

表7 解析に用いた Ewing 肉腫細胞について

	Hs 822.T	Hs 863.T	RD-ES	SK-ES-1
Organism	Homo sapiens (human)	Homo sapiens (human)	Homo sapiens (human)	Homo sapiens (human)
Morphology	epithelial	fibroblast	epithelial	epithelial
Source	bone	bone	bone	bone sarcoma
Disease	Ewing's sarcoma	Ewing's sarcoma	Ewing's sarcoma	(anaplastic osteosarcoma or Ewing's sarcoma)
Age	9y	5y	19y	18y
Gender	F	F	M	M
Ethnicity	Caucasian	Caucasian	Caucasian	Caucasian

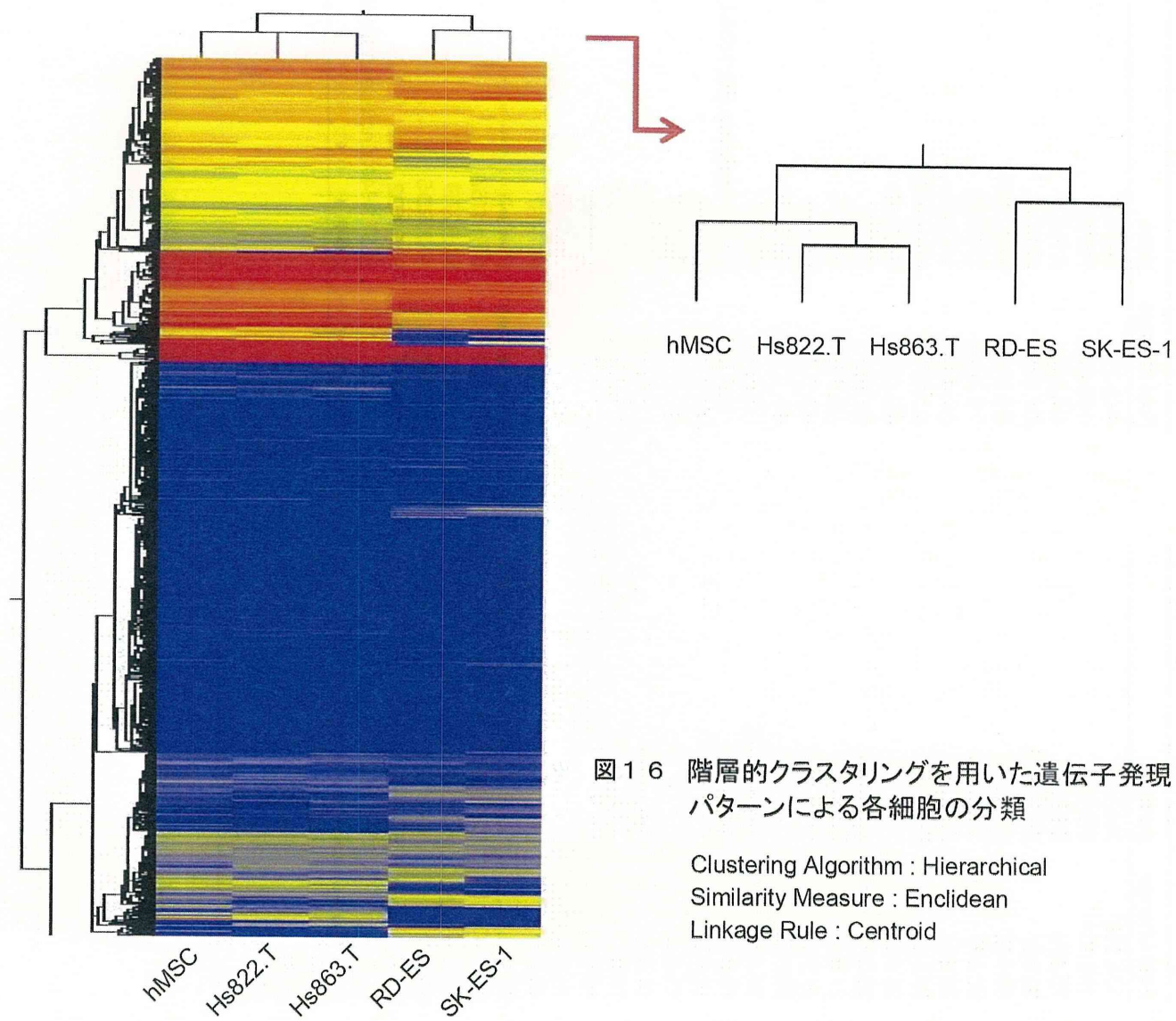


図16 階層的クラスタリングを用いた遺伝子発現パターンによる各細胞の分類

Clustering Algorithm : Hierarchical
 Similarity Measure : Euclidean
 Linkage Rule : Centroid

表 8 Hs822.TiにおいてhMSCと比較して発現
レベルが10倍以上であった遺伝子

Fold Change	gene
156.118	XIST
156.101	PTPRB
79.594	SSTR1
38.867	SLC24A3
38.078	CCND2
37.577	TMEFF2
28.372	ITGA9
28.201	DAZL
28.169	SFRP2
22.847	IGF2BP1
21.948	LGR5
21.722	CLEC2B
20.072	FAT3
17.155	LOC644192
16.004	KRT18
15.430	PCDH9
15.051	S100A4
14.957	EBF2
14.812	MYO1D
14.569	PCDH10
14.520	THEMIS
13.992	LOC286191
13.619	SGIP1
13.606	EPHA5
13.514	HDAC9
13.371	NR2F2
13.164	PTPRO
12.127	ANKRD37
12.048	PAPPA
11.485	HGD
11.431	IFIT2
11.101	PI16
10.366	COBLL1

表 9 Hs822.TiにおいてhMSCと比較して発現
レベルが1/10以下であった遺伝子

Fold Change	gene
-440.269	DDX3Y
-109.973	PENK
-94.550	S100B
-54.591	GPR37
-39.826	SEMA3A
-25.702	SHISA2
-24.490	STEAP4
-23.560	KIAA1644
-22.460	HAPLN1
-21.851	DLX6
-20.318	GTSE1
-19.482	MCAM
-19.146	KBTBD11
-18.992	FBLN1
-17.740	ORC1 (includes EG:18392)
-16.720	BEND5
-15.638	HOXB7
-14.106	SCARA3
-12.727	FBXO43
-12.428	HOXB3
-12.411	ASPHD1
-12.305	HOXB7
-11.613	HMCN1
-11.584	CYorf15A
-11.353	RAB27B
-10.727	ANKRD5
-10.437	PLCXD2
-10.156	HIST1H4A (includes others)
-10.102	IGF2

表 10 Hs863.TiにおいてhMSCと比較して発現
レベルが10倍以上であった遺伝子

Fold Change	gene
143.650	XIST
116.305	PTPRB
75.637	SLC24A3
57.297	HGD
56.218	LGR5
52.231	PTPRO
51.854	DAZL
45.390	KRT18
37.702	CCND2
30.118	SERPINB2
22.645	PCDH10
22.358	IGF2BP1
22.218	THEMIS
20.005	ANO3
19.465	MGP
17.145	EPHA5
17.093	EBF2
16.397	LOC644192
16.059	LOC100507421
14.920	MYO1D
14.840	SSTR1
14.699	LOC286191
14.504	PCDH9
14.393	CLEC2B
13.651	COBLL1
11.793	PDLIM3
11.763	SGIP1
11.744	NR2F2
11.582	IFIT2
11.344	LOXL2
10.463	TMEFF2

表 11 Hs863.TiにおいてhMSCと比較して発現
レベルが1/10以下であった遺伝子

Fold Change	gene
-693.859	DDX3Y
-202.646	NGEF
-197.845	KIAA1644
-143.480	S100B
-80.753	PENK
-47.589	C10orf93
-47.362	KRTAP1-3
-42.967	GPR37
-42.206	SEMA3A
-33.004	DLX6
-32.973	ASPHD1
-27.459	CD24
-24.363	FBLN1
-23.568	CLCN4
-22.246	SOX4
-22.110	ORC1 (includes EG:18392)
-19.837	KBTBD11
-18.837	STEAP4
-18.352	HMMR
-14.819	BEND5
-13.580	DLEU2
-13.478	IGF1
-13.056	MAFB
-12.768	GTSE1
-12.740	BAALC
-12.732	GNG2
-12.709	CENPA
-12.626	FOXQ1
-12.403	PTGDS
-12.357	SCARA3
-11.738	HAPLN1
-11.443	DLGAP5
-11.111	CCNA2
-10.732	PLCXD2
-10.692	CRIP1
-10.525	DDIT4L
-10.298	IGF2
-10.198	CASC5
-10.167	CHRD1
-10.122	MCM10 (includes EG:307126)
-10.111	SHISA2

表 12 RD-ESにおいてhMSCと比較して発現レベルが10倍以上であった遺伝子

Fold Change	gene	Fold Change	gene
723.318	SBK1	19.111	IGF2BP3
444.270	LMO3	18.849	FBXO15
378.243	CLCA1	18.705	TMPO
324.331	SLC24A3	18.696	SORD
299.377	CPXM1	18.058	MTL5
288.588	IGF2BP1	17.561	LRRC4C
240.303	PI15	17.279	AKAP7
164.669	KCNE3	16.650	MDK
147.131	XKR4	16.122	TSPAN13
132.741	PAX3	15.776	DENND2C
111.904	JAKMIP2	15.545	LOC283174
101.108	PROK2	15.171	PDS5B
86.034	FAT3	15.036	TMEM132B
84.145	EFNA1	14.913	MEX3A
75.912	LRRC10B	14.698	IQGAP2
73.150	EPHA4	13.731	CHRNA5
67.745	CCND2	13.652	RAB3IP
66.534	GCNT2	13.481	LOC644192
62.668	POU4F1	13.451	PDK3
62.244	ARPP21	13.380	ABHD3
53.994	LGR5	12.900	DGAT2
49.961	C9orf93	12.632	FZD3
45.890	KIAA1958	12.581	PLAG1
45.593	RGS16	12.576	STMN3
44.717	STRBP	12.449	STARD13
44.236	AIF1	12.448	KIAA0408
41.260	EPB41	12.217	LONRF1
35.714	FAM132B	12.072	SLC47A1
34.418	TMEFF2	12.003	F11R
34.111	HSD17B8	11.766	MYEF2
33.822	LOC100507421	11.717	CTSH
32.361	CBX2	11.562	CNTNAP2
31.399	SOX6	11.550	LRP4
30.966	CLDN1	11.543	CSRNP3
30.766	SYT1	11.447	TRHDE
29.708	PMAIP1	11.323	RAB38
28.243	OGDHL	11.320	RMND5A
28.218	PREX1	11.105	CDK5R1
27.622	MCF2L	11.092	CDS1
27.537	NEFH	11.066	FOXD3
27.302	BEND5	10.954	KL
27.088	DNAJC12	10.881	SLC35F2
25.901	SEPP1	10.825	CELSR2
25.576	DPYSL4	10.666	TMEM170B
25.286	CENPV	10.611	NAA38
25.008	FNDC5	10.593	QPRT
24.856	KIT	10.562	EZH2
24.696	PEG10	10.462	ETNK1
23.150	FAM60A	10.323	CADM1
22.884	GNA14	10.285	SALL2
22.406	SSTR1	10.257	CYFIP2
20.735	SEPT6	10.180	PRIM1
20.508	ATF5	10.121	WWOX
19.412	PDZD4	10.112	SKP2
19.405	ABHD6	10.074	TRPM4

表 13 RD-ES において hMSC と比較して発現レベルが 1/10 以下であった遺伝子

Fold Change	gene	Fold Change	gene	Fold Change	gene	Fold Change	gene	Fold Change	gene	Fold Change	gene
-9283.568	DDIT4L	-166.517	CXXC5	-64.578	PSG9	-35.445	RAB31	-23.759	ADAMTS1	-17.088	SH3D19
-6305.481	MFGE8	-159.337	VDR	-64.314	PCOLCE2 (includes EG:26577)	-35.381	NEDD9	-23.395	PLXNA2	-16.789	SERPINB1
-3705.679	LOXL1	-159.208	ATP10A	-63.808	DPYD	-35.336	STXBP5	-23.228	S100A6	-16.772	QPCT
-3147.853	BGN	-157.496	ANKH	-63.641	CHSY3	-34.967	C3orf64	-23.189	CA12	-16.617	DSE
-2335.618	IL13RA1	-152.966	THSD4	-63.490	WNT5B	-34.785	SPATS2L	-22.515	HECW2	-16.611	C14orf139
-1856.056	COL4A1	-149.160	CD109	-63.161	SYNC	-34.580	KITLG	-22.479	LOC375295	-16.546	MIR100HG
-1846.364	S100A10	-147.530	AHNAK	-62.666	HGF	-33.747	MME	-22.393	RPL22L1	-16.488	GPR176
-1303.179	BDNF	-147.266	VCAN	-60.008	CYBRD1	-33.689	FGF1	-22.146	MCC	-16.325	MAP1B
-1202.724	COL3A1	-146.961	SEMA5A	-59.434	STC2	-33.678	SEC24D	-22.025	SPARC	-16.284	RRAGA
-1187.056	COBL1	-146.499	ABI3BP	-59.188	COL1A1	-33.554	COL5A2	-21.993	PTGS2	-16.192	TCP11L1
-1175.490	CD59	-144.990	PION	-58.777	DUSP1	-33.050	OSBPL3	-21.824	LTBP1	-16.148	TPM4
-883.312	DCN	-143.122	RAB32	-57.963	PCSK5	-32.982	LIMCH1	-21.747	STEAP4	-16.112	SFTPF
-877.647	KRTAP1-3	-132.062	PLA2G4A	-57.798	SLC4A4	-32.652	LMNA	-21.667	AMOTL2	-16.083	AVP1
-860.255	CD44	-128.899	IGFBP7	-57.194	FGF2	-32.538	NEGR1	-21.626	SLC41A2	-15.893	TWIST2
-791.605	INPP1	-128.420	C9orf150	-56.833	ZFP38L2	-32.164	JAZF1	-21.614	TLE4	-15.838	SYNPO2
-789.307	PYGL	-128.067	ENG	-56.165	PCDH18	-31.986	ENTPD1	-21.589	NID2	-15.745	GXYLT2
-786.219	DOK5	-124.585	DPYSL3	-55.671	PAPSS2	-31.983	LOC100505881	-21.529	RCAN1	-15.697	MEIS4
-703.440	NOO1	-124.345	PDE1C	-55.585	EMILIN1	-31.816	PERP	-21.404	LAMP2	-15.689	LEPR
-695.265	ADAMTS2	-123.887	SORDL	-54.591	GRAMD3	-31.679	JAG1	-21.215	LOC100506941	-15.636	ARL4C
-627.948	EHD4	-117.842	FSTL1	-53.684	CEBPD	-31.574	SGK3	-21.030	TSHZ1	-15.524	BOC
-508.072	CDH6	-115.906	PTRF	-53.457	RBM3	-31.312	CAMK2D	-20.986	LOX	-15.517	TBC1D12
-578.876	PPIC	-113.741	MKX	-53.287	CD9	-31.203	KIAA1644	-20.969	HEG1	-15.411	SNTB1
-568.658	TAGLN2	-112.809	OAT	-52.989	GCNT1	-31.079	EDIL3	-20.967	RNASE4	-15.275	AKAP2/PALM2-AKAP2
-539.840	PPP1R3C	-110.813	PTN	-52.800	SRPX2	-31.008	UBE2E2	-20.910	AP0BEC3B	-15.263	PTGES
-534.258	CTHRC1	-108.870	RNLS	-52.370	CARD16	-30.966	LOC79015	-20.847	PTGES	-15.169	C10orf136
-530.097	LXN	-107.250	THBS2	-52.136	NRP2	-30.721	PLAUR	-20.838	ANX2P2	-15.127	ARPC1B
-468.417	ARHGAP22	-106.116	SAMD9	-50.911	FGF5	-30.565	SEMA3C	-20.826	ACTN1	-15.121	EP8R
-456.509	MICALL2	-105.690	LTBP2	-50.438	CALU	-30.321	TWIST1	-20.483	ACAN	-15.116	SEMA3A
-452.415	ITGAV	-105.386	FRMD6	-50.092	NNMT	-29.658	IL21R	-20.465	LOC284454	-15.047	HEY2
-448.751	FLJ32255	-104.984	S100A13	-49.171	LOC100507054	-29.156	MAMDC2	-20.214	SERPIN1	-14.901	PLAU
-435.990	ENC1	-103.483	SGMS2	-49.019	MRC2	-29.061	PRRX1	-19.990	SAMD9L	-14.845	RAI14
-387.394	LAMC1	-102.289	MAML2	-48.565	IL6	-28.779	SIGLEC15	-19.882	NCRNA00152	-14.757	SGMS1
-370.299	FBXO32	-96.753	PDLIM5	-48.508	NEXN	-28.595	COL5A1	-19.824	KRT19	-14.583	SOCS3
-362.418	CYR61	-95.773	FAM101B	-48.352	HMOX1	-28.477	LPP	-19.592	TM4SF1	-14.535	C10TNF5
-362.343	MT1E	-94.905	LOC100505584	-48.085	PHACTR2	-28.464	C1GALT1	-19.584	ANTXR2	-14.408	CCDC80
-349.267	GLIS3	-94.739	PLOD2	-47.790	KLF2	-28.387	MGP	-19.453	SLC2A10	-14.386	SRPX
-345.785	ICAM3	-94.061	GBE1	-47.742	MLPH	-28.376	TSPAN5	-19.387	ZNF503	-14.312	ITGA11
-341.924	CYP1B1	-92.307	CDKN1A	-47.491	WDR1	-28.205	GALNT10	-19.368	TAGLN	-14.310	CAST
-307.299	SDC1	-92.147	CTSK	-47.358	FHOD3	-27.970	FERMT2	-19.283	PTRF	-14.292	DEPTOR
-292.224	LHFPL2	-90.642	FN1	-47.052	SCUBE3	-27.927	LIMS2	-19.102	SLC1A1	-14.224	KLF9
-286.094	TOB1	-90.166	RHOB	-46.091	INHBA	-27.545	COL6A1	-18.931	SH3BP5	-14.180	SLC22A15
-264.828	RGMB	-88.945	HIC1	-44.588	CALD1	-27.354	EMB	-18.860	TRAM2	-14.103	SLC16A4
-255.266	PTX3	-87.780	SEPT11	-42.920	C9orf3	-27.112	NUAK1	-18.821	KANK1	-13.854	ELL2
-254.973	FAM20C	-87.448	S100A11	-42.885	HOXA5	-27.023	RCN3	-18.756	IGFBP3	-13.852	ITGB5
-253.311	mir-21	-87.299	TNFRSF12A	-42.439	SLIT2	-26.937	FAM114A1	-18.730	SERPINB8	-13.801	RPS27L
-247.594	MFAP5	-85.389	PLA2G16	-41.087	NRC3C1	-26.755	QSOX1	-18.620	MARCKS	-13.668	MT1X
-220.175	GLIPIR1	-83.611	PRSS23	-40.394	SULF1	-26.674	HAPLN1	-18.606	LGALS1	-13.573	ADCY7
-217.087	CTGF	-82.511	ADAMTS5	-40.351	DCBLD1	-26.577	GSN	-18.452	MGLL	-13.451	WIPF1
-216.617	PPAP2B	-82.269	SCIN	-40.241	BICC1	-26.308	GALNT1	-18.323	KAT2B	-13.355	SHOX2
-207.446	ANXA1	-82.130	IGFBP6	-40.205	FAM198B	-25.624	GOLIM4	-18.310	SYNM	-13.183	LOXL4
-206.736	LGALS3	-80.220	PRUNE2	-40.087	GBP1	-25.551	FOXQ1	-18.225	HTRA1	-13.073	NUCB2
-198.014	CD68	-78.855	CDKN2B	-39.889	LOC100131262	-25.522	RND3	-18.222	ITGA10	-12.833	WIP1
-197.590	KDELR3	-77.834	FKBP11	-38.851	PDE4D	-25.360	COL4A2	-18.096	TGFB2	-12.782	P4HA2
-197.326	GLS	-77.053	MMP2	-37.712	CTSL1	-25.305	SYNJ2	-17.812	ZMAT3	-12.774	BNC2
-193.687	IGFBP4	-76.866	TMEM9B	-37.476	GAS6	-24.956	DSP	-17.744	ADAMTS7	-12.703	PLCB4
-189.613	AMIGO2	-76.539	SNED1	-37.264	PALLD	-24.935	VGLL3	-17.617	ECM2	-12.694	SPOCK1
-187.309	TPM2	-72.661	MOXD1	-36.755	FBN1	-24.604	SCHIP1	-17.325	S100A16	-12.521	RFTN1
-180.043	DAB2	-70.483	IGFBP5	-36.713	AXL	-24.514	GNG12	-17.253	LPAR1	-12.407	NAP1L3
-170.269	FHL2	-69.170	EHD2	-36.285	CRIM1	-24.372	FAM20A	-17.131	CXCL12	-12.386	ARL4A
-169.538	PCOLCE	-68.946	FMN2	-36.254	MID1	-24.165	PEA15	-17.111	PHLDA1	-12.370	NFKBIZ
-168.067	SH3BP4	-67.904	LOC100288911	-36.162	FND3C3B	-23.836	SELENBP1	-17.084	NUPR1		
-167.966	TPM1 (includes EG:22003)	-65.232	NFASC	-35.795	TP53I3	-23.813	ARHGAP29	-17.071	ARMCX2		

表 14 SK-ES-1においてhMSCと比較して発現レベルが10倍以上であった遺伝子

Fold Change	gene	Fold Change	gene
833.906	LMO3	22.060	STOX2
592.833	SBK1	21.646	GCNT2
411.792	PROK2	20.972	HSD17B8
247.690	CCND2	18.881	SKP2
207.475	IGF2BP1	18.424	FAM60A
197.834	TMEFF2	18.145	LOC100505971
173.842	SLC24A3	17.522	SLC47A1
158.980	PI15	17.083	VASH2
140.781	JAKMIP2	16.554	KHDRBS3
140.638	POU4F1	16.225	TRHDE
120.980	EFNA1	16.002	CSRNP3
113.940	C9orf93	15.846	SALL2
110.882	XKR4	15.194	DPYSL4
103.265	FAT3	15.170	CLCA1
78.557	CLDN1	15.133	CYFIP2
77.120	KL	14.779	TMPO
73.372	AIF1	14.588	D4S234E
65.782	LRRC10B	13.739	PDS5B
64.846	KIAA1958	13.606	OPN3
61.865	KCNE3	13.246	PLAG1
57.113	SYT1	13.178	CELSR2
50.914	FOX D3	13.095	TAZ
50.651	DNAJC12	12.854	ARHGDIB
45.571	EPB41	12.544	RNF182
43.460	ARPP21	12.469	MEX3A
43.414	CBX2	12.453	UBE2CBP
40.728	IQGAP2	12.385	MTL5
39.858	LOC100507421	12.307	SSX4/SSX4B
39.705	PEG10	12.069	RFX3
37.772	NEFH	12.059	MBNL3
37.462	RGS16	11.872	RAB39B
35.580	CNTNAP2	11.808	EZH2
32.427	ROBO2	11.626	CDS1
31.118	EPHA4	11.296	MDK
30.658	FNDC5	11.174	SORD
29.127	OGDHL	11.105	MYEF2
28.783	SSTR1	10.937	LOC100132999 (includes others)
27.512	KIT	10.790	WWOX
27.074	PDZD4	10.771	EXO1
27.043	CENPV	10.652	SYNE2
26.690	BEND5	10.583	CENPH
26.590	PAX3	10.583	LOC100510742/OCLN
26.559	F11R	10.377	QPRT
26.554	IGF2BP3	10.346	PCDHA6
25.544	CLEC2B	10.340	MARCKSL1
25.497	KIAA0408	10.250	FNBP1
25.345	STRBP	10.190	NAA38
22.875	RAB3IP	10.153	STEAP2
22.526	SOX6	10.109	LONRF1
22.379	FAM132B		

表 15 SK-ES-1 において hMSC と比較して発現レベルが 1/10 以下であった遺伝子

Fold Change	gene	Fold Change	gene	Fold Change	gene	Fold Change	gene	Fold Change	gene	Fold Change	gene	Fold Change	gene
-11663.061	CXCL12	-122.639	LOXL4	-49.562	FHOD3	-32.226	MT1H	-21.568	RNF150	-15.075	PTGDS	-11.522	HPCAL1
-3814.166	IGFBP7	-120.863	FLJ32255	-49.109	SCIN	-31.798	CYR61	-21.456	SRPX2	-15.054	S100A6	-11.487	STAT1
-2845.778	TAGLN	-119.326	GLIPR1	-49.001	SERPINE2	-31.695	ADAMTS7	-21.355	RGS4	-15.000	IGFBP5	-11.472	MLPH
-2328.537	ADAMTS2	-117.628	PLA2G16	-48.101	PCOLCE2 (includes EG:26577)	-30.650	TWIST2	-21.021	PRRX1	-14.926	HEG1	-11.397	BACE1
-2173.698	MFAP5	-110.084	HAPLN1	-47.337	RND3	-30.425	DSE	-20.915	LRRN3	-14.883	FGF5	-11.382	NPR2
-1945.834	SPOCK1	-106.134	MSRB3	-47.124	NID2	-30.168	PERP	-20.688	METRNL	-14.863	CCDC165	-11.358	VAT1
-1941.181	HTRA1	-106.013	TNFRSF12A	-47.055	IGFBP4	-29.917	CALD1	-20.641	ITGA10	-14.800	LEPREL4	-11.356	PARVB
-1593.733	SLC2A10	-105.269	SDSL	-46.083	PALLD	-29.816	TIMP3	-20.445	MMP2	-14.769	FERMT2	-11.299	SELM
-1101.269	GAS6	-104.167	MT1E	-45.817	ENC1	-29.525	COL16A1	-20.343	VDR	-14.735	RRBP1	-11.283	FADS3
-1091.994	CD44	-100.195	HGF	-45.791	NINJ2	-29.336	PLCB4	-20.327	AMY1A (includes others)	-14.614	RAI14	-11.277	LMNA
-1004.499	CHSY3	-97.134	ABI3BP	-45.530	THEM4	-29.031	NQO1	-20.317	LOC100507054	-14.493	FAM98A	-11.250	CYB561
-906.588	MAN1A1	-96.814	PRUNE2	-45.517	GBE1	-28.983	2DHHC2	-19.987	ZFP36L2	-14.454	APLP2	-11.103	SOC53
-827.044	KRT19	-94.284	FLG	-45.445	LHFPL2	-28.811	ADSSL1	-19.934	CA12	-14.340	FGF2	-11.085	EFCAB4B
-705.132	BDNF	-93.278	ZNF469	-45.155	KDEL3	-28.799	SAMD9L	-19.864	C1QTNF5	-14.213	DDX60	-11.070	NCRNA00152
-656.917	COL6A1	-89.916	mir-21	-44.806	NFKBIZ	-28.743	DAB2	-19.681	CYP4V2	-14.031	MIR100HG	-11.020	KLF2
-566.423	MT1M	-89.844	TPM1 (includes EG:22003)	-44.631	RAB27B	-28.325	CD55	-19.656	KCTD15	-13.895	SYNM	-11.005	LTBP1
-546.042	THBS2	-87.948	C9orf150	-44.076	IGFBP6	-28.109	MT1X	-19.298	FNDCC3B	-13.861	SMAD7	-11.004	ACTN1
-527.072	PTX3	-87.264	LOC100505584	-43.930	QPCT	-27.895	SELENBP1	-19.270	E1F3F	-13.807	GM2A	-11.001	CRYBG3
-486.501	CTHRC1	-86.923	PION	-43.865	MEIS4	-27.890	LOXL2	-19.117	OAT	-13.752	CSF1	-10.970	LRP10
-474.074	IGFBP3	-86.830	ATP10A	-43.851	STC2	-27.715	MT2A	-19.091	BAALC	-13.728	NPEPL1	-10.981	DCBLD1
-452.245	ITGA11	-85.328	PHACTR2	-43.635	FRMD6	-27.397	TFPI2	-19.025	AKAP2/PALM2-AKAP2	-13.720	RCAN1	-10.915	SLC16A4
-442.273	EHD2	-83.094	IL4R	-43.557	LOC375295	-27.302	SIGLEC15	-18.901	C3orf64	-13.689	RACLN3	-10.904	ECHDC2
-424.544	PPIC	-80.719	BICC1	-43.557	MAML2	-27.037	LOC100505881	-18.715	GADD45B	-13.587	AVP1	-10.862	SYNJ2
-417.053	KRTAP1-3	-79.214	RFTN1	-43.516	MAMDC2	-26.909	B4GALT1	-18.346	FAIM	-13.509	SH3BP4	-10.839	RAB3B
-412.034	TM4SF1	-78.351	FGF1	-43.350	LOXL1	-26.869	NRP2	-18.343	VGLL3	-13.501	SH3BP5	-10.814	PSG9
-411.340	ARHGAP22	-77.944	SNAI2	-42.031	SLC25A43	-26.846	TGFBR2	-18.124	EHD4	-13.265	CD24	-10.801	ANXA1
-393.497	WNT5B	-77.526	PHLDA1	-41.362	ACTA2	-26.618	TMEM90B	-18.119	TNS3	-13.180	MFGE8	-10.624	CD248
-350.049	INHBA	-77.400	FBLN5	-40.865	S100A16	-26.416	P4HA2	-18.039	SIMS2	-12.946	SEPT11	-10.569	RHBDF1
-348.983	FKBP10	-73.885	OLFML1	-40.461	PRNP	-26.375	S100A11	-17.654	FAM198B	-12.896	PCDH18	-10.540	AHNAK
-327.683	LGALS3	-71.429	AKR1C3	-39.858	CCDC80	-26.375	SH3D19	-17.604	ADM	-12.853	CLMP	-10.484	ACSL1
-326.966	LTBP2	-71.183	AKR1C1/AKR1C2	-39.850	CDKN2B	-26.161	NUDT16	-17.502	LXN	-12.784	QKI	-10.278	NMT2
-325.100	SCUBE3	-71.068	TNFRSF11B	-38.924	SULF2	-26.093	MT1P2	-17.033	BHLHE41	-12.754	KAZALD1	-10.213	ITGB1
-323.312	SERPINB1	-70.576	MICALL2	-38.654	NEXN	-25.739	IL6	-16.981	LAPTM5	-12.751	ZNF503	-10.201	AGMAT
-303.662	FBLN5	-68.302	PTRF	-38.436	LAMC1	-25.601	MID1	-16.980	FAT1	-12.727	COL3A1	-10.174	CDH6
-277.564	PSMB9	-68.214	ACAN	-38.034	CAMK2D	-25.579	RHOB	-16.810	SERPINI1	-12.706	GALNT10	-10.174	HEY2
-264.392	FAM20A	-66.675	CYP11B1	-37.783	CXXC5	-25.565	TP53I3	-16.732	DRAM1	-12.704	TLR4	-10.164	PDLIM1
-263.011	VCAN	-65.758	SEMA5A	-37.500	RNLS	-25.240	CD59	-16.725	OPTN	-12.693	TMEM200A	-10.142	SNTB1
-250.016	NFASC	-65.659	ITGA3	-37.438	PLAGL1	-24.893	HECW2	-16.604	COL5A2	-12.669	GLS	-10.090	MGP
-233.777	NNMT	-65.273	WIP1	-37.124	GALNT1	-24.866	NAP1L3	-16.481	COL4A1	-12.578	CACNA1A	-10.090	SHISA2
-204.928	LOX	-65.184	TOX	-36.175	FAM114A1	-24.693	PRKD1	-16.458	CD9	-12.577	LARP6	-10.076	VASN
-204.540	C10orf136	-65.146	NEDD9	-35.781	PDE1C	-24.589	SORDL	-16.410	GNG12	-12.534	RAGE	-10.065	CTSK
-199.920	GLIS3	-64.714	ADAMTS1	-35.629	SFTPF	-24.551	DNAJC3	-16.277	C10orf54	-12.493	PLXNA2		
-199.888	KCTD12	-64.646	DCN	-35.618	EMILIN1	-24.536	ATP1B1	-16.184	ERAP2	-12.330	PCGF5		
-198.523	FBN1	-63.894	GCNT1	-35.465	HOKA9	-24.233	CRIM1	-16.088	CTS8	-12.280	HSPG2		
-189.472	PPAP2B	-62.861	KCNK1	-35.264	COL5A1	-24.050	S100A10	-16.083	PCOLCE	-12.157	CD151		
-188.716	PRSS23	-60.436	POPCDC3	-35.031	DPYD	-24.002	SYNPO2	-16.047	NME5	-12.154	STK17A		
-183.360	CTGF	-58.436	SULF1	-34.920	IL13RA1	-23.870	TNFAIP3	-16.002	TRAM2	-12.146	GRAMD3		
-180.775	ELL2	-57.799	CEBPD	-34.859	MOXD1	-23.842	FSTL1	-15.965	LOC100505501	-12.079	PARVA		
-180.402	FN1	-57.457	BHMT2	-34.752	RAB32	-23.627	CDK15	-15.746	HMOX1	-12.058	ECM1		
-178.242	ANKH	-56.655	HIC1	-34.433	AMIGO2	-23.350	PLAU	-15.697	MAP1B	-12.046	CCPG1		
-176.721	NEAT1	-56.143	SNED1	-34.188	ZC3HAV1	-23.217	NBL1	-15.672	TPM4	-12.011	TLL3		
-175.607	CDC42EP3	-55.779	RUNX2	-33.864	COTL1	-23.003	TJP1	-15.658	ARHGAP29	-12.001	ITPR1P12		
-173.107	COL1A1	-55.529	CDKN1A	-33.713	CDO1	-22.986	AXL	-15.654	B4GALT6	-11.912	CD68		
-159.382	FGL2	-54.666	MYLK	-33.603	ADAMTS5	-22.940	C1GALT1	-15.451	IFTM2	-11.803	C9orf64		
-157.250	NUPR1	-54.401	FHL2	-33.597	PAPSS2	-22.660	MGLL	-15.447	IL6ST	-11.754	MAF		
-151.762	SAMD9	-54.175	HMGAA2	-33.361	NQO1	-22.494	KITLG	-15.418	SDC2	-11.710	SGMS1		
-144.779	LOC100506941	-51.903	C9orf95	-33.238	FOXQ1	-22.379	C9orf3	-15.387	SEMA3C	-11.690	MT1G		
-144.583	DSP	-50.460	SRPX	-33.153	STEAP4	-22.253	SRXN1	-15.370	SLFN5	-11.606	QSX1		
-137.568	MME	-50.118	MXK	-33.041	SLC16A3	-21.813	SYNC	-15.248	FAM20C	-11.589	ID1		
-125.887	PPP1R3C	-49.991	APOBEC3B	-32.783	SPARC	-21.769	PTGS2	-15.241	NR3C1	-11.524	PEA15		

表 16 Hs822.T及びHs863.T.ともにhMSCと比較して発現レベルが10倍以上変化した遺伝子

	Hs822.T	Hs863.T
ASPHD1	-12.411	-32.973
BEND5	-16.720	-14.819
CCND2	38.078	37.702
CLEC2B	21.722	14.393
COBLL1	10.366	13.651
DAZL	28.201	51.854
DOX3Y	-440.269	-693.859
DLX6	-21.851	-33.004
EBF2	14.957	17.093
EPHA5	13.606	17.145
FBLN1	-18.992	-24.363
GPR37	-54.591	-42.967
GTSE1	-20.318	-12.768
HAPLN1	-22.460	-11.738
HGD	11.485	57.297
IFIT2	11.431	11.582
IGF2	-10.102	-10.298
IGF2BP1	22.847	22.358
KBTBD11	-19.146	-19.837
KIAA1644	-23.560	-197.845
KRT18	16.004	45.390
LGR5	21.948	56.218
LOC286191	13.992	14.699
LOC644192	17.155	16.397
MYO1D	14.812	14.920
NR2F2	13.371	11.744
ORC1 (includes EG:18392)	-17.740	-22.110
PCDH10	14.569	22.645
PCDH9	15.430	14.504
PENK	-109.973	-80.753
PLCXD2	-10.437	-10.732
PTPRB	156.101	116.305
PTPRO	13.164	52.231
S100B	-94.550	-143.480
SCARA3	-14.106	-12.357
SEMA3A	-39.826	-42.206
SGIP1	13.619	11.763
SHISA2	-25.702	-10.111
SLC24A3	38.867	75.637
SSTR1	79.594	14.840
STEAP4	-24.490	-18.837
THEMIS	14.520	22.218
TMEFF2	37.577	10.463
XIST	156.118	143.650

表 17

hMSCと比較してEwing肉腫細胞全てにおいてmRNA発現が10倍以上変化した遺伝子とその変化

	Hs822.T	Hs863.T	RD-ES	SK-ES-1
BEND5	-16.720	-14.819	27.302	26.690
CCND2	38.078	37.702	67.745	247.690
FBLN1	-18.992	-24.363	-36.755	-198.523
HAPLN1	-22.460	-11.738	-26.674	-110.084
IGF2BP1	22.847	22.358	288.588	207.475
SLC24A3	38.867	75.637	324.331	173.842
SSTR1	79.594	14.840	22.406	28.783
STEAP4	-24.490	-18.837	-21.747	-33.153
TMEFF2	37.577	10.463	34.418	197.834

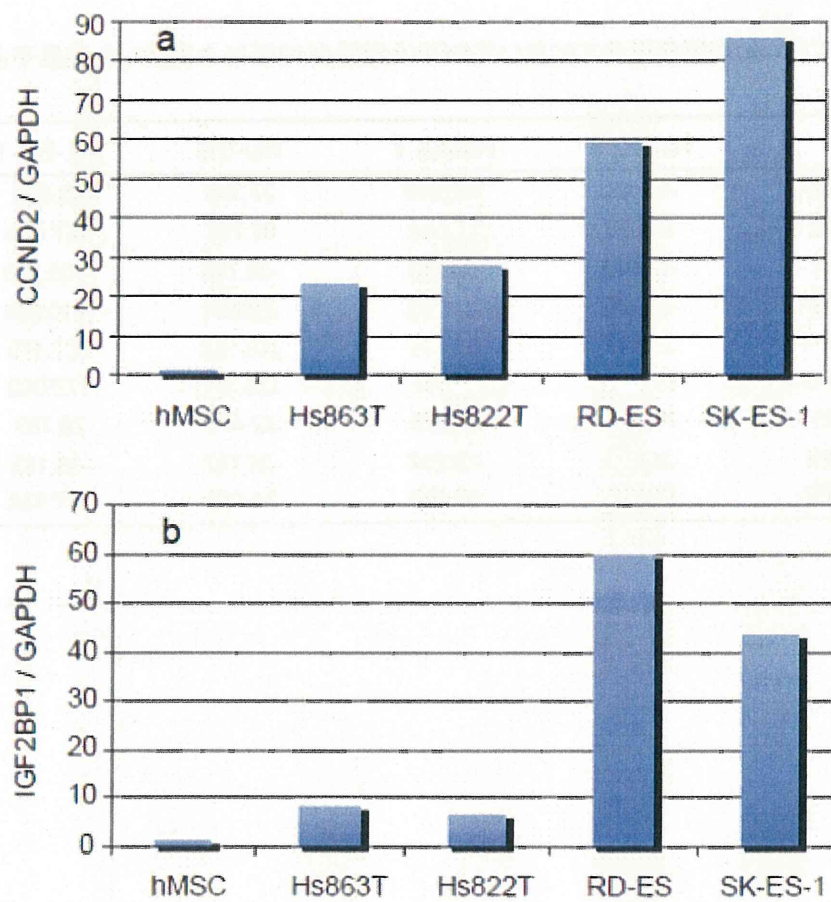


図17 hMSC及びEwing肉腫細胞におけるCCND2(a)とIGF1BP2(b)のmRNA発現レベル
hMSCの発現レベルを1とした際の値を示した。

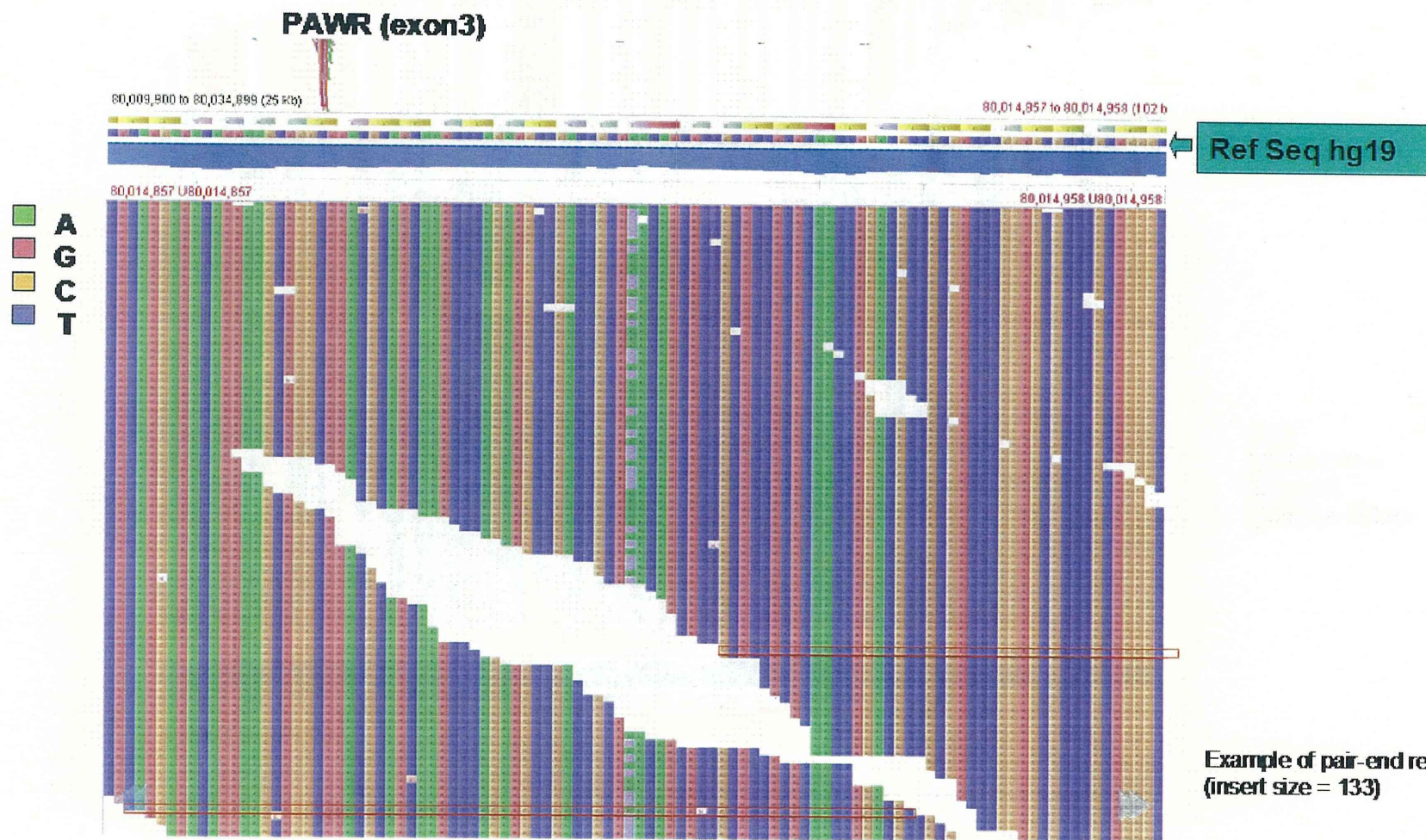
表 18 変異候補部位の抽出 (一部)

ID	Ref_base	#9 base	#9 coverage	#20 base	#20 coverage	Status
chr1_100152443	T	C	25	Y	23	Both
chr1_100164000	A	R	17	ND	ND	only #9
chr1_100164547	a	G	3	ND	ND	only #9
chr1_100182884	C	Y	17	T	26	Both
chr1_100185282	G	K	8	T	8	Both
chr1_100194305	C	S	11	G	12	Both
chr1_100203501	c	ND	ND	T	3	only #20
chr1_100203571	a	R	13	G	9	Both
chr1_100203597	G	R	19	A	13	Both
chr1_100203648	C	Y	36	T	21	Both
chr1_100203693	G	R	29	A	29	Both
chr1_100206665	G	S	3	ND	ND	only #9
chr1_100213115	T	Y	13	C	14	Both
chr1_100213151	T	ND	ND	C	3	only #20
chr1_100214391	T	W	11	A	14	Both
chr1_100316589	A	R	77	ND	ND	only #9
chr1_100316765	C	Y	16	T	17	Both
chr1_100327026	C	ND	ND	T	9	only #20
chr1_100329889	G	S	41	C	35	Both
chr1_100330237	A	ND	ND	G	5	only #20
chr1_100335883	A	R	15	ND	ND	only #9
chr1_100336361	C	Y	36	T	27	Both
chr1_100340225	G	R	21	A	20	Both

R; A or C, Y; C or T, K; G or T, S; C or G, W; A or T, M; A or C

表 19 突变候选部位

Chromosome	Position	Ref base	#0 base	#0 coverage	#20 base	#20 coverage	Mutation	Annotation
chr1	143361986	A	A/G	48	G/C	41	A→C	
chr1	143365020	T	A/G	49	A	48	G→A (LOH?)	
chr1	143378206	G	A/G	44	G/T	53	A→T	
chr2	131266530	C	A/T	17	A	49	T→A (LOH?)	
chr4	110685687	G	A/G	63	G/T	53	A→T	NM000204, CHI
chr9	90432732	A	A/G	48	A/T	46	G→T	
chr12	80014907	A	A/T	73	C	75	A→C, T→C	NM002583, PAWR
chr14	104381502	T	T	46	C/A	27	T→C, T→A	NM004894, c14orf2
chr17	33518182	C	A/C	46	C/T	55	A→T	



18 Early passage (#9)

Ax37, Tx36

PAWR (exon3)

30,009,900 to 80,034,899 (25 Kb)

80,014,857 to 80,014,958 (102 bp)

30,014,857 80,014,857

C/C

80,014,958 80,014,958

Example of pair-end read
(insert size = 156)

C x 75

18 Late passage (#20)

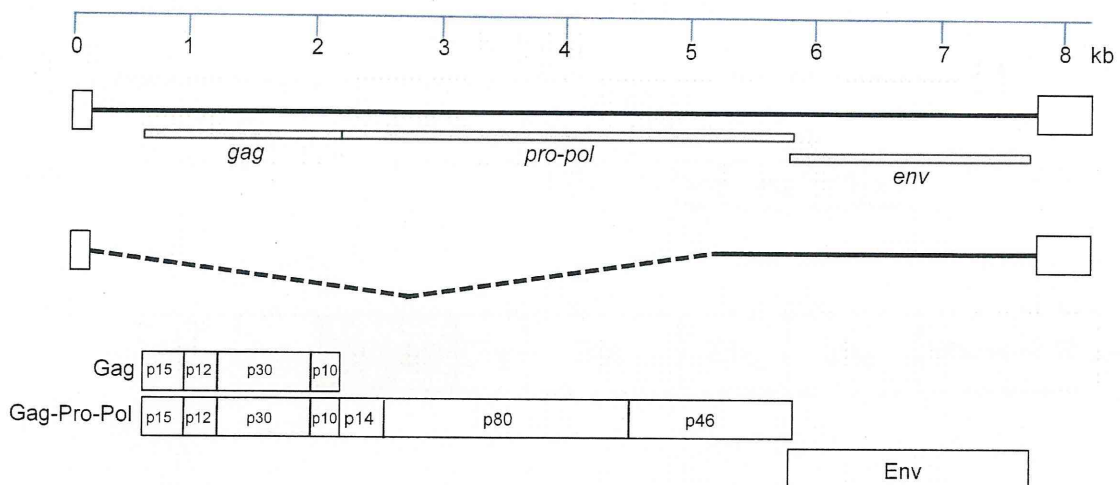


図 19 XMRV のゲノム構造と Gag, Gag-Pro-Pol タンパク質

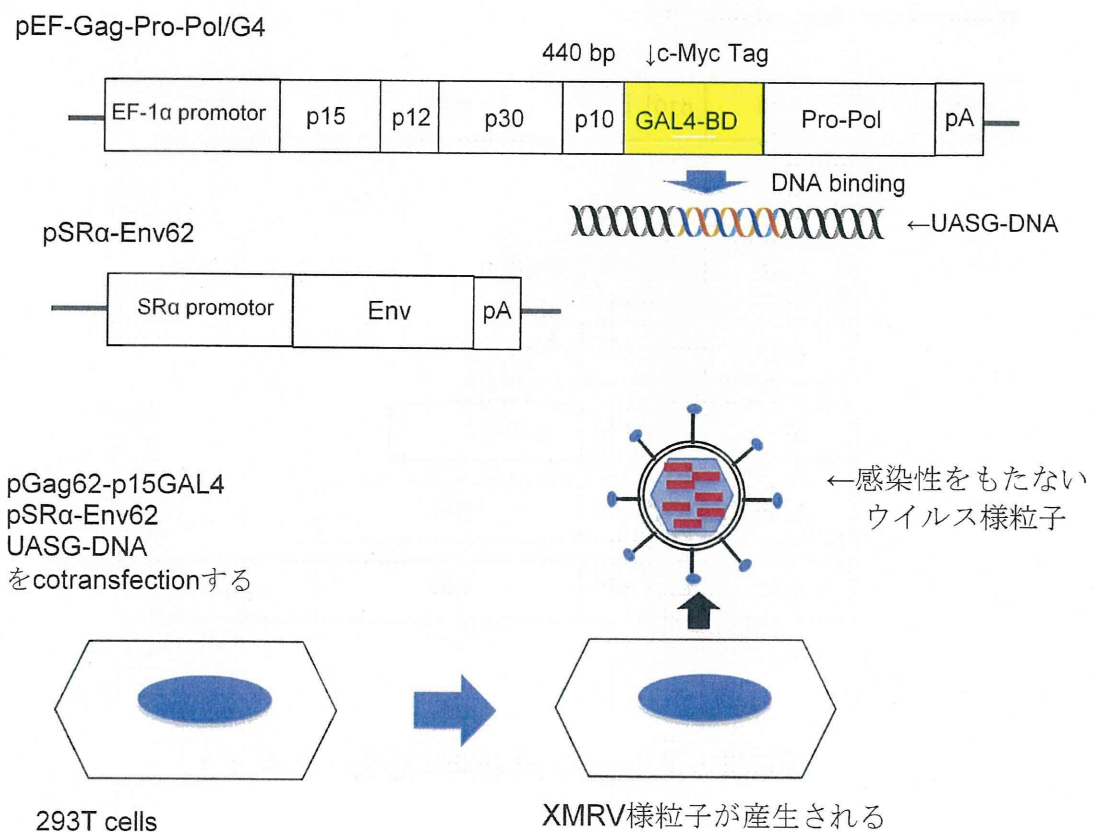


図 20 ウイルス様粒子の作成

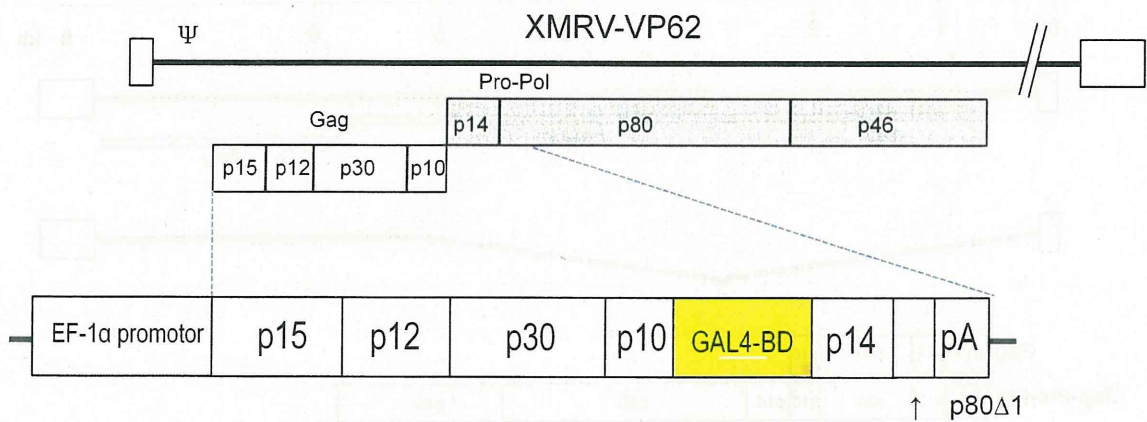


図 21 ウイルス様粒子発現ベクターの構築

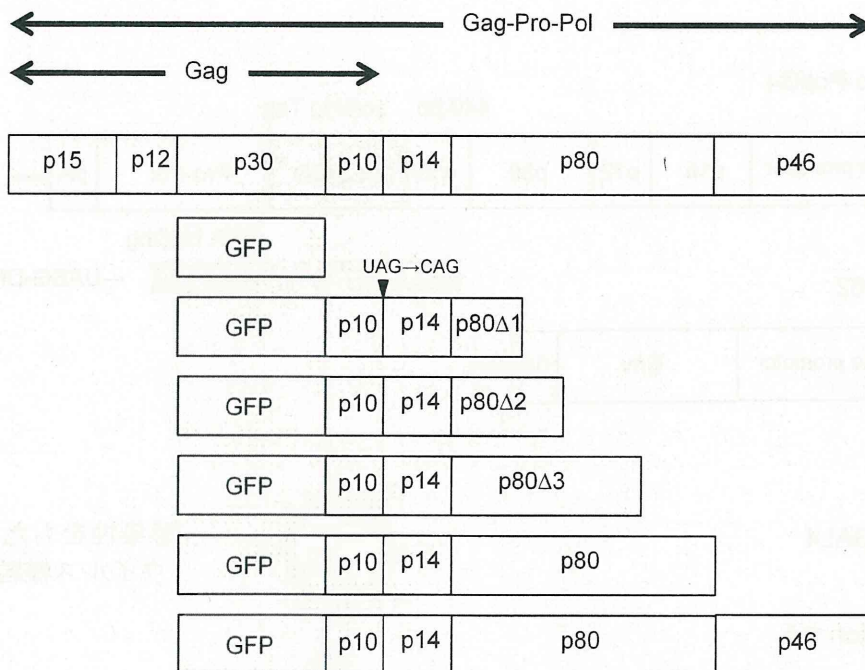


図 22 GFP-p10-p14-p80 発現ベクター

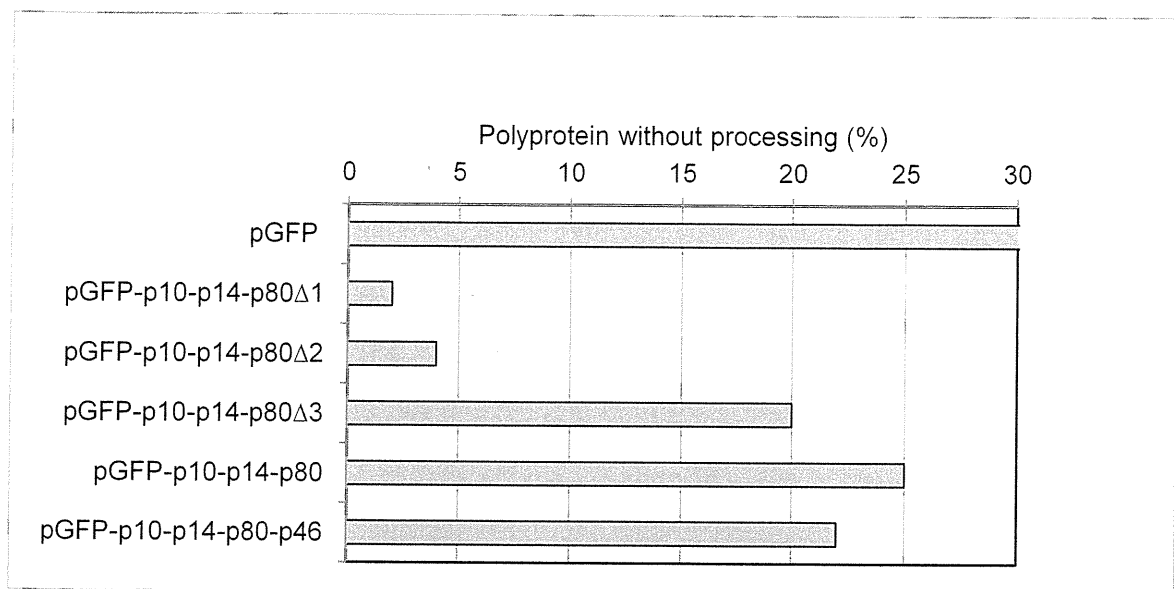


図 23 GFP-p10-p14 安定発現に必要な p80 領域の決定

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」
分担研究報告書

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

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

研究要旨

サイトカインの一種である血管内皮増殖因子（VEGF）の分泌は、ヒト間葉系幹細胞（hMSC）の虚血損傷修復作用の機序のうち主要なものの一つとされている。我々は最近、DNA マイクロアレイと統計学を用いて、虚血応答性 VEGF 分泌促進に深くかかわると予想される2つの遺伝子（VSR6, VSR7）を同定している。本研究では、これらの VSR 遺伝子の作用様式に関する検討を行った。VSR6 または VSR7 のいずれかについて RNAi を行った3ロットの hMSC について、低酸素条件または通常条件下にて培養を行い、ELISA により VEGF 分泌を測定した。また、hMSC を虚血条件ないし通常条件下で培養し、定量性 RT-PCR を用いて低酸素誘導因子 1 α (HIF1 α) 制御下にある遺伝子の発現量を測定した。

RNAi により、VSR6 および VSR7 の遺伝子発現はそれぞれ 25-45%、43-48%に低下した。VSR7 遺伝子発現のノックダウンにより、低酸素応答性の VEGF 分泌および HIF1 α 感受性遺伝子の虚血による発現上昇が抑制された。一方、VSR6 の遺伝子発現のノックダウンにより、これら双方が促進された。これらの結果により、VSR7 は虚血応答性 VEGF 分泌を HIF1 α を介して制御していること、および VSR6 は虚血に応答して VEGF の遺伝子翻訳または分泌過程を制御していることが示唆された。

研究協力者

倉持 智美
東邦大学薬学部
薬物安全性学教室

安田 智
国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部 主任研究官

佐藤 光利
東邦大学薬学部
薬物安全性学教室 准教授

A. 研究目的

ヒト骨髄中には造血幹細胞と間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cell: hMSC) という 2 種の体性幹細胞が存在する。前者は骨髄中で自己複製しながら血球前駆細胞を産生する。骨髄中の造血幹細胞の維持には骨髄ストローマ細胞が必要である。骨髄ストローマ細胞は複雑な三次元網目構造を形成しており、造血幹細胞はその構造の中で未分化状態を維持したり分化したりしている。骨髄ストローマ細胞の一部の細胞集団は、培養条件によって骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞などの間葉系細胞へと分化することから、間葉系幹細胞と呼ばれている。間葉系幹細胞については、その造血支持能に注目し、hMSC 併用移植による移植後造血系再構築促進効果が検討されている。また、骨再生・軟骨再生を目的とした再生医療に用いる細胞の供給源としても期待され、さらに、hMSC の免疫抑制能と炎症・組織障害部位への集積性に着目した移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) や虚血性心疾患・末梢動脈疾患の治療に関する研究が活発化しており、有効性を示唆する報告も多い。

しかしながら、こうした hMSC の有効性に関する報告に関しては、その機序が必ずしも明らかではなく、従ってリスク評価に限界がある点が問題である。すなわち、hMSC を細胞・組織加工製品ないしその原材料として利用する場合には、可能な限り作用機序の解明を行い、有効性／安全性評価ないし品質評価のための細胞特性指標を同定することが重要である。たとえば、虚血性疾患の治療を目的とし、虚血部位に hMSC を投与し組織保護・再生等の治療効果が認められる報告は数多いが、その機序については不明なことが多い。

hMSC の虚血性疾患に対する作用機序については、虚血部位に移動した hMSC が組織へと組み込まれ、組織細胞へと分化するためであ

ると従来考えられてきた。しかし近年、1) 移植後の hMSC の分化割合が低い、2) hMSC の培養上清やサイトカインの直接投与によっても同様の効果が得られるなどの報告から、局所あるいは遠くに存在する目標部位に対してサイトカインを放出することで治療効果に貢献していることも示唆されている。hMSC からのサイトカイン分泌の役割が注目されており、中でも、修復効果の一つとして知られる治療的血管新生については、サイトカインの関与が大きいと考えられている。しかし、hMSC による虚血性組織の修復についての実態はまだ明らかになっておらず、虚血性疾患に対するその有効性を理解するためには、投与された細胞が置かれるストレスの多い環境下での細胞の挙動を理解することが重要となる。

我々はこれまでに、平成 20・22 年度の厚生労働科学研究費補助金 (再生医療実用化研究事業) の「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」(研究代表者：山口照英)において、擬似的虚血条件下 (酸素濃度 1.0%、グルコースなし) でヒト間葉系幹細胞 (hMSC: human Mesenchymal Stem Cell, 骨髄由来) を培養し、通常条件下 (通常酸素濃度、グルコースあり) で培養したものと比較することにより、虚血条件下で特異的に分泌が上昇する血管新生関連サイトカインの探索を実施した。具体的には、まず特定のサイトカインを持続的に分泌するには、転写レベルでの調節が必要であると考えられるため、遺伝子発現量の検討が行われ、その結果、虚血条件下で有意な発現増加が見られるサイトカイン遺伝子が 5 種類同定された。遺伝子発現量とサイトカイン分泌量は必ずしも関連しないことから、5 つの遺伝子についてサイトカイン分泌量が検討された。すると、6 ロット全てで虚血後の有意な分泌増加が見られ、さらに生理的レベルに相当するオーダーの分