

201335008A

厚生労働省科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究(再生医療関係研究分野)

ヒト幹細胞の造腫瘍性における病態解明と
その克服に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 早川 堯 夫

平成 26(2014)年 3 月

厚生労働省科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

[難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

(再生医療関係研究分野)]

ヒト幹細胞の造腫瘍性における病態解明と

その克服に関する研究

平成 25 年度 総括分担研究報告書

研究代表者 早 川 堯 夫

平成 26 (2014) 年 3 月

目次		頁
I. 総括研究報告		
ヒト幹細胞の造腫瘍性における病態解明とその克服に関する研究		2
	早川 堯夫	
II. 分担研究報告		
1. 各種細胞調製と特性評価		31
	早川 堯夫	
2. 細胞・腫瘍の各種分子生物学的評価手法の開発と活用およびモデル動物による腫瘍形成と病理学的評価		52
	佐藤 陽治 堤 秀樹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		67
IV. 研究成果の刊行物・別刷		71

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」

総括研究報告書

ヒト幹細胞の造腫瘍性における病態解明とその克服に関する研究

研究代表者：早川 堯夫 近畿大学薬学総合研究所 所長・特任教授

研究要旨

ヒト iPS 細胞や ES 細胞などの多能性幹細胞が従来の医療の壁を越える製品を生み出し、病に苦しむ患者に光明をもたらす可能性が大きく期待されている。しかし、iPS/ES 細胞などから各種の革新的医療製品を開発していく際には、これら多能性幹細胞の特性である造腫瘍性にかかわるリスク対策を講ずる必要があり、これが実用化促進の最大の隘路の一つとされている。この造腫瘍性のリスク対策には、リスクの量的把握と質的把握が必要であるが、いずれも世界的に十分な検討がなされていない。わが国がこれらの問題解決に必要な技術基盤を世界に先駆けて構築できれば、ヒト iPS/ES 細胞や由来製品に関する研究開発の先駆性と併せ、再生医療実用化における国際的な優位性を確保できると期待される。本研究では、主に造腫瘍性リスクの質的把握に関して、とくに、原材料としての各種ヒト iPS/ES 細胞の造腫瘍性に関する発生頻度、悪性度とその機序、その検査方法の観点から検討し、対応策等の研究開発を行うことを目的としている。

平成 25 年度は主に、各種のヒト iPS/ES 細胞を調製し、初期化遺伝子の存在（量）その他の細胞特性を解析するとともに、材料としての各種ヒト多能性幹細胞の造腫瘍性と関係するヒト多能性幹細胞の特性指標の同定を目標とし、重度免疫不全マウスである NOG マウスへのヒト多能性幹細胞の移植試験プロトコルの検討および至適化を試みた。その結果、形質が安定なヒト脂肪組織由来幹細胞の作製、ならびにこの細胞を材料とした高品質の iPS 細胞を複数株樹立することに成功した。これらのエピゾーマル遺伝子導入により作製に至った初代 iPS 細胞では、腫瘍の悪性化と関係すると推定されている遺伝子群の発現が極めて低く、また導入された初期化遺伝子の残存がないことなどが観察された。一方、ヒト多能性幹細胞は、酵素処理等により単一細胞にまで分散するとアポトーシスを起こすというユニークな性質をもつことが知られている。この「分散誘導性アポトーシス」を回避しつつ、NOG マウスにおいて高い生着性と再現性をもってヒト多能性幹細胞の造腫瘍性を評価するための試験プロトコルの検討を行った。その結果、ヒト多能性幹細胞をヒト新生児由来繊維芽細胞および ROCK 阻害剤とともにマトリゲルに懸濁して背部皮下に投与するという方法により、100 個程度の少量の iPS 細胞の移植によっても腫瘍形成が観察されることが明らかとなった。なお、ヒト多能性幹細胞の生着性・造腫瘍性向上はヒト新生児由来繊維芽細胞に特異的であり、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞との同時投与では ROCK 阻害剤およびマトリゲル共存下においても全く観察されないことが明らかとなった。

分担研究者（順不同）

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

堤 秀樹 (公財)実験動物中央研究所 試験事業部 部長

研究協力者（順不同）

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

草川 森士 公益財団法人 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

森山 博由 近畿大学 薬学総合研究所 准教授

森山 麻里子 (公財)先端医療振興財団 研究員

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞や ES 細胞などの多能性幹細胞が従来の医療の壁を超える製品を生み出し、病に苦しむ患者に光明をもたらす可能性が大きく期待されている。

しかし、iPS 細胞や ES 細胞などから各種の革新的再生医療製品を開発していく際には、これら多能性幹細胞の特性である造腫瘍性にかかわるリスク対策を講ずる必要があり、これが実用化促進の最大の隘路の一つとされている。

この造腫瘍性のリスク対策には、リスクの量的把握と質的把握が必要であるが、いずれも世界的に十分な検討がなされていない。わが国がこれらの問題解決に必要な技術基盤を世界に先駆けて構築できれば、ヒト iPS/ES 細胞や由来製品に関する研究開発の先駆性と併せ、再生医療実用化における国際的な優位性を確保できると期待される。

本研究では、主に造腫瘍性リスクの質的把握に関して、とくに、原材料としての各種ヒト iPS 細胞及び ES 細胞の造腫瘍性に関する発生頻度、悪性度と機序、その検査方法の観点から検討し、対応策等の研究開発を行うことを目的としている。

B. 研究方法

本研究の主な課題の一つは、ヒト iPS/ES 細胞株などの多能性幹細胞に由来する腫瘍の発生頻度、悪性度と機序、検査法の検討である。そのため、まず、様々なヒト多能性幹細胞株を調製し、それらの特性解析を行い、重度免疫不全動物 NOG マウスに投与し、腫瘍（奇形腫）形成をモニターすることにより、どのような特性指標を持つ細胞が腫瘍形成やその悪性度にどのような影響を及ぼすかの検討を行おうとしている。そのため 25 年度は、以下の方法により、ヒト iPS 細胞を調製もしくは入手、細胞特性解析をするとともに、NOG マウスへのヒト多能性幹細胞の移植試験プロトコルの検討および至適化を試みた。

B-1. ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の樹立と培養

ヒト皮下脂肪組織は形成外科時の余剰部位として、インフォームドコンセントを十分に行い供与を受けた。研究プロトコルは近畿大学薬学総合研究所、公益財団法人先端医療振興財団、神戸大学病院、大阪市立大学医学部の倫理委員会によって承認されている。新規ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞（hypoxia-induced human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Hx-hASC）は、以下のように調整した。ヒト脂肪組織は細かく切り刻んだ後、0.3 units/mL のコラゲナーゼ溶液中で 37°C、1 時間振盪し消化させた。消化物はセルストレイナーで漉した後、600 g で 10 分間遠心した。沈殿物を PBS で再懸濁し、赤血球を Lymphoprep（密度 1.077）で除去した後、DMEM に 10% ウシ胎児血清を加えた培地で培養した。24 時間後、浮遊細胞を除去するためにリン酸緩衝液で洗浄した後、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）で処理し、浮遊してきた細胞のみをフィブロネクチンコーティングディッシュに播種、低酸素濃度下で培養した。使用した培地は 60% DMEM（低グルコース）、40% MCDB-201 培地、1×インスリン-トランスフェリン-セレニウム（Life Technologies 社）、1 nM デキサメタゾン、100 mM アスコルビン酸、10 ng/mL epidermal growth factor（ペプロテック社）、5% ウシ胎児血清である。細胞は 5×10^3 細胞/cm² になるようにフィブロネクチンコーティングディッシュに播種し、2 日おきに培地交換を行った。

B-2. iPS 細胞の樹立

レンチウイルスを用いた山中 4 因子の導入には、pLM-fSV2A（Addgene より購入）を用いた。pLM-fSV2A、pCMV-VSVG-HSV-Rev、pCMV-HIVgp（理研 三好先生より供与され

た)を 293T 細胞に導入し、レンチウイルスベクターを作成し、Hx-hASC に感染させた。レトロウイルスを用いた山中 4 因子の導入には、pMX-hOCT4、pMX-hcMYC、pMX-hSOX2、pMX-hKLF4、pCMV-VSVG を Platinum-GP Retroviral Packaging Cell Line (Cell BioLabs 社)に導入し、レトロウイルスベクターを作製し、Hx-hASC に感染させた。エピゾーマルベクターを用いた山中因子の導入は以下のように行った。HxhASC に pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL、pCXWB-EBNA1 (Addgene より購入)を Nucleofector 4D (ロンザ社)を用いて導入した。遺伝子導入した Hx-hASC はコンフルエントになった後、マトリゲル (コーニング社)でコートした 6 ウェルプレートに播種した。遺伝子導入後 2 日目に、hASC 用培地: mTeSR1 (Stem Cell Technologies 社) 1:1 培地に置き換え、3 日目に Hx-hASC 培地: mTeSR1 1:3 培地に置き換え、4 日目に mTeSR1 培地に置き換え、以後毎日 mTeSR1 で培地交換した。遺伝子導入後約 18 日後、iPS のコロニーを顕微鏡下で拾い、マトリゲルコートしたディッシュで培養を行った。

B-3. 免疫染色法

iPS 細胞を 4%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液で固定し、2%スキムミルク、0.1% TritonX-100 含有 PBS で 1 時間ブロッキングした後、ウサギ免疫抗 Oct4 抗体 (Abcam 社; 1/1000)、ウサギ免疫抗 Nanog 抗体 (ReproCell 社; 1/200)、ラット免疫抗 E-cadherin 抗体 (クロンテック社、クローン ECCD-2; 1/2000)、マウス免疫抗 TRA-1-60 抗体 (Millipore 社; 1/1000) を加え、4°C、オーバーナイトでインキュベートした。二次抗体は Alexa488 標識抗マウス IgM 抗体、Alexa488 標識抗ラット IgG 抗体、Alexa546 標識抗ウサギ IgG 抗体 (いず

れも Life Technologies 社; 1/1000)を用いた。核は DAPI で染色し、観察、撮影は BioRevo (キーエンス社)で行った。

B-4. フローサイトメトリー解析

iPS 細胞を CTK 溶液 (0.25% trypsin and 0.1 mg/mL collagenase IV in PBS containing 20% KSR and 1 mM CaCl₂) で回収した後、Tryple Express (Life Technologies 社)でシングルセルにした。以降は Y-27632 (Rock 阻害剤)を 10 μM となるように加え、細胞死を抑制した。FACS 染色液 (1% BSA、2 mM EDTA、0.1%アジ化ナトリウム含有 PBS) に懸濁し、PE 標識抗 SSEA-3 抗体、FITC 標識抗 TRA-1-60 抗体、FITC 標識抗 TRA-1-81 抗体、PE 標識抗 CD324 (E-cadherin) 抗体 (全て BioLegend 社)で染色を行った。死細胞は Live/Dead Fixable Violet Dead Cell Stain (ライフテクノロジーズ社)により除去した。解析は EC800 (SONY 社)を用いて行った。

B-5. 定量的 PCR

hASC 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。cDNA 合成は Verso cDNA Synthesis Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を用い、プロトコールに準拠して行った。得られた cDNA は SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad 社)を用い、CFX96 で定量的 PCR に供した。使用したプライマーは Table1 に示した。

B-6. エピゾーマルベクターの残存試験

iPS 細胞からのエピゾーマル DNA 抽出は QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen)を用いて行った。iPS 細胞からのゲノム抽出は、Lysis Buffer (50 mM KCl、10 mM Tris-HCl

(pH 8.3)、1.5 mM MgCl₂、0.1% Gelatin、0.45% Tween-20、0.45% NP-40 (Nonidet P-40)、125 µg/ml Proteinase K) 中で 55°C、オーバーナイトで細胞を溶かして行った。PCR 反応は、HotStar Taq Master Mix (Qiagen 社) を用い、プライマーとして pEP4-SF1 : 5'-TTC CAC GAG GGT AGT GAA CC-3'、pEP4-SR1 : 5'-TCG GGG GTG TTA GAG ACA AC-3'を用いて行った。サイクル数は以下のように行った。

94°C	15 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
64°C	30 sec	
72°C	40 sec	

反応産物は 2% アガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、UV 照射して撮影した。

B-7 使用動物

本実験に用いた SPF の NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic (NOG 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。NOG マウスは、6~8 週齢の雄を搬入し 1 週間の馴化期間の後に細胞の移植を行った。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-8 iPS 細胞移植試験

iPS 細胞 (201B7) は、理化学研究所バイオリソースセンターから入手し、マトリゲル (Corning) でコートしたディッシュまたはプラスチック内で、mTeSR1 培地 (STEMCELL Technologies) にて培養・継代した。正常ヒト繊維芽細胞 (Neonatal Normal Human Dermal Fibroblasts: NHDF) は、Lonza 社の

ものを購入し、10%ウシ胎児血清と抗生物質 (ペニシリン/ストレプトマイシン) を含む MEM 培地で培養・継代した。NHDF は、移植日前日にマイトマイシン C (和光) を培地に 10 µg/ml の濃度で添加し、37°C/5% CO₂ 条件下で 3 時間インキュベートすることで、分裂増殖を停止させる処理を施した。iPS 細胞は、CTK 溶液 (ReproCELL) 及び STEMPRO EZPassage (Life Technologies) を用いてクランプ状態までの分散処理、または Accutase (Life Technologies) を用い単一細胞までの分散処理を施し、mTeSR1 培地で懸濁し細胞数を調整した。一方、NHDF はトリプシン/EDTA を用いて分散処理を施し、mTeSR1 培地で懸濁し細胞数を調整した。移植に際しては、培地とマトリゲルで 1 : 1 の割合で構成された 100mL の細胞懸濁液を、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移植した。NHDF 10⁶ に対し、iPS 細胞を様々な細胞数に調整し混入させた細胞懸濁液を NOG マウスへ移植し、結節形成を 16 週間観察した。移植群は、以下の 9 群からなる: ①iPS クランプ移植: 細胞用量 5 点 (0, 10¹, 10², 10³, 10⁴; 各 6 例)、②iPS 単一細胞移植: 細胞用量 4 点 (10¹, 10², 10³, 10⁴; 各 6 例 [コントロールは①の 0])。移植時の細胞継代数は、iPS 細胞が 32、NHDF は 6 であった。

次に、iPS 細胞の NOG マウスへの生着を高める目的で、分散誘導性のアポトーシスを抑制する作用で知られる ROCK 阻害剤 (Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho 結合キナーゼ) を添加した細胞懸濁液を移植する試験を行った。移植に際しては、培地とマトリゲルで 1 : 1 の割合で構成され、さらに、ROCK 阻害剤である Y-27632 (和光) を 10 µM 含む 100mL の細胞懸濁液を、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移植した。

最初の実験と同様、NHDF 10⁶に対し、iPS 細胞を様々な細胞数に調整し混入させた細胞懸濁液を NOG マウスへ移植し、結節形成を 16 週間観察した。移植群は以下の 5 群からなる：iPS 単一細胞移植：細胞用量 5 点 (0, 10¹, 10², 10³, 10⁴; 各 10 例)。移植時の細胞継代数は、iPS 細胞が 35、NHDF は 7 であった。

B-9 hMSC 中に混入する iPS 細胞の検出能力の検討

骨髄由来ヒト間葉系幹細胞 (human Mesenchymal Stem Cell: hMSC) は、Lonza 社より入手し、同社推奨のプロトコールに従って、同社のヒト間葉系幹細胞専用培地 (MSCGM™ BulletKit™) を用い、培養・継代した。iPS 細胞は、Accutase を用い、一方、hMSC はトリプシン/EDTA を用いて分散処理を施し、mTeSR1 培地で懸濁し細胞数を調整した。移植に際しては、培地とマトリゲルで 1:1 の割合で構成され、さらに、Y-27632 を 10 μM 含む 100mL の細胞懸濁液を、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移植した。hMSC 10⁶に対し、iPS 細胞を様々な細胞数に調整し混入させた細胞懸濁液を NOG マウスへ移植し、結節形成を 16 週間観察する。移植群は以下の 5 群からなる：iPS 単一細胞移植：細胞用量 5 点 (0, 10¹, 10², 10³, 10⁴; 各 10 例)。移植時の細胞継代数は、iPS 細胞が 35、hMSC は 7 であった。

B-10 統計処理

移植細胞数と腫瘍形成確率を元に、Spearman-Kärber 法を用い、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) を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、近畿大学薬学総合研究所の動物実験指針、研究倫理審査委員会規程等にある倫理面の審査・承認に係る一切の研究項目に該当しない。また、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞及びヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞由来 iPS 細胞はヒト検体より得られるが、検体提供元での倫理委員会にて近畿大学薬学総合研究所との共同研究を明記した倫理審査で研究が認められている。また、今回の研究実施用途から考えて、上述以上、特段に倫理面への配慮に該当するような事項はないと考えられる。一方、分担研究機関においては、動物実験を行う際、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」および(公財)実験動物中央研究所で定められた規定に基づき、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」および(公財)実験動物中央研究所で定められた規定を遵守した上で研究を実施した。

C. 研究結果

C-1. 形質が安定なヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の創製

形質が安定なヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を創製するため、我々は低酸素に注目し、低酸素濃度条件にて培養を行った。すると、低酸素濃度下で培養したヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞(Hx-hASC)は、従来の hASC と比べ、細胞倍加レベル (図 1A) ならびに EdU の取り込みによる増殖能 (図 1B) とともに向上していることが明らかとなった。また、脂肪、骨、軟骨への分化能を調べたところ、骨、脂肪 (図 2A)、軟骨 (図 2B) へのいずれにおいても、分化能が向上していることが明らかとなった。

また、低酸素濃度下で培養することによって、この細胞内での酸化ストレスが減少し(図 3A)、抗老化作用があることが示唆された(図 3B)。また、この増殖能・分化能の向上をもたらす因子を探索したところ、低酸素濃度下では低酸素応答因子(Hypoxia Induced Factor: HIF)は上昇していないことが示された(図 4D, E)。一方、低酸素濃度下では Notch1 の活性化(図 4A)ならびにその下流因子である Hes1 の発現上昇が確認された(図 4B, C)。また、Notch シグナルを抑制することによって、細胞倍加レベルも抑制された(図 4F)ことから、Hx-hASC の増殖能は、Notch シグナルによって制御されていることが示唆された。

C-2. 新規ヒト脂肪組織由来幹細胞由来 iPS 細胞の作製

hASC と Hx-hASC に山中 4 因子をレトロウイルスベクターで導入し、フィーダーフリーで iPS 細胞を作製したところ、表 2 に示すように Hx-hASC を用いた方がより多数の iPS コロニーを得ることが出来ると判明した。そこで以降、Hx-hASC を用いて iPS 細胞を樹立することにした。単一レンチウイルスベクターによる山中 4 因子の導入、ならびにエピゾーマルベクターによる山中 4 因子の導入により、約 0.01~0.1% の細胞が iPS コロニーを形成した。それぞれ 24 個ずつコロニーをピックアップし、培養を続けたところ、レトロウイルスベクターによる iPS 細胞株は 8 株、レンチウイルスベクターを用いた iPS 細胞株は 4 株、エピゾーマルベクターによる iPS 細胞株は 10 株樹立することに成功した。それらの iPS 細胞株は Oct3/4、Nanog、LIN28A、TRA-1-60、TRA-1-81、SSEA-3、SSEA-4、E-Cadherin 陽性であることが、免疫染色(図 5A)、フローサイトメトリー解析(図 5B)、ならびに定量的 PCR(図 5C)によって示された。

C-3. 樹立 iPS 細胞株の特性解析評価法のバリデーション

エピゾーマルベクターにより樹立した iPS 細胞株のゲノムを抽出し、エピゾーマルベクターの残存性ならびにゲノムへの挿入の有無を PCR で確認したところ、導入された初期化遺伝子は残存していないことが確認された(図 6)。また、腫瘍の悪性化と関係すると推定されている *HHLA1*、*ABHD12B*、*C4orf51* 遺伝子の発現量を定量的 PCR で確認したところ、これらの遺伝子発現量は我々の樹立した iPS 株ではきわめて低いことが判明した(図 7)。

C-4 iPS 細胞移植試験

本研究では、T 細胞、B 細胞および NK 細胞を欠損する重度免疫不全マウスモデルである NOG マウスにおいて、iPS 細胞の生着性を検討した。ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に酵素処理等で単一細胞まで分散するとアポトーシスを起こすという特性を有しているため、動物個体への生着性を評価するためには iPS 細胞を単一細胞まで分散させず、小さな細胞塊(クランプ)の状態に移植することが望ましいと考えられた。そこでまず、予備的試験として、iPS 細胞の細胞数を段階的に振って NOG マウスへの移植を行ったが、細胞数依存的な腫瘍形成が明瞭に観察されなかった(データ省略)。その理由として、クランプの状態では細胞数のばらつきが生じ、このことが結果に影響した可能性や、ヒト iPS 細胞を動物に効率よく生着させるためには、移植方法など何らかの工夫が必要である可能性などが考えられた。そこで、Hentze らによって 2009 年に報告されていたヒト ES 細胞の造腫瘍性試験の方法を参考にし、ヒト iPS 細胞への応用を試み、多能性幹細胞の培養時にフィーダー細胞として用いられる繊維芽細胞を混ぜた状態で移

植を行った。正常ヒト繊維外細胞である NHDF 10^6 に対し、iPS 細胞をクランプもしくは単一細胞の状態、様々な細胞数に調整し混入させた細胞懸濁液を雄性の NOG マウスへ各群 6 匹ずつ移植し、結節形成を 16 週間観察した。

その結果、細胞移植後 3 週目において、iPS クランプ移植群では、 10^4 個移植群で 4 匹、 10^3 個移植群で 1 匹に結節形成が認められた。一方、iPS 単一細胞移植群では、 10^4 個移植群で 1 匹に結節形成が認められた。移植後 8 週目においては、iPS クランプ移植群では、 10^4 個移植群で 6 匹全て、 10^3 個移植群で 5 匹に結節形成が認められたのに対し、iPS 単一細胞移植群では、 10^4 個移植群で 5 匹に結節形成が認められたものの、それより少ない細胞数の移植では結節形成が全く観察されなかった。それ以降 16 週目までの結果を含め、図 8 に示した。Table 1 に NOG マウスにおける iPS 細胞生着能として、移植後 16 週目における各群の腫瘍形成率をまとめた。これらの数値から Spearman-Kärber 法で算出された TPD_{50} 値は、iPS クランプ移植群、iPS 単一細胞移植群でそれぞれ 3.1×10^2 、 1.3×10^3 であった。 TPD_{50} 値の変化をみると、iPS クランプ移植群 (iPS clamp) では 8 週目の時点以降でほぼ安定し、iPS 単一細胞移植群 (iPS single cell) ではわずかに遅れ 9 週目以降で安定することが明らかとなった (図 9)。

次に、iPS 単一細胞移植時の生着性向上を目指し、ROCK 阻害剤を添加した細胞懸濁液を移植する試験を行った。現在、移植後 9 週目までの結果が得られており、図 10 にこれまでの経過を示した。前回の試験と比べ若干遅かったものの、5 週目以降になって結節が観察され始めた。しかしながら、前回では結節形成が認められなかった 10^2 、 10^3 個移植の群でも結節が認められた。移植後 8 週目において、 10^4 個移植群で 7 匹、 10^3 個移植群で 6 匹、さらに 10^2

個移植群でも 2 匹に結節形成が認められた。一方、 10^1 個の移植では、本試験の観察期間において結節形成がどの個体でも観察されなかった。16 週間の観察期間における結果を図 10 に示す。また、表 3 に NOG マウスにおける ROCK 阻害剤を添加したときの iPS 細胞生着能として、移植後 16 週目における各群の腫瘍形成率をまとめた。 TPD_{50} 値は、ROCK 阻害剤を添加した iPS 単一細胞移植群で 6.3×10^2 であった。前回の結果と比較して、ROCK 阻害剤の添加によって、iPS 単一細胞の生着性は約 15 倍向上することが確認された。 TPD_{50} 値の変化については、図 9 に示した。ROCK 阻害剤を添加した iPS 単一細胞移植群 (iPS single cell+RI) では 13 週目以降で TPD_{50} が安定することが明らかとなった。

各マウスで形成された結節はそれぞれ単離し凍結保存されている。今後、病理組織標本作製し、iPS 移植によって NOG マウスで形成された結節の特性解析を行う予定である。具体的には、結節がヒト細胞由来であること、正常な iPS 細胞生着の指標となる 3 胚葉分化した良性腫瘍 (テラトーマ) であること等を、各種染色法、免疫組織化学的解析によって確認する予定である。

C-5 hMSC 中に混入する iPS 細胞の検出能力の検討

前項で示したとおり、iPS 単一細胞の NOG マウスへの生着性が、ROCK 阻害剤を添加することで大きく向上することが確認された。そこで、この方法を利用し、hMSC 中に混入する iPS 細胞の検出能力を検討した。 10^6 個の hMSC に一定量の iPS 単一細胞 (0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4) を混入させ、ROCK 阻害剤を添加し、さらに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、16 週間にわたり結節形成の観察を行った。各個体共に、移植

部位における膨隆は観察されていたが、触診を続けた結果、固さ、大きさ等の変化は確認できず、結節形成と判定される個体は出現しなかった。尚、 10^2 移植群の1個体において、状態悪化（体重減少、頻呼吸）が認められたため、15週の時点で安楽死させた。剖検の結果、脾臓腫大、肝臓肥大が観察されたため、病理組織学的検査を実施中である。その他の個体についても、観察期間終了後、剖検を行い、膨隆部の確認、採取等を行った。

10^4 個のiPS細胞は、NHDFとの共移植では高頻度で生着が認められていたが、MSCでは1匹も生着が起こらなかった。これらの結果は、MSCがiPS移植による結節形成を抑制している可能性を示すものと考えられた。

D. 考察

D-1. 形質が安定なヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の創製

本研究には様々な特性の異なるiPS細胞を調製する必要があるが、そのためには、形質が安定で細胞集団としての不均一性が比較的低い素材が有用である。今回我々は、低酸素濃度で培養したヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞（hASC）からそうした素材の一つとしてヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞（Hx-hASC）を創製することができた。低酸素濃度下で培養したhASC（Hx-hASC）は増殖能、分化能ともに優れ（図1、図2）、さらに酸化ストレスを抑制することによる、抗老化の表現系を示す。（図3）また、低酸素濃度下における増殖能・分化能・抗老化能はNotchシグナルによって制御されていることも判明した（図4）。

D-2. 新規ヒト脂肪組織由来幹細胞由来iPS細胞の作製とその特性

ヒトiPS細胞/ES細胞株に由来する腫瘍の

発生頻度、悪性度と機序、検査法の検討課題を達成することは、ヒトiPS細胞等多能性幹細胞由来製品の製造、品質管理に関わる重要な課題である。特に細胞の種類及び起源が異なることによる影響を明らかとすることにより、ヒト多能性幹細胞由来製品の造腫瘍性リスクの量及び質を把握することが可能となるものと期待される。そこで、従来の様々なヒトiPS細胞/ES細胞株（国立成育医療研究センター、理研BRC、WiCell等より入手）に加え、腫瘍リスクの少ないhASC、Hx-hASC、ならびにこれら細胞より樹立したヒトiPS細胞株の造腫瘍性リスクを評価すべく、本年度は主にHx-hASCより樹立したヒトiPS細胞株の樹立および維持に注力した。

ヒトiPS細胞/ES細胞株の特性解析およびプロファイリングについては、上述のHx-hASCより樹立した初代iPS細胞の特性について、その性状を精査し、細胞特性およびプロファイリングの一端を明らかにした。それらのiPS細胞株は形態学的のみならず、Oct3/4をはじめとする多能性幹細胞マーカー陽性であった（図5）。メチローム解析、核型解析、テラトーマ形成能については現在精査中である。

一方、創製したヒト脂肪組織由来幹細胞および、それを素材にエピゾーマルベクターを用いて作製に至った初代iPS細胞では、腫瘍の悪性化と関係すると推定されている*HHLA1*, *ABHD12B*, *C4orf51* 遺伝子の発現が極めて低く（図7）、また導入された初期化遺伝子の残存がない（図6）ことなどが観察された。これは同時に、これら遺伝子解析に基づいたトランスクリプトミクス解析が評価法として有用であることを示している。

D-3. iPS細胞移植試験およびhMSC中に混入するiPS細胞の検出能力の検討

本研究課題では、ヒト iPS/ES 細胞株間の NOG マウスにおける造腫瘍性の質的な差を検討することが大きな目的となっている。造腫瘍性に関する細胞株の内因的な性質の差を捉えるためには、移植時の細胞の初期条件を可能な限り揃える必要がある。一方、ヒト iPS/ES 細胞は、酵素処理等により単一細胞にまで分散するとアポトーシスを起こすというユニークな性質をもつことが知られている。分散誘導性アポトーシスを回避するという観点からすれば、移植細胞は単一細胞にまで分散させてはいけないことになる。従って、造腫瘍性試験において分散誘導性アポトーシスを回避する手段としては、単一細胞まで分散させず、小さな細胞塊(クランプ)の状態での移植することが望ましい。しかし、クランプの状態での移植では、移植細胞数に大きなバラツキが生じてしまい、このバラツキによって細胞株間の質的な差がマスクされてしまう恐れが高くなる。実際、我々が検討した結果、クランプの状態での移植では、明瞭な細胞数依存的な腫瘍形成が観察されなかった。Hentze らは 2009 年の報告の中で、ヒト ES 細胞のフィーダー細胞として用いられるヒト新生児由来繊維芽細胞をヒト ES 細胞と混合して移植することにより、免疫不全マウスにおけるヒト ES 細胞の生着性が向上することを明らかにしている。また、ヒト iPS/ES 細胞の分散誘導性アポトーシスにおいては Rho/ROCK の情報伝達系が重要な役割をこなうことが知られている。そこで我々は、ヒト新生児由来繊維芽細胞との同時投与およびその際に ROCK 阻害剤を添加することにより、ヒト iPS 細胞を NOG マウスに移植した際のヒト iPS 細胞の生着性・造腫瘍性に与える影響を検討した。その結果、Hentze らの報告とは異なり、分散したヒト iPS 細胞をヒト新生児由来繊維芽細胞と同時投与するだけでは、ヒト iPS 細胞をクランプとして投与した場合に比べても生着率が低いことが

明らかとなった。次に、ヒト新生児由来繊維芽細胞と ROCK 阻害剤との併用した際の分散したヒト iPS 細胞の生着・造腫瘍性を検討した結果、5 週目以降になって結節形成が観察され始めた。5 週目には 10^2 個と少ない数の移植群でも結節形成が認められており、ROCK 阻害剤の添加によって細胞の生着性が大きく向上していることが確認された。

ヒト間葉系幹細胞は、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞のみならず、神経細胞や、肝細胞、インスリン産生細胞など、さまざまな細胞へ分化する能力を持つことが知られており、再生医療において有用性が高いとされている。また、ヒト間葉系幹細胞はサイトカイン類を分泌するいわゆるパラクライン効果により、炎症や過剰な免疫応答の抑制をもたらすこと、および宿主内でも拒絶反応がほとんど惹起されないことが知られており、すでにカナダおよびニュージーランドでは同種ヒト骨髄由来の培養間葉系幹細胞が移植片対宿主病 (GVHD) の予防を目的とした細胞治療薬として販売承認されている。ただし、同種ヒト骨髄に由来する間葉系幹細胞は分裂回数が有限な体細胞であり、遅かれ早かれ製品の細胞基材であるセル・バンクの枯渇は避けられず、そうなれば品質の恒常性を確保することが困難になるという大きな問題が残されている。この問題を解決し、一定の品質の間葉系幹細胞を安定供給するために、現在、米国においてはヒト多能性幹細胞を原料とした間葉系幹細胞の開発が進んでいる。本分担研究で検討した造腫瘍性試験法において、ヒト iPS 細胞の NOG マウスにおける生着性・造腫瘍性に対する ROCK 阻害剤の効果が、もし、ヒト新生児由来繊維芽細胞の効果よりもドミナントであって、ヒト新生児由来繊維芽細胞をヒト間葉系幹細胞と置換してもヒト iPS 細胞の生着性・造腫瘍性に変化が無いとすれば、我々の方法は、多能性幹細胞の特性評価法としてだけでなく、ヒ

ト多能性幹細胞由来間葉系幹細胞に残存するヒト多能性幹細胞を高感度で検出可能な優れた方法としても利用することが可能となるはずである。そこで、この仮説を検証する目的でヒト新生児由来繊維芽細胞をヒト間葉系幹細胞と置換した実験を試みた。その結果、ROCK阻害剤が共存していたとしても、同時投与する分化細胞がヒト新生児由来繊維芽細胞ではなくヒト間葉系幹細胞である場合には、NOG マウスにおけるヒト iPS 細胞の生着性・造腫瘍性は著しく低下することが明らかとなった。つまり、今回我々が検討した方法は、ヒト多能性幹細胞由来間葉系幹細胞の品質評価法としては転用することができないということが示唆される。本実験により、ヒト iPS 細胞の生着性・造腫瘍性を向上させる働きは、ヒト由来細胞が共通して持つ作用ではなく、ヒト新生児由来繊維芽細胞に特異的な作用であると考えられる。なお、ヒト間葉系幹細胞はヒト iPS 細胞の生着性・造腫瘍性をむしろ抑制する可能性も考えられる。

E. 結論

安全かつ倫理的問題の少ない再生医療用細胞基材の一つとして注目されているヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞より、さらに形質が安定し、増殖・分化能力の高い Hx-hASC の創製に成功した。また、Hx-hASC 由来のヒト iPS 細胞を樹立し、初期化遺伝子の存在 (量) その他の細胞特性を解析した。その結果、Hx-hASC 細胞を材料とした高品質かつ安全性が高いと予想される iPS 細胞を複数株樹立することに成功した。これら iPS 細胞株は腫瘍の悪性化と関係すると推定されている遺伝子群の発現が極めて低いことから、腫瘍形成リスクが低いことが予想される。また、エピゾーマルベクターにより作製した iPS 細胞株でも導入された初期化遺伝子の残存がないことが観察された。

このことから、これら遺伝子解析に基づいたトランスクリプトミクス解析が評価法として有用であることを示している。一方、研究では造腫瘍性リスクの質的把握に関し、特に、原材料としての各種ヒト多能性幹細胞の造腫瘍性と関係するヒト多能性幹細胞の特性指標の同定を目指している。本研究においては、初年度である本年度は、NOG マウスへの移植試験プロトコルの検討および至適化を試みた。複数の細胞株を比較する際、投与時の細胞の初期条件を揃えることが不可欠と考え、単一細胞にまで分散しても安定的に生着し、造腫瘍性の評価が可能となる試験系として、ヒト多能性幹細胞とヒト新生児由来繊維芽細胞および ROCK 阻害剤の同時投与の系を確立した。今後は本試験系を用い、様々な細胞株について造腫瘍性および形成された腫瘍の特性の評価を行い、悪性度等とその他の細胞特性指標との関係を検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

- 1) Moriyama H, Moriyama M, Isshi H, Ishihara S, Okura H, Ichinose A, Ozawa T, Matsuyama A and Hayakawa T.: Role of Notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *STEM CELLS & DEV.* 2014 *in press.*
- 2) Moriyama M, Moriyama, Uda J, Matsuyama A, Osawa M and Hayakawa T.: BNIP3 Plays Crucial Roles in the Differentiation and Maintenance of Epidermal Keratinocytes. *J*

- Invest Dermatol. 2014 134(6):1627-35
- 3) Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T.: Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem cells by lentivirus with tet-off system. PLoS One. 2013 Jun 12;8(6):e66274.
 - 4) Takayama K, Nagamoto Y, Mimura N, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Hayakawa T, Kawabata K, Mizuguchi H.: Long-Term Self-Renewal of Human ES/iPS-Derived Hepatoblast-like Cells on Human Laminin 111-Coated Dishes. Stem Cell Reports. 2013 Oct 3;1(4):322-335.
 - 5) 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. 2013 141(1):91-100
 - 6) Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Kishimoto K, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Kanda K, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H.: 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. Biomaterials. 2013 Feb;34(7):1781-9.X
 - 7) Kinoshita M, Nakatsuji Y, Suzuki S, Hayakawa T, Kakehi K.: Quality assurance of monoclonal antibody pharmaceuticals based on their charge variants using microchip isoelectric focusing method. J Chromatogr A. 2013 Sep 27;1309:76-83.
 - 8) Iwatsuka K, Watanabe S, Kinoshita M, Kamisue K, Yamada K, Hayakawa T, Suzuki T, Kakehi K.: Free glycans derived from glycoproteins present in human sera. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2013 Jun 1;928:16-21.
 - 9) 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, 3198–3205 566)
 - 10) 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 Feb 7;13(2):1021-33.
 - 11) 森山博由, 森山麻里子, 早川堯夫.『ヒト脂肪由来間葉系幹細胞における効率の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).
 - 12) 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.
 - 13) 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)
 - 14) 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? 実験医学増刊 2013 (印刷中)
 - 15) 佐藤陽治 「ヒト iPS 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」 *Cytometry Research* (印刷中)
- 16) 安田智, 佐藤陽治 動物細胞の培養を成功させる条件設定集「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 (印刷中)
 - 17) 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)
 - 18) 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.
 - 19) 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: 71-7.
 - 20) 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.

G-2 学会発表

- 1) 早川堯夫: 再生医療製品・遺伝子治療薬等の品質評価の上での科学的妥当性とは. 第10回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム (基調講演), 東京 (2013.12.12)
- 2) 木下充弘, 三ツ井洋介, 原沙也香, 山田佳太, 早川堯夫, 掛樋一晃: ヒトメラノーマ細胞のグライコフォームフォーカストプロテオミクス, 2013年8月 第32回日本糖質学会年会 (2013.8.)
- 3) 神末和哉, 木下充弘, 早川堯夫, 掛樋一晃: シー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.)
- 4) 木下充弘, 鈴木茂生, 早川堯夫, 掛樋一晃: レーザー回折法を用いる Sub-visible 領域タンパク質凝集体の解析. 第134年回日本薬学会年会 (2014.3.)
- 5) 岩本裕貴, 安井裕太郎, 岩塚欣也, 鈴木茂生, 早川堯夫, 掛樋一晃: ウサギ角膜上皮細胞の糖鎖生合成に対する外的物理的ストレスの影響 (2014.3.)
- 33) Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. Role of Notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. The 7th Notch meeting. Feb. 14-15, 2013. National Institute of Genetics, Mishima.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露下における脂肪由来間葉系幹細胞の Notch シグナル亢進と解糖系調節機構の解明. Mar, 21-23, 2013. 第12回日本再生医療学会総会.
- 37) 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
- 38) 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.
- 39) 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.
- 40) Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko, Ueda Ayaka, Nishibata Yusuke, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa

- Takao. ROLE OF NOTCH SIGNALING IN THE MAINTENANCE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER HYPOXIC CONDITIONS. June 13, 2013, CBRC, Harvard Medical School, Boston, U.S.A.
- 41) 野村昇吾, 森山麻里子, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「表皮分化過程における Forkhead box タンパク質の関与」 June 12-15, 2013, 第 4 回生命機能研究会, 滋賀.
- 42) 曾根千晶, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いたインスリン産生細胞の作製」 June 12-15, 2013, 第 4 回生命機能研究会, 滋賀.
- 43) 大森重成, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いた効率的なドパミン産生細胞作製」 June 12-15, 2013, 第 4 回生命機能研究会, 滋賀.
- 44) 石原 慎, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「低酸素培養における Notch シグナルを介した解糖系調節機能の解明」 June 12-15, 2013, 第 4 回生命機能研究会, 滋賀.
- 45) 森山麻里子, ○宇田純輝, 北川綾弓, 野村昇吾, 早川堯夫, 森山博由. Bcl-2 ファミリー分子 BNIP3 が表皮構築に及ぼす影響. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
- 46) 古谷圭史, 村上健太, 雨宮有佑, 北野亮介, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床段階における指針について. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
- 47) 村上健太, 古谷圭史, 雨宮有佑, 北野亮介, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. ヒト幹細胞加工医薬品開発をめざしたヒト体性幹細胞樹立のための基準. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
- 48) 北川綾弓, 森山麻里子, 宇田純輝, 野村昇吾, 早川堯夫, 森山博由. Bcl-2 ファミリー分子 BNIP3 が表皮構築に及ぼす影響. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
- 49) Junki Uda, Mariko Moriyama, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama. Indispensable roles of BNIP3, an inducer of autophagy, in both differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. The 35th annual meeting of the molecular biology society of Japan. Dec 3-6, Kobe, Japan.
- 50) 森山 麻里子, 森山 博由, 宇田 純輝, 早川 堯夫: オートファジーと皮膚構築. Mar 15-16, 2014. 第 2 回皮膚の会. 松山.
- 51) Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露を介する脂肪由来間葉系幹細胞のドパミン産生細胞分化. Mar, 4-6, 2014. 第 13 回日本再生医療学会総会. 京都.
- 52) Mariko Moriyama, Hiroyuki Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露下における脂肪由来間葉系幹細胞の Notch 進と解糖系調節機構の解明. Mar, 4-6, 2014. 第 13 回日本再生医療学会総会. 京都.
- 53) Sato Y. Tumorigenicity of Human Cell-Processed Therapeutic Products. IABS-JST Joint Workshop, kyoto (2014 年 3 月 7-8 日)
- 54) 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 回再生医療学会総会, 京都 (2014 年 3 月 4-6 日)
- 55) 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 回再生医療学会総会, 京都 (2014 年 3 月 4-6 日)
- 56) 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 回再生医療学会総会, 京都 (2014 年 3 月 4-6 日)
- 57) 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 回再生医療学会総会, 京都 (2014 年 3 月 4-6 日)
- 58) 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)
- 59) 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 IL2rg^{null} mice for quality assessment of human cell-processed therapeutic products. World Stem Cell Summit 2013, San Diego (2013年12月4-6日)

- 60) Sato Y. Japanese Regulatory Principles for Ensuring Quality and Safety of Cell/Tissue-Processed Products. World Summit on Regenerative Medicine 2013, 西安 (2013年10月19-22日)
- 61) 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, 東京 (2013年6月23日)
- 62) Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Current Japanese guidelines on ensuring quality and safety of products derived from processing of human stem cells. International Society for Stem Cell Research 11 th Annual Meeting, Boston (2013年6月12-15日)
- 63) 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)
- 64) 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, 東京 (2013年5月10日)
- 65) 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)
- 66) Tsutsumi H, Machida K, Kusakawa S, Sawada R, Yasuda S, Ito M, Sato Y. Quantitative Analysis on HeLa Engrafting Ability in NOG Mice. 12th FELASA, Barcelona, Spain (2013年6月10-13日)
- 67) 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)
- 68) Mizushima T, Machida K, Inoue R, Kusakawa S, Sawada R, Sato Y, Tsutsumi H. Analysis in Xenograft Susceptibility in NOG

and NOG-hairless Mice. 4th 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

【政策への提言】

- 1) 厚生労働省医薬食品局 「再生医療等製品原料基準」のあり方に関する検討」での提言
- 2) 経済産業省 「グローバル認証基盤整備事業再生医療等基準検討委員会」での提言

<i>POU5F1</i> F	GAGAACCGAGTGAGAGGCAACC
<i>POU5F1</i> R	CATAGTCGCTGCTTGATCGCTTG
<i>Nanog</i> F	AATACCTCAGCCTCCAGCAGATG
<i>Nanog</i> R	TGCGTCACACCATTGCTATTCTTC
<i>LIN28A</i> F	AGCGCAGATCAAAAGGAGACA
<i>LIN28A</i> R	CCTCTCGAAAGTAGGTTGGCT
<i>ABHD12B</i> F	AAGCTGGTAAAGGTGCTGAGT
<i>ABHD12B</i> R	GCATCCGTAGTCAGTCCCTC
<i>C4orf51</i> F	TGGCAGGATGAAACACGATGG
<i>C4orf51</i> R	GGGCCTGGTTATATCAGGGAA
<i>HHLA1</i> F	CAGCCACATGGTTCAGTGC
<i>HHLA1</i> R	GCCCACGTCTGTCTGTCAG

表 1 : 今回の研究で用いた primer 配列。

Experiment	No. of iPS colonies generated	No. of iPS colonies generated
	from hASC	from Hx-hASC
1	87 (0.087%)	146 (0.146%)
2	2 (0.002%)	9 (0.009%)
3	72 (0.072%)	128 (0.128%)
4	4 (0.004%)	23 (0.023%)
5	31 (0.031%)	66 (0.066%)
6	28 (0.028%)	48 (0.048%)
7	18 (0.018%)	46 (0.046%)

表 2: hASC と Hx-hASC よりフィーダーフリーで作製した iPS コロニー数の比較。それぞれ 1×10^5 個の hASC もしくは Hx-hASC より生成した iPS コロニー数を示す。()内は生成率。