

G-1 特許取得 なし

G-2 実用新案登録 なし

G-3 その他 なし

Table 1 使用した hMSC のドナーに関する情報

ID	Lot# of Manufacturer	Age (Years)	Race	Sex
C	5F0138	19	Black	Male
B	4F0312	27	Black	female
H	4F0760	25	Caucasian	female

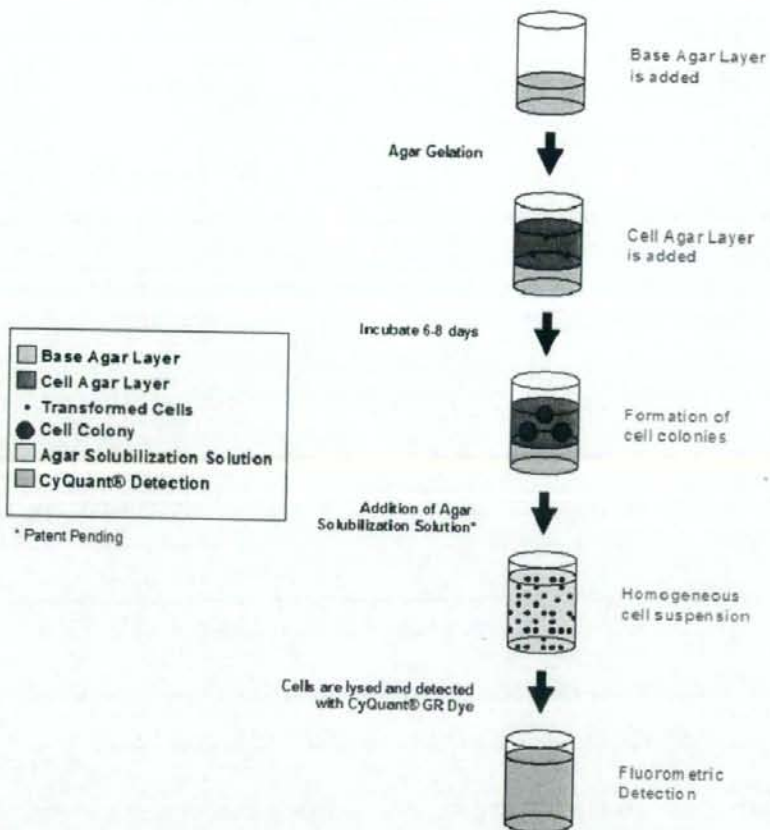
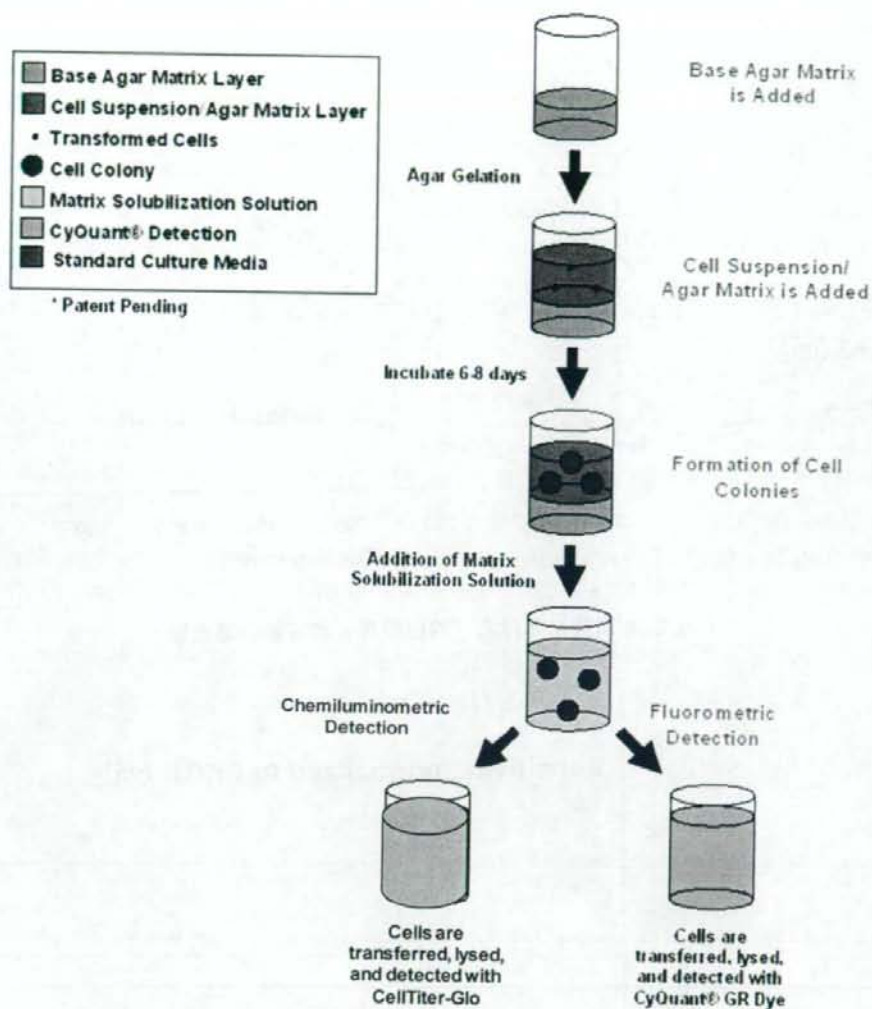


Fig. 1 CBA-130 CytoSelect Cell Transformation Assay の測定原理

CBA-130 では、軟寒天層を可溶化した際に細胞を生きたまま回収できない。細胞数の評価は CyQuant GR を使用した蛍光検出により行う。



**Fig. 2 CBA-140 CytoSelect Cell Transformation Assay (Cell Recovery) の測定原理**  
 軟寒天層を可溶化した際に細胞は生きたまま回収可能。オリジナルプロトコールでは  
 CyQuant GR を使用した蛍光検出により細胞数を評価する（最下段右）。本研究ではこれに  
 加え、CellTiter Glo による化学発光検出により細胞数を評価する系も検討した（最下段左）。

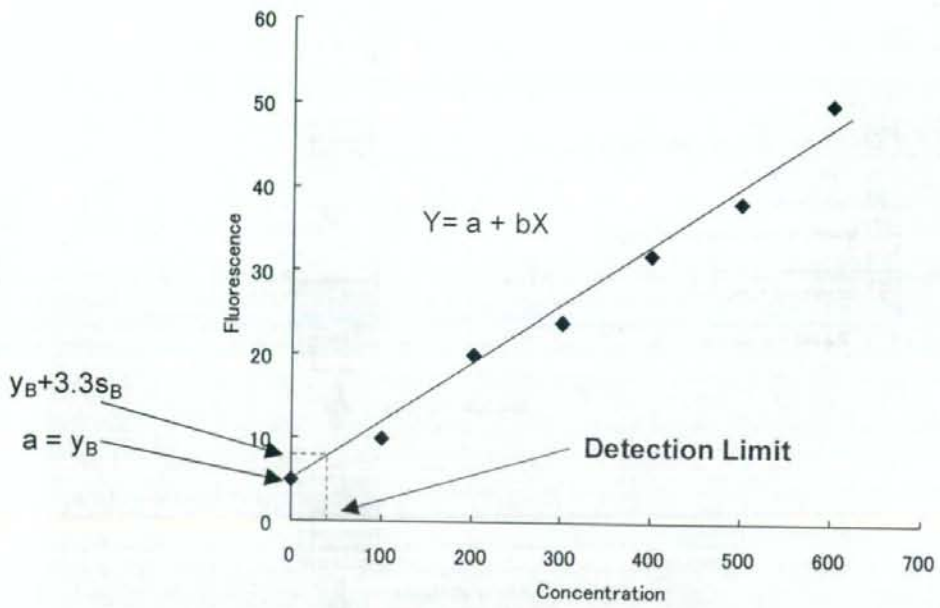


Fig. 3 本研究における「検出限界」の定義の概念図

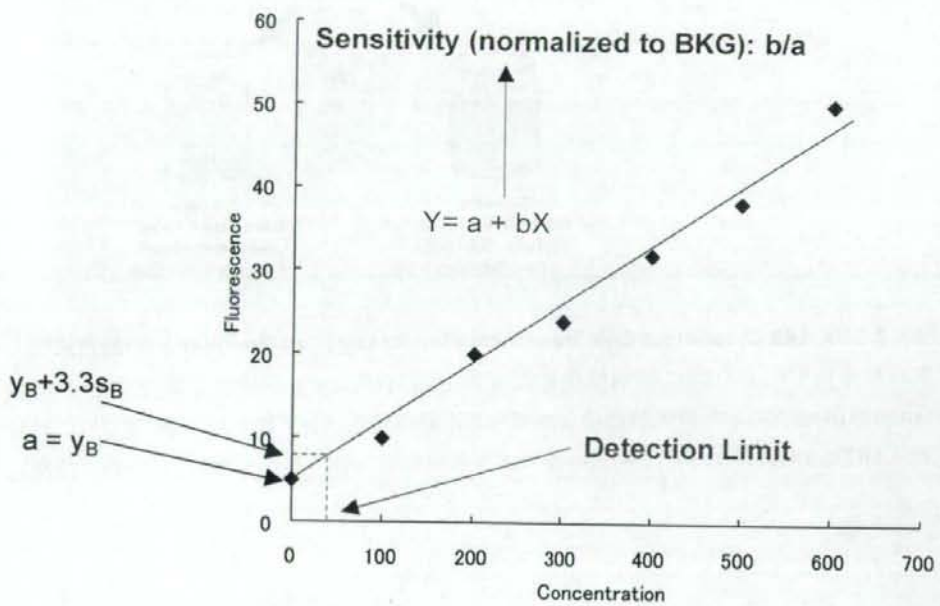


Fig. 4 本研究における「感度」の定義の概念図

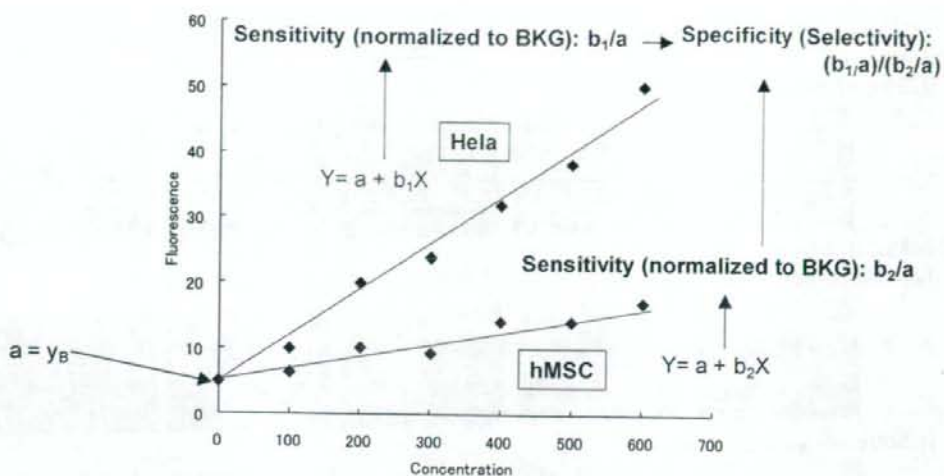


Fig. 5 本研究における「特異性（選択性）」の定義の概念図

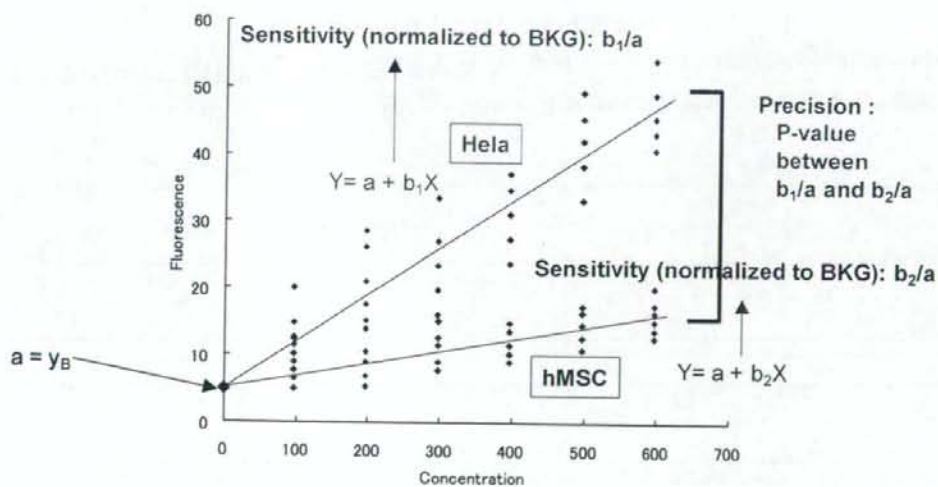


Fig. 6 本研究における「精度（併行精度）」の定義の概念図

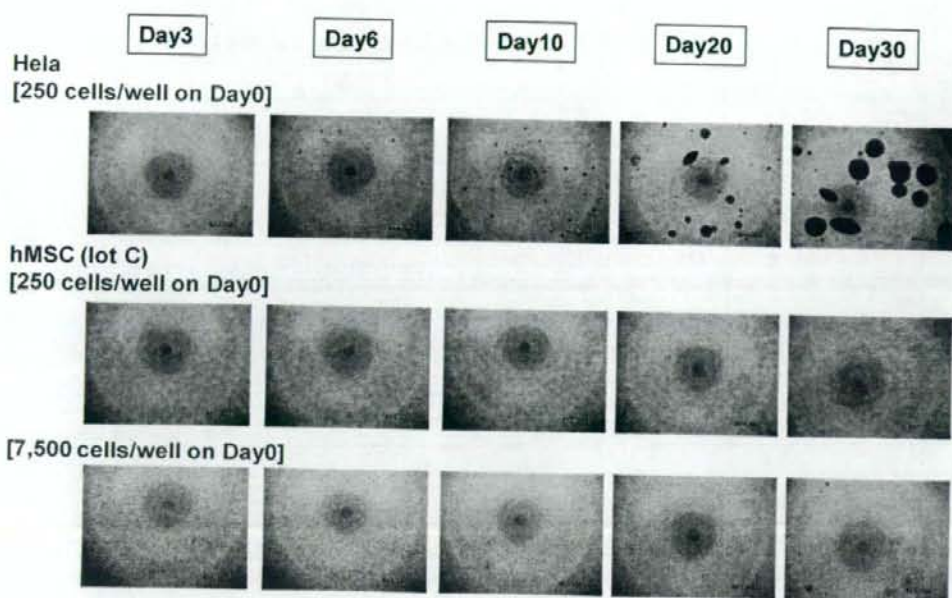


Fig. 7 軟寒天中のコロニー形成の時間経過

Hela 細胞は時間依存的にコロニーの形成・拡大が認められたが、hMSC (Lot C)では高密度に播種してもコロニー形成は認められなかった。



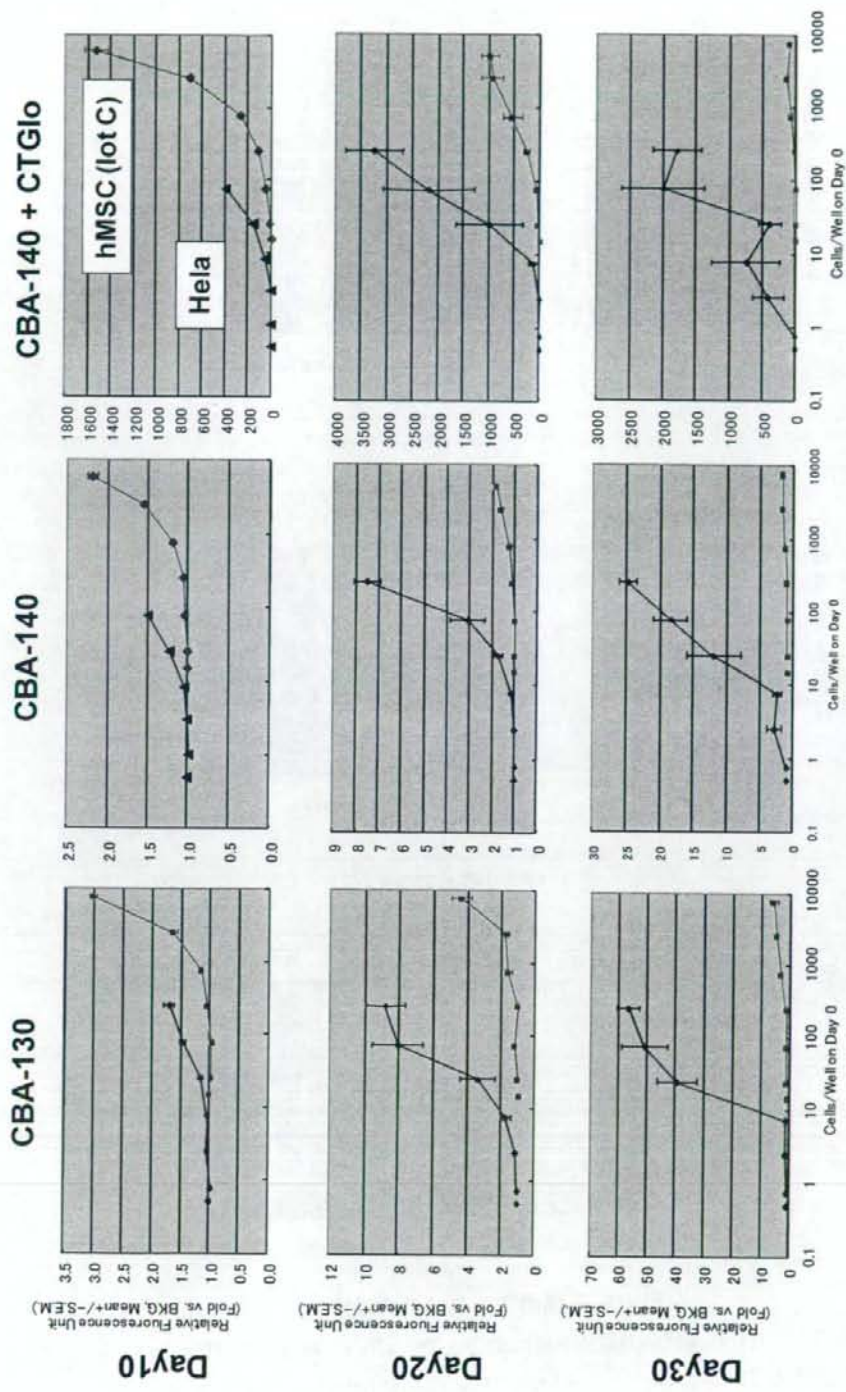


Fig. 8 細胞播種密度と測定時の細胞数シグナルとの間の用量作用関係



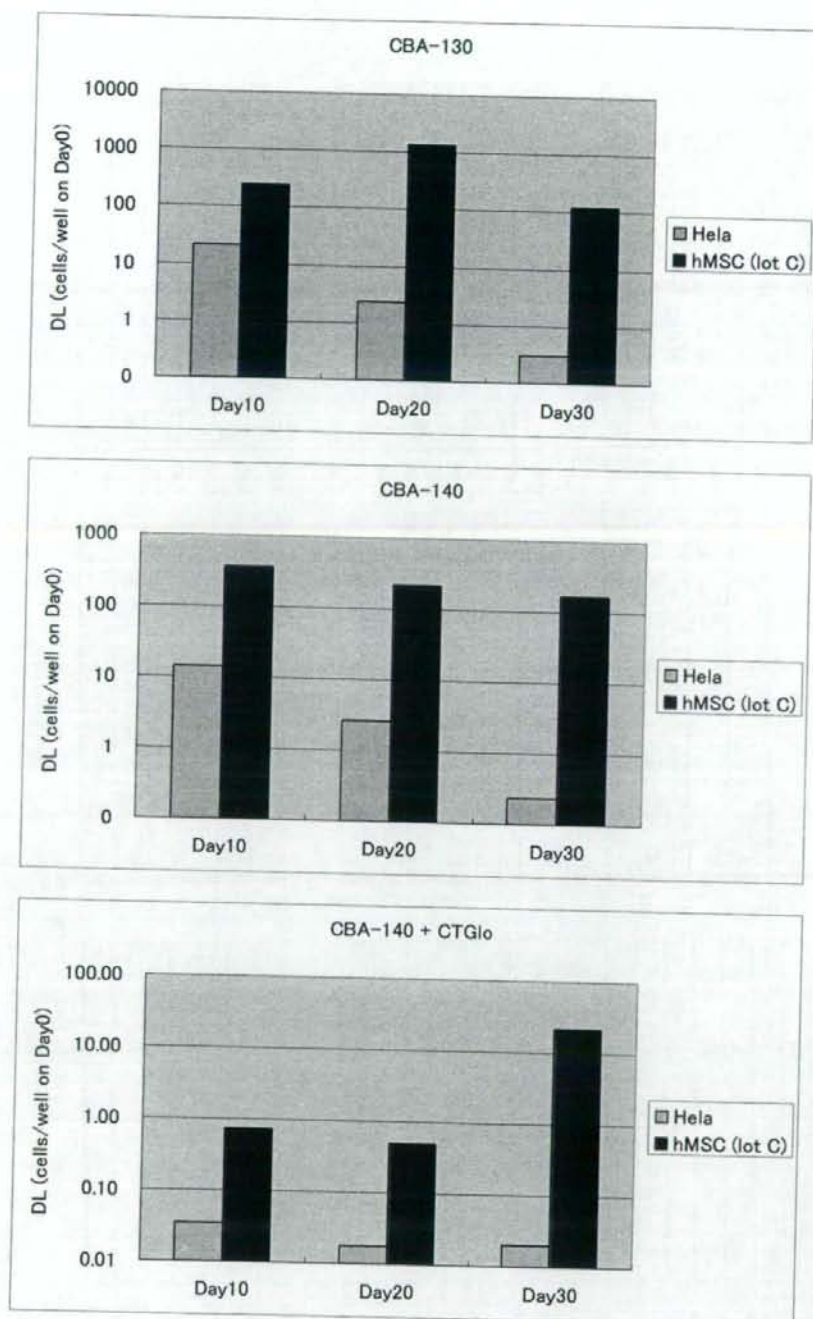
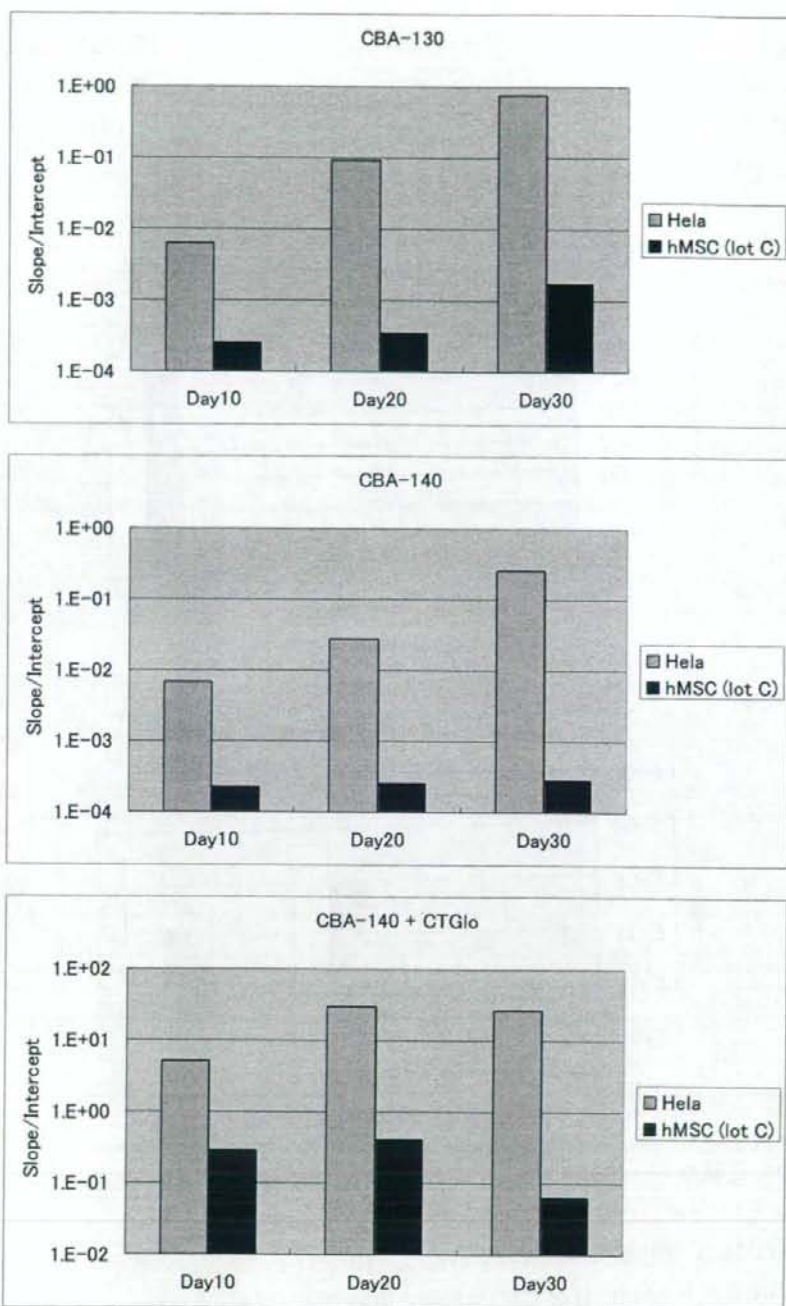


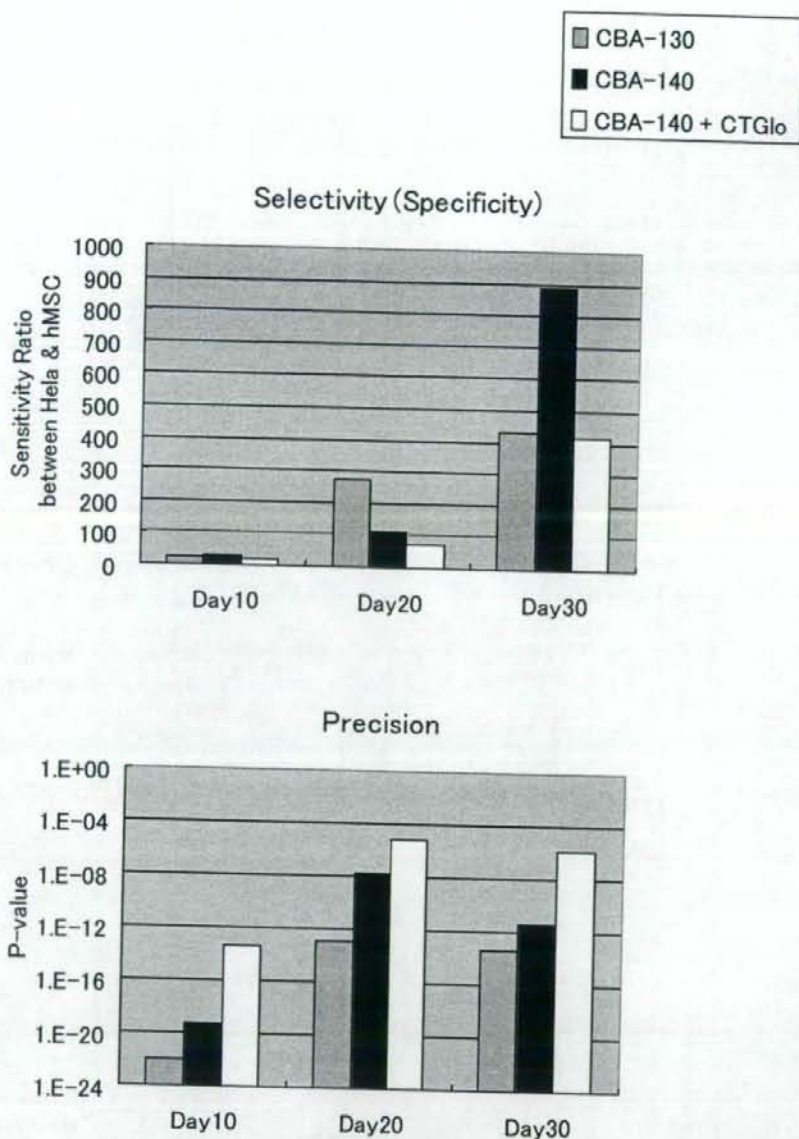
Fig. 9 三種のアッセイ系の検出限界

培養期間依存的に HeLa 細胞の検出限界は低下した。CBA-140 は CellTiter Glo とのコンビネーションにより HeLa 細胞および hMSC (Lot C) の検出限界を顕著に下げた。



**Fig. 10 三種のアッセイ系の感度**

培養期間依存的に HeLa 細胞の感度は増加した。CBA-140 は CellTiter Glo とのコンビネーションにより HeLa 細胞および hMSC (Lot C) の感度を顕著に上げた。



**Fig. 11** 三種のアッセイ系のHela細胞に対する選択性（上）および精度（下）  
 hMSC (Lot C)と比較した場合、培養期間依存的にHela細胞に対する選択性は増加した。  
 100倍以上のHela細胞選択性を実現するには、10日以上培養が必要であった。また、  
 Hela細胞の検量線とhMSC (Lot C)の検量線との間では、培養20日目および30日目にお  
 いて、CBA-130はCBA-140およびCBA-140とCellTiter-Gloとのコンビネーションに比  
 べて低いP値を示した。

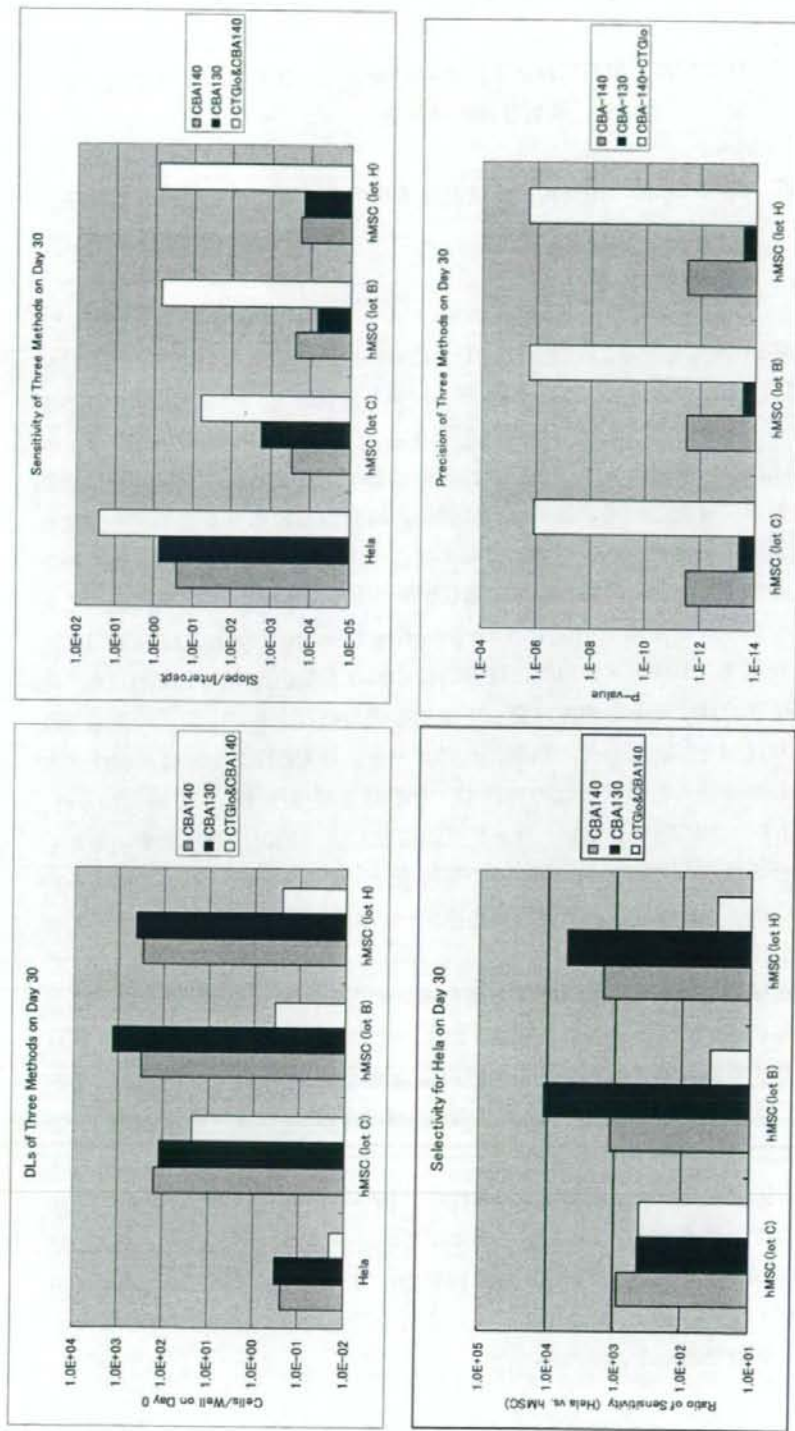


Fig. 12 hMSCの製造ロット（ドナー）の差による各アッセイ系の特性

培養30日目において、Lot Cに加えて、Lot BおよびHで各アッセイ系の特性を検討した。検出限界と感度の点ではCBA-140とCellTiter-Gloのコンベンションが優れるが、HeLa細胞への選択性および精度に関してはCBA-130が優れていた。



再生医療実用化に向けた細胞組織加工医薬品の安全性・品質等の確保に関する  
基盤技術開発研究

分担研究者 鈴木 和博 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部部長

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・組織加工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、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞をモデルとし、培養過程における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) 法を用いて検討した結果、1 ロットの細胞に培養過程における染色体変化を検出した。それを受け、本研究ではその発生頻度に関して検討を進めるとともに、異常の生成過程に関して詳細な検討を加えた。その結果、他のロットには CGH アレイにて検出可能な細胞集団として共通した異常は認められず、その発生頻度は低いことがわかった。また、異常発生ロットに関するセントロメア FISH 法による検討により培養初期から異常細胞の存在を検出していたが、その後の経時変化に関してさらに詳しく解析を行った。また、GeneChip 解析による遺伝子発現データより、異常ロットに特徴的に発現変化する遺伝子群を抽出した。

一方、培養過程における培養環境の安全性を検討する目的で、1 細胞レベルでの染色体異常の検出に向けて、染色体異常試験、およびその簡便な検出法としての小核試験法の導入に関する基礎的な検討をヒト骨髄由来間葉系幹細胞を使って行った。また、1 細胞レベルでの癌化形質の検出へ向けて、間葉系幹細胞のコロニー形成能に関する検討を開始した。

さらに、細胞組織加工医薬品の品質、有効性を評価するためのバイオマーカーを検出する手法として、高感度ナノ LC・MS 測定によるショットガンプロテオミクスを用いた網羅的発現解析系の確立を行い、間葉系幹細胞のプロテオーム解析を行った。その結果、各種 CD 抗原を含め 700 以上のタンパク質を同定でき、細胞のキャラクターゼーションにも有効であることがわかった。

## 協力研究者

- 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
- 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
- スレッジ  
ティルハッティ 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
- 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
- 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
- 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

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、その安全性、主に腫瘍原性が問題となっており、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享受するためにも、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。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考えられ、培養の過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。その後の検討により、他のロットにおいては異常が認められないこと、異常は比較的初期から検出されることがわかってきた。そこで、この普遍性 (発生頻度) と、発生時期及び培養に伴う拡散課程について、今年度の研究ではさらに詳細な検討を加えた。

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。

さらに本研究では、細胞培養過程における、品質および有効性評価に有用なバイオマーカーの探索のため、細胞を用いた網羅的プロテオーム解析のための高感度分析手法の開発を、オンラインナノ LC・タンデム質量分析装置を用いて行った。

## B. 研究方法

### 1. 細胞の染色体安定性に関する検討

#### 1. 使用した細胞株

Cambrex 社より入手した正常ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 (hMSC) および前骨髄性白血病細胞 HL60 細胞株を使用した。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て継代を続けた。

HL60 細胞は、10%牛胎児血清添加 RPMI1640 培地にて培養をした。

#### 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) を用い、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 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 mismatches 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 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。

### 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、48 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

これまでの検討で染色体異常が認められた hMSC のロット 5F1650 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作製し、以下に示した 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。

- Vysis CEP8 Spectrum Green
- Vysis 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. GeneChip データの解析

hMSC の培養過程における遺伝子発現変化を Affymetrix 社の GeneChip Human U133 アレイを用いて解析したデータをもとに、データ解析ソフトウェア GeneSpring (Agilent)を用いて、染色体異常の確認されたロット特異的な遺伝子発現に関して解析を行った。

## 9. 染色体異常および小核試験

hMSC 細胞の染色体解析のため、細胞を分裂中期にて停止させるため Nocodazol (SIGMA)を DMSO に溶解し、各種濃度で培地中に添加し、1、3、6、24、48 時間作用させたときの効果を調べた。小核試験の観察用には、細胞をトリプシンにて剥離後、0.075M KCl 溶液にて 37°C 18 分低張処理をした後、カルノア溶液にて 5 分間固定後、遠心分離にて細胞を回収し、カルノア溶液にて 10 分間最固定した後、細胞を少量のカルノア溶液に懸濁させ、濡れたキムタオルの上においたガラススライド上に滴下し、エアードライ法にて標本作製した。

## II. 細胞のプロテオーム解析

### 1. サンプルの前処理

(タンパク質の抽出)

1.5X10<sup>5</sup> 個の細胞を 50 $\mu$ l の細胞溶解液にて溶解した後、450 $\mu$ l のアセトンを加えてタンパク質を沈殿させ、30 $\mu$ l の RapiGest

溶液に溶解した。

(還元アルキル化)

タンパク溶液 30 $\mu$ l に、30 $\mu$ l の 10mM DDT を加え、60°C 30 分間反応させて還元後、室温に戻した後、60 $\mu$ l の 30mM ヨードアセトアミド溶液を加え、遮光して室温にて 30 分間反応させた。

(トリプシン消化)

還元アルキル化したサンプル溶液にそのままトリプシン溶液を 4.6 $\mu$ l (0.25 $\mu$ g/ $\mu$ l) 加え、37°C で一晩消化した。

### 2. ナノ LC

本研究にはナノ LC として、Qstar 接続用に Splitless Nano HPLC System DiNa (KYA テクノロジーズ)を、LTQ 接続用に Ultimate(Dionex)使用した。配管には内径 50 $\mu$ m のヒューズドキャピラリーチューブを用い、C-18 逆相カラム (KYA, W-3) およびトラップカラムを使用した。移動相は A(2% アセトニトリル、0.1% ギ酸)、B(80% アセトニトリル、0.1% ギ酸)の 2 種類の組成の溶媒を用い、A100%から B100%へのグラジエントをかけてペプチドを順次カラムより溶出させた。

### 3. 質量分析装置

本研究に使用した質量分析装置は、ESI-Q/TOF 型 QSTAR-XL-PF (Applied Biosystems) および ESI-ion trap/FT 型 LTQ-Orbitrap(Thermo Fisher)であり、前述のナノ LC とオンライン接続し、LC-MS としての測定を行った。通常の測定は、ポジティブモードを使用した。ESI ナノスプレー用チップとして、KYA 社製スプレーチップを使用した。逆相カラムにてペプチドを分離後、ナノスプレーインターフェースにて

質量分析装置へと導入した。この際、スプレー電圧は1400Vから2000Vの間でスプレーチップの劣化に応じて変更し、安定したスプレーを得ることを確認した。

質量分析装置の設定に関しては、基本的に以下のTOF-MS測定条件をデフォルト値として使用した。

#### (Qstar)

- TOF マス質量範囲 ; 350-1400m/z
- Total Analysis Time ; 150 min
- Accumulation time ; 4 sec.
- Spray Voltage ; 1600V

#### (LTQ)

- TOF マス質量範囲 ; 350-2000m/z
- Total Analysis Time ; 150 min
- Accumulation time ; Normal (0.1-0.3 sec.)
- Spray Voltage ; 1700V

その他のパラメーターは、測定を行いながら最適化した。

#### 4. TOF マス測定とデータ処理

QSTAR-XLによる質量分析データは、基本的に付属のソフトウェアであるAnalystQSを用いて解析された。同様にLTQ-Orbitrapデータは、Xcaliburを用いて解析された。QSTAR-XLにてTOFマス依存解析を行う場合には、積算時間は4秒と長めに設定した。LTQ-Orbitrapの場合には、FT-MS測定とMS/MS測定が同時に行われるため、基本的にデータ依存的MS/MS測定(上位3親イオンを測定)を同時に行い、スキャンスピードはノーマルに設定した。この場合、シングルスキャン

のフルレンジFT-MS測定に要する時間は約0.02とQSTARに比べてかなり早い。

Rawデータの解析のため、Analystにて作成されるWiff形式ファイルおよびXcaliburにて生成されるRaw形式のファイルの加工のため、共通フォーマットであるmzXMLへの変換ツールとして、Systems Biology Instituteより提供されているTrans-Proteomic Pipeline (TPP)というソフトウェアを利用した。このソフトウェアにより、mzXML形式ファイルを、さらにLC-MSデータとしての3Dグラフによる可視化を行った。また、同時に独自の定量解析ソフトとして"mzMore"と名付けたソフトウェアの開発を進めた。

#### 5. データベースサーチによるタンパク質の同定

MS/MS測定から得られたフラグメントイオンパターンより、ペプチドマスフィンガープリンティング法によるタンパク質の同定を行うための解析ソフトであるMASCOT(Matrix Science)を用いて、SwissProtプロテインデータベースを検索した。MASCOTの検索パラメーターとしてはLTQ用のデフォルト値を用い、可変修飾として、メチオニンの酸化、およびシステインのカルバジドメチル化を設定した。同定の信頼性には、MASCOTのデフォルト値である、 $p < 0.05$ を用い、切断ミス許容数1にて検索を行った。

#### 8. データ解析ソフト「mzMore」の開発

質量分析機に付随する解析用のソフトウェアはマススペクトルの測定という点に関しては十分な性能と機能を持っているが、



測定後のデータ解析については、既存のソフトウェアでは十分でなく、データ解析用のツールが必要とされている。このような目的に開発された市販のソフトウェアはいくつか存在するが、いずれも高価である点とカスタマイズが難しいという問題から、我々は前述のフリーソフトウェアの利用とともに、独自の解析用ソフトウェアの開発を試みている。「mzMore」と名づけたこのソフトウェアシステムの開発は、協力研究者である Suresh Thiruppathi 博士を中心に、インド RUSHMORE 社のシステムエンジニアである Ramesh Kanagapathy 氏の協力の下、進められた。

## C. 結果

### 1. 細胞の染色体安定性に関する検討

#### 1. 異なる hMSC ロットにおける hMSC 細胞の遺伝子安定性に関する検討

これまでの SNP チップ解析の結果、異常を示した hMSC 株ロット #4F1560 (図 1) 以外の 3 ロットおよびヒト骨格筋芽細胞 (HSMM) に関しては、ゲノムコピー数の異常は検出されていなかった。今回さらに新たな 2 ロットについても同様に検討したところ、異常は検出されず、染色体変化は上記ロット #4F1560 に特徴的に起きた変化であり、少なくともその頻度はあまり高くないことがわかった。

#### 2. セントロメア特異的 FISH プローブを用いた異常獲得ロットにおける染色体

## 異常蓄積の経時変化に関する検討

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が、7 番染色体セントロメアプローブを用いた FISH 解析により、セントロメア数は正常であることがわかった。一方、同じくコピー数異常の認められた 17 番染色体特異的セントロメアプローブを用いた FISH 解析から、シグナル数の増加が認められ、異常が観察された。この結果より、2 本増加していた 7 番染色体には、17 番染色体由来のセントロメアが存在する可能性が示唆されるとともに、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。そこで、正常対照として 8 番染色体特異的セントロメアプローブを用い、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各種継代数の細胞について行った。間期核におけるそれぞれのシグナル数を元に、異常細胞数の解析を行った。得られた異常細胞の例を図 2 に示す。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% であった異常頻度が、15、17、および 21 継代と培養が進むにつれて、それぞれ 34%、45%、53% と増加し、24 継代では 97% とほぼすべてに異常が見られた。

このことから、比較的培養初期から異常細胞が存在し、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 3 に示すとおり、異常のあった #4F1560 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考えられた。そこで、さらに培養を続けたところ、30 継代以上増殖を続けたが、34 継代を超えたところでほぼ増殖をしなくなり、不死化は起こっていないことがわかった。

### 3. 染色体異常が観察された hMSC ロットにおける遺伝子発現変化の解析

CGH アレイによって異常が観察された hMSC のロット #4F1560 に関しては、初期に起きた異常により増殖優位性を獲得した細胞が、継代とともそのポピュレーションを拡大し、培養系全体に広がっていったことがわかった。即ち、染色体変化が細胞に増殖性を獲得させたわけであるが、その増殖性の原因となった変化は何であったのだろうか？染色体変化からその謎に迫るアプローチも考えられるが、すでに我々の研究グループでは、本異常ロットを含めた複数の hMSC ロットに関して、培養に伴う遺伝子発現変化を GeneChip を用いて解析したデータがあり、これを使って、遺伝子発現変化という視点から、増殖性獲得のメカニズムに迫ることを考えた。

遺伝子発現データの詳細に関しては、すでに公共データベースに登録されており、

以下のサイトにて情報を得ることができる。これまでの研究では、主に培養に伴う遺伝子発現変化という観点から解析が行われたが、今回は、異常が認められたロットに着目し、そこで特徴的に起こっている遺伝子発現変化を他の正常ロットと比較することにより検討した。データ解析には、必要に応じてソフトウェアとして GeneSpring (Agilent Technologies) を使用した。

まず、異常ロットを含む hMSC6 ロットに対し、異なる継代数の細胞に関する計 53 チップデータを、単純にすべての遺伝子を用いてクラスタリング解析した結果を図 4 に示す。ロットを問わず、20 継代を超える長期培養後の細胞における発現パターンは、一群のクラスターを形成し、培養に伴う共通した変化が示唆された。その中で、異常のあったロット #4F1560 のデータに関しては、他のロットと分離したクラスターを形成し、染色体変化を反映した、特徴的な遺伝子発現変化が存在する可能性が示唆された。

そこで、この特徴的な変化をもたらす遺伝子群を調べるため、このロットにおいて他のロットと異なる発現変化を示す遺伝子の抽出を GeneSpring を用いて行った。検索条件としては、28 継代の 4F1560 の 1 ロットにおいて、他のロットにおける 20 継代以上の遺伝子発現と比較して 5 倍以上の変化を示す遺伝子をフィルタリングし、このうち、データの信頼性を考慮し、半数以上で遺伝子発現量が 100 以下の遺伝子は除いたところ、合計 49 遺伝子が選択された。これら遺伝子の発現パターンを、他の 20 継代以上の長期培養 4F1560 ロットのデータで確認したところ、図 6 に示したようにいずれの遺伝子も選択に使ったサンプル (4