

A. 研究目的

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) や胚性幹細胞 (ES 細胞) といった多能性幹細胞は、再生医療を目的とした細胞・組織加工製品の原材料として大きな期待を担っている。人工多能性幹細胞は、様々な系譜の細胞に分化するという幅広い多能性と半永久的な自己増殖能を有するため、大量培養した細胞から目的細胞への分化を促すことにより、今まで入手困難であった様々な細胞を安定的に供給することができる。実際に米国では、Geron 社の脊髄損傷患者を対象としたヒト ES 細胞由来オリゴデンドロサイトの治験 (経済的事由より中止) と、アドバンスト・セル・テクノロジー社の加齢黄斑変性患者とスタルガルト病患者を対象としたヒト ES 細胞由来網膜色素上皮細胞の治験が既に行われている。国内では、理化学研究所と先端医療振興財団の滲出性加齢黄斑変性患者を対象としたヒト自己 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の臨床研究が 2013 年 7 月に承認された。このような近年の再生医療の発展に伴い、再生医療における細胞培養加工についての基準および再生医療製品の承認・許可制度を新設するための薬事法改正も進められている。

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

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

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

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

本研究は、iPS 細胞株の目的細胞への分化を適切に予測することを目標とし、分化プロペンシティを指標とした細胞特性解析法の開発を行う。ヒト iPS 細胞 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。

B. 研究方法

B-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 1 で示した。

B-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-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 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-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、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-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 μ 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。

C. 研究結果

C-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. 1)。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 2 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 3)。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-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（Table 4-7）。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

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（Table 5-7）。

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. 2)。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ることができる。

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)。この報告をうけて、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 3)。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 (Table 3 および 8) 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、文献 18 で示された“質の悪い” (= 外胚葉系に分化しにくい) iPS 細胞株は、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 5-7 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

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。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. 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.
2. 田埜慶子, 草川森士, 佐藤陽治 「細胞・組織加工製品の製造における造腫瘍性評価」 技術情報協会 (印刷中)
3. 中島啓行, 安田智, 佐藤陽治 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 2013 (印刷中)
4. 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)
5. 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)
6. 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)

7. 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.
8. 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.
9. 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.

G-2 学会発表

1. Sato Y. Tumorigenicity of Human Cell-Processed Therapeutic Products. IABS-JST Joint Workshop, kyoto (2014年3月7-8日)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
 5. 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)
 6. 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)
 7. 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^{null} mice for quality assessment of human cell-processed therapeutic products. World Stem Cell Summit 2013, San Diego (2013年12月4-6日)
 8. 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)
 9. 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)
 10. 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)
 11. 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)

12. 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)

13. 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)

14. 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. 取得特許

なし

H-2. 実用新案登録

なし

H-3. その他

なし

Table 1 本研究で用いたヒト iPS 細胞株

iPS 細胞株名	由来細胞	導入遺伝子	導入方法
201B7	皮膚線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス
253G1	皮膚線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4	レトロウイルス
409B2	皮膚線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28, p53shRNA	エピゾーマルベクター
Human mc-iPS (mc-iPS)	脂肪幹細胞	Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28	プラスミド
HiPS-RIKEN-1A (R-1A)	臍帯由来線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス
HiPS-RIKEN-2A (R-2A)	臍帯由来線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス
HiPS-RIKEN-12A (R-12A)	臍帯由来線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4	レトロウイルス
Tic	肺線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス
ATCC-DYR0110 hiPSc (Ai-100)	皮膚線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス
ATCC-DYR0103 hiPSc (Ai-103)	肝線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス

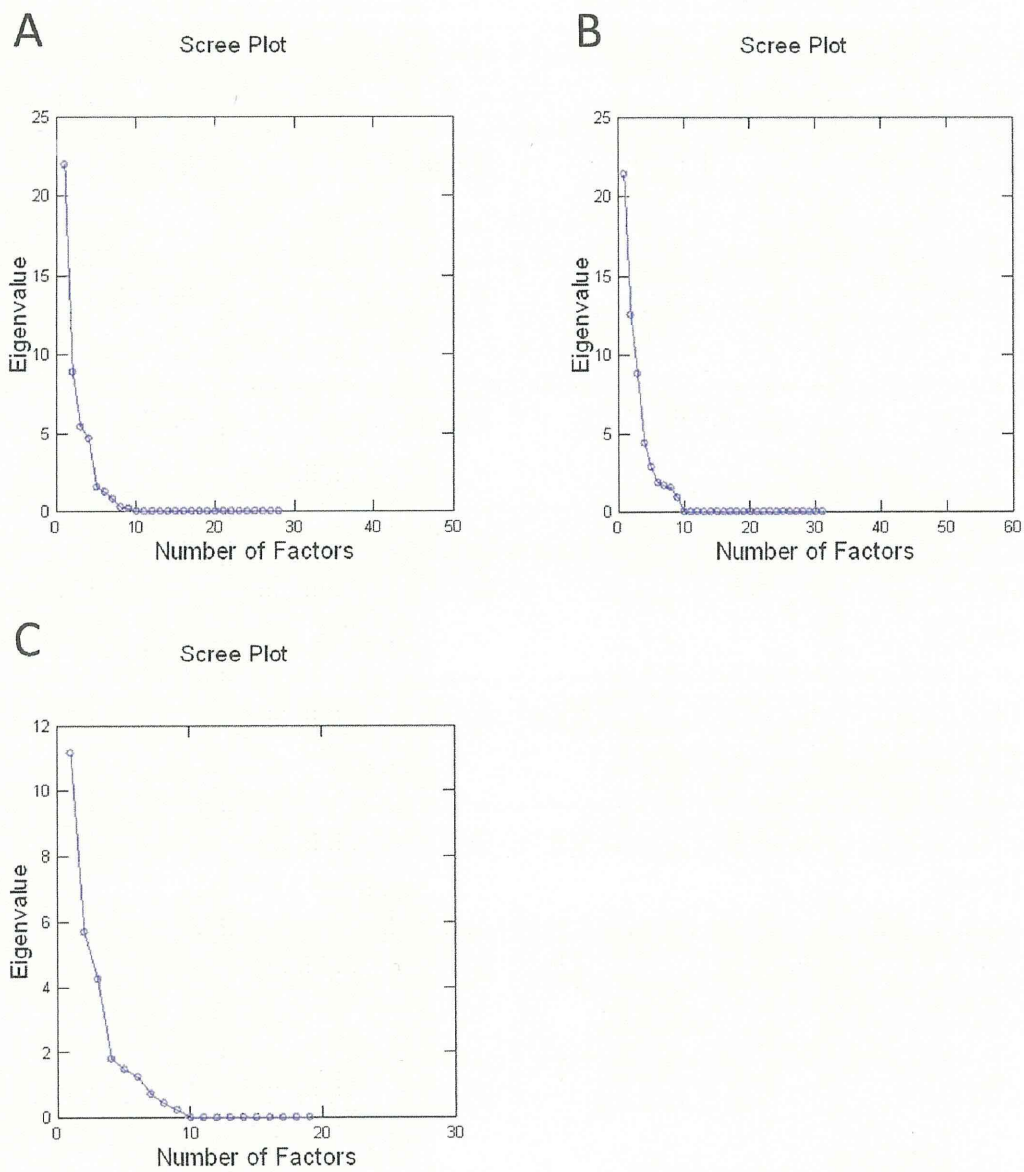


Figure 1 三胚葉系細胞マーカー遺伝子発現量による主成分分析

A) 外胚葉系細胞マーカーでの主成分寄与率, B) 中胚葉系細胞マーカーでの主成分寄与率, C) 内胚葉系細胞マーカーでの主成分寄与率.

Table 2 外胚葉, 中胚葉および内胚葉系細胞における遺伝子発現量の主成分分析から算出された第一主成分係数

外胚葉		中胚葉		内胚葉	
遺伝子名	主成分係数	遺伝子名	主成分係数	遺伝子名	主成分係数
<i>PAX3</i>	0.987	<i>TNFRSF1A</i>	0.969	<i>AFP</i>	0.948
<i>MAP2</i>	0.963	<i>ITGB3</i>	0.950	<i>GATA6</i>	0.931
<i>NES</i>	0.960	<i>ANPEP</i>	0.934	<i>GATA1</i>	0.907
<i>CDH2</i>	0.958	<i>STAT3</i>	0.928	<i>HNF1A</i>	0.904
<i>TUBB3</i>	0.955	<i>KDR</i>	0.926	<i>APOE</i>	0.894
<i>SYP</i>	0.954	<i>PDGFRA</i>	0.903	<i>CD44</i>	0.854
<i>PAX7</i>	0.949	<i>CD44</i>	0.889	<i>GATA4</i>	0.831
<i>PAX6</i>	0.915	<i>ITGB1</i>	0.888	<i>ITGB1</i>	0.795
<i>MAPT</i>	0.912	<i>MME</i>	0.882	<i>THY1</i>	0.794
<i>SOX9</i>	0.899	<i>PECAM1</i>	0.882	<i>ITGA6</i>	0.710
<i>SOX10</i>	0.884	<i>SPI1</i>	0.865	<i>GCG</i>	0.701
<i>NGFR</i>	0.854	<i>CD34</i>	0.855	<i>CDX2</i>	0.672
<i>OTX2</i>	0.854	<i>HAND1</i>	0.850	<i>SOX17</i>	0.598
<i>FOXD3</i>	0.851	<i>ITGAM</i>	0.844	<i>SLC2A2</i>	0.582
<i>NEFL</i>	0.836	<i>THY</i>	0.843	<i>SST</i>	0.535
<i>GBX2</i>	0.818	<i>ITGAL</i>	0.828	<i>SOX7</i>	0.533
<i>CRABP2</i>	0.808	<i>CD36</i>	0.823	<i>PDX1</i>	0.433
<i>MNX1</i>	0.798	<i>GATA4</i>	0.781	<i>NEUROG3</i>	0.398
<i>ITGA4</i>	0.787	<i>ITGA6</i>	0.781	<i>FOXA2</i>	0.394
<i>NCAM1</i>	0.785	<i>CEACAM1</i>	0.753	<i>CTNNB1</i>	0.364
<i>SOX2</i>	0.731	<i>MYOG</i>	0.738	<i>MIXL1</i>	0.201
<i>MCAM1</i>	0.650	<i>INHBA</i>	0.726	<i>HNF1B</i>	0.186
<i>NOTCH1</i>	0.645	<i>ITGAX</i>	0.647	<i>EOMES</i>	0.015
<i>TH</i>	0.516	<i>RUNX1</i>	0.620	<i>ISL1</i>	-0.399
<i>EN1</i>	0.455	<i>TWIST1</i>	0.614	<i>CDH2</i>	-0.438
<i>FAS</i>	0.391	<i>BMP2</i>	0.597	<i>SYP</i>	-0.463
<i>FGF5</i>	0.363	<i>ICAM1</i>	0.597	<i>PAX6</i>	-0.530

<i>NEUROG3</i>	0.361
<i>NOG</i>	0.239
<i>IRF6</i>	0.076
<i>FUT4</i>	-0.186
<i>PDGFRA</i>	-0.263
<i>ICAM1</i>	-0.271
<i>ITGB1</i>	-0.334
<i>FGFR2</i>	-0.378
<i>SNAI2</i>	-0.432
<i>ITGA6</i>	-0.454
<i>THY1</i>	-0.492
<i>GATA2</i>	-0.526
<i>HAND1</i>	-0.543
<i>GATA3</i>	-0.551
<i>ABCG2</i>	-0.597
<i>CD44</i>	-0.599
<i>APOE</i>	-0.672
<i>TDGF1</i>	-0.842

<i>ITGAV</i>	0.556
<i>ABCG2</i>	0.505
<i>SDC</i>	0.503
<i>FUT4</i>	0.457
<i>SRF</i>	0.455
<i>NODAL</i>	0.451
<i>CDH5</i>	0.429
<i>MYOD1</i>	0.419
<i>GATA2</i>	0.356
<i>KIT</i>	0.320
<i>CD4</i>	0.319
<i>GATA3</i>	0.306
<i>MIXL1</i>	0.271
<i>ADIPOQ</i>	0.270
<i>NOTCH1</i>	0.266
<i>T</i>	0.258
<i>ACTC1</i>	0.152
<i>EOMES</i>	0.077
<i>HHEX</i>	0.074
<i>NCAM1</i>	0.023
<i>FGF5</i>	0.008
<i>MCAM1</i>	-0.024
<i>ITGA4</i>	-0.070
<i>FOXC1</i>	-0.071
<i>NGFR</i>	-0.114
<i>LEF1</i>	-0.186
<i>NES</i>	-0.358
<i>CDH2</i>	-0.421
<i>DLL1</i>	-0.598

Table 3 iPS細胞 10株の第一主成分得点ランク

外胚葉		中胚葉		内胚葉	
iPS細胞株	主成分得点	iPS細胞株	主成分得点	iPS細胞	主成分得点
mc-iPS	28.625	R-2A	41.111	R-2A	18.867
R-1A	26.398	409B2	18.473	409B2	9.485
253G1	23.865	R-12A	12.138	Ai-100	5.555
201B7	22.213	201B7	1.540	R-1A	5.412
409B2	-11.643	Ai-100	0.877	Ai-103	2.757
Tic	-14.502	Ai-103	0.182	201B7	-0.253
Ai-100	-17.750	R-1A	-2.455	R-12A	-0.489
Ai-103	-18.153	253G1	-12.634	253G1	-9.377
R-12A	-19.165	Tic	-27.006	Tic	-14.033
R-2A	-19.889	mc-iPS	-32.226	mc-iPS	-17.924

Table 4 第一主成分得点ランクと有意な相関のある probe set 数

外胚葉		
正に相関のあるprobe set数	mRNA 136	miRNA 3
負に相関のあるprobe set数	mRNA 92	miRNA 3
中胚葉		
正に相関のあるprobe set数	mRNA 35	miRNA 12
負に相関のあるprobe set数	mRNA 7	miRNA 1
内胚葉		
正に相関のあるprobe set数	mRNA 9	miRNA 23
負に相関のあるprobe set数	mRNA 29	miRNA 0

Table 5 外胚葉分化に相関のある mRNA および miRNA

正に相関のある mRNA

Gene Symbol	相関係数				
<i>LOC389906</i>	0.9030	<i>TFPI</i>	0.7333	<i>CDK6</i>	0.6848
<i>ADII</i>	0.8545	<i>TRIM2</i>	0.7333	<i>ING5</i>	0.6848
<i>NUP98</i>	0.8424	<i>NAP1L5</i>	0.7333	<i>MRPL43</i>	0.6848
<i>LUC7L3</i>	0.8303	<i>RHOBTB2</i>	0.7212	<i>LOC644246</i>	0.6848
<i>WNT10B</i>	0.8182	<i>FBN1</i>	0.7212	<i>ING3</i>	0.6848
<i>LOC100507265</i>	0.8182	<i>SYCP1</i>	0.7212	<i>DCAF8</i>	0.6848
<i>LOC389906</i>	0.8182	<i>MPPED2</i>	0.7212	<i>PXDNL</i>	0.6848
<i>YAF2</i>	0.8061	<i>NGDN</i>	0.7212	<i>SMC3</i>	0.6727
<i>IDS</i>	0.7939	<i>RABL3</i>	0.7212	<i>TAF13</i>	0.6727
<i>TFPI</i>	0.7818	<i>KIF21A</i>	0.7212	<i>NME5</i>	0.6727
<i>KREMEN2</i>	0.7818	<i>ARHGAP36</i>	0.7212	<i>TM4SF1</i>	0.6727
<i>MBNL3</i>	0.7818	<i>SORBS2</i>	0.7091	<i>NR3C1</i>	0.6727
<i>CDK6</i>	0.7818	<i>APOBEC3B</i>	0.7091	<i>RABGAP1L</i>	0.6727
<i>TM4SF1</i>	0.7697	<i>ALG13</i>	0.7091	<i>STXBP5L</i>	0.6727
<i>MYL5</i>	0.7576	<i>CNFN</i>	0.7091	<i>DCLRE1C</i>	0.6727
<i>PTX3</i>	0.7576	<i>API5</i>	0.7091	<i>PRICKLE1</i>	0.6727
<i>SLC7A8</i>	0.7576	<i>SALL3</i>	0.6970	<i>TMEM43</i>	0.6727
<i>C20orf103</i>	0.7576	<i>METTL6</i>	0.6970	<i>EIF3C</i>	0.6727
<i>PCDH9</i>	0.7576	<i>LOC100510692</i>	0.6970	<i>BCLAF1</i>	0.6606
<i>SORBS2</i>	0.7576	<i>/// NAIP</i>	0.6970	<i>POLQ</i>	0.6606
<i>SFRS3</i>	0.7576	<i>ST8SIA3</i>	0.6970	<i>PTN</i>	0.6606
<i>MGC45800</i>	0.7576	<i>PVRL3</i>	0.6970	<i>TCF12</i>	0.6606
<i>LOC100507226</i>	0.7576	<i>BCLAF1</i>	0.6970	<i>NRP2</i>	0.6606
<i>NR3C1</i>	0.7455	<i>AIFM2</i>	0.6970	<i>CSNK2A1</i>	0.6606
<i>PARD6B</i>	0.7455	<i>BRWD1</i>	0.6970	<i>PRICKLE1</i>	0.6606
<i>GPAM</i>	0.7455	<i>STON2</i>	0.6970	<i>ZNF326</i>	0.6606
<i>GUSBP1 ///</i>	0.7455	<i>LOC100131015</i>	0.6970	<i>SLC25A34</i>	0.6485
<i>GUSBP4</i>		<i>SPAG9</i>	0.6848	<i>CCDC160</i>	0.6485
<i>KCNH5</i>	0.7333	<i>WDFY2</i>	0.6848	<i>C17orf104</i>	0.6485
<i>MBNL1</i>	0.7333	<i>KIAA0101</i>	0.6848	<i>RIOK3</i>	0.6485
<i>CHGA</i>	0.7333	<i>RPS21</i>	0.6848	<i>ZFX /// ZFY</i>	0.6485
<i>SRP19 /// ZRSR1</i>	0.7333	<i>ZFX</i>	0.6848	<i>ITFG2</i>	0.6485
<i>DGKI</i>	0.7333	<i>SYCP1</i>	0.6848	<i>LOC145474</i>	0.6485
		<i>DDI2</i>	0.6848	<i>CHD9</i>	0.6485

負に相関のある mRNA

Gene Symbol	相関係数
<i>UBR5</i>	-0.8667
<i>CPZ /// GPR78</i>	-0.8545
<i>LY75</i>	-0.8303
<i>C6orf54</i>	-0.8303
<i>C3</i>	-0.8303
<i>DPEP3</i>	-0.8303
<i>LOC100288092</i>	-0.8303
<i>SLC6A15</i>	-0.8182
<i>CBLC</i>	-0.8061
<i>SCGB3A2</i>	-0.8061
<i>CTCFL</i>	-0.7939
<i>STOM</i>	-0.7939
<i>SOX15</i>	-0.7939
<i>CHP2</i>	-0.7939
<i>CYorf15B</i>	-0.7939
<i>FLJ35024</i>	-0.7818
<i>KLK8</i>	-0.7818
<i>TNNC1</i>	-0.7818
<i>C6orf54</i>	-0.7818
<i>ZNF204P</i>	-0.7818
<i>C9orf64</i>	-0.7818
<i>LOC728730</i>	-0.7818
<i>STOM</i>	-0.7697
<i>COCH</i>	-0.7697
<i>COMT</i>	-0.7697
<i>SRY</i>	-0.7576
<i>DPPA5</i>	-0.7576
<i>LOC728730</i>	-0.7576

<i>CASZ1</i>	-0.7576
<i>ZNF385B</i>	-0.7455
<i>LHX8</i>	-0.7455
<i>ITPKB</i>	-0.7455
<i>DDX3Y</i>	-0.7455
<i>TMSB4Y</i>	-0.7455
<i>EFCAB4A</i>	-0.7455
<i>LOC100271722</i>	-0.7455
<i>CLC</i>	-0.7333
<i>ART3</i>	-0.7333
<i>CAT</i>	-0.7333
<i>TRIM22</i>	-0.7333
<i>SOHLH2</i>	-0.7333
<i>LOC440173</i>	-0.7333
<i>SCNN1G</i>	-0.7333
<i>GALNT3</i>	-0.7212
<i>DDX3Y</i>	-0.7212
<i>PCDHB11</i>	-0.7212
<i>ECHDC3</i>	-0.7212
<i>CYP11B1</i>	-0.7091
<i>CORO2A</i>	-0.7091
<i>LOC100507619</i>	-0.7091
<i>NTN4</i>	-0.7091
<i>COCH</i>	-0.6970
<i>FKBP11</i>	-0.6970
<i>DKFZP434L187</i>	-0.6970
<i>LOC100505608</i>	-0.6970
<i>ZNF385B</i>	-0.6848
<i>PTCH1</i>	-0.6848

<i>HGC6.3</i>	-0.6848
<i>PION</i>	-0.6848
<i>ZNF385B</i>	-0.6848
<i>SYNPR</i>	-0.6848
<i>CAT</i>	-0.6727
<i>KDM5D</i>	-0.6727
<i>INVS</i>	-0.6727
<i>BBS9</i>	-0.6727
<i>TCL1A</i>	-0.6727
<i>EFCAB2</i>	-0.6606
<i>NR3C2</i>	-0.6606
<i>ADCY8</i>	-0.6606
<i>C7orf46</i>	-0.6606
<i>DLG2</i>	-0.6606
<i>C13orf38</i>	-0.6606
<i>RBMS3</i>	-0.6606
<i>CHRM3</i>	-0.6606
<i>ACSM3</i>	-0.6485
<i>TEK</i>	-0.6485
<i>LRRC34</i>	-0.6485
<i>KCNQ5</i>	-0.6485

正に相関のある miRNA

Gene Symbol	相関係数
hsa-miR-20b-star_st	0.7091
hp_hsa-mir-20b_x_st	0.6848
hvt-miR-H14-star_st	0.6606

負に相関のある miRNA

Gene Symbol	相関係数
hsa-miR-371-3p_st	-0.8303
hsa-miR-373_st	-0.8182
hsa-miR-371-5p_st	-0.6848