

パネルの濃縮

C型肝炎ウイルス (HCV) の PEI ビーズ濃縮について、昨年度は HCV 国内標準品を用いて検討し、C型肝炎ウイルス (HCV) はヒト正常血漿中のウイルスを PEI ビーズにより高効率で濃縮可能であった。また、PEI ビーズ濃縮により、血漿中に含まれる 1 IU/ml の HCV を確実に検出可能であることを明らかにした。今年度は、HCV のパネル血漿に適用可能かどうかを検討した。HCV の国内標準品はジェノタイプ 1b であるが、ジェノタイプが異なる HCV も PEI ビーズで濃縮可能かどうかを検討した。使用した HCV ジェノタイプパネルの詳細を Table 1 に示す。これらのジェノタイプと由来の異なる 10 種類のパネル血漿について、ヒト正常血漿で 40 倍に希釈後、ウイルス濃縮を検討した。その結果、検体のウイルス量が異なるため、検出されるウイルス量も検体により異なるが、検討した全てのパネル血漿が濃縮可能であることが示された (Fig.1A)。濃縮倍率はパネル ID302-07(ジェノタイプ 3a)の約 5 倍から、ID302-04(ジェノタイプ 2a/2c)及び ID302-10(ジェノタイプ 4)の約 20 倍までと種類により差が認められたが、少なくとも 5 倍以上の濃縮が可能であった (Fig.1B)。

(2) PEI ビーズによる HCV セロコンバージョンパネルの濃縮

次に、HCV のセロコンバージョンパネルについて、PEI ビーズによる濃縮を試みた。使用したセロコンバージョンパネル血漿の詳細を Table 2 に示す。Fig.2 に示すとおり、90 μ l のパネル血漿からウイルスを直接抽出した場合にはパネル ID12 の 44 日目以降

の検体が HCV 陽性と確認された。一方、0.9ml のパネル血漿について、PEI ビーズを用いて HCV を濃縮すると、直接抽出よりも 6 日早いパネル ID11 の 38 日目の検体も HCV 陽性であることが確認できた。Table 2 に示すとおり、Roche 社の HCV monitor 法ではパネル ID11 以降が HCV 陽性と確認されているが、Chiron 社の bDNA 法や PCR RNA quantitative results ではパネル ID12 以降のみ陽性である。従って、PEI ビーズ濃縮法は HCV monitor 法と同等の高感度検出が可能であり、bDNA 法や PCR RNA quantitative results と比べて、ウィンドウ期の短縮効果が認められた。Roche 社法は、0.4~0.8ml の非検液から HBV ゲノムを抽出して試験を行っており、これと同様の感度が得られていることから、今後、より多量の血漿に本法を適用することにより、さらに感度を向上させることも可能と考えられる。また、本研究で用いた HCV 検出用の PCR プライマー、プローブや検出条件は最適化されたものではないことから、条件の最適化を行うことも必要と考えられる。

(3) PEI ビーズによる HBV ジェノタイプパネルの濃縮

B型肝炎ウイルス (HBV) の PEI ビーズ濃縮について、昨年度は国内標準品を用いて検討した。その結果、培養液中の HBV の PEI ビーズによる濃縮は FCS で阻害され、HAV や HCV と比べて濃縮効率が劣るが、PEI ビーズ濃縮の際、抗 HBV-IgM 抗体を添加することにより濃縮効率が改善された。また、ヒト正常血漿で希釈した場合、抗 HBV 抗体陽性の試料は効率よく濃縮されたが、HBV 標準品の濃縮は困難であった。HBV

標準品は抗 HBV 抗体陰性のウインドウ期の血漿であることから、抗 HBV 抗体の存在が濃縮の可否に関与している可能性が示唆された。今年度は、HBV の国内ジェノタイプパネルの濃縮に PEI ビーズ濃縮法が適用可能かどうかを検討した。使用した HBV 標準パネル血漿の詳細を Table 3 に示す。これらのパネル血漿について、0.1ml から直接ウイルス DNA を抽出したものとパネル血漿 1ml を PEI ビーズで濃縮したもので回収されたウイルス量を比較したところ、パネルの一部を除き、ほとんど濃縮効果が認められなかった (Fig.3A)。濃縮倍率をみると、ID003, 015, 068, 069 では 4 倍以上に濃縮されたが、その他の試料はほとんど濃縮されなかった (Fig.3B)。血漿中の乳糜の影響を除くため、フィルターろ過を行ってみたが、フィルターにより濃縮効率が改善されたのは ID007 と 015 の 2 種類のみで、フィルターろ過しても回収率は変わらないか、かえって回収率が低下した試料も多く認められた。4 倍以上の濃縮が認められた 4 検体は、いずれもジェノタイプ C の抗体陽性血漿あるいは低濃度キャリア血漿である (Table 3)。その他の検体は全てウインドウ期のものであり、ジェノタイプの差よりもウインドウ期であることの方が濃縮に影響している可能性が考えられた。また、抗 HBV 抗体の存在が濃縮の可否に関与している可能性が確認された。ウインドウ期の検体に適用することを考慮すると PEI ビーズ濃縮法は HBV の濃縮にはあまり適していないと考えられる。

(4) ZnCl₂ と抗 HBV 抗体による HBV ジェノタイプパネルの濃縮

HBV は PEI ビーズ法で濃縮が難しいことから、他の濃縮法の開発を検討した。我々は、既に ZnCl₂ や MnCl₂ など 2 価イオンとスルホン酸磁気ビーズを組み合わせる方法が多くウイルス濃縮に適用可能であることを報告している (Iwata et al, *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1065, 2003)。これらの方法を準用して、HBV 標準パネル血漿に抗 HBV 抗体を添加後、ZnCl₂ を加え、抗体と結合した HBV を沈殿として回収することを試みた。その結果、抗体の有無にかかわらず、14 種類のパネル血漿の中で、12 種類の検体は ZnCl₂ と抗 HBV 抗体により効率よく回収された (Fig.4A)。濃縮倍率を求めると、ID007 と 017 以外は、5 倍から 20 倍に濃縮され、十分に効果があることが確認された (Fig.4B)。ID007 と 017 が沈殿として回収されなかった原因は明らかではないが、007 はウイルス量 10² 未満と極めて微量であること、また、ID 017 もウイルス量は 10² オーダーと低く、ウイルスサブタイプが 007 は adr mutant、017 は adw mutant であることから、使用した抗 HBV 抗体の反応性が低かったことなどがその要因のひとつであるかもしれない。今後、本法を HBV のセロコンバージョンパネルに適用し、ウインドウ期の短縮が可能かどうか検討する予定である。

D. 結論

細胞組織利用医薬品のウイルス安全性に関する研究として、本年度は、これまで培養系の細胞に適用したウイルスの高感度検出のためのポリエチレンイミン結合磁気ビーズ (PEI ビーズ) によるウイルス濃縮法を、ドナーのスクリーニング法として応用

するための検討を行った。このためにまず、HCV、HBV のパネル血漿に適用した。その結果、PEI ビーズ濃縮法は HCV の 10 種類のジェノタイプや由来の異なる検体を全て濃縮可能であった。また HCV のセロコンバージョンパネルに適用すると、通常の PCR 法よりも数日早い段階の検体でウイルス検出が可能となり、ウインドウ期の短縮が可能であることが示された。一方、HBV のジェノタイプパネルに PEI ビーズ濃縮法を適用したが、HBV 抗体陽性のパネル血漿以外は濃縮できなかった。そこで、新たな濃縮法として抗 HBV 抗体と $ZnCl_2$ による濃縮法を検討したところ、抗体陰性のパネル血漿も効果的に濃縮された。以上の結果より、PEI ビーズ濃縮法及び抗 HBV 抗体と $ZnCl_2$ によるウイルス濃縮法は、それぞれ HCV、HBV 陽性検体の濃縮・高感度検出に有用であることが示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Teruhide Yamaguchi, Eriko Uchida: Regulatory Aspects of Oncolytic Virus Products, *Current Cancer Drug Targets*, 7, 203-208 (2007)
- 2) Toshie Kanayasu-Toyoda, Takayoshi Suzuki, Tadashi Oshizawa, Eriko Uchida, Takao Hayakawa, Teruhide Yamaguchi: Granulocyte Colony-Stimulating Factor Promotes The Translocation of Protein Kinase C α in Neutrophilic Differentiation Cells, *Journal of Cellular Physiology*, 211, 189-196 (2007)
- 3) 内田 恵理子: 遺伝子治療薬開発の現状と品質・安全性確保における国際的動向, *Pharmstage*, 7(9), 1-5 (2007)
- 4) 山口照英、内田恵理子: 日米 EU 医薬品規制調和国際会議遺伝子治療専門家会議の活動と遺伝子治療薬の規制における国際動向, *Drug Delivery System*, 22-6, 651-659 (2007)
- 5) 内田恵理子、石井 (渡部) 明子、山口照英: 遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保、臨床とウイルス、35(4), 278-290 (2007)
- 6) 川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹: 薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第 7 回, *Pharm Tech Japan*, 23 (2), 81-87 (2007)
- 7) 川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹: 薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第 9 回, *Pharm Tech Japan*, 23 (4), 101-109 (2007)
- 8) 川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹: 薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第 12 回, *Pharm Tech Japan*, 23 (8), 85-93 (2007)
- 9) 内田恵理子、川崎ナナ、宮田直樹: 薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第 15 回, *Pharm Tech Japan*, 23 (11), 93-100 (2007)
- 10) Eriko Uchida, Mieko Kogi, Tadashi Oshizawa, Koei Satoh, Akiko Iwata, Mitsuhiro Murata, Mikio Hikata, Teruhide Yamaguchi: Optimization of the virus concentration method using polyethyleneimine-conjugated

magnetic beads and its application to the detection of human hepatitis A, B and C viruses, *Journal of Virological Methods*, 143, 95-103 (2007)

- 11) 川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹：薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第18回、*Pharm Tech Japan*, 24(1), 101-105 (2008)

2. 学会発表

- 1) 内田恵理子、小木美恵子、村田充弘、日方幹雄、佐藤功栄、岩田明子、鈴木和博、山口照英：ポリエチレンイミン結合磁気ビーズを用いた C 型肝炎ウイルスの濃縮・高感度検出法、第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)、2007年12月14日、横浜
- 2) 伊藤さつき、川崎ナナ、橋井則貴、原園 景、中島 紫、高倉大輔、内田恵理子、押澤 正、山口照英：ヒト ミエロペルオキシダーゼの部位特異的糖鎖構造解析、第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)、2007年12月12日、横浜
- 3) 押澤 正、豊田淑江、内田恵理子、鈴木孝昌、鈴木和博、山口照英：カルシウム結合タンパク質 S100A8 は HL-60 細胞の好中球分化において増殖・分化に重要な働きをする、第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)、2007年12月12日、横浜
- 4) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：放射照射による Op9 細胞の造血

支持能の増強に関与する分子の探索、第7回日本再生医療学会総会、2008年3月13日、名古屋

- 5) 内田恵理子、小木美恵子、村田充弘、日方幹雄、佐藤功栄、岩田明子、鈴木和博、山口照英：医薬品のウイルス安全性確保のためのヒト肝炎ウイルスの濃縮・高感度検出法の開発、日本薬学会第128年会、2008年3月27日、横浜
- 6) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：造血支持能を担うストローマ細胞膜タンパク質の探索、日本薬学会第128年会、2008年3月27日、横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 Worldwide HCV Performance Panel (WWHV 302)

Panel ID	Genotype		Origin	HCV RNA (copies/ml)	
	Bayer Trugene 5'NC	Innogenetics INNO-LiPA		Roche COBAS PCR	Bayer HCV RNA3.0
302-01	1b	1b	China	3.1×10^6	6.6×10^6
302-02	1	1a	Thailand	1.1×10^6	2.3×10^6
302-03	1b	1b	South Africa	4.0×10^5	3.7×10^5
302-04	2a	2a/2c	China	2.5×10^6	2.7×10^6
302-06	3b	3b	China	6.6×10^6	8.6×10^6
302-07	3a	3a	USA	8.2×10^5	4.7×10^5
302-09	4a	4	Egypt	1.0×10^6	8.7×10^5
302-10	4	4	Egypt	8.8×10^4	1.2×10^5
302-12	5a	5a	Unknown	6.5×10^5	4.4×10^4
302-14	6a	6a	Unknown	1.6×10^6	7.1×10^5

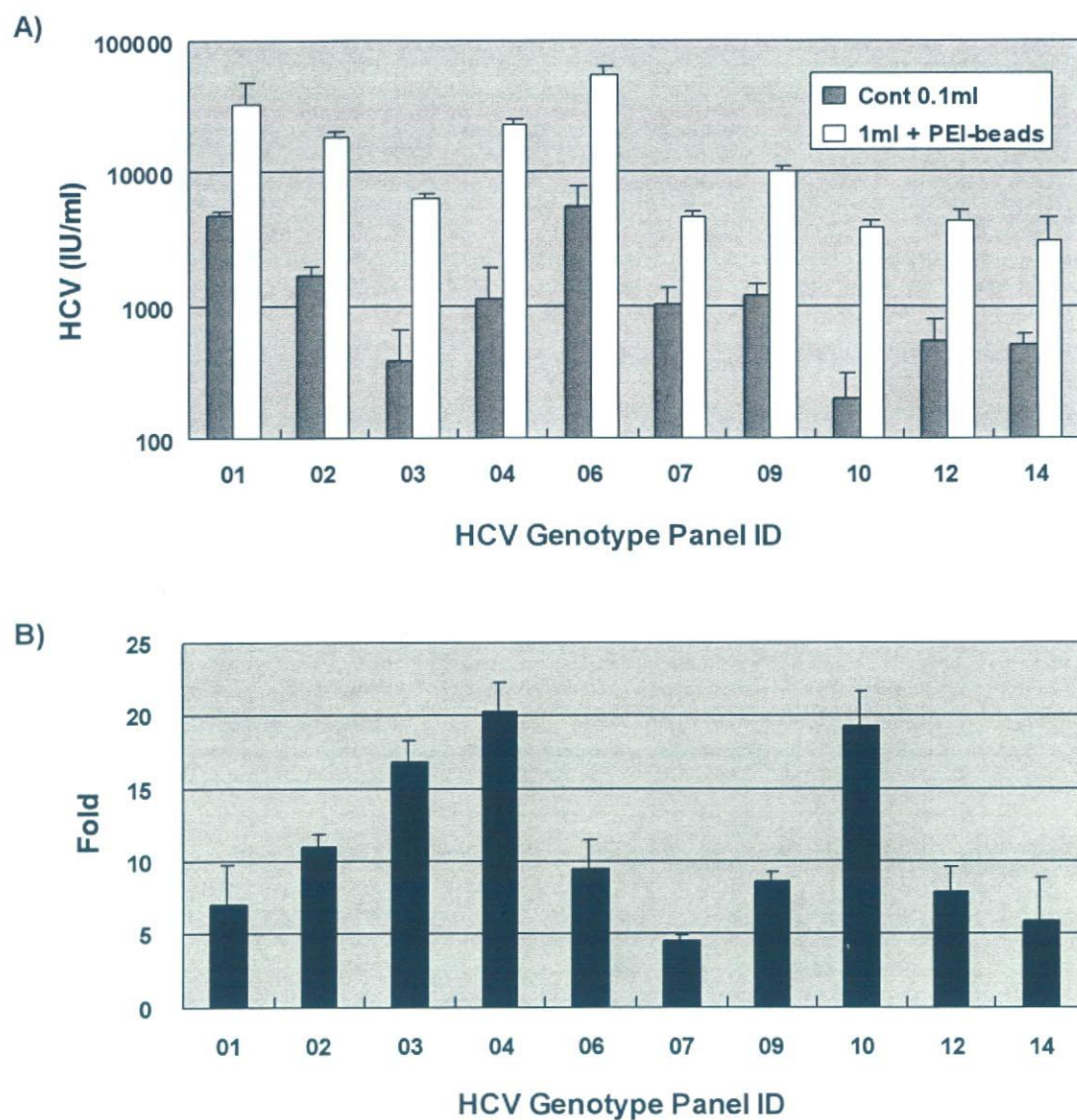


Fig. 1 PEIビーズによるHCV ジェノタイプパネルの濃縮

A) HCVジェノタイプパネル0.1ml, 1mlから得られたウイルス量

B) HCVジェノタイプパネル 1mlのPEI磁気ビーズによる濃縮倍率

Table 2 Anti-HCV Seroconversion Panel (Donor No. 62999)

Panel ID	Bleed Date	CHIRON bDNA (Meq/ml)	ROCHE HCV MONITOR (copies/ml)	PCR RNA Quantitative Result Lab #3
6225-01	10/25/96	<0.2	<175	<100
6225-02	10/28/96	<0.2	<179	<100
6225-03	11/01/96	<0.2	<226	<100
6225-04	11/06/96	<0.2	<135	<100
6225-05	11/08/96	<0.2	<149	<100
6225-06	11/13/96	<0.2	<147	<100
6225-07	11/19/96	<0.2	<182	<100
6225-08	11/22/96	<0.2	<154	<100
6225-09	11/26/96	<0.2	<148	<100
6225-10	11/29/96	<0.2	<155	<100
6225-11	12/03/96	<0.2	670	<100
6225-12	12/09/96	27.02	390,000	3,000,000
6225-13	12/11/96	98.84	1,300,000	4,300,000
6225-14	12/16/96	77.79	1,300,000	2,900,000
6225-15	12/20/96	54.71	810,000	3,100,000
6225-16	12/24/96	>120	2,400,000	5,000,000
6225-17	01/06/97	9.373	510,000	4,200,000
6225-18	01/11/97	4.971	460,000	1,700,000
6225-19	01/13/97	3.242	230,000	1,600,000

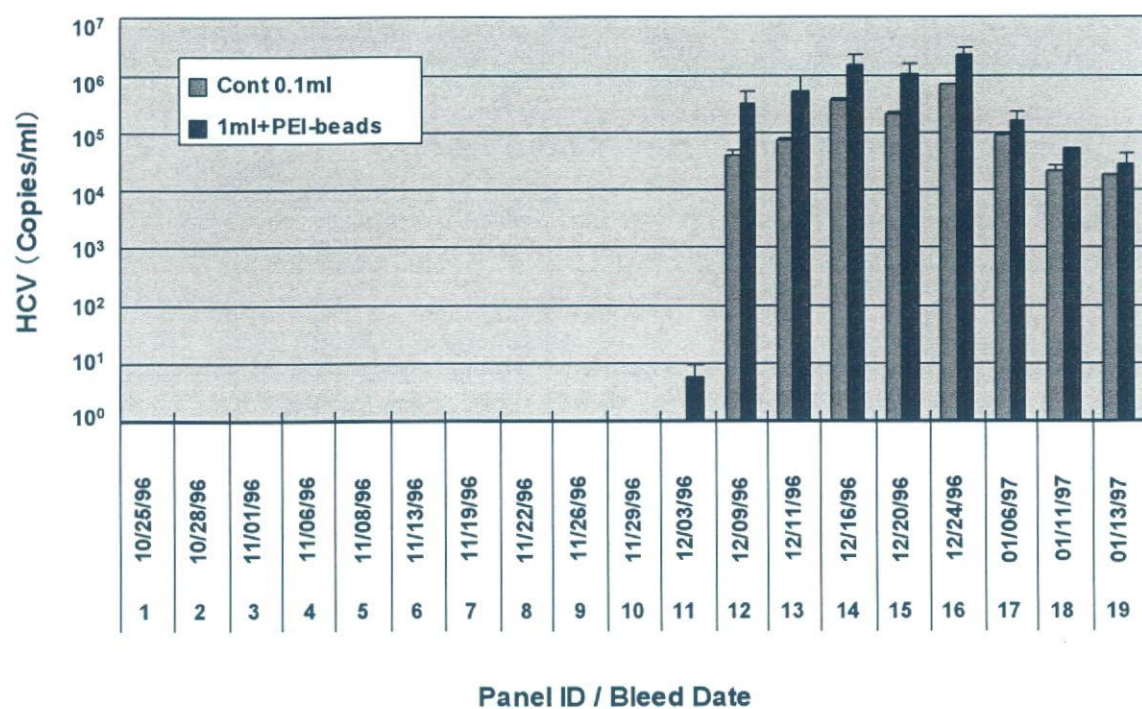


Fig. 2 PEIビーズによるHCV セロコンバージョンパネルの濃縮

Table 3 HBV標準パネル血漿

Panel ID	Genotype	Subtype	HBsAb	HbcAb	HBV DNA	
					A法 (copies/ml)	B法(copies/ml)
P1-002	B	adw	-	-	1.4×10^4	1.3×10^4
P1-003	C	adw	+	-	7.0×10^4	6.3×10^4
P1-007	C	adr mutant	-	-	$<10^2$	(+)
P1-010	C	adr mutant	-	-	6.6×10^3	5.0×10^3
P1-011	C	adr	-	-	5.2×10^2	5.1×10^2
P1-012	C	adr	-	-	1.6×10^3	1.3×10^3
P1-013	C	ayr	-	-	1.4×10^4	1.6×10^4
P1-015	C	adr	-	+	2.5×10^4	2.0×10^4
P1-017	C	adw mutant	-	-	5.3×10^2	6.3×10^2
P1-022	B	adw	-	-	7.3×10^3	6.3×10^3
P1-028	B	adw	-	-	2.0×10^5	1.0×10^5
P1-060	A	adw	-	-	4.7×10^3	4.0×10^3
P1-068	C	adr	-	+	5.0×10^2	5.0×10^2
P1-069	C	adr	-	+	1.4×10^2	5.0×10^2

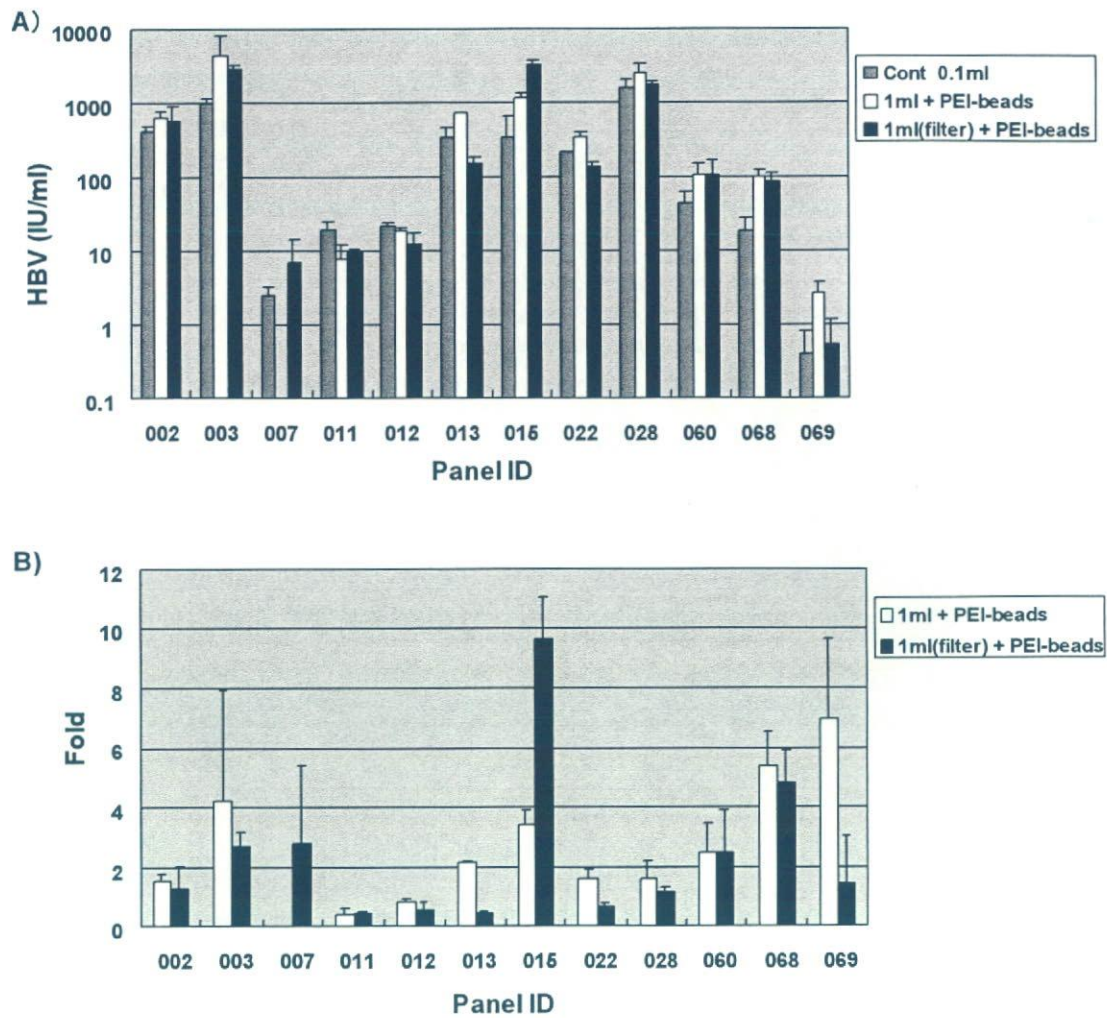


Fig. 3 PEIビーズによるHBV ジェノタイプパネルの濃縮

A) HBVジェノタイプパネル0.1ml, 1mlから得られたウイルス量

B) HBVジェノタイプパネル 1mlのPEI磁気ビーズによる濃縮倍率

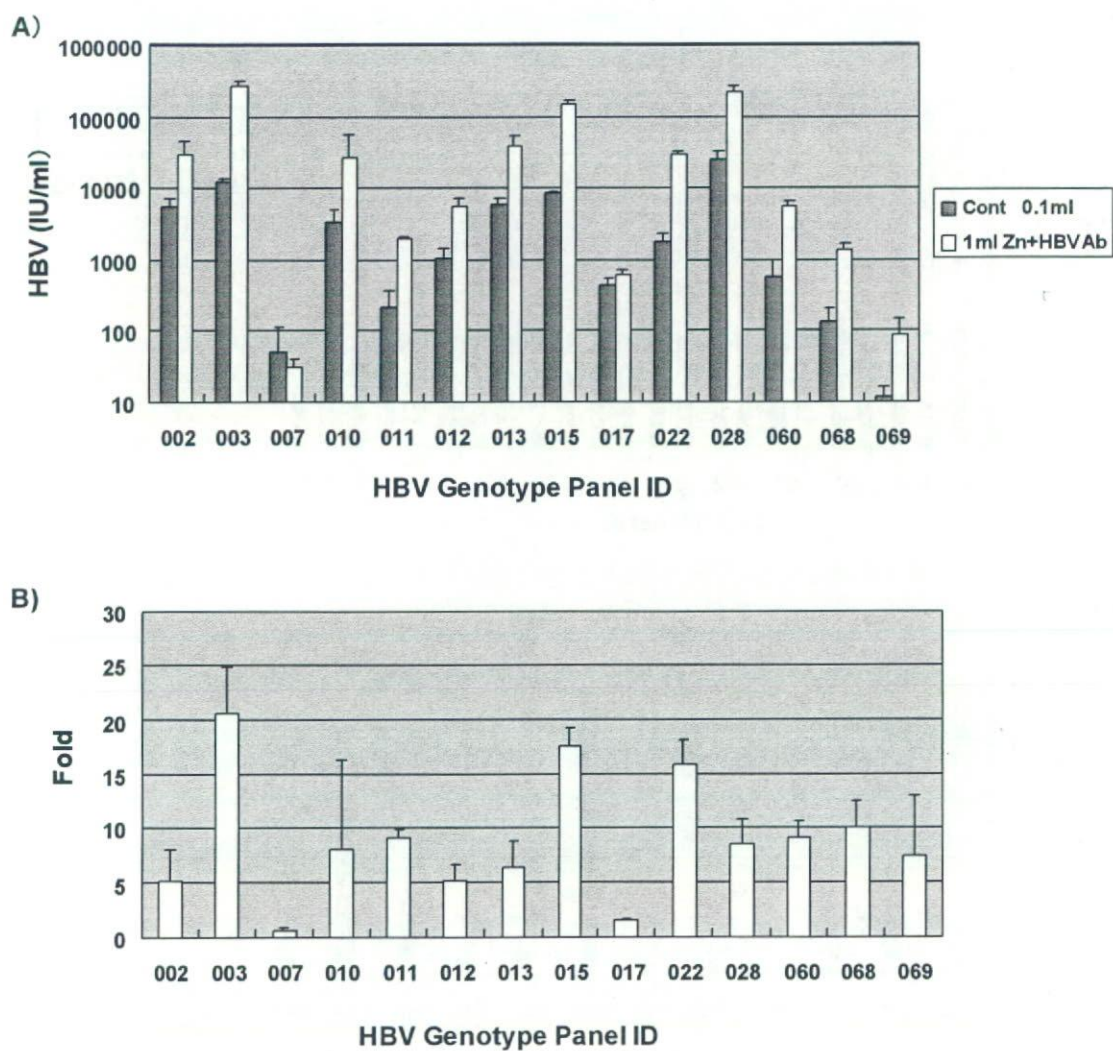


Fig. 4 Zincと抗HBV抗体によるHBV ジェノタイプパネルの濃縮

A) HBVジェノタイプパネル0.1ml, 1mlから得られたウイルス量

B) HBVジェノタイプパネル 1mlの抗HBV抗体とZnCl₂による濃縮倍率

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）分担研究報告書
分担研究報告書

細胞組織利用医薬品の同一性や遺伝的安定性評価手法の開発に関する研究

分担研究者 鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部室長

研究要旨

ヒト iPS 細胞の開発を受け、幹細胞を利用した細胞治療による再生医療の実現に向けた機運が高まりつつある。一方で、生体外で培養した細胞を、治療として生体へ戻す際の癌化をはじめとする危険性に関しても指摘されており、臨床応用へ向けて、細胞・組織利用医薬品の品質チェックと安全性確保は我々に課せられた重要な課題である。こうした要求に答えるべく、我々は主に細胞の培養過程における遺伝子の安定性の評価手法に関して研究を行ってきた。その中で、染色体レベルで遺伝的安定性を網羅的かつ詳細に調べる目的で、マイクロアレイを使った CGH (Comparative Genome Hybridization) 法が有効であることを示してきた。特に、一塩基多型 (SNP ; single nucleotide polymorphism) を大規模に解析可能な GeneChip (SNP チップ) は、本来 CGH 用ではないものの、シグナル強度の比較によりコピー数変化も検出できることが確認でき、微細な染色体欠失や組み換え型の LOH など、従来の染色体解析法では検出できなかった異常を検出することができた。この手法の応用として、今後実際の細胞治療に利用されること想定されるヒト間葉系幹細胞の培養過程における染色体安定性に関して SNP アレイを用いて解析したところ、長期培養における染色体コピー数のクローナルな変化が検出でき、染色体解析により転座を伴う増幅が起きていることが確認された。今年度は、この変化にどの程度普遍性があるかを、他のヒト間葉系幹細胞ロットおよびヒト骨格筋筋芽細胞を用いて検討を行った結果、異常は検出されず、その頻度はそれほど高くないことがわかった。一方で、異常が起きた細胞に関して、異常を持つ染色体のセントロメアプローブを使って培養過程での経時変化を追跡したところ、比較的早い段階から異常細胞の出現が確認でき、このロットにおいては、初期より微量に異常細胞が含まれており、その増殖優位性により、培養過程で異常細胞へと置き換わって行ったことが示唆された。この事例は、今後幹細胞培養過程における染色体変化およびがん化に結びつく増殖性獲得細胞の出現、さらにはその検出法の開発に向けて貴重な情報を与えた。

協力研究者

田邊思帆里	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 研究員
佐藤 陽治	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 室長
スレッジ ティルパッティ	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 流動研究員
押澤 正	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 主任研究員
ブラバ ドゥライサイ	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 賃金職員
本間正充	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
小木美恵子	金沢工業大学 情報フロンティア学部 教授

A. 研究目的

昨年のヒト人工多能性幹細胞 (iPS) の開発は、体細胞を利用した再生医療、細胞治療法の開発に大きな可能性をもたらし、実用化に向けた急速な流れが各方面で加速されつつある。iPS は細胞治療の分野に大きな期待をもたらすとともに、その一方で、レトロウイルスベクターを使ってがん遺伝子を組み込むという手法を用いたがゆえに、その安全性、主に腫瘍原性は避けては通れない課題であり、これを如何に克服して、

実用化へのハードルをクリアするかは、各種細胞の開発とともにわれわれに課せられた大きな課題である。我々は、ヒト iPS 細胞の開発以前より、細胞治療用医薬品の安全性に関して、特に遺伝子および染色体の安定性という観点から検討を進めてきた。体内では比較的安定な細胞も、外に取り出して、人工的な培養環境の下、時として増殖因子や多種血清成分のなかでの分裂、増殖、分化を強いられるわけで、いくら培養環境を整えても、細胞の DNA や遺伝情報にエラーがおき、何らかの異常細胞が出現する可能性は高い。最悪のケースとして、ひとつでも癌化した形質を獲得した細胞が培養過程で生じた場合、この細胞を治療に用いることは、確実な癌原性物質を投与することに他ならず、その危険性は極まりなく大きいといえる。しかし、一方で遺伝病や各種疾患に基づく生体の機能的欠損を、対外で培養した機能性の細胞集団を持って治療することは、従来治療法がなかった疾患に対し画期的な治療法となる可能性を秘めている。こうしたベネフィットをより有益に教授するためにも、考えられるリスクをきちんと評価してそれを把握し、それをコントロールするための安全面での検討は非常に重要である。各種生体由来の幹細胞などを培養、分化後に生体へ戻す場合など、培養過程における染色体変化や、がん遺伝子の活性化などの遺伝子変化が引き起こされる危険性があり、これらを十分にチェックする検査法を持つことが、細胞治療医薬品の安全を担保する上で重要な課題となる。細胞の染色体レベルでの変化を捉える手法として、CGH 法があるが、これまでに我々は、BAC(bacterial artificial chromosome)

クローンやオリゴマーをスポットした CGH マイクロアレイおよび SNP を網羅的に検出する GeneChip による CGH 法を用いることにより、従来の手法では検出できなかったゲノム異常を網羅的かつ高解像度に検出可能であることを示した。そして、HL60 細胞における c-myc がん遺伝子の増幅様式に関してシーケンスレベルでの構造解析を行い、Double Minute 染色体が環状構造を持つことを明らかにした。

さらに、実際の細胞治療を想定したモデルケースとして、市販のヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の継代培養における染色体変化の可能性を検討し、長期培養により細胞集団全体が、特定の染色体異常を持った細胞に置き換わるという事例を発見することに至った。長期培養で染色体が不安定となることは一般的にも指摘されているところであり、例えばテロメアの縮小による染色体転座のメカニズムも考えられているが、この場合にはランダムな変化が高頻度で起こることが考えられ、CGH アレイで検出可能となるような共通した変化とはならないことが予想される。今回異常を示したロットでは培養開始時には異常が検出されなかったことから、培養の課程でいつかひとつの異常細胞（これは常に低頻度ではランダムに生じていると考えられるが）が出現し、その細胞が比較的安定でかつ増殖性を獲得していたがゆえに、その後の継代を経て徐々にカルチャー中に拡大していった事を物語っている。

ゆえにこの事実は、以下にあげるようないくつかの疑問を投げかけることとなった。

1. こうした異常はどのくらい一般的に起こりうるのか

2. どの時期に最初に異常細胞が生じたか？
3. どのようなメカニズムで異常細胞は増殖性を獲得したか？
4. この増殖性の細胞にがん原性はあるか？
5. こうした細胞の出現を早期に高感度で検出するにはどうしたらよいのか？

今年度の我々の研究は、こうした疑問に答えるべく、ヒト間葉系幹細胞を使った培養形における遺伝子安定性の検討を中心に計画された。

ヒト間葉系幹細胞は、正常の体細胞由来であり、こうした細胞においても、培養過程において検出する異常が見つかったことは、特に今後 iPS 細胞等の人為的加工を施した細胞の利用に向けても警鐘を鳴らすものである。「怖がりすぎず、かつ怖がらなさ過ぎず」という態度で細胞治療の実用化を進めていく上でも、起こりうるリスクを正しく評価することは不可欠であり、本研究はこうした安全性の評価に寄与することを願って進められた。

B. 研究方法

1. 使用した細胞株

Cambrex 社より入手した正常ヒト骨髓由来間葉系幹細胞株 (hMSC) およびヒト骨格筋芽細胞 (HSMM) を使用した。hMSC は 2 継代目にて入手後、間葉系幹細胞培養用基本培地培地 Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM) に間葉系幹細胞添加因子セット (MSCGM SingleQuots, TAKARA)

および 10%FBS を添加し培養を行い、50-70%コンフルエントの状態に継代を続けた。

HSMM 細胞は、2 継代目にて入手後、骨格筋細胞基本培地 (SkBM®-2) に骨格筋細胞添加因子セット・2 (SkGM®-2 SingleQuots®, FBS 含有) を添加し、50-70%コンフルエントの状態に継代を続けた。

2. 細胞からの DNA の抽出

上記各培養細胞を遠心分離によって集め、培地を除いた後 proteinaseK 溶液にて処理した後、通常の Phenol/chloroform 法にてゲノム DNA の抽出を行った。得られた DNA の沈殿を 70%Ethanol にて洗浄し、TE-4 バッファーに溶解させた。また一部 DNA の抽出には市販の QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) を使い、プロトコールに従って行った。

3. 使用した SNP チップ

ヒト約 5 万 SNP サイトを網羅した GeneChip® Human Mapping 50K Array XbaI にて解析を行った。アレイには、フォトリソグラフィー製造法により同時合成された、配列の明らかな 25 bp オリゴヌクレオチドプローブが、1 種類あたり 100 万コピー以上から構成される。各 SNP には、1 組が 4 つのプローブからなる 5 組のプローブが対応し、各組は、4 対のパーマフェクトマッチプローブとミスマッチプローブから成り、位置をずらして SNP1 個あたりの 25 bp オリゴヌクレオチド合計 40 種類により判定を行う。

4. ゲノム DNA の制限酵素による消化とラベル化

細胞より抽出したゲノム DNA250ng を制限酵素 XbaI で消化し、XbaI シーケンスと続く PCR 増幅用のプライマー配列を持つアダプターをライゲーションした。その後、アダプター配列を認識する一種類のプライマーを用いて、アダプターを付加した DNA フラグメントを増幅した。この際、用いた PCR 条件は 250~1,000 bp のサイズのフラグメントを優先的に増幅するよう最適化した。次に、増幅した DNA を断片化し、ビオチン標識した後、GeneChip Mapping 50K Array にハイブリダイズさせた。

5. チップへのハイブリと、染色、洗浄およびシグナル検出

チップへのハイブリダイゼーションは、55 度にて一晩行い、ハイブリ溶液を除いた後、発現解析用チップと同様に Affymetrix 社の GeneChip 用フルイディックステーションにて洗浄および、ストレプトアビジン・フィコエリスリンによる蛍光ラベル化を行った後、GeneChip 専用スキャナーにてスキャンを行い、チップの蛍光イメージを取得した。

6. SNP の判定と LOH 解析

SNP の判定には、各 40 プローブずつのシグナル強度データを、専用の解析ソフトウェアである GeneChip DNA Analysis Software (GDAS) ソフトウェアで解析した。SNP 判定を元に、GDAS により LOH 領域が判定された。

7. ゲノムコピー数の解析

ゲノムコピー数の解析のため、フリーウェアとして利用可能であった、dCHIP (Lin et al., 2004) および CNAG (Nannya et al., 2005) というソフトウェアを使用した。

8. 間期核の FISH 解析

昨年度の検討で染色体異常が認められた hMSC のカルチャーについて、保存していた各種継代数の凍結細胞を用いてスライド標本を作製し、以下に示した各種 FISH プローブを用いて、染色体の数的異常の出現時期に関する検討を行った。

(Cambio)

- Star*FISH Human Specific-Centro Probes Cy3 Chromosome 7
- Star*FISH Human Specific-Centro Probes FITC Chromosome 8
- Star*FISH Human Specific-Centro Probes Cy3 Chromosome 17

(Vysis)

- CEP7 Spectrum Orange
- CEP8 Spectrum Green
- CEP17 Spectrum Orange

各セントロメア FISH プローブを、プロトコールに従ってハイブリ後、DAPI にて核を染色し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

9. Agilent カスタム CGH アレイを用いた 17 番染色体特異的 CGH 解析

本研究所、変異遺伝部にて作製された 17 番染色体特異的 CGH アレイ (Agilent) を使用し、異常の見られた hMSC 細胞由来の

DNA を用いて、標準プロトコールに従って解析を行った。概要は、ゲノム DNA を *Rsa*I にて消化後、ランダムプライマーを用いた PCR により Cy3 および Cy5-dUTP ラベルを行った。反応液を Microcon YM-30 カラムにて精製後、専用のハイブリチャンバー内にて 60°C、40 時間ハイブリを行った。そして、バッファーにて洗浄後乾燥させ、GenePix 4000B スキャナーにてシグナルを読み取り、CGH Analytics software (Agilent) にて解析を行った。なお、コントロールとして、市販のヒトリファレンス DNA (Promega) を用い、競合的にハイブリさせた。

C. 結果

1. 異常を持つ hMSC 細胞の Agilent CGH アレイを用いた確認

昨年度 SNP チップ解析した hMSC 株ロット #F1460 に関しては、図 1 に示すように 7 番および 17 番染色体に異常が検出されている。7 番染色体の異常については、マルチカラー FISH 法による染色体解析の結果から、セントロメア近傍が新たな染色体として 2 本分増加していることがわかった。また、正常な 7 番染色体の片方は、17 番染色体と転座融合しており、転座した 17 番染色体においては、SNP チップによる CGH 解析で、複雑な変化の兆候を示したことから、複雑なリアレンジメントがおきている可能性が示唆された。この 17 番染色体コピー数の変化と、その詳細について検討する目的で、17 番染色体特異的にデザインされたオリゴ CGH アレイを用いて解析を行っ

た。

その結果、図2に示すように17番染色体全体に渡って複数の増減を持つ領域が確認され、17番染色体においてもコピー数の変化が存在することが明らかとなった。

2. 異なるhMSCロットおよびHSMM細胞株におけるhMSC細胞の遺伝子安定性に関する検討

培養に伴う染色体変化にどの程度の一般性があるかを調べる目的で、他のhMSCロットおよびヒト骨格筋芽細胞に関しても同様に、培養に伴う染色体コピー数変化をGeneChip SNP 50K アレイを用いて解析した。

その結果として、HSMMでの解析例を図3に示す。リファレンスに用いたデータとの性の不一致により性染色体は差が見られた(ポジコンとなる)が、それ以外の染色体に関してシグナルの変化は認められなかった。また、他のhMSCロット(#4F1127, 4f0312, 5f0138)に関しても、培養の期間にかかわらず異常を示す細胞は認められなかった(表1)。また、SNPデータより、ヘテロ接合性の消失(LOH)に関しても検討を行ったが、有意にLOHを示す例は認められなかった。以上の結果より、幹細胞培養過程において最初に発見された染色体の変化の出現頻度は高くないことがわかり、こうした幹細胞は、一般には正常な核型を維持できることがわかった。

3 FISH解析による染色体変化の経時追跡

異常が確認されたロット#4F1560においては、CGHおよびマルチカラーFISH解析より7番染色体のコピー数増加が認められたため、7番染色体セントロメアプローブと、正常対照として8番染色体プローブを用いた2重FISH染色を長期培養後の25継代細胞を用いて解析した。その結果、予想に反して、7番染色体のセントロメアは正常の2個しか観察されず、異常が見られないことが示唆された。そこで、もうひとつ異常の見られた染色体として17番染色体プローブを用いて単独のFISH解析を行ったところ、ほぼすべての細胞において3個以上のシグナルが認められ、異常が観察された。この結果より、詳細は不明であるが、17番染色体のセントロメアをプローブとして異常細胞を検出できることがわかったため、8番染色体と17番染色体セントロメアプローブによる2重FISHを、凍結保存してあった同一ロットの12および21継代後の細胞を用いて行った。その結果、図5, 6に示すようなシグナルが得られた。そこで、それぞれ100個ずつの間期核細胞を使って解析した結果、表2に示すようなシグナル数が観察された。8番染色体セントロメア2シグナル以下の細胞に関し、3つ以上の17番セントロメアシグナルが得られた細胞および8番3および4シグナルに対し、5以上の17番シグナルを持つ細胞を異常細胞として判定し、その出現頻度を調べた結果、12継代で17%および21継代で53%と約半数を占めた。マルチカラーFISHを行った25継代の細胞ではほぼすべてに異常が見られたことから、21継代付近で急激に異常細胞の割合が増加したことが示唆された。これは、細胞の増殖曲線の記

録にも反映されており、図7に示すとおり、異常のあった#4F1450では、この付近において増殖曲線の傾きが急になっていた。このロットにおいては、比較的長期培養が可能であり、増殖性を獲得した細胞が不死化した可能性も残されている。

D. 考察

各種体性幹細胞を含む細胞治療用の細胞を、*in vitro*において培養する場合には、必ずいくつかの危険性が伴う。まず、起こりにくいが深刻な問題となる細胞の取り違い、これは既に細胞バンク等で指摘されているように、複数の細胞を同一機関で培養する際の危険性として指摘されている。この問題については、STR解析やSNP解析により高精度で細胞の同一性を保証できることを既に示した。次に、染色体異常に代表される遺伝的安定性を調べることが重要となる。特に、最近報告されたヒト万能性幹細胞 iPS の場合には、*c-myc* 遺伝子の導入や、レトロウイルスベクターの使用による染色体の不安定性が懸念されており、がん化につながる初期変化として、その検出は重要な課題となることが予想される。我々はすでにヒト骨髄由来間葉系幹細胞 hMSC を題材として用い、長期培養による遺伝的安定性を SNP チップをはじめとするアレイ CGH の手法を用いて検討を行った。その結果、解析した最初の例においてゲノムのコピー数の変化が認められ、マルチカラー-FISH 法による染色体解析において、7番および17番染色体の転座および増幅を伴う異常を検出した。CGH アレイにて検出された事からも推察されたように、長期培

養により細胞集団は全てこの異常を持った細胞集団へと変化していた。これは、幹細胞の培養過程における染色体変化の危険性、および増殖性細胞の出現を示す結果であり、今年度は、この現象がどの程度の頻度でおこるか、また起きた変化は培養のどの時期から起きていたかに関して検討を加えることにした。

まず、普遍性という課題に関しては、調べた他のロットおよび骨格筋芽細胞においてCGH解析およびLOH解析による異常は見いだされなかった。よって、染色体変化はそれほど頻度が高い現象ではなく、最初の異常が特殊なケースであったことがわかった。ただし、ここで注意しなければいけないのは、CGH法にてゲノムの変化として検出できるのは、異常が少なくとも全体の細胞集団の半数を占めた場合、即ち、異常細胞が増殖性を獲得して細胞集団に広がった場合にのみ検出可能と言える。その意味では、がん化に必要な増殖性を獲得した細胞を検出できる系であるとも言え、今後そのような応用も考えられる。

次に、培養の過程において異常が発現した時期に関する検討に関しては、昨年度の報告書にて、算術的に細胞集団へ異常が広がるためにはかなり長い培養期間を要するという考察から、比較的早い時期に最初の異常が起きていたことを予測していたが、今年度のFISHを用いた解析により、予想通り比較的早い時期から異常が出現していることが明らかとなった。12継代目に2割弱異常細胞が存在するという事は、培養開始初期から微量に異常細胞が存在したことを示唆するものである。この予測を裏付ける事実として、最近開かれた第7回日本

再生医療学会総会において、他の研究室において培養された Cambrex 社 hMSC の同一ロット（# 4F1560）が、継代の過程において我々の場合と同様に途中で増殖曲線の傾きが変化し増殖速度が少し速くなるというデータが発表されている事に気がついた。これは、細胞購入時にすでに異常細胞が存在した可能性を強く示唆しており、現在、凍結保存された同一ロットからもう一度継代培養を続け、同じ異常が出現するかどうかを検討している。

今回 FISH 解析では、当初予想された 7 番染色体セントロメアプローブでは数的異常は検出されず、代わりに 17 番染色体セントロメアプローブにて異常が検出できた訳であるが、間期核での検討であるため詳細はな理由は不明である。可能性としては染色体解析において増えていた 7 番染色体が 17 番染色体のセントロメアを持つことになり、非常に不思議である。17 番染色体自体にもコピー数変化が検出されているので、その可能性はあるが、メカニズムを含めてその真偽に興味を持たれる。今後、分裂中期像を使って FISH 解析を行うことによりその詳細を検討したい。

今回異常示した hMSC ロットが不死化およびがん原性を持つかという疑問に関しては十分に検討できなかったが、前者に関しては、増殖速度は落ちるものの、他のロットより長期培養可能であり、現在 39 継代まで培養を続けている。がん原性を持つかどうかに関しては、今後免疫不全マウスへの移植実験などにより確認したい。

さらに、今回の異常細胞がどうして増殖性を持ったかという疑問に関しても十分に検討ができなかったが、7 番染色体セン

トロメア近傍にある癌関連遺伝子として、乳癌細胞において増幅が認められている EGFR（Epidermal Growth Factor Receptor）遺伝子があり、この遺伝子数の増加が増殖性獲得に寄与している可能性が考えられる。今後、EGFR 遺伝子プローブによるコピー数変化の確認を行うとともに、その発現量に関しても検討を加えたい。

以上、今年度は SNP チップによる CGH、LOH 解析と、FISH による特定染色体コピー数変化を解析してきたが、両者はそれぞれ一長一短を持ち、相補的に働く。即ち、前者は網羅的であり、微細な変化も検出できるが、全体の平均を取るため異常細胞の割合が多くなると検出できず、感度という面では劣る。逆に、セントロメアプローブを用いた FISH 法では一細胞ずつを対象とできるため、異常が低頻度であっても数をこなすことにより検出できるが、特定の染色体にのみ限られるため、それ以外の染色体の異常は検出できないという網羅性に欠ける。その点、マルチカラー FISH は網羅性は高いがスループットという点では今のところ十分ではない。両者の欠点、長所をうまく補いながら使っていくことが重要かと思われる。

実際の細胞治療の場において、こうした染色体解析技術を細胞の品質評価に使うとする場合、どうしても異常細胞を低頻度の状態から検出できる方法が望まれる。残念ながら現在の技術水準ではそれを達成する手法は存在しないが、上記のような既存の技術をうまく組み合わせていく手法に加え、新しい原理に基づいた革新的な試験法を開発するアプローチが今後必要であると考えられる。

E. 結論

SNP チップを用いた解析により、LOH 解析とともに染色体コピー数の変化の検出に有効であることが示され、細胞治療に用いる培養細胞の遺伝的安定性の検証法として、その利用が期待できる。また、oligoCGH アレイはカスタムデザインが可能なアレイとして、より詳細な解析が可能であり、がん遺伝子増幅のメカニズム解析にも有効であることが示された。また、ヒト間葉系幹細胞を使った長期培養実験から、染色体変化が観察され、その発生時期や一般性に関して検討を加えた結果、頻度は高くないものの、変化が比較的培養初期からおきていたことが判明し、新たな課題が呈された。FISH 法は比較的low頻度な状態から、特定の染色体変化を検出する手法として有用であった。

一方、CGH 解析は確かに検出感度という点ではやや劣るが、網羅性、解像力に優れており、長期培養による評価が許される場合においては、増殖性の変異を検出可能となるという利点も兼ね備えることになり、現実的な手法として、今後実際に細胞の品質評価の上でも有用な手法であることが判明した。以上の結果より、今後細胞治療用培養細胞の遺伝的安定性の評価のためには、追加培養を加えた CGH 解析の手法を推奨する。なお、自家培養や緊急性を要する場合など、追加培養による CGH 解析が適さない場合には、マルチカラーFISH 法などの染色体解析法が有用だと考える。ただし現実的な問題として、異常が見つかった際の対処が十分取れない場合などには、試験自体を行う意義についても十分に検討をし

ておく必要があると考えられる。

G. 健康危険情報

特になし

H. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe T, Tobe K, Nakachi Y, Kondoh Y, Nakajima M, Hamada S, Namiki C, Suzuki T, Maeda S, Tadakuma A, Sakurai M, Arai Y, Hyogo A, Hoshino M, Tashiro T, Ito H, Inazumi H, Sakaki Y, Tashiro H, Furihata C. Differential Gene Expression Induced by Two Genotoxic N-nitroso Carcinogens, Phenobarbital and Ethanol in Mouse Liver Examined with Oligonucleotide Microarray and Quantitative Real-time PCR. *Genes and Environment*, 29:115-127, 2007.

Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M. Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. *Mutat Res.*, 619:113-123, 2007.

Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Oshizawa T, Yamaguchi T. A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133-positive cells. *J Biol Chem.*, 282:33507-33514, 2007.