

IL-2 受容体 γ 鎖欠損免疫不全ブタを用いたヒト細胞 in vivo 造腫瘍性試験：モデル確立とヒト脱分化
脂肪細胞(DFAT)の移植安全性評価

日本大学大学院医学研究科博士課程
生理系細胞再生・移植医学専攻

佐野 太一

2022 年

指導教員 松本 太郎

IL-2 受容体 γ 鎖欠損免疫不全ブタを用いたヒト細胞 in vivo 造腫瘍性試験：モデル確立とヒト脱分化脂肪細胞 (DFAT) の移植安全性評価

日本大学大学院医学研究科博士課程
生理系細胞再生・移植医学専攻

佐野 太一

2022 年

指導教員 松本 太郎

目次

概要	1
緒言	4
材料と方法	14
結果	21
考察	28
まとめ	34
謝辞	35
図表	36
引用文献	63
研究業績	67

概要

【背景・目的】

in vivo 造腫瘍性試験は、免疫不全動物にヒト細胞を移植し、動物の体内で増殖する造腫瘍性細胞を検出することを目的とした試験である。現在、In vivo 造腫瘍性試験には、主に NOG マウスといった重度免疫不全を呈するマウスが用いられている。一方、マウスは体重、サイズ、寿命、臓器の構造などがヒトと大きく異なるため、よりヒトに近い大動物を使った試験系の確立が求められている。ブタは、マウスより生理学的及び解剖学的にヒトとの類似性が高いため、よりヒトに近い医学研究ツールとして期待できる。近年、ヒト重症複合型免疫不全症 (severe combined immunodeficiency: SCID) の原因遺伝子であるインターロイキン-2 (IL-2) 受容体 γ 鎖を欠損させた重度免疫不全ブタ (IL2rg 欠損ブタ) が開発された。IL2rg 欠損ブタは、NOG マウスと同様に、ヒトがん細胞を拒絶せず腫瘍形成することが推測され、ヒト細胞の造腫瘍性試験に利用できる可能性がある。

本研究では、重度免疫不全を呈する IL2rg 欠損ブタにヒトがん細胞 (HeLa 細胞) を移植し、その生着や腫瘍性増殖を検討した。そしてこの IL2rg 欠損ブタが、ヒト細胞加工製品の in vivo 造腫瘍性試験に利用できる研究用モデル動物となりうるか検証した。さらに現在、血管再生治療用細胞として開発が行われているヒト脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cells: DFAT) を臨床試験と同様の投与方法で IL2rg 欠損ブタに移植し、その腫瘍形成性の有無を解析した。

【方法】

IL2rg 欠損ブタは、免疫不全ブタ飼育室に設置された免疫不全ブタ用クリーンラックシステムを用いて飼育した。ヒト DFAT は、脂肪吸引術をうける患者から提供された皮下吸引脂肪組織を細胞原料として、セルプロセッシングアイソレータを用いて天井培養法にて調製した。Hela 細胞移植実験では、IL2rg 欠損ブタの皮下または浅臀筋内にマトリゲルとともに Hela 細胞(1×10^6 /頭または 1×10^7 /頭)を移植し、移植 1 週間後および移植 1 ヶ月後に移植部位および主要遠隔臓器の病理学的解析を行った。DFAT 移植実験では、IL2rg 欠損ブタの浅臀筋内に 1 cm 間隔で 20 ヶ所に臨床グレードのヒト DFAT (2×10^7 /頭)を移植した。また陰性対照細胞としてヒト皮膚線維芽細胞(Fibroblast)を同様の方法で移植した。移植 1 ヶ月後に移植部位および主要遠隔臓器(脾臓、肺、心臓、肝臓、腎臓、膵臓)の病理学的解析を行った。また抗ヒトビメンチン抗体を用いた免疫組織染色により、移植筋肉組織に生着するヒト DFAT の細胞動態を経時的に解析した。

【結果】

IL2rg 欠損ブタの形質解析を行った結果、検討したすべての個体で胸腺や腸管膜リンパ節の欠如が認められ、末梢血中のリンパ球は著明に減少していた。IL2rg 欠損ブタに Hela 細胞を異種移植した結果、皮下移植、筋肉内移植共に Hela 細胞は拒絶されず、移植 1 週間後から移植部位に腫瘍形成を示し、移植 1 ヶ月後には、炎症細胞の浸潤を伴う著明な腫瘍の形成が確認された。一方、主要遠隔臓器に Hela 細胞の転移所見は認められなかった。IL2rg 欠損ブタにヒト DFAT を筋肉内移植した結果、移植 1 ヶ月の時点において移植筋肉組織および主要遠隔

臓器に腫瘍形成は認められなかった。陰性対照である Fibroblast を移植したブタも同様に腫瘍形成は観察されなかった。DFAT 移植筋肉組織のヒトビメンチン染色の結果、移植後 1 週間から 12 週間後までヒトビメンチン陽性の DFAT が移植部位に検出された。

【結論】

IL2rg 欠損ブタは Hela 細胞を拒絶せず、移植部位に腫瘍形成を示すことが明らかになった。一方、ヒト DFAT や Fibroblast を臨床研究と同様の方法で筋肉内投与しても腫瘍形成は起こらないことが明らかになった。臨床プロトコルに従い投与されるヒト DFAT は腫瘍形成されることなく安全に筋肉内投与できることが示された。IL2rg 欠損ブタは、既存の免疫不全マウスの欠点を補完し、移植ヒト細胞の造腫瘍性をより臨床プロトコルに近い形で評価できる動物モデルとなりうることが示唆された。

緒言

1. 再生医療等製品（ヒト細胞加工製品）の非臨床試験

再生医療分野において、幹細胞などを用いたヒト細胞加工製品の臨床応用が進められており、さまざまな器官・組織に由来する細胞からヒトへ投与する製品が製造され、多様な疾患に対して臨床研究や治験などが行われている。このような再生医療等製品は、治療法としての期待が高い反面、関連する経験や知見の蓄積が乏しいことに伴う安全性上の懸念が存在する。例えば、胚性幹細胞（embryonic stem cells: ESC）や人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells: iPSC）では、未分化状態では、奇形腫といった腫瘍形成能を有することが知られている [1]。そのため、最終製品の臨床研究や治験開始の前に、医薬品と同様、製品として適切な品質が確保されるとともにヒトに投与される際に安全性上の問題が存在しないかの把握が必要とされている。独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）では、細胞加工製品の非臨床安全性評価の概要は、「再生医療等製品（ヒト細胞加工製品）の品質、非臨床試験及び臨床試験の実施に関する技術的ガイダンス」として公表され、非臨床安全性に関する全般的な評価の考え方が示されている [2]。

再生医療等製品に含まれる細胞または非細胞成分について、「一般毒性」、「腫瘍性」、「生命維持に関わる重要な器官・組織への影響」、「製造工程由来不純物」

および「遺伝子改変に関する事項」などの観点からの評価が必要とされる。一般的に ESC および iPSC 由来の再生医療等製品と比較して、成熟細胞や間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSC) に代表される体性幹細胞に由来する再生医療等製品の造腫瘍性ハザードは非常に低いと考えるが、製造工程や遺伝子改変等が形質転換細胞の生成に影響することから、「製造工程で生じる悪性形質転換細胞による悪性腫瘍形成能」および「最終製品自身の悪性腫瘍化能」を有する可能性はないか、ヒトへ投与する前に評価が必要であるとされている [3]。造腫瘍性評価として、in vitro 試験の「核型試験」、「軟寒天コロニー形成試験」および in vivo 試験の「免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験」が主に実施される。軟寒天コロニー形成試験は、3-4 週間の所要時間で高感度に細胞の足場非依存的増殖 (悪性形質転換細胞) を検出できるが、①造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断しなくてはならない、②浮遊系細胞には利用できない、③良性不死化細胞は検出できない、といった欠点がある。またヒト iPSC では、寒天培地内で分散誘導性細胞死が起こるため、未分化ヒト iPSC の検出には適さないことが報告されている [4]。これに対し、in vivo 造腫瘍性試験は、免疫不全動物にヒト細胞を移植し、動物の体内で増殖する造腫瘍性細胞を検出することを目的とした試験である。①造腫瘍性細胞の有無を直接的に評価できる、②臨床適用相当部位の微小環境での造腫瘍性を評価できる、③未分化ヒト iPSC の評価も可能、といった利

点がある。一方、試験にかかる所要時間は16週間以上であり、①試験に費用と時間がかかる、②専用動物施設が必要、といった欠点がある。適切な in vivo 造腫瘍性試験を行うためには、表1 [3]のような試験条件が必要であると考えられている。

2. 重度免疫不全マウスを用いた造腫瘍性試験

免疫不全動物は、異種の細胞に対する拒絶反応を起こさないため、移植細胞の生体内での生着、分化、増殖の評価ができる。この特性を利用して、免疫不全動物に被験細胞を移植しその造腫瘍性を評価することができる。現在、in vivo 造腫瘍性試験は、主にげっ歯類由来の免疫不全動物が用いられている。世界保健機構 (World Health Organization: WHO) Technical report Series (TRS) No. 878 Annex 1 は動物を使った生物由来製剤の造腫瘍性試験の唯一の国際的ガイドラインである [5]。このガイドラインでは、造腫瘍性試験に用いる動物として、T 細胞欠損ヌードマウスを推奨している。しかしこのガイドラインは生物製剤製造時に細胞基材として使用する動物細胞株の造腫瘍性評価を主目的としたものであり、移植用のヒト細胞加工物中に混在する微量の腫瘍細胞を検出するには、ヌードマウスは検出感度が十分でないことが知られている [6]。日本実験動物中央研究所が2002年に開発した NOG (NOD/Shi-scid, IL-

2R γ null) マウスは、現在最も重度の免疫不全を呈するマウスの一種であり、近年、造腫瘍性試験に頻用されている [7]。NOG マウスは、免疫不全 NOD-SCID マウスと、免疫細胞の分化・成熟に関わるインターロイキン-2 受容体の第 3 番目のサブユニット、 γ 鎖をノックアウトした (IL-2R γ KO) マウスを交配して得られた系統である。この NOG マウスは T 細胞・B 細胞・NK 細胞・補体活性の欠損および樹状細胞・マクロファージの機能不全を有しており、ヒト CD34⁺造血幹細胞を移植すると生着し、多様な免疫細胞へ分化することが知られている [8]。

Kanemura ら [9] は、マトリゲルで包埋した被験細胞を NOG マウス皮下に移植する試験系において、ヒト網膜色素細胞 25 万個中に 1,000 個 (0.4%) の割合で混入するヒト iPSC を 50% の確率で検出できることを報告している。また Kusakawa ら [10] は、同様の試験系において、ヒト MSC 1,000 万個中に 2,000 個 (0.002%) の割合で混入する腫瘍細胞 (HeLa 細胞) を 50% の確率で検出できることを報告している。この報告では、HeLa 細胞の腫瘍性増殖を 50% 検出できる細胞数は、ヌードマウスでは、 4.0×10^5 個であったのに対し、NOG マウスでは 1.3×10^4 個であり、NOG マウスはヌードマウスに比べて腫瘍細胞の検出感度が約 30 倍高いことが明らかになっている。

一方、マウスは体重、サイズ、寿命、臓器の構造などがヒトと大きく異なるため、造腫瘍性試験においての限界があることも明らかになっている。例えば、臨

床では静脈内投与などによる全身投与、筋肉内投与、カテーテルを用いた臓器局所への投与など様々な移植部位とデリバリー方法があるが、マウスでは個体サイズや臓器構造の違いから臨床と同じ投与方法が行えず、背中または腹部の皮下移植といったように代替部位、代替移植方法で評価されることが多い(表 2)。また安全性が担保された最大投与量を決定する際にも、マウスとヒトでは体重が大きく異なるため、最大投与量の正確な評価が行えないといった問題点がある。したがってよりヒトに近い大動物を使った試験系の確立が求められている。

3. SCID ブタ

ブタは、マウスより生理学的及び解剖学的にヒトとの類似性が高いため、よりヒトに近い医学研究ツールとして役立つことが期待できる。一方、表 1 に示すように、現在再生医療の薬事承認においてブタの実験は必須項目として求められておらず、その試験条件も設定されていない。これまでに重度免疫不全(SCID)を呈するブタとして、T 細胞やB 細胞の発達過程の DNA 修復に必要な ARTEMIS 遺伝子変異を有する自然発症 ARTEMIS 欠損 SCID ブタや、遺伝子改変技術を用いて T 細胞レセプター及び B 細胞レセプター成熟に必要な VDJ 組換えに関与する RAG1、RAG2 をノックアウトした RAG1/2 欠損 SCID ブタなどが開発されている [11]。ARTEMIS 欠損 SCID ブタ及び RAG1/2 欠損 SCID ブタでは、免疫に関

与するリンパ球の内、免疫応答の調節や発達の司令塔である T 細胞や液性免疫の中心となる B 細胞は欠損するが、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞を攻撃して破壊する NK 細胞が残存することが知られている。

また国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構の Suzuki、Onishi らの研究グループは、2012 年に体細胞クローン技術と遺伝子改変技術を組み合わせてヒト重症複合型免疫不全症 (SCID) の原因遺伝子である IL-2 受容体 γ 鎖を欠損させた重度免疫不全ブタ (IL2rg 欠損ブタ) を開発した [12]。IL-2 受容体 γ 鎖遺伝子は、X 染色体上 q13 に存在するため、ホモノックアウト (IL2rg^{-/-}) のみならず、オスのヘミノックアウト (IL2rg^{-/Y}) でも SCID の形質を示す。この IL2rg 欠損ブタでは、免疫に必須な器官である胸腺やリンパ節が欠失または高度萎縮しており、免疫細胞の内、T 細胞、NK 細胞が消失している。B 細胞は残存しているが、抗体産生能は消失している。Suzuki ら [12] はこの IL2rg 欠損ブタに同種骨髄細胞を移植すると拒絶されずに生着することを報告している。また Nochi ら [13] はこの IL2rg 欠損ブタに正常免疫能を有する同種骨髄細胞を移植すると小腸内に孤立リンパ小胞の出現が認められ、移植した骨髄細胞の一部が免疫細胞に分化したことを報告している。これらの結果は、IL2rg 欠損ブタが非自己細胞を拒絶せず、長期間生着し細胞機能を獲得する可能性を示唆している。また IL2rg 欠損ブタは、NOG マウスと同様に、ヒトがん細胞を受容し、腫瘍形成する

ことが推測され、ヒト細胞の造腫瘍性試験に利用できる可能性がある。一方、免疫機能低下による易感染性により、IL2rg 欠損ブタは通常の飼育環境では2ヶ月以内に死亡することが明らかになっている。このような理由により、これまでにIL2rg 欠損ブタにヒトがん細胞を移植しその生着、増殖を検討した研究は報告がない。

4. 脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cells: DFAT)

日本大学の Matsumoto、Kano らの研究グループでは、これまでに、脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を「天井培養」という方法で培養することによって得られる DFAT と呼ばれる細胞が、MSC に類似した高い増殖能と多分化能を獲得することを明らかにした (図 1) [14]。DFAT は骨髄 MSC や脂肪組織に含まれる MSC (adipose-derived stem cells: ASC) と共通の細胞表面抗原発現プロファイルを示し、クローンレベルで脂肪、骨、軟骨、平滑筋への多分化能を示す。マイクロアレイ法による網羅的遺伝子解析の結果、DFAT の遺伝子発現プロファイルは ASC と 99.5%以上一致し、両者の形質は非常に類似していることが明らかになった。また種々の疾患モデル動物に DFAT を移植することにより、組織再生、創傷治癒、血管再生、抗炎症、免疫制御といった MSC に類似した治療効果を示すことが報告されている [15-24]。さらにマウスやラットを用いた研究で移植した DFAT が生体内で血管、心筋、軟骨などに直接分化し組織再生に寄与することも示されて

いる [18, 19, 25, 28]。DFAT は治療用細胞として、①ドナー年齢や基礎疾患に影響されず調製できる。②少量(約 1g)の脂肪組織から高効率に大量調製できる。③初代培養から均質な細胞が得られる。といった特長を有している。このことから DFAT は、実用性の高い治療用細胞ソースとして有望であると考えられる。

DFAT は、Vascular endothelial growth factor (VEGF)、Hepatocyte growth factor (HGF)、Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)などの血管新生因子を分泌するとともに、ペリサイトや血管内皮細胞といった血管構成細胞への分化能を有し、安定した高い血管新生能を示すことが報告されている [25-28]。これらの研究成果を元に、2020 年より日本大学医学部附属板橋病院において重症下肢虚血(critical limb ischemia: CLI)を対象とした DFAT 移植による血管再生細胞治療の臨床研究を開始している(jRCTb030190212)。この臨床研究では、閉塞性動脈硬化症(arteriosclerosis obliterans: ASO)に起因し、既存の治療に抵抗性の CLI 患者を対象として、自家 DFAT 移植治療の安全性と有効性を評価することを目的としている。具体的には CLI 患者より約 10 ml の吸引脂肪組織を採取し、施設内の細胞加工施設 (CPF) に設置されたアイソレータを用いて脂肪細胞を単離後、約 5 週間培養し、必要数の DFAT 細胞を製造後、患者の虚血筋肉内 20 カ所に 0.25 ml ずつ移植する (図 2)。主要評価項目は安全性の確認であり、移植後 52 週までに発現した有害事象について評価する。副次評価項目は有効性の

評価であり、重症度分類、虚血性疼痛などの変化を評価する。

本臨床研究の実施にあたり、ヒト DFAT の非臨床安全性試験として、軟寒天コロニー形成試験、核型試験や、NOG マウスを用いた in vivo 造腫瘍性試験を実施した。その結果、本臨床研究で使用するヒト DFAT に足場非依存性増殖を示す細胞の存在や、明らかな染色体異常は認められず、NOG マウスに皮下注射しても腫瘍形成は認められなかった。これらの非臨床安全性試験の結果より、ヒト DFAT の移植安全性は問題ないことが推定された。一方、PMDA の「再生医療等製品（ヒト細胞加工製品）の品質、非臨床試験及び臨床試験の実施に関する技術的ガイダンス」では、in vivo 造腫瘍性評価における試験条件として、最終製品を可能な限り臨床試験と同じ移植部位に同じ条件で移植することが求められている [2]。本臨床研究では、 $1 \times 10^5/\text{kg}$ （低用量群）または $3 \times 10^5/\text{kg}$ （高用量群）の DFAT を 1cm 以上の間隔で 0.25 ml ずつ 20 ヶ所に筋肉内投与するプロトコルである。今回、臨床研究実施前に行った NOG マウスを用いた in vivo 造腫瘍性試験では臨床研究と同様の方法で筋肉内移植するのは困難であったため、代替方法として、右側腹部の皮下 1 カ所に DFAT 1×10^7 個/0.2 ml/頭を移植して評価を行った。したがって、この試験結果は、臨床で実施する投与方法と大きく異なるため、移植安全性を正確に評価していないことが危惧される。体重や筋肉組織の大きさがヒトに近いブタであれば、本臨床研究と同じ移植部位、移植条件

で検討ができるため、移植部位の微小環境の影響を忠実に模倣できると考えられ、より信頼性の高い造腫瘍性の評価ができると予想される。

5. 研究目的

本研究では、重度免疫不全を呈する IL2rg 欠損ブタにヒトがん細胞を移植し、その生着や腫瘍性増殖を検討する。そしてこの IL2rg 欠損ブタが、ヒト細胞加工製品の *in vivo* 造腫瘍性試験に利用できる研究用モデル動物となりうるか明らかにする。さらに現在、細胞医薬品として開発が行われているヒト DFAT を臨床試験と同様の投与方法で IL2rg 欠損ブタに移植し、その腫瘍形成性の有無を検討する。

材料と方法

1. 実験動物

本研究の動物実験は日本大学医学部動物実験委員会の指針に従い、日本大学遺伝子組換え実験実委員会（整理番号：2016 医 13）および日本大学動物実験委員会（承認番号：AP17M006）の承認を得て実施した。IL2rg 欠損（IL2rg^{-/-}）ブタは、国立研究開発法人農業生物資源研究所より譲渡を受け、離乳後に日本大学医学部の免疫不全ブタ飼育室に搬送した。搬送後、免疫不全ブタ飼育室に設置された特注型免疫不全ブタ用クリーンラックシステムを用いて飼育した（図 3）。飼育ケージの換気は HEPA フィルター簡易ファンユニットから各飼育ケージに均等に送風し、排気はケージ下部より自然排気とし、換気回数は 1 時間に 20 回に設定した。自動給水は、5 μm のフィルターを通しフラッシング式とした。飼料は体重に合わせて 300 g~1,000 g/日のブタ用飼料を与えた。感染を予防するため、10 kg ブタ用飼料の中に、リンコマイシン 20 g、ミヤゴールド 20 g、CTC 散 20 g を配合した。1 週間馴化させた後、IL2rg 欠損ブタより採血を行い、血算、血液像、フローサイトメトリーによる白血球分画の解析を行い、野生型ブタとの比較を行った。

2. 細胞の調製

本研究で使用するヒト DFAT は、健常ボランティアまたは湘南美容クリニックにて脂肪吸引術をうける患者から事前に同意を得て、提供された皮下吸引脂肪組織を細胞原料として調製した。これらの研究は、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て実施した（承認番号：RK161011-01 健常ボランティア脂肪組織、RK160209-6 湘南美容クリニック手術検体）。健常ボランティアからの脂肪組織採取は、日本大学医学部形成外科に所属する脂肪吸引術に熟達した医師により、外来処置室において局所麻酔下に約 10 ml 脂肪組織を吸引採取した。DFAT の調製は、既報 [29] に従い、脂肪組織をコラゲナーゼ処理、フィルトレーション、低速度遠心分離を行った後、成熟脂肪細胞を含む浮遊層を採取し、天井培養を行い調製した。調製に用いた基礎培地、血清、酵素などの試薬はすべて臨床研究で用いている GMP グレードの試薬を用い、日本大学医学部リサーチセンター CPF に設置されたセルプロセッシングアイソレータ内で臨床用細胞の製造法に準じた方法で調製を行った。Hela 細胞 (CCL-2, ATCC) およびヒト皮膚由来 fibroblast (normal human dermal fibroblasts, Cat. CC-2511, Lot No. 0000488388, Lonza Walkersville Inc.) は研究室で凍結保存していたものを使用した。DFAT および fibroblast は、20% 胎仔ウシ血清 (fetal bovine serum : FBS, JRH Bioscience) 含有 Dulbecco' s modified Eagle' s medium (DMEM, Invitrogen) を用いて 37°C、5% CO₂ の条件で培養した。Hela 細胞は、10%

FBS 含有 DMEM を用いて 37°C、5% CO₂ の条件で培養した。移植用 DFAT と fibroblast は、第 3 継代細胞が 90%以上コンフルエントになった時、トリプシン処理を行い細胞培養フラスコから細胞を剥離させ、生理食塩水で 2 回洗浄後、生理食塩水に浮遊させ、 2×10^7 個/5 ml の細胞懸濁液を調整した。移植用 HeLa 細胞は、細胞懸濁液とマトリゲル基底膜マトリックス (Corning) を 1 : 1 の比率で混合し、最終細胞濃度 1×10^6 個/ml、または 1×10^7 個/ml に調整した。

3. HeLa 細胞移植実験

HeLa 細胞移植実験では、WHO TRS No. 878 Annex 1 のプロトコルに準拠した投与ルートとするため、皮下組織に移植する方法と、臨床研究と同じ投与ルートである筋肉組織に移植する方法で検討した。皮下組織移植実験では、IL2rg^{-/-} ブタ (雄性、4~5 週齢) にミダゾラムを臀部に筋肉内投与 (1 mg/kg) して鎮静させ、セボフルラン 4% による吸入麻酔を施し、HeLa 細胞マトリゲル懸濁液 1 ml (高用量: 1×10^7 個/ml, 低用量: 1×10^6 個/ml) を 23G 注射針装着したシリンジを用いて、それぞれ左右の耳介皮下に注射した (n = 2)。また筋肉内移植実験では、セボフルラン (2-4%) 麻酔下に HeLa 細胞マトリゲル懸濁液 1ml (高用量: 1×10^7 個/ml, 低用量: 1×10^6 個/ml) を 23G 注射針装着したシリンジを用いて、それぞれ左右の浅殿筋内 1 箇所注射した (n = 2)。筋肉内移植

の場合は移植部位を同定しやすくするため、注射部位の両側 1cm に入れ墨でマークした。細胞移植後、毎日ブタの一般状態、体表から腫瘍の有無を観察した。一般状態の悪化が著しく、実験継続不能と判断した場合を人道的エンドポイントとした。細胞移植 1 週間後または 1 ヶ月後にダゾラムで鎮静してから、セボフルランによる深麻酔下において、脱血による安楽死とした。安楽死後、移植部位および主要臓器の肉眼的、組織学的評価を行った。

4. DFAT 造腫瘍性試験

DFAT 造腫瘍性試験に用いる移植用 DFAT は、臨床研究で使用するヒト細胞加工物と同一のものとするため、臨床研究の製造プロトコルに従い調製した DFAT (2×10^7 個) を 5 ml の生理食塩水に懸濁した細胞懸濁液を用いた。IL2rg^{-/-} ブタ (n = 4) を、全身麻酔下に DFAT 懸濁液 5 ml を 23G 注射針装着したシリンジ (1×10^6 個 / 0.25 ml) に分注し、浅殿筋内に 1 cm の間隔で 20 箇所、合計 2×10^7 個 筋肉内注射した。解析時に移植部位の同定を容易にするため、移植部位の四隅に入れ墨でマークした (図 4)。陰性コントロールとして DFAT の代わりに Fibroblast 懸濁液 5 ml を 23 G 注射針装着したシリンジ (1×10^6 個 / 0.25 ml) に分注し、浅殿筋内に 1 cm の間隔で 20 箇所、合計 2×10^7 個 筋肉内注射した (n = 1)。細胞移植後、毎日ブタの一般状態、体表から腫瘍の有無

を観察した。細胞移植 1 ヶ月後に安楽死させ、移植筋肉部位および主要臓器の肉眼的、組織学的評価を行った。

5. DFAT 移植後の生着解析実験

IL2rg^{-/-}ブタ (n = 3)を、全身麻酔下に DFAT 懸濁液 5 ml を 23G 注射針装着したシリンジ (1 × 10⁶ 個 /0.25 ml) に分注し、浅殿筋内に 1 cm の間隔で 20 箇所、合計 2 × 10⁷ 個 筋肉内注射した。細胞移植 1 週間後 (n = 2) および 12 週間後 (n = 1) に安楽死させ、移植筋肉部位の組織学的評価を行った。

6. 移植筋肉組織および主要臓器の肉眼的評価

観察期間を終了した個体は、ミダゾラムで鎮静してから、セボフルランによる深麻酔下において、脱血による安楽死とした。安楽死後は、移植部位の皮下組織および筋肉組織を肉眼で観察してから摘出した。Fibroblast と DFAT 移植の場合は移植範囲内の筋肉を取り出した後、摘出組織の大きさに応じて移植 1 週間後の検体は 6 個、移植 1 ヶ月および 3 ヶ月後の検体は 9 個のブロックにそれぞれ均等に切り出し、10%緩衝ホルマリン液による固定を行った。また胸部と腹部の中央を切開し、胸腺や腸間膜リンパ節の発達を肉眼的に観察した。その後、心臓、肺臓、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓などを摘出し、外観および切断面の肉眼的観察を

行った。また組織学的検討を行うために各臓器の一部を取り出し、生理食塩水で洗浄後 10%緩衝ホルマリン液による固定を行った。

7. 病理組織学的評価

ホルマリン固定組織標本は常法に従いパラフィンによる包埋処理を行い、5 μ m 厚の組織切片標本を作成した。脱パラフィン後、Hematoxylin & Eosin (HE) 染色を行い、光学顕微鏡 (BZ-X710, Keyence)にて観察し、腫瘍性変化、異所性組織形成、炎症反応の有無などを確認した。また酵素抗体法による免疫組織染色では、脱パラフィン処理後、抗原賦活処理としてサンプルを target retrieval solution (DAKO Cytomation)とともに圧力鍋にて 20 分煮沸した。20 分の復温後洗浄し、5%ウマ血清を室温で 30 分反応させ、非特異的反応の阻害処理を行った。その後 1 次抗体としてウサギ抗ヒトビメンチンモノクローナル抗体 (1:100 希釈, SP20, #413551, Nichirei Biosciences) を 4°C 一晩反応させた。PBS で洗浄後、ABC 法 (Horse Anti-Mouse/Rabbit IgG, Vector) にて室温で 30 分ずつ反応させた。PBS で洗浄後、DAB 基質 (Sigma)を用いて光学顕微鏡で観察しながら発色させた。その後ヘマトキシリン (武藤化学) を反応させ、核染色した。光学顕微鏡による観察を行い、ヒト由来細胞の有無とヒト由来細胞異常増殖などを確認した。実験で使用する抗ヒトビメンチン抗体がヒト細胞を特異的に認識し、

ブタ細胞に対する交差反応がないことは、予備検討として行った正常ヒト組織および正常ブタ組織を用いた免疫組織染色にて確認した。また実験時には、陰性コントロールとしてヒト細胞を移植していない浅殿筋組織に対して同じプロトコルで免疫染色を行い、染色性がないことを確認した。造腫瘍性の有無については「移植されたヒト由来細胞が病理組織学的に増殖性が確認され、悪性または良性の腫瘍を形成した」場合、造腫瘍性ありと判定した。

8. 統計解析

血算の結果は、平均 ± 標準誤差として示した。2 群間の連続変数に関する統計解析は t 検定を用いて評価した。P < 0.05 を統計的に有意であると考えた。統計解析は Excel (Microsoft Corporation) と EZR version 1.54 (自治医科大学さいたま医療センター) を用いて行った。

結果

1. IL2rg 欠損ブタの形質解析

はじめに本研究に用いた IL2rg 欠損ブタの免疫組織の発達や末梢血中の白血球数を野生型ブタと比較した。免疫組織の肉眼的観察を行った結果、野生型ブタの気管の両側には胸腺が確認されたが、IL2rg 欠損ブタでは胸腺が欠失し、胸腺の代わりに脂肪様組織が認められた (図 5)。また野生型ブタの腸間膜組織にはリンパ節が散在していたが、IL2rg 欠損ブタの腸間膜にはリンパ節の発達が認められなかった。

末梢血中の白血球数および白血球分画の比較解析を行った結果、野生型ブタに対し、IL2rg 欠損ブタの末梢血白血球は有意に少なかった (WT $11,183 \pm 865/\mu\text{l}$ vs. IL2rg^{-/-} $5,590 \pm 874/\mu\text{l}$, $P < 0.001$) (図 6)。白血球分画検査では、野生型ブタに比べ IL2rg 欠損ブタでは、特にリンパ球数が著明に減少した (WT $7,144 \pm 585/\mu\text{l}$ vs. IL2rg^{-/-} $277 \pm 71/\mu\text{l}$, $p < 0.001$)。一方、好中球数、単球数は、両者で明らかな違いが認められなかった。末梢血単核球のフローサイトメトリー解析でも、野生型ブタに比べ IL2rg 欠損ブタのリンパ球分画は著しく減少していることを確認した (図 7)。

2. IL2rg 欠損ブタに対する HeLa 細胞移植実験

IL2rg 欠損ブタにヒトがん細胞 (HeLa 細胞) を移植し、移植細胞が拒絶されずに生着し、腫瘍形成を来すか検討した。まず耳介部皮下組織に HeLa 細胞を皮下注射し、全身状態および移植部位の観察を行った。移植 1 週間後は検討した全ての個体で全身状態良好であり、局部感染所見も認められなかった。移植 1 ヶ月後には、検討した個体に感染症を疑わせる下痢や右後肢の化膿性炎症所見が認められた。移植 1 ヶ月後の移植部位には、肉眼的にも確認できる皮下腫瘍を認めた (図 8)。移植細胞数 1×10^6 個および 1×10^7 個共に腫瘍形成が認められ、 1×10^7 個移植により形成された腫瘍は、 1×10^6 個よりやや大きい傾向があった。移植 1 週間後、または 1 ヶ月後に腫瘍を摘出し、病理学的解析を行った。その結果、移植 1 週間後の HE 染色像では、基質であるマトリゲル内に包埋された腫瘍細胞の増殖像が認められ、しばしばコロニーを形成していた (図 9A)。移植 1 ヶ月後の HE 染色像では、腫瘍細胞が著明に増殖し腫瘍を形成している所見と、大量の好中球や単球と思われる形態を示す炎症細胞の浸潤が認められた。ヒト由来細胞を同定するために、ヒトビメンチンに対する免疫組織染色を行った結果、移植 1 週間後では、マトリゲル内にビメンチン陽性細胞が集族する所見が認められた (図 9B)。移植 1 ヶ月後では、より大量のヒトビメンチン陽性細胞が細胞塊を形成している所見が認められた。ヒトビメンチン陽性細胞塊の周囲や間隙には、炎症細胞の浸潤を示唆するヒトビメンチン陰性の有核細胞

も多く認められた。

次に IL2rg 欠損ブタの浅殿筋に HeLa 細胞 (1×10^6 または 1×10^7 個) を筋肉内注射し、移植部位の観察を行った。移植 1 ヶ月後に、移植部位の筋肉を摘出したところ、筋肉内に腫瘍様組織を認めた (図 10)。筋肉内に形成された腫瘍組織は、HeLa 細胞を 1×10^6 個および 1×10^7 個移植した個体共に認められた。移植 1 週間後および 1 ヶ月後に移植筋肉組織を摘出し、病理学的解析を行った。その結果、HE 染色像では、移植 1 週間後には、移植部位に一致して筋肉組織中にマトリゲルとともに腫瘍細胞の増殖像が認められた (図 11A)。移植 1 ヶ月後には腫瘍細胞がさらに増殖し腫瘍を形成し、しばしば正常筋肉組織へ浸潤している所見が認められた。ヒトビメンチンに対する免疫組織染色を行った結果、移植 1 週間後には、HE 染色で認められた腫瘍細胞集簇部位に一致してヒトビメンチン陽性細胞が認められた (図 11B)。移植 1 ヶ月後には大量のヒトビメンチン陽性細胞からなる腫瘍形成とヒトビメンチン陽性細胞が筋肉組織中にびまん性に浸潤している像が認められた。また皮下移植と同様にヒトビメンチン陰性を示す炎症細胞の浸潤が認められた。HeLa 細胞の移植細胞数による違いとしては、 1×10^7 個移植では、 1×10^6 個移植に比べ、形成される腫瘍がより大きく、筋肉内組織への浸潤の程度もより高度であった。

HeLa 細胞移植後の遠隔転移の有無を確認するために、皮下移植、または筋肉

内移植後の主要臓器（心臓、腎臓、肺臓、肝臓、脾臓、膵臓）を摘出し、腫瘍形成の有無を観察した。その結果、移植1週間後および移植1ヶ月後に解析したいずれの個体も、各臓器に腫瘍形成を認めなかった（図12）。また各臓器の一部から組織切片標本を作製し、組織学的に腫瘍病変の有無を検討した。その結果、組織学的にも各臓器に腫瘍性病変は認められなかった（図13A）。また脾臓組織標本に対してヒトビメンチンに対する免疫染色を実施した。その結果、脾臓組織中にヒトビメンチン陽性細胞は検出されなかった（図13B）。

以上の結果より、IL2rg欠損ブタにHela細胞を移植すると、皮下移植、筋肉内移植共に拒絶されず、腫瘍形成を示すことが明らかになった。Hela細胞による腫瘍形成は移植部位に局限しており、少なくとも移植後1ヶ月以内に遠隔転移は認められないことが確認された。

3. IL2rg欠損ブタを用いたDFAT造腫瘍性試験

IL2rg欠損ブタに対するHela細胞移植実験の結果から、IL2rg欠損ブタを用いたヒト細胞加工製品の腫瘍形成能の評価が可能であることが示唆された。そこで、IL2欠損ブタに対して臨床研究と同様の投与方法でヒトDFAT筋肉内注射を行い、移植1ヶ月後をエンドポイントとして、移植筋肉組織および主要臓器の腫瘍形成の有無を評価した（n = 4）。陰性コントロールとして、ヒトFibroblast

を同様の実験プロトコルで移植し、腫瘍形成の有無や生着の程度を DFAT 移植した個体と比較検討した (n = 1)。検討した検体の臨床所見のまとめを表 3 に示す。DFAT を移植した 4 頭 (D1~D4)、Fibroblast を移植した 1 頭 (F1) とともに、移植 1 週間後までは、全身状態は良好で感染を疑わせる所見は認められなかった。移植 1 ヶ月後には、DFAT 移植した 4 頭のうち 3 頭 (D1、D2、D4) および Fibroblast 移植した 1 頭 (F1) は全身状態良好で順調な体重増加が認められた。一方、DFAT 移植した 1 頭 (D3) で下痢および体重増加不良が認められた。また DFAT 移植した 4 頭のうち 3 頭 (D2、D3、D4) には移植部位とは異なる部位 (四肢、肩など) に化膿性炎症所見が認められた。DFAT 移植した 1 頭 (D1) および Fibroblast 移植した 1 頭 (F1) は、移植 1 ヶ月後も全身状態良好で局所の感染所見も認められなかった。移植 1 ヶ月後の解剖所見では、全ての検体で胸腺は低形成を示し、リンパ節は確認されなかった。また主要臓器に化膿性炎症など明らかな病変は認められなかった。

移植 1 ヶ月後の移植筋肉組織を肉眼的に観察した結果、DFAT 移植した 4 頭 (D1~D4)、Fibroblast 移植した 1 頭 (F1) 共に、移植筋肉組織に腫瘍形成など明らかな異常所見は認められなかった (図 14)。また開胸、開腹後、主要臓器を摘出し肉眼的に観察した結果、DFAT 移植した 4 頭 (D1~D4)、Fibroblast 移植した 1 頭 (F1) 共に、主要臓器 (心臓、腎臓、肺臓、肝臓、脾臓、膵臓) に腫瘍形成な

どの異常所見を認めなかった (図 15、16)。移植 1 ヶ月後の移植部位の筋肉組織および主要臓器の肉眼所見のまとめを表 4 に示す。

移植 1 ヶ月後の移植筋肉組織を組織学的に観察した結果、DFAT 移植した 4 頭 (D1~D4)、Fibroblast 移植した 1 頭 (F1) 共に、移植筋肉組織に腫瘍性病変や炎症所見など明らかな異常所見は認められなかった (図 17)。また移植 1 ヶ月後の主要臓器の組織学的検討を行った結果、肉眼的所見と同様に検討したすべての検体において腫瘍性病変や炎症所見など明らかな異常所見は認められなかった (図 18)。移植 1 ヶ月後の移植部位の筋肉組織および主要臓器の組織学的所見のまとめを表 5 に示す。以上の結果より、DFAT 筋肉内注射により、少なくとも 1 ヶ月間までは、移植部位および主要遠隔臓器において腫瘍形成が起こらないことが示唆された。

次に移植細胞の生着の有無を明らかにするために、移植 1 ヶ月後の移植筋肉組織に対しヒトビメンチンに対する免疫組織染色を行った。その結果、DFAT 移植した 4 頭のうち 3 頭 (D1、D2、D4) と Fibroblast 移植した 1 頭 (F1) は移植筋肉組織に少量ながらヒトビメンチン陽性細胞が検出された (図 19、表 5)。DFAT 移植した検体の中には、脂肪細胞様の形態を示すビメンチン陽性細胞も検出された (図 19 左図)。一方、移植 1 ヶ月後の脾臓のヒトビメンチン免疫組織染色では、検討したすべての検体において、ヒトビメンチン陽性細胞は検出されなか

った (図 20)。以上の結果より、筋肉内投与された DFAT は fibroblast と同様に少なくとも 1 ヶ月間は移植部位に局在し、生存していることが明らかになった。

次に移植した DFAT の経時的局在変化を明らかにする目的で、IL2rg 欠損ブタに対して同様のプロトコルで DFAT を移植し、移植後 1 週間および 12 週間の時点で安楽死処置を行い、移植筋肉組織を摘出し組織学的検討を行った。その結果、移植 1 週間後の移植筋肉組織には比較的多数のヒトビメンチン陽性細胞が集族している所見が認められた。移植 1 ヶ月後にはヒトビメンチン陽性細胞は明らかに減少しており、陽性細胞の集族所見はほとんど検出されなかった。移植 12 週間後にも、数は非常に少ないもののヒトビメンチン陽性細胞が検出された。以上の結果より、IL2rg 欠損ブタ筋肉内に移植された DFAT は、少なくとも移植後 12 週間まで移植部位に生着できることが示された。

考察

本研究では IL2rg 欠損ブタにヒト子宮頸がん由来する HeLa 細胞を移植する実験により、ブタ体内に HeLa 細胞が生着し腫瘍増殖することを明らかにした。HeLa 細胞は皮下注射のみならず、筋肉内注射でも腫瘍形成が認められた。一方、正常細胞であるヒト皮膚由来 Fibroblast を移植した場合には、腫瘍形成は起こらず、少なくとも移植後 1 ヶ月間は移植部位に生存していることが確認された。これらの結果より、IL2rg 欠損ブタがヒト細胞の *in vivo* 造腫瘍性試験として利用できることが示唆された。

これまでに免疫不全ブタに対してヒトがん細胞の生着を検討した研究がいくつか報告されている [30, 31]。Basel ら [30] は、自然発症型 ARTEMIS ノックアウト SCID ブタにヒトメラノーマ細胞 (A375SM 細胞) やヒト膵癌細胞 (PANC-1) を移植した結果、検討した 6 頭すべてで移植 22 日後に腫瘍形成が確認されたと報告した。Boettcher ら [31] は、ART 遺伝子をノックアウトした生後 1-5 日の SCID 仔ブタに卵巣がん細胞 (OSPC-ARK1 細胞) を移植した結果、4 頭中 3 頭にがん細胞の増殖が認められたと報告した。Lee ら [32] は、RAG2 遺伝子をノックアウトした SCID ブタにヒト iPSC を移植した結果、奇形腫を形成させることに成功したと報告した。今回の研究では、IL2rg 欠損ブタを用いて、皮下または筋肉内に移植されたヒトがん細胞 (HeLa 細胞) が、移植 1 週間後および 1 ヶ月後の時点で、腫瘍

形成をきたすことを初めて明らかにした。

HeLa 細胞はヒト子宮頸部類上皮がんより樹立された細胞株である。正常免疫能を有する異種動物の体内では生着、増殖することはないが、胸腺を摘出し免疫機能を低下させた動物の体内では生着、増殖させることができることが知られており、重度免疫不全マウスを用いた造腫瘍性試験の陽性対照細胞として頻用されている。造腫瘍性試験の国際的ガイドラインである WHO TRS No. 878 Annex 1 では、ヌードマウスに対し、陽性対照細胞として 1×10^7 個の HeLa 細胞を皮下移植することを標準プロトコルとしている [5]。今回、IL2rg 欠損ブタでは移植する HeLa 細胞の細胞数が、 1×10^7 個のみならず $1/10$ の 1×10^6 個でも腫瘍形成が起こることが示された。この所見は、IL2rg 欠損ブタが、少なくともヌードマウスと同等の検出感度でヒトがん細胞を検出できることを示唆している。ヌードマウスの場合、50%の確率で腫瘍を形成させるために必要な HeLa 細胞の細胞数は 40 万個 (4×10^5 個) であることが報告されている [10]。今後、より少数の HeLa 細胞を IL2rg 欠損ブタに移植することにより、どの程度鋭敏にヒトがん細胞を検出できるか明確にすることが望まれる。同時に、造腫瘍性試験として種々のがん細胞に広く適応するためには、HeLa 細胞以外のヒトがん細胞を用いた検討も必要であると考えらる。

本研究では、IL2rg 欠損ブタを用いて臨床試験と同じ、投与部位、細胞数、投

与経路、投与方法にてヒト DFAT を移植し、腫瘍形成の有無を検討した（表 2）。その結果、DFAT は移植部位、主要遠隔臓器において腫瘍性増殖は認められなかった。本研究で用いた DFAT の細胞数は 2×10^7 個/頭であり、この投与量は、約 67 kg の患者に臨床研究の高用量（ 3×10^5 個/kg）を投与した細胞数に該当する。これらの結果から、臨床研究のプロトコルに従い投与される DFAT は安全に筋肉内投与できることが示唆された。再生医療等製品の移植安全性を正確に評価するためには、移植部位の微小環境の影響をできるだけ一致させるために、臨床投与部位に相当する部位での細胞の挙動を評価することが重要であると報告されている [33]。本研究結果は、NOG マウスを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験の結果を補完するデータとなりうると考えられる。実際に臨床研究開始前に実施した PMDA レギュレトリーサイエンス戦略相談対面助言において、本実験データを DFAT の移植安全性試験の一つとして提示しており、その結果、臨床研究で使用する DFAT の品質および安全性について、機構との合意を得るに至っている。将来的に *in vivo* 造腫瘍性試験における IL2rg 欠損ブタの利用方法として、まず国際ガイドラインで規定された検討数 10 頭前後の NOG マウスを用いた方法で造腫瘍性の有無をスクリーニングした上で、マウスでは検討が困難な臨床と同じ移植条件（投与ルート、投与デバイス、移植組織など）による試験を数頭の IL2rg 欠損ブタを使って評価するといった利用方法が想定される。

本研究では、臨床研究と同様の方法で筋肉内に移植した DFAT が、移植後 12 週間まで検出することができた。この結果から、DFAT は少なくとも 12 週間は移植部位に局在する可能性が示唆された。また本研究により、IL2rg 欠損ブタはヒトがん細胞のみならず、ヒト Fibroblast といった体細胞も拒絶せずに長期間生着させることが明らかになった。この結果は、IL2rg 欠損ブタが、がん研究のみならず他のいろいろなヒト疾患研究に有益な研究ツールとなりうることを期待される。例えば、ヒト肝細胞を本免疫不全ブタの体内に移植し生着させた後に、B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルスを感染させることにより、これらの抗ウイルス薬の開発が可能となることが予想される。また未成熟なヒト造血幹細胞を本免疫不全ブタに移植し、ヒト免疫細胞を保有するキメラピッグを作出することにより、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus: HIV) などに起因するヒト特異的血液疾患に対する治療法の開発などに利用できると期待される。

今回の IL2rg 欠損ブタを用いた DFAT 造腫瘍性試験では、以前実施した NOG マウスを用いた試験に比べ、移植部位のヒト DFAT の数は著しく少なかった。この理由の一つとして、IL2rg 欠損ブタは B 細胞が残存していることから、異種細胞に対する免疫反応が NOG マウスより起こりやすいことが考えられる。また、DFAT は MSC や ASC と同様に障害部位に効率的に集積し一定期間生着するが、組織の

正常化に伴い速やかに消失することが明らかになっている。今回の実験では、DFAT を健常骨格筋組織に移植しているため移植後早期にアポトーシスを起こし吸収消失したと考えられる。最近、MSC 移植の治療効果は、移植細胞自身の作用のみならず、アポトーシスを起こした MSC に対する宿主細胞の免疫反応も重要であることが報告されている [34]。また今回の検討において、Hela 細胞移植後、移植部位に炎症細胞の浸潤が認められたのに対し、DFAT や fibroblast を移植した部位には炎症細胞の浸潤が認められなかった。この理由として DFAT や fibroblast では Hela 細胞と異なり、治癒しない創傷組織に類似したがん微小環境を形成しなかったことが挙げられる。特に DFAT では MSC や ASC と同様に免疫制御や抗炎症に作用する液性因子を分泌することから、炎症細胞の浸潤プロセスが誘導されなかったと推測される。

IL2rg 欠損ブタを用いたヒト細胞の造腫瘍性試験を確立する上で重要な課題は、どのように感染症を防御するかということがある。IL2rg 欠損ブタは通常の飼育環境では早期に重篤な感染症を起こすため、生存期間は 2 週間から 7 週間であることが報告されている [12]。このため、SCID ブタの飼育には感染防御対策を施した専用の施設と適切な無菌操作が必要であることが提唱されている [35]。本研究では、免疫不全ブタ専用クリーンラックシステムを用いて、清浄度が高い環境で IL2rg 欠損ブタを飼育した。また感染症予防目的で、各種抗生物

質や整腸剤を混合した飼料で飼育した。このような対策により、本研究では多くの個体で1ヶ月以上安定して実験を行うことが可能であった。一方、移植後1ヶ月間観察した5検体中3検体で何かしらの局所感染所見が認められ、そのうち1検体では消化器感染症に起因すると思われる体重増加不良が認められた。このように、今回のIL2rg欠損ブタを使ったin vivo造腫瘍性試験では、4週間とといった比較的短期間における造腫瘍性を評価することは可能である一方、より長期間の造腫瘍性を評価したり、移植細胞がドナー体内環境に与える影響(細胞毒性)を正確に評価することは難しいと思われた。今後、安定してより長期間の評価を可能とする飼育法や試験法の改良が望まれる。例えば今回使用した飼料にはグラム陽性球菌および一部のグラム陰性桿菌に効果がある抗生物質(リンコマイシン、CTC散)を混合していたが、これだけでは十分ではない可能性があり、真菌などより広い病原体に対する抗菌薬を予防的に投与することも検討すべきと考える。

本研究のLimitationとして、今回、重度免疫不全動物を用いることから全身状態低下や感染症のリスクを考慮した結果、大腿動脈切除などによる下肢虚血は作成せず、健常の筋肉組織にDFATを投与し評価を行った。今後、より臨床の病態に近い下肢虚血条件下における移植安全性についても評価することが望まれる。

まとめ

本研究では、重度免疫不全を呈する IL2rg 欠損ブタにヒトがん細胞(Hela 細胞)を異種移植し、がん細胞による腫瘍性増殖が起こるか検討した。その結果、移植された Hela 細胞は、皮下移植、筋肉内移植共に拒絶されず、移植 1 週間後から移植部位に腫瘍形成を示すことが明らかになった。また現在、細胞医薬品として開発が行われているヒト DFAT を臨床試験と同様の投与方法で IL2rg 欠損ブタに移植し、その腫瘍形成性の有無を検討した。その結果、ヒト DFAT は移植後 1 ヶ月の時点で移植筋肉内に検出されるものの、移植部位および主要遠隔臓器に腫瘍形成性は認められなかった。以上の結果より、臨床研究のプロトコルに従い投与される DFAT は安全に筋肉内投与できることが示唆された。IL2rg 欠損ブタは、既存の免疫不全マウスの欠点を補完し、移植ヒト細胞の造腫瘍性をより臨床プロトコルに近い形で評価できる動物モデルとなりうることが示唆された。

謝辞

本研究は、所属する日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野で実施したものです。本研究を遂行するにあたり、熱心な御指導と適切な御助言を頂きました日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野 松本太郎教授、李予昕准教授に深く御礼申し上げます。また、学会発表の機会も与えて下さいましたことを重ねて御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、実験の核となる貴重な遺伝子改変ブタを提供して下さいました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 鈴木俊一先生、淵本大一郎先生に深く御礼申し上げます。免疫不全ブタの長期飼育について御助言を頂きました日本大学生物資源科学部 大西彰教授、三角浩司准教授に深く御礼申し上げます。研究報告会や日々のディスカッションで御意見を頂きました、日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野 風間智彦先生、長岡悠紀先生、萩倉一博先生、山元智衣先生に深く御礼申し上げます。また医学研究支援部門ラボラトリーアニマル系動物飼育室・動物実験室のスタッフ方には、日々体調が変化する免疫不全ブタの飼育や解剖の支援をして頂きました。深く御礼申し上げます。

图表

表 1. in vivo 造腫瘍性評価における試験条件
(Tsunoda S et al. RSMP 8(2):123-128, 2018 [3])

被験製品	最終製品
使用動物	げっ歯類由来の免疫不全動物（ヌードマウス/ラット, SCID, NOD/SCID/ γ Cnull 等）
評価例数 移植量	最終製品移植群 1 用量（10匹/群程度） 技術的に可能な最大量 ⇒一般毒性評価における MTD・MFD の考え方を参照
移植回数	1 回 ⇒ハザード評価の観点 臨床適用回数 ⇒一般毒性と同時評価する場合 ^{注)}
移植部位	臨床適用部位 代替部位 ⇒臨床適用部位と組織構造の類似性等 ⇒ハザードが適切に評価可能な部位
観察期間	一般的な製品 ⇒4～16週間 複雑な製造工程・一般的な性質と相違・長期間生着等 ⇒16週を超える期間 観察期間の妥当性 ⇒移植部位におけるヒト細胞の消失確認等
検査方法	一般毒性試験で実施する通常の病理組織学的検査（H.E 染色） ⇒移植部位と全身の器官・組織 ⇒異所性組織, 腫瘍性（良性・悪性）の有無 異所性・腫瘍性組織が観察された場合（免疫組織学的染色） ⇒抗ヒト抗体：ヒト由来細胞の生着・残存 ⇒増殖マーカー（抗 PCNA 抗体等）：増殖性の有無

^{注)}一般毒性評価において免疫不全動物を使用する場合、一般毒性試験に造腫瘍性評価を組み込むことで、同一試験内での評価が可能な場合が多い

表 2. DFAT 移植方法に関する臨床試験と前臨床移植安全性試験との比較

	NOGマウス安全性試験 (WHO TRS No878準拠)	臨床試験	IL2rg欠損ブタ安全性試験
注射細胞数	1 x 10 ⁷ /頭	低用量群 1 x 10 ⁵ /Kg 高用量群 3 x 10 ⁵ /Kg	2 x 10 ⁷ /頭
注射箇所	1ヶ所	20ヶ所	20ヶ所
注射液量	0.2ml	5ml (0.25ml x 20ヶ所)	5ml (0.25ml x 20ヶ所)
注射部位	右側腹部	下肢	臀部
注射方法	皮下注射	筋肉内注射	筋肉内注射

表 3. DFAT 移植による造腫瘍性試験（臨床所見）

個体	BW (Kg)		全身所見	解剖所見				局部感染所見
	pre	post		移植部位	胸腺	リンパ節	各臓器	
D1	11.3	22	良好	病変認めず	低形成	確認できず	病変認めず	病変認めず
D2	11.8	30	良好	病変認めず	低形成	確認できず	病変認めず	左前肢に筋肉内膿瘍病変あり、 左後肢に化膿性炎症巣あり
D3	9.8	13.1	下痢 るいそう	病変認めず	低形成	確認できず	病変認めず	右前肢と両後肢に複数の化膿 性病変あり
D4	8.7	19.1	良好	病変認めず	低形成	確認できず	病変認めず	左肩部に筋肉内膿瘍あり
F1	7.6	18	良好	病変認めず	低形成	確認できず	病変認めず	病変認めず

表 4. DFAT 移植による造腫瘍性試験（腫瘍形成肉眼所見）

個体	移植細胞	腫瘍形成肉眼所見						
		移植部位 筋肉	脾臓	肺臓	心臓	肝臓	腎臓	膵臓
D1	DFAT	-	-	-	-	-	-	-
D2	DFAT	-	-	-	-	-	-	-
D3	DFAT	-	-	-	-	-	-	-
D4	DFAT	-	-	-	-	-	-	-
F1	Fibroblast	-	-	-	-	-	-	-

表 5. DFAT 移植による造腫瘍性試験（組織所見）

個体	移植細胞	細胞異常増殖							hVimentin ⁺ 細胞	
		移植部位	脾臓	肺臓	心臓	肝臓	腎臓	脾臓	移植部位	脾臓
D1	DFAT	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D2	DFAT	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D3	DFAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D4	DFAT	-	-	-	-	-	-	-	+	-
F1	Fibroblast	-	-	-	-	-	-	-	+	-

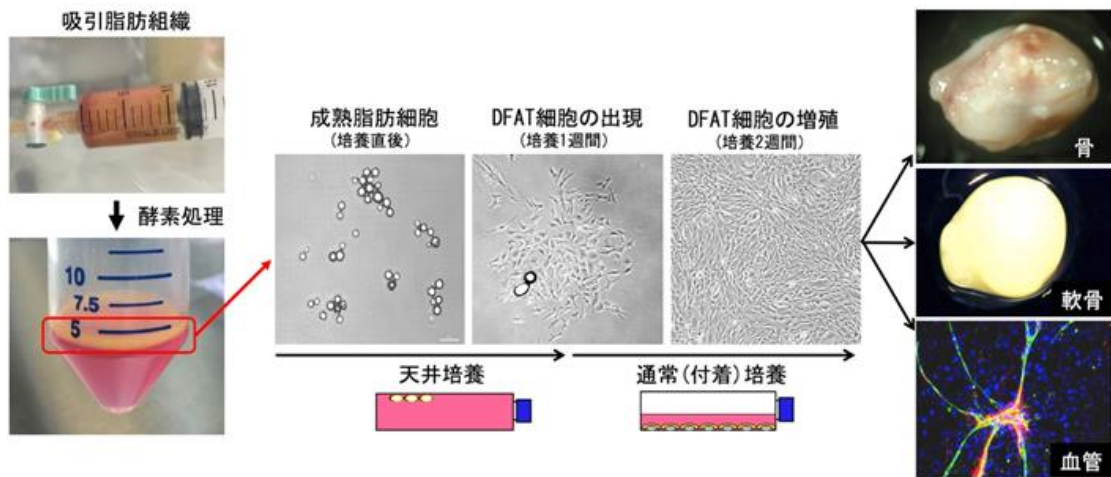


図 1. 脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)製造法の概略

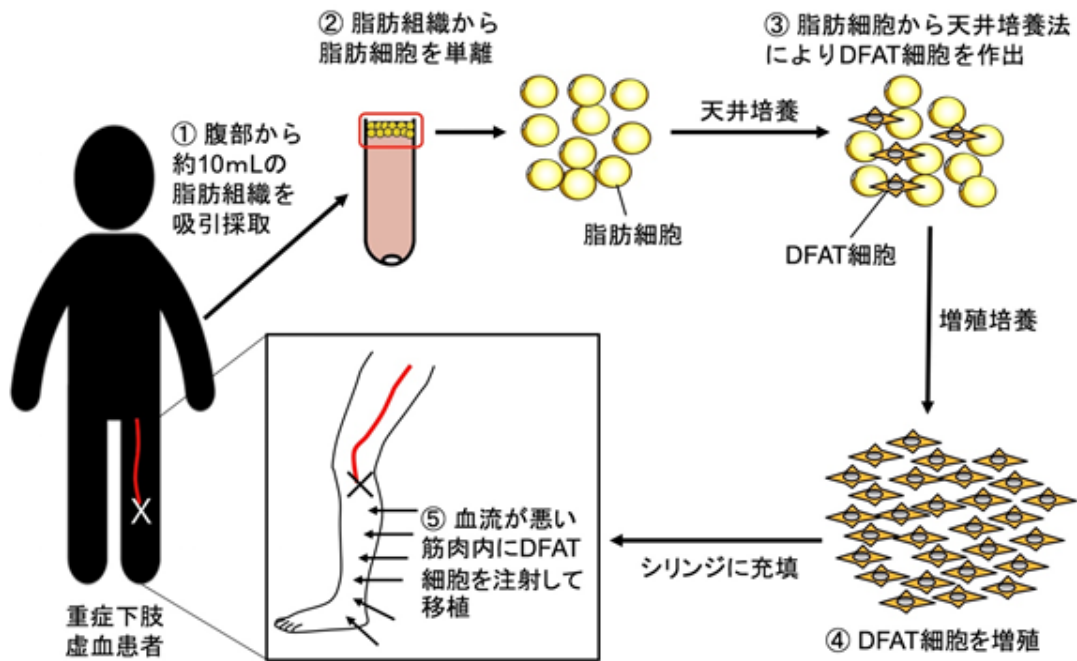


図 2. 重症下肢虚血に対する自家 DFAT 移植



図 3. 免疫不全ブタ用クリーンラックシステムと飼育ケージの内部

免疫不全ブタ専用飼育室は、クリーンエリアを確保し免疫不全ブタの長期飼育を可能とする構造となっている。専用飼育室入口には扉内側に軟質塩ビカーテンを取り付け二重扉の構造となっている。飼育装置は、特注型免疫不全ブタ用クリーンラックシステムを設置している。ブタ飼育用ケージはステンレス製であり、ブタのサイズに合わせて交換可能な樹脂コーティングスノコを備えている。糞尿はスノコより約 30 cm 下の床に洗い流し、洗浄と消毒が容易な構造となっている。また飼育ケージ内は清浄度が高い環境とする必要があることから、側面を開閉可能な軟質塩ビカーテンで覆い、HEPA フィルター簡易ファンユニットからの送風をケージ天井部分の多孔板付送風ボックスより均等に送風するシステムとなっている。排気はケージ下部より自然排気とし、換気回数を 20 回/時間に設定している。自動給水システムは 5 μ m のフィルターを通しフラッシング式となっている。

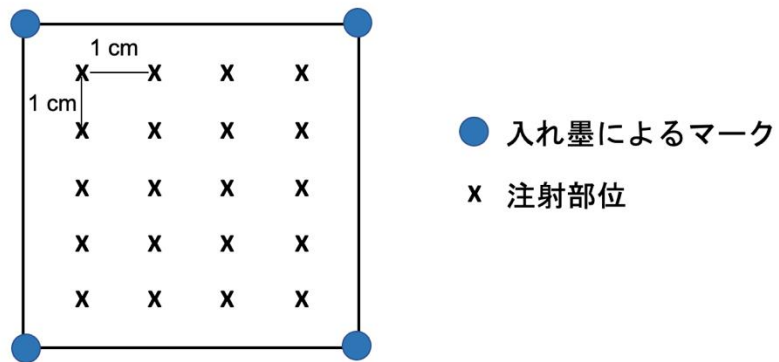


図 4. IL2rg 欠損ブタを用いた DFAT 造腫瘍性試験の移植方法

IL2rg 欠損ブタ (IL2rg^{-/-}) の浅臀筋細胞移植部位に 5 × 4 cm の四角を書き、この四角内に 1 cm の間隔で、注射部位 20 箇所をマークし、その各マーク部位に、DFAT (1 × 10⁶ 個) または fibroblast (1 × 10⁶ 個) の細胞懸濁液 0.25 ml を筋肉内注射した。解析時に移植部位の同定を容易にするため、四角の四隅を入れ墨でマークした。

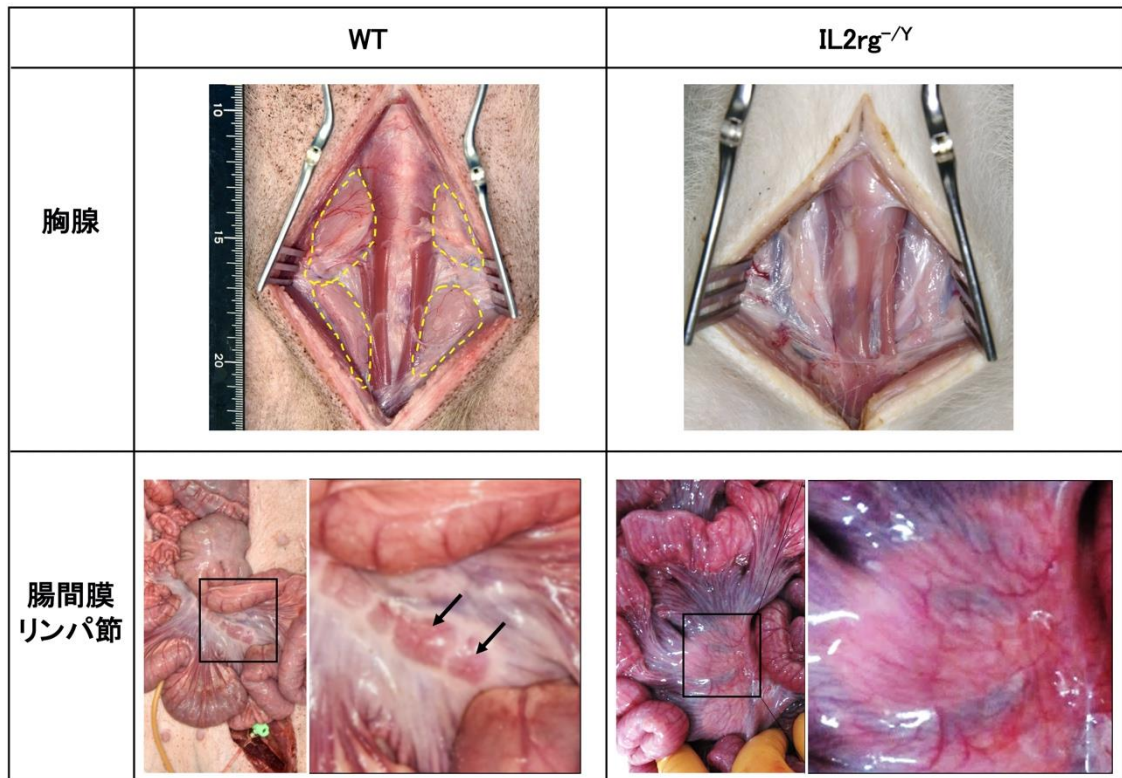


図 5. IL2rg 欠損ブタの免疫組織の肉眼的所見

上図：野生型ブタ (WT) および IL2rg 欠損ブタ (IL2rg^{-/-}) における胸腺の状態。破線部位は胸腺を示す。下図：野生型ブタ (WT) および IL2rg 欠損ブタ (IL2rg^{-/-}) における腸間膜リンパ節の状態。矢印は腸間膜リンパ節を示す。

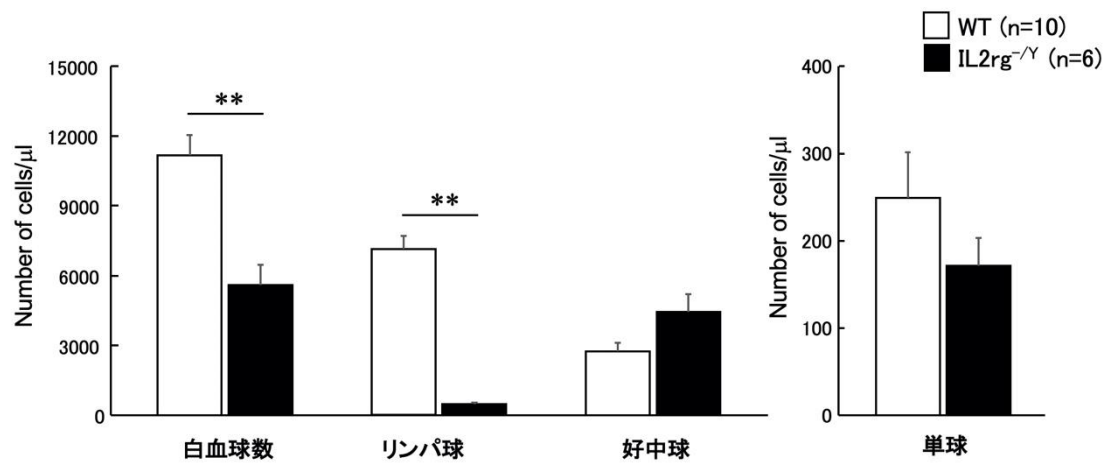


図 6. IL2rg 欠損ブタの末梢血白血球数、白血球分画検査

野生型ブタ (WT) および IL2rg 欠損ブタ (IL2rg^{-/-}) から採血を行い、末梢血白血球数および白血球分画 (リンパ球数、好中球数、単球数) の測定を行った。*****p* < 0.001.**

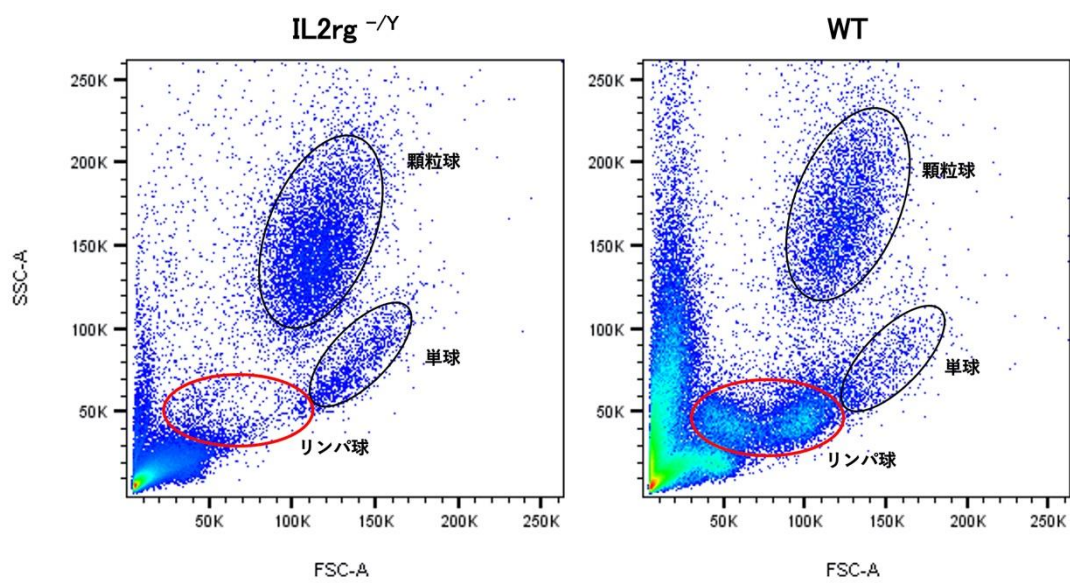


図7. IL2rg 欠損ブタの末梢血フローサイトメトリー検査

野生型ブタ (WT) および IL2rg 欠損ブタ (IL2rg^{-/-}) から採血を行い、末梢血単核球のフローサイトメトリー解析を行った。

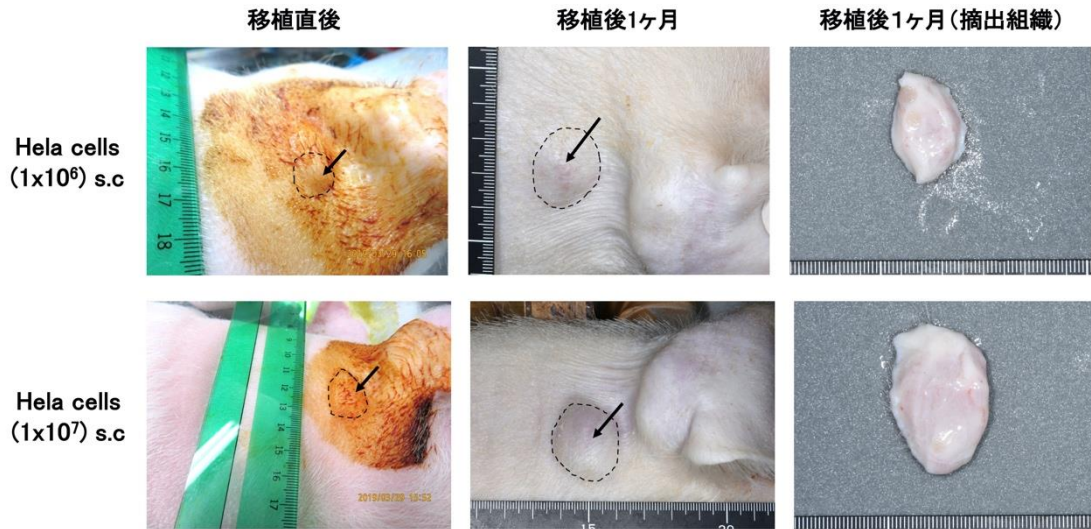


図 8. IL2rg 欠損ブタに対する Hela 細胞皮下移植後の肉眼所見

IL2rg 欠損ブタの耳介部皮下組織に Hela 細胞 (1×10^6 または 1×10^7 個) を皮下注射した。移植直後および移植後 1 ヶ月の移植部位の肉眼像、移植後 1 ヶ月の時点で形成された腫瘍組織の肉眼像を示す。破線および矢印は Hela 細胞移植による硬結を示す。

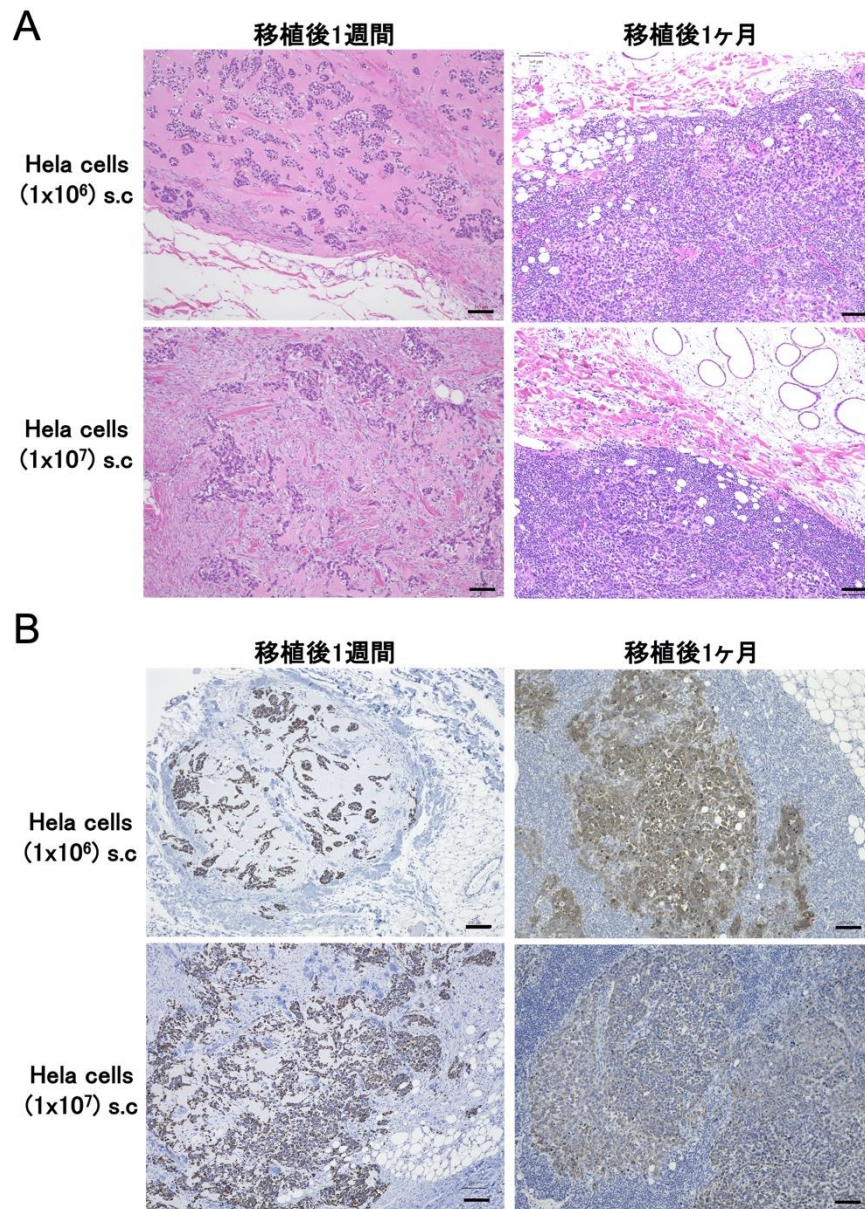


図9. IL2rg 欠損ブタに対する HeLa 細胞皮下移植後の組織学的所見(移植部位)

IL2rg 欠損ブタの耳介部皮下組織に HeLa 細胞 (1×10^6 または 1×10^7 個) を皮下注射した。移植後 1 週間および移植後 1 ヶ月に皮下に形成された腫瘍組織を摘出し、切片標本を作成後、組織学的検討を行った。A: 腫瘍組織の HE 染色像。Scale bars: $100 \mu\text{m}$ 。B: 腫瘍組織のヒトビメンチンに対する免疫組織染色像。Scale bars: $100 \mu\text{m}$ 。

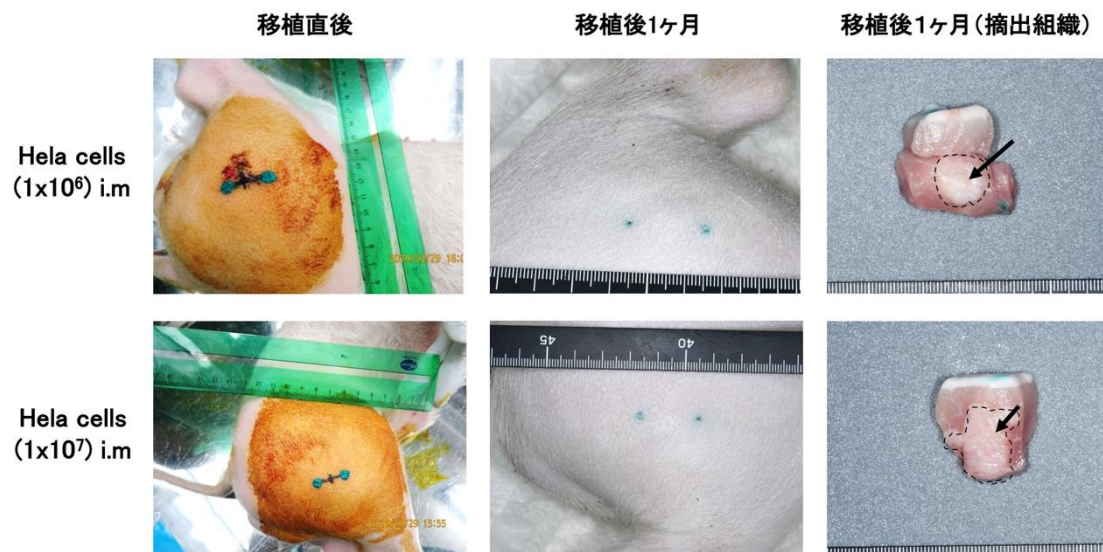


図 10. IL2rg 欠損ブタに対する HeLa 細胞筋肉内移植後の肉眼所見

IL2rg 欠損ブタの臀部（浅臀筋）筋肉組織に HeLa 細胞（ 1×10^6 または 1×10^7 個）を筋肉内注射した。移植直後および移植後 1 ヶ月の移植部位の肉眼像、移植後 1 ヶ月の時点で形成された腫瘍組織の肉眼像を示す。破線および矢印は形成された腫瘍組織を示す。

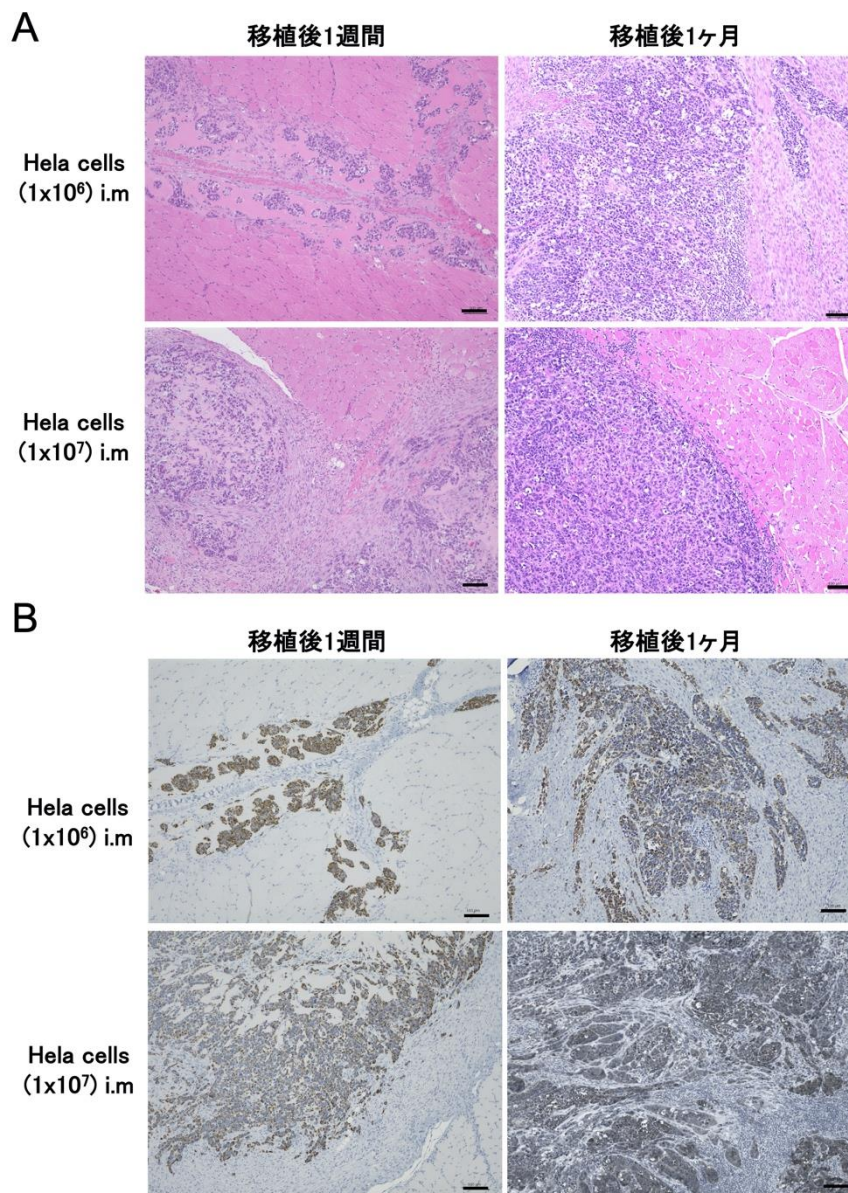


図 11. IL2rg 欠損ブタに対する HeLa 細胞筋肉内移植後の組織学的所見
(移植部位)

IL2rg 欠損ブタの臀部（浅臀筋）筋肉組織に HeLa 細胞（ 1×10^6 または 1×10^7 個）を筋肉内注射した。移植後 1 週間および移植後 1 ヶ月に移植部位筋肉組織を摘出し、切片標本を作成後、組織学的検討を行った。A: 移植筋肉組織の HE 染色像。Scale bars: $100 \mu\text{m}$ 。B: 移植筋肉組織のヒトビメンチンに対する免疫組織染色像。Scale bars: $100 \mu\text{m}$ 。

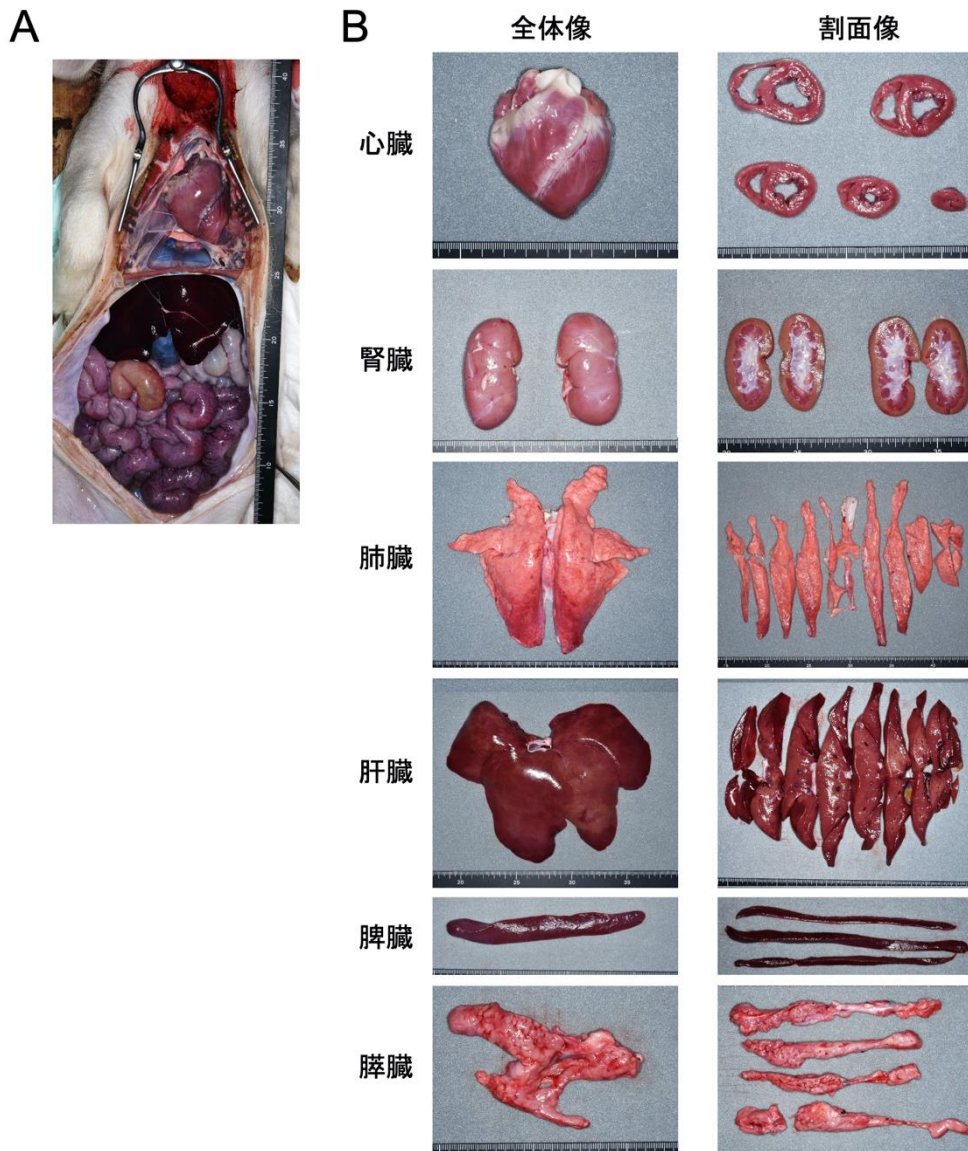


図 12. IL2rg 欠損ブタに対する HeLa 細胞移植後の肉眼的所見（主要臓器）

IL2rg 欠損ブタの耳介部皮下組織および臀部（浅臀筋）筋肉組織に HeLa 細胞（ 1×10^6 または 1×10^7 個）を注射した。移植後 1 週間および移植後 1 ヶ月に主要臓器（心臓、腎臓、肺臓、肝臓、脾臓、膵臓）を摘出し、腫瘍形成の有無を観察した。A: 移植後 1 週間の開腹時の肉眼像。B: 移植後 1 週間の各臓器の肉眼像。

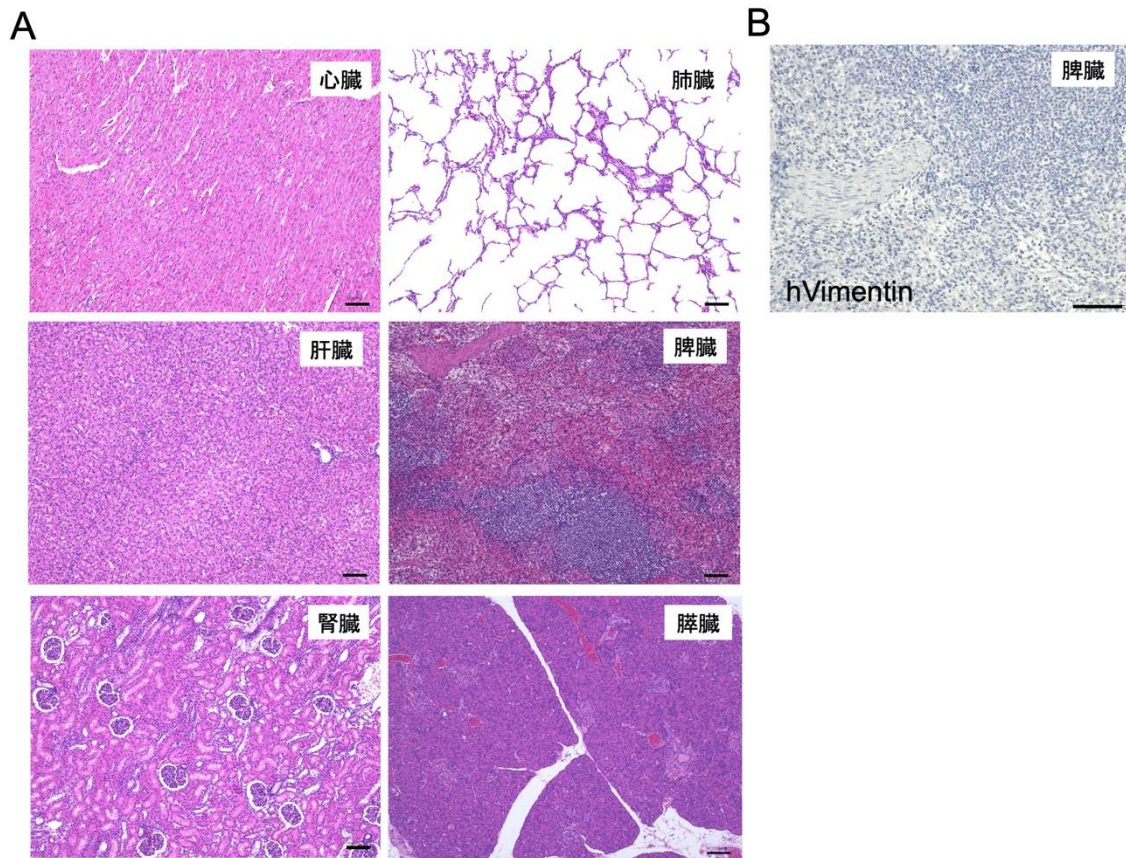


図 13. IL2rg 欠損ブタに対する HeLa 細胞移植後の組織学的所見（主要臓器）

IL2rg 欠損ブタの耳介部皮下組織および臀部（浅臀筋）筋肉組織に HeLa 細胞（ 1×10^6 または 1×10^7 個）を注射した。移植後 1 週間および移植後 1 ヶ月に主要臓器（心臓、腎臓、肺臓、肝臓、脾臓、胸腺）を摘出後、組織切片標本を作成し、腫瘍形成の有無を観察した。A: 各臓器の HE 染色像。Scale bars: $100 \mu\text{m}$ 。 B: 脾臓のヒトビメンチンに対する免疫組織像。Scale bar: $100 \mu\text{m}$ 。

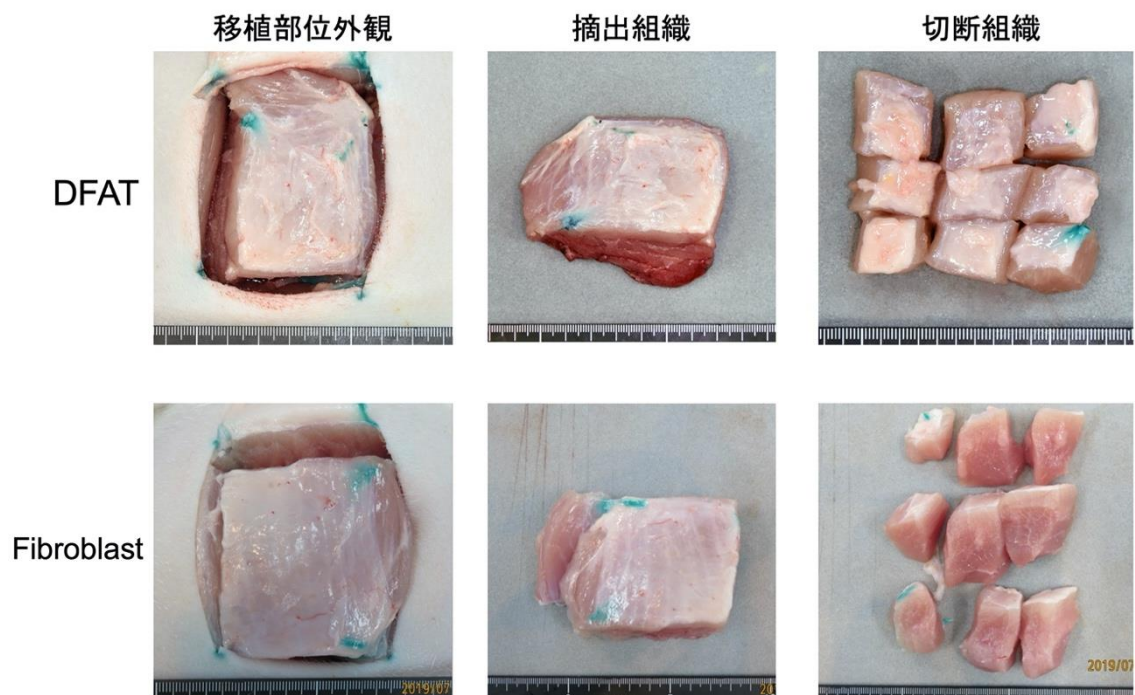


図 14. IL2rg 欠損ブタを用いた DFAT 造腫瘍性試験
(移植部位の肉眼的所見)

IL2rg 欠損ブタに対し、DFAT (n=4) または Fibroblast (n=1) をそれぞれ 1×10^6 個 / 0.25 mL 生理食塩水に希釈し、浅臀筋 20 箇所合計 2×10^7 個を筋肉内注射した。移植 1 ヶ月後に移植筋肉組織および主要臓器を摘出し、腫瘍形成の有無を肉眼的および組織学的に検討した。DFAT 移植した個体と Fibroblast 移植した個体の移植 1 ヶ月後の移植筋肉組織の肉眼像（移植部位外観、摘出組織、切断組織）を示す。

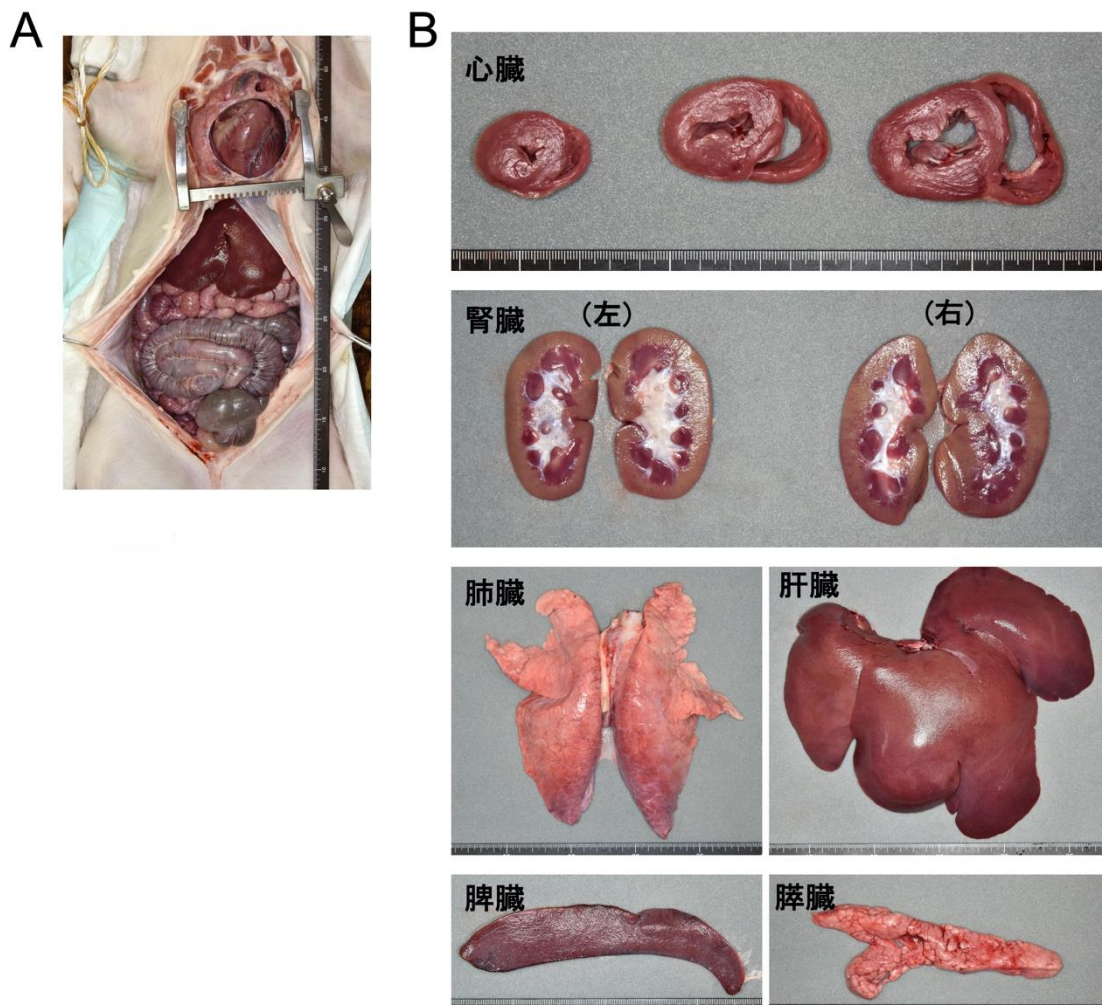


図 15. IL2rg 欠損ブタを用いた DFAT 造腫瘍性試験
(DFAT 移植した個体の主要臓器の肉眼的所見)

IL2rg 欠損ブタに対し、DFAT ($n = 4$) または Fibroblast ($n = 1$) をそれぞれ 1×10^6 個 / 0.25 mL 生理食塩水に希釈し、浅臀筋 20 箇所合計 2×10^7 個を筋肉内注射した。移植 1 ヶ月後に移植筋肉組織および主要臓器を摘出し、腫瘍形成の有無を肉眼的および組織学的に検討した。DFAT 移植した個体の移植 1 ヶ月後の開腹時の肉眼像と主要臓器 (心臓、腎臓、肺臓、肝臓、脾臓、膵臓) の肉眼像を示す。

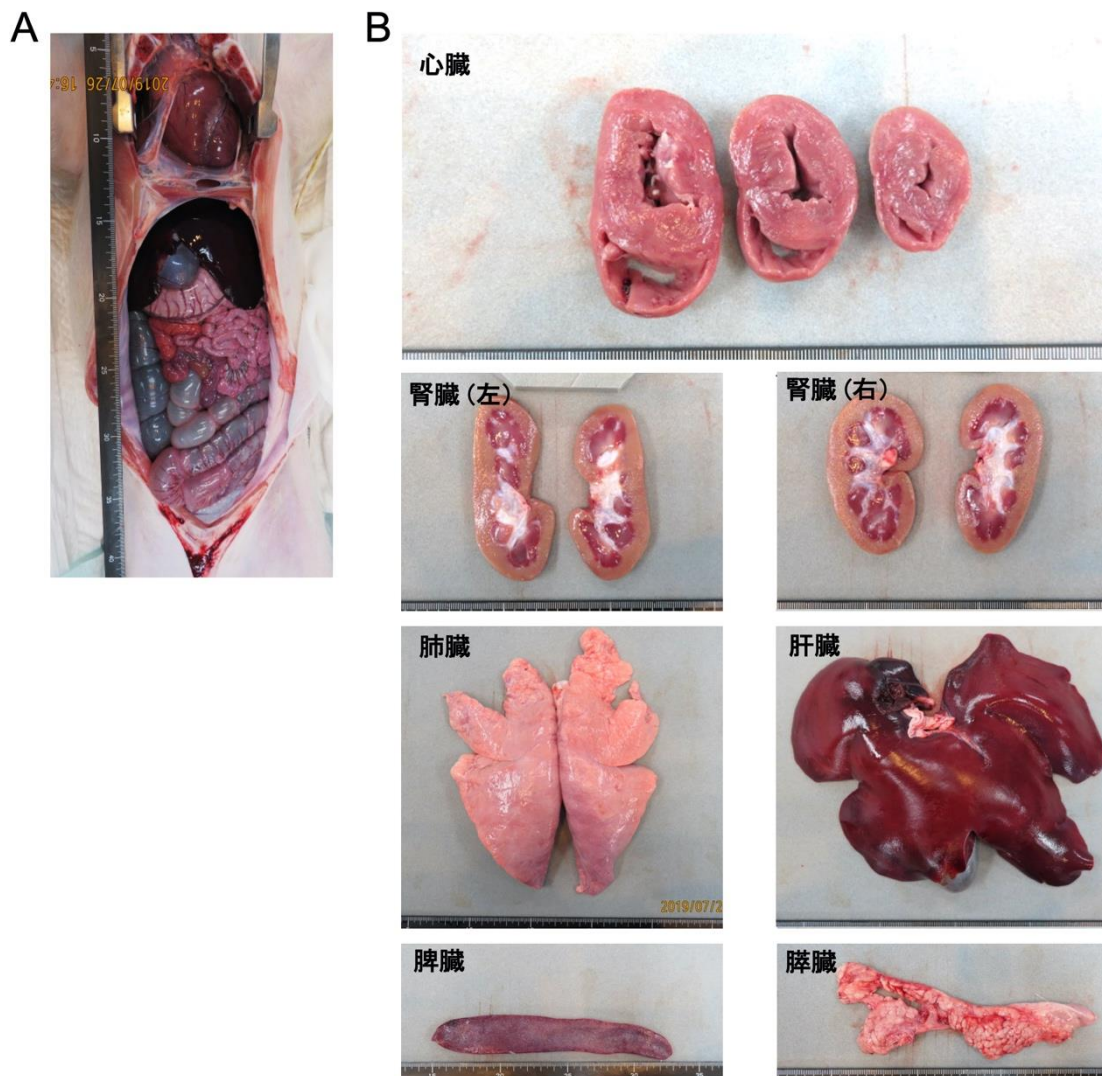


図 16. IL2rg 欠損ブタを用いた DFAT 造腫瘍性試験
(Fibroblast 移植した個体の主要臓器の肉眼的所見)

IL2rg 欠損ブタに対し、DFAT ($n = 4$) または Fibroblast ($n = 1$) をそれぞれ 1×10^6 個 / 0.25 mL 生理食塩水に希釈し、浅臀筋 20 箇所合計 2×10^7 個を筋肉内注射した。移植 1 ヶ月後に移植筋肉組織および主要臓器を摘出し、腫瘍形成の有無を肉眼的および組織学的に検討した。Fibroblast 移植した個体の移植 1 ヶ月後の開腹時の肉眼像と主要臓器 (心臓、腎臓、肺臓、肝臓、脾臓、膵臓) の肉眼像を示す。

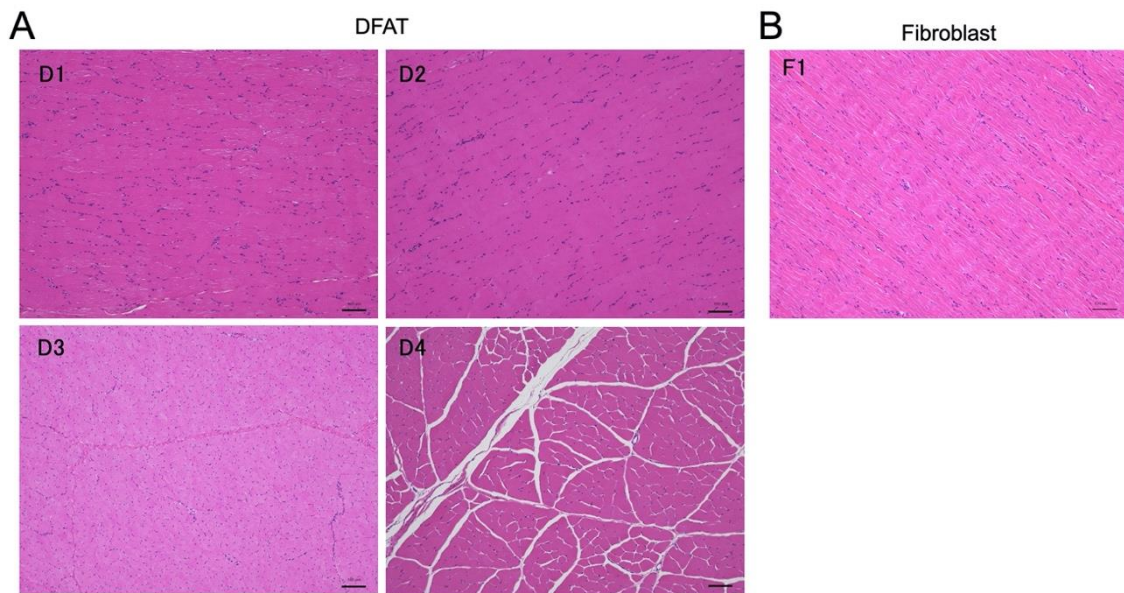


図 17. IL2rg 欠損ブタを用いた DFAT 造腫瘍性試験
(移植筋肉組織の組織学的所見)

IL2rg 欠損ブタに対し、DFAT (n = 4) または Fibroblast (n = 1) をそれぞれ 1×10^6 個 / 0.25 mL 生理食塩水に希釈し、浅臀筋 20 箇所合計 2×10^7 個を筋肉内注射した。移植 1 ヶ月後に移植筋肉組織および主要臓器を摘出し、腫瘍形成の有無を肉眼的および組織学的に検討した。DFAT 移植した個体および Fibroblast 移植した個体の移植 1 ヶ月後の移植筋肉組織の HE 染色像を示す。
Scale bars: 100 μ m.

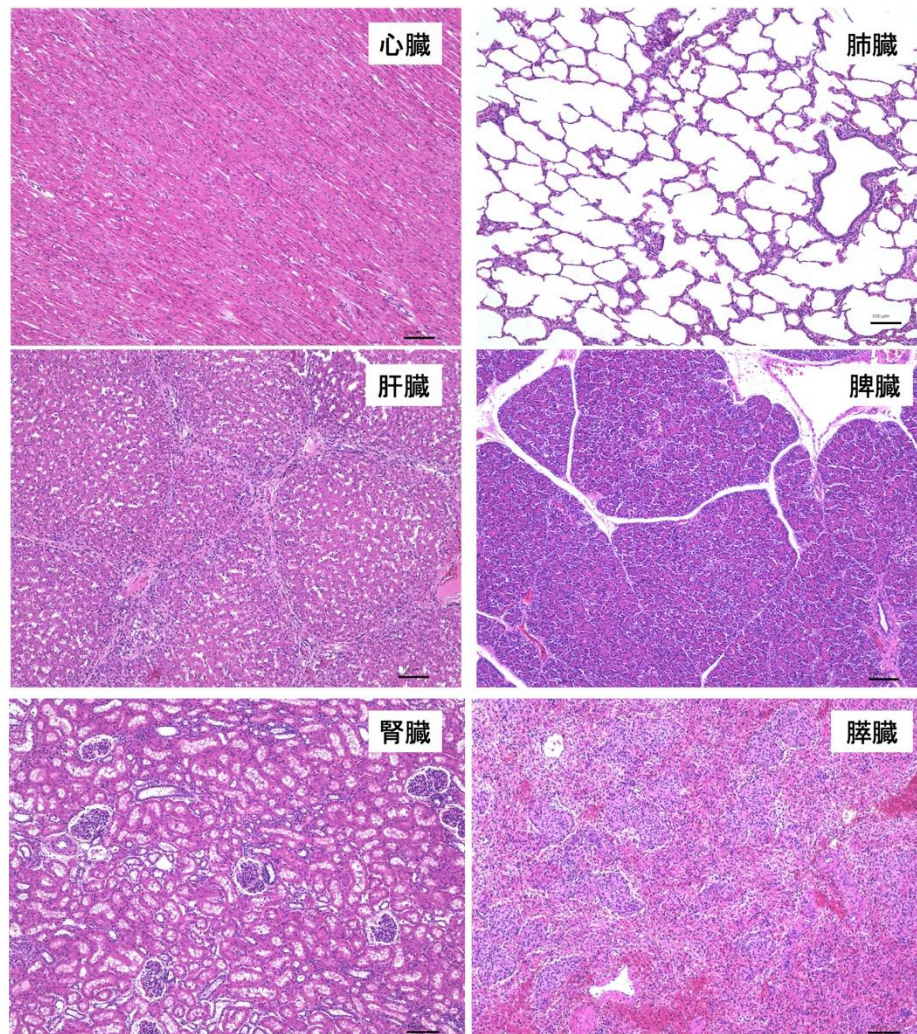


図 18. IL2rg 欠損ブタを用いた DFAT 造腫瘍性試験
(DFAT 移植後の主要臓器の組織学的所見)

IL2rg 欠損ブタに対し、DFAT (n = 4) または Fibroblast (n = 1) をそれぞれ 1×10^6 個/0.25 mL 生理食塩水に希釈し、浅臀筋 20 箇所合計 2×10^7 個を筋肉内注射した。移植 1 ヶ月後に移植筋肉組織および主要臓器を摘出し、腫瘍形成の有無を肉眼的および組織学的に検討した。DFAT 移植した個体の移植 1 ヶ月後の主要臓器（心臓、腎臓、肺臓、肝臓、脾臓、胸腺）の HE 染色像を示す。Scale bars: 100 μ m.

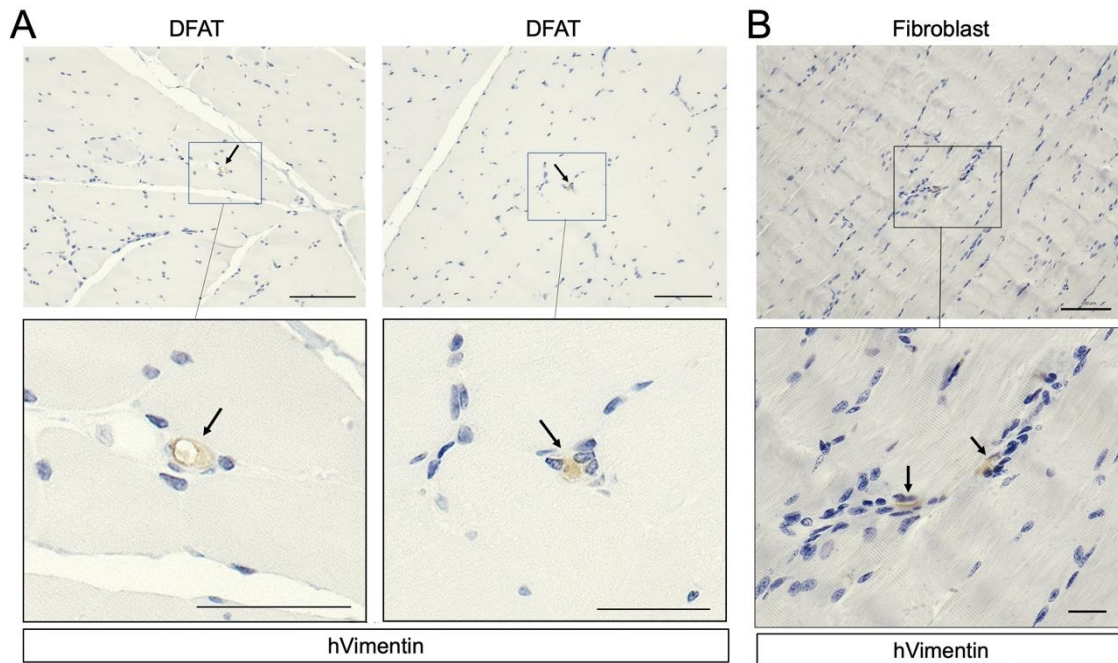


図 19. IL2rg 欠損ブタを用いた DFAT 造腫瘍性試験
(移植筋肉組織の免疫組織学的所見)

IL2rg 欠損ブタに対し、DFAT (n = 4) または Fibroblast (n = 1) をそれぞれ 1×10^6 個/0.25 mL 生理食塩水に希釈し、浅臀筋 20 箇所合計 2×10^7 個を筋肉内注射した。移植 1 ヶ月後に移植筋肉組織および主要臓器を摘出し、腫瘍形成の有無を肉眼的および組織学的に検討した。DFAT 移植した個体および Fibroblast 移植した個体の移植 1 ヶ月後の移植筋肉組織のヒトビメンチンに対する免疫染色像を示す。矢印はヒトビメンチン陽性細胞を示す。 Scale bars: 100 μ m.

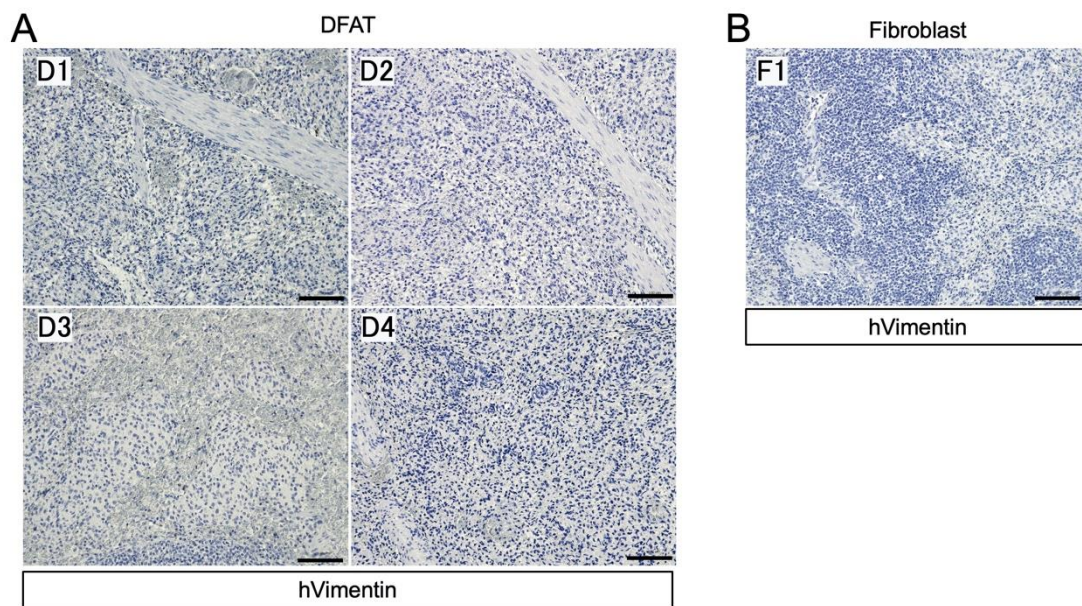


図 20. IL2rg 欠損ブタを用いた DFAT 造腫瘍性試験
(脾臓組織の免疫組織学的所見)

IL2rg 欠損ブタに対し、DFAT (n = 4) または Fibroblast (n = 1) をそれぞれ 1×10^6 個/0.25 mL 生理食塩水に希釈し、浅臀筋 20 箇所合計 2×10^7 個を筋肉内注射した。移植 1 ヶ月後に移植筋肉組織および主要臓器を摘出し、腫瘍形成の有無を肉眼的および組織学的に検討した。DFAT 移植した個体および Fibroblast 移植した個体の移植 1 ヶ月後の脾臓組織のヒトビメンチンに対する免疫染色像を示す。Scale bars: 100 μ m.

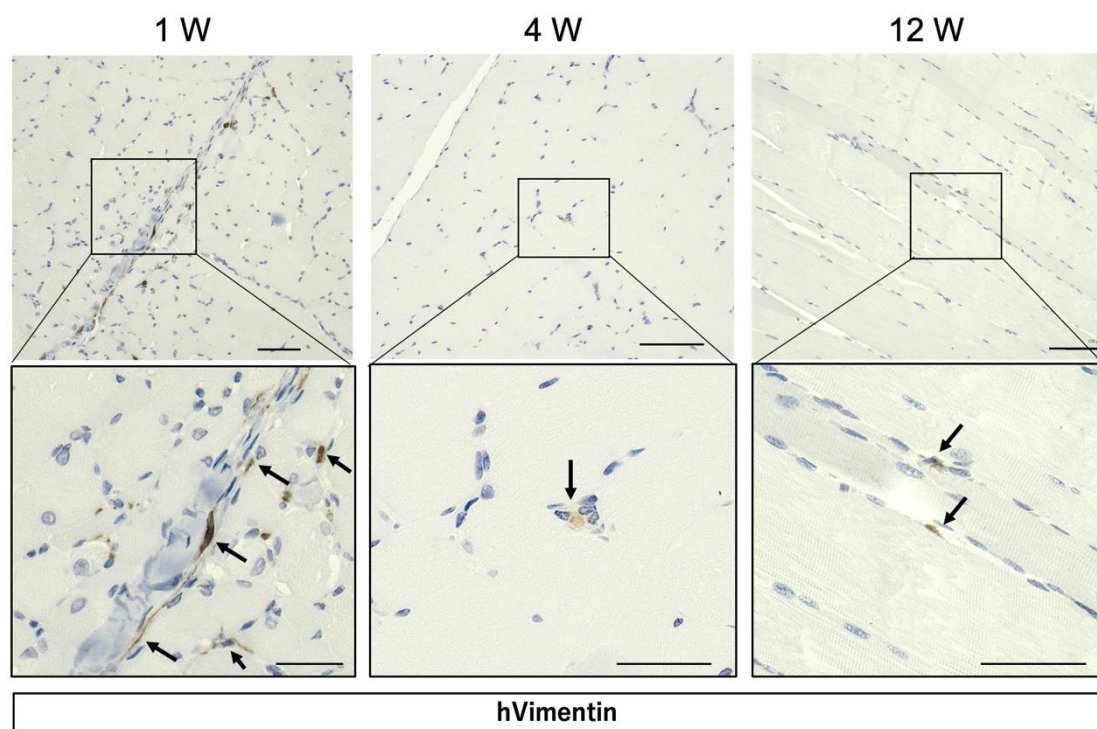


図 21. 移植された DFAT の経時的局在解析

IL2rg 欠損ブタに対し、DFAT をそれぞれ 1×10^6 個/0.25 mL 生理食塩水に希釈し、浅臀筋 20 箇所合計 2×10^7 個を筋肉内注射した。移植 1 週間後、4 週間後、12 週間後に移植筋肉組織を摘出し、切片標本を作成した。移植 DFAT の生着を評価するために、酵素抗体法を用いてヒトビメンチンに対する免疫組織染色を行った。矢印はヒトビメンチン陽性細胞を示す。Scale bars: 100 μ m.

引用文献

- [1] Bulic-Jakus F, Katusic Bojanac A, Juric-Lekic G, Vlahovic M, Sincic N. Teratoma: from spontaneous tumors to the pluripotency/malignancy assay. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2016;5(2):186-209.
- [2] 独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA). 再生医療等製品(ヒト細胞加工製品)の品質、非臨床試験及び臨床試験の実施に関する技術的ガイダンスについて. 平成28年6月14日薬機発第0614043号.
- [3] 角田聡. 間葉系幹細胞の非臨床安全性評価. *RSMP* 2018;8(2):123-8.
- [4] Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, et al. 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(5):e37342.
- [5] Organization WH. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals. WHO technical report series 1998 No878 Annex1.
- [6] Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products. *Biol Pharm Bull* 2013;36(2):189-92.
- [7] Ito M, Kobayashi K, Nakahata T. NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;324:53-76.
- [8] Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 2002;100(9):3175-82.
- [9] Kanemura H, Go MJ, Nishishita N, Sakai N, Kamao H, Sato Y, et al. Pigment epithelium-derived factor secreted from retinal pigment epithelium facilitates apoptotic cell death of iPSC. *Sci Rep* 2013;3:2334.
- [10] Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, et al. Characterization of in vivo tumorigenicity tests using severe immunodeficient

- NOD/Shi-scid IL2Rgamma(null) mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *Regen Ther* 2015;1:30-7.
- [11] Boettcher AN, Loving CL, Cunnick JE, Tuggle CK. Development of Severe Combined Immunodeficient (SCID) Pig Models for Translational Cancer Modeling: Future Insights on How Humanized SCID Pigs Can Improve Preclinical Cancer Research. *Front Oncol* 2018;8:559.
- [12] Suzuki S, Iwamoto M, Saito Y, Fuchimoto D, Sembon S, Suzuki M, et al. Il2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs. *Cell Stem Cell* 2012;10(6):753-8.
- [13] Nochi T, Suzuki S, Ito S, Morita S, Furukawa M, Fuchimoto D, et al. Elucidation of the Effects of a Current X-SCID Therapy on Intestinal Lymphoid Organogenesis Using an In Vivo Animal Model. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2020;10(1):83-100.
- [14] Matsumine H, Takeuchi Y, Sasaki R, Kazama T, Kano K, Matsumoto T, et al. Adipocyte-derived and dedifferentiated fat cells promoting facial nerve regeneration in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 2014;134(4):686-97.
- [15] Sakuma T, Matsumoto T, Kano K, Fukuda N, Obinata D, Yamaguchi K, et al. Mature, adipocyte derived, dedifferentiated fat cells can differentiate into smooth muscle-like cells and contribute to bladder tissue regeneration. *J Urol* 2009;182(1):355-65.
- [16] Obinata D, Matsumoto T, Ikado Y, Sakuma T, Kano K, Fukuda N, et al. Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells improves urethral sphincter contractility in a rat model. *Int J Urol* 2011;18(12):827-34.
- [17] Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, Kazama M, Kano K, Ryu J, et al. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Eng Part A* 2013;19(15-16):1792-802.
- [18] Shimizu M, Matsumoto T, Kikuta S, Ohtaki M, Kano K, Taniguchi H, et al. Transplantation of dedifferentiated fat cell-derived micromass pellets contributed

- to cartilage repair in the rat osteochondral defect model. *J Orthop Sci* 2018;23(4):688-96.
- [19] Jumabay M, Matsumoto T, Yokoyama S, Kano K, Kusumi Y, Masuko T, et al. Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47(5):565-75.
- [20] Soejima K, Kashimura T, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H. Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on generation and vascularisation of dermis-like tissue after artificial dermis grafting. *J Plast Surg Hand Surg* 2015;49(1):25-31.
- [21] Kashimura T, Soejima K, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H. The effect of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on a dorsal skin flap model. *J Invest Surg* 2016;29(1):6-12.
- [22] Asami T, Soejima K, Kashimura T, Kazama T, Matsumoto T, Morioka K, et al. Effects of combination therapy using basic fibroblast growth factor and mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on skin graft revascularisation. *J Plast Surg Hand Surg* 2015;49(4):229-33.
- [23] Akita D, Kano K, Saito-Tamura Y, Mashimo T, Sato-Shionome M, Tsurumachi N, et al. Use of Rat Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells as a Cell Source for Periodontal Tissue Regeneration. *Front Physiol* 2016;7:50.
- [24] Maruyama T, Fukuda N, Matsumoto T, Kano K, Endo M, Kazama M, et al. Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated monoclonal antibody 1-22-3-induced glomerulonephritis by immunosuppression with increases in TNF-stimulated gene 6. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:80.
- [25] Watanabe H, Goto S, Kato R, Komiyama S, Nagaoka Y, Kazama T, et al. The neovascularization effect of dedifferentiated fat cells. *Sci Rep* 2020;10(1):9211.
- [26] Jumabay M, Abdmaulen R, Urs S, Heydarkhan-Hagvall S, Chazenbalk GD, Jordan MC, et al. Endothelial differentiation in multipotent cells derived from mouse and human white mature adipocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2012;53(6):790-800.
- [27] Song N, Kou L, Lu XW, Sugawara A, Shimizu Y, Wu MK, et al. The perivascular

- phenotype and behaviors of dedifferentiated cells derived from human mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;457(3):479-84.
- [28] Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004;109(5):656-63.
- [29] Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S, Yun K. Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation* 1986;31(1):42-9.
- [30] Basel MT, Balivada S, Beck AP, Kerrigan MA, Pyle MM, Dekkers JC, et al. Human xenografts are not rejected in a naturally occurring immunodeficient porcine line: a human tumor model in pigs. *Biores Open Access* 2012;1(2):63-8.
- [31] Boettcher AN, Kiupel M, Adur MK, Cocco E, Santin AD, Bellone S, et al. Human Ovarian Cancer Tumor Formation in Severe Combined Immunodeficient (SCID) Pigs. *Front Oncol* 2019;9:9.
- [32] Lee K, Kwon DN, Ezashi T, Choi YJ, Park C, Ericsson AC, et al. Engraftment of human iPS cells and allogeneic porcine cells into pigs with inactivated RAG2 and accompanying severe combined immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(20):7260-5.
- [33] Bailey AM. Balancing tissue and tumor formation in regenerative medicine. *Sci Transl Med* 2012;4(147):147fs28.
- [34] Pang SHM, D'Rozario J, Mendonca S, Bhuvan T, Payne NL, Zheng D, et al. Mesenchymal stromal cell apoptosis is required for their therapeutic function. *Nat Commun* 2021;12(1):6495.
- [35] Powell EJ, Charley S, Boettcher AN, Varley L, Brown J, Schroyen M, et al. Creating effective biocontainment facilities and maintenance protocols for raising specific pathogen-free, severe combined immunodeficient (SCID) pigs. *Lab Anim* 2018;52(4):402-12.

研究業績

佐野 太一

I	発表	①一般発表	6
		②特別発表	なし
II	論文	①原著論文	なし
		②症例報告	なし
		③総説	なし
III	著書		なし

以 上

I 発表

①一般発表

1. 佐野太一, 李予昕, 風間智彦, 長岡悠紀, 萩倉一博, 山元智衣, 鈴木俊一, 淵本大一郎, 三角浩司, 大西彰, 松本太郎 : 免疫不全ブタを用いたヒト脱分化脂肪細胞移植安全性試験, 第6回日本先進医工学ブタ研究会, 静岡県, 2018年 10月
2. 佐野太一, 李予昕, 風間智彦, 長岡悠紀, 萩倉一博, 山元智衣, 鈴木俊一, 淵本大一郎, 三角浩司, 大西彰, 加野浩一郎, 松本太郎:免疫不全ブタを用いたヒト脱分化脂肪細胞移植安全性試験, 第18回日本再生医療学会総会, 兵庫県, 2019年 3月
3. 佐野太一, 李予昕, 風間智彦, 長岡悠紀, 萩倉一博, 山元智衣, 鈴木俊一, 淵本大一郎, 三角浩司, 大西彰, 加野浩一郎, 松本太郎 :免疫不全ブタを用いた造腫瘍性評価法の検討, 第40回日本炎症・再生医学会, 兵庫県, 2019年 7月
4. 佐野太一, 李予昕, 風間智彦, 長岡悠紀, 萩倉一博, 山元智衣, 鈴木俊一, 淵本大一郎, 三角浩司, 大西彰, 加野浩一郎, 松本太郎:免疫不全ブタを用いた再生医療等製品の造腫瘍性試験, 第7回日本先進医工学ブタ研究会, 愛媛県, 2019年 10月
5. 佐野太一, 李予昕, 風間智彦, 長岡悠紀, 萩倉一博, 山元智衣, 鈴木俊一, 淵本大一郎, 三角浩司, 大西彰, 加野浩一郎, 松本太郎: ブタを用いた造腫瘍性試験に関する検討, 第19回日本再生医療学会総会, WEB開催, 2020年 5月
6. 佐野太一, 李予昕, 風間智彦, 長岡悠紀, 萩倉一博, 山元智衣, 鈴木俊一, 淵本大一郎, 三角浩司, 大西彰, 加野浩一郎, 松本太郎: ブタを用いたヒト脱分化脂肪細胞 (DFAT) の造腫瘍性試験, 第41回日本炎症・再生医学会, WEB開催, 2020年 7月

②特別発表 なし

II 論文

①原著論文 なし

②症例報告 なし

③総説 なし

III 著書 なし