

Table 10 iPS細胞 10株の第一主成分得点ランク

外胚葉		中胚葉		内胚葉	
iPS細胞株	主成分得点	iPS細胞株	主成分得点	iPS細胞	主成分得点
mc-iPS	28.625	R-2A	41.111	R-2A	18.867
R-1A	26.398	409B2	18.473	409B2	9.485
253G1	23.865	R-12A	12.138	Ai-100	5.555
201B7	22.213	201B7	1.540	R-1A	5.412
409B2	-11.643	Ai-100	0.877	Ai-103	2.757
Tic	-14.502	Ai-103	0.182	201B7	-0.253
Ai-100	-17.750	R-1A	-2.455	R-12A	-0.489
Ai-103	-18.153	253G1	-12.634	253G1	-9.377
R-12A	-19.165	Tic	-27.006	Tic	-14.033
R-2A	-19.889	mc-iPS	-32.226	mc-iPS	-17.924

Table 11 第一主成分得点ランクと有意な相関のある probe set 数

外胚葉		
正に相関のあるprobe set数	mRNA 136	miRNA 3
負に相関のあるprobe set数	mRNA 92	miRNA 3
中胚葉		
正に相関のあるprobe set数	mRNA 35	miRNA 12
負に相関のあるprobe set数	mRNA 7	miRNA 1
内胚葉		
正に相関のあるprobe set数	mRNA 9	miRNA 23
負に相関のあるprobe set数	mRNA 29	miRNA 0

**Table 12 外胚葉分化に相関のある mRNA および miRNA**

正に相関のある mRNA

Gene Symbol	相関係数				
<i>LOC389906</i>	0.9030	<i>TFPI</i>	0.7333	<i>CDK6</i>	0.6848
<i>AD11</i>	0.8545	<i>TRIM2</i>	0.7333	<i>ING5</i>	0.6848
<i>NUP98</i>	0.8424	<i>NAP1L5</i>	0.7333	<i>MRPL43</i>	0.6848
<i>LUC7L3</i>	0.8303	<i>RHOBTB2</i>	0.7212	<i>LOC644246</i>	0.6848
<i>WNT10B</i>	0.8182	<i>FBN1</i>	0.7212	<i>ING3</i>	0.6848
<i>LOC100507265</i>	0.8182	<i>SYCP1</i>	0.7212	<i>DCAF8</i>	0.6848
<i>LOC389906</i>	0.8182	<i>MPPED2</i>	0.7212	<i>PXDNL</i>	0.6848
<i>YAF2</i>	0.8061	<i>NGDN</i>	0.7212	<i>SMC3</i>	0.6727
<i>IDS</i>	0.7939	<i>RABL3</i>	0.7212	<i>TAF13</i>	0.6727
<i>TFPI</i>	0.7818	<i>KIF21A</i>	0.7212	<i>NME5</i>	0.6727
<i>KREMEN2</i>	0.7818	<i>ARHGAP36</i>	0.7212	<i>TM4SF1</i>	0.6727
<i>MBNL3</i>	0.7818	<i>SORBS2</i>	0.7091	<i>NR3C1</i>	0.6727
<i>CDK6</i>	0.7818	<i>APOBEC3B</i>	0.7091	<i>RABGAP1L</i>	0.6727
<i>TM4SF1</i>	0.7697	<i>ALG13</i>	0.7091	<i>STXBP5L</i>	0.6727
<i>MYL5</i>	0.7576	<i>CNFN</i>	0.7091	<i>DCLRE1C</i>	0.6727
<i>PTX3</i>	0.7576	<i>API5</i>	0.7091	<i>PRICKLE1</i>	0.6727
<i>SLC7A8</i>	0.7576	<i>SALL3</i>	0.6970	<i>TMEM43</i>	0.6727
<i>C20orf103</i>	0.7576	<i>METTL6</i>	0.6970	<i>EIF3C</i>	0.6727
<i>PCDH9</i>	0.7576	<i>LOC100510692</i>	0.6970	<i>BCLAF1</i>	0.6606
<i>SORBS2</i>	0.7576	<i>/// NAIP</i>		<i>POLQ</i>	0.6606
<i>SFRS3</i>	0.7576	<i>ST8SIA3</i>	0.6970	<i>PTN</i>	0.6606
<i>MGC45800</i>	0.7576	<i>PVRL3</i>	0.6970	<i>TCF12</i>	0.6606
<i>LOC100507226</i>	0.7576	<i>BCLAF1</i>	0.6970	<i>NRP2</i>	0.6606
<i>NR3C1</i>	0.7455	<i>AIFM2</i>	0.6970	<i>CSNK2A1</i>	0.6606
<i>PARD6B</i>	0.7455	<i>BRWD1</i>	0.6970	<i>PRICKLE1</i>	0.6606
<i>GPAM</i>	0.7455	<i>STON2</i>	0.6970	<i>ZNF326</i>	0.6606
<i>GUSBP1///</i>	0.7455	<i>LOC100131015</i>	0.6970	<i>SLC25A34</i>	0.6485
<i>GUSBP4</i>		<i>SPAG9</i>	0.6848	<i>CCDC160</i>	0.6485
<i>KCNH5</i>	0.7333	<i>WDFY2</i>	0.6848	<i>C17orf104</i>	0.6485
<i>MBNL1</i>	0.7333	<i>KIAA0101</i>	0.6848	<i>RIOK3</i>	0.6485
<i>CHGA</i>	0.7333	<i>RPS21</i>	0.6848	<i>ZFX///ZFY</i>	0.6485
<i>SRP19 /// ZRSR1</i>	0.7333	<i>ZFX</i>	0.6848	<i>ITFG2</i>	0.6485
<i>DGKI</i>	0.7333	<i>SYCP1</i>	0.6848	<i>LOC145474</i>	0.6485
		<i>DDI2</i>	0.6848	<i>CHD9</i>	0.6485

負に相関のある mRNA

Gene Symbol	相関係数				
<i>UBR5</i>	-0.8667	<i>TMSB4Y</i>	-0.7455	<i>NR3C2</i>	-0.6606
<i>CPZ /// GPR78</i>	-0.8545	<i>EFCAB4A</i>	-0.7455	<i>ADCY8</i>	-0.6606
<i>LY75</i>	-0.8303	<i>LOC100271722</i>	-0.7455	<i>C7orf46</i>	-0.6606
<i>C6orf54</i>	-0.8303	<i>CLC</i>	-0.7333	<i>DLG2</i>	-0.6606
<i>C3</i>	-0.8303	<i>ART3</i>	-0.7333	<i>C13orf38</i>	-0.6606
<i>DPEP3</i>	-0.8303	<i>CAT</i>	-0.7333	<i>RBMS3</i>	-0.6606
<i>LOC100288092</i>	-0.8303	<i>TRIM22</i>	-0.7333	<i>CHRM3</i>	-0.6606
<i>SLC6A15</i>	-0.8182	<i>SOHLH2</i>	-0.7333	<i>ACSM3</i>	-0.6485
<i>CBLC</i>	-0.8061	<i>LOC440173</i>	-0.7333	<i>TEK</i>	-0.6485
<i>SCGB3A2</i>	-0.8061	<i>SCNN1G</i>	-0.7333	<i>LRRC34</i>	-0.6485
<i>CTCFL</i>	-0.7939	<i>GALNT3</i>	-0.7212	<i>KCNQ5</i>	-0.6485
<i>STOM</i>	-0.7939	<i>DDX3Y</i>	-0.7212		
<i>SOX15</i>	-0.7939	<i>PCDHB11</i>	-0.7212		
<i>CHP2</i>	-0.7939	<i>ECHDC3</i>	-0.7212		
<i>CYorf15B</i>	-0.7939	<i>CYP11B1</i>	-0.7091		
<i>FLJ35024</i>	-0.7818	<i>CORO2A</i>	-0.7091		
<i>KLK8</i>	-0.7818	<i>LOC100507619</i>	-0.7091		
<i>TNNC1</i>	-0.7818	<i>NTN4</i>	-0.7091		
<i>C6orf54</i>	-0.7818	<i>COCH</i>	-0.6970		
<i>ZNF204P</i>	-0.7818	<i>FKBP11</i>	-0.6970		
<i>C9orf64</i>	-0.7818	<i>DKFZP434L187</i>	-0.6970		
<i>LOC728730</i>	-0.7818	<i>LOC100505608</i>	-0.6970		
<i>STOM</i>	-0.7697	<i>ZNF385B</i>	-0.6848		
<i>COCH</i>	-0.7697	<i>PTCH1</i>	-0.6848		
<i>COMT</i>	-0.7697	<i>HGC6.3</i>	-0.6848		
<i>SRY</i>	-0.7576	<i>PION</i>	-0.6848		
<i>DPPA5</i>	-0.7576	<i>ZNF385B</i>	-0.6848		
<i>LOC728730</i>	-0.7576	<i>SYNPR</i>	-0.6848		
<i>CASZ1</i>	-0.7576	<i>CAT</i>	-0.6727		
<i>ZNF385B</i>	-0.7455	<i>KDM5D</i>	-0.6727		
<i>LHX8</i>	-0.7455	<i>INVS</i>	-0.6727		
<i>ITPKB</i>	-0.7455	<i>BBS9</i>	-0.6727		
<i>DDX3Y</i>	-0.7455	<i>TCL1A</i>	-0.6727		
		<i>EFCAB2</i>	-0.6606		

正に相関のある miRNA

Gene Symbol	相関係数
hsa-miR-20b-star_st	0.7091
hp_hsa-mir-20b_x_st	0.6848
hvt-miR-H14-star_st	0.6606

負に相関のある miRNA

Gene Symbol	相関係数
hsa-miR-371-3p_st	-0.8303
hsa-miR-373_st	-0.8182
hsa-miR-371-5p_st	-0.6848

**Table 13 中胚葉分化に相関のある mRNA および miRNA**

正に相関のある mRNA

Gene Symbol	相関係数
<i>LOC400680</i>	0.8667
<i>TRIM4</i>	0.8061
<i>ALPK3</i>	0.7939
<i>KLK5</i>	0.7939
<i>ALPK3</i>	0.7939
<i>ZNF506</i>	0.7455
<i>FLJ34208</i>	0.7212
<i>SH3PXD2A</i>	0.7212
<i>PKIB</i>	0.7091
<i>FGFR4</i>	0.6970
<i>ZNF572</i>	0.6848
<i>ZFP3</i>	0.6848
<i>ZNF506</i>	0.6848
<i>CBLC</i>	0.6727
<i>CIDEB</i>	0.6727
<i>FLJ35024</i>	0.6606
<i>CAT</i>	0.6606
<i>CD47</i>	0.6606
<i>ZNF585B</i>	0.6485
<i>CAT</i>	0.6485
<i>DHDH</i>	0.6485
<i>ATP8B3</i>	0.6485
<i>LOC100128252</i>	0.6485

負に相関のある mRNA

Gene Symbol	相関係数
<i>TNFRSF11B</i>	-0.7939
<i>EN2</i>	-0.7818
<i>AJAPI</i>	-0.7212
<i>FOXP1</i>	-0.6970
<i>ASCL1</i>	-0.6849
<i>SALL3</i>	-0.6606
<i>LOC389906</i>	-0.6606

正に相関のある miRNA

Gene Symbol	相関係数
hp_hsa-mir-516a-2_s_st	0.7212
hsa-miR-518e-star_st	0.7212
hsa-miR-520c-5p_st	0.7212
hsa-miR-526a_st	0.7212
hsa-miR-518c-star_st	0.6848
hsa-miR-519c-5p_st	0.6848
hsa-miR-222-star_st	0.6727
hsa-miR-512-5p_st	0.6606
hsa-miR-519a-star_st	0.6606
hsa-miR-524-5p_st	0.6606
hsa-miR-518d-5p_st	0.6485
hsa-miR-518f-star_st	0.6485

負に相関のある miRNA

Gene Symbol	相関係数
aae-miR-100_st	-0.6970

**Table 14 内胚葉分化に相関のある mRNA および miRNA**

正に相関のある mRNA

Gene Symbol	相関係数
<i>DDX58</i>	0.842424
<i>C3orf67</i>	0.733333
<i>CRYZ</i>	0.721212
<i>AACSP1</i>	0.684848
<i>SLC25A4</i>	0.684848
<i>EFCAB2</i>	0.660606
<i>ATP8B3</i>	0.648485

負に相関のある mRNA

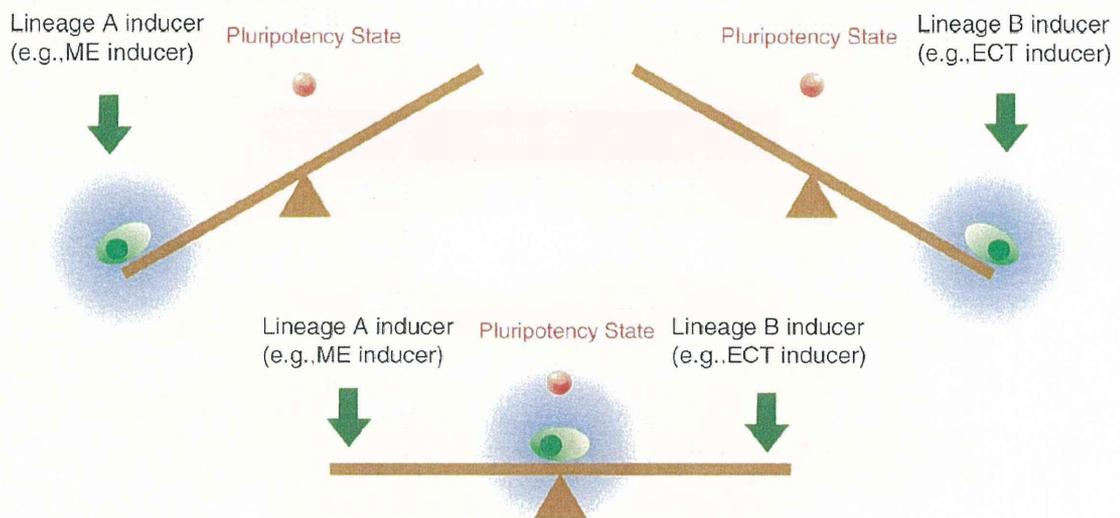
Gene Symbol	相関係数
<i>TNFRSF11B</i>	-0.89091
<i>NXP2</i>	-0.80606
<i>RAB3B</i>	-0.79394
<i>ST8SLA4</i>	-0.79394
<i>NHS</i>	-0.78182
<i>MED13L</i>	-0.7697
<i>SORBS2</i>	-0.74545
<i>LHFP</i>	-0.73333
<i>LARP4</i>	-0.73333
<i>SPIRE2</i>	-0.72121
<i>BAGE2 /// BAGE3 /// BAGE5 /// MLL3</i>	-0.72121
<i>FBN1</i>	-0.70909
<i>AJAP1</i>	-0.69697
<i>SORBS2</i>	-0.69697
<i>C17orf51</i>	-0.69697
<i>PCDH9</i>	-0.68485
<i>XPNPEP3</i>	-0.68485
<i>KLF12</i>	-0.68485
<i>DCC</i>	-0.68485
<i>CPNE8</i>	-0.68485
<i>AJAP1</i>	-0.67273
<i>C6orf106</i>	-0.66061
<i>GPAM</i>	-0.66061
<i>SALL3</i>	-0.66061
<i>CDK6</i>	-0.64848
<i>OSBPL11</i>	-0.64848
<i>CDK6</i>	-0.64848
<i>APCDD1L</i>	-0.64848

正に相関のある miRNA

Gene Symbol	相関係数
hsa-miR-150-star_st	0.7818
ame-miR-3741_st	0.7455
hp_hsa-mir-516a-2_s_st	0.7455
hsa-miR-367_st	0.7333
hsa-miR-4505_st	0.7091
hsa-miR-515-3p_st	0.7091
hsa-miR-516a-5p_st	0.7091
bdi-miR166a_st	0.6970
hsa-miR-4739_st	0.6848
hsa-miR-4521_st	0.6727
hsa-miR-520g_st	0.6727
bmo-miR-2785_st	0.6606

負に相関のある miRNA

なし



**Figure 18** シーソーモデル

iPS 細胞が分化多能性をもつメカニズムの仮説として Shu らの論文 (*Cell*. 2013; 153: 963-975) 中で紹介されたモデル. 青色で示した領域は偶然性 (ノイズ) があると思われる細胞状態, 赤色で示した点は多能性領域を示す. ここでは例として, Lineage A inducer が中内胚葉への分化促進遺伝子, Lineage B inducer が外胚葉への分化促進遺伝子として示されており, 両者がバランスを保った際に細胞は多能性を獲得するという概念を表している.

Table 15 未分化マーカーにおける iPS 細胞の第一主成分得点ランク

未分化	
iPS細胞株	主成分得点
R-2A	12.011
Ai-103	5.939
Tic	5.821
R-12A	3.695
Ai-100	3.434
409B2	2.106
R-1A	-7.200
253G1	-7.318
201B7	-7.437
mc-iPS	-11.050

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
「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」  
分担研究報告書

新規免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験法の開発

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

研究分担者：堤 秀樹 公益財団法人実験動物中央研究所 試験事業部・部長

### 研究要旨

公益財団法人実験動物中央研究所は、NOG (NOD/Shi-*scid*IL2R $\gamma$ <sup>null</sup>) マウスをヘアレス化した系統 (NOD/Shi-*scid*IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> *Hr<sup>Hr</sup>*) を作出・保有しており、造腫瘍性試験を実施した際の視診・触診の容易化や、イメージング技術による各種評価系への適応拡大を目指している。しかし、その免疫学的な背景がオリジナルの NOG マウスと同等か否かは不明確であったため、HeLa 細胞の TPD50 を指標にして異種細胞の生着能を、ヒト臍帯血由来造血幹細胞移植後の経時的 FACS 解析データを指標にして血球細胞の分化動態を求め、その差異を NOG マウスと比較した。

NOG-*hr* マウスの異種細胞 TPD50 は HeLa 細胞単独移植、あるいはマトリゲルとの混合移植の何れにおいても NOG マウスよりも高値を示し、異種細胞生着能が僅かながら低いことが判明した。また、ヒト造血幹細胞移入後のヒト細胞 (CD45 陽性細胞) の出現率はいずれのポイントにおいても NOG-*hr* マウスの方が低かった。しかし、各細胞分画には両者間に大きな差異はなかった。これらのことは NOG-*hr* マウスの免疫不全能は NOG マウスと量的な差はあるものの、質的な差はないことを示している。

### 研究協力者

草川 森士 先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 研究員

浦野 浩司 公益財団法人実験動物中央研究所 試験事業部 室長

町田 一彦 公益財団法人実験動物中央研究所 試験事業部 研究員

## A. 研究目的

再生医療等製品の *in vivo* 造腫瘍性評価試験用の動物として、T 細胞・B 細胞・NK 細胞の欠損、マクロファージと樹状細胞の機能不全、補体活性の消失等の特徴を有する NOG (NOD/Shi-*scid* IL2R $\gamma$ <sup>null</sup>) マウス (Ito *et al.*, Blood, 2002) が中心に位置付けられている。公益財団法人実験動物中央研究所は、BALB/cA ヘアレスマウスのヘアレス遺伝子 (*hr*) をスピードコンジェニック法を併用して NOD/shi マウスに導入し、その後 NOG マウスと 2 回交配してヘアレス化した NOG ヘアレス (NOD/Shi-*scid* IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> *Hr*<sup>hr</sup>、以下 NOG-*hr*) マウスを作出・保有しているが (Fig. 1)、その免疫学的な背景がオリジナルの NOG マウスと同等か否かは不明確なままであった。

そこで、HeLa 細胞の TPD50 (Tumor-producing dose at the 50% endpoint) を指標にして異種細胞の生着能を、ヒト臍帯血由来造血幹細胞移植後の経時的 FACS 解析データを指標にして、異種血球細胞分化動態を求め、その差異を NOG マウスと検討した。

## B. 研究方法

### B-1 異種細胞 (HeLa 細胞) 生着能の差について

#### B-1-1 動物

実中研にて液体窒素中に保存している NOG-*hr* マウスの凍結保存胚から個体に戻

した雌雄各 80 匹を用いた。また、比較対象として雌ヌードマウス 40 匹 (日本クレア) および雌 NOG マウス 100 匹を用いた。なお、雄ヌードマウスおよび雄 NOG マウスに関する TPD50 のデータは草川ら (第 12 回日本再生医療学会総会) のデータを引用した。

#### B-1-2 試験群構成

実中研内にある生産区域から実験専用動物室 (バリア区域内) に移動後、1 週間の馴化を経た後、全頭体重測定を行い、平均値が等しくなる様「汎用群分けシステム (ヴィジョンズ)」を用いて、Table 1 に示した群に分けた。全て 10 匹/群とし、個体識別は耳パンチ/カット法により行った。

#### B-1-3 被験細胞と移植方法

HeLa 細胞は独立行政法人医薬基盤研究所から国立医薬品食品衛生研究所、遺伝子細胞医薬部が購入し、同所で培養したものを用いた。細胞は所定の手順にしたがい、培地 (MEM+10%ウシ胎児血清+ペニシリン/スプレプトマイシン) またはマトリゲル (LONZA, Allendale, NJ) により、投与容量が 0.1 mL/匹になる様に懸濁調整し、25 G 注射針付き 1mL ツベルクリン用シリンジに充填し、移植直前まで 4°C にて保存した。移植は無麻酔下にて各マウスの背部皮下に行い、移植日を 0 日とした。

#### B-1-4 結節形成の判定

毎週 1 回体重測定および触診による結節形成の確認を行った。結節が確認されたらノギスで長径(L)と短径(W)を測定し、結節体積(V)を「ヌードマウスと抗癌剤評価」(野村達次、櫻井欽夫、稲葉實編著、蟹書房、1991)の腫瘍体積簡易計算式にしたがい、計算式  $V=LW^2/2$  で算出した。この結節体積は比重を 1 として結節重量とし、体重の 10%を超過した際は、人道的エンドポイントとして観察を終了し、イソフルラン吸入麻酔下で安楽死させ、移植部位を採材した。

#### B-1-5 TPD50 の計算

雌雄別、群別に結節形成率を求め、統計解析ソフト Prism (Ver. 6 GraphPad Software, Inc.) を使用し、4 パラメータのロジスティック回帰分析の結果より算出した。

### B-2 ヒト臍帯血由来造血幹細胞の分化動態の経時的変化

#### B-2-1 動物

B-1 と同様に、凍結保存胚から個体に戻した NOG-*hr* マウス雌 3 匹、雄 4 匹および NOG マウス雌雄各 5 匹を用いた。

#### B-2-2 ヒト臍帯血造血幹細胞移入および FACS 解析

マウスは 7-8 週齢時に 2.5Gy の放射線照射を行った後、ヒト臍帯血由来造血幹細胞 (Allells, LLC, Alameda, CA)  $8.5 \times 10^4$

個/匹を尾静脈より移入した。

移入後 4, 8, 13, 16 および 20 週後にイソフルラン吸入麻酔下で眼窩静脈叢より 100 $\mu$ L 採血して 2 本のチューブに分取し、各々遠心分離 (3000 rpm、3 分、室温) して血漿分画を得た後、1 x RBC lysis buffer 1 mL を加えての遠心分離 (3000 rpm、3 分、室温) を数回繰り返した。上清除去後、予め調整した抗体カクテル A (mCD45, hCD45, hCD3, hCD19, hCD33, BioLegend, San Diego, CA) あるいは B (hCD45, hCD3, hCD4, hCD8, hCD56, BioLegend, San Diego, CA) を添加して充分攪拌し、氷上で 30 分静置後 2% FBS 加 PBS, 1 mL を添加して遠心分離 (3000 rpm、3 分、室温) し、上清を廃棄した後 P/RNase staining buffer, 125  $\mu$ L を添加した染色細胞浮遊液を FACSCant (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) にて測定・解析した。

#### (倫理面への配慮)

本動物試験の全ては「公益財団法人実験動物中央研究所 動物実験等に関する規程」に則り必要な審査を受け、承認されたものであった。

また使用された HeLa 細胞はヒト由来細胞であるが、提供者の国立医薬品食品衛生研究所内において適切に培養され、作業者に直接接触することなく動物に移植された。さらにヒト臍帯血由来造血幹細胞は米国内の法律に則り、インフォームドコンセントの得られたボランティアから提供された主要感染症陰性の証明書が

添付された市販品を使用した。

## C. 研究結果

### C-1 異種細胞 (HeLa 細胞) 生着能の差について

雄 NOG-*hr* マウスの異種細胞 TPD50 は HeLa 細胞単独移植、あるいはマトリゲルとの混合移植の何れにおいても、NOG マウスよりも高く、異種細胞生着能が僅かながら低いことが明らかになった (Fig. 2, 3)。

一方、雌 NOG-*hr* マウスの異種細胞 TPD50 は、HeLa 細胞単独の場合はヌードマウスと同等であり、マトリゲルと混合した場合は、同条件の NOG マウスよりも TPD50 が低下する現象がみられた (Fig. 2, 3)。

### C-2 ヒト臍帯血由来造血幹細胞の分化動態の経時的変化

#### C-2-1. 末梢血中へのヒト細胞の出現

NOG および NOG-*hr* マウスにおけるヒト CD45 陽性細胞の出現は移入 4 週間後からみられ、16 週間後まで漸次的に増加した。出現率はいずれのポイントにおいても NOG-*hr* マウスの方が低かった (Fig. 4)。

#### C-2-2. 細胞分画について

分化した各細胞分画は NOG-*hr* マウスおよび NOG 間における差異は観察されなかった。

移入 4 週間後には B 細胞 (CD19 陽性細

胞) が約 50%を占めており、移植後 8 週をピークに、以降減少した。T 細胞 (CD3 陽性細胞) は移入 13 週から出現し、時間の経過に伴い漸次的に増加した。

細胞障害性 T 細胞 (CD8 陽性細胞) およびヘルパー T 細胞 (CD4 陽性細胞) の割合に、NOG-*hr* マウスおよび NOG マウス間の大きな差異は認められなかった。

NK 細胞 (CD56 陽性細胞) は移入 4 週間後から認められた、NOG-*hr* マウスの方が NOG マウスよりも出現率は多い傾向にあった。

## D. 考察

NOG-*hr* マウスの HeLa 細胞 TPD50 は雌雄間で著しい差が認められた。特に雌において HeLa 細胞移植群の TPD50 がヌードマウスに近似であったにも関わらず、マトリゲルとの混合移植群では、極めて低い値 (1/6004) を示し、マウスの遺伝的素因よりも、移植細胞あるいは移植操作時の何らかの副次的要因に影響されていると考えられた。

ただし、雄の TPD50 データ、ならびにヒト臍帯血由来造血幹細胞の分化動態を俯瞰すると、NOG-*hr* マウスは NOG マウスよりも免疫不全度が低下している傾向が十分に採れた。*hr* 遺伝子を NOD/Shi マウスに導入する過程において、スピードコンジュニック法を併用して理論的には十分に遺伝子置換 (バッククロス) したが、マーカー遺伝子以外の領域に何らかの BALB/c A の遺伝的素因が残存し、こ

れに起因して免疫機構が僅かに惹起した可能性が考えられた。現在、より詳細な背景遺伝子検査と NOG マウスへの追加交配を実施している。

NOG-*hr* マウスの代替候補として当所では BALB/c A *Rag2<sup>null</sup>* *Il2rg<sup>null</sup>* (BALB/c-dKO) も保有している。本系統にはヌード (BALB/c-dKO-nu) も存在しているため、同様の方法で TPD50 を求めて、今回のデータと比較することを来年度計画している。また、NK 活性および補体活性も測定中であり、レギュラトリーサイエンスの現場に最も適した造腫瘍性試験用動物を選択するための基礎データを今後も揃えていく。

#### E. 結論

NOG-*hr* マウスの免疫不全能は NOG マウスと量的な差はあるものの、質的な差はなかった。

#### F. 研究危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### G-1 論文発表

なし

##### G-2 学会発表

1. 町田一彦、草川森士、澤田留美、安田智、伊藤守、堤秀樹、佐藤陽治  
NOGマウスにおけるHeLa細胞生着能の定量的検討 第60回日本実験動

物学会総会、つくば(2013年5月15-17日)

2. Tsutsumi H, Machida K, Kusakawa S, Sawada R, Yasuda S, Ito M, Sato Y. Quantitative Analysis on HeLa Engrafting Ability in NOG Mice. 12<sup>th</sup> FELASA, Barcelona, Spain (2013年6月10-13日)
3. Urano K, Machida K, Kusakawa S, Sawada R, Yasuda S, Ito M, Tsutsumi H, Sato Y. Quantitative Analysis on HeLa Engrafting Ability in NOG Mice. EUROTOX 2013, Interlaken, Switzerland (2013年9月1-4日)
4. Mizushima T, Machida K, Inoue R, Kusakawa S, Sawada R, Sato Y, Tsutsumi H. Analysis in Xenograft Susceptibility in NOG and NOG-hairless Mice. 4<sup>th</sup> International Workshop Humanized Mice. Seoul, Korea (2013年9月30日-10月2日)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### H-1. 取得特許

なし

##### H-2. 実用新案登録

なし

##### H-3. その他

なし

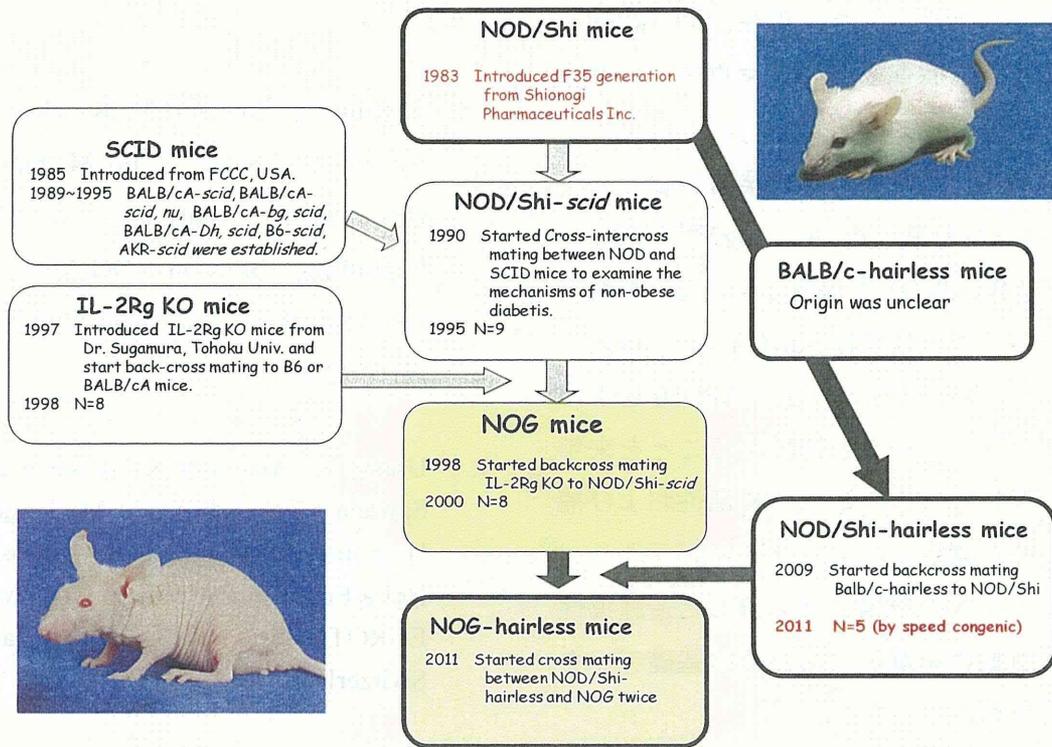


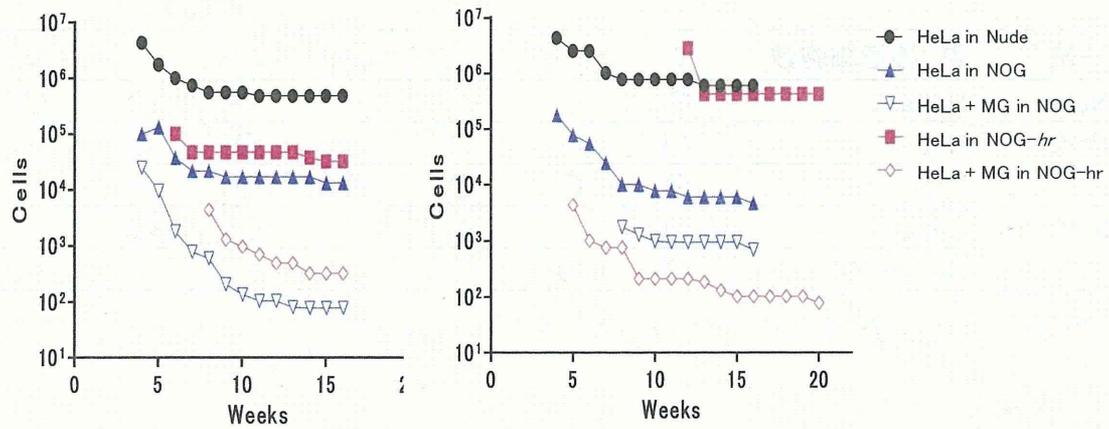
Fig. 1. NOG-*hr* (NOD/Shi-*scid*IL2Ry<sup>null</sup> *Hr<sup>hr</sup>*) マウスの開発経緯

BALB/cヘアレスマウスのヘアレス遺伝子 (*hr*) をスピードコンジェニック法を併用してNOD/shi マウスに導入し、その後NOG マウスと2回交配してヘアレス化した

Table 1 試験群構成

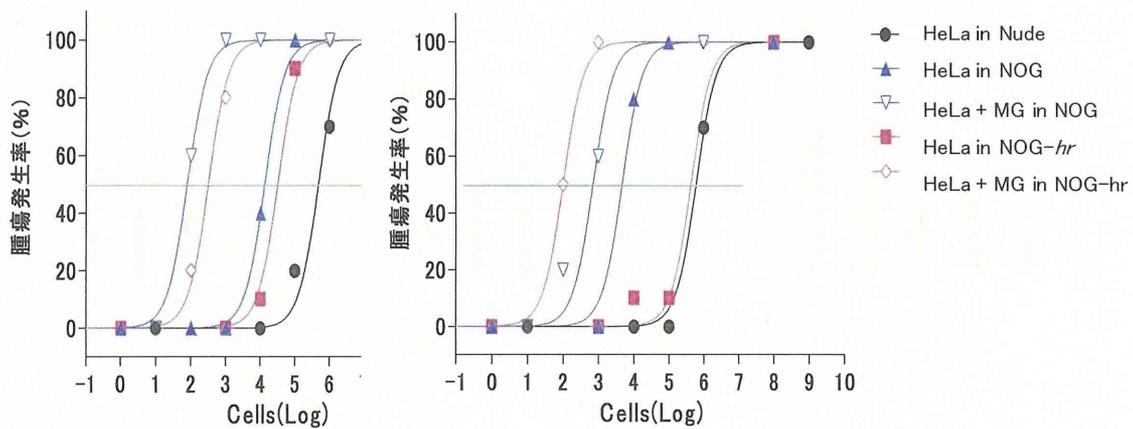
系統	群/移植細胞数	0	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$
Nude	HeLa	○	—	—	—	○	○	○
NOG	HeLa	○	—	○	○	○	○	—
	HeLa+MG	○	○	○	○	○	—	—
NOG-hr	HeLa	○	—	—	○	○	○	—
	HeLa+MG	○	○	○	○	—	—	—

雌雄ともに同じ群構成とした。○は設定群、—は未設定群



**Fig. 2** TPD50 の推移

雄（左）では週の経過とともに何れの群も低下し、移植後16週で安定した。雌（右）では、NOG-*hr*マウスのHeLa細胞移植群はヌードマウスに近似し、HeLa細胞とマトリゲルの混合移植群ではNOGマウスの同移植群よりも著しく低下した。



系統	群	雄		雌	
		TPD 50	倍率	TPD 50	倍率
Nude	HeLa	$4.2 \times 10^5$ *	1 *	$6.0 \times 10^5$	1
NOG- <i>hr</i>	HeLa	$3.2 \times 10^4$	1/13	$4.2 \times 10^5$	1/1.4
	HeLa+MG	$2.1 \times 10^2$	1/2040	$1.0 \times 10^2$	1/6004
NOG	HeLa	$1.3 \times 10^4$ *	1/33 *	$4.6 \times 10^3$	1/129
	HeLa+MG	$7.8 \times 10$ *	1/5431 *	$7.0 \times 10^2$	1/859

\*: 草川ら (第 12 回日本再生医療学会総会) から引用\*

Fig. 3 移植後 16 週における腫瘍形成率のロジスティック回帰分析 (上段左: 雄、同右雌) と各群の TPD50 値とヌードマウスを基準にした倍率 (下段)

ヌードマウスの HeLa 細胞 TPD50 には雌雄差はなかった。NOG-マウスでは HeLa 細胞 TPD50 は雌が雄よりも低かった (異種細胞生着能が高かった) が、マトリゲルを混合した場合その状況が逆転した。NOG-*hr* マウスの HeLa 細胞 TPD50 は、雄ではヌードマウスと NOG マウスの中間の値を示したが、雌ではヌードマウスに近似であった。しかし、マトリゲルを混合した場合雌雄で状況が異なり、雄では NOG マウスよりも高値を、雌では低値を示した。