

OPEN

Pigment Epithelium-Derived Factor Secreted from Retinal Pigment Epithelium Facilitates Apoptotic Cell Death of iPSC

SUBJECT AREAS:

REGENERATIVE
MEDICINE

INTRACELLULAR SIGNALLING
PEPTIDES AND PROTEINS

APOPTOSIS

INDUCED PLURIPOTENT STEM
CELLS

Hoshimi Kanemura^{1,2}, Masahiro J. Go¹, Naaki Nishishita¹, Noriko Sakai², Hiroyuki Kamao^{2,4}, Yoji Sato³, Masayo Takahashi² & Shin Kawamata^{1,2}

¹Foundation for Biomedical Research and Innovation, Kobe, Japan, ²Laboratory for Retinal Regeneration, RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe, Japan, ³Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan, ⁴Department of Ophthalmology, Kawasaki Medical School, Okayama, Japan.

Received
22 February 2013

Accepted
5 July 2013

Published
1 August 2013

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.K. (kawamata@fbri.org)

We show that pigment epithelium-derived factor (PEDF), which is secreted from primary or iPSC-derived retinal pigment epithelium (RPE), dramatically inhibits the growth of iPSCs. PEDF is detected abundantly in culture supernatants of primary or iPSC-derived RPE. Apoptotic cell death is induced in iPSC when co-cultured with RPE, a process that is significantly blocked by addition of antibody against PEDF. Indeed, addition of recombinant PEDF to the iPSC cell culture induces apoptotic cell death in iPSCs, but the expression of pluripotency related-genes is maintained, suggesting that PEDF causes cell death, not differentiation, of iPSCs. To recapitulate this event *in vivo*, we examined tumor formation in NOG mice after subcutaneous injection of iPSCs with or without an iPSC-derived RPE sheet (2.5×10^5 RPE cells). We observed that the tumor forming potential of iPSCs was significantly suppressed by simultaneous transplantation with an iPSC-derived RPE sheet.

Cell therapy using embryonic stem cells (ESC) or induced pluripotent stem cells (iPSC) has already entered the scope of clinical application. Indeed, a clinical trial using ESC derived-RPE cells for Stargardt's disease and the dry type of age-related macular degeneration (dry AMD) has been initiated¹. Clinical trials using autologous iPSC-derived RPE for the wet type of age-related macular degeneration (wet AMD) are also being planned by several groups².

However, tumor formation from residual undifferentiated iPSCs or ESCs is an issue to be evaluated carefully in the transplantation of pluripotent stem cell-derived tissue products. This issue becomes more serious in the case of transplanting autologous iPSC-derived cells or tissues at sites lacking an immune barrier. The tumor forming potential of the remaining undifferentiated iPSCs in iPSC derived-cell products should be examined by taking into account the number of iPSC-derived cells to be transplanted, and the micro-environment of the transplantation site. The method and its sensitivity to detect the remaining iPSCs are also key issues to assure the safety of transplantation of iPSC-derived cell products.

We recently reported a method that was highly sensitive for the detection of residual iPSCs in iPSC-derived retinal pigment epithelium (RPE). It relied on qRT-PCR using primers for the *LIN28A* transcript³. With this method, we could theoretically detect iPSCs equivalent to 0.01% of the total cell product. Considering the fact that we plan to transplant $4 - 8 \times 10^4$ iPSC-derived RPE cells in a clinical setting, we should be able to detect the few residual iPSCs in the iPSC-derived RPE prior to transplant. Apart from the development of a sensitive residual iPSC detection method, it is important to explore the paracrine effects originating from differentiated iPSCs and/or host tissues on residual iPSCs. Secreted factors could have profound effects on iPSCs and their derived products after transplant. For example, RPE is known to secrete a variety of cytokines, connective tissue proteins, extracellular matrix proteins, complement factors, proteases, and protease inhibitors⁴. In this report, we studied the non-autonomous trans-effects of RPE on iPSCs and discuss the safety concerns for tumor formation from residual iPSCs in iPSC-derived RPE.

Results

Differentiation of iPSC into RPE cells. In an effort to establish a robust differentiation protocol for pluripotent stem cells into retinal pigment epithelium (RPE), the differentiation protocol shown in Figure 1A was used. In this

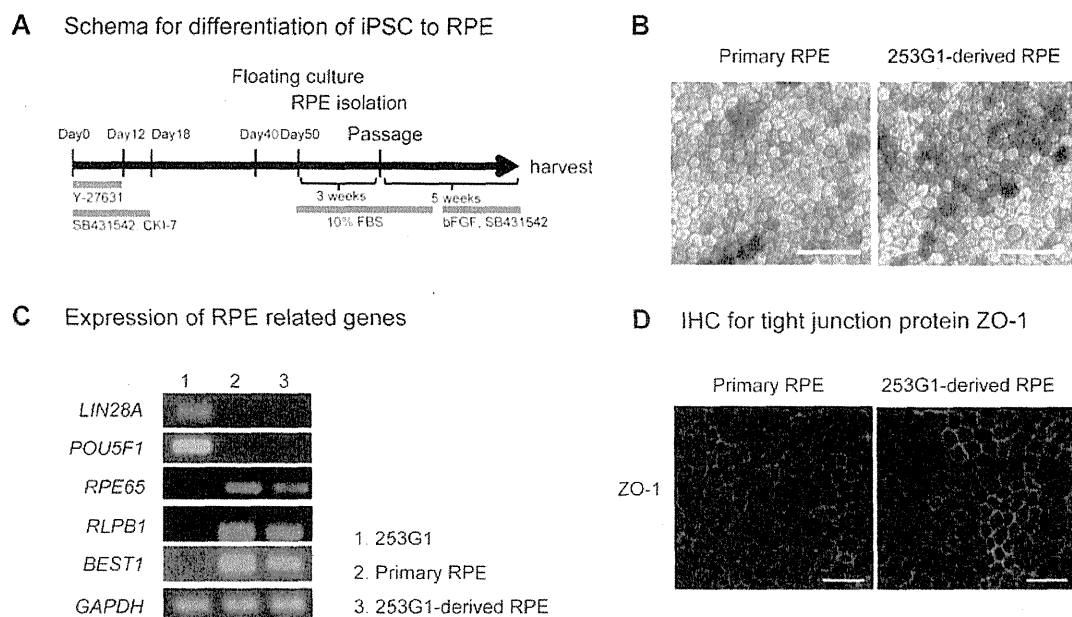


Figure 1 | Characterization of pigment epithelial cells derived from iPSC. (A) Protocol for differentiation to RPE from iPSC clone. (B) Phase contrast images of primary RPE (left panel) and iPSC clone 253G1-derived RPE (right panel). Scale bar = 50 μ m. (C) Expression of pluripotency-related undifferentiated marker genes (*LIN28A* and *POU5F1*) and RPE-specific genes (*RPE65*, *RLPB1*, and *BEST1*) detected by qRT-PCR. *GAPDH* was used for internal gene expression control. (D) Immunofluorescence staining of tight junction protein ZO-1. Secondary antibody Alexa 488 was used to visualize the staining. Scale bar = 50 μ m.

report, we used a commercially available iPSC clone 253G1⁵ (Riken Bio Resource Center, Tsukuba Japan) as a cell source for RPE differentiation to present a reproducible profile of iPSC-derived RPE. RPEs are sporadically pigmented, polygonal in shape, and grow in monolayers when cultured in dishes. iPSC clone 253G1 derived-RPE and primary RPE showed the same morphology in microscopic observation (Fig. 1B). To determine whether iPSC-derived RPE cells possessed the characteristic gene expression of primary RPE, the expression of *RPE65*, *RLPB1*, and *BEST1* was analysed by RT-PCR. 253G1-derived RPE cells expressed the *RPE65*, *RLPB1*, and *BEST1* messages, but not pluripotency-related genes such as *LIN28A* and *POU5F1* (Fig. 1C). Tight junction specific protein, ZO-1 was also detected both in 253G1-derived RPE and primary RPE by immunofluorescent staining (Fig. 1D).

Cell growth of iPS cells co-cultured with iPSC-derived RPE was drastically perturbed. To explore the effect of factors secreted by iPSC-derived RPE on iPSCs *in vitro*, we conducted co-culture experiments (Fig. 2A). iPSCs seeded on Matrigel-coated culture (Transwell) inserts were co-cultured with iPSC-derived RPE seeded on CELL start-coated dishes in iPS medium (ReproFF2 supplemented with bFGF). The iPSCs in the culture insert were harvested every four days and the cell number was scored. We found that the proliferation of iPSC was significantly inhibited by co-culturing with iPSC-derived RPE (Fig. 2B,C). It is notable that a similar trans-effect was observed when iPSCs were co-cultured with primary RPE (Supplementary Fig. 1A–C). Marked inhibition of the growth of iPSCs co-cultured with iPSC-derived RPE was, at least partly, mediated by apoptotic cell death, as shown by the presence of TUNEL-positive cells (Fig. 2D, E). Furthermore, immunostaining and qRT-PCR study of the remaining iPSCs in co-culture showed that the expression of pluripotency-related genes (such as *LIN28A*, *POU5F1*, and *NANOG*) was markedly reduced, suggesting that the conditioned medium from iPSC-derived RPE induced cell death and at the same time promoted differentiation of iPSCs (Fig. 2F,G).

This observation prompted us to explore the factors from iPSC-derived RPE and primary RPE that had a trans-effect on iPSC cell proliferation. We performed microarray analysis with the GeneChip[®] system (Affymetrix), studying primary RPE, the 253G1-derived RPE and the parent iPSC clone 253G1. Several secreted factors were identified, with high message expression in both primary RPE and iPSC-derived RPE but only low/no expression in iPSC. For example, pigment epithelium-derived factor (PEDF), vascular endothelium growth factor (VEGF), bone morphogenetic protein 4 (BMP4), microsomal glutathione S-transferase (MGST), and glutathione S-transferase mu3 (GSTM3) showed high levels of message [Supplementary Table 1 and Data Set in GEO <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds> (GEO number: GSE43257)]. Among those molecules, PEDF, VEGF, BMP4 have been reported to affect differentiation, proliferation, migration, and apoptosis^{9,10,11}. Thus, they were extracted and examined for a trans-effect on iPSCs.

Apoptotic cell death of iPSC is partly mediated by PEDF. Using a specific anti-PEDF antibody, PEDF protein (with a size of 50 kDa) was detected by Western blotting (Fig. 3A) in the conditioned medium of iPSC-derived RPE, and in cell lysates of both iPSC and iPSC-derived RPE. Fresh iPSC medium (medium without co-culturing) was used as a control sample. The amount of PEDF present after 24 h of cell culture (24 hours after changing with fresh medium) was measured by ELISA. The conditioned media from both primary RPE and iPSC-derived RPE contained a considerable amount of PEDF (more than 1 μ g/mL) (Figure 3B).

VEGF and BMP4 in the conditioned media from primary RPE or iPSC-derived RPE cell cultures were detected by ELISA (Supplementary Fig. 2A,B). However, addition of 0.1 μ g/mL, 5 μ g/mL, or 20 μ g/mL of recombinant VEGF (rVEGF, Peprotech), or 0.02 μ g/mL, 1 μ g/mL, or 4 μ g/mL of rBMP4 (Peprotech) failed to alter cell growth markedly (Supplementary Fig. 2C). Then, we examined the effect of PEDF on the growth of iPSCs. To address this, a specific neutralizing antibody for PEDF (BioProducts, MD) was added to the co-culturing system and the proliferation of iPSCs in the culture

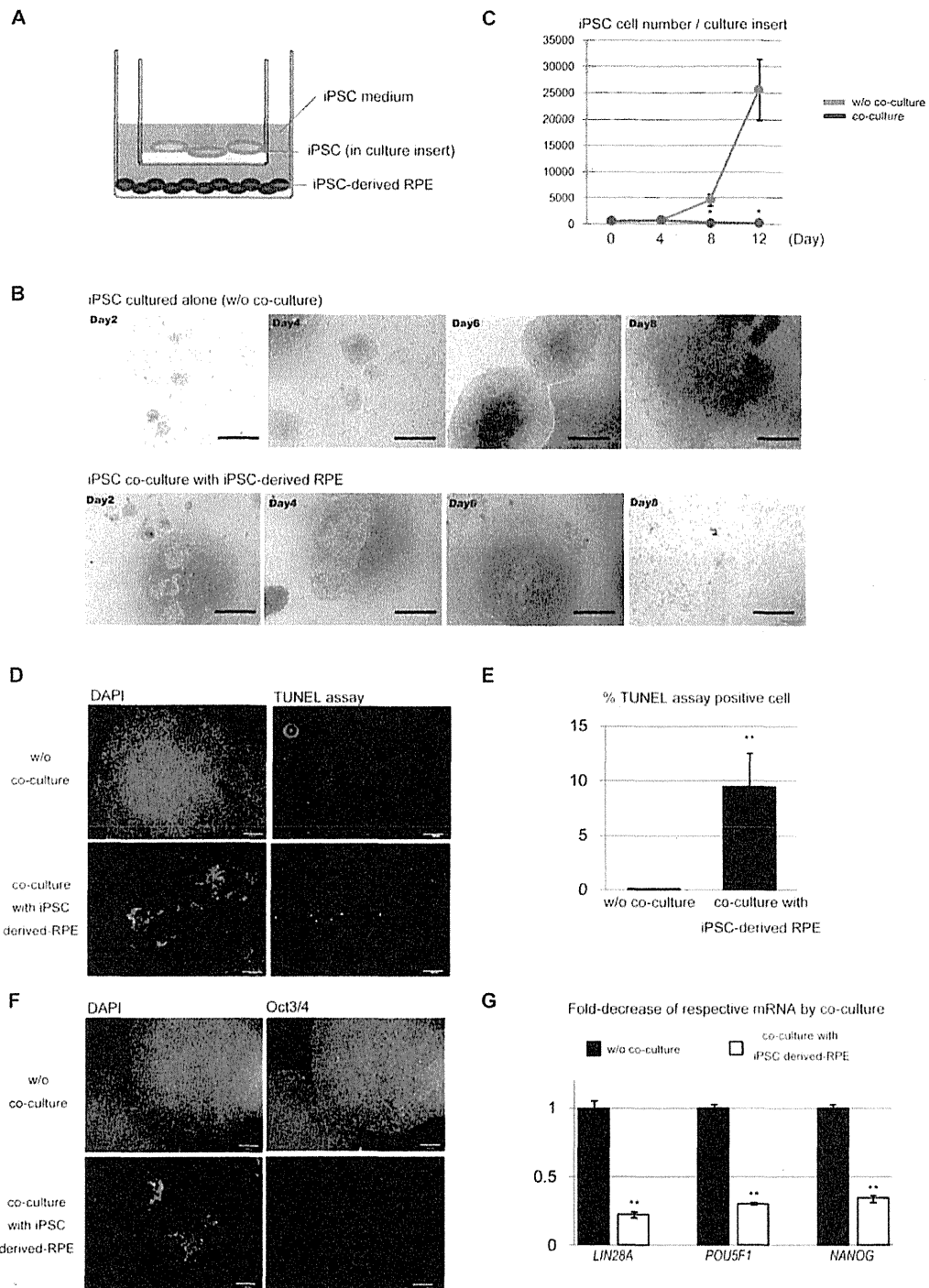


Figure 2 | Cell growth of iPSCs co-cultured with iPSC-derived RPE was perturbed. (A) Schema for co-culturing iPSC with RPE. iPSCs were maintained in culture inserts coated with Matrigel and co-cultured with iPSC-derived RPE seeded on the bottom of the dishes in iPSC culture medium. (B) Phase contrast photos of iPSC clone 253G1 in 12-well Transwells either cultured alone or co-cultured with 253G1-derived RPE on the designated day of culture. Scale bar = 500 μ m. (C) Growth curve of iPSC clone 253G1 co-cultured with 253G1-derived RPE or cultured alone (w/o co-culture). The number of iPSC clone 253G1 cells in 12-well Transwells at the designated day of culture was scored. Means of three independent experiments are plotted on a linear graph with standard deviation (SD). *, $P < 0.05$, compared as indicated. (D) Apoptotic cell death was examined (or analyzed) by TUNEL assays and visualized as white spots on day six of culture. Scale bar = 200 μ m. (E) Ratio of TUNEL-positive cells to DAPI positive 253G1 cells (as a percentage) either cultured alone (w/o co-culture) or co-cultured with 253G1-derived RPE. Mean results (with SD) from four independent experiments. **, $P < 0.005$, compared as indicated. (F) 253G1 cells co-cultured with 253G1-derived RPE markedly lost the expression of undifferentiated marker Oct3/4 (POU5F1) after six days of culture. Cells were stained with antibody for Oct3/4 (POU5F1), and then visualized with secondary antibody Alexa 488 (green, right panels). Nuclei were stained with DAPI (blue, left panels). Scale bar = 200 μ m. (G) Fold-decrease of indicated mRNAs in iPSC resulting from co-culturing with iPSC-derived RPE. mRNA levels of *LIN28A*, *POU5F1* or *NANOG* in 253G1 were measured by quantitative RT-PCR. *GAPDH* was used as an internal control to normalize the mRNA levels of these genes. Mean results (with SD) derived from three independent experiments. **, $P < 0.005$, compared as indicated.

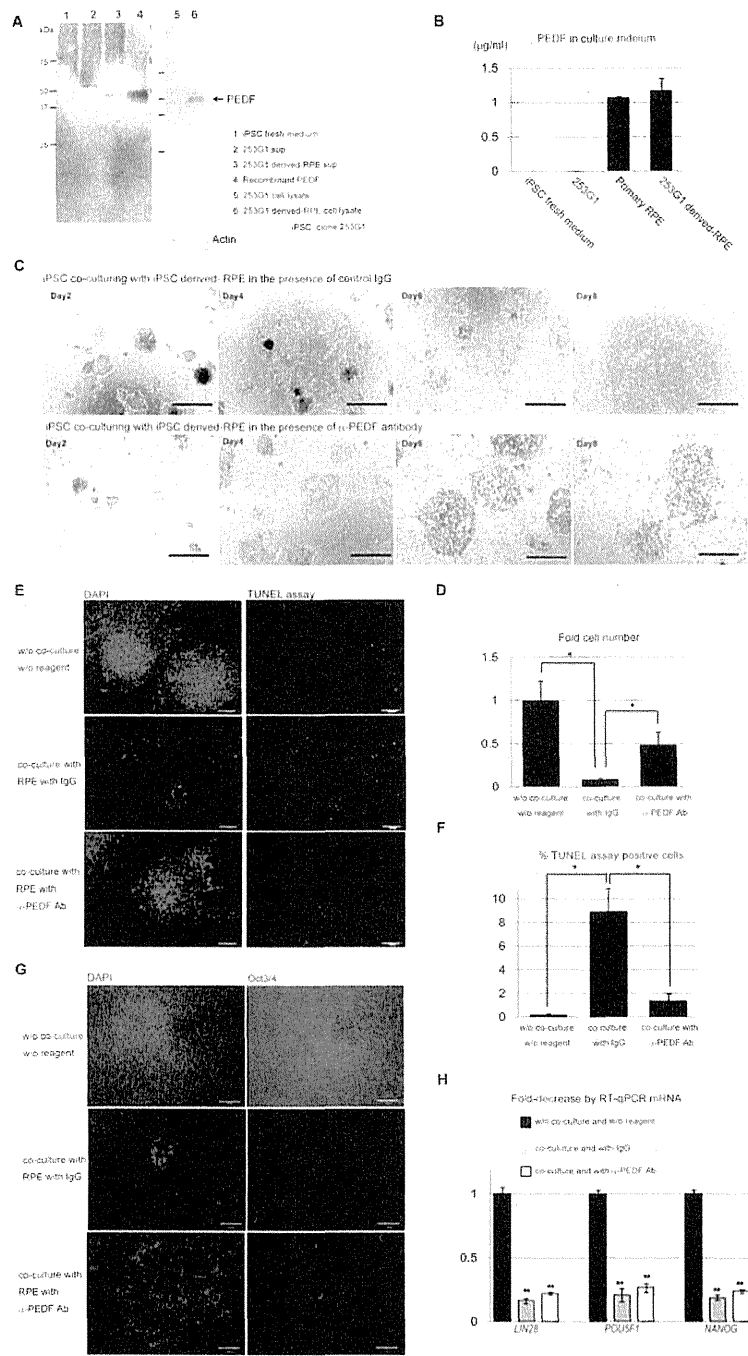


Figure 3 | Addition of antibody against PEDF blocked apoptotic cell death in iPSC induced by co-culture with RPE. (A) Western blot of iPSC fresh culture medium, 253G1 sup, 253G1-derived RPE sup and recombinant PEDF, or cell lysates of 253G1 and 253G1-derived RPE using an anti-PEDF specific antibody. Detection of actin was used as a loading control for cell lysates. **(B)** Quantitation of PEDF in iPSC fresh culture medium, 253G1 sup, primary RPE or 253G1-derived RPE conditioned medium by ELISA. Mean results of three independent experiments (with SD). **(C)** Phase contrast images of 253G1 co-cultured with 253G1-derived RPE in the presence of control IgG1 or anti-PEDF antibody on the designated day of culture. Scale bar = 500 µm. **(D)** Fold-change in the number of 253G1 cells co-cultured with 253G1-derived RPE in the presence of IgG1 or anti-PEDF antibody after six days of incubation. Cell counts were compared to 253G1 cultured alone without reagent. Mean results of four independent experiments (with SD). *, $P < 0.05$. **(E)** 253G1 co-cultured with 253G1-derived RPE in the presence of control IgG1 or anti-PEDF antibody after six days of culture were examined by TUNEL assay visualized as white spots. 253G1 cultured alone without reagent was used as the control. Scale bar = 200 µm. **(F)** Ratio of TUNEL assay-positive 253G1 cells to DAPI positive cells when 253G1 cells were co-cultured with 253G1-derived RPE in the presence of control IgG1 or anti-PEDF antibody after six days of incubation. Mean results (with SD) from four independent experiments. *, $P < 0.05$, compared as indicated. **(G)** 253G1 cells co-cultured with 253G1-derived RPE markedly lost the expression of undifferentiated marker Oct3/4 (POU5F1) after six days of incubation. Cells were stained with antibody for Oct3/4, and then visualized with secondary antibody Alexa 488. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar = 200 µm. **(H)** Fold-decrease of indicated mRNAs in iPSC resulting from co-culturing with 253G1-derived RPE. mRNA levels of *LIN28A*, *POU5F1* and *NANOG* were measured by quantitative RT-PCR. *GAPDH* was used as an internal control to normalize the mRNA expression levels. Mean results of three independent experiments (with SD). **, $P < 0.005$.

inserts was examined. Growth inhibition of 253G1 cells co-cultured with 253G1-derived RPE was observed in the presence of control IgG. However, growth inhibition was efficiently blocked by anti-PEDF antibody (Fig. 3C). Almost half of the iPSCs were rescued by addition of 5 µg/mL polyclonal anti-PEDF neutralizing antibody (Fig. 3D). Specifically, it appeared that neutralizing antibody against PEDF reduced apoptotic death of iPSCs (Fig. 3E, 3F). Based on this experiment, we concluded that PEDF induced cell death of iPSCs.

Next, we examined whether PEDF could promote differentiation of iPSCs as well as induce cell death. iPSCs co-cultured with RPE in the presence of control IgG initiated differentiation as evidenced by a decrease of *LIN28A*, *POU5F1* and *NANOG* message levels. This message reduction was not attenuated by the addition of anti-PEDF antibody (Fig. 3G, 3H), suggesting that PEDF contributed to the induction of iPSC death but not to iPSC differentiation. VEGF and BMP4, known to induce pluripotent stem cell differentiation, were also detected in the RPE-conditioned medium by ELISA (Supplementary Fig. 2 A, B). We hypothesize that those factors could contribute to the differentiation of iPSCs. However, most iPSCs are subject to cell death by PEDF in RPE-conditioned medium (Fig. 2B, C). Thus, the differentiation of the remaining iPSCs induced by these factors, if any, might well be masked.

To directly address the effects of PEDF on the growth of iPSC, we used recombinant PEDF protein (rPEDF, Millipore). The biological activity of procured rPEDF was titrated with human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), as PEDF reportedly has anti-angiogenic function¹². Indeed, the conditioned medium from RPE showed a cell growth inhibitory effect on HUVEC (Supplementary Fig. 3A). Thus, we examined several doses of rPEDF (Supplementary Fig. 3B) for its growth inhibitory effect on HUVEC. We found that 50 µg/mL PEDF possessed a biological effect on HUVEC comparable to that of 1/4 volume of conditioned medium mixed with HUVEC medium (M-200 supplemented with LSGS). There was no cell growth inhibitory effect under 50 µg/mL of rPEDF. Therefore, we used 50 µg/mL of rPEDF for further examination of the effect of rPEDF. At 50 µg/mL rPEDF, we observed increased apoptosis in HUVECs (Supplementary Fig. 3C), as well as a growth inhibitory effect (Supplementary Fig. 3D). To rule out the possibility that the high dose of recombinant protein contained various non-specific factors that might have non-specifically induced cell death, neuroblastoma SK-N-BE (2) and primary RPE cells were cultured with 50 µg/mL of rPEDF. We found that 50 µg/mL rPEDF did not change either the morphology or reduce the number of neuroblastoma cells (Supplementary Fig. 3E) or primary RPE (Supplementary Fig. 3F).

One plausible explanation for the marked gap in dosage between the amount of PEDF in the conditioned medium and the biologically relevant dose of rPEDF would be low biological activity of rPEDF due to altered post-transcriptional modification of PEDF when it is produced in Baby Hamster Kidney cells. Fifty µg/mL rPEDF inhibited cell growth of iPSC (Fig. 4A,B) and induced apoptotic cell death as evidenced by TUNEL assay (Fig. 4C,D). It is interesting to note that 50 µg/mL of rPEDF also induced apoptotic cell death in human ES cells (khES01) (Supplementary Fig. 4). The morphology of the remaining iPSCs after rPEDF addition was the same as untreated iPSC (Fig. 4A). Moreover, reductions in the messages of pluripotency related-genes *LIN28A*, *POU5F1*, and *NANOG* in the remaining cells were not observed (Fig. 4E). The cell number counted by scoring DAPI-positive cells after rPEDF treatment was not constant. That may account for the up-regulation of message of pluripotency related-genes after addition of rPEDF.

We next explored the PEDF-mediated signal pathway leading to apoptosis in iPSCs. Western blotting detected phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cleaved caspase-3 after rPEDF stimulation of iPSC (Fig. 4F,G). Taken together, it is conceivable that PEDF induced the apoptotic death of iPSC, but did not induce differentiation of iPSC.

RPE cell sheet suppressed tumor formation potential of iPSC when co-transplanted *in vivo*. We plan to transplant a cell sheet of RPE to the retinas of patients who suffer from aged macular degeneration. Specifically, we will use one to two RPE cell sheets (1.3 mm × 3 mm), consisting of approximately $2 - 5 \times 10^4$ RPE cells. The RPE sheet is prepared on a collagen gel [Kamao H, et al. manuscript submitted]. The possibility of tumor formation from residual undifferentiated iPSCs or incompletely differentiated cells in an iPSC-derived product after transplant remains an issue. To evaluate the trans-effect of RPE on the remaining iPSCs after transplant to the retina, we set up a series of iPSC “spike tests” in the presence of RPE sheets using immunosuppressed animals. We tested the tumor formation potential in several immunosuppressed animals by injecting several doses of iPSCs either subcutaneously or in the retina. Recipient animals included rat (nude rat: F344/N)cl-rnu/rnu) and mouse (Nude: BALB/cA, JCl-nu/nu; SCID: C.B-17/1cr-scid/scid, Jcl; NOD-SCID: NOD/ShiJic-scid, Jcl; NOG: NOD/ShiJic-scid, IL-2Rγ KO Jic). We found the NOG mouse was the most sensitive animal in terms of tumor formation from iPSCs and HeLa cells when injected subcutaneously with Matrigel (BD), in agreement with a previous report¹³. Then, 10^2 , 10^3 , or 10^4 iPSCs (clone 253G1 or 454E2) were co-transplanted into NOG mice subcutaneously without or with iPSC clone 253G1 or a 454E2 derived-RPE sheet consisting of approximately 2.5×10^5 RPE cells. The mice were monitored for tumor development at the site of injection for 30 weeks. Three-way ANOVA (factors: dose of iPSCs, clone of iPSCs, presence of RPE cell sheet) and the post-hoc Student-Neuman-Keuls test for latency of tumor formation indicated that tumors appeared significantly earlier in the groups inoculated with 10^3 or 10^4 iPSCs, compared with that inoculated with 10^2 iPSCs (Fig. 5, $P < 0.001$). More importantly, the statistical analysis indicated a significant difference between the groups with and without RPE sheet ($P < 0.01$), whereas there was no difference between the iPSC clones.

Discussion

In this report, we demonstrated that both primary and iPSC-derived RPE secreted PEDF that induced apoptosis in iPSC.

To elucidate the mechanism by which the tumor (teratoma) forming capacity of iPSCs was suppressed when the RPE cell sheet was co-transplanted, additional studies are required. It is possible that nonspecific effects of the transplanted RPE sheet could compete with the tumor for endogenous growth substrates. Alternatively, it might induce the host immune system to attack co-transplanted cells or reduce the size of the tumor through an anti-angiogenic effect of PEDF as reported^{16,17}. However, we have some suggestive data pertinent to this issue. Effect of PEDF on cell growth *in vitro* varies depending on cell type. Indeed, reduction of HeLa cell number was not drastic compared with that of iPSC cell number after the RPE conditioned medium treatment (Supplementary Fig. 5A). In this context, HeLa cells formed tumors when as few as one hundred cells were injected into the retinas of nude rats ($TPD_{50} = 32$). In contrast, injection of as many as one thousand hiPSCs into nude rat retinas did not generate teratomas ($TPD_{50} = 31623$) (Supplementary Fig. 5B). These experiments suggested that a non-autonomous effect of RPE *in vivo*, if any, is cell-type specific, and that RPE selectively suppress the growth of iPSCs when iPSCs are transplanted in RPE or co-transplanted with RPE.

Considering the fact that we plan to transplant $4 - 8 \times 10^4$ iPSC-derived RPE cells in a clinical setting and have developed a highly sensitive iPSCs detection system using qRT-PCR³ (theoretically capable of detecting iPSCs in RPE cells when iPSCs constitute only 0.01% of the total cell product), the chances of a tumor formation from the undetectably low number of residual iPSCs in iPSC-derived RPE cell sheet following the transplantation should be extremely low in the presence of PEDF secreted from RPE.

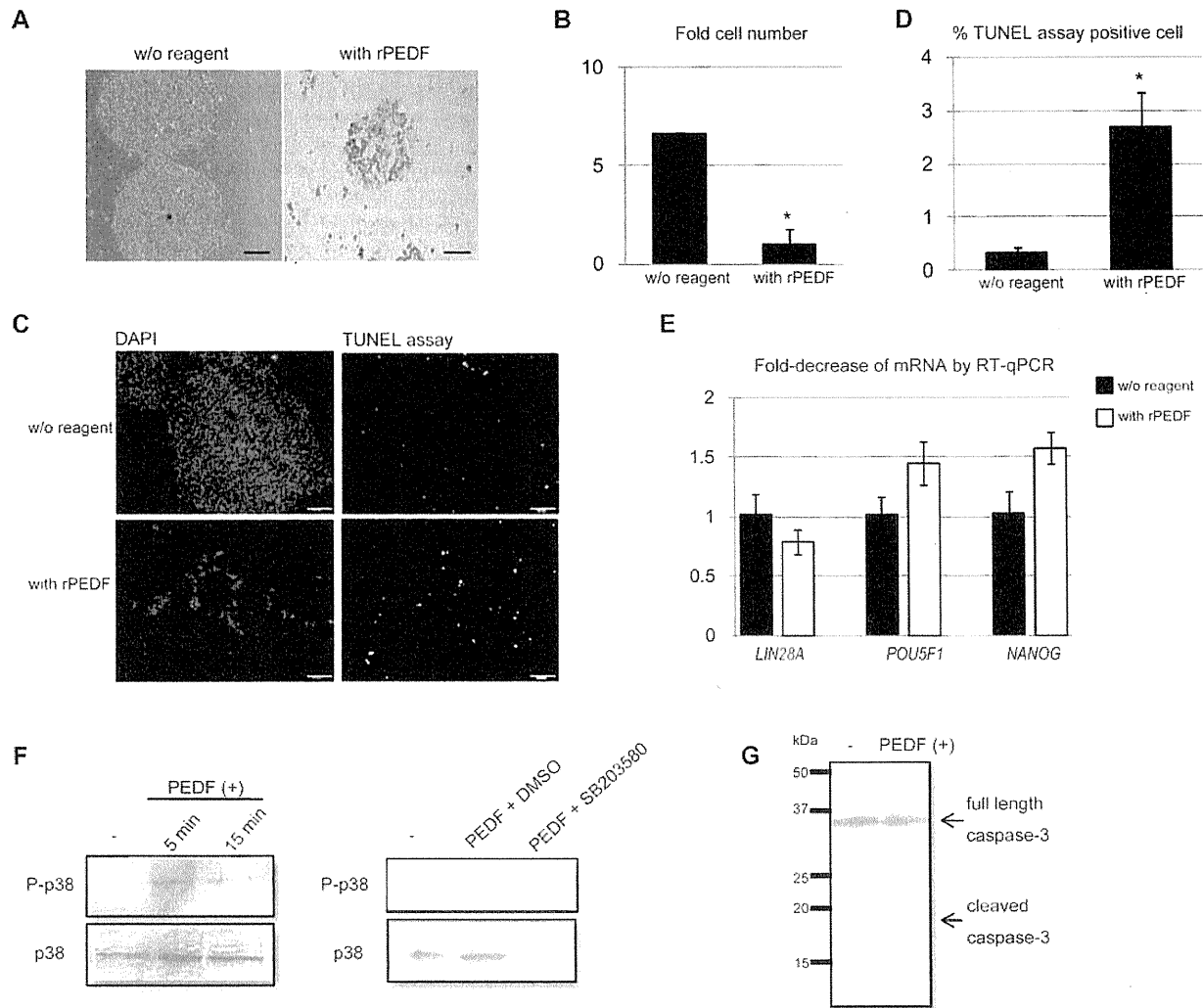


Figure 4 | Recombinant PEDF (rPEDF) induced apoptotic death in iPSCs. (A) Phase-contrast images of iPSC clone 253G1 without or with rPEDF (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) after four days of culture. Scale bar = 200 μm . (B) Fold-change in the number of 253G1 cells cultured with rPEDF (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) after four days of culture, compared with the number of 253G1 cells cultured without rPEDF. Mean results of three independent experiments (with SD). *, $P < 0.05$, compared as indicated. (C) Apoptotic death of 253G1 cells was examined by the TUNEL assay and visualized as white spots (right) after four days of culture. Nuclear staining with DAPI is shown on the left. Scale bar = 200 μm . (D) Ratio of TUNEL positive cells to DAPI positive cells, as a percentage, when cultured with or without recombinant PEDF. Mean results of three independent experiments (with SD). *, $P < 0.05$, compared as indicated. (E) mRNA levels of *LIN28A*, *POU5F1* and *NANOG* in 253G1 cells after four days of culture without or with rPEDF (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were measured by qRT-PCR. *GAPDH* was used as an internal control to normalize mRNA expression levels. Fold-decrease or increase of respective mRNAs in iPSC. Mean results of three independent experiments (with SD). (F) Left panels: phosphorylated p38 MAPK (P-p38) or p38 MAPK (p38) after six hr serum starvation of iPSCs (-), and five min (5 min) or 15 min (15 min) after addition of PEDF (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [PEDF (+)]. Proteins were detected by Western blotting with specific antibody. p38 was used as an internal control. Right panels: phosphorylated p38 MAPK (P-p38) in serum starved iPSCs (-), 10 min after addition of PEDF (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the absence (PEDF + DMSO) or presence of p38 inhibitor SB203580 (PEDF + SB203580). Proteins were detected by Western blotting. (G) Cleaved Caspase-3 after six hr serum starvation of iPSCs [-], or ten min after addition of PEDF (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [PEDF(+)] was detected by Western blotting with specific antibody.

PEDF is a 50 kDa secreted protein that is also known as serpin F1^{14,15}. PEDF is reported to possess various biological functions including inhibition of endothelial proliferation^{9,11} and angiogenesis^{16,17}, as well as neurophilic functions^{18,19,20} and induction of apoptosis^{21,22}, after binding to its receptor²³. PEDF enhances gamma secretase activities leading to cleavage of VEGF receptor-1²⁴ and VEGF receptor-2²⁵, and induces an anti-angiogenic protein, thrombospondin²⁶. With regard to angiogenesis and endothelial cell proliferation, RPE secretes both counter-acting PEDF and VEGF. RPE, however, maintains the microenvironment and the structure of the retina by secreting these factors into a different side of the retinal

membrane. These facts necessitate RPE sheet transplantation in the proper orientation rather than as single RPE cells to ensure the function of retina. PEDF is reported to promote the differentiation of primitive retinal cells²⁷ and retinoblastoma cells¹⁹, but the effect of PEDF on iPSC seems to be limited to induction of apoptotic cell death, not neural differentiation of iPSC.

PEDF reportedly stimulates several signal pathways including activation of Ras, NF- κB ¹⁸, FAS/FASL¹², PPAR-gamma, and the p53-mediated pathway²¹. The p38 MAPK-mediated cleavage of caspases is also reported in endothelial cells²². In this study, we showed the activation of p38 and cleavage of caspase-3 after

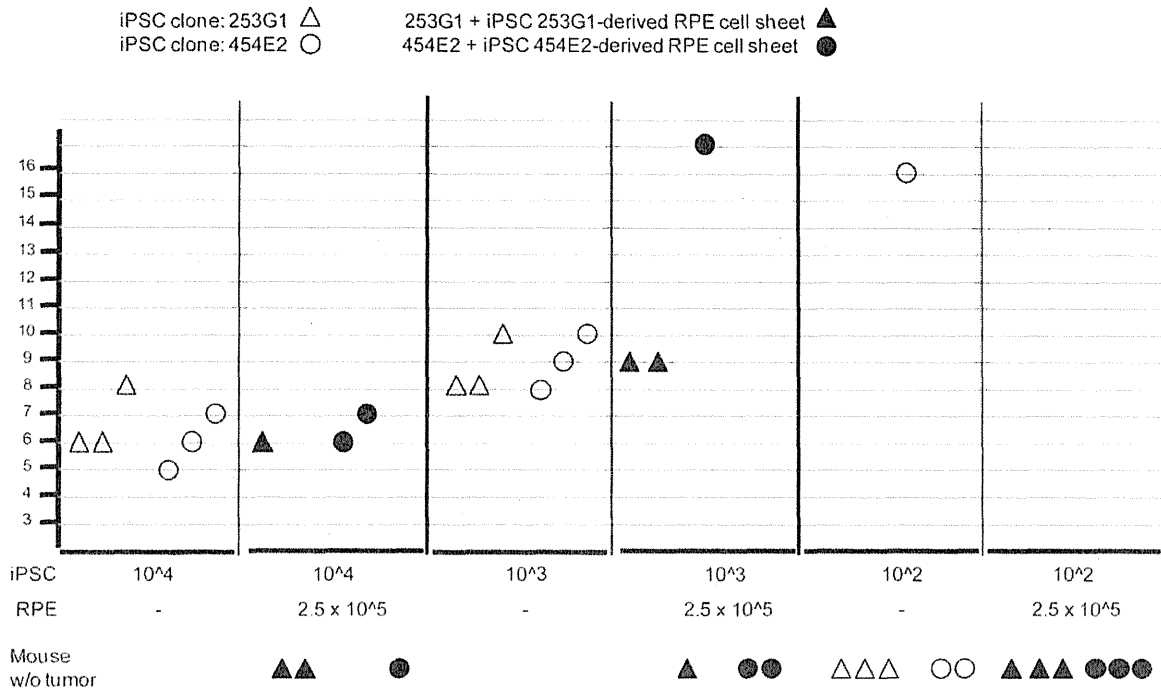


Figure 5 | iPSC clones 253G1 or 454E2 (10^2 , 10^3 and 10^4 cells) were subcutaneously transplanted to NOG mice (three per group) without or with a 253G1-derived RPE sheet or a 454E2-derived RPE sheet, respectively. The sheets consisted of (approximately) 2.5×10^5 RPE cells. The Y-axis shows the week when the tumors were first detected in each case. The number of iPSC cells and iPSC-derived RPE are shown on the X-axis. The numbers of mice without tumor formation are shown as symbols below the X-axis.

rPEDF stimulation in iPSC (Fig. 4F). Therefore, it is conceivable that p38 MAPK-dependent cleavage of multiple caspases could lead to apoptosis in iPSC after PEDF stimulation. Recently, it was reported that PEDF activated ERK1/2 and maintained growth of hESC²⁸. They used 100 ng/mL rPEDF to show activation of ERK1/2 in serum-starved hESC, and ERK1/2 inhibitor PD98059 inhibited growth of hESC. Based on these experiments, they concluded that PEDF maintained cell growth of hESC via ERK1/2 activation. ERK1/2, key signal molecules, activate multiple signals leading to various biological responses. Blocking ERK1/2 activities will inevitably suppress multiple critical cellular responses and not necessarily address a PEDF specific-signal event. In our experiments, we did not observe a biological process resulting from rPEDF stimulation below 50 μ g/mL (Supplementary Fig. 3B). Thus, we believe 100 ng/mL rPEDF might be enough to initiate ERK1/2 signaling, but not enough to initiate cellular events in hiPSC or hESC.

In summary, we showed a novel effect of PEDF on the survival of remaining iPSCs in iPSC-derived RPE and suggest further application of PEDF in pluripotent stem cell-based cell therapy in the future.

Methods

All the experiments using human samples and animal studies were approved by the IRB of the Foundation for Biomedical Research and Innovation (FBRI) and Riken Center for Developmental Biology (Riken CDB), and the committee for animal experiments of the FBRI.

Cell culture. Human primary retinal pigment epithelium (RPE, Lonza) was maintained in Retinal Pigment Epithelial Cell Basal Medium (Lonza Biologics, Basel, Switzerland) containing supplements (L-glutamine, GA-1000, and bFGF; Lonza). Human iPSC cell (iPSC) lines 253G1⁵ [Riken Bio Resource Center (Tsukuba, Japan)] and 454E2⁶ were maintained on feeder cell SNL⁷ in human ES cell culture medium and 5 ng/mL bFGF (Peprotech). iPSCs were cultured in ReproFF2 (ReproCELL) supplemented with 5 ng/mL bFGF medium. iPSC-derived RPE^{3,8} was maintained in RPE maintenance medium [DMEM:F12 (7:3) (Sigma-Aldrich) containing B-27 supplement (Invitrogen), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 0.5 mM SB431542 (Sigma-Aldrich) and 10 ng/mL bFGF (Wako)]. HUVECs (BDTM) were maintained

in M-200 supplemented with LSGS and neuroblastoma cells (SK-N-BE (2), ATCC) were cultured in DMEM containing 10% FBS.

Cell growth of iPSCs, HUVECs and neuroblastoma cells in the absence or presence of recombinant PEDF or anti-PEDF antibody. 253G1 cells were seeded in Matrigel (BD Bioscience)-coated 12-well Transwell cell culture inserts with an 8 μ m pore size (BD). They were co-cultured with primary RPE or 253G1 derived-RPE seeded on the bottom of dishes in ReproFF2 medium supplemented with bFGF in the absence or presence of one to 50 μ g/mL rPEDF (Millipore, cat # GF134 lot: DAM 1821182) or 5 μ g/mL polyclonal anti-PEDF blocking antibody (cat # AB-PEDF1, BioProducts MD)^{29,30,31,32} or 5 μ g/mL non-functional control rabbit IgG (Santa Cruz). Cell growth of 253G1, HUVEC, neuroblastoma and primary RPE in the absence and presence of 50 μ g/mL rPEDF was evaluated after four to 6 days of culture (without co-culture).

Chip analysis. Total RNA from 253G1 or 253G1-derived RPE was isolated with a RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instruction and hybridized with Gene Chip Human Genome U133 Plus ver. 2.0 (Affymetrix). Hybridized microarray data were scanned with a GeneChip Scanner 3000 7 G. Analyzed data can be retrieved from the GEO <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>. Our GEO data set number is GSE43257.

ELISA. Levels of PEDF, VEGF or BMP4 in primary RPE or iPSC (253G1)-derived RPE culture medium (conditioned medium) collected after 24 h of culture were determined with human ELISA kits (PEDF, BioVendor; VEGF, eBioscience; BMP4, RayBiotech) in accordance with the manufacturers' instructions.

qRT-PCR. Total RNA was isolated with the RNeasy plus Mini Kit (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instructions. Contaminating genomic DNA was removed using a gDNA Eliminator spin column. cDNA was generated from one μ g of total RNA using PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio) and PrimeSTAR MAX DNA Polymerase (TaKaRa Bio). Real-time PCR was then performed with an ABI 7000 Sequence Detection System (Applied-Biosystems) and SYBR-green in accordance with the manufacturer's instruction. The primers designed for real-time PCR were as follows: for *LIN28A*, forward primer, 5'-CTGTCCAAATGCAA GTGAGG-3', reverse primer, 5'-GCAGGTTGTAGGGTATTCC-3'; for *POU5F1*, forward primer, 5'-GAAGGTATTCAGCCAAACGAC-3', reverse primer, 5'-GTT ACAGAACCACACTCGGA-3'; for *NANOG*, forward primer, 5'-CTCAGCTACA AACAGGTGAAGAC-3', reverse primer, 5'-TCCTGTGGTATGGAAGAG TAAA-3'; for *RPE65*, forward primer, 5'-ATGGACTTGGCTTGAATCACTT-3', reverse primer, 5'-GAACAGTCCATGAAAGGTGACA-3'; for *BEST1*, forward primer, 5'-ATCAGAGGCCAGGCTACTACAG-3', reverse primer, 5'-TCCACAG TTTTCCTCCTCACTT-3'; for *RLPB1*, forward primer, 5'-GACTGGG

TTAAATCTCACAGC-3', reverse primer, 5'-TGACATGTTGCCTATGGAAGAC-3'; for GAPDH, forward primer, 5'-CGATGCTGGCGCTGAGTAC-3', reverse primer, 5'-CCACCCTGACACGTTGGC3'. Respective gene expression levels were normalized to that of GAPDH.

TUNEL staining and Immunohistochemistry. Apoptotic cells were detected with the *In situ* Cell Death detection kit (fluorescein, Roche Diagnostics) in accordance with the manufacturer's instructions. The percentage of TUNEL-positive cells was calculated by scoring TUNEL-positive cells divided by total DAPI-positive cells in three non-overlapping areas (two mm² per well).

For immunohistochemical staining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde followed by staining with antibodies against Oct3/4 (POU5F1) (1 : 100 dilution; sc-5279; Santa Cruz), or ZO-1 (1 : 200 dilution; Invitrogen). Antibodies were visualized with Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (1 : 1,000; Invitrogen) or Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1 : 1,000; Invitrogen). Fluorescent microscopic images were captured with a fluorescent microscope (Olympus BX51, IX71; Tokyo, Japan).

Western blotting. Cell culture supernatants (conditioned media) or recombinant protein samples were loaded onto a 5 – 20% gradient SDS-polyacrylamide gel, subjected to electrophoresis under reducing conditions and blotted onto a PVDF membrane (BioRad). Blots were blocked with a solution of 3% nonfat dry milk/PBS/0.1% Tween-20 at room temperature, rinsed twice with PBS/0.1% Tween-20 and incubated with 1 : 200 diluted polyclonal anti-PEDF antibody (BioProducts MD), followed by 1 : 5000 diluted anti-rabbit IgG-HRP (Amersham). Detection of actin by anti-actin antibody (Santa Cruz 1-19) was used as a loading control. Membranes were rinsed three times in PBS/0.1% Tween-20. Signals were detected with horseradish peroxidase using an ECL kit (Promega). Cell lysates were made from iPSCs that were serum-starved for six h (–) or five min or 15 min after addition of PEDF in the absence or presence of p38 MAPK inhibitor SB203580 (Cell Signaling). Lysates were blotted onto PVDF membranes, and anti-phospho-p38 antibody (Cell Signaling), anti-p38 antibody (Cell Signaling) or anti-caspase 3 antibody (Cell Signaling) was used to detect the respective molecules.

1. Lu, B. *et al.* Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cell*. **27**, 2126–2135 (2009).
2. Schwartz, S. D. *et al.* Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*. **379**, 713–720 (2012).
3. Kuroda, T. *et al.* Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPSC cells. *PLoS One*. **7**, e37342 (2012).
4. An, E. *et al.* Secreted proteome profiling in human RPE cell cultures derived from donors with age related macular degeneration and age matched healthy donors. *J. Proteome Res.* **5**, 2599–2610 (2006).
5. Nakagawa, M. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* **26**, 101–106 (2008).
6. Kajiwara, M. *et al.* Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**, 12538–12543 (2012).
7. Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. **448**, 313–317 (2007).
8. Osakada, F. *et al.* In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *J. Cell. Sci.* **122**, 3169–3179 (2009).
9. Mori, K. *et al.* Pigment epithelium-derived factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. *J. Cell. Physiol.* **188**, 253–263 (2001).
10. Kiyono, M. & Shibuya, M. Bone morphogenetic protein 4 mediates apoptosis of capillary endothelial cells during rat pupillary membrane regression. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4627–4636 (2003).
11. Duh, E. J. *et al.* Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 821–829 (2002).
12. Volpert, O. V. *et al.* Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat. Med.* **8**, 349–357 (2002).
13. Machida, K. *et al.* Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors. *J. Toxicol. Sci.* **34**, 123–127 (2009).
14. Filleur, S., Nelius, T., de Riese, W. & Kennedy, R. C. Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein. *J. Cell. Biochem.* **106**, 769–775 (2009).
15. Steele, F. R., Chader, G. J., Johnson, L. V. & Tombran-Tink, J. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 1526–1530 (1993).
16. Amaral, J. & Becerra, S. P. Effects of human recombinant PEDF protein and PEDF-derived peptide 34-mer on choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 1318–1326 (2010).

17. Dawson, D. W. *et al.* Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*. **285**, 245–248 (1999).
18. Tombran-Tink, J. & Barnstable, C. J. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 628–636 (2003).
19. Tombran-Tink, J., Chader, G. G. & Johnson, L. V. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp. Eye Res.* **53**, 411–414 (1991).
20. Karakousis, P. C. *et al.* Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Mol. Vis.* **7**, 154–163 (2001).
21. Ho, T. C. *et al.* PEDF induces p53-mediated apoptosis through PPAR gamma signaling in human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* **76**, 213–223 (2007).
22. Chen, L., Zhang, S. S., Barnstable, C. J. & Tombran-Tink, J. PEDF induces apoptosis in human endothelial cells by activating p38 MAP kinase dependent cleavage of multiple caspases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**, 1288–1295 (2006).
23. Notari, L. *et al.* Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J. Biol. Chem.* **281**, 38022–38037 (2006).
24. Cai, J., Jiang, W. G., Grant, M. B. & Boulton, M. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J. Biol. Chem.* **281**, 3604–3613 (2006).
25. Zhang, S. X., Wang, J. J., Gao, G., Parke, K. & Ma, J. X. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *J. Mol. Endocrinol.* **37**, 1–12 (2006).
26. Guan, M. *et al.* Inhibition of glioma invasion by overexpression of pigment epithelium-derived factor. *Cancer. Gene. Ther.* **11**, 325–332 (2004).
27. Funatsu, H. *et al.* Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology*. **113**, 294–301 (2006).
28. Gonzalez, R. *et al.* Screening the mammalian extracellular proteome for regulators of embryonic human stem cell pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 3552–3557 (2010).
29. Amaral, J. & Becerra, S. P. Effects of human recombinant PEDF protein and PEDF-derived peptide 34-mer on choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 1318–1326 (2010).
30. Ablonczy, Z. *et al.* Human retinal pigment epithelium cells as functional models for the RPE in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 8614–8620 (2011).
31. Lydia, W. T. *et al.* Pigment epithelium-derived factor is estrogen sensitive and inhibits the growth of human ovarian cancer and ovarian surface epithelial cells. *Endocrinology*. **147**, 4179–4191 (2006).
32. Matsuoka, M. *et al.* Expression of pigment epithelium derived factor and vascular endothelial growth factor in choroidal neovascular membranes and polypoidal choroidal vasculopathy. *Br J Ophthalmol.* **88**, 809–815 (2004).

Acknowledgments

We thank Shin-Ichi Nishikawa for scientific discussion, Masayuki Shikamura for the animal work and statistical analysis of the results, Kentaro Matsushima for the protein work and Riken BRC for supplying iPSC clone 253G1. This study was supported by JST research grant "Safety Tests for Pluripotent Stem Cell (2010-2014)" Japan.

Author contributions

H. Kanemura conducted all of the biological assays and prepared the manuscript; M.G. designed the research; N.N. analyzed the gene chip data; N.S. supplied the iPSC and iPSC-derived RPE; H. Kamao supplied the RPE sheets; Y.S. performed the statistical analysis of transplantation experiments; M.T. performed the QC for the RPE sheets and interpreted the *in vivo* experiments; S.K. supervised all the experimental results and edited the manuscript.

Additional information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/scientificreports>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Kanemura, H. *et al.* Pigment Epithelium-Derived Factor Secreted from Retinal Pigment Epithelium Facilitates Apoptotic Cell Death of iPSC. *Sci. Rep.* **3**, 2334; DOI:10.1038/srep02334 (2013).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported license. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>

再生医療製品の 造腫瘍性・悪性腫瘍形成能の評価

五十嵐友香／いがらしゆか

佐藤陽治／さとうようじ

国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部

再生医療または細胞治療に用いる目的で、ヒト体細胞、体性幹細胞、ES細胞、iPS細胞などに培養などの加工を施して製造・調製されるものは再生医療製品(または細胞・組織加工製品)とよばれている。再生医療製品のリスクのひとつとして“造腫瘍性”があげられる。一般的には“造腫瘍性のリスク”と一口にいわれることが多いが、安全性上の視点から大きく2つ、すなわち“腫瘍による物理的障害のリスク”と“悪性腫瘍形成のリスク”に分けられる。“腫瘍による物理的障害”とは腫瘍形成により周辺組織が圧迫などを受けることによる障害で、関節再生・脊髄再生などのケースで問題となる。この場合はたとえ良性であっても腫瘍自体がリスクファクターとなる。一方、“悪性腫瘍形成”は腫瘍の悪性度がリスクファクターとなる。

ヒト体細胞・体性幹細胞由来製品

移植医療の現場では細胞・組織の造腫瘍性の評価がほとんど行われていない。つまり、再生医療製品の原材料となるような未加工のヒト体細胞・体性幹細胞には一般的に造腫瘍性がないと考えられていることになる。また、世界各地でヒト体細胞・体性幹細胞に由来する再生医療製品の臨床応用が進んでいるが、これらの製品の投与を原因とする腫瘍形成の学術論文としての報告は、ヒト胎児由来神経幹細胞を用いた毛細血管拡張性運動失調症の治療により脳腫瘍が形成されたとするもの1件しかない¹⁾。成人由来の体細胞または体性幹細胞を原材料とした再生医療製品に限れば、患者への投与による腫瘍形成の報告は著者らの知るところでは存在しない。

過去にヒト間葉系幹細胞の*in vitro*培養時の自発的な悪性形質転換が4件報告されているが、このうち2件^{2,3)}は癌細胞株のクロスコンタミネー

ションによるものであることが後に判明している。また、残りの2件^{4,5)}では*in vitro*培養時に細胞の不死化が確認されている。これらのことは、最終製品への悪性腫瘍細胞のクロスコンタミネーション防止および細胞増殖特性の把握が重要であることを示している。したがって、十分な工程管理の下に培養・加工され、細胞増殖特性解析で異常がないことを確認した成人体細胞・体性幹細胞由来の再生医療製品については、非臨床安全性試験として免疫不全マウスを用いた造腫瘍性試験を行う必要性はあまり高くないと考えられる。

ヒトES/iPS細胞由来製品

ヒトES細胞またはiPS細胞に由来する再生医療製品には未分化ES/iPS細胞の残留の可能性がある。したがって、残存未分化ES/iPS細胞に起因する奇形腫形成能(造腫瘍性)の評価・管理が重要となる。ヒトES/iPS細胞が増殖分化して形成する奇形腫は多くの場合、良性であり、正常二倍体のヒトES細胞を免疫不全マウスに移植して悪性腫瘍が発生したという報告はない。一方、ヒト由来iPS細胞に関しては免疫不全マウスに投与した場合に悪性腫瘍が形成されたという報告が存在する⁶⁾。また、iPS細胞樹立時の細胞初期化過程は悪性形質転換の研究で従来用いられてきた発癌フォーカス形成試験(*in vitro*での遺伝子導入による悪性肉腫形成試験)との間での類似性が指摘され、共通の機序の存在が提唱されている⁷⁾。

ヒトiPS細胞由来の再生医療製品のなかに残存する未分化iPS細胞の造腫瘍性にはさまざまな要素、すなわち目的細胞への分化の難しさ、ヒトiPS細胞の原材料となる体細胞の種類、ヒトiPS細胞中における初期化因子残存の有無⁶⁾など、ヒトiPS細胞に付随する要因と、投与部位、投与細胞数、マトリゲルなどの共投与物の有無といった外部要因とが影響する。再生医療製品の原材料としてのヒトiPS細胞に内在する奇形腫悪性化にかかわる因子・機序の詳細は明らかではなく、悪性腫瘍を形成しやすい細胞株の判定方法および使用防止策を明らかにすることは今後の課題である。ただし、ヒトES/iPS細胞由来製品の造腫瘍性を評価するうえでは“原材料となる幹細胞の造腫瘍

性と最終製品の造腫瘍性との相関・因果関係は未解明である”という点に最大の注意が必要である。すなわち、臨床適用に際しては原材料となるヒトES/iPS細胞ではなくあくまで最終製品としてのヒトES/iPS細胞由来製品の造腫瘍性評価がもっとも重要であることにつねに留意しなければならない。

新技術による造腫瘍性評価の可能性

最近、ヒトiPS細胞由来の再生医療製品および原材料としてのヒトiPS細胞の造腫瘍性・悪性腫瘍形成能の評価に先端的分析技術である次世代シーケンサーを利用できないかという議論がある。ただし、原材料のiPS細胞またはiPS細胞由来製品に含まれる細胞の遺伝子変異による造腫瘍性の変化の評価を目的として全ゲノムシーケンス解析や全エクソンシーケンス解析を行うことは、現実的にはあまり用をなさない。その理由は再生医療製品の安全性との因果関係が明瞭な遺伝子変異の具体例は非常に乏しく、個々の製品の安全性の指標としての各変異の有用性がいまのところまだほとんど明らかでないからである。あえて行うのならばむしろ、発癌リスクと非常に高い相関があることが既知である少数の遺伝子変異について何らかの高精度・高感度な方法で解析し、わずかな変異の出現を検出する努力をする方が有用と考えられる。再生医療製品の開発における次世代シーケンサーの用途としてはほかに、縦列型反復配列(short tandem repeat: STR)解析などの代替として原材料iPS細胞の同一性評価を目的とした利用や、比較ゲノムハイブリダイゼーション(comparative genomic hybridization: CGH)解析などの代替として細胞のゲノム不安定性の評価を目的とした利用も考えられるが、その際には各目的に応じた試験系の性能と限界についての科学的

検討が事前に必要である。

新しい技術が開発されても、それがただちに製品の安全性評価に適用できるとは限らない。すなわち、その技術による試験の結果を受け、製品開発、製造および臨床の場において具体的にどういふ判断が可能なのか明らかでなければ安全対策としての試験の意味をなさないということに注意しなければならない。要するに、すくなくとも現段階では細胞の造腫瘍性の変化、不死化、悪性形質転換を評価するには、たとえば*in vivo*造腫瘍性試験、軟寒天コロニー形成試験、*in vitro*細胞増殖速度評価など、直接的に細胞増殖特性を評価する試験の実施を考えることが先決であることには変わりないということである。

文献

- 1) Amariglio, N. et al.: Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med.*, **6**: e1000029, 2009.
- 2) Rubio, D. et al.: Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.*, **65**: 3035-3039, 2005.
- 3) Røslund, G. V. et al.: Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res.*, **69**: 5331-5339, 2009.
- 4) Wang, Y. et al.: Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy*, **7**: 509-519, 2005.
- 5) Tang, D. Q. et al.: *In vitro* generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation. *Am. J. Stem Cells*, **1**: 114-127, 2012.
- 6) Griscelli, F. et al.: Malignant germ cell-like tumors, expressing Ki-1 antigen (CD30), are revealed during *in vivo* differentiation of partially reprogrammed human-induced pluripotent stem cells. *Am. J. Pathol.*, **180**: 2084-2096, 2012.
- 7) Riggs, J. W. et al.: Induced pluripotency and oncogenic transformation are related processes. *Stem Cells Dev.*, **22**: 37-50, 2013.

* * *

細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究

佐藤陽治[#], 堤秀樹^{*}, 澤田留美, 鈴木孝昌, 安田智

Regulatory science research to facilitate the development of cell/tissue-processed products

Yoji Sato[#], Hideki Tsutsumi^{*}, Rumi Sawada, Takayoshi Suzuki, Satoshi Yasuda

Regenerative medicine is regarded as innovative therapy for severe diseases and damages caused by tissue loss and functional impairment. In Japan, regenerative medicine is one of the most important subjects issued by Council for Science and Technology Policy and also referred to in Medical Innovation of New Growth Strategy. Cell/tissue-processed products are living cells, which have been manipulated or processed for the purpose of regenerative medicine, and are extensively developing. Human somatic cells, somatic stem cells, embryonic stem cells, and induced pluripotent stem cells are cell sources used for regenerative medicine. Since we lack in experiences with cell/tissue-processed products, technical development of safety and quality assessment is urgently needed. National Institute of Health Sciences has carried out a mission of Regulatory Science and worked on safety assessment of pharmaceuticals and medical devices and their guideline development. The objective of our study is to develop safety and quality assessment methods for cell/tissue-processed products derived from stem cells, based on recent progresses in life science. We are currently developing methods to evaluate products as follows; a) useful and quantitative tumorigenicity tests to detect contamination of undifferentiated and/or abnormal cells in products, b) quality assessment by gene expression analysis and detection of genetic stability in a manufacturing process, and c) analysis of quality attributes associated with propensity of undifferentiated cells to set acceptable criteria of cell banks. We will be able to provide indicators to control the quality, efficacy and safety of stem cell-processed products and support efficient and economical promotion of the products. Especially, this study would help translate stem cell science into therapeutic products to patients with severe and life-threatening diseases, consequently contributing to administrative policy of Ministry of Health, Labor and Welfare.

Keywords: cell/tissue-processed products, induced pluripotent stem (iPS) cells, regenerative medicine

研究目的

再生医療は、身体の一部の機能不全や欠損による重篤な疾患や障害を治療できる革新的な方法として注目されており、総合科学技術会議の提言や「新成長戦略」のメディカルイノベーションなどにおいても最重要課題とさ

れている。平成25年1月11日閣議決定の『日本経済再生に向けた緊急経済対策』でも、iPS細胞等を用いた再生医療等に係る研究開発・実用化を支援する環境整備に取り組むことが明記されている。平成25年2月には再生医療等の新規医療産業の国際競争力を高める司令塔機能として、内閣官房に『健康・医療戦略室』が設置された。また、平成25年4月26日成立の『再生医療推進法』には、再生医療の迅速かつ安全な研究開発及び提供並びに普及の促進に関する施策を総合的に策定及び実施する責務を国が有することが示されている。

再生医療（や細胞治療）に使用することを目的に生きた細胞を加工して製造される製品は細胞・組織加工製品と呼ばれ、国内外で活発に研究・開発が行われている。

[#] To whom correspondence should be addressed:

Yoji Sato; Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501; Tel: +81-3-3700-9373; Fax: +81-3-3700-9373; E-mail: yoji@nihs.go.jp

^{*} Testing Services Department, Central Institute for Experimental Animals

細胞ソースとしてはヒト体細胞に加え、近年ではヒト体性幹細胞、胚性幹細胞（ES細胞）などの幹細胞が対象とされてきている。また最近、生命倫理的な問題や免疫学的な拒絶をクリアできると考えられる人工多能性幹細胞（iPS細胞）が登場し、再生医療が社会的に大きな期待を集めている。しかしながら細胞・組織加工製品は、臨床使用経験が少ないために知見の蓄積も乏しく、国内指針やICH、WHOなどの生物製剤製造国際ガイドライン等にある従来の品質・安全性評価法が役立つないケースが頻出しており、新たに適切な評価技術を樹立することが火急の課題となっている。本研究では、新たなガイドライン作成に資する細胞・組織加工製品、特に幹細胞加工製品の品質・安全性評価法の開発を行うことを最終目的とする。具体的には、幹細胞の加工過程における未分化細胞/異常細胞の混入は、幹細胞加工製品においてがん化を引き起こすとして最も懸念される。最終製品に含まれるこれらの細胞の高感度かつ定量的な測定方法は開発が遅れている。そこで、本研究では汎用性・定量性のある幹細胞加工製品の造腫瘍性試験法の開発を目指した実験研究を展開する。また細胞の培養・加工過程での細胞の形質安定性も考慮に入れる必要があることから、培養工程での遺伝子発現の動態解析による品質評価法および遺伝子安定性評価法の開発に関する研究を行う。さらに安全性上の懸念として、ヒト多能性幹細胞株間での各種目的細胞への分化のし易さ（分化プロペンシティ）のバラツキがある。原材料の細胞の分化プロペンシティの情報は細胞株の選択に必要不可欠であり、その評価系は最終製品を見据えた細胞バンクの構築に必要である。未分化細胞において分化プロペンシティの評価系を含んだ細胞特性解析法を確立することにより、幹細胞由来加工製品の品質の一定性・有効性・安全性のさらなる確保に繋がること期待される。

行政への貢献

本研究の成果により幹細胞加工製品の有効性・安全性に関する品質評価に必要な指標・試験法が示され、製品の迅速かつ経済的な開発を推進することが可能になることにより、特に治療困難な重篤な疾患に対して期待の大きい再生医療・細胞治療が実用化され普及することに貢献できる。国民に安全かつ有用性の高い再生医療・細胞治療をいち早く提供するという厚生労働行政の施策に大きく寄与するものと考えられる。具体的には、以下のことが挙げられる。1) 幹細胞加工製品の合理的な製法、工程管理に必要な要件、品質評価方法の確立に貢献できる。2) 均一性・再現性を確保するための原材料（幹細胞株/バンク）のあり方において、より合理的な規格の設定が可能となり、適切な開発が推進される。3) 生命

科学の進歩に見合ったガイドラインや基準の策定及び改訂に役に立つ。4) 幹細胞加工製品の科学的規制に関する国際調和に貢献できる。5) 幹細胞加工製品の先進性、有用性に関する理解が深められる。

研究の進捗状況

平成24年度の研究としては、1. 「汎用性・定量性のある幹細胞加工製品の造腫瘍性試験法の開発を目指した実験研究」として、新規免疫不全動物NOGヘアレスマウスを用いた造腫瘍性試験法の開発にむけた動物コロニーの拡大、および試験方法の条件検討を行った。2. 「培養工程での遺伝子発現の動態解析に基づく品質・安全性評価指標の開発に関する研究」として、幹細胞の*in vitro*培養工程における遺伝子発現の動態解析による品質評価技術の開発を行い、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞のがん化と相関すると予想される遺伝子に関する機能解析を行った。3. 「製造工程における遺伝子安定性評価法の開発に関する研究」として次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析の性能評価を行った。また、4. 「幹細胞（未分化細胞）における分化プロペンシティの評価系の開発に関する研究」として、ヒト多能性幹細胞の分化プロペンシティを予測するための指標の同定の基盤となるデータの収集を行った。

1. 新規免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験法の開発

我々は、重度免疫不全動物であるNOGマウスとヌードマウスにおけるHeLa細胞単独、あるいはマトリゲルとの混合物のTPD₅₀（投与した動物の半数で腫瘍を形成するために必要な細胞数）を検討し、マトリゲルに検体細胞を懸濁してNOGマウスに投与することにより、ヌードマウスを用いた従来の国際ガイドラインにある方法より数千倍高感度で腫瘍細胞を検出することが可能であることを示すデータを得ている。実験動物中央研究所では、このNOGマウスをヘアレス化した系統を樹立しており、NOGマウスと同様の条件において造腫瘍性細胞の検出能力の検討を行った（その際の動物は、体外受精させた胚を仮親に移植して大量生産する手法を用いて作出した80匹以上の同一週齢雄動物を用いた）。雄NOGヘアレスマウスにおけるHeLa細胞のTPD₅₀は、ヌードマウスの1/11 ($3.7 \times 10^4 / 4.2 \times 10^5$)、マトリゲルを混合した場合は1/2000 ($2.1 \times 10^2 / 4.2 \times 10^5$)であり、NOGマウスにおけるそれらよりも高値であった。これは、導入したヘアレス遺伝子がBalb/cマウス由来であり、免疫不全度が僅かながら低下したことによると推測された。NOGヘアレスマウスはNOGマウスと比較し、目視・触診による腫瘍形成の検出が容易であり、造腫瘍性試験の効率化が期待される。

2. 幹細胞の*in vitro*培養工程における遺伝子発現の動態解析による品質評価技術の開発

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) の*in vitro*培養時の遺伝子発現変化を網羅的に解析し, Ewing肉腫4種類 (Hs822.T, Hs863.T, RD-ES, SK-ES-1) を陽性対照として比較検討することにより, 細胞のがん化の指標となり得る候補遺伝子として, これまでにCyclin D2, IGF2BP1など9遺伝子を見出している. ...

ークエンスおよびエクソンシーケンスから得られるデータの品質評価および遺伝子変異検出の効率に関して, モデル細胞を用いた実データから検討を行った. ...

4. 分化プロペンシティを指標とした細胞特性解析法の開発

無フィーダー培養した未分化状態のヒトiPS細胞9株において網羅的なmRNA発現情報をジーンチップにより取得した. ...

3. 次世代シーケンサーを用いた細胞の遺伝的安定性評価指標の開発

細胞の遺伝的安定性評価を目的としたホールゲノムシ

研究の将来展望

これらの成果を更に展開することにより細胞・組織加

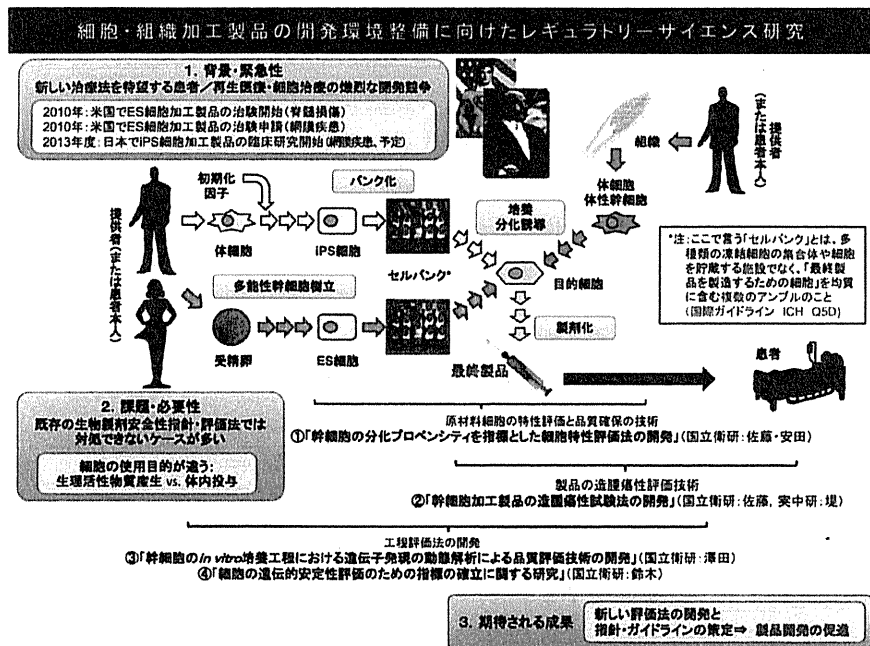


図 研究の背景・緊急性, 課題・必要性および期待される成果

工製品の有効性・安全性に関する品質評価に必要な指標・評価法が示され、迅速で適切な製品開発・審査および再生医療の実用化推進に貢献できると考えられる。

謝辞：本研究の成果は、厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究」（H24-医薬-指定-027）によるものである。

タンパク質・内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化に向けて

斎藤嘉朗[#], 前川京子, 齊藤公亮, 佐藤陽治, 鈴木孝昌

Toward acceleration of drug development with proteomic and metabolomic biomarkers

Yoshiro Saito[#], Keiko Maekawa, Kosuke Saito, Yoji Sato, Takayoshi Suzuki

Biomarkers, reflecting disease states or predicting/assessing drug efficacy or adverse reactions, are expected to play pivotal roles in effective drug development and promoting proper usage of drugs. To accelerate biomarker identification and usage, administrative guidance can direct to design appropriate exploration, validation and utilization studies and show examination procedures. However, very limited number of guidance or its draft were released from Japanese, US and European regulatory authorities so far. From 2012, we have been conducting proteomic and metabolomic studies using blood and urine samples from human and rat, in order to establish draft guidance for sampling/storage of these biofluid and for extrapolation of biomarker candidates from animals in the non-clinical to humans in the clinical studies. The results are still partial and the rest of the analysis is ongoing. However, we developed sensitive proteomic system for urine and found large inter-sex differences in the proteomic profiles of rat. In addition, matrix-, sex- and generation-differences were also observed in the metabolite levels in human blood, some of which showed over 2-fold differences. We continue this regulatory science studies for contribution to accelerated novel biomarker findings and its usage by generation of the draft guidance.

Keywords: Biomarker, Biofluid, Drug development, Metabolomics, Proteomics

はじめに

バイオマーカーは、「客観的に測定され、評価される特性値であり、正常な生物学的プロセス、病理学的プロセス、または治療的処置に対する薬理学的反応の指標」と米国のバイオマーカー定義ワーキンググループにて定義されている¹⁾。臨床的な最終評価指標を、早期に、簡便に、かつ頑健に反映するサロゲート（代替え）マーカーとしての利用が医薬品開発において始まっている。疾患の状態や医薬品の有効性確保および安全性向上のための指標となり、医薬品開発が効率化されるため、バイオマーカーを利用した世界の臨床試験年間登録数は急増している²⁾。さらに医薬品の市販後においても、各患者における有効性を最大限に確保し、副作用を最小限に抑え

るために、その利用が期待されている。重篤な副作用は死亡や重い後遺症につながることもあり、バイオマーカーの診断費用を含めても医療経済学的に有用との研究結果もある³⁾。

バイオマーカー自体は、新しい概念ではなく、例えば肝障害におけるアラニンアミノトランフェラーゼ (ALT) や腎障害におけるクレアチニンなど、古くから用いられているものも多い。しかし臓器障害がある程度重篤になってからしか上昇が見られない、または臓器特異性が低いなど、問題が多いマーカーも使われており、臨床現場では問題となっている。そのため、より早期に軽症の段階で検出しうる新規バイオマーカーの探索が活発に行われている。

バイオマーカーとしては、遺伝子多型やmRNAレベル等のゲノムバイオマーカーに関する検討が多くなされており、近年ではマイクロRNAも注目されている。しかし、遺伝子多型に関しては、ヒトに固有であり、一部の代謝酵素等を除いて非臨床試験段階で検討することは難しく、臨床試験段階で初めて十分なデータが得られる

[#] To whom correspondence should be addressed:

Yoshiro Saito; Division of Medicinal Safety Science, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-9528; Fax: +81-3-3700-9788; E-mail: yoshiro@nihs.go.jp

ため、医薬品開発の初期から利用することは難しい。一方で、血液や尿などの体液に含まれるタンパク質⁴⁾や内在性代謝物⁵⁾は、種差が報告されている分子が一部存在するものの、非臨床で用いられる動物から、臨床におけるヒトへの外挿は、多くの場合、理論的に可能と考えられる。

1. バイオマーカーとしての要件

医薬品開発において有用なバイオマーカーは、

- 1) 種差なく共通して変化し、非臨床から臨床への外挿が可能、
- 2) 疾病や医薬品の有効性および安全性と、その早期段階から感度・特異度高く相関、
- 3) 食事や運動等の環境要因を含め、目的とする要因以外による影響を受けにくい、

ものと考えられる。さらにバイオマーカーを適切に評価するためには、正確度および精度高く測定することが必要であり、これには

- 4) 生体試料を測定する機器や方法（バイオアナリシス）の要件
- 5) 測定する試料の品質に関する要件

も重要となる。しかしバイオマーカーの利用はまだ緒に就いたばかりであり、各製薬会社はその利用方法を模索している状態である。

2. 行政的な動向

各国の規制当局である日本の厚生労働省/医薬品医療機器総合機構、米国・食品医薬品庁（FDA）、欧州・医薬品庁（EMA）もバイオマーカーについては注目しており、その積極的な利用を促進するため、いくつかのガイダンス等が公開されている。しかし、そのほとんどはゲノムバイオマーカーを対象にしており、タンパク質や内在性代謝物は対象外となっているものが多い。また、手続きに関する記載が多く、評価要件など技術的なものは少ない。

ゲノムバイオマーカーに関しては、その定義を「正常な生物学的過程、発病過程、及び/または治療的介入等への反応を示す指標となる、DNAもしくはRNAの測定可能な特性」としたゲノム薬理学における用語集について（ICH E15）⁶⁾を始め、ゲノムデータの申請方法（FDA）⁷⁾、バイオマーカーと診断法の同時開発（EMA）⁸⁾、臨床試験の研究デザインやデータ解析方法（EMA, FDA）^{9, 10)}、薬物動態解析におけるゲノムバイオマーカー利用のスキーム（EMA）¹¹⁾、医薬品の製造販売後監視におけるゲノムバイオマーカー利用の課題（EMA）¹²⁾、試料採取や保管・測定法・データ処理（EMA, FDA）^{13, 14)}に関するガイダンス（または案、コンセプトペーパーやリフレク

ションペーパーを含む）が公開されている。

一方、タンパク質や内在性代謝物に関してのガイダンスは、ほとんど無い。適格性確認のための資料における用法の記載要領、構成及び様式を定めた「医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発におけるバイオマーカー（ICH E16）」¹⁵⁾はゲノム以外のバイオマーカーを明示的には適用範囲としていないが、この文書に記載される原則は、タンパク質等の他のバイオマーカーについても適用可能としている。これ以外には、組織学的知見を陽性対照としたFDAの概要的ガイダンス案¹⁶⁾しかなく、実データを反映した明確な評価要件がないため、その探索・検証・利用は個別に模索している状態である。

このようにバイオマーカーの有用性を担保するための評価要件が確立していない状況では、不適切な試料の利用や不的確なバイオマーカーの利用により、かえって医薬品開発の遅延や混乱を招く可能性がある。今後は、ゲノム同様、タンパク質や内在性代謝物に関しても、測定試料の品質要件を始めとする多くのガイダンスを策定する必要がある。しかし、その策定の基礎となるデータは非常に乏しいのが現状である。

3. 体液中のタンパク質および内在性代謝物をバイオマーカーとする場合の、ガイダンス案策定に向けて

3-1. 研究班の目的、構成と期待される成果

平成24年度より厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床適用に関する評価要件の確立研究（研究代表者：斎藤嘉朗，研究分担者：熊谷雄治（北里大学）、鈴木孝昌、前川京子）」が開始された。本研究は、血液・尿中のタンパク質および内在性代謝物バイオマーカーの医薬品開発における利用を促進するための評価要件案作成の一環として、特に問題となる測定用試料の採取条件、および非臨床動物で見出されたバイオマーカーのヒトへの外挿性に関する評価要件案の作成を最終目標として、1) バイオマーカーの開発動向調査、2) 測定用血液・尿の採取等に関する要件の明確化、3) 動物モデルおよびヒト試料を用いた外挿性に関する実践的検討と、注意すべき評価要件の明確化、等を行うものである（図）。本研究の遂行により、血液・尿中のタンパク質および内在性代謝物バイオマーカーの測定用試料採取、および非臨床試験から臨床試験への外挿に関する評価要件案が作成され、ガイダンス等として発出されると、本邦におけるバイオマーカーの開発および利用推進につながり、医薬品開発を効率化して新薬創出の増加に結びつくこと期待される。またこれら試料採取に関する要件案および非臨床から臨床への外挿に関する評価要件案は、世界的にも例がなく、国際的にも



図 研究の背景、目的と計画

貢献できる研究である。

3-2. 研究の進捗状況

現在、三年計画の一年目が終了した段階であるが、下記の成果を挙げている。

3-2-1. バイオマーカーの開発動向調査

開発動向としては、腎障害マーカーとして尿中Kim-1等の新規バイオマーカーが有用であることが報告されている¹⁷⁾。さらにタンパク質マーカーとしては、抗がん剤ゲムシタピンによる重篤な血液毒性(好中球減少および血小板減少)の発症と血中のハプトグロビンのレベルが有意に相関すること¹⁸⁾、血清中のアポリポ蛋白タンパク質Eのレベルが89%の正確性で薬物性肝障害患者と健常人を区別しうること¹⁹⁾等が報告されている。代謝物マーカーとしては、薬物性肝障害に関して、血中ALT+γ-GTのレベルがマーカーとなりうること²⁰⁾、急性腎障害患者の血清を対象とした研究でアシルカルニチンや数種のアミノ酸レベルの増加、リゾホスファチジルコリンの減少²¹⁾が報告されている。

3-2-2. プロテオミクス解析による尿中タンパク質に関する検討

ショットガンプロテオミクス法では、トリプシン消化後にタンパク質およびペプチド混合試料を、液体クロマトグラフ-質量分析計(LC-MS)で分析するが、尿中に

は高発現量のタンパク質があり、そのため微量のタンパク質は検出できない²²⁾。そこで、雄ラット尿を用いて、有機溶媒による簡便な高発現タンパク質の除去に関する前処理条件の検討を行った。収率は低くなるものの高発現のタンパク質を効率的に除去し、低濃度のタンパク質を中心に一回の分析で700種以上を同定しうる系を構築した。これを用いて、ラット尿中のプロテオーム解析を行った。雌雄間の比較では、予想されたように差が認められ、特に雌雄のいずれかのみで発現が認められるタンパク質が、同定タンパク質数の約1/3程度を占めた。食事影響については、比較的小さいものであった。従って、非臨床試験に用いるラットの尿を対象としたタンパク質バイオマーカーの探索と候補の選択に当たっては、性差を十分考慮に入れる必要があると示唆された。一方、食事影響については、重要でないと考えられた。

さらに平成25年度の解析としては、高齢群の一部の個体において、ばらつきの原因となる高発現量のタンパク質の存在が明らかとなり、注意が必要であることが示唆されている。

3-3. メタボロミクス解析による血中内在性代謝物に関する検討

内在性代謝物は親水性の高いもの(糖リン酸や核酸等)から低いもの(リン脂質やトリアシルグリセロール等)まで、その分子論的な性質は多様である。このため、現在の技術では一つの方法で全ての種類の内在性代謝物を

測定することは不可能であり、複数の方法を組み合わせる必要がある。本研究では、大きく親水性代謝物と疎水性代謝物に分類し、前者はLC/MSとガスクロマトグラフィー質量分析計にて、後者はLC/MSにて、カラム等の条件を変えて測定を行った。

まず絶食後のヒト血液試料に関し、内在性代謝物濃度への採取・背景条件（性別、年齢、血漿・血清）および保管条件（凍結融解）の影響を、網羅的に明らかにした。測定可能であった代謝物数は、約550種である。血漿と血清間の比較では、親水性および疎水性代謝物共に、血液凝固に関係する代謝物群などの一部分子種で、そのレベルが血漿・血清間で大きく異なることが明らかになった。2倍以上のレベル差を示した代謝物数は、若年男性、老年男性、若年女性、老年女性のいずれの群でも30種程度で、親水性代謝物が多かった。

男女差に関しては、有意なレベル差のある代謝物が、老年よりも若年で多く認められた。若年ではアミノ酸類が男性において、脂肪酸類が女性において有意に高いレベルを示した。また年齢にかかわらず、女性でスフィンゴミエリンレベルが有意に高い傾向を示した。男女間で2倍以上の差があった代謝物は、若年血漿、老年血漿、若年血清、老年血清で、それぞれ数種であった。

年齢（30歳程度と60歳程度）に関しては、レベルに有意な差のある代謝物は、男性よりも女性で多く認められた。女性では、黄体ホルモン代謝物等が若年において、胆汁酸代謝物やトリアシルグリセロール等が老年において有意に高いレベルを示した。若年・老年間で2倍以上の差があった代謝物は、男性血漿、男性血清、女性血漿、女性血清で、それぞれ10種程度であった。

さらに若年男性の血漿と血清に関し、凍結融解回数（2回と10回）による相違について検討を行った。凍結融解を繰り返した場合、親水性代謝物では、血清と比べ血漿で大きなレベルの変化が認められる分子種が多かった。一方、疎水性代謝物では、血漿・血清ともに、ほぼすべてのリン脂質分子種等で、20-30%程度のレベル減少が認められた。

以上の結果、健常人というバックグラウンドレベルで、各条件につき2倍以上の差が認められた代謝物は、バイオマーカーの探索・診断の際に十分注意すべきであると考えられた。また、臨床におけるバイオマーカー診断に際しては、検体を選択することは不可能であり、検体間において普遍的なバイオマーカーが求められる。したがって、内在性代謝物をバイオマーカーとして測定する際には、1) 血液試料として、血漿・血清のいずれでも利用可能だが、親水性代謝物の場合は凍結融解の影響を考慮すると血清が望ましく、疎水性代謝物の場合は、血液凝固過程の影響を受けにくい血漿が望ましいこと、

2) 検出率が高く、試料背景間および各試料背景内における差異の小さい代謝物をバイオマーカーとして選択すること、3) 以上を満たせない場合には、これら背景の差異に対して、病気や薬剤反応性などによる差異が相対的に大きい代謝物（程度については、今後、検討予定）を選択すべきであること、が示唆された。

4. 研究の将来展望

今後は、健常ラットと健常人におけるタンパク質および内在性代謝物レベルの相違（外挿性）について検討を行う予定である。さらに、特定の副作用に関し、ラットのモデル系と副作用患者の試料を比較して、副作用マーカーの外挿性を検討する。

これらの知見を基に、バイオマーカーの測定用試料採取、および非臨床試験から臨床試験へのバイオマーカーの外挿に関する血液・尿中バイオマーカーの評価要件案を作成する予定である。

5. おわりに

総合科学技術会議は平成25年4月17日の会議で、「個別化医療の世界的研究開発競争における日本の出遅れ、および創薬力の低下」を指摘している。本邦におけるバイオマーカー探索・同定とその医薬品開発への応用の早期実現は、まさに待ったなしの状況である。本研究の遂行によるガイダンス案の作成は、バイオマーカー評価の一部ではあるが、国としての基準を示すものとなり、本邦におけるバイオマーカー開発とその利用を通じた医薬品開発の活性化につながると期待される。今後とも医薬品の品質、有効性および安全性を確保するための研究機関として、医薬品の開発と適正使用の推進に向けた適切な規制のための研究という社会的な役割を十分に果たしていきたい。

謝辞：本研究の成果は、厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床適用に関する評価要件の確立研究」（H24-医薬-指定-028）によるものである。

引用文献

- 1) Biomarkers Definitions Working Group.: *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 89-95 (2001).
- 2) Phillips, K.A., Van Bebber, S. and Issa, A.M.: *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 463-9 (2006).
- 3) Dong, D., Sung, C., Finkelstein, E.A.: *Neurology.* 79, 1259-67 (2012).
- 4) Feng, Z., Prentice, R. and Srivastava, S.: *Pharma-*

- cogenomics*. 5, 709-19 (2004).
- 5) Kell, D.B.: *Expert Rev. Mol. Diagn.* 7, 329-33 (2007).
 - 6) ゲノム薬理学における用語集. 薬食審査発第0109013号, 薬食安発第0109002号, 平成20年1月9日
 - 7) Pharmacogenomic Data Submission. FDA, March 2005.
 - 8) Reflection paper on co-development of pharmacogenomic biomarkers and Assays in the context of drug development (Draft). EMA/CHMP/641298/2008, 24 June 2010.
 - 9) Reflection paper on methodological issues associated with pharmacogenomic biomarkers in relation to clinical development and patient selection (Draft). EMA/446337/2011, 9 June 2011.
 - 10) Clinical Pharmacogenomics: Premarket Evaluation in Early-Phase Clinical Studies and Recommendations for Labeling. FDA, January 2013.
 - 11) Guideline on the use of pharmacogenetic methodologies in the pharmacokinetic evaluation of medicinal products. EMA/CHMP/37646/2009, 12 December 2011.
 - 12) Concept paper on key aspects for the use of pharmacogenomic methodologies in the pharmacovigilance evaluation of medicinal products. EMA/CHMP/917570/2011, 15 December 2011.
 - 13) Reflection paper on pharmacogenomic samples, testing and data handling. EMEA/CHMP/PGx-WP/201914/2006, 15 November 2007.
 - 14) Pharmacogenomic Data Submission-Companion Guidance (Draft). FDA, August 2007.
 - 15) 医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発におけるバイオマーカー: 適格性確認のための資料における用法の記載 要領, 資料の構成及び様式. 薬食審査発0120第1号, 薬食安発0120第1号, 平成23年1月20日.
 - 16) Use of histology in biomarker qualification studies (Draft). FDA, December 2011.
 - 17) Fuchs, T.C. and Hewitt, P.: *AAPS J.* 13, 615-31 (2011).
 - 18) Matsubara, J., Ono, M., Negishi, A., Ueno, H., Okusaka, T., Furuse, J., Furuta, K., Sugiyama, E., Saito, Y., Kaniwa, N., Sawada, J., Honda, K., Sakuma, T., Chiba, T., Saijo, N., Hirohashi, S. and Yamada, T.: *J. Clin. Oncol.* 27, 2261-8 (2009).
 - 19) Bell, L.N., Vuppalanchi, R., Watkins, P.B., Bonkovsky, H.L., Serrano, J., Fontana, R.J., Wang, M., Rochon, J., Chalasani, N.; US Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) Research Group: *Aliment Pharmacol. Ther.* 35, 600-12 (2012).
 - 20) Soga, T., Sugimoto, M., Honma, M., Mori, M., Igarashi, K., Kashikura, K., Ikeda, S., Hirayama, A., Yamamoto, T., Yoshida, H., Otsuka, M., Tsuji, S., Yatomi, Y., Sakuragawa, T., Watanabe, H., Nihei, K., Saito, T., Kawata, S., Suzuki, H., Tomita, M. and Suematsu, M.: *J Hepatol.* 55, 896-905 (2011).
 - 21) Sun, J., Shannon, M., Ando, Y., Schnackenberg, L.K., Khan, N.A., Portilla, D., Beger, R.D.: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 893-4, 107-113 (2012).
 - 22) Decramer, S., Gonzalez de Peredo, A., Breuil, B., Mischak, H., Monsarrat, B., Bascands, J.L. and Schanstra, J.P.: *Mol. Cell. Proteomics.* 7, 1850-62 (2008).

ヒト人工多能性幹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

佐藤 陽治

In Vitro Tumorigenicity Tests for Process Control of Health Care Products Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells

Yoji Sato

Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences;
1-18-1 Kami-yoga, Setagaya-ku 158-8501, Japan.

(Received August 30, 2013)

The goal of pharmaceutical sciences is to deliver effective and safe medicinal products to patients. To achieve this goal, we need to ensure the efficacy, safety and quality of the products. Currently, many attempts are made to utilize human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) in regenerative medicine/cell therapy. There are significant obstacles, however, preventing the clinical use of hiPSC-derived products. One of the most obvious safety issues is the presence of residual undifferentiated cells that have tumorigenic potential. Therefore, the assessment and control of the tumorigenicity of hiPSC-derived products is essential in order to prevent tumor development by residual pluripotent stem cells after implantation. We recently examined three *in vitro* assay methods to detect undifferentiated cells: soft agar colony formation assay, flow cytometry assay and quantitative real-time polymerase chain reaction assay (qRT-PCR). Although the soft agar colony formation assay was unable to detect hiPSCs, the flow cytometry assay using anti-TRA-1-60 antibody detected 0.1% undifferentiated hiPSCs that were spiked in primary retinal pigment epithelial (RPE) cells. Moreover, qRT-PCR with a specific probe and primers was found to detect a trace amount of *LIN28* mRNA, which is equivalent to that present in a mixture of a single hiPSC and 5.0×10^4 RPE cells. Our findings provide highly sensitive and quantitative *in vitro* assays essential for facilitating safety profiling of hiPSC-derived RPE cells for their clinical use.

Key words—induced pluripotent stem cell; regenerative medicine; tumorigenicity; safety; quality control

1. はじめに

近年、ヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cells; ES細胞) やヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPS細胞) といった多能性幹細胞由来する分化細胞を移植することによる再生医療・細胞治療の開発が活発化している。ヒト iPS細胞を用いた再生医療に関連する科学技術の進歩は目覚ましく、平成19年に京都大学・山中伸弥博士らによる世界初のヒト iPS細胞樹立の報告があった後、早くも平成25年7月には、神戸の理化学研究所と先端医療センター病院による滲出性加齢黄斑変性症の治療を目的としたヒト自己 iPS細胞由来網

膜色素上皮細胞を用いた臨床研究計画が厚生労働大臣の了承を受け、疾患治療を目的とした世界初の iPS細胞由来移植細胞のヒトへの投与が平成26年夏にも行われる予定となっている。ヒト iPS細胞由来移植細胞の臨床応用に社会的な期待は非常に高く、平成25年4月には iPS細胞などを使った再生医療の実用化を目指した「再生医療推進法」が成立し、平成25年6月に閣議決定された「日本再興戦略」でも「iPS細胞等の再生医療の研究と実用化推進のための研究を集中的かつ継続的に推進する」と記されている。しかし、その実用化に必要な品質及び安全性を評価・確保するための基盤技術の整備はまだ十分とはいえないのが現状である。本稿では、ヒト iPS細胞由来移植細胞の品質・安全性の確保を目的とした試験法の概略と、われわれのこれまでの試験法開発の経験の一部を紹介する。

The author declares no conflict of interest.

国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

e-mail: yoji@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第133年会シンポジウム S30-106 で発表した内容を中心に記述したものである。