

図1：低酸素濃度下で培養した hASC の増殖能。(A) 通常酸素濃度下 (Normoxia)、低酸素濃度下 (Hypoxia) で培養した hASC の細胞倍加レベル。(B) 通常酸素濃度下 (Nx)、低酸素濃度下 (Hx) で培養した hASC の EdU 取り込みによる増殖能の評価。

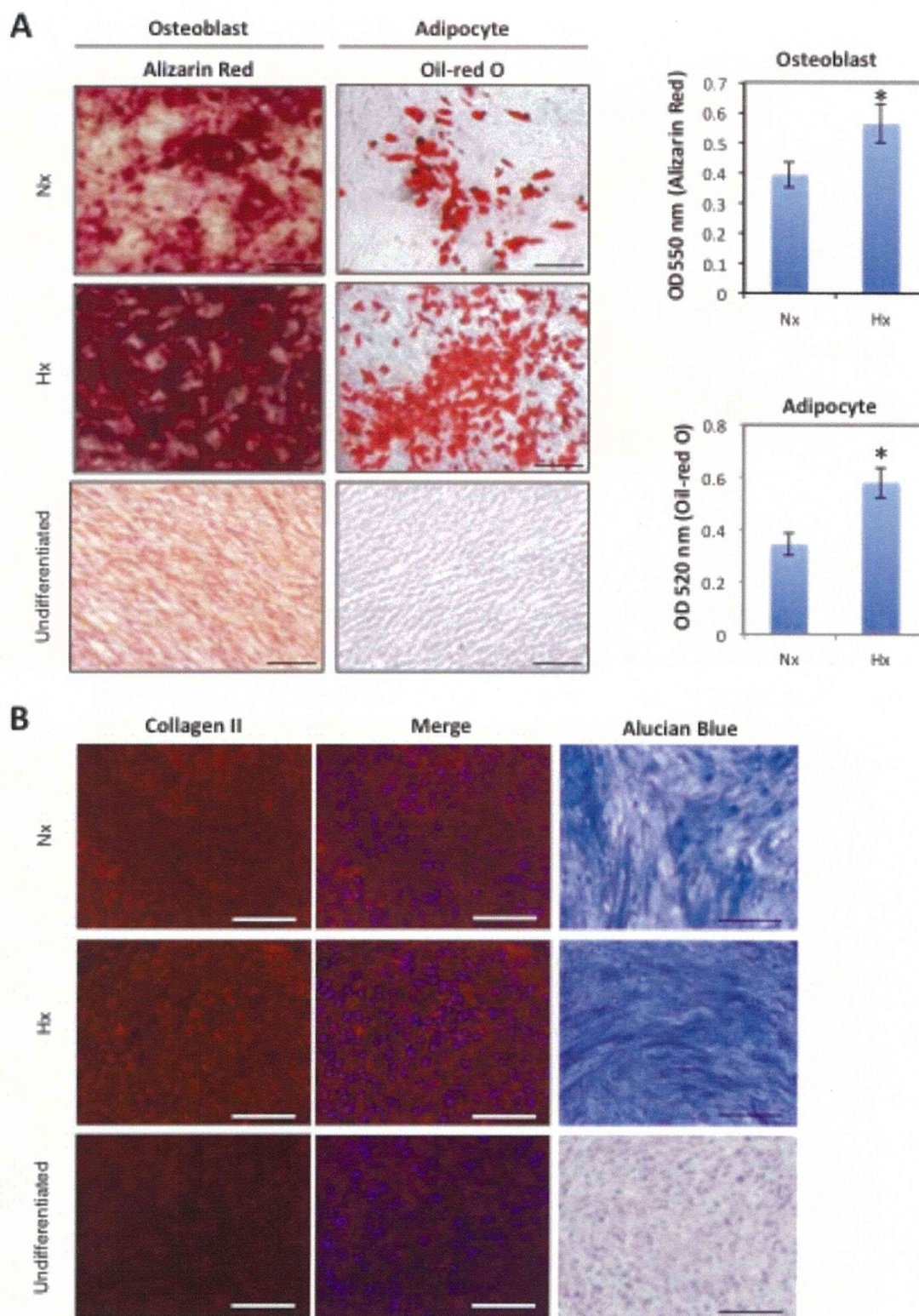


図 2：低酸素濃度下で培養した hASC の分化能。(A)骨 (Osteoblast)、脂肪 (Adipocyte) への分化能。それぞれ Alizarin Red と Oil-red O で染色し、抽出して比色定量を行い、グラフをプロットした。(B) 軟骨への分化能。Collagen II での免疫染色と Alucian Blue 染色を示す。分化誘導していない細胞 (Undifferentiated)はコントロールとして示した。

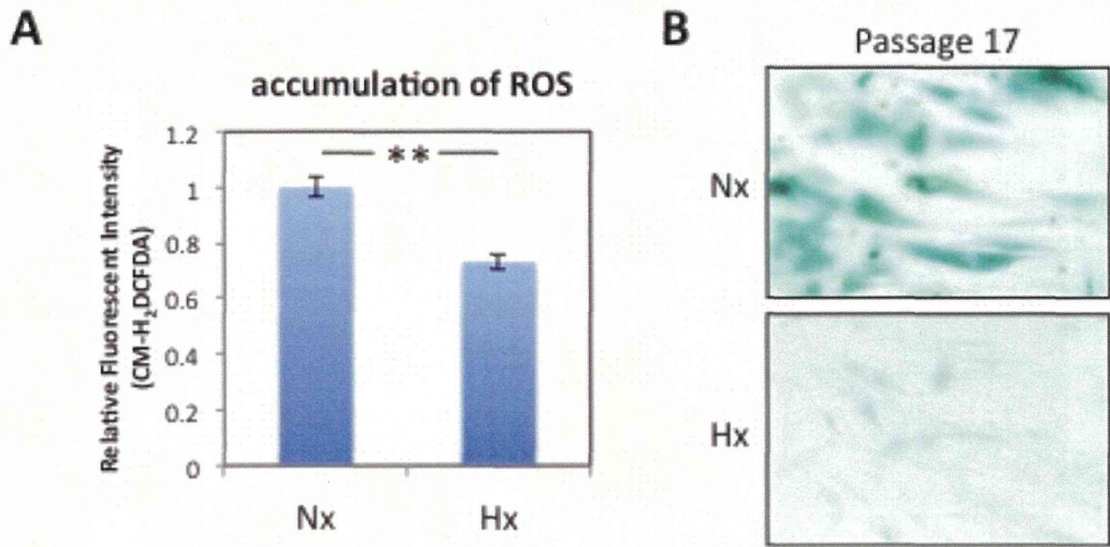


図3：低酸素濃度培養における抗老化作用。(A) 通常酸素濃度下 (Nx)、低酸素濃度下 (Hx) で培養した hASC の細胞老化。老化特異的 β -ガラクトシダーゼ染色を行った。(B) 通常酸素濃度下 (Nx)、低酸素濃度下 (Hx) で培養した hASC の細胞内酸化ストレスの測定。

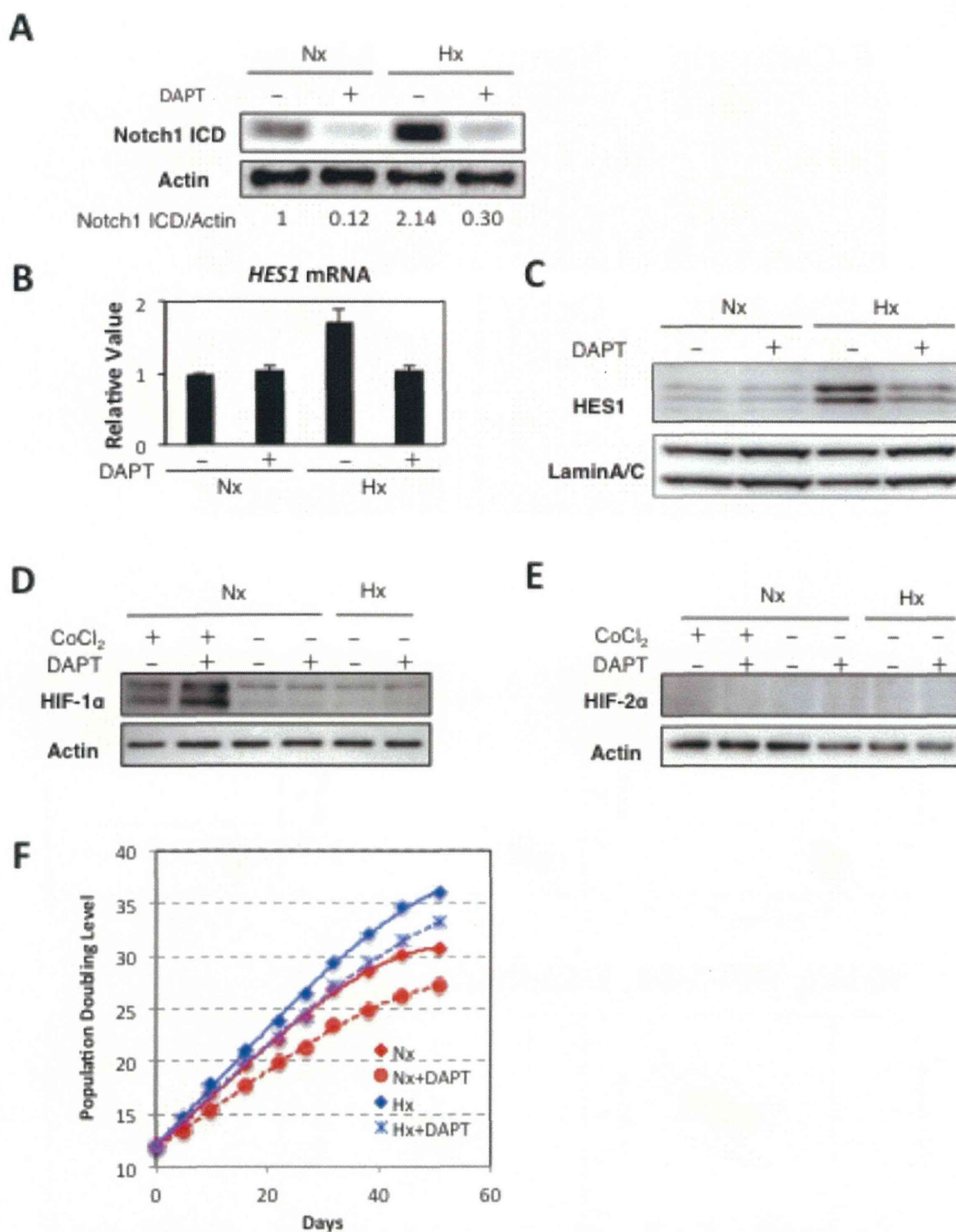
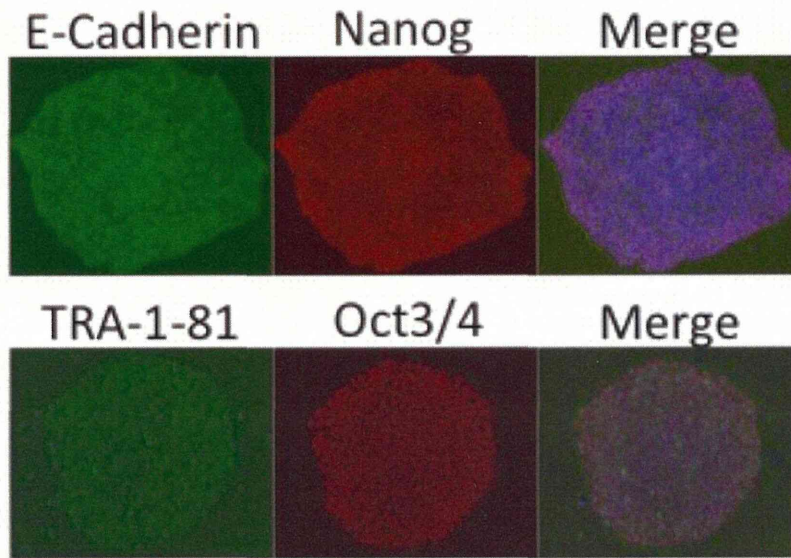
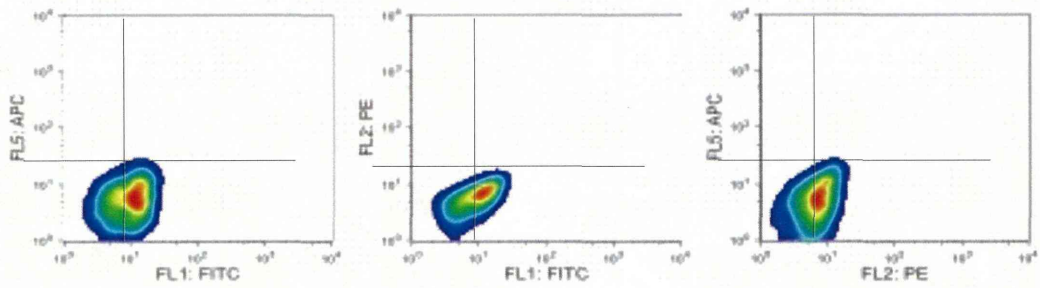


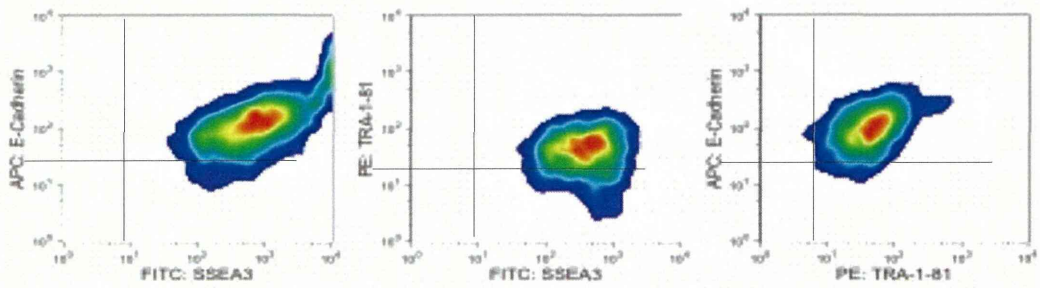
図 4： 低酸素濃度下での増殖性向上に関与する因子の探索。hASC を通常酸素濃度下 (Nx) もしくは低酸素濃度下 (Hx) で培養した。Notch 阻害剤として 1 μ M DAPT を添加したものとコントロール群に分けている。(A) 活性化型 Notch1 (Notch1 ICD) のウェスタンブロッティング像。Actin は内部コントロール。(B, C) Notch の下流因子である Hes1 の定量的 PCR (B) とウェスタンブロッティング像 (C)。LaminA/C は内部コントロール。(D, E) HIF-1 α (D) と HIF-2 α (E) のウェスタンブロッティング像。Actin は内部コントロール。CoCl₂ (100 μ M) は HIF タンパク質を安定化させるためのポジティブコントロールとして添加している。

A**B**

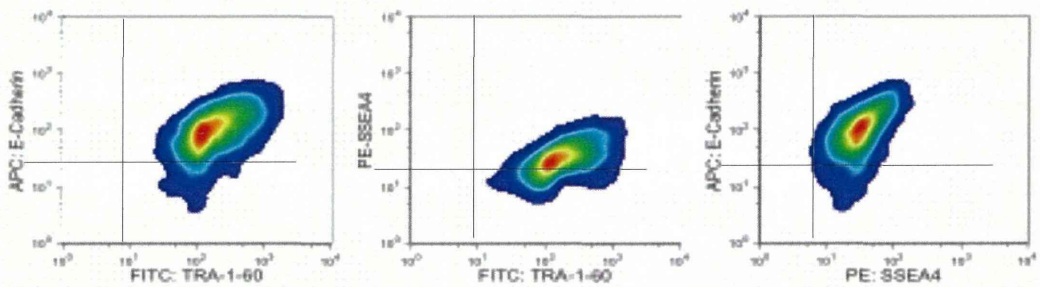
Isotype control



SSEA3, TRA-1-81, E-Cadherin



TRA-1-60, SSEA4, E-Cadherin



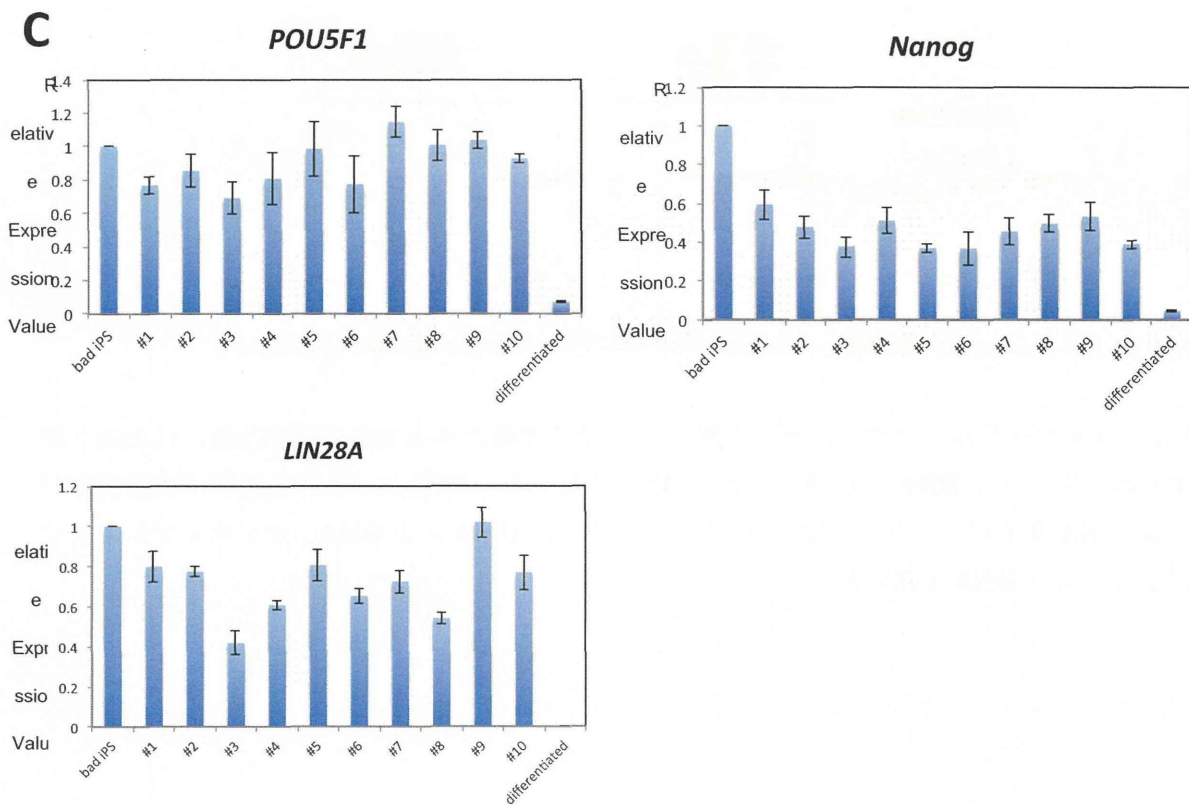


図 5: Hx-hASC より樹立した iPS 細胞株の未分化マーカー解析。(A、上段) E-Cadherin (緑)、Nanog (赤) の免疫染色像を示す。(A、下段) TRA-1-81 (緑)、Oct3/4 (赤) の免疫染色像を示す。青は核染色 (DAPI) を示す。(B) フローサイトメトリー解析の結果。(上段) Isotype control、(中段) SSEA3 (FITC)、TRA-1-81 (PE)、E-Cadherin (APC)、(下段) TRA-1-60 (FITC)、SSEA4 (PE)、E-Cadherin (APC)での染色結果を示す。(C) 定量的 PCR の結果。それぞれ 10 種類の樹立した iPS より RNA を抽出し、定量的 PCR を行った。bad iPS は腫瘍を作りやすい iPS 細胞である。分化させた iPS (differentiated) をネガティブコントロールとして示した。

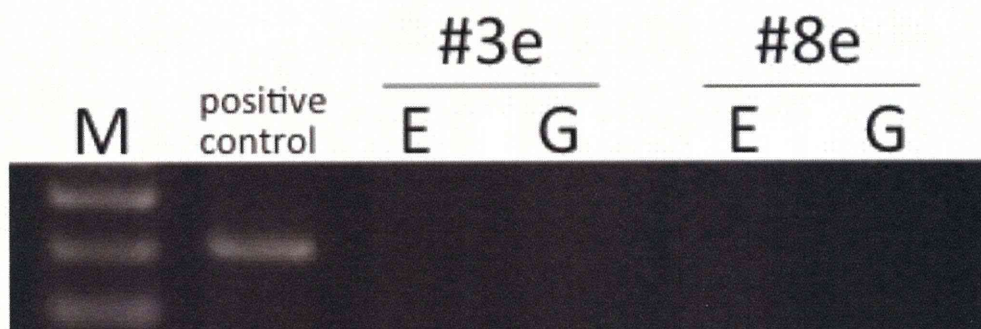


図 6 : エピゾーマルベクターによって樹立した iPS 細胞の外来遺伝子否定試験。代表的な細胞株よりエピゾーマル DNA ならびにゲノム DNA を抽出し、PCR による外来遺伝子の検出を行った。M: DNA サイズマーカー。E: エピゾーマル DNA。G: ゲノム DNA。ポジティブコントロールはプラスミド DNA を用いた。

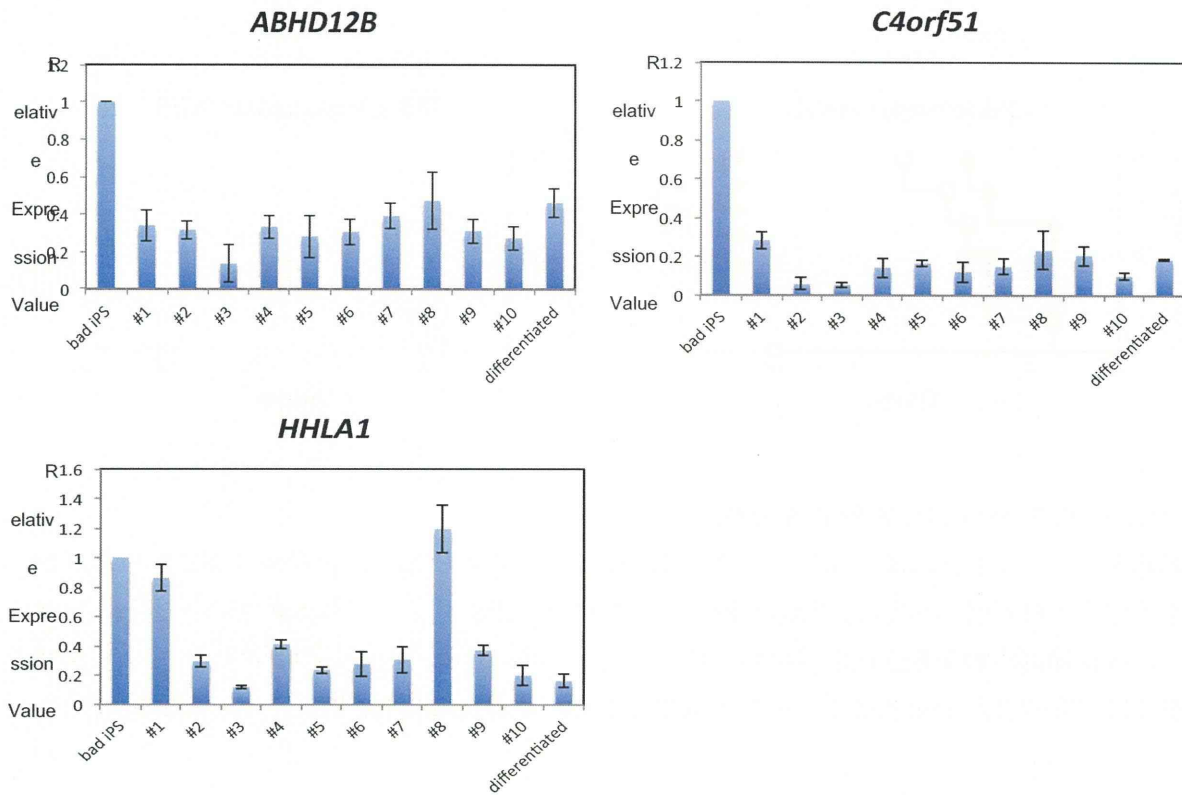


図 7：樹立した iPS 細胞株の造腫瘍性リスクに関与する遺伝子群の発現プロファイル。それぞれ 10 種類の樹立した iPS より RNA を抽出し、*ABHD12B*, *C4orf51*, *HHLA1* に対する定量的 PCR を行った。bad iPS は腫瘍を作りやすい iPS 細胞である。分化させた iPS は differentiated として示した。

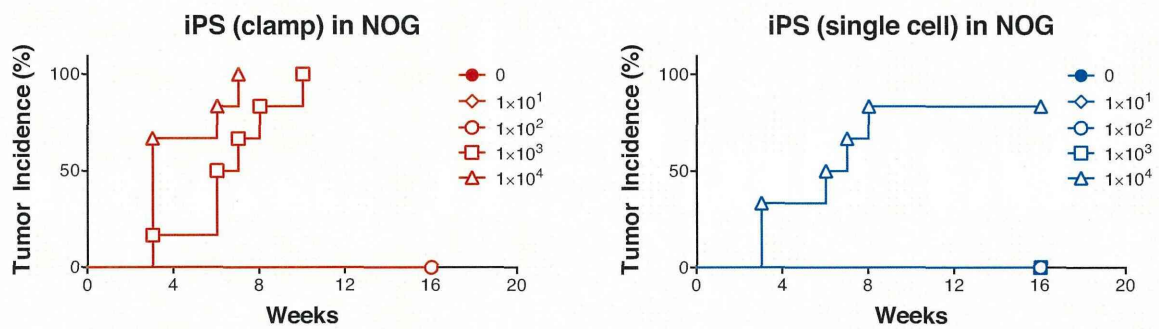


図8 NOG マウスへの iPS 細胞の生着性

iPS 細胞をクランプまたは単一細胞の状態で NOG マウスに移植した。移植後3週目から移植細胞由来と推定される明らかな結節形成が観察され始めた。iPS クランプ移植群では移植後約8週目までには結節形成の用量依存性が明らかになった。一方、iPS 単一細胞移植群では、クランプ移植群に比べ生着性がかなり低く、最高用量である 10^4 個移植群でしか結節形成が認められなかった。

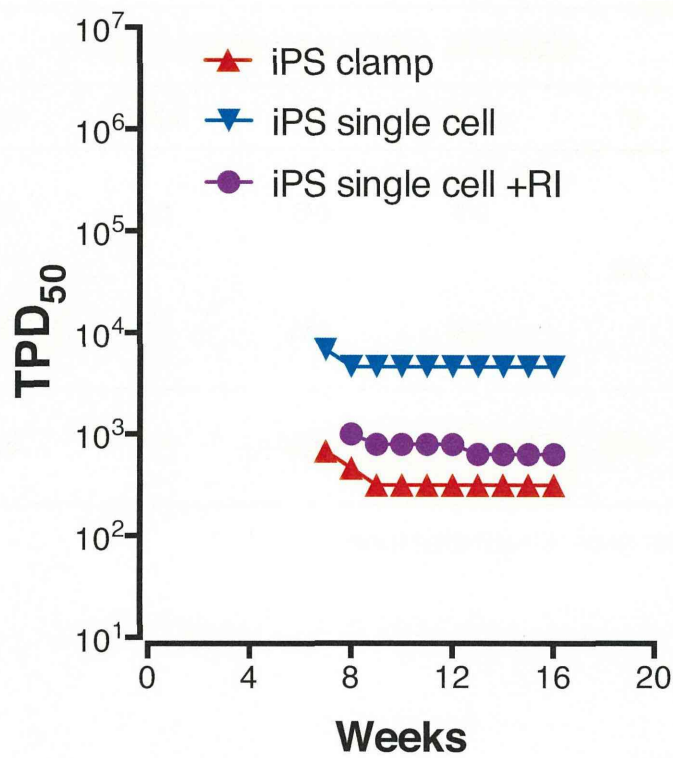


図 9 NOG マウスへの iPS 細胞移植における TPD₅₀ 値の推移

iPS クランプ移植群 (iPS clamp) では 8 週目の時点以降で TPD₅₀ 値はほぼ安定し、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 TPD₅₀ 値が安定した。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 TPD₅₀ 値が安定した。

表3 NOG マウスにおける iPS 細胞生着能 (16 週目の結果)

系統	移植群	腫瘍形成率 (腫瘍を呈した頭数/供試頭数)					TPD ₅₀
		0 ^a	1x10	1x10 ²	1x10 ³	1x10 ⁴	
NOG	iPS/NHDF (クランプ)	0/6	0/6	0/6	6/6	6/6	3.1x10 ²
NOG	iPS/NHDF (単一細胞)	0/6	0/6	0/6	0/6	5/6	4.6x10 ³
NOG	iPS/NHDF+RI (単一細胞)	0/10	0/10	2/10	7/10	8/10	6.3x10 ²

^a: iPS 細胞混入数, RI: ROCK 阻害剤, NHDF: ヒト新生児繊維芽細胞

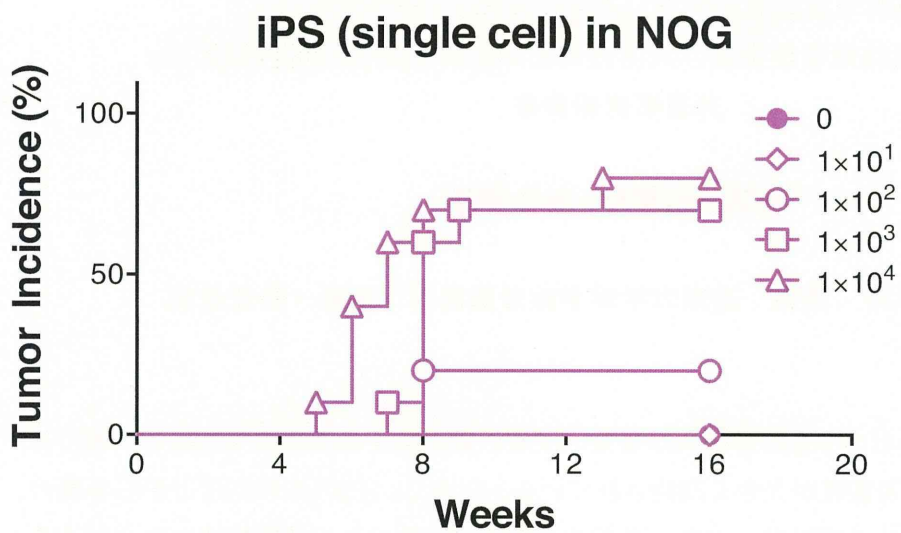


図 1 0 iPS 単一細胞を ROCK 阻害剤を添加して NOG マウスに移植した際の結節形成

iPS 単一細胞移植後、5 週目以降になって結節形成が観察され始めた。 10^2 、 10^3 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。

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」
分担研究報告書

各種細胞調製と特性評価

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した。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。

研究協力者（順不同）

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 細胞を調製し、細胞特性を解析した。

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・セレンウム（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 × 10⁶ 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。

(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。

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一解析 (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 7)。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)。

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

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) は、骨髄、脂肪、臍帯血などに存在することが知られており、脂肪、骨、軟骨のみならず、神経、肝細胞、インスリン産生細胞、心筋を含むさまざまな細胞へ分化する能力を持つ。また、創傷部位への高い遊走能力、各種成長因子分泌による組織修復能力、さらには免疫拒絶回避能力も持つことが報告されていることから、再生医療におけるあらたな細胞供給源として高い注目を集めている。

その中でも、脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ASC) は、そのもととなる脂肪組織が安全か

つ簡易に採取できることのみならず、美容整形や形成外科領域における手術時に余剰医療廃棄物として大量に得ることが可能であり、倫理的懸念も極めて少ない。このような理由から、細胞治療用、組織構築用、遺伝子治療用等、様々な臨床応用の素材として ASC に寄せられる期待は大きい。しかしながら、ASC は初代培養細胞の宿命である老化による集団倍加能力の欠如や、細胞集団の不均一性という欠点を持ち、それが臨床への応用に制限を与えている。その期待に付託するために、形質が安定であり、より長い寿命を持つ均一性の高い ASC を樹立することによって、ASC の基礎から臨床研究を強力に推進することが必要不可欠である。

そこで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、我々は今回低酸素に注目した。脂肪由来間葉系幹細胞が生体内ニッチに存在している際の酸素濃度は 3~8%程度であると言われているため、低酸素濃度での hASC の増殖能を確認したところ、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ことが明らかとなり (図 3)、より臨床応用に近い幹細胞の創製に成功したと言える。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) ことから、今後、Notch シグナルを標的とした新規幹細胞創製に対する期待が高まることである。

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 iPS 細胞/ES 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、上述した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、本年度は主に本課題達成に必要なヒト 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、上述における 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はあるが、概ね良好な結果を得られそうである。

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、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。

E. 結論

安全かつ倫理的問題の少ない再生医療基剤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の高いと予想される 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

- 21) 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*.
- 22) 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
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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)
- 30) Kinoshita M, Mitsui Y, Kakoi N, Yamada K, Hayakawa T, Kakehi K.: Common Glycoproteins Expressing Polylysamine-Type Glycans on Matched Patient Primary and Metastatic Melanoma Cells Show Different Glycan Profiles. J Proteome Res. 2014 Feb 7;13(2):1021-33.
- 31) 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).

G-2 学会発表

- 6) 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）
- 7) 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.）
- 8) 神末和哉、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃：シースト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.）
- 9) 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.）
- 10) 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.）
- 11) 桑原侑己、東江直樹、瀧川義浩、早川堯夫、角谷晃司：カンゾウ (*Glycyrrhiza glabra* L.)のフラボノイド系ポリフェノール配糖化酵素遺伝子の単離と解析日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台 口頭), 2013.3.
- 12) 森川敏生、二宮清文、李 雪征、西田枝里子、山下千裕、山田友視、松田久司、中村誠宏、吉川雅之、早川堯夫、村岡修：デイジーフラワー (*Bellis perennis*, 花部) 成分の脂質代謝改善作用. 日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台), 2013.3.
- 13) 高森康暢、森川敏生、二宮清文、李 雪征、西田枝里子、松田久司、中村誠宏、吉川雅之、早川堯夫、村岡修：デイジーフラワー (*Bellis perennis*, 花部) 成分のコラーゲン産生促進作用. 日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台), 2013.3.
- 14) 中西勇介、森川敏生、二宮清文、松田久司、中嶋聡一、三木尚子、宮下 優、吉川雅之、早川堯夫、村岡修：漢薬 蠟梅花 (*Chimonanthus praecox*, 花部) のメラニン産生抑制活性成分. 日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台), 2013.3.
- 15) 二宮清文、高森康暢、沖野健二、王 立波、中村誠宏、松田久司、呉 立軍、早川堯夫、吉川雅之、村岡 修、森川敏生：エバーラスティングフラワー (*Helichrysum arenarium*, 花部) の機能性成分 (5) -含有フラボノイドのコラーゲン産生促進活性-. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013.3.
- 16) 二宮清文、松本友里恵、柿原なみ子、赤木淳二、王 立波、中村誠宏、松田久司、呉 立軍、早川堯夫、吉川雅之、村岡 修、森川敏生：エバーラスティングフラワー (*Helichrysum arenarium*, 花部) の機能性成分 (6) -含有フラボノイドの DPP-4 阻害活性-. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013.3.
- 17) 森川敏生、中西勇介、二宮清文、沖野健二、高森康暢、松浦豪之、早川堯夫、吉川雅之、村岡 修：漢薬 胡黄連 (*Picrorrhiza kurrooa*, 根茎) の機能性成分 (4) -含有フェニルエタノイドおよびイリドイドのコラーゲン産生促進活性-. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013.3.
- 18) 森川敏生、金敷辰之介、二宮清文、早川堯夫、吉川雅之、村岡 修：タイ天然薬物 *Mimusops elengi* L. 花部の機能性成分 (1) -新規フェニルプロパノイド配糖体の化学構造-. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013.3.
- 19) 八幡郁子、西田枝里子、松田久司、畑裕基、菅原かおる、吉川雅之、二宮清文、村岡 修、早川堯夫、森川敏生：メース (*Myristica fragrans*, 仮種皮) の脱顆粒抑制作用成分. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会 (名古屋), 2013.5
- 20) 森川敏生、西田枝里子、李 雪征、二宮清文、松田久司、山下千裕、伊藤友紀、中村誠宏、村岡 修、早川堯夫、吉川雅之：デイジーフラワー (*Bellis perennis*, 花部) の中性脂質上昇抑制作用成分. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会 (名古屋), 2013.5.
- 21) Toshio Morikawa, Mayumi Sueyoshi, Saowanee Chaipech, Hisashi Matsuda, Yukiko Nomura, Mikuko Yabe, Tomoko Matsumoto, Kiyofumi Ninomiya, Masayuki Yoshikawa, Yutana Pongpiriyadacha, Takao Hayakawa, Osamu Muraoka: Suppressive effects of prenylcoumarins from *Mammea siamensis* on iNOS synthase expression in RAW264.7 cells. 14th Tetrahedron Symposium, (Vienna, Austria), 2013.6.
- 22) 萬瀬貴昭、二宮清文、酒井千恵、西 亮介、村岡 修、早川堯夫、Chaipech