

図 3-3 HL60-RG 細胞 22 番染色体の Hetero SNP Call 率

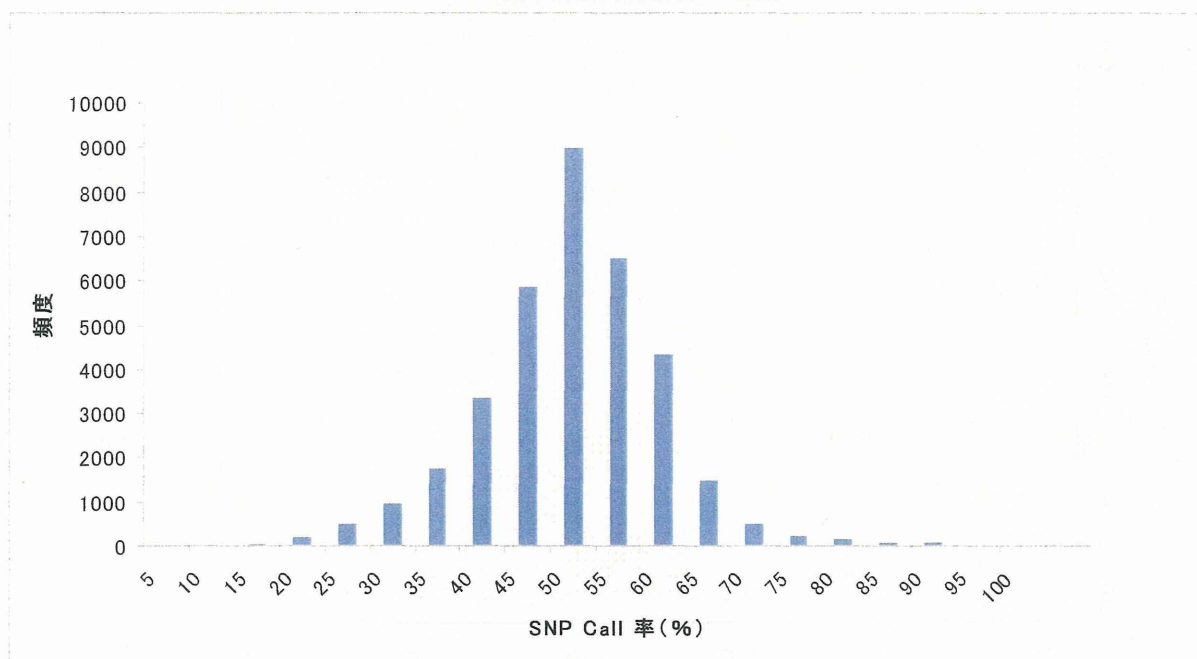
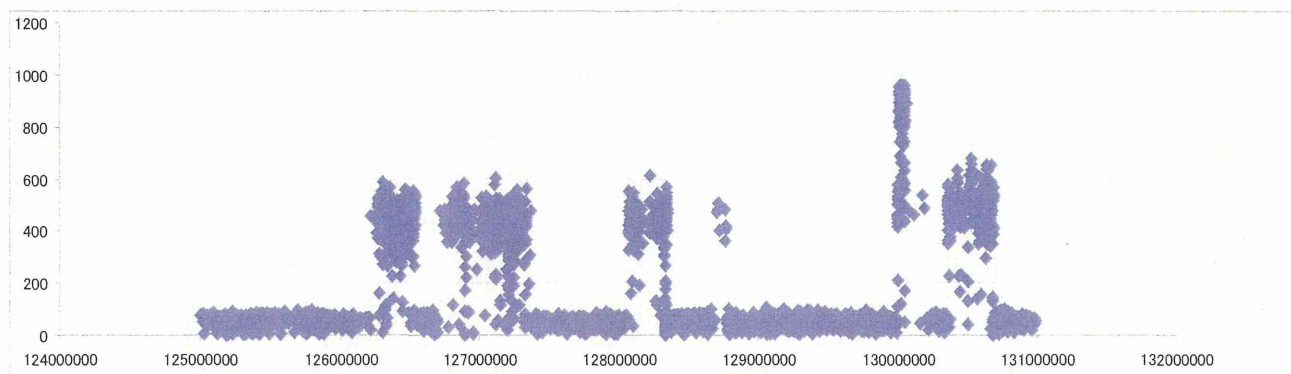


図 3-4 シークエンスデータを利用した 8 番染色体 c-myc 領域のコピー数変化の解析



(以前得られた CGH アレイデータによる同一領域のコピー数変化)

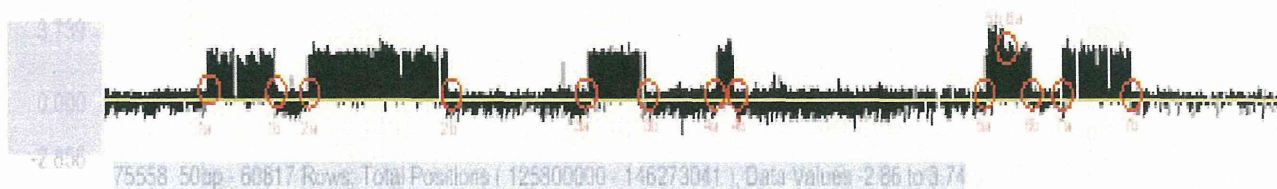


図 3-5 TK6 細胞を用いた突然変異試験結果

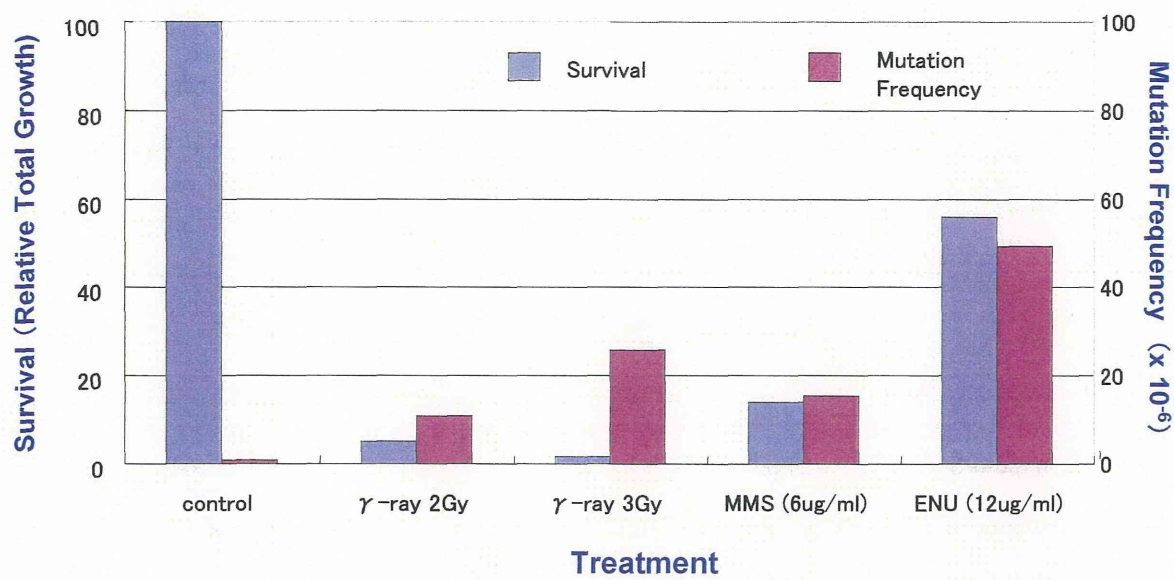
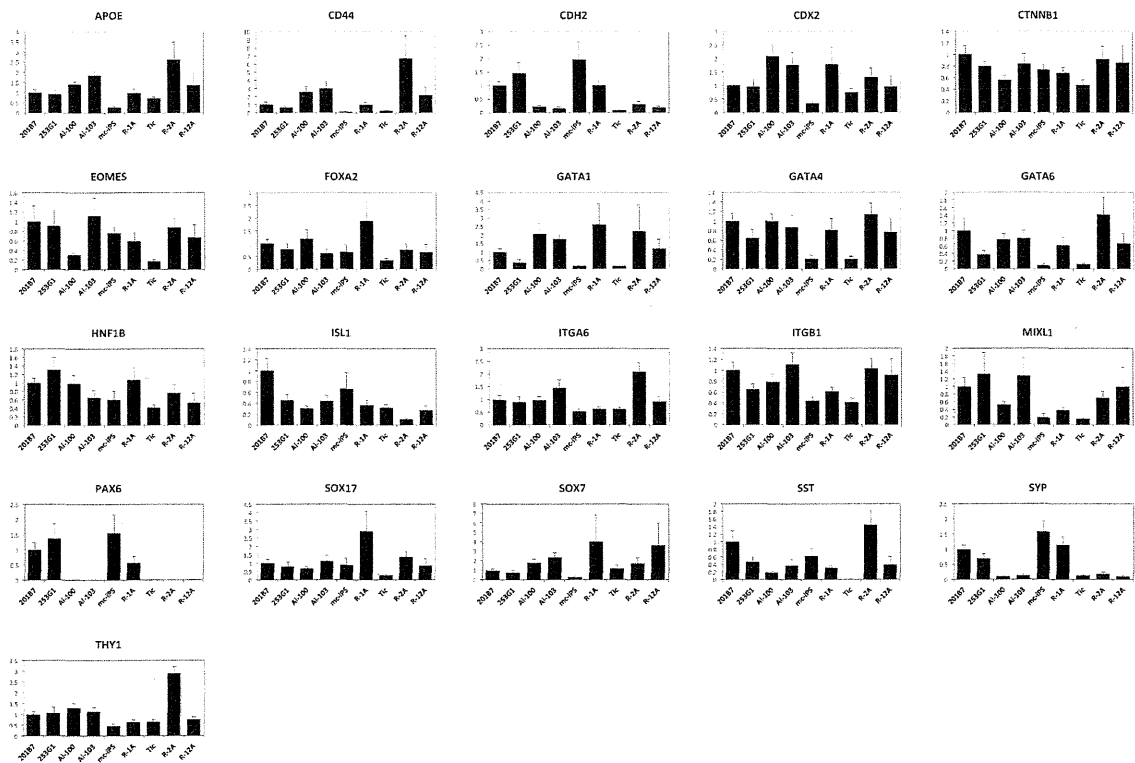


Table 4-1 本研究で用いたヒト iPS 細胞株

ヒト iPS 細胞株名	由来細胞	導入遺伝子	導入方法
201B7	皮膚線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス
253G1	皮膚繊維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4	レトロウイルス
Human mc-iPS	脂肪幹細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	プラスミド
HiPS-RIKEN-1A	臍帯由来線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス
HiPS-RIKEN-2A	臍帯由来線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス
HiPS-RIKEN-12A	臍帯由来線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4	レトロウイルス
Tic	肺線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス
ATCC-DYR0100 hiPSc	皮膚線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス
ATCC-HYR0103 hiPSc	肝線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス

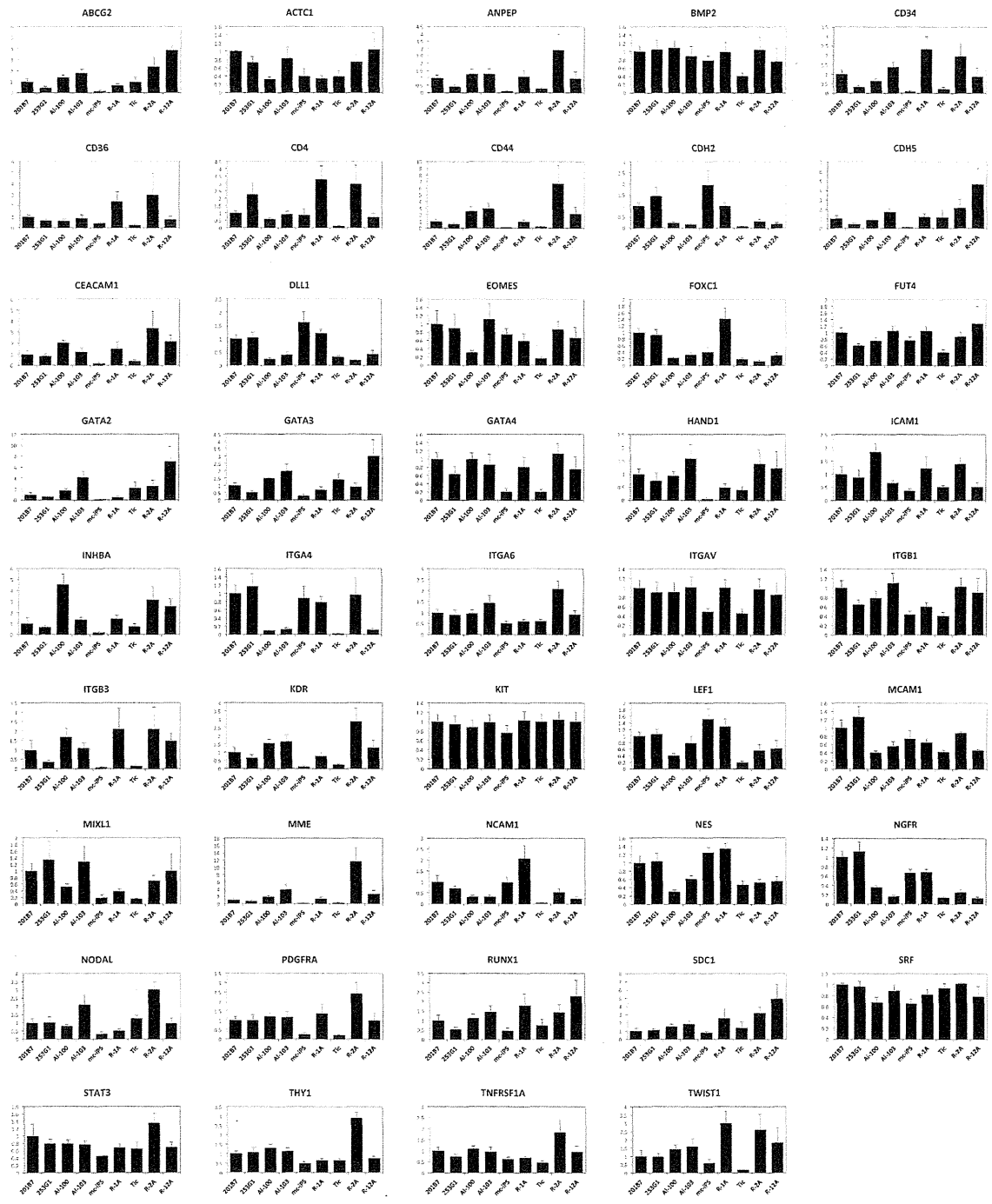
Table 4-2 本研究において定量 PCR で測定した三胚葉マーカー遺伝子

遺伝子名	内胚葉	中胚葉	外胚葉	Assay ID
ABCG2		○	○	Hs01053790_m1
ACTC1		○		Hs00606316_m1
ANPEP		○		Hs00174265_m1
APOE	○		○	Hs00171168_m1
BMP2		○		Hs00154192_m1
CD34		○		Hs00156373_m1
CD36		○		Hs00169627_m1
CD4		○		Hs010587_m1
CD44	○	○	○	Hs01075861_m1
CDH2	○	○	○	Hs00983056_m1
CDH5		○		Hs00174344_m1
CDX2	○			Hs00230919_m1
CEACAM1		○		Hs00989786_m1
CRABP2			○	Hs00275636_m1
CTNNB1	○			Hs00170025_m1
DLL1		○		Hs01011325_g1
EN1			○	Hs00154977_m1
EOMES	○	○		Hs00172872_m1
FAS			○	Hs00163653_m1
FGFR2			○	Hs01552926_m1
FOXA2	○			Hs00232764_m1
FOXC1		○		Hs00559473_s1
FOXD3			○	Hs00255287_s1
FUT4		○	○	Hs01106466_s1
GATA2		○	○	Hs00231119_m1
GATA3		○	○	Hs00231122_m1
GATA4	○	○		Hs001713_m1
GATA6	○			Hs00232018_m1
GBX2			○	Hs00230965_m1
HAND1		○	○	Hs00231848_m1
HNF1B	○			Hs01001602_m1
ICAM1		○	○	Hs99999152_m1
INHBA		○		Hs01081598_m1
IRF6			○	Hs006082_m1
ISL1	○			Hs00158126_m1
ITGA4		○	○	Hs00168433_m1
ITGA6	○	○	○	Hs01041011_m1
ITGAV		○		Hs00233808_m1
ITGB1	○	○	○	Hs00559595_m1
ITGB3		○		Hs01001469_m1
KDR		○		Hs00911700_m1
KIT		○		Hs001729_m1
LEF1		○		Hs01547250_m1
MAP2			○	Hs00258900_m1
MAPT			○	Hs00902194_m1
MCAM		○	○	Hs00174838_m1
MIXL1	○	○		Hs00430824_g1
MME		○		Hs00153510_m1
MNX1			○	Hs00907365_m1
NCAM1		○	○	Hs00941821_m1
NEFL			○	Hs00196245_m1
NES		○	○	Hs00707120_s1
NGFR		○	○	Hs00609977_m1
NODAL		○		Hs00415443_m1
NOG			○	Hs00271352_s1
NOTCH1			○	Hs01062014_m1
OTX2			○	Hs00222238_m1
PAX6	○		○	Hs002871_m1
PDGFRA		○	○	Hs00998018_m1
RUNX1		○		Hs00231079_m1
SDC1		○		Hs00896423_m1
SNAI2			○	Hs00161904_m1
SOX10			○	Hs00366918_m1
SOX17	○			Hs00751752_s1
SOX2			○	Hs00602736_s1
SOX7	○			Hs00846731_s1
SOX9			○	Hs00165814_m1
SRF		○		Hs00182371_m1
SST	○			Hs00174949_m1
STAT3		○		Hs00374280_m1
SYP	○		○	Hs00300531_m1
TDGF1			○	Hs02339499_g1
THY1	○	○	○	Hs00174816_m1
TNFRSF1A		○		Hs00533568_g1
TUBB3			○	Hs00801390_s1
TWIST1		○		Hs00361186_m1



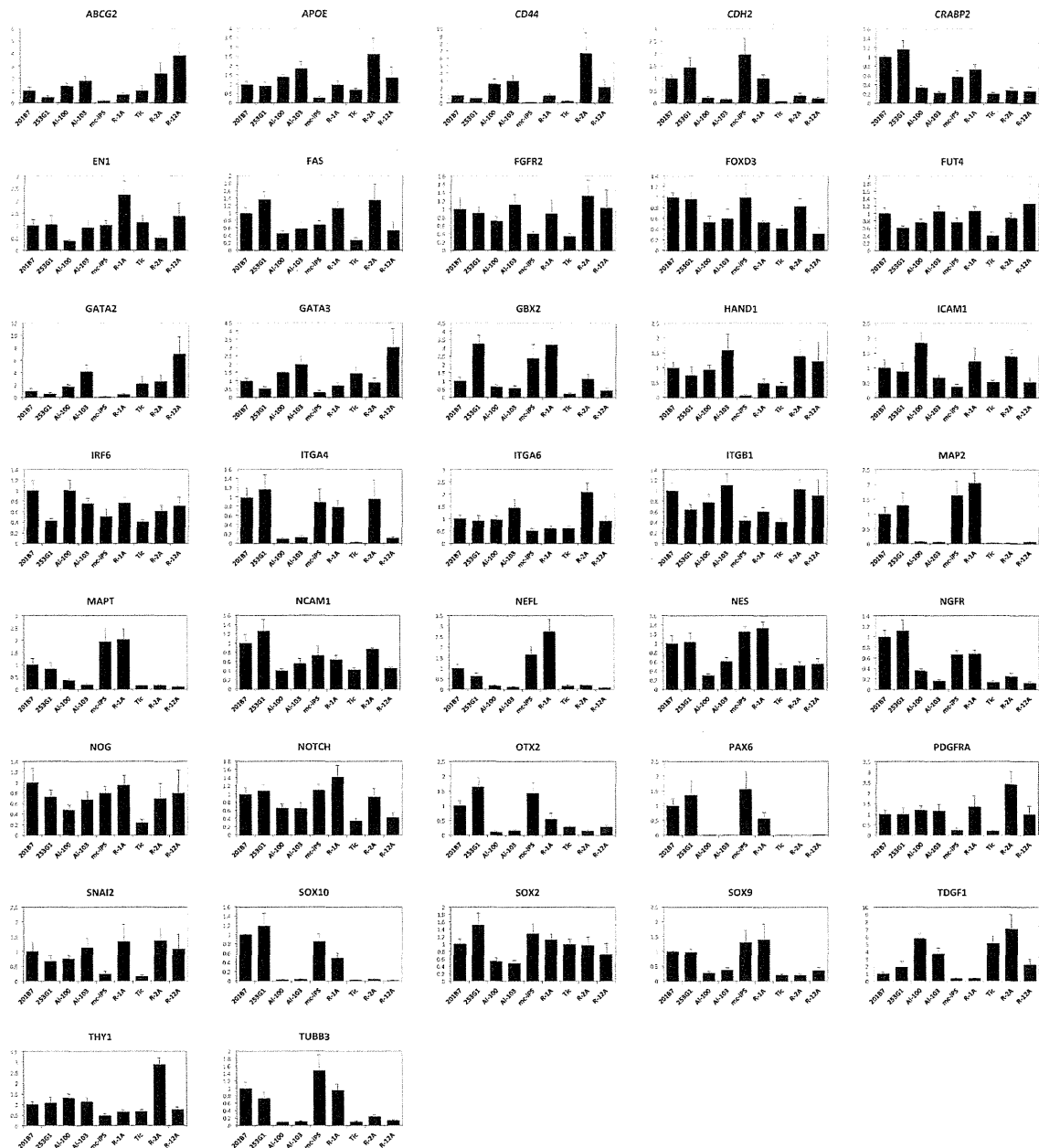
**Fig. 4-1 ヒト iPS 細胞株由来胚葉体の内胚葉マーカー遺伝子発現量**

フィーダー細胞上で培養したヒト iPS 細胞 9 株を、分化培地を用いて超低接着プレート上で 37°C, 16 日間培養し、胚葉体を形成させた。胚葉体から RNA を抽出し、cDNA を合成し、上記の内胚葉マーカー遺伝子の定量 PCR を行った。発現量は GAPDH 量で補正した。縦軸は相対的な発現量、横軸はヒト iPS 細胞株を示している。棒グラフは、平均値 ± SEM (n=6)。



**Fig. 4-2 ヒト iPS 細胞株由来胚葉体の中胚葉マーカー遺伝子発現量**

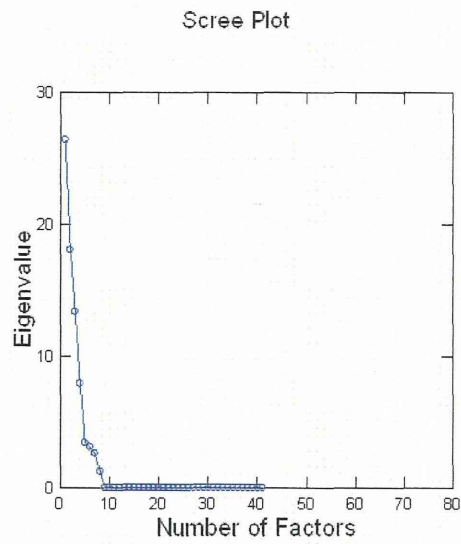
フィーダー細胞上で培養したヒト iPS 細胞 9 株を、分化培地を用いて超低接着プレート上で 37°C, 16 日間培養し、胚葉体を形成させた。胚葉体から RNA を抽出し、cDNA を合成し、上記の中胚葉マーカー遺伝子の定量 PCR を行った。発現量は GAPDH 量で補正した。縦軸は相対的な発現量、横軸はヒト iPS 細胞株を示している。棒グラフは、平均値 ± SEM (n=6)。



**Fig. 4-3 ヒト iPS 細胞株由来胚葉体の外胚葉マーカー遺伝子発現量**

フィーダー細胞上で培養したヒト iPS 細胞 9 株を、分化培地を用いて超低接着プレート上で 37°C, 16 日間培養し、胚葉体を形成させた。胚葉体から RNA を抽出し、cDNA を合成し、上記の外胚葉マーカー遺伝子の定量 PCR を行った。発現量は GAPDH 量で補正した。縦軸は相対的な発現量、横軸はヒト iPS 細胞株を示している。棒グラフは、平均値  $\pm$  SEM (n=6)。

A



B

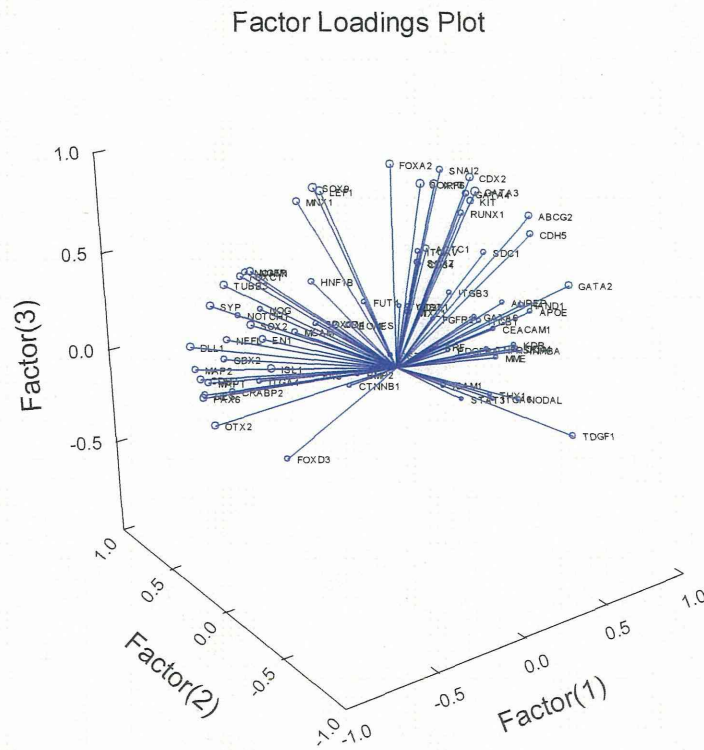


Fig. 4-4 三胚葉マーカー遺伝子発現量による主成分分析

A. 主成分寄与率. B. 変量プロット.



Table 4-3 第1主成分, 第2主成分および第3主成分

遺伝子名	第1主成分
APOE	0.973
KDR	0.938
ANPEP	0.917
CD44	0.916
CEACAM1	0.869
HAND1	0.86
MME	0.84
GATA6	0.837
TNFRSF1A	0.83
NODAL	0.81
ITGA6	0.808
THY1	0.794
CDH5	0.787
ITGB1	0.757
PDGFRA	0.757
TDGF1	0.755
SDC1	0.742
INHBA	0.712
FGFR2	0.704
GATA2	0.704
STAT3	0.7
ITGB3	0.695
ABCG2	0.671
RUNX1	0.608
CD34	0.581
GATA4	0.58
ITGAV	0.568
CD36	0.565
TWIST1	0.514
ICAM1	0.5
KIT	0.487
SNAI2	0.463
SRF	0.397
SST	0.394
CDX2	0.365
SOX7	0.363
ACTC1	0.32
MIXL1	0.296
FUT4	0.286
BMP2	0.262
GATA3	0.238
CD4	0.212
CTNNB1	0.195
EOMES	0.146
IRF6	0.105
FAS	0.082
FOXA2	0.077
SOX10	0.055
SOX17	0.039
HNF1B	-0.065
MCAM	-0.163
NOG	-0.192
MNX1	-0.239
LEF1	-0.249
ITGA4	-0.268
FOXD3	-0.293
SOX9	-0.31
NOTCH1	-0.317
NCAM1	-0.353
FOXC1	-0.426
EN1	-0.47
NGFR	-0.482
CRABP2	-0.531
GBX2	-0.531
NEFL	-0.556
ISL1	-0.561
SOX2	-0.584
TUBB3	-0.655
NES	-0.666
MAPT	-0.701
SYP	-0.718
MAP2	-0.719
OTX2	-0.773
CDH2	-0.778
PAX6	-0.799
DLL1	-0.833

遺伝子名	第2主成分
NOTCH1	0.92
NOG	0.909
FAS	0.858
CD4	0.834
ITGA4	0.817
NCAM1	0.768
SOX17	0.751
BMP2	0.709
GBX2	0.698
FOXC1	0.69
CTNNB1	0.684
TWIST1	0.677
FUT4	0.675
CD36	0.673
NES	0.666
MAP2	0.651
CRABP2	0.634
FGFR2	0.633
MCAM	0.629
NEFL	0.619
HNF1B	0.617
EOMES	0.603
CD34	0.598
SST	0.59
ITGAV	0.589
PDGFRA	0.564
MAPT	0.561
FOXD3	0.526
NGFR	0.5
CDH2	0.497
ITGB3	0.482
SYP	0.478
DLL1	0.476
MNX1	0.46
TUBB3	0.45
GATA6	0.447
PAX6	0.439
EN1	0.427
OTX2	0.385
STAT3	0.373
SOX2	0.343
TNFRSF1A	0.331
CEACAM1	0.327
ANPEP	0.319
SOX7	0.317
ITGB1	0.313
MIXL1	0.306
RUNX1	0.285
ICAM1	0.278
SNAI2	0.275
SDC1	0.268
MME	0.262
THY1	0.252
LEF1	0.247
ITGA6	0.244
KDR	0.236
GATA4	0.216
SOX9	0.213
SRF	0.211
ISL1	0.209
CD44	0.192
ACTC1	0.191
APOE	0.159
FOXA2	0.152
HAND1	0.105
KIT	0.063
NODAL	0.04
CDH5	-0.034
INHBA	-0.074
CDX2	-0.081
SOX10	-0.112
IRF6	-0.15
ABCG2	-0.155
GATA3	-0.282
GATA2	-0.421
TDGF1	-0.436

遺伝子名	第3主成分
FOXA2	0.956
SOX10	0.931
IRF6	0.931
GATA3	0.904
SOX9	0.898
CDX2	0.898
LEF1	0.86
SNAI2	0.836
MNX1	0.755
KIT	0.725
GATA4	0.707
ABCG2	0.672
RUNX1	0.585
CDH5	0.526
ACTC1	0.484
NGFR	0.443
TUBB3	0.426
GATA2	0.391
SOX7	0.369
SDC1	0.359
FOXC1	0.352
NCAM1	0.335
SYP	0.328
ITGAV	0.312
HNF1B	0.27
SOX2	0.242
CD34	0.24
DLL1	0.147
MIXL1	0.123
EN1	0.117
HAND1	0.099
ITGB3	0.091
NEFL	0.072
FUT4	0.069
ISL1	0.062
NOG	0.061
NOTCH1	0.052
ANPEP	0.036
APOE	0.021
MCAM	0.019
EOMES	-0.004
TWIST1	-0.006
CD36	-0.016
SOX17	-0.02
ITGB1	-0.031
CDH2	-0.04
SRF	-0.055
INHBA	-0.056
MAP2	-0.057
GBX2	-0.063
GATA6	-0.066
CD4	-0.085
MAPT	-0.099
CEACAM1	-0.104
FGFR2	-0.106
PAX6	-0.11
KDR	-0.182
CD44	-0.182
NES	-0.209
TNFRSF1A	-0.212
CRABP2	-0.216
SST	-0.228
MME	-0.239
OTX2	-0.241
PDGFRA	-0.279
ITGA4	-0.289
ICAM1	-0.317
BMP2	-0.346
FAS	-0.357
CTNNB1	-0.385
NODAL	-0.392
TDGF1	-0.403
THY1	-0.439
ITGA6	-0.464
STAT3	-0.485
FOXD3	-0.61

**Table 4-4 iPS 細胞株の第 1 主成分得点, 第 2 主成分得点および第 3 主成分得点**

細胞株	第 1 主成分得点	細胞株	第 2 主成分得点	細胞株	第 3 主成分得点
R-2A	48.26	R-1A	25.09	R-12A	33.17
Ai-103	21.54	201B7	13.79	R-1A	7.11
Ai-100	14.27	R-2A	13.27	Ai-103	-2.08
R-12A	7.37	253G1	11.02	201B7	-3.12
201B7	-7.20	mc-iPS	-0.60	Ai-100	-5.65
Tic	-10.00	Ai-103	-6.41	253G1	-6.23
R-1A	-11.24	R-12A	-7.21	mc-iPS	-6.24
253G1	-20.41	Ai-100	-14.74	Tic	-6.26
mc-iPS	-42.59	Tic	-34.21	R-2A	-10.71

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」  
分担研究報告書

新規免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験法の開発

研究分担者：堤 秀樹 公益財団法人 実験動物中央研究所 試験事業部・部長  
（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

NOG (NOD/Shi-*scid* IL2R $\gamma$  null) マウスは、T 細胞・B 細胞・NK 細胞の欠損、マクロファージと樹状細胞の機能不全、補体活性の消失等の特徴を有する重度免疫不全マウスである (Ito *et al.*, Blood, 2002)。公益財団法人実験動物中央研究所は、この NOG マウスをヘアレス化した系統 (NOD/Shi-*scid* IL2R $\gamma$  null *Hr<sup>Hr</sup>*) を作出・保有しているが、本系統は被毛を有していないため、造腫瘍性試験を実施した際の視診・触診による判定が容易になるばかりではなく、イメージング技術を応用した各種評価系への利用が期待されている。そこで草川ら（第 12 回日本再生医療学会総会）のプロトコールにしたがい、HeLa 細胞に対する TPD50 の調査（実験）を行い、基本的性能調査を行った。移植後 10 週時点において、NOG ヘアレスマウスの結節形成数（割合）は NOG マウスのそれよりも低い傾向にあること、結節形成開始時期についても、NOG ヘアレスマウスは NOG マウスよりも僅かに遅い傾向がみられている。調査（実験）は現在も継続中であり、細胞移植後 16 週まで継続する。

### 研究協力者

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

## A. 研究目的

NOG (NOD/Shi-*scid* IL2R  $\gamma$  null) マウスは、T 細胞・B 細胞・NK 細胞の欠損、マクロファージと樹状細胞の機能不全、補体活性の消失等の特徴を有する重度免疫不全マウスである (Ito *et al.*, Blood, 2002)。異種細胞である HeLa 細胞の TPD50 を指標にした場合、細胞単体ではヌードマウスの約 30 倍に、細胞にマトリゲルを組み合わせることでヌードマウスの 5,000 倍以上に皮下結節形成感度が上昇する (草川ら、第 12 回日本再生医療学会総会)。公益財団法人実験動物中央研究所 (実中研) は、この NOG マウスをヘアレス化した系統 (NOD/Shi-*scid* IL2R  $\gamma$  null *Hr<sup>Hr</sup>*、以下 NOGヘアレスマウス) を作出・保有しているが、本系統はその名が示す通り被毛を有していないため、造腫瘍性試験を実施した際に視診・触診による判定が容易になることや、イメージング技術を応用した各種評価系への応用展開できることが期待されている。

その一方、このヘアレス遺伝子は BALB/cA-hr に由来しているため、オリジナルの NOD マウスが獲得した重度免疫不全能に変化が生じている可能性もある。それを解明するための最初の調査として草川ら (前述) と同様のプロトコールにしたがい、HeLa 細胞に対する TPD50 を求める実験を行った。なお、実験はまだ進行中のため、移植後 10 週 (平成 25 年 2 月末日) 時点までの中間報告となる。

## B. 研究方法

### B-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  $\gamma$  null *Hr<sup>Hr</sup>*) 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-2 HeLa 細胞を用いた造腫瘍性評価

#### B-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, 1x10<sup>2</sup>, 1x10<sup>3</sup>, 1x10<sup>4</sup> (個/匹)
- HeLa+マトリゲル群 : 0, 1x10<sup>1</sup>, 1x10<sup>2</sup>, 1x10<sup>3</sup> (個/匹)

#### B-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℃にて保存した。

#### B-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-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。

#### (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。

## C. 研究結果

### C-1 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)。

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)。

## E. 結論

試験終了していないため、結論は出していない。

## F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表 なし

G-2 学会発表 なし

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 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

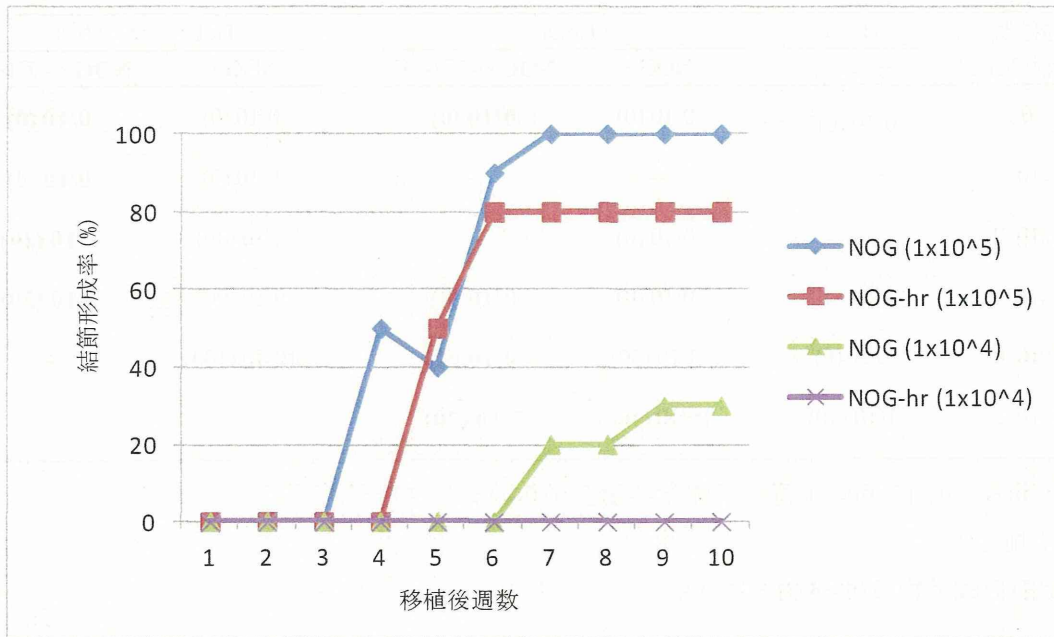
移植数 (個/匹)	HeLa	HeLa		HeLa + マトリゲル	
	ヌード*	NOG*	NOG ヘアレス	NOG*	NOG ヘアレス
0	0/10 (0) <sup>a</sup>	0/10 (0)	<b>0/10 (0)</b>	0/10 (0)	<b>0/10 (0)</b>
1x10 <sup>1</sup>	—	—	—	0/10 (0)	<b>0/10 (0)</b>
1x10 <sup>2</sup>	—	0/10 (0)	—	4/10 (40)	<b>2/10 (20)</b>
1x10 <sup>3</sup>	—	0/10 (0)	<b>0/10 (0)</b>	9/10 (90)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

\*: 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

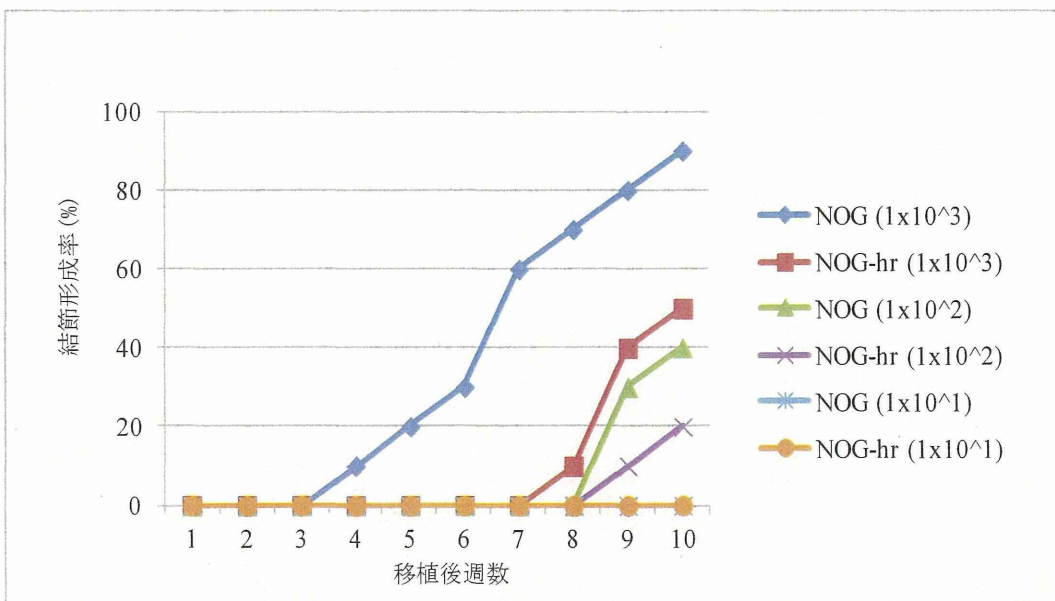
—: 実施せず

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** 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。



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」  
分担研究報告書

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

研究分担者：澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第三室・室長

研究要旨

本研究では、幹細胞の安全性と品質の確保に関する新規評価手法の開発を目的として、遺伝子発現解析技術により、バイオマーカーを検索することによって幹細胞の品質を確保する許容変動域の設定を目指す。我々はこれまでに、間葉系幹細胞の *in vitro* 培養時の遺伝子発現変化を網羅的に解析し、Ewing 肉腫 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 CCND2, IGF2BP1 など 9 遺伝子を抽出した。そこで今年度は、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（hMSC）への CCND2, IGF2BP1 の過剰発現などを行いがん化のマーカースとしての妥当性を調べることを目的とした。CCND2, 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。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- $\beta$ 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。また、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。

研究協力者

河野 健

国立医薬品食品衛生研究所

医療機器部 研究員

## A. 研究目的

間葉系幹細胞は、骨、軟骨等に加え、肝、心筋など胚葉を越えた分化も可能な細胞であり、幅広い医療分野での再生医療への応用を目指した臨床研究がすでに行われている。現在、骨髄、脂肪組織、臍帯血由来の間葉系幹細胞について、その採取技術及び *in vitro* での培養技術が確立されており、それぞれの由来によって分化能を含む細胞の性質の違いなども示されている。幹細胞は多分化能と同時に自己複製能を持つ細胞であるため、正常細胞でありながら増殖能力を持つ。幹細胞を細胞組織加工医薬品または医療機器に利用するためには、細胞を生体内から取り出して *in vitro* で培養して増殖させるという工程を経る場合が多い。しかし、*in vitro* 培養中の自己複製能が正常に制御されていない場合、がん化のような好ましくない変化が起きる可能性も否定できない。このため、幹細胞の *in vitro* 培養中の性質の変化に着目し、その品質を検討することは非常に重要であると思われる。再生医療において、増殖期間中における幹細胞の phenotype 維持は、その後の治療への利用の際に非常に重要となる。一方、長期培養に伴う幹細胞のがん化も報告<sup>1)</sup>されたが、その後その報告は他の癌細胞の混入によるものであったと判断され取り下げられており<sup>2)</sup>、未だ長期培養による影響の全貌は把握されていない。再生医療の健全且つ迅速な発展には細胞及び細胞製品の安全性や品質を担保することが必須であり、少なくとも一定期間の培養において幹細胞の品質が維持されているかを評価・判定する指標が求められる。

そこで本研究では、幹細胞の安全性と品質の確保に関する新規評価手法の開発を目的として、遺伝子発現解析技術により、バ

イオマーカーを検索することによって幹細胞の品質を確保する許容変動域の設定を目指す。我々はこれまでに、幹細胞の安全性を評価するための遺伝子レベルにおけるマーカーの検索を行うために、幹細胞の培養時の安全性として最も懸念されるがん化について、近年その由来が間葉系幹細胞であろうと報告<sup>3)</sup>されている Ewing 肉腫を陽性対照として間葉系幹細胞と比較検討した。用いた Ewing 肉腫は 4 種類 (Hs822.T, Hs863.T, RD-ES, SK-ES-1) で、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) との比較を行うことにより、肉腫細胞に特異的な発現パターンについて検討した。その結果、Hs822.T と Hs863.T については他の 2 種の肉腫細胞よりも hMSC の発現パターンにより近い事がわかった。未分化細胞 (hMSC) に似た発現パターンの 2 種に着目してがん化のマーカー候補を絞り込み、CCND2, IGF2BP1 など 9 遺伝子を抽出した。そこで今年度は、hMSC への CCND2, IGF2BP1 の過剰発現などを行いがん化のマーカーとしての妥当性を調べることを目的とした。CCND2, 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。

## B. 研究方法

### 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 1 に示した。

## 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' - GAATTCGCCACCATGGAGCTGCTGTGCCACGAGG -3' (下線; EcoR I 認識部位), Reverse 5' - CTCGAGTACAGGTCGATATCCCGCACG-3' (下線; Xho I 認識部位)、IGF2BP1 : Forward 5' - GAATTCGCCACCATGAACAAGCTTTACATCGG -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。

## 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/cm<sup>2</sup> 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  $\mu$ g/ml) または G418 (250  $\mu$ g/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。

## 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。

## 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

それぞれの遺伝子の 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' -TACTTCAAGTGCCTGCAGAAGGAC-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- $\beta$ 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 Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) を用いて Roche Light Cycler (version 4.0) で行った。

#### 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/cm<sup>2</sup> 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  $\mu$ 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。

#### 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。

#### 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  $\mu$ 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。

#### 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、倫理的問題はないと思われる。

### C. 研究結果

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 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、