

201328037A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤陽治

平成26(2014)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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 陽 治

平成 26 (2014) 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 . . . . . 佐藤 陽治	1
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 . . . . . 堤 秀樹	69
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 . . . . . 澤田 留美	79
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 . . . . . 鈴木 孝昌	99
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 . . . . . 安田 智	117
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	144
IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . .	147

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、マトリゲルに HeLa 細胞を懸濁して NOG マウスに投与することにより、従来の国際ガイドラインにある方法より約 5,000 倍高感度で腫瘍細胞を検出できることを既に示している。NOG ヘアレスマウス (NOG-*hr*) 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。しかし、その免疫学的な背景がオリジナルの NOG マウスと同等かは不明確であったため、HeLa 細胞の TPD<sub>50</sub> を指標にして異種細胞の生着能を、ヒト臍帯血由来造血幹細胞移植後の経時的 FACS 解析データを指標にして血球細胞の分化動態を求め、その差異を NOG マウスと比較した。NOG-*hr* マウスの異種細胞 TPD<sub>50</sub> は HeLa 細胞単独移植、あるいはマトリゲルとの混合移植の何れにおいても NOG マウスよりも高値を示し、異種細胞生着能が僅かながら低いことが判明した。また、ヒト造血幹細胞移入後のヒト細胞 (CD45 陽性細胞) の出現率はいずれのポイントにおいても NOG-*hr* マウスの方が低かった。しかし、各細胞分画には両者間に大きな差異はなかった。これらのことは NOG-*hr* マウスの免疫不全能は NOG マウスと量的な差はあるものの、質的な差はないことを示している。②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い、Cyclin D2 の強制発現によって hMSC の増殖が亢進されることを見出した。遺伝子発現の網羅的解析から、Cyclin D2 の強制発現によって hMSC の「細胞増殖」や「細胞周期」に関わる機能が有意に亢進されることがわかった。また、hMSC において genome integrity を脅かす可能性がある LINE-1s と、その抑制因子と報告されている A3B との関係について、A3B 遺伝子型と LINE-1s の発現量の解析を行った。A3B mRNA 発現量と LINE-1s mRNA の発現量には相関関係は見られなかった。しかし、LINE-1s mRNA の ORF2 領域の配列を解析したところ、A3B を発現する Ins/Ins と Ins/Del では同程度の変異が見られたが、Del/Del ではほとんど変異が見られなかった。したがって、Del/Del では遺伝子配列が保存された転移可能な LINE-1s が多く残存している可能性が示唆された。③我々は、主に細胞の遺伝的安定性の評価という観点から、次世代型シーケンサーの活用に関して検討を行ってきた。ホールゲノムシーケンシングに関しては、バンク化されるマスター細胞の品質保証としての利用が考えられているが、そのデータの信頼性評価と解析が課題となっている。我々は、既に遺伝子増幅や染色体のリアレンジメントが起きていることが確認されている細胞をモデルとして用いて、次世代シーケンサーを用いたホールゲノム解析を進めた。シーケンシング解析法としての有用性ととも、コピー数変化の検出法としても有用であることを示すとともに、今回は遺伝子レベルでの欠失および増幅の検出に関する知見を得た。一方で、LC-MS/MS を用いたプロテオミクスデータの可視化により各種細胞より得られるタンパク発現プロファイルに関する質的および量的情報をリファレンスデータとして提供するためのツールとして ProteomeMap というソフトウェアを開発した。④ヒト iPS 細胞 10 株から胚葉体を形成させ、三胚葉系細胞のマーカー遺伝子を定量し、主成分分析を行うことにより、各々の細胞株の内胚葉、中胚葉および外胚葉系細胞へ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ヒト iPS 細胞株の網羅的なトランスクリプトーム解析を行い、発現量と分化プロペンシティとの相関のある mRNA と miRNA の同定を試みた。今回の結果は、未分化状態のヒト iPS 細胞株における内胚葉、中胚葉および外胚葉系細胞への分化プロペンシティ予測マーカーの同定に繋がるものと期待される。【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4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
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
スレッシュ ティルパッティ	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第3室
黒田 拓也	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第4室 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2年
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
中島 啓行	(公財)先端医療振興財団 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 開発支援室 研究員
高田 のぞみ	(公財)先端医療振興財団 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 開発支援室 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などにおいても最重要課題とされている。また再生医療の実用化促進に向けて、平成25年4月に「再生医療推進法（再生医療を国民が迅速かつ安全に受け入れられるようにするための施策の総合的な推進に関する法律）」が成立し、さらに平成25年11月には「薬事法等の一部を改正する法律」および「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」が成立した。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（再生医療製品）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。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。しかしながら、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）のバラツキがあり、その情報は原材料である細胞株の選択に必要不可欠である。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実施する。

平成25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、NOGヘアレスマウスにおけるHeLa細胞のTPD<sub>50</sub>を指標とした異種細胞の生着能と、ヒト臍帯血由来造血幹細胞移植後の経時的FACS解析データを指標にした血球細胞の分化動態を求め、NOGマウスと比較した。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、遺伝子発現解析により抽出された遺伝子のヒト骨髄由来間葉系幹細胞（hMSC）におけるがん化マーカーとしての妥当性を調べた。また、遺伝子の不安定化に関与するレトロトランスポゾンのhMSCでの発現や転移について検討した。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から得られる配列情報の信頼性およびその評価基準の設定に向けた基礎検討を行った。また、網羅的ペプチド発現情報を可視化し、リファレンスデータを提供するためのソフトウェアの開発を開始した。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三胚葉系への分化プロペンシティと発現量との相関のあるmRNAとmiRNAの同定を試みた。

## 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 異種細胞 (HeLa 細胞) 生着能の差について

##### B-1-1-1 動物

実中研にて液体窒素中に保存している NOG-*hr* マウスの凍結保存胚から個体に戻した雌雄各 80 匹を用いた。また、比較対象として雌ヌードマウス 40 匹 (日本クレア) および雌 NOG マウス 100 匹を用いた。なお、雄ヌードマウスおよび雄 NOG マウスに関する TPD<sub>50</sub> のデータは草川ら (第 12 回日本再生医療学会総会) のデータを引用した。

##### B-1-1-2 試験群構成

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) に移動後、1 週間の馴化を経た後、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)」を用いて、Table 1 に示した群に分けた。全て 10 匹/群とし、個体識別は耳パンチ/カット法により行った。

##### B-1-1-3 被験細胞と移植方法

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 (LONZA, Allendale, NJ) により、投与容量が 0.1 mL/匹になる様に懸濁調整し、25 G 注射針付き 1 mL 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。移植は無麻酔下にて各マウスの背部皮下に行い、移植日を 0 日とした。

##### B-1-1-4 結節形成の判定

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、移植部位を採材した。

##### B-1-1-5 TPD<sub>50</sub> の計算

雌雄別, 群別に結節形成率を求め, 統計解析ソフト Prism (Ver. 6 GraphPad Software, Inc.) を使用し, 4 パラメータのロジスティック回帰分析の結果より算出した。

### B-1-2 ヒト臍帯血由来造血幹細胞の分化動態の経時的变化

#### B-1-2-1 動物

B-1 と同様に, 凍結保存胚から個体に戻した NOG-*hr* マウス雌 3 匹, 雄 4 匹および NOG マウス雌雄各 5 匹を用いた。

#### B-1-2-2 ヒト臍帯血造血幹細胞移入および FACS 解析

マウスは 7-8 週齢時に 2.5 Gy の放射線照射を行った後, ヒト臍帯血由来造血幹細胞 (Allells, LLC, Alameda, CA)  $8.5 \times 10^4$  個/匹を尾静脈より移入した。

移入後 4, 8, 13, 16 および 20 週後にイソフルラン吸入麻酔下で眼窩静脈叢より 100 $\mu$ L 採血して 2 本のチューブに分取し, 各々遠心分離 (3000 rpm, 3 分, 室温) して血漿分画を得た後, 1 x RBC lysis buffer 1 mL を加えての遠心分離 (3000 rpm, 3 分, 室温) を数回繰り返した。上清除去後, 予め調整した抗体カクテル A

( mCD45, hCD45, hCD3, hCD19, hCD33, BioLegend, San Diego, CA) あるいは B (hCD45, hCD3, hCD4, hCD8, hCD56, BioLegend, San Diego, CA) を添加して充分攪拌し, 氷上で 30 分静置後 2% FBS 加 PBS, 1 mL を添加して遠心分離 (3000 rpm, 3 分, 室温) し, 上清を廃棄した後 P/RNase staining buffer, 125  $\mu$ L を添加した染色細胞浮遊液を FACSCant (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) にて測定・解析した。

### B-1-3 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, 作業者に直接接触することなく動物に移植された。さらにヒト臍帯血由来造血幹細胞は国内の法律に則り, インフォームドコンセントの得られたボランティアから提供された主要感染症陰性の証明書が添付された市販品を使用した。

## 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 Cyclin D2 の過剰発現による hMSC 遺伝子発現変化の網羅的解析

#### B-2-1-1 細胞培養

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 : hMSC (Lonza) は, Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を加えた培地 (MSCGM) で培養した。レンチウイルスベクター感染後の hMSC は, MSCGM に抗生物質 Puromycin (1 $\mu$ g/ml) を加えた培地で培養した。

#### B-2-1-2 Cyclin D2 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 遺伝子を増幅した。PCR に使用したプライマーは, Forward 5'-GAATTCGCCACCATGGAGCTGCTGTGCCACGAGG-3' (下線; EcoR I 認識部位), Reverse 5'-CTCGAGTCACAGGTCGATATCCCGCACG-3' (下線; Xho I 認識部位) である。増幅した PCR

産物は TArget Clone<sup>TM</sup>-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 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) に組換えた。作製したレンチウイルスベクタープラスミドを Lenti-X<sup>TM</sup> 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-2-1-3 組換えレンチウイルスベクターによる Cyclin D2 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)。タンパク質発現のネガティブコントロールとして空ベクターを感染させた (hMSC/Puro)。感染 48 時間後, 培地中に抗生物質 Puromycin (1  $\mu$ g/ml) を加え, 2 日ごと培地を交換し, Cyclin D2 タンパク質強制発現細胞を選択した。

#### B-2-1-4 Total RNA の調製

hMSC/CyclinD2 及び hMSC/Puro から RNeasy



Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を調製した。

#### B-2-1-5 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-2-1-6 パスウェイ解析

DNA アレイ解析による mRNA 発現の網羅的解析の結果から、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いてパスウェイ解析を行った。

#### B-2-1-7 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は市販品であり、倫理的問題はないと思われる。

### B-2-2 hMSC におけるレトロトランスポゾン (LINE-1) の発現解析

#### B-2-2-1 細胞培養

1) ヒト骨髄由来間葉系幹細胞：hMSCs (Lonza) は、Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を加えた培地 (MSCGM) で培養した。

2) 日本人指由来間葉系幹細胞：Yub621, Yub622, Yub623, Yub625, Yub631, Yub632, Yub633, Yub634, Yub 10F (医薬基盤研究所) は、POWEREDBY10 (GP バイオサイエンス) で培養した。Yub635, Yub636, Yub637b, Yub642p (医薬基盤研究所) は M061101 (GP バイオサイエンス) で培養した。

3) 日本人胎盤由来間葉系幹細胞：PL521, PL523 (医薬基盤研究所) は POWEREDBY10 で

培養した。PL512, PL514, PL518, PL532 (医薬基盤研究所) は M061101 で培養した。PL505, PL507, PL508 (医薬基盤研究所) は PLUSOID-M (GP バイオサイエンス) で培養した。

4) 日本人臍帯由来間葉系幹細胞：UC701, UC702, UC704 (医薬基盤研究所) は M061101 で培養した。

#### B-2-2-2 定量 Reverse transcription (RT) –PCR

(qRT-PCR) による mRNA 発現量の定量的解析

細胞から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA を

SuperScriptIII First-Strand Synthesis System (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い cDNA

へ変換した。得られた cDNA を使い LINE-1s 及び A3B mRNA 発現量を qRT-PCR 法により定量

した。LINE-1s の qRT-PCR にはハイブリダイゼーション法を用い、プライマー及びプローブは

Forward: 5'-GAGAACAAAGACACCACATACC-3', Reverse: 5'-

GGCATTTAGTGCTATAAATTTCCC-3', FAM-5'-TCTCTGGGACGCATTCAAAGCAGT-3'-BHQ1

を使用した。PCR 反応は LightCycler TaqMan Master (Roche Applied Science) を用いて Roche

LightCycler (version 4.0) で行った。A3B の qRT-PCR にはインターカレーション法を用い、

プライマーは Forward: 5'-GACCCTTTGGTCCTTCGAC-3', Reverse: 5'-GCACAGCCCCAGGAGAAG-3'を使用した。

PCR 反応は LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science) を用いて

Roche LightCycler (version 4.0) で行った。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。

#### B-2-2-3 A3B 遺伝子型決定

細胞から DNeasy Blood & Tissues Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を抽出し、PCR 法により A3B 遺伝子型を決定した。使用したプライマーは Deletion\_F; 5'-TAGGTGCCACCCCGAT-3', Deletion\_R; 5'-TTGAGCATAATCTTACTCTTGAC-3', Insertion1\_F; 5'-TTGGTGCTGCCCCCTC-3', Insertion1\_R; 5'-TAGAGACTGAGGCCCAT-3', Insertion2\_F; 5'-TGTCCTTTTCAGAGTTTGAGTA-3', Insertion2\_R; 5'-TGGAGCCAATTAATCACTTCAT-3'である。

#### B-2-2-4 LINE-1s mRNA の sequence

細胞から total RNA を抽出し、cDNA へ変換した。得られた cDNA を鋳型とし、LINE-1s open reading frame 2 (ORF2) 領域の一部をプライマー  
Forward:  
5'-CAGGGCAATCAGGCAGGAGA-3', Reverse:  
5'-TTGCCACGCCTATGTCCTG-3' を用いて PCR 法にて増幅した。PCR 反応は KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を用いた。反応後、増幅産物を Target Clone™-Plus- (TOYOBO) を用いてプラスミド pTA2 Vector に Ligation した。Ligation 後のプラスミドを用い、大腸菌 DH5 $\alpha$  (TOYOBO) を形質転換した。形質転換後の DH5 $\alpha$  からプラスミドを抽出し LINE-1s の sequence を行った。

#### B-2-2-5 LINE-1s の遺伝子配列

日本人由来間葉系幹細胞に発現していた LINE-1s の遺伝子配列は LINE-1.3 (L19088), L1 $\beta$ -thal (AF149422), L1 $_{RP}$  (AF148856) と比較した。配列は GeneBank のデータベースより得た。

#### B-2-2-6 倫理面への配慮

本研究において用いたヒト由来間葉系幹細胞

は全て市販品であり、倫理的問題はないと思われる。

### 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にて継代を続けた。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 $\mu$ l とタンパク質分解酵素 10 $\mu$ 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 $\mu$ 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 次世代シーケンサーを用いたホールゲノムシーケンス解析

シーケンス用のサンプルは、Illumina TruSeq DNA sample preparation guide に従い、1 $\mu$ 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ス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、シーケンス解析に関しては、株式会社アプロサイエンスに委託した.

### B-3-4 遺伝的不安定性モデルとしてのとして

### の BLM 欠損 TK6 細胞の利用

ブルーム症候群の原因遺伝子である BLM を、相同的組み換えを利用して薬剤耐性遺伝子と置き換えることにより破壊した TK6 BLM-TSCER2 株を国立医薬品食品衛生研究所、変異遺伝部より入手し、ホールゲノムシーケンス解析データを親株の TK6 と比較することにより、遺伝的不安定性の検出の可能性を検討した。シーケンス解析に関しては、株式会社アプロサイエンスに委託した。

また、発現タンパク質の変化についても、LC-MS/MS を用いたショットガンプロテオミクスの手法により比較した。

### B-3-5 タンパク質プロファイル情報提供のための可視化ツールとしての Proteome Map ソフトウェアの開発

LC-MS/MS を用いたショットガンプロテオミクス解析より得られた生データを用い、検出されたペプチドをイメージデータに変換して 2 次元マップ上に記載するとともに、MS/MS データやタンパク同定結果に関する情報をマップ上にて提供するためのソフトウェアとして「Proteome Map」の開発を行った。ソフトウェアプログラムのプログラミングに関しては、インド Rushmore 社に委託した。

### 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 ヒト iPS 細胞

本研究では、10 株のヒト正常細胞由来 iPS

細胞株 (201B7, 253G1, 409B2, 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, 409B2, 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 8 で示した。

### B-4-2 ヒト iPS 細胞から胚葉体の調製

胚葉体は、各細胞株あたり 6 サンプル作製した。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。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。胚葉体の total RNA 抽出は、RNeasy micro kit (キアゲン) を用いて行った。

### B-4-3 マイクロアレイ

マイクロアレイ解析は、各細胞株あたり 6 サンプルで行った。iPS 細胞株 10 種類を未分化の状態、60 mm 細胞培養ディッシュ (BD Bioscience) にフィーダーレス条件下で 6~7 日間培養したのち、RNeasy mini kit (キアゲン) を用いて total RNA を抽出した。各 RNA の品質評価は Agilent RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies) を用いて、28S と 18S の rRNA 比率を算出することにより純度を確認した。RNA サンプルのビオチンラベル化 cRNA 合成は、GeneChip 3' IVT Express kit (Affymetrix) を用いて、製品プロトコールに従って行った。GeneChip Hybridization Oven (Affymetrix) を用いて、Genechip アレイ Human Genome U133

Plus 2.0 Array (Affymetrix) に作製したビオチンラベル化 aRNA をハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後、GeneChip Wash and Stain Kit (Affymetrix) と GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) を用いて洗浄とフィコエリスリン染色を行った。その後、GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix) を用いて Genechip アレイの蛍光画像をスキャンし、イメージ画像を取得した。得られた蛍光強度のデータは Expression Console Ver.1.1 (Affymetrix) を用いて解析した。シグナルのノーマライズは MAS5 アルゴリズム、および MSK ファイル (Affymetrix) を用いて行った。

#### B-4-4 miRNA アレイ

miRNA アレイ解析は、各細胞株あたり 6 サンプルで行った。

iPS 細胞株 10 種類それぞれを未分化の状態、60 mm 細胞培養ディッシュ (BD Bioscience) にフィーダーレス条件下で 6~7 日間培養したのち、miRNeasy mini kit (キアゲン) を用いて miRNA を含む total RNA を抽出した。miRNA は、FlashTag Biotin HSR RNA Labeling Kit (Affymetrix) を用いて、プロトコールに従い miRNA のポリ A 鎖を伸長しビオチンで標識した。miRNA のビオチン標識は、ELOSA QC Assay をプロトコールに従って行い、確認した。GeneChip Hybridization Oven (Affymetrix) を用いて、ビオチン標識 miRNA サンプルを miRNA アレイ (miRNA 3.0 Array, Affymetrix) にハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後、GeneChip® Wash and Stain Kit (Affymetrix) と GeneChip® Fluidics Station (Affymetrix) を用いて洗浄染色を行った。その後 GeneChip Scanner (Affymetrix) でスキャンし、イメージ画像を取得した。得られた画像は、Expression Console 解析ソフトウェアでシグナルの数値化・解析を行った。

#### B-4-5 データ解析

マイクロアレイと miRNA アレイのデータは、当研究室が報告した方法 (*Biochem J.* 2011; 437: 345-55.) に従い、以下の 3 種類のフィルターをかけた。

[フィルター1]

Expression Console で解析された各 Probe Set のシグナルは Absolute Analysis (発現の有無を判定する解析) の結果、「発現があるもの: P (Present)」、「発現があるかわからないもの: M (Marginal)」あるいは「発現がないもの: A (Absent)」として判定がなされる。細胞株各群の 6 例の半数以上 (つまり 4 例以上) で P と判断された Probe Set については、当該細胞株においてその Probe Set がコードする遺伝子が発現していると判断した。逆に各群の 6 例のうち P 判定されたものが 3 例以下の場合には、当該細胞株においてその Probe Set をコードする遺伝子の発現はないと判断した。細胞株のうち、少なくとも 1 株以上において発現が見られる Probe Set は次のフィルターをかけ、全ての細胞株で発現が見られない Probe Set は棄却した。

[フィルター2]

一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) で細胞株間の遺伝子発現の平均値の比較を行い、有意水準 5% の条件で細胞株間の平均値に差がないという帰無仮説が棄却できたもの、すなわち 10 細胞株の中で発現が飛びぬけて多いもしくは少ないものが少なくとも 1 つは存在する結果が出た Probe Set は次のフィルターをかけ、いずれの細胞株間でも有意差が認められなかった Probe Set は棄却した。

[フィルター3]

細胞株 10 種類の最低の平均値と最高の平均値の差が 5 倍以上ある Probe Set をスクリーニングし、差が 5 倍より小さいものは棄却した。

#### B-4-6 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  $\mu$ 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 97 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 (*Methods*. 2001; 25: 402-8.) により相対的な遺伝子発現量を算出した。平均値と標準偏差により標準化 (z スコア化) した後、統計ソフトウェア SYSTAT (SYSTAT Software) により主成分分析し、外胚葉、中胚葉、内胚葉分化の指標となる主成分を得た。

#### B-4-7 倫理面への配慮

本研究計画は、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会にて承認済みである。

### **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

##### C-1-1 異種細胞 (HeLa 細胞) 生着能の差について

雄 NOG-*hr* マウスの異種細胞 TPD<sub>50</sub> は HeLa 細胞単独移植、あるいはマトリゲルとの混合移植の何れにおいても、NOG マウスよりも高く、異種細胞生着能が僅かながら低いことが明らかになった (Figs. 2, 3)。

一方、雌 NOG-*hr* マウスの異種細胞 TPD<sub>50</sub> は、HeLa 細胞単独の場合はヌードマウスと同等であり、マトリゲルと混合した場合は、同条件の NOG マウスよりも TPD<sub>50</sub> が低下する現象がみられた (Figs. 2, 3)。

#### C-1-2 ヒト臍帯血由来造血幹細胞の分化動態の経時的变化

##### C-1-2-1 末梢血中へのヒト細胞の出現

NOG および NOG-*hr* マウスにおけるヒト CD45 陽性細胞の出現は移入 4 週後からみられ、16 週後まで漸次的に増加した。出現率はいずれのポイントにおいても NOG-*hr* マウスの方が低かった (Fig. 4)。

##### C-1-2-2 細胞分画について

分化した各細胞分画は NOG-*hr* マウスおよび NOG 間における差異は観察されなかった。

移入 4 週後には B 細胞 (CD19 陽性細胞) が約 50% を占めており、移植後 8 週をピークに、以降減少した。T 細胞 (CD3 陽性細胞) は移入 13 週から出現し、時間の経過に伴い漸次的に増加した。

細胞障害性 T 細胞 (CD8 陽性細胞) およびヘルパー T 細胞 (CD4 陽性細胞) の割合に、NOG-*hr* マウスおよび NOG マウス間の大きな差異は認められなかった。

NK 細胞 (CD56 陽性細胞) は移入 4 週後から認められた、NOG-*hr* マウスの方が NOG マウスよりも出現率が多い傾向にあった。

#### 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

##### C-2-1 Cyclin D2 の過剰発現による hMSC 遺伝子発現変化の網羅的解析

Cyclin D2 強制発現より遺伝子の発現にどのような変化が起こっているのかを網羅的に調べるために、hMSC/CyclinD2 及び hMSC/Puro

から total RNA を抽出し, DNA マイクロアレイ解析を行った。

Cyclin D2 強制発現により遺伝子発現が 2 倍以上変化した遺伝子は 690 個あった (Fig. 5)。これらの遺伝子の発現変化について IPA によりパスウェイ解析を行い関与する細胞機能について検討したところ, 「細胞増殖」や「細胞周期」が Activation z-score が 2 以上あり統計学的, 生物学的に有意に亢進されることが示された (Table 2)。発現レベルが 2 倍以上変化した 690 個の遺伝子の中で, 細胞増殖に関わる遺伝子 186 個のうち 94 個が細胞増殖を促進する方向に発現レベルが変化していた (Table 3)。また細胞周期に関わる遺伝子については, 50 個のうち 19 個が細胞周期を進める方向に発現レベルが変化していた (Table 4)。

#### C-2-2 hMSC におけるレトロトランスポゾン (LINE-1) の発現解析

これまで, ヒト ES 細胞及び iPS 細胞で LINE-1s の発現が確認されていたが, hMSCs での発現については報告されていなかった。そこで Lonza から購入した欧米人由来 hMSCs から mRNA を抽出し, qRT-PCR によって調べたところ, 理化学研究所バイオリソースセンターから購入した iPS 細胞 (201B7) と同程度またはそれ以上に hMSC で LINE-1s が発現していることがわかった (Fig. 6)。

LINE-1s の転移を抑える細胞内因子として A3B が知られているが, この遺伝子には欠失多型が存在し, 日本人にその割合が多いと報告されている<sup>3)</sup>。A3B を発現しない日本人由来 hMSCs は LINE-1s の転移によってゲノムの安定性が損なわれる可能性が考えられたので, 次に A3B 遺伝子型と LINE-1s の発現量について解析を行った。

医薬基盤研究所から購入した日本人 25 人分の hMSCs において A3B 遺伝子型の解析を行っ

たところ, 野生型ホモ個体 (Ins/Ins) が 14 人, 野生型/欠失型ヘテロ個体 (Ins/Del) が 9 人, 欠失型ホモ個体 (Del/Del) が 2 人であり (Fig. 7, Table 5), 欠失型アリル頻度は 26%であった。

それぞれの細胞から mRNA を抽出し, A3B mRNA の発現を定量解析したところ, A3B 遺伝子型と mRNA 発現量にある程度の相関は見られたが, それぞれの遺伝子型の発現量の差は統計学的に有意な差ではなかった (Figs. 8, 9)。また, LINE-1s mRNA の発現量を定量解析し (Fig. 10), A3B mRNA と LINE-1s mRNA の発現量を比較したが相関関係は見られなかった (Fig. 11)。

次に Ins/Ins (Yub633, PL523), Ins/Del (Yub621, Yub631, Yub 10F), Del/Del (Yub637b, PL523) の LINE-1s ORF2 領域の遺伝子配列を調べた。転移能力が残っていると報告されている LINE-1s (LINE-1.3, L1 $\beta$ -thal, L1<sub>RP</sub>) と比較した結果, Ins/Ins の変異頻度が 4.24% (884 mutations/20839 bp) (Figs. 12A, 13A), Ins/Del が 3.46% (967 mutations/37942 bp) (Figs. 12B, 13B), Del/Del が 0.794% (202 mutations/25410 bp) (Figs. 12C, 13C) であった。また Ins/Ins や Ins/Del ではシトシン (C) →チミン (T) やグアニン (G) →アデニン (A) の変異が多く見られたが, Del/Del ではそれ以外の変異も見られた。

#### 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, 昨年度に報告した HL60-RG 細胞に続き, ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (Hmsc) に関しても, ホー

ルゲノムシーケンス解析を行った。

イルミナ HiSeq2000 シークエンサーにて 101bp リード 4 回のランにて読み取られたリード数は約 18.5 億で、塩基数としては 1871 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 Fig. 14 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 91.7% と良好であり、リファレンスゲノム上の 99.3% 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 99.1% 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% 未満であり、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 4,475,876 個、Indel (インサクションおよびデリション) の総数 687,240 個、合計約 500 万箇所が抽出された。

今回解析に用いた hMSC 細胞は、クローナな染色体異常を持つことが既に確認されている細胞であり、今回得られたホールゲノムシーケンスデータの各染色体部位のリード数 (冗長度) を用いた擬似的比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) 法による解析の結果、Fig. 15 に示すように、既に得られている 7 番および 17 番染色体の部分的コピー数の増減が確認できた。コピー数変化に関しては、塩基配列レベルで高精細な情報が得られるため、今後さらに詳細なりアレンジメントの解析に応用できると期待できる。さらに、従来のアレイ CGH 法等によっても検出されていなかった微細なコピー数変化も検出され、その確認が必要となった。

次に、すでに得られた HL60 細胞のホールゲ

ノムシーケンスデータについて、遺伝子レベルでの詳細なコピー数変化の検討を加えた。

Table 6 に、HL60 細胞の各染色体におけるコピー数変化の見られた領域と、そこに存在する遺伝子をリストアップしたものである。コピー数変化の解析は、10kb を単位として冗長度の平均を取ったデータを使用したため、コピー数変化の最小単位は 10kb となっているが、実際にはさらに細かい単位での検討も可能である。

全体としては、欠失に比べて増加の方が多く、領域としては短いものから長いものまで幅が見られた。一つの特徴としては、比較的近傍に増加または減少の同じ方向の変化がまとまって見られた点であり、代表的なものが 8 番染色体の c-myc 領域 (8q24) における複雑な増幅であり、合計 7 つの領域が約 16 コピーという類似した増幅度で変化していた。このうち一つの領域に関してはコピー数が 33 と他の約二倍であり、この領域を 2 回含んだ増幅単位が 1 ユニットとして増幅したことを示している。

欠失については主にコピー数は 1 と片側のアレルのロスを示したが、部分的にはホモ欠失の領域も認められた。注目すべきは 17 番染色体の欠失領域であり、Table 7 に示したように、ヘテロ欠失として短腕全体 (17p) のロスが見られるが、さらにこのうちの二つの領域、それぞれ癌抑制遺伝子である TP53 と ARHGAP44 (Rho GTPase activating protein 44) を含む短い領域はホモに欠失していることがわかった。即ち染色体の FISH 解析により 7p のヘテロ欠失は簡単に観察されていたが、正常に見えた片側のアレルにも欠失領域が存在し、短いため染色体解析においては検出不可能であった変化が、シーケンス解析データにより検出できたことになる。

また増幅している領域には、MAP2K3 や CDC27 という細胞周期に関連した遺伝子が存在し、癌化との関わりが示唆された。17 番染



色体以外においても、コピー数変化の見られた領域には重要と思われる遺伝子が多く含まれており、HL60 細胞の癌化のヒストリーを反映している可能性が考えられる。

さらに、コピー数変化のあった領域について見てみると、レトロトランスポゾンの挿入サイトを含めた繰り返し（相同）配列が特徴的に観察され、これらが染色体異常の生成に関与している可能性が示唆された。

### C-3-2 次世代シーケンサーを用いた細胞の遺伝的不安定性の検出

細胞の遺伝的不安定性を検出するためのモデル細胞として、国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部において開発された BLM 遺伝子ノックアウト細胞を使用した。BLM 遺伝子は染色体不安定性を示すブルーム症候群の原因遺伝子であり、DNA 二本鎖切断の修復酵素である DNA ヘリカーゼをコードしている。この遺伝子を破壊した TK6 細胞株は、親株に比べて高い染色体異常および突然変異誘発性を持つことが確かめられている。

この TK6 細胞 BLM 欠損株の遺伝子配列を、親株の TK6 細胞と比較して、突然変異およびコピー数変化を検出するため、ホールゲノムシーケンシング解析を行った。また同時にミトコンドリアのシーケンシング解析も行った。得られたシーケンシングデータの解析結果については、次年度の報告書にて報告する。

### C-3-3 タンパク質プロファイル情報提供のための可視化ツールとしての ProteomeMap ソフトウェアの開発

我々はこれまでに、LC-MS/MS を用いたショットガンプロテオーム解析により得られたデータの可視化に関する検討を行ってきたが、その経験を生かして、各種細胞のタンパク質発現プロファイルに関するリファレンス情報の提供

と細胞間のデータ比較を可能とするためのソフトウェア「ProteomeMap」の開発に着手した。

通常質量分析装置から得られるデータは、膨大な量の数値データであり、このままではその全貌および詳細をつかみにくいことから、リテンションタイムと質量数を(m/z)各軸に取った 2 次元マップ上にイメージデータとして変換して可視化を行うことにした。この際、各ペプチドピークに対してタンデムマス (ms/ms) 測定が行われていた場合には、そのスペクトル情報が付随してくるが、これらも合わせて情報提供できるよう、クリックابلマップとして、対応するペプチドピークをマップ上でクリックした際に、ピーク情報がグラフとして表示される機能を加えた。また、ms/ms 測定がされたピークに対しては、mascot によるデータベース検索でのタンパク質同定結果の取り込みを行い、mascot 検索結果を表示させる機能も開発した。実際のプログラミングに関しては外部の専門家に委託し、修正と改良を加えつつプロトタイプ of ソフトウェアが完成した。その内容を Fig. 16 に示す。

現在のところ使用している質量分析器が Thermo Scientific 社のものなので、.raw 形式の生データを取り込めるよう設計した。ここでは、細胞より得られたデータの例として TK6 細胞のプロテオームデータを使用した。得られたペプチドピークの総数は 48,950 であり、これらを横軸にリテンションタイム、縦軸に質量数 (m/z) を取りプロットした。(2) 得られたペプチドピークの総数は 48950 であり、全てのピークを 2 次元マップ上にスポットした。この 5 万近いペプチドのうち、実際に MS/MS 測定が成されたのは約 2 割の 10,000 個であり、そのうち MASCOT 検索にて同定されたペプチドの総数は 2805 と全体の約 6 パーセントであり、ここからタンパク質が同定されたのは 931 個であった。今後はさらに同定数を増やしていき

たい。

2次元マップ上 MS/MS データを持つペプチドピークは青または赤の印がマークされるが、前者は MASCOT 検索にて同定結果が得られたピーク、後者は未同定のピークをあらわす。画面はズームイン機能を有し、それぞれのピークをクリックすることにより、MS/MS のスペクトルデータを表示させることができる。

本ソフトウェアは複数のサンプルのデータを取り込み、相互に比較することが可能であり、各ピークの濃度からおよその定量比較が可能であるが、今後より定量的な比較が可能となるよう改良を加えてゆきたい。

以上のように、現段階ではスタンドアローンソフトウェアとして、生データの取り込みと可視化表示が可能であることが動作確認できたが、今後各種幹細胞のプロテオーム解析から得られたデータに関して同様に 2 次元マップ化を行うとともに、同定数を増やし、ウェブ上でリファレンスデータとして提供できるように改良を加えてゆきたい。将来的には、ウェブ上でのデータデポジットを可能にし、多種の細胞種やそれらの異なる状態におけるタンパク発現プロファイルに関するデータベースの構築を目標としている。

#### **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 細胞株の三胚葉へ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 10 株を、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 27 種類、中胚葉マーカー遺伝子 56 種類、外胚葉マーカー遺伝子 45 種類の mRNA 量を定量 PCR で測定した。しかしながら測定した三胚葉マーカー遺伝子は多岐にわたるため、各遺伝子の発現を分化プロペンシティと関連付けて解釈する際に、個々のマーカー遺伝子にどの程度の重み付けをした上で解釈してよいかは明らかでない。そこで得られた多くのデータをより分かりやすくするために、主成分分析を用いてデータ解析を行い、これによって算出された第一主成分得点から細胞株による分化プロペンシティの違いについて比較検討した。

外胚葉、中胚葉および内胚葉マーカー遺伝子について、それぞれの胚葉ごとに主成分分析を行った。この結果から、算出された主成分が資料の情報をどれくらい説明しているのかの目安を与える、すなわち主成分の妥当性を表す数値である寄与率を調べた。すると、外胚葉での第一主成分は 45 個ある資料のうち約 22 個の情報、すなわち資料の本質の約 48.6% を説明していることが認められた。また、中胚葉での第一主成分は 56 個ある資料のうち約 21 個の情報、すなわち資料の本質の約 38.2% を説明しており、内胚葉での第一主成分は 27 個ある資料のうち約 11 個、すなわち資料の本質の約 41.3% を説明していることが認められた (Fig. 17)。また外胚葉、中胚葉および内胚葉の主成分分析から算出された第一主成分係数を Table 9 に示した。第一主成分係数は、主成分の分散が最大になるようにかかる重みである。

さらに iPS 細胞株 10 種類における外胚葉、中胚葉および内胚葉マーカー遺伝子の第一主成分得点ランキングを作成した。iPS 細胞株 10 種類の標準化した遺伝子発現量の値と、外胚葉、中胚葉および内胚葉マーカーのそれぞれの主

成分分析から得た第一主成分係数の値を掛け合わせた値の総和である第一主成分得点を得た。この第一主成分得点について、各細胞株における外胚葉、中胚葉および内胚葉それぞれのマーカー遺伝子の合計点を算出し、ランキングを作成した (Table 10)。その結果、外胚葉は mc-iPS が最も第一主成分得点が高く、R-2A が最も第一主成分得点が低かった。また中胚葉および内胚葉は R-2A が最も第一主成分得点が高く、mc-iPS が最も第一主成分得点が低かった。すなわち mc-iPS は外胚葉に分化しやすく、中胚葉および内胚葉には分化しにくい傾向にあることを示し、同様に R-2A は中胚葉および内胚葉に分化しやすく、外胚葉には分化しにくい傾向にあることを示唆している。

#### C-4-2 iPS 細胞株の分化プロペンシティ予測マーカー候補の選別

未分化状態における発現量が各胚葉への分化プロペンシティと相関する遺伝子を探索するために、スピアマンの順位相関分析を行った。ここで相関係数として順位相関を選択した理由は、未分化状態における特定の遺伝子発現が外胚葉、中胚葉および内胚葉への分化に影響する場合、未分化状態の遺伝子発現量と分化効率は必ずしも線形の相関を示すとは限らないためである。また、いくつかの飛離れた値が存在する場合には、たとえ相関が線形であったとしても、ピアソンの積率相関係数などの間隔尺度や比尺度間の相関係数の場合はそれらの値に引きずられて不当に高い相関係数が得られてしまうからである。

まず、マイクロアレイ解析による mRNA および miRNA の発現量シグナルと、各細胞株における外胚葉、中胚葉、内胚葉それぞれのマーカー遺伝子の第一主成分得点ランキングを用いて、スピアマンの順位相関係数を算出した。順位相関係数が正の場合は 1 に近いほど相関

が高いことを表しており、分化しやすい細胞株に高発現していることを示している。また順位相関係数が負の場合は、-1 に近いほど相関が高いことを表しており、分化しにくい細胞株に高発現していることを示している。算出した順位相関係数について、有意水準 5% の条件 (相関係数が 0.648 より大きい、もしくは -0.648 より小さい) で有意差を検討した (Tables 11-14)。外胚葉分化プロペンシティと正に相関する probe set の数は mRNA で 136、miRNA で 3、負に相関する probe set の数は mRNA で 92、miRNA で 3 であった。同様に中胚葉では正に相関する probe set の数は、mRNA で 35、miRNA で 12、負に相関する probe set の数は mRNA で 7、miRNA で 1 であった。内胚葉では正に相関する probe set の数は mRNA で 9、miRNA で 23、負に相関する probe set の数は mRNA で 29、miRNA で 0 であった。これらの mRNA および miRNA を分化プロペンシティ予測マーカー候補とした。

## 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

NOG-*hr* マウスの HeLa 細胞 TPD<sub>50</sub> は雌雄間で著しい差が認められた。特に雌において HeLa 細胞移植群の TPD<sub>50</sub> がヌードマウスに近似であったにも関わらず、マトリゲルとの混合移植群では、極めて低い値 (1/6004) を示し、マウスの遺伝的素因よりも、移植細胞あるいは移植操作時の何らかの副次的要因に影響されていると考えられた。

ただし、雄の TPD<sub>50</sub> データ、ならびにヒト臍帯血由来造血幹細胞の分化動態を俯瞰すると、NOG-*hr* マウスは NOG マウスよりも免疫不全度が低下している傾向が充分に採れた。*hr* 遺伝子を NOD/Shi マウスに導入する過程において、スピードコンジェニック法を併用して理論

的には十分に遺伝子置換（バッククロス）したが、マーカー遺伝子以外の領域に何らかのBALB/c A の遺伝的素因が残存し、これに起因して免疫機構が僅かに惹起した可能性が考えられた。現在、より詳細な背景遺伝子検査とNOG マウスへの追加交配を実施している。

NOG-*hr* マウスの代替候補として当所ではBALB/c A *Rag2<sup>null</sup> Il2rg<sup>null</sup>* (BALB/c-dKO) も保有している。本系統にはヌード (BALB/c-dKO-nu) も存在しているため、同様の方法でTPD<sub>50</sub>を求めて、今回のデータと比較することを来年度計画している。また、NK活性および補体活性も測定中であり、レギュラトリーサイエンスの現場に最も適した造腫瘍性試験用動物を選択するための基礎データを今後も揃えていく。

## 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

### D-2-1 Cyclin D2 の過剰発現による hMSC 遺伝子発現変化の網羅的解析

本研究の昨年度までの検討により、Cyclin D2 の強制発現によって hMSC の増殖が亢進されることを見出した。今年度は、そのメカニズムについてさらに検討するために hMSC への Cyclin D2 の過剰発現による遺伝子発現の変化について網羅的に解析した。

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<sup>4-10)</sup>。一方で、Cyclin D2 の発現により細胞増殖が止まるという報告<sup>11)</sup>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<sup>12-16)</sup>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。遺伝子発現の網羅的解析から、Cyclin D2 の強制発現によって hMSC の「細胞増殖」や「細胞周期」に関わる機能が有意に亢

進されることがわかった。このことから、Cyclin D2 は細胞増殖やがん化等に関わる遺伝子群の発現に影響を及ぼす事によって hMSC の増殖亢進に寄与する事が示唆された。

### D-2-2 hMSC におけるレトロトランスポゾン (LINE-1) の発現解析

LINE-1s は動く遺伝子、レトロトランスポゾン的一种で、ヒトゲノムの約 17%を占めている。現在、ヒトゲノム中の多くの LINE-1s は遺伝子の一部欠失や変異を受けており、転移活性を失っているが、80-100 コピーは転移活性が残っていると考えられている。LINE-1s は胚細胞において活性化しており、発生初期に重要な役割を担っていると考えられている<sup>17,18)</sup>。体細胞の多くは LINE-1s がメチル化により不活性化していると考えられているが、ヒトの脳が発達する過程において神経前駆細胞で LINE-1s が活性化し、ゲノムの他の領域に転移する事が明らかとなっている<sup>19)</sup>。また、最近では ES 細胞や iPS 細胞などの幹細胞でも LINE-1s が活性化していると報告があった<sup>20,21)</sup>。LINE-1s の転移は個性や進化などの多様性の獲得に関わっていると想定されるが、一方でランダムな LINE-1s の転移は遺伝子の機能を壊す可能性があり、実際に血友病 A, B や筋ジストロフィーなどいくつかの遺伝性疾患を引き起こしている。

APOBEC 蛋白は細胞内に存在するシチジン脱アミノ化酵素の一つで、ヒト免疫不全ウイルスを始めとするレトロウイルスの感染抑制因子として知られている<sup>22)</sup>。APOBEC 蛋白はレトロウイルスが逆転写反応時に作るウイルス DNA にシトシン (C) からウラシル (U) への変異を導入する事で、最終的にウイルスゲノムに多数のグアニン (G) からアデニン (A) への変異を導入し、ウイルスの複製を阻害する<sup>23)</sup>。最近、APOBEC 蛋白の一つ APOBEC3B