

合後、NucleoSpin Tissue Column に添加し、遠心した。Buffer BW 500  $\mu$ l をカラムに添加し、遠心後、Buffer B5 600  $\mu$ l をカラムに添加し、遠心を行った。70°C に温めた Buffer BE 100  $\mu$ l を加え、室温で 1 分間インキュベートした後、11,000 $\times$ g で 1 分間遠心することによりゲノム抽出を行った。ゲノム量は NanoDrop (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて測定した。

### B-3 核型解析

#### B-3-1 染色体標本作製

培地中に 300 $\mu$ g/ml でチミジンを添加し 16 時間同調培養を行った。PBS で洗浄し、チミジンリリース後 5 時間培養し、コルセミドを 0.02 $\mu$ g/ml 濃度で添加した。さらに 1 時間培養を行った後、トリプシンで細胞をはがして回収し、0.075M KCl で 37°C、20 分間低張処理し、メタノール：酢酸=3:1 の固定液で細胞を固定し、スライドグラスに広げた。

#### B-3-2 Qバンディング

1 $\mu$ g/ml 濃度のヘキスト 33258 溶液に染色体標本を 10 分間浸漬し、次いで 50 $\mu$ g/ml のキナクリンマスタード液に 10 分間浸漬した。退色防止剤でマウントして蛍光で染色体画像を撮影した。

### B-4 次世代シーケンサーを用いた Exome 解析

上記方法にて抽出された hiPS 細胞のゲノム DNA における Exon (CDS) 領域を濃縮し、次世代シーケンサーによるシーケンスを行ったのち、変異塩基を抽出した。ゲノム DNA の品質を濃度測定および電気泳動などにより確認後、5  $\mu$ g 以上、100ng/

$\mu$  L 以上、OD260/OD280=1.6 以上、OD260/OD230=1.6 以上の純度を満たしたサンプルを使用した。サンプルを数百 bp に物理的に断片化を行い、二本鎖 DNA の両末端にアダプターを付加したフラグメントライブラリーを作製した。SureSelect Human All Exon V5 (アジレント・テクノロジー社) を用いて Exon (CDS) 領域を濃縮し、タグ配列を有するプライマーを用いて PCR 増幅を行い、シーケンスの鋳型となる DNA ライブラリーを作製した。HiSeq システム (イルミナ社) を用いて、100base 両末端のシーケンスを行い、5Gbase 相当のシーケンスデータを得た。シーケンスデータを参照ゲノム配列 (hg19) に対してマッピングし、ペア検体のマッピング情報から、体細胞変異塩基 (一塩基置換および十数塩基程度までの挿入、欠失) を検出した。さらに遺伝子位置情報ならびに既知変異データベースを用いて、体細胞変異塩基位置をアノテーションした。

### B-5 CGH アレイを用いたコピーナンバー変異 (CNV) 解析

Exome 解析に供したすべてのゲノム DNA について、CGH アレイを用いてシグナルデータを取得し、コピーナンバー変異をリスト化する解析を以下の通り実施した。ゲノム DNA の品質を濃度測定および電気泳動などにより確認後、2  $\mu$ g 以上、100ng/ $\mu$  L 以上、OD260/OD280=1.8~2.0、OD260/OD230=1.0 以上の純度を満たしたサンプルを使用した。アジレント社推奨の方法に準じて標識ターゲット調製を行い、SurePrint G3 Human CGH 1 $\times$ 1M (Agilent 社) を用いてハイブリダイゼーション、ス

キャニング、シグナル数値化などのアレイ解析を行った。GenomicWorkbench ソフトウェアにてシグナル Raw データを解析し、その結果をレポートファイルにまとめ、コピーナンバー変異をリスト化した。

## B-6 SNP アレイを用いた変異解析アレイ解析

Exome 解析に供したすべてのゲノム DNA について、SNP アレイを用いたゲノムタイピングを以下の通りに実施した。ゲノム DNA の品質を濃度測定および電気泳動などにより確認後、2  $\mu$ g 以上、100ng/ $\mu$ L 以上、OD260/OD280=1.6 以上、OD260/OD230=1.6 以上の純度を満たしたサンプルを使用した。HumanOmni2.5-8 BeadChip Kit (イルミナ社) を用いて、約 200 万塩基についてタイピングを行った。得られたデータを GenomeStudio により解析し、生殖細胞変異塩基 (一塩基置換) およびコピーナンバー変異を検出した。

### (倫理面への配慮)

ヒト由来の生体試料に関しては、試料提供者に一切不利益および危険性が伴わない、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに採取された試料を用いた。また、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について国立医薬品食品衛生研究所・研究倫理委員会による審査・承認を得た上で研究を実施した。

## C. 研究結果

### C-1 HiSeq システム (イルミナ社) を用いたシーケンス解析

#### C-1-1 ゲノム DNA の品質評価

上述の方法にて培養された iPS 細胞におけるゲノム品質を評価するために、二本鎖 DNA の量を測定した結果、最低 1 回はシーケンスを行える量を取得することができた (表 1)。また、核酸定量・アガロースゲル電気泳動を行い、濃度及び純度の品質検定を行った結果、すべてのサンプルにおいて問題が無いと判断された (表 2、図 1)。

#### C-1-2 ライブラリーの品質評価

品質確認を行ったゲノム DNA について、SureSelect XT Human All Exon v5 を用いてライブラリー作製を行い、それらライブラリーの品質を Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて測定した結果、すべての検体においてクローニングサイズが約 200 bp 長からなるライブラリーを作製することができた (図 2) さらに、一部の検体について、これらライブラリーを用いてシーケンスを行った結果、一検体あたりのペアエンドリード数が約 5 億個、総塩基数に換算すると約 50Gb 相当の配列がシーケンスされていることが確認できた。また、塩基配列をシーケンスするときには発生するエラー率を、以下の数式を用いて Phred クオリティスコアの値を算出した。

$$Q = -10\log_{10}p$$

その結果、Q30 (シーケンスエラーが生じる確率が 0.1%) のクオリティスコアが、いずれの検体についても 90%以上であることが確認できた (表 3)。

### C-2 ビーズアレイ解析および Agilent aCGH 解析

各培養条件で回収された iPS 細胞におけるゲノムワイドなジェノタイピングと

Copy Number Variant (CNV) の解析を行うために、それぞれのiPS細胞からゲノムDNAを回収し、核酸定量・アガロースゲル電気泳動を行い、濃度及び純度の品質検定を行った結果、すべてのサンプルにおいて問題が無いと判断し、これらをビーズアレイ解析に用いることとした。現在、Illumina Infinium LCG Quad Assay (Illumina, Inc.) のマニュアルプロトコルに従って、HumanOmni2.5-8 v1.1を用いたSNP解析およびCNV解析を実施している。同様に、Agilent aCGH解析に供するためのDNAサンプルも問題なく精製することができ、現在、SurePrint G3 Human CGH マイクロアレイ 1×1 Mを用いて解析中である。

### C-3 長期培養後における iPS 細胞の核型の評価

フィーダーフリー培養環境下で18継代培養された iPS 細胞の核型解析を、Q-Banding 法にて解析した結果、正常な核型を持つ細胞は、20細胞あたり2細胞のみであり、大半の細胞において染色体が異常であることが観察された (図3)。

### D. 考察

細胞加工物等の品質に影響を及ぼすと想定される要因は、製造工程内では多数存在するため、本分担研究では、一つのモデルケースとして、細胞の継代および凍結融解のプロセスに着目し、細胞加工物等の品質の指標となるゲノム不安定性について、次世代シーケンサーなどを用いた解析により評価をおこなった。製造工程の上流に位置するiPS細胞 (原材料でもある) を、

多分化能を維持したまま約4ヶ月間継代培養を行ったが、9割の細胞において、染色体の異常が観察された。この異常のほとんどは、12番染色体トリソミーであり、過去の報告からも核型の異常としては主に12、17、20番染色体またはX染色体の全体あるいは一部が増幅する例が報告されており、通常の培養条件下 (研究方法参照) でも染色体の構造異常が起こりうる事が判明した。iPS細胞を再生医療に使用するという観点からすると、このような染色体異常が起こることは、極めて重要な問題であり、培養の早い段階でそのような異常を検出する必要があると考えられる。本研究では、このiPS細胞について、長期培養 (18継代) の間に起こったゲノム変異について、3継代ごとの細胞に関する全エクソン解析、CGHマイクロアレイ解析、ビーズアレイ解析のデータを収集する予定であり、どの時点で染色体異常が起こったのかが検証できると思われる。さらには、今回のエキソーム解析は通常の読み深度 (Depth) よりも深く (50Gb相当の総塩基数) シーケンスされているため、低頻度のゲノム変異を検出することも可能であると考えられる。即ち、ゲノム変異と染色体の構造異常の相関が得られることが予想され、次世代シーケンサーを用いたゲノム異常検出系の確立にも、本研究成果は役立つものと期待される。来年度は上述に掲げた予測をもとに、正常核型をもつ細胞を含めた同様の解析結果を収集し、次世代シーケンサーを用いた細胞の品質評価系を検証していく予定である。

### E. 結論

・フィーダーフリーの培養環境下で長期間（18継代）培養されたiPS細胞において、核型異常のある細胞が出現した。

・高品質のシーケンスライブラリーを作製することができ、すべての検体において、50Gb相当のシーケンスを読むことができた。

・現在、全エキソーム解析、CGHマイクロアレイ解析、ビーズアレイ解析が進行中であるため、次年度以降、これらすべての解析が完了後には、これまでのゲノム評価試験結果との比較検討を行い、簡便性、再現可能性、信頼性などについて総合的に評価することで、細胞加工物等におけるゲノム不安定性を指標にした場合の標準的な方法論を提案する予定である。

## F. 研究発表

### F-1. 論文発表

1. 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 in press
2. Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Okura H, Tsutsumi H, Kawamat H, Sato Y. Characterization of in vivo tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2Rgamma null mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *Regen Ther*. 2015, 1: 30-37
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. Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. In vitro detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol*. 2014, 1210: 183-192.
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: 432-436
6. 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
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. *PHARM STAGE*. 2014, 14: p1-5
8. 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. *日本DDS学会誌*. 2014, 29: 207-216

### F-2. 学会発表

1. Sato Y. Tumorigenicity. IABS - International Regulatory Endeavour Towards Sound Development of Human Cell Therapy Products, 東京（2015年2月18～19日）
2. 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17～18日）
3. Sato Y. Japanese Regulations for Quality and Safety of Regenerative Medicine and Cell Therapy. 11th Annual Meeting DIA Japan 2014, 東京（2014年11月16～18日）
  4. 佐藤 陽治 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。第87回日本生化学会大会，京都（2014年10月15～18日）
  5. 佐藤 陽治 再生医療に関する日本の新しい規制の枠組み。RAPS Japan（Regulatory Affairs Professionals Society of 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」，東京（2014年10月29日）
  6. 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。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。アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2014，東京（2014年9月8～9日）
  7. 佐々木澄美，吉田徳幸，内田恵理子，佐藤陽治，井上貴雄。siRNAの細胞内取り込み機構の解析。第6回日本RNAi研究会，広島（2014年8月28～30日）
  8. Uchida E, Igarashi Y, Sato Y., Onodera M, Yamaguchi T. Study on the biosafety of ex vivo transduced cells with retroviral vectors and Cartagena protocol domestic law. 第20回日本遺伝子治療学会学術集会，東京（2014年8月6～8日）
  9. Suresh T, Maekawa K, Saito Y, Sato Y., Suzuki T. Individual Variations in the Human Urinary Proteome in Relation to Rats. The 3rd International Congress on Personalized Medicine, プラハ（2014年6月26～29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. ISSCR 12th Annual Meeting, バンクーバー（2014年6月18～21日）
  11. 佐藤 陽治 再生医療・細胞治療に関する国内外の規制動向。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，東京（2014年6月6日）
  12. 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. International Society for Cellular Therapy 2014, パリ（2014年4月23～26日）
- G. 知的財産権の出願・登録状況
- G-1. 特許取得  
なし
  - G-2. 実用新案登録  
なし
  - G-3. その他  
特記事項なし

表1. 二本鎖DNA定量結果

| サンプル名                    | 液量(ul) | 濃度(ng/ul) | 総量(ug) | 吸光定量値/蛍光定量値 |
|--------------------------|--------|-----------|--------|-------------|
| 454E2 P17 (4) MG coat    | 87     | 207       | 18     | 1.3         |
| 454E2 P20 (7) MG coat    | 87     | 331.8     | 28.9   | 1.4         |
| 454E2 P23 (10) MG coat   | 87     | 115.8     | 10.1   | 1.4         |
| 454E2 P26 (13) MG coat   | 87     | 352.8     | 30.7   | 1.3         |
| 454E2 P24 (11) MG coat   | 87     | 134.4     | 11.7   | 1.2         |
| 454E2 P24 (11) LNE8 coat | 87     | 63.6      | 5.5    | 1.3         |
| 454E2 P27 (14) MG coat   | 87     | 453.6     | 39.5   | 1.3         |
| 454E2 P29 (16) MG coat   | 84     | 235.8     | 19.8   | 1.3         |
| 454E2 P32 (19) MG coat   | 84     | 402       | 33.8   | 1.2         |
| 454E2 P30 (17) MG coat   | 84     | 64.8      | 5.4    | 1.1         |
| 454E2#10 P3 (29) MG coat | 84     | 338.4     | 28.4   | 1.2         |

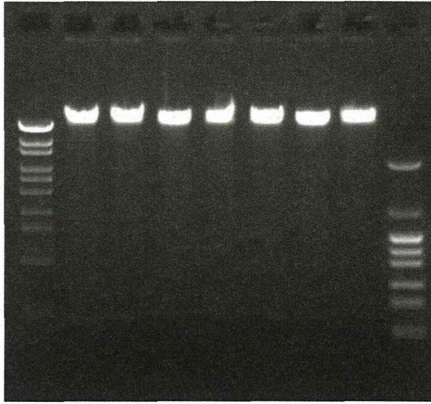
Quant-iT dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen) を用いた蛍光定量が行われた。

「吸光定量値/蛍光定量値」は核酸定量結果と二本鎖DNA 定量結果の乖離を示す（推奨値 $\leq 3$ ）。評価項目として、解析に必要とされる核酸濃度、総量、及び核酸定量結果（表1）と二本鎖DNA 定量結果の乖離データを指標にして評価した。

MG coat : matrigelコートディッシュで培養、LNE8 coat : laminin-E8コートディッシュで培養、括弧内の数字 : フィーダーフリーの培養環境下で培養された継代数

表2. ゲノムDNAの定量結果 (Nanodrop を用いた吸光定量)

| サンプル名                    | 液量(ul) | 濃度(ng/ul) | 総量(ug) | 260/280 | 260/230 |
|--------------------------|--------|-----------|--------|---------|---------|
| 454E2 P17 (4) MG coat    | 87     | 264.9     | 23     | 1.9     | 2.4     |
| 454E2 P20 (7) MG coat    | 87     | 473.4     | 41.2   | 1.9     | 2       |
| 454E2 P23 (10) MG coat   | 87     | 161.1     | 14     | 2       | 2.3     |
| 454E2 P26 (13) MG coat   | 87     | 472.2     | 41.1   | 1.9     | 2.3     |
| 454E2 P24 (11) MG coat   | 87     | 162.3     | 14.1   | 2       | 2.4     |
| 454E2 P24 (11) LNE8 coat | 87     | 82.8      | 7.2    | 2       | 2.3     |
| 454E2 P27 (14) MG coat   | 87     | 594       | 51.7   | 1.9     | 2.4     |
| 454E2 P29 (16) MG coat   | 84     | 298.2     | 25     | 1.9     | 2.1     |
| 454E2 P32 (19) MG coat   | 84     | 488.7     | 41.1   | 1.9     | 2.2     |
| 454E2 P30 (17) MG coat   | 84     | 69        | 5.8    | 1.9     | 1.8     |
| 454E2#10 P3 (29) MG coat | 84     | 419.4     | 35.2   | 1.9     | 2.2     |



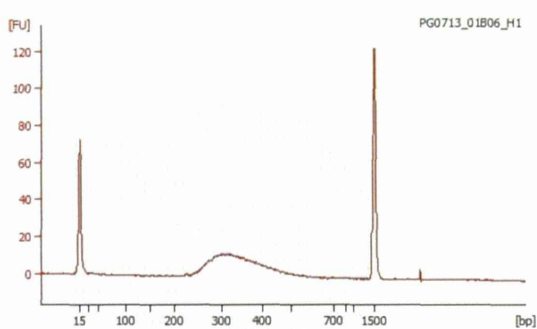
| レーン (左から) | サンプル名                    |
|-----------|--------------------------|
| 1         | λ-EcoT14 I digest        |
| 2         | 454E2 P17 (4) MG coat    |
| 3         | 454E2 P20 (7) MG coat    |
| 4         | 454E2 P23 (10) MG coat   |
| 5         | 454E2 P26 (13) MG coat   |
| 6         | 454E2 P24 (11) MG coat   |
| 7         | 454E2 P24 (11) LNE8 coat |
| 8         | 454E2 P27 (14) MG coat   |
| 9         | pHY Marker               |



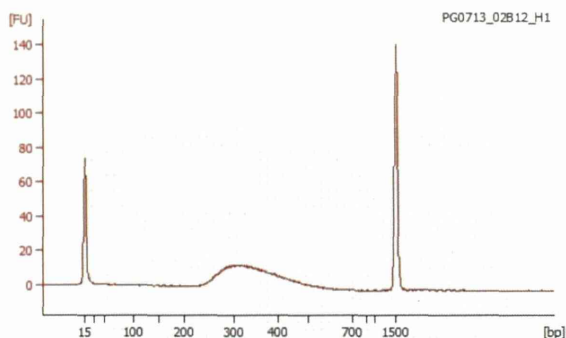
| レーン (左から) | サンプル名                    |
|-----------|--------------------------|
| 1         | λ-EcoT14 I digest        |
| 2         | 454E2 P29 (16) MG coat   |
| 3         | 454E2 P32 (19) MG coat   |
| 4         | 454E2 P30 (17) MG coat   |
| 5         | 454E2#10 P3 (29) MG coat |
| 6         | pHY Marker               |

図 1. アガロースゲル電気泳動によるゲノム DNA の品質確認

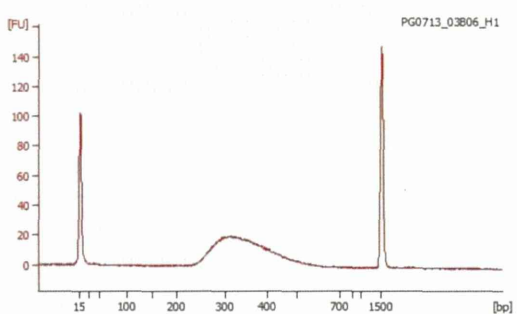




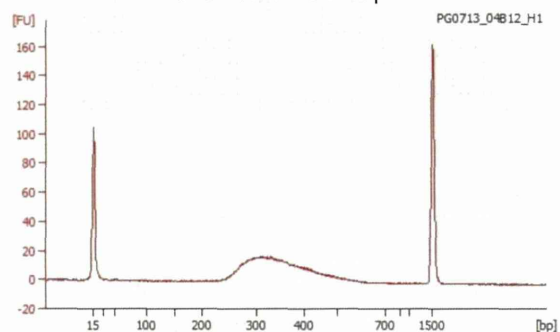
454E2 P17 (4) MG coat  
ピークサイズ : 303bp



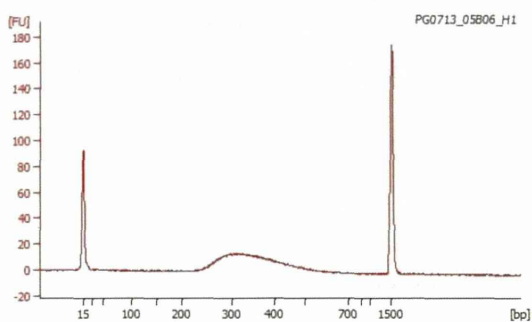
454E2 P20 (7) MG coat  
ピークサイズ : 306bp



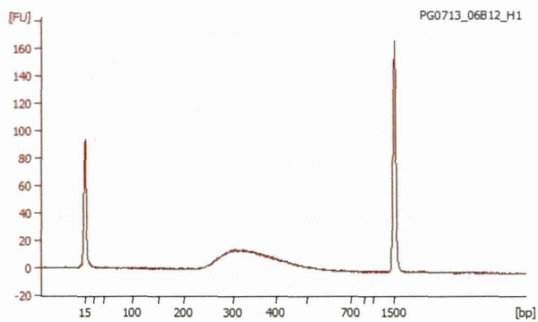
454E2 P23 (10) MG coat  
ピークサイズ : 311bp



454E2 P26 (13) MG coat  
ピークサイズ : 329bp

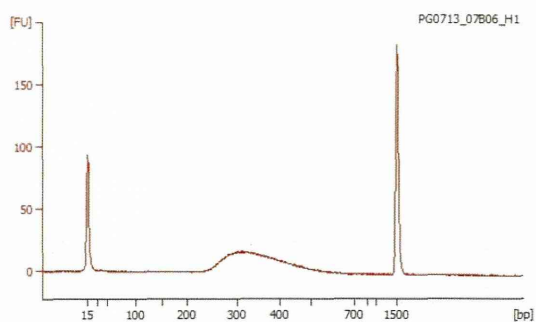


454E2 P24 (11) MG coat  
ピークサイズ : 316bp

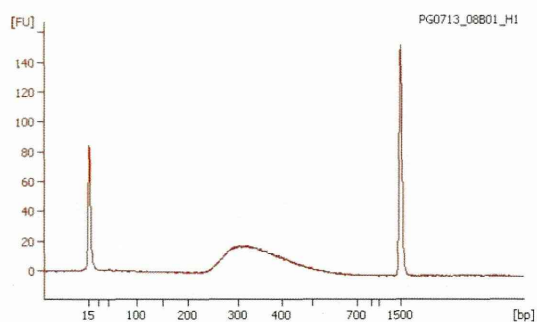


454E2 P24 (11) LNE8 coat  
ピークサイズ : 303bp

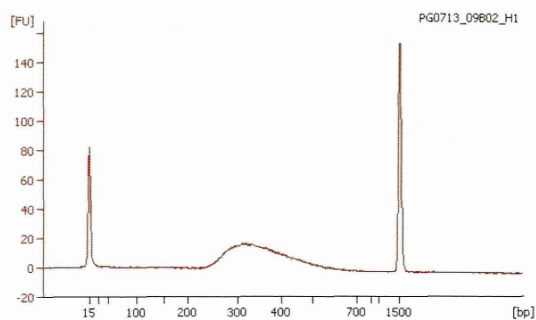
図2. Agilent 2100 Bioanalyzer を用いたリード長の検定結果



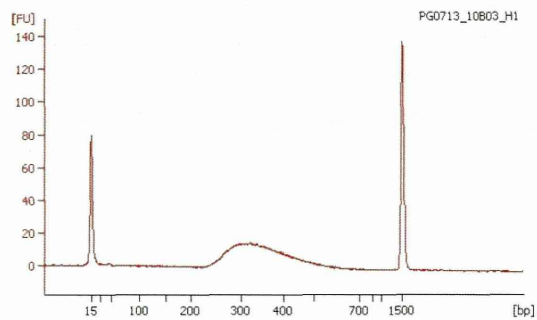
454E2 P27 (14) MG coat  
ピークサイズ : 312bp



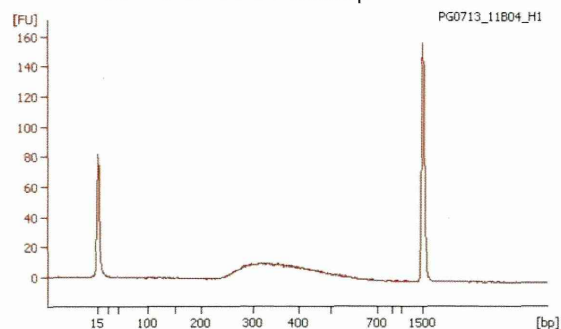
454E2 P29 (16) MG coat  
ピークサイズ : 304bp



454E2 P32 (19) MG coat  
ピークサイズ : 312bp



454E2 P30 (17) MG coat  
ピークサイズ : 320bp



454E2#10 P3 (29) MG coat  
ピークサイズ : 312bp

図2. Agilent 2100 Bioanalyzer を用いたリード長の検定結果 (続き)

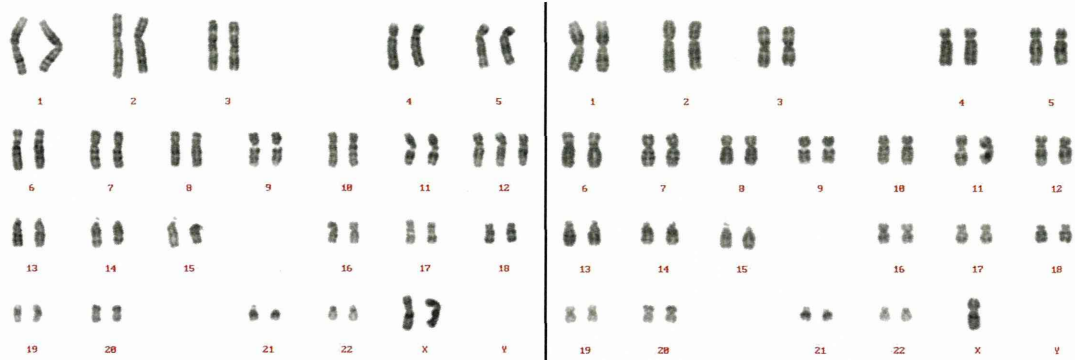
作製されたシーケンスライブラリーの品質をAgilent 2100 Bioanalyzer を用いて測定した。また、ライブラリーにはアダプター配列を付加されているため、ピークサイズからアダプターサイズ (約100base) を除いたサイズがクローニングサイズとなる。

表3. Phredクオリティスコアに基づいたシーケンス解析の精度評価

| サンプル名                    | リード数        | 塩基数            | Q30R1 | Q30R2 |
|--------------------------|-------------|----------------|-------|-------|
| 454E2 P17 (4) MG coat    | 474,768,598 | 47,476,859,800 | 95.7  | 92.6  |
| 454E2 P20 (7) MG coat    | 451,422,146 | 45,142,214,600 | 95.9  | 93    |
| 454E2 P23 (10) MG coat   | 467,368,748 | 46,736,874,800 | 95.5  | 92.6  |
| 454E2 P26 (13) MG coat   | 456,948,964 | 45,694,896,400 | 95.6  | 92.6  |
| 454E2 P24 (11) MG coat   | 532,750,982 | 53,275,098,200 | 93.9  | 90.2  |
| 454E2 P24 (11) LNE8 coat | 463,986,610 | 46,398,661,000 | 95.5  | 92.4  |
| 454E2 P27 (14) MG caot   | 503,181,358 | 50,318,135,800 | 94.9  | 91.6  |

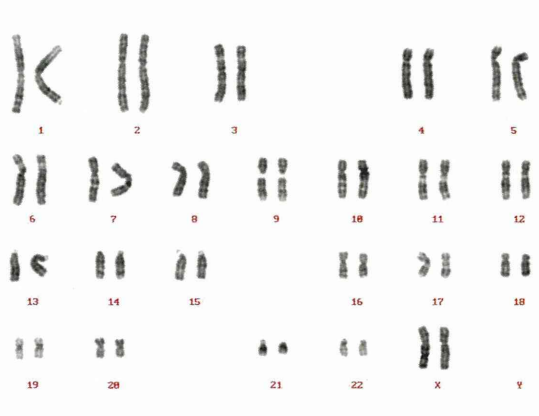
Q30R1: 片鎖・両鎖解析において1 回目に読み取られるリードの品質

Q30R2: 両鎖解析において2 回目に読み取られるリードの品質



47,XX,+12

45,X



46,XX

<核型>

47,XX,+12 (14/20)

45,X (2/20)

46,XX (2/20)

45,X,-11,+12 (1/20)

46,XX,+12,-18 (1/20)

図3. iPS細胞（フィーダーフリー環境下で18継代培養）における核型解析結果

### Ⅲ. 学会等発表実績

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「特定細胞加工物/再生医療等製品の品質確保に関する研究」

機関名：国立医薬品食品衛生研究所 新見伸吾

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 |
|---|---|--|----------------|--------|
| 培養工学観点から見たiPS細胞培養技術の展開  | 紀ノ岡 正博  | 第14回日本再生医療学会総会   | 2015年3月21日     | 国内     |
| Tumorigenicity（口頭）  | 佐藤 陽治   | IABS - International Regulatory Endeavour Towards Sound Development of Human Cell Therapy Products | 2015年2月18～19日  | 国内     |
| 再生医療における微生物管理の現状  | 水谷 学<br>紀ノ岡 正博  | 日本PDA製薬学会 第4回微生物シンポジウム「最新の迅速微生物測定法」  | 2015年2月2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     |
| 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     |
| 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     |
| 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,<br>山本誠司,<br>吉田徳幸,<br>佐々木澄美,<br>飯村信,<br>小泉誠,<br>佐藤陽治,<br>植村英俊,<br>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,<br>吉田徳幸,<br>内田恵理子,<br>佐藤陽治,<br>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,<br>Igarashi Y,<br>Sato Y,<br>Onodera M,<br>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     |

| 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 |
|---|--|---|---------------|--------|
| 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 | 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                               | 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     |
| 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) | Tano K, Yasuda S, Umezawa A, Sato Y.             | International Society for Cellular Therapy 2014         | 2014年4月23～26日 | 国外     |

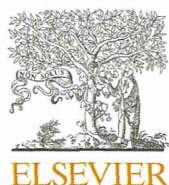
## 2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

| 掲載した論文（発表題目）  | 発表者氏名  | 発表した場所（学会誌・雑誌等名）             | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|---|--|------------------------------|--------|--------|
| Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells.   | Kono K, Takada N, Yasuda S, Sawada R, Niimi S, Matsuyama A, Sato Y.                                    | Biologicals                  | 2015年  | 国外     |
| Characterization of in vivo tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2Rgamma null mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. | Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Okura H, Tsutsumi H, Kawamat H, Sato Y. | Regenerative Therapy         | 2015年  | 国内     |
| A novel in vitro method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system.   | Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y.  | PLoS One                     | 2014年  | 国外     |
| In vitro detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells.  | Kuroda T, Yasuda S, Sato Y.  | Methods in Molecular Biology | 2014年  | 国外     |

| 掲載した論文（発表題目）                                     | 発表者氏名           | 発表した場所<br>（学会誌・雑誌等名） | 発表した時期 | 国内・外<br>の別 |
|--|-----------------|----------------------|--------|------------|
| ヒト多能性幹細胞加工製品に<br>残存する未分化多能性幹細胞<br>の高感度検出法の開発.    | 佐藤 陽治           | 再生医療                 | 2014年  | 国内         |
| 再生医療・細胞治療に使用する<br>細胞加工物の品質・安全性<br>評価の原則と造腫瘍性の考え方 | 三浦 巧,<br>佐藤 陽治  | 谷本学校毒性質問箱            | 2014年  | 国内         |
| 薬事法改正と再生医療等安全<br>性確保法を踏まえた再生医療<br>／細胞治療の開発       | 中島 啓行,<br>佐藤 陽治 | PHARM STAGE          | 2014年  | 国内         |
| 再生医療・細胞治療の規制動<br>向とレギュラトリーサイエンス                  | 村岡ひとみ,<br>佐藤 陽治 | 日本DDS学会誌             | 2014年  | 国内         |

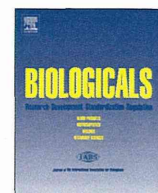


#### IV. 研究成果の刊行物・別刷



Contents lists available at ScienceDirect

Biologicals

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biologicals](http://www.elsevier.com/locate/biologicals)

Short paper

## Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells

Ken Kono <sup>a,1</sup>, Nozomi Takada <sup>b,c,1</sup>, Satoshi Yasuda <sup>b,d</sup>, Rumi Sawada <sup>a</sup>, Shingo Niimi <sup>a</sup>, Akifumi Matsuyama <sup>c</sup>, Yoji Sato <sup>b,d,e,f,g,\*</sup>

<sup>a</sup> Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kami-yoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>b</sup> Division of Cellular & Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kami-yoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>c</sup> Research on Disease Bioresources, Platform of Therapeutics for Rare Disease and Health Policy, National Institute of Biomedical Innovation, Kobe International Business Center Rm#602, 5-5-2 Minatojima-Minami-Machi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan

<sup>d</sup> Foundation for Biomedical Research and Innovation, Hyogo, Japan

<sup>e</sup> Department of Quality Assurance Science for Pharmaceuticals, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Aichi, Japan

<sup>f</sup> Department of Cellular & Gene Therapy Products, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan

<sup>g</sup> Department of Translational Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 October 2014

Received in revised form

13 November 2014

Accepted 24 November 2014

Available online xxx

#### Keywords:

Regenerative medicine

Cellular therapy

Tumorigenicity

Mesenchymal stem cell

Quality

Safety

### ABSTRACT

The analysis of *in vitro* cell senescence/growth after serial passaging can be one of ways to show the absence of immortalized cells, which are frequently tumorigenic, in human cell-processed therapeutic products (hCTPs). However, the performance of the cell growth analysis for detection of the immortalized cellular impurities has never been evaluated. In the present study, we examined the growth rates of human mesenchymal stem cells (hMSCs, passage 5 ( $P = 5$ )) contaminated with various doses of HeLa cells, and compared with that of hMSCs alone. The growth rates of the contaminated hMSCs were comparable to that of hMSCs alone at  $P = 5$ , but significantly increased at  $P = 6$  (0.1% and 0.01% HeLa) or  $P = 7$  (0.001% HeLa) within 30 days. These findings suggest that the cell growth analysis is a simple and sensitive method to detect immortalized cellular impurities in hCTPs derived from human somatic cells.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of The International Alliance for Biological Standardization. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

### 1. Introduction

Human cell-processed therapeutic products (hCTPs) are expected to provide novel breakthrough therapies for currently life-threatening or incurable diseases. In the clinical applications of hCTPs to patients, however, one of the major concerns is the tumorigenic cellular impurities in the products. Since pluripotent stem cells (PSCs), such as embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, are tumorigenic [1–3], there is a risk of tumor formation if the products contain the residual undifferentiated

PSCs [4]. On the other hand, somatic cells are considered to have little tumorigenic potential even after substantial manipulations like *in vitro* expansion, because they consistently pass into senescence [5]. Malignant transformation of the cells is believed to occur through multiple processes involving the accumulation of mutations in key regulatory genes that promote cell survival and proliferation [6,7]. Although a few individual groups reported the spontaneous transformation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) during *in vitro* culture [8–11], two of them retracted their papers because the results appeared to be attributable to contamination with tumorigenic cells (fibrosarcoma, osteosarcoma, or glioma cell lines) [12,13]. The rest of the groups found the immortalization of the cells, which is closely associated with tumorigenicity, during *in vitro* culture, indicating that the good practices to avoid contamination with tumorigenic cells and the monitoring of cell growth are critical for the quality control of hCTPs derived from human somatic cells.

\* Corresponding author. Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kami-yoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan.

E-mail addresses: [kenkono@nihs.go.jp](mailto:kenkono@nihs.go.jp) (K. Kono), [takada.n@nihs.go.jp](mailto:takada.n@nihs.go.jp) (N. Takada), [yasuda@nihs.go.jp](mailto:yasuda@nihs.go.jp) (S. Yasuda), [rsawada@nihs.go.jp](mailto:rsawada@nihs.go.jp) (R. Sawada), [niimi@nihs.go.jp](mailto:niimi@nihs.go.jp) (S. Niimi), [akifumi-matsuyama@umin.ac.jp](mailto:akifumi-matsuyama@umin.ac.jp) (A. Matsuyama), [yoji@nihs.go.jp](mailto:yoji@nihs.go.jp) (Y. Sato).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2014.11.007>

1045-1056/© 2014 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of The International Alliance for Biological Standardization. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).



### Abbreviations

|         |  |
|---------|--|
| hCTP    | human cell-processed therapeutic product |
| PSC     | pluripotent stem cell                    |
| hMSC    | human mesenchymal stem cell              |
| STR     | short tandem repeat                      |
| $P = n$ | passage $n$                              |
| PBS     | phosphate buffered saline                |
| RT      | room temperature                         |
| HPV     | human papillomavirus                     |

Cross contamination of cells with unidentified cells is usually evaluated by the short tandem repeat (STR) analysis [14]. However, the cell growth analysis which simply monitors the cell proliferation for a limited period may be adequately sensitive for the detection of the contamination of somatic cells with immortalized/tumorigenic cells, because somatic cells usually show slower growth, compared with that of immortalized/tumorigenic cells, as well as the attenuation of the growth after serial passaging [15–17]. In fact, the European Medicines Agency has considered that the evaluation of *in vitro* cell senescence after serial passaging is sufficient to prove the absence of immortalized/tumorigenic cells in a somatic cell-based product [18]. However, the performance of the cell growth analysis for detection of the immortalized/tumorigenic cellular impurities in somatic cells has never been studied. In the present study, we examined the growth of hMSCs contaminated with various doses of HeLa cells, a well-known cancer cell line, to determine the sensitivity of the cell growth analysis for the detection of the immortalized/tumorigenic cells in human somatic cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cells

hMSCs (Lonza, Walkersville, MD) at passage 2 ( $P = 2$ ) were cultured in MSCGM BulletKit, a mesenchymal stem cell basal medium with mesenchymal cell growth supplement, L-glutamine, and gentamycin/amphotericin-B (Lonza). HeLa cells (the Health Science Research Resources Bank, Osaka, Japan) were maintained in Eagle's minimum essential medium (Sigma), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma), 0.1 mM non-essential amino acids (Life Technologies), 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin (Life Technologies). Cells were cultured in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37 °C, and were passaged upon reaching 90% confluence.

### 2.2. Cell growth analysis

At  $P = 5$  of hMSCs,  $1 \times 10^6$  of hMSCs were mixed with 1000, 100, or 10 of HeLa cells and seeded into T175 flasks (Corning). The cells were maintained in 40 ml of Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% FBS, 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin. Upon reaching approximately 90% confluence, the cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and treated with 0.05% trypsin-EDTA solution (Gibco) for detachment from the flasks. The cells were centrifuged at  $450 \times g$  for 5 min and suspended with the fresh culture medium. Aliquots of the suspended cells were stained with Trypan Blue solution and counted by Countess Automated Cell Counter (Invitrogen) according to the manufacture's protocol. One million cells in the

suspension were re-seeded into T175 flasks and cultured until the next passage. This process was repeated by  $P = 10$ . The growth rate ( $R_n$ ) at  $P = n$  was calculated by the following equation:

$$R_n = [\log_2(N_{n+1} - N_n)] / (D_{n+1} - D_n)$$

where  $N_k$  and  $D_k$  are the number of accumulated cells and the date at  $P = k$ , respectively.

### 2.3. Immunofluorescence microscopy

hMSCs contaminated with HeLa cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS (Nacalai Tesque) for 10 min at room temperature (RT) and blocked in Blocking One (Nacalai Tesque) for 30 min at RT. The cells, then, were incubated with anti-HPV18 E7 antibody (8E2) (abcam) diluted at 1:500 in the blocking solution (PBS containing 5% Blocking One) for 1 h at RT for primary staining, and secondarily stained with goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (1:1000; Invitrogen) in the blocking solution for 45 min at RT. The cells were mounted with VECTASGIELD mounting medium with DAPI (VECTOR) and observed with a fluorescence microscope (IX71, Olympus).

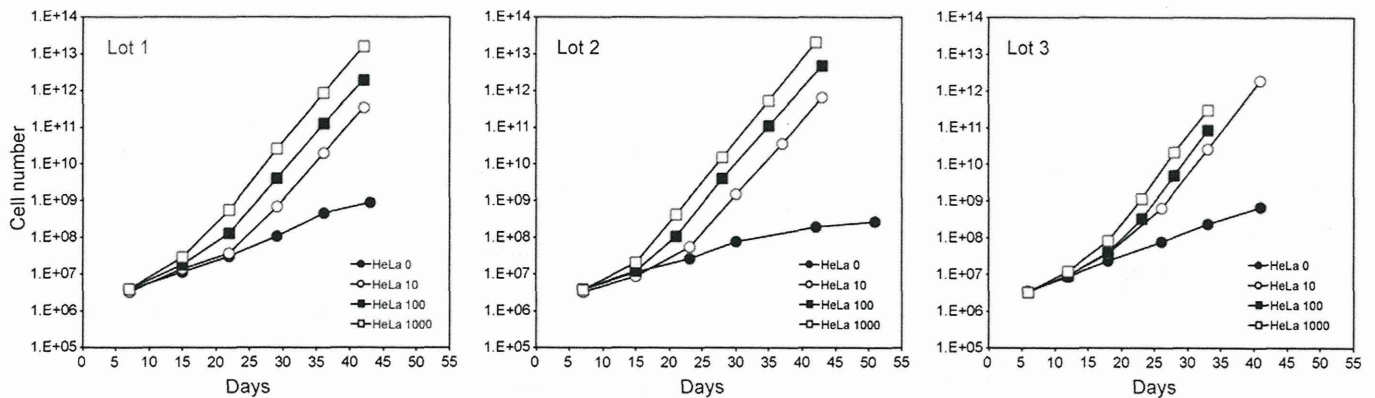
## 3. Results and discussion

In the present study, we added 1000, 100, or 10 of HeLa cells to  $1 \times 10^6$  of hMSCs of passage 5 ( $P = 5$ ) and compared their growth with that of hMSCs alone (HeLa 0) until  $P = 10$ . The growth curves of three lots of hMSCs and the contaminated hMSCs are shown in Fig. 1. The cell numbers of HeLa 0 and the contaminated hMSCs were comparable at  $P = 5$ . The growth of HeLa 0 was constant during the early culture and getting slower with time (Fig. 1), while the growth of the contaminated cells was accelerated.

To confirm that the increases in the growth were attributable to the contamination with HeLa cells, we observed the cells with phase contrast microscopy. In the images of the contaminated hMSCs, we found small cells clearly different from hMSCs (Fig. 2A), and their relative abundance increased every passage. Because HeLa cells are infected with human papillomaviruses (HPV), we performed immunofluorescence analysis using HPV18 E7 antibody and confirmed that the cells were HeLa cells not transformed hMSCs (Fig. 2B). At  $P = 10$ , hMSCs were hardly identified in images of HeLa 1000 (Fig. 2C), because almost all of hMSCs were exchanged for HeLa cells at the five passages.

Next, we examined the growth rates of the contaminated cells (Fig. 3A). They were comparable to that of HeLa 0 at  $P = 5$ , and got significantly increased at  $P = 6$  (HeLa 1000 and HeLa 100) or  $P = 7$  (HeLa 10). These results indicated that the gross proliferation rate was not influenced by the spiked cells at  $P = 5$  and then the population of HeLa cells in hMSCs increased in dose- and time-dependent manner. Eventually, the growth rate (doubling/day) of the contaminated hMSCs increased, and then reached plateau. The average growth rate of the contaminated cells at  $P = 9$  and 10 was 0.73, suggesting that the growth rate of HeLa cells was approximately 0.7 in this culture condition. The average growth rates of the three lots are plotted along the passage number in Fig. 3B. The growth rates of HeLa 1000 and HeLa 100 at  $P = 7$  and HeLa 10 at  $P = 8$  were significantly increased compared with the growth rates at  $P = 5$  ( $*P < 0.05$ , two-way repeated measures ANOVA and Student-Newman-Keuls test). These results indicate that the cell cultures longer than  $P = 7$  (about 20 days) and  $P = 8$  (about 30 days) detect cross-contaminations of 100 (0.01%) and 10 (0.001%) HeLa cells, respectively, assuming that  $10^6$  hMSCs were contaminated at  $P = 5$ .

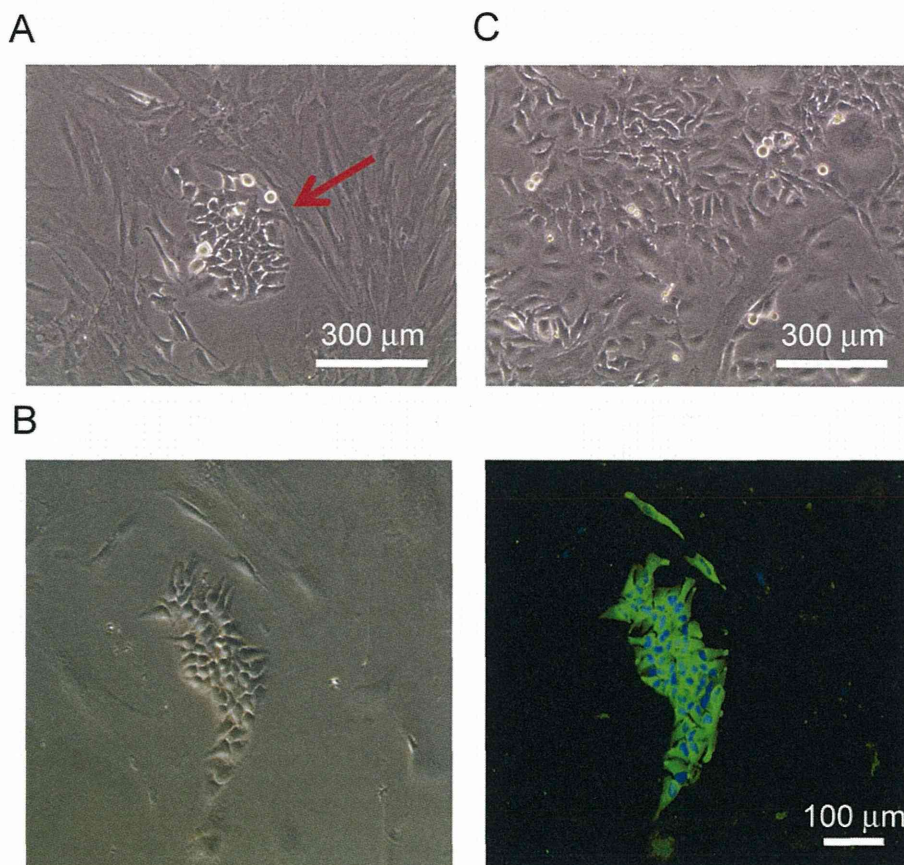




**Fig. 1.** Cell growth analysis of hMSCs contaminated with HeLa cells. At the passage 5 ( $P = 5$ ) of hMSCs,  $1 \times 10^6$  of hMSCs were mixed with 0, 10, 100, or 1000 of HeLa cells (HeLa 0, HeLa 10, HeLa 100, or HeLa 1000). Cells were passaged and counted at the indicated day from  $P = 5$ . The results of three lots of hMSCs are presented (Lot 1, 2, and 3).

The tumorigenicity has been evaluated by *in vitro* assays (e.g., soft agar formation assay, karyotype analysis) and/or *in vivo* assays (transplantation into immunodeficient animals) [8,9,19,20]. When these assays are performed to detect a trace amount of tumorigenic cells in hCTPs, they need to be of high sensitivity. Recently, we developed a highly sensitive *in vivo* tumorigenicity test using severely immunocompromised mice, NOG mice, in combination with Matrigel. Subcutaneous transplantation into NOG mice with Matrigel allowed inoculation with  $1 \times 10^7$  cells and actually achieved detection of 0.002% HeLa cells spiked into hMSCs in a half of the mice (unpublished data). However, *in vivo* tumorigenicity test

using immunodeficient animals requires a specific facility, and takes 3–4 months. In contrast, the cell growth analysis is not only simple and economical, but also detects as few as 0.001% immortal cellular impurities in hMSCs within 30 days, in case that the growth properties of the immortal cells are comparable to those of HeLa cells. Although immortality does not necessarily indicate tumorigenicity, it is known to be closely associated with cell transformation in many cases of tumorigenesis. Therefore, the present study can be said to be the first scientific basis for the usefulness of the cell growth analysis as one of tumorigenicity tests for hCTPs derived from human somatic cells.



**Fig. 2.** Phase contrast and immunofluorescence microscopy of hMSCs contaminated with HeLa cells. (A) Representative image of the contaminated cells (HeLa 100 at  $P = 8$ ) is presented. Red arrow pointed at the small size cells which were clearly different from hMSCs. (B) Phase contrast and immunofluorescence microscopy of HeLa 1000 at day 5 was conducted by using anti-HPV E7 antibody. Green: Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG; blue: DAPI. (C) Representative image of HeLa 1000 at  $P10$  is presented.