

201235058A

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

細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けた

レギュラトリーサイエンス研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤陽治

平成 25 (2013) 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

細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けた

レギュラトリーサイエンス研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐 藤 陽 治

平成 25 (2013) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	頁
細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究	1
佐藤 陽治	
II. 分担研究報告書	
1. 新規免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験法の開発	48
堤 秀樹	
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	54
澤田 留美	
3. 次世代シーケンサーを用いた細胞の遺伝的安定性評価指標の開発	71
鈴木 孝昌	
4. 分化プロペンシティを指標とした細胞特性解析法の開発	86
安田 智	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	104
IV. 研究成果の刊行物・別刷	108

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）
「細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究」
総括研究報告書

研究代表者：佐藤陽治 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 部長

研究要旨

【目的】本研究は、新たなガイドライン作成に資する細胞・組織加工製品、特に幹細胞加工製品の品質・安全性評価法の開発を行うことを目的とする。【方法】①汎用性・定量性のある幹細胞加工製品の造腫瘍性試験法の開発を目指した実験研究、②培養工程での遺伝子発現の動態解析に基づく品質・安全性評価指標の開発に関する研究、③製造工程における遺伝子安定性評価法の開発に関する研究、④幹細胞（未分化細胞）における分化プロペンシティの評価系の開発に関する研究を実施した。【結果】①我々は、重度免疫不全動物である NOG マウスとヌードマウスにおける HeLa 細胞単独、あるいはマトリゲルとの混合物の TPD₅₀(投与した動物の半数で腫瘍を形成するために必要な細胞数)を検討し、マトリゲルに検体細胞を懸濁して NOG マウスに投与することにより、ヌードマウスを用いた従来の国際ガイドラインにある方法より数千倍高感度で腫瘍細胞を検出することが可能であることを示すデータを得ている。実験動物中央研究所では、この NOG マウスをヘアレス化した系統を樹立しており、NOG マウスと同様の条件における TPD₅₀ の調査を行った（その際の動物は、体外受精させた胚を仮親に移植して大量生産する手法を用いて作出した 80 匹以上の同一週齢雄動物を用いた）。雄 NOG ヘアレスマウスにおける HeLa 細胞の TPD₅₀ は、ヌードマウスの 1/11 ($3.7 \times 10^4 / 4.2 \times 10^5$)、マトリゲルを混合した場合は 1/2040 ($2.1 \times 10^2 / 4.2 \times 10^5$) であり、NOG マウスにおけるそれらよりも高値であった。これは、導入したヘアレス遺伝子が Balb/c マウス由来であり、免疫不全度が僅かながら低下したこと推測された。NOG ヘアレスマウスは NOG マウスと比較し、目視・触診による腫瘍形成の検出が容易であり、造腫瘍性試験の効率化が期待される。②ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) 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 4 種類 (Hs822.T, Hs863.T, RD-ES, SK-ES-1) を陽性対照として比較検討することにより、細胞のがん化の指標となり得る候補遺伝子として、これまでに Cyclin D2, IGF2BP1 など 9 遺伝子を見出している。そこで平成 24 年度は、hMSC への Cyclin D2, IGF2BP1 の過剰発現による hMSC の増殖能、老化及び染色体数等への影響について検討し、さらに hMSC の遺伝子発現パターンの変化について網羅的に解析した。その結果、Cyclin D2 の強制発現によって hMSC の増殖が亢進され、遺伝子発現の網羅的解析により細胞増殖などに関わる遺伝子発現の有意な変化が認められた。Cyclin D2 は hMSC では細胞増殖に正に関与し、さらに細胞老化を遅らせることによって増殖の亢進に寄与した可能性も示された。遺伝子発現の網羅的解析で hMSC と発現パターンが似ていた Hs822.T 及び Hs863.T はほぼ正常な染色体数だったのに対し、RD-ES 及び SK-ES-1 はどちらも染色体数が大きく変化し、hMSC の遺伝子発現パターンとの類似性と同様の傾向が見られた。③細胞の遺伝的安定性評価を目的としたホールゲノムシーケンスおよびエクソンシーケンスから得られるデータの品質評価および遺伝子変異検出の効率に関して、モデル細胞を用いた実データから検討を行った。その結果、点突然変異および小さな増幅、欠失変異に対する検出率および正確性の高さが確認できた。一方、大きな欠失、増幅ならびに転座などの複雑なリアレンジメントに関しては、通常の解析では検出が難しいことがわかり、これらに特化したデータ解析手法の検討が必要であることがわかった。④無フィーダー培養した未分化状態のヒト iPS 細胞株 (9 株, n=6) において網羅的な mRNA 発現情報をジーンチップにより取得した。さらに細胞特性評価に用いる候補遺伝子の今後の絞り込みのため、iPS 細胞株間で統計学的に有意に発現量の異なる遺伝子群を抽出した。ヒト iPS 細胞 9 株から低吸着ディッシュ上で胚葉体を形成させ RNA の抽出の後に、三胚葉マーカー遺伝子発現を定量的 RT-PCR で測定し、各々の細胞株の分化プロペンシティを主成分分析により数値化した。その結果、第 1 主成分得点は中胚葉分化の正の指標および初期外胚葉分化の負の指標となることが示された。【結論】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・評価法が示され、迅速で適切な製品開発・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（順不同）

堤 秀樹	(公財)実験動物中央研究所 試験事業部 部長
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
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
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 室長

研究協力者（順不同）

草川 森士	(公財)先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 研究員
町田 一彦	(公財)実験動物中央研究所 試験事業部 研究員
伊藤 守	(公財)実験動物中央研究所 実験動物研究部 部長
黒田 拓也	(公財)先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 研究員
河野 健	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第3室 研究員
本間 正光	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長
山田 雅巳	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 第1室 室長
黒田 拓也	(公財)先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 研究員
城 しおり	名古屋市立大学大学院薬学研究科 医薬品質保証学分野 修士課程1年
田埜 慶子	成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部 研究員
高田 のぞみ	(公財)先端医療振興財団 再生医療研究開発部門 研究員

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おり、総合科学技術会議の提言や「新成長戦略」のメディカルイノベーションなどにおいても最重要課題とされている。平成 25 年 1 月 11 日閣議決定の『日本経済再生に向けた緊急経済対策』でも、iPS 細胞等を用いた再生医療等に係る研究開発・実用化を支援する環境整備に取り組むことが明記されている。平成 25 年 2 月には再生医療等の新規医療産業の国際競争力を高める司令塔機能として、内閣官房に『健康・医療戦略室』の設置された。

再生医療（や細胞治療）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は細胞・組織加工製品と呼ばれ、国内外で活発に研究・開発が行われている。細胞ソースとしてはヒト体細胞に加え、近年ではヒト体性幹細胞、胚性幹細胞（ES 細胞）などの幹細胞が対象とされてきている。また最近、生命倫理的な問題や免疫学的な拒絶をクリアできると考えられる人工多能性幹細胞（iPS 細胞）が登場し、再生医療が社会的に大きな期待を集めている。しかしながら細胞・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、国内指針や ICH, WHO などの生物製剤製造国際ガイドライン等にある従来の品質・安全性評価法が役立たないケースが頻出しており、新たに適切な評価技術を樹立することが火急の課題となっている。本研究では、新たなガイドライン作成に資する細胞・組織加工製品、特に幹細胞加工製品の品質・安全性評価法の開発を行うことを最終目的とする。具体的には、幹細胞の加工過程における未分化細胞／異常細胞の混入は、幹組織加工製品においてがん化を引き起こすとして最も懸念される。最終製品に含まれるこれらの細胞の高感度かつ定量的な測定方法は

開発が遅れている。そこで、本研究では汎用性・定量性のある幹細胞加工製品の造腫瘍性試験法の開発を目指した実験研究を展開する。また細胞の培養・加工過程での細胞の形質安定性も考慮に入れる必要があることから、培養工程での遺伝子発現の動態解析による品質評価法および遺伝子安定性評価法の開発に関する研究を行う。さらに安全性上の懸念として、ヒト多能性幹細胞株間での各種目的細胞への分化のし易さ（分化プロペンシティ）のバラツキがある。原材料の細胞の分化プロペンシティの情報は細胞株の選択に必要不可欠であり、その評価系は最終製品を見据えた細胞バンクの構築に必要である。未分化細胞において分化プロペンシティの評価系を含んだ細胞特性解析を確立することにより、幹細胞由来加工製品の品質の一定性・有効性・安全性のさらなる確保に繋がることが期待される。

平成 24 年度の研究としては、①「汎用性・定量性のある幹細胞加工製品の造腫瘍性試験法の開発を目指した実験研究」として、新規免疫不全動物 NOG ヘアレスマウスを用いた造腫瘍性試験法の開発にむけた動物コロニーの拡大、および試験方法の条件検討を行った。②「培養工程での遺伝子発現の動態解析に基づく品質・安全性評価指標の開発に関する研究」として、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を行い、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞のがん化と相関すると予想される遺伝子に関する機能解析を行った。③「製造工程における遺伝子安定性評価法の開発に関する研究」として次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析の性能評価を行った。また、④「幹細胞（未分化細胞）における分化プロペンシティの評価系の開発に関する研究」として、ヒト多能性幹細胞の分化プロペンシティを予測するための指標の同定の基盤となるデータの収集を行った。

B. 研究方法

B-1 新規免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験法の開発

B-1-1 体外受精・胚移植法による使用動物の大量一括生産

実中研にて液体窒素中に保存している NOG ヘアレスマウス (NOD/Shi-*scid* IL2R γ null *Hr^{Hr}*) の凍結保存胚 385 個を 20 匹の仮親 (Jcl:ICR) に移植し、帝王切開法により無菌的に 169 匹の産仔を得た。全ての産仔は 25 匹の SPF の里親 (IQI/Jic) に哺育させ、雄 87 匹、雌 68 匹を離乳した。実験にはこの中から雄 85 匹を用い、雌は次回の実験のために保存胚採取用動物として用いた。

B-1-2 HeLa 細胞を用いた造腫瘍性評価

B-1-2-1 動物

実中研内にある生産区域から実験専用動物室 (バリア区域内) に移動した 85 匹の動物は 1 週間の馴化後全頭体重測定を行い、平均値が等しくなる様「汎用群分けシステム (ヴィジョンズ)」により 8 群 (10 匹×8 群, 予備動物 5 匹) に分けた。個体識別は耳パンチ/カット法により行った。

群構成

- HeLa 群 : 0, 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 (個/匹)
- HeLa+マトリゲル群 : 0, 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 (個/匹)

B-1-2-2 被験細胞

HeLa 細胞は独立行政法人医薬基盤研究所から国立医薬品食品衛生研究所、遺伝子細胞医薬部が購入し、同所で培養したものを用いた。細胞は所定の手順にしたがい、培地 (MEM+10%ウシ胎児血清+ペニシリン/スプレプトマイシン) またはマトリゲルにより、投与容量が

0.1 mL/匹になる様に懸濁調整し、1mL ツベルクリン用シリンジに充填し、移植直前まで 4°C にて保存した。

B-1-2-3 細胞移植および結節形成確認

1mL ツベルクリンシリンジに 25G 注射針を装填し、無麻酔下で各マウスの右腹部皮下に移植した。移植日を 0 日とし、毎週 1 回体重測定および触診による結節形成の確認を行った。

結節が確認されたらノギスで長径 (L) と短径 (W) を測定し、結節体積 (V) を「ヌードマウスと抗癌剤評価」(野村達次, 櫻井欽夫, 稲葉實編著, 蟹書房, 1991) の腫瘍体積簡易計算式にしたがい、計算式 $V=LW^2/2$ で算出した。この結節体積は比重を 1 として結節重量とし、体重の 10% を超過した際は、人道的エンドポイントとして観察を終了し、イソフルラン吸入麻酔下で安楽死させ、移植部位を採材し、10% 中性緩衝ホルマリンにより固定した。

B-1-3 統計解析

試験途中であるため、統計解析あるいは TPD50 の算出は実施していない。

B-1-4 倫理面への配慮

本動物試験の全ては「公益財団法人実験動物中央研究所 動物実験等に関する規程」に則り必要な審査を受け、承認されたものであった。

また使用された HeLa 細胞はヒト由来細胞であるが、提供者の国立医薬品食品衛生研究所内において適切に培養され、作業者に直接触れることなく動物に移植された。

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) ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 : 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 2-1 に示した。

B-2-2 Cyclin D2 及び IGF2BP1 発現組換えレンチウイルスベクターの作製

SK-ES-1 から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し, SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) を用いて cDNA に変換した。変換した cDNA を鋳型として, KOD-Plus-Neo (ToYoBo) を用いた PCR 法により Cyclin D2 及び IGF2BP1 遺伝子を増幅した。PCR に使用したプライマーは Cyclin D2 : Forward 5' - GAATTCGCCACCATGGAGCTGCTGTGCC ACGAGG -3' (下線 ; EcoR I 認識部位), Reverse 5' - CTCGAGTCACAGGTCGATATCCCCGCACG -3' (下線 ; Xho I 認識部位), IGF2BP1 : Forward 5' - GAATTCGCCACCATGAACAAGCTTTACAT CGG -3' (下線 ; EcoR I 認識部位), Reverse 5' - TCTAGATCACTTCCTCCGTGCCTGGG -3' (下線 ; Xba I 認識部位) である。増幅した

PCR 産物は TArget Clone™ -Plus- (ToYoBo) を用いてクローニングを行った。遺伝子配列を確認したインサートを制限酵素 EcoR I 及び Xho I (Cyclin D2), EcoR I 及び Xba I (IGF2BP1) を用いて, レンチウイルスベクタープラスミドである pLVSIN-CMV Pur Vector (TaKaRa), pLVSIN-CMV Neo Vector (TaKaRa) にそれぞれ組換えた。作製したレンチウイルスベクタープラスミドを Lenti-XTM HTX Packaging System (TaKaRa) を用いて 293T 細胞にトランスフェクションし, トランスフェクション後 72 時間の培地上清を組換えレンチウイルスベクターとした。

B-2-3 組換えレンチウイルスベクターによる Cyclin D2 及び IGF2BP1 タンパク質の強制発現

hMSC を 12,000 cells/cm² で 6 well plate (Corning) に播種し, 1 晩培養後, それぞれ組換えレンチウイルスベクターを感染させた (hMSC/CyclinD2, hMSC/IGF2BP1)。タンパク質発現のネガティブコントロールとしてそれぞれの空ベクターを感染させた (hMSC/Puro, hMSC/Neo)。感染 48 時間後, 培地中に抗生物質 Puromycin (1 μg/ml) または G418 (250 μg/ml) を加え, 2 日ごと培地を交換し, Cyclin D2 及び IGF2BP1 タンパク質強制発現細胞を選択した。

B-2-4 Total RNA の調製

hMSC / Puro 及び hMSC / CyclinD2 から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を調製した。

B-2-5 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。それぞれ

れの遺伝子の 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, Cyclin D2 : Forward 5' -TACTTCAAGTGCGTGCAGAAGGAC-3' , Reverse 5' -TCCCACACTTCCAGTTGCGATCAT-3' , IGF2BP1 : Forward 5' -CAGAAGGGACAGAGTAACCAG-3' , Reverse 5' -GAGATCAGGGTTCCTCACTG-3' , p16 : Forward 5' -CACTCACGCCCTAAGC-3' , Reverse 5' -GCAGTGTGACTCAAGAGAA-3' , p21 : Forward 5' -TTGATTAGCAGCGGAACA-3' , Reverse 5' -GGAGAAACGGGAACCAG-3' , Bmi1 : Forward 5' -CTGATGTGTGTGCTTTGTGGAG-3' , Reverse 5' -GGTCTGGTCTTGTGAACTTGGA-3' である. MMP2 及び TGF- β 2 の RT-PCR には, 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) を用いた. また, 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を用いて行った. PCR 反応は, Light Cyler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) を用いて Roche Light Cyler (version 4.0) で行った.

B-2-6 細胞増殖速度の測定

Cyclin D2 及び IGF2BP1 強制発現 hMSC (hMSC/CyclinD2 及び hMSC/IGF2BP1) を 6,000 cells/cm² で 24 well plate (Corning) に播種し, 1 晩培養後, TetraColor ONE (生化学工業) を含む培地 (20 μ l/ml) に交換し, 2 時間培養した. 培養後, 培地上清を回収し, マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm (対照波長 : 600 nm) の吸光度を測定した.

B-2-7 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-2-8 染色体数測定

hMSC, hMSC/CyclinD2, Hs822.T, Hs863.T, RD-ES, SK-ES-1 をコルセミド (0.02 μ g/ml) で一晩処理し, トリプシンで細胞を回収した. 75 mM KCl 溶液で室温 20 分間低張処理したのち, カルノア液 (氷酢酸 : メタノール = 1 : 3) で 3 回固定した. 固定後の染色体をギムザ染色し, 分裂中期像を撮影して染色体数を計測した.

B-2-9 倫理面への配慮

本研究において用いたヒト骨髄由来間葉系幹細胞及び 4 種類の Ewing 肉腫は全て市販品であり, 国立医薬品食品衛生研究所「研究倫理審査委員会規程」により, 倫理的問題はないと判断された.

B-3 次世代シーケンサーを用いた細胞の遺伝的安定性評価指標の開発

B-3-1 使用した細胞株

・ヒト白血病細胞株 HL60 (RG)

国立医薬品食品衛生研究所, 細胞バンク (当時) より入手したヒト前骨髄球系白血病細胞株 HL60 細胞およびその増殖性変異株である HL60-RG 株を使用した. この細胞は既に染色体解析および CGH 法にて解析が行われ, myc 遺伝子の増幅を Double Minute (DM) 染色体および Homologous Staining Region (HSR) として持つことが知られている.

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

・ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 (hMSC)

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を継代を続けた。18-19 世代再培養し、凍結保存した細胞を使用した。

・ヒトリンパ芽球細胞株 TK6

国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部より入手。正常 p53 遺伝子を持ち、EB ウイルスにて不死化された細胞株で、thymidine kinase (TK) 遺伝子の変異をヘテロに持つことで、この遺伝子を指標とした突然変異の検出が可能となっている。細胞は 10% (v/v) 馬血清を含む RPMI-1640 培地 (Nacalai Tesque) にて培養。

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 $1-2 \times 10^6$ 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)

- 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°C 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。

B-3-3 ミトコンドリア DNA の抽出

細胞からミトコンドリア DNA のみを抽出するため、市販の BioVision Mitochondrial DNA Isolation Kit (フナコシ) を使用し、以下のプロトコールに従って抽出を行った。

1. $2-5 \times 10^7$ 個の細胞を集め、5-10 ml の氷 PBS にて洗浄し、600 x g, 5 分 4°C にて遠心分離し、上清を除いた。..
2. 細胞を 1 ml の 1X Cytosol Extraction Buffer に懸濁し、10 分間インキュベートした。..
- 3.. 細胞を氷冷した dounce tissue grinder に

て、50-100 回ピストルを上下させホモジナイズした。

4. ホモジネートを 1.5 ml のマイクロチューブに移し、700 x g 10 分間 4°C.にて遠心分離し、核および細胞の破片を沈殿させた。

5. 上清を新しい 1.5 ml のマイクロチューブに移し、10,000 x g 30 分 min, 4°C にて遠心分離し、ミトコンドリアを沈殿させた。

6. 上清を除き、ペレットを 1X Cytosol Extraction Buffer に懸濁し、再び 10000 x g 30 分, 4°C にて遠心分離し、ミトコンドリアをペレットとして分離した。

7. 上清を除き、ペレットを 30 μ l の Mitochondrial Lysis Buffer に溶かし、氷上で 10 分間静置した。

8. 5 μ l Enzyme B Mix を加えて 50°C の water bath にて 60 分間溶液が透明になるまでインキュベートした。

9. 100 μ l のエタノールを加え混合し、-20°C にて 10 分間放置した。

10. 微量高速遠心機にて最高スピードで 5 分間室温にて遠心分離した。

11. 上清を除き、沈殿したミトコンドリア DNA を 1 ml の 70 % エタノールにて 2 回洗浄し、残存するエタノールを完全に除いた後、5 分間風乾した。

12. DNA を 20 μ l の TE バッファーに溶解し、-20°C にて保存した。

B-3-4 次世代シーケンサーを用いたシーケンシ

B-3-4-1 ホールゲノムシーケンシ

シーケンシ用のサンプルは、Illumina TruSeq DNA sample preparation guide に従い、1 μ g のゲノム DNA を covaris system にて断片化し 300-400bp のインサートサイズを持つライブラリーを作成した。3'または 5'エンドにオーバーハングを持つ二本鎖 DNA フラグ

メントを End Repair Mix にて blunt end に変換して、3'末端に A を一塩基追加し、T を 3'末端に一塩基追加したアダプター配列とライゲーションした。ライゲーションプロダクトのうち約 300-400bp のインサートサイズを持つものを選択し、次のクラスター生成に用いた。こうしてエンリッチした DNA ライブラリーを用い、アダプター配列に相補的プライマーによる PCR にて増幅しシーケンシ解析用サンプルとした。Illumina HiSeq2000 シーケンサーにて、Sequencing-by-Synthesis 法にて、数百万のクラスターを持つフローセル内での独自の架橋増幅反応と一塩基伸長ごとのイメージングにより、各クラスターごとの配列情報を読み取った。

読み取ったデータを、BWA ソフトウェアにてヒトリファレンスゲノム UCSC hg19 に対してマッピングした。そして、SNP 等のリファレンスゲノムに対する変化を SAMTOOLS ソフトウェアを用いて解析した。

なお、シーケンシ解析に関しては、株式会社アプロサイエンスに委託した。

B-3-4-2 エクソンシーケンシ

ゲノム中のエクソン配列のみをシーケンシ解析に供するための前処理として、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 II x) を用いて、ペアエンド法により、断片化した DNA の両端のシーケンシを解析した。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シタグを付加した後、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-3-4-3 1分子シーケンサー

次々世代シーケンサーとして注目される Pacific Biosciences 社の PacBio RS 1 分子シーケンサーにより、ミトコンドリアゲノムの変異解析を行った。サンプルとしてミトコンドリア 2 本鎖 DNA を準備し、DNA を断片化、SMRTbell アダプター (ヘアピン状のアダプター) を 2 本鎖 DNA の両端に付加した。アダプターの一方の末端には、DNA 合成開始に必要なプライマーが付加されており、PacBio RS ではシーケンスセル (SMRT Cell) 内において、1 分子の DNA ポリメラーゼは、ライブラリーの SMRTbell アダプターに結合し、DNA 配列を順に合成する。合計 150,000 の ZMW(穴)があり、この中で、1 分子の DNA ポリメラーゼによる DNA 合成を行う。右図は、ZMW の拡大図。穴の下方に固定されているものが、1 分子の DNA ポリメラーゼが ZMW の底部に固定され、ヌクレオチドが取り込まれるときに、リン酸についての蛍光が自動的に切り離され、そのときレーザーで励起されて、A,T,G,C に特徴的な波形データが得られる。これらの反応をリアルタイムに継続的に動画として記録し、配列を解析する。

B-3-5 TK6 細胞に対する変異原処理と突然変異解析

ミトコンドリアのシーケンス解析に向けて、バックグラウンドのバリエーションを抑える目的で、実験への使用に先立って、細胞のクローニングを行った。シングルコロニーを単離して、必要な細胞数にエクスパンドした後、実験

に使用した。

(変異原処理)

Control

ガンマ線 2Gy (RS (survival) 10%を予想)

ガンマ線 3Gy (RS: 1%予想)

MMS 6 ug/ml (0.05 mM) (RS: 5%予想)

ENU 12ug/ml (0.1 mM) (RS: 5%予想)

B-3-6 倫理面への配慮

Lonza 社の hMSC はヒト由来細胞であるが、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該当品目ではなかった。

B-4 分化プロペンシティを指標とした細胞特性解析法の開発

B-4-1 細胞培養

本研究では、9 株のヒト正常細胞由来 iPS 細胞株 (201B7, 253G1, ATCC-DYR0100, ATCC-HYR0103, mc-iPS, HiPS-RIKEN-1A, HiPS-RIKEN-2A, HiPS-RIKEN-12A および Tic) を用いた。201B7, 253G1, HiPS-RIKEN-1A, HiPS-RIKEN-2A および HiPS-RIKEN-12A は理研バイオリソースセンターより入手した。ATCC-DYR0100 および ATCC-HYR0103 は ATCC より入手した。mc-iPS は System Biosciences より入手した。Tic は医薬基盤研究所より入手した。iPS 細胞作製に用いたヒト正常細胞およびその iPS 細胞作製法は Table 4-1 で示した。フィーダー細胞を用いた iPS 細胞培養は、マイトマイシン C 処理した SNL 細胞 (マウス線維芽細胞 STO 株にネオマイシン耐性遺伝子および LIF を発現させた細胞) 上において、4 ng/ml ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF, 和光純薬) を添加したヒト ES 細胞培地 (リブロセル) 中で培養することにより行った。フィーダーレスによる iPS 細胞培養は、マトリゲル

(BD バイオサイエンス) でコートを行ったデ
ッシュ上において, mTeSR1 培地 (STEMCELL
Technologies) で培養することにより行った。
未分化な細胞コロニーは, CTK 溶液 (リプロ
セル) および STEMPRO EZPassage (インビト
ロジェン) を用い, 100 μ m セルストレイナー
(BD バイオサイエンス) を通過させた細胞塊
(クランプ) として, 5~6 日ごとに継代した。
すべての細胞株は, 5%CO₂-95%Air, 37°C の条
件で培養し, 培地交換は毎日行った。

B-4-2 ヒト iPS 細胞から胚葉体の調製

iPS 細胞からの胚葉体の調製は, Bock ら (Cell.
2011; 144: 439-52.) の方法に従った。フィーダ
ー細胞上で培養した iPS 細胞を CTK 溶液で剥
離し, 20%KSR (Knockout Serum Replacement,
インビトロジェン) を含む分化培地
[KO-DMEM (インビトロジェン), 0.1 mM 非
必須アミノ酸, 0.2 mM L-グルタミン酸, 0.1%
2-メルカプトエタノール, 100 U/ml ペニシリ
ン, 100 μ g/ml ストレプトマイシン] で懸濁し
た。ゼラチンコートディッシュ (イワキ) 上で
37°C で 1 時間培養し, フィーダー細胞を付着
させた後に, iPS 細胞を超低接着プレート
(Ultra-Low Attachment, コーニング) 上で
37°C, 16 日間培養し, 胚葉体を形成させた。
培地交換は 2~3 日ごとに行った。

B-4-3 RNA 抽出

未分化 iPS 細胞および胚葉体からの RNA 抽
出は, RNeasy Mini Kit (キアゲン) と QIAcube
(キアゲン) を用いて, プロトコールに従って
行った。RNA の濃度は 260 nm の吸光度を測定
することにより算出した。RNA の品質評価は,
RNA6000 ピコキット (アジレント・テクノロ
ジー) と 2100 バイオアナライザー (アジレン
ト・テクノロジー) を用いて, 28S と 18S のリ
ボソーム RNA 比率を算出することにより行っ

た。

B-4-4 定量的 PCR

胚葉体から抽出した RNA の逆転写反応は,
High Capacity RNA-to-cDNA Kit (アプライドバ
イオシステムズ) を用いて, プロトコールに従
って行った。1 μ g total RNA から合成した cDNA
を TaqMan Gene Expression Master Mix (アプラ
イドバイオシステムズ) と混和し, Bock ら (Cell.
2011; 144: 439-52.) の報告を参考にして選択し
た 192 種類の遺伝子をターゲットとする
TaqMan プローブとプライマーの入った 384 ウ
ェル TaqMan Array Micro Fluidic Cards (アプラ
イドバイオシステムズ) にアプライした後,
7900HT Fast Real-Time PCR System (アプライド
バイオシステムズ) を用いて duplicate で測定
した。PCR 条件は, 50°C, 2 min; 94.5°C, 10 min;
97°C, 30 sec, 59.7°C, 1 min, 40 cycles で行っ
た。発現量の補正は GAPDH により行い, $\Delta\Delta C_T$ 法
(Livak と Schmittgen Methods. 2001; 25:402-8.)
により相対的な遺伝子発現量を算出した。

B-4-5 マイクロアレイ解析

未分化 iPS 細胞より抽出した RNA のビオチ
ンラベル化 cRNA 合成は, GeneChip 3'
IVT Express Kit (アフィメトリックス) を用い
てプロトコールに従って行った。すなわち total
RNA から T7 プロモーター配列を含む 2 本鎖
cDNA 合成を行い, *in vitro* 逆転写反応により
cDNA を鋳型としたビオチンラベルされた
cRNA を合成した。その後, ハンマーヘッド反
応を利用したカルシウムランダム分解により,
~100-120 nt の RNA 断片を作製した。GeneChip
アレイ (Human Genome U133 Plus 2.0, アフィ
メトリックス) に作製したビオチンラベル化
cRNA をハイブリダイズさせ, Fluidics Station
450 (アフィメトリックス) により洗浄とフィ
コエリスリン染色を行った。その後, GeneChip

Scanner 3000 7G (アフィメトリックス) を用いて GeneChip アレイの蛍光画像のスキャンを行った。得られた蛍光強度のデータは Expression Console Ver. 1.1 (アフィメトリックス) で解析し、MAS5 発現分析アルゴリズムを用いて MASK ファイルを使ったスケールリングを行った。マイクロアレイ解析は、各細胞株群あたり 6 サンプルで行った。

C. 研究結果

C-1 新規免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験法の開発：NOG ヘアレスマウスにおける HeLa 細胞の増殖性

HeLa 細胞群および Hela 細胞+マトリゲル群の何れにおいても NOG ヘアレスマウスにおける結節形成数 (割合) は NOG マウスのそれよりも低い傾向にある (Table 1-1)。

また、結節形成開始時期についても、NOG ヘアレスマウスは HeLa 細胞群および Hela 細胞+マトリゲル群の何れも NOG マウスよりも遅い傾向がみられている (Fig. 1-1)。

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

Cyclin D2 及び IGF2BP1 発現組換えレンチウイルスベクターを作製し、hMSC に感染させた。感染後の hMSC から total RNA を抽出し、RT-PCR 法によって Cyclin D2 及び IGF2BP1 の発現量を測定した。その結果、Cyclin D2 は約 10,000 倍、IGF2BP1 は約 2 倍、発現が上昇していた (図 2-1)。また感染後の細胞形態を位相差顕微鏡で観察した所、hMSC/Puro 及び hMSC/Neo, hMSC/IGF2BP1 は、感染前の細胞と形態は変わっていなかったが、hMSC/CyclinD2 の細胞形態は小さくなっていた (図 2-2)。次に Cyclin D2 及び IGF2BP1 の強制発現によって細胞の増殖速度が変化するか調べた。その結果、hMSC/CyclinD2 は hMSC/Puro よりも明らか

に増殖速度が上がっていた (図 2-3)。一方、hMSC/IGF2BP1 の増殖速度は hMSC/Neo と比べ大きな変化はなかった。

Cyclin D2 発現組換えレンチウイルスベクター感染 14 日後の hMSC の total RNA を抽出し、細胞周期に関わる遺伝子 (p16, p21, Bmi1) 及びがん細胞の転移に関わる遺伝子 (MMP2) の発現変化を調べた (図 2-4)。Cyclin D2 導入 14 日後では p16, p21 遺伝子の発現に大きな違いは見られなかった。一方、Bmi1, MMP2 遺伝子の発現は Cyclin D2 導入細胞で低くなっていた。hMSC を長期 (3 ヶ月) にわたり培養し、その間、2 週間毎に total RNA を抽出して細胞周期に関わる遺伝子 (p16, TGF- β 2) の発現変化を RT-PCR 法により測定した (図 2-5)。その結果、hMSC/CyclinD2 及び hMSC/Puro とともに継時的に p16 の発現が上昇したが、hMSC/CyclinD2 の方がその上昇率は高かった。一方、TGF- β 2 の発現は全ての培養期間で hMSC/CyclinD2 の方が低かった。Cyclin D2 強制発現により遺伝子の発現にどんな変化が起こっているか網羅的に調べるために、hMSC/CyclinD2 及び hMSC/Puro から total RNA を抽出し、mRNA のマイクロアレイ解析を行った。Cyclin D2 の導入によって発現レベルが有意に変化した遺伝子群が、それぞれどのような生体機能に関わるのかについて、IPA にて解析したところ (表 2-2, 2-3)、がんに関わる遺伝子に影響を及ぼしており、細胞の移動、細胞成長及び増殖、細胞形態に関わる遺伝子にも影響があった。

Cyclin D2 の高発現による染色体への影響を調べるため、hMSC/CyclinD2 および、Ewing 肉腫細胞の染色体数を測定した。hMSC/CyclinD2 及び Hs822.T, Hs863.T は hMSC と同様に 46 本にピークを示す分布を示した (図 2-6)。一方、RD-ES 及び SK-ES-1 ではそれぞれ 68 本、50 本にピークを示した (図 2-6)。

これまでに、コンフルエントになり接触阻害

を受けている時や血清飢餓の状態の際、繊維芽細胞では Cyclin D2 の発現を上げて、細胞の増殖を抑えることが報告されている⁴⁾。そこで、hMSC は接触阻害を受けている時に Cyclin D2 の発現が上昇するか調べたところ、以前の報告と同様に、細胞がコンフルエントになり接触阻害が起きている培養 6 日後で Cyclin D2 の発現が上昇していた (図 2-7)。次に、Hs822.T 及び Hs863.T についても調べたところ、接触阻害が起こる前から Cyclin D2 の上昇しており、その上昇率も高かった (図 2-7)。

C-3 次世代シーケンサーを用いた細胞の遺伝的安定性評価指標の開発

C-3-1 ホールゲノムシーケンス解析による細胞の品質評価

遺伝子変異や欠失と増幅を含めたコピー数変化、さらには遺伝子転座等の染色体異常といったゲノムの異常を、どの程度シーケンス解析により検出できるかを確かめる目的で、既に SNP アレイを用いた CGH 解析等により、遺伝子変異および増幅の起きている場所に関する詳細な情報を得ている HL60-RG 細胞を用いて、ホールゲノムシーケンス解析を行った。

イルミナ HiSeq2000 シーケンサーにて 100bp リード 2 回のランにて読み取られたリード数は約 17.5 億で、塩基数としては 1767 億 bp に達した。ヒトのゲノムは約 30 億塩基対であるため、平均重複度は約 60 となった。重複度 (sequence depth) の分布を図 3-1 に示す。

得られたシーケンスデータをヒトリファレンスゲノム hg19 に対してマッピングした結果、最終的にマップ可能であったリードの割合は全体の 93.1%と良好であり、リファレンスゲノム上の 99.2%をカバーできた。ベースコールにある程度の信頼度を持つ重複度を 10 とした場合のカバー率は 98.9%であった。よ

って十分な情報が得られなかったのはゲノム上わずか 1%程度であり、遺伝子上のエクソン配列に関してはほぼ網羅できていると考えられる。

SAMTOOLS ソフトウェアを用いてリファレンスゲノムからの変異を検出した結果、SNP の総数として 3,545,099 個、Indel (インサクションおよびデリーション) の総数 565,658 個、合計約 400 万箇所が抽出された。これらは、重複度 10 以下の信頼度の低い変化も含むため、一定の基準を設けてさらに吟味を行う必要があると考えられる。SAMTOOLS による SNP quality のスコアが参考になると考えられるが、暫定的には、ホモ SNP の場合アレルあたり 10call 以上、変異率 8 割以上あれば確実でありと考えている。また、ヘテロ SNP の場合には、15 call 以上、変異率 4-6 割程度が妥当であると考えられる。

HL60 細胞には、ガン関連遺伝子に関する変異がすでいくつか報告されている。これらが、ホールゲノムシーケンスで検出できたかどうかを検証してみた。塩基対置換の例として CDKN2A((p16)遺伝子、および NRAS 遺伝子に関する結果を表 3-1 に示した。それぞれ、26 および 49 の重複数で 100%が変異塩基 call であり、変異が確認できた。CDKN2A 遺伝子の場合、報告では Homo 変異であり今回の結果と一致していたが、NRAS 遺伝子の場合には、報告では Hetero であったが、今回の結果は Homo になっていた。これは、今回用いた HL60-RG 細胞株がオリジナルな HL60 細胞から派生した増殖性を示す subline であることに起因している。これまでの SNP アレイを用いた検討により、RG 細胞株では 1 番染色体で uniparental disomy が起きており、染色体全体において LOH が起きていることがわかっていたが、それを反映して 1 番染色体で観察された SNP および Indel は基本的に全て Homo で

あり, uniparental disomy が確認できた. RG 細胞株にて残った側のアレルは NRAS 変異を持っており, 機能的に細胞の増殖性獲得との関連性が示唆された.

その他の部分の SNP と Indel については, 重複度は異なるものの, homo アレルに関してはほぼ 100% で Call が一致しており, シークエンス解析の正確性がかなり高いことがわかった. これを, サイズの最も小さい 22 番染色体を例に染色体全体に関して検証してみると, 図 3-2 に示すように, Homo call では約 95% が 100% の一致率を示しており, 90% 以上の一致を示したものは約 95% であった. 一方, hetero call の SNP サイトに関しては, 変異 Call の割合を調べたところ, 図 3-3 に示すように, 50% を中心に均等に分布しており, 4 から 6 割の間に全体の 83% のデータが存在した.

次に, Homo call において 1 または 2 の別塩基コールがされた場合をシークエンスエラーと仮定した場合, この頻度は 22 番染色体全体において $2013/1039162=1.9\%$ であり, 約 2% のエラー率であった. この程度のエラー率の場合, 重複度 10 で読んだ際に, 8 割以上ミスコールする確率は計算上 $(0.02)^8 \times (0.98)^2 \times 10C_2 + (0.02)^9 \times (0.98) \times 10C_1 + (0.02)^{10} = \text{約 } 10^{-12}$ となり, ゲノム全体の 3×10^9 塩基中ほぼ 0 となる. 同じく, hetero SNP を仮定して, 10 リード中 4 から 6 リードミスコールをする確率は, $(0.02)^4 \times (0.98)^6 \times 10C_4 + (0.02)^5 \times (0.98)^5 \times 10C_5 + (0.02)^6 \times (0.98)^4 \times 10C_6 = 3 \times 10^{-5}$ となり, 無視できない数となる. 重複度を 20 に増やして 4 から 6 割とすることで, この確率は 2.5×10^{-9} になり, ゲノム上 1 未満に押さえられることになる.

次に, このシークエンスリードの重複度を指標として, CGH 的にコピー数の変化を検出できるかどうかを検証した. HL60 細胞に関しては, すでに報告されているようにガン遺伝子

c-myc の増幅があることがわかっているが, この遺伝子増幅はシークエンス変化を伴わないため, リファレンスゲノムからの変化としては検出されなかった. ただし, リード数は遺伝子の存在量を反映するため, 8 番染色体の c-myc 領域に関して, 検出された SNP と Indel のリード数の変化をプロットした. その結果, 図 3-3 に示すように, 従来 CGH アレイ等で得られていたのと同様に, 複数の領域にまたがった遺伝子の増幅領域が再現できた. これにより, シークエンス解析データは CGH 解析として利用可能であることがわかった.

さらに, この遺伝子増幅領域に関しては, 図 3-4 に示すように, 複数の増幅領域が複雑につながり合ったリアレンジメントが起きていることが確かめられているが, 通常の解析においてはシークエンスの変化として検出できなかった. 転座タイプの変異の場合には, 読まれた断片のアラインメントの際に, リファレンスゲノムにアラインすることが難しいと考えられ, アラインメントができない断片となったことが予測される. こうした, アラインメントが付かないフラグメントに注目し, 独自のアルゴリズムによる転座配列の解析法の開発が必要であると考えられる. 今後 Raw data の利用により, 転座配列のジャンクションの確認を行いたい.

HL60 細胞は p53 遺伝子の欠失変異をホモに持つが, 通常のシークエンス解析においては, 欠失領域が大き過ぎるため deletion 変異としては検出できなかった. 比較的大きな挿入欠失変異に対しては CNV の解析からのアプローチが必要である. 特に, ヘテロ欠失の場合には現存する正常アレルの影響によって, 変化なしと判断される可能性が高い. 1/2 のコピー数を正確に検出できるデータ量, および解析アルゴリズムが必要となる.

C-3-2 エクソンシークエンスの利用

HL60 細胞に関しては、ホールエクソンシークエンス解析も行ったが、データが間に合わなかったため、以前に行った hMSC のホールエクソン解析の例を引用して、その利用法に関して考察を加えることにした。用いた hMSC 細胞に関しても、遺伝子増幅や転座などのリアレンジメントがあることがわかっていたが、エクソンシークエンスの結果からは、それらを完全に反映することは難しかった。これは、エクソンのみではゲノムの数パーセントを読むに過ぎないことから来る必然的な限界であり、エクソンシークエンスとしては、既存遺伝子の SNP および突然変異の検出という、遺伝子機能に根ざした利用法に重きが置かれると考えられる。検出された変異は遺伝子の機能に直結するため、細胞の機能的変化を解析する上では効率が良い。また、ゲノムワイドな遺伝子不安定性を検出する目的において、指標遺伝子として利用することを考える場合には、たとえ数パーセントでも十分に利用価値はあるといえ、そうした利用法も考慮できる。ただし、ホールゲノムシークエンスの場合も含め、通常の次世代シーケンサーから得られるシークエンス情報は、全体のポピュレーションのマジョリティーを反映するものであり、遺伝的不安定性の誘発によりマイナーな変異が頻発した場合であっても、それを検出することが難しいと予想される。変異として検出されるためには、シークエンスの重複度にも依存はするが、通常重複度 50 程度でシークエンスをする場合には、シークエンスエラーの可能性を考慮すると、変異として確定するためには最低 5 程度のリード数 (10%) が必要であり、ヘテロ変異の場合には、その倍即ち細胞のポピュレーションとして 2 割程度は必要であると考えられる。この感度を高めるためには、遺伝子を限定して重複度を増やしたディープシークエンスが必要となる。

ただし、その場合にも、シークエンス解析の前処理に PCR 反応を用いる場合には、そのエラーレベルがバックグラウンドノイズとり、感度的限界となる。そこで、その対策としては、PCR 反応を解さず直接シークエンス解析が可能な、1 分子シークエンサーの利用が必要となる。

C-3-3 1 分子シークエンサーを利用した高感度変異検出系の確立

DNA シークエンサーによる高感度な変異検出法の確立に向け、細胞あたりのコピー数、ゲノムサイズ、変異感受性という観点から、ミトコンドリアゲノムを標的として解析を行うことにした。通常のゲノム遺伝子はコピー数が 2 のため、 10^6 レベルの感度を達成するためには、少なくとも 10^7 レベルの細胞数が必要となる。ミトコンドリアは細胞内に数百から数千コピー存在し、1つのミトコンドリア内に複数個のミトコンドリア DNA が存在するため、少量の細胞で十分なターゲット数を確保できるという利点がある。

このミトコンドリアを用いた 1 分子シーケンサーによる変異検出法の感度を従来の一般的な突然変異検出法と比較する目的で、tk 遺伝子を用いた突然変異試験に用いられている TK6 細胞を用いた検討を行うことにした。

モデル変異原として、欠失形の変異を主に誘発するガンマ線および点突然変異を誘発するアルキル化剤 Ethyl nitrosourea (ENU) および Methyl methanesulfonate (MMS) を用い、TK6 細胞を処理した後、通常の突然変異試験を行うとともに、その過程において処理した一部の細胞をエクスパンドし、ミトコンドリア DNA を抽出した。

TK6 遺伝子当然変異試験の結果を図 3-5 に示す。いずれの処理においても tk 遺伝子の変異頻度の有意な上昇が観察された。ENU に関しては予想された細胞毒性よりはやや弱かつ

たが、変異誘発率は最も高かった。Deletion タイプの変異の誘発の指標となる Slow growth の変異体の割合に関しては、コントロールの 50.4%に対して、ガンマ線処理の場合はいずれも 100%であり、大きな欠失型の変異が主に誘発されていることが確認できるとともに、ENU と MMS の場合にはそれぞれ 25.8%および 13.8%と低い値を示し、主に点突然変異が誘発されていることが確認できた。

TK6 細胞より抽出したミトコンドリア DNA から PacBio RS シークエンサー解析のためのライブラリーを作成したが、良好なライブラリーが作成できなかった。使用したサンプル DNA がゲル上で低分子化していることが確認され、抽出した DNA の品質に問題があることがわかった。現在、DNA 抽出法を含めて、細胞から高品質なミトコンドリア DNA の抽出プロトコールに関して検討を行っている。

PacBio RS シークエンサーにおいては、直線的に比較的長い配列を読み取る方法と比較的短めのインサートを用いて鋳型を環状にして、繰り返しシーケンスを読み取ることによりエラー率を下げる方法とが存在するが、本研究のためには、後者の方法が必須となるため、インサートサイズを下げ、シーケンスの重複度を上げる方向でのライブラリー作成を行うこととした。

C-4 分化プロペンシティを指標とした細胞特性解析法の開発

C-4-1 iPS 細胞株の分化プロペンシティ

多能性幹細胞を三胚葉へ自発的に分化させるために、浮遊条件下で細胞を凝集させ胚葉体 (embryoid body) を形成させる方法が広く行われている。また胚葉体形成は初期の *in vivo* 胚発生を模倣するモデルとしても用いられる。内胚葉は消化管、肺、膵臓、肝臓などを、中胚葉は筋肉、心臓、血液、骨などを、外胚葉は脳、

皮膚などを形成することが知られている。

ヒト iPS 細胞株 9 株を、血清の代わりに KSR を用いた無血清培地と超低接着プレートで 16 日間培養し、胚葉体を形成させた。胚葉体で発現した内胚葉マーカー遺伝子 21 種類、中胚葉マーカー遺伝子 45 種類、外胚葉マーカー遺伝子 37 種類の mRNA 量を定量 PCR で測定した。測定した遺伝子は、Table 4-2 に示した。これらの遺伝子の発現量は、内胚葉マーカー (Fig. 4-1)、中胚葉マーカー (Fig. 4-2)、外胚葉マーカー (Fig. 4-3) すべてにおいて、iPS 細胞株間で大きく異なっていた。これらのことは、以前の報告と同様にヒト iPS 細胞の三胚葉への分化プロペンシティは細胞株によって大きく異なることを示している。また一方で、同じ胚葉のマーカーであっても、細胞株間の発現パターンが異なることが観察された。内胚葉マーカーで見ると、胚体内胚葉 (definitive endoderm) マーカーである CDH2, CTNNB1, FOXA2, GATA4, HNF1B, SOX17 において、細胞株群の発現量パターンがこれらの遺伝子で一致するわけではないことも示された。中胚葉マーカーにおいても、初期中胚葉 (early mesoderm) マーカーである BMP2, CD34, CDH2, EOMES, FOXC1, MIXL1, NODAL, TWIST1 で細胞株間での発現パターンは一致していなかった。外胚葉マーカーにおいても同様に、初期外胚葉 (early ectoderm) マーカーである GBX2, NES, NOG, NOTCH, OTX2, PAX6, TUBB3 で細胞株間での発現パターンは一致していなかった。これらの細胞株間での発現パターンの違いは、マーカー遺伝子間における発現制御の時間的な違いおよび発現部位特異性の違いによるものだと考えられる。

測定した三胚葉マーカー遺伝子は多種類にわたるため、一見しただけでは細胞株の分化プロペンシティを判断できない。そこで、多変量の資料からエッセンスとなる少数の変量を合

成し分析するという主成分分析の手法を用いて、データ解析を行った。各細胞株の三胚葉マーカー遺伝子 76 種の発現量の平均値を、遺伝子ごとに標準化 (z スコア化) し、主成分分析に用いた。主成分分析の結果、寄与率 34.7% の第 1 主成分、寄与率 23.7% の第 2 主成分、寄与率 13.4% の第 3 主成分が算出され、第 1 主成分、第 2 主成分と第 3 主成分の累積寄与率が 71.8% となった (Fig. 4-4)。

変量プロットを見ると、第 1 主成分が正と負に分かれていることが観察される。第 1 主成分の変量の係数が正の遺伝子数は 49 あり、内胚葉マーカーが 13、中胚葉マーカーが 35、外胚葉マーカーが 19 である。一方で、第 1 主成分の変量の係数が負の遺伝子数は 27 あり、内胚葉マーカーが 4、中胚葉マーカーが 9、外胚葉マーカーが 22 である。中胚葉マーカーにおいて正の係数を示す遺伝子数が負の係数を示す遺伝子数の 4 倍程度となっていることから、第 1 主成分においては主に中胚葉マーカー遺伝子の係数が正に出ていることが明らかになった。さらに興味深いことに、外胚葉マーカーで負の係数を持つものを見ると、前述した初期外胚葉マーカーである GBX2, NES, NOG, NOTCH, OTX2, PAX6, TUBB3 がすべて負の変量係数を示している。すなわち細胞株の第 1 主成分得点は、中胚葉への正の分化プロペンシティおよび初期外胚葉への負の分化プロペンシティの指標となっている (Table 4-3)。iPS 細胞株の第 1 主成分得点を算出し、高い順に並べると、HiPS-RIKEN-2A, ATCC-HYR0103, ATCC-DYR0100, HiPS-RIKEN-12A, 201B7, Tic, HiPS-RIKEN-1A, 253G1, mc-iPS の順となった。これらの結果は、HiPS-RIKEN-2A は中胚葉系の細胞に分化しやすく、mc-iPS は中胚葉系の細胞に分化しにくいことを示唆している (Table 4-4)。

第 2 主成分において細胞のシグナル伝達に

関わる変量の係数が大きい遺伝子として、NOTCH (0.92), NOG (0.909), FAS (0.858), BMP2 (0.709), CTNNB1 (0.684) が挙げられる。NOTCH は Notch シグナル、NOG と BMP2 は BMP シグナル、FAS は Fas シグナル、CTNNB1 は Wnt/ β -catenin シグナルの中心的な因子である。これらのシグナル伝達は、細胞の分化において非常に重要な役割を果たしていることが知られている。したがって第 2 主成分得点は、分化に関わる細胞のシグナル伝達の活性化の程度を表していると考えられた (Table 4-3)。iPS 細胞株の第 2 主成分得点を算出し、高い順に並べると、HiPS-RIKEN-1A, 201B7, HiPS-RIKEN-2A, 253G1, mc-iPS, ATCC-HYR0103, HiPS-RIKEN-12A, ATCC-DYR0100, Tic の順となった。HiPS-RIKEN-1A は分化に関する細胞シグナルがより活性化されており、一方で Tic はより不活性化されている可能性がある (Table 4-4)。

第 3 主成分では変量の係数の上位 10 遺伝子において、内胚葉マーカーが 2、中胚葉マーカーが 3、外胚葉マーカーが 8 含まれている。多く含まれている外胚葉マーカーに着目すると、転写因子である SOX10, SOX9, SNAI2 は神経堤細胞のマーカー遺伝子である。神経堤細胞は、外胚葉由来の脊椎動物に特異的に存在する多能性細胞であり、移動した後に末梢神経、腸神経、グリア細胞、色素細胞、平滑筋細胞、頭部骨格などに分化することから「第 4 の胚葉」とも呼ばれている。興味深いことに、神経堤細胞分化のマスター制御因子として報告されている FOXD3 は逆に最も値の低い変量の係数を示した。また神経堤細胞は形成後に上皮間葉転換 (EMT) し、移動を始めるという特徴を有する。変量の係数の上位 10 遺伝子に含まれる FOXA2, GATA3, CDX2 は、EMT の負の制御因子であることが報告されており、これらの因子が神経堤細胞からの分化に何らかの影響を

与えていることが考えられた。総合的に勘案すると、第3主成分得点は神経堤細胞の形成度の指標と考えられる (Table 4-3)。iPS 細胞株の第3主成分得点を算出し、高い順に並べると、HiPS-RIKEN-12A、HiPS-RIKEN-1A、ATCC-HYR0103、201B7、ATCC-DYR0100、253G1、mc-iPS、Tic、HiPS-RIKEN-2A の順となった。以上の結果より、HiPS-RIKEN-12A でより神経堤細胞が形成されやすく、HiPS-RIKEN-2A でより形成されにくいことが示唆された (Table 4-4)。

C-4-2 iPS 細胞株のマイクロアレイ解析

iPS 細胞株 9 株 (n=6) の網羅的な遺伝子発現解析を、probe set 数 54,675 の HG U133 Plus 2.0 を用いて行い、既にすべてのジーンチップデータを採取した。今後これらのジーンチップデータを用いて iPS 細胞株間で統計的に有意な差のある probe set の中で分化プロペンシティとの相関の高い遺伝子群を絞り込む予定である。

D. 考察

D-1 新規免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験法の開発

試験を終了していないため、考察は尚早。

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

Cyclin D2 は細胞増殖などを制御する Cell Cycle に関わる遺伝子の 1 つであるが、がん細胞や悪性度の高い腫瘍などでは、その発現が上昇している事が報告されている⁵⁻¹¹⁾。一方で、Cyclin D2 の発現により細胞増殖が止まるという報告⁴⁾や Cyclin D2 遺伝子のサイレンシングによりがん化が進行するという報告¹²⁻¹⁶⁾もあり、細胞によって Cyclin D2 の働きも変わると考えられている。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も関わるが、肺がん患者の腫瘍の悪性度の上昇とともに発現が上がると報告されている¹⁷⁾。本研究では、hMSC と Ewing 肉腫を用いた遺伝子発現の網羅的解析により Ewing 肉腫で発現が高い事が明らかとなった Cyclin D2 及び IGF2BP1 が hMSC のがん化のマーカーとしての妥当性について検討した。

Cyclin D2 を強制発現させると hMSC の細胞大きさは小さくなり、増殖が亢進した (図 2-2, 2-3)。しかし、その増殖は 1 ヶ月程度で止まり、無限増殖化には至らなかった (data not shown)。遺伝子発現の網羅的解析により、細胞増殖などに関わる遺伝子の発現が有意に変化していた事 (表 2-2, 2-3) から、Cyclin D2 は hMSC では細胞増殖に正に関与する事が明らかとなった。我々は以前、TGF- β 2 の発現抑制により hMSC の増殖能力が維持されると報告した¹⁸⁾。hMSC/CyclinD2 は hMSC/Puro より、TGF- β 2 の発現が低かった事から、Cyclin D2 の強発現により、TGF- β 2 の発現が抑えられた事が増殖の亢進に寄与した可能性も考えられた。しかし、hMSC/CyclinD2 は hMSC/Puro よりも細胞の老化とともに発現が上昇する p16 遺伝子の発現上昇率が高く、このため、無限増殖には至らなかったと考えられる。

IGF2BP1 は組換えレンチウイルスベクターで強制発現させたにも関わらず、RT-PCR による mRNA の定量の結果、2 倍程度しか発現が上昇していなかった (図 2-1)。同時に行った Cyclin D2 では 10,000 倍程度上昇していた事から、IGF2BP1 の強制発現は何らかの問題があったと考えられる。IGF2BP1 遺伝子を組み込んだプラスミドで形質転換した大腸菌は明らかにその増殖が悪かった (data not shown)。これらの事実から、IGF2BP1 の強発現は生体に何らかの悪影響を及ぼすと考えられた。Ewing 肉腫は IGF2BP1 の強発現を許容できるように変化し、がん化した可能性がある。今