

ークエンس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、通常の次世代シークエ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。

### 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 分子シークエ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 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ったが、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ことが存在するが、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。

#### D. 考察

DNA シークエ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わけであるが、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。

再生医療における、DnA シークエンサーの細胞の品質評価への利用に関しては、主に細胞の同一性および安定性(培養環境の影響を含めた)という二つの視点が考えられる。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、ほぼ完璧であるといえる。この観点では、エクソンシーケンスでも十分であり、細胞を取り間違えは起きないと考えられるが、例えばマスターバンクに登録した汎用性の高い細胞株の場合には、さらにホールゲノムで情報を取得しておくことは有意義であると考えられる。

現在では1000ドルでホールゲノムが読める程度のコストになり、マスター細胞については解析は一度のみでよいことも考慮すると、品質保証データとしてホールゲノム情報を取得しておくことは、十分に現実的な要求であるといえる。これにより、同一性の保障のみならず、遺伝的安定性の評価にも応用が可能となる。また、ガン関連遺伝子等の変異に関する情報は、細胞の腫瘍原性を評価する上でも重要である。機能的保障という意味においては、エクソンシーケンス、さらには、既知ガン関連遺伝子変異の検出のみでも十分であるかもしれないが、未知の変異や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意味が大きい。コスト面から最終製品でどこまでを要求するかという問題もあるが、汎用性を持つマスター細胞に関しては、ホールゲノムシーケンスを要求しても良いだろう。現状では、エクソンシーケンスをする際に、ターゲットのエンリッチメントに用いる前処理に比較的成本もかかるため、シーケンスコ

ストが下がれば、むしろホールゲノム解析の方が優先される可能性もある。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るが、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。

シーケンス解析に関しては、癌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2割程度にならないと検出が不可能であるといえる。これを前提にシーケンスデータの利用を考えなければならないが、この限界を打破する現実的な手法として、一定期間細胞に培養を加えた後に解析を行うことを提唱したい。我々は過去にhMSCを用いて培養過程における新たな変異の固定を検出したが、詳細な解析の結果、オリジナルな細胞集団にあったごく微量の変異細胞が、長期培養課程で、細胞集団全体に広がっていき最終的にはドミナントとなったことを確かめた。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ため、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、変異により細胞が増殖性を獲得した際、即ちガン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。

一方で、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の評価も重要な課題となっている。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が、この観点において、我々は次々世代シーケンサーとして注目される1分子シーケンサーの利用に着目した。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応用していきたい。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 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

2) 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

3) 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

### 2. 学会発表

1) 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)

2) 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)

3) 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)

4) 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)

## 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

表 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;splicing	AMPD1
chr01	115253684	115253684	A	G	hom	190	45	45	intronic	NRAS
chr01	115255710	115255711	TT	-	hom	214	62	62	intronic	NRAS
<b>chr01</b>	<b>115256529</b>	<b>115256529</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>hom</b>	<b>222</b>	<b>49</b>	<b>49</b>	<b>exonic</b>	<b>NRAS</b>
chr01	115290340	115290340	A	G	hom	222	55	55	intronic	CSDE1
chr01	115296984	115296984	G	C	hom	201	49	49	intronic	CSDE1
<b>chr09</b>	<b>21970916</b>	<b>21970916</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>hom</b>	<b>222</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>exonic</b>	<b>CDKN2A</b>
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 1 ホールゲノムシーケンスデータの冗長度

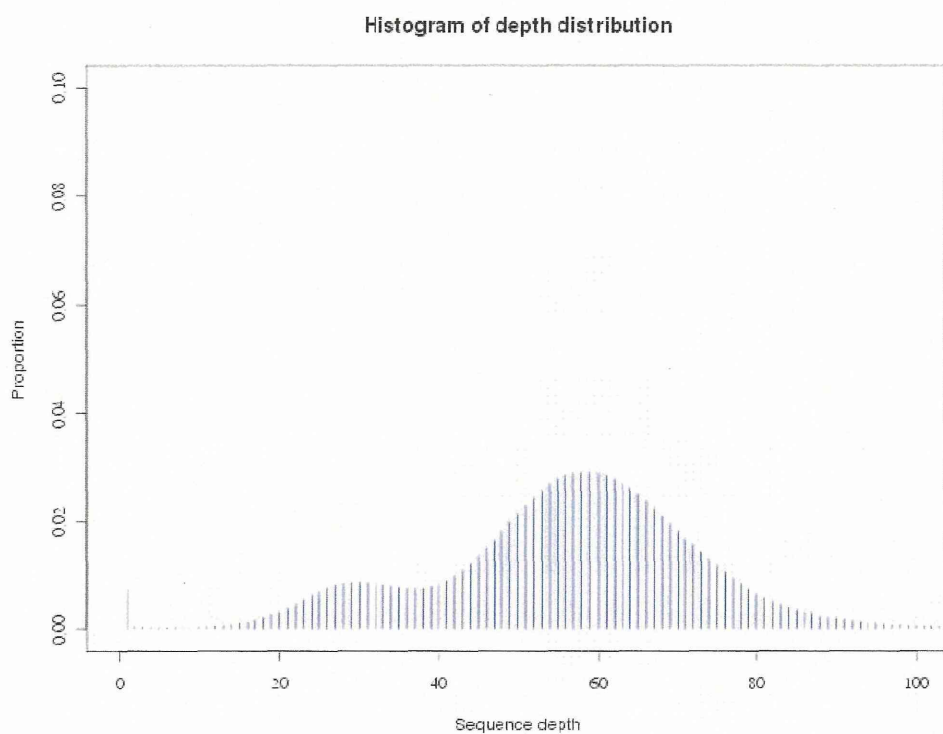


図 2 HL60-RG 細胞 22 番染色体の Homo SNP Call 一致率

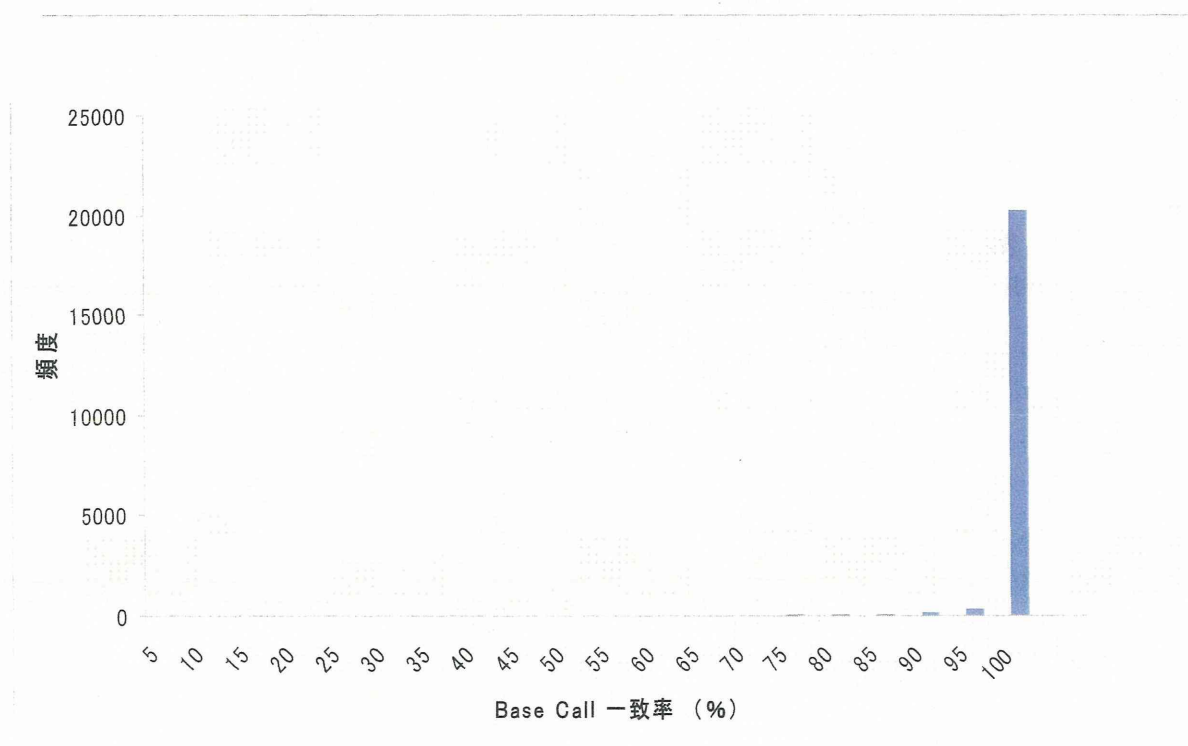


図3 HL60-RG 細胞 22 番染色体の Hetero SNP Call 率

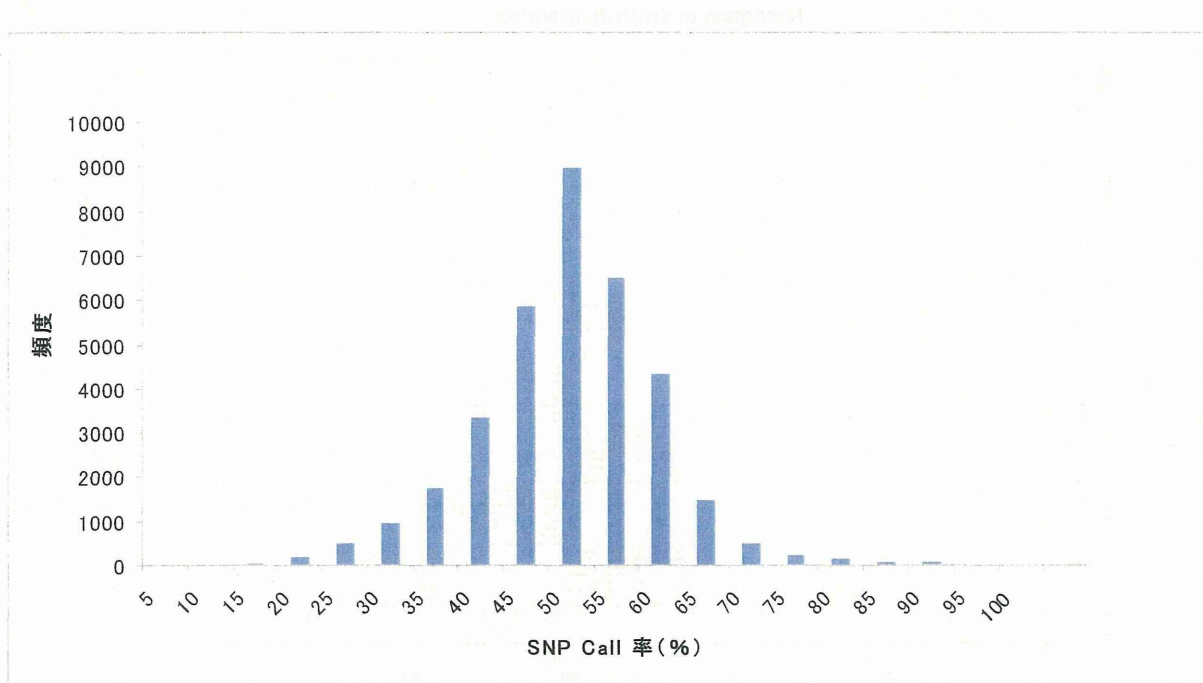
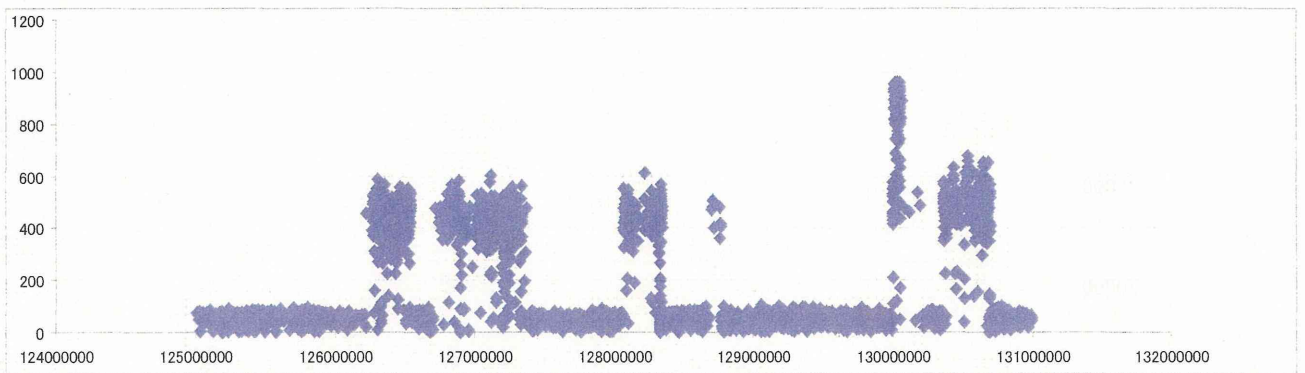


図4 シークエンスデータを利用した 8 番染色体 c-myc 領域のコピー数変化の解析



(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)

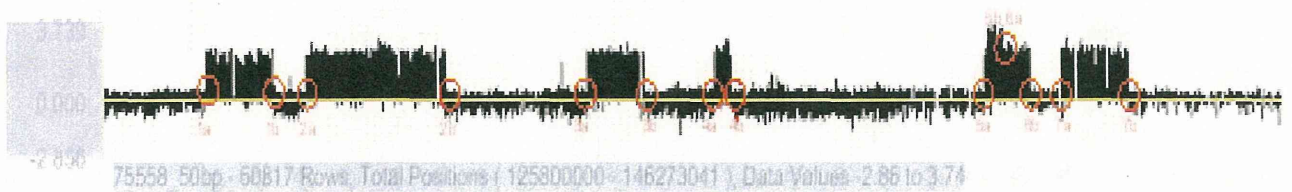
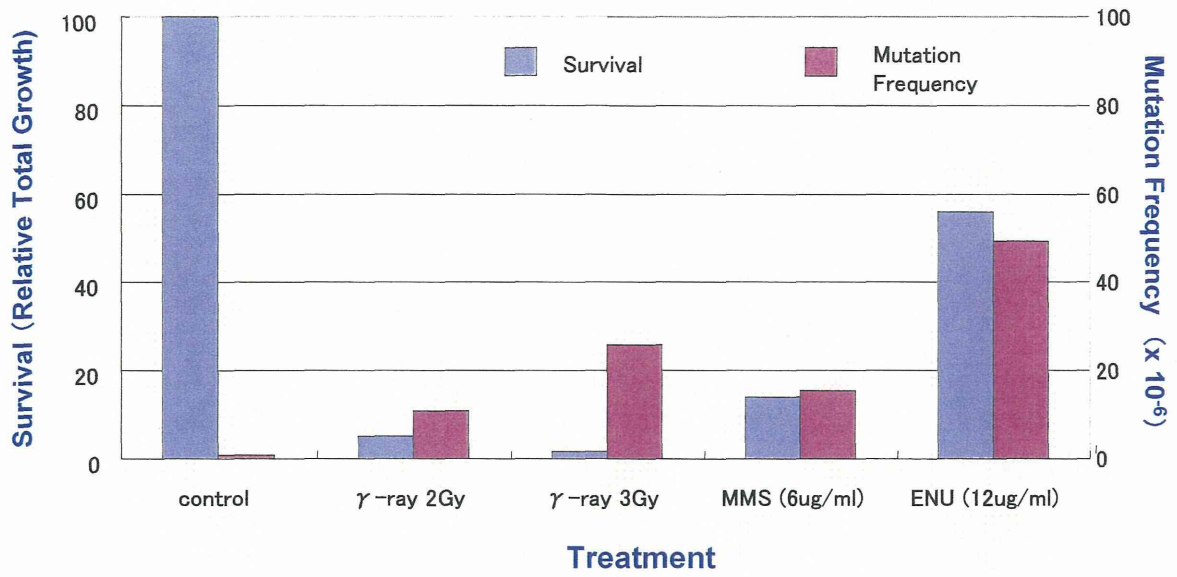


図5 TK6細胞を用いた突然変異試験結果





厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器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

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

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  
研究分担者：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

**研究要旨**

iPS細胞といった多能性幹細胞は、再生医療を目的とした細胞・組織加工製品の原材料として大きな期待を担っている。多能性幹細胞利用製品の実用化促進には、多能性幹細胞から目的細胞への分化効率を上昇させ、目的外細胞の製品への混在をより低減する必要がある。多能性幹細胞は分化プロペンシティを持つことから、目的細胞への分化に最適な株を選定して、製品化を行うことが重要である。本研究は、多能性幹細胞株の目的細胞への分化を適切に予測することを目標とし、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を行う。ヒトiPS細胞株9株から胚葉体を形成させ、三胚葉マーカー遺伝子を定量し、主成分分析を行うことにより、各々の細胞株の分化プロペンシティを数値化した。さらに未分化状態でのiPS細胞株の網羅的な遺伝子発現解析を、マイクロアレイ解析によって検討した。その結果、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。今回の結果は、マイクロアレイ解析のデータと合わせることにより、分化プロペンシティと発現量との高い相関を持つ遺伝子の探索に繋がるものと期待される。

**研究協力者**

黒田 拓也 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 医薬品質保証学講座 修士課程1年  
草川 森士 先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 研究員  
田埜 慶子 国立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 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

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) や胚性幹細胞 (ES 細胞) といった多能性幹細胞は、再生医療を目的とした細胞・組織加工製品の原材料として大きな期待を担っている。その理由として、①様々な系譜の細胞に分化するという幅広い多能性を有することと、②半永久的な自己増殖能を有することが挙げられる。幅広い多能性を有するので、目的細胞に分化させることにより今まで入手困難であった様々な細胞を作製することが可能である。また半永久的な自己増殖能を有するため、大量に培養して分化を促すことにより、これまで製造できる量が限られていた細胞・組織加工製品を安定的に供給することが可能である。実際に米国では、Geron 社の脊髄損傷患者を対象としたヒト ES 細胞由来オリゴデンドロサイトの治験（経済的事由より中止）と、アドバンスト・セル・テクノロジー社の加齢黄斑変性患者とスタルガルト病患者を対象としたヒト ES 細胞由来網膜色素上皮細胞の治験が既に行われている。国内では、理化学研究所と先端医療振興財団の滲出性加齢黄斑変性患者を対象としたヒト自己 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の臨床研究が 2013 年度に開始する予定である。

多能性幹細胞を利用した細胞・組織加工製品の臨床応用に当たり懸念されるのは、製品に混在する可能性のある造腫瘍性細胞による移植部位での腫瘍形成である。未分化の多能性幹細胞は、動物に移

植することにより奇形腫（テラトーマ）を形成するという造腫瘍性を元来有する。製品中の未分化細胞は腫瘍形成を誘発する可能性があるため、製造工程における未分化細胞の残存に対する方策が強く望まれている。また未分化な多能性幹細胞を分化させることにより製品が製造されるため、目的とは異なった分化細胞などの製品への混在の可能性もある。これらの目的外細胞の製品への混在をより低減するには、多能性幹細胞から目的とした細胞への分化効率を上昇させる必要があり、分化方法の改良が世界中の研究機関で精力的に行われている。

「分化プロペンシティ」とは、ある系譜の細胞への分化のしやすさのことである。ヒト多能性幹細胞は、内胚葉、中胚葉および外胚葉系の細胞に分化することが可能であるが、その分化プロペンシティは細胞株間で大きく異なることが報告されている。すなわちヒト多能性幹細胞の肝臓細胞、心筋細胞や神経細胞などへの分化プロペンシティは、細胞株に大きく依存する。したがって細胞・組織加工製品の品質・安全性を担保するためには、分化方法の改良だけではなく、目的細胞への分化効率が高い最適な株を選別し、最終製品に混入する目的外細胞の数をできるだけ少なくする必要がある。しかしながら製品に最適な多能性幹細胞株を選別する際に、すべての細胞株を分化させ、目的細胞に特異的に発現している遺伝子・タンパク質の量、細胞機能、細胞形

態などで判別することは、時間的にも労力的にも負担が大きい。未分化状態における各々の多能性幹細胞株の特性から各々の株の分化プロペンシティが予測できれば、より少ない時間と労力で最適な株を選別することが可能になることが想定される。

本研究は、iPS 細胞株の目的細胞への分化を適切に予測することを目標とし、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を行う。ヒト iPS 細胞株 9 株から無血清条件下で胚葉体を形成させ、三胚葉に選択的に発現するマーカー遺伝子を定量し、主成分分析を行うことにより、各々の細胞株の分化プロペンシティを数値化した。さらに未分化状態での iPS 細胞株 9 株の遺伝子発現を、マイクロアレイ解析によって検討した。

## B. 研究方法

### B-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 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 (リプロセル) 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  $\mu$ 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%CO<sub>2</sub>-95%Air, 37°C の条件で培養し、培地交換は毎日行った。

### B-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 µg/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-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 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 µg 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-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 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 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. 1)、中胚葉マーカー (Fig. 2)、外胚葉マーカー (Fig. 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)。

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 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)。

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/ $\beta$ -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 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)。

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 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)。

#### C-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

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

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。

## F. 研究危険情報

なし



## G. 研究発表

### G-1 論文発表

1. 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
2. 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.
3. Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products. *Biol. Pharm. Bull.* 2013;36(2):189-92.
4. 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
5. 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  $\beta$ -blocker in G protein-independent and GRK5/ $\beta$ -arrestin2-dependent signaling pathways. *J Biol Chem.* 2012;287(42):35669-77.
6. 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
7. 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.
8. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療における細胞・組織加工製品の治験とレギュレーション *実験医学増刊* 2012; 30(10): 1702-1707.
9. 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.
10. 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. 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)

2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. 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. 取得特許

なし

### H-2. 実用新案登録

なし

### H-3. その他

なし

**Table 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 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