

swJB-M8 について均一性試験を実施し、ウイルスはほぼ分散していることを確認した。これらの結果より、ウイルスパネルの均一性が確認され、ウイルス希釈列を用いても定量性に問題はないものと考えられた。

C.2 HEV 標準パネルのコピー数設定

HEV パネル候補品について、共同検定に参加した 6 施設において定量を行い、各パネルのコピー数を算出した。HEV は heterogeneity が高く、参加施設数も少ないため、共同検定では可能な限り統一したプロトコールに従って行うこととした。ウイルス核酸の抽出は、ブタ糞便由来で RNase 等の RT-PCR を阻害する不純物が多く含まれると想定されるため、カラム法が適していることから、カラム法の同一キットを採用することとした。また、RT-PCR のキット、検出に用いるプライマー、プローブもすべての機関で統一した。RT-PCR に用いた機器は施設により異なり、ABI 7500 が 2 施設、ABI 7500fast、ABI 7900、ABI 7000、Roche LightCycler が各 1 施設であった。使用機器及び施設により、RT-PCR の反応系の容量やプライマー、テンプレートの量などは適宜変更した。

各共同検定参加施設では、パネル 3 セットについて日を変えて核酸抽出とリアルタイム RT-PCR を行うことにより定量を実施した (Log copies/ml を N=3 で算出) 結果を Table.3 にまとめた。全 6 施設の平均値を求めたところ、どのパネルメンバーにおいても SD が 0.5 以上と非常にばらつきが大きくなった (Table.4)。特に、6 施設のうち 1 施設のデータが値のばらつきが大きく、また他施設よりも定量値がかなり低い傾向が

認められたことから、測定系になんらかの問題があることが考えられた。そこでこの 1 施設を除いた 5 施設の平均値を求めたところ、参考値に近い値となり SD も 0.5 以内となった。そこで、この 5 施設平均値をパネルのコピー数として設定した (Table.4)。

C.3 HEV 標準パネルの検出限界

HEV 標準パネルの定量に用いた検出法による標準パネルの検出限界について検討を行った。各パネルについてヒト陰性血漿を用いて 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 の 4 段階に希釈後、ウイルス核酸を抽出し、リアルタイム定量 PCR により測定した。各パネルの希釈による計算値と実測値を Table 5 に示す。NAT ガイドラインによると、「95% の確率で検出される検体一定量当たりのウイルス遺伝子の際定量である陽性カットオフ値を検出感度として設定する。」とあり、十分な回数の試験を繰り返して求める必要がある。N=3 で実施した今回のデータからは厳密な検出限界を算出することはできないが、2/3 以上が検出される条件を考慮すると、10~20 copies/reaction 程度まで検出可能と考えられた。

D. 考察

HEV の NAT による測定の評価に用いる標準パネルの樹立に関する検討を行った。国内の HEV の遺伝子型は 3 型又は 4 型で、4 種類のクラスター (G3jp, G3us, G3sp, G4jp) に分類される。HEV パネル候補品は、国内 4 クラスターに属し、実験感染ブタ糞便から得た 4 株と培養細胞で増幅した 1 株の計 5 株をヒト血清で約 10^5 copies/ml に希釈し、0.5ml ずつ分注したものであり、均一

性試験を実施して確認後、参加 6 施設でリアルタイム PCR 定量を実施することにより各パネルの単位を設定した。今回は HEV 標準品が利用できなかったため、合成 RNA を用いてコピー数を設定したが、WHO の HEV 標準品が樹立されれば、今後、WHO の標準品を基に単位を換算できるようにすることが望ましい。今回樹立した HEV-NAT 評価用標準パネルは今後広く公開する予定であり、幅広い活用が期待される。

E. 結論

E 型肝炎ウイルス (HEV) の核酸増幅検査 (NAT) による測定の評価に用いる標準パネルの樹立に関する検討を行い、HEV-NAT 評価用標準パネルを樹立した。本パネルは、今後の公開により幅広い活用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ken Nishimura, Masayuki Sano, Manami Ohtaka, Birei Furuta, Yoko Umemura, Yoshiro Nakajima, Yuzuru Ikehara, Toshihiro Kobayashi, Hiroaki Segawa, Satoko Takayasu, Hideyuki Sato, Kaori Motomura, Eriko Uchida, Toshie Kanayasu-Toyoda, Makoto Asashima, Hiromitsu Nakauchi, Teruhide Yamaguchi and Mahito Nakanishi: Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming,

J. Biol. Chem., 286, 4760–4771 (2011)

- 2) 小木 美恵子、石丸 幸大、西脇 基晃、宮脇 英明、内田 恵理子、得永 嘉昭：遺伝子導入用インパルス応力波素子開発のための実験的検討、信学技報 US2010-97, 31-34 (2011)
 - 3) 奥田晴宏、川崎ナナ、内田恵理子、山本美智子、宮田直樹：薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第 50 回、*Pharm Tech Japan*, 26(10), 1927-1936 (2010)
- ### 2. 学会発表
- 1) 押澤正、豊田淑江、内田恵理子、鈴木孝昌、山口照英、鈴木和博：カルシウム結合蛋白質 S100A8 による HL-60 細胞の増殖抑制、第 11 回 Pharmac-Hematology シンポジウム、2010 年 6 月、東京
 - 2) 内田恵理子、古田美玲、鈴木和博、佐藤功栄、岩田明子、山口照英：抗体医薬品のウイルス安全性確保のためのウイルス除去カラムの開発、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 2010 年 12 月、神戸
 - 3) 古田美玲、内田恵理子、豊田淑江、中西真人、西村健、大高真奈美、山口照英：持続発現型センダイウイルスベクターの CGD 遺伝子治療への応用、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 2010 年 12 月、神戸
 - 4) 押澤正、豊田淑江、内田恵理子、鈴木孝昌、山口照英、鈴木和博：カルシウム結合タンパク質 S100A8 は HL-60 細胞

の好中球様分化において増殖・分化に重要な働きをする(その3)、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(BMB2010), 2010年12月、神戸

- 5) 小木美恵子、石丸幸大、西脇基晃、宮脇 英明、内田恵理子、得永嘉昭：遺伝子導入用インパルス応力波素子開発のための実験的検討、電子情報通信学会超音波研究会、2011年1月、京都
- 6) 小木 美恵子、西脇 基晃、會澤 康治、内田 恵理子、得永 嘉昭：遺伝子導入用インパルス応力波の創発に関する基礎研究、日本音響学会 2011年春季研究発表会、2011年3月、東京
- 7) 會澤 康治、西脇 基晃、小木 美恵子、内田 恵理子、得永 嘉昭：遺伝子導入用レーザー誘起インパルス応力波発生素子に関する研究、第58回応用物理学関係連合講演会、2011年3月、横浜

- 8) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：造血支持能を持つフィーダー細胞膜タンパク質の機能解析、第10回日本再生医療学会総会、2011年3月、東京
- 9) 内田恵理子、岡田義昭、水澤左衛子、柚木幹広、辻川宗男、皆木隆男、稲田耕一、小西久郎、五十嵐正志、鈴木光、嘉悦洋、下瀬克郎、萩原克郎、安江博、生田和良、鈴木和博、山口照英：E型肝炎ウイルスの核酸増幅検査(NAT)評価用標準パネルの樹立、日本薬学会第131年会、2011年3月、静岡

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし

Table 1 HEV 標準パネル候補品の内容

	パネル名	クラスター	由来	容量
1	HEV swJR-P5	G3jp	実験感染ブタ糞便	0.5ml/tube
2	HEV swJB-E10	G3sp	実験感染ブタ糞便	0.5ml/tube
3	HEV swJB-E10cul	G3sp	A549 細胞培養上清	0.5ml/tube
4	HEV swJB-M8	G3us	実験感染ブタ糞便	0.5ml/tube
5	HEV swJB-H7	G4jp	実験感染ブタ糞便	0.5ml/tube
6	Negative control	—	希釈用ヒト血清	0.5ml/tube

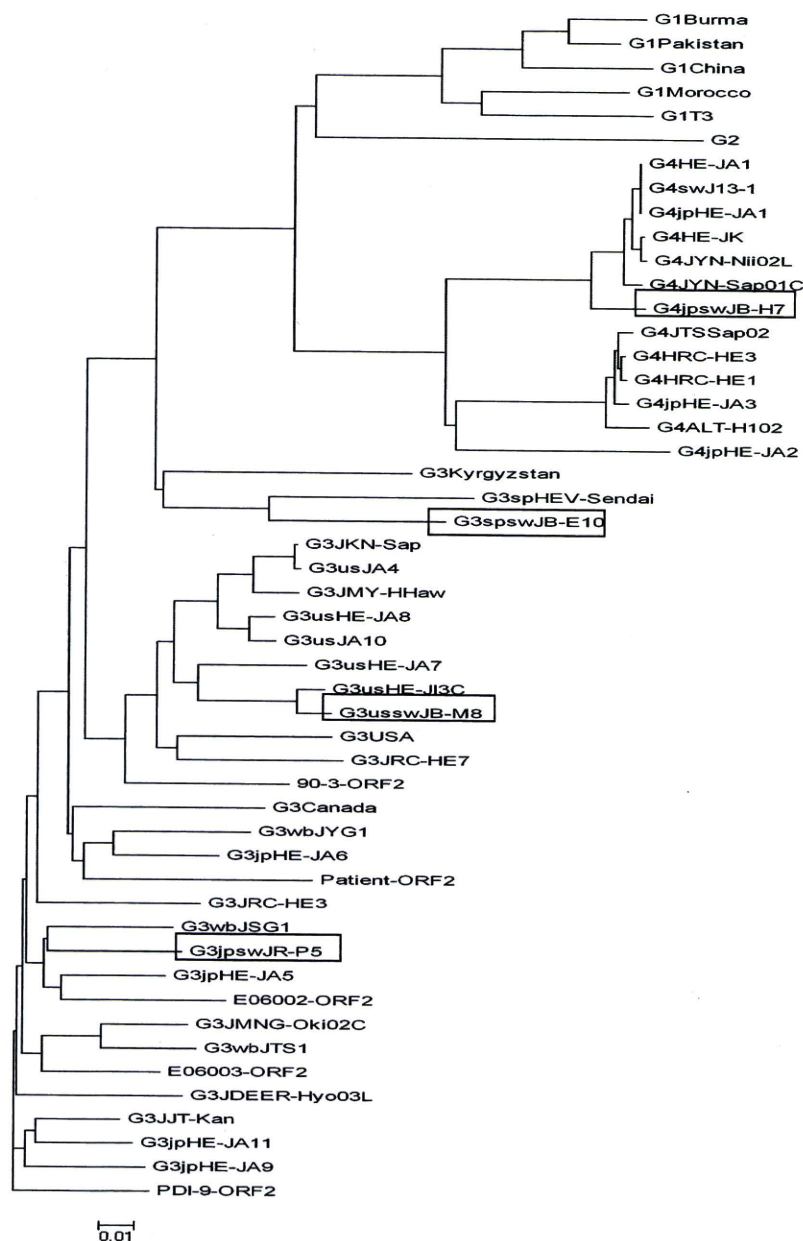


Fig.1 HEV パネルの系統樹

Table 2 HEV 定量に用いるプライマー及びプローブ

	名称	サイズ	配列番号	配列
Sense primer	HE86	18mer	5286-5303	5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'
Antisense primer	HE87	18mer	5355-5338	5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3'
Probe (swJB-M8 以外)	FHE88	18mer	5309-5326	5'-FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-TAMRA-3'
Probe (swJB-M8 用)	FHE100	18mer	5309-5326	5'-FAM-TGATTCC <u>C</u> CAGCCCTTCGC-TAMRA-3'

配列番号は GeneBank AB073912 の番号に準じた

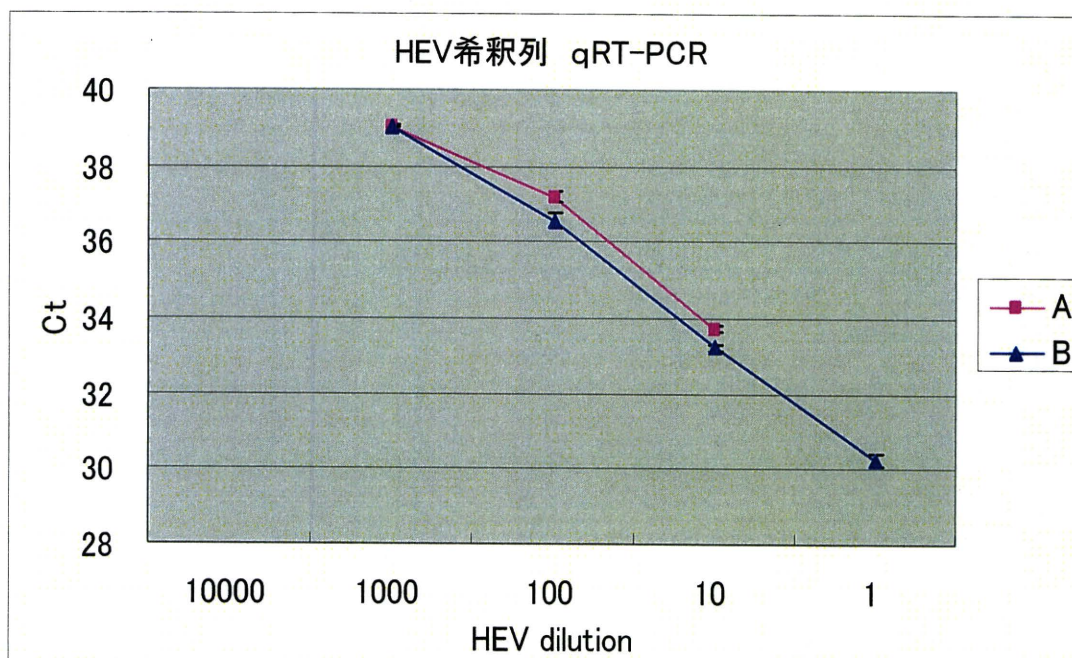


Fig.2 HEV パネル候補品 (swJB-H7) の均一性試験

A : HEV 原液より RNA を抽出後に 10 倍希釈列を調製し、qRT-PCR を実施

B : HEV の 10 倍希釈列から HEV RNA を抽出し、qRT-PCR を実施

Table 3 各施設における HEV パネル定量の実測値と平均値

swJR-P5(G3jp) (単位: log copies/ml)

施設 No.	1 回目	2 回目	3 回目	平均値	S.D.
1	4.87	4.86	4.83	4.85	0.02
2	5.19	5.64	5.47	5.43	0.19
3	5.44	5.43	5.45	5.44	0.01
4	4.98	5.00	5.16	5.05	0.08
5	4.30	4.70	4.80	4.60	0.22
6	4.26	3.73	4.18	4.05	0.23

swJB-E10(G3sp) (単位: log copies/ml)

施設 No.	1 回目	2 回目	3 回目	平均	S.D.
1	4.66	4.60	4.47	4.58	0.08
2	5.01	5.45	5.18	5.21	0.18
3	5.14	5.10	5.06	5.10	0.03
4	4.67	4.52	4.90	4.70	0.16
5	4.3	4.4	4.6	4.43	0.12
6	4.04	2.56	3.23	3.28	0.61

swJB-E10cul(G3sp) (単位: log copies/ml)

施設 No.	1 回目	2 回目	3 回目	平均	S.D.
1	4.27	4.30	4.18	4.25	0.05
2	4.58	5.01	4.77	4.79	0.18
3	4.71	4.73	4.71	4.72	0.01
4	4.49	4.17	4.48	4.38	0.15
5	4.0	4.0	4.0	4.00	0.00
6	3.68	2.28	3.66	3.21	0.66

swJB-H7(G4jp) (単位: log copies/ml)

施設 No.	1 回目	2 回目	3 回目	平均	S.D.
1	4.73	4.75	4.75	4.74	0.01
2	5.14	5.45	5.25	5.28	0.13
3	5.28	5.31	5.41	5.33	0.06
4	4.88	4.88	5.04	4.93	0.08
5	4.5	4.5	3.8	4.27	0.33
6	3.74	3.20	3.81	3.59	0.27

swJB-M8(G3us) (単位: log copies/ml)

施設 No.	1 回目	2 回目	3 回目	平均	S.D.
1	5.11	5.03	4.97	5.04	0.06
2	5.36	5.85	5.67	5.63	0.20
3	5.67	5.74	5.77	5.73	0.04
4	5.23	5.07	5.35	5.22	0.11
5	4.6	4.7	4.9	4.73	0.12
6	2.72	3.82	3.15	3.23	0.45

Table. 4 HEV 標準パネルのコピー数設定

(単位 : log copies/ml)

パネル	6 施設の平均値	パネルのコピー数*	参考値**
swJR-P5 (G3jp)	4.90 ± 0.52	5.07 ± 0.35	5.27 ± 0.16
swJB-E10 (G3sp)	4.55 ± 0.69	4.80 ± 0.33	4.83 ± 0.09
swJB-E10cul (G3sp)	4.22 ± 0.60	4.43 ± 0.31	4.37 ± 0.04
swJB-H7 (G4jp)	4.69 ± 0.64	4.91 ± 0.42	4.83 ± 0.06
swJB-M8 (G3us)	4.93 ± 0.86	5.27 ± 0.39	5.39 ± 0.06

*: ばらつきが大きい 1 施設のデータを除いた値

** : パネル分注品の均一性試験結果 (ベネシス社データ)

Table. 5 HEV 標準パネルの希釈列の定量

(単位 : copies/reaction)

	HEV panel	1/10 dilution	1/100 dilution	1/1000 dilution	1/10000 dilution
HEV swJR-P5	計算値	235.0	23.5	2.3	0.2
	実測値	284.9	1.8	6.3	—
HEV swJB-E10	計算値	126.2	12.6	1.3	0.1
	実測値	75.8	11.8	—	1.1
HEV swJB-E10cul	計算値	53.8	5.4	0.5	0.1
	実測値	31.4	—	1.8	—
HEV swJB-H7	計算値	162.6	16.3	1.6	0.2
	実測値	223.4	26.7	—	—
HEV swJB-M8	計算値	170.2	17.0	1.7	0.2
	実測値	92.5	3.7	1.5	0.6

検出頻度

: 3/3

: 2/3

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

細胞組織利用医薬品の同一性・安定性評価手法の開発に関する研究

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

我々は再生医療の実現へ向け、細胞・組織加工医薬品の品質保証、標準化のためのバイオマーカー検索を行なっている。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が危惧されるため、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。培養過程におけるタンパク質、ペプチドの質的、量的変化をとらえるため、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞をモデルとし、ナノ LC-MS/MS 装置を用いた網羅的プロテオーム解析系の確立を行ってきた。すでに、定量比較ソフトウェアを利用したノンラベル法によるアプローチにより、膨大な質量分析データからバイオマーカーを発見するためのデータ解析の効率化を図ることができた。

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の総タンパク質をトリプシン消化し、ナノ LC (DiNa)・LTQ・Orbitrap により解析した結果、2 万を超えるペプチドピークが認識され、千を超えるタンパク質が同定できた。今年度は、このうち hMSC の細胞表面特異的マーカーとされる 10 種類の CD 抗原由来のペプチドに注目し、安定同位体導入ペプチドを利用してこれらを同時に定量する方法を確立した。

他方、我々はこれまでに hMSC 遺伝的な安定性に関しても、CGH 等の解析により検討を行い、培養により hMSC の染色体変化が起きた事例を見出すとともに、その異常が細胞樹立の初期に起こっていたことを示した。最近になってヒト iPS 細胞においても、細胞株樹立初期においてゲノムが変化しやすいことが相次いで報告されたため、これらの報告の内容を我々の結果と合わせて再検討を行うとともに、今後期待される次世代シーケンサーによるゲノム解析および統合オミックス解析への応用に向けた基礎検討を行った。

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
ティルパ ッティ 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
元流動研究員

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 細胞を含めた細胞治療用の各種幹細胞の品質評価の観点から、LC-MS を用いたプロテオーム解析による検討を行ってきた。

近年の質量分析装置における技術革新により、タンパク発現のプロファイルを網羅的に解析するプロテオーム解析がより現実的のものとなってきている。そして、比較プロテオーム解析により、疾患や薬物治療

のバイオマーカー探索が可能となってきている。我々も、当所において共同利用型機器として使用可能な、最新型タンデム質量分析装置を有効活用し、ナノ LC との組み合わせによる高感度ショットガンプロテオーム解析系を確立してきた。この技術を利用して、細胞の培養過程におけるタンパク質発現の変化を網羅的に解析し、細胞の品質や安全性評価のためのバイオマーカーの検索を行うことが本研究の目的である。また、質量分析装置はすでに知られているタンパク質バイオマーカーの検出において、ELISA 法やフローサイトメーターを用いる既存の方法に替わりうる可能性を秘めており、特に検出に抗体を必要としない点、多重項目を同時に検出可能である点において期待がもたれている。昨年度の検討において検出された hMSC 特異的細胞膜抗原である複数の CD 分子種を、質量分析装置を用いて同時定量を行う試験系の確立を今年度の主な目的とした。

さらに、昨年度までに hMSC のゲノム安定性に関する検討を行い、一部異常を認められた細胞株に関する検討を行ってきたが、最近になって、iPS 細胞株における樹立時のゲノム不安定性に対する報告がなされたことより、我々の結果との比較において再検討を行う意味で、シーケンスレベルでの安定性に関する検討を加えることにした。最近では、次世代、次々世代シーケンサーの開発により、シーケンス解析のスループットは飛躍的に上昇しており、細胞のゲノム安定性の評価にも、直接全ゲノムシーケンスしたデータを取得することも現

実的に対応可能となってきた。こうした状況を踏まえ、次世代シーケンサーから得られるシーケンス情報の評価という観点も含めて、我々の見出した異常 hMSC 細胞株における遺伝子変化をシーケンスレベルで詳細に検討するため、次世代シーケンサーによる全エクソン配列解析にも着手することにした。

B. 研究方法

I. 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)

1.5X10⁵ 個の細胞を 50 μ l の細胞溶解液にて溶解した後、450 μ l のアセトンを加えてタンパク質を沈殿させ、30 μ l の RapiGest 溶液に溶解した。

(還元アルキル化)

タンパク溶液 30 μ l に、30 μ l の 10mM DDT を加え、60 $^{\circ}$ C 30 分間反応させて還元後、室温に戻した後、60 μ 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 μ l (0.25 μ g/ μ l) 加え、37 $^{\circ}$ C で一晩消化した。

2. ナノ LC

本研究にはナノ LC として、Splitless Nano HPLC System DiNa (KYA テクノロジー) を使用した。配管には内径 50 μ 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、昨年度の検討よりより高感度、高精度の測定が可能であった 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 社製および New Objective 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 1600V から 2400V 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。

(LTQ-Orbitrap)

- 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

LTQ-Orbitrap 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 Xcalibur を用いて解析し、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。

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、固定修飾としてシステインのカルバミドメチル化を、可変修飾として、メチオニンの酸化、

およびセリン、スレオニン、リジンのリン酸化を設定した。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。

6. Progenesis LC-MS ソフトウェアによる定量解析

ノンラベルによるサンプル間の各ペプチドピークの定量比較を行う目的で、Nonlinear Dynamics 社製、Progenesis LC-MS ソフトウェアを使用した。本ソフトウェアは、二次元電気泳動のゲルスポットの定量比較のために開発されたソフトウェアを基本とし、LC-MS 用に開発されたものである。LTQ-Orbitrap からの生データである Raw 形式のファイルを直接読み込むことができ、TPP と同様に 3D グラフ化が可能である。この画像化されたデータを元に、異なるサンプル間のリテンションタイムの補正を行うことにより、ペプチドスポットのマッチングを行い、複数のサンプル間の定量比較および、統計解析を行うことが可能である。また、MS/MS データを含む複数の Raw データを統合して MASCOT 検索を行う機能もあり、同定結果を取り込んで、タンパクレベルでの解析を行うこともできる。

II. 細胞の遺伝的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髓由来間葉系幹細胞株 (hMSC) のうち、以前の検討において、異常が認められたロット 4F1560 と同一ロットを使用した。h

MSC は、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、70-80%コンフルエントの状態に継代を続けた。細胞継代時に凍結保存しておいた細胞、およびそれを 1-2 世代再培養した細胞を使用した。

2. ゲノム DNA の抽出

次世代シーケンサー解析用のサンプル調整を行うため、以下の 2 種類の方法を用いてゲノム DNA の抽出を行った。

a. TRIZOL 法

TRIZOL 溶液 (Invitrogen) は主に RNA の抽出に用いられるが、タンパクおよびゲノム DNA も同時に分離抽出できる。これらを用いて同一細胞から、遺伝子発現 (RNA)、ゲノム情報 (DNA) およびプロテオーム (タンパク) に関して、統合的なオミックス解析を行うことが可能となる。以下の操作手順に従って、各細胞成分の抽出を行った。

(細胞の溶解)

凍結保存細胞 $1-2 \times 10^6$ 個を融解し、TRIZOL 試薬 1ml を加え混和した。

(RNA の抽出)

室温にて 5 分間放置し、クロロホルム 0.2ml を加えた。チューブに蓋をして、15 秒間激しく混合し、室温にて 3 分間放置した。その後、5°Cにて 15 分間、12,000g にて遠心分離した。この際、暗赤色のフェノール/クロロホルム層、中間層、および無色の上部水層に分離した。RNA を含む水層を新しいチューブに移し、イソプロピルアル

コール 0.5ml を加えて RNA を沈殿させた。サンプルを室温にて 10 分間放置した後、5°Cにて 10 分間、12,000g にて遠心分離した。

上清を除去し、RNA ペレットを 75%エタノール 1ml にて 1 回洗浄し、5°Cにて 15 分間、7500g にて遠心分離した。RNA ペレットを風乾後、RNase free 水に溶解した。(DNA の抽出)

上記の中間層の上に残っている水槽を完全に除去し、中間層およびフェノール/クロロホルム層に 100%エタノール 0.3ml を加え転倒混和し、室温で 3 分間放置した。室温にて 3 分間放置し、DNA を沈殿させ、5°Cにて 5 分間 2,000g にて遠心分離した。

タンパクを含むフェノール、エタノール含有の上層を新しいチューブに取り分け、10%エタノールに 0.1M クエン酸ナトリウムを加えた溶液 1ml で室温 30 分間インキュベートし、DNA ペレットを 2 回洗浄した。5°Cにて 5 分間、2,000g にて遠心分離し、沈殿を回収後、75%エタノール溶液 1.5ml に懸濁、室温 15 分放置、5°Cにて 5 分間、2,000g にて遠心分離した。上清を除いて風乾した後、8 mM NaOH 50 μ l に溶解した。

(タンパクの抽出)

上のフェノール、エタノール含有層に 1.5 ml のイソプロピルアルコールを加え、5°Cにて 10 分間、12,000g にて遠心分離し、タンパクを沈殿させた。上清を除去し、0.3M 塩酸グアニジンを含む 95%エタノール溶液 2ml を加え、室温にて 20 分間インキュベート、5°Cにて 10 分間、12,000g にて遠心分離の操作によりペレットを 3 回洗浄した。その後、ペ

レットにエタノール 2ml を加え、ボルテックスした後、室温で 20 分間放置し、5°C にて 5 分間、7,500g にて遠心分離した。ペレットを遠心濃縮機にて、10 分間真空乾燥し、1%SDS 溶液を加え、ピペティングにて溶解させた。

b. DNA Extractor WB キット

DNA Extractor WB キット (和光純薬工業) は、フェノールやクロロホルムといった有毒な有機溶媒を用いず、ヨウ化ナトリウムとイソプロパノールにて、細胞より DNA のみを抽出する簡便な方法である。また、核分離を行った後 DNA の抽出を行うため、比較的純度の高い DNA を得ることができる。以下の操作にしたがって、細胞よりゲノム DNA を抽出した。

(細胞の溶解と核分離)

- 1) 凍結保存細胞 $1\cdot 2 \times 10^6$ 個に溶解液を 0.5ml 加えて、チューブを数回転倒混和した。
- 2) 遠心分離 (10K×g, 4°C, 20 秒間) した後、上清を除いた。
- 3) 再び溶解液を 1ml 加えて、30 秒間激しく攪拌し、遠心分離 (10K×g, 4°C, 20 秒間) した後、上清を除いた。
- 4) ステップ 3) をもう一度繰り返した。

(核膜の破壊とタンパク変性)

8) イソプロパノールを 0.5ml 加えて、白い綿状の DNA が完全に見えてくるまで混合した。

9) 遠心分離 (10K×g, 室温, 10 分間) した後、上清をゆっくり除き、容器をろ紙の上に逆さに置き、器壁に残った溶液を十分に除いた。

10) 洗浄液 A を 1ml 加えて混合し、遠心分離 (10K×g, 室温, 5 分間) した後、上清を除いた。

11) 洗浄液 B を 1ml 加えて混合し、遠心分離 (10K×g, 室温, 5 分間) した後、上清を除いた。

12) DNA 沈殿を風乾し、TE バッファーに溶解させた。

3. 次世代シーケンサーを用いたシーケンス解析

解析すべきゲノム配列をある程度絞り込むために、ゲノム DNA をアコースティックソルビライザー (コバリス社) を用いて断片化した後、Agilent 社の SureSelect™ Human All Exon Kit V.2 を用いて、エクソン部分の DNA 配列を濃縮した。イルミナ社の次世代シーケンサー (Illumina Genome Analyzer IIx) を用いて、ペアエンド法により、断片化した DNA の両端のシーケンスを解析した。2 種類の細胞から得られたゲノム DNA にそれぞれ異なる配列のシーケンスタグを付加した後、1 ウェルに混合して解析することにより、シングルランで細胞あたり約 150bp を 1.5 億リード読んだ。得られたシーケンスデータを専用のソフトウェアにてヒトゲノム上にマッピングし、2 つの細胞間における変異配列の検出を行った。

なお、シーケンス解析に関しては、北海道システムサイエンス社に委託した。

C. 結果

I. 細胞のプロテオーム解析

1. hMSC 特異的 CD 分子種の検出と同定

昨年度までの検討により、本研究所において利用可能なタンデム型質量分析装置である Linear Iontrap-FT(Orbitrap) 型の LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher)を用いたプロテオーム解析の検討を行い、本装置が分解能だけでなく感度においても優れていることがわかり、ナノ LC とノ組み合わせによる高感度ショットガンプロテオーム解析の手法を確立した。

これを用いて、hMSC にて発現するタンパク質を網羅的に検索した結果、ペプチド数として 2 万以上のピークを検出でき、MS/MS 測定結果を用いた MASCOT データベース検索により、5000 個を超えるペプチドが同定でき、1000 個以上のタンパク質を検出することができた。これらの中には、hMSC 特異的膜抗原とされる 10 個の CD 分子種 (CD13, CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD107a, CD107b, CD166) 由来のペプチドが含まれていた (図 1)。複数のペプチドが同定された場合には、シグナル強度の強いものを選択し、定量分析を行うための指標とした。これらペプチドのアミノ酸配列を表 1 に示す。

2. 安定同位体ラベルペプチドの合成

得られた CD 分子種の指標となるペプチドを質量分析装置で同時定量するために、得られたペプチドの配列情報を元に、内部標準として添加するための安定同位体導入ペプチドを合成した。安定同位体は、ペプチドシーケンス中の 1 箇所のアミノ酸を ^{13}C および ^{15}N で標識し、元のペプチドと比較して 5-10 質量数の重いペプチド (Heavy peptide) を作成した。

3. 安定同位体ラベルペプチド混合物の LC-MS による分析

こうして合成したペプチドを一定量混合し、ラベル CDmix を作成した。この一部を取り、通常に分析を行う条件で LC-MS 分析を行った結果、図 2 に示す Elution profile が得られた。これは、オリジナルなペプチドの溶出位置とほぼ一致するとともに、マスにて測定された質量数も、安定同位体を含む理論値と一致した。

これらペプチドは、価数+2 価または+3 価のピークとして観察され、オリジナルのペプチドよりも m/z 値として 2.5-4 高質量側にシフトした位置に観察された。各ペプチドは当モル数混合したが、それぞれのピーク強度は必ずしも同じとはならなかった。

4. hMSC サンプルを用いた CD 分子種の定量

次に実サンプルを用いて、CD 分子種を低了するための条件検討を行った。hMSC より調製したタンパクのトリプシン消化物に

対して、作成した同位体ラベル CDmix を量を変えながら添加し、ピーク強度の比較を行い、43ng の細胞由来ペプチドに 0.8ng のラベル CDmix を添加した際に、図 3 に示すような良好な結果が得られた。

ここでは、CD44 の例を示したが、いずれの CD 種に対しても、安定同位体ラベルペプチドと同じリテンションタイムに、対応する非ラベルペプチドのピークが観察されたことから、Mascot 検索にて同定したペプチドが確かに目的とする CD 分子種由来であることが証明された。

次に、観察された多価ピークのうち最も強度の強いものを選び (2 価または 3 価)、Progenesis ソフトウェアによるピーク解析により、ペプチドピークのピーク面積を算出した (表 2、abundance)。

そして、サンプル中の非ラベルペプチドのピーク強度と、ラベル CDmix における対応するピークの強度との比の値から、サンプル中に含まれる各 CD 分子種の量を算出した。なお、ピークが小さく Progenesis にて自動認識できなかった CD71 と 90 に関しては、Xcalibur ソフトウェアにより算出される raw data でのピークの高さを指標とした。

こうして、hMSC サンプルに含まれる 10 種の CD 分子種の質量分析を用いた一斉定量が可能となった。この手法は、骨髄由来間葉系幹細胞のキャラクタリゼーションに有効であるとともに、同様の手法は ES 細胞や iPS 細胞など、他の幹細胞のキャラクタリゼーションにも有効であると考えられる。

今後は、CD 抗原以外にも間葉系幹細胞のキャラクタリゼーションに有用なタンパクマーカーの検索を行ない、細胞の品質評価へと応用したい。

さらに、より定量性の高い手法として期待される MRM (Multiple Reaction Monitoring) の手法を用いた、タンデム型質量分析装置による 定量分析法の確立をはかり、細胞の品質評価手法として普及を図りたい。

II. 細胞の遺伝的安定性に関する検討

我々は昨年までに検討において、hMSC の 1 ロット (4F1560) にゲノムコピー数異常を伴う染色体異常が起きていることを見出し、この異常が細胞購入時より微量に存在したことを証明した。この結果は、幹細胞の樹立時、もしくはドナーの体内にて異常細胞が生じたことを意味しており、注目される。骨髄からの間葉系幹細胞樹立時の染色体異常の発生に関しては、同様の報告が Johns Hopkins 大学の Wang ら (Cytotherapy. 7: 509-519, 2005) によっても報告されている。

同様の報告が、iPS 細胞に関して最近 Nature 誌に報告され、細胞樹立時のゲノム不安定性に関して警鐘がなされた。そこで、我々の hMSC でのデータの比較という意味でも、これらの論文のデータについて、ここで検証することにした。

1. iPS 細胞のゲノム不安定性に関する報告

(ゲノムコピー数変化)

Hussein SM, et al.,
Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency.
Nature. 471: 58-62. (2011)

体細胞のリプログラミングにより iPS 細胞を作成する際、ゲノムの性状がどの程度安定であり、元の細胞と同一であるかは重要な問題である。本論文ではコピー数多型 (CNV) という観点から、SNP アレイを用いたゲノムワイドな解析を行い、iPS 細胞の樹立および培養過程での変化を、ES 細胞や体細胞と比較している。その結果、培養初期の iPS 細胞では、培養中期の iPS 細胞や ES 細胞、繊維芽細胞などに比べて、多くの CNV を持つことがわかった。iPS 細胞においてはその樹立や初期培養の過程において新規の CNV が発生しやすく、多くの CNV がモザイクで存在する状態にあり、これらの多くは細胞の増殖に不利に働くため、さらに培養を続ける過程で消失していくが、その中で増殖に有利に働く変異が選択されてくると考えられる。

我々が hMSC で観察したゲノム異常も、最初は *de novo* に起きた変異であり、その存在量はわずかであったが、おそらく増殖に有利な変化であったため、培養環境下での選択圧により増加したという点で、まったく同じ経緯をたどったと考えられる。すなわち、幹細胞の樹立や、その後の培養過程自体が、増殖性を持つ細胞を選択する圧力として働き、ゲノム変化をもった細胞集団を拡大させる危険性を持つということの意味する。現状では、CNV の検出はゲノムワイドには個別の細胞で検出が難しいため、培養による選択圧を与えた後にチェックをする必要があると考えられる。

(DNA シークエンス変化)

Gore A, et al.,

Somatic coding mutations in human induced

pluripotent stem cells.

Nature. 471: 63-7. (2011)

iPS 細胞は、シーケンズレベルでどの程度の突然変異を蓄積しており、それが癌化等の異常として、治療用の細胞の性状に影響を与えるかは重要な課題である。近年の DNA シークエンサーの飛躍的な進歩に伴い、いわゆる次世代シーケンサーを使ってゲノムワイドに塩基配列を解析することが可能となってきた。そこで、本論文では、5つの異なる方法により樹立された 22 のヒト iPS 細胞株を用いて、コーディング領域の網羅的シーケンズ解析を行い、起源の細胞との比較を行った結果、全エクソンあたり平均 6 個の突然変異を検出した。これらは主にコードするタンパクの機能変化を伴うもので、注目すべきことに、それらに癌関連遺伝子が多く見られた。そして、これら遺伝子変異のうち少なくとも半数が、リプログラミング前の細胞にも存在することがわかり、前述の CNV のケースと同様、リプログラミングやその後の培養の過程が、わずかに存在した増殖性のこうした変異細胞を拡大させる作用を持ったと考えられる。こうした事実は、iPS 細胞由来の細胞を治療に用いた場合の癌化の危険性に十分注意が必要であることを示唆している。臨床応用において安全性を確保するためには、全ゲノム(エクソン)シーケンズを含めた詳細なゲノム解析が標準となるべきと主張している。

我々の観察した hMSC の場合には、癌関連遺伝子に異常があるかどうかまでは検討されていなかったが、本報告を受け、全エクソンのシーケンズ解析を行うことにした。CNV での結果を考えると、比較的安定とさ

れる体性幹細胞の場合においても、シーケンシング解析等によるゲノム安定性に関する詳細な解析が要求されるべきであると考えられる。

(エピジェネティック変化)

*Lister R, et al.,
Hotspots of aberrant epigenomic
reprogramming in human induced pluripotent
stem cells.*

Nature. 471: 68-73. (2011)

DNA メチル化の変化もゲノムの構造変化の一部として捉えられ、遺伝子発現に影響を与えるエピジェネティックな変化として、最近注目を浴びている、体細胞のリプログラミング自体もエピジェネティックな変化であり、ES 細胞と iPS 細胞では共通した DNA メチル化パターンを持つことが知られている。本論文では、この類似性に関して、ゲノムワイドに詳細な解析を行い、ES 細胞とは異なった iPS 細胞特有の DNA メチル化の変化について報告している。iPS 細胞に共通する ES 細胞とは異なるメチル化領域は、一般に低メチル化状態であり、リプログラミングが不完全とも考えられる。また iPS のメチル化異常の特徴として、CpG 配列以外でのメチル化の変化がセントロメアまたはテロメア近傍のまとまった領域に起きており、これらの部位では、ヒストンメチル化の変化も伴っている。こうした変化は、iPS 細胞を分化させた後の細胞においても記憶されている。

以上の結果より、iPS 細胞特異的なメチル化の異常が示され、メチル化状態の解析が、細胞の品質評価に有用であると考えられる。我々の hMSC の例ではメチル化の変化に

ついては検討を行っていなかったが、ごく最近の論文*で、同じ骨髄由来間葉系幹細胞を用いて、たった二つの癌抑制遺伝子 (HIC1、RassF1A) のプロモーターのメチル化が、細胞を形質転換したという驚くべき事実が報告された。今後、エピジェネティクスな変もゲノムの安定性を考える上で重要な要素となると考えられる。

** Teng IW, et al.,*

*Targeted methylation of two tumor suppressor
genes is sufficient to transform mesenchymal
stem cells into cancer stem/initiating cells.*

*Cancer Res. 2011 Apr 25. [Epub ahead of
print]*

2. 次世代シーケンサーを用いた変異解析

異常が認められた hMSC 株において、シーケンシングレベルでどの程度の変異がおきていたか、また、何が増殖性獲得の原因となったかを調べるため、培養初期と、培養後期の細胞での全エクソンの塩基配列を、次世代シーケンサーを用いて解析した。

使用した次世代シーケンサーは Illumina 社の Genome Analyzer IIx であり、1 ラン(1 レーン)あたり約 1.5Gbp のデータを取得できる。全エクソンをカバーするために、エクソン部分のみを Agilent 社の SureSelect™ Human All Exon Kit V.2 にてキャプチャーし、シーケンシング反応に用いた。このキットを用いることにより、エクソン由来の約 50Mbp を解析対象として絞り込むことができ、1 レーンで平均 30 の重複度でシーケンシング解析が可能となる。よって、2 サンプルを混ぜて測定した場合の、サンプルあたりの重複度は 15 となり、変異

によるヘテロコールを識別可能な数であるとと考えられる。

シーケンス結果について、残念ながら本報告書作成に間に合わなかったため、今後の継続する研究報告のなかで紹介させていただくこととする。

3. ゲノム DNA 抽出法に関する検討

次世代シーケンサー解析のためのゲノム DNA の調製のため、TRIZOL 法および DNA Extractor WB キットを用いて、サンプル調製を行った。TRIZOL 法では、DNA だけでなく、RNA、タンパクの抽出も同時に行えるため、まずこの方法を試した。2x10⁶ 個の hMSC (8 継代および 18 継代) 細胞を用い、RNA を抽出後、残った溶液から DNA とタンパク質を抽出した。得られた DNA 溶液の濃度をナンドロップ吸収光度計にて測定した結果、収量はそれぞれ、24.9 μ g および 10.6 μ g であった。OD 260/280 も約 1.8 と良好な値を示したが、電気泳動にて確認したところ、十分な量のバンドが確認できず、Qubit 蛍光度計による測定においても、解析において最小限必要とされる 3 μ g に満たなかった。DNA 量に差が見られた原因については不明であるが、DNA の分解、RNA の混入が考えられたため、より純粋に DNA のみを抽出する方法として DNA Extractor WB キットを用いた。9 継代および 20 継代の細胞 1.2x10⁶ 個より、それぞれ吸収光度測定により 25.3 μ g および 22.6 μ g の DNA が得られた。その結果、Qubit 蛍光度計によっても、6.9 μ g および 6.1 μ g と必要量が確保できたので、この DNA サンプルを次世代シーク

エンサーによる解析に供した。

DNA を使った解析には、より純度の高い方法として、核を単離して DNA のみを抽出する方法が適しているが、TRIZOL 法は、RNA とタンパク質も同時に抽出できるという点で優れている。細胞のより詳細な品質評価を目指して、CGH、メチル化、シーケンス解析等のゲノミクス解析、RNA を用いたトランスクリプトーム解析、タンパクを用いたプロテオーム解析を組み合わせた統合オミックス解析を行う上で、TRIZOL 法は魅力的であり、今後さらに検討を加えていきたい。

D. 考察

これまで検討を行ってきたプロテオーム解析に関しては、最新型タンデム質量分析装置の利用とデータ解析ソフト Progenesis の導入により、十分な量のペプチドシグナルの検出が可能となるとともに、ノンラベル法によるサンプル間の定量比較が可能となった。これにより、今後、細胞組織加工医薬品の品質評価に有用なバイオマーカーの開発につながると期待される。

今年度は、hMSC の品質評価の手法として、その表面マーカーとされる CD 分子種に注目し、これらを質量分析装置を用いて一斉に定量する方法を確立した。質量分析装置では、測定ごとのコンディションの差により、正確な定量が難しいとされるが、安定同位体ラベルした合成ペプチドを内部標準として添加することにより、それが可能となった。今後は、より正確な定量へ向け、希釈サンプルを用いた直線性の確認を

行うとともに、四重極型タンデム質量分析装置を用いたターゲット特異的選択イオンモニタリング (SRM) を組み合わせた MRM 法による定量法への応用を行いたい。MRM 法は、抗体を用いることなく、大量のタンパク質の同時定量を可能とする手法として注目されており、CD 分子種だけでなく、品質評価に有用なバイオマーカーとなるタンパク質を組み込むことにより、より信頼性の高い評価を行える試験系の確立が可能となる。

昨年度に得られた、継代により変化するバイオマーカー候補タンパク質群に関しては、さらなる検討を加えることができなかったが、得られた配列情報と MS/MS スペクトルデータから、SRM 法に必要となる特異的質量ピークの組み合わせを作成することが可能であり、今後 MRM 法により検討を加えて行きたい。

最近の iPS 細胞に関するゲノム不安定性の報告や、我々の hMSC での検討結果から、幹細胞株の樹立 (含リプログラミング) やその後の *in vitro* での細胞培養の過程が、わずかに存在する増殖性のゲノム変異を伴った細胞の選択圧として働く危険性が示唆された。また、iPS 細胞において観察された遺伝子変異が、癌関連遺伝子に多くに認められた点、および癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化が直接細胞を形質転換させるといった最近の報告を受け、癌化につながる変化としてのゲノム不安定性の評価の重要性が再認識された。理想的には、個々の細胞におけるゲノム安定性が評価できれば良いが、既存の手法ではそこまでの感度はなく、ポピュレーション全体の平均として評価をせざるを得ない。そこで、

増殖性の変化に着目し、一定期間培養を続けた後の細胞を使って評価するアプローチによりこの問題がある程度解決できるのではないかと考える。

さらに、ゲノムの安定性の評価指標としては、次世代シーケンサーの活用によるホールゲノム (前段階としてはエクソン) シーケンシングの活用が有効であると考え、遅ればせながら検討を開始した。今後活用できる基礎的データとなることを期待したい。DNA シーケンサーをめぐる近年の進展は目を見張るものがあり、次々世代シーケンサーでは、一分子による測定も可能となることから、細胞一個レベルでの解析にも期待がかかる。また、コストダウンも進んで、既に次世代シーケンサーもパーソナルユースな機器となってきており、全ゲノム解析が 1000 ドルでできる日も近づいている。そうすると、治療用の細胞の品質評価として、全ゲノムシーケンシングを標準的な試験として課することも現実的であると考えられる。

E. 結論

- ナノ LC-MS を用いた高感度分析により、間葉系幹細胞のハイスループットなプロテオーム解析が可能となり、今後再生医療の実現に向けた細胞の標準化および品質チェックへの応用が期待できる。
- 間葉系幹細胞に特徴的な表面 CD マーカーを網羅的に検出できた。
- 安定同位体ラベルをした合成ペプチドを内部標準として用いることにより、

10種のhMSC特異的CD分子種を、質量分析装置により同時に定量可能な試験系を確立できた。

- 細胞のゲノム安定性の解析手法として、次世代シーケンサーの活用が注目される。
- 各種幹細胞株の樹立とその後の培養過程は、わずかに存在する増殖性の変異を選択する危険性を秘めており、注意が必要である。

G. 健康危険情報

特になし

H. 研究発表

1. 論文発表

Yamaguchi T, Suzuki T, Arai H, Tanabe S, Atomi Y. Continuous mild heat stress induces differentiation of mammalian myoblasts, shifting fiber-type from fast to slow. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 298, C140-C148. (2010)

鈴木孝昌

日本の体外診断用医薬品の規制をめぐる動向～DNAチップを用いた遺伝子型判定装置に関する評価指標の策定
PHARMSTAGE 7月号1-2 (2010)

2. 学会発表

鈴木孝昌、押澤 正、スレッシュ ティルパッ

ティ、宮澤明史、辻 勉、鈴木和博
定量解析ソフトウェアを用いたノンラベル法による比較プロテオーム解析 -細胞・組織加工医薬品の品質評価へのアプローチ-
日本ヒトプロテオーム機構第8回大会 第6回日本臨床プロテオーム研究会連合大会 (2010.7) (浦安)

鈴木孝昌 降旗千恵

Proteome analysis for urinary biomarkers specific to genotoxic hepatocarcinogens
第69回日本癌学会学術総会大会 (2010.9) (大阪)

鈴木孝昌

バルカン腎症とアリストロキア酸とお菊虫
第46回全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11) (神戸)

鈴木孝昌, スレッシュ ティルパッティ, 押澤 正, 宮澤明史, 辻 勉, 内野 正, 五十嵐良明, 西村哲治, 鈴木和博
尿プロテオーム解析を用いた砒素の生体影響評価のためのバイオマーカー探索
日本環境変異原学会第39回大会 (2010.11) (つくば)

鈴木孝昌、押澤 正、スレッシュ ティルパッティ、田邊思帆里、宮澤明史*、辻 勉*、鈴木和博
質量分析装置を用いた間葉系幹細胞特異的CDマーカーの網羅的検出と定量
第10回日本再生医療学会総会 (2011.3) (新宿)

鈴木孝昌