

§: $p < 0.05$ 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*

Fig. 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。

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、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、マーカー候補遺伝子として Cyclin D2, IGF2BP1 など 9 遺伝子を抽出し、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、ヒト ES 細胞や iPS 細胞と同様に 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。このことから、A3B の遺伝子多型が hMSC の LINE-1 の転移機能に影響を与える事が示唆された。

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 第三室 研究員

A. 研究目的

間葉系幹細胞は、胚葉を越えた分化も可能な細胞であり、再生医療への応用が早くから期待され、すでに多くの臨床研究が行われている。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。また、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。また、幹細胞の長期培養による影響の全貌は未だ把握されていない。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。再生医療の健全か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されている Ewing 肉腫（本研究では Hs822.T, Hs863.T, RD-ES, SK-ES-1 の 4 種類）を陽性対照として間葉系幹細胞と比較検討した。その結果、マ-

ーカー候補遺伝子として Cyclin D2, IGF2BP1 など 9 遺伝子を抽出し、さらにヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) に Cyclin D2, 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た。IGF2BP1 強制発現では hMSC の増殖に大きな変化は認められなかったが、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。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 Cyclin D2 の過剰発現を行い、遺伝子発現の変化について網羅的に解析した。

細胞ががん化する主な原因は遺伝子の変異である。したがって、*in vitro* 培養中の幹細胞の genome integrity を担保することは非常に重要である。そこで今年度はさらに、転移因子であるレトロトランスポゾンに着目し、遺伝子の不安定化に関与するレトロトランスポゾン Long interspersed nuclear element 1s (LINE-1s) の間葉系幹細胞での発現や転移について検討した。ヒトゲノム中で活性を持つレトロトランスポゾン (LINE-1s, Alu など) は、がん細胞やヒト ES 細胞ではその発現が認められ、正常組織においては発現が認められていないことから、幹細胞の未分化性やがん化に関与する可能性も考えられるが、hMSC におけるレトロトランスポゾンの影響についてはほとんど解明されていない。そこで、hMSC において genome integrity を脅かす可能性がある LINE-1s の発現とさらにその抑制因子と報告されている APOBEC3B (A3B) ²⁾ との関係について解析を行い、幹細胞の未分化性やがん化との関わりを探る。

B. 研究方法

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

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 μ g/ml) を加えた培地で培養した。

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™-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-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

Cyclin D2 タンパク質の強制発現

hMSC を 12,000 cells/cm² 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 μ 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。

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。

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。

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 Pathways Analysis (IPA) を用いてパスウェイ解析を行った。

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。

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

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。

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'-GAGAACAAAGACACCCACATACC-3',
Reverse: 5'-GGCATTTAGTGCTATAAATTTCCC-3',
FAM-5'-TCTCTGGGACGCATTCAAAGCAGT-3'-B

HQ1 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。

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'-TGTCCCTTTTCAGAGTTTGAGTA-3', Insertion2_R; 5'-TGGAGCCAATTAATCACTTCAT-3' である。

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' - TTGCCCACGCCTATGTCCTG-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 α (TOYOBO) を形質転換した。形質転換後の DH5 α からプラスミドを抽出し LINE-1s の sequence を行った。

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 β -thal (AF149422), L1RP (AF148856) と比較した。配列は GeneBank のデータベースより得た。

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。

C. 研究結果

I. 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 (図 1)。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。(表 1)。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 (表 2)。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 (表 3)。

II. 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 (図 2)。

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³⁾。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 (図 3、表 4)、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 (図 4、5)。また、LINE-1s mRNA の発現量を定量解析し (図 6)、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 (図 7)。

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_{β-thal}, L1_{RP}) と比較した結果、Ins/Ins の変異頻度が 4.24% (884 mutations/20839 bp) (図 8-1, 9-1)、Ins/Del が 3.46% (967 mutations/37942 bp) (図 8-2, 9-2)、Del/Del が 0.794% (202 mutations/25410 bp) (図 8-3, 9-3) 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。

D. 考察

I. 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^{4,10}。一方で、Cyclin D2 の発現により細胞増殖が止まるという報告¹¹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¹²⁻¹⁶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。

II. 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^{17,18}。体細胞の多くは LINE-1s がメチル化により不活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¹⁹。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^{20,21}。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²²⁾。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²³⁾。最近、APOBEC 蛋白の一つ APOBEC3B (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 に変わる) 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。

E. 結論

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。

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. 研究発表

1. 論文発表

1) Kono K., Niimi S., and 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., 101(9), 2573-85, (2013).

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., 77(6), 1229-1235, (2013).

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., 131, 16-19, (2013).

2. 学会発表

1) 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)

2) 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)

3) 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)

4) 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)
- 5) 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, 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)
- 6) 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)
- 7) 加藤玲子, 薮島由二, 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)
- 8) 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)
- 9) 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 NOG mice for quality assessment of human cell-processed therapeutic products, World Stem Cell Summit 2013 (2013.12)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 薮島由二, 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)
- 13) 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)
- 14) 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)

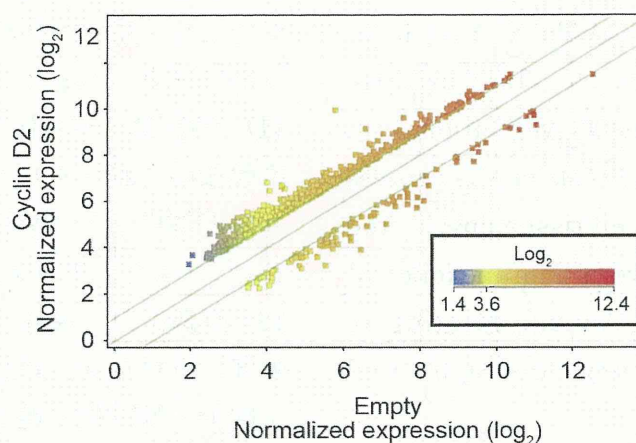


図1 Cyclin D2導入により2倍以上発現量が変化した遺伝子の網羅的発現解析

表1 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

表3 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

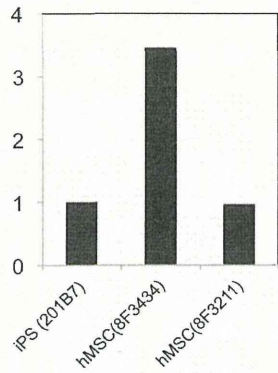


図2 iPS細胞及びhMSCsにおけるLINE-1s mRNAの発現

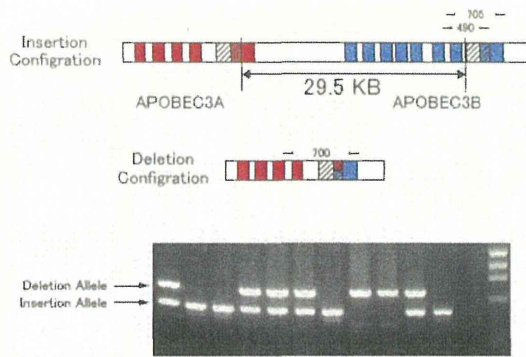


図3 PCRによるA3B遺伝子型解析

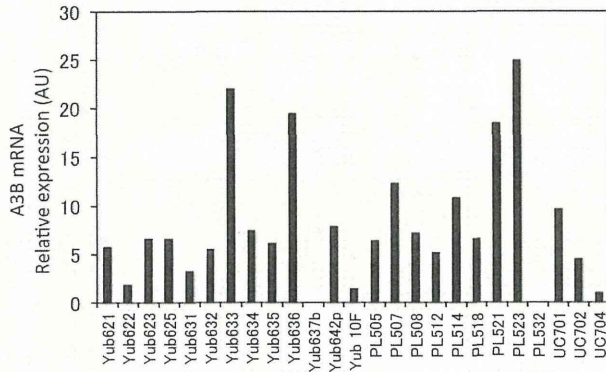


図4 hMSCsにおけるA3B mRNAの発現比較

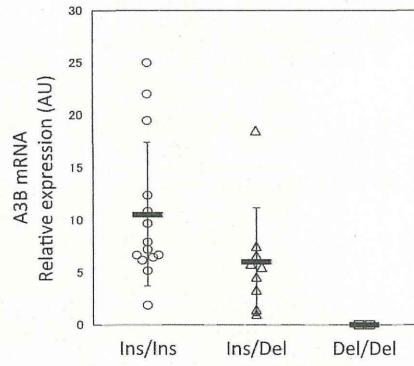


図5 A3B遺伝子型によるA3B mRNAの発現比較

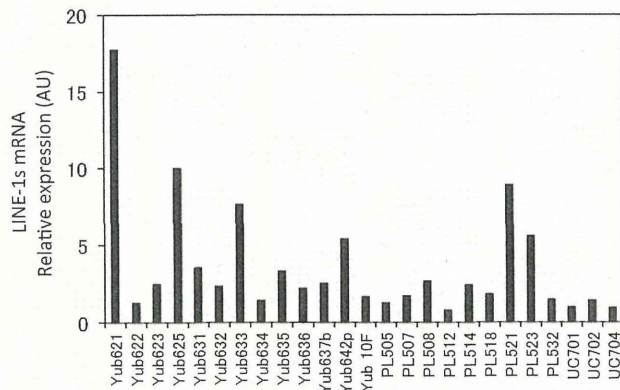


図6 hMSCsにおけるLINE-1s mRNAの発現比較

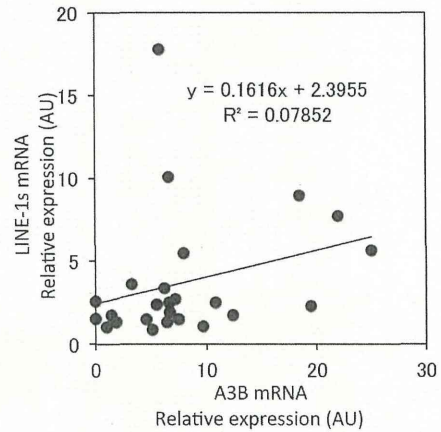


図7 hMSCsにおけるA3B、LINE-1s mRNA発現の相関

[GENETYX-MAC: Multiple Alignment]
date 2013.11.19

```

LINE-1.3(PCR) 1 ----- 1
L1 b-thal(PCR) 1 ----- 1
L1 RP(PCR) 1 ----- 1
11-8For 1 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGANGTGCAGGTTTTCGATAGGTTTATATC-4
11-13For 1 ---NNNNNNNNNNNNNNCTCNGGTCGANGTTTTCGATAGGTTTATATC-4
11-25For 1 ---NNNNNNNNNNNNNNNNNCGAGGTCGANGTTTTCGATAGGTTTATATC-4
11-30For 1 ---NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAGC---TTTTCGATAGGTTTATATC-4
11-3Rev 1 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGCGGCCCTCTAGACGATGTTTCCCGCTCAGG
LINE-1.3(PCR) 1 ----- 47
L1 b-thal(PCR) 1 ----- 47
L1 RP(PCR) 1 ----- 47
11-8For 55 AATFCCAATACTCAGGGCAATCAGGCAGGAGAAATAAGGGTATTCGAATAGGA 114
11-13For 53 AATFCCAATACTCAGGGCAATCAGGCAGGAGAAATAAGGGTATTCGAATAGGA 110
11-25For 52 AATFCCAATACTCAGGGCAATCAGGCAGGAGAAATAAGGGTATTCGAATAGGA 111
11-30For 48 AATFCCAATACTCAGGGCAATCAGGCAGGAGAAATAAGGGTATTCGAATAGGA 107
11-3Rev 62 AATFCCAATACTCAGGGCAATCAGGCAGGAGAAATAAGGGTATTCGAATAGGA 120
LINE-1.3(PCR) 48 AAGAGGAAGTCAAATGTCCCTGTTTCAGACGACATGATTGTATACTAGAAAACCC 106
L1 b-thal(PCR) 48 AAGAGGAAGTCAAATGTCCCTGTTTCAGACGACATGATTGTATACTAGAAAACCC 106
L1 RP(PCR) 48 AAGAGGAAGTCAAATGTCCCTGTTTCAGACGACATGATTGTATACTAGAAAACCC 106
11-8For 115 AAGAGGAAGTCAAATGTCCCTGTTTCAGACGACATGATTGTATACTAGAAAACCC 173
11-13For 111 AAGAGGAAGTCAAATGTCCCTGTTTCAGACGACATGATTGTATACTAGAAAACCC 170
11-25For 112 AAGAGGAAGTCAAATGTCCCTGTTTCAGACGACATGATTGTATACTAGAAAACCC 170
11-30For 108 AAGAGGAAGTCAAATGTCCCTGTTTCAGACGACATGATTGTATACTAGAAAACCC 164
11-3Rev 121 AAGAGGAAGTCAAATGTCCCTGTTTCAGACGACATGATTGTATACTAGAAAACCC 179
LINE-1.3(PCR) 107 ATGCTCAGCCCAAATCTCTTAAGCTGATAGCAACTTCAGCAAGGTCAGGATAC 166
L1 b-thal(PCR) 107 ATGCTCAGCCCAAATCTCTTAAGCTGATAGCAACTTCAGCAAGGTCAGGATAC 166
L1 RP(PCR) 107 ATGCTCAGCCCAAATCTCTTAAGCTGATAGCAACTTCAGCAAGGTCAGGATAC 166
11-8For 174 ATGCTCAGCCCAAATCTCTTAAGCTGATAGCAACTTCAGCAAGGTCAGGATAC 233
11-13For 171 ATGCTCAGCCCAAATCTCTTAAGCTGATAGCAACTTCAGCAAGGTCAGGATAC 230
11-25For 172 ATGCTCAGCCCAAATCTCTTAAGCTGATAGCAACTTCAGCAAGGTCAGGATAC 230
11-30For 165 ATGCTCAGCCCAAATCTCTTAAGCTGATAGCAACTTCAGCAAGGTCAGGATAC 229
11-3Rev 180 ATGCTCAGCCCAAATCTCTTAAGCTGATAGCAACTTCAGCAAGGTCAGGATAC 232
LINE-1.3(PCR) 167 AAAATCAATGTACAAAATCACAAAGATTCTTATACCCAACACAGACAACAGAGAGG 226
L1 b-thal(PCR) 167 AAAATCAATGTACAAAATCACAAAGATTCTTATACCCAACACAGACAACAGAGAGG 226
L1 RP(PCR) 167 AAAATCAATGTACAAAATCACAAAGATTCTTATACCCAACACAGACAACAGAGAGG 226
11-8For 234 AAAATCAATGTACAAAATCACAAAGATTCTTATACCCAACACAGACAACAGAGAGG 293
11-13For 233 AAAATCAATGTACAAAATCACAAAGATTCTTATACCCAACACAGACAACAGAGAGG 290
11-25For 231 AAAATCAATGTACAAAATCACAAAGATTCTTATACCCAACACAGACAACAGAGAGG 282
11-30For 223 AAAATCAATGTACAAAATCACAAAGATTCTTATACCCAACACAGACAACAGAGAGG 282
11-3Rev 240 AAAATCAATGTACAAAATCACAAAGATTCTTATACCCAACACAGACAACAGAGAGG 299
LINE-1.3(PCR) 227 CAATCATGTGCTGAATCCATTCGAAATGCTTCAAGAGATAAATAATCTCAGGAATC 286
L1 b-thal(PCR) 227 CAATCATGTGCTGAATCCATTCGAAATGCTTCAAGAGATAAATAATCTCAGGAATC 286
L1 RP(PCR) 227 CAATCATGTGCTGAATCCATTCGAAATGCTTCAAGAGATAAATAATCTCAGGAATC 286
11-8For 294 CAATCATGTGCTGAATCCATTCGAAATGCTTCAAGAGATAAATAATCTCAGGAATC 353
11-13For 291 CAATCATGTGCTGAATCCATTCGAAATGCTTCAAGAGATAAATAATCTCAGGAATC 350
11-25For 283 CAATCATGTGCTGAATCCATTCGAAATGCTTCAAGAGATAAATAATCTCAGGAATC 342
11-30For 283 CAATCATGTGCTGAATCCATTCGAAATGCTTCAAGAGATAAATAATCTCAGGAATC 342
11-3Rev 300 CAATCATGTGCTGAATCCATTCGAAATGCTTCAAGAGATAAATAATCTCAGGAATC 359
LINE-1.3(PCR) 287 CAACCTTACAGGGATGTGAAGGACCTTCAAGGAGAACTACAAACCCTGCTCAAGAA 346
L1 b-thal(PCR) 287 CAACCTTACAGGGATGTGAAGGACCTTCAAGGAGAACTACAAACCCTGCTCAAGAA 346
L1 RP(PCR) 287 CAACCTTACAGGGATGTGAAGGACCTTCAAGGAGAACTACAAACCCTGCTCAAGAA 346
11-8For 354 CAACCTTACAGGGATGTGAAGGACCTTCAAGGAGAACTACAAACCCTGCTCAAGAA 413
11-13For 351 CAACCTTACAGGGATGTGAAGGACCTTCAAGGAGAACTACAAACCCTGCTCAAGAA 410
11-25For 343 CAACCTTACAGGGATGTGAAGGACCTTCAAGGAGAACTACAAACCCTGCTCAAGAA 402
11-30For 343 CAACCTTACAGGGATGTGAAGGACCTTCAAGGAGAACTACAAACCCTGCTCAAGAA 402
11-3Rev 368 CAACCTTACAGGGATGTGAAGGACCTTCAAGGAGAACTACAAACCCTGCTCAAGAA 419
LINE-1.3(PCR) 347 AAAAAAGAGGACACAAACAAATGGAAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGATCAAT 406
L1 b-thal(PCR) 347 AAAAAAGAGGACACAAACAAATGGAAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGATCAAT 406

```

```

L1 RP(PCR) 347 AAAAAAGAGGACACAAACAAATGGAAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGATCAAT 406
11-8For 471 AAAAAAGGCTACAAACAAATGGAAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGATCAAT 471
11-13For 411 AAAAAAGAGGACACAAACAAATGGAAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGATCAAT 470
11-25For 403 AAAAAAGAGGACACAAACAAATGGAAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGATCAAT 462
11-30For 403 AAAAAAGAGGACACAAACAAATGGAAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGATCAAT 462
11-3Rev 420 AAAAAAGAGGACACAAACAAATGGAAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGATCAAT 479
LINE-1.3(PCR) 407 ATCGTGAATAGGCCATACTGCGCAAGGTAATTTAGATTCAATGCCATCCCATCAAG 466
L1 b-thal(PCR) 407 ATCGTGAATAGGCCATACTGCGCAAGGTAATTTAGATTCAATGCCATCCCATCAAG 466
L1 RP(PCR) 407 ATCGTGAATAGGCCATACTGCGCAAGGTAATTTAGATTCAATGCCATCCCATCAAG 466
11-8For 472 ATCGTGAATAGGCCATACTGCGCAAGGTAATTTAGATTCAATGCCATCCCATCAAG 531
11-13For 471 ATCGTGAATAGGCCATACTGCGCAAGGTAATTTAGATTCAATGCCATCCCATCAAG 530
11-25For 463 ATCGTGAATAGGCCATACTGCGCAAGGTAATTTAGATTCAATGCCATCCCATCAAG 522
11-30For 463 ATCGTGAATAGGCCATACTGCGCAAGGTAATTTAGATTCAATGCCATCCCATCAAG 522
11-3Rev 489 ATCGTGAATAGGCCATACTGCGCAAGGTAATTTAGATTCAATGCCATCCCATCAAG 539
LINE-1.3(PCR) 467 CTACCAATGACTTCTTCACAGAAATGGAAAAA-CTACTTTAAAGTTCATATGGAAACA 525
L1 b-thal(PCR) 467 CTACCAATGACTTCTTCACAGAAATGGAAAAA-CTACTTTAAAGTTCATATGGAAACA 525
L1 RP(PCR) 467 CTACCAATGACTTCTTCACAGAAATGGAAAAA-CTACTTTAAAGTTCATATGGAAACA 525
11-8For 532 CTACCAATGACTTCTTCACAGAAATGGAAAAA-CTACTTTAAAGTTCATATGGAAACA 591
11-13For 531 CTACCAATGACTTCTTCACAGAAATGGAAAAA-CTACTTTAAAGTTCATATGGAAACA 589
11-25For 523 CTACCAATGACTTCTTCACAGAAATGGAAAAA-CTACTTTAAAGTTCATATGGAAACA 581
11-30For 523 CTACCAATGACTTCTTCACAGAAATGGAAAAA-CTACTTTAAAGTTCATATGGAAACA 581
11-3Rev 540 CTACCAATGACTTCTTCACAGAAATGGAAAAA-CTACTTTAAAGTTCATATGGAAACA 598
LINE-1.3(PCR) 526 AAAAAAGGCGCCGATTCGCAAGTCAATCTAAGCCAAAAGAAACAAGCTGGAGGATCA 585
L1 b-thal(PCR) 526 AAAAAAGGCGCCGATTCGCAAGTCAATCTAAGCCAAAAGAAACAAGCTGGAGGATCA 585
L1 RP(PCR) 526 AAAAAAGGCGCCGATTCGCAAGTCAATCTAAGCCAAAAGAAACAAGCTGGAGGATCA 585
11-8For 592 AAAAAAGGCGCCGATTCGCAAGTCAATCTAAGCCAAAAGAAACAAGCTGGAGGATCA 651
11-13For 598 AAAAAAGGCGCCGATTCGCAAGTCAATCTAAGCCAAAAGAAACAAGCTGGAGGATCA 649
11-25For 582 AAAAAAGGCGCCGATTCGCAAGTCAATCTAAGCCAAAAGAAACAAGCTGGAGGATCA 641
11-30For 582 AAAAAAGGCGCCGATTCGCAAGTCAATCTAAGCCAAAAGAAACAAGCTGGAGGATCA 641
11-3Rev 599 AAAAAAGGCGCCGATTCGCAAGTCAATCTAAGCCAAAAGAAACAAGCTGGAGGATCA 658
LINE-1.3(PCR) 586 ACTACTGACTTCAAACTATCTACAAGGCTACAGTAAACAAAAGCAATGCTATGCTA 645
L1 b-thal(PCR) 586 ACTACTGACTTCAAACTATCTACAAGGCTACAGTAAACAAAAGCAATGCTATGCTA 645
L1 RP(PCR) 586 ACTACTGACTTCAAACTATCTACAAGGCTACAGTAAACAAAAGCAATGCTATGCTA 645
11-8For 652 CTACTGACTTCAAACTATCTACAAGGCTACAGTAAACAAAAGCAATGCTATGCTA 711
11-13For 650 CTACTGACTTCAAACTATCTACAAGGCTACAGTAAACAAAAGCAATGCTATGCTA 709
11-25For 642 CTACTGACTTCAAACTATCTACAAGGCTACAGTAAACAAAAGCAATGCTATGCTA 701
11-30For 642 CTACTGACTTCAAACTATCTACAAGGCTACAGTAAACAAAAGCAATGCTATGCTA 701
11-3Rev 659 CTACTGACTTCAAACTATCTACAAGGCTACAGTAAACAAAAGCAATGCTATGCTA 718
LINE-1.3(PCR) 646 CAAAAACAGAGATATAGATCAATGGAACAGAACAGAGCCCTCAGAAATATGCCATAT 705
L1 b-thal(PCR) 646 CAAAAACAGAGATATAGATCAATGGAACAGAACAGAGCCCTCAGAAATATGCCATAT 705
L1 RP(PCR) 646 CAAAAACAGAGATATAGATCAATGGAACAGAACAGAGCCCTCAGAAATATGCCATAT 705
11-8For 712 CAAAAACAGAGATATAGATCAATGGAACAGAACAGAGCCCTCAGAAATATGCCATAT 771
11-13For 710 CAAAAACAGAGATATAGATCAATGGAACAGAACAGAGCCCTCAGAAATATGCCATAT 769
11-25For 702 CAAAAACAGAGATATAGATCAATGGAACAGAACAGAGCCCTCAGAAATATGCCATAT 761
11-30For 702 CAAAAACAGAGATATAGATCAATGGAACAGAACAGAGCCCTCAGAAATATGCCATAT 761
11-3Rev 719 CAAAAACAGAGATATAGATCAATGGAACAGAACAGAGCCCTCAGAAATATGCCATAT 775
LINE-1.3(PCR) 706 CTACAACATCTGATCTTGGACAACCTGAGAAAAACAAGCAATGGGAAAGGATTCCT 765
L1 b-thal(PCR) 706 CTACAACATCTGATCTTGGACAACCTGAGAAAAACAAGCAATGGGAAAGGATTCCT 765
L1 RP(PCR) 706 CTACAACATCTGATCTTGGACAACCTGAGAAAAACAAGCAATGGGAAAGGATTCCT 765
11-8For 772 CTACAACATCTGATCTTGGACAACCTGAGAAAAACAAGCAATGGGAAAGGATTCCT 831
11-13For 778 CTACAACATCTGATCTTGGACAACCTGAGAAAAACAAGCAATGGGAAAGGATTCCT 829
11-25For 762 CTACAACATCTGATCTTGGACAACCTGAGAAAAACAAGCAATGGGAAAGGATTCCT 820
11-30For 762 CTACAACATCTGATCTTGGACAACCTGAGAAAAACAAGCAATGGGAAAGGATTCCT 820
11-3Rev 776 CTACAACATCTGATCTTGGACAACCTGAGAAAAACAAGCAATGGGAAAGGATTCCT 835
LINE-1.3(PCR) 766 ATTTAATAATGGTGTGGGAAACCTGGTAGCCATA-ITGTAAGAGCTGAAACTGGATC 824
L1 b-thal(PCR) 766 ATTTAATAATGGTGTGGGAAACCTGGTAGCCATA-ITGTAAGAGCTGAAACTGGATC 824
L1 RP(PCR) 766 ATTTAATAATGGTGTGGGAAACCTGGTAGCCATA-ITGTAAGAGCTGAAACTGGATC 824
11-8For 832 ATTTAATAATGGTGTGGGAAACCTGGTAGCCATA-ITGTAAGAGCTGAAACTGGATC 889
11-13For 830 ATTTAATAATGGTGTGGGAAACCTGGTAGCCATA-ITGTAAGAGCTGAAACTGGATC 888
11-25For 826 ATTTAATAATGGTGTGGGAAACCTGGTAGCCATA-ITGTAAGAGCTGAAACTGGATC 880
11-30For 826 ATTTAATAATGGTGTGGGAAACCTGGTAGCCATA-ITGTAAGAGCTGAAACTGGATC 880
11-3Rev 832 ATTTAATAATGGTGTGGGAAACCTGGTAGCCATA-ITGTAAGAGCTGAAACTGGATC 894
LINE-1.3(PCR) 825 CCTTCTTACACCTTATACAAAATCAATTCAGATGGATTAAGGATTTAAACTTAAAT 884
L1 b-thal(PCR) 825 CCTTCTTACACCTTATACAAAATCAATTCAGATGGATTAAGGATTTAAACTTAAAT 884
L1 RP(PCR) 825 CCTTCTTACACCTTATACAAAATCAATTCAGATGGATTAAGGATTTAAACTTAAAT 884

```

図8-1 PL523 (Ins/Ins) におけるLINE-1s mRNAのsequence

[GENETYX-MAC: Multiple Alignment]
Date : 2013.11.19

LINE-1.3(PCR) 1 ----- 1
L1 b-thal1(PCR) 1 ----- 1
L1 RP(PCR) 1 ----- 1
1-1For 1 -NNNNNNNNNNNNNNNNNGGCTCGANGGTATGATAAGCTTGATTCGAATCCCAAT 60
1-4For 1 -NNNNNNNNNNNNNNNNCGCTCGANGGTATGATAAGCTTGATTCGAATCCCAAT 60
1-5For 1 -NNNNNNNNNNNNNNNNCGCTCGANGGTATGATAAGCTTGATTCGAATCCCAAT 59
1-6For 1 -NNNNNNNNNNNNNNNNCGCTCGANGGTATGATAAGCTTGATTCGAATCCCAAT 59
1-8For 1 -NNNNNNNNNNNNNNNNCGCTCGANGGTATGATAAGCTTGATTCGAATCCCAAT 58
LINE-1.3(PCR) 1 --CAGGCCAATCAGGCAGGAGAAAGAAATAAAGGGTATTCAATTAGGAAAAGGGAAGT 57
L1 b-thal1(PCR) 1 --CAGGCCAATCAGGCAGGAGAAAGAAATAAAGGGTATTCAATTAGGAAAAGGGAAGT 57
L1 RP(PCR) 1 --CAGGCCAATCAGGCAGGAGAAAGAAATAAAGGGTATTCAATTAGGAAAAGGGAAGT 57
1-1For 61 AGT-AGGGCAATCAGGCAGGAGAAAGAAATAAAGGGTATTCAATTAGGAAAAGGGAAGT 119
1-4For 61 AGT-AGGGCAATCAGGCAGGAGAAAGAAATAAAGGGTATTCAATTAGGAAAAGGGAAGT 119
1-5For 60 AGT-AGGGCAATCAGGCAGGAGAAAGAAATAAAGGGTATTCAATTAGGAAAAGGGAAGT 119
1-6For 59 AGT-AGGGCAATCAGGCAGGAGAAAGAAATAAAGGGTATTCAATTAGGAAAAGGGAAGT 116
1-8For 60 AGT-AGGGCAATCAGGCAGGAGAAAGAAATAAAGGGTATTCAATTAGGAAAAGGGAAGT 118
LINE-1.3(PCR) 38 CAAAATGTCCTGTTTGGAGAGACATGATTTGATATAGAAAACCCCATCTCTCAGG 117
L1 b-thal1(PCR) 58 CAATTTGCTCTGTTTGGAGAGACATGATTTGATATAGAAAACCCCATCTCTCAGG 117
L1 RP(PCR) 58 CAATTTGCTCTGTTTGGAGAGACATGATTTGATATAGAAAACCCCATCTCTCAGG 117
1-1For 120 CAATTTGCTCTGTTTGGAGAGACATGATTTGATATAGAAAACCCCATCTCTCAGG 179
1-4For 120 CAATTTGCTCTGTTTGGAGAGACATGATTTGATATAGAAAACCCCATCTCTCAGG 179
1-5For 120 CAATTTGCTCTGTTTGGAGAGACATGATTTGATATAGAAAACCCCATCTCTCAGG 179
1-6For 117 CAATTTGCTCTGTTTGGAGAGACATGATTTGATATAGAAAACCCCATCTCTCAGG 176
1-8For 119 CAATTTGCTCTGTTTGGAGAGACATGATTTGATATAGAAAACCCCATCTCTCAGG 178
LINE-1.3(PCR) 118 CAAAATCTCCTTAAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAAGTCTCAGGATACAAAATCAATGT 177
L1 b-thal1(PCR) 118 CAAAATCTCCTTAAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAAGTCTCAGGATACAAAATCAATGT 177
L1 RP(PCR) 118 CAAAATCTCCTTAAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAAGTCTCAGGATACAAAATCAATGT 177
1-1For 180 CAAAATCTCCTTAAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAAGTCTCAGGATACAAAATCAATGT 239
1-4For 180 CAAAATCTCCTTAAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAAGTCTCAGGATACAAAATCAATGT 239
1-5For 180 CAAAATCTCCTTAAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAAGTCTCAGGATACAAAATCAATGT 239
1-6For 177 CAAAATCTCCTTAAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAAGTCTCAGGATACAAAATCAATGT 236
1-8For 179 CAAAATCTCCTTAAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAAGTCTCAGGATACAAAATCAATGT 238
LINE-1.3(PCR) 178 CAAAATCACAAGCATTCTTATACACCAACACAGCAAAACAGAGGCCAATCATGGG 237
L1 b-thal1(PCR) 178 CAAAATCACAAGCATTCTTATACACCAACACAGCAAAACAGAGGCCAATCATGGG 237
L1 RP(PCR) 178 CAAAATCACAAGCATTCTTATACACCAACACAGCAAAACAGAGGCCAATCATGGG 237
1-1For 240 CAAAATCACAAGCATTCTTATACACCAACACAGCAAAACAGAGGCCAATCATGGG 299
1-4For 240 CAAAATCACAAGCATTCTTATACACCAACACAGCAAAACAGAGGCCAATCATGGG 299
1-5For 240 CAAAATCACAAGCATTCTTATACACCAACACAGCAAAACAGAGGCCAATCATGGG 299
1-6For 237 CAAAATCACAAGCATTCTTATACACCAACACAGCAAAACAGAGGCCAATCATGGG 296
1-8For 239 CAAAATCACAAGCATTCTTATACACCAACACAGCAAAACAGAGGCCAATCATGGG 298
LINE-1.3(PCR) 238 TGAATCCCAATCTGAATTCCTTAAAGGAATAAAAATCTAGGAATCCCACTTACAAG 297
L1 b-thal1(PCR) 238 TGAATCCCAATCTGAATTCCTTAAAGGAATAAAAATCTAGGAATCCCACTTACAAG 297
L1 RP(PCR) 238 TGAATCCCAATCTGAATTCCTTAAAGGAATAAAAATCTAGGAATCCCACTTACAAG 297
1-1For 300 TGAATCCCAATCTGAATTCCTTAAAGGAATAAAAATCTAGGAATCCCACTTACAAG 359
1-4For 300 TGAATCCCAATCTGAATTCCTTAAAGGAATAAAAATCTAGGAATCCCACTTACAAG 359
1-5For 300 TGAATCCCAATCTGAATTCCTTAAAGGAATAAAAATCTAGGAATCCCACTTACAAG 359
1-6For 297 TGAATCCCAATCTGAATTCCTTAAAGGAATAAAAATCTAGGAATCCCACTTACAAG 356
1-8For 299 TGAATCCCAATCTGAATTCCTTAAAGGAATAAAAATCTAGGAATCCCACTTACAAG 358
LINE-1.3(PCR) 298 CGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAACTACAAA-----CACTGCTCAGGAAATAAAG 353
L1 b-thal1(PCR) 298 CGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAACTACAAA-----CACTGCTCAGGAAATAAAG 353
L1 RP(PCR) 298 CGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAACTACAAA-----CACTGCTCAGGAAATAAAG 353
1-1For 360 CGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAACTACAAA-----CACTGCTCAGGAAATAAAG 415
1-4For 360 CGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAACTACAAA-----CACTGCTCAGGAAATAAAG 415
1-5For 360 CGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAACTACAAA-----CACTGCTCAGGAAATAAAG 415
1-6For 357 CGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAACTACAAA-----CACTGCTCAGGAAATAAAG 414
1-8For 359 CGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAACTACAAA-----CACTGCTCAGGAAATAAAG 416
LINE-1.3(PCR) 354 AGGACACAACAACAAATGGAAGAACATCCATGCTCATGGTAGGAAGAAATCAATTCGTGA 413
L1 b-thal1(PCR) 354 AGGACACAACAACAAATGGAAGAACATCCATGCTCATGGTAGGAAGAAATCAATTCGTGA 412

L1 RP(PCR) 354 AGGACACAACAACAAATGGAAGAACATCCATGCTCATGGTAGGAAGAAATCAATTCGTGA 413
1-1For 416 AGGATACAACAACAAATGGAAGAACATCCATGCTCATGGTAGGAAGAAATCAATTCGTGA 472
1-4For 416 AGGATACAACAACAAATGGAAGAACATCCATGCTCATGGTAGGAAGAAATCAATTCGTGA 475
1-5For 416 AGGATACAACAACAAATGGAAGAACATCCATGCTCATGGTAGGAAGAAATCAATTCGTGA 475
1-6For 417 AGGACACAACAACAAATGGAAGAACATCCATGCTCATGGTAGGAAGAAATCAATTCGTGA 476
1-8For 415 AGGACACAACAACAAATGGAAGAACATCCATGCTCATGGTAGGAAGAAATCAATTCGTGA 474
LINE-1.3(PCR) 414 AAATGGCCATACTGCCAAGGTAATTTACAGATTCATGCCATCCCCATCAAGCTACCAA 473
L1 b-thal1(PCR) 414 AAATGGCCATACTGCCAAGGTAATTTACAGATTCATGCCATCCCCATCAAGCTACCAA 473
L1 RP(PCR) 414 AAATGGCCATACTGCCAAGGTAATTTACAGATTCATGCCATCCCCATCAAGCTACCAA 473
1-1For 473 AAATGGCCATACTGCCAAGGTAATTTACAGATTCATGCCATCCCCATCAAGCTACCAA 532
1-4For 473 AAATGGCCATACTGCCAAGGTAATTTACAGATTCATGCCATCCCCATCAAGCTACCAA 535
1-5For 476 AAATGGCCATACTGCCAAGGTAATTTACAGATTCATGCCATCCCCATCAAGCTACCAA 535
1-6For 477 AAATGGCCATACTGCCAAGGTAATTTACAGATTCATGCCATCCCCATCAAGCTACCAA 536
1-8For 475 AAATGGCCATACTGCCAAGGTAATTTACAGATTCATGCCATCCCCATCAAGCTACCAA 534
LINE-1.3(PCR) 474 TGAATTTCTTACAGAAATGGAAAAAACAATCTTAAAGTTCATATGGAACAAAAAAGAG 533
L1 b-thal1(PCR) 474 TGAATTTCTTACAGAAATGGAAAAAACAATCTTAAAGTTCATATGGAACAAAAAAGAG 533
L1 RP(PCR) 474 TGAATTTCTTACAGAAATGGAAAAAACAATCTTAAAGTTCATATGGAACAAAAAAGAG 533
1-1For 533 TGAATTTCTTACAGAAATGGAAAAAACAATCTTAAAGTTCATATGGAACAAAAAAGAG 592
1-4For 536 TGAATTTCTTACAGAAATGGAAAAAACAATCTTAAAGTTCATATGGAACAAAAAAGAG 595
1-5For 536 TGAATTTCTTACAGAAATGGAAAAAACAATCTTAAAGTTCATATGGAACAAAAAAGAG 595
1-6For 537 TGAATTTCTTACAGAAATGGAAAAAACAATCTTAAAGTTCATATGGAACAAAAAAGAG 593
1-8For 535 TGAATTTCTTACAGAAATGGAAAAAACAATCTTAAAGTTCATATGGAACAAAAAAGAG 594
LINE-1.3(PCR) 534 CECGCAATGCCAAGTCAATCTAAGCCAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACACTCTG 593
L1 b-thal1(PCR) 534 CECGCAATGCCAAGTCAATCTAAGCCAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACACTCTG 593
L1 RP(PCR) 534 CECGCAATGCCAAGTCAATCTAAGCCAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACACTCTG 593
1-1For 593 CECGCAATGCCAAGTCAATCTAAGCCAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACACTCTG 652
1-4For 596 CECGCAATGCCAAGTCAATCTAAGCCAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACACTCTG 655
1-5For 596 CECGCAATGCCAAGTCAATCTAAGCCAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACACTCTG 655
1-6For 592 CECGCAATGCCAAGTCAATCTAAGCCAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACACTCTG 651
1-8For 595 CECGCAATGCCAAGTCAATCTAAGCCAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACACTCTG 654
LINE-1.3(PCR) 594 ACTTCAAATATACTACAAGGCTACAGTAACAAAAACAGCATGGTACTGGTACAAAACA 653
L1 b-thal1(PCR) 594 ACTTCAAATATACTACAAGGCTACAGTAACAAAAACAGCATGGTACTGGTACAAAACA 653
L1 RP(PCR) 594 ACTTCAAATATACTACAAGGCTACAGTAACAAAAACAGCATGGTACTGGTACAAAACA 653
1-1For 653 ACTTCAAATATACTACAAGGCTACAGTAACAAAAACAGCATGGTACTGGTACAAAACA 712
1-4For 656 ACTTCAAATATACTACAAGGCTACAGTAACAAAAACAGCATGGTACTGGTACAAAACA 715
1-5For 656 ACTTCAAATATACTACAAGGCTACAGTAACAAAAACAGCATGGTACTGGTACAAAACA 715
1-6For 652 ACTTCAAATATACTACAAGGCTACAGTAACAAAAACAGCATGGTACTGGTACAAAACA 711
1-8For 655 ACTTCAAATATACTACAAGGCTACAGTAACAAAAACAGCATGGTACTGGTACAAAACA 714
LINE-1.3(PCR) 654 GAGATATAGATCAATGGAACAGACAGAGCCCTCAGAAATAATGCCGATA-----CTACAA 711
L1 b-thal1(PCR) 654 GAGATATAGATCAATGGAACAGACAGAGCCCTCAGAAATAATGCCGATA-----CTACAA 711
L1 RP(PCR) 654 GAGATATAGATCAATGGAACAGACAGAGCCCTCAGAAATAATGCCGATA-----CTACAA 711
1-1For 713 GAGATATAGATCAATGGAACAGACAGAGCCCTCAGAAATAATGCCGATA-----CTACAA 770
1-4For 716 GAGATATAGATCAATGGAACAGACAGAGCCCTCAGAAATAATGCCGATA-----CTACAA 775
1-5For 716 GAGATATAGATCAATGGAACAGACAGAGCCCTCAGAAATAATGCCGATA-----CTACAA 773
1-6For 712 GAGATATAGATCAATGGAACAGACAGAGCCCTCAGAAATAATGCCGATA-----CTACAA 769
1-8For 715 GAGATATAGATCAATGGAACAGACAGAGCCCTCAGAAATAATGCCGATA-----CTACAA 772
LINE-1.3(PCR) 712 CTATCTGATCTTTGACAAACCTGAGAAAAACAGCAATGGGAAAGGATCCCTATTT-A 770
L1 b-thal1(PCR) 712 CTATCTGATCTTTGACAAACCTGAGAAAAACAGCAATGGGAAAGGATCCCTATTT-A 770
L1 RP(PCR) 712 CTATCTGATCTTTGACAAACCTGAGAAAAACAGCAATGGGAAAGGATCCCTATTT-A 770
1-1For 771 CTATCTGATCTTTGACAAACCTGAGAAAAACAGCAATGGGAAAGGATCCCTATTT-A 829
1-4For 776 CTATCTGATCTTTGACAAACCTGAGAAAAACAGCAATGGGAAAGGATCCCTATTT-A 834
1-5For 774 CTATCTGATCTTTGACAAACCTGAGAAAAACAGCAATGGGAAAGGATCCCTATTT-A 827
1-6For 770 CTATCTGATCTTTGACAAACCTGAGAAAAACAGCAATGGGAAAGGATCCCTATTT-A 829
1-8For 773 CTATCTGATCTTTGACAAACCTGAGAAAAACAGCAATGGGAAAGGATCCCTATTT-A 831
LINE-1.3(PCR) 771 AATAATGGTCTGGGAAAACTGGCTAGCCATATGTAGAAAGCTGAAACTGGATCCCTTCC 830
L1 b-thal1(PCR) 771 AATAATGGTCTGGGAAAACTGGCTAGCCATATGTAGAAAGCTGAAACTGGATCCCTTCC 830
L1 RP(PCR) 771 AATAATGGTCTGGGAAAACTGGCTAGCCATATGTAGAAAGCTGAAACTGGATCCCTTCC 830
1-1For 830 AATAATGGTCTGGGAAAACTGGCTAGCCATATGTAGAAAGCTGAAACTGGATCCCTTCC 839
1-4For 835 AATAATGGTCTGGGAAAACTGGCTAGCCATATGTAGAAAGCTGAAACTGGATCCCTTCC 834
1-5For 833 AATAATGGTCTGGGAAAACTGGCTAGCCATATGTAGAAAGCTGAAACTGGATCCCTTCC 832
1-6For 830 AATAATGGTCTGGGAAAACTGGCTAGCCATATGTAGAAAGCTGAAACTGGATCCCTTCC 830
1-8For 832 AATAATGGTCTGGGAAAACTGGCTAGCCATATGTAGAAAGCTGAAACTGGATCCCTTCC 831
LINE-1.3(PCR) 831 TTACACCTTATACAAAATCAATTCAGATGGATTAAGAAATTAACCTTTTAACTTAAAC 808
L1 b-thal1(PCR) 831 TTACACCTTATACAAAATCAATTCAGATGGATTAAGAAATTAACCTTTTAACTTAAAC 808

図-8-2 Yub621 (Ins/Del) におけるLINE-1s mRNAのsequence

[GENETYX-MAC: Multiple Alignment]
Date 2013.11.15

LINE-1.3(PCR) 1 ----- 1
L1 b-thal1(PCR) 1 ----- 1
L1 RP(PCR) 1 ----- 1
3-1 For 1 ----N-----NNNNNCCAGGTCGANGGATCCATAAGTTTGATATC--GAAT 50
3-6 For 1 ----N-----NNNNNCCAGGTCGANGGATCCATAAGTTTGATATC--GAAT 53
3-10 For 1 ----N-----NNNNNCCAGGTCGANGGATCCATAAGTTTGATATC--GAAT 48
3-13 For 1 ----N-----NNNNNCCAGGTCGANGGATCCATAAGTTTGATATC--GAAT 51
3-2 Rev 1 NNNNNNNNNNNNNGGCGGCGCTGTAGACTAGGNCCECGGCTGCGAAT 60
LINE-1.3(PCR) 1 -----CAGGGCAATCAGGAGGAGAAATAAGGGTATTCAATTAGGAAAG 50
L1 b-thal1(PCR) 1 -----CAGGGCAATCAGGAGGAGAAATAAGGGTATTCAATTAGGAAAG 50
L1 RP(PCR) 1 -----CAGGGCAATCAGGAGGAGAAATAAGGGTATTCAATTAGGAAAG 50
3-1 For 31 TCCCAATCTCAGGGCAATCAGGAGGAGAAATAAGGGTATTCAATTAGGAAAG 119
3-6 For 34 TCCCAATCTCAGGGCAATCAGGAGGAGAAATAAGGGTATTCAATTAGGAAAG 113
3-10 For 49 TCCCAATCTCAGGGCAATCAGGAGGAGAAATAAGGGTATTCAATTAGGAAAG 100
3-13 For 52 TCCCAATCTCAGGGCAATCAGGAGGAGAAATAAGGGTATTCAATTAGGAAAG 111
3-2 Rev 61 TCCCAATCTCAGGGCAATCAGGAGGAGAAATAAGGGTATTCAATTAGGAAAG 120
LINE-1.3(PCR) 51 AGGAAGTCAAAATGTCCCTGTTTGAGAGGACATGATGTTTATCTAGAAAACCCCAATC 110
L1 b-thal1(PCR) 51 AGGAAGTCAAAATGTCCCTGTTTGAGAGGACATGATGTTTATCTAGAAAACCCCAATC 110
L1 RP(PCR) 51 AGGAAGTCAAAATGTCCCTGTTTGAGAGGACATGATGTTTATCTAGAAAACCCCAATC 110
3-1 For 111 AGGAAGTCAAAATGTCCCTGTTTGAGAGGACATGATGTTTATCTAGAAAACCCCAATC 110
3-6 For 114 AGGAAGTCAAAATGTCCCTGTTTGAGAGGACATGATGTTTATCTAGAAAACCCCAATC 123
3-10 For 189 AGGAAGTCAAAATGTCCCTGTTTGAGAGGACATGATGTTTATCTAGAAAACCCCAATC 168
3-13 For 112 AGGAAGTCAAAATGTCCCTGTTTGAGAGGACATGATGTTTATCTAGAAAACCCCAATC 171
3-2 Rev 121 AGGAAGTCAAAATGTCCCTGTTTGAGAGGACATGATGTTTATCTAGAAAACCCCAATC 180
LINE-1.3(PCR) 111 TCTCAGCCCAAAAATCTCTTAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAGTCTCAGGATACAAAA 170
L1 b-thal1(PCR) 111 TCTCAGCCCAAAAATCTCTTAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAGTCTCAGGATACAAAA 170
L1 RP(PCR) 111 TCTCAGCCCAAAAATCTCTTAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAGTCTCAGGATACAAAA 170
3-1 For 171 TCTCAGCCCAAAAATCTCTTAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAGTCTCAGGATACAAAA 230
3-6 For 174 TCTCAGCCCAAAAATCTCTTAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAGTCTCAGGATACAAAA 233
3-10 For 169 TCTCAGCCCAAAAATCTCTTAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAGTCTCAGGATACAAAA 228
3-13 For 172 TCTCAGCCCAAAAATCTCTTAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAGTCTCAGGATACAAAA 231
3-2 Rev 181 TCTCAGCCCAAAAATCTCTTAAGCTGATAAGCAACTTCAGCAAGTCTCAGGATACAAAA 240
LINE-1.3(PCR) 171 TCAATGTACAAAAATCACAAGCATCTTATACACCAACACAGACAAACAGAGGCCAAA 230
L1 b-thal1(PCR) 171 TCAATGTACAAAAATCACAAGCATCTTATACACCAACACAGACAAACAGAGGCCAAA 230
L1 RP(PCR) 171 TCAATGTACAAAAATCACAAGCATCTTATACACCAACACAGACAAACAGAGGCCAAA 230
3-1 For 231 TCAATGTACAAAAATCACAAGCATCTTATACACCAACACAGACAAACAGAGGCCAAA 290
3-6 For 234 TCAATGTACAAAAATCACAAGCATCTTATACACCAACACAGACAAACAGAGGCCAAA 293
3-10 For 229 TCAATGTACAAAAATCACAAGCATCTTATACACCAACACAGACAAACAGAGGCCAAA 288
3-13 For 232 TCAATGTACAAAAATCACAAGCATCTTATACACCAACACAGACAAACAGAGGCCAAA 291
3-2 Rev 241 TCAATGTACAAAAATCACAAGCATCTTATACACCAACACAGACAAACAGAGGCCAAA 300
LINE-1.3(PCR) 231 TCAATGTGAATCCCATTTCTAATGGTTCAAGGAGATAAATAATCTAGAAATCCAA 290
L1 b-thal1(PCR) 231 TCAATGTGAATCCCATTTCTAATGGTTCAAGGAGATAAATAATCTAGAAATCCAA 290
L1 RP(PCR) 231 TCAATGTGAATCCCATTTCTAATGGTTCAAGGAGATAAATAATCTAGAAATCCAA 290
3-1 For 291 TCAATGTGAATCCCATTTCTAATGGTTCAAGGAGATAAATAATCTAGAAATCCAA 350
3-6 For 294 TCAATGTGAATCCCATTTCTAATGGTTCAAGGAGATAAATAATCTAGAAATCCAA 353
3-10 For 289 TCAATGTGAATCCCATTTCTAATGGTTCAAGGAGATAAATAATCTAGAAATCCAA 348
3-13 For 292 TCAATGTGAATCCCATTTCTAATGGTTCAAGGAGATAAATAATCTAGAAATCCAA 351
3-2 Rev 301 TCAATGTGAATCCCATTTCTAATGGTTCAAGGAGATAAATAATCTAGAAATCCAA 360
LINE-1.3(PCR) 291 TTACAAGGGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAGAACTACAACCACTGCTCAAGGAATAA 350
L1 b-thal1(PCR) 291 TTACAAGGGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAGAACTACAACCACTGCTCAAGGAATAA 350
L1 RP(PCR) 291 TTACAAGGGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAGAACTACAACCACTGCTCAAGGAATAA 350
3-1 For 351 TTACAAGGGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAGAACTACAACCACTGCTCAAGGAATAA 419
3-6 For 354 TTACAAGGGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAGAACTACAACCACTGCTCAAGGAATAA 413
3-10 For 349 TTACAAGGGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAGAACTACAACCACTGCTCAAGGAATAA 408
3-13 For 352 TTACAAGGGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAGAACTACAACCACTGCTCAAGGAATAA 411
3-2 Rev 361 TTACAAGGGATGTGAAGGACCTCTTCAAGGAGAACTACAACCACTGCTCAAGGAATAA 420
LINE-1.3(PCR) 351 AAGAGGACCAAAACAATGGAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGAATCAATATCG 410
L1 b-thal1(PCR) 351 AAGAGGACCAAAACAATGGAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGAATCAATATCG 410

L1 RP(PCR) 351 AAGAGGACCAAAACAATGGAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGAATCAATATCG 410
3-1 For 411 AAGAGGACCAAAACAATGGAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGAATCAATATCG 470
3-6 For 414 AAGAGGACCAAAACAATGGAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGAATCAATATCG 473
3-10 For 409 AAGAGGACCAAAACAATGGAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGAATCAATATCG 468
3-13 For 421 AAGAGGACCAAAACAATGGAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGAATCAATATCG 471
3-2 Rev 421 AAGAGGACCAAAACAATGGAGAACATTCATGCTCATGGGTAGGAAGAATCAATATCG 480
LINE-1.3(PCR) 411 TGAATAATGGCCATACTGCCCAAGGTAATTTACAGATTCATGCCATCCCATCAAGCTAC 470
L1 b-thal1(PCR) 411 TGAATAATGGCCATACTGCCCAAGGTAATTTACAGATTCATGCCATCCCATCAAGCTAC 470
L1 RP(PCR) 411 TGAATAATGGCCATACTGCCCAAGGTAATTTACAGATTCATGCCATCCCATCAAGCTAC 470
3-1 For 471 TGAATAATGGCCATACTGCCCAAGGTAATTTACAGATTCATGCCATCCCATCAAGCTAC 530
3-6 For 474 TGAATAATGGCCATACTGCCCAAGGTAATTTACAGATTCATGCCATCCCATCAAGCTAC 533
3-10 For 469 TGAATAATGGCCATACTGCCCAAGGTAATTTACAGATTCATGCCATCCCATCAAGCTAC 528
3-13 For 472 TGAATAATGGCCATACTGCCCAAGGTAATTTACAGATTCATGCCATCCCATCAAGCTAC 531
3-2 Rev 481 TGAATAATGGCCATACTGCCCAAGGTAATTTACAGATTCATGCCATCCCATCAAGCTAC 540
LINE-1.3(PCR) 471 CAATGACTTTCTTCACAGAAATGGAAAAAATACTTTAAAGTTCATATGGAAACAAAAA 530
L1 b-thal1(PCR) 471 CAATGACTTTCTTCACAGAAATGGAAAAAATACTTTAAAGTTCATATGGAAACAAAAA 530
L1 RP(PCR) 471 CAATGACTTTCTTCACAGAAATGGAAAAAATACTTTAAAGTTCATATGGAAACAAAAA 530
3-1 For 531 CAATGACTTTCTTCACAGAAATGGAAAAAATACTTTAAAGTTCATATGGAAACAAAAA 590
3-6 For 534 CAATGACTTTCTTCACAGAAATGGAAAAAATACTTTAAAGTTCATATGGAAACAAAAA 593
3-10 For 529 CAATGACTTTCTTCACAGAAATGGAAAAAATACTTTAAAGTTCATATGGAAACAAAAA 588
3-13 For 532 CAATGACTTTCTTCACAGAAATGGAAAAAATACTTTAAAGTTCATATGGAAACAAAAA 591
3-2 Rev 601 CAATGACTTTCTTCACAGAAATGGAAAAAATACTTTAAAGTTCATATGGAAACAAAAA 600
LINE-1.3(PCR) 531 -GAGCCGCAATTCGCAAGTCAATCTTAAGCAAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACACTA 589
L1 b-thal1(PCR) 531 -GAGCCGCAATTCGCAAGTCAATCTTAAGCAAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACACTA 589
L1 RP(PCR) 531 -GAGCCGCAATTCGCAAGTCAATCTTAAGCAAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACACTA 589
3-1 For 591 -GAGCCGCAATTCGCAAGTCAATCTTAAGCAAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACACTA 650
3-6 For 594 -GAGCCGCAATTCGCAAGTCAATCTTAAGCAAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACACTA 652
3-10 For 589 -GAGCCGCAATTCGCAAGTCAATCTTAAGCAAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACACTA 647
3-13 For 592 -GAGCCGCAATTCGCAAGTCAATCTTAAGCAAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACACTA 650
3-2 Rev 601 -GAGCCGCAATTCGCAAGTCAATCTTAAGCAAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACACTA 659
LINE-1.3(PCR) 590 CTTGACTTCAAACTATACACAGGTCACAGTAAACAAACAGATGGTACTGGTACCA 649
L1 b-thal1(PCR) 590 CTTGACTTCAAACTATACACAGGTCACAGTAAACAAACAGATGGTACTGGTACCA 649
L1 RP(PCR) 590 CTTGACTTCAAACTATACACAGGTCACAGTAAACAAACAGATGGTACTGGTACCA 649
3-1 For 651 CTTGACTTCAAACTATACACAGGTCACAGTAAACAAACAGATGGTACTGGTACCA 710
3-6 For 653 CTTGACTTCAAACTATACACAGGTCACAGTAAACAAACAGATGGTACTGGTACCA 712
3-10 For 648 CTTGACTTCAAACTATACACAGGTCACAGTAAACAAACAGATGGTACTGGTACCA 707
3-13 For 651 CTTGACTTCAAACTATACACAGGTCACAGTAAACAAACAGATGGTACTGGTACCA 710
3-2 Rev 660 CTTGACTTCAAACTATACACAGGTCACAGTAAACAAACAGATGGTACTGGTACCA 719
LINE-1.3(PCR) 650 AACAGAGATATAGATCAATGGAAACAGAACAGGCCCTCAGAAATAATGCCGATATCTAC 709
L1 b-thal1(PCR) 650 AACAGAGATATAGATCAATGGAAACAGAACAGGCCCTCAGAAATAATGCCGATATCTAC 709
L1 RP(PCR) 650 AACAGAGATATAGATCAATGGAAACAGAACAGGCCCTCAGAAATAATGCCGATATCTAC 709
3-1 For 711 AACAGAGATATAGATCAATGGAAACAGAACAGGCCCTCAGAAATAATGCCGATATCTAC 770
3-6 For 713 AACAGAGATATAGATCAATGGAAACAGAACAGGCCCTCAGAAATAATGCCGATATCTAC 772
3-10 For 708 AACAGAGATATAGATCAATGGAAACAGAACAGGCCCTCAGAAATAATGCCGATATCTAC 767
3-13 For 711 AACAGAGATATAGATCAATGGAAACAGAACAGGCCCTCAGAAATAATGCCGATATCTAC 770
3-2 Rev 720 AACAGAGATATAGATCAATGGAAACAGAACAGGCCCTCAGAAATAATGCCGATATCTAC 729
LINE-1.3(PCR) 710 AACTATCTGATCTTTGCAAACTGGAAAAACAAGCAATGGGGAAGGATTCCTTATTT 769
L1 b-thal1(PCR) 710 AACTATCTGATCTTTGCAAACTGGAAAAACAAGCAATGGGGAAGGATTCCTTATTT 769
L1 RP(PCR) 710 AACTATCTGATCTTTGCAAACTGGAAAAACAAGCAATGGGGAAGGATTCCTTATTT 769
3-1 For 771 AACTATCTGATCTTTGCAAACTGGAAAAACAAGCAATGGGGAAGGATTCCTTATTT 830
3-6 For 773 AACTATCTGATCTTTGCAAACTGGAAAAACAAGCAATGGGGAAGGATTCCTTATTT 832
3-10 For 768 AACTATCTGATCTTTGCAAACTGGAAAAACAAGCAATGGGGAAGGATTCCTTATTT 827
3-13 For 771 AACTATCTGATCTTTGCAAACTGGAAAAACAAGCAATGGGGAAGGATTCCTTATTT 830
3-2 Rev 780 AACTATCTGATCTTTGCAAACTGGAAAAACAAGCAATGGGGAAGGATTCCTTATTT 839
LINE-1.3(PCR) 770 AATAAATGGTGTGGGAAACTGGTAGCCATATGTAGAAAGCTGAACCTGGATCCCTTC 829
L1 b-thal1(PCR) 770 AATAAATGGTGTGGGAAACTGGTAGCCATATGTAGAAAGCTGAACCTGGATCCCTTC 829
L1 RP(PCR) 770 AATAAATGGTGTGGGAAACTGGTAGCCATATGTAGAAAGCTGAACCTGGATCCCTTC 829
3-1 For 831 AATAAATGGTGTGGGAAACTGGTAGCCATATGTAGAAAGCTGAACCTGGATCCCTTC 890
3-6 For 833 AATAAATGGTGTGGGAAACTGGTAGCCATATGTAGAAAGCTGAACCTGGATCCCTTC 892
3-10 For 828 AATAAATGGTGTGGGAAACTGGTAGCCATATGTAGAAAGCTGAACCTGGATCCCTTC 887
3-13 For 831 AATAAATGGTGTGGGAAACTGGTAGCCATATGTAGAAAGCTGAACCTGGATCCCTTC 890
3-2 Rev 840 AATAAATGGTGTGGGAAACTGGTAGCCATATGTAGAAAGCTGAACCTGGATCCCTTC 899
LINE-1.3(PCR) 840 ETTTACCTTTATACAAAATCAATTCAGATGGATTAAGATTTAAAGCTTAACCTAAATA 889
L1 b-thal1(PCR) 840 ETTTACCTTTATACAAAATCAATTCAGATGGATTAAGATTTAAAGCTTAACCTAAATA 889

図8-3 Yub637b (Del/Del) におけるLINE-1s mRNAのsequence

		To				
		A	C	G	T	
From	A		17	43	11	
	C	16		20	65	
	G	57	17		18	
	T	16	51	5		n=10
		336 mutations 9087 bp				

		To				
		A	C	G	T	
From	A		27	77	21	
	C	31		26	108	
	G	97	31		25	
	T	32	65	8		n=13
		548 mutations 11752 bp				

図9-1 hMSCs (Ins/Ins) におけるLINE-1s mRNAの mutation解析

		To				
		A	C	G	T	
From	A		16	40	5	
	C	12		9	58	
	G	70	20		13	
	T	15	49	8		n=10
		315 mutations 9,049 bp				

		To				
		A	C	G	T	
From	A		16	51	19	
	C	26		6	66	
	G	49	18		19	
	T	21	32	11		n=10
		334 mutations 8,935 bp				

		To				
		A	C	G	T	
From	A		8	44	12	
	C	21		12	63	
	G	60	22		11	
	T	12	49	4		n=11
		318 mutations 9,958 bp				

図9-2 hMSCs (Ins/Del) におけるLINE-1s mRNAの mutation解析

		To				
		A	C	G	T	
From	A		3	15	4	
	C	5		5	17	
	G	25	9		8	
	T	5	35	3		n=17
		134 mutations 15428				

		To				
		A	C	G	T	
From	A		1	4	1	
	C	3		2	16	
	G	19	2		0	
	T	2	17	1		n=11
		68 mutations 9982				

図9-3 hMSCs (Del/Del) におけるLINE-1s mRNAの mutation解析