

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

- 1) Takao Hayakawa, Takashi Aoi, Akihiro Umezawa, Keiya Ozawa, Yoji Sato, Yoshiki Sawa, Akifumi Matsuyama, Shinya Yamanaka, and Masayuki Yamato. Study on Ensuring the Quality and Safety of Pharmaceuticals and Medical Devices Derived from the Processing of Autologous Human Somatic Stem Cells. Regenerative Therapy 2015 in press.
- 2) Takao Hayakawa, Takashi Aoi, Akihiro Umezawa, Keiya Ozawa, Yoji Sato, Yoshiki Sawa, Akifumi Matsuyama, Shinya Yamanaka, and Masayuki Yamato. Study on Ensuring the Quality and Safety of Pharmaceuticals and Medical Devices Derived from the Processing of Allogenic Human Somatic Stem Cells. Regenerative Therapy 2015 in press.
- 3) Takao Hayakawa, Takashi Aoi, Akihiro Umezawa, Keiya Ozawa, Yoji Sato, Yoshiki Sawa, Akifumi Matsuyama, Shinya Yamanaka, and Masayuki Yamato. Study on Ensuring the Quality and Safety of Pharmaceuticals and Medical Devices Derived from Processing of Autologous Human Induced Pluripotent Stem Cell (-Like Cells). Regenerative Therapy 2015 in press.
- 4) Takao Hayakawa, Takashi Aoi, Akihiro Umezawa, Keiya Ozawa, Yoji Sato, Yoshiki Sawa, Akifumi Matsuyama, Shinya Yamanaka, and Masayuki Yamato. Study on Ensuring the Quality and Safety of Pharmaceuticals and Medical Devices Derived from Processing of Allogenic Human Induced Pluripotent Stem Cell (-Like Cells). Regenerative Therapy 2015 in press.
- 5) Takao Hayakawa, Takashi Aoi, Akihiro Umezawa, Keiya Ozawa, Yoji Sato, Yoshiki Sawa, Akifumi Matsuyama, Shinya Yamanaka, and Masayuki Yamato. Study on Ensuring the Safety and Quality of Pharmaceuticals and Medical Devices Derived from the Processing of Human Embryonic Stem Cells. Regenerative Therapy 2015 in press.
- 6) Moriyama H, Moriyama M, Isshi H, Ishihara S, Okura H, Ichinose A, Ozawa T, Matsuyama A, Hayakawa T. Role of notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *Stem Cells Dev.* 2014 Sep;23(18):2211-24.
- 7) Moriyama M, Moriyama H, Uda J, Matsuyama A, Osawa M, Hayakawa T. BNIP3 plays crucial roles in the differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2014 Jun;134(6):1627-35.
- 8) Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Inamura M, Ohashi K, Okuno H, Yamaguchi T, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Okano T, Furue MK, Mizuguchi H. CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF  $\beta$  receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision. *Development.* 2014 Jan;141(1):91-100.
- 9) 早川堯夫：再生医療と安全性：わが国発の技術の確立に向けて。 *Medical Tribune*, p.16, 9月4日号 (2014) (株) メディカルトリビーン、東京
- 10) 早川堯夫：再生医療の産業化をめぐる課題、再生医療用語ハンドブック (再生医療学会監修、岡野 光夫、浅島 誠編集統括) pp. 294-297 (2015)、(株) メディカルトリビーン、東京
- 11) Yagi Y, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Application of microchip electrophoresis sodium dodecyl sulfate for the evaluation of change of degradation species of therapeutic antibodies in stability testing. *Anal Sci.* 2014;30(4):483-8.
- 12) Toshio Morikawa, Kiyofumi Ninomiya, Katsuya Imura, Takahiro Yamaguchi, Yoshinori Akagi, Masayuki Yoshikawa, Takao Hayakawa, Osamu Muraoka, Hepatoprotective triterpenes from traditional Tibetan medicine *Potentilla anserina*. *Phytochemistry*, **102**, 169—181 (2014).
- 13) Toshio Morikawa, Yusuke Nakanishi, Kiyofumi Ninomiya, Hisashi Matsuda, Souichi Nakashima, Hisako Miki, Yu Miyashita, Masayuki Yoshikawa, Takao Hayakawa, Osamu Muraoka, Dimeric pyrrolidinoindoline-type alkaloids with melanogenesis inhibitory activity in flower buds of *Chimonanthus praecox*. *J. Nat. Med.*, **68**, 539—549 (2014).

## G-2 学会発表

- 1) 早川堯夫：科学的合理性に基づくバイオ医薬品開発のあり方について - 規制面からの視点、BIOJAPAN 2014、Oct.15, 2014、横浜.
- 2) Takao Hayakawa: Aspects of Quality Evaluation and Control Corresponding to the Type of Cell-based Products for Regenerative Medicine. CMC Strategy Forum Japan 2014, December 8, 2014, Tokyo, JAPAN
- 3) Takao Hayakawa: Acceptance of William Hancock Award. WCBP2015 - 4th William Hancock Award Ceremony, January 27-29, 2015, Washington, DC. USA.
- 4) Takao Hayakawa: Challenges for developing a minimum consensus package plus case by case approaches for evaluating cell therapy products. IABS Tokyo 2015 meeting [International Regulatory Endeavor towards Sound Development of Human Cell Therapy Products], February 18-19th, 2015, Tokyo, Japan.
- 5) Takao Hayakawa, Norihisa Sakamoto: Specifications. IABS Tokyo 2015 meeting [International Regulatory Endeavor towards Sound Development of Human Cell Therapy Products], February 18-19th, 2015, Tokyo, Japan.
- 6) Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露を介する脂肪由来間葉系幹細胞のドーパミン産生細胞分化誘導. Mar, 4-6, 2014.第 13 回日本再生医療学会総会. 京都.
- 7) Mariko Moriyama, Junki Uda, Hiroyuki Moriyama, Akifumi Matsuyama, Masatake Osawa, Takao Hayakawa. オートファジー関連分子 BNIP3 は、表皮分化ならびに表皮形態維持に重要な働きをする. Mar 4-6, 2014.第 13 回日本再生医療学会総会. 京都.
- 8) 森山麻里子, 宇田純輝, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. オートファジーと皮膚構築. 皮膚の会 (総会), Mar 15-16, 2014. 松山.
- 9) 森山博由. 早川堯夫. 再生医療を照らす脂肪由来幹細胞の製造法と派生效果. 5/14~5/16, 2014, BIO tech 2014 -国際バイオテクノロジー展/技術会議-アカデミックフォーラム. 東京
- 10) Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko, Ueda Ayaka, Nishibata Yusuke, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa Takao. ROLE OF NOTCH SIGNALING IN THE MAINTENANCE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER HYPOXIC CONDITIONS. June 18 - 21, 2014, 12<sup>th</sup> ISSCR at Vancouver, CANADA.
- 11) Uda Junki, Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Osawa Masatake, Hayakawa Takao. BNIP3 PLAYS CRUCIAL ROLES IN THE DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. June 18 - 21, 2014, 12<sup>th</sup> ISSCR at Vancouver, CANADA.
- 12) Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Sawaragi Kei, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa Takao. Development of a single tet-off lentiviral vector system with tightly regulated and homogeneous expression of target genes in human adipose-derived mesenchymal stem cells. June 18 - 21, 2014, 12<sup>th</sup> ISSCR at Vancouver, CANADA.
- 13) Ohmori Shigenari, Taniguchi Yuki, Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Hayakawa Takao. DIFFERENTIATION OF DOPAMINERGIC NEURONAL CELLS FROM HUMAN ADIPOSE-DERIVED MULTILINEAGE PROGENITOR CELLS. June 18 - 21, 2014, 12<sup>th</sup> ISSCR at Vancouver, CANADA.
- 14) 大森重成、森山麻里子、谷口祐紀、深瀬堯哉、松山晃文・早川堯夫、森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMPC) を用いたドーパミン産生細胞への誘導法の確立. 2014 年 8 月 28~29 日, 生体機能と創薬シンポジウム 2014. 東大阪.
- 15) 大森重成、森山麻里子、谷口祐紀、深瀬堯哉、松山晃文・早川堯夫、森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMPC) を用いたドーパミン産生細胞への誘導法の確立. 2014 年 8 月 28~29 日, 生体機能と創薬シンポジウム 2014. 東大阪.

- 16) 河野真有香、森山麻里子、中北和樹、早川堯夫、森山博由. 幹細胞資材におけるウイルス混入及び残存試験法確立を目的とした高感度・高精度な新規核酸増幅基盤技術開発. 2014年8月28~29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
- 17) 谷口祐紀、森山麻里子、大森重成、早川堯夫、森山博由. キンドラー症候群患者由来ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)より樹立したiPS細胞の皮膚ケラチノサイトへの分化誘導法確立. 2014年8月28~29日生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
- 18) 山田 翼, 森山麻里子, 宇田純輝, 森山博由, 早川堯夫. BCL-2 ファミリー分子BNIP3 が表皮分化および表皮形態維持に及ぼす影響. 2014年8月28~29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
- 19) 百合祐樹, 森山麻里子, 森山博由, 早川堯夫. 新規ヒト脂肪組織由来多能性前駆細胞に存在するOCT4陽性細胞は真の多能性幹細胞たりうるのか?. 2014年8月28~29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
- 20) 石原慎、森山麻里子、阪口公一、石濱里穂、大倉華雪、松山晃文、早川堯夫、森山博由. 低酸素状態におけるNotchシグナルと解糖系の関係. 2014年8月28~29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
- 21) 曾根千晶、森山麻里子、大倉華雪、松山晃文、早川堯夫、森山博由. 新規ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)を用いたインスリン産生細胞の作製. 2014年8月28~29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
- 22) Tadashi Michiyama, Horoyuki Moriyama, Mario Moriyama, Takao Hayakawa, Kiyofumi Ninomiya, Osamu Muraoka, Saowanee Chaipech, Toshio Morikawa. Inhibitory effects of oligostilbenoids from bark of *Shorea roxburghii* on malignant melanoma cell growth: implications for a candidate of novel topical anticancer agents. The 27th International Conference on Polyphenols (ICP2014), (Nagoya, Japan), 2014.9.
- 23) MARIKO MORIYAMA, JUNKI UDA, MASATAKE OSAWA, TAKAO HAYAKAWA, HIROYUKI MORIYAMA. BNIP3 Plays Crucial Roles in the Differentiation and Maintenance of Epidermal Keratinocytes. Sept 11-15, 2014. European society for dermatological research (ESDR). Copenhagen, Denmark.
- 24) JUNKI UDA, MARIKO MORIYAMA, MASATAKE OSAWA, TAKAO HAYAKAWA, HIROYUKI MORIYAMA. BNIP3 PLAYS CRUCIAL ROLES IN THE DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. Sept 22-26, 2014. Austrarian society for Dermatology Research (ASDR). Sydney, Australia.
- 25) 宇田純輝, 森山麻里子, 北川綾弓, 野村昇吾, 早川堯夫, 森山博由. Bcl-2 ファミリー分子BNIP3 が表皮構築に及ぼす影響. 第64回日本薬学会近畿支部総会・大会.[口頭発表]10/11, 2014, 京都薬科大学, 京都.
- 26) 雨宮有佑, 北野亮介, 古谷圭史, 村上健太, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. 日本の新薬承認格差の現状とその打開策についての検討. [ポスター発表]第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2014, 京都薬科大学, 京都.
- 27) 山田翼, 森山麻里子, 宇田純輝, 早川堯夫, 森山博由. BCL-2 ファミリー分子BNIP3 と表皮分化および形態維持機構との関連性. [ポスター発表]第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2014, 京都薬科大学, 京都.
- 28) 石原慎, 森山麻里子, 阪口公一, 上村充香, 大石実央, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 低酸素状態におけるNotchシグナルと解糖系の相関性. [ポスター発表]第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2014, 京都薬科大学, 京都.
- 29) 石濱里穂, 森山麻里子, 鈴木格, 早川堯夫, 森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)を用いたメラノサイトの作製. [ポスター発表]第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2014, 京都薬科大学, 京都.

- 30) 曾根千晶, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 新規ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)を用いたインスリン産生細胞の作成. [ポスター発表]第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2014, 京都薬科大学, 京都.
- 31) 大森重成, 森山麻里子, 谷口祐紀, 深瀬堯哉, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)を用いたドパミン産生細胞への誘導法の確立. [ポスター発表]第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2014, 京都薬科大学, 京都.
- 32) 道山 忠史, 森山 麻里子, 二宮 清文, Saowanee Chaipech, 村岡 修, 森川 敏生, 早川 堯夫, 森山 博由. 悪性黒色腫細胞に対する *Shorea roxburghii* 由来オリゴスチルベノイドの影響. 第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2014, 京都薬科大学, 京都.
- 33) 北野亮介, 雨宮有佑, 古谷圭史, 村上健太, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. 再生医療製品実用化における規制制度の課題について. [ポスター発表]第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2014, 京都薬科大学, 京都.
- 34) 野村昇吾, 森山麻里子, 宇田純輝, 早川堯夫, 森山博由. 表皮構築過程における Foxo3a の関与. [ポスター発表]第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2014, 京都薬科大学, 京都.
- 35) 森山 麻里子, 宇田 純輝, 石濱 里穂, 大森 重成, 石原 慎, 曾根 千晶, 谷口祐紀, 百合 祐樹, 早川 堯夫, 森山 博由「贅肉は贅沢!? ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞の魅力」【講演】Nov 23, 2014, 第5回生命機能研究会, 甲南大学ポートアイランドキャンパス, 神戸.
- 36) 宇田 純輝, 森山 麻里子, 早川 堯夫, 森山 博由. オートファジー制御関連分子 BNIP3 は表皮分化ならびに表皮形態維持に重要な働きをする. [口頭発表] Nov 23, 2014, 第5回生命機能研究会, 甲南大学ポートアイランドキャンパス, 神戸. [最優秀口頭発表賞受賞]
- 37) 大森重成, 森山麻里子, 谷口祐紀, 深瀬堯哉, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)を用いたドパミン産生細胞への誘導法の確立. [ポスター発表] Nov 23, 2014, 第5回生命機能研究会, 甲南大学ポートアイランドキャンパス, 神戸.
- 38) 石濱里穂, 森山麻里子, 鈴木格, 早川堯夫, 森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)を用いたメラノサイトの作製. [ポスター発表] Nov 23, 2014, 第5回生命機能研究会, 甲南大学ポートアイランドキャンパス, 神戸.
- 39) 百合祐樹, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. 新規ヒト脂肪組織由来多能性前駆細胞に存在する OCT4 陽性細胞は真の多能性幹細胞たりうるのか? [ポスター発表] Nov 23, 2014, 第5回生命機能研究会, 甲南大学ポートアイランドキャンパス, 神戸.
- 40) Junki Uda, Mariko Moriyama, Hiroyuki Moriyama, Takao Hayakawa. BNIP3 PLAYS CRUCIAL ROLES IN THE DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. [Oral presentation] The 36<sup>th</sup> annual meeting of the molecular biology society of Japan. Nov 25-27, Pacifico-Yokohama, Yokohama, Japan.
- 41) Junki Uda, Mariko Moriyama, Hiroyuki Moriyama, Takao Hayakawa. BNIP3 PLAYS CRUCIAL ROLES IN THE DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. [Poster presentation] The 36<sup>th</sup> annual meeting of the molecular biology society of Japan. Nov 25-27, Pacifico-Yokohama, Yokohama, Japan.
- 42) Shin Ishihara, Mariko Moriyama, Koichi Sakaguchi, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama. Role of Notch signaling in glycolysis regulation under hypoxic conditions. [Oral presentation] The 36<sup>th</sup> annual meeting of the molecular biology society of Japan. Nov 25-27, Pacifico-Yokohama, Yokohama, Japan.
- 43) Shin Ishihara, Mariko Moriyama, Koichi Sakaguchi, Hanayuki Okura, Akifumi

- Matsuyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama. Role of Notch signaling in glycolysis regulation under hypoxic conditions. [Poster presentation] The 36<sup>th</sup> annual meeting of the molecular biology society of Japan. Nov 25-27, Pacifico-Yokohama, Yokohama, Japan.
- 44) Riho Ishihama, Tadashi Michiyama, Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Takao Hayakawa, Kiyofumi Ninomiya, Osamu Muraoka, Saowanee Chaipech<sup>1,2</sup> and Toshio Morikawa. Inhibitory Effects of Oligostilbenoids from Bark of *Shorea roxburghii* on Malignant Melanoma Cell Growth: Implications for a Candidate of Novel Topical Anticancer Agents. [Poster presentation] The 36<sup>th</sup> annual meeting of the molecular biology society of Japan. Nov 25-27, Pacifico-Yokohama, Yokohama, Japan.
- 45) Chiaki Sone, Mariko Moriyama, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama. Transdifferentiation of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells into insulin-producing cells. [Poster presentation] The 36<sup>th</sup> annual meeting of the molecular biology society of Japan. Nov 25-27, Pacifico-Yokohama, Yokohama, Japan.
- 46) Junko Uda, Mariko Moriyama, Hiroyuki Moriyama, Takao Hayakawa. BNIP3 PLAYS CRUCIAL ROLES IN THE DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. [Oral presentation] The 39<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese society for Investigative Dermatology. Dec 12-14, Expopark-Hankyu Osaka, Japan.
- 47) Mariko Moriyama. Hiroyuki Moriyama. Takao Hayakawa. BNIP3 Plays Crucial Roles in the Differentiation and Maintenance of Epidermal Keratinocytes. Looking to the future of Notch signaling. December 18th, 2014. Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.
- 48) Kiyofumi Ninomiya, Toshio Morikawa, Taku Matsumoto, Mayumi Sueyoshi, Seiya Miyazawa, Shunsuke Saeki, Saowanee Chaipech, Takao Hayakawa, Osamu Muraoka. Anti-inflammatory effects and mode of action of prenylcoumarins from Thai natural medicine *Mammea siamensis*. The 27th International Conference on Polyphenols (ICP2014), (Nagoya, Japan), 2014.9.
- 49) Toshio Morikawa, Ikuko Hachiman, Kiyofumi Ninomiya, Hisashi Matsuda, Yuki Hata, Kaoru Sugawara, Yuri Sakata, Masayuki Yoshikawa, Takao Hayakawa, Osamu Muraoka. Antiallergic principles from *Myristica fragrans*: inhibitors of degranulation and TNF- $\alpha$  release in RBL-2H3 cells. The 27th International Conference on Polyphenols (ICP2014), (Nagoya, Japan), 2014.9.
- 50) Tadashi Michiyama, Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Takao Hayakawa, Kiyofumi Ninomiya, Osamu Muraoka, Saowanee Chaipech, Toshio Morikawa. Inhibitory effects of oligostilbenoids from bark of *Shorea roxburghii* on malignant melanoma cell growth: implications for a candidate of novel topical anticancer agents. The 27th International Conference on Polyphenols (ICP2014), (Nagoya, Japan), 2014.9.
- 51) Kiyofumi Ninomiya, Toru Minamino, Kaiten Ozeki, Natsuko Matsuo, Chihiro Kawabata, Takao Hayakawa, Toshio Morikawa. Effects of constituents from hooks of *Uncaria rhynchophylla* on neurite outgrowth and TNF- $\alpha$ -induced cell damage. The 8th JSP-CCTCM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy, (Fukuoka, Japan), 2014.9.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

**H-1 取得特許** なし

**H-2 実用新案登録** なし

## H-3 その他

### 【政策への提言】

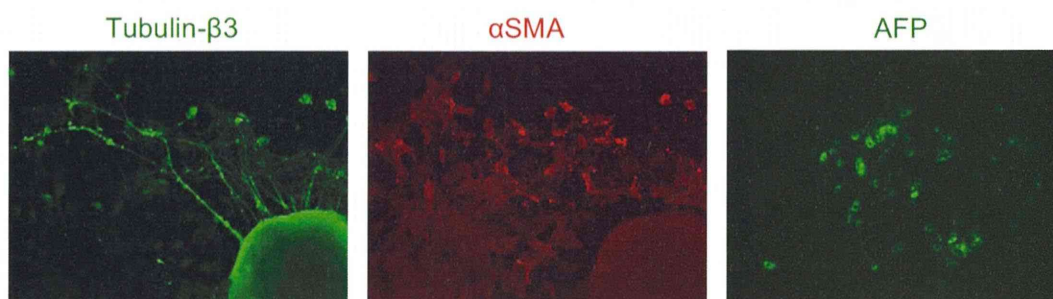
- 1) 「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行令」及び「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則」の取扱いについて（平成26年10月31日医政研発1031第1号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知）

- 2) 生物由来原料基準の一部を改正する件」(平成26年厚生労働省告示第375号)；

表 1 : 本研究で用いたプライマー配列

<b>target</b>	<b>Forward primer sequence (5'-3')</b>	<b>Reverse primer sequence (5'-3')</b>
<b>OCT4A</b>	CGCAAGCCCTCATTTCAC	CATCACCTCCACCACCTG
<b>NANOG</b>	AGATGCCTCACACGGAGACT	TTTGCGACACTCTTCTCTGC
<b>LIN28A</b>	AGCGCAGATCAAAGGAGACA	CCTCTCGAAAGTAGGTTGGCT
<b>AFP</b>	AGTGAGGACAAACTATTGGCCT	ACACCAGGGTTTACTGGAGTC
<b>FOXA2</b>	GCGACCCCAAGACCTACAG	GGTTCTGCCGGTAGAAGGG
<b>ALB</b>	GAGACCAGAGGTTGATGTGATG	AGTTCCGGGGCATAAAAGTAAG
<b>NKX2.5</b>	CGGTTGGAAGTGGGACTG	GACGGCGAGATAGCAAAGG
<b>KRT14</b>	CATGAGTGTGGAAGCCGACAT	GCCTCTCAGGGCATTTCATCTC
<b>IVL</b>	TCCTCCAGTCAATACCCATCAG	GCAGTCATGTGCTTTTCCTCTTG
<b>SPRR2A</b>	TCTGCCTTGGAGAACCTGAT	ACATGGCTCTGGGCACTTT
<b>NES</b>	GGCGCACCTCAAGATGTCC	CTTGGGGTCCTGAAAGCTG
<b>NEFM</b>	GAGTGGTTCAAATGCCGCTAC	CTCTAGCTCGATGCTCTTGGA
<b>TUBB3</b>	GGCCAAGGGTCACTACACG	GCAGTCGCAGTTTTTCACACTC
<b>ACTB</b>	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
<b>UBE2D2</b>	TGGCAAGCTACAATAATGGGG	GGAGACCACTGTGATCGTAGA

正常ヒト由来 iPS #7



皮膚疾患ヒト由来 iPS #1

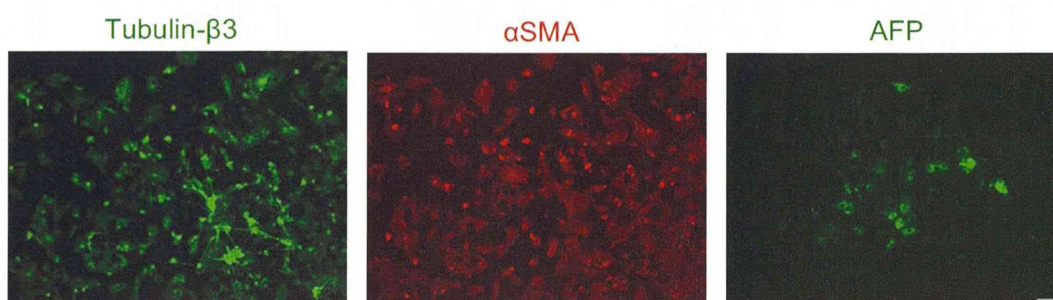


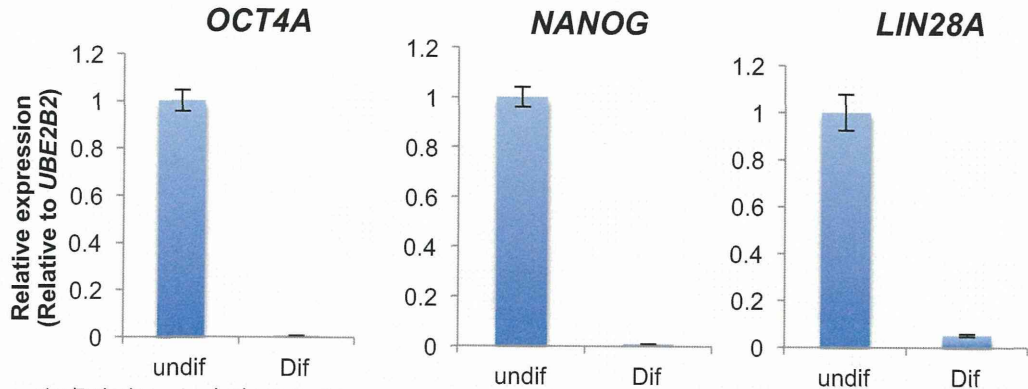
図 1 : 本研究で作製した代表的な iPS の三胚葉系への分化能

(上) 健常ヒト由来 iPS #7 を胚様体から分化させ、Tubulin-β3 (外胚葉)、αSmooth Muscle Actin (αSMA; 中胚葉)、αFetoprotein (AFP; 内胚葉)の発現を免疫染色により確認した。

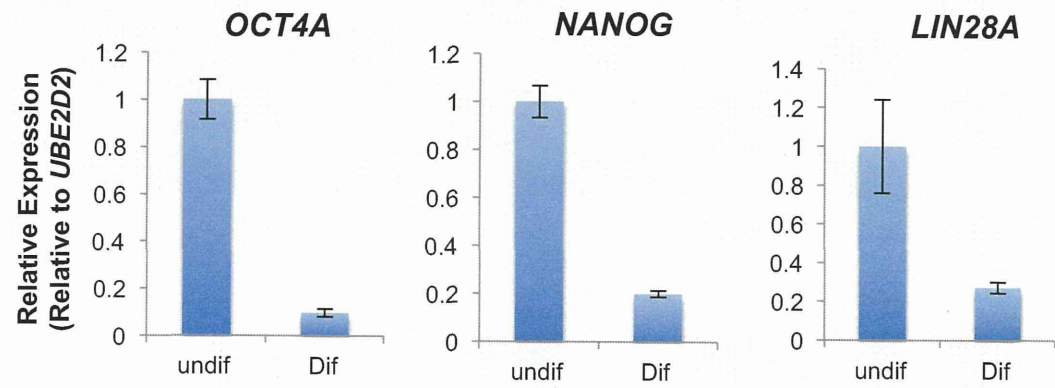
(下) 皮膚疾患ヒト由来 iPS #1 を胚様体から分化させ、Tubulin-β3 (外胚葉)、αSmooth Muscle Actin (αSMA; 中胚葉)、αFetoprotein (AFP; 内胚葉)の発現を免疫染色により確認した。



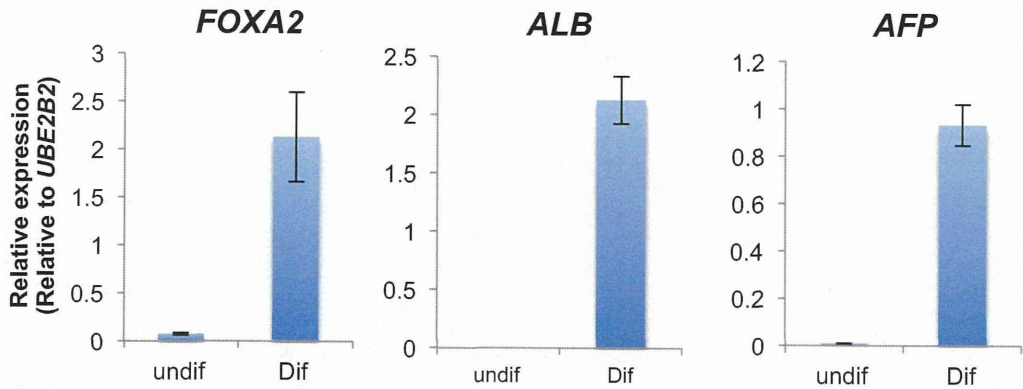
**A** 正常ヒト由来 iPS #7



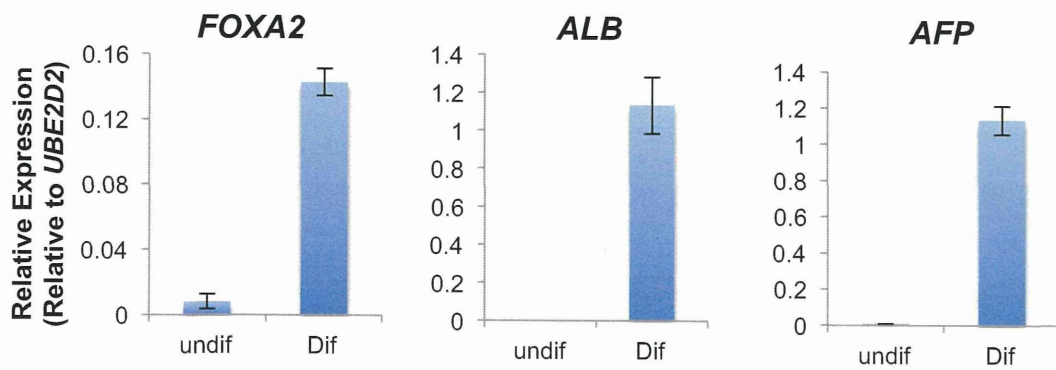
皮膚疾患ヒト由来 iPS #1



**B** 正常ヒト由来 iPS #7

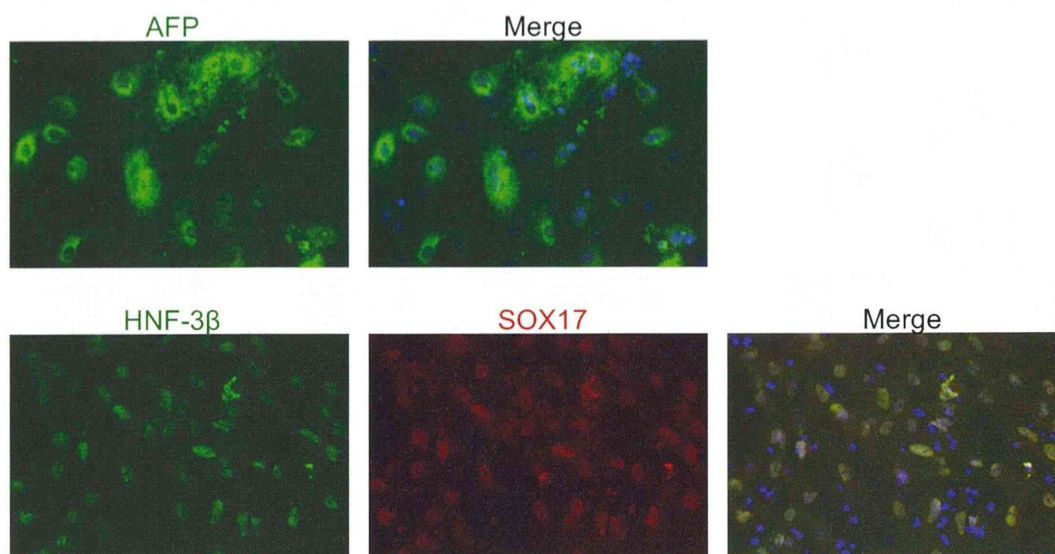


皮膚疾患ヒト由来 iPS #1



C

正常ヒト由来 iPS #7



皮膚疾患ヒト由来 iPS #1

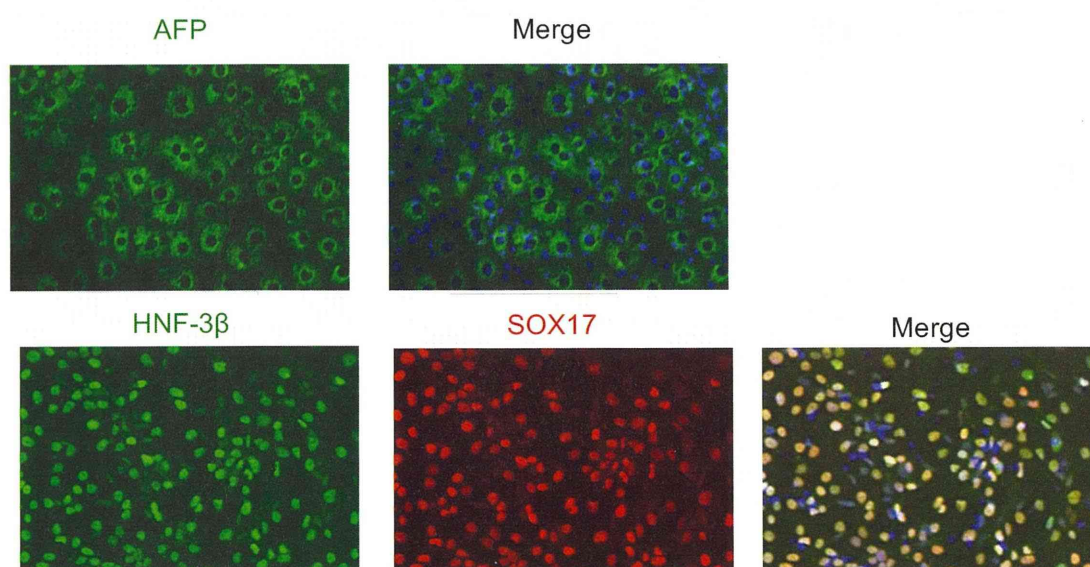


図 2： 作製した iPS 細胞の肝細胞への分化誘導

(A) 分化誘導した細胞における *OCT4A*, *NANOG*, *LIN28A* 遺伝子の発現を定量的 PCR 法にて確認した。

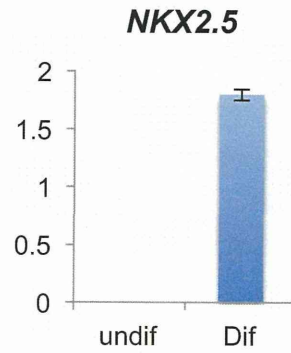
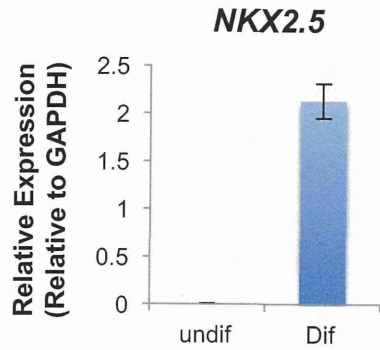
(B) 分化誘導した細胞における *FOXA2*, *ALB*, *AFP* 遺伝子の発現を定量的 PCR 法にて確認した。

(C) 分化誘導した細胞における AFP, HNF-3 $\beta$ , SOX17 の発現を免疫染色法にて確認した。青は核 (DAPI) を示す。

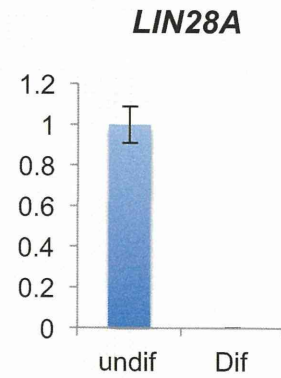
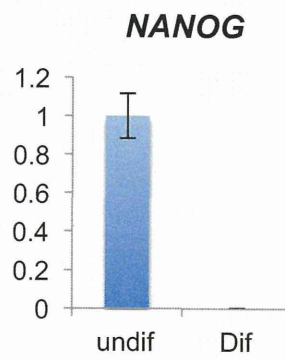
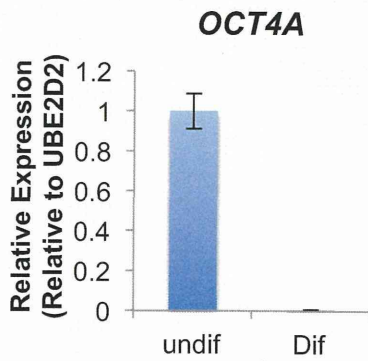
**A**

健康ヒト由来 iPS #7

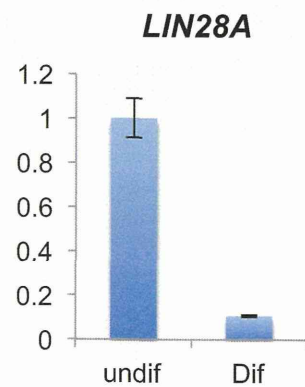
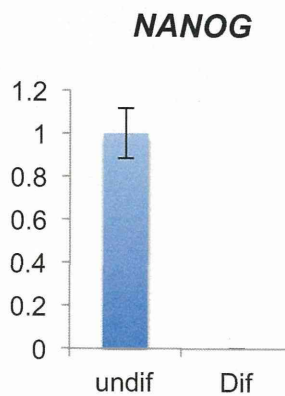
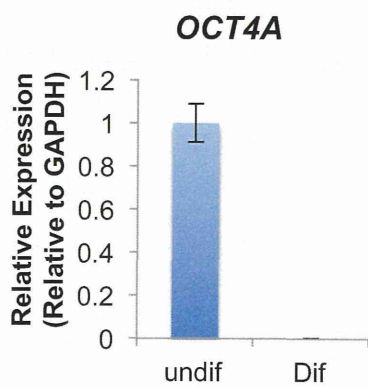
皮膚疾患ヒト由来 iPS #1

**B**

健康ヒト由来 iPS #7

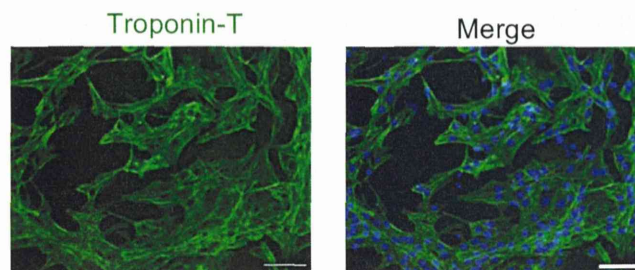


皮膚疾患ヒト由来 iPS #1



C

健常ヒト由来 iPS #7



皮膚疾患ヒト由来 iPS #1

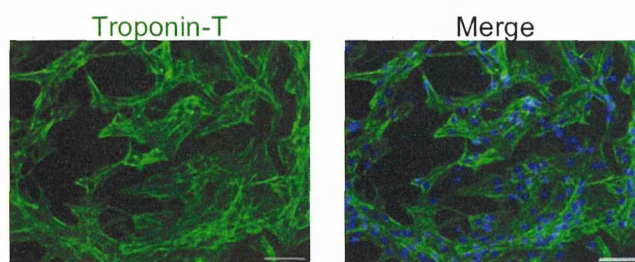
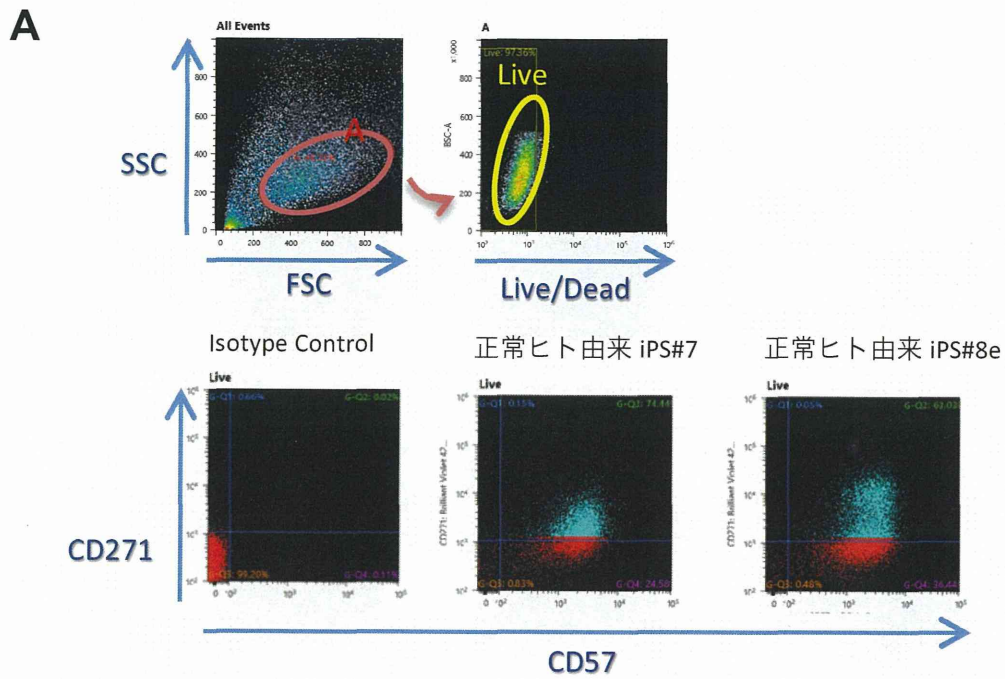


図 3： 作製した iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導

(A) 分化誘導した細胞における *NKX2.5* 遺伝子の発現を定量的 PCR 法にて確認した。

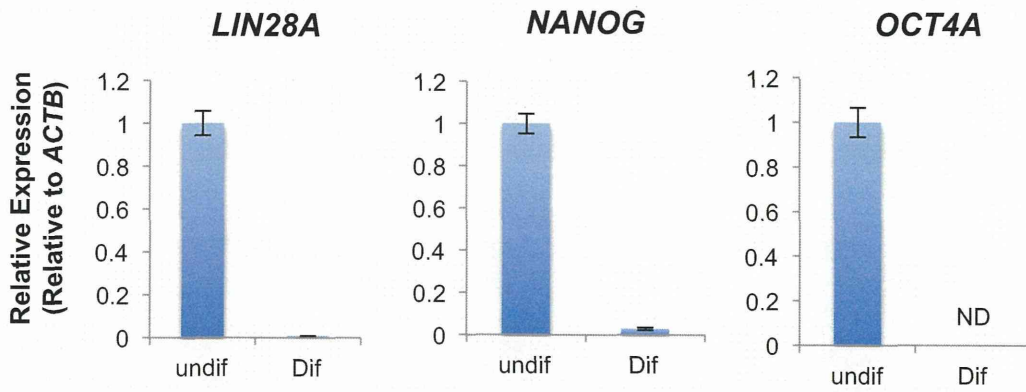
(B) 分化誘導した細胞における *OCT4A*, *NANOG*, *LIN28A* 遺伝子の発現を定量的 PCR 法にて確認した。

(C) 分化誘導した細胞における Troponin-T の発現を免疫染色法にて確認した。青は核 (DAPI) を示す。

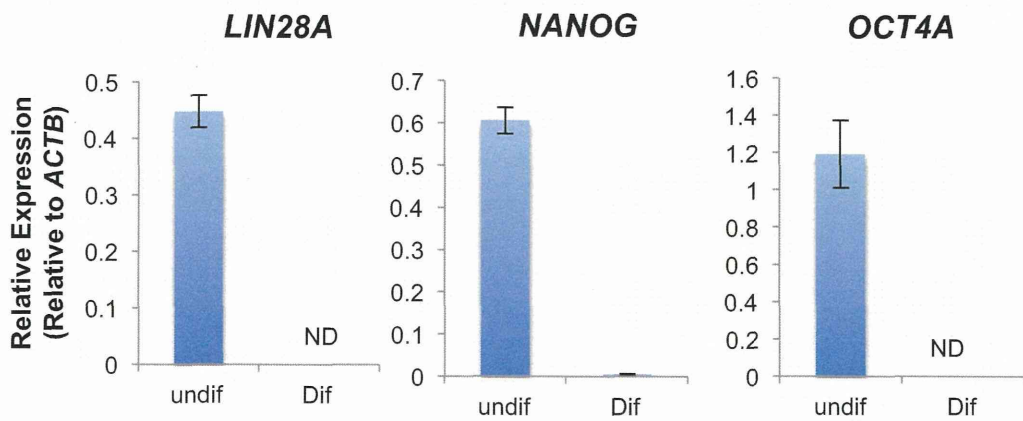


**B**

正常ヒト由来 iPS #7

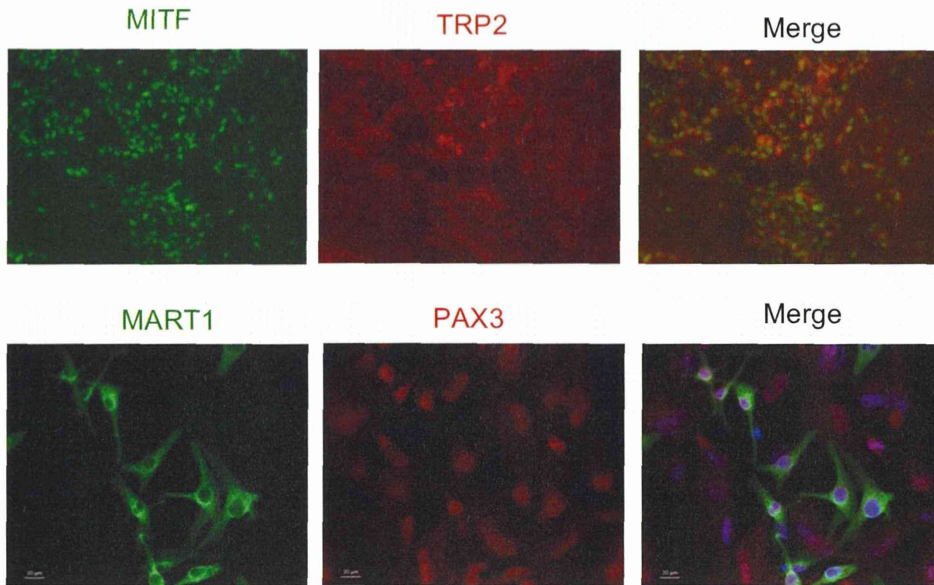


正常ヒト由来 iPS #8

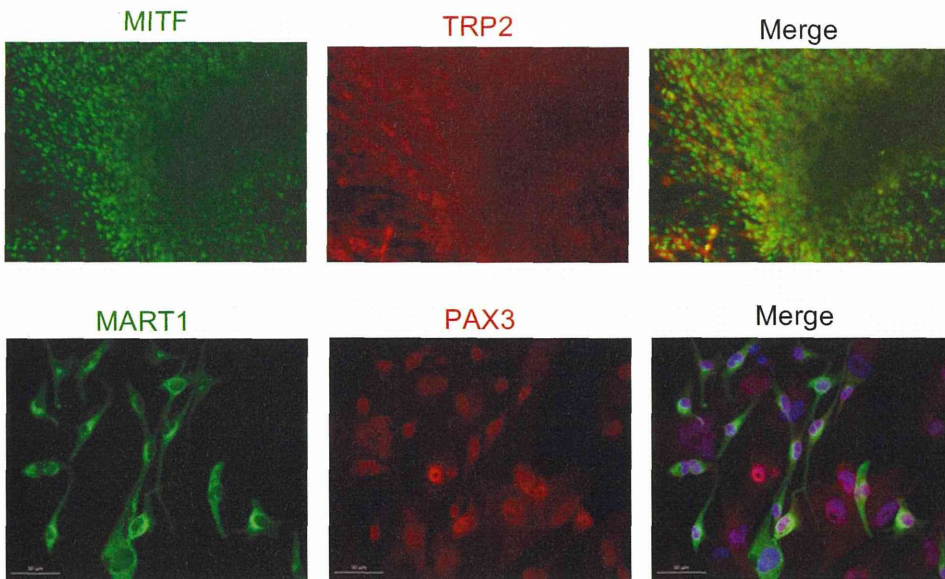


**C**

正常ヒト由来 iPS #7



正常ヒト由来 iPS #8



**D**



図4：作製した iPS 細胞のメラノサイトへの分化誘導

(A) 分化誘導した 11 日目の細胞における CD271 (NGFR/p75), CD57 (HNK1)の発現をフローサイトメトリー法にて確認した。

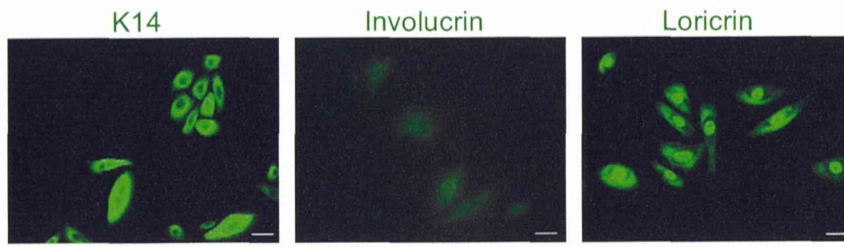
(B) 分化誘導した 26 日目の細胞における *OCT4A*, *NANOG*, *LIN28A* 遺伝子の発現を定量的 PCR 法にて確認した。

(C) 分化誘導した細胞における MITF (緑), DCT (赤), MART1(緑) , PAX3(赤)の発現を免疫染色法にて確認した。青は核 (DAPI) を示す。

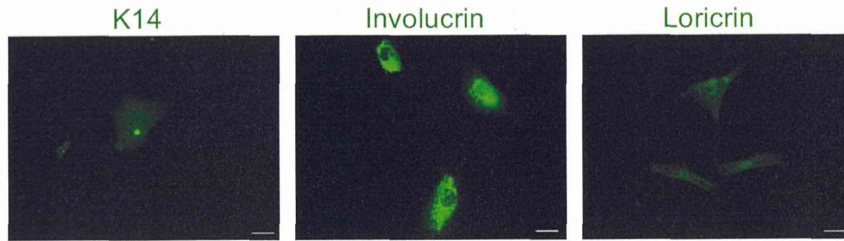
(D) 分化誘導した細胞のメラニン産生を示す。

**A**

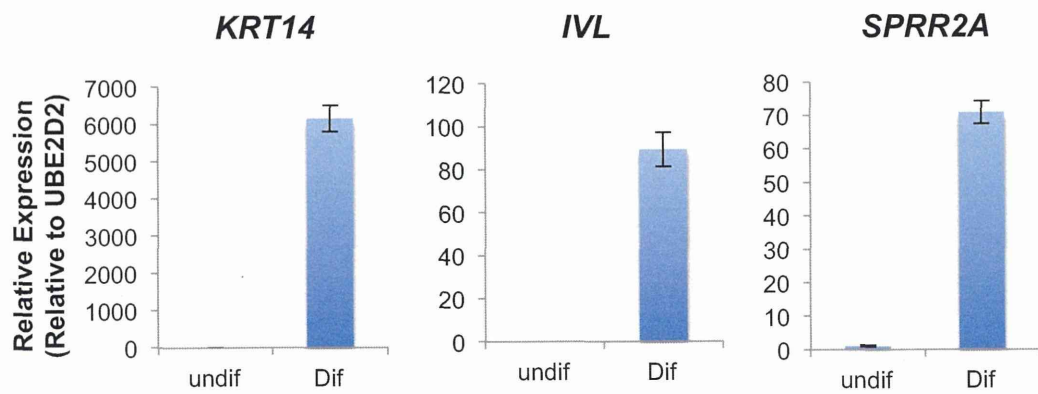
正常ヒト由来 iPS #7



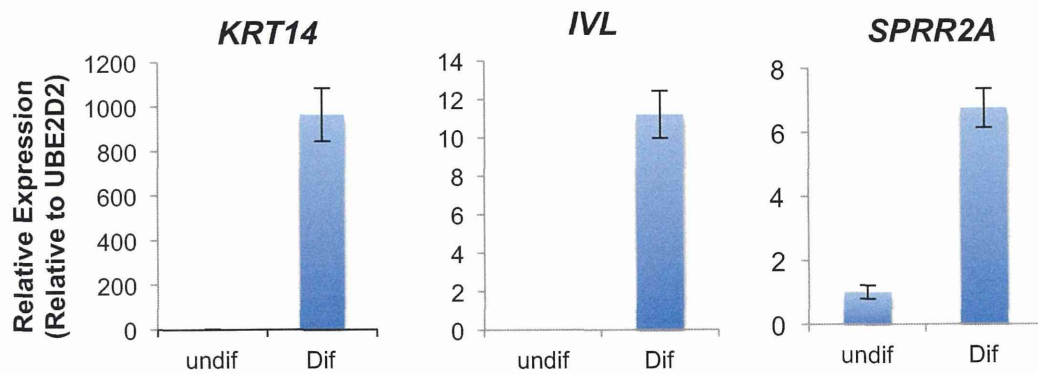
皮膚疾患ヒト由来 iPS #1

**B**

正常ヒト由来 iPS #7



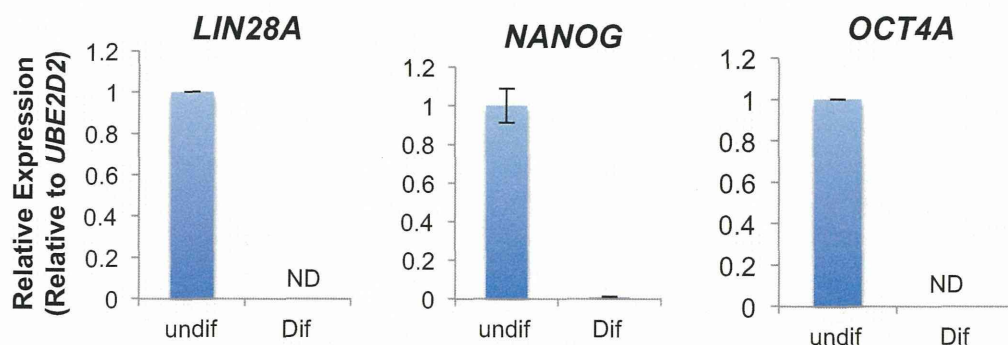
皮膚疾患ヒト由来 iPS #1





**C**

正常ヒト由来 iPS #7



皮膚疾患ヒト由来 iPS #1

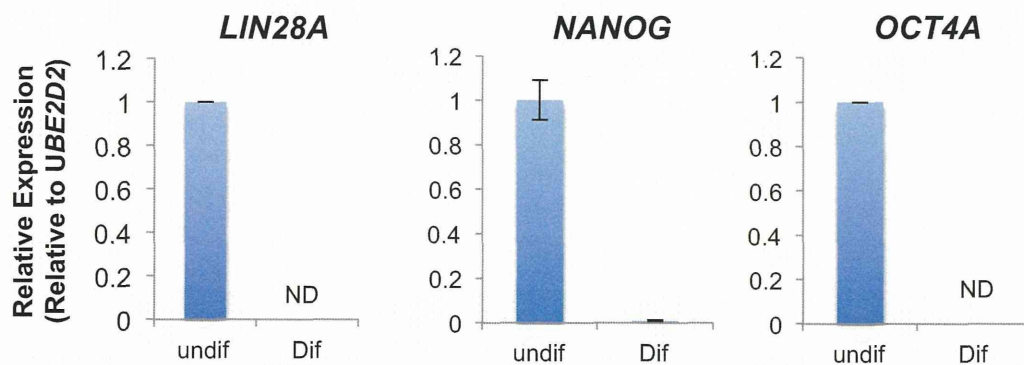


図 5 : 作製した iPS 細胞のケラチノサイトへの分化誘導

(A) 分化誘導した 30 日目の細胞における Keratin 14 (K14)、Involucrin、Loricrin の発現を免疫染色法にて確認した。

(B) 分化誘導した 30 日目の細胞における *KRT14*, *IVL*, *SPRR2A* 遺伝子の発現を定量的 PCR 法にて確認した。

(C) 分化誘導した 30 日目の細胞における *LIN28A*, *NANOG*, *OCT4A* 遺伝子の発現を定量的 PCR 法にて確認した。

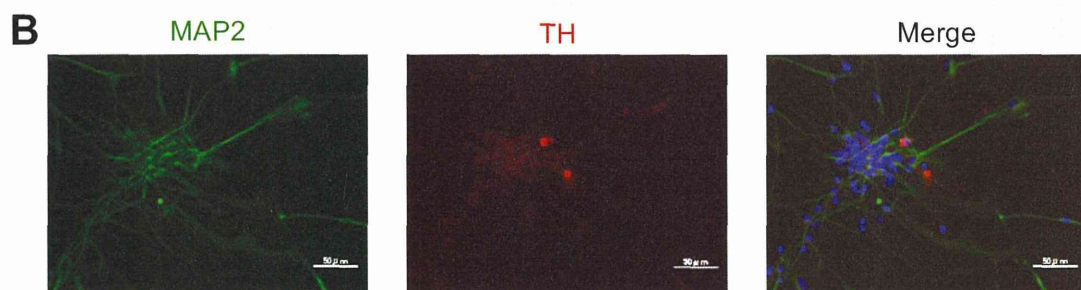
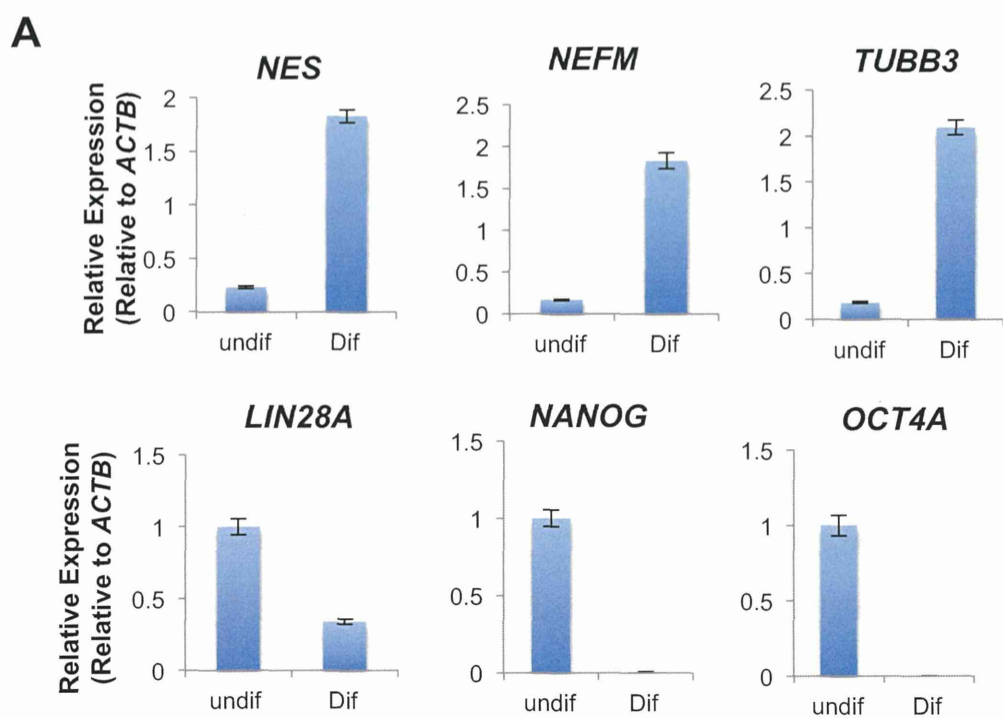


図6：作製した iPS 細胞の神経細胞への分化誘導

(A) 分化誘導し、増殖させた神経幹細胞における *NES*, *NEFM*, *TUBB3*, *LIN28A*, *NANOG*, *OCT4A* の発現を定量的 PCR 法にて確認した。

(B) 分化誘導した神経幹細胞をさらにドパミン産生細胞へと分化誘導し、免疫染色法で MAP2 (緑)、チロシン水酸化酵素 (TH; 赤) の発現を確認した。青は核 (DAPI) を示す。

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
「再生医療早期実用化促進及び汎用性向上のための周辺基盤技術開発」  
分担研究報告書

細胞・腫瘍の各種分子生物学的評価手法の開発と活用および  
モデル動物による腫瘍形成と病理学的評価

研究分担者：佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長

研究分担者：安田 智 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部第三室 室長

研究要旨

本研究は、ヒト多能性幹細胞由来の再生医療等製品／特定細胞加工物の造腫瘍性リスクの質的把握に関し、特に、原材料としての各種ヒト多能性幹細胞の造腫瘍性に与える、ヒト多能性幹細胞の特性指標の同定を目標とする。重度免疫不全マウスである NOG マウスに種類および起源の異なる各種ヒト iPS 細胞 10 株を移植し、腫瘍（結節）を形成させることで、その発生頻度やサイズの相互比較を行った。また造腫瘍性リスクとの関連が示唆されている核型解析を移植するヒト iPS 細胞について行い、さらに網羅的な遺伝子発現データをマイクロアレイによって取得し、移植細胞の特性解析を行った。3 x 10<sup>4</sup> 個の細胞移植時の NOG マウスにおけるヒト iPS 細胞の腫瘍形成率は細胞株で大きく異なり（58 ± 30%）、株間で生着にばらつきがあることが明らかになった。また移植した iPS 細胞の 10 株中 2 株に、多能性幹細胞に頻出する 12 番染色体のトリソミーが観察された。細胞株の網羅的な遺伝子発現プロファイルをもとに階層的クラスタリングを行った結果、作製方法と作製元による株間の類似性に加えて、核型異常を示した 2 株においても株間の類似性が認められた。今後は、本年度に得られた知見に加えて、病理学的な解析等により形成腫瘍の悪性度の評価を行い、腫瘍の形成率や悪性度等に関係する細胞特性指標の探索を行う予定である。

## 研究協力者

堤 秀樹	公益財団法人実験動物中央研究所 試験事業部 部長
黒田 拓也	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 第3室 研究員
草川 森士	公益財団法人 先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 研究員
高田 のぞみ	独立行政法人基盤研究所 難病・疾患資源研究部 研究員
田埜 慶子	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 第1室 研究員
中島 啓行	公益財団法人 先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 研究員
松山 さと子	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 技術補佐員