

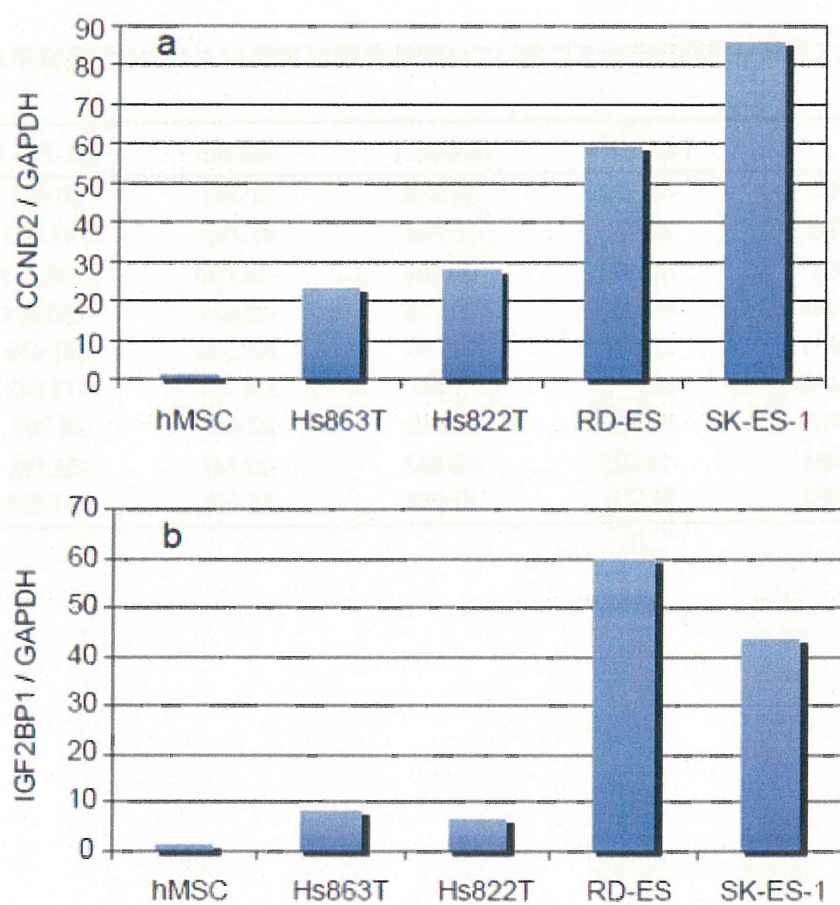


図2. hMSC及びEwing肉腫細胞におけるCCND2(a)とIGF1BP2(b)のmRNA発現レベル

hMSCの発現レベルを1とした際の値を示した。

分担研究課題

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

研究分担者 氏名 鈴木 和博 所属 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部

研究要旨：

ヒト幹細胞を用いた再生医療の実用化に向けた動きが加速する中で、その安全性確保、特に腫瘍原性の評価が大きな課題となっている。我々は、より安定で臨床応用に近いと考えられる体性幹細胞である骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)のゲノム安定性を検討する過程で、培養に伴い染色体変化を示す事例を発見し、この異常が細胞株樹立の樹立初期から存在したことをつきとめた。この染色体異常は、増殖優位性を与えるため、細胞の樹立と培養の過程で、正常細胞が異常細胞に置き換わっていった。そこで、この細胞においてどの程度遺伝子突然変異が蓄積しているかを検討するため、次世代シーケンサーを用いた解析を行った。

シーケンス解析の効率化を図るため、Agilent 社の SureSelect™ Human All Exon Kit V.2 を用いて、エクソン部分の DNA 配列を濃縮した後、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。培養初期と後期の hMSC 細胞のシーケンス比較により、多数の LOH とともに 数箇所の変異部位が特定できた。その 1 つはアポトーシス関連遺伝子である PWAR(PRKC apoptosis WT1 regulator)上にあり、増殖性との関連が示唆された。得られたシーケンスデータの信頼性は高く、細胞組織加工医薬品の遺伝的安定性の評価手法として有用であることが示された。

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

A. 研究目的

ES 細胞、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS) および体性幹細胞等を利用した再生医療、細胞治療法の開発、および、実用化に向けた流れが各方面で加速されつつある。画期的な治療法の開発に期待が高まる反面、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、我々に課せられた大きな課題である。

我々はこれまでに、骨髄由来ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) のゲノム安定性に関する検討を行

い、一部異常を認めた細胞株に関する検討を行ってきたが、さらに詳細な検討を加えるため、シーケンスレベルでの細胞のゲノム解析を試みた。最近では、次世代、さらには次々世代シーケンサーの導入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、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を行い、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に関して検討を行った。

B. 研究方法

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) 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で継代を続けた。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、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 μ l とタンパク質分解酵素 10 μ l (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 μ l 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。

(倫理面への配慮)

使用した細胞は、適切な手続きによりインフォームドコンセントを取って採取した生体試料より調製されたことが確認されている市販品を用いた。

C. 研究結果

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、シーケ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 の重複度でシーケ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ケンス結果について、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ケンス解析を行った結果、生データとして得られたシーケンスデータ量は以下の通りであった。

hMSC #9 3.32 x 10⁹ bp

hMSC #20 2.92 x 10⁹ 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 1 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 2 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 (complement 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1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。

D. 考察

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ケンス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る、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法について検討したい。

残念ながら、倫理的制限で細胞提供者のゲノム情報は得られなかったため、MSC の樹立過程における変異の可能性に関しては検討できなかったが、今後提供者のゲノム情報が得られるようなサンプルがあれば、検討を行いたい。

今回解析した細胞では、染色体転座や増幅、欠失を含む染色体異常が起きていることが確認されていたが、シーケンス解析の結果からは、それを反映する情報は得られなかった。その理由として、まずエクソン領域のみを解析しているため、転座の breakpoint が検出できなかった可能性が考えられる。全ゲノム解析を行えば、breakpoint を含むシーケンス断片を検出することは可能であるが、現在の解析方法ではおそらくマッピングの段階で、マップできない情報として削除されてしまうと考えられるので、それを拾い上げるための別の解析手法が必要である。さらに、ゲノムコピー数の増減についても、同様のアプローチが必要であると考えられる。

今回得られた PAWR 遺伝子は、癌抑制遺伝子の WT-1 に作用して、その転写活性を抑制することが知られており、前立腺細胞のアポトーシスの過程で発言が特異的に上昇していることが知られている。また、最近の知見では、それ自身が細胞外から Fas が関与したパスイに働いて、NF-kappa-B の転写活性を抑制することによりアポトーシスを誘発することが報告されている (Cell 138 220-222, 2009)。よって、今回観察された PAWR 遺伝子の変異により、このアポトーシス誘導活性が影響を受け、

染色体異常を持ちながらもアポトーシスを回避するために、増殖性を獲得した可能性が示唆された。この変異が、PAWR 遺伝子の機能的変化をもたらすかどうかについて、検討が必要である。

E. 結論

次世代シーケンサーによるシーケンス解析は、細胞の遺伝子異常の検出のための有力なツールであり、解析対象をエクソンに絞ること、作業の効率化を図ることができる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Luan Y, Kogi M, Rajaguru P, Ren J, Yamaguchi T, Suzuki K, Suzuki T

Microarray analysis of responsible genes in increased growth rate in the subline of HL60 (HL60RG) cells

Mutation Res. 731: 20-29 (2012)

2) Ramadan A, Suzuki T

Detection of Genotoxicity of Phenolic Antioxidants, Butylated hydroxyanisole and tert-Butylhydroquinone in Multiple Mouse Organs by the Alkaline Comet Assay

J. American Science 8: 722-727 (2012)

3) 鈴木孝昌: 個別化医療のためのバイオマーカーの探索・バリデーションと活用手法

「個別化医療の世界的動向を踏まえた開発・事業戦略」, 技術情報協会, 77-89 頁, (2011)

4) Uchida M, Ishii I, Hirata K, Yamamoto F, Tashiro K, Suzuki T, Nakayama Y, Ariyoshi N, Kitada M.

Degradation of filamin induces contraction of vascular smooth muscle cells in type-I collagen matrix honeycombs

Cell Physiol Biochem. 27: 669-80 (2011)

2. 学会発表

1) 鈴木孝昌: 植物由来発癌物質 “アリストロキア酸” の強力な変異原性とオミックスアプロ

ーチによるバイオマーカー探索

第 70 回日本癌学会学術総会 (2011.10) (名古屋)

2) 鈴木孝昌、押澤正、宮澤明史、佐藤陽治、降旗千恵、鈴木和博: 次世代シーケンサーを用いた間葉系幹細胞における突然変異検出とゲノム安定性の検討

日本環境変異原学会 第 40 回大会 (2011.11) (東京)

3) 鈴木孝昌: Genetic instability of human mesenchymal stem cells

インド環境変異原学会 (変異原と環境ストレスに対するヒトの健康の分子基盤に関する国際シンポジウム) (2012.1) (ブヴァネーシュヴァル/インド)

4) 鈴木 孝昌、ラマダン・アリ、小原 有弘、本間 正充、林 真、菊池 裕: バルカン腎症の原因物質と考えられるオクラトキシン A およびアリストロキア酸のマウスに対する遺伝子傷害性の比較

日本マイコトキシン学会 第 70 回 学術講演会 (2012.1) (東京)

表 1 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 2 突然変異候補部位

Chromosome	Position	Ref_base	#9_base	#9_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	NM_000204, CFI
chr9	90432732	A	A/G	48	A/T	46	G → T	
chr12	80014907	A	A/T	73	C	75	A → C, T → C	NM_002583, PAWR
chr14	104381502	T	T	46	C/A	27	T → C, T → A	NM_004894, c14orf2
chr17	33518182	C	A/C	46	C/T	55	A → T	

1

PAWR (exon3)

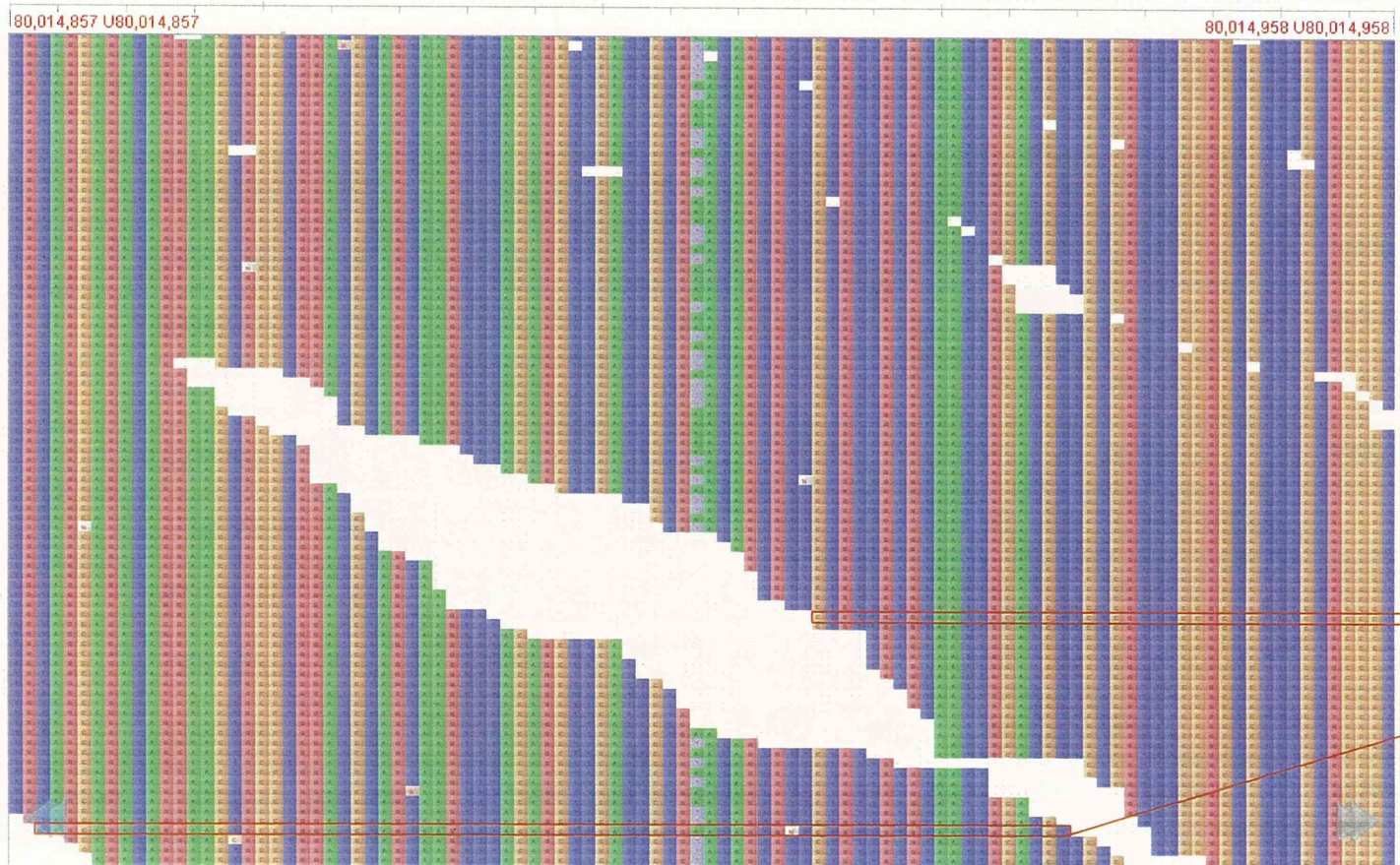
Early passage (#9)

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

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

Ref Seq hg19

A
G
C
T



Example of pair-end read
(insert size = 133)

Ax37, Tx36

PAWR (exon3)

Late passage (#20)

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

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

80,014,857 U80,014,857

C/C

80,014,958 U80,014,958

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

C x 75

再生医療製品のウイルス安全性評価

遊佐敬介 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨： 再生医療製品におけるウイルス安全性を確保するためには、汚染する恐れのあるヒト感染ウイルスの検出や除去・不活化が必要とされる。ヒト細胞・組織由来のウイルスとして、HIV(エイズウイルス)、HAV (A型肝炎ウイルス)、HBV (B型肝炎ウイルス)、HCV (C型肝炎ウイルス)、HTLV-I/II (ヒトTリンパ好性ウイルス)、ヒトパルボウイルス B19、CMV (サイトメガロウイルス) 等などがあげられるが、これに加えて XMRV (Xenotropic murine leukemia virus-related virus) とよばれるウイルスが数年前から北米で問題となった (Lombardi, *et al.*, *Science* 326: 585-589, 2009)。本研究では、XMRV の再生医療製品への混入が懸念されたので、このウイルスについて検討を行って来た。ところが、昨年このウイルスのヒトへの感染報告そのものが、誤りであることが明らかになった (Simmons, *et al.*, *Science* 334: 814-817, 2011)。そこで本研究では研究方針を変更し、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使えるかどうかの検討を始めた。これによって感染性はもたないが、簡便で高感度にモニターできる代替ウイルスを使えるようになり、再生医療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事が期待される。

A. 研究目的

再生医療製品を汚染する恐れのあるヒト感染ウイルスとして、HIV(エイズウイルス)、HAV (A型肝炎ウイルス)、HBV (B型肝炎ウイルス)、HCV (C型肝炎ウイルス)、HTLV-I/II (ヒトTリンパ好性ウイルス)、ヒトパルボウイルス B19、CMV (サイトメガロウイルス) 等があげられるが、これに加えて XMRV (Xenotropic murine leukemia virus-related virus) とよばれる新規ウイルスが高頻度で慢性疲労症候群 (CFS) の患者で高頻度に見つかるという報告が北米で問題となった (Lombardi, *et al.*, *Science* 326: 585-589, 2009)。また健常人でも 3.7% が感染しているものと報告された。本研究では、新規に報告された XMRV の再生医療製品への混入が懸念されたので、このウイルスについて検討を行って来た。ところが、その後複数の研究室から患者での高頻度の感染を否定する報告がなされ、その真偽に関心が集まった (Simmons, *et al.*, *Science* 334: 814-817, 2011)。さらに多くの検討がなされ、患者サンプルが、感染陽性とされたのには、いくつかの可能性が考えられることがわかった。その可能性として挙げられるのは、

- ① 使われた一部の核酸増幅法検査試薬そのものが、マウスの核酸で汚染されていたため XMRV とごく近縁の内在性マウスレトロウイルス遺伝子が増幅し、それを陽性とした可能性。
- ② 実験室ではマウス由来培養細胞を日常的に使う機会が多く、マウス細胞の核酸によって反応液が汚染された場合もマウスゲノム内にある内在性マウスレトロウイルスが増幅する可能性がある。
- ③ ヒトの腫瘍細胞株は、ヌードマウスに移植されて樹立されたものがある。ヒトの腫瘍細胞株を調べると、1.2% (5/411 細胞株) で XMRV プライマーを使って調べると感染陽性となる場合がある。つまり実験室内で何らかの理由でサンプルや反応液が、ヒトの細胞株 DNA で汚染されると偽陽性となる可能性がある。

などである。この他、このウイルスは、ヒト前立腺癌細胞株 22 Rv1 にも感染しているとされているが、その細胞から複数のウイルスクロンを分離して調べてみると、異なる時系列

や異なる地域に住む患者から分離されたウイルス間のシークエンスバリエーションよりも高いことがわかった。細胞株から分離した複数のウイルスのバリエーションが、患者由来のシークエンスバリエーションよりも高いということは、通常考えにくいことである。22Rv1細胞は、樹立する過程で、ヌードマウス体内で継代されているが、継代初期には、XMRVに感染していないことが明らかになった。つまりXMRVはもともとヒトの前立腺癌組織には存在しておらず、マウス体内で継代している間にマウスからウイルスが感染し、しかもXMRVは、2つの異なるウイルスが、複数回の組み換えを起こして出現したものがXMRVとして持続感染するようになったと推定された(Paprotka, *et al.*, *Science* 333: 97-101, 2011). 以上から慢性疲労症候群の患者で高頻度に感染しているとされたXMRVは、①-③のような核酸による汚染によって引き起こされたものと考えられる。

そこで本研究では研究方針を変更し、XMRVのウイルス粒子を使って、ウイルス試験法に使われるモデルウイルスの代替ウイルス様粒子として使えるかどうかの検討を始めた。レトロウイルスは、バイオ医薬品の製造工程では注意を払わねばならない重要なウイルスである。再生医療製品の製造過程で万一汚染が起きた場合にそのウイルスがどんな挙動を示すのかをモニターする必要がある場合が想定される。そこで感染性をもつモデルウイルスとは異なり、感染性をもたないが、簡便で高感度にモニターできる代替ウイルスが使えるようになれば、再生医療製品の製造工程におけるウイルス安全性評価につながることを期待される。この代替ウイルスは、感染性ウイルスと同様にエンベロープ構造をもつ、しかしウイルスRNAはパッケージングシグナルをもたないためウイルス粒子には取り込まれず感染性を持たないため、取り扱いが簡便である。ウイルスRNAの代わりに核酸増幅によってウイルス量をモニターするための短いDNAをウイルス粒子内に導入する。そのためGAL-4 DNA結合ドメインを構造タンパク質と融合する形

で組み込む。これによって、ウイルスコピー数が簡便にかつ感度よく追跡できるようになると考えられる。

B. 研究方法

(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。

(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,
GGGGCTCCTGACCCTGACCTCCCTGGTCAC
CTAAGGTCAGGAGGGAG; XP03,
GGAGGTCAGGGTCAGGAGCCCC; XP04HA,
TTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAC
TGTATGTGGGGCTTGATCCCC; XP06,
TTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAG
AGGAGTGTAGAGGTTTCTAGA; XP08,
TTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAG
GGGGCCCCACGGGTTAATCTT; XP14HA,

TTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAG
TCTGGGCCCCAATTAAACAGAGT; XP16HA,
TTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAC
AAGATCTCGAGGCAGTCATGGGG.

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)

ヒト由来試料は使わないので倫理面の配慮は必要ない。

C. 研究結果

(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1)。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と考えられた(図2)。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3)。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。

(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いる。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を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4). 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5). 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

ウイルスの産生量は、細胞内に発現する Gag, Gag-Pro-Pol タンパク質量に依存する. まずウイルスタンパク質は一連のポリペプチドとして合成されたのち Gag-Pro-Pol 内の Pro によるプロセッシングによって切断されるが、その切断が細胞内で起きてしまうと小胞形成に必要とされる ESCRT I, II, III と呼ばれる 100 種類以上のタンパク質をリクルートできずに、ウイルス粒子形成はごく効率の悪いものになると考えられる. つまり細胞内で合成された Gag, Gag-Pro-Pol のプロセッシングが、一時的にでも抑制される仕組みがあると考えられきたが、その実体は不明なままである. p15 はミリストイル化されているので、細胞膜にアンカーされているが、p12, p30, p10 は、そうではないため、ウイルス粒子の成熟に必要な分子が、ウイルス粒子内に取り込まれないからである. また ESCRT 分子群をリクルートすることもできなくなるため、ウイルス粒子産生能は極端に低下するものと考えられる. 通常はウイルス粒子が細胞の外にリリースされてもすぐは感染性をもたず、1-2 時間すると感染性を獲得するようになるがこれは細胞内ではプロセッシングが抑制されており、アッセンブリーと出芽が起きたあとで、プロセッシングが開始され、切断されたカプシドタンパク質である p30 によってコア形成がおきるか

らである. しかし、実際には細胞内でもプロセッシングがある程度起きており、必ずしも効率的な粒子形成は実際に行われず、その制御は、leaky なものであろうと考えられている. その状況下でも p80 のアミノ酸残基 340~499 までに細胞内でのプロセッシングを抑制する領域があることがわかった.

本実験の目的は、モニター配列を複数ウイルス粒子内にもつウイルス様粒子の作製である. こうしたウイルス様粒子の作製のために必要な条件とは、(1) ウイルス粒子内に、ウイルスゲノム RNA が取り込まれないこと、(2) ウイルス粒子内でカプシドを形成する p30 が Gag ポリペプチドから細胞内で切り出されず、細胞外にリリースされてから適切にプロセッシングされること、(3) ウイルス粒子形成時に、ウイルス粒子数をモニターするための 2 本鎖 DNA を効率よく取り込ませること、である.

まず(1)については *gag* 遺伝子の上流にあるパッケージングシグナルを除くことによってウイルスゲノムを含まないウイルス様粒子を作製することができる. Gag とプロテアーゼを含む Pro-Pol は同じ翻訳フレーム上にタンデムに並んでいるが、Gag と Pro-Pol の間には UAG (終止コドン) があり、翻訳は通常この UAG で停止するが、そのポリペプチドの 5-10% はこの終止コドンで停止せず、伸長を続け、Gag-Pro-Pol となる. そして Gag-Pro-Pol に含まれているプロテアーゼによってウイルスのカプシド形成が起きる. ところがこのプロセッシングがウイルス粒子の出芽以前に感染細胞内で起きてしまうと、ウイルス粒子形成の効率を大きく低下させる原因となる. 実際にはこのプロテアーゼによるプロセッシング過程を制御するしくみがあると考えられているがその詳細は不明である. そこでこの点について検討を行い、Pol 領域に細胞内でのプロセッシングを抑制する領域があることがわかった. (3)に関しては、モニター用の DNA を結合する為に特異的な DNA 結合能をもつ複数のタンパク質について検討を行い、UASG (Upstream Activatin Sequences for galactose) と呼ばれる 2 本鎖 DNA を認識して結合することがで

きる転写調節遺伝子 GAL4 を用いることにした。GAL4 の DNA 結合ドメインを Gag との融合タンパク質とすることによって、ウイルス粒子内にモニター用の DNA を>2000 コピー取り込ませ、ウイルスモニターの感度を上げることが可能になる。以上を考慮し、実用に耐えるウイルス様粒子を作製することができるものと考えられた。

E. 結論

ウイルス動態を調べるための有用なウイルス様粒子の作製のためのいくつかの基礎的な検討を終えることができた。とくに安定なウイルス様粒子作製のためには、Pol 領域の p80 に細胞内での Pro によるプロセッシングを抑制する領域があり、それを導入する必要があることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Yuan, Y., Maeda, Y., Terasawa, H., Monde, K., Harada, S., Yusa, K. A Combination of Polymorphic Mutations in V3 Loop of HIV-1 gp120 Can Confer Noncompetitive Resistance to Maraviroc. *Virology*, 413:293-299, 2011.

(2) Maeda, Y., Yoshimura, K., Miyamoto, F., Kodama, E., Harada, S., Yuan, Y., Harada, S., Yusa, K. *In vitro* and *In vivo* Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry Inhibitors. *J. AIDS Clin. Res.* S2-004, 2011.

(3) 遊佐敬介, 山口照英, 川崎ナナ. ヒトに感染が疑われているレトロウイルスとウイルス安全性, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 42: 444-447, 2011.

(4) 遊佐敬介, 新見伸吾, 橋井則貴. バイオ医薬品の外来性感染物質について *Pharm. Tech. Jpn.* 28: 941-946, 2012.

2. 学会発表

(1) Yusa, K., Yuan, Y., Maeda, Y., Hiromi, T., Monde, K., Harada, S. A Combination of Polymorphic Mutations in V3 Loop of HIV-1 gp120 Can Confer Noncompetitive Resistance to Maraviroc. *International Union of Microbiological Societies, XV, International Congress of Virology*, Sapporo, September 2011.

(2) 原田恵嘉, 濱治有希, 遊佐敬介, 松下修三, 吉村和久. 抗HIV剤がEnv多様性に与える影響. 第25回日本エイズ学会学術総会 東京 11.30.2011.

(3) 中野雄介, 前田洋助, 遊佐敬介, 原田信志. コレセプター阻害剤によるCCR5のoligomerization 増強に關与するCCR5領域の解析. 第25回日本エイズ学会学術総会 東京 11.30.2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

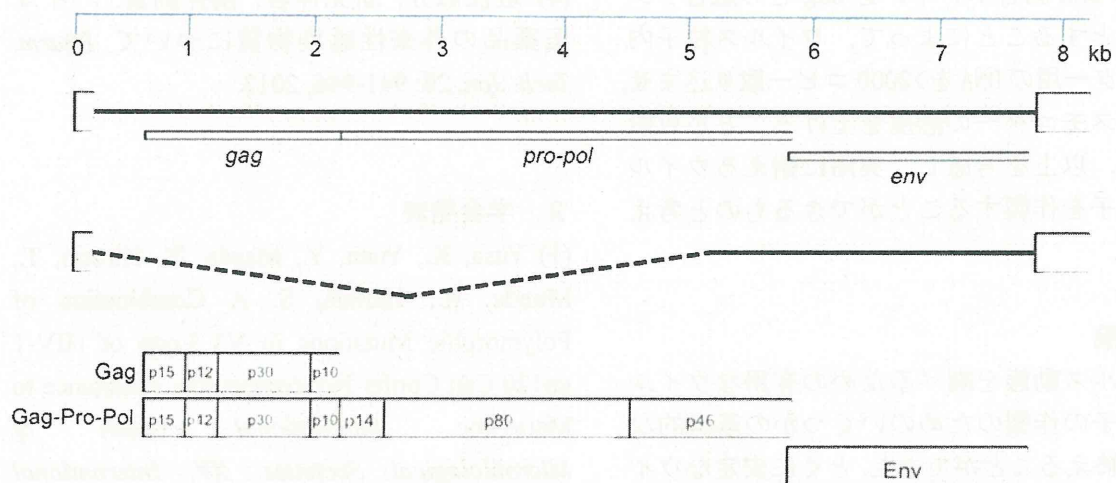


図1 XMRVのゲノム構造とGag, Gag-Pro-Polタンパク質

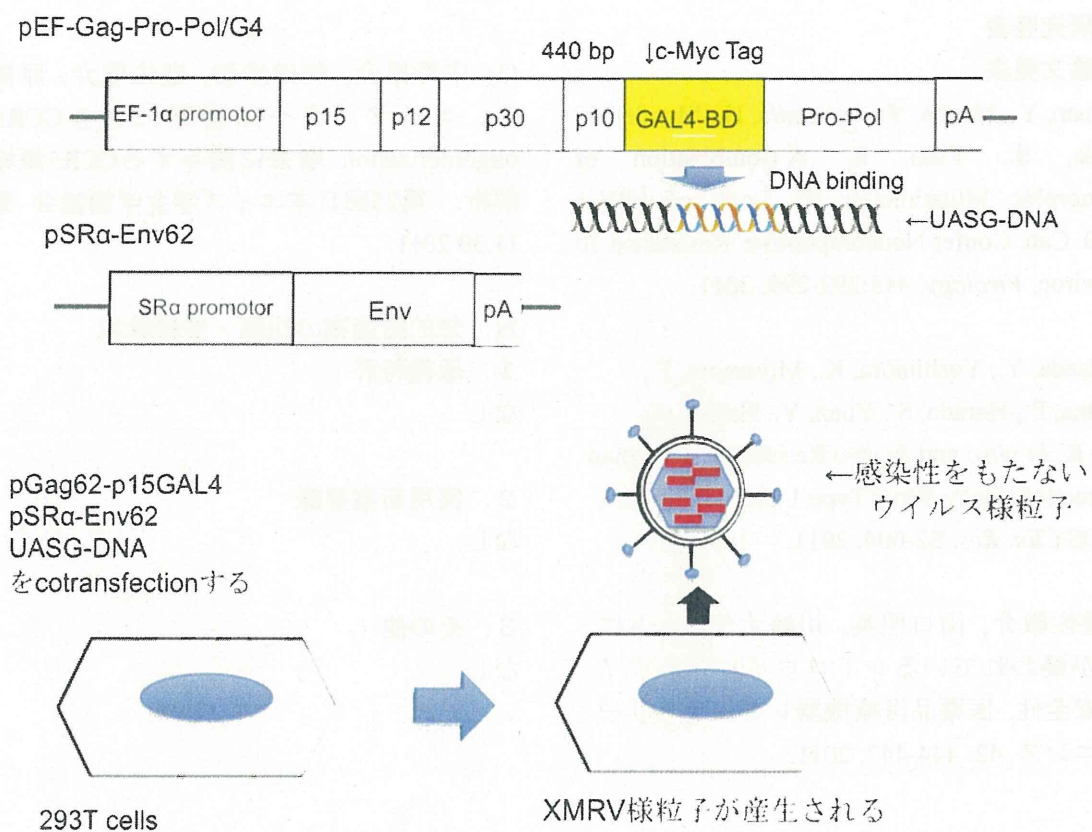


図2 ウイルス様粒子の作製

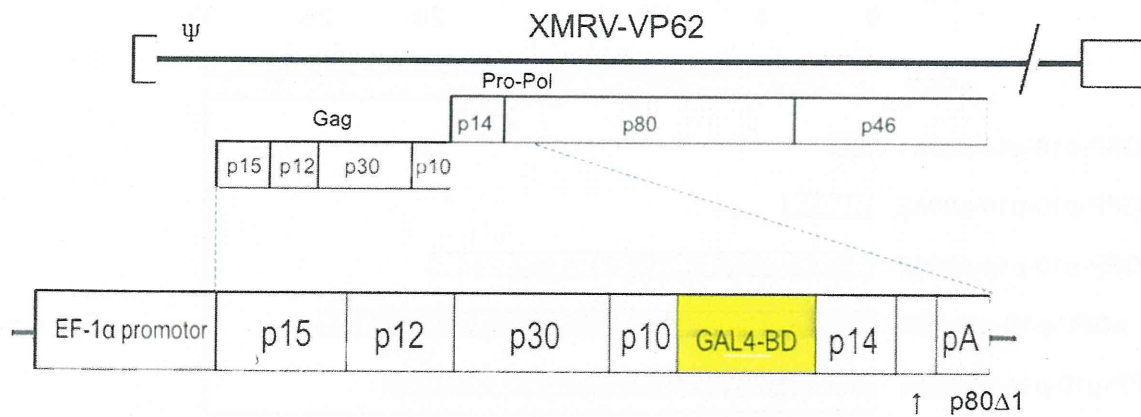


図3 ウイルス様粒子発現ベクターの構築

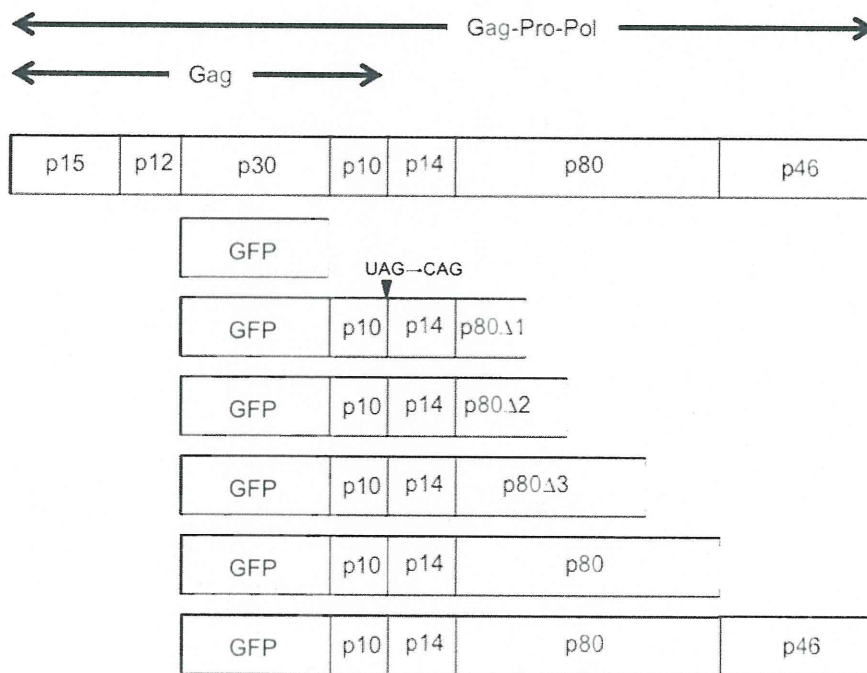


図2 GFP-p10-p14-p80発現ベクター

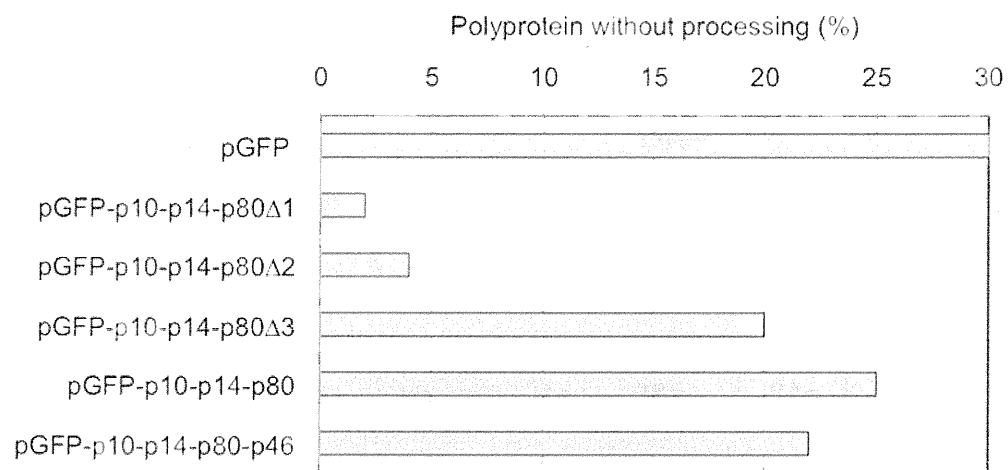


図5 GFP-p10-p14 安定発現に必要なp80領域の決定

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	頁
鈴木孝昌	個別化医療のためのバイオマーカーの探索・バリデーションと活用手法	安保公介	個別化医療の世界的動向を踏まえた開発・事業戦略	技術情報協会	東京	2011	77-89

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
鈴木和博	再生医療と細胞特性	国立医薬品食品衛生研究所報告	129	27-36	2011
佐藤陽治, 黒田拓也	ヒト多能性幹細胞を使った再生医療・細胞治療における造腫瘍性試験の現状	医学のあゆみ	239	1460-5	2011
Nishioka K, Nishida M, Ariyoshi M, Jian Z, Saiki S, Hirano M, Nakaya M, Sato Y, Kita S, Iwamoto T, Hirano K, Inoue R, Kurose H.	Cilostazol Suppresses Angiotensin II-induced Vasoconstriction via Protein Kinase A-mediated phosphorylation of TRPC6 channel.	Arterioscler Thromb Vasc Biol.	31	2278-86	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する指針整備と主なポイント	再生医療	10	206-10	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（案）—総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について—	再生医療	10	211-8	2011

早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（案）—総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について—	再生医療	10	219-26	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト（自己）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（案）—総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について—	再生医療	10	227-37	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（案）—総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について—	再生医療	10	238-48	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（案）—総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について—	再生医療	10	249-60	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（案）—ヒト体性幹細胞, iPS（様）細胞又は ES 細胞を加工して製造される医薬品等（ヒト幹細胞加工医薬品等）の最終製品の品質管理—	再生医療	10	261-6	2011