

- Saowanee, 森川敏生：紅豆蔻 (*Alpinia galanga*, 果実) 由来フェニルプロパノイド成分の中性脂肪代謝促進活性. 第30回和漢医薬学会大会(金沢), 2013.08.
- 23) 酒井千恵, 二宮清文, 中西勇介, 宮本陸平, 早川堯夫, 木下充弘, 掛樋一晃, 宮田信吾, 遠山正彌, 森川敏生：川芎 (*Cnidium officinale*, 根茎) の脂肪代謝促進活性成分. 第30回和漢医薬学会大会(金沢), 2013.08.
- 24) 二宮清文, 萬瀬貴昭, 西亮介, 酒井千恵, Chaipech Saowanee, 早川堯夫, 村岡修, 森川敏生：紅豆蔻 (*Alpinia galanga*, 果実) の機能性成分(2)－新規フェニルプロパノイドおよびジテルペン成分の構造と中性脂肪代謝促進活性－. 日本生薬学会第60回年会(北海道), 2013.9.
- 25) 二宮清文, 八幡郁子, 西田枝里子, 尾関快天, 早川堯夫, 村岡修, 森川敏生：メース (*Myristica fragrans*, 仮種皮) の機能性成分(3)－含有ネオリグナン成分の一酸化窒素産生抑制活性－. 日本生薬学会第60回年会(北海道), 2013.9.
- 26) 森川敏生, 金敷辰之介, 牛尾名恵花, 二宮清文, 松田久司, 松本朋子, 一川怜史, 袴田祐里, 三宅史織, 吉川雅之, 早川堯夫, Chaipech Saowanee, 村岡修：タイ天然薬物 *Melodrum fruticosum* 花部の機能性成分(2)－含有ブテノリド成分の一酸化窒素産生抑制活性－. 日本生薬学会第60回年会(北海道), 2013.9.
- 27) 二宮清文, 中西勇介, 木内恵理, 赤木淳二, 早川堯夫, 村岡修, 森川敏生：漢薬 胡黄連 (*Picrorhiza kurroa*, 根茎) の機能性成分(5)－含有フェニルエタノイド配当体のアルドース還元酵素新規阻害活性－. 日本生薬学会第60回年会(北海道), 2013.9.
- 28) 二宮清文, 酒井千恵, 中西勇介, 宮本陸平, 早川堯夫, 木下充弘, 掛樋一晃, 宮田信吾, 遠山正彌, 森川敏生：川芎 (*Cnidium officinale*, 根茎) の機能性成分(2)－含有フタリド成分の脂肪代謝促進活性－. 日本生薬学会第60回年会(北海道), 2013.9.
- 29) 二宮清文, 居村克弥, 坂本幸栄, 十川慶太, 早川堯夫, 村岡修, 森川敏生：漢薬 女貞子 (*Ligustrum lucidum*, 果実) の機能性成分(3)－含有トリテルペン成分のアロマターゼ阻害活性－. 日本生薬学会第60回年会(北海道), 2013.9.
- 30) 二宮清文, 尾関快天, 南野享, 早川堯夫, 木下充弘, 掛樋一晃, 宮田信吾, 遠山正彌, 森川敏生：釣藤鈎の機能性成分(1)－含有アルカロイドおよびトリテルペンの抗TNF- $\alpha$ 活性成分－. 日本生薬学会第60回年会(北海道), 2013.9.
- 31) 森川敏生, 末吉真弓, 松本拓, Saowanee Chaipech, 二宮清文, 松田久司, 野村友起子, 梅山美樹子, 吉川雅之, 向井秀仁, 木曾良明, 早川堯夫, 村岡修：タイ天然薬物 *Mammea siamensis* 由来プレニルクマリン mammeasin 類のiNOS合成酵素発現抑制作用および好中球様細胞活性化抑制作用. 第55回天然有機化合物討論会(京都), 2013.9.
- 32) 森川敏生, 萬瀬貴昭, 二宮清文, 西亮介, 酒井千恵, Chaipech Saowanee, 早川堯夫, 村岡修：紅豆蔻 (*Alpinia galanga*, 果実) の中性脂肪代謝促進活性成分－. 第57回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会(埼玉), 2013.10.
- 33) 森川敏生, 金敷辰之介, 二宮清文, 牛尾名恵花, 松田久司, 松本朋子, 一川怜史, 袴田祐里, 三宅史織, 吉川雅之, 早川堯夫, Chaipech Saowanee, 村岡修：タイ天然薬物 *Melodrum fruticosum* 花部の一酸化窒素産生抑制活性成分. 第57回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会(埼玉), 2013.10.
- 34) 二宮清文, 南野享, 尾関快天, 早川堯夫, 木下充弘, 掛樋一晃, 宮田信吾, 遠山正彌, 森川敏生：釣藤鈎の機能性成分(2)－含有アルカロイドおよびトリテルペンの抗炎症作用－. 第63回日本薬学会近畿支部総会・大会(京都), 2013.10.
- 35) 森川敏生, 二宮清文, Chaipech Saowanee, 三宅荘八郎, 坪山晃大, 早川堯夫, 村岡修：タイ天然薬物 *Kaempferia parviflora* 由来メトキシフラボノイド成分のメラニン産生抑制作用. 第5回食品薬学シンポジウム(京都), 2013.11.
- 36) 森川敏生, 二宮清文, Chaipech Saowanee, 三宅荘八郎, 坪山晃大, 早川堯夫, 村岡修：タイ天然薬物 *Kaempferia parviflora* 由来メトキシフラボノイド成分のメラニン産生抑制作用. 第5回食品薬学シンポジウム(京都), 2013.11.
- 37) 二宮清文, 奥村尚道, 村岡修, 許鳳鳴, 松田久司, 吉川雅之, 早川堯夫, 森川敏生：エジプト天然薬物 *Nigella sativa* の肝脂肪低減作用物質. 第31回メディスナ

- ルケミストリーシンポジウム (広島), 2013.11.
- 69) 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.
- 70) 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.
- 71) 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.
- 72) 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.
- 73) 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
- 74) 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, 11<sup>th</sup> ISSCR at BOSTON, U.S.A.
- 75) 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, 11<sup>th</sup> ISSCR at BOSTON, U.S.A.
- 76) 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.
- 77) 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.
- 78) 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.
- 79) 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.
- 80) 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.
- 81) 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.
- 82) 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.
- 83) 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.
- 84) 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.
- 85) 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 35<sup>th</sup> annual meeting of the molecular biology society of Japan. Dec 3-6, Kobe, Japan.

- 86) 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.
- 87) 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ー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.
- 88) 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.

#### 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】

- 3) 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
- 4) 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。

<b>Experiment</b>	<b>No. of iPS colonies generated from hASC</b>	<b>No. of iPS colonies generated from Hx-hASC</b>
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  $1 \times 10^5$  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。

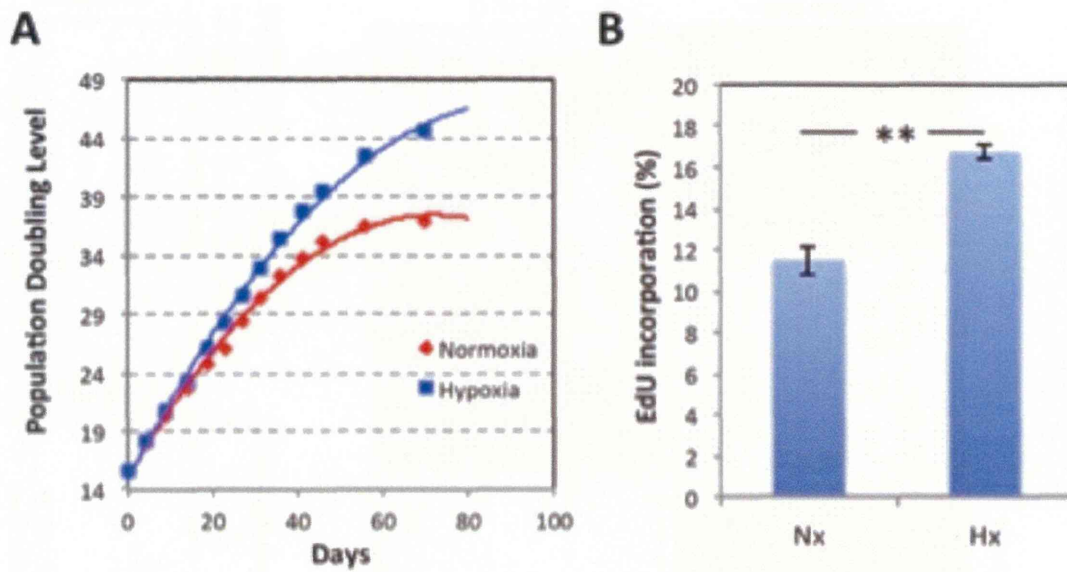


図 1 : 低酸素濃度下で培養した hASC の増殖能。(A) 通常酸素濃度下 (Normoxia)、低酸素濃度下 (Hypoxia) で培養した hASC の細胞倍加レベル。(B) 通常酸素濃度下 (Nx)、低酸素濃度下 (Hx) で培養した hASC の EdU 取り込みによる増殖能の評価。

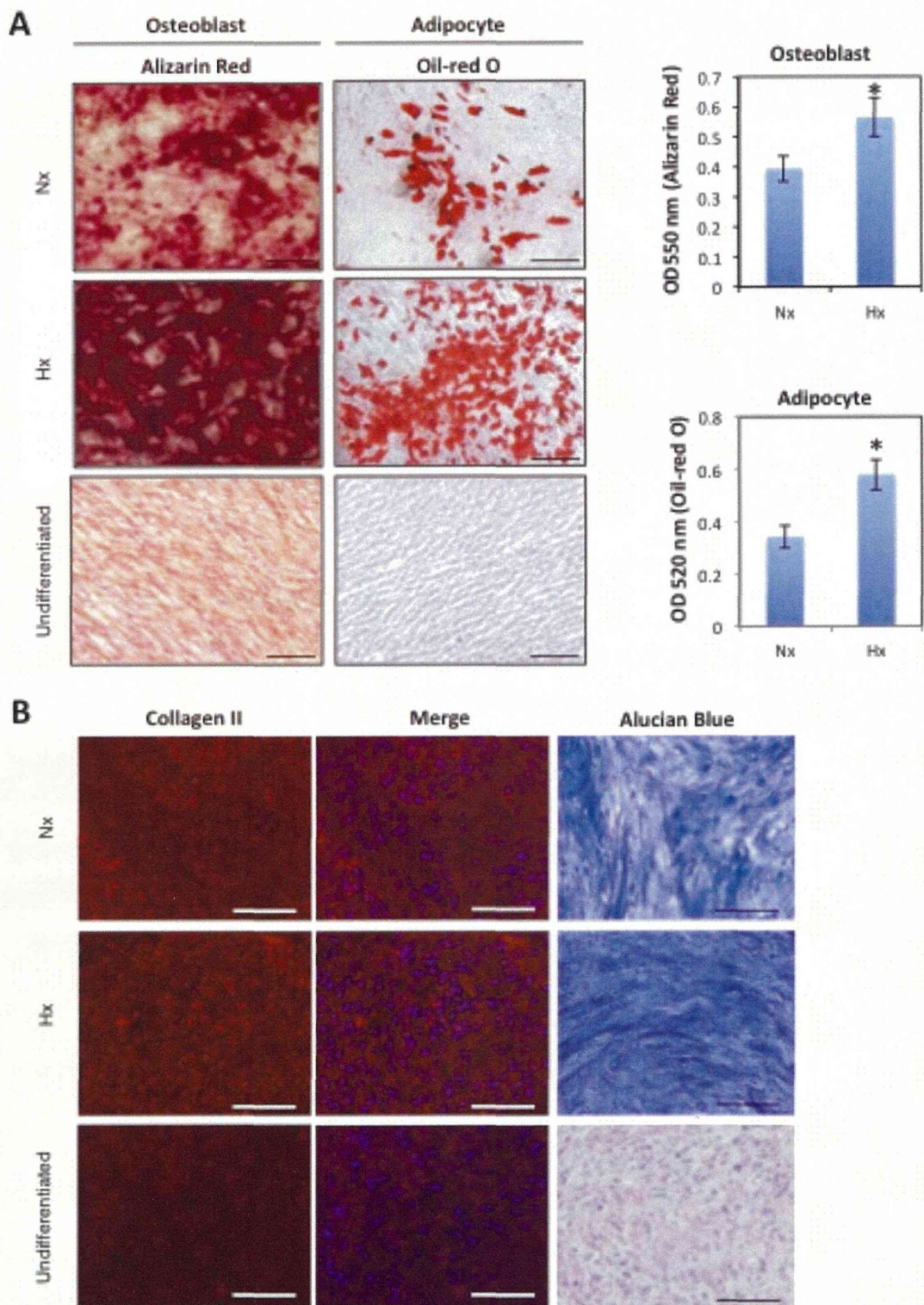


図 2 : 低酸素濃度下で培養した hASC の分化能。(A)骨 (Osteoblast)、脂肪 (Adipocyte) への分化能。それぞれ Alizarin Red と Oil-red O で染色し、抽出して比色定量を行い、グラフをプロットした。(B) 軟骨への分化能。Collagen II での免疫染色と Alucian Blue 染色を示す。分化誘導していない細胞 (Undifferentiated)はコントロールとして示した。

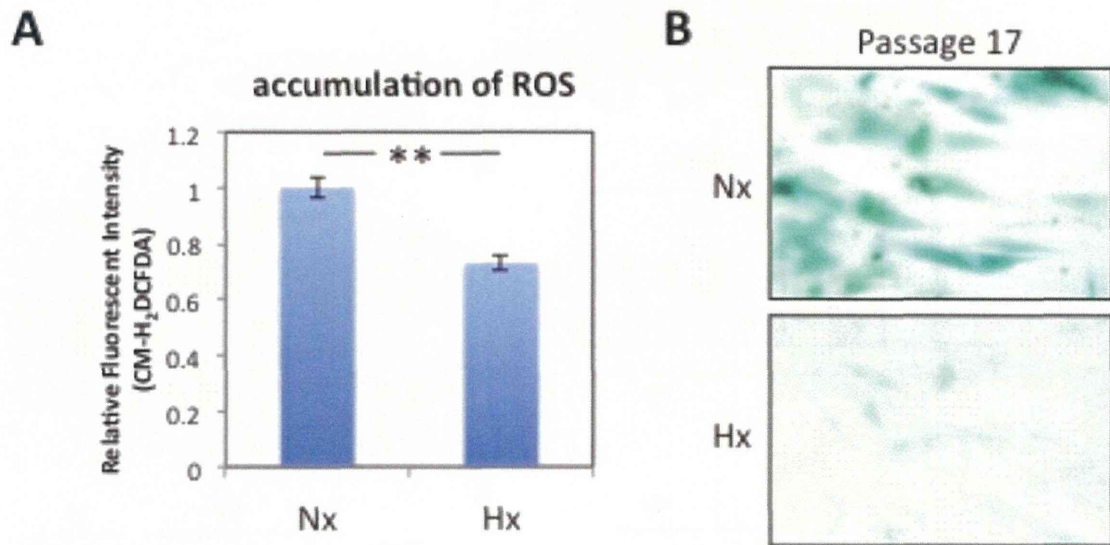


図 3: 低酸素濃度培養における抗老化作用。(A) 通常酸素濃度下 (Nx)、低酸素濃度下 (Hx) で培養した hASC の細胞老化。老化特異的  $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色を行った。(B) 通常酸素濃度下 (Nx)、低酸素濃度下 (Hx) で培養した hASC の細胞内酸化ストレスの測定。



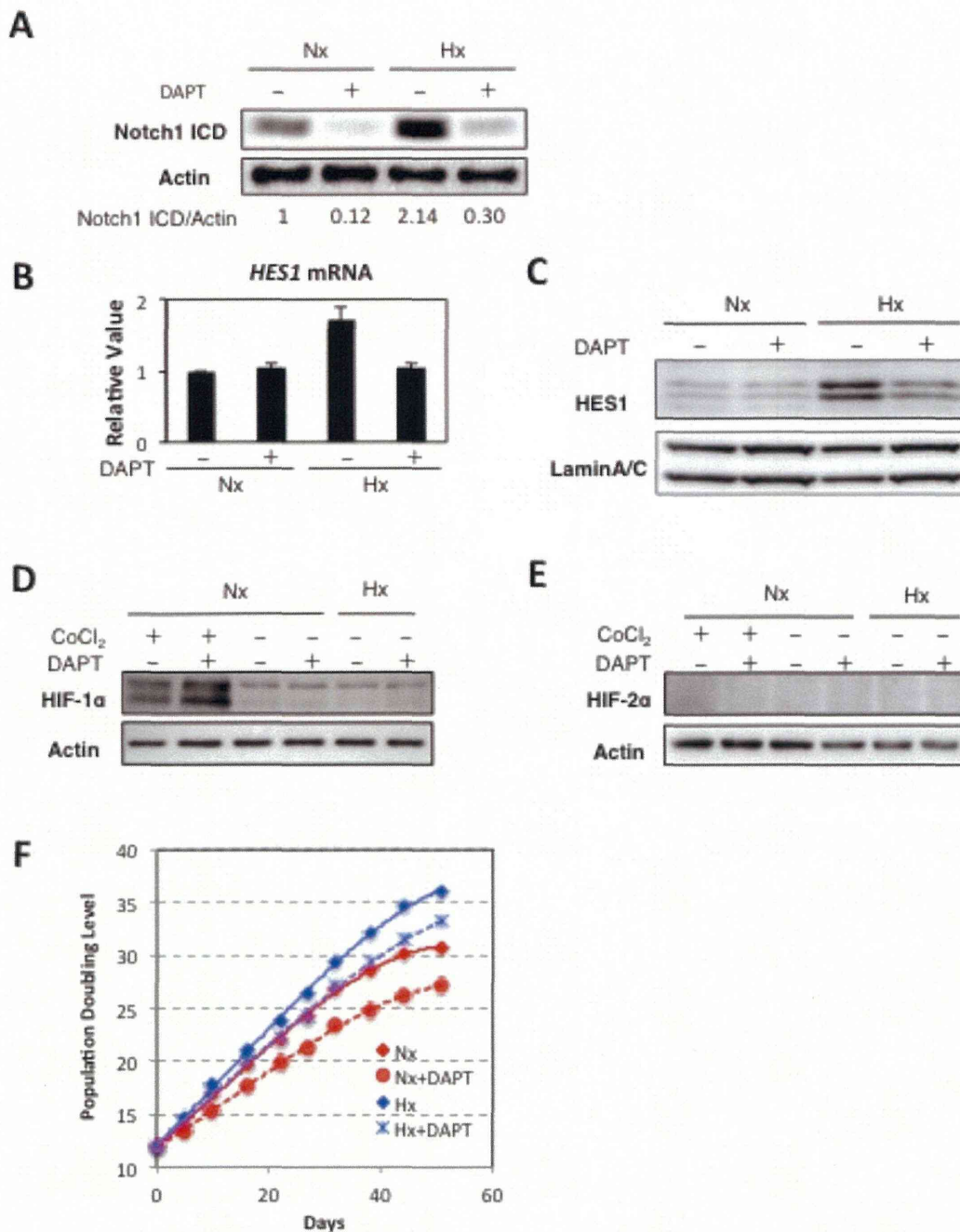
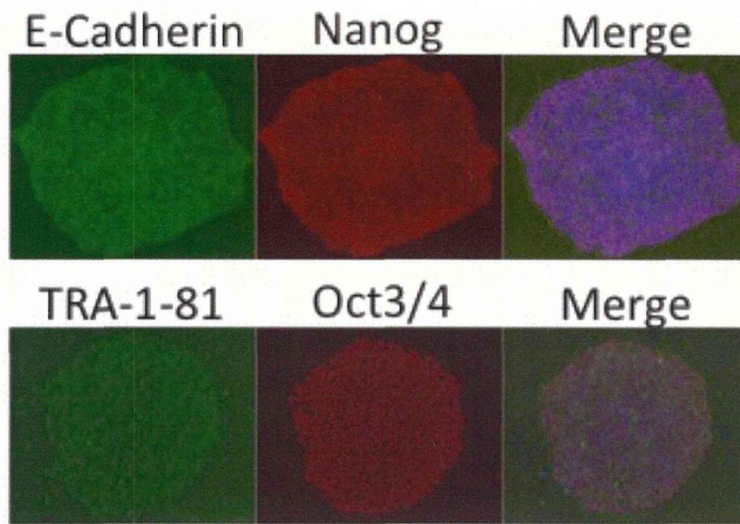
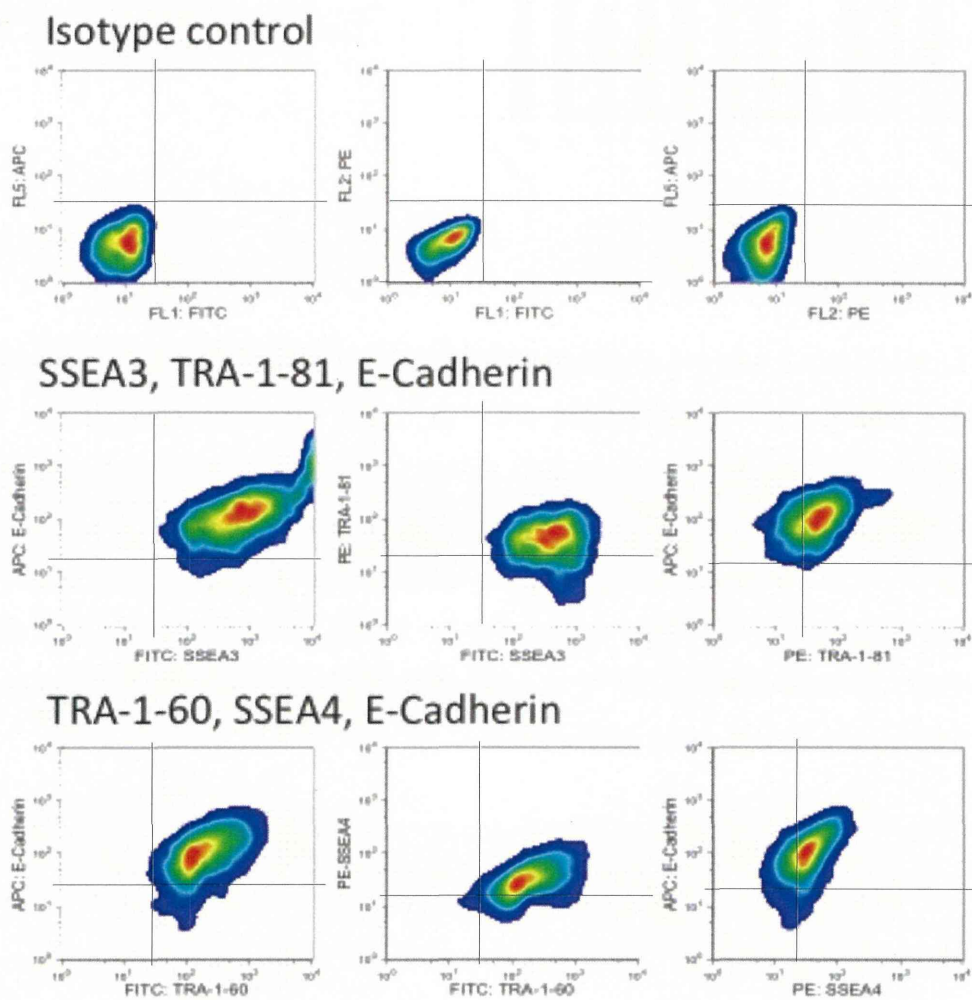


図 4：低酸素濃度下での増殖性向上に関与する因子の探索。hASC を通常酸素濃度下 (Nx) もしくは低酸素濃度下 (Hx) で培養した。Notch 阻害剤として 1  $\mu$ M DAPT を添加したものとコントロール群に分けている。(A) 活性化型 Notch1 (Notch1 ICD) のウェスタンブロッティング像。Actin は内部コントロール。(B, C) Notch の下流因子である HES1 の定量的 PCR (B) とウェスタンブロッティング像 (C)。LaminA/C は内部コントロール。(D, E) HIF-1 $\alpha$  (D) と HIF-2 $\alpha$  (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。CoCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ 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**

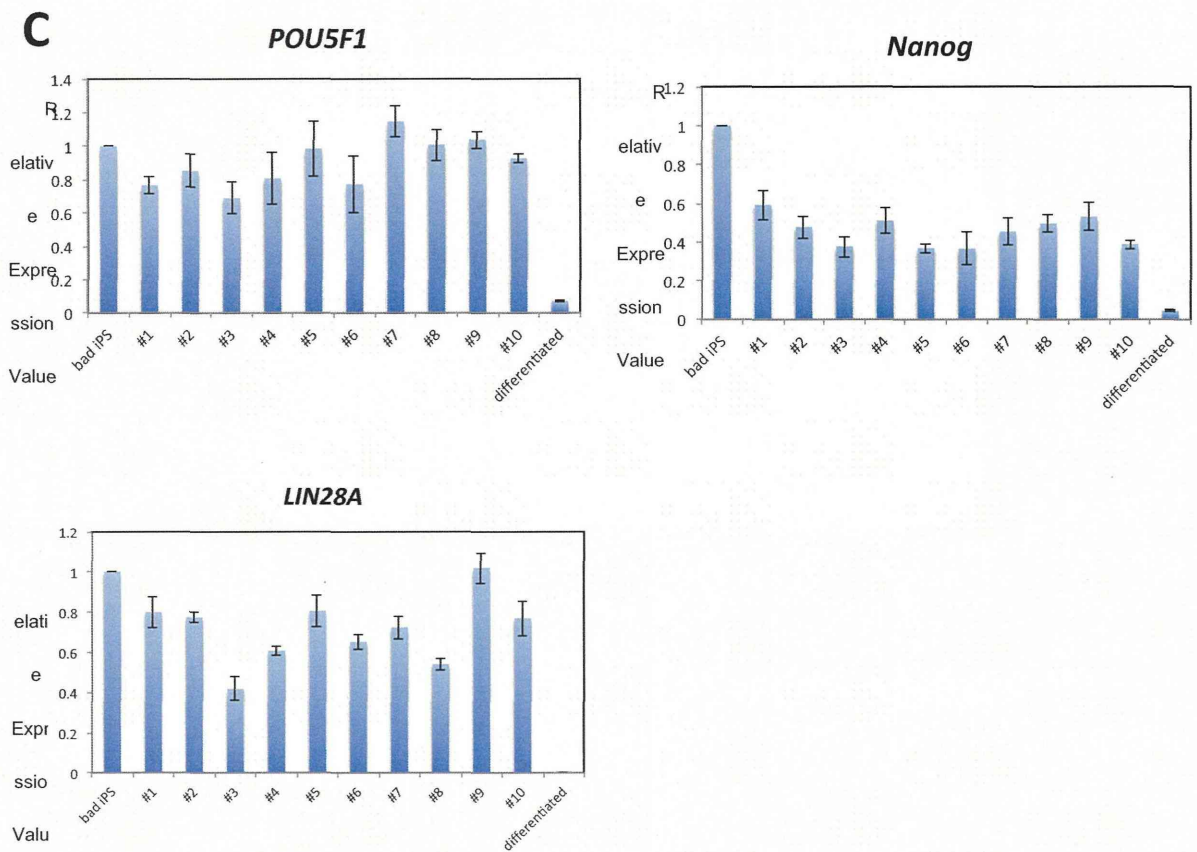


図 5 : Hx-hASC より樹立した iPS 細胞株の未分化マーカー解析。(A、上段) E-Cadherin (緑)、Nanog (赤) の免疫染色像を示す。(A、下段) TRA-1-81 (緑)、Oct3/4 (赤) の免疫染色像を示す。青は核染色 (DAPI) を示す。(B) フローサイトメトリー解析の結果。(上段) Isotype control、(中段) SSEA3 (FITC)、TRA-1-81 (PE)、E-Cadherin (APC)、(下段) TRA-1-60 (FITC)、SSEA4 (PE)、E-Cadherin (APC)での染色結果を示す。(C) 定量的 PCR の結果。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。

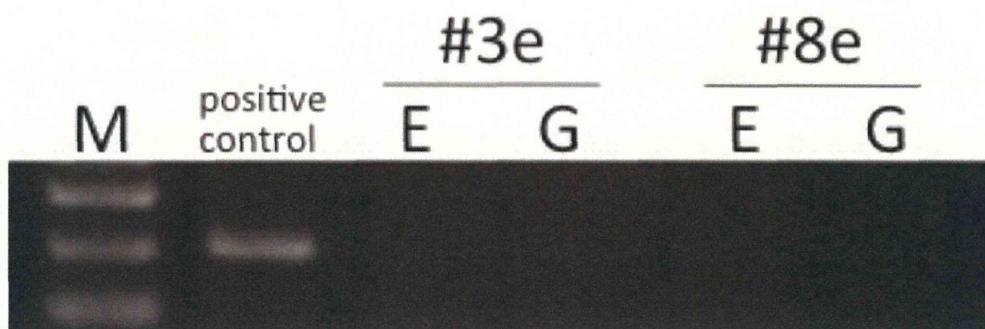


図6： エピゾーマルベクターによって樹立した iPS 細胞の外来遺伝子否定試験。代表的な細胞株よりエピゾーマル DNA ならびにゲノム DNA を抽出し、PCR による外来遺伝子の検出を行った。M: DNA サイズマーカー。E: エピゾーマル DNA。G: ゲノム DNA。ポジティブコントロールはプラスミド DNA を用いた。

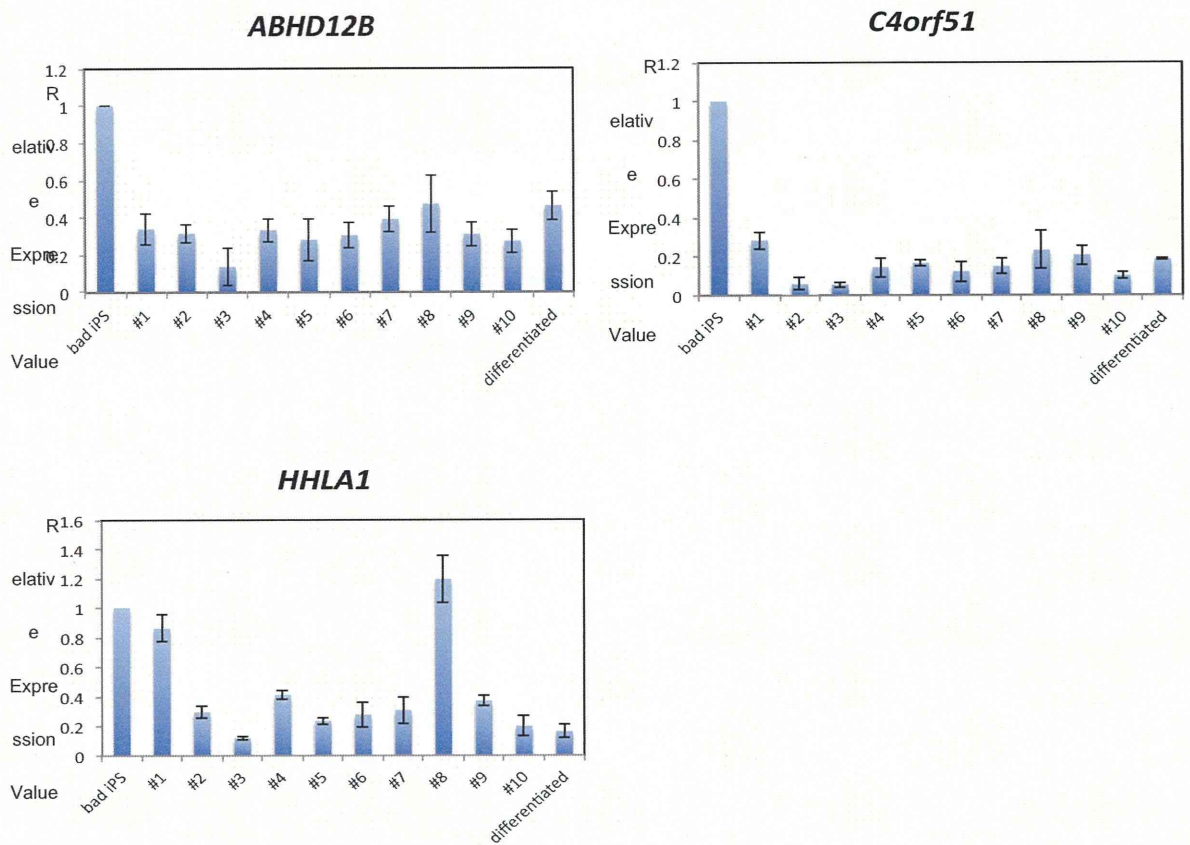


図7：樹立した iPS 細胞株の造腫瘍性リスクに関与する遺伝子群の発現プロファイル。それぞれ 10 種類の樹立した iPS より RNA を抽出し、*ABHD12B*, *C4orf51*, *HHLA1* に対する定量的 PCR を行った。bad iPS は腫瘍を作りやすい iPS 細胞である。分化させた iPS は differentiated として示した。

厚生労働科学研究費補助金 難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業  
「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」  
分担研究報告書

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

研究分担者：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

ヒト多能性幹細胞由来の再生医療等製品／特定細胞加工物の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に与える、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。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、移植時の細胞の状態を可能な限り均一な状態に揃える必要がある。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。

### 研究協力者

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  
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

## 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再生医療等製品/特定細胞加工物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る、これが実用化促進の最大の隘路の一つであるとされている。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。

具体的な戦略としては、まず、各種のヒト iPS 細胞及び 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、NOG マウスに移植して腫瘍を形成させ、その発生頻度を相互比較する。NOG マウスは、種差を超えてヒト細胞の腫瘍性細胞に対して免疫拒絶なく、

高い生着率で腫瘍形成が期待できる、現在、最も免疫学的に不全なモデル動物であり、実験動物中央研究所において開発されたものである。ヒト iPS 細胞及び ES 細胞の特性解析プロトコール、および NOG マウスへの移植試験プロトコールを確立した後、各細胞からの形成された腫瘍の特性について、「良性か悪性か」や「悪性度」を含めて、病理学的手法や各種分子生物学的手法を駆使して解析し、悪性度等とその他の細胞特性指標の関係を検討する。また、iPS 細胞の培養条件の差異や製品細胞の移植部位の微小環境が移植時の奇形腫の悪性化に関与する可能性を検証する。これらをふまえて、腫瘍の悪性度に関する検査方法を確立するとともに、より安全な原材料としての多能性細胞を選択すべく対策を講ずることを予定している。平成 25 年度の本分担研究においては、NOG マウスへの移植試験プロトコールの検討および至適化を試みた。

## B. 研究方法

### B-1 使用動物

本実験に用いた SPF の NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic (NOG マウス) および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-2 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フラスコ内で、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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で添加し、37°C / 5% CO<sub>2</sub> 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ump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 100 $\mu\text{L}$  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 10<sup>6</sup> 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ump移植：細胞用量 5 点 (0, 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>; 各 6 例)、②iPS 単一細胞移植：細胞用量 4 点 (10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>; 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  $\mu\text{M}$  含む 100 $\mu\text{L}$  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 10<sup>6</sup> 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, 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>; 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-2 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 100μL 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 10<sup>6</sup> 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, 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>; 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-3 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、TPD<sub>50</sub> 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)

動物実験を行う際には国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」に基づき、実験内容の審査と承認をうけた上で実施した。指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施した。また、ヒト由来の生体試料を用いる場合は、国立医薬品食品衛生研究所「研究倫理審査委員会規程」を遵守した上で研究を

実施した。

## C. 研究結果

### C-1 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) の状態で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 マウスへの移植が行われたが、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<sup>6</sup> 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的 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、Figure 1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<sub>50</sub>値は、iPSクランプ移植群、iPS単一細胞移植群でそれぞれ $3.1 \times 10^2$ 、 $1.3 \times 10^3$ であった。TPD<sub>50</sub>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(Figure 2)。

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、Figure 3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Figure 3に示す。また、Table 1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<sub>50</sub>値は、ROCK阻害剤を添加したiPS単一細胞移植群で $6.3 \times 10^2$ 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<sub>50</sub>値の変化については、Figure 2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<sub>50</sub>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-2 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<sup>6</sup>個の hMSC に一定量の iPS 単一細胞(0, 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>)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<sup>2</sup> 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<sup>4</sup>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

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)の状態に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になうことが知られている。そこで次に、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