

後, IGF2BP1 強発現 hMSC の長期培養等により, 細胞を馴化し, IGF2BP1 の発現を許容できる細胞が現れないか調べる予定である。

Cyclin D2 の強制発現によって hMSC の染色体数に変化は見られなかった (図 2-6)。このことから, Cyclin D2 の発現により大きな染色体異常は起こらないものと考えられる。また, 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 も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。RD-ES と SK-ES-1 は染色体レベルでの異常が確認できた。

ヒト正常繊維芽細胞では接触阻害や血清飢餓状態になると Cyclin D2 の発現を上げ, 細胞増殖を止めると報告された [1]。つまり, Cyclin D2 は繊維芽細胞では細胞増殖に対して負に働くと考えられる。一方, 本研究では, hMSC では Cyclin D2 は細胞増殖に正に働く事が明らかとなったので, 過去の報告の様な結果は得られないと考えられた。しかし, 接触阻害がかかっていると考えられる細胞密度の時に Cyclin D2 の発現が上昇していた。この理由については, 現在不明であるが, Hs822.T 及び Hs863.T では接触阻害がかかる前の細胞で Cyclin D2 の発現が上昇していた。またその発現上昇率も高かった。hMSC や Hs822.T, Hs863.T では接触阻害には関係なく, 細胞播種後の培養皿に接着した時から Cyclin D2 の発現が上昇し, 細胞増殖を亢進させるのかもしれない。また, 接触阻害時の増殖阻害には別の因子の関与も示唆された。

今後, Cyclin D2 と IGF2BP1 の hMSC の無限増殖化について検討するため, IGF2BP1 の発現を許容できる細胞獲得を目指す。また, その細胞に Cyclin D2 を導入する事で p16 遺伝子等の制御が効かなくなった細胞が得られないかについて検討する予定である。

D-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

DNA シーケンサーによる細胞の遺伝的安定性の評価に関して基礎的検討を行った。シーケンス解析の正確性に関しては, 次世代型のシーケンサーは複数リード間のベースコールの一致率が高く, 予想以上のパフォーマンスを示した。従来型のシーケンサーでは, 波形として判定が付きにくいケースも経験していたが, 次世代シーケンサーの場合には, デジタルデータを重複して読み取ることによりデータの信頼度は増している。今回得られたエラー率より, 概ね 10 以上の重複度を持って同じベースコールがされれば, ほぼ正確な結果が得られたと考えてよい。

D-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

本研究では, 多能性幹細胞であるヒト iPS 細胞 9 株から分化培地において胚葉体を形成させ, 76 種の三胚葉マーカー遺伝子の発現を定量し, それらの値を基に主成分分析を行い, 細胞株の分化プロペンシティを主成分得点として数値化した。変量の係数の絶対値が大きい遺伝子の機能により, 第 1 主成分得点は中胚葉への分化の指標, 第 2 主成分得点は細胞の分化シグナルの活性化の指標, 第 3 主成分得点は神経堤細胞形成の指標となることが示唆された。これらの主成分得点における細胞株の順番は, 第 1, 2, 3 主成分間で大きく異なっていた。このように, ヒト iPS 細胞は細胞株によってある系譜の細胞への分化プロペンシティが違うことが我々の研究においても示された。しかしながら本研究の真の目的は, 分化プロペンシティを指標とした細胞特性解析法を開発し, 細胞株の分化プロペンシティを未分化の細胞株の解析から適切に予測することである。したがって, 同時に行った未分化 iPS 細胞株のマイクロア

レイ解析データを用いて、細胞株間の発現量と分化プロペンシティと相関する遺伝子を絞り込み、分化予測マーカーとして適切かどうかの検討を今後行っていく必要がある。

ヒト iPS 細胞の目的細胞への分化・精製に要する時間は、目的細胞の種類や分化誘導法によって様々である。網膜色素上皮細胞の場合は約 100 日間、ドーパミン産生神経細胞の場合は約 40 日間、心筋細胞の場合は約 30 日間の日時を要することが知られている。収量や分化効率の観点から再生医療に用いる原材料として最適な iPS 細胞株を選別する際に、すべての候補となる iPS 細胞株を凍結ストックから数代継代し、目的細胞に分化させるのには時間・労力が必要となる。仮に細胞株の分化プロペンシティが予測できるのなら、保存した未分化細胞の RNA から分化予測マーカー遺伝子を定量し、必要な細胞株のみを起こせば良いと考えられる。世界中で臨床応用のための iPS 細胞株や ES 細胞株のストック化が進められており、本研究は今後さらに重要性が高まると予想される。

E. 結論

E-1 新規免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験法の開発

NOG ヘアレスマウスは従来の NOG マウスと比較して、目視・触診による腫瘍形成の検出がはるかに容易であり、造腫瘍性試験の効率化が期待される。今後は、新たな造腫瘍性検出用動物としての NOG ヘアレスマウスの有用性、汎用性を明らかにする予定である。

E-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

これまでに hMSC と Ewing 肉腫 4 種類 (Hs822.T, Hs863.T, RD-ES, SK-ES-1) を用いた遺伝子発現の網羅的解析により Ewing 肉

腫で発現が顕著に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なり得るかの妥当性について検討した。

hMSC への IGF2BP1 強制発現では hMSC の増殖に大きな変化は認められなかった。一方、Cyclin D2 の強制発現によって hMSC の増殖が亢進されることが確認された。さらに、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ており、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。しかし Cyclin D2 の強制発現による hMSC の無限増殖化には至らなかった。また Cyclin D2 の強制発現によって p16 などの老化遺伝子の上昇は抑制しないものの TGF- β 2 の発現上昇を抑制しており、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考えられた。

E-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

再生医療における細胞の品質・安全性評価への DNA シーケンサーの利用に関しては、主に 1) 細胞の同一性評価、2) 最終製品の安全性の指標としての個々の遺伝子変異の利用、および 3) 製造工程における細胞の遺伝的安定性(「加工」の変異原性)の評価という 3つの視点が考えられる。

E-3-1 細胞の同一性評価

同一性という観点に関しては、例えば個人識別に用いられる STR マーカーでも十分な結果が得られるが、SNP チップを用いればさらに確実度が上がり、さらに次世代シーケンサーを用いれば、一段と確実度が上がると考えられる。この観点では、ホールゲノムシーケンスでなくエクソンシーケンスの解析でも十分であり、細胞を取り間違えは起きないと考えられる。ただし、現在では 1,000 ドルでホールゲノムが

読める程度のコストになっており、さらなるコスト低下が実現するならば、細胞の同一性や遺伝的安定性の評価を目的に、ホールゲノムシーケンス解析（およびエクソンシーケンス解析）をルーチンで利用することは非現実的な話ではなくなっている。

E-3-2 最終製品の安全性の指標としての個々の遺伝子変異の利用

製造工程における細胞の増殖異常に密接に関連する遺伝子変異や、目的分化細胞のがん化と有意に関連する遺伝子変異の検出のためにエクソンシーケンス解析を行うことは、解析単価が十分に安くなれば、従来の特定遺伝子変異に焦点を絞った解析に代わる簡便な試験法として有意義かもしれない。ホールゲノムシーケンス解析は、エクソンシーケンスでは検出できない、染色体の増幅、欠失やアレンジメントといった変化をゲノムワイドに評価できる点は有意義な可能性がある。この場合の課題は、データ量の増加による解析の難しさにあり、ソフトウェアを含めた技術革新により、その障壁が取り払われることが期待される。ただし、原材料の遺伝子のインテグリティ（同一性）や『「加工」の変異原性』を品質管理・工程管理の視点から検討する目的ではなく、最終製品の安全性評価を直接の目的として、ホールゲノムシーケンス解析やエクソンシーケンス解析を含めた遺伝子・染色体解析を行うことは、現実的にはあまり意味がない。その理由は、細胞・組織加工製品の安全性との因果関係が明瞭な遺伝子変異の具体例が非常に乏しく、各製品種の安全性の指標（サロゲートマーカー）としての有用性が今のところまだほとんど明らかでないからである（RAS 遺伝子すら、単一塩基の変異だけではがん化は起こらないし、具体的にどの遺伝子のこういった変異がさらに蓄積すればがん化するかも分かっていない）。した

がって、特定の遺伝子変異の有無や染色体変異の有無よりも、細胞の造腫瘍性の変化、不死化、悪性形質転換を直接評価する目的で、細胞増殖特性に関する試験（例えば *in vivo* 造腫瘍性試験、軟寒天コロニー形成試験、*in vitro* 細胞増殖速度評価など）を実施することがむしろ先決である。

シーケンス解析に関しては、がん化関連変異を獲得した細胞の検出という期待もかかるが、原理的に細胞集団全体の平均値としての解析という制限から、通常の重複度で解析をした場合には、異常細胞集団が少なくとも数%~2割程度にならないと明瞭な検出が不可能であると考えられる。これを前提にシーケンスデータの利用を考えた場合、既定の培養期間を超えて細胞を培養した後に解析を行うことで異常細胞集団の検出が容易になるかもしれない。この場合もあくまで細胞増殖特性の解析を同時に行うことが前提であり、シーケンスデータはサブとしての位置づけにしか過ぎないことに注意すべきである。細胞培養過程では、常にある一定の確率で突然変異が起きていると考えられるが、大部分の変異はその後消えていくか、ポピュレーションを拡大することはない。こうした無数にある微量な変異を通常のシーケンス解析で検出することは難しい。しかし、特定の変異により、がん化に関しての重要な形質の第一ステップを獲得した場合には、その後の培養により変異細胞集団が拡大し、見かけ上増幅されて検出可能となると期待できる。培養環境の工夫等で、さらにこうした変異細胞を積極的に選択できる可能性もあり、今後検討の余地が残されている。ただしここでも、見かけ上増幅されて検出可能となる変異が悪性形質転換の過程に機能的に寄与しているか（すなわち安全性と因果関係を持っているか）、それとも単なる無関係のコインシデンスなのかどうかは、検査した製品そのものを投与してレシピエ

ント（ヒトまたは免疫不全動物）の体内で当該細胞の造腫瘍性を調べるなど、細胞の増殖特性の検討を行い、かつ当該製品とは別途に製造される同一製品（ロットの異なる同一製品）において同様の変異と増殖異常が生じたとき（つまり再現性が確認されたとき）にしか科学的検証が不可能であることにも注意しなければならない。つまり、遺伝子変異をいくら網羅的に検査・検出したとしても、最終製品の安全性（最終目的細胞の異常増殖性獲得）との因果関係が予め明瞭でないかぎり、検査結果は、「将来の安全性研究」には役立つかもしれないが、「当該製品の安全性評価」には使用できないことになる。これは「試験の必要性」の定義にも注意が必要であることを意味している。つまり、目の前にある製品の「安全性評価」のために必要な試験なのか、将来の製品の安全性確保を目指した「安全性研究」のために必要な試験なのか、関係者は明確に区別することが重要である。なお、上で『「将来の安全性研究」には役立つかもしれない』と述べたが、通常、細胞・組織加工製品の対象患者数は従来のような低分子化合物医薬品の場合と比べ、桁違いに少ない。一方、ロットの異なる製品を別途に製造する際においても、膨大な数のヒトエクソン中で同一の変異が発生し、かつ同様な細胞増殖異常（と増殖異常による有害事象）が発生する確率が非常に高いとは到底考えられないし、起こったとしても細胞増殖異常がそれほど高頻度で発生するのでは臨床利用に堪える最終製品になりえない。その場合は、原材料・製造工程の見直しからやり直さなければならない。したがって、『「将来の安全性研究」には役立つかもしれない』というのは「可能性はゼロでない」という確率論的意味に依拠した理屈であって、因果関係に関して偽陽性でないことを統計学的に証明できるだけの例数を揃えることは現実的意味においては「不可能」である。

E-3-3 製造工程における細胞の遺伝的安定性（「加工」の変異原性）の評価

一方、細胞自身の形質としての変異の起こりやすさ、および細胞製品の製造過程における培養環境の変異誘発性、すなわち『「加工」の変異原性』は、細胞のがん化と比例関係にあると考えられ、その評価は重要な課題である。『「加工」の変異原性』の評価は、当該加工行為の前後におけるシーケンシングにより評価することが可能と考えられる。なお同様な評価は当該加工行為の前後における核型解析や CGH 解析など従来の手法でも可能と考えられるが、シーケンシングには自動化できるという利点がある。ただし、前述のシーケンサーの限界から、こうした観点においてシーケンスデータを利用するためには、マイナーな変異も検出して、真の変異頻度を評価できる試験系が必要とされる。この観点からすれば、次々世代シーケンサーとして注目される 1 分子シーケンサーが有用かもしれない。この系においては、シーケンス前処理としての PCR 反応を必要としないため、バックグラウンドノイズとしての PCR 反応による高いエラー率を回避でき、さらにサイクルリードを行い、重複度を増やすことにより、シーケンスのエラーを極小化し、高感度な変異検出を達成できるものと期待される。今後、TK6 細胞での検討を元に、iPS 細胞をはじめとする各種幹細胞での経に検出に活用していきたい。

E-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

本研究では9株のヒトiPS細胞の分化プロペンシティを数値で表すため、胚葉体の三胚葉マーカー遺伝子の発現を定量し、主成分分析を行うことにより低変量数化した。第1主成分は中胚葉への分化の指標、第2主成分は細胞の分化

シグナルの指標, 第3主成分は神経堤細胞形成の指標となることが示唆され, 各々の主成分得点の違いにより iPS 細胞株の分化プロペンシティにおける序列化を行うことができた. またマイクロアレイ解析による9株のヒトiPS細胞の網羅的遺伝子発現解析も行い, 分化プロペンシティの程度と発現量との相関の高い遺伝子を今後探索していきたいと考えている.

「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」に関する参考文献

- 1) Rubio D, Garcia-Castro J, Martin M.C, Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A: Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005, 65:3035-3039.
- 2) Fuente R, Bernad A, Garcia-Castro J, Martin MC, Cigudosa JC, Retraction: Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2010, 70:6682.
- 3) Riggi N, Suvà ML, Suvà D, Cironi L, Provero P, Tercier S, Joseph JM, Stehle JC, Baumer K, Kindler V, Stamenkovic I: EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2008, 68:2176-2185.
- 4) Meyyappan M, Wong H, Hull C, Riabowol KT: Increased expression of cyclin D2 during multiple states of growth arrest in primary and established cells. *Mol Cell Biol* 1998, 18:3163-3172.
- 5) Takano Y, Kato Y, Masuda M, Ohshima Y, Okayasu I: Cyclin D2, but not cyclin D1, overexpression closely correlates with gastric cancer progression and prognosis. *J Pathol* 1999, 189:194-200.
- 6) Takano Y, Kato Y, van Diest PJ, Masuda M, Mitomi H, Okayasu I: Cyclin D2

overexpression and lack of p27 correlate positively and cyclin E inversely with a poor prognosis in gastric cancer cases. *Am J Pathol* 2000, 156:585-594.

- 7) Mermelshtein A, Gerson A, Walfisch S, Delgado B, Shechter-Maor G, Delgado J, Fich A, Gheber L: Expression of D-type cyclins in colon cancer and in cell lines from colon carcinomas. *Br J Cancer* 2005, 93:338-345.
- 8) Dhillon VS, Shahid M, Husain SA: CpG methylation of the FHIT, FANCF, cyclin-D2, BRCA2 and RUNX3 genes in Granulosa cell tumors (GCTs) of ovarian origin. *Mol Cancer* 2004, 3:33.
- 9) Igawa T, Sato Y, Takata K, Fushimi S, Tamura M, Nakamura N, Maeda Y, Orita Y, Tanimoto M, Yoshino T: Cyclin D2 is overexpressed in proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Cancer Sci* 2011, 102:2103-2107.
- 10) Chen S, Shimoda M, Chen J, Matsumoto S, Grayburn PA: Transient overexpression of cyclin D2/CDK4/GLP1 genes induces proliferation and differentiation of adult pancreatic progenitors and mediates islet regeneration. *Cell Cycle* 2012, 11:695-705.
- 11) Houldsworth J, Reuter V, Bosl GJ, Chaganti RS: Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis. *Cell Growth Differ* 1997, 8:293-299.
- 12) Buckley MF, Sweeney KJ, Hamilton JA, Sini RL, Manning DL, Nicholson RI, deFazio A, Watts CK, Musgrove EA, Sutherland RL: Expression and amplification of cyclin genes in human

- breast cancer. *Oncogene* 1993, 8:2127-2133.
- 13) Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, Garrett E, Mehrotra J, Polyak K, Sukumar S, Argani P: DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Int J Cancer* 2003, 107:970-975.
 - 14) Virmani A, Rathi A, Heda S, Sugio K, Lewis C, Tonk V, Takahashi T, Roth JA, Minna JD, Euhus DM, Gazdar AF: Aberrant methylation of the cyclin D2 promoter in primary small cell, nonsmall cell lung and breast cancers. *Int J Cancer* 2003, 107:341-345.
 - 15) Matsubayashi H, Sato N, Fukushima N, Yeo CJ, Walter KM, Brune K, Sahin F, Hruban RH, Goggins M: Methylation of cyclin D2 is observed frequently in pancreatic cancer but is also an age-related phenomenon in gastrointestinal tissues. *Clin Cancer Res* 2003, 9:1446-1452.
 - 16) Yu J, Leung WK, Ebert MP, Leong RW, Tse PC, Chan MW, Bai AH, To KF, Malfertheiner P, Sung JJ: Absence of cyclin D2 expression is associated with promoter hypermethylation in gastric cancer. *Br J Cancer* 2003, 88:1560-1565.
 - 17) Kato T, Hayama S, Yamabuki T, Ishikawa N, Miyamoto M, Ito T, Tsuchiya E, Kondo S, Nakamura Y, Daigo Y: Increased expression of insulin-like growth factor-II messenger RNA-binding protein 1 is associated with tumor progression in patients with lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007, 13:434-442.
 - 18) Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Seyama Y,

Tsuchiya T: FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF-beta2. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 359:108-114.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表 なし

1. Sawada R., Kono K., Isama K., Haishima Y., and Matsuoka A. : Calcium-incorporated titanium surfaces influence the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. A*, in press.
2. 澤田留美「再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の安全性評価の実際」再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み, シーエムシー出版, 東京 (2012) pp. 28-37
3. 松岡厚子, 澤田留美, 加藤玲子「次世代医療機器評価指標作成事業—再生医療分野—」再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み, シーエムシー出版, 東京 (2012) pp. 38-46
4. Wu Y, Qi X, Gong L, Xing G, Chen M, Miao L, Yao J, Suzuki T, Furihata C, Luan Y, Ren J, Identification of BC005512 as a DNA damage responsive murine endogenous retrovirus of GLN family involved in cell growth regulation. *PLoS One*. 7, e35010. 2012
5. Watanabe T, Suzuki T, Natsume M, Nakajima M, Narumi K, Hamada S, Sakuma T, Koeda A, Oshida K, Miyamoto Y, Maeda A, Hirayama M, Sanada H, Honda H, Ohyama W, Okada E, Fujiishi Y, Sutou S, Tadakuma A,

- Ishikawa Y, Kido M, Minamiguchi R, Hanahara I, Furihata C. Discrimination of genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens by statistical analysis based on gene expression profiling in the mouse liver as determined by quantitative real-time PCR. *Mutat Res.*, 747, 164-175. 2012
6. Suenaga K, Takasawa H, Watanabe T, Wako Y, Suzuki T, Hamada S, Furihata C. Differential gene expression profiling between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in young rat liver determined by quantitative real-time PCR and principal component analysis *Mutat Res.*, 751, 73-83. 2013i
 7. 安田智, 佐藤陽治 安全性評価の総論, 造腫瘍性試験の現状と展望「幹細胞医療の実用化技術と産業展望」(シーエムシー出版)印刷中
 8. Nakaya M, Tajima M, Kosako H, Nakaya T, Hashimoto A, Watari K, Nishihara H, Ohba M, Komiya S, Tani N, Nishida M, Taniguchi H, Sato Y, Matsumoto M, Tsuda M, Kuroda M, Inoue K, Kurose H. GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance. *Nat Commun.* 2013;4:1532.
 9. Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products. *Biol. Pharm. Bull.* 2013;36(2):189-92.
 10. 佐藤陽治, 村岡ひとみ 再生医療分野の関連規制: FDA の動向「稀少疾患/難病の診断・治療と製品開発」(編集: 技術情報協会) pp330-335 (2012), 技術情報協会, 東京
 11. Nakaya M, Chikura S, Watari K, Mizuno N, Mochinaga K, Mangmool S, Koyanagi S, Ohdo S, Sato Y, Ide T, Nishida M, Kurose H. Induction of cardiac fibrosis by β -blocker in G protein-independent and GRK5/ β -arrestin2-dependent signaling pathways. *J Biol Chem.* 2012;287(42):35669-77.
 12. 安田智, 佐藤陽治 再生医療に対する規制・制度等について: 欧米の動向「幹細胞技術の標準化—再生医療への期待」(堀友繁・監修/田中正躬・編著) pp206-214 (2012), 日本規格協会, 東京
 13. 安田智 再生医療における細胞・組織加工製品の品質・安全性の評価 *PHARMSTAGE* 2012;12(7):1-2.
 14. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療における細胞・組織加工製品の試験とレギュレーション *実験医学増刊* 2012; 30(10):1702-1707.
 15. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S, Kawamata S, Sato Y. Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One.* 2012;7(5):e37342.
 16. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療・細胞治療の規制と開発支援に関する国際比較「再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み」(編集: 岩田博夫, 岸田晶夫, 松岡厚子, シーエムシー出版, 東京) 2012, 20-27.

G-2 学会発表

1. 澤田留美, 齋島由二, 福井千恵, 河野 健, 松岡厚子「間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすエンドトキシンの影響について(2) —遺伝子発現の網羅的解析による検討—」第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6)
2. 齋島由二, 福井千恵, 澤田留美, 松岡厚子「間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすエンドトキシンの影響について(1) —蛋白質の網羅的発現解析による検討—」第 11 回日本再生医療学会 (2012.6)
3. 佐々木寛人, 澤田留美, 清田泰次郎, 本多

- 裕之, 加藤竜司「骨髄由来間葉系幹細胞の画像情報解析による劣化度評価」第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6)
4. 佐々木寛人, 高橋厚妃, 坪井泰樹, 澤田留美, 清田泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司「間葉系幹細胞画像の情報解析による細胞状態分類法の有効性」第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6)
 5. Sasaki, H., Matsuoka, F., Takeuchi, I., Sawada, R., Honda, H., Kato, R.; Morphology-based cell quality assessment of differentiation potential of mesenchymal stem cells, 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2012.6)
 6. Sasaki, H., Matsuoka, F., Takahashi, A., Takeuchi, I., Sawada, R., Kiyota, Y., Honda, H., Kato, R.; Morphology-based prediction of differentiation potential of mesenchymal stem cells, 3rd TERMIS World Congress2012 (2012.9)
 7. 澤田留美, 河野 健, 松岡厚子「細胞・組織加工医療機器に用いられる間葉系幹細胞の品質評価—がん化の指標探索のための遺伝子発現解析—」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11)
 8. 河野 健, 澤田留美, 伊佐間和郎, 齧島由二, 松岡厚子「チタン表面の化学処理による間葉系幹細胞の骨分化誘導」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11)
 9. 澤田留美, 齧島由二, 福井千恵, 河野 健, 松岡厚子「間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について—遺伝子発現の網羅的解析による検討—」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
 10. 齧島由二, 澤田留美, 福井千恵, 松岡厚子「間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について—蛋白質発現の網羅的解析による検討—」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
 11. 河野 健, 澤田留美, 松岡厚子「細胞・組織加工医療機器に用いられる間葉系幹細胞の品質評価」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
 12. 鈴木孝昌:我々は既に被曝していた(放射線リスクに関する HP の紹介) 平成 24 年度 環境変異原学会公開シンポジウム (2012.5) (東京)
 13. 鈴木孝昌: Omics approach for the biomarker of genotoxicity by aristolochic acid. 韓国毒性学会, 公衆衛生学会合同国際シンポジウム(2012.6)(ソウル)
 14. 鈴木孝昌, 田邊思帆里, 山口鉄生, 鈴木和博: MYBPC2 はヒト骨格筋筋芽細胞の筋分化マーカーとなる 第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6) (横浜)
 15. 鈴木孝昌, 小原有弘, 松本真理子, 広瀬明彦, 林 真, 本間正充: ジメチルアニリン異性体のマウスでの変異原性 日本環境変異原学会 第 41 回大会 (2012.11) (静岡)
 16. 草川森士, 町田一彦, 安田智, 黒田拓也, 澤田留美, 伊藤守, 堤秀樹, 川真田真, 佐藤陽治 細胞・組織加工製品の製造工程管理法としてのNOGマウス造腫瘍性試験系のバリデーション 第12回日本再生医療学会総会, 横浜 (2013年3月23日)
 17. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y., Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. The final version of Japanese guidelines on ensuring quality and safety of products derived from processing of various stem cells. World Stem Cell Summit 2012, West Palm Beach, USA (2012年12月3-5日)
 18. 草川森士, 船田正彦, 安田智, 黒田拓也, 山内淳司, 佐藤陽治 レポーター蛋白を利用した多能性幹細胞の神経分化の評価

- 第35回日本神経科学大会，名古屋（2012年9月18-21日）
19. 佐藤陽治 再生医療／細胞・組織加工製品の安全性評価 第39回日本毒性学会年会，仙台（2012年7月17日）
 20. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Suzuki K, Kawamata S, Sato Y. Validation of in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research 10 th Annual Meeting, Yokohama（2012年6月14日）
 21. 佐藤陽治 国際協調と日本のあるべき姿 第11回日本再生医療学会総会，横浜（2012年6月13日）
 22. 黒田拓也，安田智，草川森士，鈴木和博，川真田伸，佐藤陽治 ヒトiPS 細胞由来網膜色素上皮細胞中に残存する未分化細胞のin vitro 高感度検出法の開発と評価 第11回日本再生医療学会総会，横浜（2012年6月13日）
 23. 佐藤陽治 ヒト多能性幹細胞加工製品の製造における造腫瘍性評価 第11回日本再生医療学会総会，横浜（2012年6月12日）

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得 なし

H-2. 実用新案登録 なし

H-3. その他 特記事項なし

Table 1-1 NOG ヘアレスマウスの移植後 10 週における結節形成数と割合

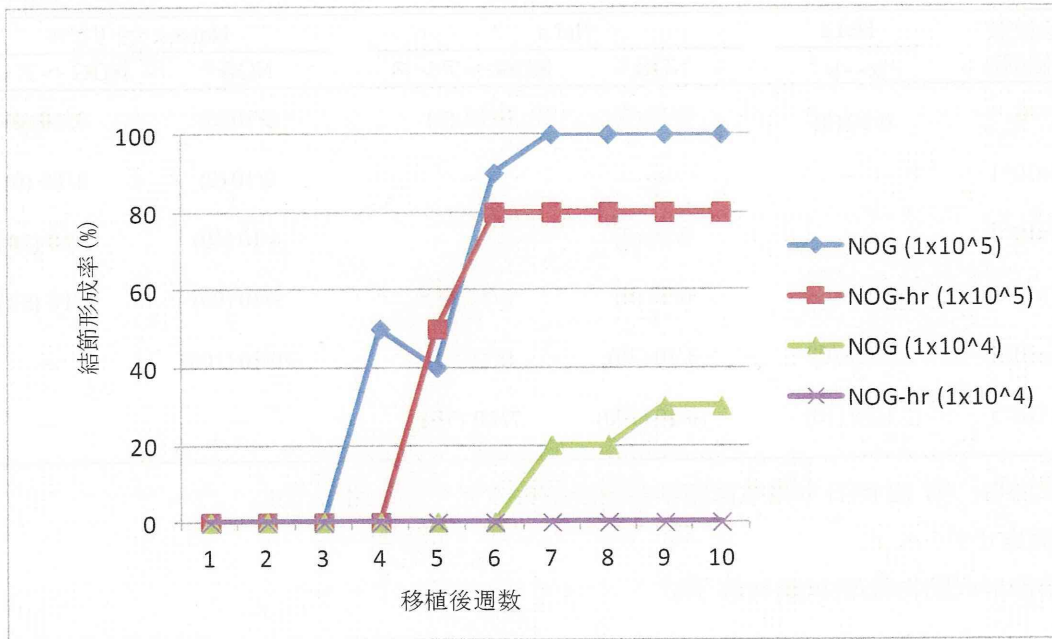
移植数 (個/匹)	HeLa	HeLa		HeLa + マトリゲル	
	ヌード*	NOG*	NOG ヘアレス	NOG*	NOG ヘアレス
0	0/10 (0) ^a	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)
1x10 ¹	—	—	—	0/10 (0)	0/10 (0)
1x10 ²	—	0/10 (0)	—	4/10 (40)	2/10 (20)
1x10 ³	—	0/10 (0)	0/10 (0)	9/10 (90)	5/10 (50)
1x10 ⁴	0/10 (0)	3/10 (30)	0/10 (0)	10/10 (100)	—
1x10 ⁵	1/10 (10)	10/10 (100)	7/10 (70)	—	—

*: 草川ら, 第 12 回日本再生医療学会総会からのデータを引用

—: 実施せず

a: 結節形成動物数/供試動物数 (%)

HeLa 細胞群



HeLa 細胞+マトリゲル群

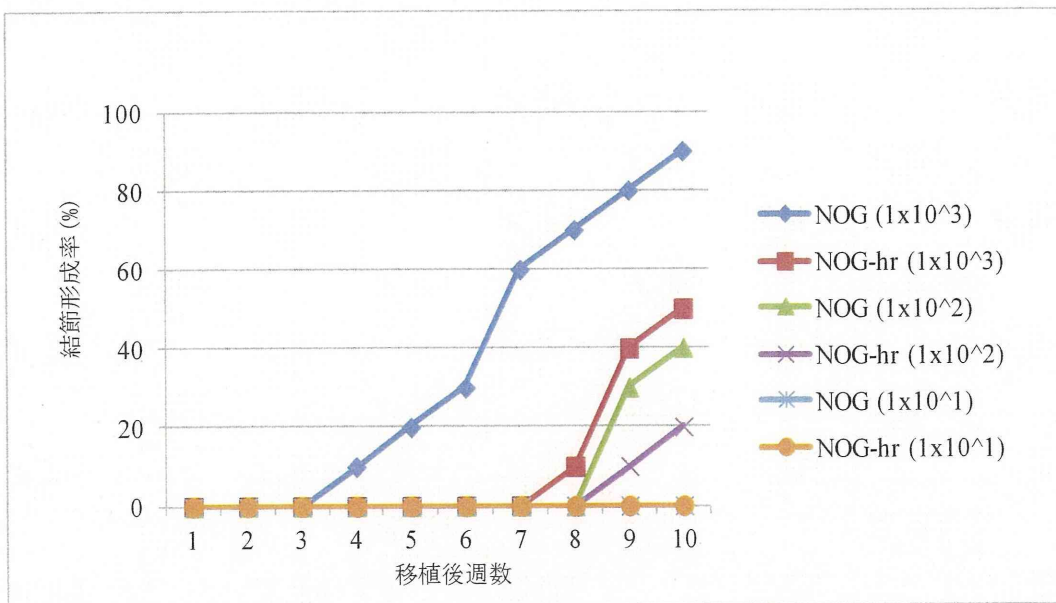


Fig.1-1 NOG マウスおよびNOG ヘアレスマウスにおける結節形成率の経時的変化
 上段は HeLa 細胞群，下段は HeLa+マトリゲル群を示す．NOG ヘアレスマウスの結節形成開始時期は HeLa 細胞群および Hela 細胞+マトリゲル群の何れも遅い傾向がみられている．なお，NOG マウスのデータは草川ら（第 12 回日本再生医療学会総会）からの引用となる．

表 2-1 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

表 2-2 Cyclin D2 の導入により mRNA 発現が認められるようになった遺伝子が関与する生体機能 (Top5)

Diseases and Disorders

Name	p-value	Molecules
Cancer	< 4.53×10^{-2}	409
Reproductive System Disease	< 3.98×10^{-2}	49
Developmental Disorder	< 3.95×10^{-2}	31
Neurological Disease	< 4.53×10^{-2}	34
Cardiovascular Disease	< 3.77×10^{-2}	37

Molecular and Cellular Functions

Name	p-value	Molecules
Cell Morphology	< 4.53×10^{-2}	87
Cellular Development	< 4.53×10^{-2}	151
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	< 4.53×10^{-2}	71
Antigen Presentation	< 1.42×10^{-2}	8
Cellular Function and Maintenance	< 4.53×10^{-2}	139

表 2-3 Cyclin D2 の導入により mRNA 発現が 2 倍以上上昇した遺伝子が関与する生体機能 (Top5)

Diseases and Disorders

Name	p-value	Molecules
Cancer	$< 4.53 \times 10^{-2}$	409
Reproductive System Disease	$< 3.98 \times 10^{-2}$	49
Developmental Disorder	$< 3.95 \times 10^{-2}$	31
Neurological Disease	$< 4.53 \times 10^{-2}$	34
Cardiovascular Disease	$< 3.77 \times 10^{-2}$	37

Molecular and Cellular Functions

Name	p-value	Molecules
Cell Morphology	$< 4.53 \times 10^{-2}$	87
Cellular Development	$< 4.53 \times 10^{-2}$	151
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	$< 4.53 \times 10^{-2}$	71
Antigen Presentation	$< 1.42 \times 10^{-2}$	8
Cellular Function and Maintenance	$< 4.53 \times 10^{-2}$	139

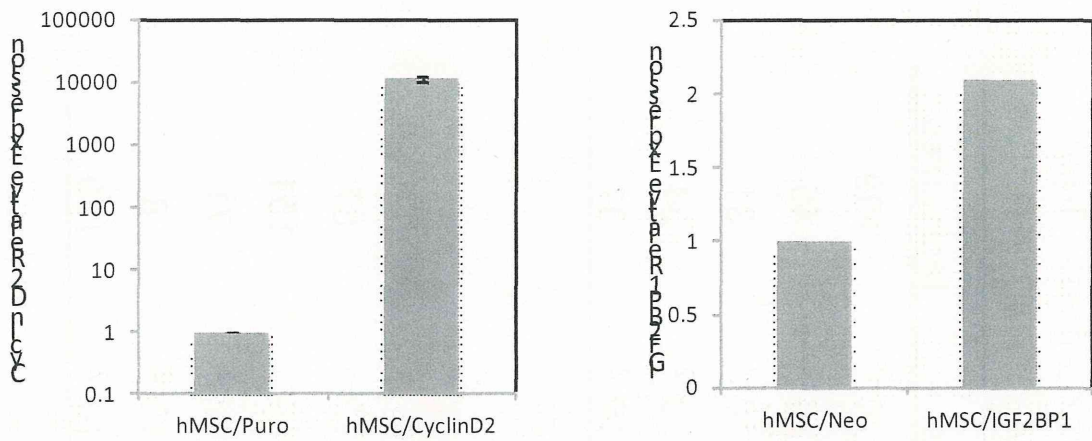


図 2-1 Cyclin D2 及び IGF2BP1 の発現量の比較
(hMSC/Puro 及び hMSC/Neo における発現を 1 とした際の値)

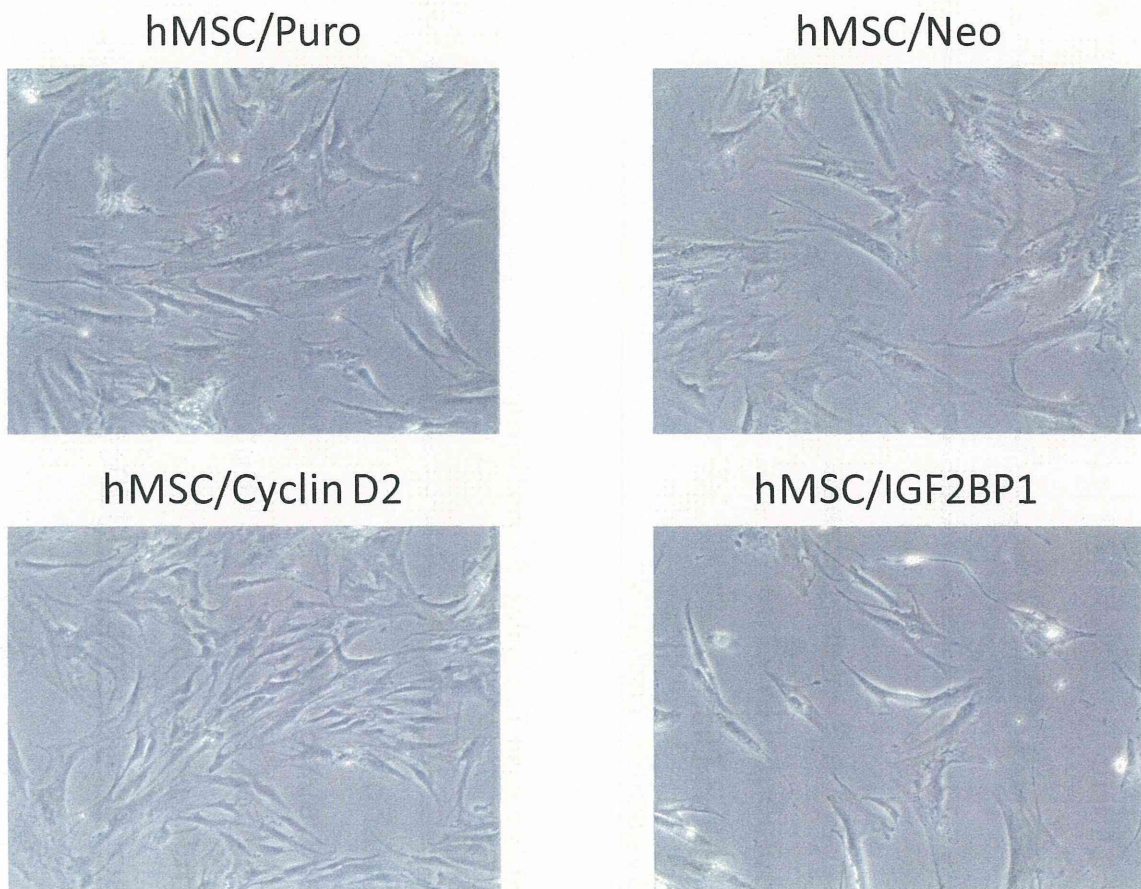


図 2-2 組換えレンチウイルス感染 2 週間後の細胞形態

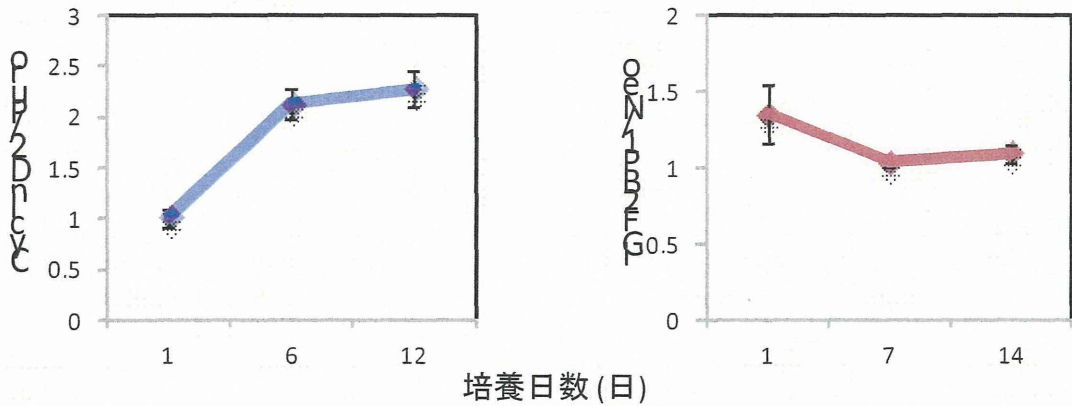


図 2-3 Cyclin D2 及び IGF2BP1 強制発現による細胞増殖比
(それぞれネガティブコントロールである hMSC/Puro, hMSC/Neo との比較値)

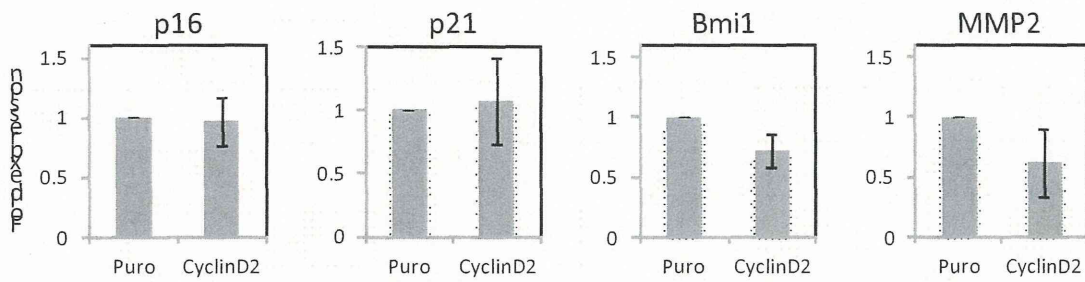


図 2-4 Cyclin D2 強制発現による細胞増殖に関わる遺伝子の発現変化
(ウイルス感染から 14 日後)
(Puro の値を 1 とした時の比較値)

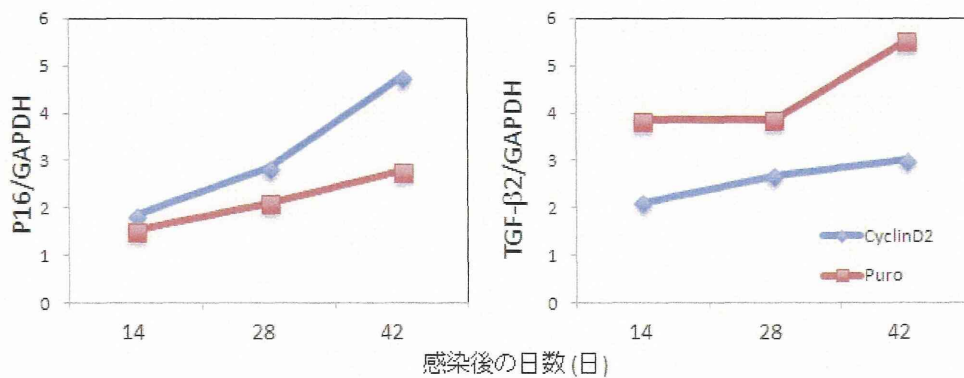


図 2-5 Cyclin D2 強制発現による細胞増殖に関わる遺伝子の継時的発現変化

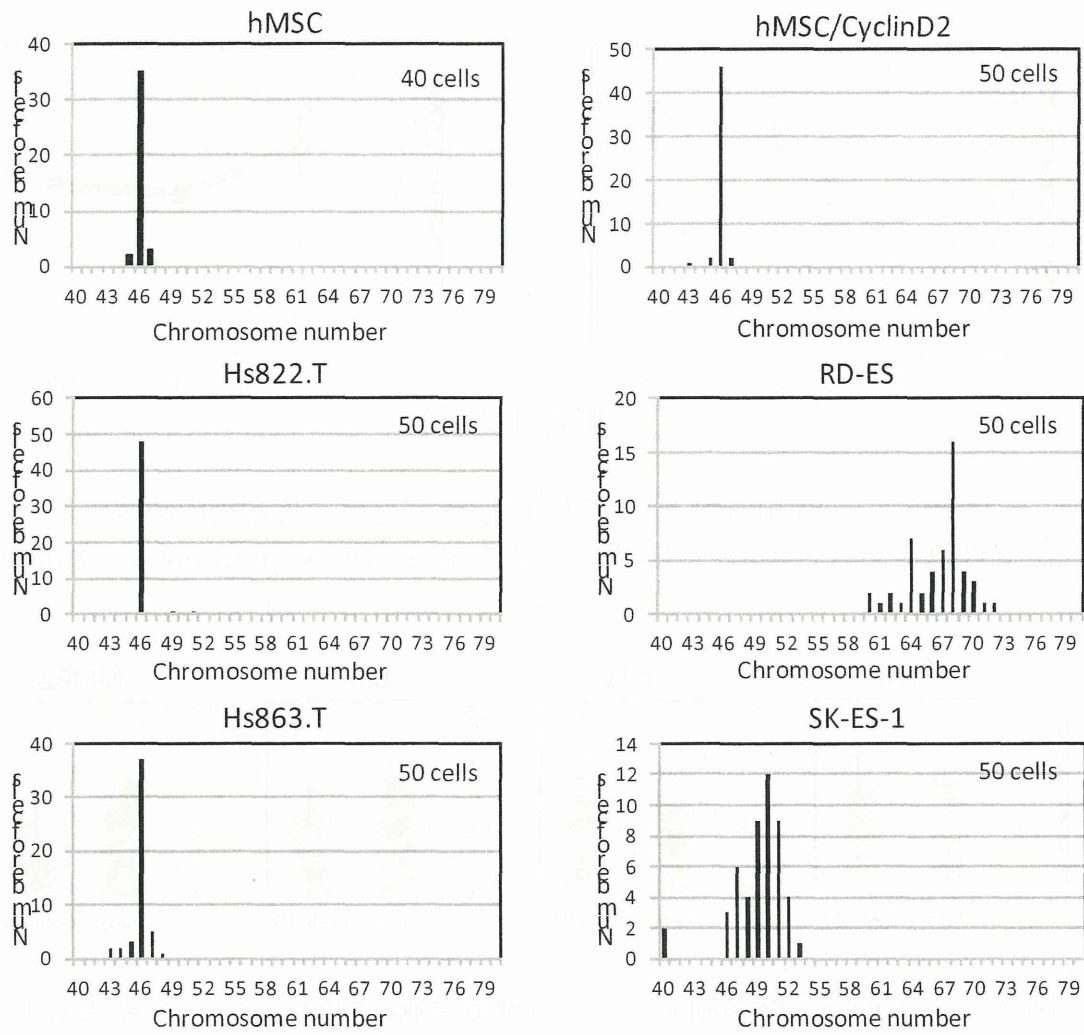


図 2-6 hMSC 及び Ewing 肉腫細胞の染色体数

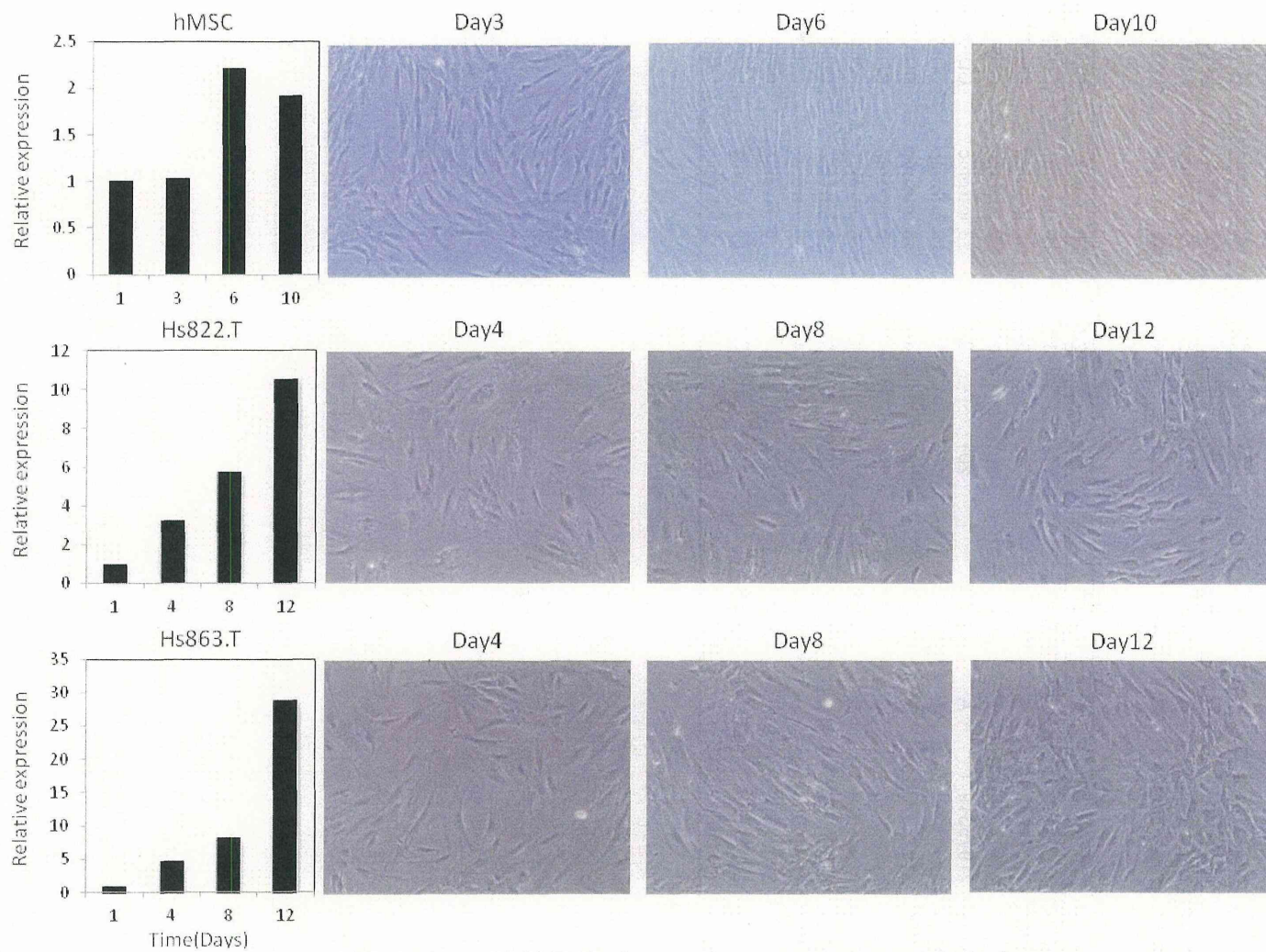


図 2-7 接触阻害時における Cyclin D2 の発現変化

表 3-1 HL60 細胞における既知のガン関連遺伝子変異の検出

#chr	start	end	ref	alt	hom/het	snp_quality	tot_depth	alt_depth	region	gene
chr01	115220467	115220474	CTTCC	-	hom	214	14	14	intronic	AMPD1
chr01	115228609	115228609	C	T	hom	222	51	51	intronic	AMPD1
chr01	115231254	115231254	G	A	hom	222	70	70	exonic	AMPD1
chr01	115235785	115235788	ATAA	-	hom	186	12	12	intronic	AMPD1
chr01	115236057	115236057	G	A	hom	222	47	47	exonic;splice	AMPD1
chr01	115253684	115253684	A	G	hom	190	45	45	intronic	NRAS
chr01	115255710	115255711	TT	-	hom	214	62	62	intronic	NRAS
chr01	115256529	115256529	T	A	hom	222	49	49	exonic	NRAS
chr01	115290340	115290340	A	G	hom	222	55	55	intronic	CSDE1
chr01	115296984	115296984	G	C	hom	201	49	49	intronic	CSDE1
}										
chr09	21970916	21970916	C	T	hom	222	26	26	exonic	CDKN2A
chr09	21971120	21971120	G	A	hom	176	15	15	exonic	CDKN2A
chr09	21971989	21971989	C	G	hom	222	32	32	intronic	CDKN2A
chr09	21973422	21973422	G	T	hom	207	35	35	intronic	CDKN2A
chr09	21975319	21975319	T	A	hom	201	33	33	intronic	CDKN2A
chr09	21976402	21976402	G	A	hom	163	19	19	intronic	CDKN2A
chr09	21978979	21978979	C	T	hom	222	46	46	intronic	CDKN2A
chr09	21980990	21980990	-	GT	hom	214	9	9	intronic	CDKN2A
chr09	21981018	21981018	T	C	het	38	16	5	intronic	CDKN2A
chr09	21981052	21981052	T	C	het	97	23	9	intronic	CDKN2A
chr09	21981086	21981087	TA	-	het	74.5	17	7	intronic	CDKN2A
chr09	21987455	21987456	GA	-	hom	101	4	4	intronic	CDKN2A
chr09	21991923	21991923	C	T	hom	210	37	37	intronic	CDKN2A
chr09	21993842	21993845	GTGT	-	hom	81.2	2	2	intronic	CDKN2A

図 3-1 ホールゲノムシーケンスデータの冗長度

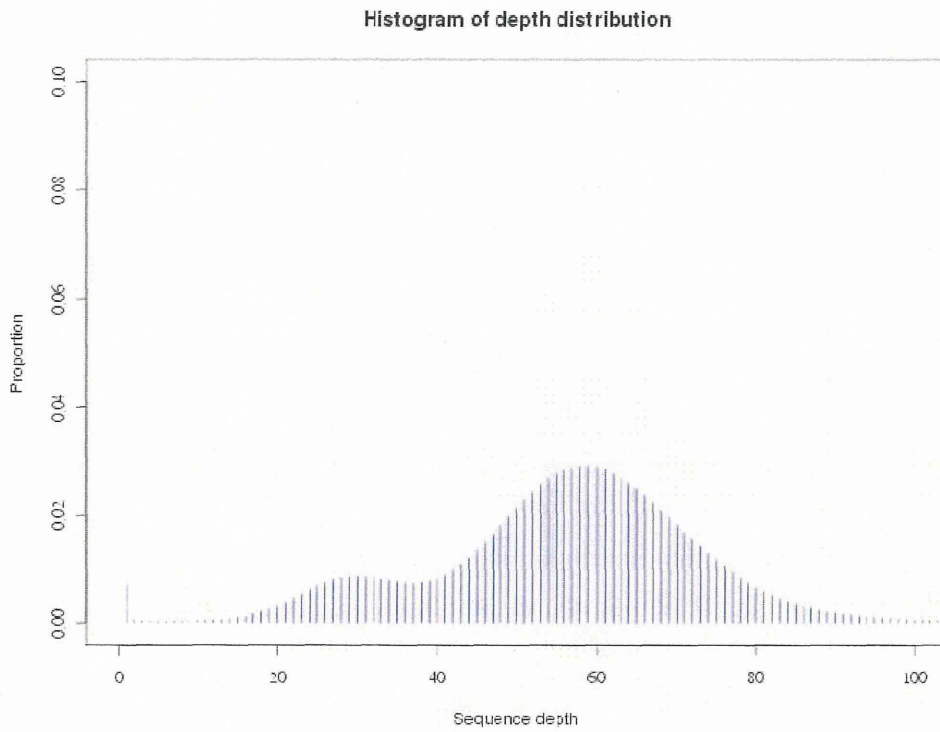


図 3-2 HL60-RG 細胞 22 番染色体の Homo SNP Call 一致率

