

# **厚生労働科学研究費補助金**

## **再生医療実用化研究事業**

**iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究**

**平成26年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 川真田 伸**

**平成 27 (2015) 年 3 月**

## 目 次

I. はじめに	1
II. 研究組織	5
III. 平成26年度 総括研究報告書	
iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究	9
川真田 伸	
IV. 平成26年度 分担研究報告書	
iPS 細胞由来神経前駆細胞の長期造腫瘍安全性試験の実施	15
郷 正博	
細胞label systemの開発	25
尾上 浩隆 / 田原 強	
iPS 細胞、および iPS 細胞由来分化細胞の規格化研究	29
西下 直希 / 田村 尚	
V. 会 議 記 録	35
VI. 研究成果の刊行物・印刷物	39

## はじめに

本報告書は、厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業の一つである「iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究」研究班における平成26年度の研究成果をまとめたものである。

本研究では、幹細胞治療では被験者保護の観点から、無限の分裂能をもつ多能性幹細胞由来細胞移植の安全性試験とりわけ腫瘍形成能の評価を主軸としたiPS細胞等多能性幹細胞由来分化細胞の造腫瘍性試験実施する。iPS細胞の細胞規格が未確定で、未分化状態で多能性幹細胞の規格を満たしていても、iPS細胞の樹立法の違いによっては、分化誘導の際に最終分化に至らない細胞の増殖がみられたこと、また多能性幹細胞を未分化培養状態で長期間培養すると、染色体構造異常が高頻度(約12%、Nature Rev Gen 2012:13 732-44)で出現するため、移植前の網羅的染色体検査方法の確立が必須であること、さらに、少数の移植細胞の転移を長期間観察するための適切な生体imaging systemがないこと等、これらの課題に答える新たな研究を実施する。最終的な安全性パッケージ構築の形としては、iPS細胞の遺伝子情報を造腫瘍性試験結果と関連づけ、ヒト癌臨床data baseと照合させることで、臨床に用いられるiPS細胞の分化抵抗性に関する評価を目指す。

平成26年度厚生労働科学研究

「iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究」研究班

研究組織

	役割	氏名	所属
研究代表者	研究総括	川真田 伸	(公財)先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター
分担研究者	造腫瘍性試験 責任者	郷 正博	(公財)先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター 細胞療法開発グループ
分担研究者	体内動態試験 責任者	尾上 浩隆	(独)理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター 生命機能動的イメージング部門 イメージング機能研究グループ
分担研究者	イメージング 実験の責任者	田原 強	(独)理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター 生命機能動的イメージング部門 イメージング機能研究グループ
分担研究者	細胞規格責任者	西下 直希	(公財)先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター 研究・細胞評価グループ
分担研究者	細胞規格責任者 イメージング実験	田村 尚	(公財)先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター 研究・細胞評価グループ
協力研究者	造腫瘍性試験	金村 星余	(公財)先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター 研究・細胞評価グループ



厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

代表研究報告書

iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究

代表研究者：川真田 伸

（公財）先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター

### 研究要旨

本研究は、iPS細胞由来分化細胞の造腫瘍性試験のデザインを策定し、造腫瘍性試験を実施し、その結果を案件開発者に feed back することを目的としている。加えて細胞移植時に問題となる移植細胞の移植部位以外での増殖や腫瘍形成を検知できる生体内動態評価 system を開発し、長期造腫瘍性試験での遠隔転移評価を実施する。この目的のための移植細胞の標識技術とその検出技術の開発を行う。また多能性幹細胞や多能性幹細胞由来細胞の遺伝子変異が腫瘍形成能獲得につながるため、real time (2-3 日)で遺伝子変異を検出できる検査法を開発を行った。

平成 26 年度は、Malignant astrocytoma U251 を  $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$  個を移植し、iPS細胞由来神経幹細胞の腫瘍形成能評価の陽性対照として使用した。現在長期（3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月）経過観察中である。また臨床実施施設（慶應大学）から入手した iPS細胞由来神経幹細胞 1210B2 由来 NSC proA (P6) (最終細胞規格ではない)の NOG マウス線条体移植試験を予備試験として開始した。

マウス B6 由来 iPS細胞を lenti-luciferase construct で label した安定株を樹立した。今後この label した細胞を B6 マウスの経尾静脈及び経皮肝臓で注入し、遠隔部位での腫瘍形成能と検出能を検討する(自家細胞移植モデル)予定である。

染色体構造や遺伝子の変異を real time で検査するため custom made CHG array の design の策定とそれを用いた機能試験を、長期培養 iPS細胞核を用いて行った。

## 【研究目的】

当研究課題は、幹細胞治療の被験者保護の観点から、無限の分裂能をもつ多能性幹細胞由来細胞移植の安全性試験のプロトコル策定とその実施を目的としている。そのため、1)腫瘍形成能の評価を主軸としたiPS細胞等多能性幹細胞由来分化細胞の造腫瘍性試験を実施。2)新規にImaging Probe開発を実施し転移性の造腫瘍性細胞の追跡評価法を開発。3)さらに無限に増殖を繰り返す可能性のある多能性幹細胞で頻発する遺伝子の変異は、腫瘍能獲得に直結するため、遺伝子変異検出試験の確立を研究目的としている。

## 【結果】

当該年度では、1)昨年度から実施している造腫瘍陽試験陽性対照である U251 (malignant astrocytoma 細胞株)の移植試験を引き続き実施した。また慶應義塾大学と大阪医療センターとで共同開発していた iPS 細胞由来神経幹細胞の分化プロトコルが確立したため、同プロトコルで分化させた iPS 細胞由来神経前駆細胞 (iPS-NSC) 1210B2 由来 proA (P6)を  $1.0 \times$

$10^1 \sim 1.0 \times 10^5$  個 NOG マウス線条体に移植を開始した。観察期間は3ヶ月6ヶ月12ヶ月である。それに伴い細胞移植手技とプロトコルの確立と NOG マウス線条体移植での組織切片免疫染色法プロトコル確立を行った。2)移植細胞を標識して、長期に移植後の体内動態を評価できる pCAG-Luc-iP ベクターを開発し、in vivo での機能試験としてマウス乳癌細胞に遺伝子導入し、この細胞をマウスに移植することで移植細胞の転移モデルの確立を行った。さらに iPS-NSC の残存 iPS 細胞の遠隔転移を調べる目的で、マウス B6 由来 iPS 細胞に pCAG-Luc-iP ベクターを用いて Luc 遺伝子を導入し、安定導入株を樹立した。次年度はこの導入株を B6 マウスに移植し、この免疫障害がない自己移植モデルとして経尾静脈移植や経皮肝臓移植を行い、移植細胞の体内動態を調べる予定である。3) 多能性幹細胞の長期継代による染色体構造の不安定性である、染色体構造や遺伝子の変異は、腫瘍形成能獲得と結びつくため、iPS 細胞と iPS 細胞由来分化細胞の遺伝子構造変異を real time base(2-3

日)で評価できる新技術の開発を行った。具体的には、custom made CHG array の design を作成し、長期培養 iPS 細胞株を用いて継代数増加による遺伝子構造の変異についてこの試作 CGH array の機能検証を兼ねた試験を実施した。

#### 【考察】

当該年度では、造腫瘍性試験、転移性試験における基盤要素技術（移植機器の整備、線条体への移植技術の導入、共有Protocolの構築、ルシフェラーゼ安定発現細胞株の樹立）の確立を行った。さらにcustom made CHG arrayの作成を行い、このarrayが有効に機能することを示した。次年度はこれらの研究実績の上にiPS細胞由来NSCの造腫瘍能についてさらに検討を進める予定である。

## iPS細胞由来神経前駆細胞の長期造腫瘍安全性試験の実施

分担研究者：郷 正博

(公財)先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター

### 研究要旨

本年度の当該研究は、慶應義塾大学・岡野 栄之グループが推進する『iPS細胞由来神経前駆細胞を用いた脊髄損傷・脳梗塞の再生医療』を側面から支援し、臨床応用への開発工程を効率化・短縮化させることを目標とする。

上記研究グループと造腫瘍性試験に対する業務分担を行い、iPS細胞由来神経幹細胞の造腫瘍試験、特に移植後の長期経過観察(1年以上)を計画した。本年度の研究では、1. NOGマウス線条体へのiPS細胞由来神経幹細胞移植時の造腫瘍性試験の試験結果の陽性対照として、U251細胞(アストロサイトーマ: JCRB細胞バンク)を用いて造腫瘍性感度試験を実施した。さらにその結果を踏まえ2. NOGマウス線条体へのiPS細胞由来神経幹細胞の移植を開始した。現時点では、iPS細胞由来神経幹細胞の最終細胞規格は決定していないが、最終細胞規格とほぼ同等という判断で、参考試験として本試験を実施した。これにより次年度の本試験実施に向けて移植手技の検討、投与方法、移植ルート、マウスのn数、観察期間などの移植プロトコール設定、組織染色法の選定を慶應義塾大学と協議し実施した。

## 【目的】

慶應義塾大学・岡野 栄之グループが推進する『iPS細胞由来神経前駆細胞を用いた脊髄損傷・脳梗塞の再生医療』を側面から支援し、臨床応用への研究開発工程を効率化・短縮化させることを目標とする。当該グループの分担業務として、iPS細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性試験を担当している。神経幹細胞の造腫瘍性試験実施に際して、その前段階としてU251細胞をdoseを振って移植し、このU251細胞の造腫瘍能を陽性対照とした。そのうえで、iPS細胞由来神経幹細胞（臨床用の最終的な細胞規格は、H26年10月の段階では決まっていないが、実際に臨床で用いる移植細胞の細胞規格と比べ大きくは変わらないという前提）を参考データとして移植した（H27年1月）。この細胞についても、その造腫瘍能を（3ヶ月、6ヶ月、1年）の長期にわたって経過観察を行う予定である。

## 【試験概要】

iPS 細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性試験として、重症免疫不全動物である NOG マウスの脳-線条体に被験細胞を投与する試験系について検討する。脊髄への細胞移植は、技術的な困難が予想されるため、脊髄と解剖学的組織が似ている脳-線条体被験細胞を投与する試験系を用いた。平成 25 年 10 月-26 年 5 月にかけて脳-線条体移植に要する手技習得という観点でインク脳内注入を行った。

### NOG マウスの脳-線条体造腫瘍性感度検討試験

#### 1 . 移植細胞: U251 細胞

造腫瘍性を有する陽性対照として U251 細胞

(アストロサイトーマ: JCRB 細胞バンク) を用いて移植部位における感度を実施した。U251 細胞の移植後、経過を観察し、腫瘍形成の有無を確認するために、3 か月後、6 か月後、脳を摘出したあとに組織切片の観察を行い、移植細胞の造腫瘍能を検討した。NOG マウス (NOD/Shi-scid,IL-2R<sup>null</sup>) は主に 9 週齢を使用し、移植経路として 両側線条体 (Bregma より前方 1 mm, 側方 2 mm の箇所) から移植した。

移植細胞数:  $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$

観察期間: 3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月

U251 細胞  $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$  個を NOG マウスに移植すれば、およそ 6 - 7 週時点で明らかな脳肥大が観察される。その組織切片を下記に示した。移植細胞を同定するためにヒト細胞特異的抗体である抗 Lamin-A 抗体を用いて染色を行った。その結果、移植細胞が移植部位 (線条体近辺) から上方に増殖していることが確認された。

#### 2 . 1210B2 株由来神経前駆細胞の安全性評価研究

本研究では、被験細胞として 1210B2 由来 NSC の造腫瘍試験を実施し、移植後長期経過観察を実施する。これまでのプロトコール A で分化誘導した 1210B2 由来 NS/PC の脳移植では、組織学的に造腫瘍形成は認めないため、NOG マウスの脳-線条に移植後、長期間観察での評価で再確認する。2015 年 2 月～ (経過観察期間 最長 12 ヶ月) から移植を実施した。具体的には、マウスの脳-線条体造腫瘍性試験として、主に 9 週齢 ♂♀の NOG マウスに対して、移植細胞: 1210B2 由来 NSC proA (P6)を両側線条体に、移植細胞数:  $1 \times 10^6$ /片側線条体 x

2 (両側線条体)に移植した。観察期間は 3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月で、観察匹数を各ポイント 5 匹、計 15 匹 (移植する個体は各ポイント 8 匹、計 24 匹で施行した。

<被験細胞について>

大阪医療センター調整 凍結細胞ストック  
準備

製造方法: 通常実験室で製造。

輸送方法:  $2 \times 10^6$  / vial を 24 本\_ドライアイス詰 クール宅急便 (冷凍)、必要培地類 (冷蔵) で輸送

#### 【今後の予定】

H27 5月現在、臨床で使用されるiPS細胞(HLA homo細胞)が京大CiRAから慶応大学に送付され、神経幹細胞への分化を始めた。iPS細胞由来神経幹細胞の製造工程が、現段階で決定したので、それを被験細胞として造腫瘍試験を開始する。またU251細胞(アストロサイトーマ)に続いて、さらなる陽性対照として患者さん由来Glioblastoma細胞株を共同研究先の大阪医療センターから入手し、造腫瘍能の陽性対照として、スパイクテストも併せて実施する。被験細胞は  $1 \times 10^6$  個をNOGマウスの線条体に移植し、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、15ヶ月 観察する。また移植細胞に関して、その細胞集団としての基本情報をFACS、抗体染色、Ki67染色、定量的RT-PCR等を用いて取得する予定である。

厚労安全性(iPS-NSC移植)工程表	H26年度											
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
U251移植(感度試験用、H25年度2月に移植)												
U251移植(免染検討用)												
U251移植(免染検討用)												
1210B2_proA(本番移植)												
厚労安全性(iPS-NSC移植)工程表	H27年度											
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
1210B2_proA(本番移植)												
1210B2_proA+GBMスパイク試験												
HLAホモiPS-NSC(本番移植)												
厚労安全性(iPS-NSC移植)工程表	H28年度											
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
1210B2_proA+GBMスパイク試験												
HLAホモiPS-NSC(本番移植)												

< H26-H28 年度 NOG 線条体への細胞移植を用いた造腫瘍性試験予定一覧表 >

U251細胞						
NOGマウス	9週齢					
両側線条体						
被験物	移植日	剖検予定期間	細胞数	観察期間	脳腫	その他剖検所見
U251細胞	2014/2/25	6週間	10 <sup>5</sup>	6週間	有	特記事項なし
				7週間	有	特記事項なし
				8週間	有	突然死(出血跡、凝固血 血栓による脳梗塞?)
	2014/3/5	3ヶ月	10 <sup>4</sup>	7週間		移植部位白っぽい? 削瘦、衰弱。臓器に異常なし。
				9週間	有	右目腫れ、削瘦、衰弱傾向
			10 <sup>3</sup>	17週間		移植部位白っぽい? 削瘦、衰弱。臓器に異常なし。
				17週間		脳肥大有、胸腺肥大、脾臓肥大
			10 <sup>2</sup>	15週間	判定不可。	旋回、眼球突出
				17週間		胸腺肥大、脾臓肥大
	2014/2/28 ~ 2014/3/6	6ヶ月	10 <sup>3</sup>	24週間	判定不可。	削瘦、判定不可
				21週間	有	脳肥大有、削瘦
				18週間	判定不可。	死亡、判定不可
				26週間		脳肥大有
				26週間		異常なし
			10 <sup>2</sup>	26週間		異常なし
				12週間	(生着確認) 無	削瘦、衰弱傾向 胸腺肥大、脾臓肥大
				26週間	(生着確認) 無	異常なし
				26週間	(生着確認) 無	異常なし
				26週間		異常なし
				26週間		異常なし
				26週間		異常なし
			10 <sup>1</sup>	26週間		脳肥大有
				26週間		脳肥大有
				26週間		脳肥大有
	26週間			異常なし		
	26週間			異常なし		
	2014/2/27, 2014/2/28	12ヶ月	10 <sup>3</sup>	12ヶ月		安楽死
				24週間	有	頭部腫瘍、削瘦
				27週間		脳超肥大
			10 <sup>2</sup>	12ヶ月		安楽死
12ヶ月					安楽死	
27週間					脳肥大	
10 <sup>1</sup>			12ヶ月		安楽死	
			12ヶ月		安楽死	
			12ヶ月		安楽死	

< U251 細胞の NOG 線条体造腫瘍性試験の結果のまとめ一覧 2015年 3月30日時点 >

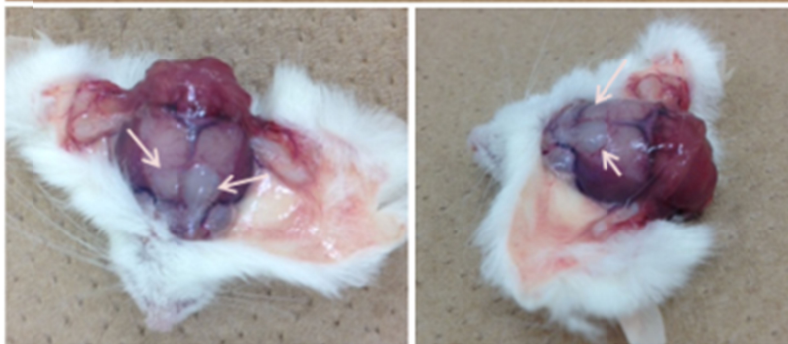


2014/02/25 U251細胞移植  $1 \times 10^5$  線条体移植

2014/04/22 突然死 (脳に出血跡、凝固血在り→血栓による脳梗塞の可能性あり。)  
急速、脳摘出。脳組織の腐敗が進行していたので、  
一部顔面組織を残した状態で固定処置。BML社に委託。

(個体番号 : NOG 143-3)

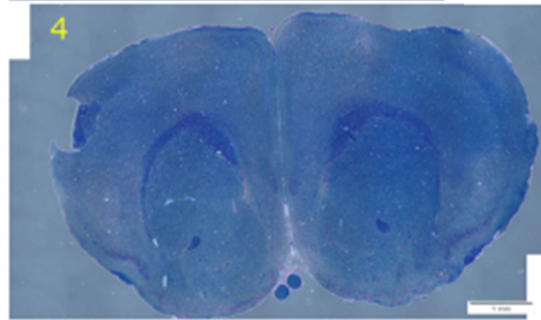
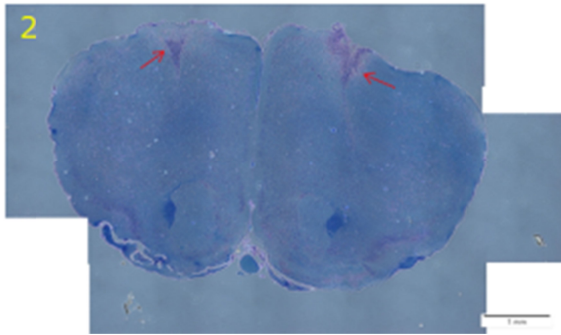
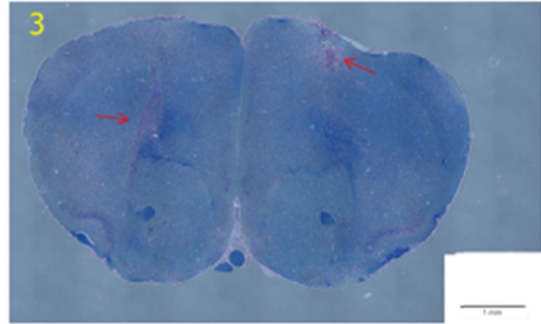
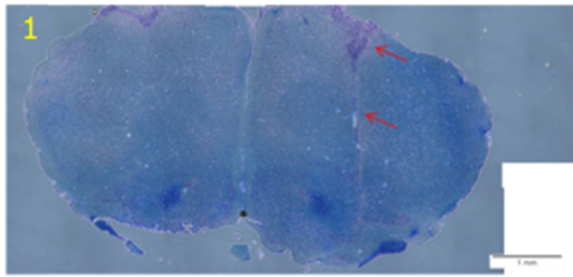
### U251細胞移植



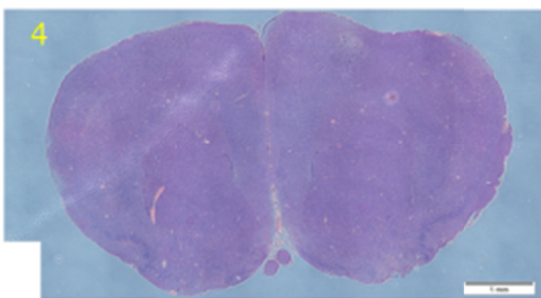
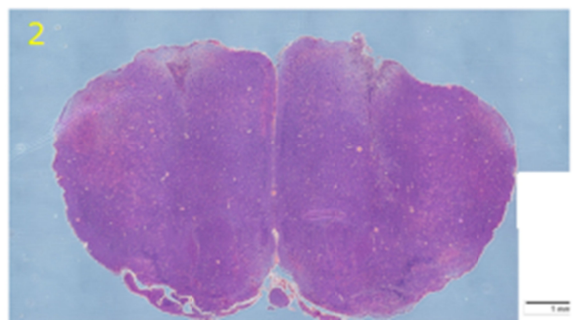
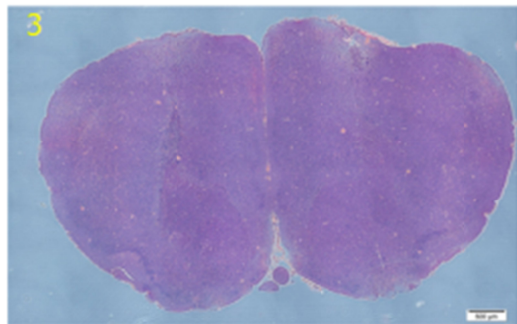
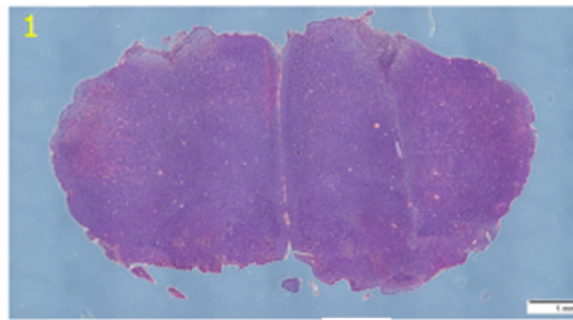
移植部位に腫瘍あり。白っぽい細胞群

線条体移植剖検例

クリューバー・バレラ染色 (KB染色)



HE染色



U251 移植細胞の組織染色

移植細胞	1210B2-NSC proA (P6)								
移植細胞数	1 x 10 <sup>6</sup> /片側線条体 x 2 (両側線条体)								
移植部位	両側線条体								
移植動物	NOG 9週齢								
移植日	2015/02/02~2015/02/10								
	凍結融解後の全細胞数	凍結融解後の生細胞数	凍結融解後の生存率	回復培養後の全細胞数	回復培養後の生細胞数	回復培養後の生存率	#	移植細胞数 (片側線条体辺り) x 2	
1	1.4 x 10 <sup>6</sup>	1.2 x 10 <sup>6</sup>	87%	1.6 x 10 <sup>6</sup>	1.5 x 10 <sup>6</sup>	97%	1	0.71 x 10 <sup>6</sup>	
2	2 x 10 <sup>6</sup>	1.7 x 10 <sup>6</sup>	85%	1.1 x 10 <sup>6</sup>	1.0 x 10 <sup>6</sup>	92%	2	0.71 x 10 <sup>6</sup>	
3	1.6 x 10 <sup>6</sup>	1.3 x 10 <sup>6</sup>	82%	2.0 x 10 <sup>6</sup>	1.7 x 10 <sup>6</sup>	86%	3	0.78 x 10 <sup>6</sup>	
4	1.6 x 10 <sup>6</sup>	1.1 x 10 <sup>6</sup>	72%	1.7 x 10 <sup>6</sup>	1.5 x 10 <sup>6</sup>	89%	4	0.78 x 10 <sup>6</sup>	
5	1.3 x 10 <sup>6</sup>	1.2 x 10 <sup>6</sup>	90%	2.5 x 10 <sup>6</sup>	2.1 x 10 <sup>6</sup>	80%	5	0.78 x 10 <sup>6</sup>	
6	1.5 x 10 <sup>6</sup>	1.3 x 10 <sup>6</sup>	87%	1.2 x 10 <sup>6</sup>	1.1 x 10 <sup>6</sup>	89%	6	0.90 x 10 <sup>6</sup>	
7	1.3 x 10 <sup>6</sup>	1.2 x 10 <sup>6</sup>	92%	2.1 x 10 <sup>6</sup>	2.0 x 10 <sup>6</sup>	96%	7	0.90 x 10 <sup>6</sup>	
8	2.7 x 10 <sup>6</sup>	1.4 x 10 <sup>6</sup>	93%	2.3 x 10 <sup>6</sup>	2.0 x 10 <sup>6</sup>	85%	8	0.57 x 10 <sup>6</sup>	
9	1.1 x 10 <sup>6</sup>	0.90 x 10 <sup>6</sup>	81%	1.6 x 10 <sup>6</sup>	1.4 x 10 <sup>6</sup>	91%	9	0.57 x 10 <sup>6</sup>	
10	1.2 x 10 <sup>6</sup>	0.90 x 10 <sup>6</sup>	75%	1.7 x 10 <sup>6</sup>	1.4 x 10 <sup>6</sup>	81%	10	0.57 x 10 <sup>6</sup>	
11	1.1 x 10 <sup>6</sup>	0.95 x 10 <sup>6</sup>	88%	2.0 x 10 <sup>6</sup>	1.1 x 10 <sup>6</sup>	56%	11	0.46 x 10 <sup>6</sup>	
12	1.1 x 10 <sup>6</sup>	0.95 x 10 <sup>6</sup>	90%	2.0 x 10 <sup>6</sup>	1.0 x 10 <sup>6</sup>	49%	12	0.46 x 10 <sup>6</sup>	
13	1.6 x 10 <sup>6</sup>	1.4 x 10 <sup>6</sup>	86%	1.1 x 10 <sup>6</sup>	0.88 x 10 <sup>6</sup>	82%	13	0.46 x 10 <sup>6</sup>	
14	1.5 x 10 <sup>6</sup>	1.4 x 10 <sup>6</sup>	93%	0.99 x 10 <sup>6</sup>	0.88 x 10 <sup>6</sup>	91%	14	0.93 x 10 <sup>6</sup>	
15	1.2 x 10 <sup>6</sup>	1.1 x 10 <sup>6</sup>	94%	1.1 x 10 <sup>6</sup>	0.99 x 10 <sup>6</sup>	95%	15	0.93 x 10 <sup>6</sup>	
16	0.95 x 10 <sup>6</sup>	0.85 x 10 <sup>6</sup>	89%	1.5 x 10 <sup>6</sup>	1.4 x 10 <sup>6</sup>	97%	16	0.93 x 10 <sup>6</sup>	
17	0.90 x 10 <sup>6</sup>	0.8 x 10 <sup>6</sup>	86%	2.3 x 10 <sup>6</sup>	2.2 x 10 <sup>6</sup>	96%	17	0.69 x 10 <sup>6</sup>	
18	1.2 x 10 <sup>6</sup>	1.1 x 10 <sup>6</sup>	92%	2.1 x 10 <sup>6</sup>	2.0 x 10 <sup>6</sup>	96%	18	0.69 x 10 <sup>6</sup>	
19	1.2 x 10 <sup>6</sup>	1.1 x 10 <sup>6</sup>	88%	1.4 x 10 <sup>6</sup>	1.4 x 10 <sup>6</sup>	94%	19	0.69 x 10 <sup>6</sup>	
20	1.3 x 10 <sup>6</sup>	1.2 x 10 <sup>6</sup>	90%	1.5 x 10 <sup>6</sup>	1.4 x 10 <sup>6</sup>	91%	20	0.75 x 10 <sup>6</sup>	
21	1.2 x 10 <sup>6</sup>	1.1 x 10 <sup>6</sup>	91%	1.6 x 10 <sup>6</sup>	1.4 x 10 <sup>6</sup>	89%	21	0.75 x 10 <sup>6</sup>	
22	1.2 x 10 <sup>6</sup>	1.1 x 10 <sup>6</sup>	93%	1.7 x 10 <sup>6</sup>	1.5 x 10 <sup>6</sup>	92%	22	0.75 x 10 <sup>6</sup>	
23	1.2 x 10 <sup>6</sup>	1.2 x 10 <sup>6</sup>	100%	1.3 x 10 <sup>6</sup>	1.2 x 10 <sup>6</sup>	96%	Ave	0.72 x 10 <sup>6</sup>	
24	1.1 x 10 <sup>6</sup>	0.95 x 10 <sup>6</sup>	90%	1.8 x 10 <sup>6</sup>	1.8 x 10 <sup>6</sup>	98%			
Ave	1.4 x 10 <sup>6</sup>	1.1 x 10 <sup>6</sup>	88%	1.7 x 10 <sup>6</sup>	1.5 x 10 <sup>6</sup>	88%			

< 1210B2 株由来神経前駆細胞 移植細胞数一覧 2015年 3月30日時点 >

NOG150 慶応プロトコール

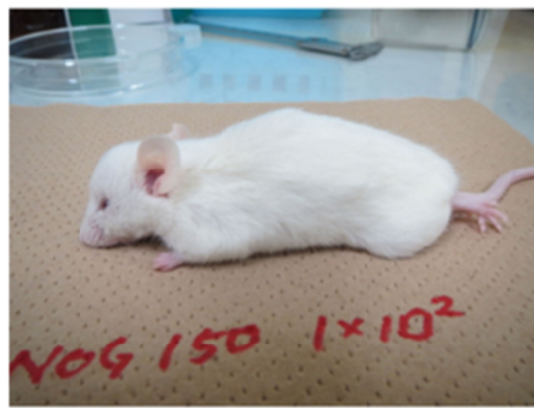
U251  $1 \times 10^3$  移植  
移植より27週観察



2014/09/04

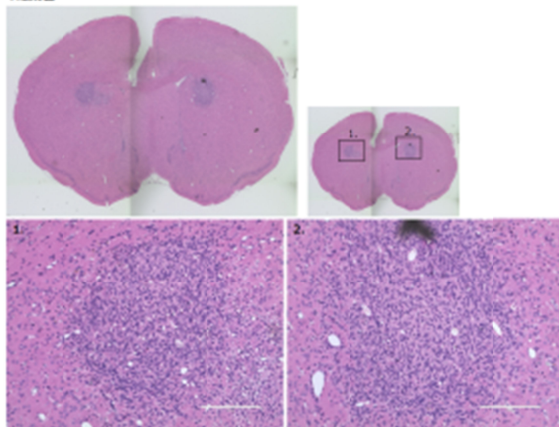
NOG150 慶応プロトコール

U251  $1 \times 10^2$  移植  
移植より27週観察。

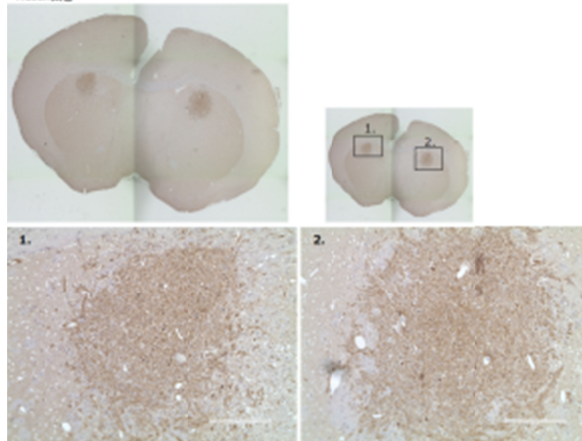


両マウスともに顕著な脳肥大が観察されたため、観察予定期間である12ヶ月以前の27週目で殺処分。剖検による観察のみ行った。切片依頼せず。

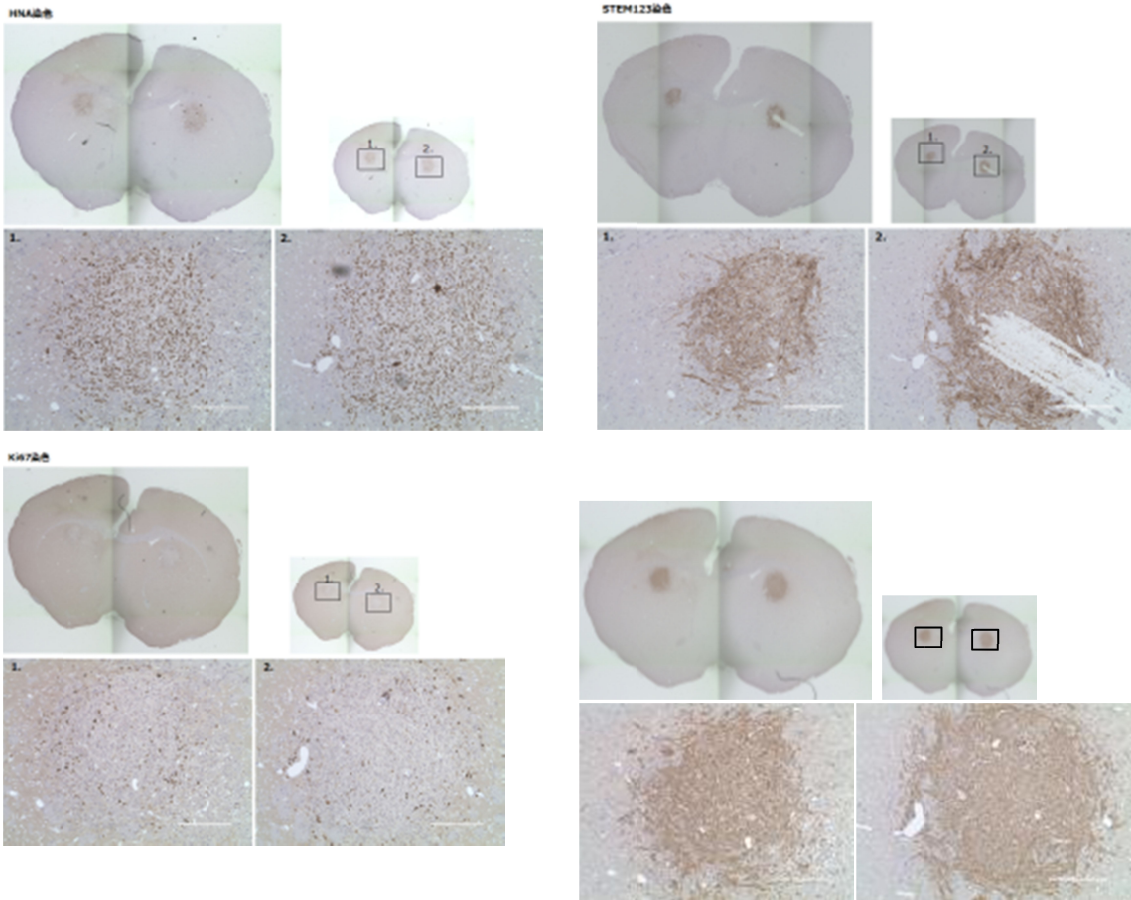
HE染色



Neotin染色







1210B2 株由来神経前駆細胞の移植細胞の組織像。上段左 HNA 染色、右 STEM 123 染色  
 下段 左 Ki67 染色、右 STEM 123 染色。

## 細胞label systemの開発

分担研究者：尾上 浩隆

分担研究者：田上 強

(独)理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター  
生命機能動的イメージング部門 イメージング機能研究グループ

### 研究要旨

移植後の細胞の移植部位における生着や他の臓器への転移・移動の有無を調べるために、非侵襲的なイメージング技術の開発は必要である。本年度は、移植細胞ヘルシフェラーゼ遺伝子を導入し、*in vivo* で移植細胞の動態を観察できるシステムの構築を検討した。

ルシフェラーゼ遺伝子発現ベクター (pCAG-Luc-iP) を構築し、発現ベクターがルシフェラーゼタンパク質を発現すること、およびルシフェラーゼ活性を示すことを確認した。次いで pCAG-Luc-iP ベクターを導入したマウス乳癌由来細胞 4T1 の安定発現株を樹立 (4T1-Luc 細胞) し、その細胞を用いてマウス乳癌転移モデルを作製した。現在、*in vivo* イメージング装置を用いて本細胞の全身分布をどの程度観察できるか検討している。また残留自己 iPS 細胞由来の腫瘍形成がどのように起こるのかを調べる目的で、マウス B6 由来 iPS 細胞株に pCAG-Luc-iP vector を導入し安定株を樹立した。

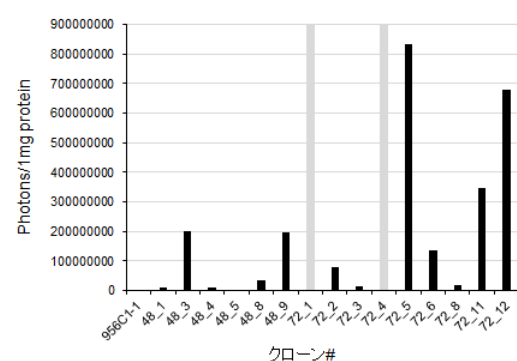
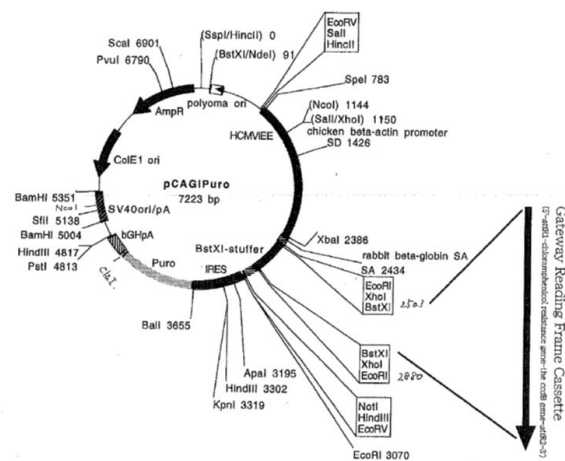
【研究目的】

再生医療の細胞移植における安全性について、非侵襲的な評価系すなわちイメージング技術は、最適なツールの一つである。移植後の細胞の移植部位における生着や他の臓器への移動の有無を調べるために、本年度は、移植細胞へルシフェラーゼ遺伝子を導入し、*in vivo*で移植細胞の動態を観察できるシステムの構築を検討した。また細胞膜を改良型PKHで標識することで、簡便な細胞標識法を開発することを目的とした。

【結果】

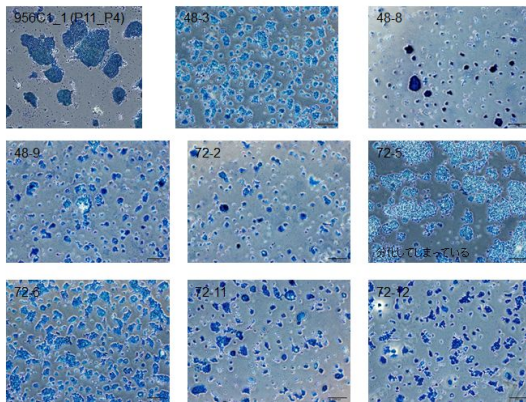
二種類のルシフェラーゼ遺伝子発現ベクター (pCAG-Luc-iP, pLenti-Luc-iV) を構築し、ウエスタンブロット法および免疫

染色により、両発現ベクターからルシフェラーゼタンパク質が発現することを確認した。また発現したタンパク質がルシフェラーゼ活性を示すかどうか調べるために活性測定を行い、いずれも高い活性が示された。次いで、pCAG-Luc-iPベクターを導入したマウス乳癌由来細胞4T1の安定発現株 (4T1-Luc細胞) を樹立するために、遺伝子導入後、2週間、 puromycin 処理を行うことで安定発現株を選択し、その細胞を用いてマウス乳癌転移モデルを作製した。安定株4T1-Luc細胞においてルシフェラーゼが高発現していることも確認された。またマウスB6由来iPS細胞株にpCAG-Luc-iPベクターを導入した安定細胞株Luc活性を測定して樹立した。



マウスB6 Luc-transfectant株の活性測定

ALP staining: Stable miPSC (956C1-1) with pCAG-LUC-iP



ALP染色による細胞形状の観察

次年度この細胞をB6マウスの尾静脈及び経皮肝臓に注入することで全身での腫瘍性遠隔転移試験を実施する予定である。また細胞表面をPKH誘導体で標識する試験を実施したが、シグナルの減衰が早い（24時間以内）、標識分子及び標識法の改善が考えられた。

#### 【考察】

ルシフェラーゼ高発現ベクターの構築および発現安定株マウスB6 - Luc細胞の樹立ができたことで、移植細胞の体内動態の観察システムの運用が可能となった。次年度はこれを用いて移植自家iPS細胞由来分化細胞の体内動態をB6マウスにB6マウスiPS細胞をspikeして行う予定である。



## iPS 細胞、および iPS 細胞由来分化細胞の規格化研究

分担研究者：西下 直希 田村 尚

(公財)先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター

### 研究要旨

多能性幹細胞を未分化培養状態で長期間培養すると染色体構造異常が高頻度で出現するので、それを迅速に検査できるシステムの構築が必要である。また検出された変異の意味づけを有意なものにするため、染色体異常と発癌との関係、ヒト癌データベースとの照合も必要である。

H26年度は、先端医療振興財団で樹立されたiPS細胞や分化神経幹細胞を用いた解析を行った。custom made CGH arrayのdesignが完成し、その試作品の機能解析を行った。今後は迅速に検査結果が判明するmulticolor BAND (mBAND)やFISH解析と合わせて、総合的に染色体の検査が実施できる基盤を構築した。

## 【目的】

多能性幹細胞由来分化細胞の移植において最大の懸念は、移植細胞の造腫瘍性評価である。造腫瘍性評価は被検細胞を免疫不全動物に当該臨床部位に移植し長期間観察する試験が必要であるが、移植前の被検細胞の細胞規格とりわけ、移植細胞中の未分化細胞の検出及び移植細胞中の未分化細胞の遺伝子変異の検出と検討が重要である。なぜならからは、未分化細胞の細胞特性に起因する腫瘍（奇形腫）の形成が懸念され、からは、多能性幹細胞の長期培養による染色体構造の変異とそれに基づく造腫瘍能獲得が懸念される。は、未分化細胞を高感度で検出出来る qRT-PCR 等の技術開発が課題であったが、については、遺伝子の構造は短期間の培養（1 - 2 か月）でも不安定になるため、多能性幹細胞由来分化細胞の遺伝子検査を2-3日のreal timeで検出出来る技術の開発が求められている。現在染色体構造検査の主流である G-band 法は検査に約1か月要するので、この試験期間を大幅に短縮し in house で検査が可能になるようなシステムの構築が必要である。

従って、本研究にて遺伝子の染色体構造や copy number variant (CNV) などの変異をほぼ real time (2-3日) で評価するための技術開発として、新規 CGH array のデザインとこの Array のデザイン機能の検証を行う。合わせて mFISH, mBAND 法の改良を行う。

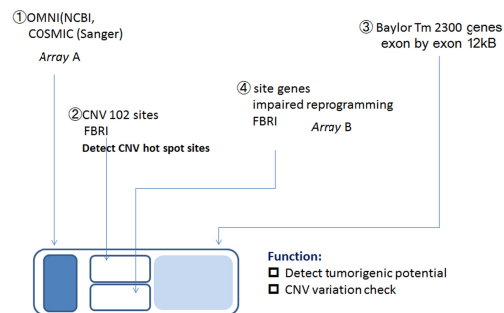
## 【試験概要】

今年度の研究では、まず custom made CGH array の design を行った。この CGH array と染色体多重の probe で hybrid する

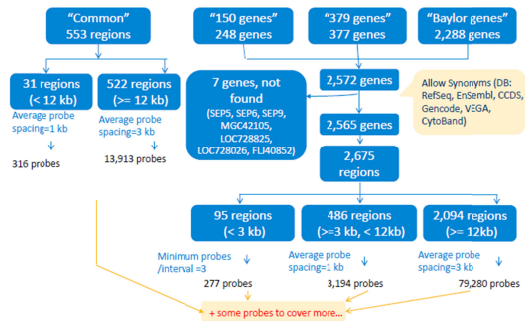
mBAND 法の開発と組み合わせ、2-3 日で結果が判明する有用な検査として使用可能であるかの検討を行った。

## 【試験方法】

CGH custom array の作成：

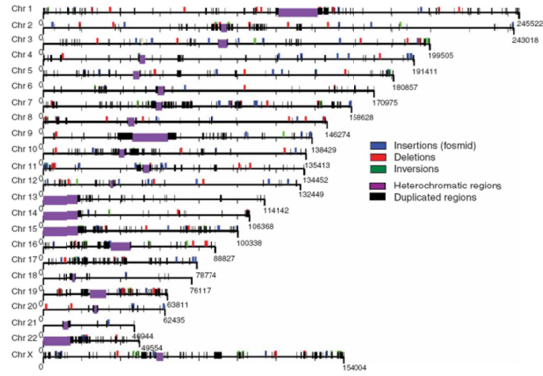


## デザインの流れ



Probe の design であるが、まず Baylor University の data base で公知になっている成人の癌責任遺伝子 2300 遺伝子を抽出し array panel に加えた。次に分化過程で分化能が阻害されている iPS 細胞由来分化細胞で発現が増強されていた遺伝子 377 個を抽出し probe を作成した。次に SANGER で公開されている家族性発癌遺伝子 COSMIC の 248 個を加え、probe を作成し、多能性幹細胞で報告されている copy number variants の hot spots 102 領域を選定し、probe を作成した。これらの癌遺伝子や CNV 領域を一つの chip に網羅的にデ

ザインすることで、培養細胞の遺伝子変異を検知できるように custom CGH を作成した。



報告されている CNV の一覧表  
Stem cell 2012:31 22-27

【試験結果】

この custom array を用いて、作動試験をした。サンプルは、Ripro FF2 で培養し、Vitronectin-N 上で培養した iPS 細胞 PFX#9 を用いた。Passage 96 と passage 36 との遺伝子を比較した。その結果、CNV の hot spot である。Chr 20 q11.20-q11.21 で CNV の異常な増幅を P96 細胞で検出した、その他の異常は検出されなかった。

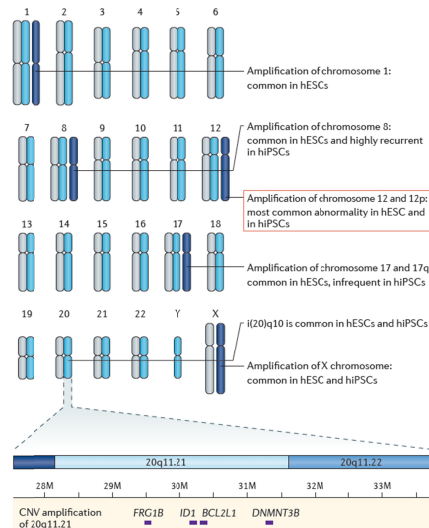
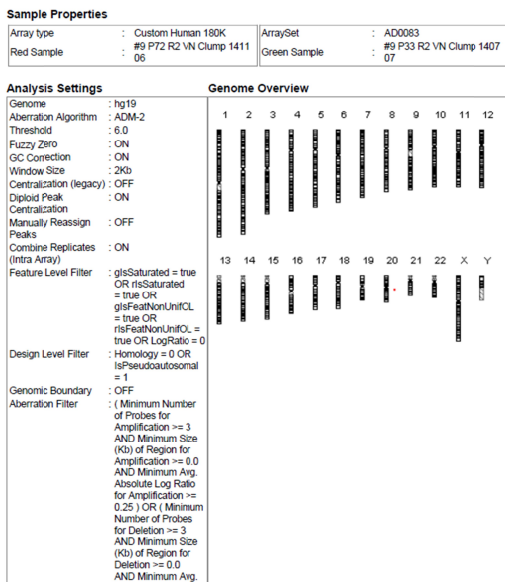
Text Summary Report for Sample AD0083\_Set03

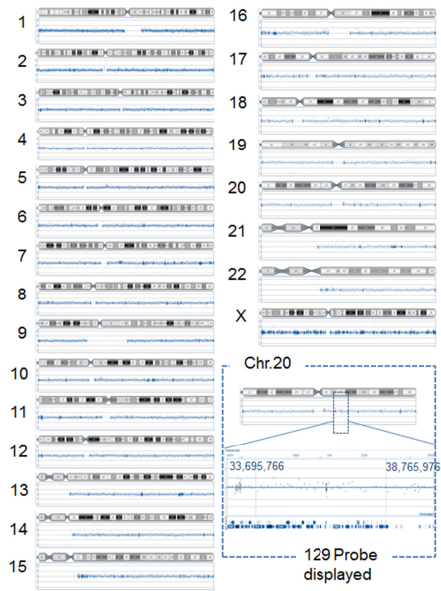
Event No	Chr	Cytoband	#Probes	Ampl/Del	P-value	Annotations
1	chr20	31358833-33384831	141	0.555020	1.40E-211	DNMT3B, MAPRE1, EFCAB8...

Chromosome	Chr	Cytoband	Start	Stop	#Probes	Amplification	Deletion	Loss	Gene Names	hg19 chr20:22669
1	chr20	q11.21-q11.22	31358833	33384831	141	0.55502			DNMT3B, MAPRE1, EFCAB8, SUN1, BPL1, BPL3, C20orf185, C20orf186, C20orf191, BAGE, C20orf171, PLINC, C20orf114, C20orf141, SNTF1, GSGAT2, NDC83, C20orf144, C20orf134, EPF1, PMPK, ZNF341, CHIR1B, NALY, EPSS2, ASP, ANCY, ITC4, MIR644, DYNLB1, MAP1LCA3, FIG1, TP53NP2, NDC68	CNV:5133, CNV:8087, CNV:110398, CNV:6886, CNV:4190, CNV:35914, CNV:73512, CNV:110399, CNV:79177, CNV:95538, CNV:80540, CNV:79178, CNV:79179, CNV:80541, CNV:80539, CNV:9319, CNV:8088, CNV:6889, CNV:6991, CNV:59022, CNV:102655, CNV:114911, CNV:79182, CNV:110400, CNV:116152, CNV:69392, CNV:110401, CNV:23011, CNV:10462, CNV:23513, CNV:81626, CNV:102656, CNV:49031, CNV:23624, CNV:44046, CNV:10464, CNV:102657, CNV:8083, CNV:87881, CNV:59023, CNV:59024

【考察】

これらのことから、今回 design した custom CGH array は、すでに *Nat Rev Gen* 2012:13, 732-744 で報告されている CNV の Hot Spot を検出しており有用に使用できる可能性が高く、さらに多くの細胞で検討を続ける予定である。課題としては、これらの解析結果を有意なものにするためには、解析結果と造腫瘍性試験の結果とリンクさせ、国内外の発癌 data base との照合も行い、臨床的に意味のある遺伝子変異を抽出し、総合的な造腫瘍性の検討を行う必要がある。





次年度京都大学CiRAから慶應大学に臨床用のhomo iPS細胞が送付され、神経幹細胞の分化誘導が慶應大学で行われ、当方に送付され造腫瘍性試験に使われるが、その細胞の遺伝子検査も品質規格試験の一環として実施する予定である。またmBANDやmFISHなどの検査がin houseで立ち上がったため、これらの検査も合わせて総合的に遺伝子検査を推進する。

**(Nat Rev Gen 2012:13, 732-744)**

平成26年度 厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業  
「iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究」

日時、場所、参加者、議題 順に記載。

- 2014年 4月30日 14:00～15:00, RIKEN 分子イメージングセンター  
財団：川真田、西下 理研：尾上、田原  
1. 研究計画会議 (H26年度Imaging Probe開発に関する立案、スケジュール)
- 2014年 5月22日 14:00～18:00, 財団  
財団：川真田、金村、西下、郷 大阪医療センター：金村  
1. 研究計画会議 (U251移植に関する、protocol策定、スケジュール確認)
- 2014年 7月11日, 14:00～15:00, RIKEN 分子イメージングセンター  
財団：川真田、金村、理研：尾上、田原  
1. 研究計画会議 (Imaging Probeに進捗確認)
- 2014年 8月26日, TEL/Mail Meeting, Skipe meeting  
財団：川真田、西下 慶應：中村、堀、大阪医療センター：金村  
1. 研究計画会議 (H25年度 移植細胞の準備状況確認と移植計画のrevise)
- 2014年11月7日 14:00-15:00, RIKEN 分子イメージングセンター  
財団：川真田、金村 理研：尾上、田原  
1. 研究計画会議 (Imaging probe作成進捗確認)
- 2014年12月15日 14:00-15:00, Skipe meeting  
財団：川真田、金村 慶應：中村、堀、大阪医療センター：金村  
1. 研究計画会議 (移植細胞の準備状況確認と移植計画の進捗確認)
- 2015年 3月 21日 9:30～10:00 @横浜再生医療学会  
1. NOG-mouse 線条体 移植スケジュール確認 (財団：田村, 慶應：中村)  
2. 財団 慶應 大阪医療センター (H26年度 研究総括,H27計画)

その他、Mail連絡等は研究実施に伴い逐次連絡できる状況を作成済み。

平成26年度 厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業  
「iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究」

研究成果の刊行に関する一覧表

Design of a Tumorigenicity Test for induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-derived Cell Products, Shin Kawamata, Hoshimi Kanemura, Noriko Sakai, Masayo Takahashi and Masahiro J. Go, Journal of Clinical Medicine, 2015, 4, 159-171, ISSN 2077-0883

Review

## Design of a Tumorigenicity Test for Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Cell Products

Shin Kawamata <sup>1,2,\*</sup>, Hoshimi Kanemura <sup>1,2</sup>, Noriko Sakai <sup>2</sup>, Masayo Takahashi <sup>2</sup>  
and Masahiro J. Go <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research and Development Center for Cell Therapy, Foundation for Biomedical Research and Innovation, TRI#308 1-5-4, Minatojima-Minamimachi, Chuo-ku, Kobe 650-0047, Japan; E-Mails: kanemura@fbri.org (H.K.); go@fbri.org (M.J.G.)

<sup>2</sup> Laboratory for Retinal Regeneration, RIKEN Center for Developmental Biology, 2-2-3, Minatojima-Minamimachi, Chuo-ku, Kobe 650-0047, Japan; E-Mails: noriko-sakai@cdb.riken.jp (N.S.); mretina@cdb.riken.jp (M.T.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: kawamata@fbri.org; Tel.: +81-78-306-0681.

Academic Editor: Michael J. Edel

Received: 22 October 2014 / Accepted: 22 December 2014 / Published: 14 January 2015

---

**Abstract:** Human Pluripotent Stem Cell (PSC)-derived cell therapy holds enormous promise because of the cells' "unlimited" proliferative capacity and the potential to differentiate into any type of cell. However, these features of PSC-derived cell products are associated with concerns regarding the generation of iatrogenic teratomas or tumors from residual immature or non-terminally differentiated cells in the final cell product. This concern has become a major hurdle to the introduction of this therapy into the clinic. Tumorigenicity testing is therefore a key preclinical safety test in PSC-derived cell therapy. Tumorigenicity testing becomes particularly important when autologous human induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-derived cell products with no immuno-barrier are considered for transplantation. There has been, however, no internationally recognized guideline for tumorigenicity testing of PSC-derived cell products for cell therapy. In this review, we outline the points to be considered in the design and execution of tumorigenicity tests, referring to the tests and laboratory work that we have conducted for an iPSC-derived retinal pigment epithelium (RPE) cell product prior to its clinical use.

**Keywords:** PSC-derived cell therapy; iPSC; RPE; tumorigenicity test

---

## 1. Introduction

Several notable clinical trials using human Pluripotent Stem Cell (PSC)-derived cell products have been conducted recently. In the first, Geron used embryonic stem cell (ESC)-derived oligodendrocyte progenitor cells (GRNOPC1) for treatment of acute spinal cord injury [1]. Advanced Cell Technology initiated a study in which ESC-derived retinal pigment epithelium (RPE) was used for treatment of Stargardt's disease and dry type Age-related Macular Degeneration (AMD) [2]. More recently, a clinical study for wet type AMD using induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-derived RPE was started at Riken CDB [3–5].

While clinical applications are moving forward, there are concerns that transplantation of differentiated PSC might lead to the formation of tumors in the recipient. Thus, examination of this possible outcome of transplantation is critically important. Cell transplantation or infusion therapy is distinctly different from drug administration. One must consider that transplanted or infused cells can survive for long periods in the host and may form tumors at the site of transplantation or at distal sites. The extent of tumor formation can be influenced by the microenvironment at the transplantation site or the ultimate homing site of the host. Furthermore, once a tumor has formed, it may influence the physical condition of the host through secreted factor(s) [6].

The aforementioned aspects of cell therapy must be addressed with animal transplantation studies prior to clinical use. Tumorigenicity tests that can assess the tumor-forming potential of transplanted cells are particularly important in the case of PSC-based cell therapies. As PSC have “unlimited” proliferation potential as undifferentiated stem cells, they can generate teratomas if they remain in the final product. The chance of generating a teratoma will increase if the procedure uses an autologous iPSC-derived cell product that presents no immunologic barrier. PSC might accumulate chromosomal abnormalities by selecting cells with unusual proliferative advantages over a long culture period. Lund *et al.* reported that some 13% of ESC and iPSC maintained in research labs worldwide demonstrated some type of genetic abnormality [7]. For that reason, the timely assessment of the genetic stability of PSC is of major interest for both research labs and clinical PSC banks. In addition, it is important to assess the potential for differentiation resistance due to incomplete reprogramming or a differentiation bias due to epigenetic memory when iPSC-based therapy is considered. In this context, it is necessary to assess the tumor-forming potential of non-terminally differentiated cells as well.

Information regarding genetic stability, gene expression, differentiation marker expression, cell growth rate and how cells were generated must be collected and evaluated prior to commencement of tumorigenicity testing. Next, it is necessary to have a clear idea about the scope and objective of related safety parameters: toxicology tests, Proof of Concept (POC) tests, biodistribution tests and tumorigenicity tests that can be conducted concurrently.

Toxicology tests can be designed depending on the properties of testing reagents and the purpose of the tests. The Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) Guideline for the



Testing of Chemicals [8] is an internationally recognized test guideline for toxicology testing. They should be conducted in a blinded fashion to minimize the bias of measurement and observation by operators. Short-term and long-term end points are to be defined. Toxicology tests should be conducted by using clinically relevant methods of administration so that they can provide insights into a safe range of therapeutic cell doses. Acute (early) and late phase end points should be established in this test.

POC tests often employ a genetically modified animal that offers a model of the disease in question (e.g., Tg, KI, KO or KD mice) or injured animals to address the potential benefit or efficacy of the investigational therapy and to define the range of the effective dose used in clinical application by escalating the doses. The administration route and the method should be as close as possible to the intended clinical use. Positive and negative events should be clearly defined. In such a POC study, indices such as physiological recovery of lost function or overall survival of transplanted cells that could underlie intended therapeutic use are examined. Measurement of indices should be conducted in a blinded fashion to minimize bias during data acquisition. The size of the test group should be large enough to permit meaningful statistical analysis.

Biodistribution tests should be conducted to address tumorigenic proliferation of transplanted cells at the ectopic site. *Alu* sequence PCR is commonly used to detect human cells in host tissues or organs. While this PCR test detects human cells over a 0.1% frequency in host tissue by DNA ratio [9], greater sensitivity is needed to detect small metastatic colonies. In PET technology, proliferative cell mass is labelled by taking in a metabolic probe such as  $^{18}\text{F}$  FLT, providing a distribution of tumorigenic cell proliferation in the animal's body. However to trace the behavior of transplanted cells and their biodistribution over time requires labeling test cells by introducing marker genes by retrovirus or lentivirus that can emit a signal with a high S/N ratio. These approaches are currently under development.

## 2. Guidelines for Tumorigenicity Tests

Somatic cells with a normal chromosomal structure show limited proliferation potential. Tumorigenicity testing of mesenchymal stem cells may not reveal a serious problem [10]. However, in the case of PSC-derived cell products, the tumor-forming potential should be examined thoroughly because of the “unlimited” proliferation capacity of PSC and their genetic instability. However, there is no internationally recognized guideline for tumorigenicity testing of cells used for cell therapy. WHO TRS 878, “Recommendation for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of cell banks” [11,12] provides a guideline for animal cell substrates used for the production of biological medicinal products, but not for cells used for therapeutic transplantation into patients. Recently, FDA/CBER commented on the issues to be considered for cell-based products and associated challenges for preclinical animal study [13]. The report stated that when tumorigenicity testing of ESC-derived cellular products is undertaken, the tumorigenicity tests should be designed considering the nature of cell products to be transplanted and the anatomical location or microenvironment of the host animal. Tumorigenic test results from the administration of cells through nonclinical routes are not considered relevant as they would not assess the behavior of transplanted cells in the intended microenvironment to which the cells would be exposed. The study design should

include groups of animals that have received undifferentiated ESCs, serial dilutions of undifferentiated ESCs combined with ESC-derived final products to infer the contamination of undifferentiated ESCs in the final product.

The aforementioned summarizes current discussions of tumorigenicity testing. However, we still need to answer a fundamental question: “How can we extrapolate animal tumorigenicity testing to humans?” The design of tumorigenicity tests should attempt to answer this question. For this, we must first estimate the risk that we will underestimate the incidence of tumor-forming events in humans by conducting an improper or non-informative animal study. So, how do we define such risk? For example, there is a risk that a study is unable to link unexpected tumor formation to genetic abnormalities of test cells presented before transplantation due to inadequate genetic information regarding test cells. In addition, there is a risk of obtaining “false” negative results by transplanting an insufficient dose, using an inadequate monitoring period, using an improper immunodeficient animal model that is insufficient to detect tumor, not transplanting into the right anatomical position, failure of transplantation itself or unexpected early death of transplanted cells in host tissue. We can address the risks by conducting quality control tests of test cells prior to transplantation and small scale pilot studies to determine the design of tumorigenicity tests. The following points should be considered in designing tumorigenicity tests.

1. The history of cell production (cultured in a research lab or Good Manufacturing Practice (GMP) grade cell processing facility).
2. Quality control records of test cells (e.g., phenotype, gene expression, sterility tests, genetic information, passage number and growth rate).
3. The type of immunodeficient animal model used and the route of administration (clinical route or subcutaneous route).
4. The method of transplantation (e.g., embedded with Matrigel or in sheets or in cell suspension).
5. Gender and number of animals to be used.
6. Information about the microenvironment at the transplanting site.
7. Dose of cells to be transplanted.
8. Selection of a positive control cell and definition of positive tumor-forming event.
9. Monitoring periods.
10. Protocol for immunohistochemistry (IHC) to detect transplanted cells in host tissue.
11. Method to detect ectopic tumor formation.

### 3. Specification of Test Cells

Cells used in tumorigenic tests should be generated in a manner as close as possible to that intended for clinical use. In this context, it is preferable that cells used for all preclinical tests should be generated in a GMP-grade cell processing facility for clinical use. This approach would minimize bias originating from differences in cell production quality. Several types of data, including gene expression profiles obtained from gene chips or qRT-PCR to assess stem cell-like markers and differentiation markers, phenotypic analysis by flow cytometry, sterility tests, mycoplasma tests, exome sequencing, chromosomal stability tests with comparative genomic hybridization (CGH) array and karyotyping by multi-color banding (mBAND) or fluorescent *in situ* hybridization (FISH) would be

valuable. For iPSC-derived cell products, EB formation assays would provide insights into differentiation potential. The results could be used to select “good” clones that demonstrate no differentiation bias or no differentiation resistance. These quality control tests and cell characterization tests are not a part of tumorigenicity testing *per se*. However, the information on starting material should be linked to the results of tumorigenicity testing to render the test results more informative.

In tumorigenicity testing of PSC-derived cell products, one can anticipate several tumor-forming events that include teratoma formation from residual “differentiation-resistant” PSC with normal karyotype, cancer-like progressive tumor formation from cells with abnormal karyotype or acquired genetic variation during culture and tumors with differentiation bias generated from imperfectly reprogrammed cells. To understand the nature of tumor-forming events, the link with results of these quality control tests is indispensable.

#### 4. Selection of an Animal Model

In general, if one were to use “non-immunodeficient” healthy animals or “non-immunodeficient” disease model animals for tumorigenicity testing, one would have to administer a large amount of immunosuppressant for long-term monitoring. However, this approach will not always guarantee satisfactory engraftment of xeno-transplants. Primates can be used for tumorigenicity testing as models representative of humans, but this model is more useful for POC tests, not for tumorigenicity tests. Therefore, immunodeficient healthy rodents are widely used for tumorigenicity testing if human cells (final product) are to be used in the test. Large immunodeficient animals like the SCID pig [14] are also available. However, again, the SCID pig model would be useful to address transplantation efficiency of human cells, such as xeno-bone marrow transplantation of human hematopoietic stem cells as a part of a POC study in large animals. They are not cost-effective large scale statistical studies. To conduct tumorigenicity tests with a sufficient number of immunodeficient animals, a rodent model is a reasonable option for the preparation of test cells. Immunodeficient mice such as nude mice (BALB/cA, JCl-nu/nu), SCID mice (C.B-17/Icr-scid/scid), NOD-SCID mice (NOD/ShiJic-scid) and NOG mice (NOD/ShiJic-scid, IL-2R $\gamma$  KO) have been widely used for human cell transplantation studies. Prior to the design of tumorigenicity tests, one needs to evaluate the tumor-generating potential of these immunodeficient mouse strains by transplanting various dose of tumorigenic cell lines subcutaneously.

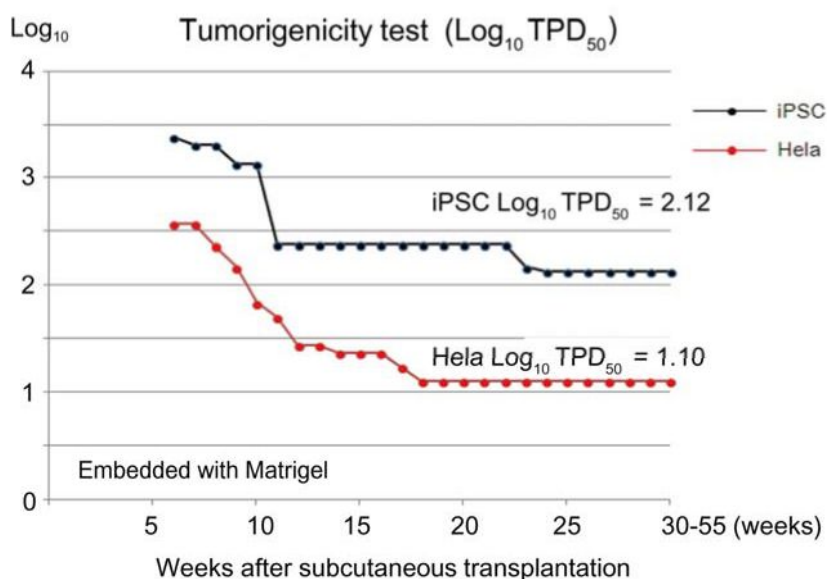
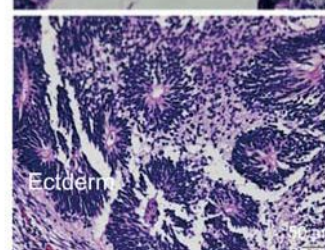
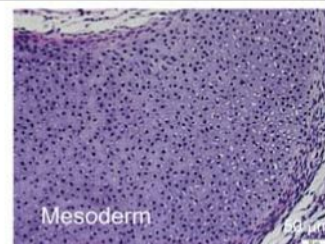
Another well-known transplantation site in rodents is beneath the testicular capsule space. This transplantation model is mainly used to test for satisfactory engraftment of test cells for POC tests, not for tumorigenicity tests. In our hands, it requires elaborate surgical skills and needs at least  $10^4$  iPSCs to generate tumors in NOG mice. In addition, tumor formation in the intraperitoneal space is hard to detect from the appearance of mice, thereby preventing statistical studies for tumor-forming events in a timely manner. In our case, the tumorigenic potential of immunodeficient mice was assessed by transplanting various doses of HeLa cells subcutaneously, following recommended procedure stated in WHO TRS 878 [11,12]. The mice were monitored over 12 months, and the TPD50 (minimum dose that can generate a tumor in 50% of transplanted mice) was calculated by the Trimmed Spearman-Kärber method for each strain [9]. HeLa cells were used as a representative line of somatic tumorigenic cells with a genetic abnormality. For transplantation, a collagen-based gel lacking

nutrients is sometime used to embed cells and to retain them at the designated transplantation site. Importantly, the gel *per se* does not support growth of the transplanted cells at the site. We have used Matrigel® (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) to embed cells and to increase their tumor-forming potential [15]. We obtained the following values for the TPD50 for HeLa cells with Matrigel® via a subcutaneous route: Nude,  $10^{3.5}$  ( $n = 120$ ); SCID,  $10^{2.5}$  ( $n = 24$ ); NOD-SCID,  $10^{2.17}$  ( $n = 24$ ); NOG,  $10^{1.1}$  ( $n = 75$ ). It is notable that during the course of experiments covering 9 months of observation, we also observed spontaneous thymomas with a frequency of some 14% in NOD-SCID mice in agreement with previous reports [16], which makes interpretation of tumorigenicity tests with NOD-SCID mice complicated.

Based on the preceding data, we chose NOG mice for subcutaneous tumorigenicity testing of iPSC-derived RPE, assuming that NOG mice could generate tumors from the lowest number of residual PSC or tumorigenic non-terminally differentiated PSC-derived cells. We then subcutaneously transplanted various doses of iPSC (201B7, Riken CDB) with Matrigel® into NOG mice to determine TPD50 for iPSC. The TPD50 value for iPSC (201B7) via the subcutaneous route was  $10^{2.12}$  ( $n = 20$ ) over 84 weeks of observation [9] (Figure 1). Tumorigenicity tests via a subcutaneous route with NOG mice is a sensitive quality control test to detect a small number of remaining PSC in PSC-derived investigational product regardless of cell type. Of course, the TPD50 for iPSC transplanted via a clinical route can be checked independently. In our case, we used nude rats for tumorigenicity testing via a clinical route, as the subretinal space of mice is very small and transplanting cells via a clinical route requires outstanding technique by a skilled operator. Thus, we needed larger animals to avoid “false” negative results due to failure of transplantation, to transplant a clinically relevant dose of GMP-grade iPSC-derived RPE (without Matrigel) and to confirm that the transplantation of brown colored RPE was in the right position in the albino eye ball of nude rats [9]. We did not use any “AMD” disease model animals [17,18] because they will not recapitulate all the features of human AMD. In human AMD, the macular region is focally affected and the rest of the retinal area is intact. Treatment of human wet-type AMD with an iPSC-derived RPE sheet is conducted by transplanting the RPE sheet into the affected lesion after removal of choroidal neovascularization. Thus, we assumed that a transplanted RPE sheet would receive a trans-effect from the intact retina. For that reason, we transplanted the RPE sheets into nude rats with intact retinal function rather the recapitulate the microenvironment of the clinical setting. Thus, the choice of animal should be made depending on the degree of immunodeficiency, anatomical demands and planned clinical manipulation. The TPD50 value for iPSC or HeLa cells via the clinical route was  $10^{4.74}$  ( $n = 26$ ) or  $10^{1.32}$  ( $n = 37$ ) respectively (Figure 2). The large discrepancy between the TPD50 values for iPSC and that of HeLa prompted us to examine the effect of the microenvironment on iPSC-derived products to better design tumorigenicity tests via the clinical route (see below).

Subcutaneous tumorigenicity test with NOG mice

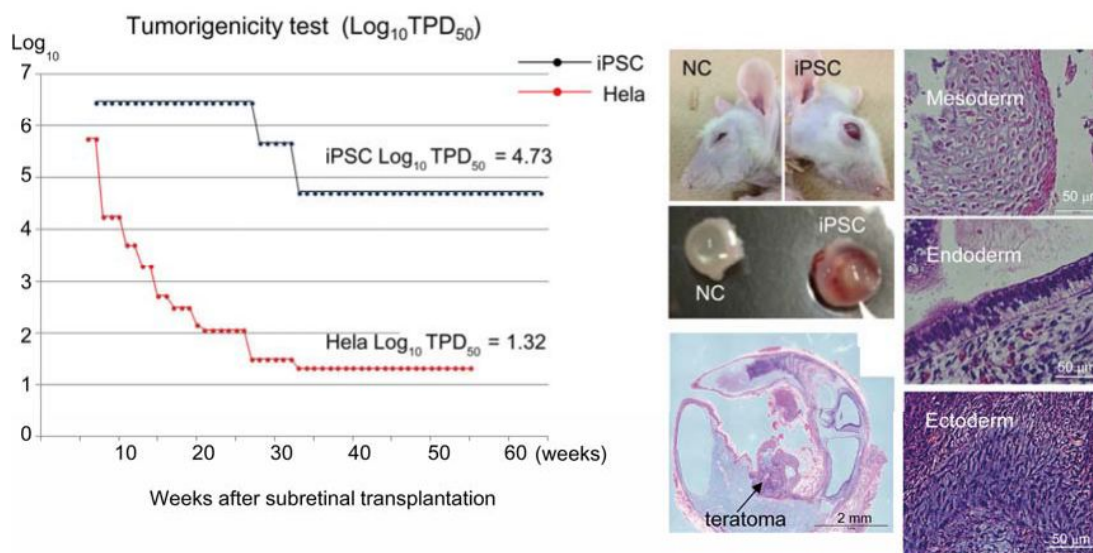
Cell type	Cell form	Min. dose for tumor formation	Weeks to observe Tumor formation (first to last)	Number of mice	Log <sub>10</sub> TPD <sub>50</sub>
iPSC 201B7	cell suspension in Matrigel	1 x 10 <sup>1</sup> cells	5 to 40 weeks	30	2.12
Hela	cell suspension in Matrigel	1 x 10 <sup>1</sup> cells	5 to 18 weeks	75	1.10



**Figure 1.** Subcutaneous tumorigenicity test with NOG mice. A table in above showed type of cells used as a positive control for tumorigenicity test (iPSC cell line 201B7 and tumor cell line HeLa), minimum dose for tumor formation and Log<sub>10</sub> TPD<sub>50</sub> for them when transplanted subcutaneously with Matrigel<sup>®</sup>. A line graph showed value for Log<sub>10</sub> TPD<sub>50</sub> for iPSC or HeLa at respective monitoring point (0–55 weeks). Photos (clock-wise); NOG mouse with tumor, teratoma from NOG mouse, Slice section of teratoma after HE staining; cartilage (mesoderm), intestinal tissue-like (endoderm) or neural rosette-like (ectoderm) tissue.

Tumorigenicity test via clinical route with Nude rats

Cell type	Cell form	Min. dose for tumor formation	Weeks to observe Tumor formation (first to last)	Number of rats	Log <sub>10</sub> TPD <sub>50</sub>
iPSC 201B7	cell suspension	1 x 10 <sup>4</sup> cells	7 to 33 weeks	20	4.73
Hela	cell suspension	1 x 10 <sup>1</sup> cells	5 to 33 weeks	13	1.32



**Figure 2.** Tumorigenicity test via clinical route with Nude rats. A table in above showed type of cells used as a positive control for tumorigenicity test (iPSC cell line 201B7 and tumor cell line HeLa), minimum dose for tumor formation and Log<sub>10</sub> TPD<sub>50</sub> for them when transplanted via clinical route. A line graph showed value for Log<sub>10</sub> TPD<sub>50</sub> for iPSC or HeLa at respective monitoring point (0–55 or 64 weeks). Photos (left from top to bottom); NC: non-transplanted control, iPSC: iPSC transplanted mouse. iPSC-transplanted (iPSC) or non-treated control (NC) eye ball. HE staining of slice section of iPSC-transplanted eye ball. Photos (right top to bottom) histology of teratoma formed; cartilage (mesoderm), intestinal tissue-like (endoderm) or neuron-like (ectoderm) tissue.

Another option to address the tumorigenic potential of autologous iPSC-derived products is to transplant rodent cells into a rodent with same genetic background to evade immune rejection associated with xeno-transplantation. Of course, it will be necessary to accumulate sufficient data to demonstrate that rodent cells used in this test are equivalent to human investigational cell products before starting the test.

**5. Administration Route and Microenvironment at the Transplantation Site**

The administration route should mimic the clinical route as closely as possible to address the tumorigenic potential of investigational cells in the context of the microenvironment at the transplantation site. Therefore, evaluation of the microenvironment of the transplantation site including trans-effects from the microenvironment on investigational cells should be assessed prior to the

commencement of large scale tumorigenicity testing. In the event of teratoma formation by residual undifferentiated PSCs, trans-effects of host tissue on PSC should be examined. Towards this end, we have established an *in vitro* co-culture system by placing PSC in culture inserts and culturing host or human primary tissue on the bottom of the dish. When iPSCs in culture inserts were co-cultured with cardiomyocytes or neural cells in the bottom of the dish, the growth of iPSC was not affected, but when they were co-cultured with RPE, the number of iPSCs was reduced drastically [19]. We found that RPE secreted Pigment Epithelium-derived Factor (PEDF). Addition of anti-PEDF antibody into the co-culture system blocked the reduction of iPSC cell number. Further addition of recombinant human PEDF (hrPEDF) induced apoptotic cell death and dramatically reduced ESC and iPSC cell number. hrPEDF did not show any reduction in the number of HeLa cells. Indeed, the TPD50 for iPSC was  $10^{4.75}$  when transplanting into the subretinal space (clinical route), while that for HeLa was  $10^{1.32}$ . That means that approximately 20 HeLa cells could generate a tumor in the subretinal space in half of the rats transplanted, but more than  $5 \times 10^4$  iPSCs were required to generate teratomas in the subretinal space in half of the rats transplanted. As we transplanted  $0.8\text{--}1.5 \times 10^4$  iPSC-derived RPE cells in sheets via the clinical route in tumorigenicity tests, it is unlikely that we could observe teratomas from tumorigenicity tests via the clinical route. Further tests, such as transplanting serial dilutions of iPSC in the final product in the subretinal space would not be informative and cannot be justified if tried. However, tumorigenicity tests via the clinical route could be useful to address the tumorigenic potential of non-terminally differentiated tumorigenic cells in iPSC-derived RPE products. This test would be sensitive enough to detect tumors in half the rats transplanted with 20 HeLa cells. We conducted this test for this reason and observed no tumor-forming event ( $n = 36$ ) during a 10–20 months monitoring period. The lack of tumor-forming events was eventually confirmed by IHC of transplanted cells in host tissue section.

We point out that the risk of teratoma formation by a small number of residual iPSC in iPSC-derived RPE in a clinical setting should be thoroughly addressed especially for autologous cell transplantation. Towards this end, subcutaneous tumorigenicity tests are being conducted concurrently with NOG mice wherein we transplant  $1 \times 10^6$  cells embedded in Matrigel. This test is sensitive enough to detect as few as 10 iPSCs [8]. We have conducted this test with 71 animals that were monitored for 9 to 21 months and obtained negative result after examination of tissue sections by IHC.

In addition, we reported a highly sensitive residual hiPSC detection method based upon qRT-PCR using primers for the *LIN28A* transcript [20] in hiPSC-derived RPE. This method enabled us to detect residual hiPSCs down to 0.002% of differentiated RPE cells. These assays were effective quality control tests and test cells with negative results with this qRT-PCR test could be used for tumorigenicity testing and therapy. We conclude that even if a few (less than 10) autologous iPSCs are present in an iPSC-derived cell product, the chance of developing a teratoma is negligible when transplanted into the subretinal space.

## 6. Monitoring Period

We subcutaneously transplanted various doses of HeLa cells with or without Matrigel<sup>®</sup> into Nude, SCID, NDO-SCID and NOG mice and into the subretinal space of nude rats. We also subcutaneously transplanted various doses of iPSC with or without Matrigel<sup>®</sup> into NOG mice or into the subretinal

space of NOG mice. As HeLa cells and iPSC can generate tumors in NOG mice with a relatively small number of cells, a long observation period can be required so that a tumorigenic event originating from a small number of transplanted cells is not overlooked. Ten HeLa cells needed 18 weeks and 10 iPSCs needed 40 weeks to generate tumors in NOG mice in the longest cases. Ten HeLa cells needed 33 weeks and  $1 \times 10^4$  iPSCs required 33 weeks to generate tumors in the subretinal space of nude rats in the most protracted cases. Overall, it is recommended that the immunodeficient rodents be monitored up to 12 months so that a tumor formation event is not missed and to conduct satisfactory statistical analyses.

## 7. Detection of Transplanted Cells

Tumor formation by transplanted human cells can be detected regardless of cell type (teratoma or tumor) by staining tissue sections of the transplant site in host animal with human-specific antibody and Ki67. Nuclear staining with DAPI or Hoechst will not demonstrate that the cells in the tissue section were viable at the time of sacrifice, but sharp margins of the nuclear membrane will suggest that cells were alive and free from autophagy or necrotic events. Human-specific antibodies such as STEM121 (StemCells, AB-121-U-050), Lamin A + C (Abcam, AB108595), and HNA clone 3E1.3 (Millipore MAB4383) can be used to identify human cells in host tissue. *In situ* hybridization with a species-specific (human, mouse, rat, *etc.*) probe may generate clear signals, but it may require elaborate sample preparation steps when a paraffin section is used. Tumor-forming cells with proliferation potentials were clearly distinguished by positive staining with Ki67 (MIB-1, Dako M7240) [9]. Further staining of human cells with antibodies specific for human differentiation markers will clearly identify the transplanted human cells.

## 8. Dose, Number and Sex of Immune Deficient Animals

The dose used in tumorigenicity tests should be determined in the context of the intended clinical use. In general, toxicology tests or POC tests require an escalation of doses to define the safety margin or the effective therapeutic margin. However, this may not be the case with tumorigenicity tests as they aim to address the tumorigenic potential of the maximum dose of the cell product that will be used in therapy. Considering the body size of the animal and anatomical space of the receptive transplant site in the animal, a relevant dose should be administered via the clinically route. In our case, we transplanted  $0.8\text{--}1.5 \times 10^4$  iPSC-derived RPE cells into the subretinal space of nude rats and  $1 \times 10^6$  iPSC-derived RPE cells with Matrigel<sup>®</sup> subcutaneously, based on the fact that we intended to transplant  $4\text{--}8 \times 10^4$  iPSC-derived RPE in the clinic. We transplanted a maximum or supra-maximum test dose to minimize the risk of underestimating tumor-forming events in a clinical setting.

The number of rodents in each group should be more than 6 for statistical analysis to obtain significant results using the Clopper-Pearson method. If the cell therapy focuses on a single gender, the sex of mice should be matched in the tumorigenicity test. If not, female mice should be chosen to conduct the tests as stated in WHO TRS 878. Male mice attack cage mates, which leads to a reduction of animal number during long-term monitoring.



## 9. Conclusions

It is important to design animal tumorigenicity tests so that they do not underestimate the frequency of tumorigenic events in a clinical setting, based on risk assessment of the respective test. In this review, we have highlighted points to be considered by emphasizing the possible risks and the countermeasures we have taken against them. It is important to gather genetic information from the PSC-derived cell product by CGH array, mBAND and FISH analysis in a timely manner. We need to evaluate the effect of the microenvironment on test cells at the transplant site and the tumor-forming potential of test animals via both the clinical route and via the subcutaneous route. The latter would serve as a sensitive quality control test. This analysis must be mindful of the required dose, type and duration of monitoring and application of an effective IHC method to detect and evaluate the transplanted cells. Conducting pilot studies will help to obtain some of the information and design informative pivotal tests. Clinical researchers need to fully understand the scope and limit of each preclinical test to predict adverse events in the clinic.

## Acknowledgments

We thank Chikako Morinaga of Laboratory for Retinal Regeneration, RIKEN Center for Developmental Biology for critical advising of the experiments, Yoji Sato of National Institute of Health Sciences, Tokyo for scientific discussion, Masayuki Shikamura of FBRI and Hiroyuki Kamao of Department of Ophthalmology, Kawasaki Medical School for rodent studies and Mamoru Ito of CIEA for supplying NOG mice.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: Hoshimi Kanemura, Masahiro J. Go and Shin Kawamata. Performed the experiments: Hoshimi Kanemura. Contributed reagents and materials/analysis tools: Noriko Sakai and Masayo Takahashi. Wrote the paper: Shin Kawamata, Hoshimi Kanemura and Masahiro J. Go.

## Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

## References

1. Strauss, S. Geron trial resumes, but standards for stem cell trials remain elusive. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 989–990.
2. Schwartz, S.D.; Hubschman, J.P.; Heilwell, G.; Franco-Cardenas, V.; Pan, C.K. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: A preliminary report. *Lancet* **2012**, *379*, 713–720.
3. Cyranoski, D. Stem cells cruise to clinic. *Nature* **2013**, *494*, doi:10.1038/494413a.
4. Reardon, S.; Cyranoski, D. Japan stem-cell trial stirs envy. *Nature* **2014**, *513*, 287–288.
5. Researchers Perform World's 1st iPS Cell Implant Surgery on Human. Available online: [http://ajw.asahi.com/article/sci\\_tech/medical/AJ201409130015](http://ajw.asahi.com/article/sci_tech/medical/AJ201409130015) (accessed on 13 September 2014).

6. Frey-Vasconcells, J.; Whittlesey, K.J.; Baum, E.; Feigal, E.G. Translation of stem cell research: Points to consider in designing preclinical animal studies. *Stem Cells Transl. Med.* **2012**, *1*, 353–358.
7. Lund, R.J.; Närvä, E.; Lahesmaa, R. Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 732–744.
8. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals. Available online: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm> (accessed on 17 December 2014).
9. Kanemura, H.; Go, M.J.; Shikamura, M.; Nishishita, N.; Sakai, N.; Kamao, H.; Mandai, M.; Morinaga, C.; Takahashi, M.; Kawamata, S. Tumorigenicity studies of induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived retinal pigment epithelium (RPE) for the treatment of age-related macular degeneration. *PLoS One* **2014**, *9*, e85336.
10. Sykova, E.; Forostyak, S. Stem cells in regenerative medicine. *Laser Ther.* **2013**, *22*, 87–92.
11. World Health Organization. Recommendations for the Evaluation of Animal Cell Cultures as Substrates for the Manufacture of Biological Medicinal Products and for the Characterization of Cell Banks. Proposed Replacement of TRS 878, Annex 1. Available online: [http://www.who.int/biologicals/Cell\\_Substrates\\_clean\\_version\\_18\\_April.pdf](http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf) (accessed on 17 December 2014).
12. 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. Available online: [http://whglibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_878.pdf](http://whglibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_878.pdf) (accessed on 17 December 2014).
13. Bailey, A.M. Balancing tissue and tumor formation in regenerative medicine. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, doi:10.1126/scitranslmed.3003685.
14. Suzuki, S.; Iwamoto, M.; Saito, Y.; Fuchimoto, D.; Sembon, S.; Suzuki, M.; Mikawa, S.; Hashimoto, M.; Aoki, Y.; Najima, Y.; *et al.* *Il2rg* gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs. *Cell Stem Cell* **2012**, *10*, 753–758.
15. Machida, K.; Suemizu, H.; Kawai, K.; Ishikawa, T.; Sawada, R.; Ohnishi, Y.; Tsuchiya, T. Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors. *J. Toxicol. Sci.* **2009**, *34*, 123–127.
16. Prochazka, M.; Gaskins, H.R.; Shultz, L.D.; Leiter, E.H. The nonobese diabetic scid mouse: Model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3290–3294.
17. Ciulla, T.A.; Criswell, M.H.; Danis, R.P.; Hill, T.E. Intravitreal Triamcinolone Acetonide Inhibits Choroidal Neovascularization in a Laser-Treated Rat Model. *Arch. Ophthalmol.* **2001**, *119*, 399–404.
18. Ciulla, T.A.; Criswell, M.H.; Danis, R.P.; Fronheiser, M.; Yuan, P.; Cox, T.A.; Csaky, K.G.; Robinson, M.R. Choroidal neovascular membrane inhibition in a laser treated rat model with intraocular sustained release triamcinolone acetonide microimplants. *Br. J. Ophthalmol.* **2003**, *87*, 1032–1037.
19. Kanemura, H.; Go, M.J.; Nishishita, N.; Sakai, N.; Kamao, H.; Sato, Y.; Takahashi, M.; Kawamata, S. Pigment Epithelium-Derived Factor Secreted from Retinal Pigment Epithelium Facilitates Apoptotic Cell Death of iPSC. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, doi:10.1038/srep02334.

20. Kuroda, T.; Yasuda, S.; Kusakawa, S.; Hirata, N.; Kanda, Y.; Suzuki, K.; Takahashi, M.; Nishikawa, S.; Kawamata, S.; Sato, Y. Highly sensitive *in vitro* methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One* **2012**, *7*, e37342.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).