

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, kyoto (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)

Cellular Therapy, Paris (2014年4月23-26
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

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 ヒト iPS 細胞の神経分化誘導プロトコール

分化誘導	培地	添加試薬	
Day 0	KSR 培地 ¹	10 μM SB431542	500 ng/ml Noggin
Day 1	KSR 培地	10 μM SB431542	500 ng/ml Noggin
Day 2	KSR 培地	10 μM SB431542	500 ng/ml Noggin
Day 4	KSR 培地 75% + N2 培地 ² 25%	10 μM SB431542	500 ng/ml Noggin
Day 6	KSR 培地 50% + N2 培地 50%	—	500 ng/ml Noggin
Day 8	KSR 培地 25% + N2 培地 75%	—	500 ng/ml Noggin
Day 10	細胞回収, RNA 抽出		

¹KSR 培地 : DMEM/F12 (Gibco), 20% KSR (Gibco), 0.1 mM β-Mercaptoethanol

²N2 培地 : Neurobasal Medium (Gibco), 100 × N2 supplement (Gibco)

Table 2 ヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導プロトコール

分化誘導	培地	添加試薬
Day 0	RPMI/B27 (w/o insulin) 培地 ¹	12 μM CHIR99021
Day 1	RPMI/B27 (w/o insulin) 培地	—
Day 3	RPMI/B27 (w/o insulin) 培地	5 μM IWP-4
Day 5	RPMI/B27 (w/o insulin) 培地	—
Day 7	RPMI/B27 培地 ²	—
Day 10	RPMI/B27 培地	—
Day 13	RPMI/B27 培地	—
Day 15	細胞回収, RNA 抽出	

¹RPMI/B27 (w/o insulin) 培地 : RPMI1640 (Sigma), 50 × B27 supplement without insulin (Gibco), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco)

²RPMI/B27 培地 : RPMI1640 (Sigma), 50 × B27 supplement (Gibco), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco)

Table 3 外胚葉分化関連候補 miRNA と標的候補遺伝子

miRNA	遺伝子名
miR-373	<i>BCLAF1</i>
	<i>BRWD1</i>
	<i>CHD9</i>
	<i>CORO2A</i>
	<i>GALNT3</i>
	<i>LAMP5</i>
	<i>LHX8</i>
	<i>MBNL1</i>
	<i>MBNL3</i>
	<i>MRPL43</i>
	<i>NTN4</i>
	<i>POLQ</i>
	<i>SLC6A15</i>
	<i>ST8SIA3</i>
	<i>STXBP5L</i>
	<i>TRIM2</i>
<i>ZFX</i>	
miR-371-5p	<i>BCLAF1</i>
	<i>CASZ1</i>
	<i>KIAA0101</i>
	<i>NME5</i>
	<i>NRP2</i>
	<i>SPAG9</i>
	<i>SRSF3</i>
	<i>STXBP5L</i>
	<i>TFPI</i>
	<i>YAF2</i>
miR-371-3p	<i>DLG2</i>

Table 4 中胚葉分化関連候補 miRNA と標的候補遺伝子

miRNA	遺伝子名
miR-524-5p	<i>CD47</i>

Table 5 内胚葉分化関連候補 miRNA と標的候補遺伝子

miRNA	遺伝子名
miR-4739	<i>APCDD1L</i>
	<i>XPNPEP3</i>
miR-4505	<i>APCDD1L</i>
	<i>ATP8B3</i>
	<i>EFCAB2</i>
miR-4521	<i>ST8SIA4</i>
miR-520g	<i>BAGE2</i>
	<i>C17orf51</i>
	<i>EFCAB2</i>
	<i>FBN1</i>
miR-3714	<i>RAB3B</i>
	<i>SLC25A4</i>
miR-367	<i>CDK6</i>
	<i>CPNE8</i>
	<i>DCC</i>
	<i>FBN1</i>
	<i>KLF12</i>
	<i>PCDH9</i>
	<i>RAB3B</i>
	<i>XPNPEP3</i>

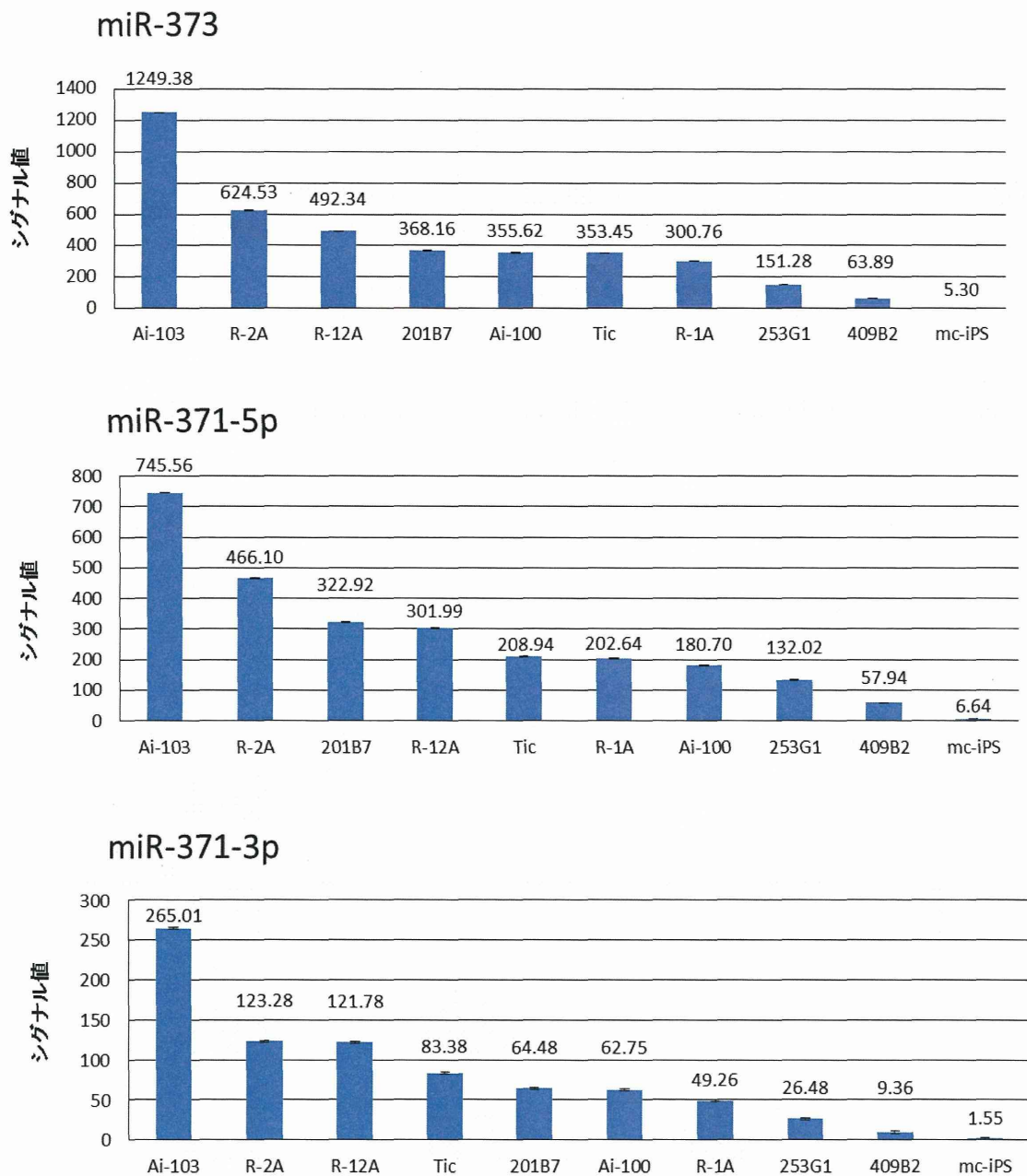


Figure 1 外胚葉分化プロペンシティ予測マーカーmiRNAの発現量

縦軸にマイクロアレイ解析から得た遺伝子発現シグナル値, 横軸にヒト iPS 細胞株を示した. データは平均値±SEM ($n = 6$) で示した.

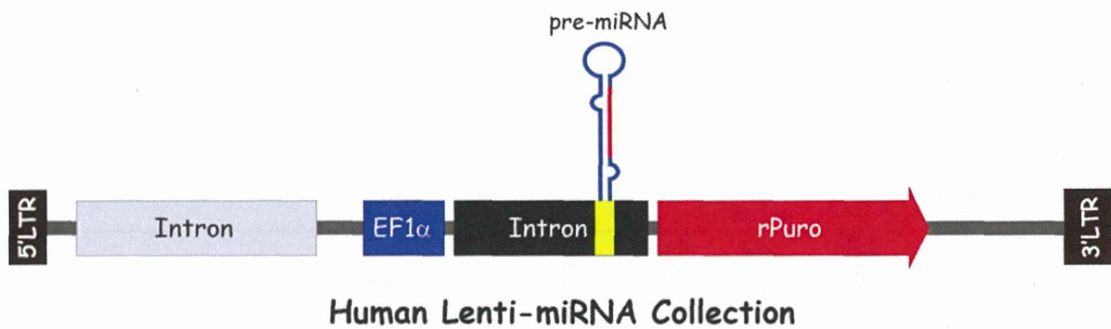


Figure 2 miRNA 過剰発現 iPS 細胞作製のために用いたレンチウイルス粒子

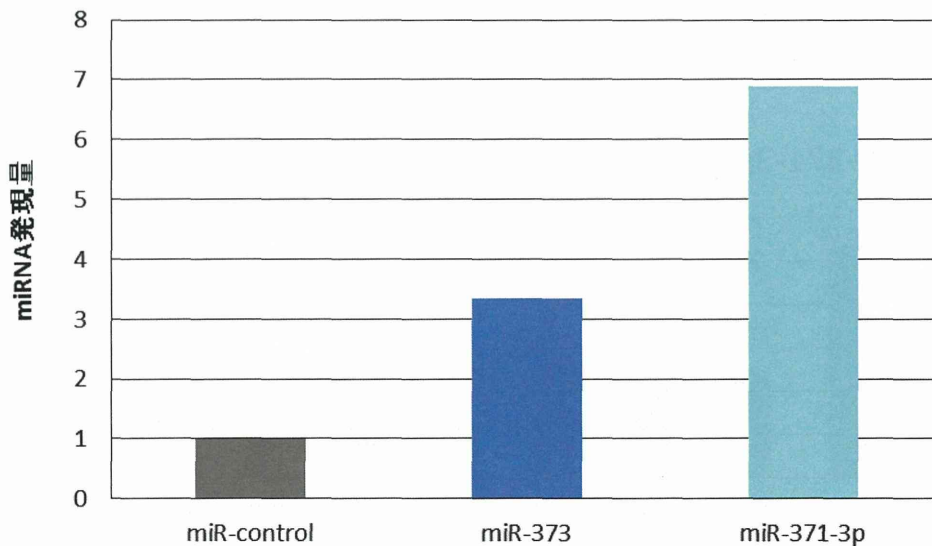


Figure 3 miR-373 および miR-371miRNA 過剰発現 iPS 細胞の miRNA 発現量

レンチウイルスを感染させることにより、miR-373 および miR-371-3p を過剰発現させた 253G1 を得た。この細胞から miRNA を含む total RNA を抽出し、定量 PCR で miRNA 発現量を測定した。発現量は 18S rRNA の発現量で補正した。縦軸に control での発現を 1 としたときの miRNA 発現量、横軸に過剰発現させた miRNA を示した。

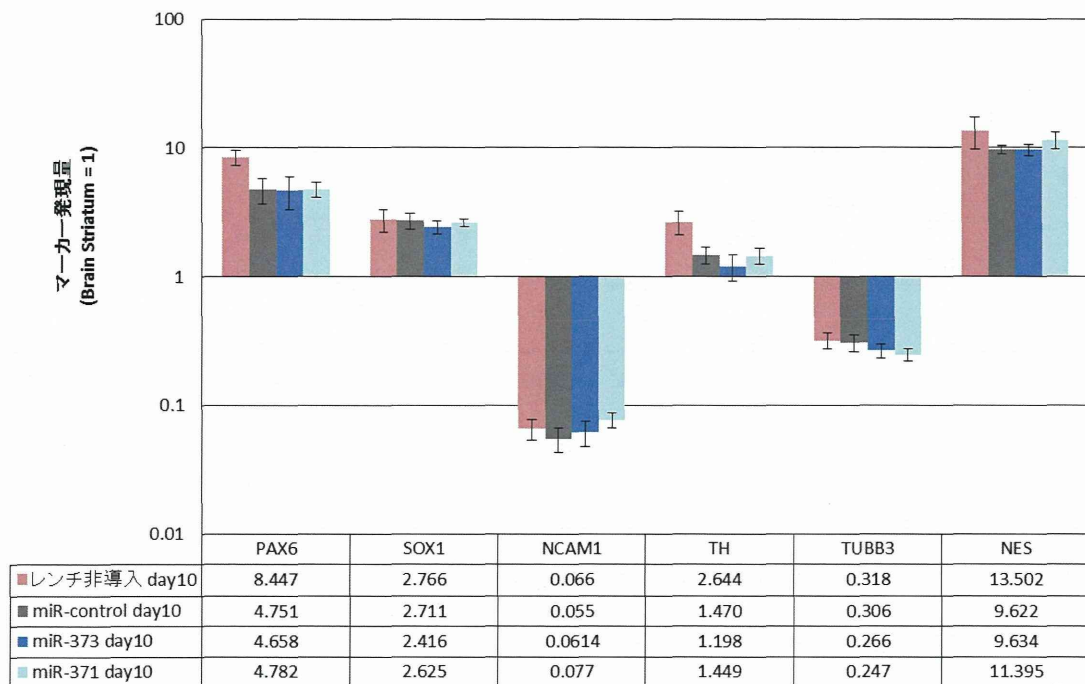


Figure 4 miRNA 過剰発現 iPS 細胞の神経分化誘導後における神経マーカー遺伝子発現量

miR-373 および miR-371 を過剰発現させた iPS 細胞を神経細胞分化プロトコールに従って 10 日間培養した後、細胞を回収、RNA を抽出した。上記の神経マーカー遺伝子 6 種類の定量 PCR を行い、発現量は *GAPDH* で補正した。Standard sample としてヒト脳線条体 (human brain striatum) の total RNA を用いた。縦軸に human brain striatum での発現量を 1 としたときの各マーカー遺伝子の発現量、横軸に各マーカー遺伝子を示した。データは平均値±SEM ($n = 5$) で示した。

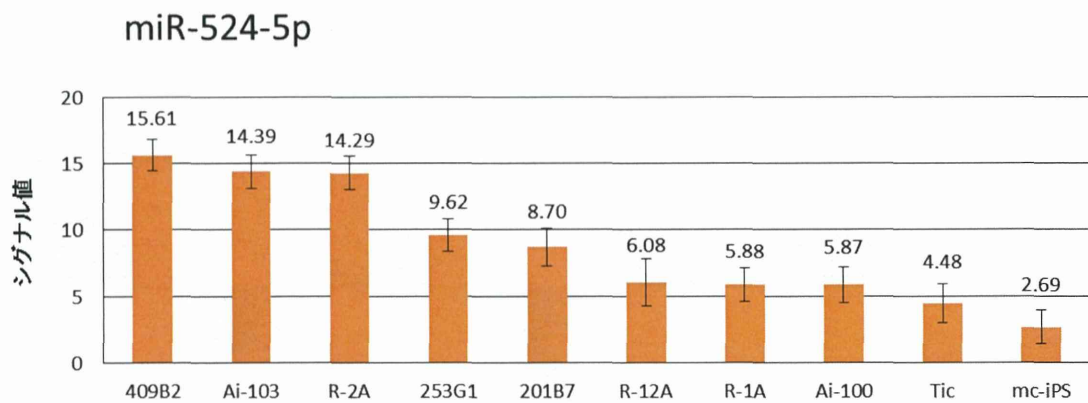


Figure 5 中胚葉分化プロペンシティ予測マーカーmiRNAの発現量

縦軸にマイクロアレイ解析から得た遺伝子発現シグナル値, 横軸にヒト iPS 細胞株を示した. データは平均値 \pm SEM ($n=6$) で示した.

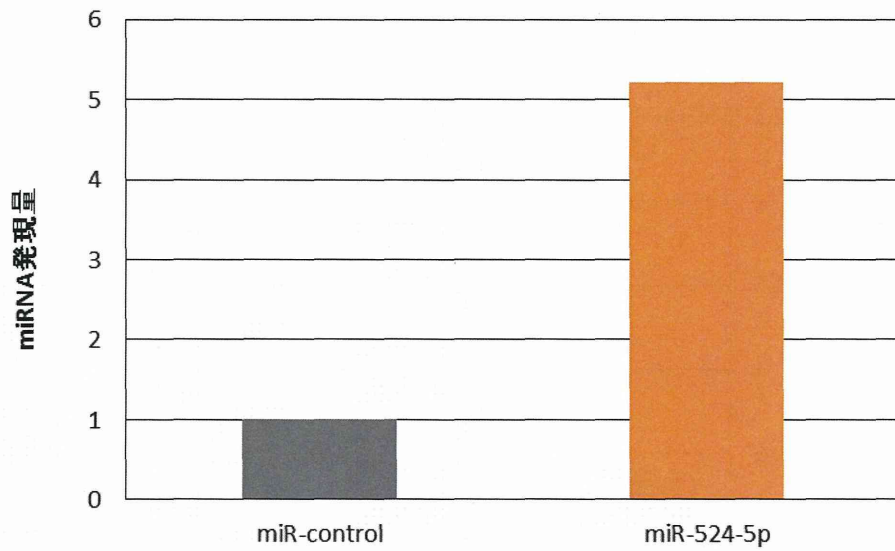


Figure 6 miR-524-5p 過剰発現 iPS 細胞の miRNA 発現量

レンチウイルスを感染させることにより，miR-524-5p を過剰発現させた 253G1 を得た．この細胞から miRNA を含む total RNA を抽出し，定量 PCR で miRNA 発現量を測定した．発現量は 18S rRNA の発現量で補正した．縦軸に control での発現を 1 としたときの miRNA 発現量，横軸に過剰発現させた miRNA を示した．

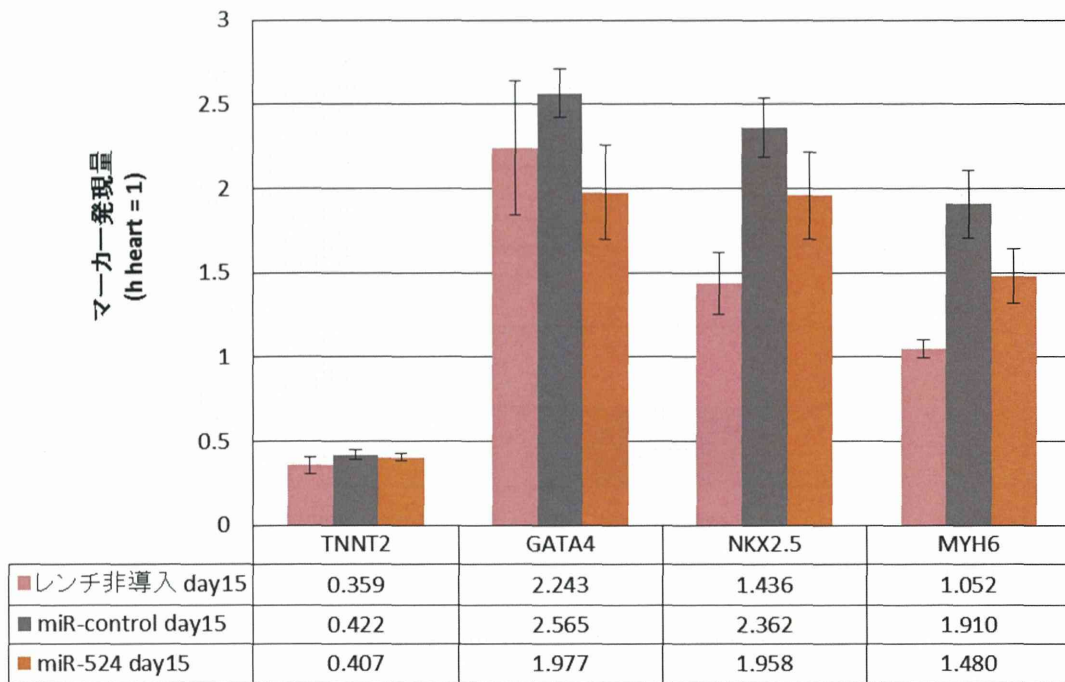
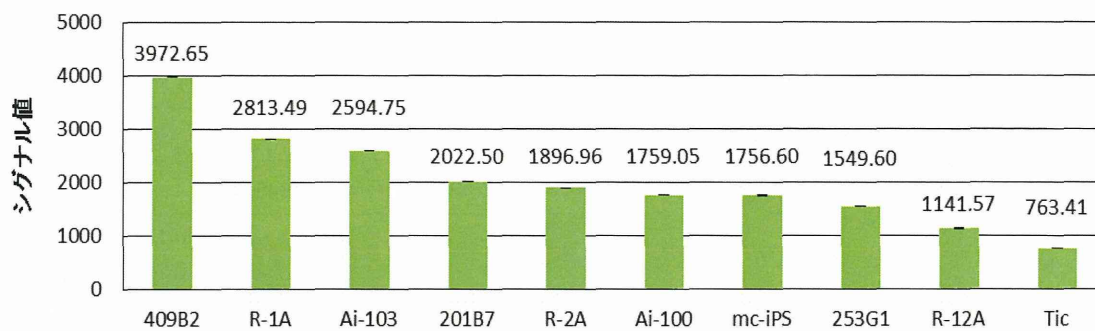


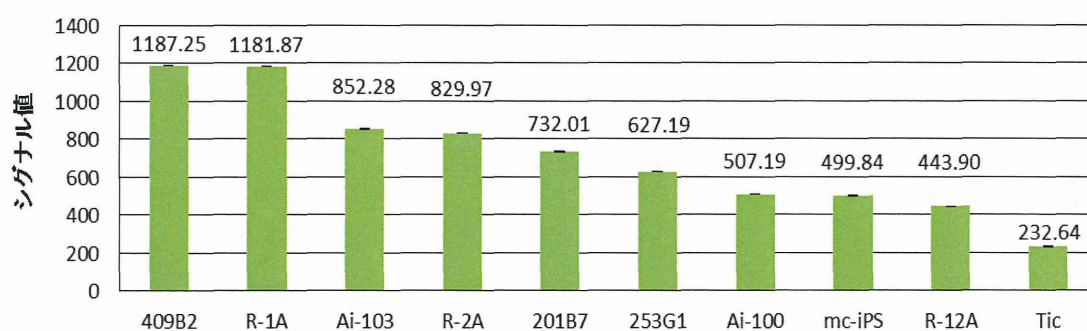
Figure 7 miRNA 過剰発現 iPS 細胞の心筋分化誘導後における心筋マーカー遺伝子発現量

miR-524-5p を過剰発現させた iPS 細胞を心筋細胞分化プロトコールに従って培養した後、細胞を 15 日目に回収、RNA を抽出した。上記の心筋マーカー遺伝子 4 種類の定量 PCR を行い、発現量は *GAPDH* で補正した。Standard sample として human heart の total RNA を用いた。縦軸に human heart での発現量を 1 としたときの各マーカー遺伝子の発現量、横軸に各マーカー遺伝子を示した。データは平均値±SEM ($n = 3$) で示した。

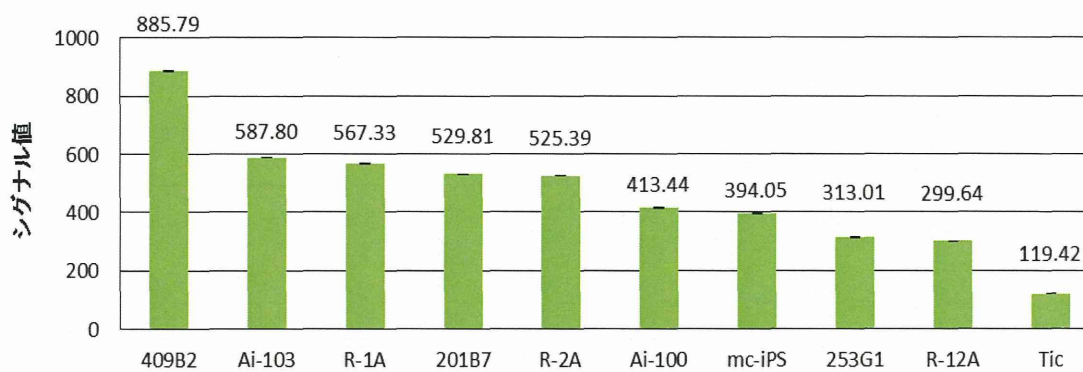
miR-4739



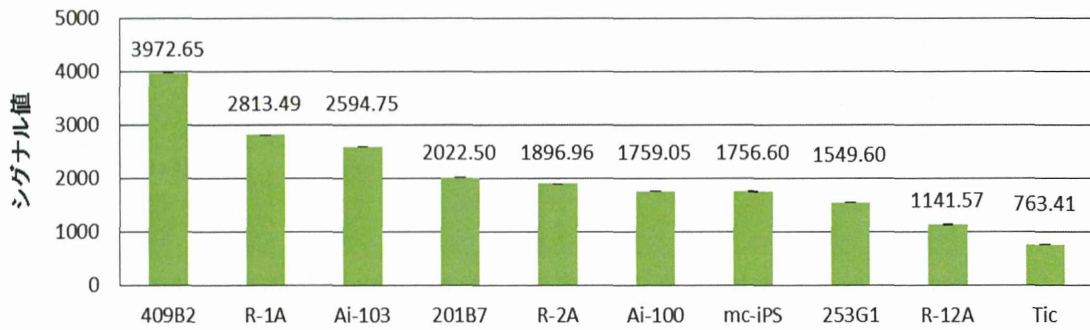
miR-4505



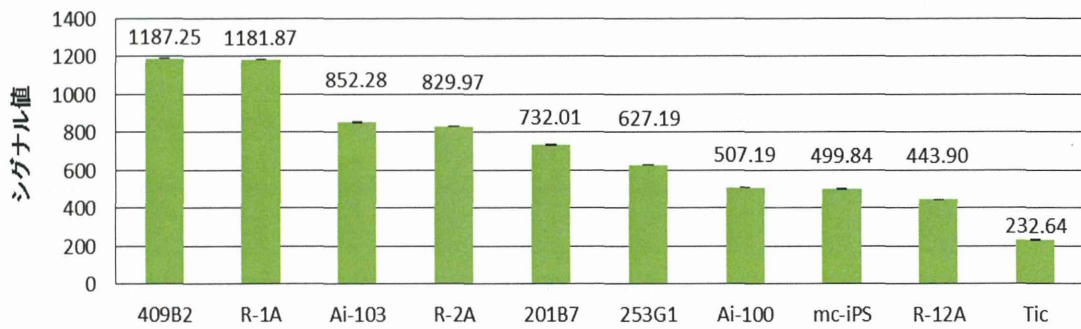
miR-4521



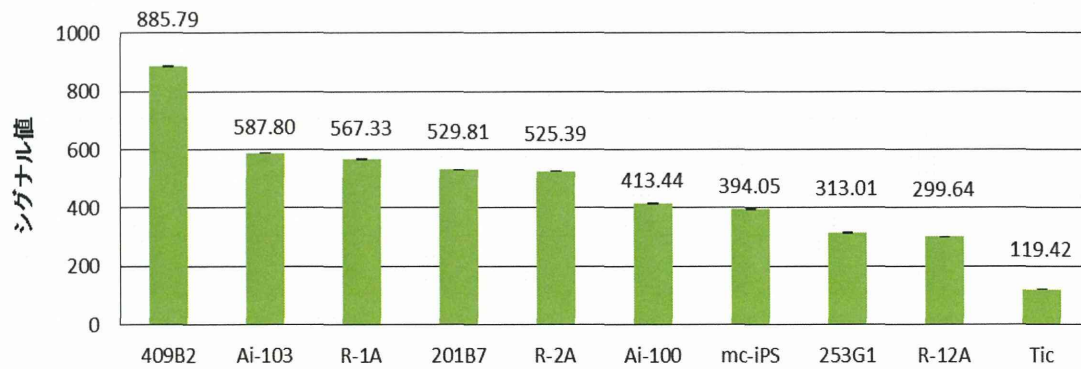
miR-4739



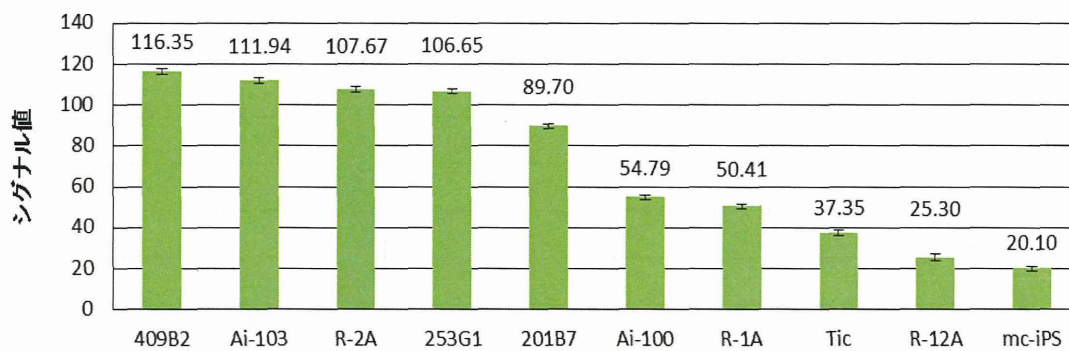
miR-4505



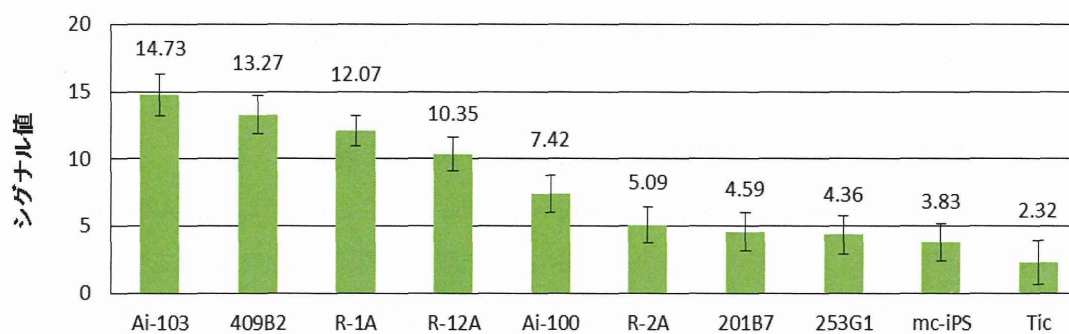
miR-4521



miR-520g



miR-3714



miR-367

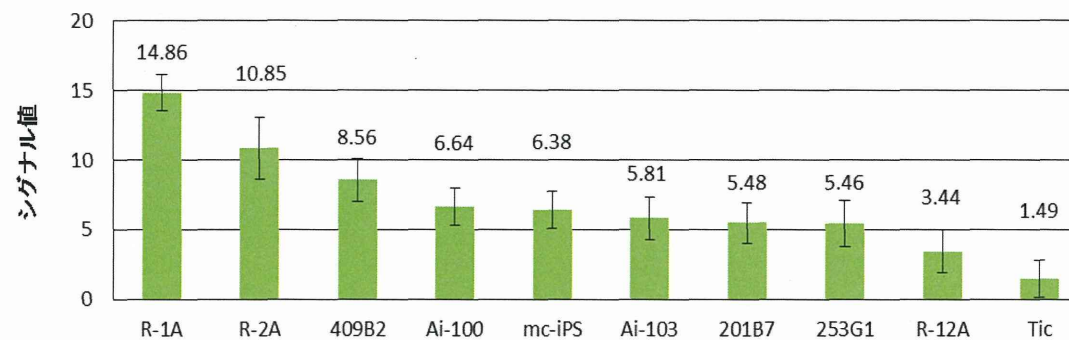


Figure 8 内胚葉分化プロペンシティ予測マーカーmiRNAの発現量

縦軸にマイクロアレイ解析から得た遺伝子発現シグナル値, 横軸にヒト iPS 細胞株を示した。データは平均値±SEM ($n = 6$) で示した。

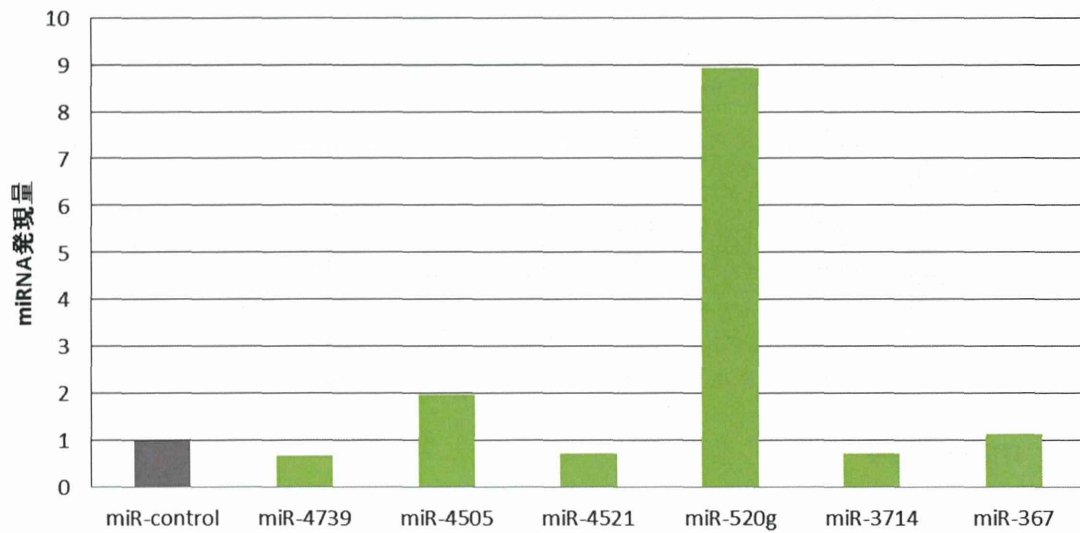


Figure 9 作製した miRNA 過剰発現 iPS 細胞の miRNA 発現量

レンチウイルスを感染させた後に puromycin を添加することにより, miR-4739, miR-4505, miR-4521, miR-520g, miR-3714, および miR-367 を過剰発現させた 253G1 を得た. この細胞から miRNA を含む total RNA を抽出しリアルタイム定量 PCR で miRNA 発現量を測定した. 発現量は 18S rRNA の発現量で補正した. 縦軸に control での発現を 1 としたときの miRNA 発現量, 横軸に過剰発現させた miRNA を示した.

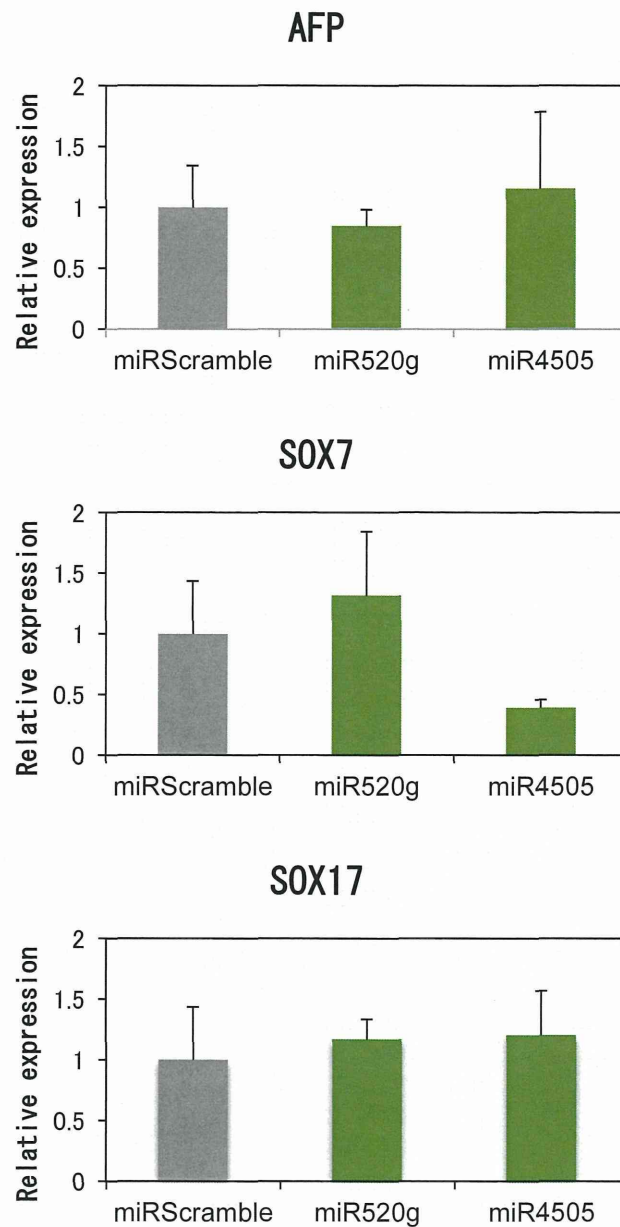


Figure 10 miRNA 過剰発現 iPS 細胞から形成した胚葉体における内胚葉マーカー遺伝子発現量

miR-520g および miR4505 を過剰発現させた iPS 細胞から胚葉体を形成させた後、16 日目に RNA を抽出した。上記の内胚葉マーカー遺伝子 3 種類の定量 PCR を行い、発現量は *GAPDH* で補正した。縦軸に miRScramble での発現量を 1 としたときの各マーカー遺伝子の発現量を示した。データは平均値±SEM ($n = 4$) で示した。

学会等発表実績

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所(学会等名)	発表した時期	国内・外の別
NOGヘアレスマウスにおける免疫不全能の定量的解析	町田一彦, 草川森士, 澤田留美, 安田智, 佐藤陽治, 堤秀樹	日本実験動物科学技術さっぽろ2014	平成26年5月15-17日	国内
Analysis of Line1 expression in human mesenchymal stem cells, ポスター	Kono K., Niimi S., Sawada R.	12th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research	2014.6	国外
Image-based profiling of mesenchymal stem cells using non-label images, ポスター	Sasaki H., Okada N., Kanie K., Kiyota Y., Honda H., Sawada R., Kato R.	TERMIS-EU 2014	2014.6	国外
生体親和性高分子材料によるヒト単球細胞の機能の制御について—遺伝子発現の網羅的解析による検討、ポスター	澤田留美, 河野健, 比留間瞳, 加藤玲子, 新見伸吾	第36回日本バイオマテリアル学会大会	2014.11	国内
ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性評価マーカの探索、ポスター	加藤玲子, 薮島由二, 福井千恵, 比留間瞳, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾	第36回日本バイオマテリアル学会大会	2014.11	国内
間葉系幹細胞における細胞分化とLINE-1の発現について、ポスター	河野健, 新見伸吾, 澤田留美	第14回日本再生医療学会総会	2015.3	国内
骨髄由来および脂肪組織由来間葉系幹細胞の継代培養における品質劣化モニタリング	佐々木寛人, 高橋厚妃, 蟹江慧, 澤田留美, 本多裕之, 清田泰次郎, 加藤竜司	第14回日本再生医療学会総会	2015.3	国内
Individual variations in the human urinary proteome in relation to rat.	Suresh T., Maekawa K., Saito Y., Sato Y., Suzuki T.	The 3rd International Conference on Personalized Medicine (Prague)	2014.6	国外
変異原暴露モニタリング手法としてのタンパクアダクトミクス	スレッシュ ティルパッティ, 斎藤嘉朗, 本間正充, 佐藤陽治, 鈴木孝昌	日本環境変異原学会第43回大会	2014.12	国内
Protein adductome analysis for the human exposure monitoring to mutagens.	Suzuki T., Suresh T.	The 4th Asian Conference on Environmental Mutagens (Kolkata)	2014.12	国外

医薬品開発においてヒト内在性物質を測定する際の定量分析法に関する留意点(案)の概要:規制の重要性と今後の課題	鈴木孝昌	第6回JBFシンポジウム	2015.2	国内
Generation of Committed Neural Progenitors from Human Fibroblasts by Defined Factors.(ポスター)	Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Tamoto R, Umezawa A, Akutsu H.	The 12th Annual Meeting International Society for Stem Cell Research, Vancouver, Canada	2014年6月18-21日	国外
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(口頭)	草川森士, 安田智, 黒田拓也, 川真田伸, 佐藤陽治	第14回再生医療学会総会	2015年3月19~21日	国内
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(口頭)	田埜慶子, 安田智, 黒田拓也, 梅澤明弘, 佐藤陽治	第14回再生医療学会総会	2015年3月19~21日	国内
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(ポスター)	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	第14回再生医療学会総会	2015年3月19~21日	国内
Tumorigenicity Tests for the Quality and Safety of Cell-Based Therapeutic Products. (口頭)	Sato Y.	IABS - International Regulatory Endeavour Towards Sound Development of Human Cell Therapy Products	2015年2月18~19日	国内
The New Japanese Regulatory Framework for Regenerative Medicine & Cell Therapy. (口頭)	Yasuda S.	World Stem Cell Summit 14, San Antonio	2014年12月3~5日	国外
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(口頭)	佐藤陽治	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~	2014年11月25日	国内
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—(口頭)	佐藤陽治	第36回日本バイオマテリアル学会大会	2014年11月17~18日	国内
Japanese Regulations for Quality and Safety of Regenerative Medicine and Cell Therapy (口頭)	佐藤陽治	11th Annual Meeting DIA Japan 2014	2014年11月16~18日	国内

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. (ポスター)	Kusakawa S, Yasuda S, Kuroda T, Kawamata S, Sato Y.	Global Controls in Stem Cells, Singapore	2014年 11月5 ~7日	国外
ヒト由来移植細胞に混入する多能性細胞・造腫瘍性細胞の検出法の性能評価 (口頭)	佐藤陽治	第87回日本生化学会大会	2014年 10月 15~18 日	国内
再生医療に関する日本の新しい規制の枠組み (口頭)	佐藤陽治	RAPS Japan 再生医療プレミアムワークショップ「再生医療・再生医療等製品のレギュラトリーサイエンス	2014年 10月 29日	国内
オリゴ核酸による自然免疫活性化の評価法に関する研究	萩原衆子, 山本誠司, 吉田徳幸, 佐々木澄美, 飯村信, 小泉誠, 佐藤陽治, 植村英俊, 井上貴雄	アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014	2014年 9月8 ~9日	国内
siRNAの細胞内取り込み機構の解析.	佐々木澄美, 吉田徳幸, 内田恵理子, 佐藤陽治, 井上貴雄	第6回日本RNAi研究会	2014年 8月28 ~30日	国内
Study on the biosafety of ex vivo transduced cells with retroviral vectors and Cartagena protocol domestic law.	Uchida E, Igarashi Y, Sato Y, Onodera M, Yamaguchi T	第20回日本遺伝子治療学会学術集会	2014年 8月6 ~8日	国内
Individual Variations in the Human Urinary Proteome in Relation to Rats.	Suresh T, Maekawa K, Saito Y, Sato Y, Suzuki T.	The 3rd International Congress on Personalized Medicine, Prague	2014年 6月26 ~29日	国外
Profiling of Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines for Predicting The Differentiation Propensity (ポスター)	Kuroda T, Tachi S, Yasuda S, Kusakawa S, Sato Y.	ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver	2014年 6月18 ~21日	国外
再生医療・細胞治療に関する国内外の規制動向 (口頭)	佐藤陽治	医療機器レギュラトリーサイエンス研究会 第9回研究会	2014年 6月6 日	国内

<p>A highly efficient culture method for growth and detection of undifferentiated human pluripotent stem cells present as impurities in cell-processed therapeutic products (口頭)</p>	<p>Tano K, Yasuda S, Umezawa A, Sato Y.</p>	<p>International Society for Cellular Therapy 2014, Paris</p>	<p>2014年 4月23 ~26日</p>	<p>国外</p>
--	---	---	--------------------------------	-----------