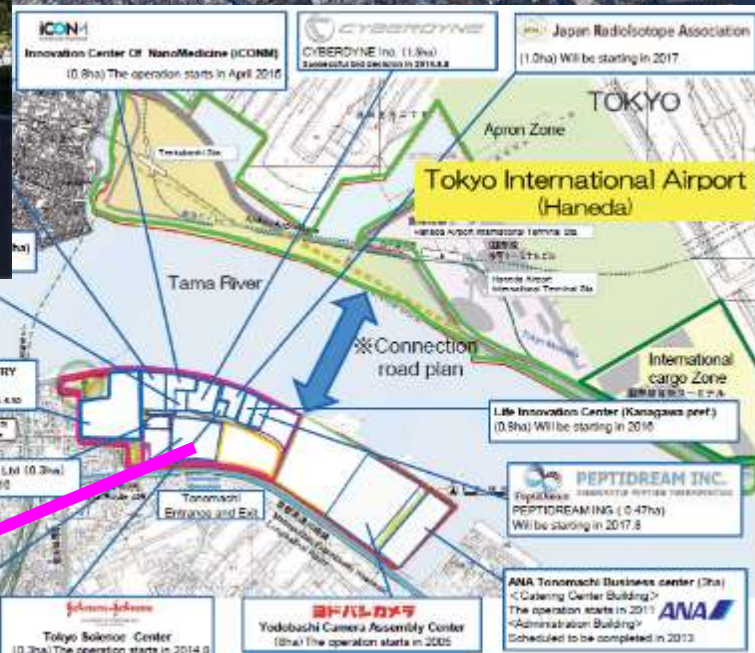


第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会  
特別セッション1 「再生医療のリスク評価」

# ヒト iPS 細胞株の造腫瘍性に関する 特性解析

国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部  
安田 智

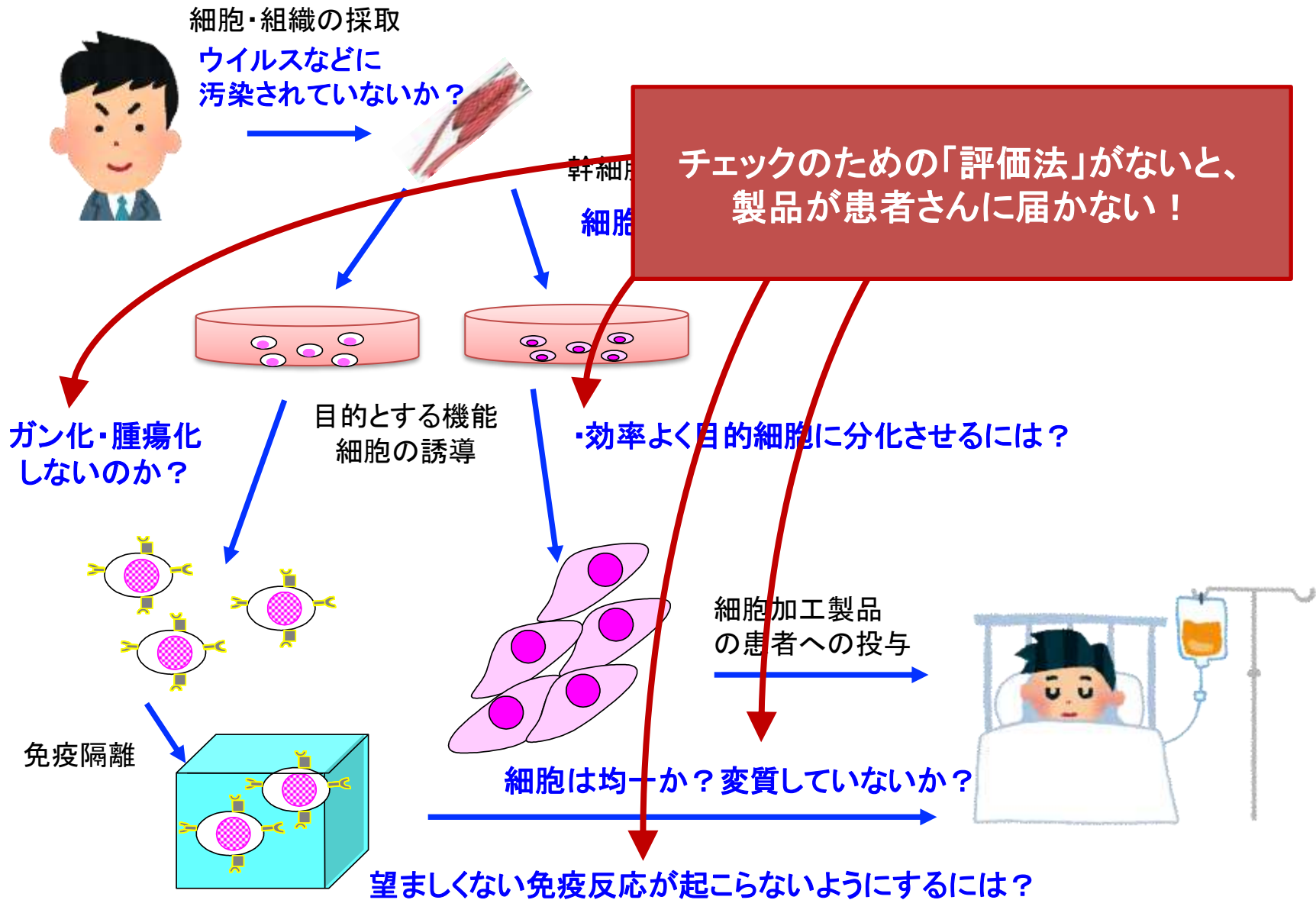
# 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 2018年に用賀から川崎市殿町地区に移転



医薬品、食品などの品質、安全性及び有効性の観点から、試験・研究や調査を実施している。

National Institute of Health Sciences  
(2.7ha) Will be starting in 2017

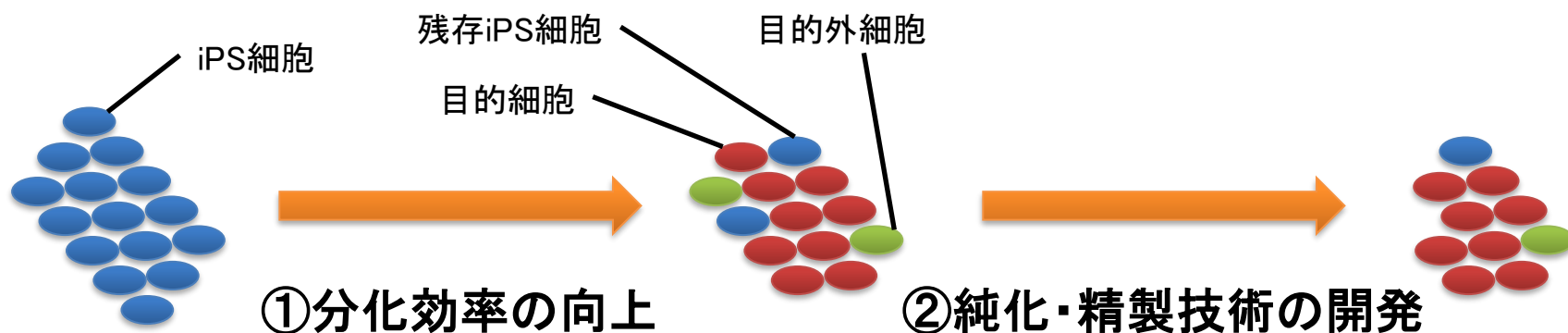
# 再生医療製品(細胞加工製品)の品質・安全性の確保



# ヒトES/iPS細胞加工製品の 腫瘍形成リスクに関するハザード(危害要因)

- 未分化なES/iPS細胞には**腫瘍形成能(造腫瘍性)**があることから、**残存ES/iPS細胞**による造腫瘍性のリスクが存在する。
- 培養に伴う**造腫瘍性形質転換細胞**の出現の可能性もある。

未分化ES/iPS細胞・造腫瘍性細胞の残存・混入を防止する工夫が必要

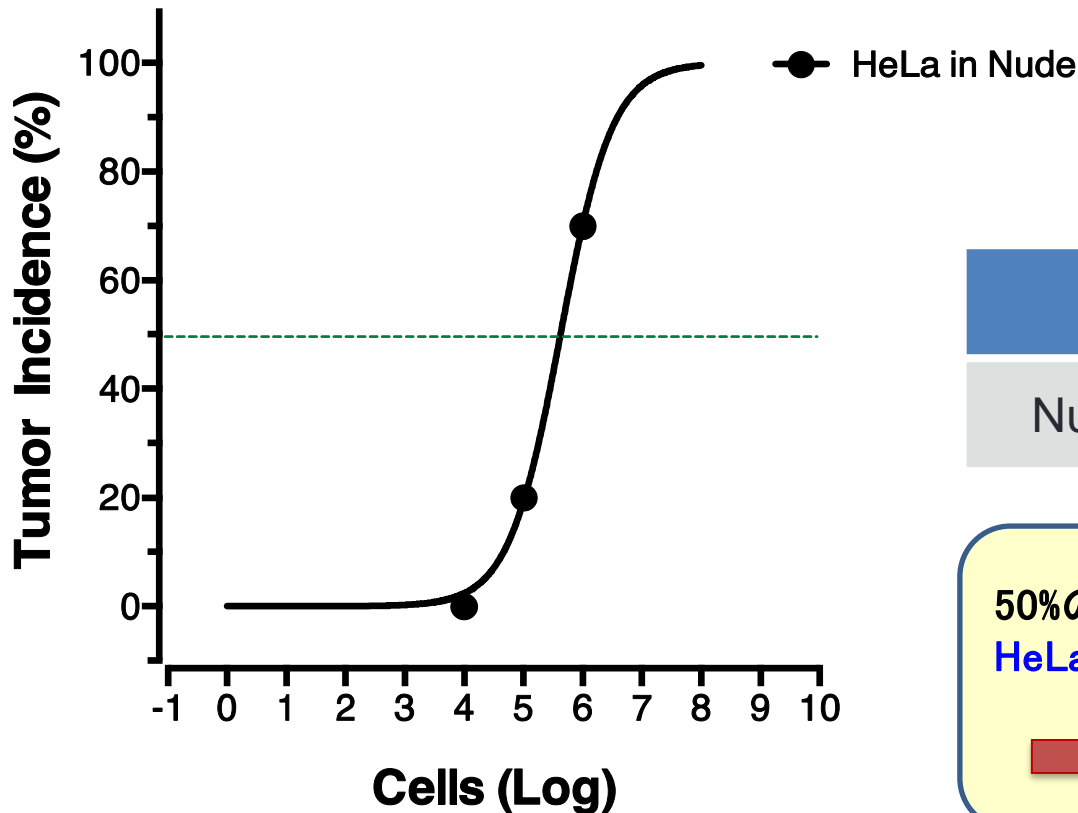


③製品の「実用化」には、未分化ES/iPS細胞や造腫瘍性形質転換細胞の  
除去・残留を確認する試験法が不可欠

# HeLa細胞皮下投与試験(ヌードマウスの感度)

## Nodule Formation

16 wks after Subcutaneous Administration



|      | TPD <sub>50</sub> | Fold |
|------|-------------------|------|
| Nude | $4.0 \times 10^5$ | 1    |

50%の確率で腫瘍を形成させるためでも  
HeLa細胞が $10^5$ 個以上も必要

➡ 十分な感度とは言えない



# 重度免疫不全マウスを用いた造腫瘍性試験系



## NOD/SCID/ $\gamma$ C<sup>null</sup>(NOG)マウス

- T、BおよびNK細胞欠失、補体活性消失、マクロファージや樹状細胞の機能不全
- **国産**(実験動物中央研究所が樹立、2002年に報告)



## NOD/SCID/IL2rgKO(NSG)マウス

- T、BおよびNK細胞欠失など、NOGと類似した表現型
- 米国Jackson Labが樹立、2005年に報告

<その他SCID/Beigeや、Rag2- $\gamma$ C double-knockout (DKO)なども、T、B、NK細胞欠失>



- ノードマウス等、従来の免疫不全動物に比べ、**ヒトの細胞や組織の生着性が著しく高く**、ヒト癌細胞を高率に生着させることが可能

ただし、科学的リスク評価のためには

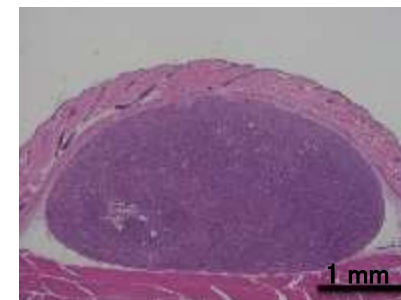
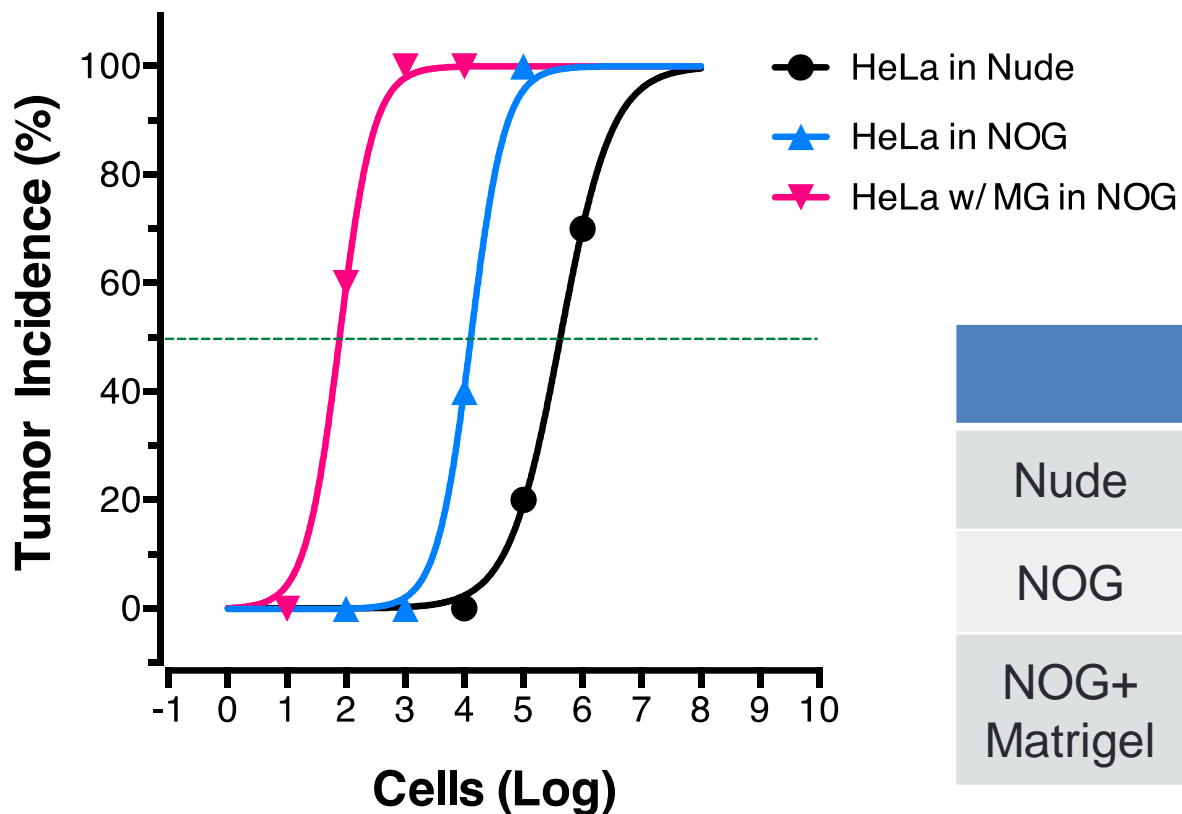
細胞・組織加工製品の造腫瘍性の**定量化の方策**の検討／**標準化**が必要

検討課題： 検出限界／感度／精度の分析的検討、陽性・陰性コントロールの在り方、投与細胞数、投与経路、投与方法、観察期間、ノードマウスとの比較試験など

# HeLa細胞皮下投与試験(ヌードマウスとの感度の比較)

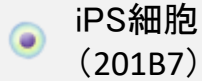
## Nodule Formation

16 wks after Subcutaneous Administration



|               | TPD <sub>50</sub>     | Fold  |
|---------------|-----------------------|-------|
| Nude          | 4.0 × 10 <sup>5</sup> | 1     |
| NOG           | 1.3 × 10 <sup>4</sup> | 25    |
| NOG+ Matrigel | 7.9 × 10              | 5,000 |

# NOGマウスを用いたヒトiPS細胞皮下投与試験①



iPS細胞  
(201B7)



feeder細胞  
(ヒト線維芽細胞)



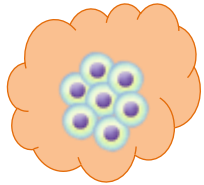
マトリゲル



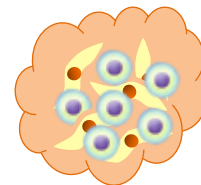
ROCK阻害剤  
(Y-27632)



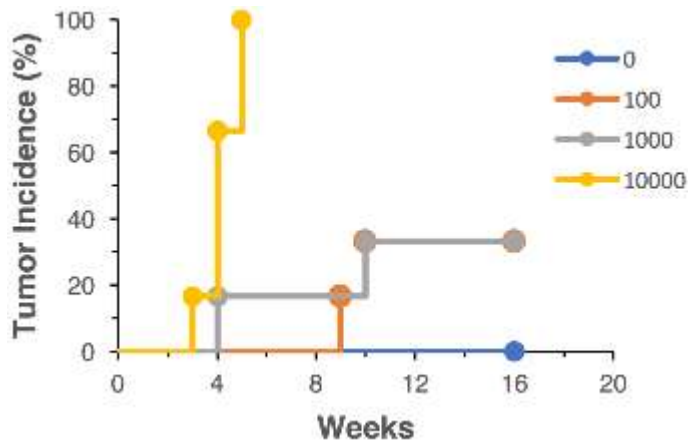
NOGマウス



iPS cells (細胞塊)  
+マトリゲル



iPS cells (分散化細胞)  
+マトリゲル  
+feeder細胞

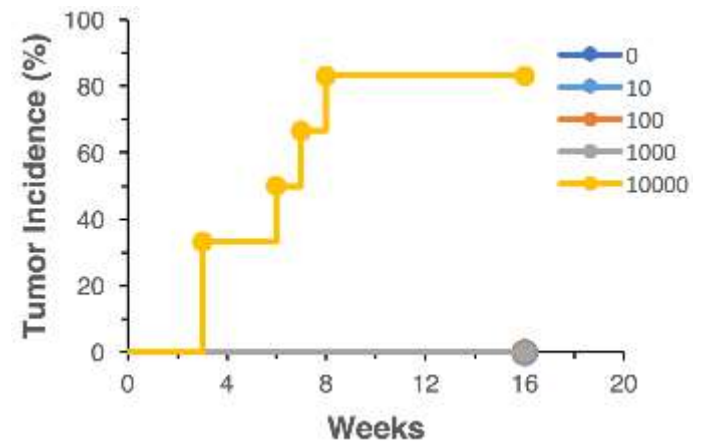


TPD<sub>50</sub> = 681 cells

定量性



感度

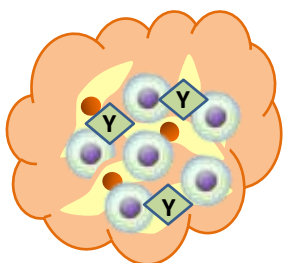
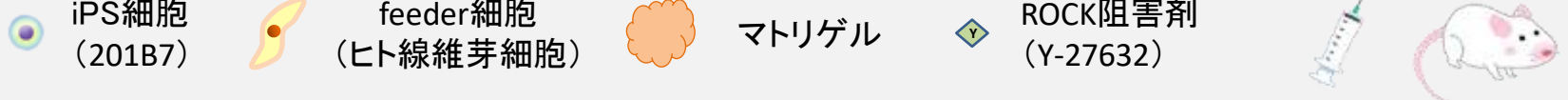


TPD<sub>50</sub> = 4642 cells

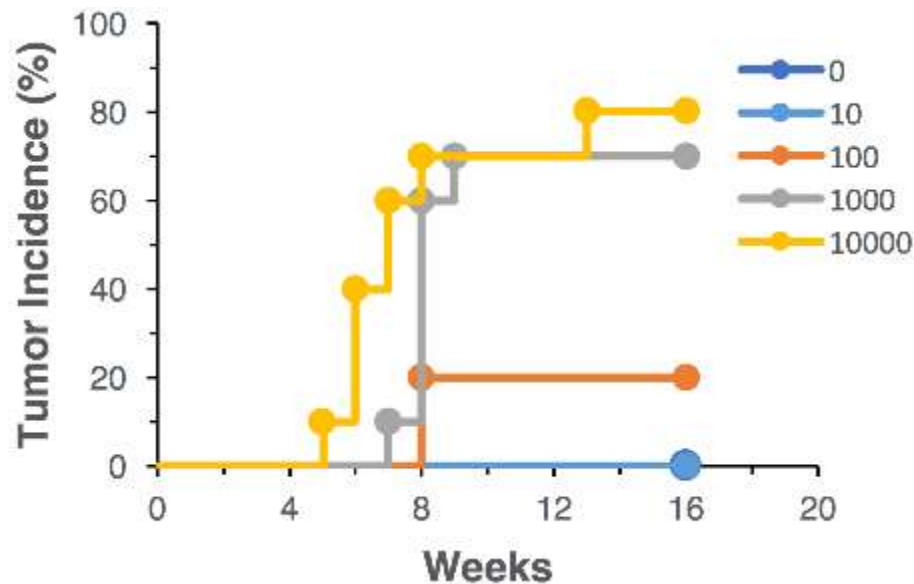
線維芽細胞とマトリゲルが存在した状態でも、単細胞に分散させるとヒトiPS細胞の生着性が低下する。



# NOGマウスを用いたヒトiPS細胞皮下投与試験②



iPS cells (分散化細胞)  
+マトリゲル  
+feeder細胞  
+ROCK阻害剤



$TPD_{50} = 631 \text{ cells}$

ROCK阻害剤の添加により、単細胞分散したヒトiPS細胞の生着率が大きく向上した。

# ヒト多能性幹細胞由来製品の造腫瘍性リスク

## 造腫瘍性リスクにおける2つの大きな問題点

量的問題:  $10^4 \sim 10^9$ 個の細胞中の僅かな未分化・造腫瘍性細胞混入の検出法・解釈法

質的問題: 未分化iPS細胞に起因する腫瘍の病理学的特性の予測・管理法

### 造腫瘍性にかかわるリスク対策

#### 「量的把握」

治療に必要な総細胞数が多いケース(例えば心筋や脊髄の再生)ほど、残存未分化iPS/ES細胞数が多くなりやすいため、腫瘍発生確率も高くなりやすいという問題を合理的に管理することである。

#### 「質的把握」

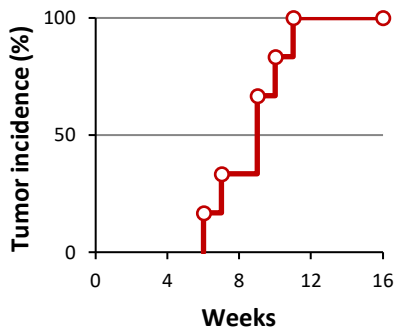
残存する未分化iPS/ES細胞の腫瘍形成能や不安定性が高いほど、患者へのリスクが高くなるという問題を合理的に管理することである。

# 造腫瘍性試験を行ったヒトiPS細胞10株

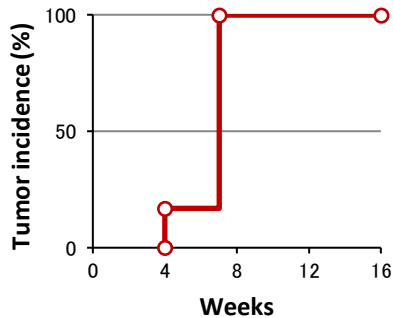
| iPS細胞株         | 由来細胞      | 導入遺伝子                                      | 導入方法        |
|----------------|-----------|--|-------------|
| 201B7          | 皮膚線維芽細胞   | Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc                  | レトロウイルスベクター |
| 253G1          | 皮膚線維芽細胞   | Oct3/4, Sox2, Klf4                         | レトロウイルスベクター |
| 409B2          | 皮膚線維芽細胞   | Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28, p53shRNA | エピソーマルベクター  |
| 454E2          | 歯髄細胞      | Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28, p53shRNA | エピソーマルベクター  |
| HiPS-RIKEN-1A  | 臍帯由来線維芽細胞 | Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc                  | レトロウイルスベクター |
| HiPS-RIKEN-2A  | 臍帯由来線維芽細胞 | Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc                  | レトロウイルスベクター |
| HiPS-RIKEN-12A | 臍帯由来線維芽細胞 | Oct3/4, Sox2, Klf4                         | レトロウイルスベクター |
| ATCC-DYR0100   | 皮膚線維芽細胞   | Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc                  | レトロウイルスベクター |
| ATCC-HYR0103   | 肝線維芽細胞    | Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc                  | レトロウイルスベクター |
| mc-iPS         | 脂肪幹細胞     | Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28                 | プラスミドベクター   |

# ヒトiPS細胞10株における腫瘍形成率の経時的変化

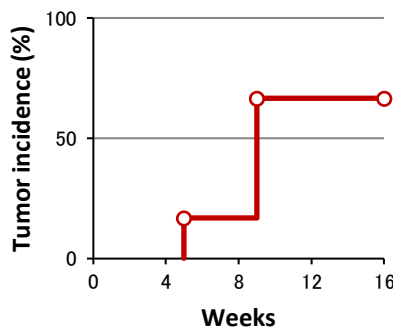
201B7



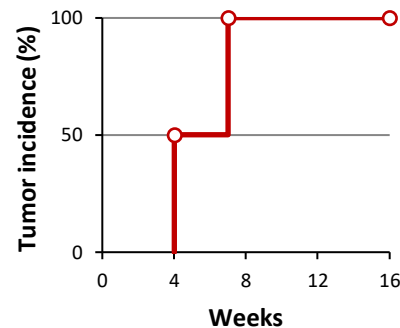
253G1



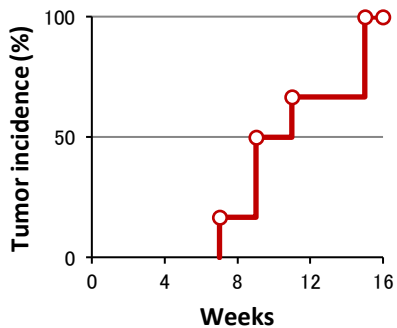
409B2



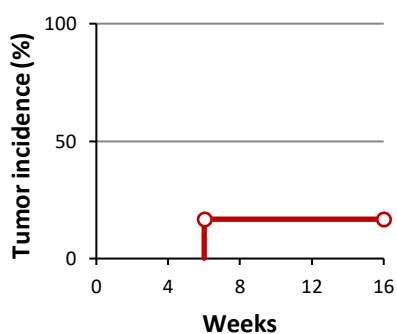
454E2



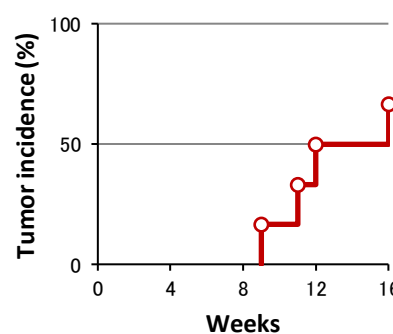
HiPS-RIKEN-1A



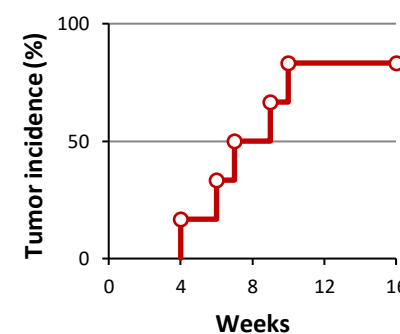
HiPS-RIKEN-2A



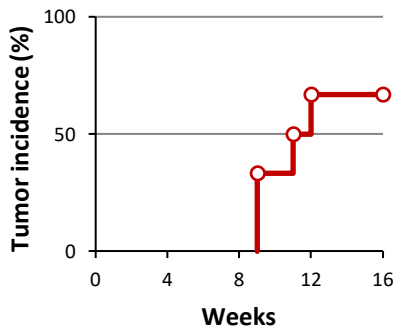
HiPS-RIKEN-12A



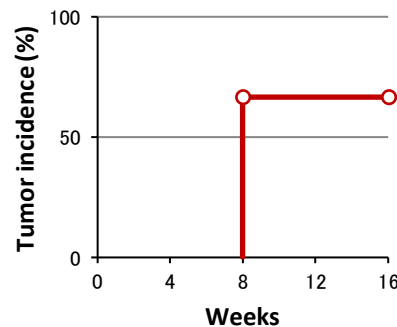
ATCC-DYR0100



ATCC-HYR0103



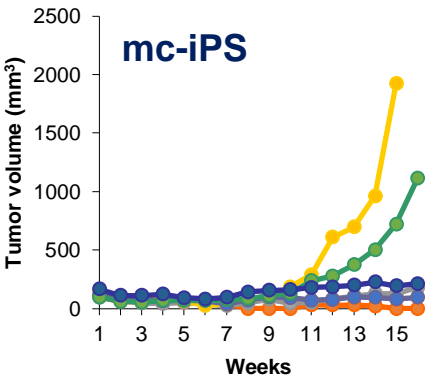
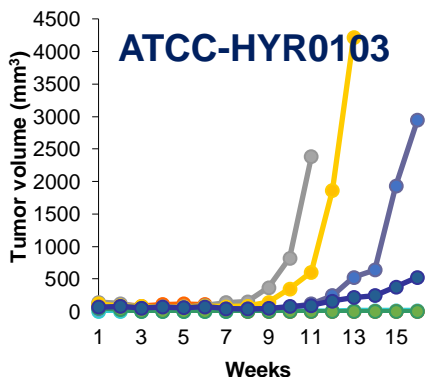
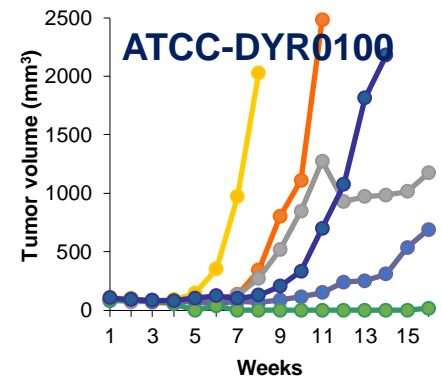
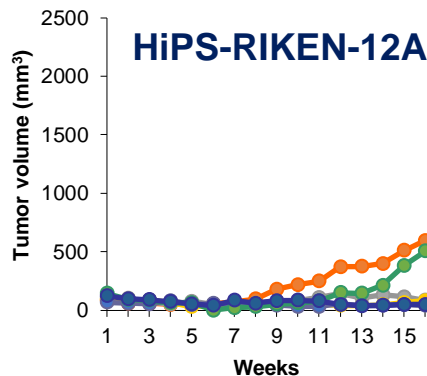
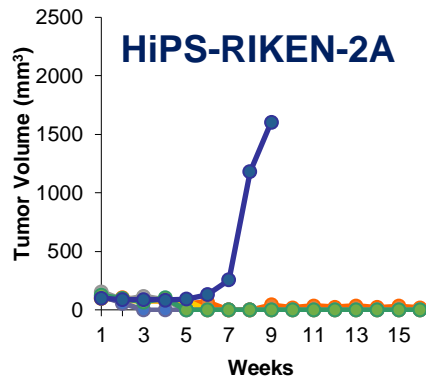
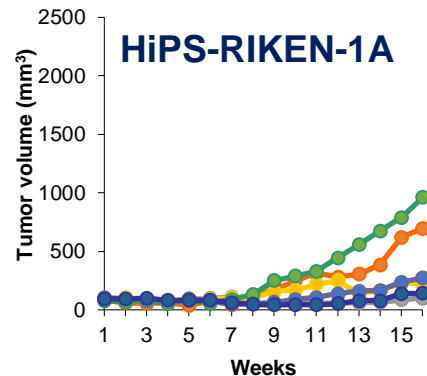
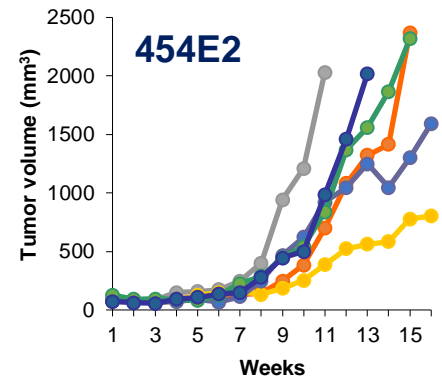
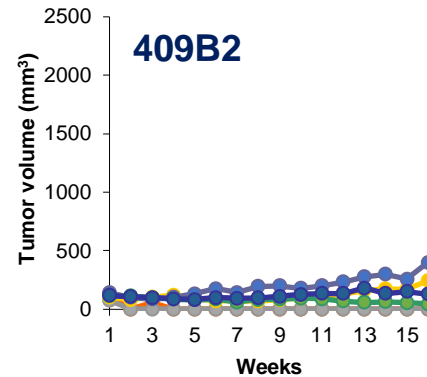
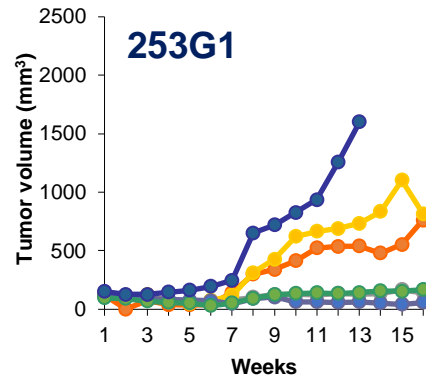
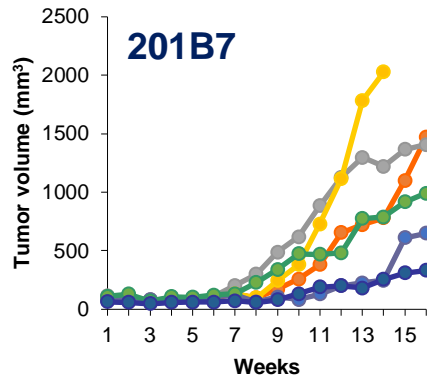
mc-iPS



ヒトiPS細胞投与数:  $3 \times 10^4$  個

腫瘍形成率において、ヒトiPS細胞株間で大きく異なる。

# ヒトiPS細胞10株における腫瘍体積の経時的変化

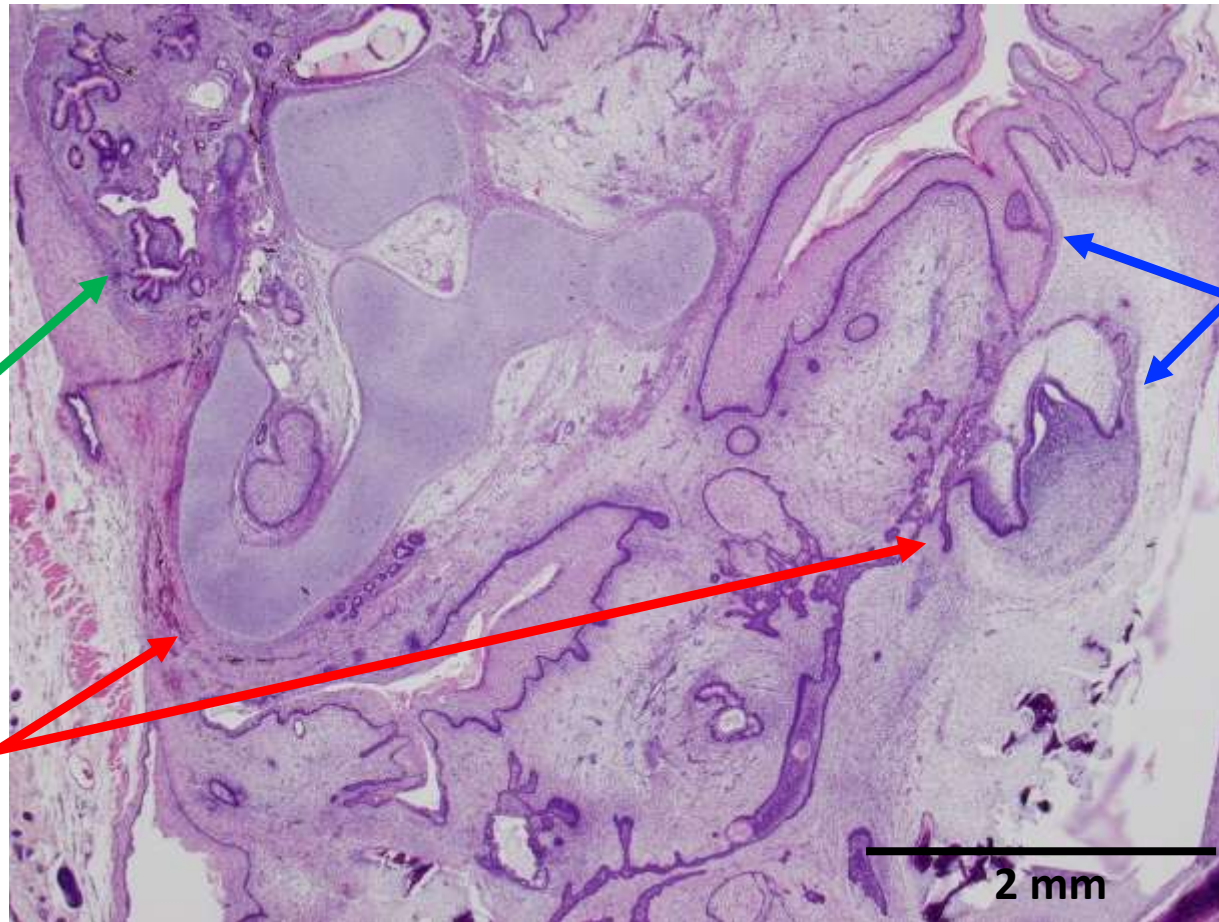


ヒトiPS細胞投与数:  $3 \times 10^4$  個

腫瘍が発現する時期や腫瘍体積の変化においても、ヒトiPS細胞株間で大きく異なる。

# 形成腫瘍の組織像①

## テラトーマ(奇形腫)



外胚葉成分

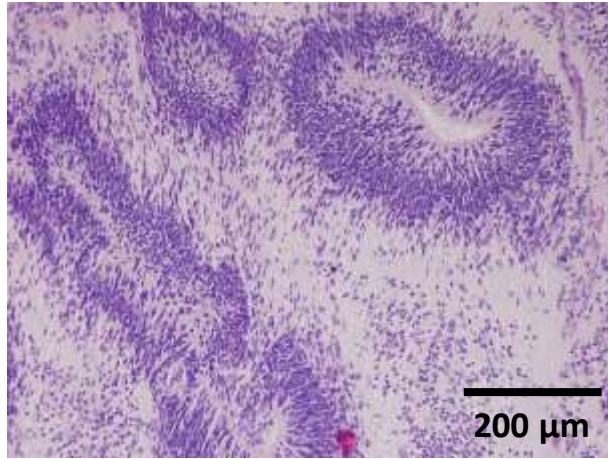
内胚葉成分

中胚葉成分

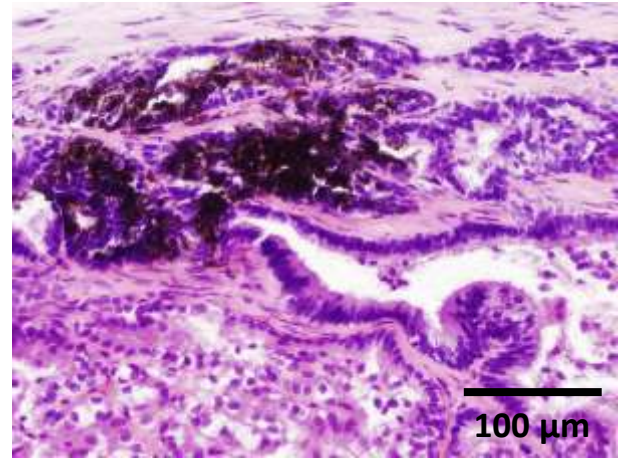
2 mm



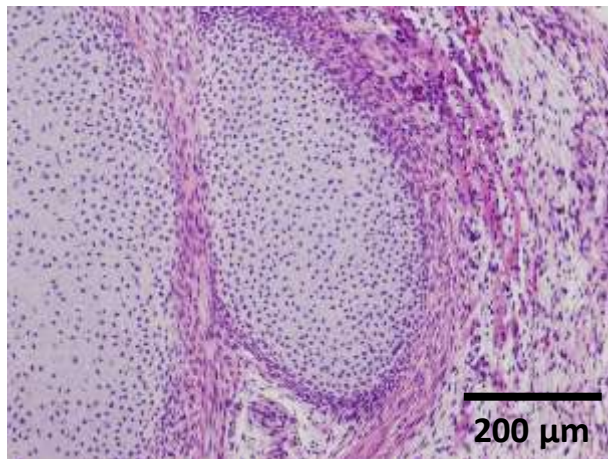
# 形成腫瘍の組織像②



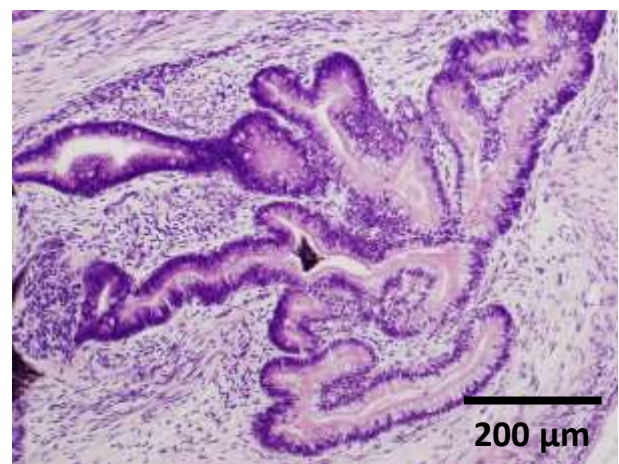
**外胚葉成分:** 神経管形成を伴う未熟神経上皮



**外胚葉成分:** メラノサイト、脈絡膜様組織



**中胚葉成分:** 軟骨



**内胚葉成分:** 杯細胞を伴う円柱上皮よりなる腸管様腺管

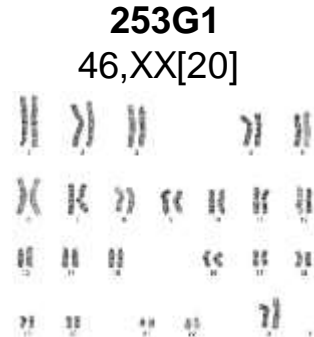
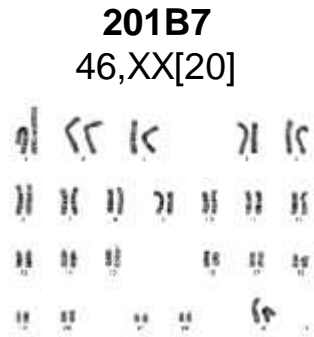
# 各腫瘍の体積および奇形腫グレード

| iPS細胞株 | No. | 腫瘍体積<br>mm <sup>3</sup> | 奇形腫分類<br>Grade | 胚葉分化  |
|--------|-----|-------------------------|----------------|-------|
| 201B7  | 1   | 1468                    | 3              | 三胚葉   |
|        | 2   | 1406                    | 1              | 三胚葉   |
|        | 3   | 2026                    | 3              | 三胚葉   |
|        | 4   | 648                     | 1              | 三胚葉   |
|        | 5   | 991                     | 3              | 外・中胚葉 |
|        | 6   | 332                     | 1              | 三胚葉   |
| 253G1  | 1   | 760                     | 1              | 三胚葉   |
|        | 2   | 139                     | 1              | 外・中胚葉 |
|        | 3   | 814                     | 1              | 外・中胚葉 |
|        | 4   | 58                      | 1              | 三胚葉   |
|        | 5   | 168                     | 1              | 外・中胚葉 |
|        | 6   | 1599                    | 3              | 外・中胚葉 |
| 409B2  | 303 | 244                     | 2              | 外・中胚葉 |
|        | 304 | 400                     | 3              | 外・中胚葉 |
|        | 305 | 43                      | 1              | 三胚葉   |
|        | 306 | 128                     | 1              | 外・中胚葉 |

| iPS細胞株         | No. | 腫瘍体積<br>mm <sup>3</sup> | 奇形腫分類<br>Grade | 胚葉分化  |
|----------------|-----|-------------------------|----------------|-------|
| 454E2          | 501 | 2369                    | 3              | 三胚葉   |
|                | 502 | 2030                    | 1              | 三胚葉   |
|                | 503 | 804                     | 1              | 外・中胚葉 |
|                | 504 | 1592                    | 1              | 外・中胚葉 |
|                | 505 | 2319                    | 1              | 三胚葉   |
|                | 506 | 2021                    | 1              | 三胚葉   |
| HiPS-RIKEN-1A  | 101 | 697                     | 3              | 三胚葉   |
|                | 102 | 99                      | 1              | 三胚葉   |
|                | 103 | 226                     | 3              | 外・中胚葉 |
|                | 104 | 273                     | 2              | 三胚葉   |
|                | 105 | 961                     | 1              | 三胚葉   |
|                | 106 | 141                     | 1              | 三胚葉   |
| HiPS-RIKEN-2A  | 206 | 1603                    | 2              | 三胚葉   |
| HiPS-RIKEN-12A | 201 | 595                     | 1              | 外・中胚葉 |
|                | 202 | 85                      | 1              | 三胚葉   |
|                | 205 | 506                     | 3              | 三胚葉   |
|                | 206 | 49                      | 1              | 三胚葉   |
| ATCC-DYR0100   | 301 | 2481                    | 3              | 三胚葉   |
|                | 302 | 1172                    | 1              | 三胚葉   |
|                | 303 | 2030                    | 1              | 三胚葉   |
|                | 304 | 690                     | 1              | 三胚葉   |
|                | 306 | 2179                    | 1              | 三胚葉   |
| ATCC-HYR0103   | 402 | 2380                    | 1              | 三胚葉   |
|                | 403 | 4218                    | 2              | 三胚葉   |
|                | 404 | 2950                    | 2              | 三胚葉   |
|                | 406 | 524                     | 1              | 三胚葉   |
| mc-iPS         | 402 | 181                     | 0              | 三胚葉   |
|                | 403 | 1921                    | 0              | 三胚葉   |
|                | 405 | 1115                    | 3              | 三胚葉   |
|                | 406 | 213                     | 1              | 三胚葉   |

- 悪性像(癌腫、肉腫、胚細胞腫瘍における胎児性癌と絨毛癌)は、46検体ともに認められなかった。
- iPS細胞株群間で奇形腫分類グレードの差は認められなかった。

# ヒトiPS細胞10株における核型解析



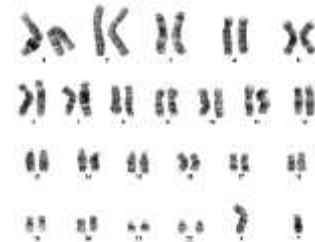
**HiPS-RIKEN-1A**  
46,XX[20]



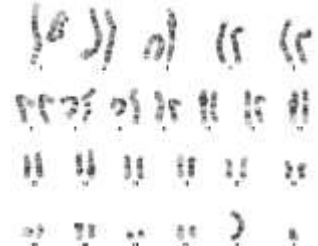
**HiPS-RIKEN-2A**  
46,XY[20]



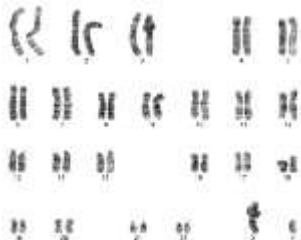
**HiPS-RIKEN-12A**  
46,XY[20]



**ATCC-DYR0100**  
46,XY[20]



**ATCC-HYR0103**  
46,XY[20]



**mc-iPS**  
47,XY,+12[20]



mc-iPS細胞株と454E2細胞株において、  
12番染色体のトリソミーが観察された。



# ヒトiPS細胞10株のがん関連遺伝子変異型解析

## がん関連遺伝子 614遺伝子

### COSMIC Census

|          |             |         |         |          |          |         |          |          |            |         |          |        |
|----------|-------------|---------|---------|----------|----------|---------|----------|----------|------------|---------|----------|--------|
| AB11     | BIRC3       | CHCHD7  | ELF4    | FIP1L1   | HOXD13   | LMO1    | MYCL     | PAX7     | RAD21      | SMAD3   | TGFB2    | ZNF521 |
| ABL1     | BLM         | CHD4    | ELK4    | FLCN     | HRAS     | LMO2    | MYCN     | PAX8     | RAD51B     | SMAD4   | THRAP3   | ZRSR2  |
| ABL2     | BMPR1A      | CHEK2   | ELL     | FLI1     | HSP90AA1 | LPP     | MYD88    | PBRM1    | RAF1       | SMARCA4 | TLX1     |        |
| ACKR3    | BRAF        | CHIC2   | ELN     | FLT3     | HSP90AB1 | LRIG3   | MYH11    | PBX1     | RALGDS     | SMARCB1 | TLX3     |        |
| ACSL3    | BRCA1       | CIC     | EML4    | FLT4     | IDH1     | LRP1B   | MYH9     | PCM1     | RANBP2     | SMARCD1 | TMPRSS2  |        |
| ACSL6    | BRCA2       | CIITA   | EP300   | FBNP1    | IDH2     | LSM14A  | MYO5A    | PCSK7    | RANBP2     | SMARCE1 | TNFAIP3  |        |
| ACVR1    | BRD3        | CLIP1   | EPS15   | FOXA1    | IGH      | LYL1    | MYO1D    | PDCD1LG2 | RAP1GDS1   | SMO     | TNFRSF14 |        |
| AFF1     | BRD4        | CLP1    | ERBB2   | FOXL2    | IGK      | LZTR1   | NAB2     | PDE4DIP  | RARA       | SDI1    | TNFRSF17 |        |
| AFF3     | BRP1        | CLTC    | ERBB3   | FOXO1    | IgL      | MAF     | NACA     | PDGFB    | RB1        | SOC31   | TOP1     |        |
| AFF4     | BTG1        | CLTCL1  | ERBB4   | FOXO3    | IKKBK    | MAFB    | NBN      | PDGFRA   | RBM10      | SOX2    | TP53     |        |
| AKAP9    | BUB1B       | CNBP    | ERC1    | FOXO4    | IKZF1    | MALAT1  | NCKIPSD  | PDGFRB   | RBM15      | SPECC1  | TPM3     |        |
| AKT1     | C12orf9     | CNOT3   | ERCC2   | FOXP1    | IL2      | MALT1   | NCOA1    | PER1     | RECQL4     | SPEN    | TPM4     |        |
| AKT2     | C15orf65    | CNTR1   | ERCC3   | FSTL3    | IL21R    | MAML2   | NCOA2    | PHF6     | REL        | SPOP    | TPR      |        |
| ALDH2    | C2orf44     | COL1A1  | ERCC4   | FUBP1    | IL6ST    | MAP2K1  | NCOA4    | PHOX2B   | RET        | SRGAP3  | TRA      |        |
| ALK      | CACNA1D     | COL2A1  | ERCC5   | FUS      | IL7R     | MAP2K2  | NCOR1    | PICALM   | RHOA       | SRSF2   | TRAF7    |        |
| AMER1    | CALR        | COX6C   | ERG     | GAS7     | IRF4     | MAP2K4  | NCOR2    | PIK3CA   | RHOH       | SRSF3   | TRB      |        |
| APC      | CAMTA1      | CREB1   | ESR1    | GATA1    | ITK      | MAP3K1  | NDRG1    | PIK3R1   | RM2        | SS18    | TRD      |        |
| APOBEC3B | CANT1       | CREB3L1 | ETNK1   | GATA2    | JAK1     | MAP3K13 | NF1      | PIM1     | RNF213     | SS18L1  | TRIM24   |        |
| AR       | CARD11      | CREB3L2 | ETV1    | GATA3    | JAK2     | MAPK1   | NF2      | PLAG1    | RNF217-AS1 | SSX1    | TRIM27   |        |
| ARHGAP26 | CARS        | CREBBP  | ETV4    | GMPS     | JAK3     | MAX     | NFATC2   | PLCG1    | RNF43      | SSX2    | TRIM33   |        |
| ARHGEF12 | CASC5       | CRLF2   | ETV5    | GNA11    | JAZF1    | MDM2    | NFE2L2   | PML      | ROS1       | SSE4    | TRIP11   |        |
| ARD1A    | CASP8       | CRTC1   | ETV6    | GNAQ     | JUN      | MDM4    | NFB      | PMS1     | RPL10      | STAG2   | TRRAP    |        |
| ARD1B    | CBFA2T3     | CRTC3   | EWSR1   | GNAS     | KAT6A    | MDS2    | NFKB2    | PMS2     | RPL22      | STAT3   | TSC1     |        |
| ARD2     | CBFB        | CSF3R   | EXT1    | GOLGA5   | KAT6B    | MECOM   | NFKBIE   | POLE     | RPL5       | STAT5B  | TSC2     |        |
| ARNT     | CBL         | CTCF    | EXT2    | GOPC     | KCNJ5    | MED12   | NIN      | POT1     | RPN1       | STAT6   | TSHR     |        |
| ASPSORI  | CBLB        | CTNNB1  | EZH2    | GPC3     | KDM5A    | MEN1    | NKX2-1   | POU2AF1  | RSP02      | STIL    | TTL      |        |
| ASXL1    | CBLC        | CUX1    | EZR     | GNPH     | KDM5C    | MET     | NONO     | POU5F1   | RSP03      | STK11   | U2AF1    |        |
| ATF1     | CCDC6       | CXCR4   | FAM131B | GRIN2A   | KDM6A    | MTF     | NOTCH1   | PPARG    | RUNDC2A    | STRN    | UBR5     |        |
| ATIG     | CENBP1IP1   | CYLD    | FAM46C  | H3F3A    | KDR      | MKL1    | NOTCH2   | PPFIBP1  | RUNX1      | SUFU    | USP6     |        |
| ATM      | CNND1       | DAXX    | FANCA   | H3F3B    | KDSR     | MLF1    | NPM1     | PPP2R1A  | RUNX1T1    | SUZ12   | USP8     |        |
| ATP1A1   | CNND2       | DCTN1   | FANCC   | HERPUD1  | KEAP1    | MLH1    | NR4A3    | PP6C     | SBD5       | SYK     | VHL      |        |
| ATP2B3   | CNND3       | DB2     | FANGC2  | HEY1     | KIAA1549 | MLLT1   | NRAS     | PRCC     | SDCA       | TAF15   | VITIA    |        |
| ATR      | CCNE1       | DDIT3   | FANCE   | HIF1A    | KIAA1598 | MLLT10  | NRG1     | PRDM1    | SDHA       | TAL1    | WAS      |        |
| ATRX     | CD274       | DDR2    | FANCF   | HIP1     | KIF5B    | MLLT11  | NSD1     | PRDM16   | SDHAF2     | TAL2    | WHSC1    |        |
| AXIN1    | CD74        | DDX10   | FANGC   | HIST1H3B | KIT      | MLLT3   | NT5C2    | PRF1     | SDHB       | TBL1XR1 | WHSC1L1  |        |
| AXIN2    | CD79A       | DDX3X   | FAS     | HIST1H4I | KLF4     | MLLT4   | NTRK1    | PRKACA   | SDHC       | TBX3    | WIF1     |        |
| B2M      | CD79B       | DDX5    | FAT1    | HLA-A    | KLF6     | MLLT6   | NTRK3    | PRKARIA  | SDHD       | TCEA1   | WRN      |        |
| BAP1     | CDK73       | DDX6    | FAT4    | HLF      | KLK2     | MNI     | NUMA1    | PRRX1    | SEPT5      | TCF12   | WT1      |        |
| BCL10    | CDH1        | DEK     | FBXO11  | HMGAI    | KMT2A    | MNX1    | NUP214   | PSIP1    | SEPT6      | TGF3    | WWTR1    |        |
| BCL11A   | CDH11       | DICER1  | FBXW7   | HMG2A    | KMT2C    | MPL     | NUP98    | PTCH1    | SEPT9      | TCF7L2  | XPC      |        |
| BCL11B   | CDK12       | DNAJB1  | FCGR2B  | HMG2P46  | KMT2D    | MSH2    | NUTM1    | PTEN     | SET        | TGFL1A  | XPC      |        |
| BCL2     | CDK4        | DNM2    | FCRL4   | HNF1A    | KRAS     | MSH6    | NUTM2A   | PTK6     | SETBP1     | TCL6    | XP01     |        |
| BCL3     | CDK6        | DNMT3A  | FEV     | HNRNP2B1 | KTNI     | MSI2    | NUTM2B   | PTPN11   | SETD2      | TERT    | YWHAE    |        |
| BCL5     | CDKN1B      | DROSHA  | FGFR1   | HOOK3    | LASP1    | MSN     | OLIG2    | PTPN13   | SF3B1      | TET1    | ZBTB16   |        |
| BCL6     | CDKN2A      | DUX4L1  | FGFR10P | HOXA11   | LCP1     | MTGP1   | OMD      | PTPRB    | SFPQ       | TET2    | ZCCHC8   |        |
| BCL7A    | CDKN2A(p14) | EBF1    | FGFR2   | HOXA13   | LCK      | MTOR    | P2RY8    | PTPRC    | SH2B3      | TFE3    | ZFHX3    |        |
| BCL9     | CDKN2C      | ECT2L   | FGFR3   | HOXA9    | LEF1     | MUC1    | PAFAH1B2 | PTPRK    | SH3GL1     | TFEB    | ZNF198   |        |
| BCOR     | CDX2        | EGFR    | FGFR4   | HOXC11   | LHFP     | MUTYH   | PALB2    | PWWP2A   | SLC34A2    | TFG     | ZNF278   |        |
| BCORL1   | CEBPA       | EIF3E   | FH      | HOXC13   | LIFR     | MYB     | PAX3     | RABEP1   | SLC45A3    | TFPT    | ZNF331   |        |
| BCR      | CEP89       | EIF4A2  | FHIT    | HOXD11   | LMNA     | MYC     | PAX5     | RAC1     | SMAD2      | TFRC    | ZNF384   |        |

### Shibata list\*

表1 がん関連遺伝子の例 (Gene Symbol で表示)

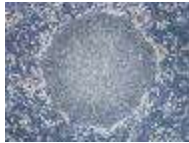
|          |         |         |        |        |         |         |
|----------|---------|---------|--------|--------|---------|---------|
| ABL1     | CBFA2T3 | ERCC4   | GATA1  | MEN1   | NUP214  | SH3GL1  |
| ABL2     | CBLB    | ERCC5   | GATA3  | MET    | NUP98   | SMAD4   |
| ACVR1B   | CBLC    | ERCC6   | GNA11  | MITF   | PAI1B2  | SMARCA4 |
| AFF3     | CNND1   | ETV4    | GNAQ   | MLH1   | PAX3    | SMARCB1 |
| AKAP9    | CNND2   | ETV5    | GNAS   | MLH3   | PBRM1   | SMO     |
| AKT1     | CNND3   | EVH1    | GOLGA5 | MLL    | PDE4DIP | SOC31   |
| AKT2     | CDK73   | EWSR1   | GOPC   | MLL2   | PDGFB   | SRGAP3  |
| ALK      | CDH1    | EXT1    | GPC3   | MLL3   | PDGFRA  | SRSF2   |
| APC      | CDH11   | EXT2    | H3F3A  | MLL3   | PDGFRB  | SS18    |
| ARHGFE12 | CDK8    | EZH2    | HMGAI  | MPL    | PK3CA   | STAT3   |
| ARD1A    | CDKN2A  | FAM123B | HMG2A  | MSH2   | PK3R1   | STK11   |
| ARD2     | CDKN2C  | FANCA   | HNF1A  | MSH6   | PRM1    | SUFU    |
| ASXL1    | CDX2    | FANCB   | HRAS   | MUTYH  | PLAQ1   | SUZ12   |
| ATF1     | CEBPA   | FANCC   | IDH1   | MYB    | PML     | SYK     |
| ATM      | CHEK1   | FANCD2  | IDH2   | MYC    | PMS2    | TCF3    |
| ATR      | CHEK2   | FANCF   | IKZF1  | MYCL1  | POLE    | TCL1A   |
| ATRX     | CIC     | FANCG   | IL2    | MYCN   | POLH    | TET2    |
| AXIN1    | COL1A1  | FANCG   | IL7R   | MYD88  | PPARG   | TFG     |
| AXIN2    | CREB1   | FANCI   | IRF4   | MYS13  | PPP2R1A | TLX1    |
| BAP1     | CREBBP  | FANCI   | JAK2   | NCOA2  | PRKARIA | TNFAIP3 |
| BCL11A   | CTNNB1  | FANCL   | JUN    | NCOA4  | PTCH1   | TP53    |
| BCL11B   | CYLD    | FANCM   | KDM5C  | NF1    | PTEN    | TPR     |
| BCL2     | DAXX    | FANCP   | KDM6A  | NF2    | PTPN11  | TSC1    |
| BCL3     | DDI2    | FBXW7   | KDF    | NFE2L2 | RAD51C  | TSC2    |
| BCL6     | DDIT3   | FEV     | KIT    | NFKB2  | RAF1    | TSHR    |
| BCOR     | DDX5    | FGFR1   | KRAS   | NIN    | RB1     | USP6    |
| BCR      | DDX8    | FGFR10P | LCK    | NONO   | REL     | VHL     |
| BHD      | DEK     | FGFR2   | LMO2   | NOTCH1 | RET     | WRN     |
| BIM      | DICER   | FGFR3   | MAF    | NOTCH2 | RNF213  | WT1     |
| BMP1R1A  | DNMT3A  | FH      | MAFB   | NPM1   | ROS1    | XPA     |
| BRAF     | EGFR    | FLCN    | MAML2  | NR4A3  | RUNX1   | XPC     |
| BRCA1    | ELK4    | FLT3    | MAP2K4 | NRAS   | SDHB    | ZNF521  |
| BRCA2    | EP300   | FOXL2   | MDM2   | NSD1   | SDHD    |         |
| CARD11   | ERBB2   | FOXP1   | MDM4   | NTRK1  | SETD2   |         |
| CARS     | ERCC3   | FUS     | MED12  | NTRK3  | SF3B1   |         |

<https://www.pmda.go.jp/files/000155938.pdf>

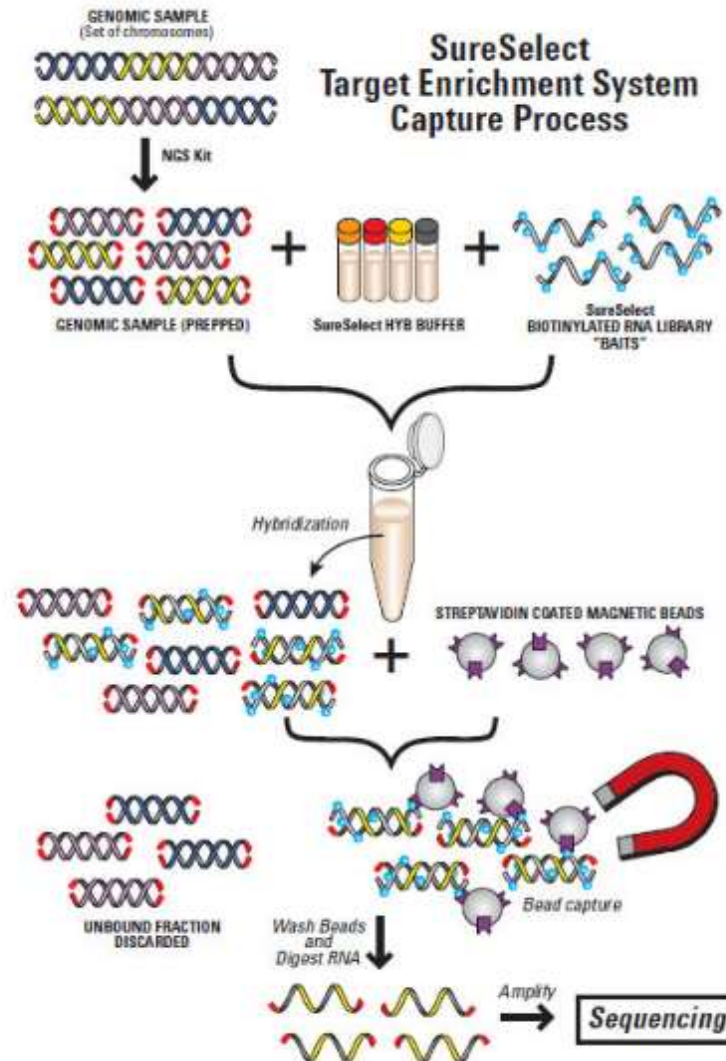
\*特定認定再生医療等委員会におけるヒト多能性幹細胞を用いる再生医療等提供計画の造腫瘍性評価の審査のポイント  
厚労省医政研発0613第3号(平成28年6月13日)

# エクソーム解析におけるライブラリー作製

ヒトiPS細胞株



1. 物理的に数百bpに断片化、インデックス・アダプター連結、PCR(5サイクル)

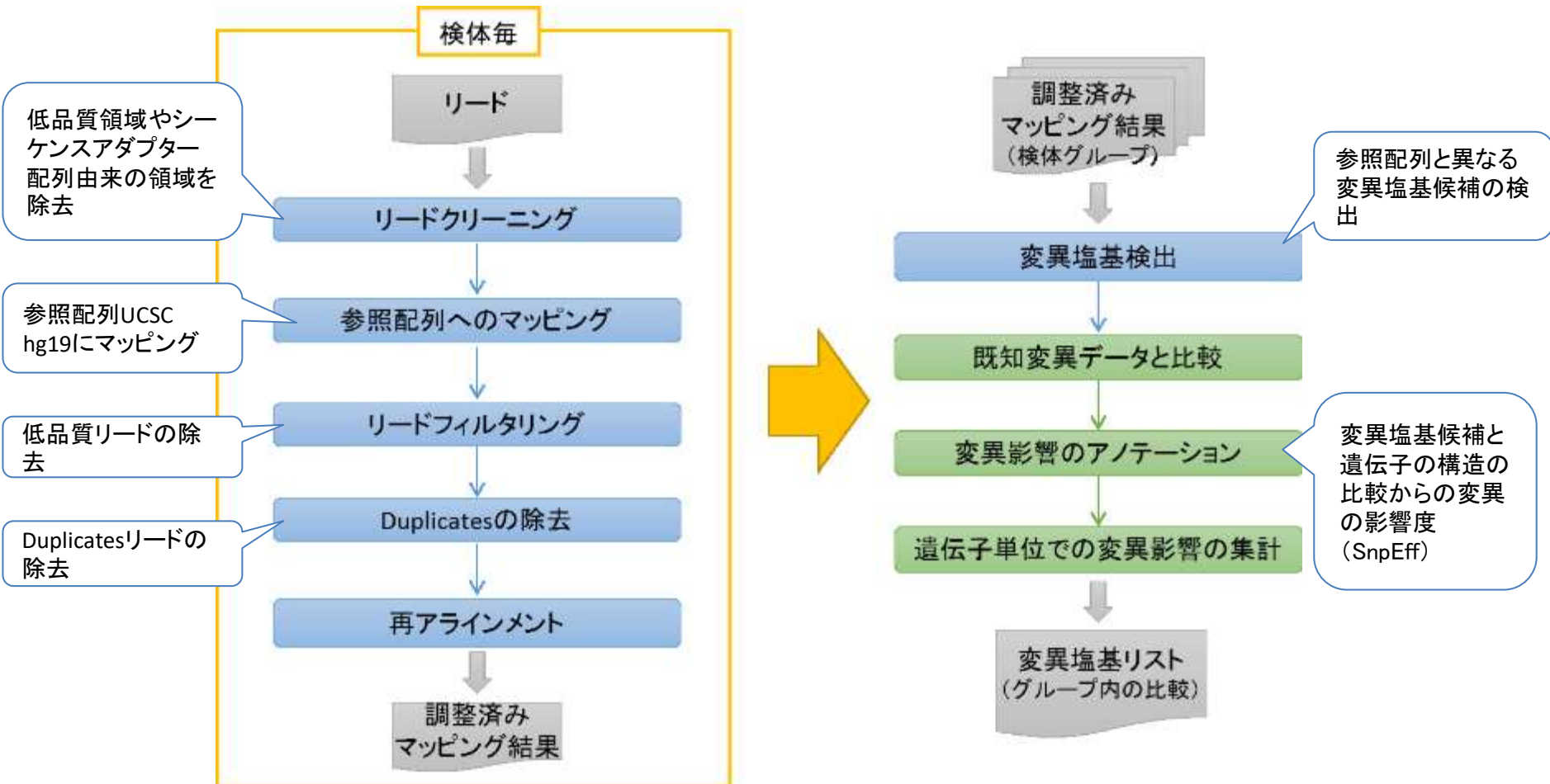


2. エクソン領域を選択的にキャプチャー

3. PCR増幅(12サイクル)



# NGSデータ解析①





# NGSデータ解析②

## ヒトiPS細胞株におけるがん関連遺伝子のエキソーム解析

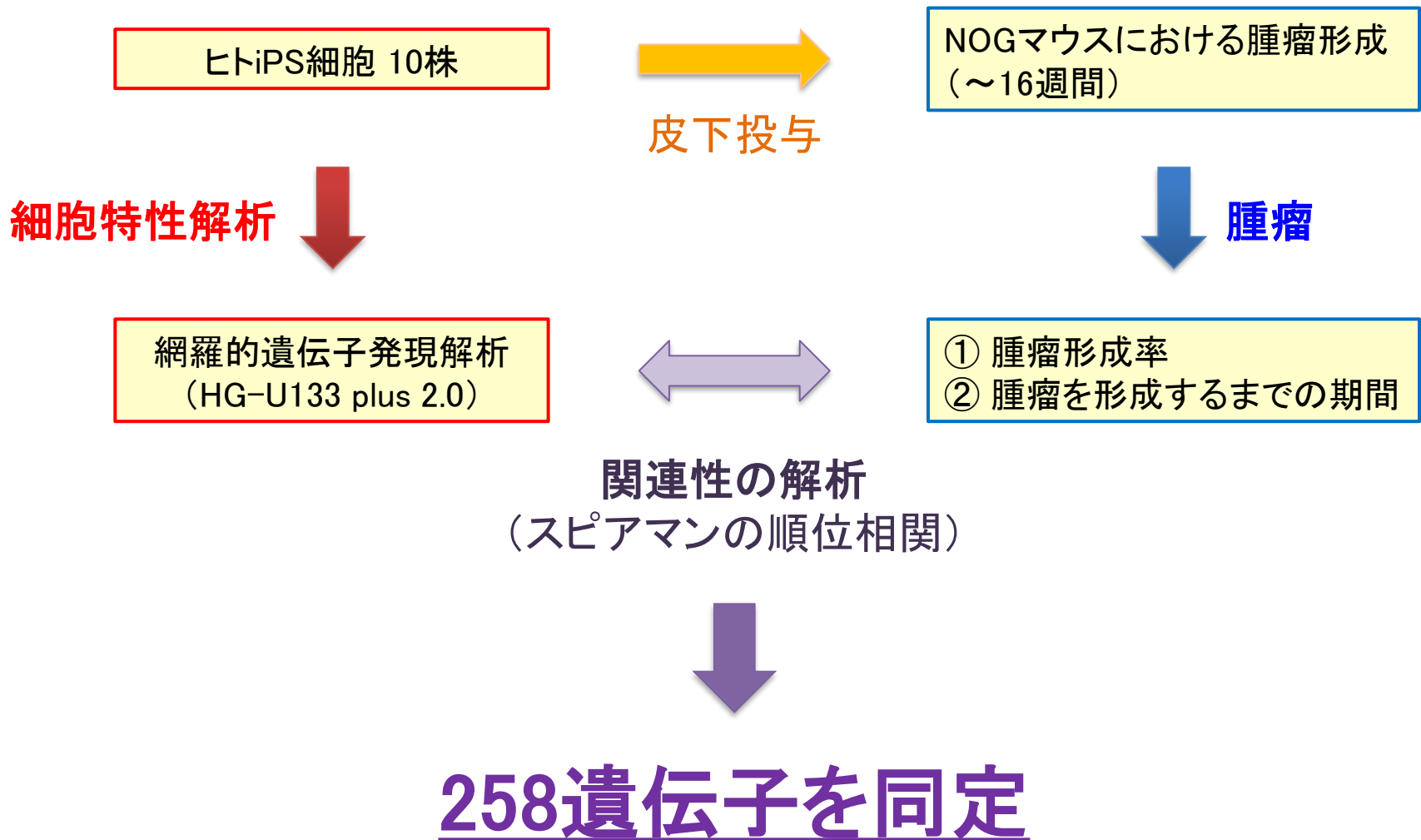
1細胞株当たり15Gb以上の全エキソン配列を取得し、614種類のがん関連遺伝子における変異型を以下のように抽出した。

- i. 変動係数0.3以下である9%以上の変異率
- ii. 40以上の冗長度 (read depth)
- iii. SnpEffによる変異型に対する予測機能スコアが **High** または **Moderate**
- iv. がん関連体細胞変異データベース (COSMIC) に登録されている変異型

| hiPSC lines    | Cancer-related genes having mutations reported in the COSMIC cancer database   |
|----------------|--|
| 201B7          | TNFRSF14, SPEN, NOTCH2, PIK3CA, TET2, FAT1, TERT, DROSHA, IL7R, APC, HLA-A, NFKBIE, KMT2C, PCM1, NCOA2, OMD, NOTCH1, KAT6B, CREB3L1, MEN1, MAML2, ATM, KCNJ5, PTPRB, SH2B3, HNF1A, NCOR2, FLT3, ERCC5, FOXA1, HIF1A, ZFH3, TP53, BRCA1, AXIN2, SETBP1, MAP2K2, JAK3, EP300, ZRSR2, FANCB           |
| 253G1          | TNFRSF14, SPEN, NOTCH2, PIK3CA, TET2, FAT1, TERT, DROSHA, IL7R, APC, HLA-A, NFKBIE, CREB3L2, KMT2C, PCM1, NCOA2, OMD, NOTCH1, KAT6B, CREB3L1, MEN1, MAML2, ATM, KCNJ5, PTPRB, SH2B3, HNF1A, NCOR2, FLT3, ERCC5, FOXA1, HIF1A, ZFH3, TP53, BRCA1, AXIN2, SETBP1, JAK3, EP300, AR, FANCB             |
| 409B2          | TNFRSF14, SPEN, NOTCH2, PIK3CA, TET2, FAT1, TERT, DROSHA, IL7R, APC, HLA-A, NFKBIE, CREB3L2, KMT2C, PCM1, NCOA2, OMD, NOTCH1, KAT6B, CREB3L1, MEN1, MAML2, ATM, KCNJ5, PTPRB, SH2B3, HNF1A, NCOR2, FLT3, ERCC5, FOXA1, HIF1A, ZFH3, TP53, BRCA1, AXIN2, SETBP1, JAK3, EP300, AR, FANCB             |
| 454E2          | NOTCH2, ALK, AFF3, FANCD2, ATR, WWTR1, TET2, FAT4, FAT1, SDHA, IL6ST, APC, RANBP17, NSD1, NFKBIE, EGFR, CREB3L2, EZH2, KMT2C, FANCD1, KAT6B, CREB3L1, MEN1, MAML2, ATM, KCNJ5, ZNF384, SH2B3, HNF1A, NCOR2, ERCC5, FOXA1, ZFH3, TP53, BRCA1, AXIN2, SETBP1, JAK3, EP300, AR, FANCB                 |
| HiPS-RIKEN-1A  | SPEN, NOTCH2, ATR, WWTR1, TET2, FAT4, FAT1, SDHA, IL6ST, APC, RANBP17, NSD1, NFKBIE, TRRAP, KMT2C, PCM1, NCOA2, OMD, NOTCH1, KAT6B, CREB3L1, MEN1, MAML2, ATM, CBL, KCNJ5, ZNF384, SH2B3, HNF1A, NCOR2, FLT3, ERCC5, FOXA1, HIF1A, ZFH3, TP53, BRCA1, AXIN2, SETBP1, AR, ATRX                      |
| HiPS-RIKEN-2A  | TNFRSF14, SPEN, NOTCH2, PIK3CA, TET2, FAT1, TERT, DROSHA, IL7R, APC, NSD1, SDHA, HLA-A, NFKBIE, EGFR, CREB3L2, KMT2C, PCM1, NCOA2, OMD, NOTCH1, KAT6B, CREB3L1, MEN1, MAML2, ATM, KCNJ5, ZNF384, COL2A1, SH2B3, HNF1A, NCOR2, FLT3, BRCA1, AXIN2, SETBP1, TCF3, KDM6A, ATRX                        |
| HiPS-RIKEN-12A | TNFRSF14, NOTCH2, PIK3CA, TET2, FAT1, TERT, DROSHA, IL7R, APC, RANBP17, HLA-A, NFKBIE, EGFR, CREB3L2, KMT2C, PTCH1, RET, KAT6B, TCF7L2, CREB3L1, MEN1, MAML2, ATM, KCNJ5, ZNF384, COL2A1, SH2B3, HNF1A, NCOR2, POLE, FLT3, BRCA2, ERCC5, FOXA1, HIF1A, ZFH3, TP53, RNF43, AXIN2, STK11, TCF3, ATRX |
| ATCC-DYR0100   | TNFRSF14, NOTCH2, ALK, FANCD2, ATR, WWTR1, KDR, PTPN13, TET2, FAT1, DROSHA, IL7R, APC, NSD1, HLA-A, ELN, CREB3L2, KMT2C, KAT6B, CREB3L1, MEN1, MAML2, ATM, KCNJ5, CHD4, ZNF384, SH2B3, HNF1A, NCOR2, POLE, FLT3, ERCC5, FOXA1, ZFH3, TP53, BRCA1, RNF43, SETBP1, ASXL1, MN1, EP300                 |
| ATCC-HYR0103   | TNFRSF14, SPEN, NOTCH2, ALK, MSH2, KDR, FAT4, FAT1, IL7R, APC, KMT2C, NRG1, PDCD1LG2, OMD, TSC1, CREB3L1, MEN1, MAML2, ATM, KCNJ5, ZNF384, COL2A1, KMT2D, SH2B3, HNF1A, NCOR2, FLT3, FOXA1, ZFH3, TP53, BRCA1, RNF43, AXIN2, MN1, EP300, AR, ATRX  |
| mc-iPS         | TNFRSF14, SPEN, NOTCH2, FANCD2, FOXL2, ATR, KIT, KDR, PTPN13, TET2, FAT4, FAT1, IL7R, APC, HLA-A, CREB3L2, KMT2C, PTCH1, NOTCH1, CREB3L1, MEN1, MAML2, ATM, KCNJ5, CHD4, ZNF384, SH2B3, HNF1A, NCOR2, FLT3, BRCA2, FOXA1, ZFH3, TP53, RNF43, AXIN2, SETBP1, TCF3, JAK3, KDM6A, ATRX                |

iPS細胞1株当たり、66-77の  
 変異型が、がん関連遺伝子  
 において認められた。

# iPS細胞株の造腫瘍性に関連する遺伝子の探索①



# iPS細胞株の造腫瘍性と関連する遺伝子の探索②

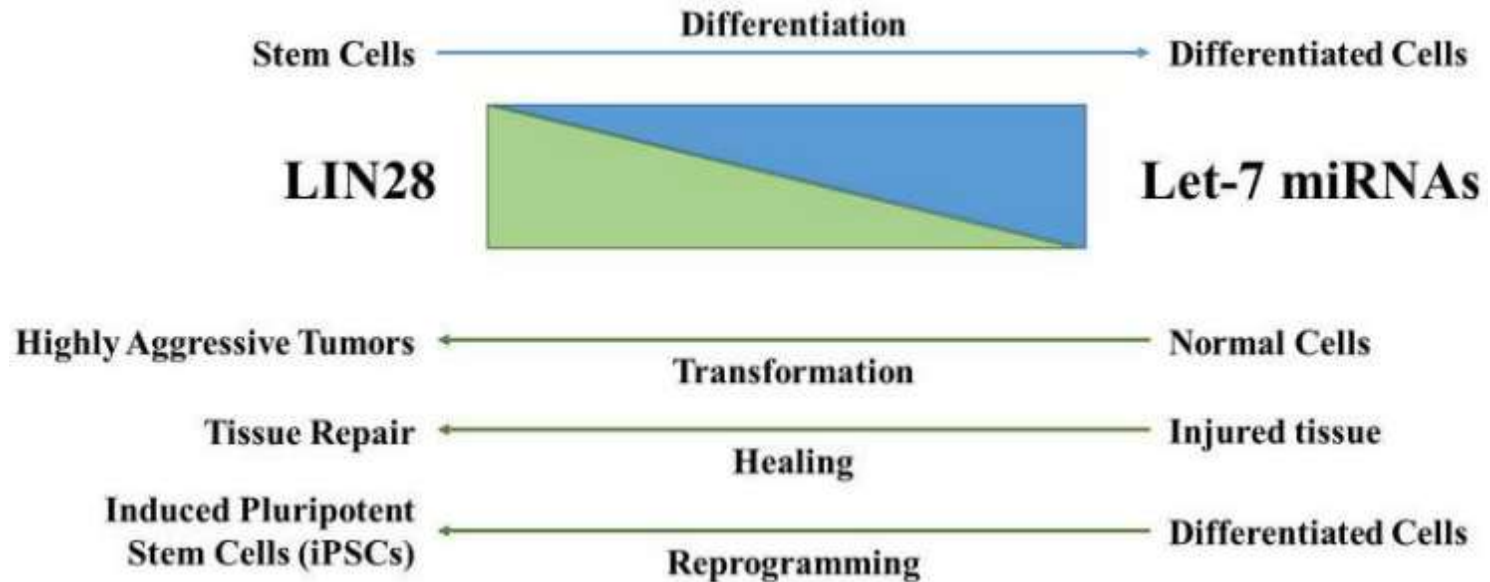
同定した258遺伝子



Ingenuity Pathway Analysis  
(IPA)

| Top 5 Upstream Regulator | p-value of overlap    |
|--------------------------|-----------------------|
| 5-fluorouracil           | $4.12 \times 10^{-4}$ |
| LIN28A                   | $1.53 \times 10^{-3}$ |
| let-7                    | $5.89 \times 10^{-3}$ |
| RASSF5                   | $6.36 \times 10^{-3}$ |
| ALKBH5                   | $6.49 \times 10^{-3}$ |

# iPS細胞株の造腫瘍性に関連する遺伝子の探索③



Balzeau J, et al. [The LIN28/let-7 Pathway in Cancer](#). *Front Genet.* 2017 Mar 28;8:31.

LIN28/let-7経路は、ヒトiPS細胞の造腫瘍性においても、重要な役割を果たしていることが示唆された。

# まとめ

- マウス皮下移植での腫瘍形成率や体積変化は、ヒトiPS細胞株間で大きく異なった。
- 移植に用いたiPS細胞株で、がん関連遺伝子の変異型及び核型異常が認められたが、形成腫瘍に悪性像は見られなかった。
- 造腫瘍性の程度と相関する遺伝子群のパスウェイ解析で、LIN28/let-7が上流制御因子として同定された。

悪性腫瘍化リスクにおいては、使用するiPS細胞株の段階で論ずるより、製品の段階で検討することに科学的合理性があると考えられる。



# 謝辞(敬称略)

## 国立医薬品食品衛生研究所

佐藤 陽治  
草川 森士  
黒田 拓也  
三浦 巧  
澤田 留美  
田埜 慶子  
松山 さと子

## 実験動物中央研究所

堤 秀樹  
浦野 浩司  
伊藤 守

## 神戸医療産業都市推進機構

川真田 伸

## 国立成育医療研究センター

梅澤 明弘  
那須 道世

## 大阪大学

早川 堯夫

## 藤田医科大学

松山 晃文  
高田 のぞみ