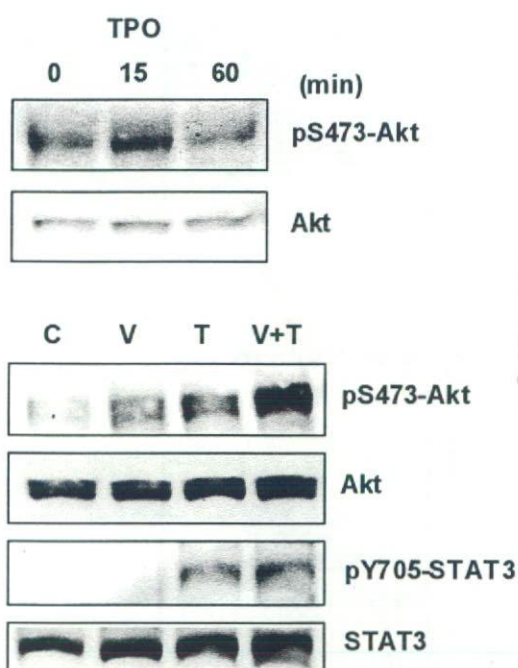


a. イムノブロットによる解析



b. FACSによるリン酸化AKTの解析

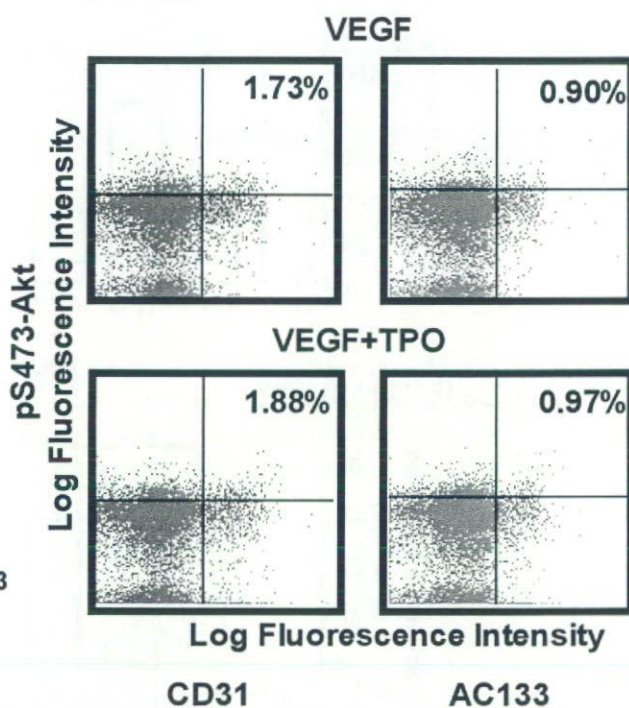


Fig.6 AC133⁺細胞におけるTPO添加によるAKT及びSTAT3のリン酸化

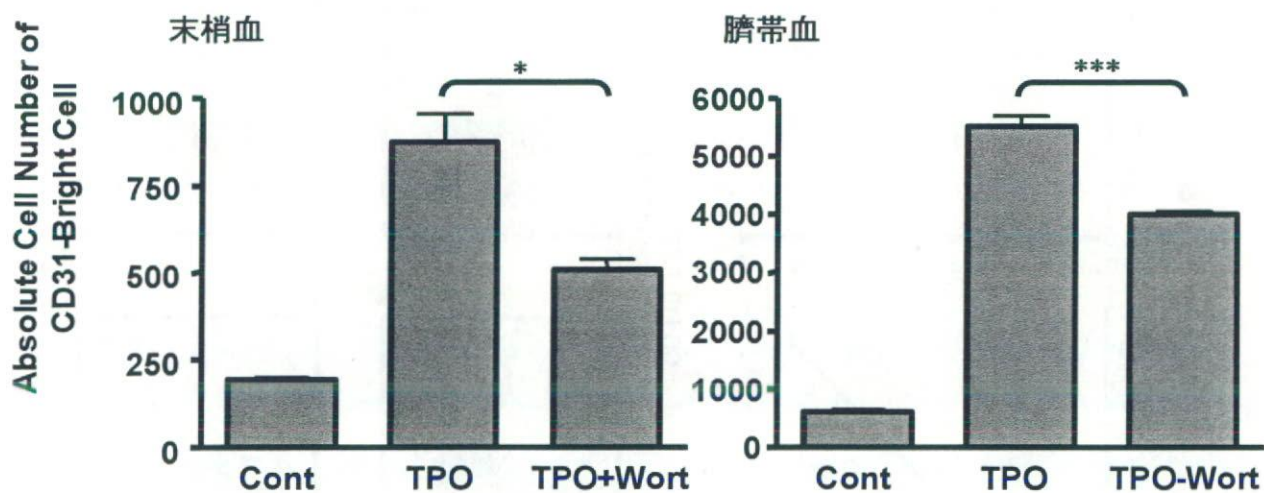


Fig.7 TPOのEPCの分化・増殖作用におけるワートマニンの効果

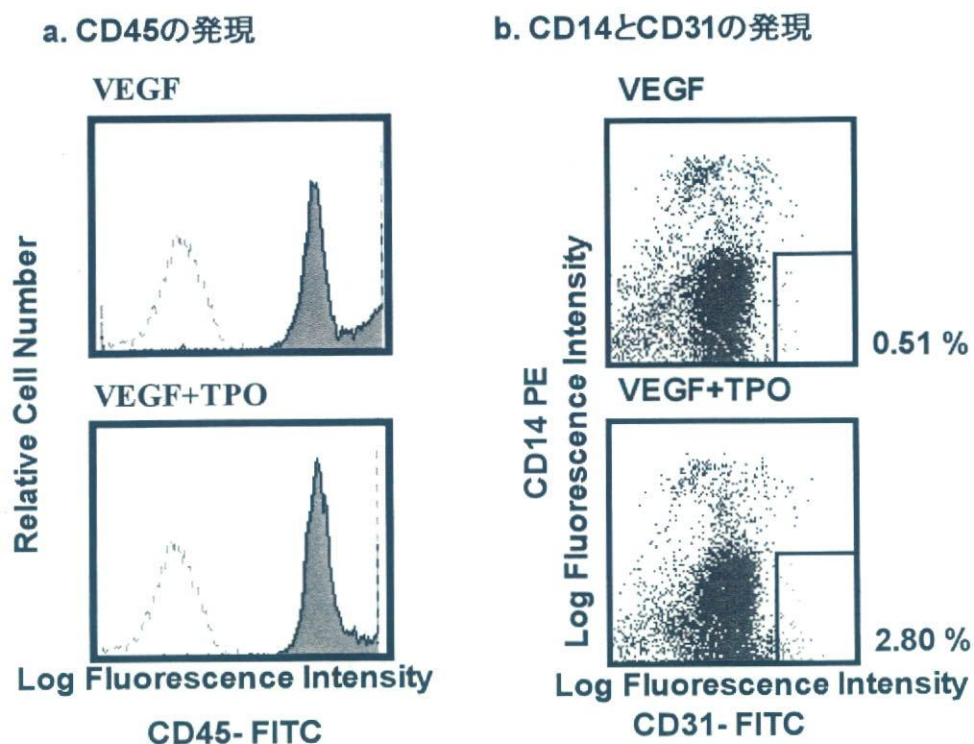


Fig.8 培養AC133陽性細胞におけるCD45とCD14の発現

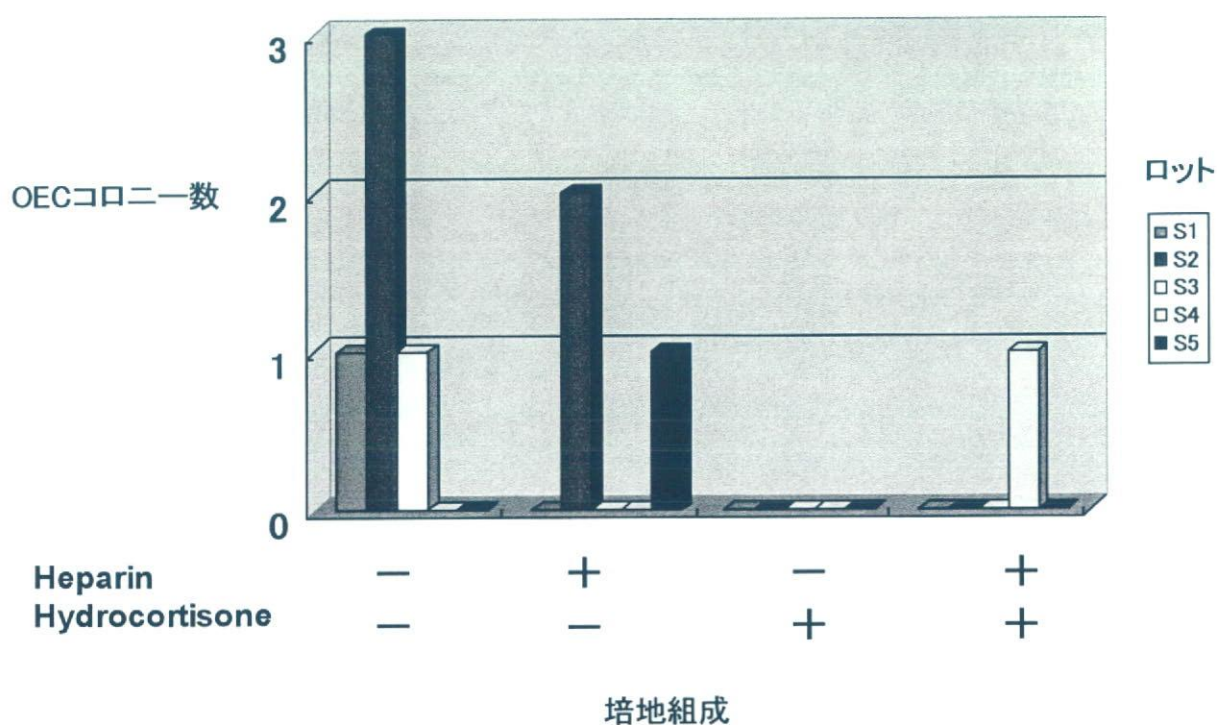


Fig.9 OECコロニー出現に対するhydrocortisoneおよびheparinの影響

Table 1 分画した単核球から誘導されたOECコロニー数

		Exp. 1	Exp. 2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Exp. 6	Exp. 7
実験条件	Cord Blood	Frozen	Frozen	Frozen	Fresh	Frozen	Fresh	Frozen
	CD45 ⁺ 回収率	56%	34%	30%		28%	46.40%	30%
	HC添加 (day 7~)	—	—	—	—	+	+	+
OECコロニー数	MNC	1 12.5x10 ⁷	1 9.1x10 ⁷	0 6x10 ⁷	0 10x10 ⁷	63 6x10 ⁷	63 8x10 ⁷	2 6x10 ⁷
	CD45 ⁺	0 30x10 ⁷	0 23.9x10 ⁷	0 45x10 ⁷		0 30.6x10 ⁷	10 10x10 ⁷	0 24x10 ⁷
	CD45 ⁺		0 3.3x10 ⁷	0 2x10 ⁷		34 6x10 ⁷	127 13x10 ⁷	21 4x10 ⁷
	CD45 ⁺ /CD34 ⁺		0 0.7x10 ⁷	0 0.55x10 ⁷		9 0.8x10 ⁷		5 3.25x10 ⁷
	CD45 ⁺ /CD34 ⁺	0 6x10 ⁷	0 0.7x10 ⁷	5 1.4x10 ⁷		1 1.6x10 ⁷		3 0.84x10 ⁷

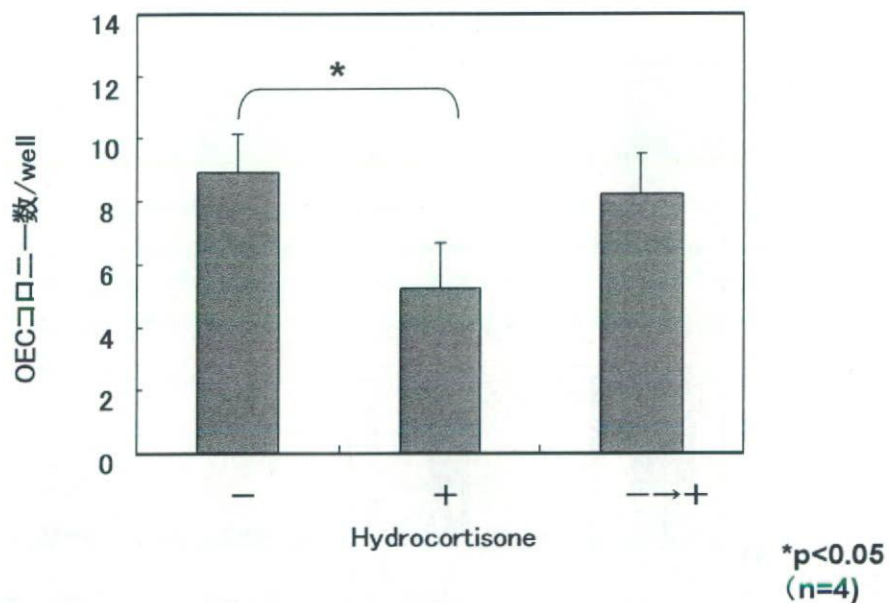


Fig.10 Hydrocortisoneの添加とOECコロニー数の関連(単一ロットでの解析)

a)

2% FCS	拡大した ライン数	6cm dish まで拡大	10cm dishまで まで拡大	10cm dish で継代	60日ぐらいまで さらに継代
		×	△	○	◎
バッチ1	3	2	1	0	0
バッチ2R	7	2	0	3	2
バッチ2N	5	0	3	2	0
バッチ3	5	4	0	0	1
バッチ4	3	2	1	0	0
バッチ5	2	1	1	0	0
計	25	11	6	5	3
割合	100.0	44.0	24.0	20.0	12.0

FCS濃度を10%に変更

b)

10% FCS	拡大した ライン数	6cm dish まで拡大	10cm dishまで まで拡大	10cm dish で継代	60日ぐらいまで さらに継代
		×	△	○	◎
S1~S5	6	1	0	0	5
割合	100.0	16.7	0.0	0.0	83.3

Fig.11 OEC拡大の成功率

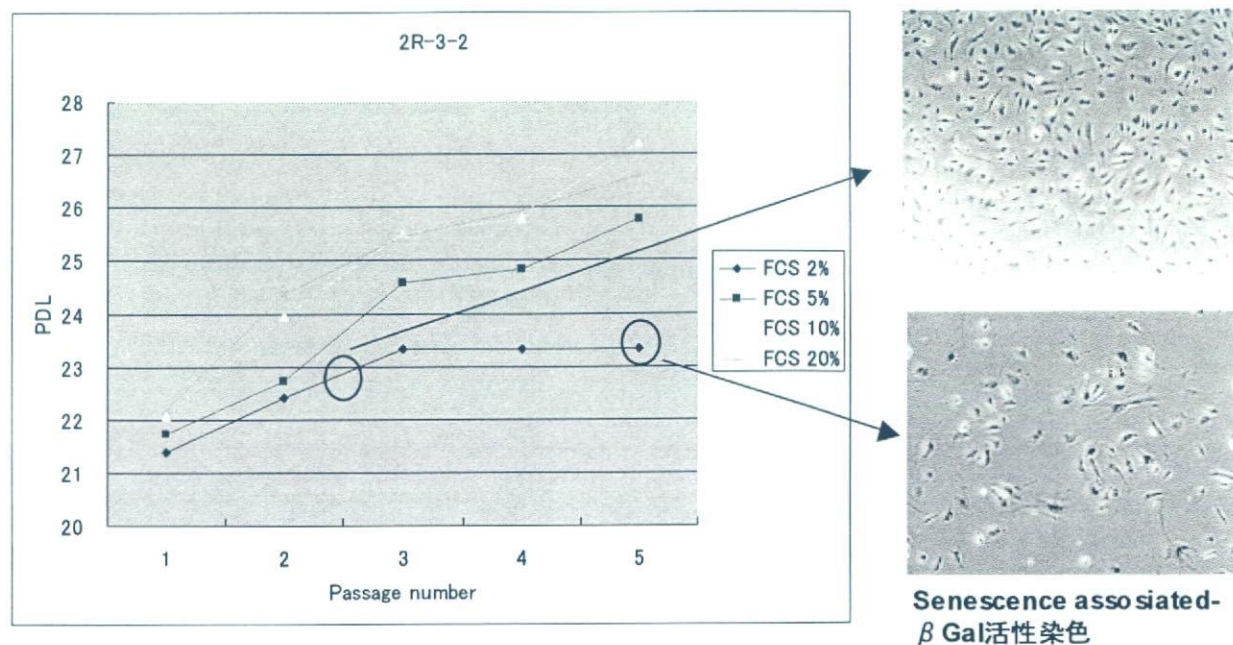
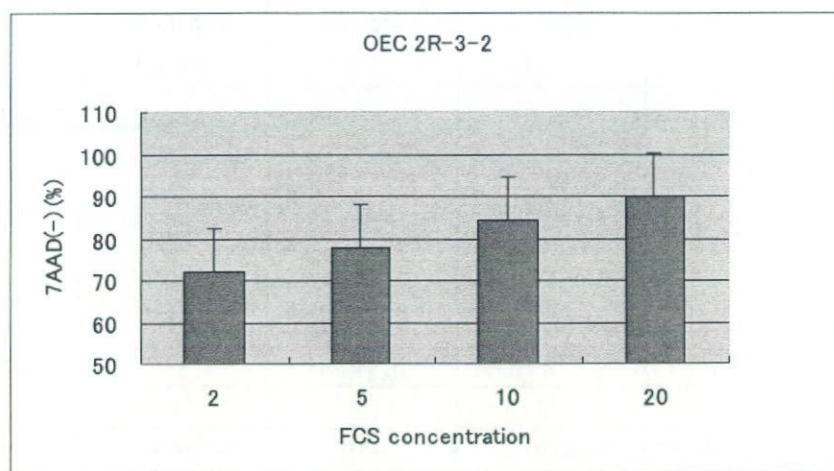
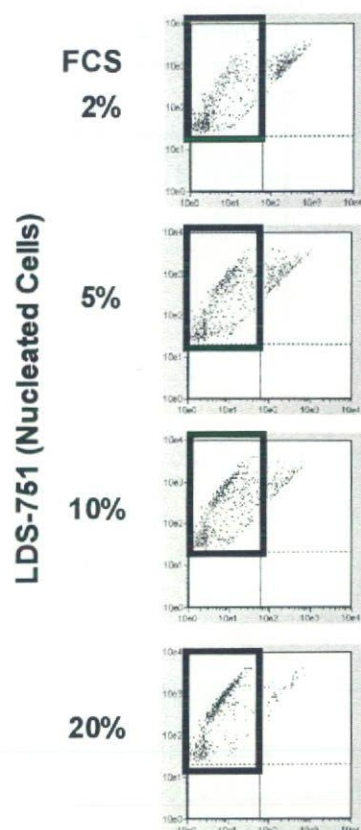


Fig.12 OEC増殖に対する血清濃度の影響



FCS 濃度	P2 **	P3	P4	P5	P6	平均
2%	72	64.8	79.8			72
5%	76	74.7	82.6	80	84	78
10%	80.5	83.6	89.3	91.1	82.2	84
20%	84.7	94.9	90.5	86.5	93.3	90

7-AAD (Apoptotic cell)

* * → Day46のOECストック起眠後の passage number

Fig.13 OECのviabilityに対する血清濃度の影響(7-AAD 染色による評価)

維持培養中の
FCS濃度

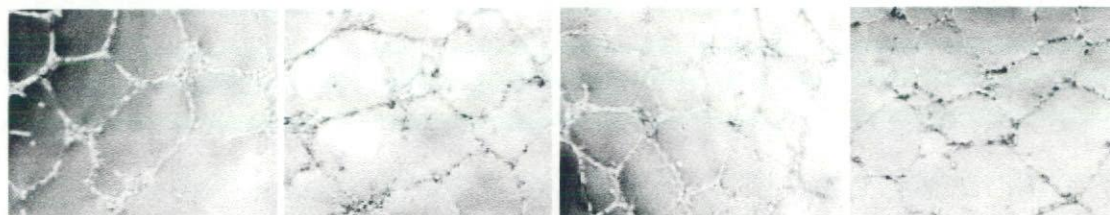
2%

5%

10%

20%

Matrigel



GFR-
Matrigel

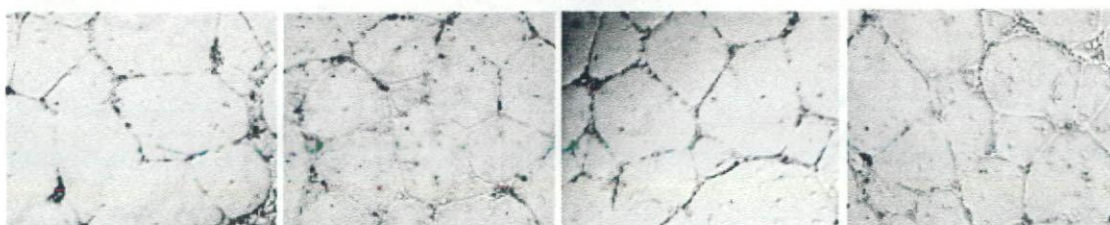


Fig.14 OECの管腔形成能に対する培養中血清濃度の影響

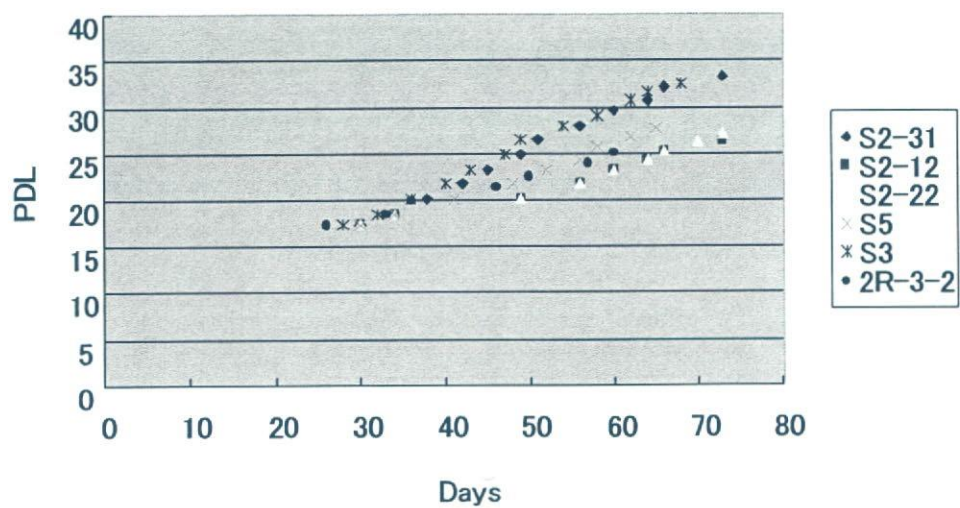


Fig.15 樹立したOEC株の増殖特性

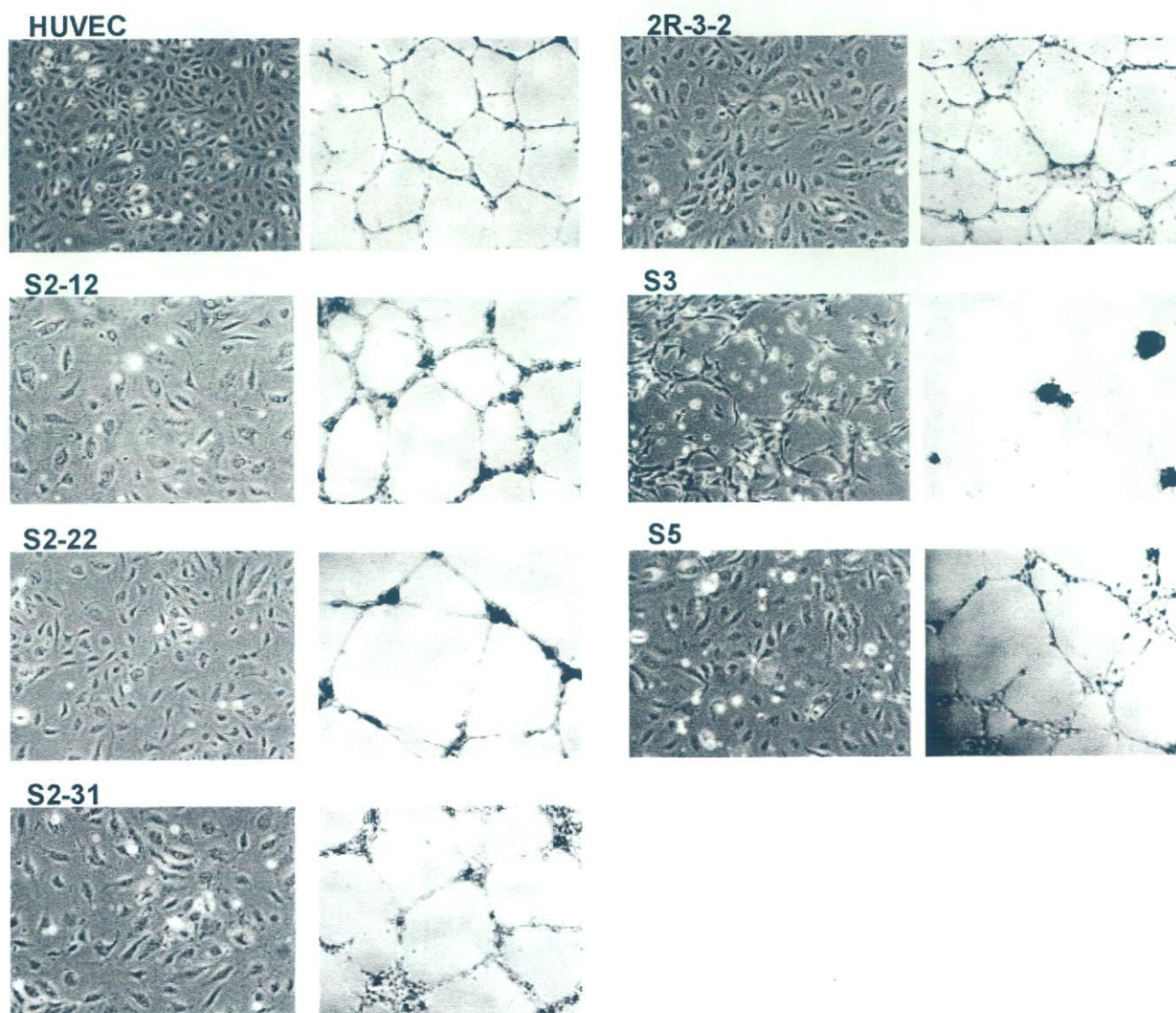


Fig.16 樹立したOEC株の形態とMatrigel上での管腔形成能

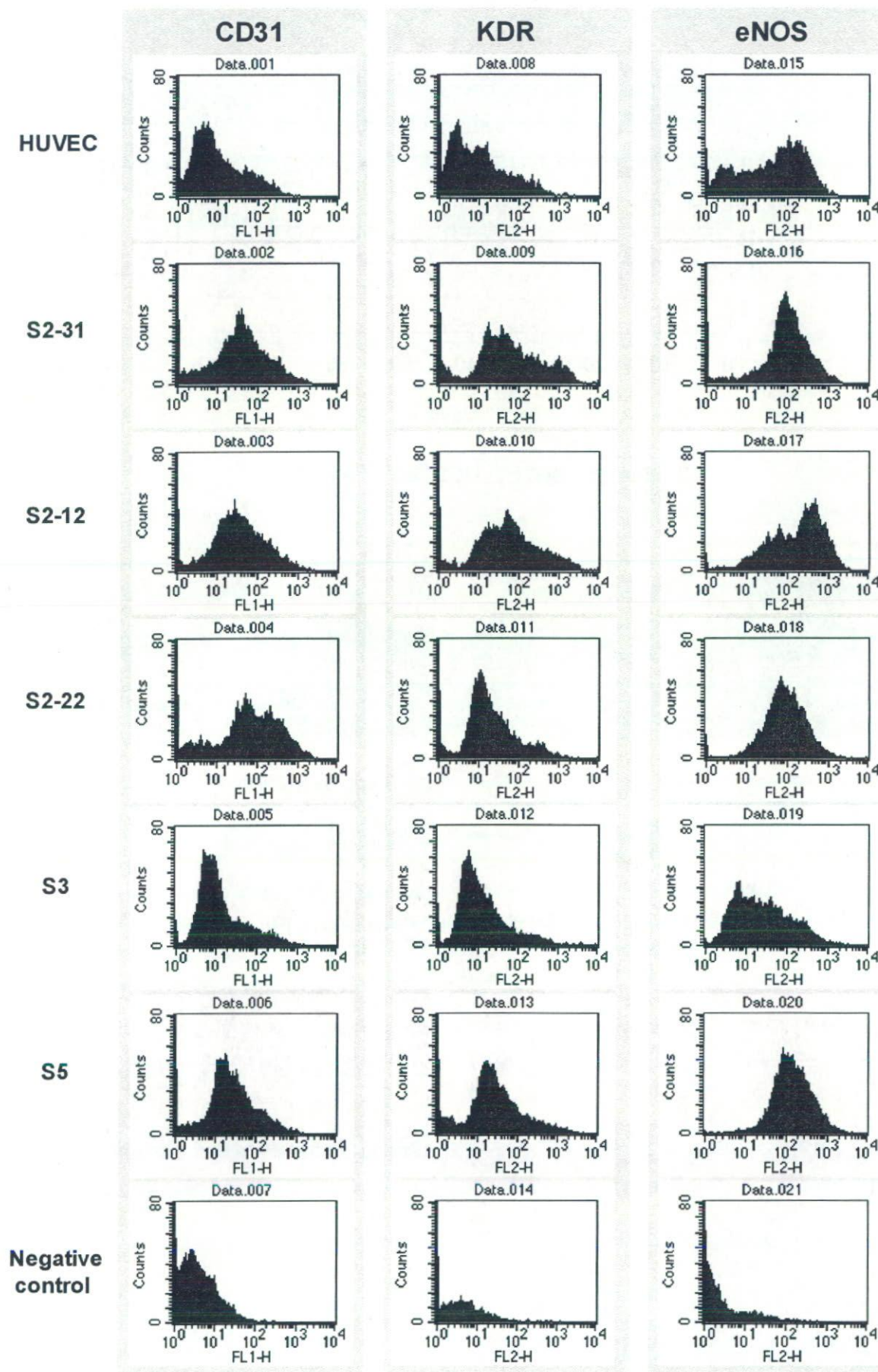


Fig.17 樹立したOEC株におけるCD31, KDR, eNOSの発現

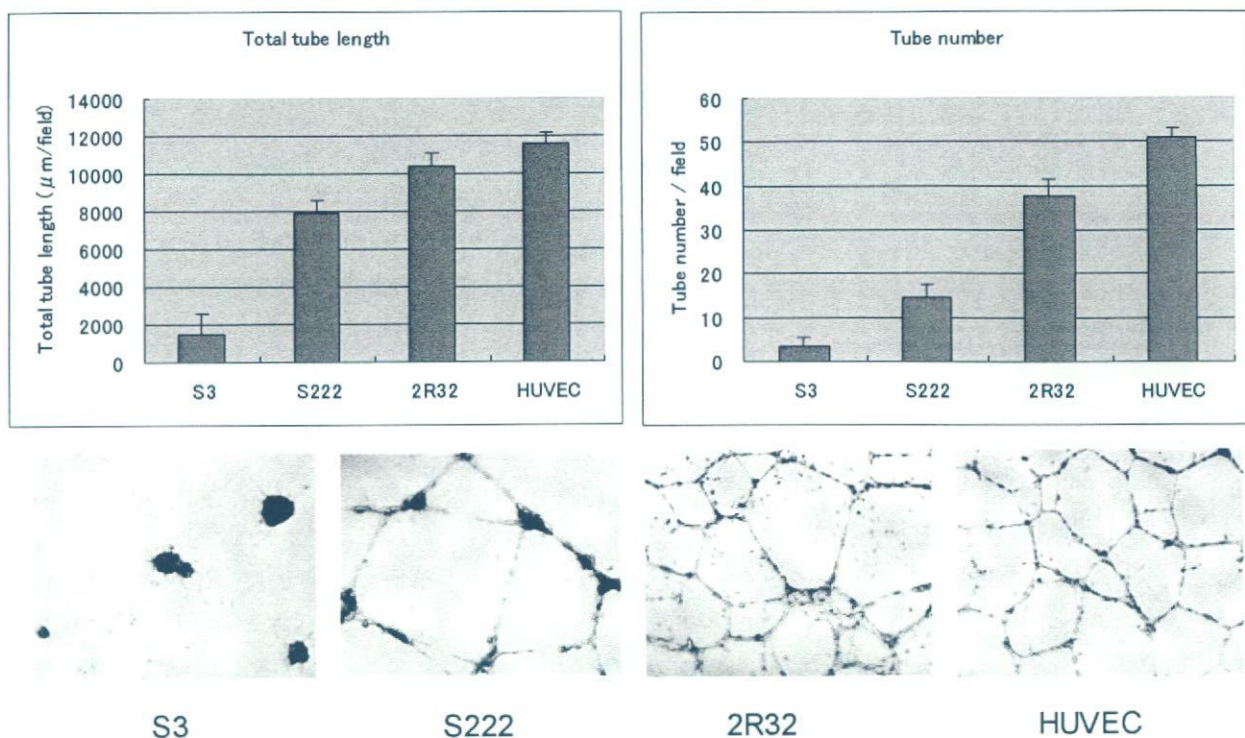


Fig.18 特性指標の探索に用いたOEC3株およびHUVECの管腔形成能の定量評価

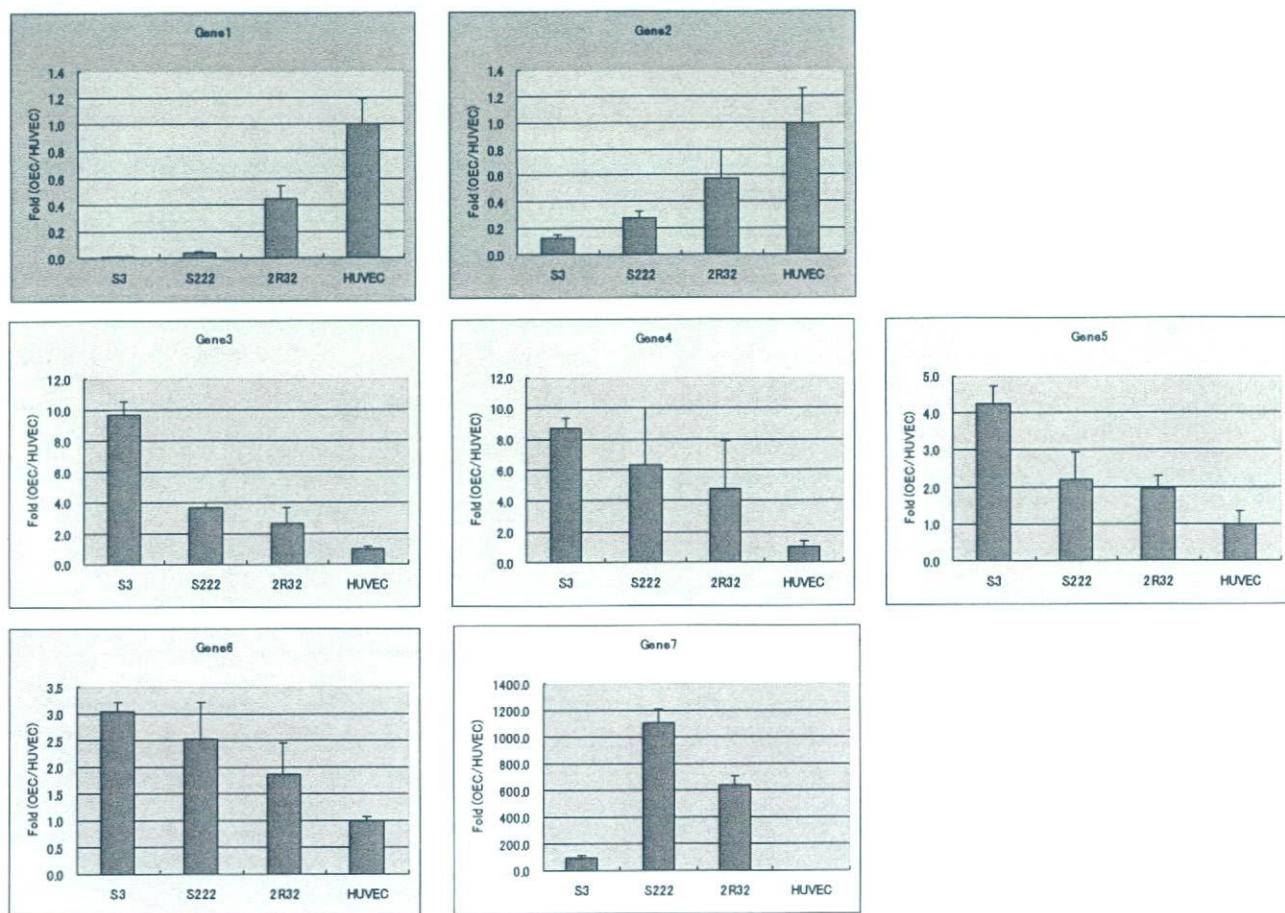


Fig.19 特性指標候補と考えられる遺伝子の発現量の比較

細胞組織利用医薬品の品質・安全性確保に関する研究

分担研究者 佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部・第2室・室長

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・第2室・研究員

研究要旨 細胞組織利用医薬品には細胞または組織が含まれるため、主作用以外の品質特性（品質を評価する対象項目）については設計段階で完全に把握することが難しい。そこで我々は、ヒト骨髓由来間葉系幹細胞(hMSC)を例にして、製品のばらつきの所在（品質特性となりうる生理機能）をトランスクリプトーム解析によって同定する方法の検討を行った。まず、複数ロットのhMSCから継代数7および9の細胞を調製し、Affymetrix HG-U133 Plus 2.0を用いてmRNAの発現を測定した。継代数7と9双方に共通してCV値（=SD/平均値）の高い遺伝子についてオントロロジー解析を行い、関連遺伝子の発現に関してロット間のばらつきの大きいオントロロジーを同定した。観測されたCV値に影響を与える非特異的ハイブリダイゼーションはAbsolute Analysisによって評価し、検出機器の検出限界および検出機器由来の測定誤差を単一の試料の繰返し測定により算出して観測値から除くことにより、試料由来のCV値を求めた。オントロロジー解析の結果、試料由来のCV値が高い遺伝子には細胞分化・発生・免疫反応等のオントロロジーと関連するものが多いことが明らかとなった。また、観測CV値は非特異的ハイブリダイゼーションと測定機器の検出限界に大きく影響されることが明らかとなった。CV値の高い遺伝子群により構成されるオントロジークラスター間の相関を、主成分分析による第一主成分の算出、および算出されたロットごとの第一主成分得点間の相関係数により評価したところ、他のどのクラスターとも相関を示さないオントロジークラスターとして“blood pressure regulation”が検出された。このことは、他の生理機能のばらつきから“blood pressure regulation”に関連する細胞表現型のばらつきを類推できないこと、つまり特別の試験系を設定しなければ評価できないことを示唆している。本分担研究により、トランスクリプトーム解析は細胞組織加工医薬品の品質のばらつきの所在、即ち品質特性の候補を同定するツールとして有用であること、およびその際にはサンプル以外に由来する誤差を慎重に吟味することが重要であることが示唆された。

A. 研究目的

ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治療に用いる細胞組織加工医薬品の開発は世界各国で急速に進んでいる。このように細胞・組織そのものを治療薬として用いることができれば、がん・筋ジストロフィー・再生不良性貧血・心筋梗塞など致命的な疾患、あるいは骨粗しょう症・重篤な肝疾患等に対して

きわめて有効な治療法になる可能性が高いと期待されている。わが国においても、様々な細胞組織加工医薬品の開発が進められており、平成19年10月には重症熱傷治療用培養皮膚製品が本邦初の細胞組織加工医薬品として承認され、近い将来にはさらに多くの細胞組織加工医薬品が実用化されると見込まれている。しかし、細胞組織加工医薬品は未知・未経験な要素が多く

本格的な実用化に至るために検討すべき課題はまだ数多い。細胞組織加工医薬品は、非常に複雑な構造と「生きている」というこれまでの医薬品にない性質を持っており、新たな特性解析技術や品質管理法の開発、あるいは安全性確保のための適切な評価技術の開発が望まれている。

医薬品の安全性確保のためには、医薬品のもつリスクを的確に評価することが必要である。具体的な作業としては、①意図する使用目的（薬効・主作用）および安全に関わる特質の明確化、②既知あるいは予見可能なハザード（毒性・副作用）の特定、および、③各ハザードに関するリスクの推定を行わなければならない。また、④これらの結果から導き出される安全上の要求事項を「漏れなく」「曖昧でなく」「かつ「相反することなく」導き出す必要がある。

一般に医薬品の品質確保において、その物理的性能（化合物の安定性など）に関しては、現代の科学技術をすれば比較的容易に設計・コントロールが可能である。医薬品の同等性・不純物混入などに関しては物理的性能よりは設計・コントロールが難しい。一方、薬物動態・薬効・毒性などの性質に関しては、現代の科学技術をして設計・コントロールすることは非常に困難である（“Drug Discovery”と言われる所以である）。医薬品の品目別に言えば、一般的に、化学合成品、天然化合物、生薬、生物薬品の順に品質の設計・コントロールが困難となっていく。

細胞組織加工医薬品の品質の設計・コントロールは、生物薬品よりも更に困難である。つまり、細胞組織加工医薬品に関しては、意図した機能・薬効以外の品質特性（品質を評価する項目）を「漏れなく」把握する事が非常に困難となる。その理由は、上述のように、細胞組織加工医薬品が非常に複雑な構造と「生きている」というこれまでの医薬品にない性質をもつことによる。つまり細胞組織加工医薬品は、製品（細胞・組織）の「ばらつき」の所在が極めて不明確であり、潜在する「ばらつき」による思わ

ぬハザードが出現する危険性がある。この問題を解決する方法として、近年開発されたハイスループットのアッセイ系（所謂“Omics”）を利用して細胞組織加工医薬品の品質特性を網羅的に探索する方法が考えられる。

ヒト骨髓由来間葉系幹細胞(hMSC)は、多分化能を有し、再生医療における細胞組織加工製品の原料として期待されているだけでなく、hMSC自身が持つ免疫抑制効果を応用し、造血系幹細胞移植医療における移植片対宿主病（GVHD, graft-versus-host disease）を抑制するための医薬品としての開発も進行している。本分担研究では、hMSCを例にして、製品の「ばらつき」の所在（品質特性となりうる生理機能）をトランスクリプトーム解析によって網羅的に同定する方法の検討を行い、その技術的問題点と解決法を評価した。

B. 研究方法

1. 細胞の培養

ヒト骨髓由来間葉系幹細胞(hMSC)はLonza社（旧Cambrex）より購入した。購入した細胞のロットは4F1127、4F0312、5F0138、4F1560、4F0591、4F0760の6種類であった。hMSCは製造者指定のプロトコールに従い、2% L-グルタミンおよび0.1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む専用増殖培地（MSCGM, Lonza社）中、炭酸ガス濃度5%、温度37℃で培養した。細胞の継代も製造者指定のプロトコールに従った。

2. 培養細胞からのtotal RNAの抽出

直径10cmの細胞培養用ディッシュに蒔いた継代数7または9のhMSCを、600 μ lのRLTバッファー（QIANEN）で溶解し、QIAshredder（QIAGEN）を用いてホモゲナイズしたのち、total RNAをRNeasy mini kit（QIAGEN）を用いて抽出した。total RNAはDEPC処理を施した蒸留水に溶解した。

3. トランスクリプトーム解析

Affymetrix社の2-cycle cRNA合成キットを用い、マニュアルに従って、抽出したtotal RNAサンプル(100 ngまたは10g)から逆転写反応によってcDNAを合成し、次いでcDNAをもとにしてビオチン化cRNA断片を合成した。GeneChip Hybridization Ovenを用いてビオチン化cRNA断片をGeneChipにハイブリダイズさせ、次いでハイブリダイズしたcRNAをGeneChip Fluidics Stationを用いてストレプトアビジン・フィコエリスリンで染色することにより可視化し、GeneChip Scanner 3000で走査した。得られた蛍光データはGCOSソフトウェア (Affymetrix) で解析した。GeneChipはHuman Genome U133 Plus 2.0 Array (54,613プローブセット/枚)を用いた。蛍光シグナルの値は、Affymetrix社の提供するMSKファイルにリスト化されているプローブセットの蛍光シグナルの平均値によって正規化した。Target Intensityは10,000とした。この際、Scaling Factorは2~3であった。

4. 遺伝子オントロジー解析

GeneChipを用いた実験における測定アーチファクトを考慮に入れた上で、6ロットのhMSC (継代数7) において、発現シグナルの変動係数 (CV値, coefficient of variation=標準偏差/平均値) の大きさが全プローブセット中のトップ1,000位に含まれるプローブセットを抽出、継代数9の細胞についても同様に上位1,000個のプローブセットを抽出した。さらに、継代数非依存的に大きなばらつきを示すプローブセットを抽出する目的で、継代数7と9のそれぞれのCV値上位1,000個に共通して含まれるプローブセットを選択した。選択されたプローブセット集団について、GOTM (Gene Ontology Tree Machine; Vanderbilt University; <http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm>)を用いて、

有意 ($P<0.01$) に濃縮される遺伝子オントロジークラスターを探索した。

5. 主成分分析および相関係数算出

GOTMを用いた遺伝子オントロジー解析において有意な濃縮が認められた各遺伝子オントロジークラスターにおいて、属するプローブセットの発現シグナルを標準化した。即ち、各ロットの発現シグナルと6ロットの平均値との差を6ロットの標準偏差で割った商 (z値) を求めた。各遺伝子オントロジークラスターに属するすべてのプローブセットについて、標準化 (z値化) された発現シグナルを用いて主成分分析を行った。主成分分析の計算には、SYSTAT J ver10.2 (SYSTAT Software Inc.) を用いた。主成分分析の結果に基づき、6ロットのそれぞれについて第一主成分得点を計算した。これにより、各遺伝子オントロジークラスターについて第一主成分得点からなる1行6列の行列を得た。次に、得られた1行6列の行列について、遺伝子オントロジークラスター間の相関係数 (スピアマン順位相関係数) およびそのP値を計算した。スピアマンの順位相関係数および有意確率 (P値) の算出はGlantz, S.A.による著書 (Primer of Biostatistics [Fifth Edition], McGraw-Hill, 2002, pp.273-277) および群馬大学社会情報学部・青木繁伸「統計学自習ノート」の「スピアマンの順位相関係数」の項 <http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/lecture/Soukan/spearman.html>に基づき、Microsoft Excelを用いて行った。有意水準は $P<0.001$ とした。

(倫理面への配慮)

ヒト由来の生体試料に関しては、試料提供者に一切不利益および危険性が伴わない、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに採取された試料を用いた。また、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について国立医薬品食品衛生研究所・研究倫理委員会によ

る審査・承認を得た上で研究を実施した。

C. 研究結果

1. GeneChip解析のアーチファクトの評価

GeneChipを用いた実験における測定アーチファクトには3種類ある。すなわち、

「GeneChipに対する非特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナル」、「測定機器の検出限界未満のノイズ」、および「測定機器由来のシグナルのばらつき」である。

1-1. 非特異的なハイブリダイゼーション

「GeneChipに対する非特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナル」を評価する方法として、GeneChipおよびGCOSプログラムによる“Absolute Analysis”の結果を採用した。“Absolute Analysis”はGeneChipの各プローブセットに対応する転写産物が実際に発現しているか否かを、プローブセット内のパーフェクトマッチプローブ由来蛍光シグナルとミスマッチプローブ由来蛍光シグナルとを比較することにより、定性的に判定する解析である。判定は“Present”、“Marginal”または“Absent”として出力される。本研究では、検討した6ロットで“Present”の判定が認められないプローブセットの蛍光シグナルを、非特異的なハイブリダイゼーションによるものと判断した。

1-2. 検出限界

いかなる測定系にも検出限界が存在する。普段あまり省みられることはないが、GeneChipとスキャナーを用いた測定系も例外ではない。ISOおよびIUPACの定義に基づくICHの定義によれば、検出限界は、

$$L_c = 3.3 \times s_m / a \quad (> \text{検出不可能}) \quad \cdots \textcircled{1}$$

とされる。 L_c は「濃度推定値の検出限界」、 s_m は測定値の標準偏差、 a は検出限界付近の検量線の傾きである。「測定値の検出限界」を

$L_m (=a \times L_c)$ とすると、

$$L_m = 3.3 \times s_m$$

となるので、測定値のCV値を CV_m とすれば①式は以下の②式のように書き換えることができる。

$$CV_m = s_m / L_m = 0.3 \quad (< \text{検出不可能}) \quad \cdots \textcircled{2}$$

つまり、「測定値の検出限界」とは、測定値のCV値(CV_m)が0.3となる点を指すことになる。

使用した6ロットのhMSC(継代数7)の中の1つから合成された単一のcRNAサンプルを用いて、繰り返し測定を行った結果をFig.1に示す。同一サンプルの繰り返し測定における測定値の標準偏差は、平均値が増加するに従って増加する傾向が認められた(Fig.1a)。これとは対照的に、CV値は平均値が増加するに従って減少する傾向が認められた(Fig.1b)。Fig.1cはFig.1bのグラフの横軸を線形目盛りとし、平均値の低い部分を拡大したものである。これから判断すると、 CV_m の移動平均値(100データ)が0.3を通過するのは測定シグナルが60のときであることが明らかとなった。同一ロットの継代数9のサンプルを繰り返し測定した場合も同様の結果が得られた(データ省略)。

1-3. 測定機器由来のばらつき

いかなる測定機器から得られた観測値にも必ず測定誤差が含まれるのは不可避である。複数のサンプルを測定する場合の観測値の標準偏差を SD_m 、このうちサンプル由来の標準偏差を SD_s 、測定機器由来の標準偏差を SD_d とした場合、以下の③式が成り立つ。

$$SD_m^2 = SD_s^2 + SD_d^2 \quad \cdots \textcircled{3}$$

単一サンプルを繰り返し測定した場合には、サ

サンプル由来の標準偏差がないと仮定できるので、観測値の標準偏差はそのまま測定機器由来の標準偏差と考えてよい。Fig.2aはFig.1aのグラフの縦軸と横軸を両対数目盛りでプロットしなおしたものである。Fig.2aより、検出限界以上の平均値に関しては、「測定機器由来の標準偏差の対数」が「平均値の対数」と比例関係にある傾向が明らかとなった。この比例関係をさらに見やすくするために、「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数の比」を「平均値の対数」についてプロットしたのがFig.2bである。Fig.2bより、「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」は平均値に依らず一定である傾向がより明らかとなった。しかし、「平均値の対数」に対する「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」の分布が平均値を挟んで対称な分布を示している保証はまだない。そこで、「平均値の順位」に対する「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」をプロットすると、長方形の分布が得られた (Fig.2c)。この結果から、検出限界以上では「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」は平均値に依らず一定であることが明らかとなった。つまり、単一サンプルを繰り返し測定した場合の測定機器由来の標準偏差 (SD_d) と平均値 (Mean) との間には、

$$\log[SD_d] / \log[Mean] = C \text{ (constant)}$$

の関係が成立する。すなわち、

$$SD_d = \text{Mean}^C \quad \cdots \textcircled{4}$$

となり、 SD_d はシグナルの平均値の関数として近似できる。従って、サンプル由来の標準偏差は、③式に④式を導入することにより、

$$SD_s = (SD_m^2 + \text{Mean}^{2C})^{1/2} \quad \cdots \textcircled{5}$$

によって観測値から算出できる。なお、同一

ロットの継代数9のサンプルを繰り返し測定した場合も同様の結果が得られた (データ省略)。

1-4. アーチファクト除去の効果

複数ロット間の遺伝子発現のばらつきについてのGeneChip解析を行う際に、以上の結果に基づいて、アーチファクトの除去を行った。すなわち、「GeneChipに対する非特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナル」を除去するために、「Absolute Analysis」の結果、検討したどのロットからも「Present」の判定が得られなかったプローブセットをその後のオンロジー解析から除外した。「測定機器の検出限界未満のノイズ」を除去するためには、測定した複数ロットのシグナルの平均値が60 ($CV_m=0.3$) 未満のプローブセットをオンロジー解析から除外した。今回の6ロットのhMSCの遺伝子発現解析では、上記2条件のいずれかのために棄却されたプローブセットは全54,675個の60%で、解析に適すると判断されたプローブセットは全体の40%であった。また、「測定機器由来のシグナルのばらつき」を除去するために、CV値を算出する際には観測値の標準偏差 (SD_m) ではなく、⑤式によるサンプル由来の標準偏差 (SD_s) を採用した。

複数ロット間の遺伝子発現のばらつきを評価する上で、3種のアーチファクトが及ぼす影響を評価するために、各アーチファクトを考慮した場合と考慮しない場合とで、CV値の順位を比較した。CV値のプローブセット上位1000に含まれるプローブセットの共通性を見ると、「GeneChipに対する非特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナル」および「測定機器の検出限界未満のノイズ」のCV値に与える影響が大きいことが明らかとなった (Fig.3)。

2. ばらつきの大きな生理機能

培養された複数ロットのhMSCにおいて発現のばらつきが大きい遺伝子が、どのような生理機能と関連しているかを検討するために、

GOTMを用いた遺伝子オントロジー解析を行った。3種のアーチファクトを考慮したうえで、まず6ロット（継代数7）のCV値上位1,000位までのプローブセットを抽出した。同様にして継代数9の細胞についても上位1,000位までのプローブセットを抽出した。継代数7と9のCV値上位1,000位のリストに共通して含まれるプローブセット、即ち継代数によらずに大きなばらつきを示すプローブセットは428セットであった。この428プローブセットについて、GOTMを用いてGene Ontology Treeを描出し、GeneChip全体のオントロジー解析結果と比較して有意（ $P < 0.01$ ）に濃縮の見られる生理機能を探索した（Fig.4）。その結果、“Biological Process”に関しては、“development”、“pregnancy”、“circulation”、“defence response”等のオントロジークラスターが検出された（Fig.4a）。また、“Molecular Function”に関しては、“carbohydrate binding”、“carbocyclic acid binding”、“phospholipid binding”、“growth factor binding”、“structural molecule activity”等のオントロジークラスターが検出された（Fig.4b）。“Cellular Component”については、“soluble fraction”、“RNA polymerase complex”、“extracellular matrix”等のオントロジークラスターが検出された（Fig.4c）。

次に、有意（ $P < 0.01$ ）に濃縮の見られる“Biological Process”中のオントロジークラスターについて、Fig.5のようにして、クラスター間の相関を検討した。その結果、スピアマンの相関係数の有意水準（P値）を0.1%として評価した場合、Table.1のような結果となり、様々なクラスターと有意な相関を示すクラスターだけでなく、“blood pressure regulation”のように他のクラスターとの相関が認められない、すなわち独自のばらつきを示すクラスターが存在することが明らかとなった。

D. 考察

細胞組織加工医薬品の品質管理上の大きな問題として、意図した薬効以外の品質特性の把握が困難であることが挙げられる。トランスクリプトームをはじめとする、いわゆる“Omics”は、細胞の表現型や遺伝子型を網羅的俯瞰することが可能なツールとして、創薬ターゲット探索、バイオマーカー探索や遺伝子多型解析等、先端医薬品開発の各方面で利用されている。しかし、細胞組織加工医薬品の品質管理を目的として直接“Omics”を利用する試みも、あるいは、原料・製造工程もしくは製品の品質管理に必要な品質特性を探索する手段として間接的に“Omics”を利用する試みもあまり見られていない。これは“Omics”が依然として高価なアプローチであるという費用的な問題点、および様々なプラットフォーム間のデータの標準化方法が確立されていない点によるところが大きい。しかし、トランスクリプトームをはじめとして、“Omics”のコストパフォーマンスは改善され続けており、またマイクロアレイデータの標準化の試みも米国を中心に進行中である。こういった現状および将来の動向を見据えた上で、品質評価および品質特性探索における“Omics”の有用性が一旦確立されれば、その応用は急速に広がっていく可能性がある。米国FDAは既に2006年より、Critical Path Initiativeの活動の一環として、生物製剤を製造するために用いられる細胞(cell substrate)の品質評価のためのマイクロアレイ利用法について、研究を開始している。その流れは近い将来細胞組織加工医薬品の品質管理にも波及する可能性が高い。

創薬ターゲット探索やバイオマーカー探索を目的とした、いわば「標的遺伝子探索」のためのトランスクリプトーム解析と、品質特性探索を目的とした、いわば「製品間のばらつき探索」のためのトランスクリプトーム解析との間の大きな違いは擬陽性シグナルの取り扱い方にある。トランスクリプトーム解析を用いた「標的遺伝子探索」における擬陽性シグナルは、定

量性RT-PCRなどの他の方法によってその真偽を再確認することが可能であるため、ある程度許容できる。一方、「製品間のばらつき探索」のためにトランスクリプトーム解析を行なう場合には、擬陽性シグナルは可能な限り回避しなければならない。その理由は、シグナルの平均値が低い遺伝子については、CV値（＝標準偏差／平均値）が自ずと大きくなる傾向があるからである。つまり、アーチファクト評価をより慎重に行う必要がある。そこで今回、本分担研究において、GeneChipを用いた実験における3種の測定アーチファクトについて検討を行った結果、測定機器の検出限界および測定機器由来誤差は単一サンプルの繰り返し測定により算出可能であることが明らかとなった。また、CV値の評価には「非特異的ハイブリダイゼーションによるシグナル」と「検出限界以下のノイズ」を除去することが重要であること、また同時に、3種の測定アーチファクトのなかでも「測定機器由来のシグナルのばらつき」は比較的影響が少ないことも明らかとなった。

遺伝子オントロジー解析を行った結果、6ロットのCV値の高いプローブセットについて、有意に関連性高いオントロジーが検出された。“development”や“defence response”およびその下位の階層のオントロジーがばらつきの大きい生理機能として検出されたことは、hMSCの再生医療および移植医療における用途を考慮した場合に重要である。次に、検出されたオントロジークラスター間の相関を、主成分分析による第一主成分の算出、および各ロットにおける第一主成分得点間のスピアマン順位相関係数の算出によって評価した。相関係数として順位相関を選択した理由は、クラスター間の相関は必ずしも線形を示すとは限らないためであり、また、いくつかの飛離れた値が存在する場合には、例えば相関が線形であったとしても、ピアソンの積率相関係数などの間隔尺度・比尺度間の相関係数の場合はそれらの値に引きずられて不当に高い相関係数が得られてしまうからである。

オントロジークラスター間の相関関係の評価は、意図した薬効が予期せぬハザードと相関している可能性を吟味する上で重要と考えられる。たとえば、今回の結果では、hMSCにおいてはばらつきの大きい生理機能と考えられる“immune response”が別のばらつきの大きい生理機能“coagulation”と有意に相関していることが示唆された。したがって、hMSCの免疫調節機能を応用した医薬品においては血液凝固関連への影響も吟味する必要がある可能性がある。また、オントロジー“blood pressure regulation”も関連遺伝子の発現のばらつきの大きい生理機能として検出されたが、このオントロジークラスターは他のどのクラスターとも相関しない、いわば孤立したクラスターであった。すなわち、このオントロジーに関する細胞表現型のばらつきについては、ほかの生理機能のばらつきから類推することが困難であり、特別に試験系を構築して評価する必要がある可能性があると考えられる。

E. 結論

以上より、トランスクリプトーム解析は細胞組織加工医薬品の品質のばらつきの所在、即ち品質特性の候補を同定するツールとして有用であること、およびその際にはサンプル以外に由来する誤差を慎重に吟味することが重要であることが示唆された。本分担研究のようなトランスクリプトーム解析によって同定された品質特性候補が真の品質特性であるか否かの評価には、遺伝子オントロジー解析で検出された生理機能において実際にばらつきが存在することを生理学的実験によって示し、そのばらつきが製品の有効性および安全性と関連するか否かに関してさらなる検討を加えていく必要がある。

F. 健康危険情報

（総括研究報告書に記載）

G. 研究発表

1. 論文発表

Haghighi K, Chen G, Sato Y, Fan GC, He S, Kolokathis F, PaterL, Paraskevaidis L, Jones WK, Dorn GW, Kremastinos DT, Kranias EG. A human phospholamban promoter polymorphism in dilated cardiomyopathy alters transcriptional regulation by glucocorticoids. *Hum Mutat.* (in press)

Yokoyama U*, Sato Y* (* equal contribution), Akaike T, Ishida S, Sawada J, Nagao T, Quan H, Jin M, Iwamoto M, Yokota S, Ishikawa Y, Minamisawa S. Maternal vitamin A altered gene profiles and structural maturation of the rat ductus arteriosus. *Physiol. Genomics.* 2007; 31: 139-57.

Nishida M, Onohara N, Sato Y, Suda R, Ogushi M, Tanabe S, Inoue R, Mori Y, Kurose H. Galpha 12/13-mediated upregulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through NFAT activation. *J Biol Chem.* 2007; 282: 23117-28.

Shinozaki Y, Sato Y (correspondence), Koizumi S, Ohno Y, Nagao T, Inoue K. Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience.* 2007; 147: 153-63.

2. 学会発表

Minamisawa S, Sato Y, Cho MC. Regulation of Activity of Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase in the Failing Heart. 第 72 回日本循環器学会総会・学術集会, 福岡 (2008 年 3 月 28 日) *Circulation J.* 2008 72 (Suppl. I): 21.

田邊 思帆里, 佐藤 陽治, 鈴木 孝昌, 鈴木 和博, 山口 照英 新規ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養時系列マーカーに関する遺伝子発現プロファイリング 日本薬学会第 128 年会 (平成 20 年 3 月 26-28 日、横浜)

重本-最上 由香里, 奥平 桂一郎, 佐藤 陽治, 為広 紀正, 篠崎 陽一, 鈴木 和博, 長尾 拓, 影近 弘之, 澤田 純一, 最上-西巻 知子 RXR アゴニスト PA024 はコレステロール低下・抗炎症作用を示し、動脈硬化病変の形性を抑制する 日本薬学会第 128 年会 (平成 20 年 3 月 26-28 日、横浜)

柳野 紗智子、佐藤 光利、鈴木 和博、佐藤 陽治 甲状腺ホルモンによる血管平滑筋石灰化関連遺伝子の制御 日本薬学会第 128 年会 (平成 20 年 3 月 26-28 日、横浜)

Nishida M, Suda R, Sato Y, Onohara N, Tanabe S, Nakaya M, Kurose H. A small GTPase rac mediates pertussis toxin-induced up-regulation of angiotensin receptors. 第 81 回日本薬理学会年会 (平成 20 年 3 月 17-19 日、横浜) *J Pharmacol Sci.* 2008 106 (Suppl. I): 217P.

Yanagino S, Satoh M, Suzuki K, Sato Y. Thyroid hormone regulates genes associated with vascular smooth muscle calcification. 第 81 回日本薬理学会年会 (平成 20 年 3 月 17-19 日、横浜) *J Pharmacol Sci.* 2008 106 (Suppl. I): 169P.

田邊 思帆里, 佐藤 陽治, 鈴木 孝昌, 鈴木 和博, 山口 照英 遺伝子発現プロファイリングによる新規ヒト骨髄由来間葉系幹細胞継代培養時系列マーカー遺伝子の探索. BMB2007 (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), 横浜 (2007 年 12 月 11-15 日)

佐藤 陽治 細胞組織製品の実用化に向けての臨
床試験と規制. 第 29 回日本バイオマテリアル学
会大会, 大阪 (2007 年 11 月 26 日)

Haghighi K, Sato Y, Fan G-C, He S, Kolokathis
F, Paraskevidis I, Jones K, Dorn GW II,
Kremastinos DT, Kranias EG. A Novel Human
Phospholamban Promoter Polymorphism in
Dilated Cardiomyopathy Alters Glucocorticoid
Nuclear Receptor Mediated Transcription
Regulation. The American Heart Association
Scientific Sessions 2007, Orlando, USA (2007
年 11 月) *Circulation*. 2007;116 (Suppl. II): 605.

柳野 紗智子, 佐藤 光利, 鈴木 和博, 佐藤 陽
治 動脈血管平滑筋細胞における甲状腺ホルモン
の生理的ターゲットとしての TGFβ遺伝子. 第
117 回日本薬理学会関東部会, 東京 (2007 年 10
月 6 日)

Sato Y. Transcriptomic approach to identify
quality characteristics of cell-based medical
products. The 6th World Congress on
Alternatives & Animal Use in the Life
Sciences: Review progress made toward the
3Rs, Tokyo, Japan (2007年8月21-25日)

田邊 思帆里, 鈴木 孝昌, 山口 照英, 鈴木 和
博, 佐藤 陽治 細胞治療薬応用を目的とした骨
髄由来間葉系幹細胞のゲノムプロファイリング.
日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会,
京都(2007年5月)

Suzuki T, Luan Y, Prabha D, Kogi M, Honma
M, Koizumi T, Tanabe S, Sato Y, Suzuki K,
Yamaguchi Y. CGH and SNP Arrays:as New
Tools for Detailed Analysis of Chromosome.

The 8th International Symposium on
Chromosomal Aberrations, Kobe, Japan (2007
年10月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

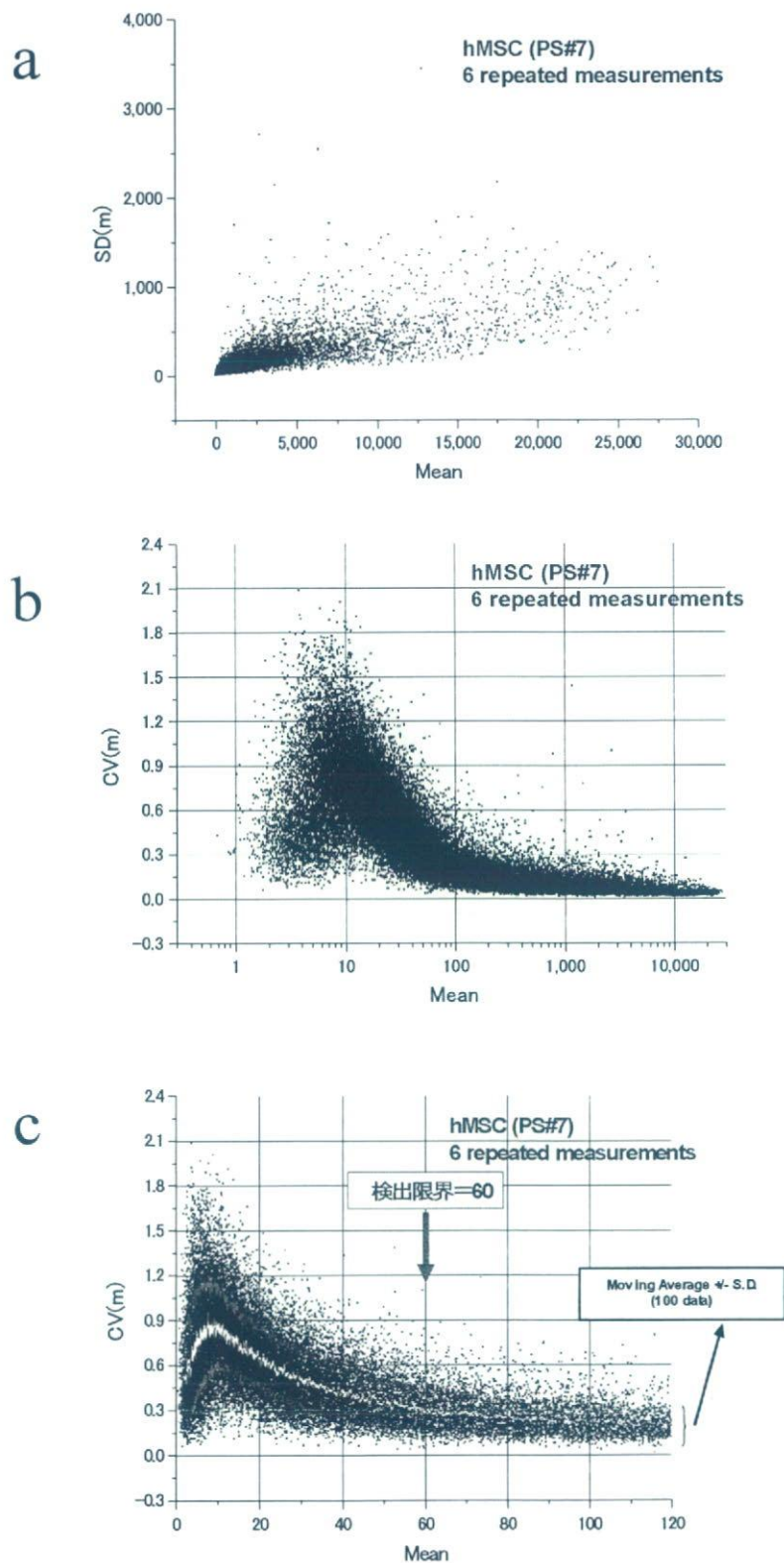


Fig. 1 同一cRNAサンプルの繰り返し測定 (6回) における測定シグナルの平均値とデータのばらつき (S.D.) の関係。a) 平均値と標準偏差 (S.D.) の関係。発現シグナルの平均値が高いほどS.D.値が高い。b) 平均値と変動係数 (CVm) の関係。c) bのグラフの横軸を線形目盛りとし、平均値の低い部分を拡大したもの。CVm値の移動平均値が0.3を通過するのは測定シグナルの平均値が60のとき。図は継代数7のヒト骨髄間葉系幹細胞のデータ。継代数9の場合も同様であった (データ省略)。

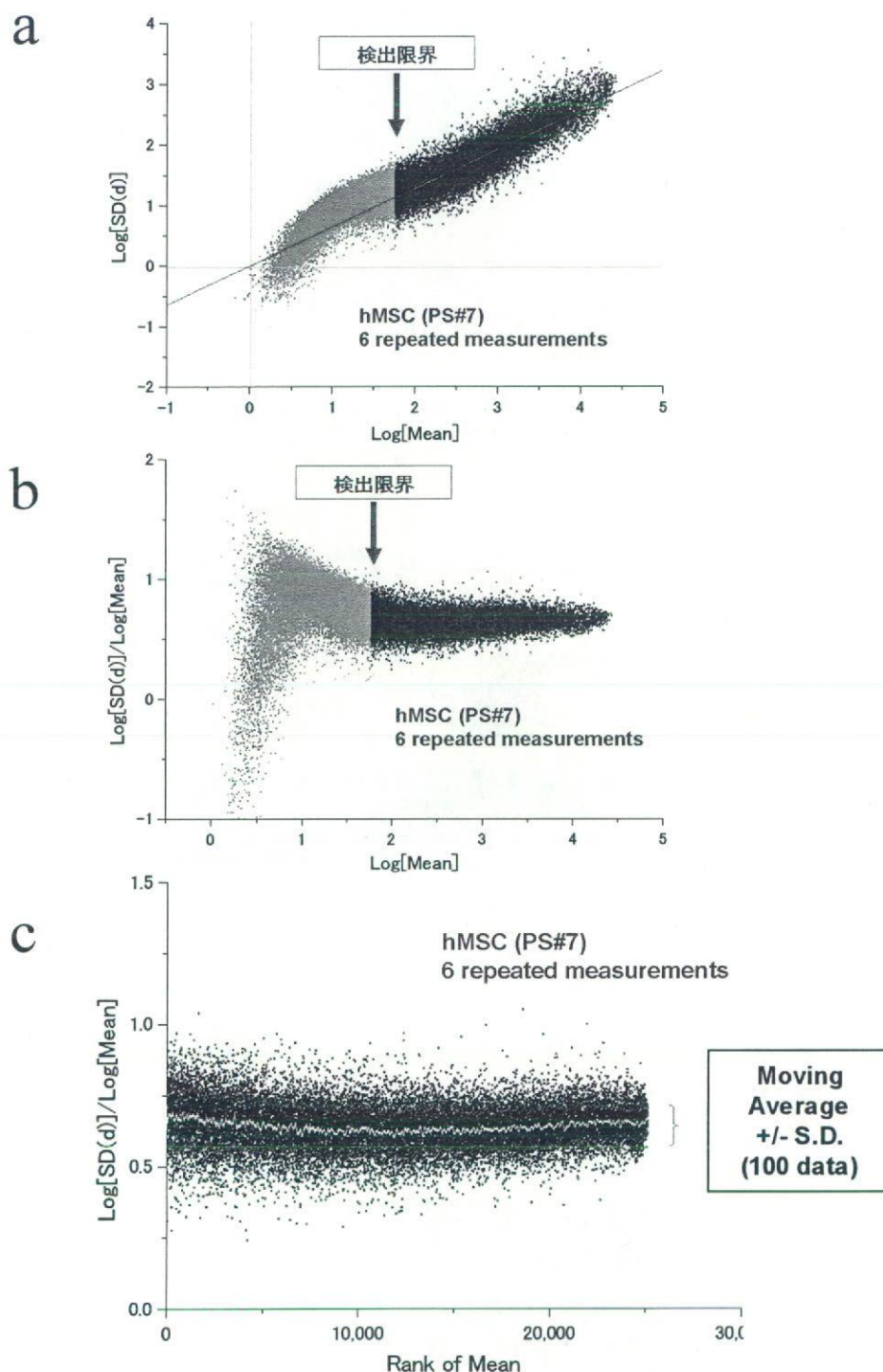


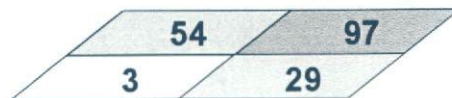
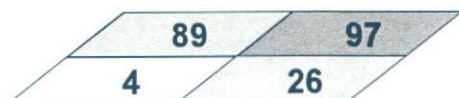
Fig. 2 同一cRNAサンプルの繰り返し測定（6回）における測定シグナルの平均値とS.D.の関係 a)検出限界以上のS.D.値の対数（青）には平均値の対数との比例関係があるように見える（赤線）。b)検出限界以上では「S.D.値の対数と平均値の対数の比」が平均値に依存しないように見えることを示す。c)横軸は検出限界以上における測定値の平均値の「順位」を示す。検出限界以上の「S.D.値の対数と平均値の対数の比」は平均値に依存しないことを示す。図は継代数7のヒト骨髓間葉系幹細胞のデータ。継代数9の場合も同様であった（データ省略）。

CV値のtop1000の共通性(%)

C. 観測値のCVでなく、サンプルのCVを使用

継代数 7

継代数 9



B. ノイズの除外

A. 非特異的ハイブリダイゼーションに由来するシグナルの除外

Fig. 3 複数ロットの遺伝子発現測定におけるCV_m値に対するアーチファクト除去の効果をCV_mの順位のtop 1000の共通性で評価

「非特異的ハイブリダイゼーションによるシグナル」と「検出限界以下のシグナル」の影響が大きい。