

表1 主な造腫瘍性関連試験

*in vivo* 試験法

試験法	測定事項	目的	利点	欠点
ヌードマウスへの移植	腫瘍形成	造腫瘍性細胞の検出	● 定量化の方策が整備 (WHO TRS 878)	● 時間 (数週間 ~ 数ヵ月)・費用がかかる ● 膵がん、乳がん、グリア細胞腫、リンパ腫、白血病細胞に由来する細胞株は腫瘍を形成しない ● わずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
NOD-SCID マウスへの移植			● ヌードマウスよりも『高感度』	● 時間 (数週間 ~ 数ヵ月)・費用がかかる ● 定量化の方策が未整備 ● 胸腺腫を自然発症
NOG/NSG マウスへの移植			● NOD-SCID マウスよりも『高感度』/ 胸腺腫なし	● 時間 (数週間 ~ 数ヵ月)・費用がかかる ● 定量化の方策が未整備

*in vitro* 試験法

試験法	測定事項	目的	利点	欠点
細胞増殖特性解析 (所定培養期間を超えた培養)	細胞増殖速度	不死化細胞の検出	● 簡便・安価 ● 時にはヌードマウスよりも『高感度』 (不死化していても腫瘍形成のないケース)	● わずかな不死化細胞の混入の検出には時間がかかる
フローサイトメトリー	細胞マーカータンパク発現	造腫瘍性細胞・未分化細胞の検出	● 短時間 (~ 1 日)・簡便 ● 時には軟寒天コロニー試験よりも『高感度』 ● 細胞を識別・分離・回収できる	● 特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない = マーカー(-) の造腫瘍性細胞を見逃すおそれ ● ゲートの掛け方で結果がばらつく
定量 RT-PCR	細胞マーカー遺伝子発現		● 短時間 (~ 1 日)・簡便 ● 時にはフローサイトメトリーよりも『高感度』	● 特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない = マーカー(-) の造腫瘍性細胞を見逃すおそれ
軟寒天コロニー形成試験	コロニー形成	足場非依存的増殖の検出	● <i>in vivo</i> 試験より短時間(数週間 ~ 1ヵ月程度) ● 安価 ● 時にはヌードマウスよりも『高感度』	● 浮遊系細胞に使用できない ● わずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない ● ヒトES/iPS 細胞は検出不能(分散誘導性細胞死)
核型分析	染色体の数・サイズ・形	染色体/遺伝子異常の検出	● 技術的に確立 ● 外部機関による受託解析もあり ● 細胞の遺伝的安定性について評価可能	● 相関性の問題 = “染色体や特定遺伝子の異常” と “造腫瘍性” との相関は未解明 ● わずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
染色体 CGH およびアレイ CGH	ゲノム DNA のコピー数異常			
蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション (FISH) 分析	特定遺伝子の位置・コピー数			
次世代シーケンサー	遺伝子配列		● 外部機関による受託解析もあり ● 細胞の遺伝的安定性について評価可能	

これらを利用(時に組み合わせて利用)することで、それぞれの目的に応じた評価が可能であると考えられる。

### 1. 原料・原材料の造腫瘍性評価

ヒトES細胞株やヒトiPS細胞株などは、文字どおり、ヒトES/iPS細胞加工製品の原料または原材料である。したがって、ヒトES/iPS細胞加工製品という生物製剤の一種を製造するための原料・原材料として、それらのセル・バンクの造腫瘍性を評価し、品質特性の1つとしてとらえておくことが重要である。ヒトES/iPS細胞加工製品の原料・原材料の品質管理のための造腫瘍性における懸念事項は、WHO TRS 878におけるセル・バンクの品質管理の考え方と同様に、「セル・バンクの造腫瘍性が既定の範囲内にあるか?」ということになる。ヒトES/iPS細胞バンクの造腫瘍性の程度に大幅な変化が生じた場合、細胞特性に何らかの異常が起ったということが示唆される。つまり、原因はいずれにせよ、ヒトES/iPS細胞バンクの安定性に異常が生じたことを検出するための方策として、ヒトES/iPS細胞バンクの造腫瘍性を細胞特性指標の1つとして評価すれば、品質管理に活用できることになる。その評価方法については、WHO TRS 878の方法を準用することが可能であると考えられる。

### 2. 製造工程(中間製品)評価のための造腫瘍性試験

ヒトES/iPS細胞加工製品の中間製品となる細胞集団には、目的細胞ないしその前駆細胞に加え、残存する未分化ES/iPS細胞およびその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。したがって、中間製品には、①「どのくらい未分化のヒトES/iPS細胞が残存しているか」ということと、②「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」という2点が、製造工程(中間製品)評価における造腫瘍性の懸念事項となる。

中間製品の中に、①「どのくらい未分化のヒトES/iPS細胞が残存しているか」ということに関しては、ES/iPS細胞のマーカータン

---

注2:薬事規制においては、「原材料」とは、「原料又は材料」を指すのではなく、「医薬品等の製造に使用する原料又は材料の由来となるもの」を指す。(「生物由来原料基準」(平成15年厚生労働省告示210号)による定義)

パク/マーカー遺伝子を検出することによって評価することが可能である。方法としてはフローサイトメトリーや定量 RT-PCR が挙げられる。これらは感度が高いことが利点である。

一方、中間製品の中に、「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということに関しては、細胞増殖特性解析（不死化細胞の検出）や、軟寒天コロニー形成試験による足場非依存性増殖細胞の検出などによって評価が可能である。ただし、ヒト ES/iPS 細胞は、トリプシン処理などによる単一細胞への分散によりアポトーシスを起す特異な性質を持つため、残存するヒト ES/iPS 細胞の検出のために、軟寒天コロニー形成試験は不向きであることに注意が必要である<sup>2)</sup>。

また、中間製品の中に「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということを検証するために、*in vivo* の方法を活用することも可能である。しかし、WHO TRS 878 にある方法（ヌードマウスなどの動物 10 匹に  $10^7$  個の細胞を投与して 16 週間観察する方法）では、再生医療製品にわずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない可能性が高く、結果が偽陰性になってしまうおそれがある。そのため、WHO TRS 878 の方法よりも十分に感度の高い系を用いる必要がある。そこで有力な選択肢として挙げられるのが、NOD/SCID/ $\gamma$ C<sup>null</sup> (NOG)<sup>3)</sup>、NOD/SCID/IL-2 $\gamma$ KO (NSG)<sup>4)</sup> などの重度免疫不全マウスシステムを利用する、従来よりも高感度な検出系である。これらのマウスは T 細胞、B 細胞および NK 細胞を欠失しており、ヌードマウスなどの従来免疫不全マウスと比べてヒトの細胞や組織の生着性が高く、ヒトがん細胞を非常に高い効率で生着させることが可能と言われている<sup>5)</sup>。これらの重度免疫不全マウスを利用することにより、再生医療製品中に残留・混入するわずかな造腫瘍性細胞を検出できる可能性は高い。ただし、現時点ではその方法は未確立であり、科学的リスク評価のためには再生医療製品の造腫瘍性の定量化の方策の検討と、その標準化が必要である。試験系開発における検討課題としては、a) 試験系の検出限界・感度・精度の分析的検討、b) 陽性・陰性コントロールのあり方、c) 投与細胞数、d) 投与経路、e) 投与方法、f) 観察期間、g) ヌードマウスとの比較、などが挙げられる。

### 3. 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験

ヒト ES/iPS 細胞加工製品の最終製品中の細胞集団, すなわち“投与細胞”には, 目的細胞に加え, 混入する前駆細胞や残存多能性幹細胞およびその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。さらに, 最終製品の造腫瘍性試験における“造腫瘍性”には, ヒトでの生着部位での腫瘍形成能を考察する材料であることが要求される。したがって, 最終製品における造腫瘍性関連の懸念事項には, ①「どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか」, ②「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということに加え, ③「投与細胞が, 生着する微小環境で腫瘍を形成するか」ということが挙げられる。①, ②については, 中間製品評価の場合と同様, 多能性幹細胞のマーカータンパク/マーカー遺伝子の検出(①), 不死化細胞の検出や足場非依存性増殖細胞の検出など(②)で, それぞれ評価が可能であると考えられる。一方, ③「投与細胞が, 生着する微小環境で腫瘍を形成するか」という懸念については, *in vivo* 造腫瘍性試験が必要となる。その場合に考慮すべき点としては, a) 試験系の検出限界, b) 投与細胞数, c) 投与部位, d) 例数, e) 観察期間, f) 陽性・陰性コントロールのあり方, などが挙げられる。特に, 投与部位は, 可能な限り, ヒトでの投与部位に相当する部位を選択すべきである。これは, 生着部位の違いによって腫瘍形成能や, 腫瘍のタイプが異なるおそれがあり, ヒトへの外挿性を考えるときに問題となる可能性があるためである。もしも, 物理学的障害を生ずるなどの理由により当該部位に対する投与細胞数に限界がある場合には, 可能であれば, 投与部位を変更するのではなく, 動物とヒトとの間の当該投与部位の相対的スケール比に応じた投与細胞数の調節などが必要となる。すなわち, 生着する微小環境と投与細胞との相互作用による腫瘍形成の可能性を考察することを優先する。免疫特権, 炎症, 虚血など, 特殊な投与環境における細胞の挙動は動物モデルにおける *in vivo* での評価でなければ, 考察することが困難だからである。

### 4. ヒト iPS 細胞加工製品の課題

近年我が国では, ヒト iPS 細胞に由来する再生医療製品(ヒト iPS 細胞加工製品)の開発に特に期待が高まっているが, ヒト iPS 細胞加

工製品の場合、原料・原材料としてのiPS細胞が持つ造腫瘍性、および最終製品に残存する未分化iPS細胞の造腫瘍性にはさまざまな要素がかかわってくる。すなわち、ヒトiPS細胞の由来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、さらにはその細胞株自身の目的細胞への分化抵抗性などが、造腫瘍性に影響すると考えられる。目的細胞に効率的に分化するような細胞株、または悪性腫瘍を形成しやすい細胞株の判定方法を明らかにすることが、今後の課題である。

しかしながら、このような判定の根拠となるような特性（例えば特定遺伝子の変異や発現など）が、あらゆるヒトiPS細胞加工製品の安全性の必要十分条件であるわけではない。つまり、ヒトiPS細胞加工製品の造腫瘍性を評価するうえでは、「原料・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・因果関係の有無は未解明あるいは最終製品次第」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、原料・原材料ではなくあくまで最終製品としてのヒトiPS細胞加工製品の造腫瘍性評価が最も重要であることに、常に留意しなければならない。

#### ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品

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ことから、ヒト体細胞・体性幹細胞に由来する再生医療製品についても、原料・原材料となる未加工の体細胞・体性幹細胞には、一般的に造腫瘍性がないと考えられる。したがって、ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品の造腫瘍性に関しては、「最終製品（ないし中間製品）の中に目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が混入しているか」という懸念と「投与細胞が、生着する微小環境において腫瘍を形成するか」という懸念についてのみ検討すれば良い、ということになる。

すでに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<sup>6)</sup>。成人由来の体細胞ないし体性幹細胞を原料とした製

品に限れば、筆者らの知るところでは、ヒト成人由来体細胞・体性幹細胞の投与による腫瘍形成の報告はされていない。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<sup>7)8)</sup>は、がん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<sup>9)10)</sup>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、GMPに準拠した厳密な工程管理の下に、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高くないと考えられる。

#### おわりに

再生医療製品を対象にした造腫瘍性試験ガイドラインは、いまだに存在しない。再生医療製品の開発を適切に推進するためには、科学的に想定される懸念事項に対し、現時点で認識しうる問題をできる限り整理したうえで、実施可能性をも考慮した対応が成されなければならない。したがって、再生医療製品の中でも特に造腫瘍性に関して懸念の強い製品については、本稿で挙げたタイプの異なる試験を複数実施し、総合的に判断すべきであると考えられる。適切な試験(を組み合わせた)結果・評価についても、ヒトでの結果を完全に保証するものではなく、各試験法の能力と限界を理解したうえで、リスク評価・リスクマネジメント立案およびインフォームド・コンセントの受領を行うことが重要である、と考えられる。なお、個別の製品で示すべき具体的評価事項は、原料・原材料や製品の特性、対象疾患、リスクマネジメントプランなどを勘案して、製品ごとに判断されるものである。

また、再生医療製品の開発、各種試験法の開発・改良に関しては、今まさに、さまざまな研究が進行中であり、現時点での知見は限られている。近い将来、関連データが集積された段階で随時検討を重ねていかなければならない。

## 文 献

- 1) World Health Organization: Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals. WHO Technical Report Series, No 878 Annex 1, 1998.
- 2) Kuroda T, et al: Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One* 7: e37342, 2012.
- 3) Ito M, et al: NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100: 3175–3182, 2002.
- 4) Shultz L D, et al: Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 174: 6477–6489, 2005.
- 5) Machida K, et al: Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors. *J Toxicol Sci* 34: 123–127, 2009.
- 6) Amariglio N, et al: Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 6: e1000029, 2009.
- 7) Garcia S, et al: Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 316: 1648–1650, 2010.
- 8) Torsvik A, et al: Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track–letter. *Cancer Res* 70: 6393–6396, 2010.
- 9) Wang Y, et al: Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytherapy* 7: 509–519, 2005.
- 10) 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.

---

**Tumorigenicity Tests for Human Cell-processed  
Therapeutic Products**

Shinji Kusakawa<sup>1</sup>, Yoji Sato<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Foundation for Biomedical Research and Innovation

<sup>2</sup> Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences

特集 高齢者医療における再生医療の可能性

総説

## 2. 再生医療・細胞治療の臨床研究から実用化までの道のり

村岡ひとみ 佐藤 陽治

### KEY WORD

■再生医療 ■臨床研究 ■先進医療 ■治験 ■薬事法

### SUMMARY

■わが国では、再生医療など(再生医療または細胞治療)の実用化には、「臨床研究」を経て「先進医療」や「保険外診療」に向かうルートと、「再生医療等製品」の治験を経て薬事承認を受けるルートがあるが、国民のアクセシビリティや国際展開という面から考えると、前者のルートの真の出口も後者を経た保険診療だとされている。ただし、わが国における再生医療などの開発は、医薬品などの国際ガイドラインに沿った国内基準への準拠が義務ではない臨床研究からスタートすることが多く、得られたデータを製品の薬事承認申請資料としてそのまま使用できないという問題を克服することが大きな課題となっている。

### はじめに

超高齢化社会では、加齢に伴って引き起こされる種々の難治性疾患に対する医療の提供が課題であり、特に、失われた機能の回復への期待は大きい。近年のヒト胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)などの多能性幹細胞の登場によって、失われた組織の再生を目指す再生医療が現実のものとして考えられるようになってきたが、このような新しい概念をこれまでの医療や医薬品の規制の枠組みの中で実用化することは容易ではない。

### 再生医療・細胞治療の開発の道筋

わが国において、ヒトまたは動物の細胞に培養そのほかの加工を施したものをを用いた再生医療など(再生医療または細胞治療)を実用化するための道筋には、「医療としての開発トラック」

と「製品としての開発トラック」との2つがある。医師・歯科医師が自らの患者に「医療」を施すことを目的に、ヒトまたは動物の細胞に医師・歯科医師が自ら加工を施し、これを患者に投与することはこれまで、「医師法」「医療法」などの医事関連法規や「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」などの行政指針に従い、「臨床研究」およびその結果を踏まえた「先進医療」(保険診療との併用が認められる保険外診療)あるいは「保険外診療」として行われてきた。ちなみに、平成25年成立の「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」(通称「再生医療新法」)施行後は、医師・歯科医師は細胞の加工を外部の「特定細胞加工物製造業者」に委託することが可能となる一方で、そのリスク区分に応じて、再生医療等提供計画を厚生労働大臣などに提出しなければならない。

一方、ヒトまたは動物の細胞に培養そのほかの加工を施し、再生医療などに用いられること

■むらおか ひとみ(国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部/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部長, 名古屋市立大学大学院薬学研究所客員教授, 大阪大学大学院薬学研究所招聘教授, 九州大学大学院薬学研究所客員教授)



を目的とした製品(再生医療等製品)を開発するトラックでは、「薬事法」の規制を受け、薬事法に基づき、治験を行った上で品質、有効性および安全性を示し、厚生労働省の製造販売承認を受けなければならない。なお、平成25年改正の「薬事法」の施行に伴い、法律名が「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」(略称「医薬品医療機器等法」)に変更されるとともに、再生医療等製品(遺伝子治療用製品を含む)は、医薬品からも医療機器からも独立した第3の категорияとして分類される。再生医療等製品のうち、申請に関わる再生医療等製品が均一でない場合、治験により効能、効果または性能を有すると推定され、安全性の確認が行われたものは、条件および期限付製造販売承認を得ることができるようになるなど、特別な規制が適用される。

「製品としての開発トラック」では、薬事法に記され、かつ医薬品国際ガイドライン(ICHガイドライン)に沿った国内基準(例えば Good Laboratory Practice (GLP), Good Manufacturing Practice (GMP)/Quality Management System (QMS), Good Clinical Practice (GCP) など)に従う必要がある。すなわち、その必要がない「医療としての開発トラック」と比べ、費用も時間も余計にかかる。ただし、「医療」としての「臨床研究」は、研究費が尽きれば実施不可能になるという点で持続可能な医療ではないことが問題である。「先進医療」では実施可能な医療機関が限定されると同時に、製品の品質にばらつきが生じるおそれがあり、また「保険外診療」は、開発に多くの投資を要する新規製品を用いるために高額となりやすく、いずれの場合も多くの国民が享受できないおそれがある。したがって、国民が広くアクセスできるようにするためには、治験を通じて薬事法上の承認を得て保険診療として実施されることが好ましい。

「先進医療」は、再生医療などの「医療としての開発トラック」における実用化の出口ととらえられることもあるが、実は「健康保険法等の一部を改正する法律」において「先進医療」は「厚生労働大臣が定める高度の医療技術を用い

た療養その他の療養であって、保険給付の対象とすべきものであるか否かについて、適正な医療の効率的な提供を図る観点から評価を行うことが必要な療養」とされており、真の出口とはされていない。同法律の示す真の実用化の出口はあくまで「保険診療」である。

なお、欧米では緊急時や治験などの例外を除き、ヒト・動物の細胞に培養そのほかの加工を施したものを臨床適用する場合には、「医療」か「製品」かの区別なく、ICHガイドラインに沿った薬事の基準に則って開発した上で、その有効性、安全性および品質について製品ごとに、規制当局の審査を受け承認を受けなければならない。したがって、日本国内で開発された再生医療などを国際的に展開することを考えた場合も、治験を通じて薬事法上の承認を得る方が好ましい。

### 再生医療の実用化の問題点と 医師主導治験

わが国における再生医療・細胞治療の開発は、大学などの研究機関の研究者の臨床研究により行われる場合が多い。「医療としての開発トラック」における臨床研究は、手続きや費用などの面で治験よりも実施が比較的容易であるものの、ICHガイドラインに沿った国内基準への準拠が義務ではない。このため、再生医療などの実用化の最終的な出口が保険診療だということになると、得られたデータを製品の薬事承認申請資料としてそのまま使用できないことが多いことが問題である。

つまり、新規の再生医療・細胞治療に関して、臨床研究で有効性・安全性を確認してから産業化を目指して薬事承認を得ようとしても、多くの場合には、国際ガイドラインと整合性のある国内基準に則った治験をやり直さなければならない。また、臨床研究を行った結果を基に実施される先進医療も、前述の通り、法的には保険診療(と薬事承認)を最終的な出口としているが、出口に至るための具体的な道筋はどこにも示されていない。このため、保険診療という出口にたどり着くために乗り越えるべき技術的要件は

薬事法(および関連する基準・指針など)で明らかにされている。臨床研究から始まった開発の場合、いかにすれば効率的にその要件を満たすことができるかという点が乗り越えられない壁となっている。

「医療」と「製品」の区別のない欧米では、「臨床研究」(医療・研究目的の臨床試験)と「治験」(商業目的の臨床試験)という区別はなく、すべての臨床試験は医薬品の国際ガイドラインに準じた各国の規制に従う必要がある。したがって、大学などにおける非商業的な臨床試験にも多くの資金・労力が必要となるものの、企業への技術移転が日本よりスムーズに進みやすい仕組みだといわれている。つまり、上記課題の解決の方法の1つとしては、大学病院や研究機関であっても、欧米のように最初から治験として開発するということが考えられる。わが国では10年ほど前まで、治験を企画・実施する主体は企業のみということになっていたが、平成14年7月公布の改正薬事法により、医師・歯科医師も自ら主体となって治験を企画・実施することが可能となった(医師主導治験)。医師主導治験の積極的な実施は、医師が開発した治療法・製品を一般に普及するための効果的な方策となると考えられる。医師主導治験の実施には、医師のデータ・技術の企業への橋渡しの仕組み(実施医療機関の体制整備費、治験薬の製造、プロトコル作成、データ管理業務、治験相談などの費用を補助するなどの支援、研究費など)をさらに充実させる必要があることから、文部科学省・厚生労働省は「臨床研究・治験活性化5か年計画2012」などの中で、日本医師会治験促進センターや中核病院・拠点医療機関などと協力し、医師主導治験を含めたわが国の治験実施の環境整備に努めている。しかしわが国の現状としては、欧米のようにすべての臨床研究を医師主導治験に置換する環境にはなっていない。

## 「医療としての開発」と「製品としての開発」をつなぐ道

こうした状況下で、再生医療などの臨床研究

を効率的に保険診療へ結びつけて行くために必要なのは、臨床研究におけるデータと製品の質を、重要なポイントだけでも、できる限り治験グレードにそろえることだと考えられる。そのためには、臨床研究であっても治験であっても再生医療等製品のすべてに最低限必須・共通の要件や基準・評価技術を定め、これに各製品の種類・特性、対象疾患、開発段階などに応じた上乘せ方策を適用するというアプローチが有効だと考えられる。こうした最低限の要件などは「ミニマム・コンセンサス・パッケージ(MCP)」と呼ばれている<sup>1)</sup>。再生医療などの開発においてMCPは、例えば臨床研究そのほかの「医療としての開発」と「製品としての開発」の切れ目のない移行を可能にする共通のプラットフォームともなると考えられ、その充実が重要と考えられる。

平成25年11月に「再生医療新法」と「医薬品医療機器等法」が成立したことに伴い、日本の再生医療などの開発環境は大きな転換期を迎えようとしている。平成26年2月現在、厚生労働省ではこれらの法律の施行に向けた政省令や基準・指針などの策定が進んでいるところである。こうした規制の中において、MCPの具体像の認識をすべてのステークホルダーで共有し、「再生医療新法」下の臨床研究であっても、少なくともそのMCPについては開発の早期から着実に踏まえることが可能となるような体制を整備し、柔軟に運用することが、今後、再生医療・細胞治療の臨床研究から真の実用化の出口としての保険診療に効率的に結びつけるためのカギになると筆者らは考えている。

## 文 献

- 1) 早川堯夫: ヒト幹細胞加工製品の品質及び安全性の確保について. 厚生労働省 厚生科学審議会科学技術部会第18回ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会(平成24年5月9日). <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000029kw0-att/2r9852000002a0tg.pdf> (平成26年2月15日アクセス)

## 特 集

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

佐藤 陽治

*In vitro* Tests for Detection of Tumorigenic/Undifferentiated Cells in Therapeutic Products  
Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells

Yoji Sato Ph.D.

Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

## Abstract

Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) possess the capabilities of self-renewal and differentiation into multiple cell types, and they are free of the ethical problems associated with human embryonic stem cells. Currently, a lot of attempts are made to develop hiPSC-derived therapeutic products for 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. We recently characterized three *in vitro* assay methods for sensitive detection of tumorigenic/undifferentiated cells in hiPSC-derived products, i.e. soft agar colony formation assay, flow cytometry assay and quantitative real-time polymerase chain reaction assay (qRT-PCR). The soft agar colony formation assay appeared to be unable to detect hiPSCs, presumably attributable to dissociation-induced apoptosis, a unique property of human pluripotent stem cells. 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 *L/N28* mRNA, which is equivalent to that present in a mixture of a single hiPSC and  $5.0 \times 10^4$  RPE cells. Our findings provide highly sensitive and quantitative *in vitro* assays essential for facilitating safety/quality profiling of hiPSC-derived RPE cells for their clinical use.

**Key words : induced pluripotent stem cells, regenerative medicine, tumorigenicity, safety, quality control 3**

## はじめに

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のための革新的な治療方法として注目されており、最近の総合科学技術会議の提言や政府の「日本再興戦略」及び「健康・医療戦略」などにおい

ても最重要課題の一つとされている。

再生医療・細胞治療での使用を目的に、生きた細胞を加工して製造される製品は「再生医療製品」と呼ばれ、従来治療が困難だった病態について活発に研究・開発が行われている。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)、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) などの幹細胞が対象とされてきている。中でもヒト 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い。京都大学・山中伸弥博士らによる世界初のヒト iPS 細

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部

受付日：平成 26 年 1 月 28 日 受理日：平成 26 年 2 月 28 日

胞樹立の報告があったのは平成 19 年のことだが、早くも平成 25 年 8 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て開始されている。本臨床研究では、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。しかしながら、このような iPS 細胞由来移植細胞は臨床使用経験が少ないために知見の蓄積も乏しい。したがって、iPS 細胞由来移植細胞の本格的実用化を進めるには新たに適切な品質・安全性評価技術を樹立することが火急の課題となっている。本稿では、ヒト iPS 細胞由来移植細胞の品質・安全性の確保の上で重要な、未分化細胞の残存の評価方法に関し、網膜色素上皮細胞を例に我々のこれまでの経験を紹介する。

### ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の造腫瘍性

「造腫瘍性」(tumorigenicity)とは、動物に移植された細胞集団が増殖することにより腫瘍を形成する能力を言う。ヒト ES 細胞株やヒト iPS 細胞株を樹立した際には、どのくらい初期胚内の多能性幹細胞の性質を保っているかを確認する必要があるが、その際、細胞の多能性の証明は通常、免疫不全動物に細胞を移植して動物体内でのテラトマ (teratoma, 奇形腫) の形成を確認し、移植した細胞が内・中・外胚葉系の様々な細胞種に分化することを示すことによってなされている。つまり、ヒト ES/iPS 細胞は造腫瘍性を元来の特性として保持しており、この点がヒト体細胞・体性幹細胞とは大きく異なる。したがって、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞 (最終製品) においては、未分化細胞の混入・残留により異所性組織形成や腫瘍形成が惹起されるリスクがあり、最終製品の造腫瘍性の評価と管理が重要な課題となる。このことは、可能な限り最終製品で用いられる目的細胞を純化し、残存する未分化な ES/iPS 細胞を除去する工夫が必要であることを意味し、実際、その取り組みに関する報告はこれまでに多く存在する<sup>1-6)</sup>。

注意しなければならないことは、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の実用化・品質評価において、こうした取り組みと同時に、未分化の ES/iPS 細胞の混入・残留を高感度で確認する方法や、最終製品に混入・残留した未分化の ES/iPS 細胞等の造腫瘍性細胞に起因する安全性上の問題の評価方法が必要だということである。しかしながら、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞

に関する造腫瘍性評価方法の開発とその体系化・標準化は、ES/iPS 細胞から特定の細胞種への効率的な分化誘導法の開発や、残存 ES/iPS 細胞の除去方法の開発などに比べて著しく立ち遅れており、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞を用いた再生医療・細胞治療の実現における最大の隘路として残されたままの状態にある。この問題の解決なしには、どのようなヒト ES/iPS 細胞等由来移植細胞であれ、実用化・産業化を達成することはほぼ不可能である。

### ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞中の造腫瘍性細胞／未分化細胞の検出方法

ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞は完全に均質な細胞の集団ではなく、目的とする細胞以外にその前駆細胞や残存 ES/iPS 細胞およびその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。こうした細胞集団における造腫瘍性に関する品質上の懸念事項としては、「どのくらいヒト ES/iPS 細胞が残存しているか」ということと「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」という 2 点が挙げられる。

「どのくらいヒト ES/iPS 細胞が残存しているか」ということに関しては、ES/iPS 細胞のマーカー遺伝子ないしマーカータンパク質を利用した方法により評価することが可能である。手技としては後述する定量 RT-PCR やフローサイトメトリーなどが挙げられる。これらの方法の詳細については後で述べる。

「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということを評価するための方法としては、例えば細胞増殖特性の評価 (不死化細胞の検出) や軟寒天コロニー形成試験 (足場非依存性増殖細胞の検出、後述) が挙げられる。造腫瘍性細胞の検出を目的とした方法として、製品を免疫不全動物に移植して腫瘍形成を評価する、いわゆる *in vivo* 造腫瘍性試験系を活用することも考えられるが、製品の中に含まれる僅かな造腫瘍性細胞を検出するため、十分に高い感度 (=十分に低い検出限界) を備えている必要がある。古典的な免疫不全動物であるヌードマウスを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験は、従来、生物製剤の製造に用いられる不死化細胞株のセル・バンクの品質管理を目的として、生物製剤の製造現場で実施されている。しかし、T 細胞のみを欠いたヌードマウスでは均質な不死化細胞株の造腫瘍性は検出できても、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞のような再生医療製品中に極僅かに混入する造腫瘍性細胞を検出することは不可能とされている。検出限界の低い試験系としては、T 細胞

に加えてB細胞およびNK細胞を欠失したNOD/SCID/ $\gamma$ Cnull (NOG) など、ヌードマウスよりも免疫力の低下した重度免疫不全マウスシステムを利用することが考えられる<sup>7,9)</sup>。ただし新規免疫不全動物モデルを用いた方法は、高価かつ時間がかかる点が問題とされ、また科学的リスク評価のためには、造腫瘍性の定量化方法の標準化が今度必要とされる。

#### 造腫瘍性関連 *in vivo* 試験<sup>10)</sup>

細胞集団の造腫瘍性、あるいは細胞集団中の造腫瘍性細胞を検出する系としていくつかの *in vivo* 試験系があるが、それぞれに長所と短所がある。この点について我々が検討した結果を *in vivo* 試験法と併せて Table 1 にまとめた。なお、核型分析などの染色体異常を検出することを目的とする試験については、技術的に確立されているものの、得られた結果と細胞の造腫瘍性との相関性が低いことが多く、最終製品の造腫瘍性を評価するというよりも、原材料の品質の安定性または製造過程における製品の遺伝的安定性を評価するという目的で実施されるべきものと言える。

軟寒天コロニー形成試験は、がん細胞の多くが足場非依存的に増殖するのに対して接着性正常細胞は足場が存在しないとアポトーシス（アノイキス）を起こすという性質を生かした試験系で、細胞を分散して軟寒天に封入し、足場非依存的な細胞増殖を検出する試験である。この試験系では、細胞のクランプ残存や寒天中での凝集による足場依存的細胞増殖を防ぐためには単一細胞への分散が重要である。一方、ヒトES細胞やヒトiPS細胞はトリプシン処理などによる分散によってアポトーシスを起こす特異な性質を持つことが知られている。そこで、ヒトiPS細胞が軟寒天培地中で増殖するかどうかについて我々が検討したところ、単一細胞に分散したヒトiPS細胞は軟寒天培地中では増殖しないことが明らかとなった。ヒトES/iPS細胞の分散誘導性アポトーシスを抑制すると言われているROCK阻害剤Y-27632存在下で検討した場合も、軟寒天培地中での増殖は認められなかった。これらの結果から、軟寒天コロニー形成試験は未分化なヒトiPS細胞の混入を検出する目的には適さないということが示唆された。

Table 1 Comparison of the tumorigenicity-associated assays

Assay	Soft agar colony formation assay	Flow cytometry	qRT-PCR	In vivo tumorigenicity assay using SCID mice (Reference #11)
Measurement standard	Colony formation	Expression of marker protein for pluripotency	Expression of marker gene for pluripotency	Tumor formation
Purpose	Detection of anchorage independent growth	Detection of undifferentiated pluripotent cells	Detection of undifferentiated pluripotent cells	Detection of tumorigenic or undifferentiated pluripotent cells
Time	30 days	1 day	6 hours	12-16 weeks
Advantage	Inexpensive	Rapid	Rapid and simple	Direct
Disadvantage	Indirect	Indirect	Indirect	Costly Time-consuming
	Not applicable to hiPSCs	Detecting only the cells that express the known marker molecules Gating techniques strongly influence the result	Detecting only the cells that express the known marker genes	
Lower Limit of Detection	1% of PA-1	0.1% of hiPSC (TRA-1-60)	≤ 0.002% of hiPSC ( <i>LIN28</i> )	245 undifferentiated hESCs with 10 <sup>6</sup> feeder fibroblasts (0.025%)

次に、試験系が機能していない可能性を否定するため、および正常細胞中への悪性形質転換細胞の混入に関する検出限界を検討するために、軟寒天培地中でのヒト卵巣テラトカルシノーマ細胞 PA-1 のコロニー形成を評価したところ、播種した細胞数が多くなるに伴って検出された PA-1 細胞のコロニーの数も多くなっていた。一方、陰性コントロールとして初代培養ヒト網膜色素上皮 (RPE) 細胞を用い、ウェルあたり  $1 \times 10^4$  個の細胞を播種したところ、30 日間の培養でもコロニーは認められなかった。次に今回の軟寒天コロニー形成試験系における PA-1 細胞の検出感度を評価した。正常細胞のモデルケースとして初代培養 RPE 細胞を用い、試験系の検出限界を求める目的で、これに 1%, 0.5%, 0.25% の割合で PA-1 細胞を添加するスパイク実験を実施した。その結果、1% の割合で PA-1 細胞を添加することにより、20 日の間にコロニー形成が認められたが、0.5% ないし 0.25% の割合で PA-1 細胞の添加した場合は、コロニー形成が検出されるまでに 30 日を要した。ネガティブコントロール (初代培養 RPE 細胞のみ) と比較して計算した場合、軟寒天コロニー形成試験系を用いて正常細胞 (初代培養 RPE 細胞) 中に混入する PA-1 細胞を検出するには、混入率が RPE 細胞の数の 1% 以上必要であることが明らかとなった。

特定のマーカータンパク質を指標に未分化ヒト iPS 細胞を検出する系として、フローサイトメトリーがある。正常細胞のモデルケースとして初代培養 RPE 細胞を用いて我々が検討したところでは、未分化細胞マーカーとされる Oct3/4, Sox2 および TRA-1-60 に対する特異的抗体によって、未分化 iPS 細胞と分化細胞とが峻別できることが確認された。特に、TRA-1-60 は未分化 iPS 細胞だけでなく、胚性がん細胞 (embryonal carcinoma) でも発現しているとされており、品質・安全性評価の上で有用と考えられる。初代培養 RPE 細胞に iPS 細胞をスパイクする実験により、正常細胞 (初代培養 RPE 細胞) に混入する未分化細胞の検出限界を検討した結果、0.1% 以上の混入量であれば有意な検出シグナルが得られることが明らかとなった。

定量性 RT-PCR は、特定のマーカー遺伝子発現を指標に未分化ヒト iPS 細胞を検出する高感度な系とだと当然のように考えられるが、どのマーカーが最適であるか、そして検出感度はどのくらいか、ということに関する情報は意外なことにほとんどない。そこで我々は、未分化細胞に選択的に発現するとされる遺

伝子として *OCT3/4*, *KLF4*, *C-MYC*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28*, *REX1* を選び、これらの中でどの遺伝子発現が未分化細胞の混入指標として最適か、最適な遺伝子を使用した場合の混入未分化細胞の検出限界はどのくらいかを、検討した。正常細胞のモデルケースとしては、軟寒天コロニー形成試験およびフローサイトメトリーの時と同様に初代培養 RPE 細胞を用いた。検討の結果、初代培養 RPE 細胞であっても、*C-MYC*, *KLF4* および *REX1* は、ヒト iPS 細胞での発現を 100% とした場合、数% ~ 25% のレベルで発現していることが明らかとなった。基礎科学としての細胞生物学・分子生物学の視点に立てば、この程度の発現量の差でも「未分化細胞選択的発現」と言えるかもしれない。しかしながら、患者あたりの一回の投与量が 104 ~ 109 とされる iPS 細胞由来移植細胞の中に僅かに残留する iPS 細胞の検出を行うには、この程度の選択性では全く不十分である。一方、*OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28* の初代培養 RPE 細胞における遺伝子発現量は、対 iPS 細胞比で 1/1,000 未満であった。RPE 細胞に iPS 細胞をスパイクして検討した結果、*OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG* を指標にした iPS 細胞の検出限界はそれぞれ、0.01%, 0.06%, 0.07% であった。*LIN28* については、初代培養 RPE 細胞中の発現が全く検出されなかったため、「ネガティブコントロールのシグナル値の平均値 + 標準偏差の 3 倍」という通常の方法により下方検出限界を求めることはできなかった。しかしながら、スパイク実験およびヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞を用いた検討から、0.002% 程度の iPS 細胞が混入した際にも *LIN28* の有意な発現シグナルが観測されることが明らかとなっている。すなわち、*LIN28* を指標にすれば、約 5 万個 RPE 細胞中に 1 個の割合で混入する未分化 iPS 細胞を検出できることになる。この方法は、我々の知り得る限り、分化細胞中の残存ヒト iPS 細胞の検出方法としては、学術論文として公表されている方法の中で最も感度が高く、平成 25 年 8 月から開始されている神戸の理化学研究所と先端医療センター病院の自己 iPS 細胞由来 RPE 細胞を用いた臨床研究計画の中でも品質管理試験として採用されるに至っている。なお、不死化細胞を *in vitro* で検出する系としては、上に紹介した方法の他、所定の培養期間を超えて細胞を培養し、その増殖特性を解析する試験がある。これらを組み合わせて未分化細胞および不死化細胞の存在を否定できれば、最終製品の造腫瘍性はかなり低いことが示唆されるが、臨床試験に進むことの妥当性は、

投与細胞数, 投与部位, リスクマネジメントプラン, あるいは *in vivo* 造腫瘍性試験データ等によって製品ごとに判断されるべきだと考えられる。

### まとめ

今回例に挙げたヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞は, 一回の滲出性加齢黄斑変性症の治療で  $10^4 \sim 10^5$  個必要とされており, 本稿で紹介した試験法の中に品質評価法として十分な性能を持つものがあつた。しかし, ヒト iPS 細胞由来の神経細胞や心筋細胞などを, それぞれ脊髄損傷や心不全の治療などに利用する場合には, 一回の施術に  $10^7 \sim 10^9$  個の細胞が必要とされ, 本稿で示した方法でも性能が十分ではない可能性がある。ケミストリーや測定方法の改良により更なる感度の上昇を実現し, 将来的には, より汎用性の高い iPS 細胞由来移植細胞の評価方法に発展することが望まれる。

ヒト iPS 細胞由来移植細胞のような再生医療製品を対象にした造腫瘍性試験ガイドラインは未だに存在しない。従って, 現時点では, 再生医療製品の中でも特に造腫瘍性に関して懸念の強い製品について, 本稿で挙げたタイプの異なる試験を複数実施し, 総合的に判断すべきであると考えられる。なお, 個別の製品で示すべき具体的評価事項は, 原材料や製品の特性・対象疾患・リスクマネジメントプランなどを勘案して製品ごとに判断されるものである。適切な試験 (を組み合わせた) 結果・評価についても, ヒトでの結果を完全に保証するものではなく, 各試験法の能力と限界を理解したうえで, リスク評価・リスクマネジメント立案およびインフォームド・コンセントの受領を行うことが重要であると考えられる。

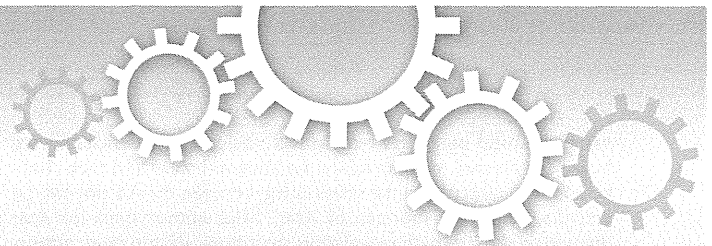
### 文 献

- 1) Lee MO, Moon SH, Jeong HC, et al: Proc Natl Acad Sci USA 2013, 110: E3281- E3290
- 2) Schuldiner M, Itskovitz-Eldor J, Benvenisty N: Stem Cells 2003, 21: 257-265
- 3) Chung S, Shin BS, Hedlund E, et al: J Neurochem 2006, 97: 1467-1480
- 4) Tang C, Lee AS, Volkmer JP, et al: Nat Biotechnol 2011, 29: 829-834
- 5) Choo AB, Tan HL, Ang SN, et al: Stem Cells 2008, 26: 1454-1463
- 6) Tohyama S, Hattori F, Sano M, et al: Cell Stem Cell 2013, 12: 127-137
- 7) Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al: Blood 2002, 100: 3175-3182
- 8) Machida K, Suemizu H, Kawai K, et al: J Toxicol Sci 2009, 34: 123-127
- 9) Kanemura H, Go MJ, Nishishita N, et al: Sci Rep 2013, 3: 2334
- 10) Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, et al: PLoS One 2012, 7: e37342
- 11) Hentze H, Soong PL, Wang ST, et al: Stem Cell Res 2009, 2: 198-210

別冊請求先: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部, 佐藤 陽治 (さとう ようじ)

Tel: 03-3700-1141 (代表) Fax: 03-3707-6950 e-mail: yoji@nihs.go.jp



OPEN

## Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability

SUBJECT AREAS:  
INDUCED PLURIPOTENT  
STEM CELLS  
PAEDIATRIC NEUROLOGICAL  
DISORDERS

Yoshihiro Fukawatase<sup>1,4</sup>, Masashi Toyoda<sup>1,5</sup>, Kohji Okamura<sup>2</sup>, Ken-ichi Nakamura<sup>6</sup>, Kazuhiko Nakabayashi<sup>3</sup>, Shuji Takada<sup>2</sup>, Mayu Yamazaki-Inoue<sup>1</sup>, Akira Masuda<sup>1</sup>, Michiyo Nasu<sup>1</sup>, Kenichiro Hata<sup>3</sup>, Kazunori Hanaoka<sup>7</sup>, Akon Higuchi<sup>8,9</sup>, Kaiyo Takubo<sup>6</sup> & Akihiro Umezawa<sup>1</sup>

Received  
18 November 2013

Accepted  
4 June 2014

Published  
27 June 2014

Correspondence and  
requests for materials  
should be addressed to  
A.U. (omezawa@  
1985.jkuin.keio.ac.  
jp)

<sup>1</sup>Department of Reproductive Biology, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, 157-8535, Japan, <sup>2</sup>Department of Systems BioMedicine, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, 157-8535, Japan, <sup>3</sup>Department of Maternal-Fetal Biology, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, 157-8535, Japan, <sup>4</sup>School of BioMedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, 113-0034, Japan, <sup>5</sup>Department of Research Team for Geriatric Medicine, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo, 173-0015, Japan, <sup>6</sup>Department of Research Team for Geriatric Pathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo, 173-0015, Japan, <sup>7</sup>Department of BioSciences, Kitasato University School of Science, Kanagawa, 252-0373, Japan, <sup>8</sup>Department of Chemical and Materials Engineering, National Central University, Taoyuan, 32001, Taiwan, <sup>9</sup>College of Science, King Saud University, Riyadh, 11451, Saudi Arabia.

**Ataxia telangiectasia is a neurodegenerative inherited disease with chromosomal instability and hypersensitivity to ionizing radiation. iPS cells lacking ATM (AT-iPS cells) exhibited hypersensitivity to X-ray irradiation, one of the characteristics of the disease. While parental ataxia telangiectasia cells exhibited significant chromosomal abnormalities, AT-iPS cells did not show any chromosomal instability *in vitro* for at least 80 passages (560 days). Whole exome analysis also showed a comparable nucleotide substitution rate in AT-iPS cells. Taken together, these data show that ATM is involved in protection from irradiation-induced cell death.**

The technology to generate human induced pluripotent stem cells (iPS cells) has impacted various medical fields, such as clinical applications and drug discovery, as well as basic biological science on reprogramming of differentiated cells<sup>1,2</sup>. The most recent attention has been placed on their potential use in cell-based transplantation. Using *in vitro* differentiation, iPS cells, like embryonic stem cells (ES cells), can provide an unlimited source of useful cell types for transplantation. The use of iPS cells in clinical application and research has been largely welcomed by society because use of these cells avoids the substantial ethical concern of cellular origin that plagues ES cells. The fact that the cells are autologous for patients could be another advantage in transplantation. Soon after human iPS cell technology was introduced, researchers also began to realize an additional and possibly greater value for the technology as a system to model human diseases<sup>3</sup>. Since iPS cells can be generated from skin biopsies or blood samples, retain all the genomic information from the original patients, and can be differentiated *in vitro* into cell types which are not easily accessible in patients, iPS cells can be utilized to study how genetic aberrancies in the patient manifest in target cells *in vitro*.

Ataxia telangiectasia (AT) is a rare neurodegenerative inherited disease characterized by early-onset progressive cerebellar ataxia, telangiectasias of the eyes and skin, immunodeficiency, chromosomal instability, hypersensitivity to ionizing radiation, and increased risk of cancer<sup>4</sup>. AT is caused by a defect in the *ATM* gene, which is responsible for recognizing and correcting DNA damage, and for destroying the cells when the errors cannot be corrected. One feature of ATM protein is its rapid increase in kinase activity immediately after double-strand DNA break formation<sup>5</sup>. The phenotypic manifestation of AT is due to the broad range of phosphorylation of substrates for the ATM kinase, involving DNA repair, apoptosis, G<sub>1</sub>/S, intra-S checkpoint and G<sub>2</sub>/M checkpoints, gene regulation, translation initiation, and telomere maintenance<sup>6</sup>. Therefore, a defect in *ATM* has severe consequences, and may lead to tumor formation. For example, the increased risk for breast cancer in AT patients implicates the involvement of ATM in the interaction and phosphorylation of BRCA1 and its associated proteins following DNA damage<sup>7</sup>.

Though the molecular basis of AT, such as a defect in the *ATM* gene and the effect that has on the broad range of substrates for the ATM kinase has been well established, the linkage between the loss of ATM function and





various clinical outcomes remain still unclear. *Atm*-deficient mice have been created to recapitulate the human disease and then characterized to understand the relationship between the AT phenotype and the pleiotropic function of *Atm*<sup>8</sup>. Mice homozygous for *Atm* disruption show growth retardation, neurologic dysfunction, immunologic abnormalities, lymphoreticular malignancies, chromosomal instability, and extreme sensitivity to ionizing radiation. However, oculocutaneous telangiectasias and remarkable histological evidence of neuronal degeneration, which are characteristics of human AT patients, have not been seen in these mice. The mouse model for AT is, therefore, very useful, but limited for understanding the human disease.

Mouse iPS cells from tail-tip fibroblasts of *Atm*-deficient mice have been reported<sup>9,10</sup>. Reprogramming efficiency is greatly reduced in the fibroblasts of *Atm*-deficient mice. Likewise, *ATM*-deficient human pluripotent stem cells, i.e. ES cells and iPS cells, have successfully been established by disrupting *ATM* gene<sup>11</sup> and from patients with ataxia telangiectasia<sup>12,13</sup>, respectively. These pluripotent stem cells exhibit disease-specific characteristics such as radiosensitivity and cell cycle checkpoint defects, and therefore serve disease model cells for clarification of pathogenic mechanism and screening novel compounds to treat the disease. The AT-iPS cell platform was indeed used to screen low-molecular compounds<sup>12</sup>.

In the present study, we attempted to generate iPS cells from fibroblasts of ataxia telangiectasia (AT-iPS cells), and successfully established the cells from the fibroblasts of AT patients. The reprogramming efficiency was very low as previously reported in the establishment of murine ATM-KO iPS cells. Human AT-iPS cells exhibited hypersensitivity to X-ray irradiation. Unexpectedly, the human AT-iPS cells did not show any chromosomal instability *in vitro*, i.e. maintenance of intact chromosomes lasted for at least 80 passages (560 days). These results indicate that the established human AT-iPS cells may be useful for the exploration of the mechanism of reprogramming, for clarifying the pathogenesis of AT, and for facilitating novel therapeutic interventions of the human disease. The possible mechanisms for the low reprogramming efficiency and for stable maintenance of their chromosome in the AT-iPS cells will also be discussed.

## Results

**Generation of iPS cells from human AT cells.** It has been reported that fibroblasts from *Atm*-deficient mice show remarkably low reprogramming efficiency compared to normal fibroblasts. Thus, we examined whether iPS cells could be efficiently generated from human cells having a mutation in the *ATM* gene (AT1OS cells, Figure 1A) by using the vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G) retroviral transduction system (Figure 1B). By using this system, the transduction efficiency was  $53.8\% \pm 11.9\%$  (mean  $\pm$  standard deviation) as estimated by enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression (Figure 1C). Southern blot analysis with cDNA probes for each of four transgenes (*OCT-3/4*, *SOX2*, *KLF-4*, and *c-MYC*) confirmed that each clone had chromosomal integration of the exogenously infected genes (Supplemental Figure S1). When the reprogramming factors *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* and *c-MYC* were introduced in  $2.0 \times 10^5$  AT1OS cells, only 10 iPS colonies were successfully generated. We compared the reprogramming efficiency of AT-iPS cells with that of MRC5-iPS cells that were generated by the same VSV-G retrovirus construct and protocol. The efficiency of AT-iPS cell colony generation (0.005%) was approximately 1/100, compared with that of MRC5-iPS cell generation (0.5%). Morphological characteristics of AT-iPS cells were similar to those of other intact iPS cells and ES cells (Figure 1D). Immunohistochemical analyses demonstrated that expression of the pluripotent cell-specific nuclear proteins, *OCT3/4*, *SOX2* and *NANOG*, and the keratan sulfate proteoglycan TRA-1-60 (Figure 1E, Supplemental Figure S2) was consistent with the profile

observed in hES cells. Hierarchical clustering analysis and principle component analysis of gene chip analysis data revealed that AT-iPS cells were grouped into the same category as MRC5-iPS cells, but not grouped into the ES cell category and parental cell category, regardless of gene set: all genes, neural genes, DNA-damage genes, and cell cycle-related genes (Supplemental Figure S3).

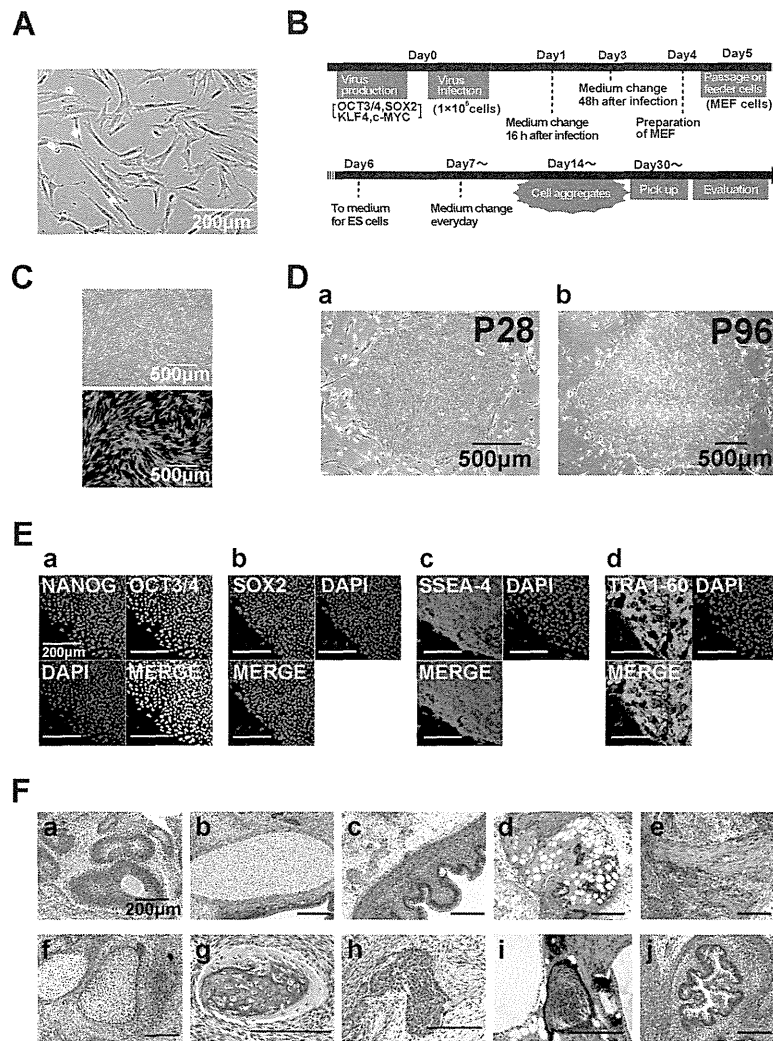
**Teratoma formation of AT-iPS cells.** To address whether the AT-iPS cells have competence to differentiate into specific tissues, teratoma formation was performed by implantation of AT-iPS cells at the subcutaneous tissue ( $1.0 \times 10^7$  cells/site) of immunodeficient NOD/SCID mice. Four independent AT-iPS cell clones induced teratomas within 6–10 weeks after implantation. Histological analysis of paraffin-embedded sections demonstrated that the three primary germ layers were generated as shown by the presence of ectodermal glia and neuroepithelium, mesodermal muscle and cartilage, endodermal ciliated epithelium morphologically in the teratoma (Figure 1F). Thus, all AT-iPS cell clones examined had potential for multi-lineage differentiation *in vivo*.

**Characterization of AT-iPS cells.** We examined the expression of the mutated *ATM* gene in AT-iPS cells by RT-PCR for amplifying the sequence including exon 31 of the *ATM* gene to confirm that the established cells were AT-derived (Figure 2A, Supplemental Table S1). AT-iPS cells clearly retained expression of the mutated *ATM* gene that had a deletion of 165 bp corresponding to the deletion of exon 31, showing that these cell clones were actually AT1OS derived. We also performed protein blot analysis on AT-iPS and MRC5-iPS cells (Supplemental Figure S4). *ATM* was detected at the protein level in MRC5-iPS cells, but not in AT-iPS cells (Supplemental Figure S4A, B). p53 was expressed at a similar level in AT-iPS and MRC5-iPS cells, and phosphorylation of p53 on serine-15 was similar in AT-iPS and MRC5-iPS cells (Supplemental Figure S4C, D).

The proliferative capacity of four AT-iPS cell clones was measured and compared with that of three MRC5-iPS cell clones (Figure 2B). No significant differences in proliferation rates were detected between the AT-iPS cell clones and the MRC5-iPS cell clones. Continuous observation through 18 passages revealed that AT-iPS cells continued to expand at a rate similar to MRC5-iPS cells, and could be cultured for more than 20 passages. Neither cessation of cell proliferation like senescence nor apoptosis/cell death was detected during cultivation through 20 passages.

**Stem cell-associated gene expression in AT-iPS cells.** The expression profiles of stem cell-associated genes were examined with qualitative RT-PCR to confirm the iPS cell characteristics of the established cell clones. The expression of the endogenous reprogramming factor genes (*KLF4*, *SOX2*, *OCT3/4*, and *c-MYC*) were undetectable or very low in the parental AT1OS cells, but were all activated in AT-iPS cells (Figure 2C to F). While the transgenes were fully silenced in AT-iPS cells (Figure 2G), expression of pluripotent cell-specific genes, such as *DNMT3B*, *NANOG*, and *TERT*, were activated in all AT-iPS cell clones to a similar extent of those in control hES cells and MRC5-iPS cells (Figure 2H to J, Supplemental Figure S5).

**Karyotypic analysis of AT-iPS cells during cultivation.** AT is a chromosome instability syndrome. The patients' cells frequently show chromosomal aberrations such as spontaneous chromatid/chromosome breaks, triradials, quadriradials and telomeric associations as well as numerical anomalies. In general, fibroblastic cell lines derived from AT patients accumulate chromosomal aberrations with an increase in passage number. Therefore, we performed karyotypic analyses of the AT1OS parental cells and AT-iPS cell clones at various passages (until 41 passages for more than 10 months). Parental AT1OS cells frequently exhibited chromosomal abnormalities, such as deletion, addition and translocation (Figure 3A).

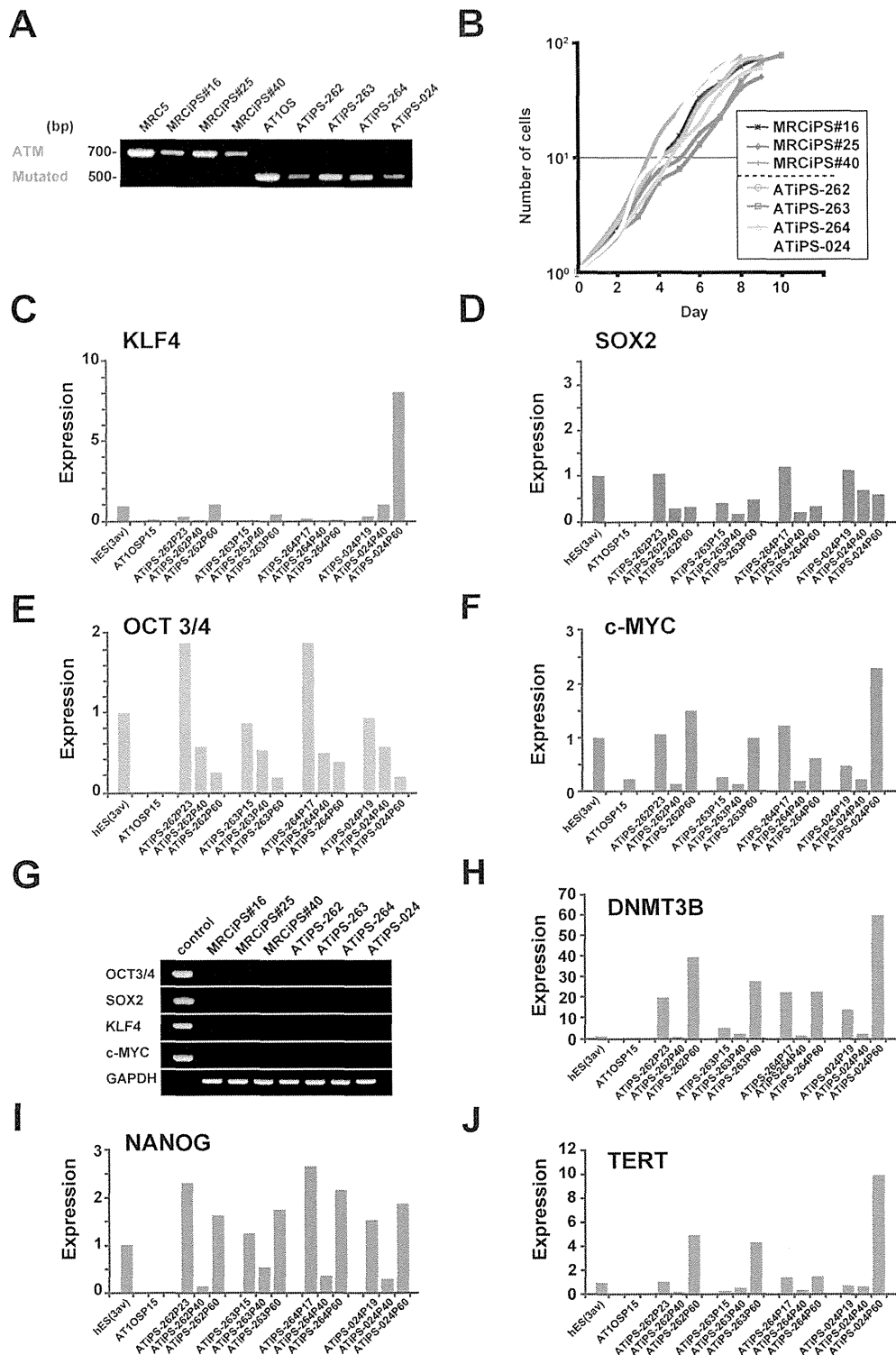


**Figure 1 | Generation of iPS cells from ataxia telangiectasia-derived cells.** (A). Phase-contrast image of AT10S ataxia telangiectasia-derived cells. (B). Protocol for iPS cell generation. (C). Infection efficiency as assessed by retrovirus carrying the EGFP gene. (D). Phase-contrast microphotographs of AT-iPS cell clones at passages 28 and 96. (E). Immunocytochemical analysis of AT-iPS cells using antibodies to NANOG (a), OCT3/4 (a), SOX2 (b), SSEA-4 (c), and TRA-1-60 (d). (F). Histology of teratoma generated by AT-iPS cells. (a): ectodermal glia and neuroepithelium, (b): cartilage, (c): intestinal epithelium, (d): adipose tissue, (e): smooth muscle, (f): epidermis, (g): bone, (h): hepatocytes, (i): retina, (j): intestine.

In contrast, most cells of the four AT-iPS cell clones had an intact karyotype at passage 13 to 16 (Figure 3B–D). Even after a long cultivation period (passage 41), karyotypes of all cells of the four AT-iPS cell clones remained intact. Morphological characteristics of AT-iPS cell colonies, i.e. the growth of flat and aggregated colonies, did not significantly change even at passage 96 (Figure 1D). Also, AT-iPS cells retained high alkaline phosphatase activity and teratoma formation after a long-term cultivation (Supplemental Figure S6).

**Elongated telomere length in AT-iPS cells.** Telomere lengths in AT10S cells and AT-iPS cells were measured (Table 1). TIG-1 at 34 population doublings served as a telomere length standard (6.91 kbp). The established ATiPS-262, -264, and -024 cells had 13.14, 15.64, and 16.54 kbp in telomere length, while the parental AT10S cells were 4.13 kbp. The results clearly show that AT-iPS cells gain elongated telomeres after iPS cell generation.

**Genomic alteration during AT-iPS cell cultivation.** Because AT10S cells exhibited considerable chromosomal abnormalities *in vitro*, we performed a structural alteration analysis using a SNP genotyping array for AT-iPS cells in ATiPS-262 cells at passage 17, ATiPS-263 cells at passage 27, ATiPS-264 cells at passage 25, and ATiPS-024 cells at passage 25. Compared to parental AT10S cells, we identified 12 unique structural alterations (Figure 4A, B). Among these genomic alterations, no common chromosomal region was detected in the AT-iPS cells. We also performed exome analysis on the AT-iPS cells to clarify the number of genetic alterations that occur when cells are induced to become pluripotent. The number of bases that our sequencer produced were 18.0, 17.2, 17.4, 17.8 and 18.1 Gb, and mean mapped depths of coverage were 91.7, 89.7, 88.0, 83.3, and 90.0 reads for ATiPS-262, ATiPS-263, ATiPS-264, and ATiPS-024 cells, respectively. In total, 212 SNVs were called. A 23,314-kb copy-neutral loss of heterozygosity (CNLOH) in ATiPS-262 cells, a 3,586-kb deletion in ATiPS-262 cells, and a 234-kb



**Figure 2** | Expression of the endogenous genes and the transgenes. (A). Expression of intact and mutated *ATM* gene in MRC5-iPS and AT-iPS cells. (B). Growth curves of AT-iPS and MRC5-iPS cells. Cell number was counted on the indicated day after cells ( $10^5$  cells/dish) were seeded on matrigel-coated 6-well plates. (C). Expression of the endogenous *KLF4* gene. (D). Expression of the endogenous *SOX2* gene. (E). Expression of the endogenous *OCT-3/4* gene. (F). Expression of the endogenous *c-MYC* gene. (G). Expression of the *OCT-3/4*, *SOX2*, *KLF4*, and *c-MYC* transgenes in each iPS cell at passage 10 (more than 30 population doublings). (H). Expression of the *DNMT-3B* gene. (I). Expression of the *NANOG* gene. (J). Expression of the *TERT* gene.



A

Cell	Mode	Karyotype
AT1OS	44(1),45(3), 46(44),47(2)	46,XY[10] 44,XY,-1,-6,add(12)(q24.1)[1] 45,XY,del(3)(q23),-6,del(14)(q32)[1] 45,XY,add(4)(p16),-16[1] 45,XY,add(11)(p15),-22[1] 46,XY,add(3)(p13),add(14)(q24)[1] 46,XY,t(3;15)(q23;p11.2)[1] 46,XY,add(11)(p11.1)[1] 46,XY,add(14)(q32)[1] 46,XY,add(2)(q31),+20[1] 46,XY,add(2)(q31),-16,+2mar[1]

B

Cell	Passage	Karyotype
ATiPS-262	P16	46,XY[19] / 45,XY,der(17;21)(q10;q10)[1]
ATiPS-263	P15	46,XY[20]
ATiPS-264	P15	46,XY[19] / 46,Y,add(X)(p22.1)[1]
ATiPS-024	P13	46,XY[20]

C

Cell	Passage	Karyotype
ATiPS-262	P41	46,XY[20]
ATiPS-263	P41	46,XY[20]
ATiPS-264	P41	46,XY[20]
ATiPS-024	P41	46,XY[20]

D

Cell	Passage	Karyotype
ATiPS-262	P76	46,XY[20]
ATiPS-263	P84	46,XY[20]
ATiPS-264	P81	46,XY[20]
ATiPS-024	P85	46,XY[20]

**Figure 3** | Karyotypes of AT-iPS cells and their parental cells after long-term cultivation. (A). Karyotypic analysis of AT1OS parental cells. (B). Karyotypic analyses of AT-iPS cell clones at Passage 13–16. (C). Karyotypic analyses of AT-iPS cell clones at Passage 41. (D). Karyotypic analyses of AT-iPS cell clones at Passage 76–85. For karyotypic analysis, 20 cells were analyzed and the number of cells with the indicated karyotype was shown in brackets.

deletion in ATiPS-024 cells involved 2, 37, and 1 SNVs, respectively. These SNVs were removed from the count because the events were caused by large-scale structural mutations rather than single nucleotide substitutions. Furthermore, ambiguously called five SNVs that escaped from the filtering process were manually eliminated (Supplemental Table S2). The numbers of SNVs were 43, 48, 35, and 41 (167 SNVs in total) in ATiPS-262, ATiPS-263, ATiPS-264, and ATiPS-024 cells, respectively (Figure 4B, Supplemental Table S2). Importantly, the identified number of non-synonymous coding bases is larger than that of synonymous coding (Figure 4C). We estimated that 0.48 single nucleotide alterations had occurred per population doubling (PD) in the AT-iPS cells. Single nucleotide change patterns in the 4 AT-iPS cells were summarized in Figure 4D.

**Detection of genomic mutation by the whole exome analysis.** The whole exome analysis, in which our samples were compared to the hg19 reference sequence, also detected the homozygous mutation at a splice donor site of the *ATM* gene (chr11:108164206, IVS31 + 2T > A) (Supplemental Table S3). The mutation at the splice donor site is compatible with the truncated *ATM* mRNA that had a deletion of exon 31 (Figure 2A). The detection of this mutation confirms reliability of the whole exome analysis.

**Sensitivity to irradiation in AT-iPS cells.** AT patients and the cells derived from the patients show higher sensitivity to ionizing radiations and to radiomimetic drugs. Thus, we examined the radiosensitivity of AT-iPS cells, and compared it with that of MRC5-iPS cells (Figure 5A). Five minutes after irradiation at