa T, Matsuyama A. Transplantation of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011 Feb;17(2):145-54.
 58. Yamada K, Mitsui Y, Kakoi N, Kinoshita M, Hayakawa T, Takehi K. One-pot characterization of cancer cells by the analysis of mucin-type glycans and glycosaminoglycans. *Anal.Biochem*. 2012 Feb 15;421(2):595-606.
 59. 早川堯夫, 水口裕之 : ヒト iPS 細胞の再生医療及び創薬研究への応用の現状と展望, *Brain and Nerve*, 64, 47-57 (2012)
 60. 早川堯夫 : 第十六改正日本薬局方について. 日本薬局方試験法ガイド(一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団編), pp.3-13 (2011) じほう, 東京
 61. 早川堯夫 : ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する2つの指針案. *医学のあゆみ*, 239, 14 (2011)
 62. 早川堯夫 : 再生医療推進のための規制環

- 境の整備. 医薬ジャーナル, 10 (2011)
63. 早川堯夫: 医薬品製造とウイルス安全性確認の基本的考え方. 医薬品の品質管理とウイルス安全性 (日本医薬品等ウイルス安全性研究会編) 文光堂, 東京, 2011
 64. 早川堯夫: 第十六改正日本薬局方について. *Phar.Tech.Japan.*, 27(8), 7-14(2011)
 65. 佐藤陽治, 鈴木和博, 早川堯夫: EUにおける細胞・組織加工製品の規制動向, 医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス. 42, 142-8 (2011)
 66. Moriyama M, Moriyama H, Ueda A, Nishibata Y, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. Human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells exposed to oxidative stress induce neurite outgrowth in PC12 cells through p38 MAPK signaling. *BMC Cell Biol.* 2012 Aug 7;13:21.
 67. 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 34(7): 1781-1789.
 68. Mitsui Y, Yamada K, Hara S, Kinoshita M, Hayakawa T, Takehi K. Comparative studies on glycoproteins expressing poly(lactosamine)-type N-glycans in cancer cells. *J Pharm Biomed Anal.* 2012 Nov;70:718-26.
 69. Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Sugawara M, Kikuchi K, Higuchi M, Nagamoto Y, Watanabe H, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction. *J Hepatol.* 2012 Sep;57(3):628-36.
 70. Nagamoto Y, Tashiro K, Takayama K, Ohashi K, Kawabata K, Sakurai F, Tachibana M, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. The promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials.* 2012 Jun;33(18):4526-34.
 71. Maeda E, Kita S, Kinoshita M, Urakami K, Hayakawa T, Takehi K. Analysis of nonhuman N-glycans as the minor constituents in recombinant monoclonal antibody pharmaceuticals. *Anal Chem.* 2012 Mar 6;84(5):2373-9.
 72. Yagi Y, Takehi K, Hayakawa T, Ohyama Y, Suzuki S: Specific detection of N-glycolylneuraminic acid and Gal α 1-3Gal epitopes of therapeutic antibodies by partial-filling capillary electrophoresis Original Research Article *Analytical Biochemistry*, Volume 431, Issue 2, 15 December 2012, Pages 120-126
 73. Tashiro K., Kawabata K., Omori M., Yamaguchi T., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa T., Mizuguchi H. Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction. *Stem Cell Res.*, 2012 Mar;8(2):300-11.
 74. Takayama K, Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H.: Efficient Generation of Functional Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells by HNF4 α Transduction. *Mol. Ther.*, 20(1) 127-137 (2012).
 75. Yamada K, Mitsui Y, Kakoi N, Kinoshita M, Hayakawa T, Takehi K.: One-pot characterization of cancer cells by the analysis of mucin-type glycans and glycosaminoglycans. *Anal Biochem.* 2012 Feb 15;421(2):595-606.
 76. Iwatsuka K, Iwamoto H, Kinoshita M, Inada K, Yasueda SI, Takehi 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.
 77. Oyama T, Yodohsi M, Yamane A, Takehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Rapid and sensitive analyses of glycoprotein-derived oligosaccharides by liquid chromatography and laser-induced fluorometric detection capillary electrophoresis. *J Chromatogr B* 2011 879(27):2928-

78. Yamamoto S, Shinohara C, Fukushima E, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Partial-filling affinity capillary electrophoresis of glycoprotein oligosaccharides derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid. *J Chromatogr A*. 2011 1218(29):4772
79. Yodoshi M, Oyama T, Masaki K, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Affinity entrapment of oligosaccharides and glycopeptides using free lectin solution. *Anal Sci*. 2011 27(4):395.
80. Kinoshita M, Kakoi N, Matsuno YK, Hayakawa T, Kakehi K. Determination of sulfate ester content in sulfated oligo- and poly-saccharides by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Biomed Chromatogr*. 2011 25(5):588
6. 城しおり, 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 佐藤陽治 ヒト iPS 細胞の分化プロペンシティ予測のための細胞特性プロファイリング 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014 年 3 月 4 日, 京都)
7. 田埜慶子, 安田智, 梅澤明弘, 佐藤陽治 ヒト多能性幹細胞由来再生医療製品中に混入する未分化細胞の高効率培養法の開発 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014 年 3 月 4 日, 京都)
8. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Kawamata S, Sato Y. Application of droplet digital PCR technology to detection of residual undifferentiated cells in cardiomyocytes derived from human iPS cells. *World Stem Cell Summit 2013, San Diego* (2013年12月4-6日)

G-2 学会発表

1. Satoh M, Ohki T, Kubo T, Sato Y, Muto S. Study of immunomodulatory effects in human mesenchymal stem cells. 第 87 回日本薬理学会年会 (2014 年 3 月 21 日, 仙台)
2. Sato Y. Tumorigenicity tests for human cell-processed therapeutic products. IABS-JST Joint Workshop “Challenges Toward Sound Scientific Regulation of Cell Therapy Products”, Kyoto, Japan (2014 年 3 月 7-8 日)
3. 佐藤陽治 再生医療等製品の品質・安全性確保のための技術的課題 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014 年 3 月 6 日, 京都)
4. 佐藤陽治 The Johnson & Johnson Innovation Award 受賞講演「ヒト多能性幹細胞加工製品に残存する未分化多能性幹細胞の高感度検出法の開発」 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014 年 3 月 5 日, 京都)
5. 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 松山さと子, 川真田伸, 澤芳樹, 佐藤陽治 デジタル PCR を用いたヒト iPS 細胞由来分化細胞に残存する未分化 iPS 細胞の高感度検出法の開発 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014 年 3 月 5 日, 京都)
9. Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Matsuyama A, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y. Characterization of *in vivo* tumorigenicity test using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2r^{0/0} mice for quality assessment of human cell-processed therapeutic products. *World Stem Cell Summit 2013, San Diego* (2013年12月4-6日)
10. Suzuki T, Suresh T, Yamada M, Honma M, Suzuki K, Sato Y. Use of the Next Generation Sequencers for the Evaluation of Genomic Integrity of Cellular Therapy Products. The 11th International Conference on Environmental Mutagens, Foz Do Iguacu, Brazil (2013 年 11 月 3-8 日)
11. Sato Y. Japanese Regulatory Principles for Ensuring Quality and Safety of Cell/Tissue-Processed Products. *World Summit on Regenerative Medicine 2013 (by TERMIS-AP)*, Xi'an, China (2013 年 10 月 20-21 日)
12. 佐藤陽治 再生医療製品の品質評価法開発—残存造腫瘍性細胞の定量— 第 5 回 MCP 策定会議/第 5 回再生医療薬事講習会 (2013 年 10 月 4 日, 東京)
13. 佐藤陽治 レギュラトリーサイエンスからみた再生医療実現への課題 第 8 回レギュラトリーサイエンス学会シンポジウ

ム ～再生医療の早期実現に向けて～
(2013年10月3日, 東京)

14. 佐藤陽治 ヒト iPS 細胞由来移植細胞中に残存する未分化細胞の *in vitro* 検出法の開発 第23回日本サイトメトリー学会学術集会 (2013年6月23日, 東京)
15. Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Kuroda T, Sawada R, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y. Validation of *in vivo* tumorigenicity test for the process control of cell/tissue-engineered products using severe immunodeficient NOG mice. International Society for Stem Cell Research 11 th Annual Meeting, Boston (2013年6月12-15日)
16. 佐藤陽治 iPS 創薬の鍵を握る細胞の品質管理 バイオファイナンスギルド第11期第10回セミナー「iPS 細胞創薬の急進展と落とし穴」(2013年5月17日, 東京)
17. 佐藤陽治 再生医療・細胞治療の規制に関する国際比較 日本バイオマテリアル学会2013年度第1回セミナー (2013年5月10日, 東京)
18. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. The Final Version of Japanese Guidelines on Ensuring Quality and Safety of Products Derived from Processing of Various Human Stem Cells. World Stem Cell Summit 2012, West Palm Beach, Florida, USA (2012年12月3-5日)
19. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human stem cells—after public consultation—. 3rd TERMIS World Congress 2012, Vienna, Austria (2012年9月5-8日)
20. 佐藤陽治 再生医療／細胞・組織加工製品の安全性評価 第39回日本毒性学会年会 (2012年7月17日)
21. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Suzuki K, Kawamata S, Sato Y. Validation of *in vitro* methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2012年6月13-16日, 横浜)
22. 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 鈴木和博, 川真田伸, 佐藤陽治 ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞中に残存する未分化細胞の *in vitro* 高感度検出法の開発と評価 第11回日本再生医療学会総会再生医療学会 (2012年6月12日, 横浜)
23. 佐藤陽治 国際協調と日本のあるべき姿 第11回日本再生医療学会総会再生医療学会 (2012年6月13日, 横浜)
24. 佐藤陽治 ヒト多能性幹細胞加工製品の製造における造腫瘍性評価 第11回日本再生医療学会総会再生医療学会 (2012年6月12日, 横浜)
25. Kuramochi T, Satoh M, Atsuki H, Yasuda S, Hayakawa T, Suzuki K, Sato Y. Modes of action of genes facilitating ischemia-induced VEGF secretion in human mesenchymal stem cells. 第85回日本薬理学会年会, 京都 (2012年3月14-16日)
26. 佐藤陽治 細胞治療・再生医療の規制の国際比較 第12回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム, 東京 (2012年2月4日)
27. Sato Y. Update on the Regulation and Development of Cell/Tissue-Based Products in Japan. 2011 International Convention of the Pharmaceutical Society of Korea, 仁川, 韓国 (2011年11月8日)
28. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human stem cells. World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany (2011年11月2-4日)
29. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human somatic stem cells. World Stem Cell Summit 2011, Pasadena, USA (2011年11月3-5日)

30. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human pluripotent stem cells. World Stem Cell Summit 2011, Pasadena, USA (2011年11月3-5日)
31. 佐藤陽治 ヒト iPS (様) 細胞を加工して製造される分化細胞の品質 第1回レギュラトリーサイエンス学会学術大会, 東京 (2011年9月3日)
32. Sato Y, Atsuki H, Satoh M, Tanabe S, Yamaguchi T, Hayakawa T, Suzuki K. Genes associated with ischemia-induced VEGF secretion of human bone marrow mesenchymal stem cells. The 10th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011年6月15-18日)
33. Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y. Identification of genes that regulate cardiomyogenesis in mouse embryonic cells. The 10th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011年6月15-18日)
34. 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)
35. 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.)
36. 神末和哉, 木下充弘, 早川堯夫, 掛樋一晃: シース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.)
37. 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.)
38. 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成合成に対する外的物理的ストレスの影響. 第134年回日本薬学会年会 (2014.3.)
39. 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.
40. 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.
41. 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
42. 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.
43. 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.
44. 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,