

Fig. 13 PEIビーズによるHCV セロコンバージョンパネルの濃縮

**Table 4 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	-	-	$1.4 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$
P1-003	C	adw	+	-	$7.0 \times 10^4$	$6.3 \times 10^4$
P1-007	C	adr mutant	-	-	$<10^2$	(+)
P1-010	C	adr mutant	-	-	$6.6 \times 10^3$	$5.0 \times 10^3$
P1-011	C	adr	-	-	$5.2 \times 10^2$	$5.1 \times 10^2$
P1-012	C	adr	-	-	$1.6 \times 10^3$	$1.3 \times 10^3$
P1-013	C	ayr	-	-	$1.4 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$
P1-015	C	adr	-	+	$2.5 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$
P1-017	C	adw mutant	-	-	$5.3 \times 10^2$	$6.3 \times 10^2$
P1-022	B	adw	-	-	$7.3 \times 10^3$	$6.3 \times 10^3$
P1-028	B	adw	-	-	$2.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$
P1-060	A	adw	-	-	$4.7 \times 10^3$	$4.0 \times 10^3$
P1-068	C	adr	-	+	$5.0 \times 10^2$	$5.0 \times 10^2$
P1-069	C	adr	-	+	$1.4 \times 10^2$	$5.0 \times 10^2$

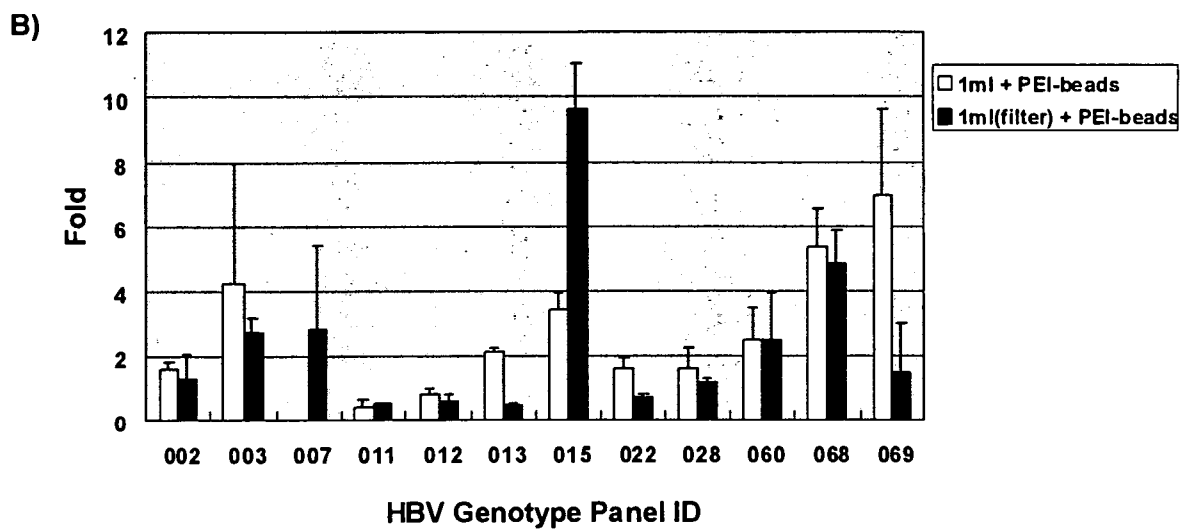
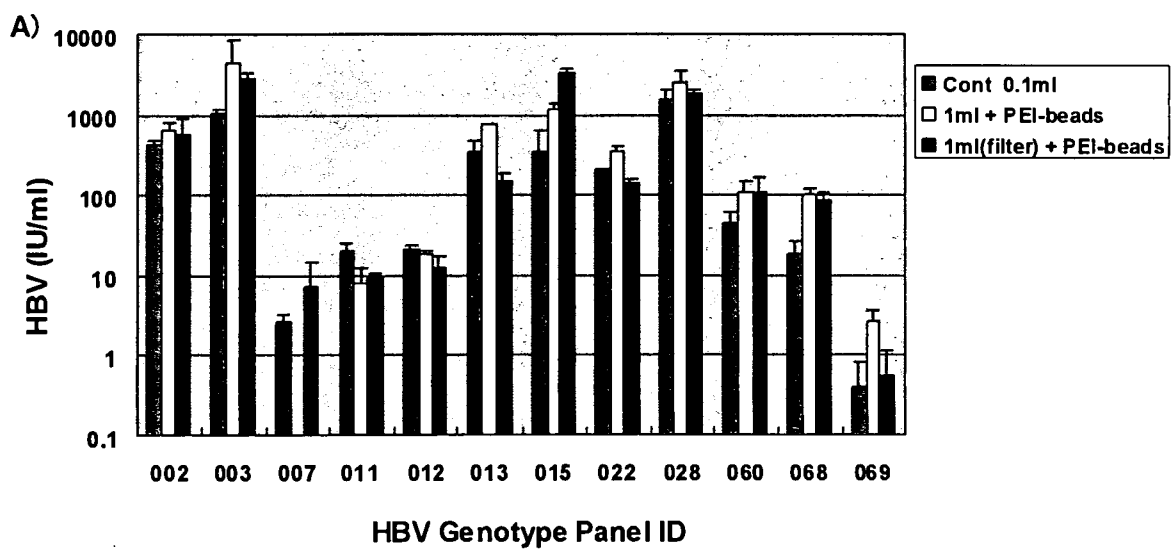
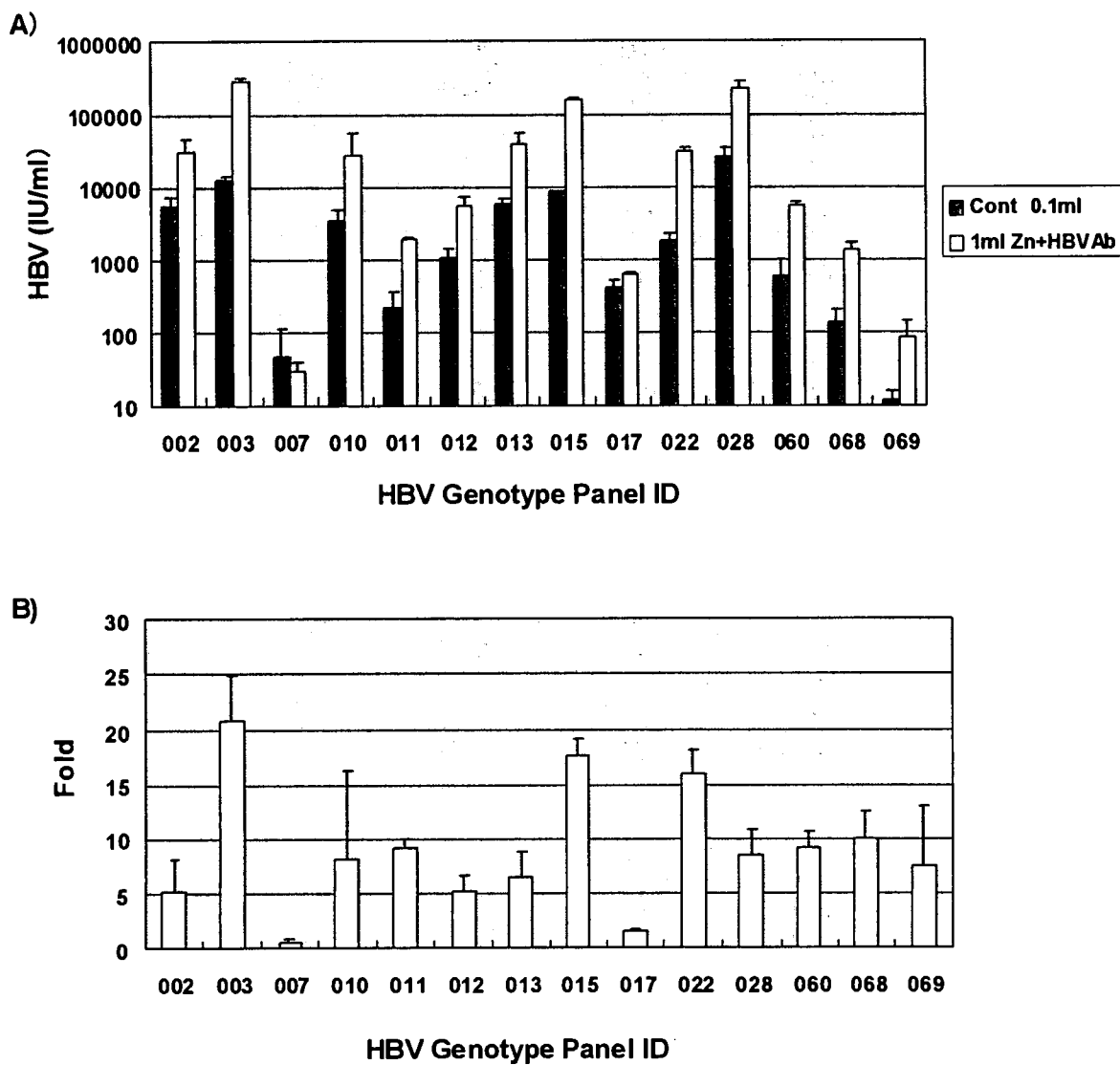


Fig. 14 PEIビーズによるHBV ジェノタイプパネルの濃縮

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. 15 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Znと抗HBV抗体による濃縮倍率

Table 5 PEI磁気ビーズによって濃縮されるウイルス

ウイルス	宿主	ウイルスゲノム	脂質膜	サイズ (nm)	PEI-磁気ビーズ濃縮
モデルウイルス					
サイトメガロウイルス (CMV)	サル	DNA	+	180-200	+
ヘルペスウイルスI型 (HSV-1)	ヒト	DNA	+	150-200	+
水疱性口内炎ウイルス (VSV)	ウシ	RNA	+	70-150	+
マウス白血病ウイルス	マウス	RNA	+	80-110	+
Sindbis ウイルス	ヒト	RNA	+	60-70	+
アデノウイルス5型	ヒト	DNA	-	70-90	+
SV-40ウイルス (SV-40)	サル	DNA	-	40-50	+
ブタパルポウイルス (PPV)	ブタ	DNA	-	18-24	+*
ポリオウイルス	ヒト	RNA	-	25-30	+**
ヒト感染性ウイルス					
ヒト免疫不全ウイルス (HIV)	ヒト	RNA	+	80-100	+
A型肝炎ウイルス (HAV)	ヒト	RNA	-	25-30	+*
B型肝炎ウイルス (HBV)	ヒト	DNA	+	40-45	+**
C型肝炎ウイルス (HCV)	ヒト	RNA	+	40-50	+

\*: 条件により濃縮されない場合もある

\*\* : IgM抗体又は抗体と補体の添加により濃縮可能

細胞・組織加工医療用具の品質等の確保に関する研究

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

細胞等を利用した医薬品は様々な疾病に対して有効な治療法となることが期待されるが、その品質や安全性確保に関しては未知の要素が多く、それらを検討するための新たな技術開発が重要である。我々は染色体レベルで遺伝的安定性を調べる目的で、マイクロアレイを使った CGH (Comparative Genome Hybridization) 法である BAC クローンやオリゴマーを用いたアレイ CGH に加え、一塩基多型 (SNP ; single nucleotide polymorphism) を大規模に解析可能な GeneChip (SNP チップ) を用いた検討を行った。その結果、微細な染色体欠失や組み換え型の LOH など、従来の染色体解析および CGH 法や FISH 法も含めたこれまでの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、その有効性を示すことができた。さらにカスタムデザインによる染色体部位特異的オリゴヌクレオチド CGH アレイを用い、HL60 細胞におけるがん遺伝子 c-myc の増幅様式を詳細に検討し、double minute (DM) 染色体としての増幅単位の完全構造を明らかにし、DM 染色体が環状構造を持つことを証明した。さらに、実際の細胞治療を想定し、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基礎的知見を得る目的で、長期間培養後の染色体変化を SNP アレイを用いて解析したところ、7番および17番染色体上に染色体コピー数の変化が検出された。マルチカラー-FISH 解析により、この二つの染色体間での転座を伴う増幅が起きていることが確認された。他の数ロットのヒト間葉系幹細胞とヒト筋芽細胞についても同様の解析を行ったところ、コピー数および LOH 異常は観察されず、その頻度は高くないことがわかった。また、FISH 解析により異常細胞の出現に関して検討を行ったところ、予想された7番染色体ではなく17番染色体セントロメアシグナルの増加が確認され、これは12継代の細胞にも2割程度存在したことから、この異常が比較的培養初期に発生していた可能性が強く示唆された。即ち、これは初期に生じた異常細胞が、その増殖優位性により培養過程で細胞集団全体へと置き換わって行ったことを物語っており、本事例は、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

欒 洋	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
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 主任研究員
佐藤 洋二	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 室長
スレッシュ 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
プラバ ドゥライサミ	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

細胞組織利用医薬品等を治療に応用するに際して、その品質のチェックや機能性の保証などが重要な課題であると考えられる。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指摘されており、これらを十分にチェックすることが、細胞治療医薬品の安全を担保する上で重要な課題である。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、現在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同時に、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。

最悪の場合、癌化した形質を獲得した細胞が一つでも培養過程で生じた場合、この細胞を治療に用いることは、確実な発癌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といった安全面での施策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を十分にチェックする方法を持つことが、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。

現在、細胞の染色体レベルでの変化を捉える手法の一つとして、CGH法があるが、これまでに我々は、従来の手法とくらべ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、網羅的かつ高解像度にゲノム異常を検出が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ズ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に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

共通した変化に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できなかったことから、培養過程のどこかで最初の異常細胞（これは常に一定の低頻度で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。

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ということは不可欠であり、本研究はこうした安全性の評価に今後寄与することを願って進められた。

このような染色体レベルでの安定性の評価に加え、プロテオーム解析技術を用いた細胞の特性解析の一環として、継代培養時のトリプシン処理溶液を使った細胞表面のペプチドーム解析系の開発についても、nano-LC-MS/MSを使った検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. アレイ CGH法を用いた培養ヒト癌細胞およびヒト組織幹細胞の染色体変化の解析

#### 1-1. 使用した細胞株

(株化細胞)

国立医薬品食品衛生研究所、細胞バン



ク（当時）より入手したヒト前骨髄球系白血病細胞株 HL60 細胞およびその増殖性変異株である HL60-RG 株を使用した。この細胞は既に染色体解析および CGH 法にて解析が行われ、myc 遺伝子の増幅を Double Minute (DM)染色体および Homologous Staining Region (HSR)として持つことが知られている。なお、分担研究者自身の血液より抽出した DNA を、正常コントロールサンプルとして用いた

(組織幹細胞)

#### 1. 骨髄由来間葉系幹細胞

Cambrex 社より入手した正常ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 (hMSC) を使用した。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。

#### 2. 骨格筋筋芽細胞

HSMM 細胞は、2 継代目にて Cambrex 社より入手後、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。

#### 1-2. 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。

#### 1-3. 使用した CGH アレイ (BAC array)

Macrogen 社にて開発された MAC Array™4K スライドを使用した。これは、Macrogen 社の所有する約 4000 個のヒト BAC DNA クローンをスライドガラス上に duplicate にてスポッティングしたもので、すべての染色体領域を平均 1Mb 以下の間隔でカバーする。

#### (NANDEMO Array)

HL60 細胞における c-myc 増幅領域の詳細検討のため、アレイ一枚あたり 39 万個のオリゴヌクレオチド (50mer) プローブをカスタムデザイン可能である Nimblegen 社 NANDEMO アレイを用いた。用いたアレイ上のプローブデザインを表 1 に示す。これまでの BacCGH および SNP アレイを使った解析から、増幅が予想される 8 番染色体 8q24 領域に対して、連続的に 50mer のプローブを配置し、その外側の領域には一定間隔をおいて、プローブを配置した。また、これまでに HL60 細胞とその増殖性の subline である HL60-RG 株との間に変化の見られた染色体領域に関しても、一定間隔で残りのプローブを配置した。このデザインに基づいて、Nimblegen 社においてオリゴマーがアレイ上にデジタルミラーを用いたマスクレス法により固層合成され、カスタムメイドマイクロアレイを得た

#### (SNP Chip)

ヒト約 1 万および 5 万 SNP サイトを網羅した GeneChip® Human Mapping 10K および 50K Array Xba にて解析を行った。アレイには、フォトリソグラフィ製造法

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。

(Agilent oligo CGH アレイ)

また、17 番染色体の詳細解析には、本研究、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 RsaI 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

#### 1-4 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 DNA 250ng を制限酵素 XbaI で消化し、XbaI シークエンスと続く 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。

#### 1-5 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。

#### 1-6 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。

#### 1-7 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。

#### 1-8 染色体解析

hMSC23 継代目の凍結保存細胞を再培養

し、24 継代目の細胞を用いて Spectral Karyotyping 法による染色体解析および G-banding による染色体解析を、SRL 社に委託解析した。また、コントロールとして 4 継代目の細胞についても、同様に再培養し、5 継代目の細胞を G-banding による染色体解析に供した。

#### 1-9 間期核の FISH 解析

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

### C. 結果

#### 1. HL60 細胞の染色体解析

#### 1-1 GeneChip を用いた HL60 および HL60-RG 株の SNP 解析

HuSNP10K 2.0 array (Affymetrix)を用いて、HL60 および HL60-RG 株の SNP 解析を行った。GeneChip SNP call に基づく LOH 解析の結果、全く予想できなかった 1 番染色体全体の LOH が新たに見いだされた。HL60-RG 細胞においては、図 1 に示した m-FISH の結果からも、11 番染色体短腕の欠失などを含む染色体異常が検出されていたが、1 番染色体に関しては全く正常だと考えられた。しかし、図 2 に示したように、RG 株における SNP 解析結果は、染色体全領域においてヘテロ接合性 (AB の call) が消失していた。一方、親株では全域に渡ってヘテロの call が存在するため、RG 株が形成された過程において、ヘテロ接合性が消失したと考えられる。CGH 解析の結果からも染色体の量的変化は起こっていないため、父もしくは母由来の染色体の片側が消失し、片親由来の染色体に置き換わった uniparental disomy が起きていると結論できる。これは、おそらく、いったん片側に染色体が一本増えた trisomy 状態から、反対側のアレルの染色体が脱落して 2 本に戻るにより生成したと予想される。

一方、染色体解析において欠失の見られた 11 番染色体短腕領域は、同様にしてヘテロ接合性の消失が見られるが (AA 若しくは BB call)、CGH の結果からもこの部位では染色体コピー数が半減していることより、それぞれ A0 または B0 という欠失型の LOH であると結論できる。SNP 解析用の GDAS ソフトウェアは染色体コピー数まで

考慮していないため、A0およびB0 と言う判定はできず、AA または BB という call になったと推察できる。また、付属の LOH 解析機能は、SNP call を元にその予測が可能であったが、染色体の増減を伴う欠失型か、伴わない組み換え型の LOH かを判定することはできない。そこで、染色体コピー数の増減に関しても検討を加えるため、SNP チップの各プローブのシグナル強度を元に Affymetrix 社より提供される CNAT および Web 上のフリーソフトとして利用可能な d-CHIP ソフトウェアを使って検討を行った。

CNAT では、正常ヒト由来のコントロールサンプルにおいても、コピー数比がコンスタントに 1 にならないなど、解析結果に信頼性が持てなかったが、d-CHIP を使った解析においては、図 3 に示すように BAC CGH とほぼ同様の結果が得られた。即ち、5 番染色体においては NG, RG 株とも同じ領域において染色体の欠失が検出でき、10 番染色体短腕部における欠失に関しては、RG 株の方がやや長い欠失領域を持つという CGH の結果が SNP チップでも再現された。以上の結果より、SNP チップは染色体の増減解析において CGH 解析と同様に使用することができ、その際に、d Chip という解析ソフトウェアが有効であることが示された。さらに、c-myc の増幅領域に関する解析については、CGH アレイにて 8 番染色体 c-myc 遺伝子近傍にひとまとまりの増幅領域として観察されていたものが、SNP アレイによる解析により、3 つの独立したピークとして検出された (図 4)。さらに驚くべき事に、c-myc 遺伝子はこの増幅領域に含まれていなかった。また、論文等にて

報告されている myc co-amplified region (MCR) も含まれていなかったため、少なくとも 5 箇所の領域が複雑に関与して、c-myc の増幅が複雑なメカニズムにより起こっていると予想される。

## 1-2 HL60 細胞の遺伝子増幅の解析

コントロールの正常ゲノム DNA をリファレンスに、HL60 細胞より抽出したゲノム DNA と、表 1 に従って作成した NANDEMO アレイ上に競合的にハイブリさせた結果得られた CGH データのうち、8q24 領域の c-myc 遺伝子近傍の部分のシグナルを図 5 に示す。図より、この領域において 6 つの独立した増幅領域が確認された。さらに詳しく見ると、5 番目の増幅領域に関しては、他と比べてコピー数の多い部分があり、この部分を独立した領域と考え、全 7 領域に関して、1-7 の番号をつけその両端をセントロメア側から a, b とした (図 5)。次に各増幅における末端部を決定するために、両端に外向きに PCR 増幅用のプライマーを設計した。プライマーの設計にあたっては、図 5 の 1a-7b 領域に置ける各プローブのシグナル強度の変化より、切断点と予想される領域から少し内側に百-数百塩基対入った場所に、ゲノムの配列情報を基に約 19-20bp のプライマーを設定した。プライマーの設計にあたっては、primer3 ソフトウェアを用いて、Tm 値や 2 次構造や相互の相補性の回避などを考慮して設計した。設計したプライマーのゲノムシークエンス上の位置 (UCSC ゲノムブラウザー) を図 5 に記した。赤矢印が設計したプライマーの位置であり、図中黒矢印は、シーク

エンス解析のためにより外側に設計したプライマーの位置である。なお、白矢印は、最終的に決定された切断点の位置である。文献と示した赤矢印は、過去の報告により用いられたプライマーの位置である。この報告では、HL60 細胞に対して、c-myc を含む領域と myc co-amplified region (MCR) の二つの領域の増幅が確認されており、今回の増幅領域においては、それぞれ 4a-b、および 5a-b に相当する。

こうして設計したプライマーを用いて、どの増幅領域とどの増幅領域が繋がっているかを調べるために、1a-7b の 14 種類のプライマーを用いた総当たりの PCR を行った。その結果、電気泳動の図 6 に示したようにいくつかの組み合わせについて増幅が認められた。非特異的増幅によるバンドも含まれていると考えられたため、確認のため増幅が見られたバンドを切り出し、PCR 産物をゲルより精製した後、シーケンス解析を行った。その結果、ゲノム配列より予想される配列が得られたペアについて下図に示した。最終的に、2b,5a に関しては、目的のシーケンスが当初得られなかったが、ランダムプライマーを使ったウオーキング法により、この両者がつながっていることが確認できた。

以上の結果より、それぞれの増幅領域における配列の順序が図 7-8 のように決定でき、全ての領域が繋がったことから、増幅領域は環状の構造をしていることが明らかとなった。HL60 細胞での遺伝子増幅領域は DM 染色体として存在するため、この結果より、DM 染色体が環状構造をしていることが証明できた。

各増幅単位の連結部分のシーケンス解

析結果を図 9 に示すが、7b と 1a のジャンクション部分の配列解析の結果、7 と 1 の配列の間に約 200bp のどちらにも属さない新たな配列が確認できた。この由来を調べるために、ヒトゲノムシーケンスに対して相同配列検索 (BLAST サーチ) を行ったところ、同じ 8 番染色体の 7b より約 6Mbp 下流 (テロメア側) の配列と一致した。この結果より、増幅単位は全てで 8 つあることが判明した。また、ジャンクション部分の特徴として、短い相同配列、およびが見られた。これは非相同的組み換えがおきる引き金となっていると予想される。また、もう一つの特徴として、ジャンクションの近傍に回文構造や、相補的配列が認められ、これらが離れた増幅単位を立体的に近傍に導く要因となったと考えられる。

## 2 ヒト間葉系幹細胞の培養過程における染色体変化の解析

### 2-1 SNP アレイによる異常の検出

Cambrex 社より購入したヒト間葉系幹細胞 (Lot#4F1560) を、推奨 MSCGM 培地にて継代培養を続け、23 継代目にあたる細胞を 5 継代目の細胞とともに DNA の抽出を行い、50K Human Mapping Array による SNP 解析およびそのシグナル強度を利用した CGH 解析を行った。

各プローブのシグナル強度の raw data を用いて CGH 解析を行うためのツールとして、CNAG および dCHIP というフリーソフトウェアが利用可能であり、これらをダウンロードして、使用説明に従って解析を行った。図 10 に 5 継代目をリファレンス

として 23 継代目のシグナル値の増減を表した結果を示す。両ソフトウェアから得られた結果は一致し、7 番および 17 番染色体上にシグナル値の異常が観察された。7 番染色体は大きく 4 つのセグメントに分かれてシグナル値の変化があり、シグナルの増加している部分、正常部分、および減少している部分が認められた。長腕側の 2 箇所は小さな領域としてシグナルが 1 段階変わっており、また短腕テロメア部分も増加していたシグナル値が一段階戻っていた。17 番染色体の方は、さらに複雑な様式でシグナルの増減を示す領域が複数箇所認められた。

dCHIP を使った LOH (Loss of Heterozygosity) 解析の結果、有意な LOH 領域として、3 番染色体および 8 番染色体の一部にヘテロの SNP Call の消失が認められた(図 11)。この LOH は、23 継代とともに 5 継代目でも同様に見られており、培養過程で起こった LOH ではなく、この細胞が元から持っていた LOH であると考えられる。この LOH 領域に存在する遺伝子を表 3 に示した。

以上の結果より、23 継代目の細胞には 7 番と 17 番染色体を含む何らかの染色体異常が起きている可能性が示唆されたため、これを確認するため Spectro Karyotyping (SKY)法および G-banding による染色体解析を行った。24 継代目の凍結保存細胞を培養し、26 継代となった時点で染色体標本作製し SKY 解析を行った結果を図 12 に示す。予想された通り、7 番染色体に異常が認められ、一部 17 番染色体との転座を含んでセントロメア付近の部分のコピー数が増えていた事がわかった。また、これに対し

て、同一カルチャーの 6 継代目の細胞を用いた結果は、正常核型を示しており、この世代間での培養の途中において、染色体変化を持った細胞が増えたことになる。異常を持つ細胞の割合については、G-banding 法を用いてより多くの細胞について、核型を解析した結果を表 2 に示した。10 細胞ずつを解析した結果、6 継代目については全て正常核型であったのに対し、26 継代目の細胞では、全てに 7 番および 17 番染色体を含む異常が観察されたほか、1 例について 21 番と 22 番染色体の転座による 2 動原体染色体が認められた。さらに各 50 メタフェーズに対して染色体数を計測した結果、6 世代目が全て正常の 46 本であったのに対し、26 継代目は 47 本を中心に 40 本まで染色体数が広く分布していた。現在、この間の経時変化について、7 番および 17 番染色体セントロメア特異的 FISH プローブを用いた追跡を行っている。

上記、染色体解析の結果得られた異常像を、CGH 解析の結果と比較したのが図 13 である。染色体解析の結果より、17 番染色体はセントロメア付近の領域のみをもつ短い染色体が 2 本少し異なるサイズにて余分に存在する。また、17 番染色体との転座融合染色体が 1 本存在する。これを CGH の結果と比較すると、ちょうどセントロメア付近でシグナルが最大になっている領域が染色体 4 本分、すなわち一番短い染色体の占める領域に相当し、2 番目に短い染色体に余分に存在する領域が、染色体 3 本分に相とすると考えられる。それ以外の部分は正常の 2 本分に相当するため、CGH で一見ロスがあるように見えた領域が、本来の正常 2 コピーに相当する領域であることがわ

かった。これはおそらく解析の過程で、本染色体が全体として増幅していたために、ベースラインが低めに算出されたことに由来すると考えられる。このように考えると、CGH 解析結果は見事に 17 番染色体の部分的増加を予測しており、両者の結果は一致していた。17 番染色体に関しては、転座した染色体に増減を伴う複雑なリアレンジメントが存在することが予想され、G-banding のパターンからもそれが支持された。21 番と 22 番染色体の転座については、染色体の増減を伴っている可能性もあるが、転座を持つ細胞は一部の細胞に限られるため、全体の平均値としてのみ検出可能な CGH 解析においては、たとえ存在しても検出できないと考えられる。

## 2-2 異常を持つ hMSC 細胞の Agilent CGH アレイを用いた確認

SNP チップ解析により異常が検出された hMSC 株ロット #F1460 に関して、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 14 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。

## 2-3 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 15 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 4)。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。

## 2-4 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(図16)。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17,18に示すようなシグナルが得られた。それぞれ100個ずつの間期核細胞を使って解析した結果、および表5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19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

細胞治療に用いる細胞の遺伝的安定性を調べることは、その品質や同一性を保証する上で重要なファクターとなる。特に、種々の幹細胞を増殖、分化させた後生体に戻すという治療においては、*in vitro*での培養過程が必須であり、この間に起きる染色体異常等の遺伝的変化は時にがん原性といった重篤な悪影響を与えかねない。そこで、遺伝的な安定性を治療前に確認して置くことが必要となり、そのために有効な試験法に関して検討してきた。我々は既に、細胞の同一性の検証のためには複数のSTRマーカーを用いた解析が有効であることを示したが、同一起源の細胞においても、染色体転座や欠失、増幅、LOHといった異常を持つ可能性があり、特に細胞のがん化形質の獲得へとつながる可能性もあることから注意が必要である。染色体の欠失は、がん抑制遺伝子の不活性化を、増幅は*myc*等のがん遺伝子の活性化を引き起こし、がん化へとつながる引き金になると考えられる。染色体の増減に関する情報を得る上で、簡便でより詳細な方法として、BACクローンを使ったCGHアレイやSNP検出用のGeneChipが有用であることを我々は既に示した。今回さらに詳細な検討が可能となるカスタムメイドのoligoCGHアレイを用いて、遺伝子増幅のメカニズムに迫るとともに、さらに高密度のSNP検出用のGeneChipを使用した骨髄間葉系幹細胞の培養過程での染色体安定性の検討を行った。

HL60細胞の*c-myc*遺伝子の増幅領域の解析においては、これまでの解析で完全に



解明できなかった部分の全貌を明らかにすることができた。各増幅領域のジャンクションについては、CGH アレイからの詳細なデータを元に設計した PCR プライマーにより、シーケンスレベルでの解明に成功した。図 11 にそのジャンクション配列の特徴を示した。まず、その一つとしてジャンクションの部分の短い相同配列が見られた。これは非相同的組み換えがおきる引き金となっていると予想される。また、もう一つの特徴として、ジャンクションの近傍に回文構造や、相補的配列が認められ、これらが立体的に高次構造を取るための原因となっていると考えられ、離れた増幅領域を結びつけるための一助になっていると考えられる。実際に得られた増幅領域のゲノム上の位置を元にモデルを作成し、各ジャンクションどうしを立体的に近傍に持ってきた際には、比較的コンパクトにまとまったタマネギ状のバブル構造を取らせることができ、増幅領域がループアウトしたような立体構造を作ることができた。こうした、ループアウトした高次構造が、組み換えにより切り出される、若しくはこの構造の中で、ジャンクション部分で乗り越えを起こしながら DNA 複製が行われることにより、全体として約 2Mb からなる閉じた環状の DNA 構造単位がゲノムより切り出され、これが DM 染色体の起源となったと予想される。通常、余分な DNA 断片は DNA 分解酵素により速やかに消化されると考えられるが、環状の比較的大きな構造体として生成したためにそうした分解を受けず、細胞の中に残り、DM 染色体になっていったと考えられる。そして、はじめは一つの単位であった DM 染色体が、複製、細胞分裂の過

程で不均等に分配されていき、コピー数の多い細胞が増殖的優位性を持ったために、DM 染色体の数が増える方向で蓄積して行ったと考えている。また、環状の構造のために、一つの鋳型から複数コピーの複製が行われ増幅が起きたと考える事もできる。セントロメアを持たない構造でどうして DM 染色体として安定に保たれるかは謎であるが、構造単位としての DM 染色体の全貌が明らかになった意義は大きい。今後、他の *c-myc* 増幅をもつ細胞株、および DM 染色体をもつ細胞株において同様の検討を行い、遺伝子増幅のメカニズムの解析を進める予定である。

oligoCGH を使った詳細な増幅単位の解析は、こうしたメカニズムを解析する上で有用であることがわかったが、細胞全体としての評価をする場合には、ゲノム全体を網羅的に解析可能な CGH アレイが必要となる。今回、そのツールとして、5 万箇所 SNP を同時に検出可能な GeneChip を使って、ヒト間葉系幹細胞の培養過程における染色体変化を検討した。まず、遺伝的変化が起きうるかを調べるために、長期培養したロットに関して、その最初と最後でのゲノム変化を解析してみた。すると、二つの染色体において明らかな CGH シグナルの変化（異常）が検出され、その後のマルチカラー-FISH による染色体解析により、染色体異常が確認された。CGH アレイで検出されるためにはその異常がある程度の範囲の細胞に及んでいる必要があり、実際に G-banding による核型解析からも、26 継代目の細胞ではほぼ全ての細胞が染色体異常を持つことが確認された。6 継代目の細胞には 50 細胞の観察からは異常が確認され

ておらず、この間の 20 世代の間に一部に起きた異常が全体へと広がったと考えられた。そのため、この異常細胞が増殖優位性を持つと考えられるとともに、全体のポピュレーションを占めるまでにはある程度の時間がかかるため、比較的早い段階で（最初からの可能性を含め）異常が発生したと予想した。この経時変化を追うために、凍結保存してあった継代途中の細胞を用いて FISH 解析による検討を行った結果、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（# 4 F1560）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。

また、増殖優位性に関して考察するため、増加が起きていた染色体領域に含まれる遺伝子が注目されるが、一つの候補として既に乳癌等で増幅が知られている EGFR が 7 番染色体セントロメア付近の 7q12 ローカスに存在し、その関与が示唆される。

以上、本研究においては、SNP および CGH マイクロアレイや FISH 法などの染色体解析技術を用いて細胞の遺伝的安定性を評価したわけであるが、それぞれの手法は、それぞれの長所短所を持っており、それらをまとめたのが表 6 である。染色体の増減に関する情報を得る上で、従来メタフェーズ染色体を用いた CGH 法が使われていたが、これに変わる簡便でより詳細な方法として、BAC クローンを使った CGH アレイが有用であることを我々は既に示した。今回さらに SNP をゲノムワイドに解析することにより LOH を含めた異常に関して検討が可能であると考え、Affymetrix 社より提供される SNP 検出用の GeneChip を使用した検討を行った。このアレイは SNP を検出するためにデザインされているが、アレイへのハイブリシグナルを解析することにより、染色体のコピー数の解析、即ち CGH 的な使い方ができることが期待された。しかし、Affymetrix 社より提供されるコピー数解析ツールでは満足した結果を得ることができなかった。これは、解析に用いるコントロール DNA の由来が不明なことにも起因すると考えられる。幸い、他の

研究者によりコピー数を解析するためにデザインされた dChip というソフトが無償で利用可能であったことからこれを用いて解析を行ったところ、BAC CGH データとも一致するデータを得ることができた。この事より、SNP チップが CGH にも利用可能であることが示された。今回用いた 10K アレイの SNP 数は約 1 万であり、4000 クローンの BAC CGH アレイと比べてやや詳細な解析が期待されたが、17 番染色体などはプローブの設計上、むしろ BAC データの方が切断点に関して有効な情報が得られた。しかし、SNP チップに関しては 100K さらには最近では 500K とより高密度なチップが利用可能となっており、さらに詳細な検討が期待できる。一方で、CGH アレイに関しても、最近では BAC クローンをを用いたものに加えて、オリゴ DNA を用いたマイクロアレイが、agilent 社などから市販されており、これらは BAC アレイに比べてさらにプローブ数が増加しているため、より詳細に検討が可能であった。特にカスタムデザイン可能な NANDEMO アレイは、連続的にプローブを設計することが可能であり、HL60 細胞の増幅領域の詳細な決定に威力を発揮した。

一方、SNP チップは本来多型を検出するためにデザインされたものであることから、コピー数に関しては、CGH アレイに比べると信頼性は低いと思われる。実際のデータをもみても、ベースラインの安定性や、再現性と言った観点では CGH アレイの方が優れていることから、コピー数の増減に着目した解析には CGH アレイが向いていると言える。さらに、コピー数の増減に関しては、定量的リアルタイム PCR を用いた検証

が有効である。

一方、SNP チップは染色体の増減を伴わない LOH を検出でき、より広範囲な異常を一つのアレイで検出できるという点で優れている。今回 HL60-RG 細胞においてこれまでには全く正常だと考えられていた 1 番染色体が全領域に渡って LOH を示すことが検出できたことは非常に意義が深い。細胞治療の現場では、G-バンディング等の標準的染色体検査を用いて核型が正常であることを保証する場合も見受けられるが、一見正常に見える染色体も実は LOH 型の異常を持つ危険性が示唆される。より確実な検証のためには、今後 SNP チップの利用が有効であると考えられる。

さらに、SNP チップでは検出できない異常として、染色体転座があげられる。白血病の発生においては特定の染色体転座がその成因のメカニズムとなっており、これらを有効に検出するためには、m-FISH 等の方法を用いる必要がある。

最終年度においては、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いと検出できず、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用する場合、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しう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る手法に加え、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

#### 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、解像性に優れており、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

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamada K, Suzuki T, Kohara A, Kato TA, Hayashi M, Mizutani T, Saeki K. Nitrogen-substitution effect on in vivo mutagenicity of chrysene. *Mutat Res.*, 586, 1-17, 2005.

Kanayasu-Toyoda T, Fujino T, Oshizawa T, Suzuki T, Nishimaki-Mogami T, Sato Y, Sawada J, Inoue K, Shudo K, Ohno Y, Yamaguchi T. HX531, a retinoid X receptor antagonist, inhibited the 9-cis retinoic acid-induced binding with steroid receptor coactivator-1 as