

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞や ES 細胞などの多能性幹細胞が従来の医療の壁を超える製品を生み出し、病に苦しむ患者に光明をもたらす可能性が大きく期待されている。しかし、iPS 細胞や ES 細胞などから各種の再生医療等製品／特定細胞加工物を開発していく際には、これら多能性幹細胞の特性である造腫瘍性にかかわるリスク対策を講ずる必要がある、これが実用化促進の最大の隘路の一つであるとされている。造腫瘍性のリスク対策には、リスクの量的把握と質的把握が必要であるが、いずれも世界的に十分な検討がなされていない。わが国がこれらの問題解決に必要な技術基盤を世界に先駆けて構築できれば、ヒト iPS/ES 細胞や由来製品に関する研究開発の先駆性と併せ、再生医療実用化における国際的な優位性を確保できると期待される。本研究では、主に造腫瘍性リスクの質的把握に関して、とくに、原材料としての各種ヒト iPS 細胞及び ES 細胞の造腫瘍性に関する発生頻度、悪性度と機序、その検査方法の観点から検討し、対応策等の研究開発を行うことを目的としている。

具体的な戦略としては、まず、各種のヒト iPS 細胞及び ES 細胞を調製し、初期化遺伝子の存在（量）その他の細胞特性を解析するとともに、NOG マウスに移植して腫瘍を形成させ、その発生頻度を相互比較する。NOG マウスは、種差を超えてヒト細胞の腫瘍性細胞に対して免疫拒絶なく、高い生着率で腫瘍形成が期待できる、現在、

最も免疫学的に不全なモデル動物であり、実験動物中央研究所において開発されたものである。ヒト iPS 細胞及び ES 細胞の特性解析プロトコール、および NOG マウスへの移植試験プロトコールを確立した後、各細胞からの形成された腫瘍の特性について、「良性か悪性か」や「悪性度」を含めて、病理学的手法や各種分子生物学的手法を駆使して解析し、悪性度等とその他の細胞特性指標の関係を検討する。また、iPS 細胞の培養条件の差異や製品細胞の移植部位の微小環境が移植時の奇形腫の悪性化に関与する可能性を検証する。これらをふまえて、腫瘍の悪性度に関する検査方法を確立するとともに、より安全な原材料としての多能性細胞を選択すべく対策を講ずることを予定している。平成 26 年度の本分担研究においては、樹立の際に用いた細胞種と作製法が異なる各種ヒト iPS 細胞を、NOG マウスに移植し腫瘍（結節）を形成させることで、その発生頻度やサイズを相互比較し、細胞株により腫瘍形成速度が異なることなどを観察した。

B. 研究方法

B-1 使用動物

本実験に用いた SPF の NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic (NOG マウス) およびは日本クレアから入手し、公益財団法人 実験動物中央研究所のバリア区域内の専用飼育室内で飼育した。NOG マウスは、6 週齢の雄を搬入し、1-2 週間の馴化期間の後に細胞の移植を行った。

ケージはマウス Hi-TPX ケージ（日本クレア、155×245×148mm）を使用し、ケージ内動物数は最高 3 匹、ケージ交換回数は週 1 回、給餌方法は自由摂取とした。

B-2 ヒト iPS 細胞移植試験

本研究では、10 株のヒト健常細胞由来 iPS 細胞株（201B7、253G1、409B2、454E2、ATCC-DYR0100、ATCC-HYR0103、mc-iPS、HiPS-RIKEN-1A、HiPS-RIKEN-2A、および HiPS-RIKEN-12A）を用いた。201B7、253G1、409B2、454E2、HiPS-RIKEN-1A、HiPS-RIKEN-2A および HiPS-RIKEN-12A は、理研バイオリソースセンターより入手した。ATCC-DYR0100 および ATCC-HYR0103 は、ATCC より入手した。mc-iPS は、System Biosciences より入手した。iPS 細胞作製に用いたヒト健常細胞およびその iPS 細胞作製法は Table 1 で示した。フィーダー細胞を用いた iPS 細胞培養は、マイトマイシン C（和光純薬）処理した SNL 細胞（マウス線維芽細胞 STO 株にネオマイシン耐性遺伝子および LIF を発現させた細胞）上において、4 ng/ml ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF、和光純薬）を添加したヒト ES 細胞培地（リプロセル）中で培養することにより行った。フィーダーレスのヒト iPS 細胞培養は、マトリゲル（Corning）でコートしたディッシュまたはプラスチック内で、mTeSR1 培地（STEMCELL Technologies）にて培養し

た。ヒト iPS 細胞は、オンフィーダー培養からフィーダーレス培養に切り替え、フィーダーレスの状態ですべて 3 回継代することで馴化させた後、動物への投与に用いた。

健常ヒト繊維芽細胞（Neonatal Normal Human Dermal Fibroblasts: NHDF）は、Lonza 社のものを購入し、10% ウシ胎児血清と抗生物質（ペニシリン/ストレプトマイシン）を含む MEM 培地で培養・継代した。NHDF は、移植日前日にマイトマイシン C を培地に 10 µg/ml の濃度で添加し、37℃/5% CO₂ 条件下で 3 時間インキュベートすることで、分裂増殖を停止させる処理を施した。

ヒト iPS 細胞の造腫瘍性試験は、平成 25 年度の本課題報告書において我々が至適化した Grop らの報告（PLoS ONE 2012; 7(9): e45532.）を参考とした方法で行った。iPS 細胞は、Accutase（Life Technologies）を用い、単一細胞までの分散処理を施し、mTeSR1 培地で懸濁し細胞数を調整した。一方、NHDF はトリプシン/EDTA を用いて分散処理を施し、mTeSR1 培地で懸濁し細胞数を調整した。移植に際しては、ROCK 阻害剤である Y-27632（和光純薬）を 10 µM 含む培地とマトリゲルで 1:1 の割合で構成された 100 mL の細胞懸濁液を、無麻酔で保定した状態のマウスの後背部皮下に 25G の注射針を付けたシリンジで移植した。NHDF 10⁶ に対し、3 × 10⁴ の iPS 細胞を混入させた細胞懸濁液をマウスへ移植し、触診およびサイズ測定による結節形成の観察を 16 週間

行った。結節体積 (V) は、結節の長径 (a) と短径 (b) から、 $V = 1/2 \times ab^2$ の計算式より算出した。結節体積が 1000 mm³ を超えた場合は、16 週間が経過していなくても、サンプル採取を行った。移植群は以下の 10 群からなる：① 253G1 株、② HiPS-RIKEN-2A 株、③ 409B2 株、④ mc-iPS 株、⑤ 201B7 株、⑥ HiPS-RIKEN-1A 株、⑦ HiPS-RIKEN-12A 株、⑧ ATCC-DYR0100 株、⑨ ATCC-HYR0103 株、⑩ 454E2 株で、一群各 6 例行った。

B-3 核型解析

iPS 細胞のコロニーを培養 (2~5 日) し、増殖中の細胞に分裂阻害剤コルセミドを添加し、中期分裂細胞を回収し、低張処理と固定の後、標本作製を行った。スライド標本作製後、G 分染法 (トリプシンとギムザ染色液を用いて分染を行う) で染色した標本を分析した。分析後の核型表記は ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) の表記法に準じて行った。

B-4 マイクロアレイ解析および統計解析

マイクロアレイ解析は、各細胞株あたり 3 サンプルで行った。iPS 細胞株 10 種類を未分化の状態、6-well プレート (BD Bioscience) にフィーダーレス条件下で 6~7 日間培養したのち、RNeasy mini kit (キアゲン) を用いて total RNA を抽出し

た。各 RNA の品質評価は Agilent RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies) を用いて、28S と 18S の rRNA 比率を算出することにより純度を確認した。RNA サンプルのビオチンラベル化 cRNA 合成は、GeneChip 3' IVT Express kit (Affymetrix) を用いて、製品プロトコールに従って行った。GeneChip Hybridization Oven (Affymetrix) を用いて、Genechip アレイ Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) に作製したビオチンラベル化 aRNA をハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後、GeneChip Wash and Stain Kit (Affymetrix) と GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) を用いて洗浄とフィコエリスリン染色を行った。その後、GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix) を用いて Genechip アレイの蛍光画像をスキャンし、イメージ画像を取得した。得られた蛍光強度のデータは Expression Console Ver.1.1 (Affymetrix) を用いて解析した。シグナルのノーマライズは MAS5 アルゴリズム、および MSK ファイル (Affymetrix) を用いて行った。この際、Target Intensity は 500 に設定した。細胞株 10 種類のうちで発現量に有意な差のある遺伝子を抽出するために、以下の 3 種類のフィルターをかけることにより統計解析を行った。

フィルター①: 遺伝子の発現が見られる probe set を選ぶために、アレイシグナルの Absolute Analysis (発現の有無を判定する解析) の結果、各細胞株のうち 2/3 以上で

遺伝子発現あり (Present) と判断されること。

フィルター②: 蛍光シグナルの値が閾値 (1.7) 以上である細胞株が 1 株以上あること。

フィルター③: 細胞株による遺伝子発現の差を比較するためには細胞株間で差があるものを選ぶ必要があるため、一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) において細胞株間の遺伝子発現の平均値の比較を行ったとき、有意水準 5% の条件で帰無仮説が棄却できること。

フィルター④: 細胞株間での差が小さいと遺伝子発現に相関が無いものまで相関があるとして検出されてしまう危険性があるため、10 細胞株の最低の平均値と最高の平均値の差が 5 倍以上あること。

細胞株間の遺伝子発現プロファイルの類似性を検討するため、上記のフィルターにより抽出された probe set 3777 個において、SYSTAT 13 ソフトウェア (HULINKS) を用いた階層的クラスタリングを行った。解析は、Distance Metric として Euclidean Distance を用い、Ward Minimum Variance Method によって行った。

(倫理面への配慮)

動物実験を行う際には、国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」および公益財団法人実験動物中央研究所「動物実験等に関する規程」に基づき、実験内容の審査と承認をうけた上で実

施した。指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施した。また、ヒト由来の生体試料を用いる場合は、国立医薬品食品衛生研究所「研究倫理審査委員会規程」を遵守した上で研究を実施した。

C. 研究結果

C-1 iPS 細胞移植試験

本研究では、T 細胞、B 細胞および NK 細胞を欠損する重度免疫不全マウスモデルである NOG マウスにおいて、各種ヒト iPS 細胞株の生着性の差異を検討するため、結節形成の有無およびそのサイズを経時的に観察した。本実験では、ヒト iPS 細胞を投与する際の条件として、線維芽細胞、マトリゲルおよび Rho キナーゼ阻害剤を混合させた。線維芽細胞と細胞外マトリックスタンパク質を多く含むマトリゲルは、足場依存性増殖を示す細胞の生着性を上昇させることが知られている。またヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に酵素処理等で単一細胞まで分散するとアポトーシスを起こすという特性を有しており、Rho キナーゼ阻害剤は多能性幹細胞のアポトーシス抑制効果を示すことが報告されている。クランプの状態ではなく、単一細胞に分散させたヒト iPS 細胞の NOG マウスへの生着が可能になったことで、高感度でより定量性のあるヒト多能性幹細胞の造腫瘍性試験を行うことができる。今回は、国内で一般的に入手可能なヒト iPS 細胞 10 株を移植実験に用いた。投与した iPS 細胞数は 1 匹当たり 3×10^4 個とし、その数は 201B7 株の

TPD₅₀ (6.3×10^2)のおよそ 50 倍であり、201B7 株を移植した場合において、ほぼ全数に生着する細胞数と想定される。ヒト iPS 細胞 10 株を NOG マウスに移植し結節形成の観察を行い、現在までに、①253G1 株、②HiPS-RIKEN-2A 株、③409B2 株、④mc-iPS 株においては 14 週間、⑤201B7 株、⑥ HiPS-RIKEN-1A 株、⑦ HiPS-RIKEN-12A 株、⑧ATCC-DYR0100 株、⑨ATCC-HYR0103 株、⑩454E2 株においては 10 週間までの観察結果が得られている。また、移植前の iPS 細胞に関して核型解析を行った。

⑪ 253G1 株

移植後 4 週目に最初の結節形成が 1 匹のマウスに認められ、7 週目に新たに 4 匹のマウスに結節形成が見られた。14 週目の時点で、結節形成率は 83%であった。結節体積に関しては、1 匹において 12 週目に 1000 mm^3 を超えた結節が認められた。他の 4 匹においては結節の大きさ自体はばらばらついているが、11 週目から大きさが一定となる傾向が見られた。核型解析においては、染色体異常は認められず、分析結果は 46,XX[20]であった (Figure 1)。

⑫ HiPS-RIKEN-2A 株

移植後 5 週目に最初の結節形成が 1 匹のマウスに認められ、その後に新たな結節形成は見られなかった。14 週目の時点で、結節形成率は 17%であった。結節体積に関しては、1 匹において 8 週目に 1000 mm^3 を超えた結節が認められた。核型解析においては、染色体異常は認められず、分析結

果は 46,XX[20]であった (Figure 2)。

⑬ 409B2 株

移植後 5 週目に最初の結節形成が 1 匹のマウスに認められ、その後 7 週目に新たな結節形成が 3 匹のマウスに見られた。14 週目の時点で、結節形成率は 50%であった。結節体積に関しては、急激に大きくなる結節はなく、14 週目の時点ですべて 300 mm^3 未満であった。核型解析においては、染色体異常は認められず、分析結果は 46,XX[20]であった (Figure 3)。

⑭ mc-iPS 株

移植後 7 週目に最初の結節形成が 4 匹のマウスに認められ、その後、新たな結節形成は見られなかった。14 週目の時点で、結節形成率は 67%であった。結節体積に関しては、 1000 mm^3 を超えた結節はないが、14 週目の時点で $100\sim 1000 \text{ mm}^3$ とばらつきが認められた。核型解析においては、観察した 20 細胞すべてにおいて 12 番染色体の数が 3 本になるトリソミーが見られ、分析結果は 47,XY,+12[20]であった (Figure 4)。

⑮ 201B7 株

移植後 6 週目に最初の結節形成が 1 匹のマウスに認められ、その後、7 週目に 1 匹、9 週目に 3 匹、10 週目に 1 匹のマウスに結節形成が見られた。10 週目の時点で、結節形成率は 83%であった。結節体積に関しては、形成時期の早い結節で体積が大きい傾向が見られた。核型解析においては、染色体異常は認められず、分析結果は 46,XX[20]であった (Figure 5)。

⑩ HiPS-RIKEN-1A 株

移植後7週目に最初の結節形成が1匹のマウスに認められ、9週目に2匹のマウスに結節形成が認められた。10週目の時点での結節形成率は50%であった。結節体積に関しては、10週目の時点ではすべて300 mm³未満であった。核型解析においては、染色体異常は見られず、分析結果は46,XX[20]であった (Figure 6)。

⑪ HiPS-RIKEN-12A 株

移植後9週目に最初の結節形成が1匹のマウスのみ認められた。10週目の時点での結節形成率は17%であった。結節体積に関しては、10週目の時点で300 mm³未満であった。核型解析においては、染色体異常は見られず、分析結果は46,XY[20]であった (Figure 7)。

⑫ ATCC-DYR0100 株

移植後4週目に最初の結節形成が1匹のマウスに認められ、6週目に1匹、7週目に1匹、9週目に1匹、10週目に1匹のマウスに結節形成が見られた。10週目の時点で、結節形成率は83%であった。結節体積に関しては、1000 mm³を超える結節が2匹のマウスで認められ、結節の大きさにばらつきが見られた。核型解析においては、染色体異常は認められず、分析結果は46,XY[20]であった (Figure 8)。

⑬ ATCC-HYR0103 株

移植後9週目に最初の結節形成が2匹のマウスに認められた。10週目の時点での結節形成率は33%であった。結節体積に関しては、まだ1000 mm³を超えるに至って

いない。核型解析においては、染色体異常は見られず、分析結果は46,XY[20]であった (Figure 9)。

⑭ 454E2 株

移植後4週目に最初の結節形成が3匹のマウスに認められ、その後7週目に新たな結節形成が3匹のマウスに見られた。14週目の時点で、結節形成率は100%であった。結節体積に関しては、1匹のみ1000 mm³を超えているが、他の5匹に関しては徐々に大きくなる結節が認められた。核型解析においては、mc-iPS細胞株と同様に、観察した20細胞すべてにおいて12番染色体のトリソミーが見られ、分析結果は47,XX,+12[20]であった (Figure 10)。

①から⑭までの、結節を呈した匹数と供試匹数と結節形成率および核型解析結果を、Tables 2 and 3 にまとめた。

各マウスで形成された結節は、それぞれ単離し、4%パラホルムアルデヒド溶液保存またはRNAlater (Life Technologies) 溶液中に凍結保存する。今後、パラホルムアルデヒド溶液保存したサンプルについては、病理組織標本作製し、iPS移植によってNOGマウスで形成された結節の特性解析を行う予定である。具体的には、結節がヒト細胞由来であること、健常なiPS細胞生着の指標となる3胚葉分化した良性腫瘍(テラトーマ)であること等を、各種染色法、免疫組織化学的解析によって確認する予定である。またRNAlaterに保存されたサンプルに関しては、RNAを抽出後、がん関連遺伝子等の定量PCRを行い、結節

の悪性度の評価を分子生物学的に行う予定である。

C-2 iPS 細胞株のマイクロアレイ解析

原材料としての iPS 細胞の造腫瘍性に関する品質評価においては、細胞の *in vivo* 造腫瘍性試験における結節形成率や悪性度に加えて網羅的な遺伝子発現解析等の細胞特性解析を行い、造腫瘍性に関連する細胞特性を把握する必要がある。将来的に造腫瘍性との相関が認められる何らかの因子が同定できれば、その因子の発現量を基に細胞の品質評価を行い、iPS 細胞の細胞加工物/再生医療等製品の原材料としての適格性を評価することが可能となる。

本年度の研究では、まず細胞特性解析の一環として投与した iPS 細胞の網羅的な遺伝子発現解析であるマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現プロファイルにもとづく階層的クラスタリングによる細胞株間の類似性を検討した。細胞株の遺伝子発現プロファイルの類似性において、

1. 409B2 株
 2. 454E2 株と mc-iPS 株
 3. 201B7 株と 253G1 株
 4. HiPS-RIKEN-12A 株、HiPS-RIKEN-1A 株、HiPS-RIKEN-2A 株、ATCC-HYR0103 株と ATCC-DYR0100 株
- の 4 つのグループに分けられることが示された (Figure 11)。

D. 考察

本研究課題では、ヒト iPS/ES 細胞株間の NOG マウスにおける造腫瘍性の質的な差を検討することが大きな目的となっている。造腫瘍性に関する細胞株の内因的な性質の差を捉えるためには、移植時の細胞の状態を可能な限り均一な状態に揃える必要がある。昨年度の報告書において、単細胞に分散させたヒト iPS 細胞を、フィーダー細胞として用いられるヒト新生児由来繊維芽細胞、分散誘導性アポトーシスを抑制する ROCK 阻害剤および細胞外マトリックスに富むマトリゲルを同時投与することにより、ヒト iPS 細胞を NOG マウスに移植した際の生着性・造腫瘍性が上昇することを示した。今回は、この至適化を行った投与条件を用いて、種類および起源が異なるヒト iPS 細胞株の NOG マウスへの移植を行い、腫瘍（結節）形成のモニターを行った。さらに造腫瘍性リスクとの関連が示唆されている核型解析も移植したヒト iPS 細胞について行い、また移植した細胞の特性解析を行うに当たり、網羅的な遺伝子発現データをマイクロアレイにより取得した。

今回の移植に用いたヒト iPS 細胞は、樹立の際に用いた細胞が、皮膚線維芽細胞、臍帯由来線維芽細胞、脂肪肝細胞、肝線維芽細胞または歯髄細胞と多岐に渡っている。また iPS 細胞の作製法も、導入方法についてはレトロウイルスベクター、エピソーマルベクターまたはプラスミドベクターを用いており、リプログラミングの初期化因子については Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、l-Myc、Lin28、p53shRNA の組み合わせと

多様である。したがって、これらの iPS 細胞 10 株を用いた造腫瘍性試験を行うことにより、全般的なヒト iPS 細胞株間の造腫瘍性におけるばらつきを把握できると考えられる。今回の移植に用いた細胞数は、1 匹当たり 3×10^4 個であり、201B7 細胞株の TPD_{50} (6.3×10^2) のおよそ 50 倍であり、201B7 細胞株であれば、ほぼ全数のマウスに生着することが想定される細胞数である。また観察予定期間は 16 週間を予定しているが、昨年度の報告において移植後 9 週間で 201B7 細胞株の TPD_{50} がほぼ安定することを我々は既に示している。14 週目 (4 株) および 10 週目 (6 株) での各種 iPS 細胞株の結節形成率の平均 \pm SD 値は、 $58 \pm 30\%$ であった。これらの iPS 細胞株の結節形成率の違いは、細胞増殖速度、細胞分化速度、細胞生存率、悪性度などが影響することが考えられるが、解明のためには形成した結節の病理学および分子生物学的な解析を、今後行っていく必要があると思われる。

造腫瘍性リスクとの関連が示唆されている核型においては、mc-iPS 細胞株および 454E2 細胞株で染色体異常が観察され、他の 8 株においては正常であった。mc-iPS 細胞株および 454E2 細胞株での結節形成率は、それぞれ 67% および 100% であった。mc-iPS 細胞株および 454E2 細胞株で認められた染色体異常は、共に 12 番染色体が 3 本となるトリソミーであった。The International Stem Cell Initiative の報告によると、ヒト ES 細胞 125 株とヒト iPS

細胞 11 株を用いた核型解析において、34% の ES 細胞株と 27% の iPS 細胞において染色体異常が見られ、これらの異常は一般に 1、12、17、および 20 番染色体における変化であった。特に 12 番染色体のトリソミーは、すべての核型異常を示す iPS 細胞株で認められたが、樹立時に用いた体細胞には認められなかった (Nat Biotechnol. 2011;29:1132-44.)。本研究で用いた iPS 細胞である mc-iPS 細胞株および 454E2 細胞株においては、観察した 20 細胞すべてにおいて核型異常が見られたため、クローニングや培養における適応の過程で、選択的に核型異常を持つ細胞が増殖した可能性が考えられた。実際に、12 番染色体のトリソミーを有するヒト多能性幹細胞は細胞増殖速度が速く、in vivo 造腫瘍性が更新することが報告されている (Ben-David et al. Nat Commun. 2014;5:4825.)。

iPS 細胞株の網羅的遺伝子発現プロファイルにもとづく階層的クラスタリングで、その類似性において 4 つのグループに分類された。1. レトロウイルスベクターを用いて京都大学で樹立された 201B7 と 253G1、2. レトロウイルスベクターを導入した理化学研究所で樹立された HiPS-RIKEN-12A 株、HiPS-RIKEN-1A 株、HiPS-RIKEN-2A 株と ATCC より入手した ATCC-HYR0103 株と ATCC-DYR0100 株、3. 核型異常の見られた 454E2 株と mc-iPS 株、4. 409B2 株である。細胞株の作製元と作製方法による類似性が見られる一方で、12 番染色体トリソミ

一を示した株においても類似性が見られた。また歯髄細胞からエピソーマルベクターを用いて樹立した 409B2 株は、他の細胞株と最も類似性を持たないことも明らかになった。今後は、細胞株間の遺伝子プロファイルの類似性と、悪性度などの造腫瘍性との関連も検討したい。

E. 結論

本研究では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指している。本分担研究においては、本年度は NOG マウスに各種 iPS 細胞を移植し、腫瘍形成率や腫瘍サイズの経時的なモニターを行った。各種 iPS 細胞の造腫瘍性におけるばらつきを把握するとともに、核型解析や網羅的遺伝子発現データ取得による細胞特性解析も行った。今後は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。

<参考文献>

Gropp M, Shilo V, Vainer G, Gov M, Gil Y, Khaner H, Matzrafi L, Idelson M, Kopolovic J, Zak NB, Reubinoff BE. Standardization of the Teratoma Assay for Analysis of Pluripotency of Human ES Cells and Biosafety of Their Differentiated Progeny. *PLoS ONE*. 2012;vol.7 (9): e45532.

The International Stem Cell Initiative. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon

conferring growth advantage. *Nat Biotechnol*. 2011;29:1132-44.

Ben-David U, Arad G, Weissbein U, Mandefro B, Maaimon A, Golan-Lev T, Narwani K, Clark AT, Andrews PW, Benvenisty N, Carlos Biancotti J. Aneuploidy induced profound changes in gene expression, proliferation and tumorigenicity of human pluripotent stem cells. *Nat Commun*. 2014;5:4825.

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Okura H, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y. Characterization of *in vivo* tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2Ry^{null} mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *Regen Ther.*, in press.
2. Kono K, Takada N, Yasuda S, Sawada R, Niimi S, Matsuyama A, Sato Y. Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells. *Biologicals.*, in press.
3. Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y. A novel *in vitro* method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system. *PLoS One*. 2014;9:e110496.
4. 佐藤陽治 再生医療と薬学 ファルマシア 2014;50:1213-5.
5. 佐藤陽治 ヒト多能性幹細胞加工製品に残存する未分化多能性幹細胞の高感度検出法の開発 再生医療 2014;13:432-5.
6. 村岡ひとみ, 佐藤陽治 再生医療・細胞治療の規制動向とレギュラトリー

- サイエンス DDS. 2014;29:207-16.
7. 中島啓行, 佐藤陽治 薬事法改正と再生医療等安全性確保法を踏まえた再生医療／細胞治療の開発 フォームステージ 2014;10:1-5.
 8. 三浦巧, 佐藤陽治 再生医療・細胞治療に使用する細胞加工物の品質・安全性評価の原則と造腫瘍性の考え方 谷本学校毒性質問箱 2014;16:1-10.
 9. 佐藤陽治 再生医療／細胞治療における細胞培養に関する規制 『再生医療の細胞培養技術開発と応用展開』(監修:紀ノ岡正博) 株式会社シーエムシー出版, 東京 (2014), pp. 27-36.
 10. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療製品の造腫瘍性評価 最新医学 2014;69(3)増刊号:745-765.
 11. 佐藤大作, 佐藤陽治 規制関連 『再生医療用語集』(印刷中)
 12. 村岡ひとみ, 佐藤陽治 再生医療・細胞治療の臨床研究から実用化までの道のり *Geriatric Medicine (老年医学)* 2014;52(3):237-239.
 13. 佐藤陽治 ヒト iPS 細胞由来移植細胞中に混入する造腫瘍性細胞／未分化細胞の in vitro 検出法 *Cytometry Research* 2014;24(1): 7-11.
 14. 安田智, 佐藤陽治 再生医療製品の品質関連規制と対応の留意点 『動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術』(編集:技術情報協会) 技術情報協会, 東京 (2014), pp. 517-22.
- G-2 学会発表**
1. 草川森士, 安田智, 黒田拓也, 川真田伸, 佐藤陽治 軟寒天コロニー形成試験を応用した再生医療製品に混在する悪性形質転換細胞の高感度検出法 第 14 回再生医療学会総会, 横浜 (2015 年 3 月 19-21 日)
 2. 田埜慶子, 安田智, 黒田拓也, 梅澤明弘, 佐藤陽治 ヒト多能性幹細胞由来再生医療製品中に残存する未分化細胞をダイレクトに検出する方法の開発 第 14 回再生医療学会総会, 横浜 (2015 年 3 月 19-21 日)
 3. 高田のぞみ, 河野健, 安田智, 澤田留美, 新見伸吾, 松山晃文, 佐藤陽治 細胞増殖特性を利用した不死化細胞検出試験法の性能評価 第 14 回再生医療学会総会, 横浜 (2015 年 3 月 19-21 日)
 4. Sato Y. Tumorigenicity Tests for the Quality and Safety of Cell-Based Therapeutic Products. IABS Workshop, Tokyo (2015 年 2 月 18-19 日)
 5. Yasuda S. The New Japanese Regulatory Framework for Regenerative Medicine & Cell Therapy. World Stem Cell Summit 14, San Antonio (2014 年 12 月 3-5 日)
 6. 佐藤陽治 ヒト／動物細胞加工製品の品質確保に関する基本的考え方 レギュラトリーサイエンス学会シンポジウム～再生医療等製品の承認審査と再生医療新法～, 東京 (2014 年 11 月 25 日)
 7. 佐藤陽治 細胞技術の許認可の実情-再生医療に関する日本の新しい規制の枠組み- 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会, 東京 (2014 年 11 月 18 日)
 8. Kusakawa S, Yasuda S, Kuroda T, Kawamata S, Sato Y. A new soft agar colony formation assay based on high-content imaging for sensitive detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. Global Controls in Stem Cells, Singapore (2014 年 11 月 5-7 日)
 9. 佐藤陽治 ヒト由来移植細胞に混入する多能性幹細胞・造腫瘍性細胞の検出法の性能評価 第 87 回日本生化学大会, 京都 (2014 年 10 月 15-18 日)
 10. Kuroda T, Tachi S, Yasuda S, Kusakawa S, Sato Y. Profiling of Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines for Predicting the Differentiation Propensity. International Society for Stem Cell Research 12 th Annual Meeting, Vancouver (2014 年 6 月 18-21 日)
 11. Tano K, Yasuda S, Umezawa A, Sato Y. A highly efficient culture method for growth and detection of undifferentiated human pluripotent stem cells present as impurities in cell-processed therapeutic products. 20 th International Society for Cellular Therapy, Paris (2014 年 4 月 23-26 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 取得特許

発明者 草川森士, 安田智, 佐藤陽治

出願人【識別番号】803000056

【名称】公益財団法人 ヒューマンサイ
エンス振興財団

特許出願番号 特願 2014-176861

特許出願日 平成 26 年 9 月 1 日

H-2. 実用新案登録

なし

H-3. その他

なし

Table 1 本研究で用いたヒト iPS 細胞株

iPS 細胞株名	由来細胞	導入遺伝子	導入方法
253G1	皮膚線維芽細胞	<i>Oct3/4, Sox2, Klf4</i>	レトロウイルスベクター
HiPS-RIKEN-2A	臍帯由来線維芽細胞	<i>Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc</i>	レトロウイルスベクター
409B2	皮膚線維芽細胞	<i>Oct3/4, Sox2, Klf4, l-Myc, Lin28, p53shRNA</i>	エピソーマルベクター
Human mc-iPS	脂肪幹細胞	<i>Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28</i>	プラスミドベクター
201B7	皮膚線維芽細胞	<i>Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc</i>	レトロウイルスベクター
HiPS-RIKEN-1A	臍帯由来線維芽細胞	<i>Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc</i>	レトロウイルスベクター
HiPS-RIKEN-12A	臍帯由来線維芽細胞	<i>Oct3/4, Sox2, Klf4</i>	レトロウイルスベクター
ATCC-DYR0100 hiPSc	皮膚線維芽細胞	<i>Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc</i>	レトロウイルスベクター
ATCC-HYR0103 hiPSc	肝線維芽細胞	<i>Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc</i>	レトロウイルスベクター
454E2	歯髄細胞	<i>Oct3/4, Sox2, Klf4, l-Myc, Lin28, p53shRNA</i>	エピソーマルベクター

① 253G1

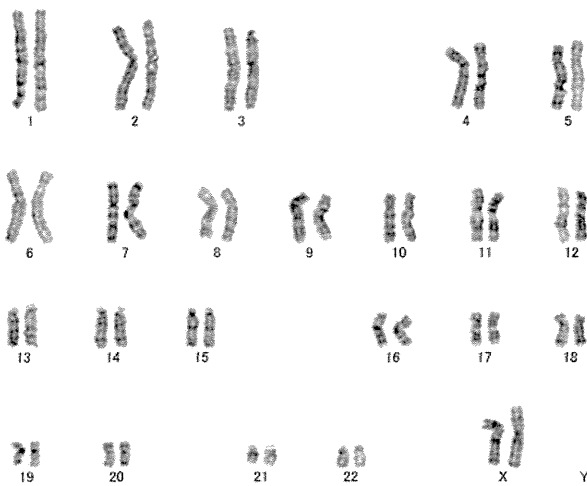
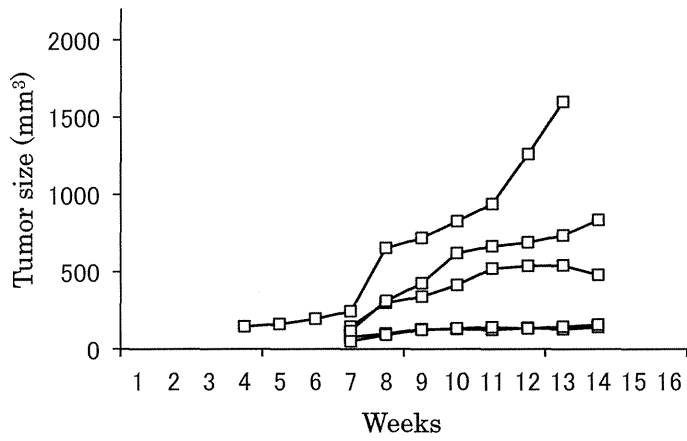
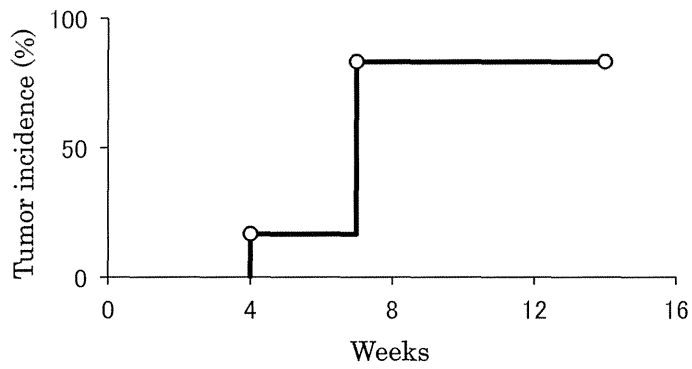


Figure 1 253G1 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化（14 週目まで）および核型解析結果

② HiPS-RIKEN-2A

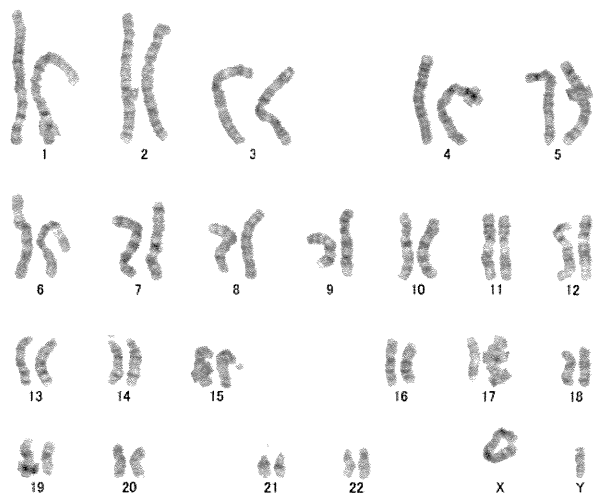
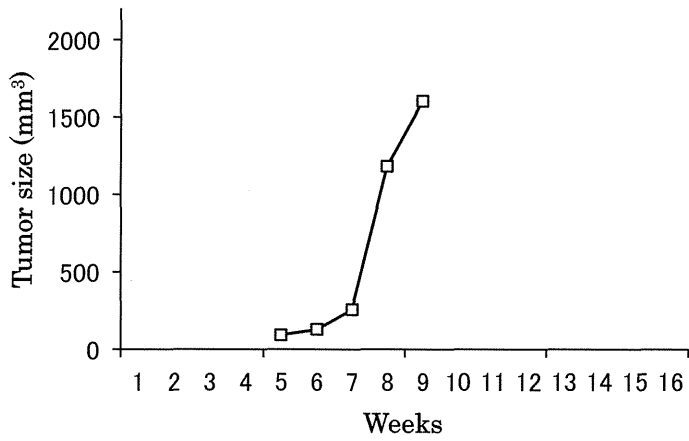
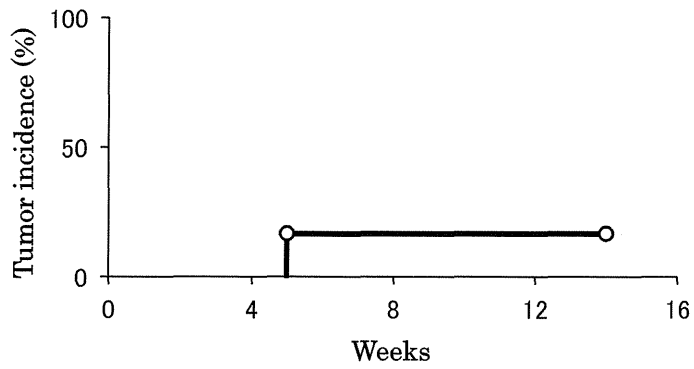


Figure 2 HiPS-RIKEN-2A 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化 (14 週目まで) および核型解析結果

③ 409B2

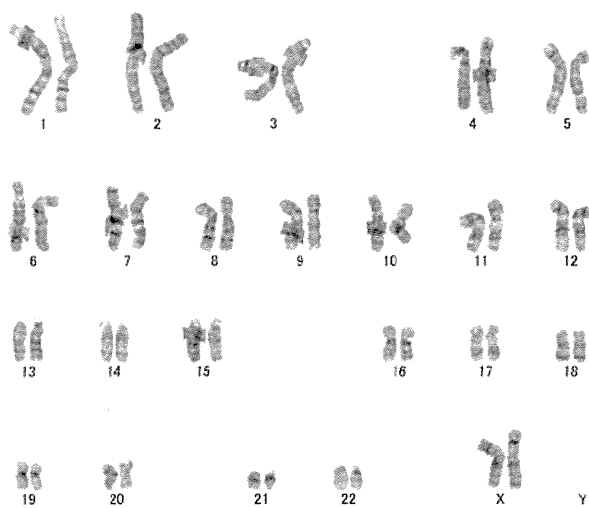
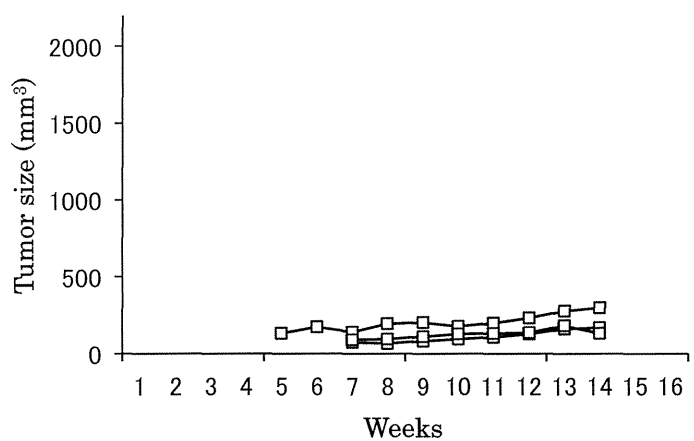
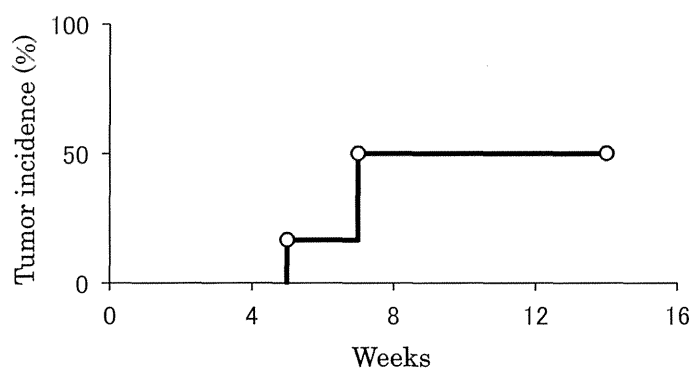


Figure 3 409B2 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化（14 週目まで）および核型解析結果

④ mc-iPS

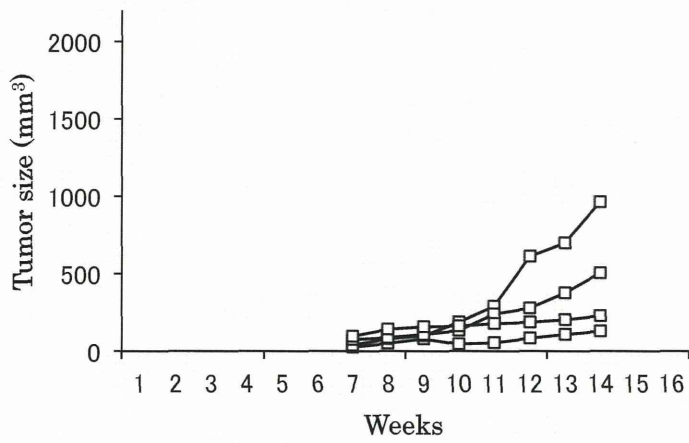
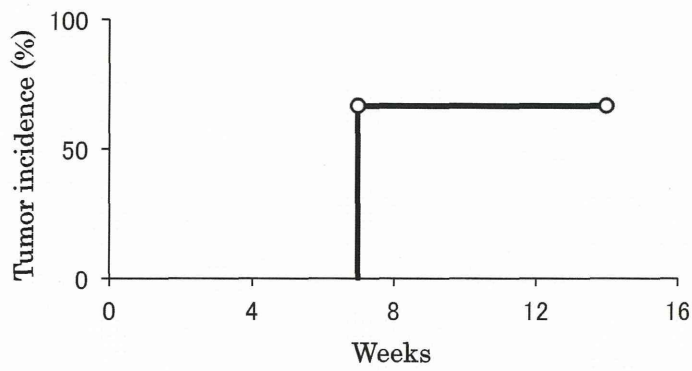


Figure 4 mc-iPS 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化（14 週目まで）および核型解析結果

⑤ 201B7

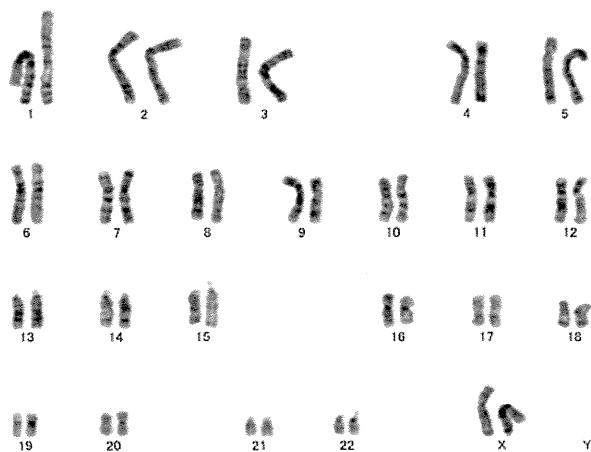
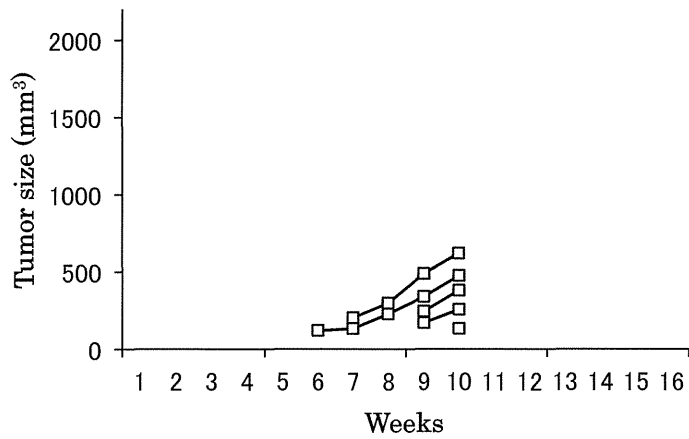
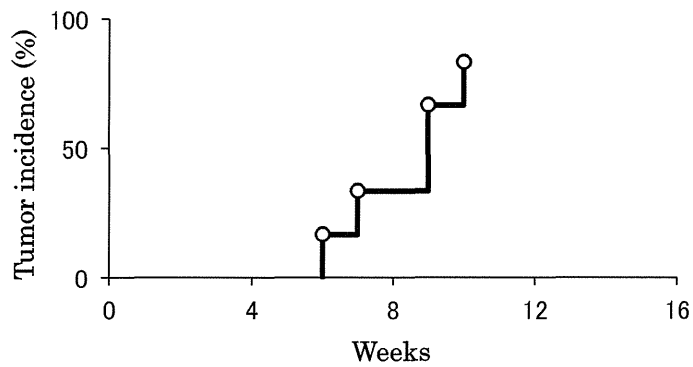


Figure 5 201B7 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化（10 週目まで）および核型解析結果

⑥ HiPS-RIKEN-1A

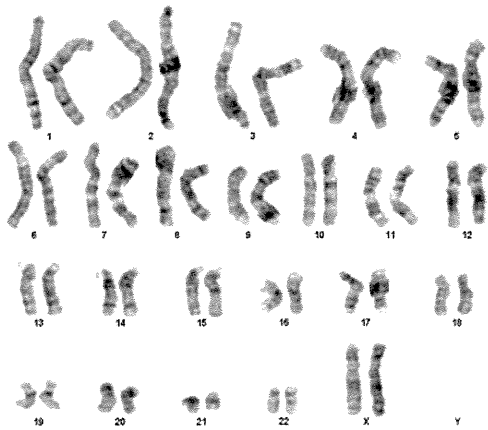
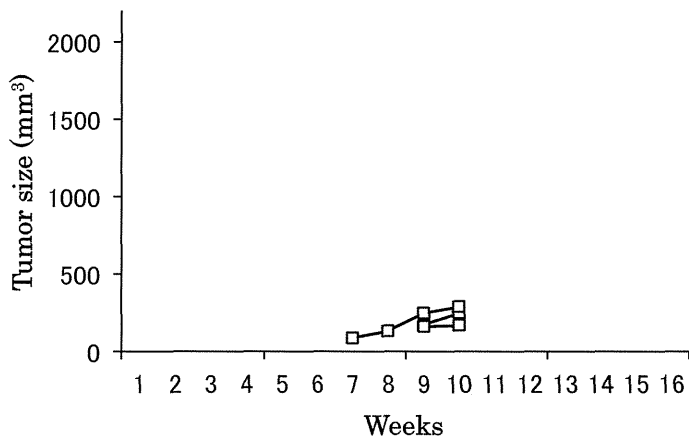
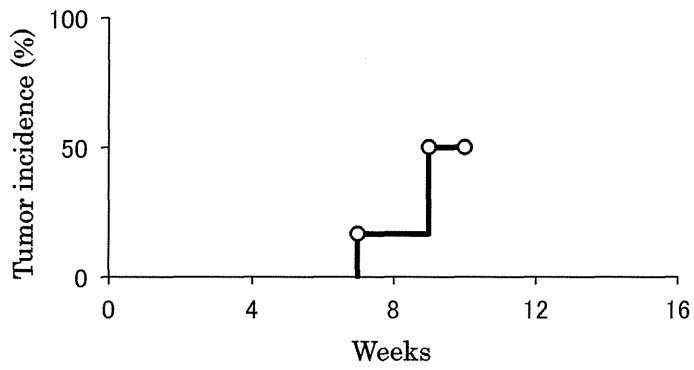


Figure 6 HiPS-RIKEN-1A 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化 (10 週目まで) および核型解析結果

⑦ HiPS-RIKEN-12A

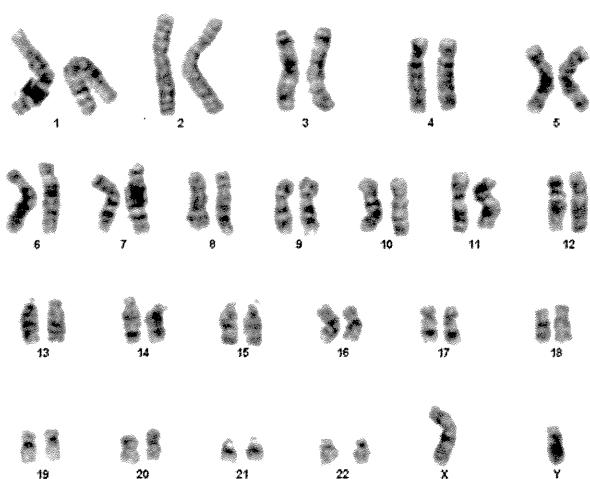
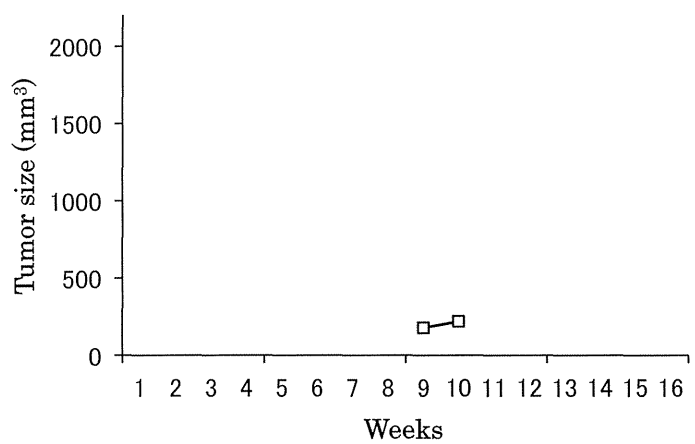
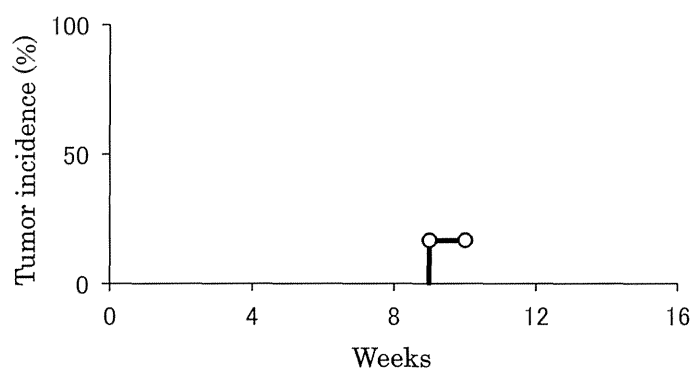


Figure 7 HiPS-RIKEN-12A 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化 (10 週目まで) および核型解析結果

⑧ ATCC-DYR0100

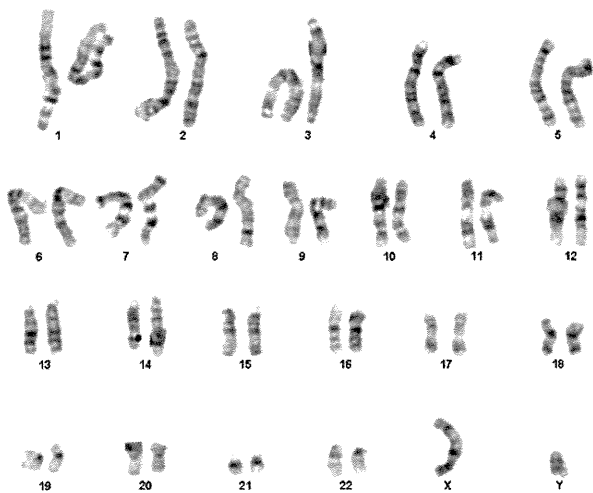
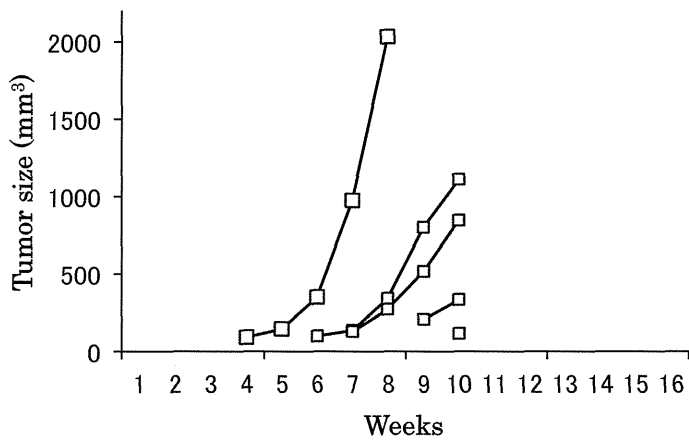
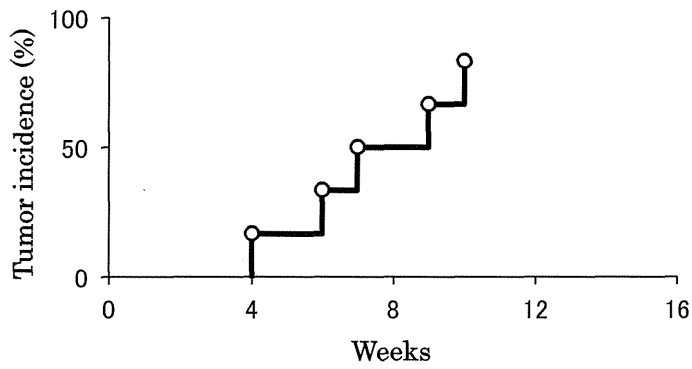


Figure 8 ATCC-DYR0100 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化 (10 週目まで) および核型解析結果