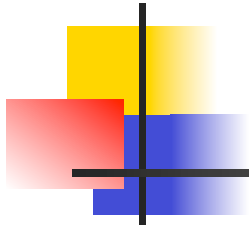


2013年5月10日

日本バイオマテリアル学会 2013年度第1回セミナー  
再生医療製品の薬事入門 – 製造から承認審査まで –

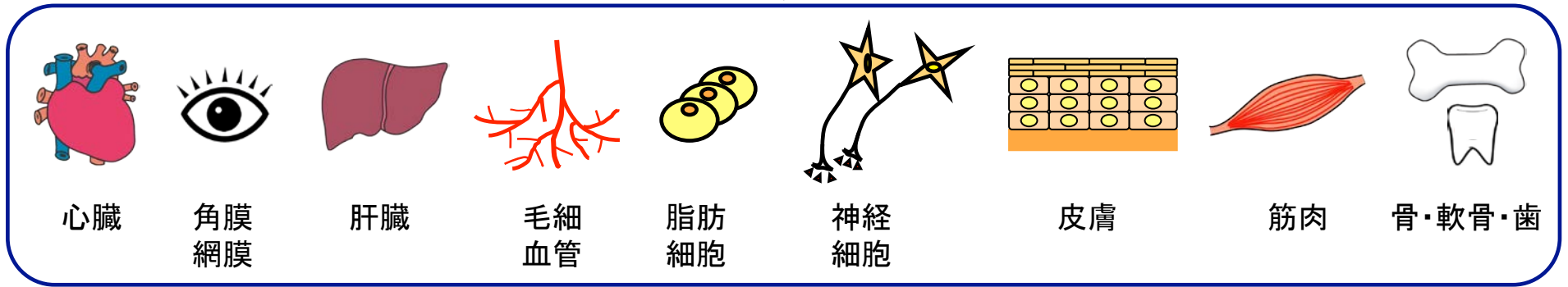
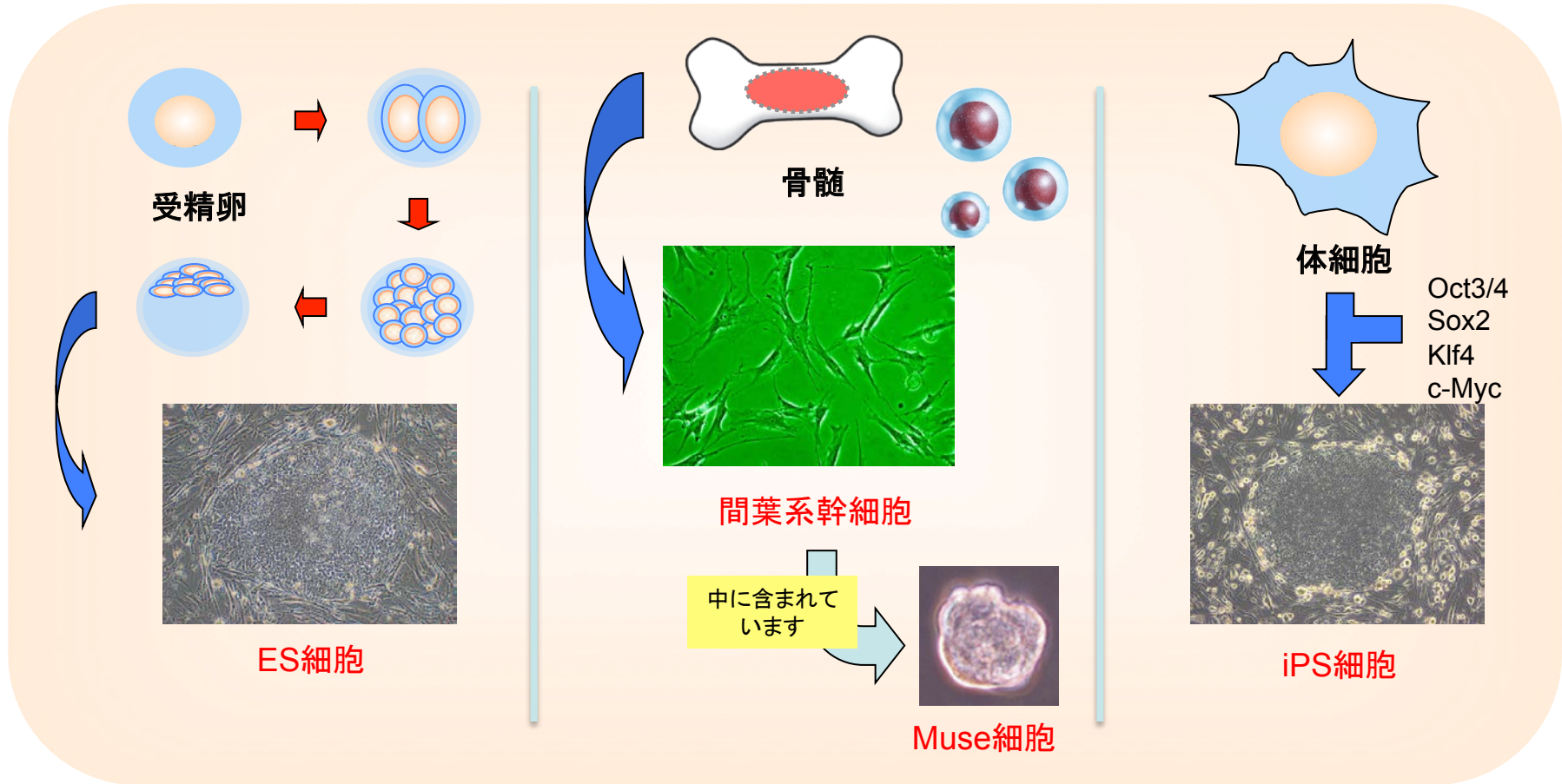


# 再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の 安全性評価法の確立を目指して

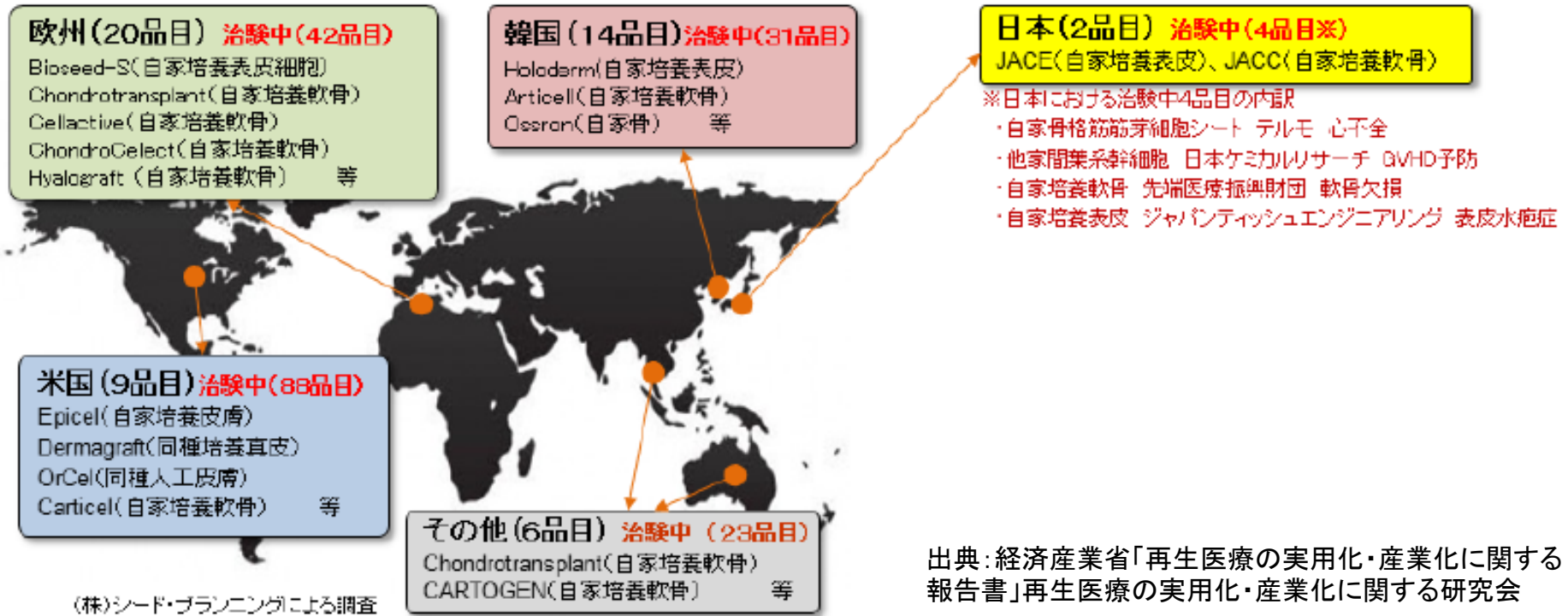
国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

澤田留美

幹細胞 → 組織



## 各国における再生医療製品の上市製品数及び治験中の製品数 (2012年12月現在)

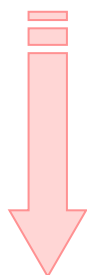


## 臨床開発中～製品化された再生医療製品(日本)

培養表皮シート



(J-TEC HPより)

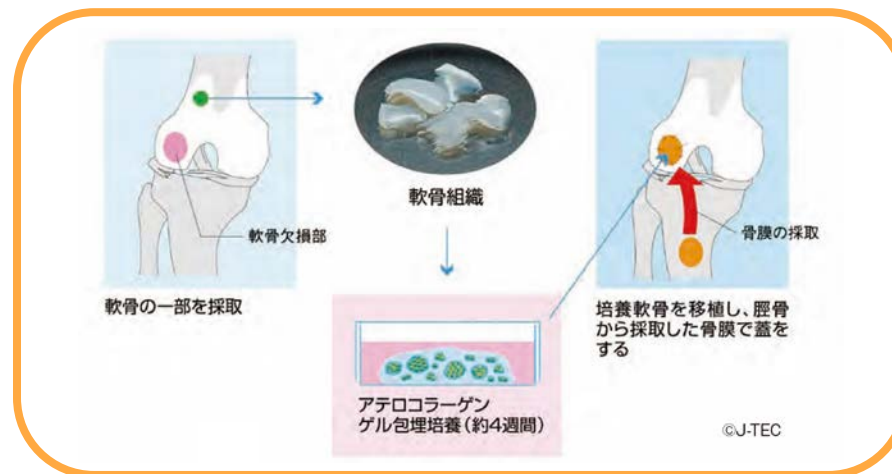
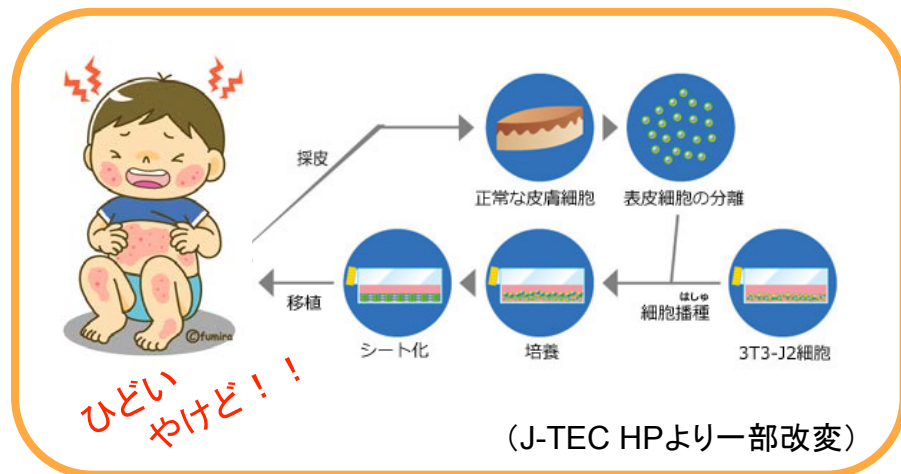


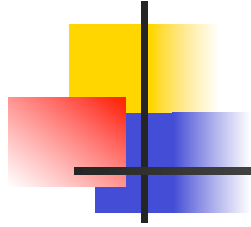
製品	適用	開発段階	分類
自家培養表皮 (販売名: ジェイス)	重度熱傷	製造販売承認取得 2007年10月	医療機器
自家培養軟骨 (販売名: ジャック)	関節軟骨損傷	製造販売承認取得 2012年7月	医療機器
同種間葉系 幹細胞	移植片対宿主病抑制	臨床第II/III試験	医薬品
骨格筋芽細胞	虚血性心疾患	2012年2月から 治験開始	医薬品
自家培養軟骨	限局性の 膝関節軟骨損傷	2012年5月から 治験開始	医療機器

培養軟骨



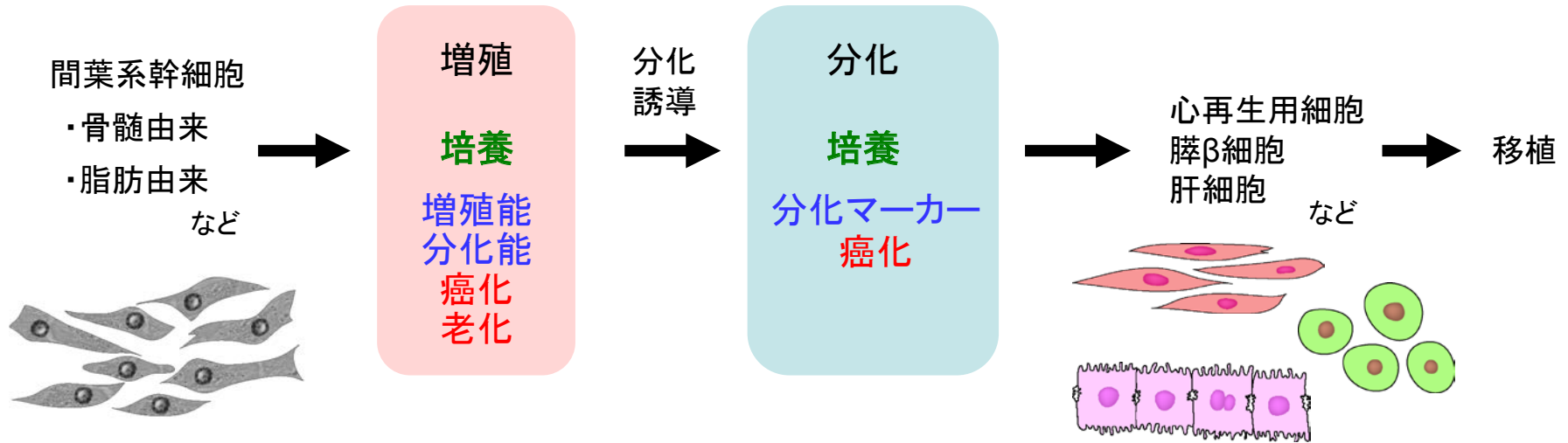
(J-TEC HPより)





# 再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の 安全性評価法の確立を目指して

幹細胞の増殖培養過程における安全性の担保 (in vitro 培養前後における品質変化のcheck)



体性幹細胞は、培養中に自然にがん化するのか？



Spontaneous human adult stem cell transformation.

Cancer Res. 2005 Apr 15;65(8):3035-9.

Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A.

⇒ **Retraction:** Spontaneous human adult stem cell transformation.

Cancer Res. 2010 Aug 15;70(16):6682.

de la Fuente R, Bernad A, Garcia-Castro J, Martin MC, Cigudosa JC.

Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation.

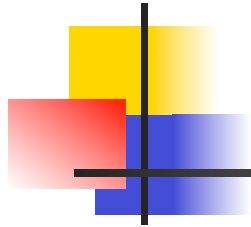
Cancer Res. 2009 Jul 1;69(13):5331-9.

Røslund GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwicz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lønning PE, Bjerkvig R, Schichor C.

⇒ Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects **cross-contamination**: putting the research field on track - letter.

Cancer Res. 2010 Aug 1;70(15):6393-6.

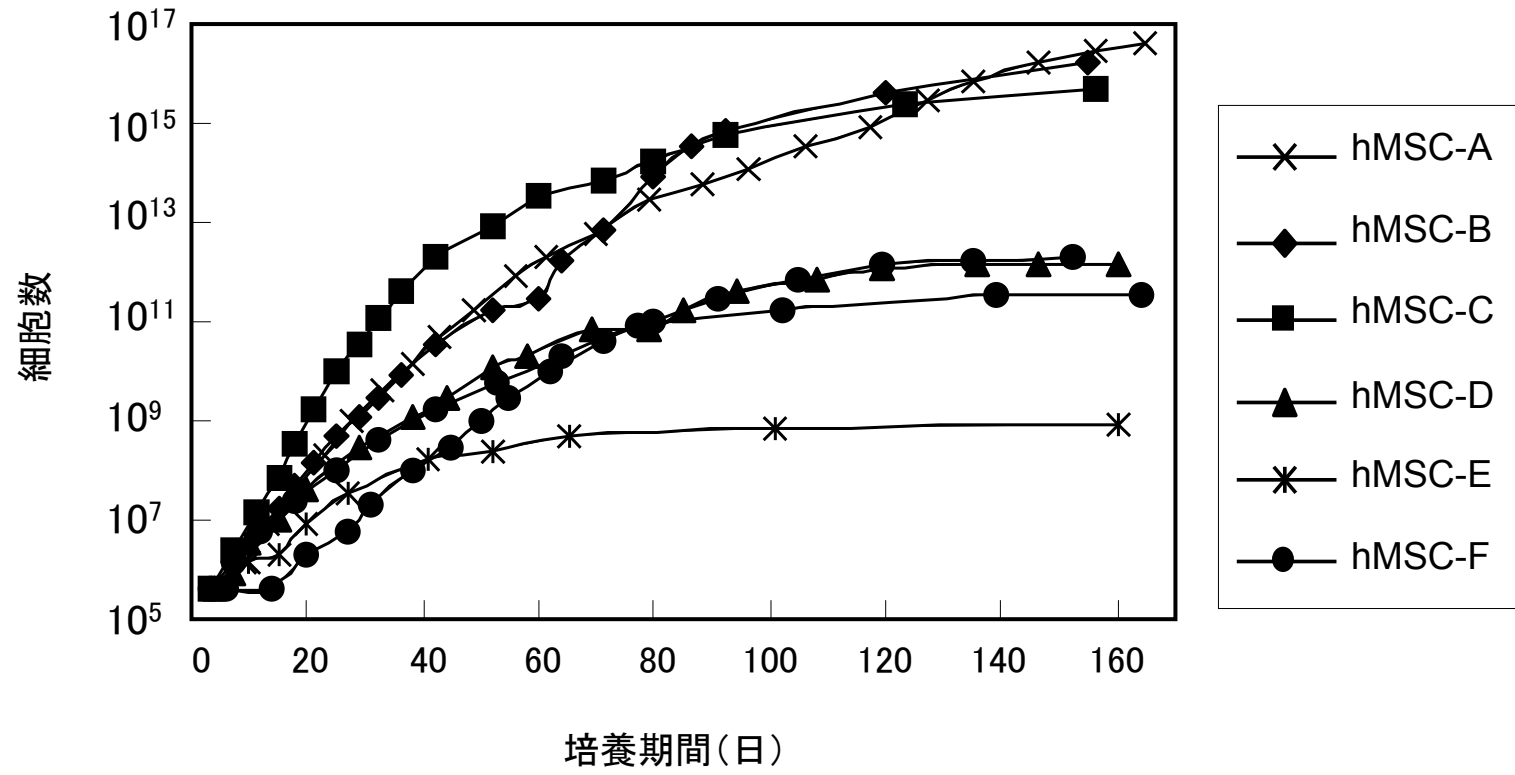
Torsvik A, Røslund GV, Svendsen A, Molven A, Immervoll H, McCormack E, Lønning PE, Primon M, Sobala E, Tonn JC, Goldbrunner R, Schichor C, Mysliwicz J, Lah TT, Motaln H, Knappskog S, Bjerkvig R.



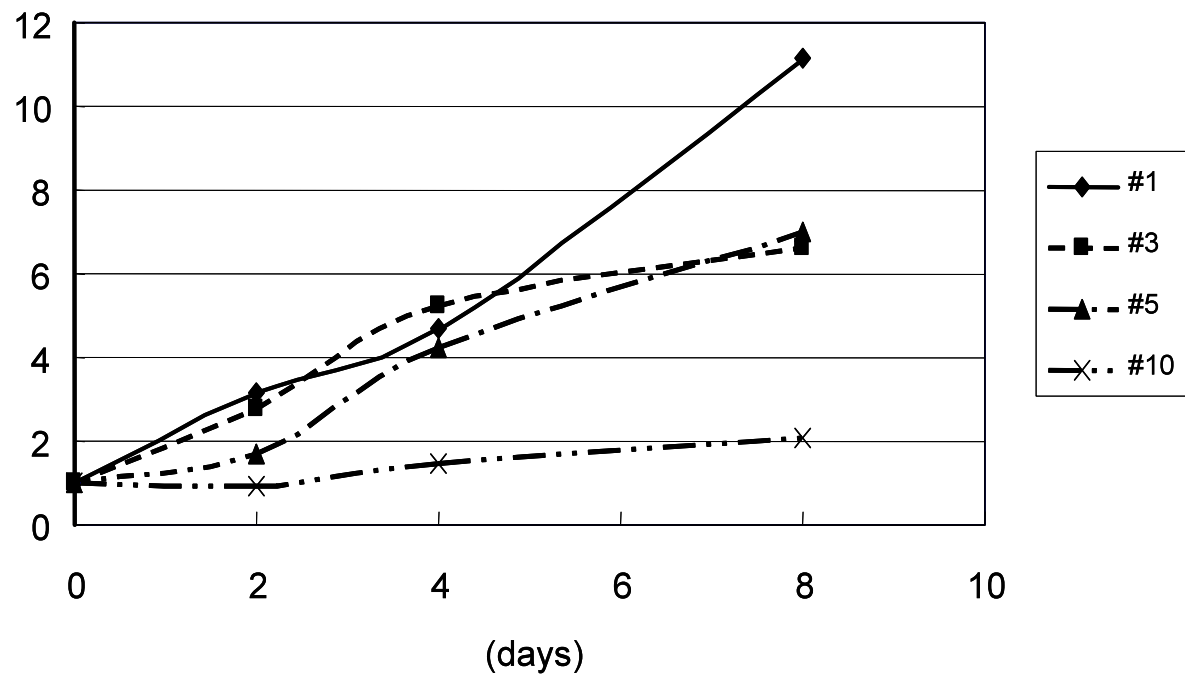
## 1. *in vitro*培養期間中の間葉系幹細胞の変化について



hMSCの増殖曲線

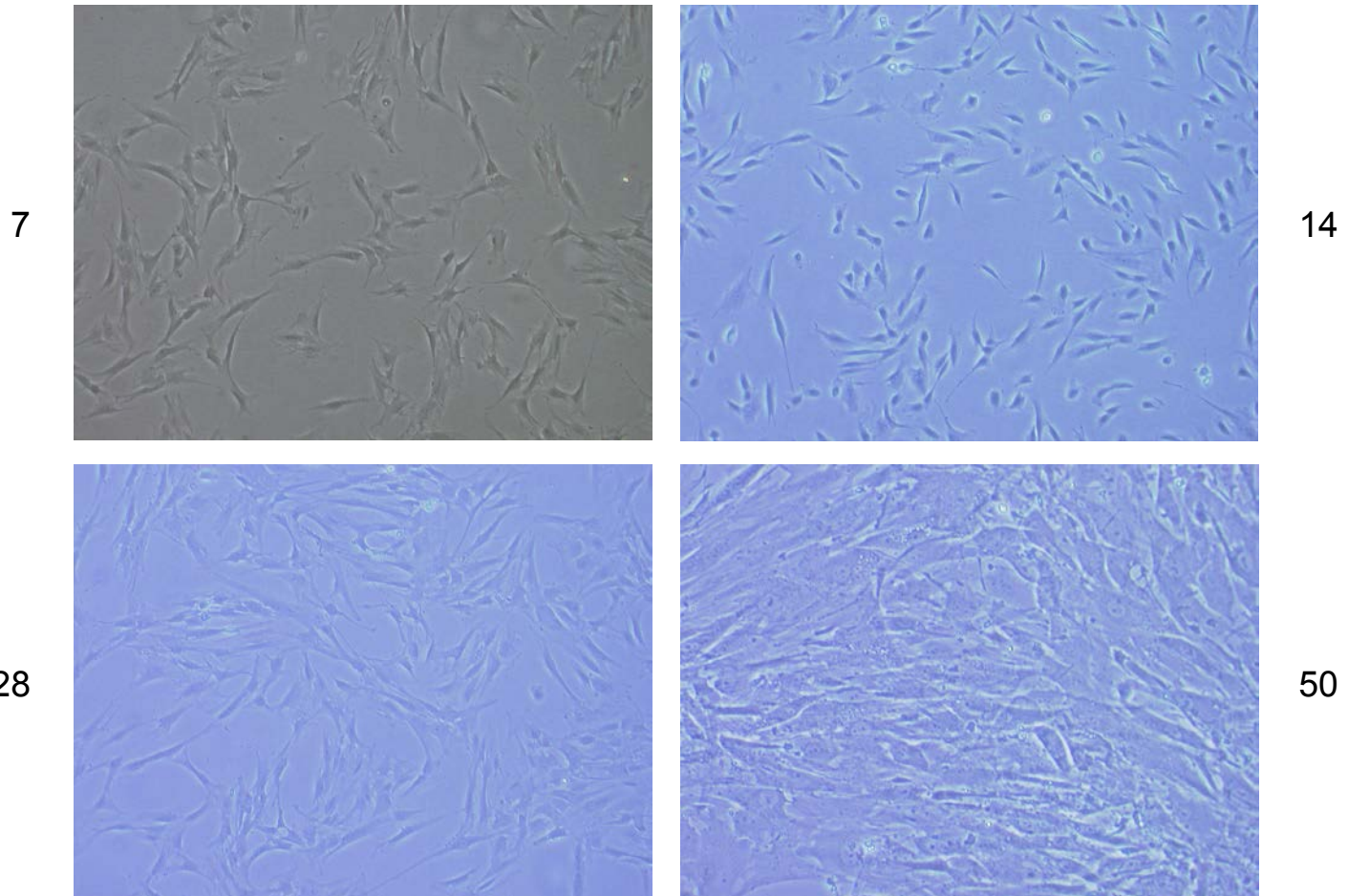


## hMSCの継代数の違いによる増殖の比較



継代数1, 3, 5, 10(#1, #3, #5, #10)のhMSCを用いてそれぞれ8日間培養し、増殖を比較した。

# hMSCの増殖培養期間中の細胞形態の変化



7

14

28

50

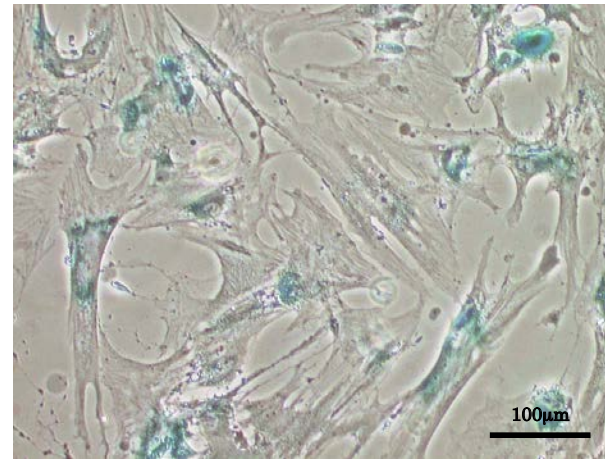
培養期間(日)

## hMSCの細胞老化について(SA- $\beta$ -Gal Staining)

#1 hMSC

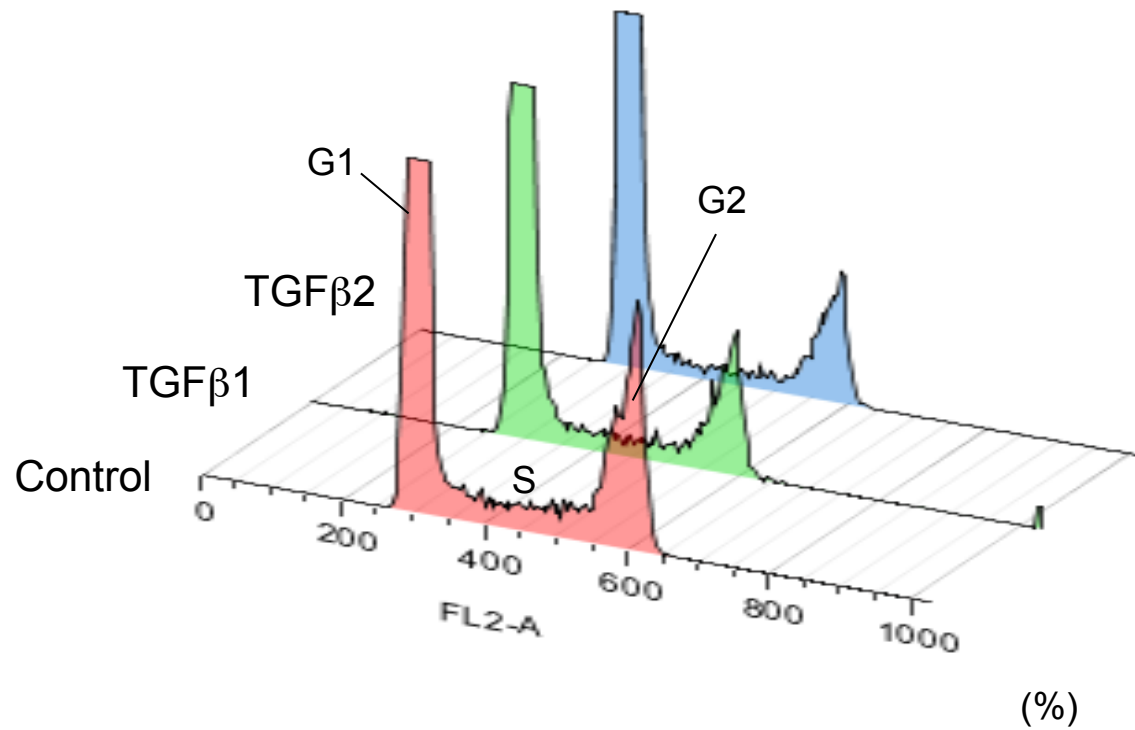


#13 hMSC



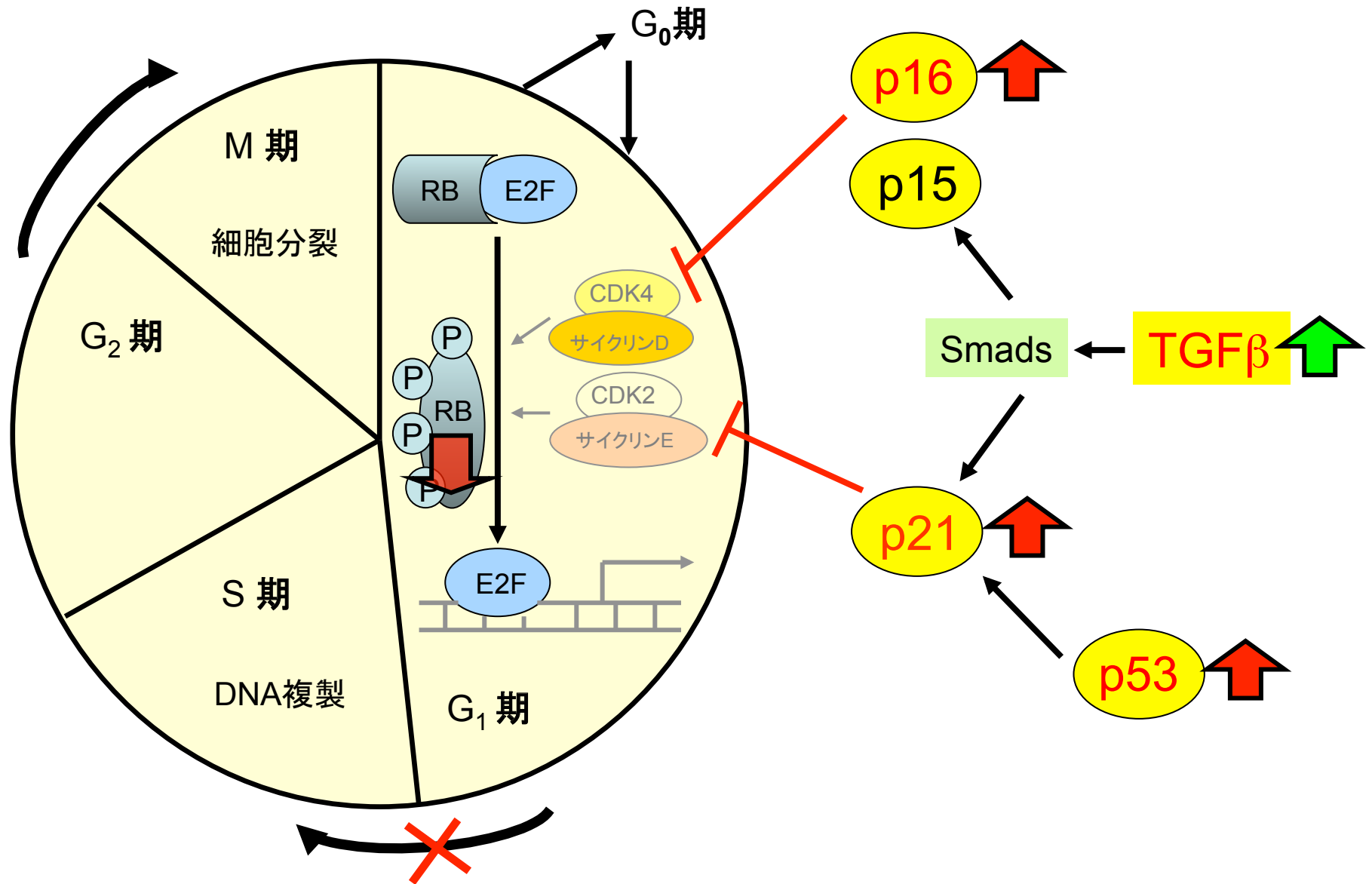
継代数1と13(#1と#13)のhMSCを比較した。

### hMSCの細胞周期に及ぼすTGFβの影響

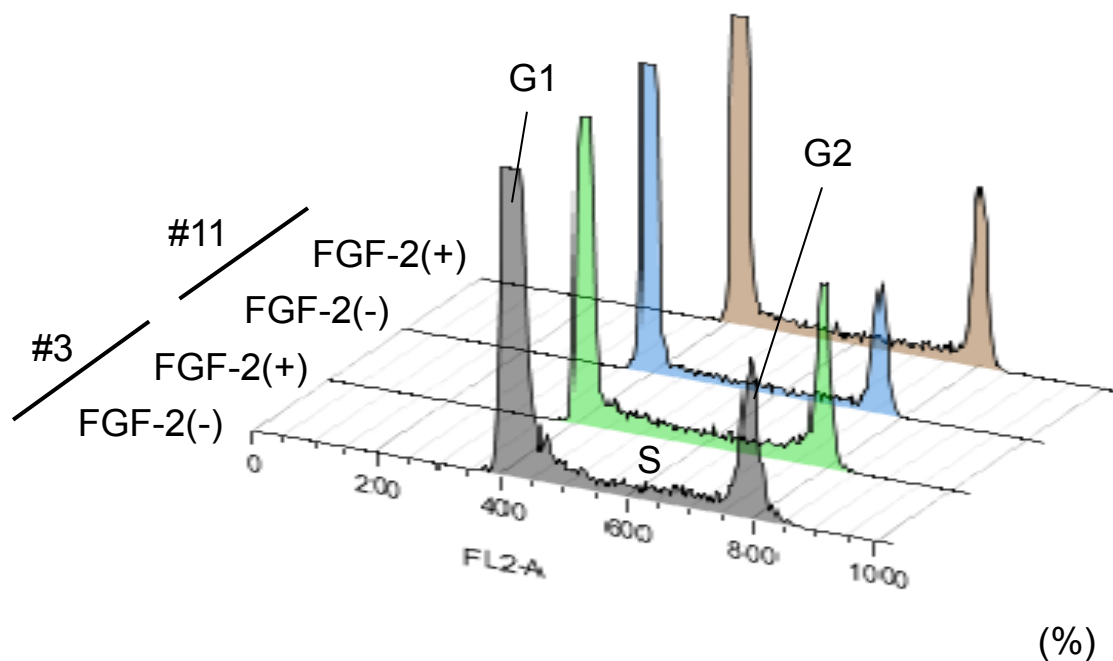


	G1	S	G2
Control	75.71	16.58	12.55
TGFβ1	92.72	9.47	6.61
TGFβ2	89.96	8.89	5.13

TGFβ または *in vitro* 培養によるhMSCの細胞周期制御因子の遺伝子発現の変化と細胞周期への影響

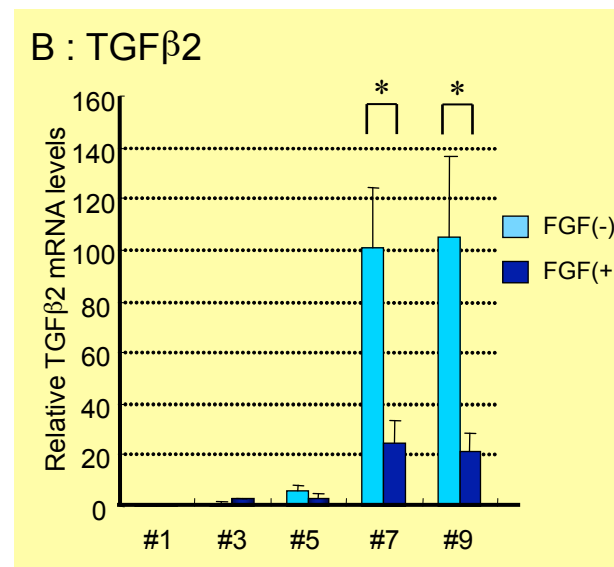
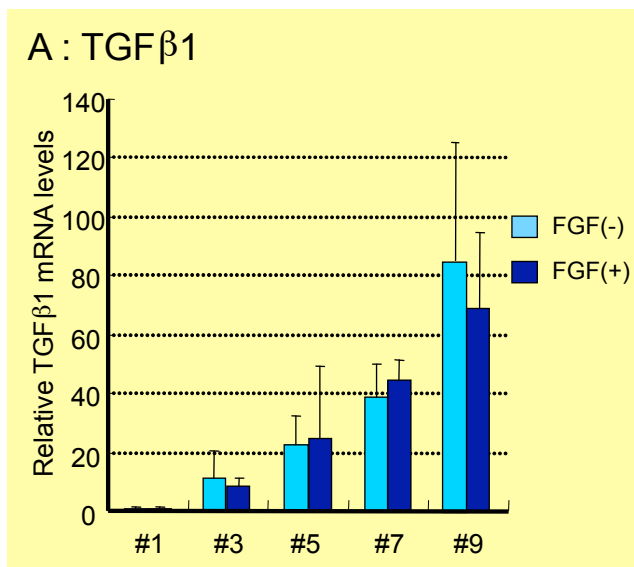


### hMSCの細胞周期に及ぼす*in vitro*培養期間とFGF-2の影響



		G1	S	G2
#3	FGF-2(-)	74.05	13.95	9.16
	FGF-2(+)	72.56	16.58	9.83
#11	FGF-2(-)	82.42	10.79	5.73
	FGF-2(+)	76.60	14.06	8.48

hMSCの*in vitro*培養によるTGFβ1(A)とTGFβ2(B)の遺伝子発現レベルの変化とFGF-2の影響



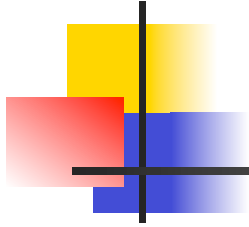
\*p<0.05

hMSCの培地にFGF-2を1ng/mL添加したものと無添加のものそれぞれの継代数1, 3, 5, 7, 9 (#1, #3, #5, #7, #9)のhMSCを用いて比較した。



## *in vitro*培養期間中の間葉系幹細胞の変化について

- ・ hMSCは通常はがん細胞のように無限増殖能を有するわけではなく、*in vitro*で培養し続けるとその増殖能力は低下し老化を伴う変化が生じる
- ・ hMSCを*in vitro*での培養を続ける事によって、TGFβシグナル伝達系、p16などの細胞周期制御因子の遺伝子発現の変化(上昇)を伴って細胞周期が停止する方向へ変化する
- ・ FGF-2が*in vitro*培養時にhMSCのTGFβ2などの細胞周期制御因子の発現を抑える事によりTGFβシグナル伝達系を介した細胞周期や細胞老化を制御している可能性



## 2. *in vitro* 培養期間中の間葉系幹細胞の品質評価について

1) *in vitro* 培養中の遺伝子発現の変化

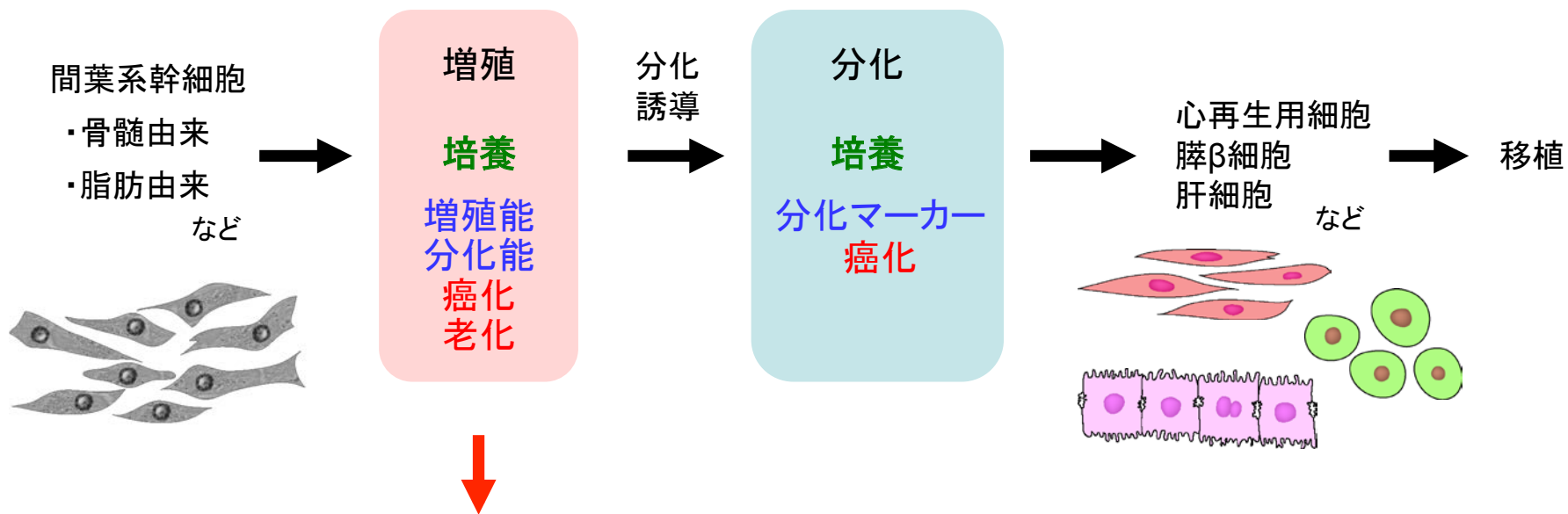
2) FISH による染色体異常解析

3) 様々な培養条件が細胞に与える影響

- ① 培養液として間葉系幹細胞の増殖培養用に開発された無血清培地について
- ② 培養中の酸素濃度について
- ③ 凍結保存

# 1) *in vitro* 培養中の遺伝子発現の変化

幹細胞の増殖培養過程における安全性の担保 (*in vitro* 培養前後における品質変化のcheck)



培養前後での遺伝子発現などを比較検討 → DNA Array → マーカー決定 → 最終的に遺伝子(発現)レベルでcheckできる系の確立

幹細胞(hMSC)と腫瘍細胞(HepG2, HeLaS3, HOS, OUMS-27)との  
遺伝子発現の比較

ヒト間葉系幹細胞 : hMSC

V.S.

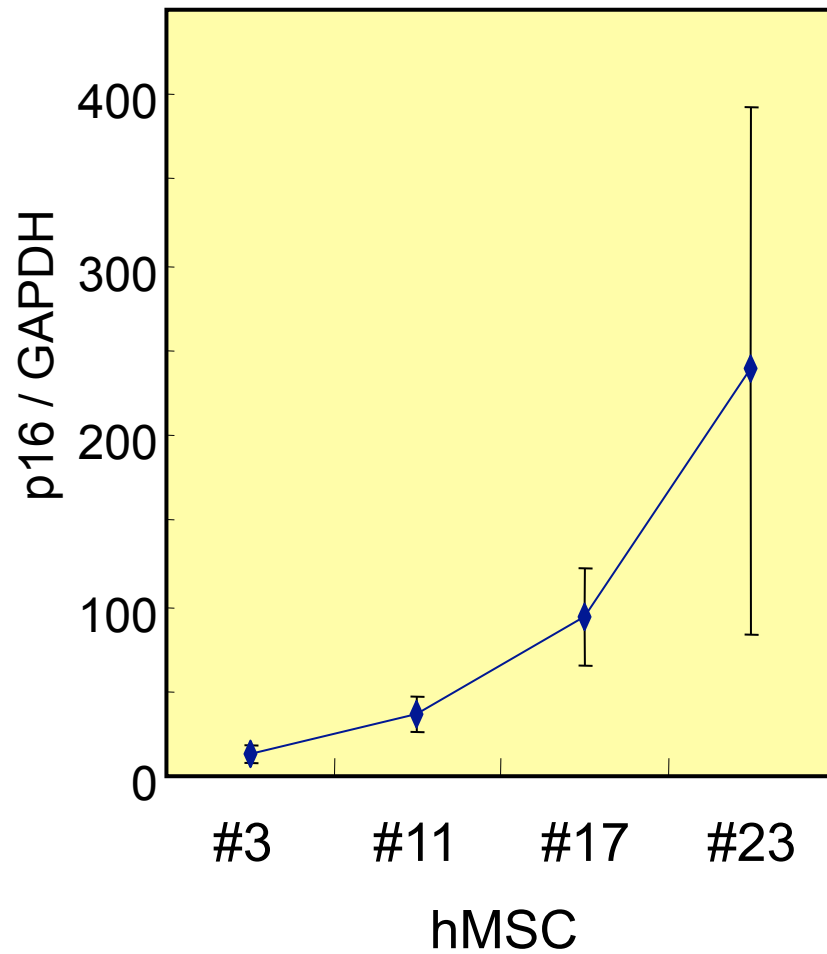
ヒト肝臓癌由来細胞 : HepG2

ヒト子宮頸癌由来細胞 : HeLaS3

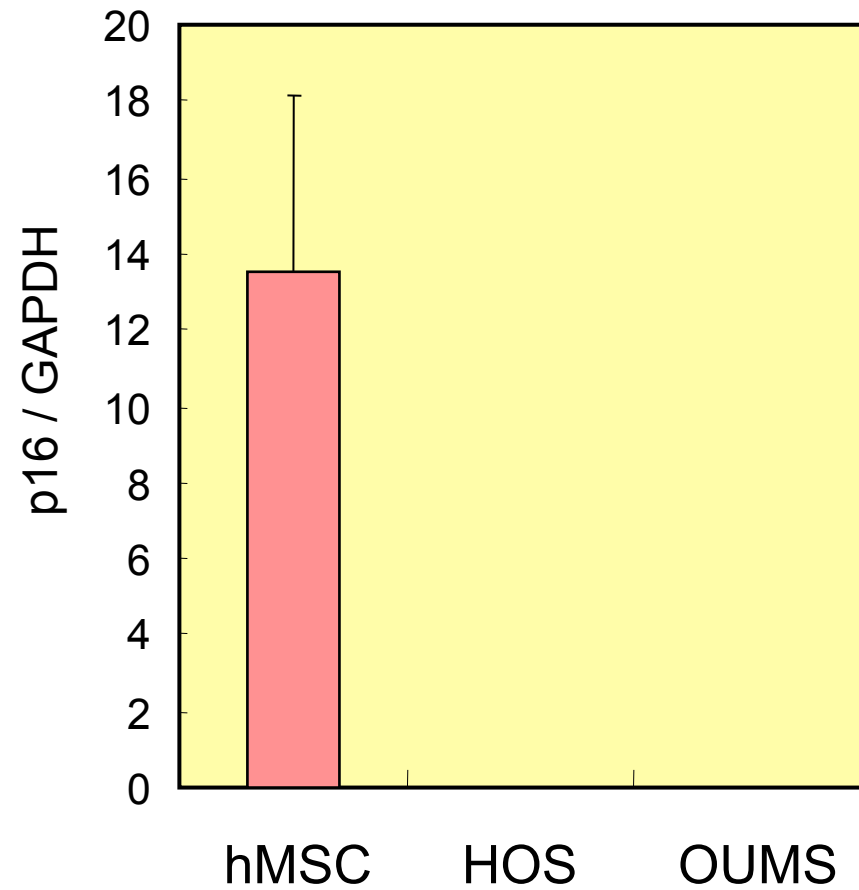
ヒト骨肉腫細胞 : HOS

ヒト軟骨肉腫細胞 : OUMS-27

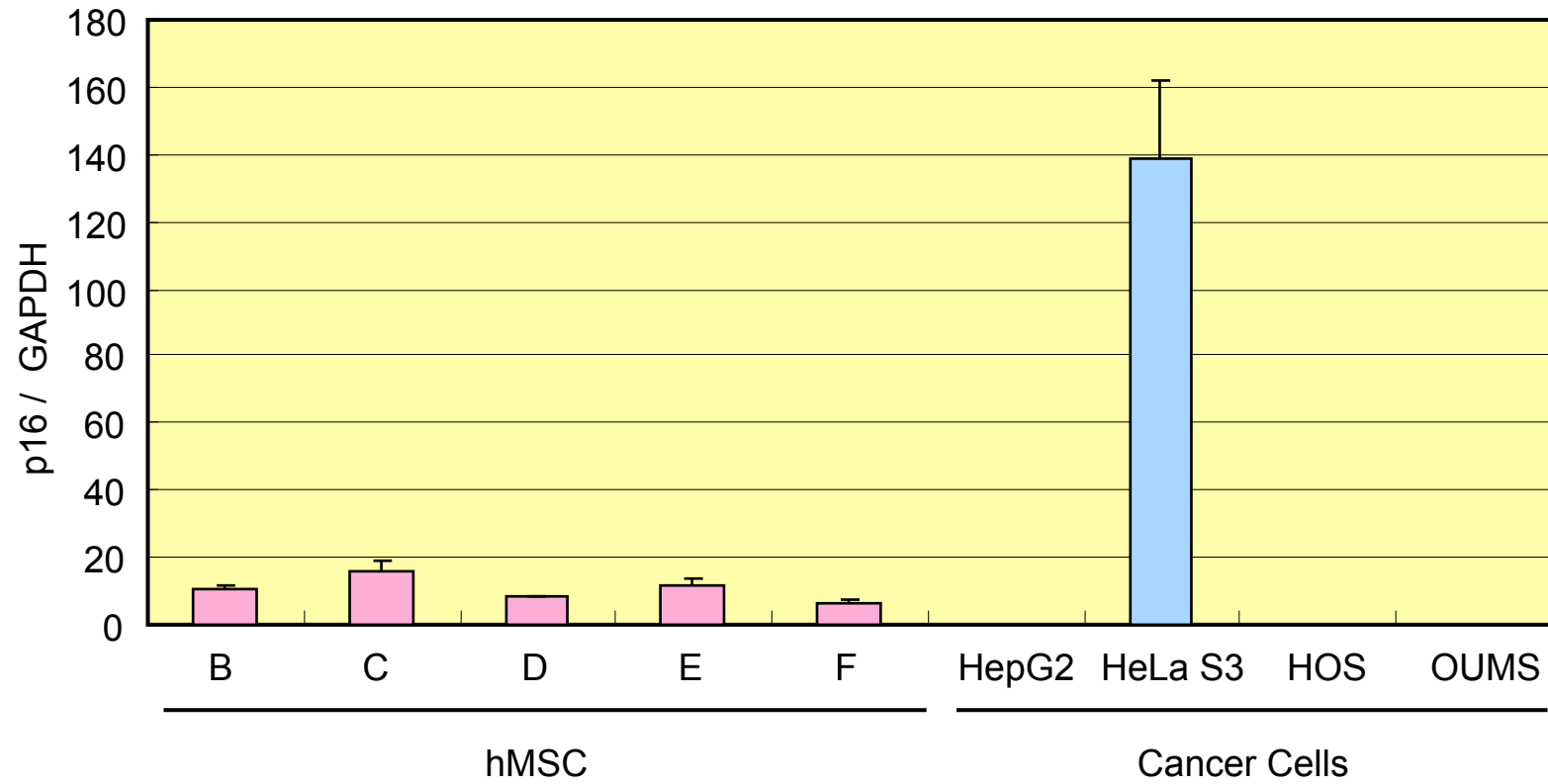
Effect of *in vitro* culture length on the mRNA expressions of p16 in hMSC



The mRNA expressions of p16 in hMSC, HOS, and OUMS-27



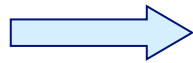
The mRNA expression of p16 in hMSCs and Cancer cells



Shibata KR, Aoyama T, Shima Y, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Kohno Y, Ito K, Fujibayashi S, Neo M, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J.

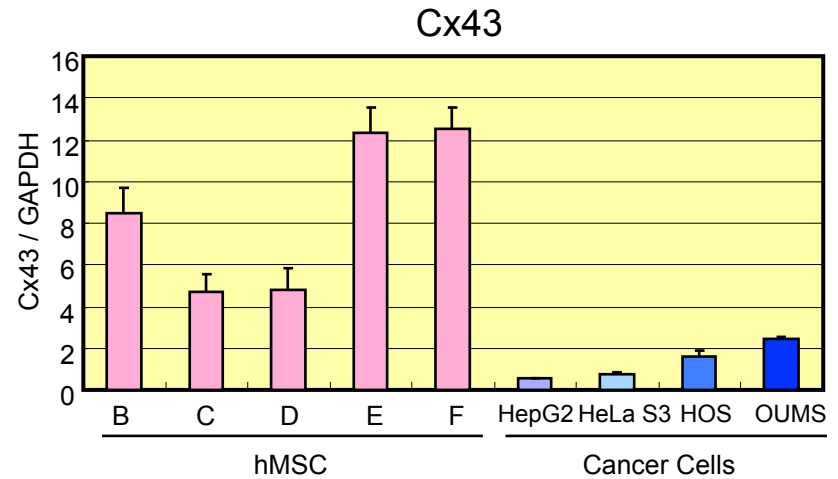
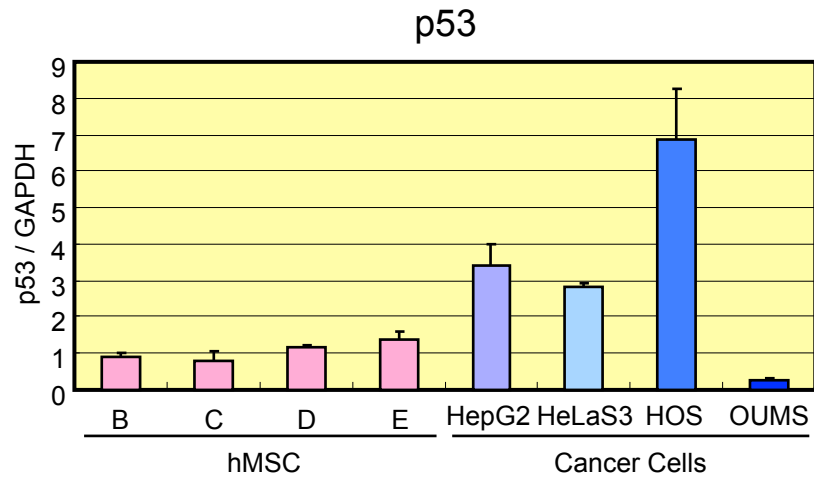
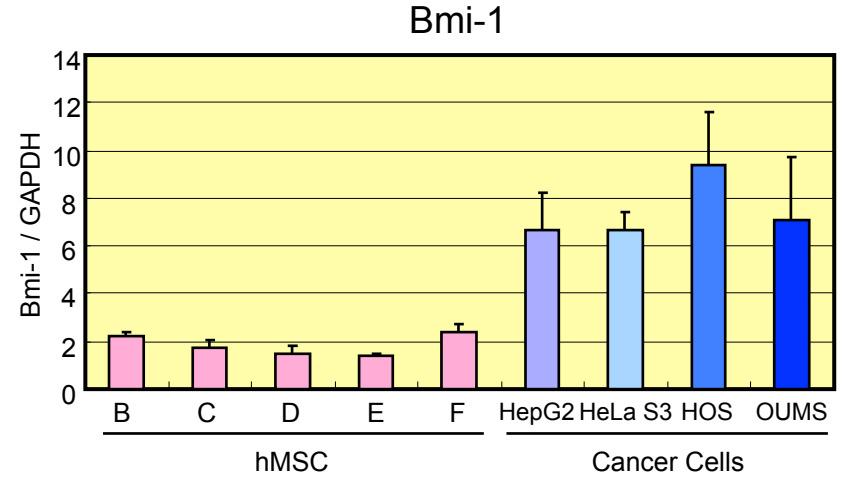
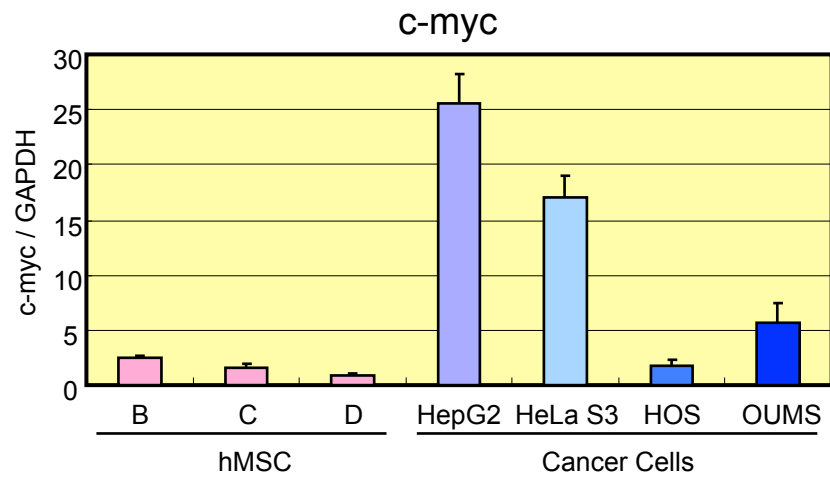
Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells and is potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion.

Stem Cells. 2007 Sep;25(9):2371-82.



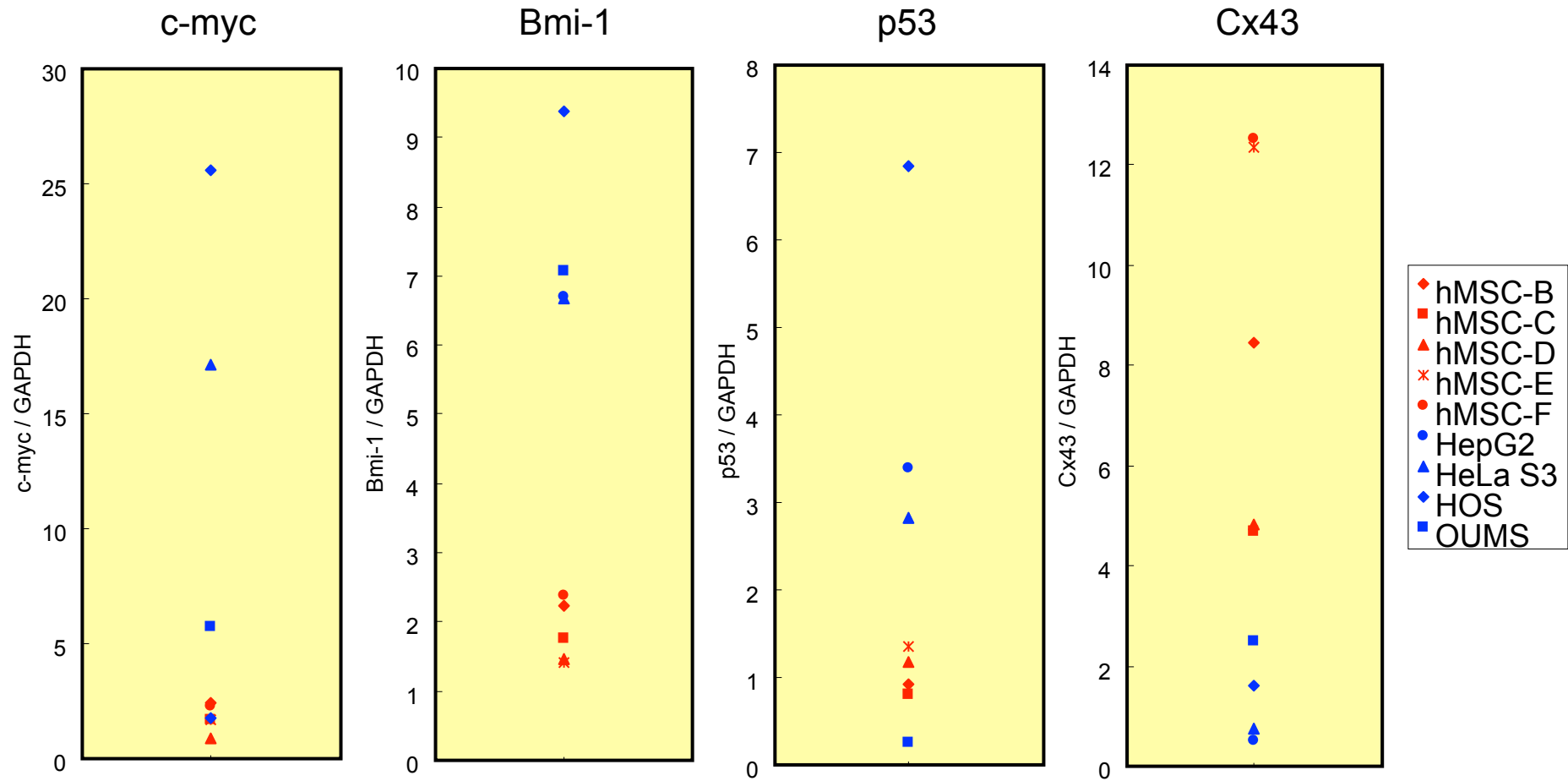
- ・ p16遺伝子の発現レベルは、hMSCの老化と大きく関わる
- ・ p16遺伝子のプロモーター領域のメチル化によって、機能(発現増加による細胞老化)が制御される

The mRNA expressions of c-myc, Bmi-1, p53 and Cx43 in hMSCs and cancer cells





The mRNA expressions of c-myc, Bmi-1, p53 and Cx43 in hMSCs and cancer cells



## hMSCの *in vitro* 培養期間による遺伝子発現の変化 —ドナー間での共通性—

複数のドナー(n=4 ; hMSC-A~D)由来のhMSCを用いて、*in vitro* 培養期間中のmRNA発現の変化についてDNAマイクロアレイを用いて網羅的に比較し、全てのhMSCで *in vitro* 培養期間中に発現に変化のなかった遺伝子を抽出した。培養期間としては、実際に細胞組織加工医療機器の材料として間葉系幹細胞を用いる場合を想定し、妥当な期間内(～50日)で検討した。

培養期間            3, 20, 50days

DNAマイクロアレイ解析

Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Human Genome U133 Plus 2.0 Array

Technical duplicate

mRNA 発現量の定量的解析 (n=5 ; hMSC-B~F)

Real time (RT) -PCR Roche Light Cycler (version 4.0)

## Donor information of hMSCs

---

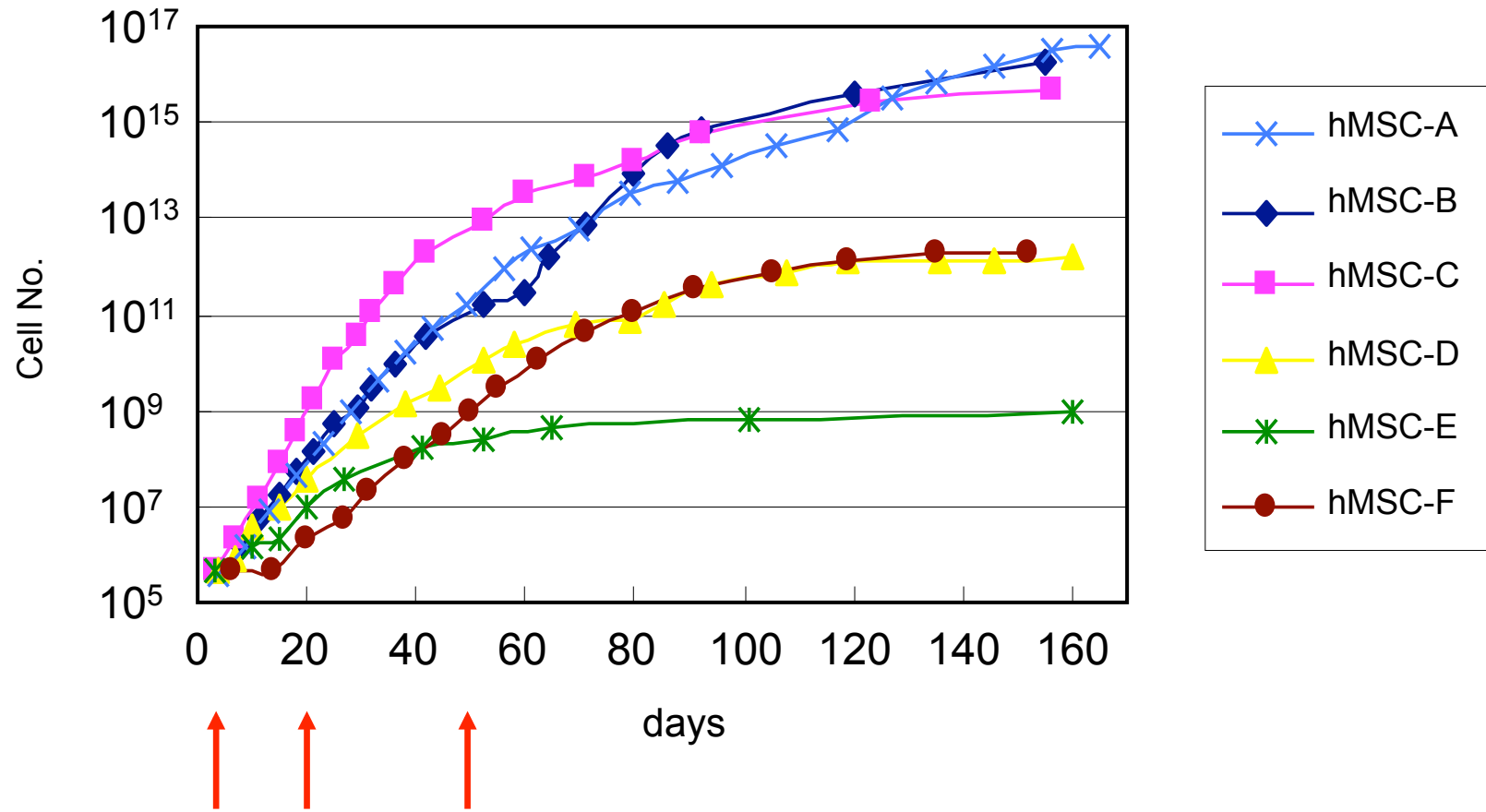
	Lot No.	Age	Race	Sex
hMSC-A	3F0664	19Y	African American	F
hMSC-B	4F1560	23Y	African American	F
hMSC-C	5F0138	19Y	African American	M
hMSC-D	5F0972	20Y	African American	M
hMSC-E	4F0218	21Y	Other*	M
hMSC-F	4F0312	27Y	African American	F

---

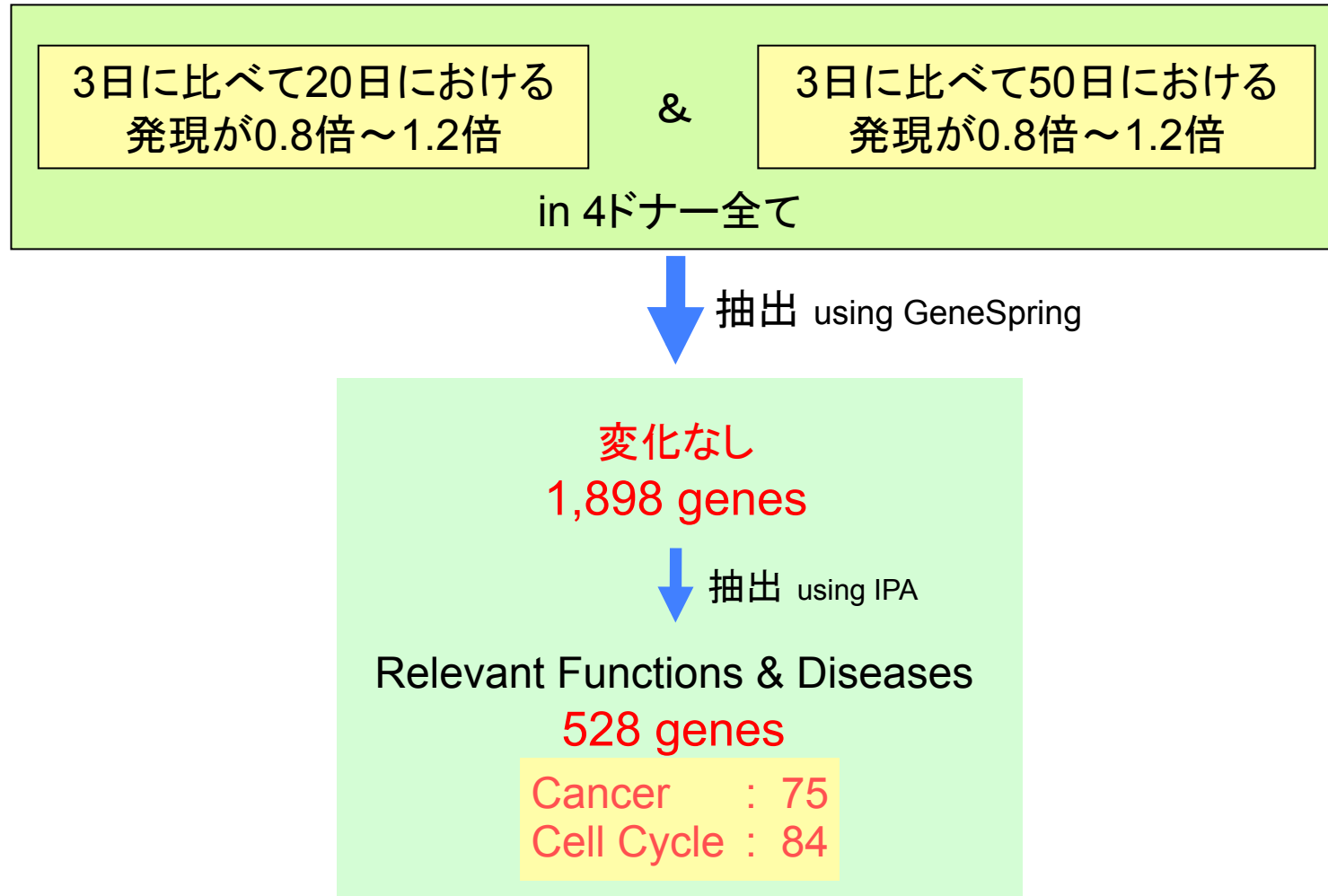
Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.

\*Except for Asian/Oriental, Caucasian, African American, Hispanic and American Indian

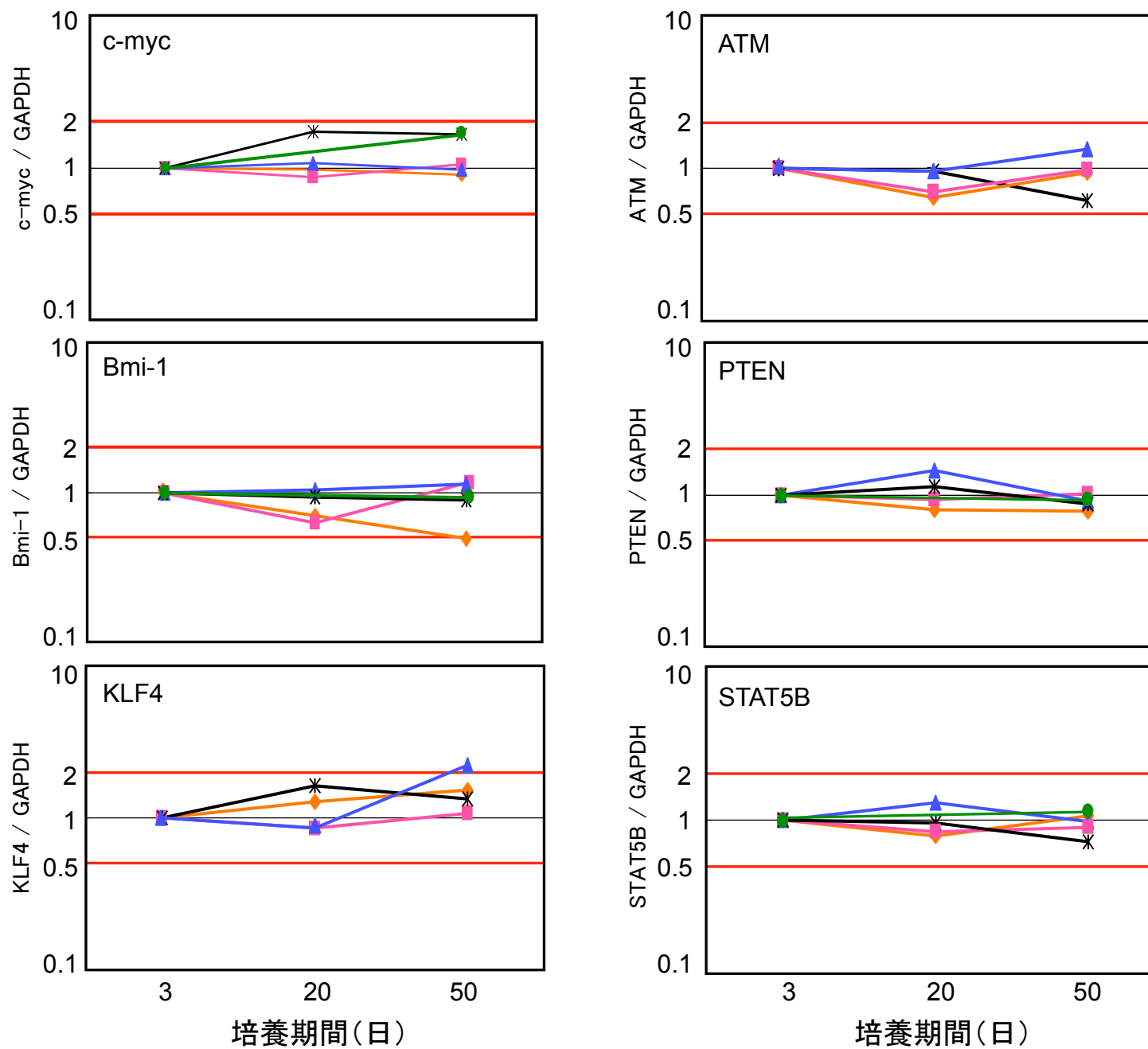
hMSCの増殖曲線



hMSCの培養期間(~50日)による発現レベルに変化のない遺伝子— 4ドナー間で共通—の抽出法

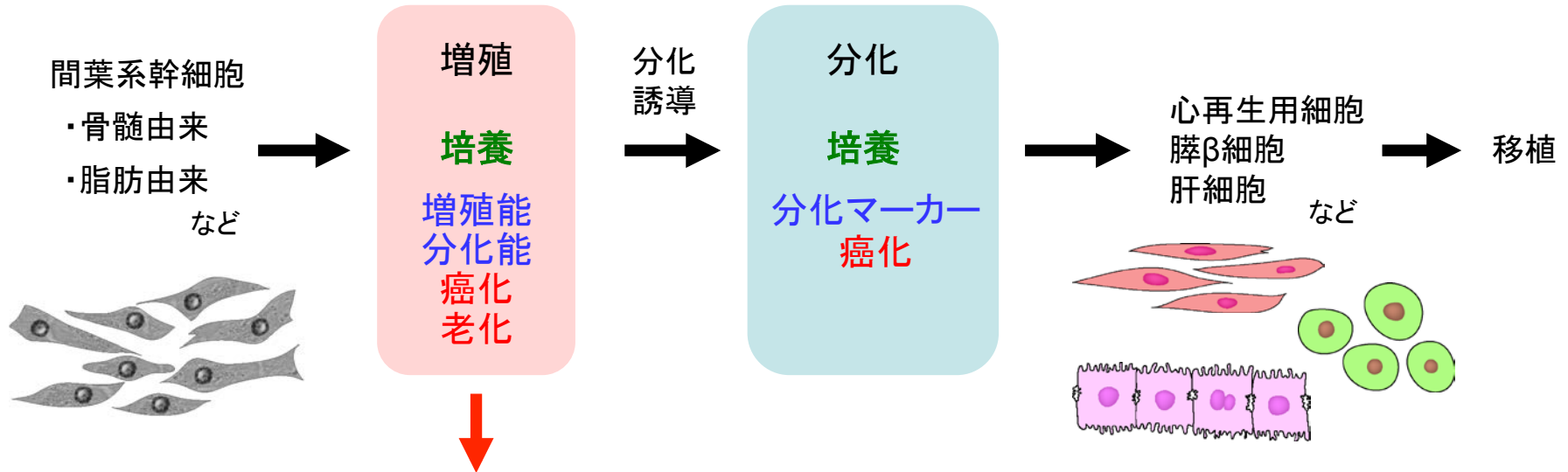


hMSCのin vitro培養中におけるc-myc, Bmi-1, KLF4, ATM, PTEN, STAT5Bの遺伝子発現の変化



# 1) *in vitro* 培養中の遺伝子発現の変化

幹細胞の増殖培養過程における安全性の担保 (*in vitro* 培養前後における品質変化のcheck)



例えば...  
c-myc, Bmi-1  
KLF4, ATM  
PTEN, STAT5B

幹細胞の自己複製制御や  
発癌制御に関する遺伝子

## 2) FISH による染色体異常解析

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) の *in vitro* での培養期間中における細胞の変化について検討する手段として遺伝子発現レベルと染色体レベルでの異常解析とを同じ遺伝子座 *c-myc* で同時に行った

### 方法

#### 1. 細胞

- ヒト間葉系幹細胞 : 5ドナー由来の **hMSC** (Lonza Walkersville, Inc.)
- ヒト子宮頸癌由来細胞 : **HeLa S3** (JCRB Cell Bank)
- ヒト骨肉腫細胞 : **HOS** (大日本住友製薬(株))
- ヒト軟骨肉腫細胞 : **OUMS-27** (JCRB Cell Bank)

#### 2. Real time RT-PCR による mRNA 発現量の定量的解析

各細胞から total RNA を抽出し、それぞれの細胞の *c-myc* の mRNA 発現レベルについて Real time RT-PCR 法にて検討した。定量的解析は、Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) を用いて Roche Light Cycler (version 4.0) で行った

#### 3. 染色体数計数と *c-myc* コピー数異常解析

##### 1) 染色体数計数

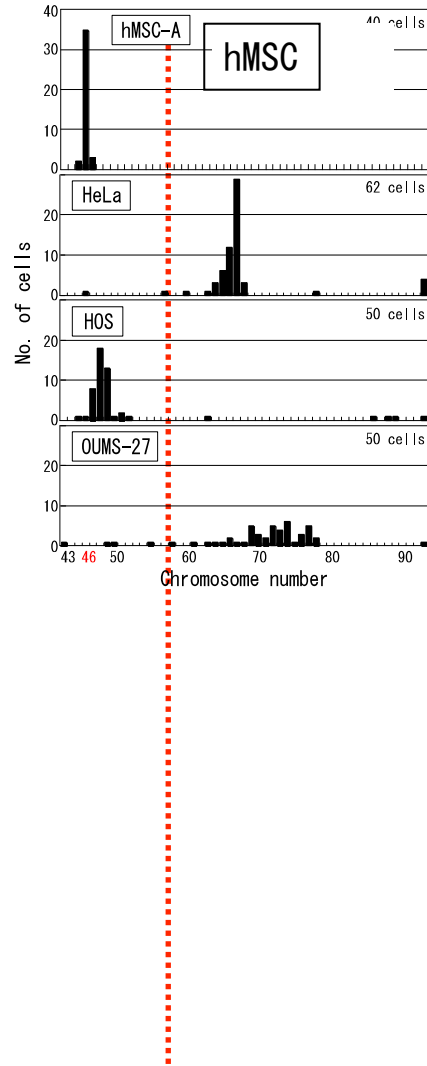
各細胞から染色体標本を作製し、ギムザ染色後、分裂中期像を撮影して染色体数を計数した

##### 2) *c-myc* コピー数異常解析

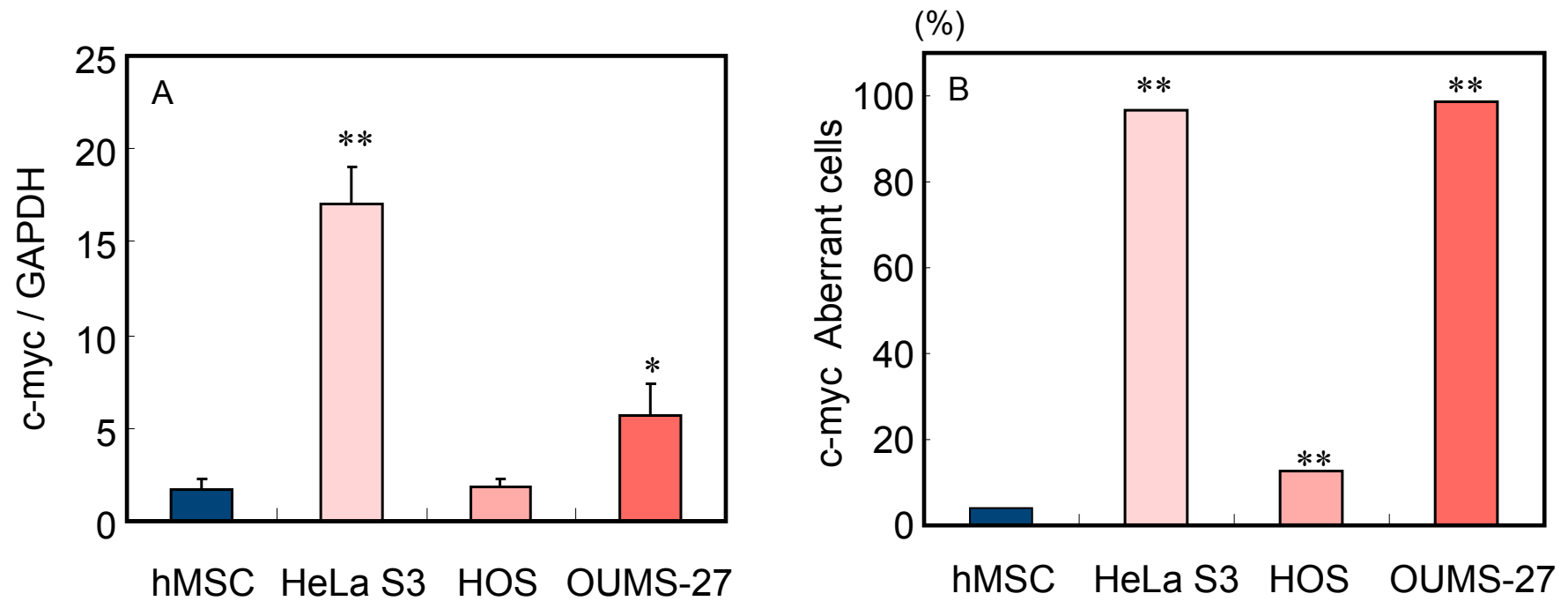
FISH (fluorescence in situ hybridization; 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション) 法にて *c-myc* の DNA プロブ (Spectrum Orange 標識, VYSIS) を用いて行った



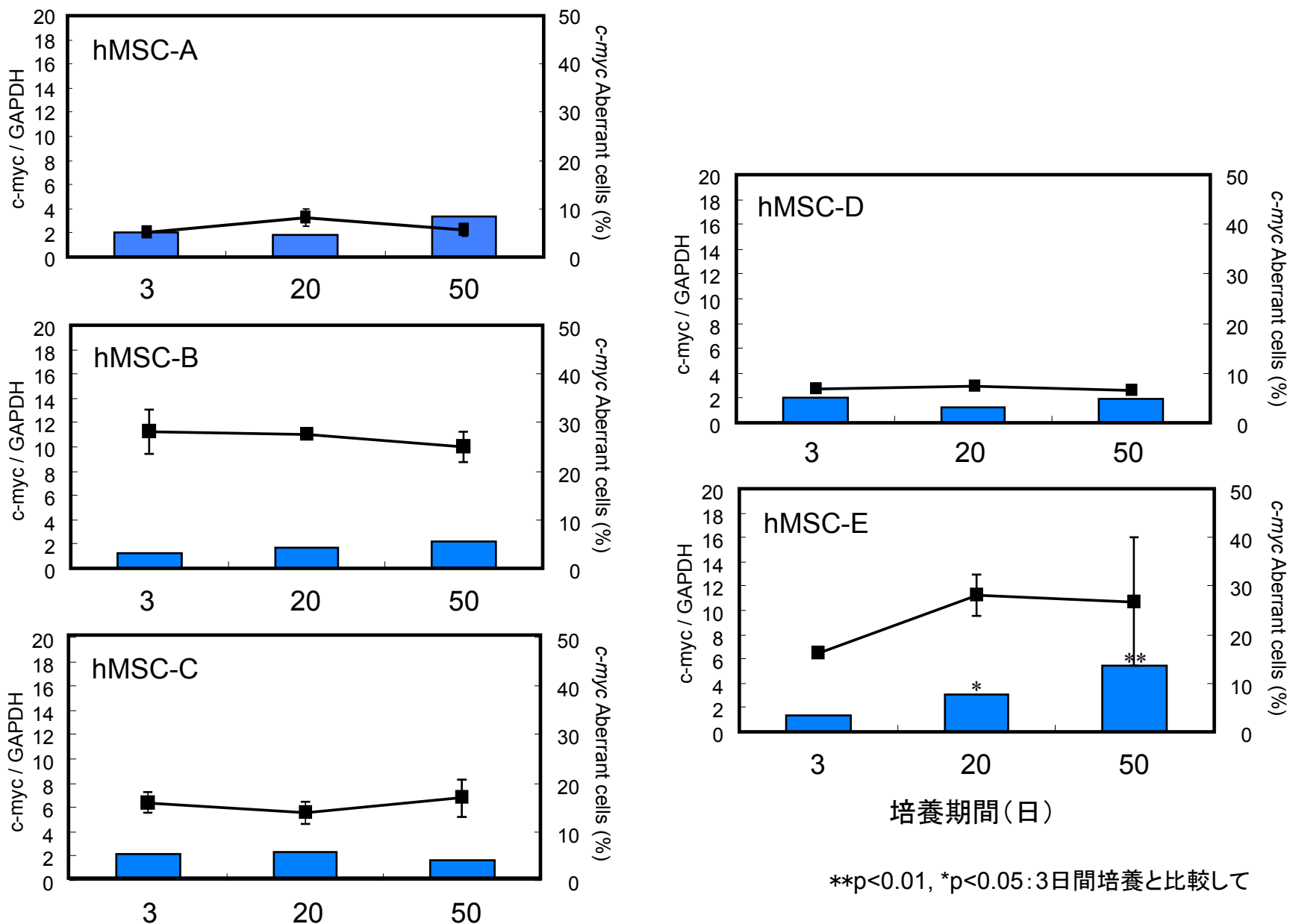
# Distribution of chromosome numbers in hMSC and cancer cells (HeLa S3, HOS, and OUMS-27)



*c-myc* gene expression (A) and chromosome aberrations at the *c-myc* locus (B) in hMSC and cancer cells (HeLa S3, HOS, and OUMS-27)



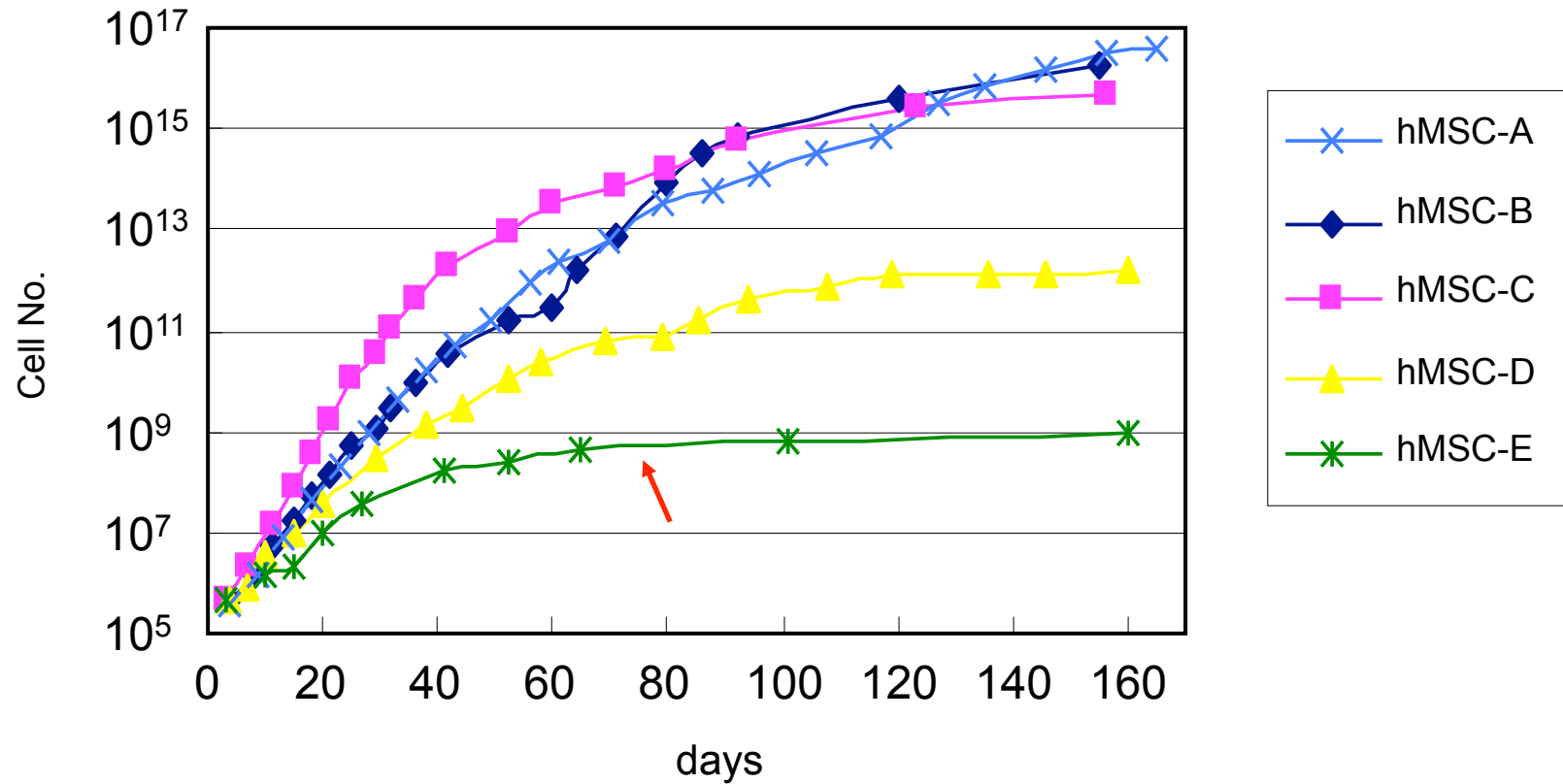
## hMSCの*in vitro*培養中におけるc-mycの遺伝子発現レベルと染色体レベルでの変化



\*\*p<0.01, \*p<0.05: 3日間培養と比較して

培養期間(日)

## hMSCの増殖曲線



- ・ FISH解析の併用の有用性
- ・ いくつかの方法による総合的な判断の必要性

### 3) 様々な培養条件が細胞に与える影響

#### ① 培養液として間葉系幹細胞の増殖培養用に開発された無血清培地について

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を、牛血清使用による病原性ウィルスやプリオンなどの混入の危険性を排除し間葉系幹細胞用に開発された無血清培地を用いて培養し、培養期間中の細胞の遺伝子発現レベルの変化に与える影響について検討した。

## 方法

細胞 ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) Lonza

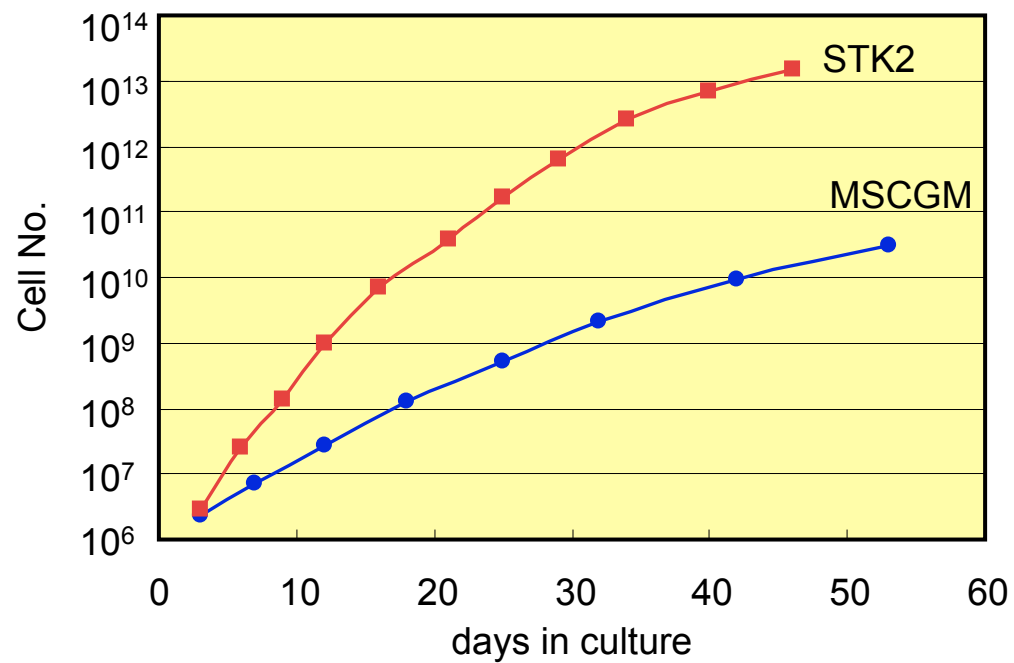
培地

- ・ **MSCGM** (mesenchymal stem cells growth medium) Lonza 含10% **FBS**
- ・ **STK2** (間葉系幹細胞用**無血清**培地) DSファーマバイオメディカル  
DMEM : MCDB201 = 1 :1 のmixture + supplement (FGF, PDGFなど)

培養期間 実際に細胞組織医療機器の材料として間葉系幹細胞を用いる場合を想定し**50日**以内  
培養3, 20, 50日でサンプリングし、subconfluent になった時点で total RNA 抽出

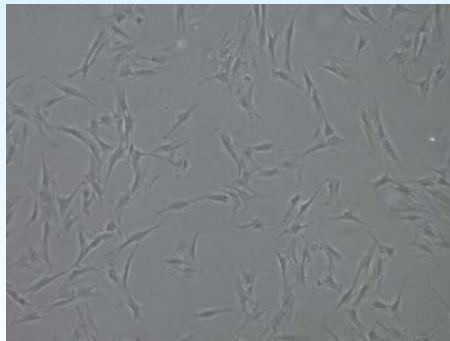
DNAマイクロアレイ解析 Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array  
12 arrays (6 samples x duplicate technical replicates)

hMSCの増殖能— MSCGMとSTK2との比較 —

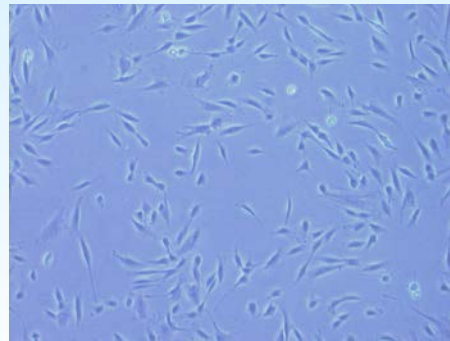


hMSCにおける *in vitro* 培養50日以内の細胞形態の変化について  
— MSCGM(10%FBS含培地)とSTK2(無血清培地)との比較 —

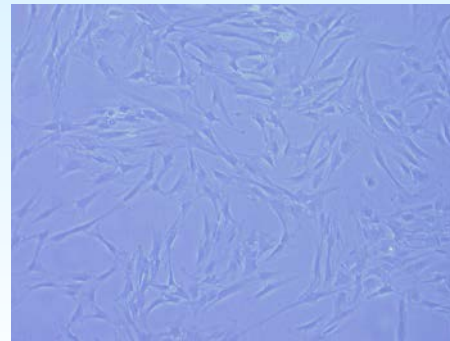
MSCGM



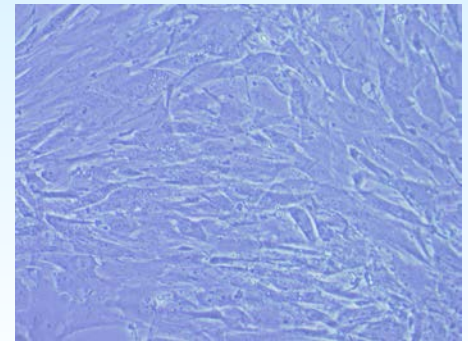
7d



14d

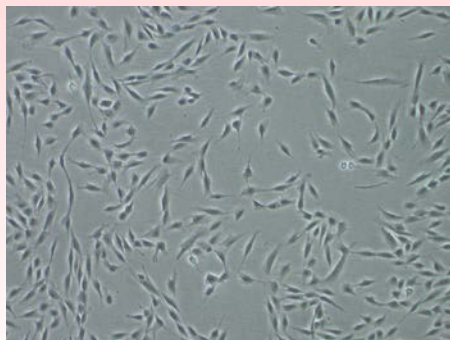


28d

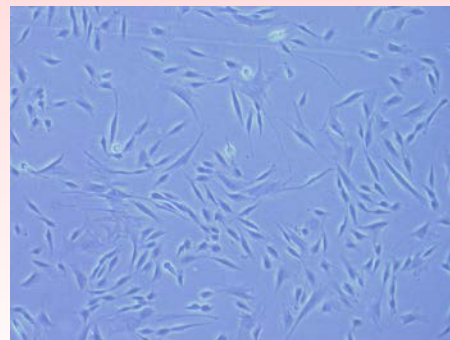


50d

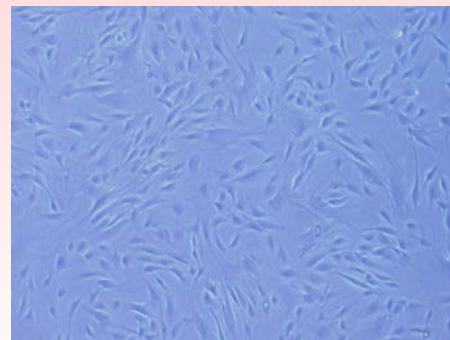
STK2



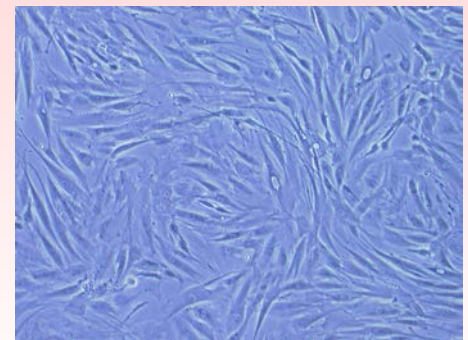
7d



14d



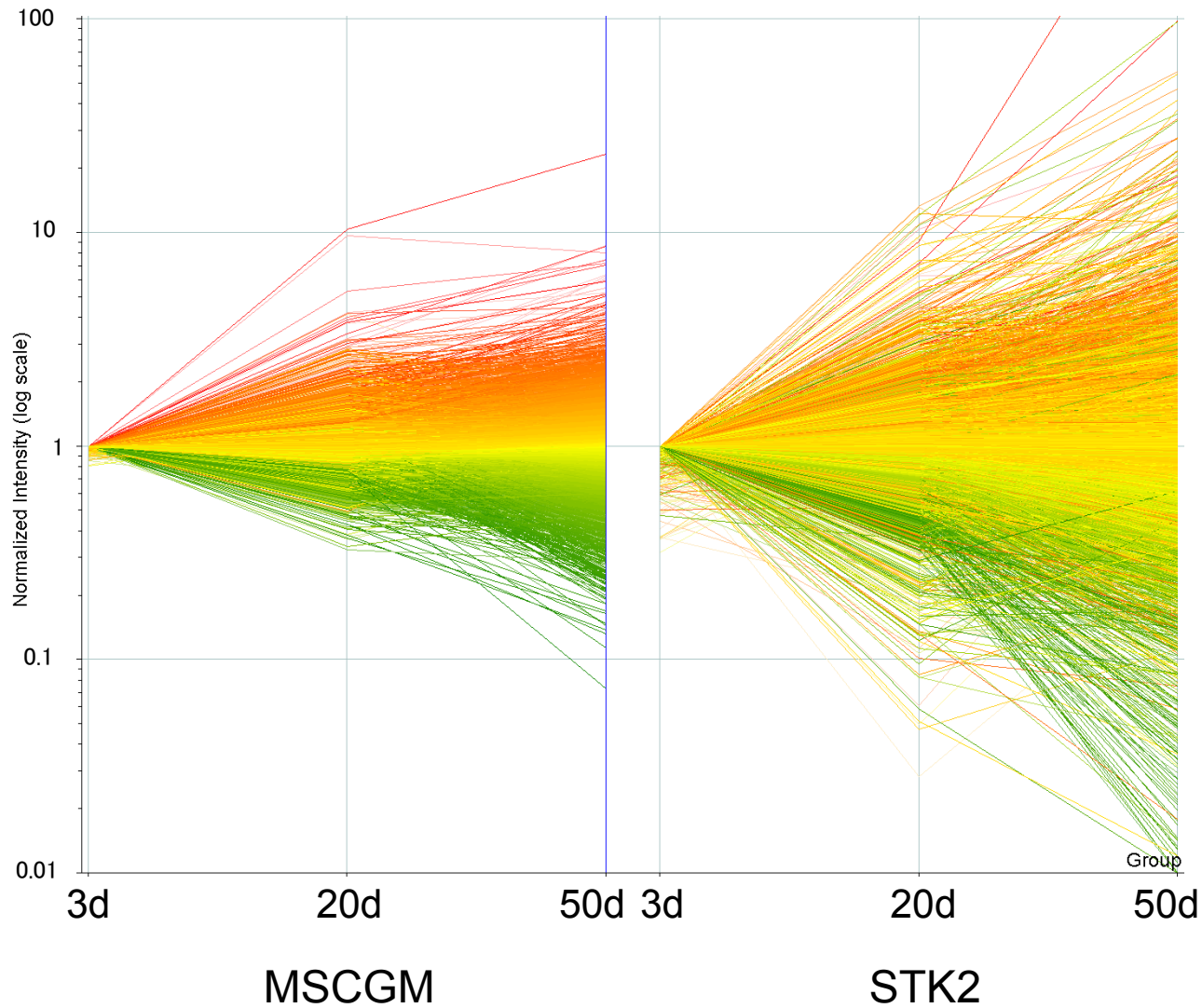
28d

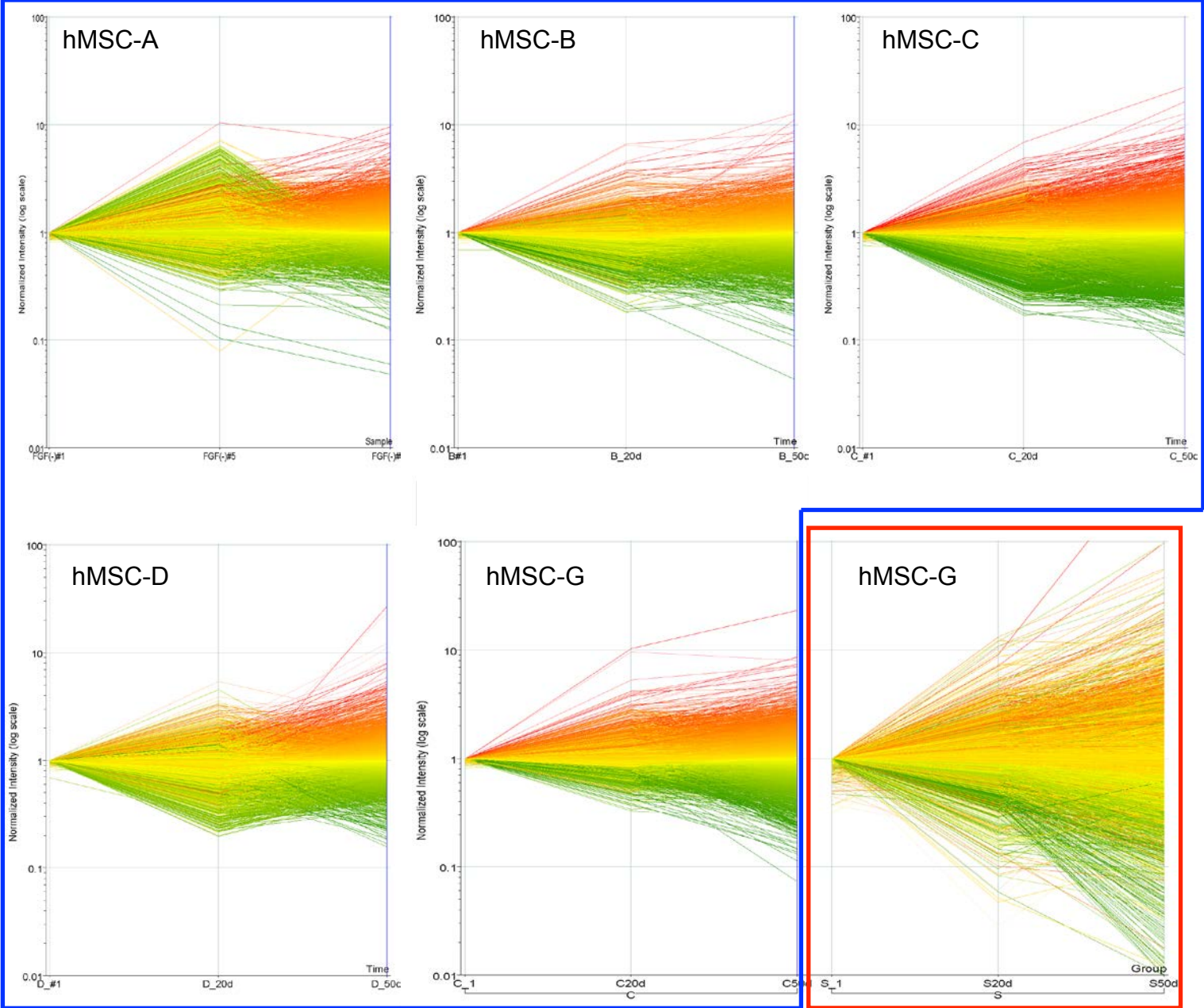


50d



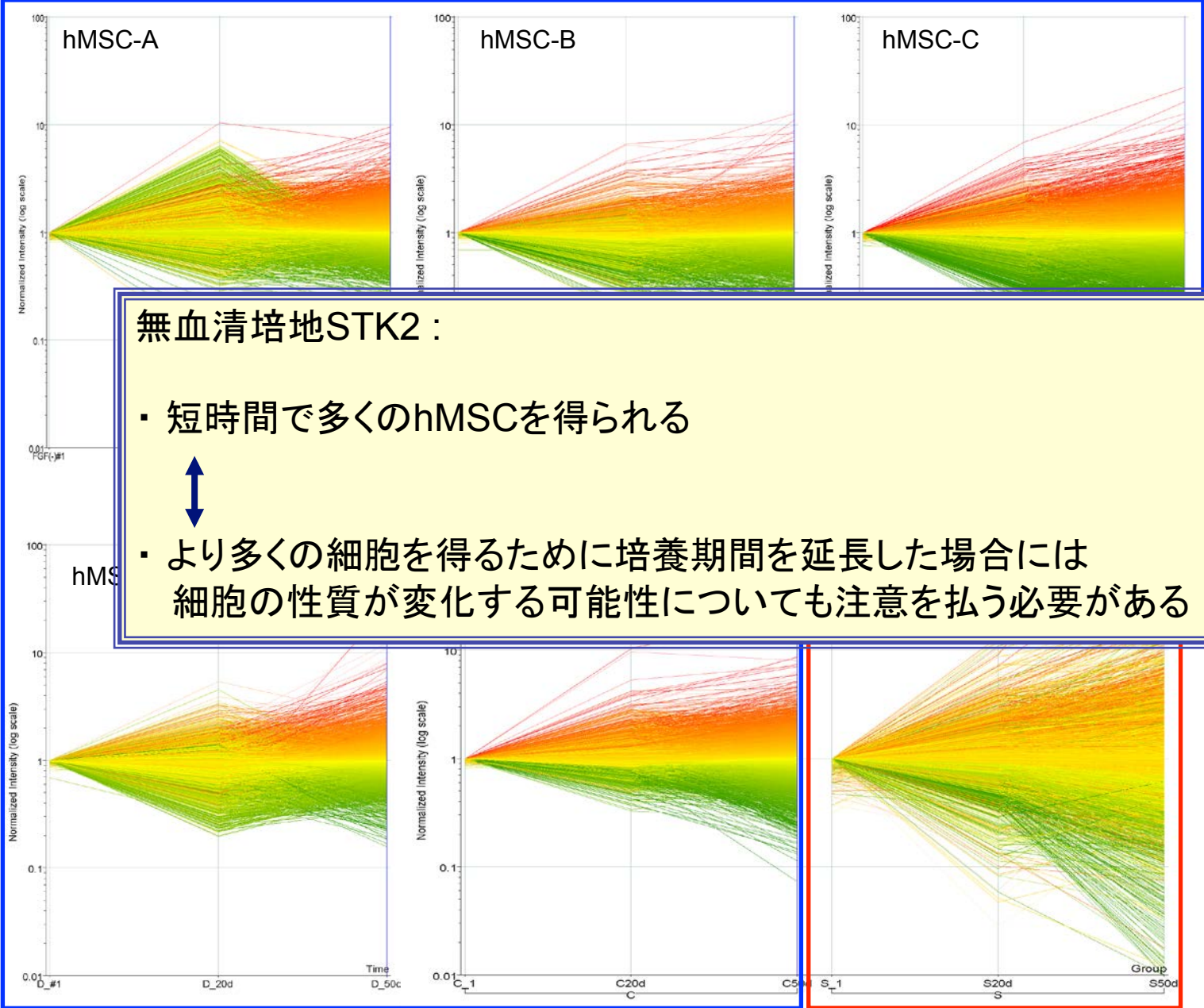
hMSCにおける *in vitro* 培養50日以内の遺伝子発現の変化について  
— MSCGM(10%FBS含培地)とSTK2(無血清培地)との比較 —





MSCGM

STK2



MSCGM

無血清培地STK2 :

- 短時間で多くのhMSCを得られる
- ↕
- より多くの細胞を得るために培養期間を延長した場合には細胞の性質が変化する可能性についても注意を払う必要がある

STK2

### 3) 様々な培養条件が細胞に与える影響

#### ② 培養中の酸素濃度について

## ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の *in vitro* 培養時の酸素濃度の影響 — 増殖や老化に与える影響 —

### 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞 (hMSC)

5%CO<sub>2</sub> 95%Air中の

a) 20% O<sub>2</sub> (通常の状態)

b) 5% O<sub>2</sub> (生体内に近い状態)

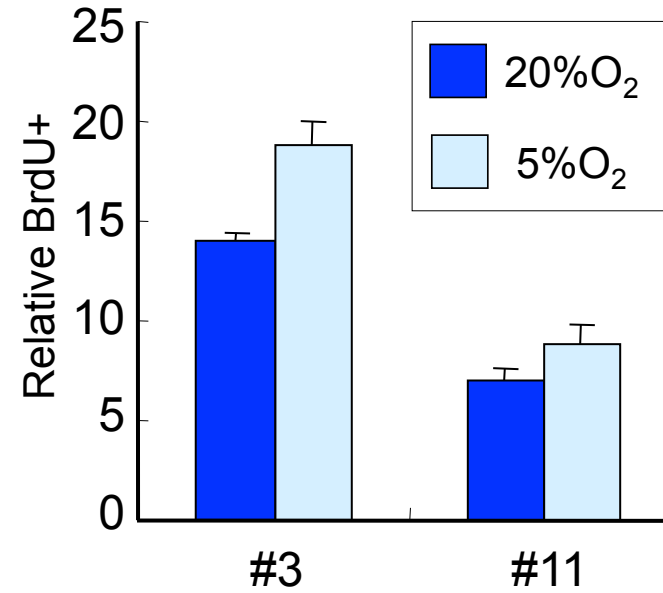
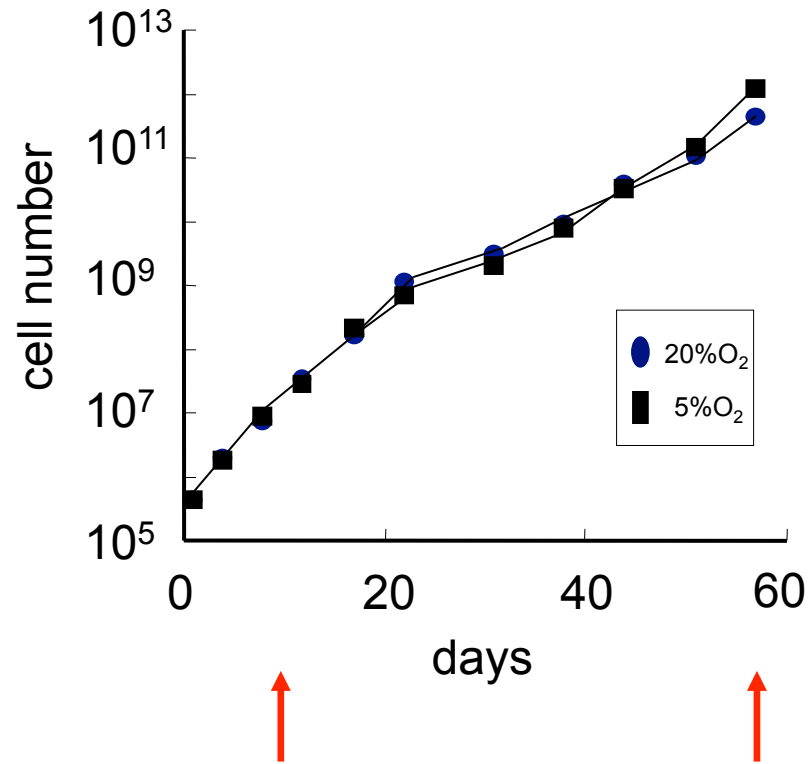
継代3代目と11代目の細胞を用いて検討

### 検討事項

- ・ 増殖能
- ・ 細胞老化
- ・ 細胞周期
- ・ 遺伝子発現

hMSCの増殖に及ぼす酸素濃度の影響

hMSCのDNA複製能に及ぼす酸素濃度の影響

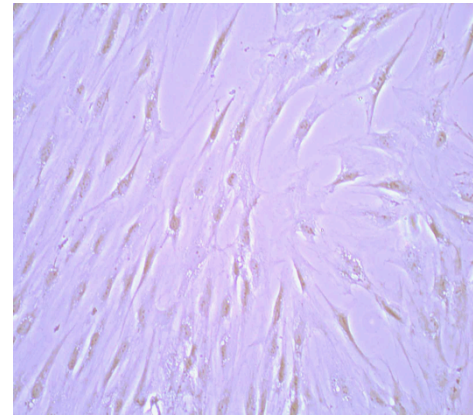
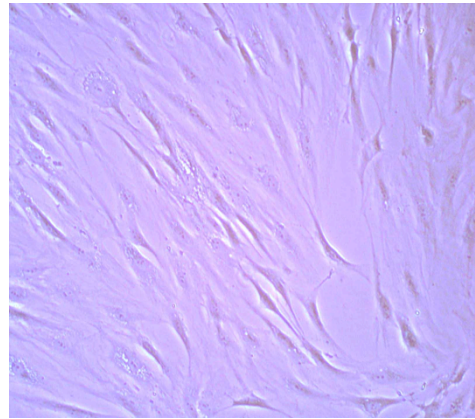


## hMSCの細胞老化に及ぼす酸素濃度の影響

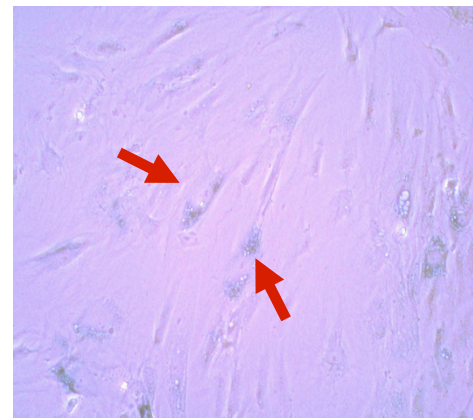
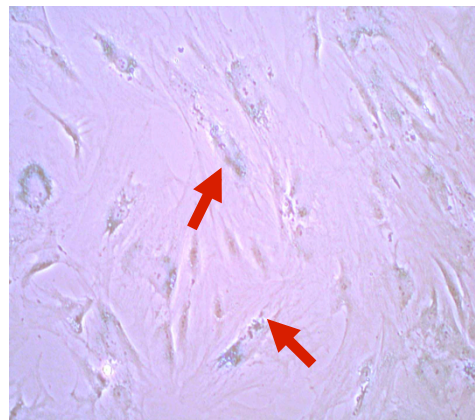
20%O<sub>2</sub>

5%O<sub>2</sub>

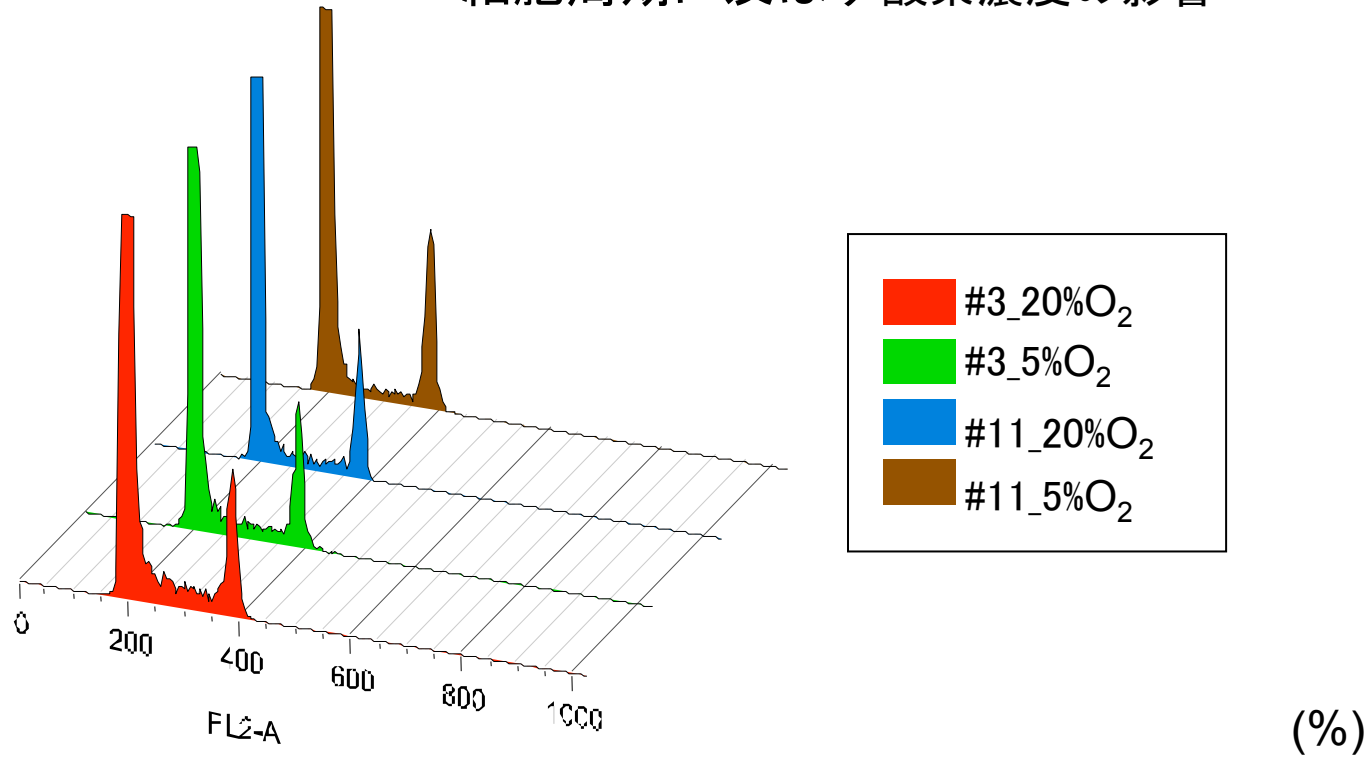
#3



#11

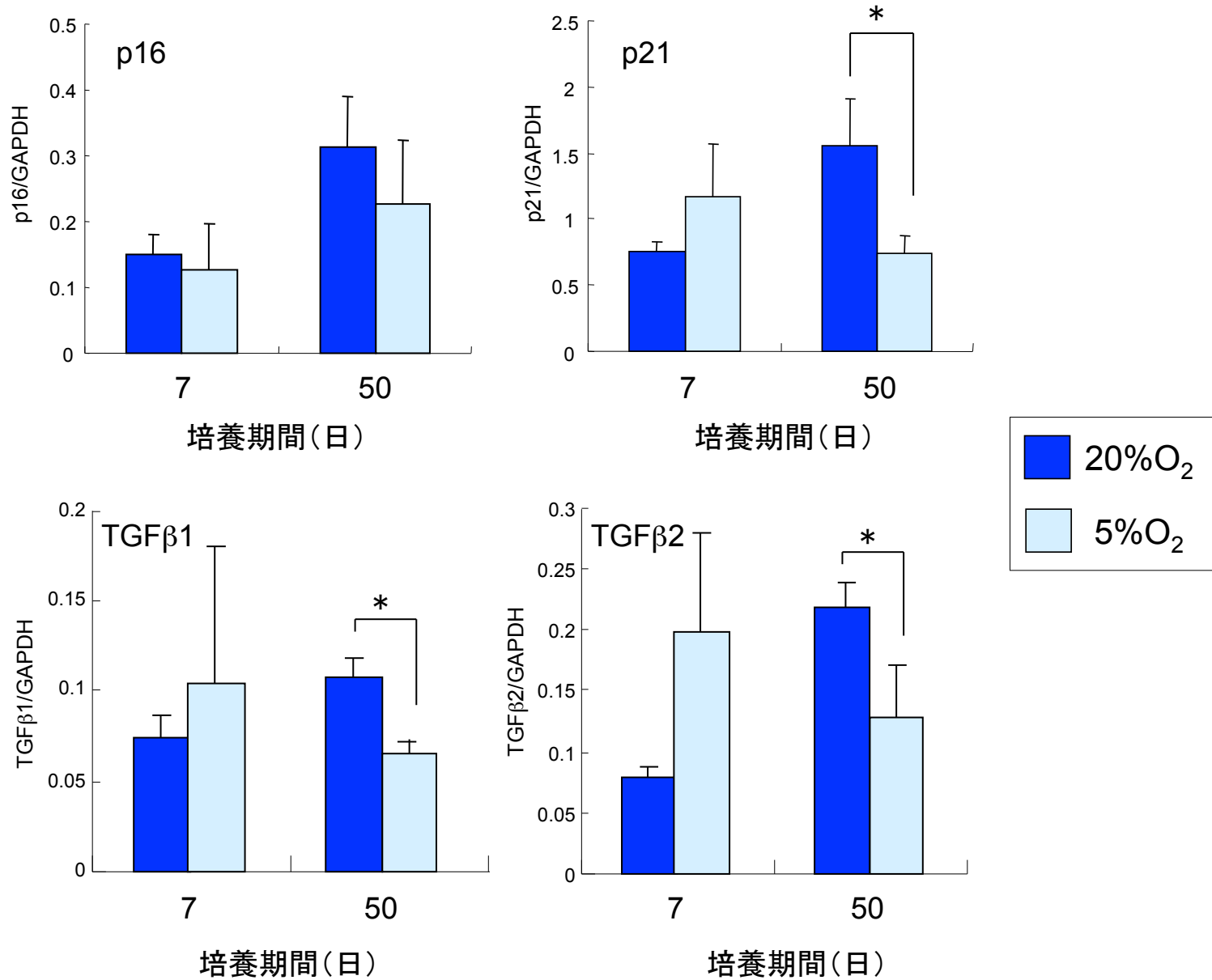


# 細胞周期に及ぼす酸素濃度の影響



	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
#3_20%O <sub>2</sub>	83.9	12.0	4.0
#3_5%O <sub>2</sub>	86.8	10.4	3.1
#11_20%O <sub>2</sub>	90.5	6.8	3.1
#11_5%O <sub>2</sub>	89.0	7.0	4.9

# hMSCのp16, p21, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 のmRNA発現に及ぼす酸素濃度の影響

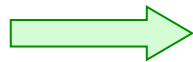




Jin Y, Kato T, Furu M, Nasu A, Kajita Y, Mitsui H, Ueda M, Aoyama T, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J.

Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase.

Biochem Biophys Res Commun. 2010 Jan 15;391(3):1471-6.



hMSCを1%O<sub>2</sub>条件下で長期培養し20%O<sub>2</sub>条件下と比較した結果、20%O<sub>2</sub>条件下では100日以上培養で細胞老化が認められたが、1%O<sub>2</sub>条件下ではp16の遺伝子発現の上昇が抑えられ細胞老化を防ぐ。

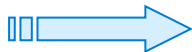
Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S.

Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells.

Cell Stem Cell. 2009 Sep 4;5(3):237-41.



ヒトやマウスのiPS細胞の樹立の際に、5%O<sub>2</sub>条件下で行う事でその効率が改善される。



培養中の酸素濃度は様々な幹細胞の品質に影響を及ぼす重要な要素の一つであると考えられる。

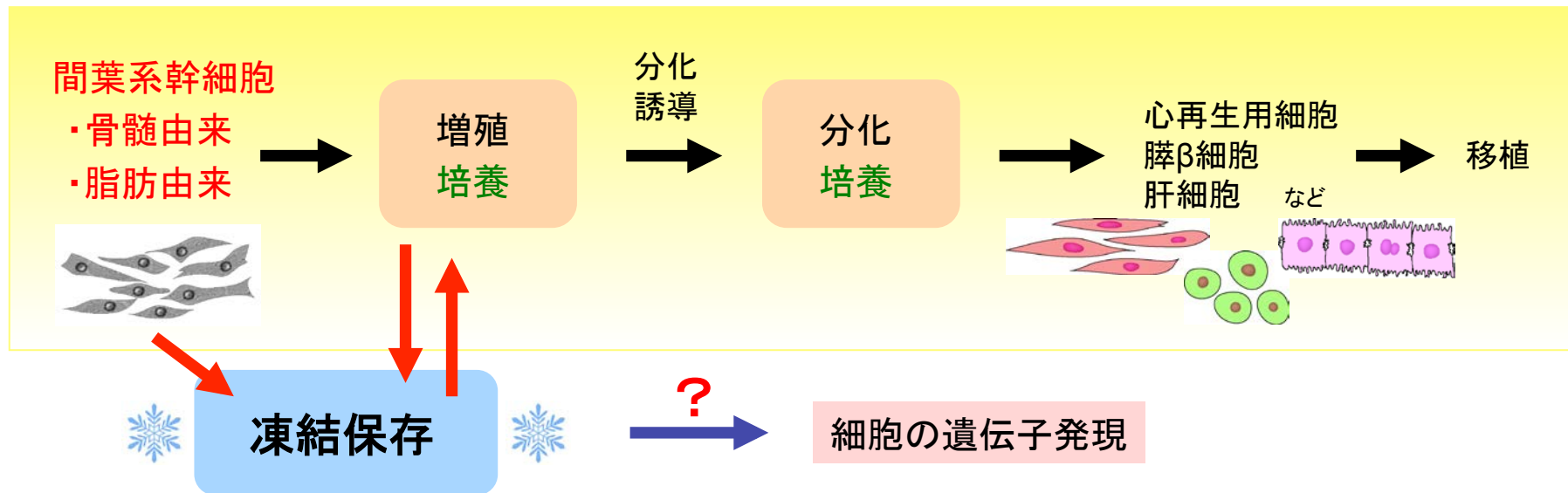
### 3) 様々な培養条件が細胞に与える影響

#### ③凍結保存

幹細胞を細胞組織加工医療機器に利用するためには、細胞を生体内から取り出して*in vitro*で培養して増殖させる必要があるため、その工程における幹細胞の品質及び安全性の確保についての検討は非常に重要である。

また、再生医療の臨床応用に向けて細胞の採取時期と移植の時期がずれる場合における患者の負担の軽減や近年の幹細胞のバンク化の推進の動きなどから、細胞の凍結保存は細胞加工の重要な一過程になると考えられる。

そこで本研究では、長期(10~18ヶ月)凍結保存による細胞の遺伝子発現への影響について検討するため、DNAマイクロアレイを用いて網羅的解析を行った。



液体窒素にて10~18ヶ月凍結保存

## 方法

### 細胞と凍結保存期間

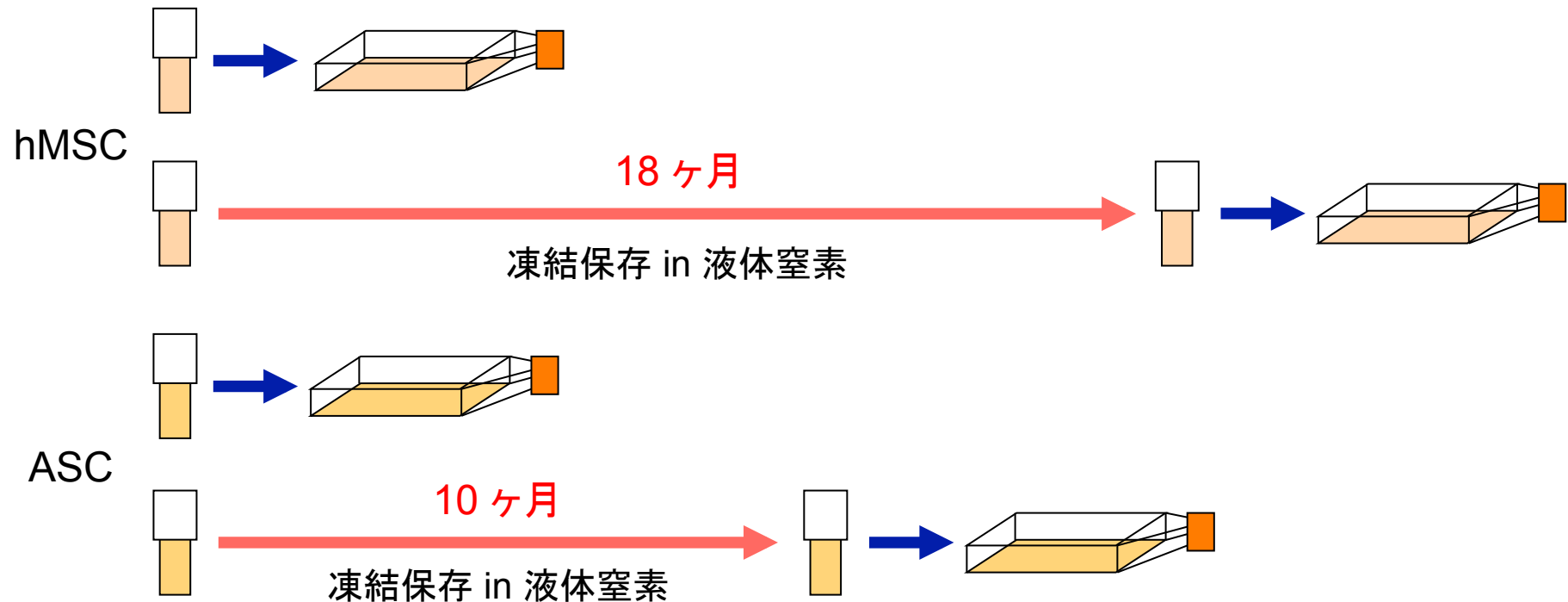
ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) Lonza … 0 or 18 ヶ月間 液体窒素保存

ヒト脂肪組織由来成体幹細胞 (Adult Stem Cell ; ASC) Zen-Bio … 0 or 10 ヶ月間 液体窒素保存

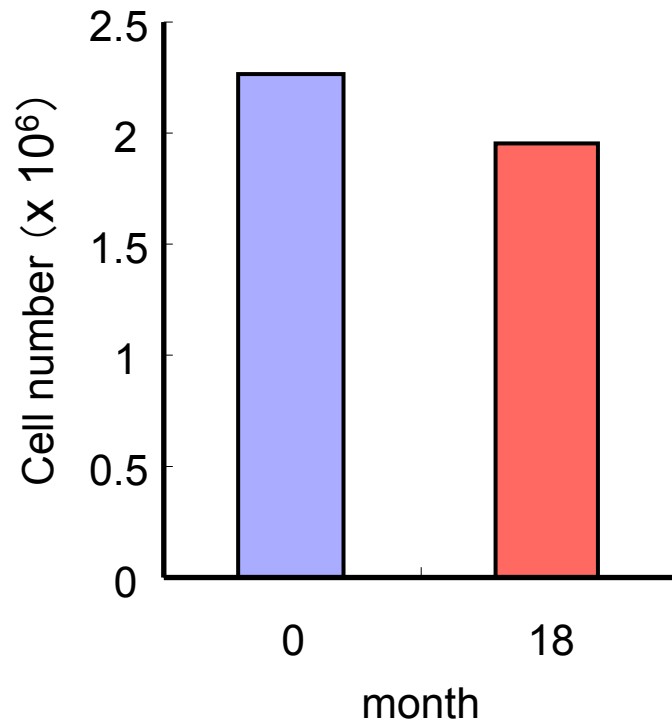
それぞれ凍結細胞を融解後1継代目の細胞を用いて比較

### DNAマイクロアレイ解析

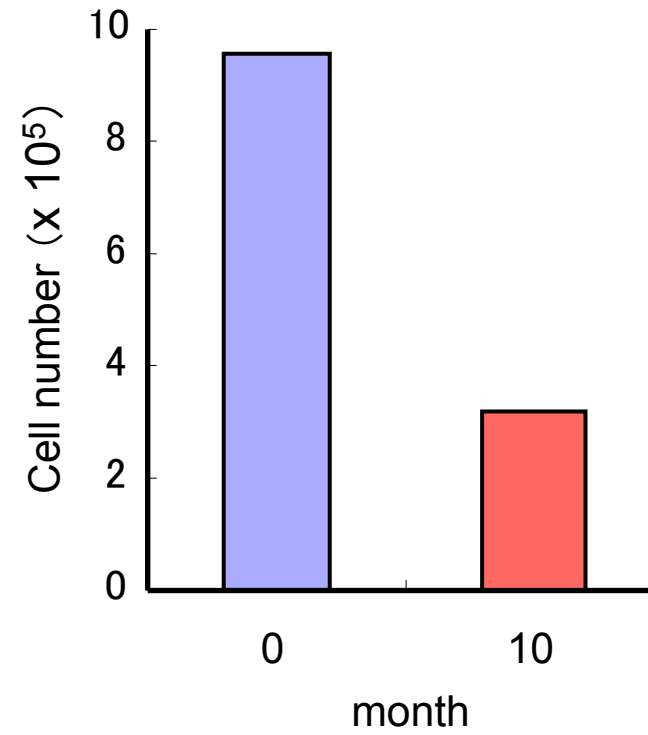
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array



hMSC

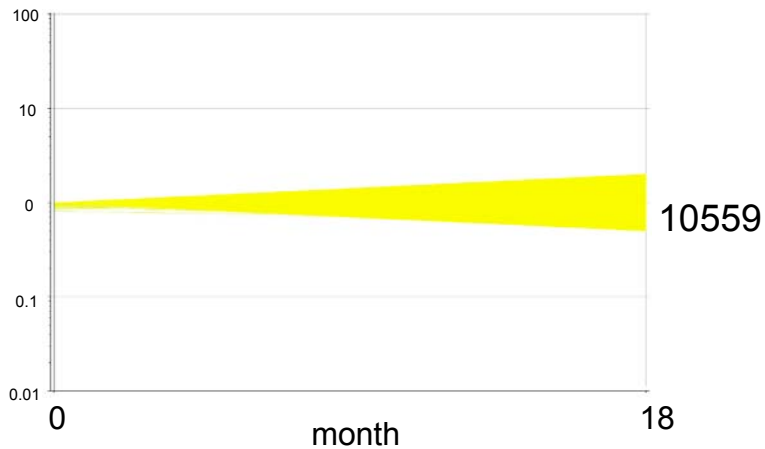
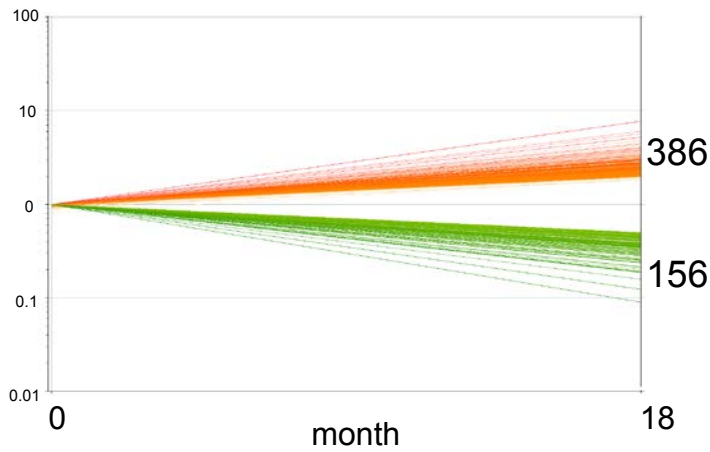
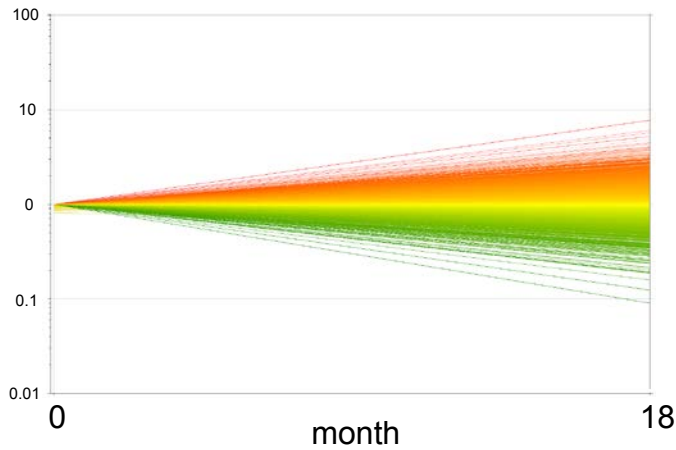


ASC



融解後のin vitro 培養における細胞数\*に及ぼす凍結保存の影響について

\*それぞれ最初の継代時に計測



proliferation and/or differentiation

BCL3	HHIP	PDGFC
CDC42	INSIG1	PEX13
COL8A1	ITGA4	PGF
COL13A1	JUN	PPHLN1
CTNNB1	KCTD11	RB1
CUL5	MDM4	RHOB
CSGALNACT1	MMP14	TAF8
CYR61	NAV1	TFDP1
DLX2	NF2	TGFB2
EDN1	NRAS	TXNDC1
EIF5A	NRG1	YDD19
FLG	NRP2	ZAK
GJC1	PDAP1	

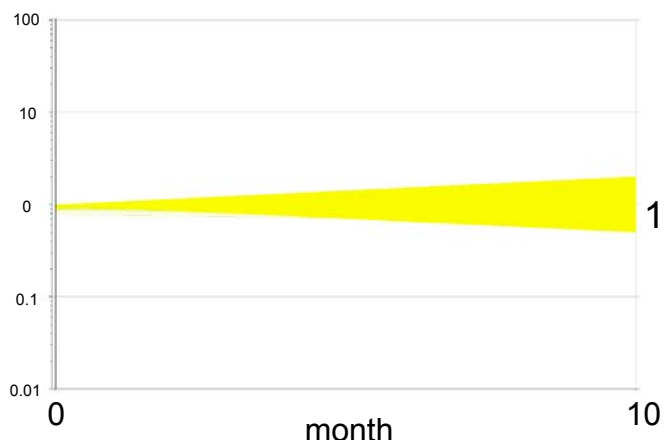
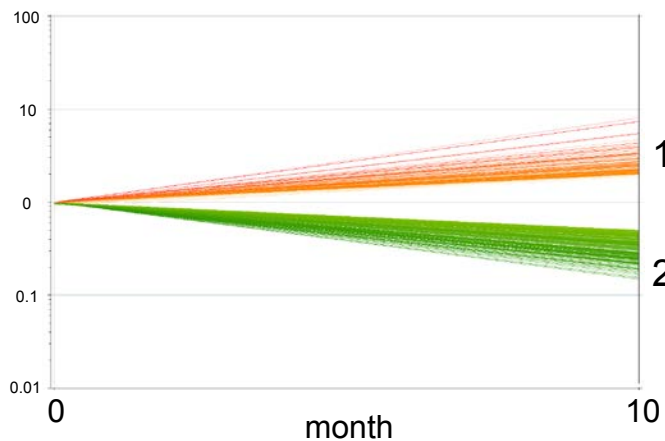
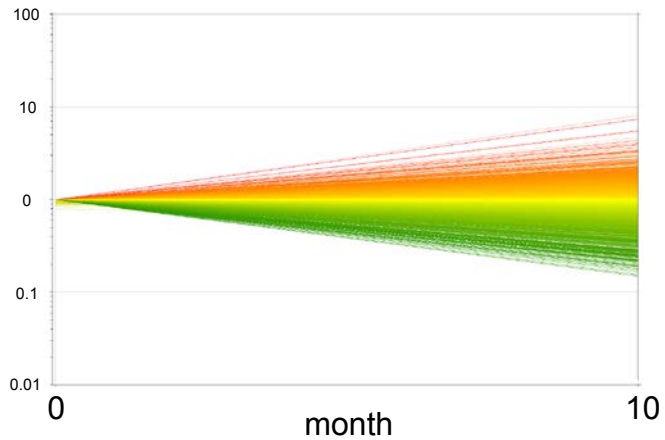
38

proliferation and/or differentiation

ACTC1	JAG1
AGT	KRT14
AHNAK2	PDGFD
COL15A1	SALL1
CRIP1	SLFN5
DAB2	SPON2
DCLK1	SQSTM1
EFHD1	STEAP4
HCLS1	TXN
HDAC9	VCAM1
ID4	
IGF2	
IRS2	

23

hMSCの凍結保存(18ヶ月間)による遺伝子発現への影響について



proliferation and/or differentiation

COL15A1	MGP
ELN	MMP14
FGF7	PAPPA
FZD1	RB1
JAG1	SLITRK4
KAZALD1	SMURF1
KITLG	STAT5B
MBNL1	

192



15

proliferation and/or differentiation

ALS2	CKS1B	MKI67
ASF1B	CKS2	PLK1
BLZF1	DLGAP5	RACGAP1
BUB1	EGR1	SFN
BUB1B	GINS1	SPATA5
CASC5	GJC1	STIL
CDC25C	HELLS	STMN1
CDC42	JUN	SUV39H2
CDKN2C	KIF15	TCF19
CENPF	KIF2C	TPX2
CKLF	KRT14	UHRF1

280



33

10488

ASCの凍結保存(10ヶ月間)による遺伝子発現への影響について

## 幹細胞のin vitro培養及び凍結保存によって発現レベルが変化しない遺伝子

	培養条件 <sup>1)</sup>	幹細胞の由来 <sup>2)</sup>	凍結保存	
	無血清培地 (STK2)	hMSC&ADSC&ADMPC	hMSC	ASC
c-myc		○	○	○
Bmi-1	○	○	○	○
PTEN	○		○	○
KLF4	○		○	○
ATM	○	○	○	○
p16			○	○
Cx43	○		○	○
STAT5B	○	○	○	
BRD2	○	○	○	○
PRDM2	○	○	○	○
EGFR		○	○	○
MAPK8	○	○	○	○
MAPK9	○	○	○	○
CDKN1B	○	○	○	○
RBL2	○	○	○	○
DIABLO	○	○	○	○
NOTCH1	○	○	○	○
RUNX1T1		○	○	○
UBE2D3	○	○	○	○
TERF1	○	○	○	○
TERF2	○	○	○	○

1) Sawada R, Yamada T, Tsuchiya T, Matsuoka A., Yakugaku Zasshi, 130, 1387-1393 (2010)

2) 澤田留美、松山晃文、大倉華雪、土屋利江、松岡厚子;再生医療 vol.9 Suppl, 294 (2010)

幹細胞のin vitro培養及び凍結保存によって発現レベルが変化しない遺伝子

	培養条件	幹細胞の由来	凍結保存	
	無血清培地 (S TK 2)	hMSC&ADSC&ADMPC	hMSC	ASC
c-myc		○	○	○
Bmi-1	○	○	○	○
PTEN	○		○	○
KLF4	○		○	○
ATM	○	○	○	○
p16			○	○
Cx43	○		○	○
STAT5B	○	○	○	
BRD2	○	○	○	○
PRDM2	○	○	○	○
EGFR		○	○	○
MAPK8	○	○	○	○
MAPK9	○	○	○	○
CDKN1B	○	○	○	○
RBL2	○	○	○	○
DIABLO	○	○	○	○
NOTCH1	○	○	○	○
RUNX1T1		○	○	○
UBE2D3	○	○	○	○
TERF1	○	○	○	○
TERF2	○	○	○	○

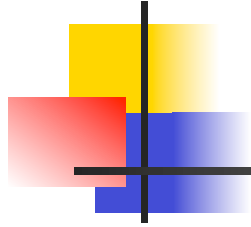


- Bmi-1
- ATM
- BRD2
- PRDM2
- MAPK8
- MAPK9
- CDKN1B
- RBL2
- DIABLO
- NOTCH1
- UBE2D3
- TERF1
- TERF2

- c-myc
- EGFR
- RUNX1T1

Bmi-1などいくつかの遺伝子が発現レベルに対して様々な条件による影響を受けにくいことがわかり、幹細胞の品質評価のマーカーとして利用できる可能性を示唆





### 3. 免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験への取り組み

1) ノードマウスを用いたhMSC皮下移植試験

2) 3種類の免疫不全マウスを用いた皮下移植による腫瘍形成の比較

## 造腫瘍性試験のガイドライン:

- ・ICH-Q5D(生物薬品製造用細胞基材の由来、調製および特性解析についてのガイドライン)
- ・WHO-TRS878

### WHO-TRS878の2010年7月の改正案

患者に移植する動物由来生細胞及び細胞・組織利用製品の原料となる細胞は「対象外」である

現段階では、再生医療製品を対象とした造腫瘍試験のガイドラインは実質存在しないと考えられる。

## 1)ヌードマウスを用いたhMSC皮下移植試験

1. 動物 BALB/c AnNCrj-nu nude mice ♂



### 2. In vivoにおける細胞の皮下移植試験

ヌードマウスを1週間予備飼育後、以下の4群に分け、マウスの背部皮下に細胞 ( $3 \times 10^6$  cells / mouse)を移植し、移植部位の腫瘍形成について観察した。

- 1) Control : PBS のみ皮下注射
- 2) hMSC : hMSC ( $3 \times 10^6$  cells / mouse) を皮下移植
- 3) hMSC (MC) : hMSC の培地中に移植3日前より発癌イニシエーターである methylcholanthrene (MC) を添加した細胞を皮下移植
- 4) HeLa S3 : ヒト子宮頸癌由来の HeLa S3 細胞を皮下移植

背部皮下へ細胞 ( $3 \times 10^6$  cells) を移植して1週間後のヌードマウスの様子



Control



hMSC(MC\*)



hMSC



HeLa S3

\*MC : 3-methylcholanthrene; 発癌イニシエーター

背部皮下へ細胞 ( $3 \times 10^6$  cells) を移植して16週間後のヌードマウスの様子



Control



hMSC(MC)



hMSC

ヌードマウスにおけるhMSC皮下移植試験

groups	1W	4W	16W
Control	0/6	0/6	0/6
hMSC	0/5	0/5	0/5
hMSC(MC)	0/5	0/5	0/5
HeLa S3	6/6	6/6	

## 2) 3種類の免疫不全マウスを用いた皮下移植による腫瘍形成の比較

1. 動物
  - ・ BALB/c nu/nu (nude) T細胞欠損 ♂♀
  - ・ NOD/Shi-*scid* (SCID) T及びB細胞欠損 ♂♀
  - ・ NOD/Shi-*scid*/ILsRg<sup>null</sup> (NOG) T,B及びNK細胞欠損 ♂♀



### 2. In vivoにおける細胞の皮下移植試験

3種類の免疫不全マウス(雄性5匹、雌性5匹)を用いて、背部皮下にHeLa S3をそれぞれ $1 \times 10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ 移植し、 $1 \times 10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ 移植群は22日間、 $1 \times 10^2$ 移植群は43日間、移植部位の腫瘍形成について観察した。

## nude、SCID、NOGマウスにHeLa S3を移植した際の腫瘍形成について

細胞数	性	腫瘍形成が認められたマウス数 (%)		
		ヌードマウス	SCID	NOG
1× 10 <sup>3</sup>	雄	—	0/5 (0%)	3/5 (60%)
	雌	—	0/5 (0%)	3/5 (60%)
	全	—	0/10 (0%)	6/10 (60%) <sup>*</sup>
1× 10 <sup>3</sup>	雄	0/5 (0%)	0/5 (0%)	3/5 (60%)
	雌	0/5 (0%)	0/5 (0%)	3/5 (60%)
	全	0/10 (0%)	0/10 (0%)	6/10 (60%) <sup>#</sup>
1× 10 <sup>4</sup>	雄	0/5 (0%)	2/5 (40%)	5/5 (100%) <sup>**</sup>
	雌	0/5 (0%)	0/5 (0%)	5/5 (100%) <sup>##</sup>
	全	0/10 (0%)	2/10 (20%)	10/10 (100%) <sup>##</sup>
1× 10 <sup>5</sup>	雄	5/5 (100%)	5/5 (100%)	—
	雌	3/5 (60%)	4/5 (80%)	—
	全	8/10 (80%)	9/10 (90%)	—

### NOGマウス:

がん細胞の皮下移植による腫瘍形成について他の免疫不全マウスよりも感受性が高い

→ より少ない細胞数、観察期間で試験を行うことが出来る可能性を示唆

\*p<0.05: SCIDマウスと比較して

\*\*p<0.01: ヌードマウスと比較して

#p<0.05: ヌードマウス及びSCIDマウスと比較して

##p<0.01: ヌードマウス及びSCIDマウスと比較して

## 細胞・組織加工製品に関する指針



### 細胞 組織

平成20年3月27日付薬食発0208003号厚生労働省医薬食品局長通知  
ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針

平成20年9月12日付薬食発0912006号厚生労働省医薬食品局長通知  
ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針

### 幹細胞

平成24年9月7日付薬食発0907第2号厚生労働省医薬食品局長通知  
ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針

平成24年9月7日付薬食発0907第3号厚生労働省医薬食品局長通知  
ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針

平成24年9月7日付薬食発0907第4号厚生労働省医薬食品局長通知  
ヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針

平成24年9月7日付薬食発0907第5号厚生労働省医薬食品局長通知  
ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針

平成24年9月7日付薬食発0907第6号厚生労働省医薬食品局長通知  
ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針



## 次世代医療機器評価指標



- 1) 平成22年1月18日付薬食機発0118第1号厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知「次世代医療機器評価指標の公表について」別添3  
重症心不全細胞治療用細胞シートに関する評価指標
- 2) 平成22年1月18日付薬食機発0118第1号厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知「次世代医療機器評価指標の公表について」別添4  
角膜上皮細胞シートに関する評価指標
- 3) 平成22年5月28日付薬食機発0528第1号厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知「次世代医療機器評価指標の公表について」別添1  
角膜内皮細胞シートに関する評価指標
- 4) 平成22年12月15日付薬食機発1215第1号厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知「次世代医療機器評価指標の公表について」別添1  
関節軟骨再生に関する評価指標
- 5) 平成23年12月7日付薬食機発1207第1号厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知「次世代医療機器評価指標の公表について」別添1  
歯周組織治療用細胞シートに関する評価指標



ご清聴、ありがとうございました。

## 幹細胞 がん化 Key Words

Bmi-1

over expressionでがん化  
正常幹細胞の自己複製の維持  
造血幹細胞の老化制御において重要な機能を果たす  
癌幹細胞の老化制御においても機能  
Bmi-1 — (負の制御) → p16 ← ← ATM → p53

STAT5

幹細胞にover expressionでがん化  
but 少し分化した前駆細胞へover expressionしてもがん化せず  
→ 幹細胞でsensitive

KLF4

正常細胞をがん化するのに必要  
KLF4 → p53↓ → 老化の回避?  
→ p21↑  
発がん性RAS (RASV12) によって誘導される細胞老化を回避できる

ATM

老化・発がんの制御に関係  
ATMによる酸化ストレスの抑制効果にて幹細胞の自己複製  
能力が維持

PTEN

がん抑制遺伝子