

201432012A

厚生労働科学研究委託費  
再生医療実用化研究事業

ヒト iPS 細胞等由来分化細胞の安全性に対する  
レシピエントの免疫状態の影響評価法の  
開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 佐藤 陽治

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の再生医療実用化研究事業による委託業務として、国立医薬品食品衛生研究所、近畿大学、および国立成育医療研究センターが実施した平成26年度「ヒト iPS 細胞等由来分化細胞の安全性に対するレシピエントの免疫状態の影響評価法の開発に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費  
再生医療実用化研究事業

ヒト iPS 細胞等由来分化細胞の安全性に対する  
レシピエントの免疫状態の影響評価法の  
開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 佐藤 陽治

平成 27 (2015) 年 3 月



# 目 次

	頁
<b>I. 委託業務成果報告（総括）</b>	
ヒト iPS 細胞等由来分化細胞の安全性に対するレシピエントの免疫状態の 影響評価法の開発に関する研究……………	1
佐藤 陽治	
<b>II. 委託業務成果報告（業務項目）</b>	
ヒト iPS 細胞等由来分化細胞の安全性に対するレシピエントの免疫状態の 影響評価法の開発に関する研究……………	23
佐藤 陽治、早川 堯夫、梅澤 明弘	
<b>III. 学会等発表実績……………</b>	<b>47</b>
<b>IV. 研究成果の刊行物・別刷……………</b>	<b>59</b>

厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（総括）

ヒト iPS 細胞等由来分化細胞の安全性に対するレシピエントの免疫状態の  
影響評価法の開発に関する研究

業務主任者：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

研究要旨

ヒト iPS 細胞等の多能性幹細胞由来移植細胞の臨床応用にあたって、非臨床段階での造腫瘍性評価は、最大の隘路とされている。製品毎に移植細胞数や原材料としての iPS 細胞の種類は様々であり、また免疫抑制剤の使用状況の違い（患者の免疫状態の違い）もあることを、造腫瘍性評価を行う上では考慮すべきである。本研究では、ヒト iPS 細胞由来分化細胞を移植細胞モデルとし、異なる免疫抑制状態のモデル動物評価系を用いて、製品中の腫瘍性細胞の混在量や混在率と陽性検出の関係づけ、移植細胞総数・移植部位などの相異が検出感度を含む造腫瘍性評価に与える影響について検討する。本年度は、ヒト末梢血由来単核細胞からナチュラルキラー細胞（NK 細胞）の拡大培養を行い、ヒト IL-2 を発現させたトランスジェニック重度免疫不全 NOG マウスに生着させることにより、遺伝的背景が揃い免疫抑制状態の異なるモデル動物を作製した。これらのヒトキメラマウスを用いたヒト iPS 細胞の造腫瘍性試験を行うため、細胞数の異なるヒト iPS 細胞を皮下投与し、NK 細胞の生着の確認とともに腫瘍形成の観察を行った。今後観察を 16 週目まで行い、ヒト NK 細胞の移植有無について TPD<sub>50</sub> を算出する予定である。自然免疫において主要な役割を果たしている NK 細胞が、ヒト iPS 細胞の造腫瘍性に対してどの程度の細胞傷害性を有するのかを検討し、適正な造腫瘍性評価法の体系化に繋げたい。

## 担当責任者

早川 堯夫	近畿大学薬学総合研究所 所長・特任教授
梅澤 明弘	独立行政法人国立成育医療研究センター 再生医療センター長

## 担当協力者（順不同）

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
西銘 千代子	公益財団法人実験動物中央研究所 試験事業部 研究員
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3室 室長
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
田塾 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
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
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
森山 博由	近畿大学薬学総合研究所 先端バイオ医薬研究室 准教授
森山 麻里子	近畿大学薬学総合研究所 先端バイオ医薬研究室 研究員

### A. 研究目的

ヒト iPS 細胞等の多能性幹細胞由来移植細胞の臨床応用にあたって、非臨床段階での造腫瘍性評価は、最大の隘路とされている。ところで、ヒト iPS 細胞等由来移植細胞は、その臨床適用法に応じて様々ではない。例えば、移植細胞数の面からみると、心筋細胞のように  $10^8 \sim 10^9$  乗個から、網膜色素上皮細胞のように数万個のものがある。また、iPS 細胞として自己由来と同種由来のものがあり、これらに由来する移植細胞を投与しようとする際、免疫抑制剤の使用の有無やどのような種類・程度の免疫抑制剤を使用するかという点で様々なケースが考えられる。

非臨床安全性試験としての造腫瘍性評

価法について考える際、最高感度検出系は、心筋細胞で想定されるような最高用量（ $10^8 \sim 10^9$  乗個/人投与）と世界最高感度と推定されている NOG マウスを組み合わせた系である。しかし、製品毎に移植細胞数や原材料としての iPS 細胞の種類は様々であり、また、免疫抑制剤の使用状況の違い（患者の免疫状態の違い）もある。NOG マウスは徹底的に免疫不全状態にしたものであって、必ずしも患者の免疫状態を反映したものではない。これらの点を考慮すると、最高感度検出系を一律にあらゆるヒト iPS 細胞等由来移植細胞の造腫瘍性評価法として適用することは必ずしも合理的とはいえない。

本研究では、ヒト iPS 細胞由来分化細胞

を移植細胞モデルとし、異なる免疫抑制状態のモデル動物評価系を用いて、製品中の腫瘍性細胞の混在量や混在率と陽性検出の関係づけ、移植細胞総数・移植部位などの相異が検出感度を含む造腫瘍性評価に与える影響について検討する。これらの研究を通じ、自己由来または同種由来の各種ヒト iPS 細胞等由来移植細胞の特性と臨床適用法、免疫抑制剤使用の有無や抑制作用の強弱に応じた適正な造腫瘍性評価法の体系化、ならびに First-in-Human での臨床適用の判断のための結果の解釈・対策を可能にするデータを集積する。平成 26 年度の本分担研究においては、ヒト末梢血由来単核細胞よりナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) の拡大培養を行い、ヒト IL-2 を発現させたトランスジェニック重度免疫不全 NOG マウスに生着させ、遺伝的背景が揃い自然免疫状態の異なるマウスモデルを作製し、ヒト iPS 細胞を移植し、腫瘍形成の経過観察を行った。

## B. 研究方法

### B-1 使用動物

本実験に用いた SPF の NOG-IL-2 Tg (NOD/Shi-*scid* IL2R $\gamma$ null-hIL-2 Tg) マウスは、公益財団法人実験動物中央研究所において NOG-IL-2 Tg マウスの凍結保存胚を、仮親である Jcl:ICR マウスの子宮内に移植することにより作製した。飼育は、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。雄性 6 週齢のマウスを 1-2 週間馴化させた後に実験に用いた。

### B-2 NK 細胞の拡大培養

NK 細胞培養はタカラバイオ CDM センターで行った。PromoCell 社のヒト末梢血由来単核細胞 (PBMC) から RetroNectin<sup>®</sup> (TaKaRa) 及び抗 CD3 抗体 (Miltenyi Biotec) を固定化したフラスコを用いてレトロネクチン誘導 T 細胞 (RN-T 細胞) 培養を行った。培養 4 日目以降、CultiLife™ 215 Culture bag (TaKaRa) に移し適宜希釈しながら培養を継続し、培養 7 日目および 14 日目の RN-T 細胞を NK 細胞培養用として分取した。NK 細胞の培養は、RN-T 細胞培養と同一ロットの PBMC をマグネットセレクションにより CD3 陽性細胞を除去後、加工処理を行った RN-T 細胞で 2 回刺激しながら、リンパ管腫治療剤 OK-432 (中外製薬)、インターロイキン 2 (IL-2、ノバルティス) と共に約 3 週間培養した。培養には CultiLife™ 215 Culture bag または GT-T610 Culture bag (TaKaRa) の 2 種類のガス透過性培養バッグを用い適宜希釈しながら拡大培養を行った。培養 21 日目の回収前に NK 純度をフローサイトメーターにより測定し、純度規格 >98% を満たしていたので回収前のマグネットセレクションは実施しなかった。凍結前に 1% ヒト血清アルブミン (HSA) を含む RPMI-1640 (フェノールレッド不含) を用いて洗浄後、必要分を凍結保存液にて  $2 \times 10^7$

cells/mL となるよう濃度調製を行った後、クライオバイアルに 2 mL ずつ充填した。NK 細胞は凍結後、-80°C以下にて保存を行った。

### B-3 培養 NK 細胞(凍結品)の融解後生細胞濃度試験及び生存率試験

NK 細胞 (凍結品) を 37°C恒温槽にて急速融解し、懸濁後の細胞溶液を一部分取し GT-T551 培地で 10 倍希釈を行った。10 倍希釈後の細胞液をさらにトリパンブルー染色液で 5 倍希釈を行い (最終 50 倍希釈)、ワンセルカウンターを用いて生細胞数/死細胞数を計測した (N=2)。細胞濃度と生存率は以下の計算式を用いて算出した。

- 細胞濃度 (cells/mL) : 生細胞数÷4 (視野) ×希釈倍率×10<sup>4</sup>
- 生存率 (%) : 生細胞数÷ (生細胞数+死細胞数) ×100

### B-4 培養 NK 細胞(凍結品)の細胞特性解析 (フローサイトメトリー解析)

NK 細胞 (凍結品) を 37°C恒温槽にて急速融解し、懸濁後の細胞溶液の一部分取しフローサイトメトリー解析に供した。検体を各染色用の抗体で反応・洗浄しフローサイトメーター (Beckman Coulter : Cytomics FC500) により測定し、解析ソフト CXP Analysis (Beckman Coulter) を用いて解析を行った。解析には以下の抗体を用いた。IgG-mixture (FITC, RD1, PC5) (2T8-2F5, Beckman Coulter); IgG-PC7 (679.1Mc7, Beckman Coulter); αCD3-PC5 (UCHT1,

Beckman Coulter); αCD56-PC7 (N901 (NKH-1), Beckman Coulter); αCD16-FITC (3G8, BD Bioscience); αNKG2D-PE (1D11, eBioscience); αCD45-FITC (J33, Beckman Coulter); αCD45-PE (J33, Beckman Coulter); αCD45-PC5 (J33, Beckman Coulter); αCD45-PC7 (J33, Beckman Coulter)

### B-5 培養 NK 細胞(凍結品)のマイコプラズマ否定試験

NK 細胞 (凍結品) を 37°C 恒温槽にて急速融解し、懸濁後の細胞溶液 200 μL を、生理食塩水 800 μL を用いて 5 倍希釈した。遠心後の上清を試験試料として供した。MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza) のプロトコールに従って試験を実施し、サンプル中のマイコプラズマの有無を判定した。

### B-6 培養 NK 細胞(凍結前)のエンドトキシン試験

培養、回収および洗浄後に  $4 \times 10^7$  cells/mL に懸濁された活性化 NK 細胞 (凍結前) を 1 mL 分取し遠心した。遠心後の上清をエンドトキシンフリー試験管に分取し、注射用水を用いて 100 倍希釈した (2 段階)。試料の調製は試験管ミキサーを用いて激しく攪拌後、溶液を試験試料として供した。Endosafe®-PTS™ カートリッジ (Charles River) に試料を 25 μL ずつ添加し、測定を行った。



## B-7 ヒト iPS 細胞およびヒト線維芽細胞の培養

ヒト iPS 細胞 201B7 株は、理研バイオリソースセンターより入手した。iPS 細胞の培養は、マトリゲル (Corning) でコートしたディッシュまたはフラスコ内で、mTeSR1 培地 (STEMCELL Technologies) にて培養した。正常ヒト線維芽細胞 (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  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で添加し、37°C/5% CO<sub>2</sub> 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。

## B-8 培養 NK 細胞を移植した NOG-IL-2 Tg マウスを用いた iPS 細胞の造腫瘍性試験

NOG-IL-2 Tg マウスの馴化終了後に全個体の体重を測定し、層別無作為割付法により各群の体重が平均化するよう群分けした。群構成は、

- ヒト NK 細胞非移植 : 0,  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  iPS 細胞/匹
- ヒト NK 細胞移植 : 0,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  iPS 細胞 / 匹

の計 10 群とし、各群とも 6 匹を配し、総計 60 匹とした。また、細胞を移植しないサテライト群を以下の様に設定し、FACS 解析を中心とした背景データを採取する。

- ヒト NK 細胞非移植 : 3 匹
- ヒト NK 細胞移植 : 3 匹

NK 細胞および iPS 細胞の移植スケジュールは、Figure 1 に示した。現在、iPS 細胞移植後 4 週目までのデータを取得済みである。ヒト NK 細胞移植するマウスは予め iPS 細胞移植日の 8 日前 (day -8) に 2.5 Gy の X 線照射を実施した。day -6, -5, -4 に  $8 \times 10^6$  cells/匹 ( $1.0 \times 10^8$  cells/mL に調整した培養ヒト NK 細胞 0.08 mL) を 26G 注射針付ツベルクリンシリンジに充填し、尾静脈内より移植した。さらに、day 17, 20, 21 に同条件での移植を行った。day 0 に iPS 細胞は NHDF  $1 \times 10^6$  個と混合し、ROCK 阻害剤である Y-27632 (和光純薬) を 10  $\mu\text{M}$  含む培地とマトリゲルで 1:1 の割合で構成された 100  $\mu\text{L}$  に細胞を懸濁し、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。腫瘍形成観察は、iPS 細胞移植後 16 週間行う予定である。ヒト NK 細胞非移植群においては Day -1 に、ヒト NK 細胞移植群においては Day -1, 16, 42, 77, 122 に、眼採血により得た血液を抗ヒト CD45 抗体を用いたフローサイトメーターの解析に供した。

### (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」、独立行政法人国立成育医療研究センター「独立行政法人国立成育医療研究センター動物実験規程」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 ヒト NK 細胞の拡大培養

本研究は、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-IL-2 Tg マウスに、ヒト NK 細胞を生着させ、ヒト iPS 細胞の造腫瘍性試験を行い、自然免疫による腫瘍形成率の変化を観察することを目的とする。重度免疫不全マウスにヒト NK 細胞を移植し生着させるには、一匹当たり  $5 \times 10^7$  個程度の細胞が必要と推定されるため、ヒト末梢血中から NK 細胞を拡大培養し、調製を行わなくてはならない。タカラバイオの技術を用いて、ヒト末梢血由来単核細胞の NK 細胞をレトロネクチン誘導 T 細胞で刺激し、ヒト由来 A 群溶血性レンサ球菌弱毒株の菌体制剤である OK-432 とヒト IL-2 の存在下で培養することにより、NK 細胞を選択的に拡大培養することができる。21 日間の培養での拡大増殖率は、202.8 倍であった (Table 4)。NK 細胞の選択的拡大培養とその純度を確認するために、培養した細胞の特性を、抗原特異的な抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した。成熟 T 細胞および胸腺細胞に発現する CD3 と、NK 活性を有する細胞に発現する CD56 のドットプロットより、培養細胞における CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>の割合は

99.8%、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>の割合は 0.1%、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>の割合は 0.1%、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>の割合は 0.0%であった。また CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>中の IgG の低親和性レセプターCD16 発現比率は 80.2%、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>中の NK 細胞に発現する NKG2D 発現比率は 99.8%であった (Table 4)。したがって、NK 細胞が選択的に培養されており、マウスへの移植の基準を満たした純度であることが、確認された。また、培養 NK 細胞は移植まで  $2 \times 10^7$  cells/mL の濃度で凍結保存されるため、融解後の生細胞濃度を調べたところ、 $2.05 \times 10^7$  cells/mL であり、生存率は 97.3%であった (Table 1)。無菌試験においては、一般細菌培養は陰性、嫌気培養は陰性であり、無菌試験は陰性と判定された。マイコプラズマ否定試験においては、MycoAlert Mycoplasma Detection Kit を用いた試験で、陰性と判断された (Table 2)。エンドトキシン濃度も、 $<1.00$  EU/mL であった (Table 3)。以上の結果より、マウス移植に適した培養 NK 細胞の調製を確認した。

### C-2 NK 細胞移植 NOG-IL-2 Tg マウスを用いたヒト iPS 細胞の造腫瘍性試験

ヒト NK 細胞を移植し重度免疫不全動物に生着させるのに当たり、NOG マウスにヒト型 IL-2 が発現しているトランスジェニック NOG マウス (NOG-IL-2 Tg) を作製した。Katano らは、ヒト臍帯血から造血幹細胞マーカーである CD34 陽性細胞を調製し、NOG-IL-2 Tg に移植した場合、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup>で特徴づけられる NK

細胞が選択的に生着することを報告している (J Immunol. 2015;194:000-000)。ヒト NK 細胞移植が有無の重度免疫不全マウスに、ヒト iPS 細胞を投与し腫瘍形成を観察することにより、NK 細胞が主要な役割を果たしている自然免疫の iPS 細胞の造腫瘍性に対する影響を検討することが可能になる。NOG-IL-2 Tg マウスを用いた NK 細胞および iPS 細胞の移植スケジュールを Figure 1 に示した。ヒト NK 細胞の生着を確認するため、iPS 細胞移植の 1 日前と 16 日後に末梢血を採取し、抗ヒト CD45 抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーで解析を行った。CD45 は白血球マーカーであり、本実験で使用した抗ヒト CD45 抗体は、ヒト CD45 には結合能を有するが、マウス CD45 には反応しない。NK 細胞を移植したマウスの末梢血において、Day -1 では 20%程度、Day 16 では 10~20%程度のヒト白血球細胞の生着が見られた。一方、NK 細胞を移植していない群においては、ヒト CD45 陽性細胞は 0.5%以下の検出であった (Figure 2)。現在のところ、iPS 細胞移植後 4 週目までマウスの腫瘍形成観察を行ったが、NK 細胞移植有無の両群で、まだ腫瘍形成は認められていない。今後さらに腫瘍形成を 16 週目まで観察し続け TPD<sub>50</sub> を算出し、NK 細胞移植有無による腫瘍形成率の違いを検討したい。

#### D. 考察

本研究では、ヒト iPS 細胞由来分化細胞を移植細胞モデルとし、遺伝的背景が揃い、

かつ異なる免疫不全マウスモデル評価系を用いて、製品中の腫瘍性細胞の混在量や混在率と陽性検出の関係づけ、移植細胞総数・移植部位などの相異が検出感度を含む造腫瘍性評価に与える影響について検討することを目的とする。

今年度は、遺伝的背景が揃い、かつ免疫抑制状態の異なるモデル動物として、NOG-IL-2 Tg マウスにヒト NK 細胞を移植し、生着させることを試みた。NK 細胞は、ヒト末梢血のリンパ球の 5~20%を構成し、自然免疫において主要な役割を果たすことが知られている。NK 細胞は、細胞傷害活性を有する顆粒リンパ球であり、その分泌顆粒にはパーフォリン、グランザイムもしくは INF- $\gamma$  を含む。また、*in vitro* および *in vivo* において、IL-2、IL-12、IL-15、INF- $\alpha/\beta$  といったサイトカインで、NK 細胞の細胞傷害活性が増強されることが報告されている。ヒト NK 細胞を生着させた動物モデルの作製するためには、NK 細胞の大量調製と、ヒト細胞の生着を許容する重度免疫不全動物が不可欠である。本研究では、NK 細胞を大量に調製するために、タカラバイオの技術を用いて、ヒト末梢血由来単核細胞より NK 細胞の拡大培養を行った。調製した培養細胞は、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>細胞が 99.8%と、T リンパ球の混入が極めて低く、NK 細胞の純度が極めて高いものであった。またヒト NK 細胞を生着させるマウスとして、ヒト IL-2 発現重度免疫不全 NOG マウス (NOG-IL2 Tg) を用い、NK 細胞の生着率の上昇を行った。NK 細胞投与第 1 クール

(Day -6, -5, -4, 1 回当たり  $8 \times 10^6$  NK cells/匹) における NK 細胞投与の結果、NK 細胞投与第2クールの直前である Day 16 でのヒト NK 細胞の末梢血での生着率は、群における平均値で 10~20%であった。また、血液中でのヒト IL-2 濃度が検出限界以下のマウスでは、ヒト NK 細胞の生着が認められなかったことから (データ未掲載)、ヒト IL-2 の発現は重度免疫不全マウスにおけるヒト NK 細胞の生着に必須であることが示唆された。

ヒト iPS 細胞の移植は、ヒト線維芽細胞、Rho キナーゼ阻害剤、マトリゲルと混合して行った。この条件により、単細胞に分散させたヒト iPS 細胞の定量性を持った造腫瘍性試験が可能になる。我々が以前に行った NOG マウスを用いた実験によると、16 週間観察後の TPD<sub>50</sub> は、 $6.3 \times 10^2$  であった。今回は、ヒト NK 細胞の有無が、ヒト iPS 細胞の造腫瘍性に及ぼす影響を検討したが、iPS 細胞移植後の観察期間が 4 週間のため、今のところ腫瘍形成はどのマウスにおいても観察されていない。今後、16 週間の腫瘍形成の観察を行い、腫瘍形成率の違いを算出する予定である。興味深いことに、Dresselらは、ES 細胞、iPS 細胞、テラトカルシノーマ細胞といった多能性幹細胞は、同系、同種および異種の NK 細胞の標的となり、NK 細胞に対する感受性が高いことを報告している (FASEB J. 2010;24:2164-77.)。しかしながら *in vivo* モデルにおいて、ヒト iPS 細胞の腫瘍形成に対するヒト NK 細胞の細胞傷害性が、どの程度のものであるのかは

分かっていない。

ES 細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞は、元来の性質として造腫瘍性を有するため、再生医療や細胞治療を目的とした多能性幹細胞由来移植細胞に混入する未分化細胞の腫瘍形成が懸念される。しかしながら、臨床応用においては、製品毎に移植細胞数や原材料としての iPS 細胞の種類は様々であることや、また、免疫抑制剤の使用状況の違い (患者の免疫状態の違い) も考慮する必要がある。今後、免疫抑制状態の異なる動物モデルを用いた iPS 細胞や iPS 細胞由来分化細胞の造腫瘍性試験を行い、腫瘍形成率等のデータを集積し、自己由来または同種由来の各種ヒト iPS 細胞等由来移植細胞の特性と臨床適用法、免疫抑制剤使用の有無や抑制作用の強弱に応じた適正な造腫瘍性評価法の体系化に繋げたい。

## E. 結論

本研究では、iPS 細胞加工製品中の腫瘍性細胞の混在量や混在率と陽性検出の関係づけ、移植細胞総数・移植部位などの相異が検出感度を含む造腫瘍性評価に与える影響について検討することを目的とする。本年度は、NOG-IL-2 Tg マウスを作製し、拡大培養したヒト NK 細胞を投与し、ヒト iPS 細胞を移植し、NK 細胞の生着と腫瘍形成の経過観察を行った。今後も観察を続け、*in vivo* モデルにおけるヒト iPS 細胞の造腫瘍性に対するヒト NK 細胞の細胞傷害性の程度を把握したい。

<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;7(9): e45532.

Katano I, Takahashi T, Ito R, Kamisako T, Mizusawa T, Ka Y, Ogura T, Suemizu H, Kawakami Y, Ito M. Predominant Development of Mature and Functional Human NK cells in a Novel Human IL-2-Producing Transgenic NOG Mouse. J Immunol. 2015;194:000-000.

Dressel R, Nolte J, Elsner L, Novota P, Guan K, Streckhuss-Bömeke K, Hasenfuss G, Jaenisch R, Engel W. Pluripotent stem cells are highly susceptible targets for syngeneic, allogeneic, and xenogeneic natural killer cells. FASEB J. 2010;24:2164-77.

**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 IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *Regen Ther*. 2015;1:30-7.
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*. 2015;43:146-9.
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 フォーマシア 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.
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.
15. Higuchi A, Ling QD, Kumar SS, Munusamy MA, Alarfaj AA, Chang Y, Kao SH, Lin KC, Wang HC, Umezawa A. Generation of pluripotent stem cells without the use of genetic material. *Lab Invest*. 2015;95(1):26-42.
16. Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, Umezawa A, Terada N. A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples. *Lab Invest*. 2015;95(1):4-13.
17. Akutsu H, Machida M, Kanzaki S, Sugawara T, Ohkura T, Nakamura N, Yamazaki-Inoue M, Miura T, Vemurib MC, Rao MS, Miyado K, Umezawa A. Xenogeneic-free defined conditions for derivation and expansion of human embryonic stem cells with mesenchymal stem cells. *Regenerative Therapy*. 2015;1:18-29.
18. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. 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.
19. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. 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.
  20. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. 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.
  21. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. 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.
  22. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. 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.
  23. 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 15;23(18):2211-24.
  24. 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.
  25. 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 TGFβ receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision. Development. 2014 Jan;141(1):91-100.
  26. 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.
  27. Morikawa T, Ninomiya K, Imura K, Yamaguchi T, Akagi Y, Yoshikawa M, Hayakawa T, Muraoka O. Hepatoprotective triterpenes from traditional Tibetan medicine *Potentilla anserina*. Phytochemistry, **102**, 169—181 (2014).
  28. 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. 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. 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)
  6. 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)
  7. 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)
  8. 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)
  9. 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)
  10. 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)
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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.
  16. 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.

17. 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.
18. 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。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. 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。
20. 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。
21. 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。
22. 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。
23. 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。
24. 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。
25. Tadashi Michiyama, Hiroyuki Moriyama, Mario Moriyama, Takao Hayakawa, Kiyofumi Ninomiya, Osamu Muraoka, Saowanee Chaipetch, 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.
26. 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.
27. 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. Australian society for Dermatology Research (ASDR). Sydney, Australia.
28. 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。
29. 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.
30. 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.
31. 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 N o t c h シグナルと解糖系の関連性. [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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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]
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. Junki 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.

53. 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.
54. Hayakawa T. 第四回ウィリアムハンコック賞 (4th William Hancock Award) 受賞 基調講演, On January 27-29, 2015 WCBP2015 (the CASSS Board). Mayflower Renaissance Hotel, Washington, DC.
55. Hayakawa T. 2015 IABS meeting [International Regulatory Endeavor towards Sound Development of Human Cell Therapy Products], Challenges for developing a minimum consensus package plus case by case approaches for evaluating cell therapy products. February 18-19th, 2015. Hitotsubashi Hall, Tokyo, Japan.
56. Hayakawa T. 2015 IABS meeting [International Regulatory Endeavor towards Sound Development of Human Cell Therapy Products], Specifications. February 18-19th, 2015. Hitotsubashi Hall, Tokyo, Japan.