

201132051A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業

再生医療製品の品質・安全性評価のための

新たな指標に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 和 博

平成 24 (2012) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

再生医療製品の品質・安全性評価のための
新たな指標に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 和 博

平成 24 (2012) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
再生医療製品の品質・安全性評価のための新たな指標に関する研究	1
鈴木 和博	
II. 分担研究報告書	
1. ヒト間葉系幹細胞における虚血応答性サイトカインの分泌に関与する因子 に関する検討	56
佐藤 陽治	
2. 幹細胞の <i>in vitro</i> 培養工程における遺伝子発現の動態解析による 品質評価技術の開発	83
澤田 留美	
3. 細胞組織加工医薬品の遺伝的安定性の評価方法に関する研究	99
鈴木 和博	
4. 再生医療製品のウイルス安全性評価	108
遊佐 敬介	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	116
IV. 研究成果の刊行物・別刷	120

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）

「再生医療製品の品質・安全性評価のための新たな指標に関する研究」

総括研究報告書

研究分担者：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

再生医療は、従来治療が困難だった重篤な疾患・障害を治療できる革新的な方法として注目されている。再生医療に使用することを目的に、生きた細胞を加工して製造される製品を細胞・組織加工製品（再生医療製品）と言い、その細胞ソースとしては、患者自身の細胞の他に、ES細胞や最近開発されたiPS細胞（人工多能性幹細胞）が有望視されている。細胞・組織加工製品は、臨床使用経験が少ないために知見の蓄積も乏しく、有効性・安全性の評価のための科学的合理性のある試験法や評価指標の整備が遅れている。本研究では、承認審査に役立つ指標作成に貢献することを目指し、臨床応用の研究・開発が活発に行われている体性幹細胞であるヒト間葉系幹細胞（hMSC）を中心に実験研究を展開し、以下のような結果を得た。①hMSCの虚血応答性サイトカイン（VEGF）分泌能を原材料・中間製品段階で予測するための指標（候補）を網羅的遺伝子発現解析により同定し、そのVEGF分泌機構への関与を検討した。②細胞のがん化の指標となり得る遺伝子を探索する目的でhMSCの遺伝子発現の*in vitro*培養時の変化およびhMSCがん化の陽性対照となり得るEwing肉腫由来細胞株の遺伝子発現を網羅的に解析し、Ewing肉腫由来細胞株の遺伝子発現パターンとhMSCとの類似性・相違性を検討した。③がん化に関連する細胞のゲノム安定性の評価指標探索の方法としての次世代シーケンサーの有用性を評価するため、hMSCの遺伝子突然変異の検出と蓄積を次世代シーケンサーを用いて評価した。④細胞・組織加工製品のウイルス安全性に関し、前立腺癌や慢性疲労症候群への関与が疑われていた新規MLV関連ウイルス（XMRV）について検討を進めていきながら、ウイルスの感染報告そのものが学界で否定されることになったため、XMRVのウイルス粒子をウイルス試験法に使われるモデルウイルスであるマウス白血病ウイルスの代替ウイルス様粒子としての利用を検討し、有用なウイルス様粒子の作製のためのいくつかの要件を明らかにした。これらの成果を更に展開することにより細胞・組織加工製品の有効性・安全性に関する品質評価に必要な指標が示され、迅速で適切な審査および再生医療の実用化推進に貢献できると考えられる。

研究分担者

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
澤田 留美	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第3室 室長
遊佐 敬介	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 ウイルス安全性研究室 室長

研究協力者

鈴木 孝昌	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第3室 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 第3室 主任研究官
安田 智	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第2室 主任研究官
河野 健	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 研究員
佐藤 光利	東邦大学薬学部 薬物安全性学教室 准教授
倉持 智美	東邦大学薬学部 薬物安全性学教室 学部6年

A. 研究目的

再生医療は、身体の一部の機能不全や欠損による重篤な疾患や障害を治療できる革新的な方法として注目されている。例えば、がん、心筋梗塞、重傷熱傷、神経疾患、脊髄損傷による運動障害など、有効な治療法が少ない病態について研究・開発され、細胞ソースとしては、患者自身の細胞、他人の細胞、ES細胞などが対象とされてきた。最近、iPS細胞（人工多能性幹細胞）が登場し、生命倫理的問題や免疫学的な拒絶をクリアできると考えられて、再生医療が社会的に大きな注目や期待を集める原因のひとつとなっている。さらには、大きな市場が見込める新たな産業の創出として捉えるグローバルな経済動向もある。しかし実際は、薬事承認を得て治療に成功している例は世界的にも少なく、我が国での承認例も重症熱傷用の自家培養皮膚一件のみである。

再生医療をめぐるのは、過熱気味の報道を背景に期待過剰の面がある。しかし臨床の現場では、その治療法が有効でかつ安全なものかが最も重要となるが、その評価方法は未確立の段階である。特にある種の生物製剤の使用や遺伝子治療のトライアルなどで、ウイルス感染や発がんなど深刻な有害事象が生じ得ることが明らかになり、事前に安全性について十分に評価・判定することが必須である。再生医療は、生きている細胞を治療に使うという革新的な分野だけに、未知・未経験の領域に踏み込んでいくことになるので、その評価・審査にはバイオサイエンスの進歩を踏まえた新たな指標が必要となる。

そこで本研究では、臨床応用の研究・開発が活発に行われている体性幹細胞であるヒト間葉系幹細胞を中心に以下の研究を実施した：

（1）原材料としてのヒト間葉系幹細胞を例に、有効性・安全性と関連する最終製品中の細胞の表現型を定量化し、その製造ロットの違いによ

る強度分布を得ると同時に、原材料の細胞（ヒト間葉系幹細胞）のトランスクリプトーム解析による網羅的遺伝子発現情報の取得を行い、製造ロット別の表現型を網羅的かつ定量的に取得することにより、「最終製品に含まれる細胞の表現型」と統計的に有意な相関のある「原材料／中間製品に含まれる細胞の表現型」、すなわち最終製品の品質・安全性に密接に関係すると考えられる、間葉系幹細胞の虚血応答性サイトカイン（VEGF）分泌能を、原材料／中間製品段階で予測するための指標（候補）の探索を試みた。

（2）ヒト間葉系幹細胞の *in vitro* 培養時の遺伝子発現変化を網羅的に解析し、Ewing 肉腫を陽性対照として比較検討することにより、がん化の指標となり得る候補遺伝子の抽出を試み、候補遺伝子の変動を解析した。

（3）細胞・組織加工製品の製造過程におけるウイルス安全性評価につながる簡便・高感度モニター可能なモデルウイルスの開発を目指し、ウイルス試験法にモデルウイルスとして使われるマウス白血病ウイルスの代替ウイルス様粒子として新規 MLV-関連ウイルス(XMRV, MLV-related virus) のウイルス粒子が使えるかどうかの検討を行った。

（4）ゲノム安定性の評価に関する次世代シーケンサーの有用性を検討する目的で、染色体異常を示す hMSC 細胞株における遺伝子変化をシーケンズレベルで詳細に検討した。

B. 研究方法

B-1 ヒト間葉系幹細胞における虚血応答性サイトカインの分泌に関与する因子に関する検討

B-1-1 低酸素条件下での hMSC の VEGF 分泌における VSR6, 7 遺伝子の影響

B-1-1-1 使用細胞

hMSC は Lonza 社より入手した。ロットご

との年齢, 性別, 人種は Table 1 の通りである.

B-1-1-2 RNAi による VSR 遺伝子の機能障害

hMSC (PS#8) を 6 穴細胞培養用マルチウェルプレートに 1×10^5 cell/well となるように播種し, 基本培地中で 37°C , $5\%\text{CO}_2$ の条件下で一時培養後, Lipofectamine RNAiMAX [Invitrogen] を用いて Stelth RNAi [Invitrogen] を導入し, VSR6, 7 遺伝子をノックダウンした.

1well あたりの添加量が 50nM となるように, Stelth RNAi を OPTI-MEM I Reduced Serum Medium [GIBCO, Invitrogen] で希釈し, Lipofectamine RNAiMAX を $4 \mu\text{L}$ /well となるように, 同様に OPTI-MEM I Reduced Serum Medium で希釈した. 希釈した Stelth RNAi 溶液と, Lipofectamine RNAiMAX 溶液を緩やかに 1:1 の容積比で混合し, 複合体を形成させるために室温で 10~15 分間インキュベートした.

hMSC を抗生物質不含の基本培地で洗浄し, 各 well に OPTI-MEM I Reduced Serum Medium を 2.5mL /well 加えた後, 混合した複合体溶液を $500 \mu\text{L}$ ずつ加えて 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 条件下で 4 時間インキュベートした. 4 時間後に培地を基本培地に交換し, さらに 20 時間(合計 24 時間) インキュベートした.

ここで用いた Stelth RNAi の配列を Table 2 に示す. Stelth RNAi のネガティブコントロールとして, Stelth RNAi Negative Universal Control Med GC#3 [Invitrogen] を用いた.

なお 3 ロット (A, C, H) について同様の実験を行った.

B-1-1-3 細胞培養

RNAi 開始 24 時間後の hMSC を $1 \times$

10^4 cell/well となるように 96 穴細胞培養プレート上に継代し, 基本培地中で 37°C , $5\%\text{CO}_2$ の条件下で 80%コンフルエントになるまで培養した. その後, 以下に示す通常条件または低酸素条件においてさらに 24 時間培養を行い, 細胞および培養上清を回収した.

通常条件 (コントロール群)

- インキュベータ: 通常酸素濃度 (37°C , $5\%\text{CO}_2$; MCO-175 [SANYO])
- 培地: 無血清, グルコース (+) 4.5g/dL DMEM [GIBCO, Invitrogen, cat# 11965] + 100 unit/mL ペニシリン G + $100 \mu\text{g/mL}$ 硫酸ストレプトマイシン [GIBCO, Invitrogen]

低酸素条件 (低酸素群)

- インキュベータ: 酸素濃度 = 1.0% (37°C , $\text{N}_2:\text{O}_2:\text{CO}_2 = 94.0\% : 1.0\% : 5.0\%$; MCO-175M [SANYO])
- 培地: 無血清, グルコース (+) 4.5g/dL DMEM [GIBCO, Invitrogen, cat# 11965] + 100 unit/mL ペニシリン G + $100 \mu\text{g/mL}$ 硫酸ストレプトマイシン [GIBCO, Invitrogen]

B-1-1-4 Total RNA の抽出

培養細胞からの Total RNA の抽出は, MagAttract RNA Cell Mini M48 Kit [QIAGEN], BioRobot M48 Workstation [QIAGEN] を使用し, QIAGEN 社のマニュアルに従って行った. RNA サンプル濃度は 260nm の吸光度を測定することで評価し, 260nm の吸光度と 280nm の吸光度の比が 1.6 以上であることを指標に純度を確認した. 吸光度測定は Nano Drop ND-1000 [Thermo] を用いて行った. 抽出した RNA サンプルは -80°C にて冷凍保存した.

B-1-1-5 ノックダウン効率の測定

RNAi を行った各遺伝子が、実際にノックダウンされているかどうか確認するために、各 VSR 遺伝子の mRNA 発現量を定量する目的で、ABI Prism 7000 [Applied Biosystems] を用いて定量的リアルタイム RT-PCR を行った。

B-1-1-4 において Total RNA を抽出した後、RNA 濃度が $1\text{ng}/\mu\text{L}$ となるよう希釈し、未知サンプルとした。

ノックダウンを行っていない hMSC を用いて同様に Total RNA を抽出し、RNA 濃度を測定後、スタンダードサンプルとして、検量線が成り立つ濃度となるように $10\text{ng}/\mu\text{L}$, $3.3\text{ng}/\mu\text{L}$, $1\text{ng}/\mu\text{L}$, $0.33\text{ng}/\mu\text{L}$, $0.1\text{ng}/\mu\text{L}$ の希釈系列を作成した。

各遺伝子の mRNA 発現量を補正するための内部標準としては EEF1A1 (Eukaryotic translation Elongation Factor 1 Alpha 1) の mRNA を用いた。定量的リアルタイム RT-PCR に内部標準として汎用される GAPDH mRNA は、低酸素条件下で発現量が大きく変動すると言われている。一方、EEF1A1 は hMSC において mRNA の安定性が高く、発現量の変動が少ないため内部標準として適している。

VSR 遺伝子の発現検出用には、TaqMan プローブとプライマーの混合液である TaqMan Gene Expression Assay [Applied Biosystems] を用いた。使用した TaqMan Gene Expression Assay は Table 3 に示す通りである。

mRNA の定量には、QuantiTect Probe RT-PCR Kit [QIAGEN] を使用し、試薬を次に示す順序および比率で混合して調整した (Table 4)。

調整した Mix Solution を $24\mu\text{L}$ ずつ 1.5mL

チューブ [Eppendorff] に分注し、RNA 濃度 $1\text{ng}/\mu\text{L}$ に希釈した未知サンプル、スタンダード用サンプルをそれぞれ $6\mu\text{L}$ ずつ混合した。また DPEC 処理済蒸留水 [Nacalai Tesque] を $6\mu\text{L}$ 混合したものを Non-template control として作成した。

以上のサンプルを、 $25\mu\text{L}/\text{well}$ となるよう Micro Optimal 96-well Reaction Plate [Applied Biosystems] に分注し、プレートを ABI PRISM Optical Adhesive Covers [Applied Biosystems] でシールした後、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System [Applied Biosystems] を用いて定量的 RT-PCR を行い、タイムコースをリアルタイムでモニターした。サーマルサイクラーの条件設定は Table 5 の通りである。

検出されたシグナルからベースラインを設定し、これらをもとに PCR 産物の増幅が指数関数的に起こる領域でシグナルの閾値を設定した。シグナルの閾値に到達するサイクル数 (Threshold Cycle : Ct 値) を縦軸に、初期の mRNA 量対数を横軸にプロットし、検量線を作成した。

未知サンプルについても Ct 値を求めることにより、検量線からサンプル中の目的 mRNA 量を算出した。得られた結果は EEF1A1 の mRNA 発現量を用いて補正し、各サンプルの補正値をネガティブコントロールの補正値と比較することで各遺伝子の発現量の変動を解析した。

B-1-1-6 VSR 遺伝子阻害後における VEGF 分泌量の測定

VEGF の分泌量は Quantikine ELISA Kit [R&D] を用いて、B-1-3 で回収した細胞上清中の VEGF 量を測定した。測定は、R&D 社のマニュアルに従って行った。使用した ELISA Kit は Human VEGF Immunoassay [R&D,

cat# DVE00] である.

B-1-1-7 統計解析

群間の差に対する統計学的検定は, 統計ソフトウェア Sigma Stat [SYSTAT Software] または Microsoft Excel [Microsoft] により行った.

mRNA ノックダウン効率測定データについては, 等分散性と正規性が仮定出来る場合には Student's t-test, 等分散性が仮定出来ないが正規性は仮定出来る場合には Welch's t-test, 正規性が仮定出来ない場合には Mann-Whitney test を用いた. 等分散性の検定には F 検定, 正規性の検定には Kolmogorov-Smirnov 検定を用いた.

VEGF の濃度データについては, two-way ANOVA を行った.

B-1-2 hMSC の VEGF 分泌における VSR6, 7 遺伝子の制御メカニズム

B-1-2-1 使用細胞および RNAi による VSR 遺伝子の機能障害

虚血応答性 VEGF 分泌における VSR6, 7 遺伝子の制御機構を検討するために, B-1-1 と同様の hMSC を使用し, B-1-2 と同様の手順で RNAi による VSR 遺伝子のノックダウンを行った.

なお 2 ロット (A および H) について同様の実験を行った.

B-1-2-2 細胞培養

RNAi 開始 24 時間後の hMSC を 1×10^4 cell/well となるように 96 穴細胞培養プレート上に継代し, 基本培地中で 37°C , $5\%\text{CO}_2$ の条件下で 80%コンフルエントになるまで培養した. その後, 以下に示す通常条件または擬似的虚血条件においてさらに 24 時間培養を行い, 細胞および培養上清を回収した.

通常条件 (コントロール群)

- インキュベータ: 通常酸素濃度 (37°C , $5\%\text{CO}_2$; MCO-175 [SANYO])
- 培地: 無血清, グルコース (+) 4.5g/dL DMEM [GIBCO, Invitrogen, cat# 11965] + 100 unit/mL ペニシリン G + $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 硫酸ストレプトマイシン [GIBCO, Invitrogen]

擬似的虚血条件 (虚血群)

- インキュベータ: 酸素濃度 = 1.0% (37°C , $\text{N}_2:\text{O}_2:\text{CO}_2 = 94.0\% : 1.0\% : 5.0\%$; MCO-175M [SANYO])
- 培地: 無血清, グルコース (-) DMEM [GIBCO, Invitrogen, cat# 11966] + 100 unit/mL ペニシリン G + $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 硫酸ストレプトマイシン [GIBCO, Invitrogen]

B-1-2-3 虚血後における HIF1 α 感受性遺伝子発現量の測定

虚血応答性 VEGF 分泌における VSR6, 7 遺伝子の制御に HIF の関与があるか検討するために, 6 種類の HIF1 α 感受性遺伝子の発現量を測定する目的で, ABI Prism 7000 [Applied Biosystems] を用いて B-1-5 と同様に, 定量的リアルタイム RT-PCR を行った.

なお, B-1-2 で回収した細胞を, B-1-4 と同様に Total RNA を抽出した後, RNA 濃度が $1\text{ng}/\mu\text{L}$ となるよう希釈し, 未知サンプルとした.

また, HIF1 α 感受性遺伝子の発現検出用には, TaqMan プローブとプライマーの混合液である TaqMan Gene Expression Assay [Applied Biosystems] を用いた. 測定した HIF1 α 感受性遺伝子と使用した TaqMan Gene Expression Assay を Table 6 に示す.

B-2 幹細胞の *in vitro* 培養工程における遺伝子発現の動態解析による品質評価技術の開発

B-2-1 細胞培養

1) ヒト間葉系幹細胞：hMSC (Lonza) は、Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を加えた培地で培養した。

2) Ewing 肉腫：Hs 822.T (ATCC) は Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM；Gibco) に 10%FBS (Intergen) を加えた培地で培養した。

3) Ewing 肉腫：Hs 863.T (ATCC) は Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM；Gibco) に 10%FBS (Intergen) を加えた培地で培養した。

4) Ewing 肉腫：RD-ES (ATCC) は RPMI-1640 Medium (Gibco) に 15%FBS (Intergen) を加えた培地で培養した。

5) Ewing 肉腫：SK-ES-1 (ATCC) は McCoy's 5a Medium Modified (Gibco) に 15%FBS (Intergen) を加えた培地で培養した。

用いた Ewing 肉腫の由来等の情報について、表 7 に示した。

B-2-2 Total RNA の調製

hMSC, Hs 822.T, Hs 863.T, RD-ES, SK-ES-1 から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を調製した。

B-2-3 DNA マイクロアレイ解析

それぞれの total RNA を用いて、Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array にて mRNA 発現を網羅的に測定した。さらに、得られたマイクロアレイデータから GeneSpring GX 11 (Agilent Technologies) を用いて統計学的、生物学的解析を行った。

B-2-4 Real time RT-PCR による mRNA 発現量の定量的解析

抽出した total RNA の cDNA への逆転写は SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) を用いて行った。そしてそれぞれの細胞の CCND2, IGF2BP1 の mRNA 発現レベルについて Real time-PCR 法にて検討した。PCR に使用したプライマーは、
CCND2 : Forward 5'-TACTTCAAGTGCGTGCAGAAGGAC-3',
Reverse 5'-TCCCACACTTCCAGTTGCGATCAT-3',
IGF2BP1 : Forward 5'-CAGAAGGGACAGAGTAACCAG-3', Reverse 5'-GAGATCAGGGTTCCTCACTG-3'である。
一方、ハウスキーピング遺伝子として GAPDH を用い、PCR 反応はライトサイクラー専用ヒト mRNA 定量プライマーセット (Search-LC) を用いて行った。PCR 反応は、Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) を用いて Roche Light Cycler (version 4.0)で行った。

B-3 細胞組織加工医薬品の遺伝的安定性の評価方法に関する研究

B-3-1 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 4 F1560 と同一ロットを使用した。hMSC 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。

B-3-2 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、DNA Extractor WB キット（和光純薬工業）を用いてDNA抽出を行った。本キットは、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 1-2x10⁶ 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℃, 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℃, 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）

5) 酵素反応液 200 μl とタンパク質分解酵素 10 μl（使用前に酵素 10mg を 0.6ml の滅菌蒸留水に溶解）を加えて混合した。

6) 37℃で 1 時間反応させた。（途中 2～3 回軽く振り混ぜた）

7) よう化ナトリウム溶液を 300 μl 加えて混合した。

（DNA の精製）

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。

B-3-3 次世代シーケンサーを用いたシーケンシス解析

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。

B-4 再生医療製品のウイルス安全性評価

B-4-1 細胞とウイルス DNA

293T細胞はDMEMに10%のウシ胎児血清を加え、培養に供した。pcDNA-XMRV-VP62はNIH AIDS Reagent Program から分与を受けた。

B-4-2 Gag-Pro-Pol の processing 阻害領域の決定

pcDNA3.1-XMRV VP62 を鋳型としてまずプライマーXP01 と XP02-TC を使い 184 bp

を増幅し、プライマーXP03 と XP04HA の増幅断片を加えたものを鋳型にして再度 XP01 と XP04HA を使って DNA 増幅を行い、2040-2820 の 780 bp を得た。一回めの DNA の増幅反応には、KOD Taq (Toyobo) を用い、2 回目の増幅には LA-Taq (Takara) を用いた。鋳型同士の相補端には p10 の 3' 末にある停止コドンがグルタミンに変わるように塩基を変えてある (TAG→CAG)。最終産物を 1 % アガロース電気泳動の後、pcDNA3.1/NT-GFP に連結し、pGFP-p10-p14-p80Δ1 とした。同様に pGFP-p10-p14-p80Δ2 (プライマー XP03, XP14HA), pGFP-p10-p14-p80Δ3 (プライマー XP03, XP16HA), pGFP-p10-p14-p80 (プライマー XP03, XP16HA), pGFP-p10-p14-p80-p46 (プライマー XP03, XP08HA) を作製した。使用したプライマーの塩基配列は以下のとおりである：

XP01, GCCACTGTAGTTATTGGTCAGA;
 XP02-TC,
 GGGGCTCCTGACCCTGACCTCCCTGGTC
 ACCTAAGGTCAGGAGGGAG; XP03,
 GGAGGTCAGGGTCAGGAGCCCC;
 XP04HA,
 TTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGT
 ACTGTATGTGGGGCTTGATCCCC; XP06,
 TTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGT
 AGAGGAGTGTAGAGGTTTCTAGA; XP08,
 TTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGT
 AGGGGGCCCCACGGGTTAATCTT;
 XP14HA,
 TTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGT
 AGTCTGGGCCCCAATTAAACAGAGT;
 XP16HA,
 TTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGT
 ACAAGATCTCGAGGCAGTCATGGGG.

293T 細胞を 2×10^5 を 12-well に播種し、翌日培養液を Opti-MEM に変えた後、

Lipofectamin 2000 を用いて、トランスフェクションを行い、2 日目に細胞を回収し、抗 GFP 抗体によりウェスタンブロットを行い、processing されていないタンパク質量を pcDNA/NT-GFP の GFP 量を 100% として求めた。またトランスフェクション効率の違いは、同時に pSV- β -galactosidase をコトランスフェクションして補正した。

(倫理面への配慮)

本研究において用いたヒト由来細胞は、提供者の同意を取り適切に細胞を採取していることが確認されている。このため国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規程にある倫理審査の対象品目ではなかった。

C. 研究結果

C-1 ヒト間葉系幹細胞における虚血応答性サイトカインの分泌に関与する因子に関する検討

C-1-1 低酸素条件下での hMSC の VEGF 分泌における VSR6, 7 遺伝子の影響

低酸素条件において VSR6, 7 遺伝子を発現抑制することにより、hMSC による VEGF 分泌にどのような影響があるか検討した。

まず RNAi により VSR6, 7 遺伝子が発現抑制されているかを確認するために、定量性リアルタイム RT-PCR でノックダウン効率を測定した。結果は VSR6 遺伝子においてはロット A が 26%, ロット C が 45%, ロット H が 37% であり、VSR7 遺伝子においてはロット A が 43%, ロット C が 48%, ロット H が 43% にまで発現が抑制された (Fig.5)。VSR6, 7 遺伝子双方において有意な発現抑制が見られた。

VSR6, 7 遺伝子発現抑制により、低酸素群の VEGF 分泌量にどのような変化が見られる

か検討した。

ロット A について測定した結果, VSR6 遺伝子の発現抑制後, 低酸素条件下においてネガティブコントロール群に比較して, VEGF 分泌の有意な増加が認められた。一方 VSR7 遺伝子の発現抑制後では, 低酸素条件下においてネガティブコントロール群に比較して, VEGF 分泌の有意な減少が認められた (Fig.6)。

さらに, このことがロット間に共通であるか確認するために, ロット C および H でも検討した。その結果, 両ロットで低酸素条件下において, ネガティブコントロール群に比較して, VSR6 遺伝子の発現抑制後は VEGF 分泌の有意な増加が認められ, VSR7 遺伝子の発現抑制後は VEGF 分泌の有意な減少が認められた (Fig. 7 および 8)。

C-1-2 hMSC の VEGF 分泌における VSR6, 7 遺伝子の制御メカニズム

hMSC の虚血応答性 VEGF 分泌に VSR6, 7 遺伝子がどのように関与しているか解明する目的で, VSR6, 7 遺伝子を発現抑制後, HIF1 α 感受性遺伝子発現量の変化を検討した。

まず VEGF 遺伝子では, ロット A のネガティブコントロール群を比較すると, これまで多くの報告にある通り, 通常条件に比べ, 虚血条件では VEGF 遺伝子の発現量が上昇した。VSR6 遺伝子を RNAi で発現抑制することにより, 虚血条件下での VEGF 遺伝子発現量は, ネガティブコントロールに比べ増加した。一方 VSR7 遺伝子を発現抑制すると, 虚血条件下での VEGF 遺伝子発現量は, ネガティブコントロールに比べ減少した (Fig.9)。同様の結果がロット H でも見られた (Fig.10)。

次に SERPINE 遺伝子の発現量を検討する。ロット A のネガティブコントロール群を比較すると, 通常条件に比べ, 虚血条件では SERPINE 遺伝子の発現量が上昇した。従って

SERPINE 遺伝子も虚血感受性を持つ遺伝子であることが示唆される。そして虚血条件においては, ネガティブコントロールに比べ, VSR6 遺伝子を発現抑制することにより, SERPINE 遺伝子発現量は増加した。一方 VSR7 遺伝子を発現抑制すると, 虚血条件下での SERPINE 遺伝子発現量は, ネガティブコントロールに比べ減少した (Fig.11)。同様の結果がロット H でも見られた (Fig.12)。

さらに PDGF β 遺伝子の発現量を検討する。同じくロット A のネガティブコントロール群を比較すると, 通常条件に比べ, 虚血条件では PDGF β 遺伝子発現量が上昇した。従って PDGF β 遺伝子も虚血に感受性を持つ遺伝子であることが示唆される。虚血条件においては, ネガティブコントロールに比べ, VSR6 遺伝子を発現抑制することにより, PDGF β 遺伝子発現量は増加し, 一方, VSR7 遺伝子を発現抑制すると, ネガティブコントロールに比べ, PDGF β 遺伝子発現量は減少した (Fig.13)。また, ロット H でも同様の結果が得られた (Fig.14)。

残る 3 種類の遺伝子 (ERO, TF, EDN1) については, ERO, TF はロット A, H 共に発現が見られなかったため, 除外した。EDN1 は, ネガティブコントロールを比較した際, 通常条件に比べ, 虚血条件で発現量の減少が見られた。従って少なくとも本研究の条件下では, hMSC においては虚血 (ないし HIF1 α) 感受性遺伝子とは言えないため除外した。

C-2 幹細胞の *in vitro* 培養工程における遺伝子発現の動態解析による品質評価技術の開発

Ewing 肉腫細胞 4 種類 (Hs822.T, Hs863.T, RD-ES, SK-ES-1) について遺伝子発現の網羅的解析を行い, 骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) との比較を行うことにより, 肉腫細胞に特異的な発現パターンについて検討した。hMSC 及び肉腫細胞の遺伝子の発現パターンについて,

GeneSpring GX 11 を用いて階層的クラスタリングを行ったところ, Hs822.T と Hs863.T, RD-ES と SK-ES-1 のそれぞれが類似した発現パターンを示し, さらに Hs822.T と Hs863.T については, 他の 2 種の肉腫細胞よりも hMSC の発現パターンにより類似している事が示された. (図 16)

次に, それぞれの肉腫細胞について hMSC と比較して 10 倍以上発現が変化した遺伝子を抽出した. Hs822.T において hMSC と比較して 10 倍以上発現が高かった遺伝子は 33 遺伝子あり, 発現比の高い順に表 8 に示した. 一方, 10 分の 1 以下であったものは 29 遺伝子あり, 発現比の低い順に表 9 に示した. また Hs863.T についても同様に抽出し, 10 倍以上発現が高かった遺伝子は 31 遺伝子 (表 10), 10 分の 1 以下であったものは 40 遺伝子 (表 11) であった. RD-ES については, 10 倍以上発現が高かった遺伝子は 110 遺伝子 (表 12), 10 分の 1 以下であったものは 429 遺伝子 (表 13) であった. そして SK-ES-1 については, 10 倍以上発現が高かった遺伝子は 99 遺伝子 (表 14), 10 分の 1 以下であったものは 401 遺伝子 (表 15) であった.

悪性度の高い乳がんの遺伝子発現パターンが ES 細胞の発現パターンに近いというがんの悪性度と未分化度の関連を示唆する報告⁴⁾もあることから, まずは hMSC に似た発現パターンの Hs822.T と Hs863.T に着目した. その両者とも hMSC よりも 10 倍以上発現が変化した遺伝子を探索したところ, 44 遺伝子が抽出された. (表 16) さらにその中で, RD-ES と SK-ES-1 でも 10 倍以上の変化が見られたものに絞り込むと, 9 遺伝子が抽出された. (表 17)

これらの遺伝子のうち, 悪性度を含めたがん化に関わることが報告されている遺伝子である CCND2^{5,6)}と IGF2BP1^{7,8)}に着目し, Real time-PCR にて mRNA 発現レベルを測定した. その結果, いずれの遺伝子も hMSC と比

較して肉腫細胞 4 種類の方が, はるかに発現レベルが高い事が確認された. (図 17)

C-3 細胞組織加工医薬品の遺伝的安定性の評価方法に関する研究

我々はこれまでに, hMSC の 1 ロット (4 F1560) 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.

異常が認められた hMSC 株において, シークエンス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 (9 継代) と, 培養後期 (20 継代) の細胞での全エクソンの塩基配列を, 次世代シークエンサーを用いて解析した.

使用した次世代シークエンサーは 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, シークエンス反応に用いた. 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 の重複度でシークエンス解析が可能となる. 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考えられる.

今回は得られたシークエンス結果について, 増殖性獲得の原因となる候補遺伝子の同定とあわせて報告する.

Illumina 社の Genome Analyzer IIx を用い, 1 ランに 2 サンプルを混合してシークエンス解析を行った結果, 生データとして得られたシークエンスデータ量は以下の通りであった.

hMSC	# 9	3.32 x 10 ⁹ bp
hMSC	#20	2.92 x 10 ⁹ bp

いずれの継代数の細胞においても、約 3 Gbp のシーケンスデータが得られ、当初予定していた十分量であったため、解析可能なデータ量であると判断できた。

次に、得られた断片的シーケンスデータをゲノム上にマッピングするため、公開されているヒトリファレンスゲノム Ref Seq hg19 を鋳型として、マッピングソフトウェア Bowtie を使ってマッピングを行った。その結果、以下に示すデータマップ率を得た。

hMSC #9 51.82 % (1.72 x 10⁹ bp)

hMSC #20 55.36 % (1.62 x 10⁹ bp)

マップ率は約半分強であり、解析可能データ量としては、想定していた 1.5Gbp を上回ることができた。

各細胞より得られたシーケンスデータとリファレンスシーケンスの異なる箇所が変異候補部位としてリストアップした。(表 18 にその一部を示す)

さらにデータの信頼度を考慮して、その絞込みのための条件として、データの重複度が少なくとも片方の細胞で 40 以上と設定した。この条件をクリアする変異候補箇所のうち、両細胞にて共通した変化は単純な多型と考えられるために除外した結果、変異候補サイトとして千箇所以上の部位が抽出された。しかし、その大部分は、SNP サイトの LOH で説明がつくものがほとんどであり、突然変異との区別がつかないため、それらを除外し、確実に変異と思われる箇所を表 19 に示す。

変異候補部位は全部で 12 箇所であり、このうち 1 番染色体上の 3 箇所は近接した部位にあった。

遺伝子のアノテーション情報が得られたものは 3 箇所であり、4 番染色体上の CF1(compliment factor-1), 12 番染色体上の PAWR (PRKC, apoptosis, WT1, regulator), C14orf2 (chromosome 14 open reading frame

2, 6.8 kDa mitochondrial proteolipid)であった。このうち、PAWR 遺伝子は、癌抑制遺伝子 WT-1 の発現を制御してアポトーシスの誘導因子として働く遺伝子であり、増殖性の獲得との関連性が注目される。

得られた変異候補部位に関して、生データのチェックを行うため、マッピングデータをフリーソフトウェア“Tablet”で可視化した結果を図 18 に示す。

変異部位周囲のシーケンスデータのリファレンスゲノムとの一致率は非常に高く、データの信頼性は高いことがわかった。PAWR 遺伝子の例を示したが、9 継代では A と T のヘテロコールであったが、それぞれ 37 コール、36 コールとほぼ同数であった。これに対し、20 継代の細胞では、75 全てのコールが C であり、変化が確認できた。

PAWR 遺伝子上の変異部位(80014907)は、exon3 上の 209 番目のアミノ酸イソロイシンにあたる部分で、ATT(A)から ATC への変化によりメチオニンにアミノ酸置換が起こっていた。

現在、検出された変異部位に関して、キャピラリーシーケンサーによる確認を行っている。

C-4 再生医療製品のウイルス安全性評価

C-4-1 XMRV の粒子形成

XMRV のウイルス RNA は、全長約 8.1 kb あり、2 つの ORF からなる。Gag は p15, p12, p30, p10 からなり、p10 の 3' 端の終止コドンが、読まれない場合は、Pro-Poly (p14, p80, p46) まで読み進められる(図 19)。もう一つの ORF はスプライシングを経て、Env の翻訳のための RNA となる。そこでウイルス様粒子形成のために、Gag, Gag-Pro-Pol を発現ベクターに組み込み、粒子形成をすればよい。安全性を高めるために、Env は独立した発現プラスミドで供

給する。またウイルス粒子のコピー数をモニターするために、p10 に GAL4 の DNA 結合ドメインを挿入し、ウイルス粒子内部にモニター用の DNA を人工的に取り込まれるようにする。しかもこうすると、理論的にはウイルス粒子あたり、2000 を超える短鎖 DNA が入ることになり(Gag の粒子内推定個数は 2000 分子を超える)、ウイルスコピー数の PCR による推定が極めて感度がよくなるものを考えられた(図 20)。また Pol には逆転写酵素(p80)とインテグラーゼ(p46)がコードされていて、粒子形成には直接関係しないものと考えられたので、p80 と p46 は粒子形成には必要がない。そこで p80 を 79 アミノ酸残基残して組み込んだ(図 21)。ところが p15-p12-p30-p10-p14 を発現ベクターに組み込み、粒子形成を調べたが、プロテアーゼ Pro(p14)による Gag ポリペプチドのプロセッシング(分解)が細胞内で起きてしまうため、効率のよい粒子形成は起きなかった(data not shown)。このことから、Pol 領域に細胞内でプロセッシングを抑制する領域があるのではないかと考えられた。そこで次にその領域を決定することにした。

C-4-2 細胞内におけるウイルスタンパク質の安定性の検討

レトロウイルスの粒子形成過程は、まず Gag ポリペプチドと Gag-Pro-Pol ポリペプチドが合成され、細胞膜に輸送されるところから始まると考えられている。ガンマレトロウイルスでは、Gag ポリペプチドは、Pro の直前にある終止コドン UAG で停止するが、全体の 5-10%はこれを終止コドンではなくグルタミンと認識し、そのまま Gag-Pro-Pol まで伸長する(translational read-through)。従って Gag ポリペプチドと Gag-Pro-Pol ポリペプチドの合成比は、Gag ポリペプチドが 90~95%に対し Gag-Pro-Pol ポリペプチドは 5~10%となる。Gag の N 末端はミリスチル化されるため、Gag も Gag-Pro-Pol は、内側の細胞膜にアンカ

ーされて出芽部位に集積すると考えられてる。ウイルス粒子形成は、小胞形成時に働く ESCRT 関連分子によって起きると考えられる。小胞形成前に Pro(プロテアーゼ)の活性化が起きると、ペプチドの切断が進み、ウイルス形成を行ったときにはすでにバラバラの状態になってしまうため、Pro の活性化は、Gag ポリペプチドと Gag-Pro-Pol のアッセンブリー(集積)、出芽まで抑制される必要がある。しかしその機構はよくわかっていない。ウイルス様粒子を作成する場合には、出芽後 processing が起きてコア形成が起きるように Pro を保持しなくてはならない。ところが、前述したように Gag-Pro にすると Pro の活性化が起きてしまい安定な粒子形成が阻害されることがわかったので、Pol をどこまで伸ばしたものウイルス粒子形成につかえばよいのかを検討する目的で GFP に p10-p14-p80-p46 を融合タンパク質の形でつなぎ、p80 以降のポリペプチドの長さを変えてその安定性を比較した(図 22)。すると p80 の N 末端から 79, 339 アミノ酸残基残したものでは、ポリペプチドの安定性が悪く、それ以降 C 末端方向に長く延びたものでは、比較的安定であることがわかった(図 23)。従って、p80 のアミノ酸残基 340~499 に Pro によるプロセッシングを細胞内で抑制する領域があることが示唆された。以上から Gag-Pro-Pol は、p80 の 499 番目のアミノ酸残基を残す必要があることがわかった。

D. 考察

D-1 ヒト間葉系幹細胞における虚血応答性サイトカインの分泌に関与する因子に関する検討

D-1-1 低酸素条件下での hMSC の VEGF 分泌における VSR6, 7 遺伝子の影響

今回着目した VSR6, 7 遺伝子は以下のことが報告されている。

- i) VSR6 [endoplasmic reticulum aminopeptidase 2] は、アミノペプチダーゼをコードする遺伝子であり、小

胞体内腔面分に可溶性タンパク質として存在することが報告されている。インターフェロンのγによって誘発されていることが知られており、小胞体において抗原性のペプチド生成過程に関与していることが示唆されている。

VSR6 と同じファミリーに属する他のアミノペプチダーゼに関して、血管内皮前駆細胞を VEGF で刺激した際に発現が上昇することや、発現低下時においては VEGF 刺激による血管新生が阻害されることなどが報告されており、VSR6 についても VEGF 分泌に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

- ii) VSR7 [family with sequence similarity 101, member B] の機能についてはほとんど知られていない。しかし最近、この遺伝子の産物であるレフィリン B (refilin B) がフィラミン A (filamin A) に結合して核周囲のアクチンネットワーク形成に関与し、核の形状を制御することが報告されている。また、レフィリン B (VSR7 遺伝子産物) が結合するとされるフィラミン A のタンパク質発現は、肺がん組織において VEGF のタンパク質発現量と正の相関を示すことが別の報告で明らかにされている。

通常酸素濃度に比べ、低酸素濃度で hMSC を培養すると、一般に VEGF の分泌量は増加することが知られている。今回の実験においても、それぞれの細胞で同様な結果が得られた。そして RNAi を用いて VSR6 遺伝子を発現抑制すると、低酸素刺激による VEGF 分泌の有意な増加が見られた。一方、VSR7 遺伝子を発現抑制すると、低酸素刺激による VEGF 分泌

の有意な減少が見られた。これらの結果は検証した 3 ロット全てで見られ、ロット間に共通することも確認された。VSR7 遺伝子に関しては、虚血条件下での VEGF 分泌の変化と同様の挙動を示した。従って、VSR7 遺伝子は虚血応答性 VEGF 分泌のみならず、低酸素応答性 VEGF 分泌にも関与していることが示唆される。さらに、虚血時と低酸素時で VSR7 遺伝子は同じ働きをしている可能性が高い。一方 VSR6 遺伝子については、低酸素応答性 VEGF にむしろ抑制的であることが示唆される。VSR6 遺伝子は、虚血条件下での VEGF 分泌の変化と逆の挙動を示し、虚血時と低酸素時には作用メカニズムが異なると考えられる。

そこで次に、hMSC の VEGF 分泌における VSR6, 7 遺伝子の制御メカニズムについて検討した。

D-1-2 hMSC の VEGF 分泌における VSR6, 7 遺伝子の制御メカニズム

HIF1 は細胞中で低酸素時に誘導される転写因子である。HIF1 α はその中の一つで、HIF1 β とヘテロ二量体を形成している。ヒトにおいては通常酸素状況下では、HIF1 α はプロリン 4 ヒドロキシダーゼによって、アミノ基末端側から 402 番目と 564 番目のプロリン残基がヒドロキシ化され、プロテアソーム分解される。つまり HIF1 α は通常酸素状況下でも産生されているが、速やかに分解されてしまうため、結果として発現量が少ない状態となる。一方、細胞が低酸素に陥るとプロテアソーム分解がされにくくなり、発現量が上昇する。上昇した HIF1 α は核内に移行し、HIF1 β と二量体を形成し、HIF1 結合配列 5'-(A/G)CGTG-3' を含む酸素応答性領域 (HRE : Hypoxia Responsive Element) に結合し、各種遺伝子の転写が促進される。

HIF1 α は直接あるいは間接的に様々な遺

伝子の制御を行っており、その数は全体の 2% に及ぶと言われている。今回使用した 6 つの遺伝子についても、この HIF1 α によって転写制御されている遺伝子であることが知られている。HIF1 α 感受性遺伝子の各々の性質は以下の通りである。

- i) VEGF [vascular endothelial growth factor] は、胚形成や骨格の成長における生理的血管新生の調節因子として、重要な役割を果たすことが知られている。また腫瘍、眼内血管新生性疾患などの病的血管新生にも関与し、薬の標的としても注目されている。
- ii) SERPINE [serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1] は、フィブリンを分解するプラスミンの生成に関係する組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) を阻害する働きがある。主に血管内皮細胞において産生され、血中へ分泌される。トロンビンやフィブリン塊、ヒスタミン、エンドトキシンに加え、インターロイキン-1、アンギオテンシン-II、血小板由来の成長因子などが、SERPINE の合成・分泌刺激因子であると報告されている。さらに、SERPINE 遺伝子の多型と冠動脈疾患の関連についても注目されている。
- iii) PDGF β [platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)] は、A 鎖および B 鎖のジスルフィド結合より成る二量体分子であり、血管新生や胚形成、癌細胞の成長や進行に欠かせないタンパク質である。4 種類のアイソフォームが存在し、間葉系細胞の遊走、増殖において重要な制

御因子となる。さらに、血管や繊維芽細胞では炎症、創傷治癒の過程において PDGF β の発現が上昇することが報告されている。また、アテローム性動脈硬化症や肺、腎の繊維増殖性疾患において PDGF やその受容体の過剰発現が確認され、密接な関係があると言われている。

- iv) EDN1 [endothelin 1] は、血管内皮細胞で合成、分泌される 21 残基ペプチドであり、強力な血管収縮作用を有することが知られている。また心筋虚血時に分泌が増強され、癌原遺伝子やプロテインキナーゼ活性の増強、心筋における変力性、肥大の誘導などにも影響を与えることが示唆されている。
- v) EPO [erythropoietin] は糖タンパク質ホルモンであり、また産生において、唯一虚血による制御を受ける造血性増殖因子である。骨髄において赤血球前駆細胞の生存、増殖、分化を通して赤血球細胞の産生を調節する役割を持つ。
- vi) TF [transferrin] は血漿中に含まれるタンパク質の一種で、生物に必須の微妙元素である鉄の輸送を行うことが知られている。鉄は、トランスフェリンと結合することで、細胞表面に発現しているトランスフェリン受容体からエンドサイトーシスにより細胞内に輸送される。

虚血条件下において、RNAi を用いて VSR7 遺伝子の発現抑制を行うと、ネガティブコントロールに比べ、SERPINE や PDGF β といった HIF1 α 感受性遺伝子発現量は減少した。また VEGF 遺伝子発現量も減少した。本研究の結果より、VSR7 遺伝子の発現抑制によって虚血応答性 VEGF 分泌、さらに低酸素応答性

VEGF 分泌が減少することが示されている。以上より、VSR7 遺伝子は、HIF の作用または発現を制御していると考えられる。つまり VSR7 遺伝子による VEGF (タンパク質) 分泌上昇のメカニズムは以下の通りであると予測できる。VSR7 遺伝子は、虚血および低酸素下において HIF の作用または発現を誘導し、それによって VEGF 遺伝子の転写が促進され、VEGF (タンパク質) 分泌が上昇する。また VSR7 遺伝子を発現抑制することで、HIF 誘導が抑制され、VEGF 遺伝子の発現も減少し、虚血および低酸素下での VEGF (タンパク質) 分泌量が減少したと考えられる (Fig. 15)。

虚血条件下において RNAi を用いて VSR6 遺伝子の発現抑制を行うと、ネガティブコントロールに比べ、SERPINE や PDGF β といった HIF1 α 感受性遺伝子発現量は増加した。また VEGF 遺伝子発現量も増加した。しかし緒言に記載したように、VSR6 遺伝子を発現抑制することで虚血条件下における VEGF 分泌量は減少し、VSR6 遺伝子は虚血応答性 VEGF 分泌を誘導することが示唆されている。これらの結果から、HIF 発現により VEGF 遺伝子の転写が誘導され、その後 VEGF (タンパク質) が合成、分泌されるまでの過程において、虚血時における VSR6 遺伝子の優位な作用点は、1)VEGF 遺伝子転写以降、すなわち VEGF (タンパク質) の合成、あるいはその後の放出までの段階と、2)HIF である可能性が高い。つまり、VSR6 遺伝子は 1)VEGF 遺伝子転写以降の過程に対しては、誘導する働きを持ち、2)HIF に対しては、抑制的に働くと考えられる。そのため VSR6 遺伝子を発現抑制すると、1)VSR6 遺伝子による VEGF 遺伝子転写以降の誘導が抑制され、VEGF (タンパク質) 分泌量が減少する。また 2)上流の VEGF 遺伝子発現については、VSR6 遺伝子による HIF 発現の抑制がなくなるため、HIF の発現が増加し、VEGF

遺伝子の発現が増加すると考えられる (Fig. 15)。

一方、低酸素時においては、本研究の結果より VSR6 遺伝子を発現抑制すると、VEGF 分泌量は増加することが示されている。従って、低酸素時の VSR6 遺伝子の働きは、HIF に対する抑制のみである可能性が高い。そのため VSR6 遺伝子を発現抑制すると、HIF 発現の抑制がなくなり、HIF の発現量が増加し、それに伴って VEGF (タンパク質) の分泌も増加すると考えられる (Fig. 15)。

D-2 幹細胞の *in vitro* 培養工程における遺伝子発現の動態解析による品質評価技術の開発

再生医療製品への応用が期待されている幹細胞の培養時の安全性として最も懸念されるがん化について、間葉系幹細胞の安全性を評価するための遺伝子レベルにおけるマーカーの検索を行った。近年その由来が間葉系幹細胞であろうと報告³⁾されている Ewing 肉腫を陽性対照として間葉系幹細胞と比較検討した。Ewing 肉腫とは、主として若年者の骨に発生する未分化で悪性度の高い腫瘍である。Ewing 肉腫症例の約 85%において、染色体転座 $t(11;22)(q24;q12)$ が認められる。この相互転座部位には 11 番染色体の FLI-1 遺伝子と 22 番染色体の EWS 遺伝子の融合遺伝子 EWS/FLI-1 が形成される。この融合遺伝子が Ewing 肉腫発生の原因であろうと考えられている。 $t(11;22)(q24;q12)$ 以外の染色体転座の症例もあり、 $t(21;22)(q22;q12)$ が Ewing 肉腫の 10-15%の症例で見られる。

本研究において、Ewing 肉腫細胞 4 種類 (Hs822.T, Hs863.T, RD-ES, SK-ES-1) について遺伝子発現の網羅的解析を行い、骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) との比較を行うことにより、肉腫細胞に特異的な発現パターンについて検討した。その結果、Hs822.T と Hs863.T, RD-ES と SK-ES-1 のそれぞれが類似した発現パターンを示し、さらに Hs822.T と Hs863.T

については、他の2種の肉腫細胞よりもhMSCの発現パターンにより類似している事がわかった。悪性度の高い乳がんの遺伝子発現パターンがES細胞の発現パターンに近いというがんの悪性度と未分化度の関連を示唆する報告⁴⁾もあることから、まずはhMSCにより近い遺伝子発現パターンを示したHs822.TとHs863.TのEwing肉腫に着目し、さらにRD-ESとSK-ES-1との共通性を探索する事で候補遺伝子の絞り込みを試みた。本研究は幹細胞の安全性と品質の確保に関する新規評価手法の開発のためのバイオマーカーを検索することが最終目的であるため、幹細胞と肉腫細胞との間での遺伝子発現の差がより大きいものを抽出することとし、両細胞間で10倍以上の遺伝子発現の変化があったものを抽出し候補遺伝子を絞り込んだ。hMSCに似た発現パターンのHs822.TとHs863.TともhMSCよりも10倍以上発現が変化した遺伝子を探索したところ、44遺伝子抽出され、さらにその中で、RD-ESとSK-ES-1でも10倍以上の変化が見られたものは9遺伝子であった。これらの遺伝子のうち、CCND2^{5,6)}とIGF2BP1^{7,8)}は悪性度を含めたがん化に関わる事が報告されている遺伝子であるため、間葉系幹細胞のがん化に関わる安全性を評価するためのマーカー遺伝子の候補となり得るのではないかと着目した。CCND2は細胞増殖などを制御するCell Cycleに関わる遺伝子の一つであり、IGF2BP1はmRNAの核外輸送、局在性、安定性、翻訳などに影響を与えるRNA結合因子で細胞増殖などに関わる。RT-PCRにより、両遺伝子ともそのmRNA発現レベルがhMSCと比較して肉腫細胞4種類の方が、はるかに高い事も確認した。

今後、CCND2とIGF2BP1が実際に幹細胞のがん化のマーカーとなり得るかの妥当性を確認するために、間葉系幹細胞に両遺伝子をそれぞれ過剰発現させ、幹細胞の増殖や形態等に影響を及ぼすのかを検討してく予定である。

D-3 細胞組織加工医薬品の遺伝的安定性の評価方法に関する研究

次世代シーケンサーは、そのスループットの飛躍的向上により、一般的なシーケンス解析にも応用が可能な段階に来ている。従来は、特定の遺伝子にターゲットを絞って変異の解析を行ってきたが、細胞組織利用医薬品の品質評価においては、どの遺伝子に異常が起こっているかを限定した評価ではなく、全遺伝子を対象とした評価が必要となるため、次世代胃シーケンサーによる全ゲノム解析の利用価値は高い。とはいえ、現状ではまだ全ゲノム解析を各細胞で行うには、手間とコストの面から難しいため、この効率化を図るために、遺伝子のエクソン領域に絞った解析を行った。

解析対象を、エクソンに限定することにより、解析対象を削減でき、かつ機能的に重要な変異をなるべくカバーできるという点において、効率的かつ実現可能な解析方法であるといえる。

今回の解析においては、シーケンスカバー率（重複率）40を信頼性の基準としたが、得られたマッピングデータを可視化してみると、その一致率は非常に高く、半分程度のカバー率であっても、十分信頼性のあるデータが取れそうなのことがわかった。今後、さらに信頼性評価のための基準の設定については検討を加えていきたい。

ヒトゲノムの場合においては、SNPの存在により、変異の解析が難しいことがわかった。直接比較したいサンプルどうしのシー区エンズ比較ができるとよかったのだが、断片化されたシーケンス情報をマッピングするという作業の必要上、いったん各サンプルをリファレンスゲノムを対象としてマッピングする必要があり、直接比較することができなかったため、解析がやや煩雑となった。今後は直接比較の可能性を含め、より効率的にデータ解析を行う手