

(A3B) が *in vitro* の系で LINE-1s の転移を抑えると報告され²⁾, これによって幹細胞などでは LINE-1s のランダムな転移を抑えているのではないかと考えられた.

これまで, ヒト ES 細胞や iPS 細胞では LINE-1s が発現しており, 転移を起こしやすい環境である事が知られていた. LINE-1s の転移は genome integrity を脅かし, 転移部位によっては遺伝子の機能を壊す可能性がある. 本研究で hMSCs における LINE-1s の発現を解析したところ, hMSCs においても LINE-1s の発現が確認された.

一方, 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. A3B はシチジン脱アミノ化酵素で C→U (DNA 複製時に T になる) に変え (相補鎖では G→A), この遺伝子変異によって LINE-1s は転移活性を失うと考えられている. しかし, 我々が hMSCs において A3B mRNA 発現量と 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. このことから, ES 細胞では A3B が LINE-1s の転移を抑制していると考えられているが, hMSCs ではあまり影響を与えていない可能性が考えられた. 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. Ins/Ins 及び Ins/Del では C→T や G→A の変異が多かったため, A3B による変異の可能性が強く示唆された.

体細胞では LINE-1s はメチル化されており不活化していると考えられているが, 多くのがん種で LINE-1s が低メチル化している事が示されている. がんにおいて LINE-1s が実際に転移を起こして LINE-1s が増加しているかどうかは不明であったが, 最近, ヒトの肺がんにお

いて高頻度に LINE-1 の転移がみられることが報告されている²⁴⁾. これらの事実から LINE-1s の転移が遺伝子の不安定性を引き起こし, がんの発生に関わっているのではないかと予想された. 本研究により A3B が発現しない Del/Del の hMSCs で転移可能な LINE-1s が多く残っている可能性が示唆された.

A3B の Del/Del は欧米人には稀で, 日本人に多い事が示されている. したがって, LINE-1s による遺伝子不安定化はわが国において考慮すべき点となる可能性がある. 今後は Del/Del で実際に LINE-1s の転移の頻度が高いのかどうか解析し, Del/Del の hMSCs が遺伝的に安定であるのかを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

これまでの検討より, 次世代シーケンサーを用いたホールゲノム解析により, 遺伝的同一性の評価のみならず, CGH 法の代替としてゲノムのコピー数変化の検出に有用であることが示された. 特に, 他の CGH 法に比べて塩基配列レベルでの高解像度な変化の検出が可能となる. 今回癌細胞である HL60 細胞のホールゲノムシーケンスデータを詳しく解析することにより, かなり小さな領域でのコピー数変化まで検出できたが, 特筆すべきはその多くの領域に細胞の増殖とかかわる遺伝子など重要だと考えられる遺伝子が存在していたことである. 既知の癌遺伝子 *c-myc* の増幅に加え, 神経芽細胞腫にて異常の見つかっている neuroblastoma breakpoint family member 8&9 (NBPF8&9)の増加, 発がん物質処理により誘発される染色体転座の共通した切断点となることが知られている fragile histidine triad (FHIT) 遺伝子座位の変化, myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (MLL) family の遺伝子である lysine (K)-specific methyltransferase 2C

(KMT2C) の増幅, その過剰発現が急性骨髄性白血病と関連する annexin A8 (ANXA8) 遺伝子の増加, 低酸素ストレスにより誘導され腫瘍との関連性が注目されている hypoxia induced factor 1 (HIF1A) 遺伝子の欠失, 細胞分裂に関与する cell division cycle27 (CDC27) の増加, TGF β シグナルパスウェイに関与し, 細胞の増殖分化とアポトーシスを制御する因子である SMAD2 遺伝子の増幅, 遺伝子多型と癌との関連性が指摘されている glutathione S-transferase T1 (GSTT1) の欠失など, 腫瘍との関連性が示唆される多くの遺伝子がコピー数変化した領域に見いだされた。さらに, 17 番染色体の短腕 (7p) は片側のアレルが完全にロスしているが, 正常に残っていると思われるアレルにも微小な欠失領域があることが分かった。その一つは有名な癌抑制遺伝子である TP53 遺伝子であり, この遺伝子の完全欠失が HL60 細胞の癌化に大きく寄与していることを物語っている。7p のもう一つのホモ欠失領域には Rho GTPase-activating protein 44 (ARHGAP44) 遺伝子が存在し, この遺伝子の機能と癌との関連性が注目される。

また染色体全体に目を向けると, 同様にホモ欠失している短い領域があり, この中には TGF β シグナルパスウェイに関与し, 細胞の増殖分化やアポトーシスと関連する signal-regulatory protein beta 1 (SIRPB1) 遺伝子が含まれていた。また, 大腸癌の予後との相関が報告されている Cytoplasmic poly(A) binding protein 4 (PABPC4) 遺伝子もホモ欠失しており, その機能との関連性が注目される。

以上のように, ホールゲノムシーケンス解析にて得られたコピー数変化領域を詳しく見てみるにより, そこに存在する遺伝子が何らかの癌の発生との関連性を示唆しており, 複数の遺伝子の異常が複雑に絡み合っただけで癌を発生させた, いわば細胞癌化のヒストリー (プロフ

ファイル) を物語っていると考えられる。各種の癌細胞に関してこうした癌化のプロファイルを蓄積していくことで, 細胞癌化の共通したメカニズムおよび癌の個性に寄与する遺伝子を浮き彫りにできる可能性が示された。

コピー数変化の検討から得られたもう一つの有益な情報として, 増減のおこっている領域には, α -サテライトのような繰り返し配列, およびレトロトランスポゾンによる挿入配列が多く存在する点が見受けられた。特にレトロトランスポゾンの配列に関しては, CDC27 遺伝子のように, 元の遺伝子の部位も同様にコピー数の変化が起きている例もあり, 染色体上の相同配列が引き金となって, 遺伝子および染色体領域のコピー数の増減が起きていることが示唆された。

細胞の発現するタンパク質のプロファイルは, 遺伝子異常のプロファイルと同様にその品質を規定する重要な情報となりうる。遺伝子解析に関しては, ホールゲノムシーケンスという強力な解析ツールが存在するが, タンパク質発現解析に関しては, すべての発現タンパクを網羅できる完璧な手法はまだ存在しない。これはタンパク発現のダイナミックレンジがかなり大きいことに由来するが, 近年の質量分析装置の進歩により, 高感度化が図られ, ペプチドレベルでは数万, タンパクレベルでは数千のタンパク質の発現情報が得られるようになった。タンパク発現は最終的な細胞の表現形質につながるものであり, 細胞のおかれた環境や状態の変化を反映して動的に変化する指標となる。細胞の標準化および品質評価においては, この動的に変化するプロテオームの情報をリファレンスと比較することにより品質の評価が可能であり, その意味で比較可能な形として細胞のタンパク発現プロファイル情報を提供することは有益だと考えられる。

我々はこれまでに LC-MS/MS を用いたショ

ットガンプロテオミクス解析を通じた質量分析データの取り扱いに関する経験を生かし、プロテオームの発現プロファイルを視覚的に分かりやすい形で情報提供し、リファレンス情報の提供と比較解析を実現するためのツールとして、ProteomeMap というオリジナルなソフトウェアの開発に着手した。そして、今年度は質量分析装置から得られた生データの取り込み、イメージデータへの変換、2次元マップとしてのデータ可視化、およびペプチドピークの認識と付随するMS/MS スペクトルおよびタンパク質同定結果の提供を同一マップ上で実現することができた。また、2次元マップ上でのペプチドの存在量はバンドの濃さとして表現されるため、量的変化も視覚的にとらえることが可能となった。

現在 ProteomeMap ソフトウェアはスタンドアロンで、Thermo Scientific 社の質量分析装置 Q-Exactive より得られた raw 形式のデータに対して動作確認をしているが、今後は各種細胞から得られたプロテオーム情報を Web 上でオンラインで情報提供できるように開発を進めていきたい。オンラインで各種細胞のリファレンスデータとなる情報を提供できれば、同定結果に対する情報を MS/MS スペクトルとともに同時提供でき、各ユーザーが得たデータに対して有益なリファレンス情報を与えることが可能になる。さらに将来的には、各ユーザーからのデータのアップロードを可能とし、リファレンスデータベースの充実を図るとともに、オンラインでのリファレンスデータとの定量比較を可能とすることにより、さらに有益な研究ツールを提供することを目標とする。

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、iPS 細胞株の分化プロペンシティ予測マーカーを同定することを目的に研究

を行った。iPS 細胞 10 種類について、外胚葉、中胚葉、および内胚葉への分化のしやすさの順位と、未分化状態での mRNA および miRNA 発現量の順位を用いて、スピアマンの順位相関解析を行い、相関のある mRNA および miRNA を分化予測マーカー候補として同定した (Tables 12-14)。

iPS 細胞株 10 種類において、三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ところ、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があることを示し、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があることを示唆する結果となった。この結果から、外胚葉への分化プロペンシティと中胚葉および内胚葉への分化プロペンシティは逆相関していると考えられた。

外胚葉へのなりやすさと、中胚葉および内胚葉へのなりやすさが逆相関している結果の妥当性を支持するデータとして、iPS 細胞の多能性維持に関する「シーソーモデル」という概念が報告されている (*Cell*. 2013; 153: 963-975)。このモデルによると、単独では外胚葉、または中内胚葉への分化の促進にはたらくとされる、相反する遺伝子群が相互にバランスをとる際に、細胞はリプログラミング (初期化) されて iPS 細胞のような多能性細胞となる。しかしながら、外胚葉遺伝子と、中内胚葉遺伝子のバランスが崩れた時にそれぞれ外胚葉、あるいは中内胚葉に分化する (Fig. 18)。すなわち、外胚葉と、中内胚葉には正反対の関係性があると考えられる。

以下に、本研究から得られた各胚葉への分化プロペンシティランキングが iPS 細胞の未分化状態との関連を示唆した例を示す。2013 年に報告された論文において、神経細胞へと分化誘導した際に未分化な細胞が残り、マウスの脳へ移植した際に腫瘍を形成する“質の悪い”iPS

細胞株が存在することがわかった (*Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: 20569-74). この報告を受けて、本研究で得られたデータから EB 形成後の未分化マーカー遺伝子発現量における iPS 細胞の第一主成分得点のランキングを作成した (Table 10). 外胚葉マーカー, 中胚葉マーカー, 内胚葉マーカー, 未分化マーカーの各遺伝子発現の第一主成分得点からなる 4 変数 (Tables 10 および 15) のうちの 2 変数間の組み合わせで遺伝子発現の第一主成分得点の順位相関を検討したところ, 外胚葉マーカーでの第一主成分得点が低い細胞株において未分化マーカーの第一主成分得点が有意に高かった (スピアマン順位相関係数: -0.891 [$p < 0.001$]). すなわち, 外胚葉に分化しにくいとされる細胞株において, 未分化状態を保ちやすいことが示唆された. この結果から, 「EB 形成後も未分化細胞が残りやすい iPS 細胞株」は, すなわち, 「EB 形成後も外胚葉 (神経細胞等) に分化しにくい細胞株」であると考えられた. なお, 本研究での iPS 細胞株における外胚葉マーカー遺伝子発現量の第一主成分得点順位と中胚葉マーカー遺伝子発現量の第一主成分得点順位と間のスピアマン相関係数は, -0.661 [$p = 0.03$]であったことから, “質の悪い” (= 外胚葉系に分化しにくい) iPS 細胞株 (*Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: 20569-74) は, 中胚葉へ分化しやすい傾向があることが予想された. また, 中胚葉マーカー遺伝子発現量での第一主成分得点順位と内胚葉マーカー遺伝子発現量の第一主成分得点順位と間のスピアマン相関係数は 0.794 [$p = 0.004$]であったことから, 中胚葉へ分化しやすい iPS 細胞株は, 内胚葉へも分化しやすい傾向があることも示唆された.

次に, マイクロアレイ解析の結果に 3 種類のフィルターをかけて抽出した probe set と, 各細胞株における外胚葉, 中胚葉, および内胚葉への分化プロペンシティ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, 分化プロペンシティ順位と有意に相関のある遺伝子を選び出した. この結果, Table 12-14 に示す mRNA および miRNA が同定された. 相関が正であれば, 分化しやすい株ほどより発現が高く, 一方, 負の場合は, 分化しやすい株でより発現が抑えられていることを意味している. このことから, これらの mRNA および miRNA の発現を測定することにより, 分化させる前の段階で分化プロペンシティを予測することができる可能性が期待される. これらのプロペンシティ予測マーカー候補が実際にマーカーとして使用することができるかを確かめるためには, より複数の iPS 細胞株を用いて各 mRNA および miRNA の汎用性を評価する必要がある.

今後, 分化プロペンシティ予測マーカーが同定されれば, iPS 細胞を用いる再生医療の発展に大きく貢献できると思われる. その理由として, 再生医療に用いられる細胞製品の作製に費やす時間, 労力およびコストが削減できると考えられるからである. ヒト iPS 細胞を目的の細胞へ分化および精製するには長い日数を要する. 例えば, 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 日間の期間が必要であるとされている. 比較的分化期間の短い心筋細胞の場合でも, 患者からの iPS 細胞株の樹立, 分化, および品質・安全性の確認の為, 移植手術開始までにはおよそ 1 年の期間を要することが想定されている. 加えて, 細胞の収量や分化効率を考慮したうえで再生医療に用いる原材料に最適な iPS 細胞株を選別するには, 候補となるすべての iPS 細胞株を培養し, 目的細胞に分化させなければならないため, さらに膨大な時間, 労力およびコストが必要となる. ここで, iPS 細胞株の分化プロペンシティを予測することができるマーカー遺伝子を用いれば, 保存した未分化 iPS 細胞の RNA から

分化プロペンシティマーカーを定量し、目的細胞の分化に適切な細胞株のみを選んで培養すればよいと考えられ、より少ない時間とコストで細胞製品を作製することができると思われる。その上、目的細胞に分化しやすい細胞株が選択できることにより、細胞製品の安全性も向上させることが可能になるとと思われる。

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-*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、質的な差はなかった。

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

Cyclin D2 の強制発現によって hMSC の増殖が亢進されるメカニズムについて検討した。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。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。

また、hMSC において genome integrity を脅かす可能性がある LINE-1s について、hMSC で LINE-1s が発現していることを見出した。さらに LINE-1s 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。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、欠失型アリル頻度は 26%であった。hMSCs において A3B mRNA 発現量と 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。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。

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

次世代シーケンサーによるホールゲノム解析のパフォーマンスは高く、通常解析でゲノム上の 99 パーセント以上の領域について、信頼性のある配列情報が得られた。さらに、ゲノム上のコピー数変化領域についても高精細なデータが得られ、がん細胞株では、その領域に多くの増殖関連遺伝子等が存在していることが明らかになり、コピー数異常のプロファイルが、細胞癌化のプロセスおよび癌の個性の理解に役立つことが示唆された。さらに、コピー数変化の見られた領域には、繰り返し配列やレトロトランスポゾンによる挿入配列が散見され、これらがゲノムのリアレンジメントの引き金となったことが示唆された。

一方で、細胞のタンパク発現プロファイルを細胞の品質評価および標準化に役立てるため、プロテオーム解析によって得られた網羅的なペプチド発現情報を可視化し、わかりやすい形で情報提供するためのツールとして ProteomeMap ソフトウェアを開発した。このソフトウェアにより、LC-MS/MS を用いたショットガンプロテオミクス解析により得られた質量分析データを二次元マップ化し、ピーク強度、MS/MS スペクトル、タンパク質同定結果の情報を同時に提供するリファレンスデータの作成が可能となった。今後さらに Web 上での公開を目指したソフトウェアの開発を進めたい。

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

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った。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。

「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) 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.
- 2) S. Wissing, M. Montano, J.L. Garcia-Perez, J.V. Moran, W.C. Greene, Endogenous APOBEC3B restricts LINE-1 retrotransposition in transformed cells and human embryonic stem cells, *J Biol Chem* 286 (2011) 36427-36437.
- 3) J.M. Kidd, T.L. Newman, E. Tuzun, R. Kaul, E.E. Eichler, Population stratification of a common APOBEC gene deletion polymorphism, *PLoS Genet* 3 (2007) e63.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.

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) H. Kano, I. Godoy, C. Courtney, M.R. Vetter, G.L. Gerton, E.M. Ostertag, H.H. Kazazian, Jr., L1 retrotransposition occurs mainly in embryogenesis and creates somatic mosaicism, *Genes Dev* 23 (2009) 1303-1312.

18) I. Georgiou, D. Noutsopoulos, E. Dimitriadou, G. Markopoulos, A. Apergi, L. Lazaros, T. Vaxevanoglou, K. Pantos, M. Syrrou, T. Tzavaras, Retrotransposon RNA expression and evidence for retrotransposition events in human oocytes, *Hum Mol Genet* 18 (2009) 1221-1228.

19) N.G Coufal, J.L. Garcia-Perez, G.E. Peng, G.W. Yeo, Y. Mu, M.T. Lovci, M. Morell, K.S. O'Shea, J.V. Moran, F.H. Gage, L1 retrotransposition in human neural progenitor cells, *Nature* 460 (2009) 1127-1131.

20) A. Macia, M. Munoz-Lopez, J.L. Cortes, R.K. Hastings, S. Morell, G. Lucena-Aguilar, J.A. Marchal, R.M. Badge, J.L. Garcia-Perez, Epigenetic control of retrotransposon expression in human embryonic stem cells, *Mol Cell Biol* 31 (2011) 300-316.

21) S. Wissing, M. Munoz-Lopez, A. Macia, Z. Yang, M. Montano, W. Collins, J.L. Garcia-Perez, J.V. Moran, W.C. Greene, Reprogramming somatic cells into iPS cells activates LINE-1 retroelement mobility, *Hum Mol Genet* 21 (2012) 208-218.

22) Y.L. Chiu, W.C. Greene, The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements, *Annu Rev Immunol* 26 (2008) 317-353.

23) K. Sato, T. Izumi, N. Misawa, T. Kobayashi, Y. Yamashita, M. Ohmichi, M. Ito, A. Takaori-Kondo, Y. Koyanagi, Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice, *J Virol* 84 (2010) 9546-9556.

24) R.C. Iskow, M.T. McCabe, R.E. Mills, S. Torene, W.S. Pittard, A.F. Neuwald, E.G. Van Meir, P.M. Vertino, S.E. Devine, Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons, *Cell* 141 (2010) 1253-1261.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Kono K, Niimi S, Sawada R. Cyclin D2 promotes the proliferation of human mesenchymal stem cells. *J Bone Marrow Res*,

- in press.
2. 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*. 2013; 101: 2573-85.
 3. Ito-Nagahata T, Kurihara C, Hasebe M, Ishii A, Yamashita K, Iwabuchi M, Sonoda M, Fukuhara K, Sawada R, Matsuoka A, Fujiwara Y. Stilbene Analogs of Resveratrol Improve Insulin Resistance through Activation of AMPK. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013; 77: 1229-35.
 4. Sato Y, Tsutsumi H, Sawada R, Suzuki T, Yasuda S. Regulatory science research to facilitate the development of cell/tissue-proceed products. *Bull Natl Inst Health Sci*. 2013; 131: 16-19.
 5. 斎藤嘉朗, 前川京子, 齊藤公亮, 佐藤陽治, 鈴木孝昌 タンパク質・内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化にむけて. 国立医薬品食品衛生研究所報告. 2013; 131: 20-24.
 6. 中村里香, 酒井信夫, 齋島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 安達玲子, 手島玲子 ショットガンプロテオミクスによる加水分解小麦とその原料であるグルテンに含まれるタンパク質の網羅的解析. 国立医薬品食品衛生研究所報告. 2013; 131, 50-57.
 7. Suzuki T. “Scientific Considerations Regarding Radiation Risk” JEMS Open Symposium 2012. *Genes and Environment*. 2013; 35: 57-62.
 8. Suzuki T. Unconscious Exposure to Radiation. *Genes and Environment*. 2013; 35, 63-68.
 9. 鈴木孝昌 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド「網羅的な発現をみる マイクロアレイ解析との比較を例に」実験医学別冊 pp. 111-121 (2013), 羊土社
 10. Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. In vitro detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Methods in Stem Cells and Tissue Repair*, in press.
 11. 佐藤陽治 「ヒト iPS 細胞由来移植細胞の製造管理のための *in vitro* 造腫瘍性評価系の開発」 Cytometry Research (印刷中)
 12. 安田智, 佐藤陽治 動物細胞の培養を成功させる条件設定集「再生医療製品の品質関連規制と対応の留意点」技術情報協会 (印刷中)
 13. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療製品の造腫瘍性評価 最新医学 (印刷中)
 14. 田埜慶子, 草川森士, 佐藤陽治 再生医療における臨床研究と製品開発「細胞・組織加工製品の製造における造腫瘍性評価」(2013), 技術情報協会
 15. 中島啓行, 安田智, 佐藤陽治 ES・iPS 細胞実験スタンダード「ヒト ES/iPS 細胞に

- 由来する再生医療製品の造腫瘍性をどう見るか？」実験医学増刊 pp. 61-68 (2013), 羊土社
16. Kanemura H, Go MJ, Nishishita N, Sakai N, Kamao H, Sato Y, Takahashi M, Kawamata S. Pigment epithelium-derived factor secreted from retinal pigment epithelium facilitates apoptotic cell death of iPSC. *Sci Rep.* 2013; 3: 2334.
 17. 田埜慶子, 佐藤陽治 再生医療製品の素材としての多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) の品質 レギュラトリーサイエンス学会誌. 2014; 4: 71-7.
 18. 五十嵐友香, 佐藤陽治 再生医療製品の造腫瘍性・悪性腫瘍形成能の評価 医学のあゆみ. 2013; 246: 1069-70.
 19. 村岡ひとみ, 佐藤陽治 再生医療・細胞治療の臨床研究から実用化までの道のり *Geriatric Medicine (老年医学)* (印刷中)
 3. Urano K, Machida K, Kusakawa S, Sawada R, Yasuda S, Ito M, Tsutsumi H, Sato Y. Quantitative Analysis on HeLa Engrafting Ability in NOG Mice. EUROTOX 2013, Interlaken, Switzerland (2013年9月1-4日)
 4. Mizushima T, Machida K, Inoue R, Kusakawa S, Sawada R, Sato Y, Tsutsumi H. Analysis in Xenograft Susceptibility in NOG and NOG-hairless Mice. 4th International Workshop Humanized Mice. Seoul, Korea (2013年9月30日-10月2日)
 5. 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法の確立を目指して」日本バイオマテリアル学会2013年度第1回セミナー (2013.5)
 6. 松岡厚子, 澤田留美, 加藤玲子, 河野健「次世代医療機器評価指標作成事業 —再生医療分野審査 WG 活動報告」日本バイオマテリアル学会 2013 年度第 1 回セミナー (2013.5)

G-2 学会発表

1. 町田一彦, 草川森士, 澤田留美, 安田智, 伊藤守, 堤秀樹, 佐藤陽治 NOGマウスにおけるHeLa細胞生着能の定量的検討 第60回日本実験動物学会総会, つくば (2013年5月15-17日)
2. Tsutsumi H, Machida K, Kusakawa S, Sawada R, Yasuda S, Ito M, Sato Y. Quantitative Analysis on HeLa Engrafting Ability in NOG Mice. 12th FELASA, Barcelona, Spain (2013年6月10-13日)
7. Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, Matsuoka A. The effect of calcium-incorporated titanium surfaces on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)
8. Kono K, Sawada R, Matsuoka A. Overexpression of cyclin D2 promotes cell proliferation of human mesenchymal stem cells. 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)

9. 澤田留美, 河野 健, 加藤玲子, 新見伸吾
「生体親和性高分子によるヒト骨髄由来
間葉系幹細胞の機能への影響 (1): 遺伝
子発現の網羅的解析」第 35 回日本バイオ
マテリアル学会大会 (2013.11)
10. 加藤玲子, 齧島由二, 福井千恵, 澤田留美,
宮島敦子, 新見伸吾「生体親和性高分子に
よるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能へ
の影響 (2): タンパク質発現の網羅的解
析」第 35 回日本バイオマテリアル学会大
会 (2013.11)
11. 河野健, 澤田留美, 新見伸吾「間葉系幹細
胞におけるレトロトランスポジションの
解析とその影響に関する研究」第 36 回日
本分子生物学会年会 (2013.12)
12. 河野健, 澤田留美, 新見伸吾「間葉系幹細
胞の増殖培養過程における品質評価のた
めの遺伝子発現解析」第 13 回日本再生医
療学会総会 (2014.3)
13. 河野健, 新見伸吾, 澤田留美「間葉系幹細
胞におけるレトロトランスポジションの
解析とその影響に関する研究」第 13 回日
本再生医療学会総会 (2014.3)
14. 齧島由二, 福井千恵, 澤田留美, 河野健,
野村祐介, 新見伸吾「ヒト骨髄由来間葉系
幹細胞の増殖能に対する抗酸化剤の影響
評価」第 13 回日本再生医療学会総会
(2014.3)
15. 佐々木寛人, 蟹江慧, 澤田留美, 清田泰次
郎, 本多裕之, 加藤竜司「間葉系幹細胞の
継代培養における品質劣化の細胞形態と
発現プロファイリングとの相関解析」第
13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)
16. 佐々木寛人, 高橋厚妃, 蟹江慧, 竹内一郎,
澤田留美, 清田泰次郎, 本多裕之, 加藤竜
司「細胞画像情報解析による間葉系幹細胞
分化能の品質プロファイリング」第 13 回
日本再生医療学会総会 (2014.3)
17. Suresh T, Oshizawa T, Maekawa K, Saito Y,
Sato Y, Suzuki T. Improvement of Rat
Urinary Proteomics by a Differential
Precipitation of Proteins. Human Proteome
Organization 12th World Congress (2013.9)
(横浜)
18. Suzuki T, Suresh T, Oshizawa T, Maekawa K,
Saito Y, Sato Y. Basic factors that influence
the rat urinary proteome. 第 13 回国際毒性
学会 (ソウル)
19. 鈴木孝昌, Suresh Thirupathi, 本間正充,
鈴木和博, 佐藤陽治 次世代 DNA シーク
エンサーの染色体異常解析への応用 日
本環境変異原学会第 42 回大会 (2013.
11) (岡山)
20. スレッシュ ティルパッティ, 斎藤嘉朗,
本間正充, 佐藤陽治, 鈴木孝昌 ヘモグロ
ビンアダクトーム; 環境変異原に対する
暴露マーカーとしての新しいアプローチ
日本環境変異原学会第 42 回大会 (2013.
11) (岡山)
21. 降旗千恵, 櫻井幹也, 渡辺貴志, 鈴木孝昌
Toxicogenomics/JEMS・MMS V: クリセン
投与 48 時間後までのマウス肝臓における
遺伝子発現変化 日本環境変異原学会第
42 回大会 (2013. 11) (岡山)

22. Suzuki T, Suresh T, Yamada M, Honma M, Suzuki K, Sato Y. Use of the next generation sequencers for the evaluation of genomic integrity of cellular therapy products. 11th International Conference on Environmental Mutagens (2013.11) (Foz do Iguacu)
23. Sato Y. Tumorigenicity of Human Cell-Processed Therapeutic Products. IABS-JST Joint Workshop, kyoto (2014年3月7-8日)
24. 佐藤陽治 再生医療等製品の品質・安全性確保のための技術的課題 第13回再生医療学会総会, 京都 (2014年3月4-6日)
25. 城しおり, 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 佐藤陽治 ヒトiPS細胞の分化プロペンシティ予測のための細胞特性プロファイリング 第13回再生医療学会総会, 京都 (2014年3月4-6日)
26. 田埜慶子, 安田智, 梅澤明弘, 佐藤陽治 ヒト多能性幹細胞由来再生医療製品中に混入する未分化細胞の高効率培養法の開発 第13回再生医療学会総会, 京都 (2014年3月4-6日)
27. 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 松山さと子, 川真田伸, 澤芳樹, 佐藤陽治 デジタルPCRを用いたヒトiPS細胞由来分化細胞に残存する未分化iPS細胞の高感度検出法の開発 第13回再生医療学会総会, 京都 (2014年3月4-6日)
28. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Kawamata S, Sato Y. Application of droplet digital PCR technology to detection of residual undifferentiated cells in cardiomyocytes derived from human iPS cells. World Stem Cell Summit 2013, San Diego (2013年12月4-6日)
29. Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Matsuyama A, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y. Characterization of *in vivo* tumorigenicity test using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2r^{0/0} mice for quality assessment of human cell-processed therapeutic products. World Stem Cell Summit 2013, San Diego (2013年12月4-6日)
30. Sato Y. Japanese Regulatory Principles for Ensuring Quality and Safety of Cell/Tissue-Processed Products. World Summit on Regenerative Medicine 2013, 西安 (2013年10月19-22日)
31. Yasuda S. Application of digital PCR on quality assessment of products derived from human pluripotent stem cells. Second Annual Droplet Digital PCR User Meeting, Boston (2013年10月21日)
32. 佐藤陽治 ヒト iPS 細胞由来移植細胞中に残存する未分化細胞の *in vitro* 検出法の開発 第23回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京 (2013年6月23日)
33. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Current Japanese guidelines on

ensuring quality and safety of products derived from processing of human stem cells. International Society for Stem Cell Research 11 th Annual Meeting, Boston (2013 年 6 月 12-15 日)

34. Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Kuroda T, Sawada R, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y. Validation of in vivo tumorigenicity test for the process control of cell/tissue-engineered products using severe immunodeficient NOG mice. International Society for Stem Cell Research 11 th Annual Meeting, Boston (2013 年 6 月 12-15 日)
35. 佐藤陽治 再生医療・細胞治療の規制に関する国際比較 日本バイオマテリアル学会 2013 年度第 1 回セミナー, 東京 (2013 年 5 月 10 日)
36. 安田智 再生医療製品における品質・安全性試験の開発と評価 第 1 回軟骨再生医療レギュラトリーサイエンスフォーラム, 東京 (2013 年 4 月 2 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

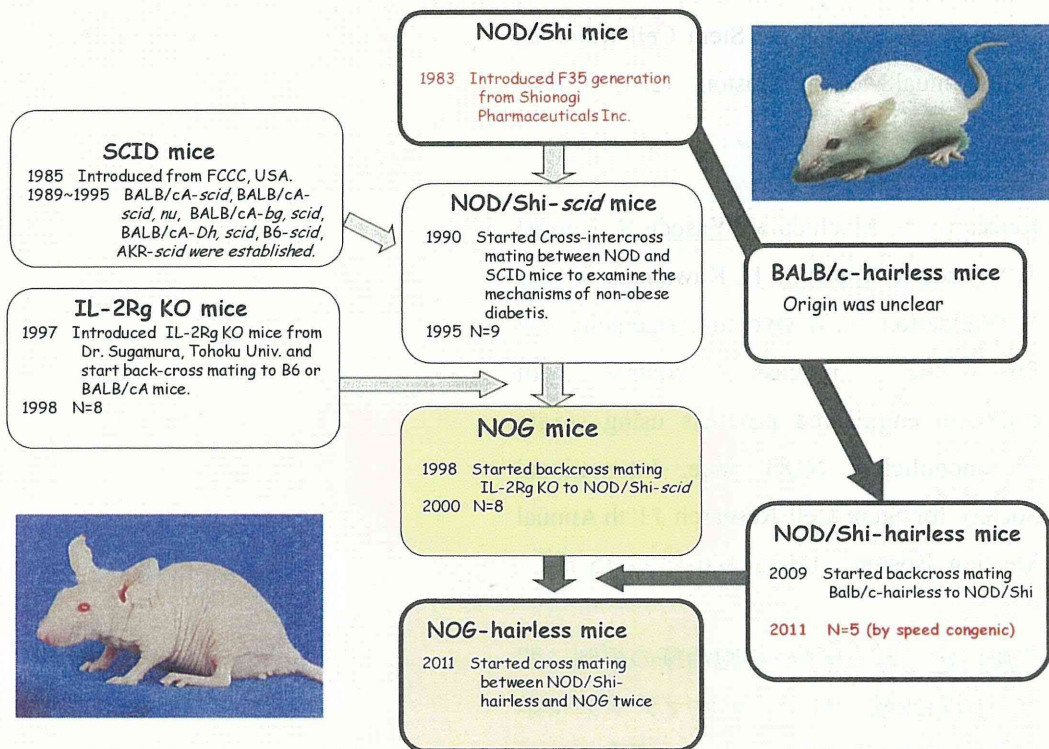


Figure 1 NOG-hr (NOD/Shi-scid IL2Ry^{null} Hr^{Hr}) マウスの開発経緯

BALB/cヘアレスマウスのヘアレス遺伝子 (*hr*) をスピードコンジェニック法を併用して NOD/shi マウスに導入し、その後 NOG マウスと 2 回交配してヘアレス化した。

Table 1 試験群構成

系統	群/移植細胞数	0	1×10^1	1×10^2	1×10^3	1×10^4	1×10^5	1×10^6
Nude	HeLa	○	—	—	—	○	○	○
NOG	HeLa	○	—	○	○	○	○	—
	HeLa+MG	○	○	○	○	○	—	—
NOG-hr	HeLa	○	—	—	○	○	○	—
	HeLa+MG	○	○	○	○	—	—	—

雌雄ともに同じ群構成とした。○は設定群，—は未設定群

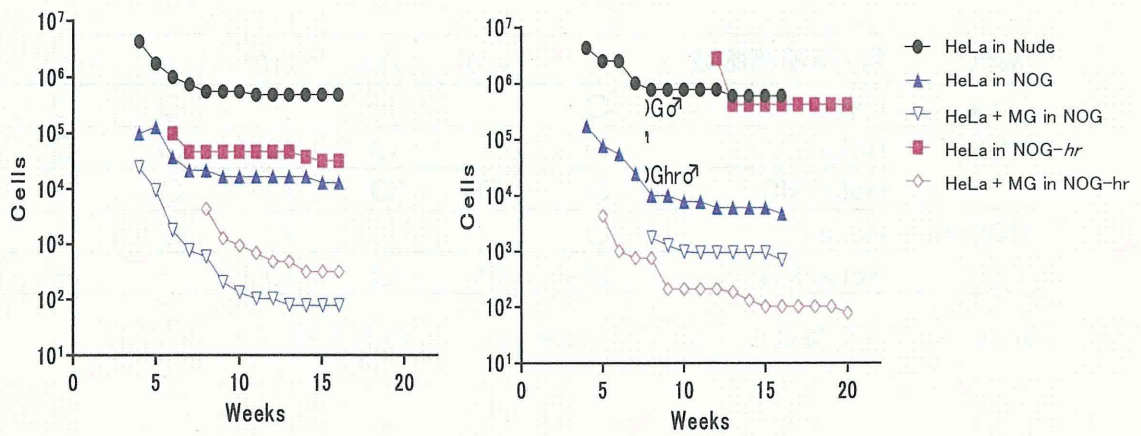
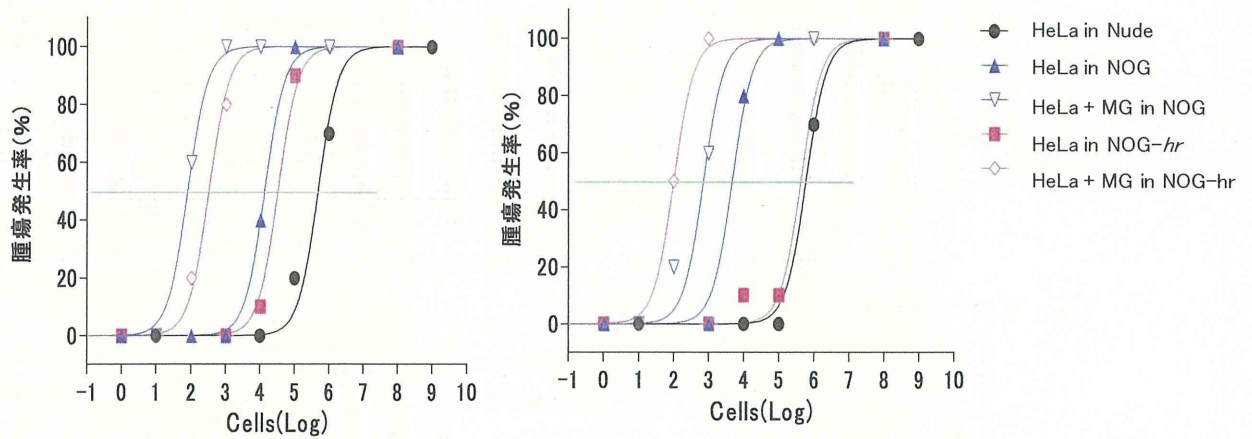


Figure 2 TPD₅₀の推移

雄（左）では週の経過とともに何れの群も低下し、移植後16週で安定した。雌（右）では、NOG-*hr* マウスの HeLa 細胞移植群はヌードマウスに近似し、HeLa 細胞とマトリゲルの混合移植群では NOG マウスの同移植群よりも著しく低下した。

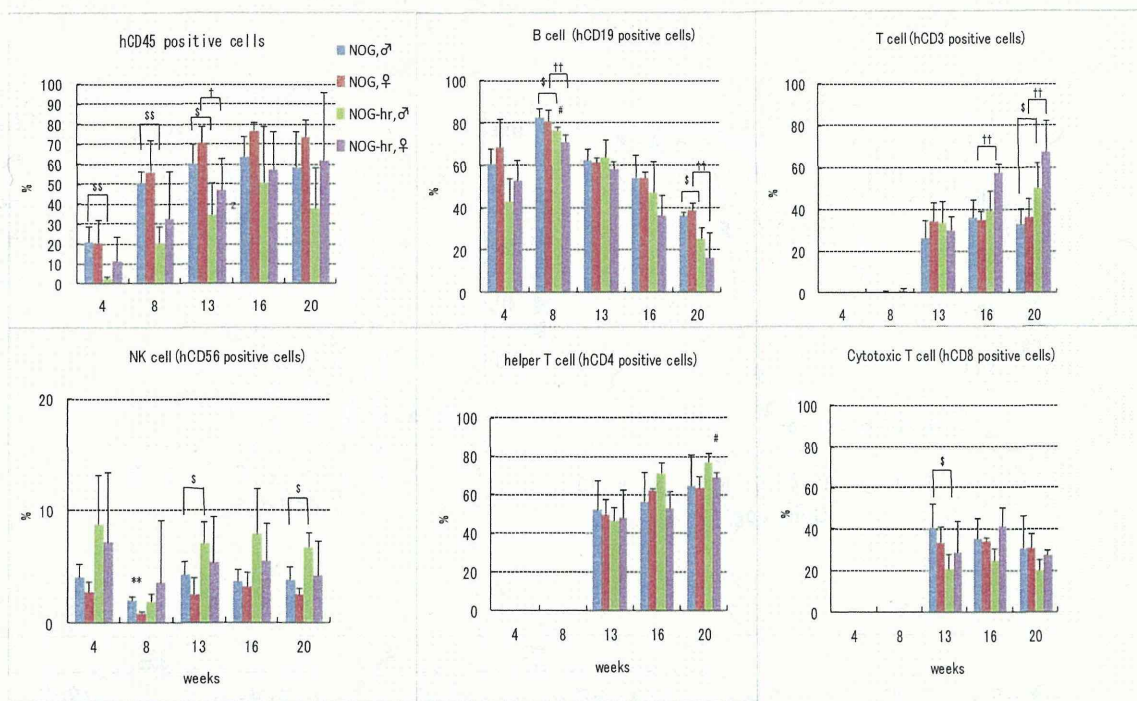


系統	群	雄		雌	
		TPD 50	倍率	TPD 50	倍率
Nude	HeLa	4.2×10^5 *	1 *	6.0×10^5	1
NOG- <i>hr</i>	HeLa	3.2×10^4	1/13	4.2×10^5	1/1.4
	HeLa+MG	2.1×10^2	1/2040	1.0×10^2	1/6004
NOG	HeLa	1.3×10^4 *	1/33 *	4.6×10^3	1/129
	HeLa+MG	$7.8 \times 10^*$	1/5431 *	7.0×10^2	1/859

*: 草川ら (第 12 回日本再生医療学会総会) から引用[§]

Figure 3 移植後 16 週における腫瘍形成率のロジスティック回帰分析 (上段左: 雄, 同右 雌) と各群の TPD₅₀ 値とヌードマウスを基準にした倍率 (下段)

ヌードマウスの HeLa 細胞 TPD₅₀ には雌雄差はなかった. NOG-マウスでは HeLa 細胞 TPD₅₀ は雌が雄よりも低かった (異種細胞生着能が高かった) が, マトリゲルを混合した場合その状況が逆転した. NOG-*hr* マウスの HeLa 細胞 TPD₅₀ は, 雄ではヌードマウスと NOG マウスの中間の値を示したが, 雌ではヌードマウスに近似であった. しかし, マトリゲルを混合した場合雌雄で状況が異なり, 雄では NOG マウスよりも高値を, 雌では低値を示した.



§ : $p < 0.05$ NOG vs. NOG-*hr* in male, §§ : $p < 0.01$ NOG vs. NOG-*hr* in male

+ : $p < 0.05$ NOG vs. NOG-*hr* in female, ++ : $p < 0.01$ NOG vs. NOG-*hr* in female

** : $p < 0.01$ male vs. female in NOG, # : $p < 0.05$ male vs. female in NOG-*hr*

Figure 4 ヒト造血幹細胞移入後のマウス末梢血中における FACS 解析

NOG および NOG-*hr* マウスにおける hCD45 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。NOG および NOG-*hr* マウスともに B 細胞 (hCD19 陽性細胞) の比率は移入 8 週後まで増加し、13 週以降の T 細胞 (hCD3, hCD4, hCD8 陽性細胞) の出現に連動して減少した。NK 細胞 (hCD56 陽性細胞) は移入 4 週後からみられたが、個体差が大きかった。

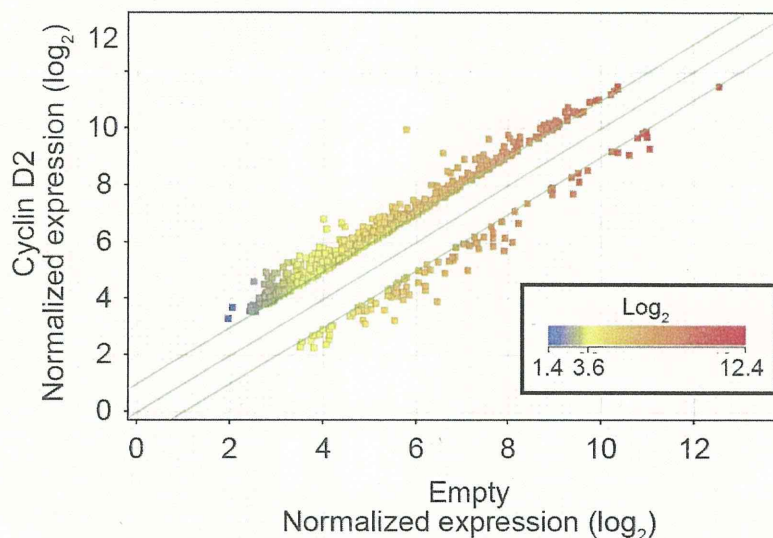


Figure 5 Cyclin D2 導入により 2 倍以上発現量が変化した遺伝子の網羅的発現解析

Table 2 Cyclin D2 導入により 2 倍以上発現量が変化した遺伝子が関与する細胞機能 (TOP5)

Top 5 functional category	Function annotation	p-Value	Activation z-score	No. of genes
Cellular Movement	cell movement of prostate cancer	7.94E-06	0.918	14
	migration of prostate cancer cells	1.54E-05	1.339	12
	recruitment of cells	6.57E-05	1.55	28
Cellular Development	proliferation of tumor cell lines	9.04E-06	1.15	92
	proliferation of cancer cells	1.96E-05	1.302	30
	differentiation of connective tissues	4.35E-05	-0.379	41
	proliferation of tumor cells	4.61E-05	1.036	37
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of tumor cell lines	9.04E-06	1.15	92
	proliferation of cancer cells	1.96E-05	1.302	30
	proliferation of tumor cells	4.61E-05	1.036	37
	proliferation of cells	9.27E-05	3.142	186
Cell Cycle	interphase	1.34E-05	2.19	50
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	recruitment leukocytes	7.13E-05	1.159	26

Table 3 Cyclin D2 導入により 2 倍以上発現量が変化した細胞増殖に関わる遺伝子

ID	Genes in dataset	Fold Change	Prediction (based on expression direction)	ID	Genes in dataset	Fold Change	Prediction (based on expression direction)	ID	Genes in dataset	Fold Change	Prediction (based on expression direction)
209292_at	ID4	3.609	Increased	201195_s_at	SLC7A5	2.083	Increased	203083_at	THBS2	2.046	Decreased
206271_at	TLR3	2.023	Increased	222749_at	SUFU	-3.251	Increased	203466_at	CDK10	2.228	Decreased
203373_at	SOCS2	3.513	Increased	204508_s_at	CA12	3.237	Increased	1552721_a_at	FGF1	-2.054	Decreased
206649_s_at	TFE3	2.069	Increased	203764_at	DLGAP5	2.188	Increased	204052_s_at	SFRP4	2.249	Decreased
201292_at	TOP2A	2.434	Increased	214012_at	ERAP1	5.288	Increased	205548_s_at	BTG3	2.073	Decreased
204766_s_at	NUDT1	2.158	Increased	204614_at	SERPIN2	-2.048	Increased	242989_at	STRN	2.145	Decreased
209321_s_at	ADCY3	2.329	Increased	201416_at	SOX4	3.11	Increased	213905_x_at	BGN	2.09	Decreased
206693_at	IL7	2.399	Increased	214581_x_at	TNFRSF21	-2.049	Increased	228780_at	POU3F3	-2.721	Decreased
205345_at	BARD1	2.029	Increased	223570_at	MCM10	2.545	Increased	205016_at	TGFA	-3.032	Decreased
226377_at	NFIC	2.026	Increased	219743_at	HEY2	2.13	Increased	1569791_at	STK4	2.396	Decreased
212148_at	PBX1	2.514	Increased	209970_x_at	CASP1	3.111	Increased	216008_s_at	ARH2	2.331	Decreased
202213_s_at	CUL4B	2.093	Increased	202684_s_at	RNMT	2.503	Increased	221577_x_at	GDF15	2.143	Decreased
224954_at	TNFSF10	2.105	Increased	242979_at	IRS1	2.329	Increased	202153_s_at	NUP62	2.009	Decreased
209960_at	HGF	2.732	Increased	225141_at	NFATC3	2.553	Increased	202556_s_at	MCRS1	2.165	Decreased
217371_s_at	IL15	2.853	Increased	218030_at	GIT1	3.032	Increased	203395_s_at	HES1	2.898	Decreased
205887_x_at	MSH3	2.1	Increased	218750_at	TAF1D	2.304	Increased	203184_at	FBN2	2.145	Decreased
1568865_at	FNTB	2.556	Increased	201795_at	LBR	2.383	Increased	203904_x_at	CD82	2.362	Decreased
208296_x_at	TNFAIP8	2.118	Increased	210045_at	IDH2	2.018	Increased	206558_at	SIM2	2.745	Decreased
226534_at	KITLG	2.22	Increased	1553810_r_at	KIAA1524	2.457	Increased	203665_at	HMOX1	2.358	Decreased
214981_at	POSTN	2.095	Increased	209160_at	AKR1C3	2.281	Increased	203543_s_at	KLF9	2.577	Decreased
206026_s_at	TNFAIP6	2.008	Increased	232424_at	PRDM16	2.334	Increased	1557729_at	GRK5	2.098	Decreased
210135_s_at	SHOX2	2.194	Increased	1554509_a_at	FAM188A	-2.494	Increased	236028_at	IBSP	-3.459	Decreased
204457_s_at	GAS1	2.134	Increased	217494_s_at	PTENP1	-2.849	Increased	221539_at	EIF4EBP1	2.467	Decreased
221884_at	MECOM	2.004	Increased	216205_s_at	MFN2	-2.34	Increased	202430_s_at	PLSCR1	2.324	Decreased
209919_x_at	GGT1	2.63	Increased	200644_at	MARCKSL1	3.121	Increased	204054_at	PTEN	2.145	Decreased
229468_at	CDK3	2.022	Increased	217991_x_at	SSBP3	3.21	Increased	209617_s_at	CTNND2	-2.01	Decreased
1563182_at	ACVR1C	-2.241	Increased	211653_x_at	AKR1C1/AKR1C2	2.791	Increased	231697_s_at	VMP1	2.741	Decreased
227404_s_at	GAS1	2.543	Increased	228302_x_at	CAMK2N1	-3.3	Increased	210143_at	ANXA10	2.124	Decreased
210933_s_at	FSCN1	2.227	Increased	234040_at	HELLS	2.476	Increased	206233_at	B4GALT6	-2.767	Decreased
205357_s_at	AGTR1	2.987	Increased	218413_s_at	ZNF639	2.019	Increased	209705_at	MTF2	2.504	Decreased
209925_at	OCLN	-2.024	Increased	242807_at	GBP2	2.488	Increased	209802_at	PHLDA2	2.17	Decreased
205732_s_at	NCOA2	2.484	Increased	219377_at	GAREM1	2.237	Increased	219685_at	TMEM35	-2.404	Decreased
215400_x_at	GFPR1	2.421	Increased	212865_s_at	COL14A1	2.516	Decreased	219047_s_at	ZNF868	2.244	Decreased
235521_at	HOXA3	2.05	Increased	203572_s_at	TAF6	2.79	Decreased	64474_g_at	DGCR8	2.201	Decreased
218807_at	VAV3	2.555	Increased	232231_at	RUNX2	2.12	Decreased	205159_at	CSF2RB	-4.605	Decreased
202202_s_at	LAMA4	3.771	Increased	202931_x_at	BIN1	2.056	Decreased	236012_at	PSMF1	2.172	Affected
205500_at	C5	2.375	Increased	214433_s_at	SELENBP1	2.103	Decreased	235833_at	PPAT	3.266	Affected
204128_s_at	RFC3	2.06	Increased	228766_at	CD36	-4.325	Decreased	221261_x_at	MAGED4/MAGED4B	3.294	Affected
200951_s_at	CND2	18.529	Increased	235300_x_at	RCHY1	2.569	Decreased	204983_s_at	GPC4	-2.902	Affected
222073_at	COL4A3	-2.278	Increased	222999_s_at	CCNL2	2.019	Decreased	231837_at	USP28	2.365	Affected
226731_at	ITGA1	2.816	Increased	208791_at	CLU	-2.492	Decreased	1554606_at	CEP120	2.141	Affected
227125_at	IFNAR2	2.053	Increased	203973_s_at	CEBPD	2.099	Decreased	224325_at	FZD8	2.488	Affected
222036_s_at	MCM4	2.31	Increased	209383_at	DDIT3	2.065	Decreased	217650_x_at	ST3GAL2	2.003	Affected
204061_at	PRKX	2.226	Increased	219266_at	ZNF350	2.143	Decreased	224022_x_at	WNT16	-3.268	Affected
228962_at	PDE4D	2.562	Increased	206826_at	OXTR	-2.396	Decreased	208962_s_at	FADS1	3.311	Affected
212672_at	ATM	2.024	Increased	205027_s_at	MAP3K8	2.11	Decreased	202948_at	IL1R1	2.512	Affected
225572_at	CREB1	2.243	Increased	205891_at	ADORA2B	2.166	Decreased	50277_at	GGA1	2.292	Affected
203046_s_at	TIMELESS	2.156	Increased	231947_at	MYCT1	-2.144	Decreased	1555843_at	HNRNPM	2.611	Affected
213943_at	WIST1	2.021	Increased	212430_at	RBM38	2.254	Decreased	214157_at	GNAS	-2.307	Affected
209465_x_at	PTN	2.357	Increased	204159_at	CDKN2C	2.004	Decreased	215987_at	RAPGEF2	2.046	Affected
213506_at	FZRL1	4.829	Increased	212401_s_at	CDK11/A/CDK11B	2.086	Decreased	216237_s_at	MCM5	2.753	Affected
231559_at	NNMT	2.208	Increased	205060_at	RARB	2.058	Decreased	206086_x_at	HFE	2.218	Affected
225740_x_at	MDM4	2.283	Increased	214727_at	BRCA2	2.489	Decreased	229807_s_at	MAZ	2	Affected
226636_at	PLD1	2.022	Increased	202718_at	IGFBP2	-2.099	Decreased	231002_s_at	RABEP1	2.266	Affected
227048_at	LAMA1	2.296	Increased	213811_x_at	TCF3	2.395	Decreased	209753_s_at	TMPO	2.116	Affected
230462_at	NUMB	2.763	Increased	202526_at	SMAD4	2.16	Decreased	201627_s_at	INSIG1	3.156	Affected
201727_s_at	ELAVL1	2.216	Increased	1567013_at	NFE2L2	3.005	Decreased	218019_s_at	PDXK	2.152	Affected
205204_at	NMB	2.09	Increased	234339_s_at	GLTSCR2	2.573	Decreased	204639_at	ADA	2.051	Affected
232044_at	RBBP6	2.324	Increased	206332_s_at	IFIH6	2.24	Decreased	236223_s_at	RIT1	2.823	Affected
205394_at	CHEK1	2.071	Increased	228967_at	EIF1	2.161	Decreased	208913_at	GGA2	2.062	Affected
57532_at	DVL2	2.03	Increased	235593_at	ZEB2	2.106	Decreased	201286_at	SDC1	2.164	Affected
208937_s_at	ID1	2.256	Increased	1556583_a_at	SLC9A1	-2.156	Decreased	201106_at	GPX4	2.067	Affected

Table 4 Cyclin D2 導入により 2 倍以上発現量が変化した細胞周期に関わる遺伝子

ID	Genes in dataset	Fold Change	Prediction (based on expression direction)
206649_s_at	TFE3	2.069	Increased
209960_at	HGF	2.732	Increased
217371_s_at	IL15	2.953	Increased
232231_at	RUNX2	2.12	Increased
235300_x_at	RCHY1	2.569	Increased
226534_at	KITLG	2.22	Increased
235423_at	ORC2	3.145	Increased
203973_s_at	CEBPD	2.099	Increased
227404_s_at	EGR1	2.543	Increased
205027_s_at	MAP3K8	2.11	Increased
212401_s_at	CDK11A/CDK11B	2.086	Increased
213811_x_at	TCF3	2.395	Increased
206332_s_at	IFI16	2.24	Increased
212672_at	ATM	2.024	Increased
235593_at	ZEB2	2.106	Increased
205394_at	CHEK1	2.071	Increased
208937_s_at	ID1	2.256	Increased
223570_at	MCM10	2.545	Increased
242979_at	IRS1	2.329	Increased
212148_at	PBX1	2.514	Decreased
204159_at	CDKN2C	2.004	Decreased
1552721_a_a	FGF1	-2.054	Decreased
205016_at	TGFA	-3.032	Decreased
201727_s_at	ELAVL1	2.216	Decreased
203395_s_at	HES1	2.898	Decreased
203665_at	HMOX1	2.358	Decreased
204054_at	PTEN	2.145	Decreased
219312_s_at	ZBTB10	2.171	Affected
229861_at	RFFL	2.017	Affected
228302_x_at	CAMK2N1	-3.3	Affected
235764_at	PRDM5	2.205	Affected
1554509_a_a	FAM188A	-2.494	Affected
232424_at	PRDM16	2.334	Affected
221539_at	EIF4EBP1	2.487	Affected
204986_s_at	TAOK2	-2.03	Affected
221577_x_at	GDF15	2.143	Affected
225740_x_at	MDM4	2.283	Affected
203046_s_at	TIMELESS	2.156	Affected
200951_s_at	CCND2	18.529	Affected
1567013_at	NFE2L2	3.005	Affected
215404_x_at	FGFR1	2.421	Affected
209753_s_at	TMPO	2.116	Affected
209383_at	DDIT3	2.065	Affected
229468_at	CDK3	2.022	Affected
204457_s_at	GAS1	2.134	Affected
218833_at	ZAK	2.125	Affected
214048_at	MBD4	2.383	Affected
205345_at	BARD1	2.029	Affected
206693_at	IL7	2.399	Affected
209292_at	ID4	3.609	Affected