

201335009A

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  
(再生医療関係研究分野)

iPS細胞を用いた再生医療における  
造腫瘍性の対策に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小澤 敬也

平成26(2014)年 5月



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  
(再生医療関係研究分野)

iPS細胞を用いた再生医療における  
造腫瘍性の対策に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小澤 敬也

平成26(2014)年 5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

iPS細胞を用いた再生医療における 造腫瘍性の対策に関する研究 小澤 敬也	-----	1
---	-------	---

### II. 分担研究報告

1. iPS細胞の遺伝子操作に関する研究 小澤 敬也、卜部 匡司	-----	6
2. iPS細胞のエピジェネティクス解析に 関する研究 古川 雄祐	-----	10
3. iPS細胞の移植後の体内動態の解析に 関する研究 阿部 朋行	-----	12

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	16
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	19
-----------------	-------	----

# I. 総括研究報告

総括研究報告書

iPS細胞を用いた再生医療における造腫瘍性の対策に関する研究

研究代表者 小澤敬也 自治医科大学医学部 教授

**研究要旨** iPS細胞は再生医療において様々な応用が期待されているが、その造腫瘍性が懸念されており臨床研究推進の妨げとなっている。その解決策の一つとしてiPS細胞に予め自殺遺伝子を搭載しておくことが挙げられる。もし細胞が制御不能となった場合には細胞死作働薬を投与することにより選択的に自殺遺伝子発現細胞を生体から排除できる。本研究では自殺遺伝子としてヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子もしくは、FKBP12とcaspase 9とのキメラ蛋白質 *inducible caspase9* 遺伝子を、アデノ随伴ウイルスが第19番染色体のAAVS1領域に組み込まれる機構を利用し、同領域にピンポイントで導入する。この方法は挿入変異発癌を来たさないないため特にiPS細胞遺伝子操作には適している。本研究では1) 自殺遺伝子をAAVS1領域に組み込んだiPS細胞を樹立し、2) エピジェネティクス解析によりその発現プロファイルを自殺遺伝子非搭載iPS細胞と比較する、3) マウス、ブタ、ヒツジ胎仔に移植し細胞死作働薬投与により細胞死を誘導できるか検証する、4) 動物に移植後長期観察することにより造腫瘍性を検討する、を研究の柱とする。本年度は主に自殺遺伝子をAAVS1領域へ挿入したiPS細胞を樹立することを目指し、基礎的検討を行った。GFP遺伝子をAAVS1領域に組み込ませるためのプラスミドとして、EF1 $\alpha$  プロモーターによりGFPを発現するカセットとPGKプロモーター下に *puromycin N-acetyltransferase* カセットをタンデムにつなぎ、GFPカセットの上流に向き合うようp5プロモーターでRepを発現するカセットを配した。iPS細胞にこのプラスミドを導入後、*puromycin* の存在下で培養を行い、単一iPS細胞由来のクローンを選別した。プラスミド側のプライマーとAAVS1プライマーを用いPCRを行い、増幅産物の塩基配列を解析したところ、119個のクローンのうち、6クローン (5.0%) でGFP遺伝子のAAVS1領域への組込みが確認できた。AAVS1配列とプラスミドの断端配列の詳細な解析から、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells: MSC)、HeLa細胞等でAAVS1特異的組込みを行った場合と同様の組込みメカニズムであることが分かった。これまでの諸報告ではAAVS1領域への組込み効率は10%以上と報告されており効率を上げることが今後の課題である。iPS細胞のエピジェネティクス解析では、自殺遺伝子を組み込んだiPS細胞における遺伝子発現パターンとDNAメチル化状態を次世代シーケンサーによって網羅的に解析し、親株との比較で自殺遺伝子の組込みによっておこる変化の有無を明らかにする。捉えられた変化と分化能・造腫瘍性との関連を移植実験によって確認し、iPS細胞の機能・安全性に関与する分子を同定するとともにその制御法を開発する。今年度はiPS細胞の作製と基礎データの取得を行った。また、モデル動物への移植研究では、ヒツジ胎仔への移植系を用いてiPS細胞由来のグラフトをもつヒツジの作製を試みた。また、近交系ブタを用いた移植系を用いて、近交系ミニブタ由来iPS細胞を用いて、iPS細胞の免疫原性の評価を行った。ブタiPS細胞の同種移植実験の結果、MHCを合致させた同系間での移植であっても未分化iPS細胞は免疫拒絶され、奇形腫は形成されなかった。このことから、ヒトiPS細胞を臨床応用する際に未分化な細胞が混入しても免疫的に排除され、奇形腫を形成する可能性は低いと考えられる。

分担研究者

卜部 匡司

自治医科大学医学部 講師

古川 雄祐

自治医科大学医学部 教授

阿部 朋行

自治医科大学医学部 助教

## A. 研究目的

iPS細胞を特定の細胞や臓器に分化誘導し生体に移植する再生医療は、難治性疾患に対する画期的治療法として開発が期待されている。しかし、人為的にゲノム操作を加えたiPS細胞の造腫瘍性が、安全性の点で解決すべき問題として残されている。その解決策として確実に移植細胞を排除できる仕組みを予めiPS細胞に搭載しておけば、癌化など制御不能の状態となった場合に対応できる。本研究では、挿入変異発癌の可能性のない部位特異的遺伝子挿入法で自殺遺伝子を組み込み、細胞死を誘導できるfail safe システムを確立する。部位特異的遺伝子組み込みは、非病原性のアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) がヒト第19番染色体のAAVS1領域に特異的に組み込まれる性質を利用する。自殺遺伝子としては、ガンシクロビル (GCV) によって細胞死を誘導できる自殺遺伝子チミジンキナーゼ (TK) と、非分裂細胞でも速やかに合成化合物AP1903もしくはAP20187でアポトーシスを誘導できるFKBP12と caspase 9とのキメラ蛋白質inducible caspase 9 (N Engl J Med. 365: 1673-83, 2011) を用いる。これら自殺遺伝子をピンポイントで安全なAAVS1領域に組み込ませておけば、挿入変異発癌を起こしにくい自殺遺伝子搭載iPS細胞を得ることができる。樹立したiPS細胞は細胞死誘導薬での応答性を評価するとともに、エピゲノム解析、マイクロアレイ解析を網羅的に行い、外来性遺伝子の組み込み、及び組み込み部位による差がないか解析する。また、ヒツジ胎仔にiPS細胞を移植し腫瘍形成の有無、導入遺伝子産物の免疫原性を長期間観察する。一方、よりヒト同種移植に近いモデルとしてブタ間の移植があるが、自殺遺伝子搭載ブタiPS細胞を同様に作製し、近交系ブタに移植し、その造腫瘍性の有無も検討する。もしこれらの移植実験において腫瘍が形成された場合は、ゲノムやエピゲノムの解析を追加し、

その発生機序の解明を試みる。

## B. 研究方法

研究全期間を通して以下のことを実施する。1) 安全な遺伝子操作技術を駆使しiPS細胞の遺伝子操作技術を確立 (小澤、卜部)、2) 自殺遺伝子を搭載したiPS細胞を樹立、及びin vitro、in vivoでの細胞死誘導の評価(小澤、卜部)、3) 遺伝子操作iPS細胞の品質解析 (古川)、4) モデル動物への移植による動態解析 (阿部) である。

### 1) iPS細胞の遺伝子操作

AAVS1領域への組み込みは、AAVのRep蛋白質がAAVゲノムの両末端のITR (Inverted Terminal Repeat)もしくはRep蛋白質の発現を制御するp5プロモーター内のRBS (Rep binding site) と、AAVS1上のRBS相同配列に結合することにより起こる。p5プロモーター配列を組み込みに使うとAAVS1領域における外来遺伝子の挿入の向きを規定できるため、本研究ではp5プロモーター配列を用いた。EF1 $\alpha$ プロモーターでGFPを発現するカセットとPGKプロモーターでpuromycin N-acetyl transferase (ピューロマイシン耐性遺伝子、Puro) を発現するカセットをタンデムに配し、またp5プロモーターでRepを発現するカセットをGFP/Puroカセットに向き合うように挿入したプラスミドを構築した。このプラスミドを細胞に導入するとp5プロモーターによりRepが発現し、同時にRepによりp5プロモーター内で切断されGFP/PuroカセットがAAVS1領域に組み込まれる。またp5プロモーターが破壊されるため、Repの発現がトランスフェクション後早期に停止するメリットもある。自殺遺伝子として単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子もしくはinducible Caspase 9 (FKBP12とcaspase 9とのキメラ蛋白質) を用いる。前者は抗ヘルペスウイルス薬であるガンシクロビルにより、後者は合成化合物AP1903もしくはAP20187により細胞死を誘導できる。

リンパ球より樹立されたiPS細胞のAAVS1領域にGFP遺伝子組み込み実験を行った。GF/PuroP発現プラスミドをiPS細胞にトランスフェクション後、puromycin存在下で培養しsingle cell clonesを得た。クローンよりゲノムDNAを抽出し、プラスミド側プライマーとAAVS1用プライマーでPCRを行い、増幅産物の塩基配列を読みAAVS1に組み込まれているか解析した (小澤、卜部)。



## 2) iPS細胞のエピジェネティクス解析

自殺遺伝子を組み込んだiPS細胞における遺伝子発現パターンとDNAメチル化状態を次世代シーケンサーによって網羅的に解析し、親株との比較で自殺遺伝子の組み込みによっておこる変化の有無を明らかにする。このようにして捉えられた変化と分化能や造腫瘍性との関連を移植実験によって確認し、iPS細胞の機能や安全性に関与する分子変化を同定するとともにその制御法を開発する(古川)。

## 3) iPS細胞の移植後の体内動態の解析

### ・ヒツジ胎仔を用いた移植実験

ヒツジ体内にヒトiPS細胞由来の造血を生着させて長期観察するために、以下の手順でヒツジ胎仔に移植した。自殺遺伝子非搭載ヒトiPS細胞をサイトカイン添加下で6日間にわたってOP9細胞と共培養することにより、中胚葉系に分化誘導した。その後、免疫寛容状態である妊娠約60日齢のヒツジ胎仔肝臓内に移植した。自然分娩(満期147日齢)したヒツジ産仔の骨髄におけるヒトiPS細胞由来造血の有無を、造血コロニーアッセイとヒト特異的な配列に対するPCR法により解析した。ヒツジ胎仔への移植手術および管理は、宇都宮大学教授 長尾慶和博士にご協力頂き、宇都宮大学農学部附属農場内で実施した(阿部)。

### ・近交系ブタを用いた移植実験

iPS細胞を臨床応用する場合、未分化細胞の残存による腫瘍形成のリスクが考えられる。そこで平成25年度は、自殺遺伝子を搭載していないクラウン系ミニブタiPS細胞を用いて、MHCを合致させたブタ間で同種移植を行った。レトロウイルスベクターを用いて、近交系クラウン系ミニブタ線維芽細胞から作製したブタiPS細胞を、同系ブタの精巣または卵巣内に移植し、腫瘍形成ならびに免疫反応の有無を評価した。移植手術ならびにブタの管理は、自治医科大学先端治療技術開発センター(ピッグセンター)内で実施した(阿部)。

### (倫理面への配慮)

本研究はヒトiPS細胞を用いるが、その由来となるリンパ球の提供者からはインフォームドコンセントを取得している。また研究実施機関において組換えDNA実験委員会と、倫理委員会の承認を得ている。

マウス、ヒツジ、ブタへの移植実験に関しても、実施機関の動物実験委員会の承認を得ている。実験に当たっては動物福祉または動物実験倫理への十分に配慮、かつ動物愛護には最大限の配慮を払いながら遂行する。

## C. 研究結果

### 1) iPS細胞の遺伝子操作

iPS細胞にGFP/Puroプラスミドをトランスフェクションして24時間後、約30%の細胞がGFPを発現していた。puromycinの存在下に培養を行いsingle cell clonesを選択した。クローンよりゲノムDNAを抽出しAAVS1への組み込みの有無をPCRにて検討した。解析した119クローンのうち、6クローン(5.0%)でGFP遺伝子のAAVS1領域への組み込みが確認できた。

### 2) iPS細胞のエピジェネティクス解析

ヒト線維芽細胞・リンパ球にOct4・Sox2・N-myc・KLF4・DNp53を導入し、iPS細胞を複数個樹立した。RNA-SeqとNOMe-Seqにて遺伝子発現プロファイルとゲノムのDNAメチル化状態を網羅的に解析し、ベースラインのデータを取得した。

### 3) iPS細胞の移植後の体内動態の解析

#### ・ヒトiPS細胞のヒツジ胎仔への移植実験

現在移植した産仔は、流産することなく産出されており、骨髄における造血キメラ状態を解析中である。体表にテラトーマの形成は見られなかった。

#### ・ブタiPS細胞の同種移植実験

ブタiPS細胞を同系ブタの精巣または卵巣へ移植した結果、奇形腫は形成されず、移植部位において炎症細胞の浸潤が観られた。また移植個体からブタiPS細胞に対する抗体が検出された。さらに、in vitroにおいてブタiPS細胞は、同系ブタのNK細胞や補体などの自然免疫反応によって障害されることが明らかとなった。以上より、MHCを合致させた同系ブタ間での移植であってもiPS細胞は免疫拒絶され、奇形腫形成が起こらなかった。

## D. 考察

### 1) iPS細胞の遺伝子操作

GFP/PuroプラスミドのiPS細胞のAAVS1領域への挿入を試みたところ、解析したクローンの5%でAAVS1領域への組み込みが認められた。そのクローンのPCRでの解析結果から、プラスミドのRBS(Rep binding site)近傍で切断され、AAVS1領域のRBS近傍に組み込まれていることが分かった。組み込み部位は今まで報告された他の細胞と同様であり、iPS細胞でもAAVのAAVS1特異的組み込み機構を利用し外来遺伝子を同部位への挿入することが可能であることが分かった。一方組み込み効率が5%であったことは、諸報告では10%以上となっていることから更に諸条件を検討し効率を上げる必要がある。具体的には遺伝子導入の際のGFPの一過性発現が約10%であったことか

ら、導入効率を上げればAAVS1への組込み効率も上昇すると考えられる。また、今回解析したクローンはすべてGFPを発現しているものを選んできたが、puromycin耐性クローンのすべてがGFPを発現していたわけではなかった。2A配列もしくはires (internal ribosome entry site) 配列を使いGFPと puromycin耐性遺伝子を同一カセットで発現させるようにすればGFPとPuro同時に発現するクローンの頻度が増し、最終的なAAVS1への組込み効率が高くなると思われる。

## 2) iPS細胞のエピジェネティクス解析

山中因子のc-mycをN-mycに変更することで発がん性の低下が期待される。一方、作製高率を向上させるためにDNp53を用いており、oncogenicな作用が懸念される。今回得られたデータをreferenceとして、自殺遺伝子導入後のパターンとの違いを明らかにする予定である。

## 3) iPS細胞の移植後の体内動態の解析

### ・ヒトiPS細胞のヒツジ胎仔への移植実験

これまでに申請者らは、サルES細胞由来造血をヒツジ体内で2年以上にわたって維持させることに成功している (Sasaki, Ozawa, Hanazono et al., Transplantation 2005)。ヒトiPS細胞でも同様に、長期的にヒツジ体内に生着させることが出来ると考えられる。

### ・ブタiPS細胞の同種移植実験

iPS細胞を臨床応用する場合、未分化細胞の残存による腫瘍形成のリスクが考えられる。そこで平成25年度は、自殺遺伝子を搭載していないクラウン系ミニブタiPS細胞を用いて、MHCを合致させたブタ間で同種移植を行うことで、臨床に近いモデルでのiPS細胞の同種移植実験を実施した。その結果、MHCを合致させた同系ブタ間での移植であってもiPS細胞は免疫拒絶され、奇形腫形成が起らなかった。これらのことから、ヒトiPS細胞を臨床応用する際に未分化な細胞が混入しても免疫的に排除され、奇形腫を形成する可能性は低いと考えられる。

## E. 結論

GFP/PuroプラスミドをヒトiPS細胞のAAVS1領域への挿入を試み、約5%の効率でAAVS1へ組み込ませることができた。今後GFP遺伝子を自殺遺伝子に置換したプラスミドを使用し、AAVS1へ組み込ませる予定である。またエピジェネティクス解析では自殺遺伝子搭載iPS細胞と親株と比較するための基礎データの取得を行った。一方、移植実験で

は、ヒツジ胎仔やブタを用いた移植系を用いて、自殺遺伝子搭載iPS細胞の有効性と安全性の検証を行う予定である。ヒト・ブタiPS細胞を用いたヒツジ胎仔および近交系ブタへの移植実験を進行中である。

## F. 健康危険情報

本研究では、特に有害事象や不都合は観察されていない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kashiwakura, Y., Ohmori, T., Mimuro, J., Madoiwa, S., Inoue, M., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Sakata, Y.: Production of functional coagulation factor VIII from iPSCs using a lentiviral vector. *Haemophilia* 20: e40-44, 2014.
2. Mimuro, J., Mizukami, H., Hishikawa, S., Ikemoto, T., Ishiwata, A., Sakata, A., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ono, F., Ozawa, K., and Sakata, Y.: Minimizing the inhibitory effect of neutralizing antibody for efficient gene expression in the liver with adeno-associated virus 8 vectors. *Mol Ther* 21: 318-323, 2013.
3. Miyata, S., Urabe, M., Gomi, A., Nagai, M., Yamaguchi, T., Tsukahara, T., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K., and Watanabe, E.: An R132H mutation in isocitrate dehydrogenase 1 enhances p21 expression and inhibits phosphorylation of retinoblastoma protein in glioma cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 53: 645-654, 2013.
4. Shimada, M., Abe, S., Takahashi, T., Shiozaki, K., Okuda, M., Mizukami, H., Klinman, D. M., Ozawa, K., and Okuda, K.: Prophylaxis and treatment of Alzheimer's disease by delivery of an adeno-associated virus encoding a monoclonal antibody targeting the amyloid Beta protein. *PLoS One* 8: e57606, 2013.
5. Takahashi, K., Mizukami, H., Saga, Y., Takei, Y., Urabe, M., Kume, A., Machida, S., Fujiwara, H., Suzuki, M., and Ozawa, K.: Suppression of lymph node and lung metastases of endometrial cancer by muscle-mediated expression of soluble vascular endothelial growth factor receptor-3. *Cancer Sci* 104: 1107-1111, 2013.
6. Tsukahara, T., Ohmine, K., Yamamoto, C., Uchibori, R., Ido, H., Teruya, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Nakamura, M., Mineno, J., Takesako, K., Riviere, I., Sadelain, M., Brentjens, R., and Ozawa, K.: CD19 target-engineered T-cells accumulate at tumor lesions in human B-cell lymphoma xenograft mouse models. *Biochem Biophys Res Commun* 438: 84-89, 2013.
7. Uchibori, R., Tsukahara, T., Mizuguchi, H.,



- Saga, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., and Ozawa, K.: NF-kappaB activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. *Cancer Res* 73: 364-372, 2013.
8. Uehara, T., Kanazawa, T., Mizukami, H., Uchibori, R., Tsukahara, T., Urabe, M., Kume, A., Misawa, K., Carey, T. E., Suzuki, M., Ichimura, K., and Ozawa, K.: Novel anti-tumor mechanism of galanin receptor type 2 in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 105: 72-80, 2014.
2. 学会発表
1. Urabe, M., Miyata, S., Tominaga, T., Tshukahara, T., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Generation of transgenic mice with human AAVS1 sequence. The 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul. 4-6, 2013, Okayama. (Abstracts p147)
2. Urabe, M., Miyata, S., Tominaga, T., Tshukahara, T., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Gene targeting in iPS cells derived from AAVS1-transgenic mice. 第75回日本血液学会学術集会 2013年10月11-13日, 札幌. (臨床血液 第54巻 9号 p432)
3. Urabe, M., Miyata, S., Tominaga, T., Tshukahara, T., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Generation of transgenic mice bearing human AAVS1 site, a safe harbor for gene insertion. 第36回日本分子生物学会年会2013年12月3-6日, 神戸.
4. 阿部朋行、長尾慶和、柳瀬公秀、原明日香、ボラジギン・サラントラガ、緒方和子、山口美緒、花園豊 ヒツジ子宮内移植系におけるヒト造血細胞の生着・増幅技術の開発 第61回日本実験動物学会総会 札幌 2014年5月15-17日 (抄録集 153)
5. 阿部朋行、長尾慶和、柳瀬公秀、サラントラガ、緒方和子、山口美緒、花園豊 ヒツジ子宮内移植系によるヒト造血幹細胞の定量評価の試み 第36回日本造血細胞移植学会、沖縄、2014年3月7-9日 (抄録集 p.233)
6. 阿部朋行、長尾慶和、柳瀬公秀、サラントラガ、緒方和子、山口美緒、林聡、花園豊 ヒツジ子宮内異種移植(II): 長期間の造血再構築 第16回日本異種移植研究会、大阪、2013年11月10日 (抄録集 p.42)
7. 長尾慶和、阿部朋行、柳瀬公秀、サラントラガ、緒方和子、山口美緒、林聡、花園豊 ヒツジ子宮内異種移植(I): 生着条件の検討 第16回日本異種移植研究会、大阪、2013年11月10日 (抄録集 p.41)
8. Abe T., Masuda S, Borjigin Sarentonglaga, Ogata K, Yamaguchi M, Hayashi S, Nagao Y and Hanazono Y. Long-term comparative study on the engraftment of human hematopoietic stem cells in sheep after xenogeneic in utero transplantation. The 12th Congress of the International Xenotransplantation Association, Osaka International Convention Center, Osaka, Japan, November 10-13, 2013. (*Xenotransplantation* 2013,vol.20(5),p.342)
9. Nagao Y, Abe T., Tanaka Y, Sasaki K, Masuda S, Borjigin Sarentonglaga, Ogata K, Yamaguchi M, Hayashi S, Kitano Y and Hanazono Y. Factors influencing engraftment of monkey embryonic stem cells in sheep after xenogeneic in utero transplantation. Oral presentation. The 12th Congress of the International Xenotransplantation Association, Osaka International Convention Center, Osaka, Japan, November 10-13, 2013. (*Xenotransplantation* 2013,vol.20(5),p.372)
10. 下澤律浩, 藤城修平, 水上喜久, 阿部朋行, 花園豊: カニクイザル初期胚を用いたES細胞の特性に関する検討. 第54回日本卵子学会, 東京, 2013年5月25-26日. (*Journal of Mammalian Ova Research*, Vol.30 (2), S94.)
11. 阿部朋行、花園豊 ヒト化ヒツジの作製を目指して 第60回日本実験動物学会総会ワークショップ、つくば市、2013年5月17日 (講演要旨集 p. 133)

## Ⅱ. 分担研究報告

分担研究報告書

iPS細胞の遺伝子操作

研究代表者 小澤敬也 自治医科大学医学部 教授  
研究分担者 ト部匡司 自治医科大学医学部 講師

**研究要旨** 非病原性のアデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus: AAV) の AAVS1 領域特異的組込み機構を利用し、同部位へ自殺遺伝子を組み込ませるシステムを iPS 細胞で樹立することを目指した。GFP 遺伝子を AAVS1 領域に組み込ませるためのプラスミドとして、EF1 $\alpha$  プロモーターにより GFP を発現するカセットと PGK プロモーター下に puromycin N-acetyltransferase を発現するカセットをタンデムにつなぎ、GFP カセットの上流に向き合うよう p5 プロモーターで Rep を発現するカセットを配した。iPS 細胞にこのプラスミドを導入後、puromycin の存在下で培養を行い、単一 iPS 細胞由来のクローンを選別した。プラスミド側のプライマーと AAVS1 プライマーを用い PCR を行い、増幅産物の塩基配列を解析したところ、119 個のクローンのうち、6 クローン(5.0%)で GFP 遺伝子の AAVS1 領域への組込みが確認できた。AAVS1 配列とプラスミドの断端配列の詳細な解析から、これまで間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells: MSC)、HeLa 細胞等で AAVS1 特異的組込みを行った場合と同様の組込みメカニズムであることが分かった。これまでの諸報告では AAVS1 領域への組込み効率は 10%以上と報告されており、効率を上げることが今後の課題である。

## A. 研究目的

iPS細胞は再生医療等における様々な応用が期待されている。しかしながら、人為的に体細胞から未分化多能性幹細胞状態に強制変換されていること、場合により初期化遺伝子がゲノムに組み込まれていること、iPS細胞が増殖旺盛であることなどのため、iPS細胞由来の細胞を生体に移植した場合のがん化の危険が払拭されていない。実際動物実験では移植後の腫瘍の発生が報告されている。

非病原性のアデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus: AAV)は第19番染色体のAAVS1領域(19q13.42)に特異的に組み込まれる性質を有する。この部位特異的組込みメカニズムは明らかにされており、その機構を利用し任意の遺伝子を同領域に特異的に組み込ませることができる。AAVS1領域はMBS85 (Myosin Binding Subunit 85) ゲノム領域に含まれるが、AAVS1へ外来遺伝子を組み込んだ正常表現型のトランスジェニックマウスの作出が可能であることから、少なくともMBS85の一アレルの破壊は許容できると考えられる。またAAVS1領域に外来性遺伝子を組み込んだでもがん化を来さず事例は報告されておらず、

挿入変異発がんを引き起こさない安全な部位と考えられる。

iPS細胞に前もって自殺遺伝子を組み込ませておけば、iPS細胞もしくはそれ由来の細胞ががん化など制御不能となった場合に、この自殺遺伝子を作動させることにより細胞死を起こさせることができる。そこで本年度は、挿入変異発がんを防ぐためにAAVS1領域特異的に外来遺伝子 (GFP、自殺遺伝子など) を挿入する方法をiPS細胞で確立することを目指す。

## B. 研究方法

### 1. AAVS1組込み用プラスミドの構築

AAVS1領域への組込みは、AAVのRep蛋白質がAAVゲノムの両末端のITR (Inverted Terminal Repeat)もしくはRep蛋白質の発現をドライブするp5プロモーター内のRBS (Rep binding site) と、AAVS1上のRBS相同配列に結合することにより起こる (図1)。またITR上のterminal resolution site (trs) のhomologも組込みには必須の配列とされている。p5プロモーターをAAVS1への組込みに使うと外来





AAVS1特異的組込みを行った場合と同様の組込みがヒトiPS細胞でも起きることが分かった。

#### D. 考察

GFP/PuroプラスミドをヒトiPS細胞のAAVS1領域への挿入を試みたところ、解析したクローンの5%でAAVS1領域への組込みが認められた。AAVS1組込みクローンの解析では部位プラスミドのtrs/RBS近傍で切断され、AAVS1領域のtrs/RBS近傍に組み込まれていることが分かった。組込み部位は今まで報告された部位と同様であり、ヒトiPS細胞でもAAVのAAVS1特異的組込み機構を利用した同部位への外来遺伝子挿入が可能であることが分かった。一方組込み効率が5%であったことは、諸報告では10%以上となっていることから更に諸条件を検討し効率を上げる必要がある。具体的には遺伝子導入の際のGFPの一過性発現が約10%であったことから、導入効率を上げればAAVS1への組込み効率も上昇すると考えられる。また、今回解析したクローンはすべてGFPを発現しているものを選んできたが、puromycin耐性クローンのすべてがGFPを発現していたわけではなかった。2A配列もしくはIRES (internal ribosome entry site) 配列を使いGFPとpuromycin耐性遺伝子を同一カセットで発現させるようにすればGFPとPuro同時に発現するクローンの頻度が増し、最終的なAAVS1への組込み効率が高くなると思われる。

#### E. 結論

GFP/PuroプラスミドのヒトiPS細胞のAAVS1領域への挿入を試み、約5%の効率でAAVS1へ組み込ませることができた。今後GFP遺伝子を自殺遺伝子に置換したプラスミドを使用し、AAVS1へ組み込ませる予定である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kashiwakura, Y., Ohmori, T., Mimuro, J., Madoiwa, S., Inoue, M., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Sakata, Y.: Production of functional coagulation factor VIII from iPSCs using a lentiviral vector. *Haemophilia* 20: e40-44, 2014.
2. Mimuro, J., Mizukami, H., Hishikawa, S., Ikemoto, T., Ishiwata, A., Sakata, A., Ohmori, T., Madoiwa, S., Ono, F., Ozawa, K., and

Sakata, Y.: Minimizing the inhibitory effect of neutralizing antibody for efficient gene expression in the liver with adeno-associated virus 8 vectors. *Mol Ther* 21: 318-323, 2013.

3. Miyata, S., Urabe, M., Gomi, A., Nagai, M., Yamaguchi, T., Tsukahara, T., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K., and Watanabe, E.: An R132H mutation in isocitrate dehydrogenase 1 enhances p21 expression and inhibits phosphorylation of retinoblastoma protein in glioma cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 53: 645-654, 2013.
  4. Shimada, M., Abe, S., Takahashi, T., Shiozaki, K., Okuda, M., Mizukami, H., Klinman, D. M., Ozawa, K., and Okuda, K.: Prophylaxis and treatment of Alzheimer's disease by delivery of an adeno-associated virus encoding a monoclonal antibody targeting the amyloid Beta protein. *PLoS One* 8: e57606, 2013.
  5. Takahashi, K., Mizukami, H., Saga, Y., Takei, Y., Urabe, M., Kume, A., Machida, S., Fujiwara, H., Suzuki, M., and Ozawa, K.: Suppression of lymph node and lung metastases of endometrial cancer by muscle-mediated expression of soluble vascular endothelial growth factor receptor-3. *Cancer Sci* 104: 1107-1111, 2013.
  6. Tsukahara, T., Ohmine, K., Yamamoto, C., Uchibori, R., Ido, H., Teruya, T., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Nakamura, M., Mineno, J., Takesako, K., Riviere, I., Sadelain, M., Brentjens, R., and Ozawa, K.: CD19 target-engineered T-cells accumulate at tumor lesions in human B-cell lymphoma xenograft mouse models. *Biochem Biophys Res Commun* 438: 84-89, 2013.
  7. Uchibori, R., Tsukahara, T., Mizuguchi, H., Saga, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., and Ozawa, K.: NF-kappaB activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. *Cancer Res* 73: 364-372, 2013.
  8. Uehara, T., Kanazawa, T., Mizukami, H., Uchibori, R., Tsukahara, T., Urabe, M., Kume, A., Misawa, K., Carey, T. E., Suzuki, M., Ichimura, K., and Ozawa, K.: Novel anti-tumor mechanism of galanin receptor type 2 in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 105: 72-80, 2014.
2. 学会発表
1. Urabe, M., Miyata, S., Tominaga, T., Tshukahara, T., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Generation of transgenic mice with human AAVS1 sequence. The 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul. 4-6, 2013, Okayama. (Abstracts p147)
  2. Urabe, M., Miyata, S., Tominaga, T., Tshukahara, T., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Gene targeting in iPS cells derived from AAVS1-transgenic mice. 第75回日本血液学会学術集会 2013年10月11-13日, 札幌.

(臨床血液 第54巻 9号 p432)

3. Urabe, M., Miyata, S., Tominaga, T., Tshukahara, T., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Generation of transgenic mice bearing human AAVS1 site, a safe harbor for gene insertion. 第36回日本分子生物学会年会2013年12月3-6日, 神戸.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。



## iPS細胞のエピジェネティクス解析

研究分担者 古川雄祐 自治医科大学医学部 教授

### 研究要旨

自殺遺伝子を組み込んだ iPS 細胞における遺伝子発現パターンと DNA メチル化状態を次世代シーケンサーによって網羅的に解析し、親株との比較で自殺遺伝子の組み込みによっておこる変化の有無を明らかにする。捉えられた変化と分化能・造腫瘍性との関連を移植実験によって確認し、iPS 細胞の機能・安全性に関与する分子を同定するとともにその制御法を開発する。今年度は iPS 細胞の作製と基礎データの取得を行った。

### A. 研究目的

遺伝子操作に伴う iPS 細胞のゲノムのメチル化および遺伝子発現パターンを網羅的に解析する。動物移植後、導入遺伝子の発現抑制や腫瘍形成が認められた場合、ゲノム及びエピゲノム解析を行って、その原因を明らかにする。

### B. 研究方法

自殺遺伝子を組み込んだ iPS 細胞における遺伝子発現パターンと DNA メチル化状態を次世代シーケンサーによって網羅的に解析し、親株との比較で自殺遺伝子の組み込みによっておこる変化の有無を明らかにする。このようにして捉えられた変化と分化能や造腫瘍性との関連を移植実験によって確認し、iPS 細胞の機能や安全性に関与する分子変化を同定するとともにその制御法を開発する。

(倫理面への配慮)

iPS 細胞は健常人ボランティアの末梢血リンパ球より樹立されたもので、血液の提供に関する同意手続き (インフォームド・コンセント) や個人情報保護の方法などを含めて、自治医科大学倫理委員会の承認を受け、その規程に従って樹立されたものである。組換え DNA 実験は、自治医科大学遺伝子組換え実験等安全管理規程に従って実施する (承認取得済み)。

### C. 研究結果

ヒト線維芽細胞・リンパ球に Oct4・Sox2・N-myc・KLF4・DNp53 を導入し、iPS 細胞を複数個樹立した。RNA-Seq と NOME-Seq にて遺伝子発現プロファイルとゲノムの DNA メチル化状態を網羅的に解析し、ベースラインのデータを取得した。

### D. 考察

山中因子の c-myc を N-myc に変更することで発がん性の低下が期待される。一方、作製

高率を向上させるために DNp53 を用いており、oncogenic な作用が懸念される。今回得られたデータを reference として、自殺遺伝子導入後のパターンとの違いを明らかにする予定である。

### E. 結論

今年度は基礎データの取得を行った。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Koyama D, Kikuchi J, Hiraoka N, Wada T, Kurosawa H, Chiba S, and Furukawa Y: Proteasome inhibitors exert cytotoxicity and increase chemosensitivity via transcriptional repression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, published online on December 4, 2013; doi: 10.1038/leu.2013.366.
2. Tago K, Funakoshi-Tago M, Itoh H, Furukawa Y, Kikuchi J, Kato T, Suzuki K, and Yanagisawa K: Arf tumor suppressor disrupts the oncogenic positive feedback loop including c-Myc and DDX5. **Oncogene**, published online on January 27, 2014 Jan 27; doi: 10.1038/onc.2013.561.
3. Kuroda I, Inukai T, Zhang X, Kikuchi J, Furukawa Y, Nemoto A, Akahane K, Hirose K, Honna-Oshiro H, Goi K, Kagami K, Yagita H, Tauchi T, Maeda Y, Sugita K: BCR-ABL regulates death receptor expression for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in Philadelphia chromosome-positive leukemia. **Oncogene** 32: 1670-1681, 2013.
4. Kikuchi J, Yamada S, Koyama D, Wada T, Nobuyoshi M, Izumi T, Akutsu M, Kano Y, and Furukawa Y: The novel orally active proteasome inhibitor K-7174 exerts anti-myeloma activity *in vitro* and *in vivo* by down-regulating the expression of class I

- histone deacetylases. **J Biol Chem** 288: 25593-25602, 2013.
5. Kikuchi J, Shibayama N, Yamada S, Wada T, Nobuyoshi M, Izumi T, Akutsu M, Kano Y, Sugiyama K, Ohki M, Park SY, and Furukawa Y: Homopiperazine derivatives as a novel class of proteasome inhibitors with a unique mode of proteasome binding. **PLoS One** 8: e60649, 2013.
  6. Hiraoka N, Kikuchi J, Koyama D, Uesawa M, Akutsu M, Wada T, Abe M, Mori S, Nakamura Y, Kano Y, and Furukawa Y: Purine analog-like properties of bendamustine underlie rapid activation of DNA damage response and synergic effects with pyrimidine analogues in lymphoid malignancies. **PLoS One** 9: e90675, 2014.
  7. Hiraoka N, Kikuchi J, Koyama D, Wada T, Mori S, Nakamura Y, and Furukawa Y: Alkylating agents induce histone H3K18

hyperacetylation and potentiate HDAC inhibitor-mediated global histone acetylation and cytotoxicity in mantle cell lymphoma. **Blood Cancer J** 3: e169, 2013.

## 2. 学会発表

1. 古川雄祐：骨髄腫の発がん分子機序。第75回日本血液学会総会、教育講演E L-38、札幌、2013年10月12日。
2. 古川雄祐：ERストレスを標的とする多発性骨髄腫の新規治療戦略。第16回癌と骨病変研究会、招待講演、東京、2013年11月15日。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

菊池次郎、古川雄祐：ホモピペラジン化合物を主成分とするプロテアソーム阻害剤：特願 2011-139235

iPS細胞の移植後の体内動態の解析

研究分担者 阿部朋行 自治医科大学医学部 助教

研究要旨

本研究では、大型動物の移植系を用いて、自殺遺伝子搭載iPS細胞の有効性と安全性について検証を行う。平成25年度は、ヒツジ胎仔への移植系ではヒトiPS細胞由来のグラフトをもつヒツジの作製を試みた。また、近交系ブタを用いた移植系では、近交系ミニブタ由来iPS細胞を用いて、iPS細胞の免疫原性の評価を行った。ブタiPS細胞の同種移植実験の結果、MHCを合致させた同系間での移植であっても未分化iPS細胞は免疫拒絶され、奇形腫は形成されなかった。このことから、ヒトiPS細胞を臨床応用する際に未分化な細胞が混入しても免疫的に排除され、奇形腫を形成する可能性は低いと考えられる。

A. 研究目的

iPS細胞を移植後に、癌化などの制御不能な状態となった場合を想定して、確実に移植細胞を排除できる仕組みを予め搭載しておくことは、安全性確保の観点から極めて重要である。しかし、ゲノム操作などの人為的処理を加えたiPS細胞では移植後の癌化が懸念されており、この造腫瘍性を完璧に排除することは困難であることから、その対策が喫緊の課題となっている。本研究では、ゲノム上の安全な遺伝子座にピンポイントで自殺遺伝子を組み込むのに加えて、自殺遺伝子搭載iPS細胞を大型動物へ移植し長期間観察することで、安全性の評価を行う。

ヒトiPS細胞を免疫寛容状態のヒツジ胎仔へ移植する実験(異種移植)は、免疫不全マウスへの移植実験の大型動物版に相当すると考えられ、マウスのような短命・小型動物ゆえの観察期間の短さ・サイズの小ささを克服できる。この系を用いて、部位特異的に自殺遺伝子が組み込まれたヒトiPS細胞をヒツジ胎仔体内に移植し、出生後の体内動態を長期的に観察する。また、ブタiPS細胞をMHC既知の近交系ブタへ移植する実験(同種移植)は、ヒト前臨床に近いモデルである。これまでに我々は、近交系ミニブタ由来iPS細胞を樹立している(Fujishiro SH et al., *Stem Cells Dev* 2013)。本研究では、これらの大型動物の移植系を用いて、自殺遺伝子搭載iPS細胞の腫瘍形成の有無、導入遺伝子産物の免疫原性ならびに自殺遺伝子の有効性について評価を行う。

B. 研究方法

・ヒツジ胎仔を用いた移植実験

ヒツジ体内にヒトiPS細胞由来の造血を生着させて長期観察するために、以下の手順でヒツジ胎仔に移植した。自殺遺伝子非搭載ヒトiPS細胞をサイトカイン添加下で6日間にわたってOP9細胞と共培養することにより、

中胚葉系に分化誘導した。その後、免疫寛容状態である妊娠約60日齢のヒツジ胎仔肝臓内に移植した(図1, 宇都宮大学農学部附属農場で実施)。自然分娩(満期147日齢)したヒツジ産仔の骨髄におけるヒトiPS細胞由来造血の有無を、造血コロニーアッセイとヒト特異的な配列に対するPCR法により解析した(図2)。ヒツジ胎仔への移植手術および管理は、宇都宮大学教授 長尾慶和博士にご協力頂き、宇都宮大学農学部附属農場内で実施した。

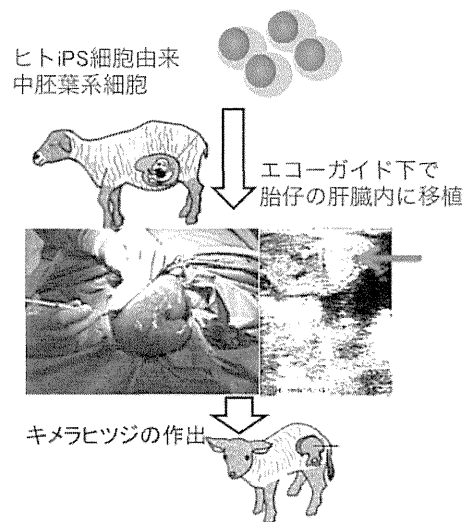


図.1 ヒトiPS細胞由来造血をもつヒツジの作出

エコーガイド下で、ヒツジ胎仔の肝臓内に細胞を移植する。その後、骨髄中にヒト造血幹細胞をもったキメラヒツジが得られる。



平成 25 年 4 月 24 日承認  
許可番号 D09-0007

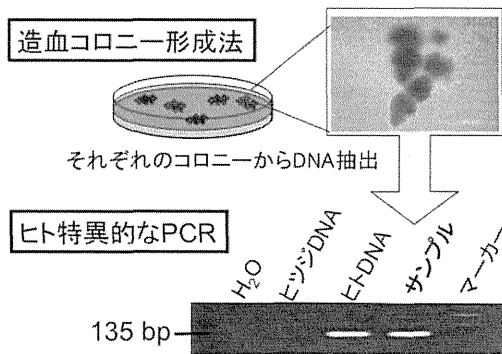


図2. ヒト造血の生着を判定する方法  
造血コロニー形成法によって、キメラヒツジ骨髄細胞から造血コロニーを得る。それぞれのコロニーからDNAを抽出し、ヒト特異的なPCRによって、ヒト造血コロニーを検出する。

- ・近交系ブタを用いた移植実験  
iPS細胞を臨床応用する場合、未分化細胞の残存による腫瘍形成のリスクが考えられる。そこで平成25年度は、自殺遺伝子を搭載していないクラウン系ミニブタiPS細胞を用いて、MHCを合致させたブタ間で同種移植を行った。レトロウイルスベクターを用いて、近交系クラウン系ミニブタ線維芽細胞から作製したブタiPS細胞を、同系ブタの精巣または卵巣内に移植し、腫瘍形成ならびに免疫反応の有無を評価した。移植手術ならびにブタの管理は、自治医科大学先端治療技術開発センター（ピッグセンター）内で実施した。

（倫理面への配慮）

①組換え DNA 実験：本研究で行われる組換え DNA 実験は、以下の通り承認を得た。ヒツジの管理は、宇都宮大学農学部附属農場 (P1A)で行った。ブタの管理は、自治医科大学で行った(施設は P2A に対応可能だが、P1A で実施可能)。

- ・阿部朋行申請 「大型動物を利用する幹細胞操作技術の開発」  
平成 25 年 12 月 20 日承認  
許可番号 13-133
- ・花園豊申請 「幹細胞を利用する再生医療技術の開発」  
平成 24 年 3 月 2 日承認  
許可番号 11-119  
改訂版 平成 25 年 8 月 27 日承認  
許可番号 13-100
- ・長尾慶和申請 「HoxB4 導入ヒト臍帯血幹細胞に由来する造血系を有するキメラヒツジのキメラ解析」

②生命倫理：ヒト iPS 細胞の作製・使用について以下の通り承認を得た。

- ・花園豊申請「iPS細胞の作製」  
平成 23 年 11 月 24 日承認  
許可番号 臨 11-8
- ・長尾慶和申請 「ヒツジ胎子内微小環境を利用した霊長類幹細胞の分化誘導法の確立」  
平成 25 年 4 月 26 日承認  
許可番号 H13-0012

③動物実験倫理：本研究ではヒツジ・ブタへの外科的処置が必須となることから、動物福祉または動物実験倫理への十分な配慮が必要である。

動物愛護には最大限の配慮を払う。本学ピッグセンターは、国際実験動物管理公認協会 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, AAALAC) の認証を受けている。

動物を用いた実験は、以下の通り承認を受けた。

- ・花園豊申請 「ヒツジを利用する幹細胞研究」  
平成 25 年 3 月 27 日承認  
許可番号 13148
- ・花園豊申請 「ブタを利用する幹細胞研究」  
平成 25 年 3 月 27 日承認  
許可番号 13150
- ・長尾慶和申請 「ヒツジ胎子内微小環境を利用した霊長類幹細胞の分化誘導法の確立」  
平成 24 年 5 月 15 日承認  
許可番号 A12-0015

### C. 研究結果

・ヒトiPS細胞のヒツジ胎仔への移植実験  
現在移植した産仔は、流産することなく産出されており、骨髄における造血キメラ状態を解析中である。体表にテラトーマの形成は観られなかった。

・ブタiPS細胞の同種移植実験  
ブタiPS細胞を同系ブタの精巣または卵巣へ移植した結果、奇形腫は形成されず、移植部位において炎症細胞の浸潤が観られた(図3)。また移植個体からブタiPS細胞に対する抗体が検出された(図4)。さらに、in vitro

においてブタiPS細胞は、同系ブタのNK細胞（図5）や補体（図6）などの自然免疫反応によって障害されることが明らかとなった。以上より、MHCを合致させた同系ブタ間での移植であってもiPS細胞は免疫拒絶され、奇形腫形成が起こらなかった。

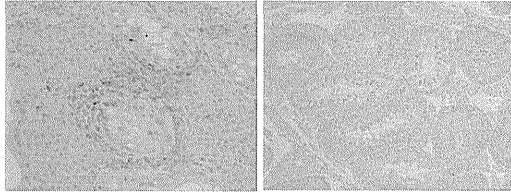


図3. CD3陽性細胞の浸潤  
左はブタiPS細胞を移植した部位、右は同じ個体の移植していない部位。

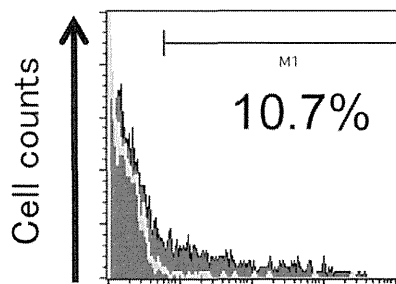


図4. 移植個体中のブタiPS細胞に対する抗体  
移植個体血清中の抗体と結合したブタiPS細胞をフローサイトメトリーにより検出・測定した。

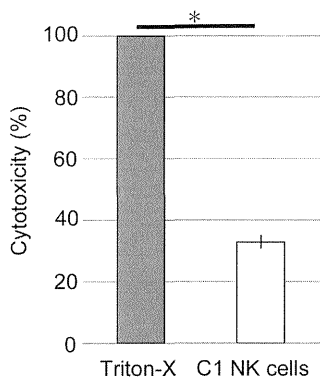


図5. NK細胞による障害  
同系ブタ(C1系統)由来のNK細胞をブタiPS細胞と反応させ、細胞内LDHの漏出を測定することで、NK細胞による障害反応を検出した（陽性対照試験としてTriton-Xを用いた）。

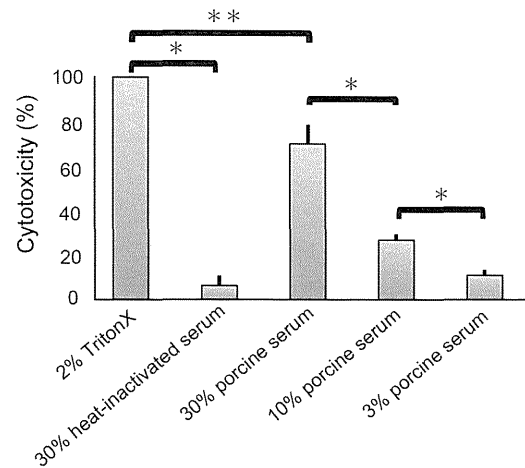


図6. ブタiPS細胞の補体による障害  
血清とブタiPS細胞を反応させ、上清中に漏出した細胞内LDHを測定することで、障害反応を検出した（陽性対照試験としてTriton-X、陰性対照試験として補体を不活化した血清を用いた）

#### D. 考察

##### ・ヒトiPS細胞のヒツジ胎仔への移植実験

これまでに申請者らは、サルES細胞由来造血をヒツジ体内で2年以上にわたって維持させることに成功している（Sasaki, Ozawa, Hanazono et al., Transplantation 2005）。ヒトiPS細胞でも同様に、長期的にヒツジ体内に生着させることが出来ると考えられる。

##### ・ブタiPS細胞の同種移植実験

iPS細胞を臨床応用する場合、未分化細胞の残存による腫瘍形成のリスクが考えられる。そこで平成25年度は、自殺遺伝子を搭載していないクラウン系ミニブタiPS細胞を用いて、MHCを合致させたブタ間で同種移植を行うことで、臨床に近いモデルでのiPS細胞の同種移植実験を実施した。その結果、MHCを合致させた同系ブタ間での移植であってもiPS細胞は免疫拒絶され、奇形腫形成が起こらなかった。これらのことから、ヒトiPS細胞を臨床応用する際に未分化な細胞が混入しても免疫的に排除され、奇形腫を形成する可能性は低いと考えられる。

#### E. 結論

本研究では、ヒツジ胎仔やブタを用いた移植実験系を用いて、自殺遺伝子搭載iPS細胞の有効性と安全性の検証を行う。ヒト・ブタiPS細胞を用いたヒツジ胎仔および近交系ブタへの移植実験を進行中である。平成25年度は、おおむね計画通り進捗している。

## G. 研究発表

1. 論文発表  
特になし

2. 学会発表

1. 阿部朋行、長尾慶和、柳瀬公秀、原明日香、ボラジギン・サラントラガ、緒方和子、山口美緒、花園豊 ヒツジ子宮内移植系におけるヒト造血細胞の生着・増幅技術の開発 第 61 回日本実験動物学会総会 札幌 2014 年 5 月 15-17 日 (抄録集 153)
2. 阿部朋行、長尾慶和、柳瀬公秀、サラントラガ、緒方和子、山口美緒、花園豊 ヒツジ子宮内移植系によるヒト造血幹細胞の定量評価の試み 第 36 回 日本造血細胞移植学会、沖縄、2014 年 3 月 7-9 日 (抄録集 p.233)
3. 阿部朋行、長尾慶和、柳瀬公秀、サラントラガ、緒方和子、山口美緒、林聡、花園豊 ヒツジ子宮内異種移植(II)：長期間の造血再構築 第 16 回日本異種移植研究会、大阪、2013 年 11 月 10 日 (抄録集 p.42)
4. 長尾慶和、阿部朋行、柳瀬公秀、サラントラガ、緒方和子、山口美緒、林聡、花園豊 ヒツジ子宮内異種移植(I)：生着条件の検討 第 16 回日本異種移植研究会、大阪、2013 年 11 月 10 日 (抄録集 p.41)
5. Abe T, Masuda S, Borjigin Sarentonglaga, Ogata K, Yamaguchi M, Hayashi S, Nagao Y and Hanazono Y. Long-term comparative study on the engraftment of human hematopoietic stem cells in sheep after xenogeneic in utero transplantation. The 12th Congress of the International Xenotransplantation Association, Osaka International Convention Center, Osaka, Japan, November 10-13, 2013. (Xenotransplantation 2013,vol.20(5),p.342)
6. Nagao Y, Abe T, Tanaka Y, Sasaki K, Masuda S, Borjigin Sarentonglaga, Ogata K, Yamaguchi M, Hayashi S, Kitano Y and Hanazono Y. Factors influencing engraftment of monkey embryonic stem cells in sheep after xenogeneic in utero transplantation. Oral presentation. The 12th Congress of the International Xenotransplantation Association, Osaka International Convention Center, Osaka, Japan, November 10-13, 2013. (Xenotransplantation 2013,vol.20(5),p.372)
7. 下澤律浩、藤城修平、水上喜久、阿部朋行、花園豊：カニクイザル初期胚を用いた ES 細胞の特性に関する検討. 第 54 回日本卵子学会、東京、2013 年 5 月 25-26 日.

(Journal of Mammalian Ova Research, Vol.30 (2), S94.)

8. 阿部朋行、花園豊 ヒト化ヒツジの作製を目指して 第 60 回日本実験動物学会総会 ワークショップ、つくば市、2013 年 5 月 17 日 (講演要旨集 p.133)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。