

201335013A

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
(再生医療関係研究分野)

ES 細胞等を用いた臨床研究に対する安全基盤の確立

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 梅澤 明弘

平成26(2014)年3月

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)

ES 細胞等を用いた臨床研究に対する安全基盤の確立

平成 2 5 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 梅澤 明弘

平成 2 6 (2 0 1 4) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

- ES 細胞等を用いた臨床研究に対する安全基盤の確立 3
梅澤 明弘

II. 分担研究報告書

1. 長期細胞保存施設の管理項目の設定と臨床情報の収集 9
松原 洋一
2. エピゲノム変化に着目した細胞長期保存後における
細胞特性の解析に関する研究 11
豊田 雅士
3. エピゲノム変化に着目した細胞長期保存後における
細胞特性の解析に関する研究 13
西野 光一郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 15

VI. 研究成果の刊行物・別刷 19

I. 総括研究報告書

ES細胞等を用いた臨床研究に対する安全基盤の確立 (H25－実用化（再生）－指定－013)

研究代表者：梅澤 明弘

独立行政法人国立成育医療研究センター 再生医療センター長

研究要旨：本研究の目的は、移植に用いたヒトES細胞を保管・保存用タンクに保管し、移植から時間が経過した後に、移植に用いたヒトES細胞を遡って検証が可能となる体制を構築することである。1. 移植に用いたヒトES細胞の長期的保管体制、2. 他の医療機関等と連携し、ヒトES細胞をはじめとする各種細胞を受入する体制、3. 移植から時間が経過した後に移植に用いたヒトES細胞を検証する体制の3本柱を構築する。本研究では高アンモニア血症を生じる小児先天性代謝異常症に対する細胞治療に用いるヒトES細胞およびES由来肝細胞について、保管・保存に関する検討を行う。エンドポイントにおける有効性を鑑みた上で、原材料及び製造関連物質の保管・保存、加工した細胞の保管・保存、最終製品の保管・保存を行う。

研究分担者

松原洋一（(独)国立成育医療研究センター
研究所長）

豊田雅士（(地独)東京都健康長寿医療センター
研究副部長）

西野光一郎（宮崎大学・准教授）

ヒトES細胞の分化能検定システムの開発ならびに分化形質発現システムを通じた情報収集を行い、有効性を損なわないヒトES細胞の保管・保存技術を確立する。ヒトES細胞の分化能検定システムについては、細胞培養系での分化誘導法の決定と免疫不全動物への移植による生着、機能発揮、組織構築能に関する検討を開始する。

A. 研究目的

本研究の目的は、移植に用いたヒトES細胞を保管・保存用タンクに保管し、移植から時間が経過した後に、移植に用いたヒトES細胞を遡って検証が可能となる体制を構築することである。1. 移植に用いたヒトES細胞の長期的保管体制、2. 他の医療機関等と連携し、ヒトES細胞をはじめとする各種細胞を受入する体制、3. 移植から時間が経過した後に移植に用いたヒトES細胞を検証する体制の3本柱を構築する。本研究では高アンモニア血症を生じる小児先天性代謝異常症に対する細胞治療に用いるヒトES細胞およびES由来肝細胞について、保管・保存に関する検討を行う。エンドポイントにおける有効性を鑑みた上で、原材料及び製造関連物質の保管・保存、加工した細胞の保管・保存、最終製品の保管・保存を行う。

B. 研究方法

細胞・組織加工医薬品等の有効性を損なわない保管・保存技術の確立

（倫理面への配慮）

1. ES細胞に関する倫理

国立成育医療研究センターでは「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づきヒトES細胞に関する医学研究が適正に行われるよう、ヒトES細胞研究倫理審査委員会が組織されている。ヒトES細胞研究に関する各種規程（「ヒトES細胞研究倫理審査委員会規程」、「ヒトES細胞樹立に関する規程」、「ヒトES細胞分配に関する規程」、「ヒトES細胞使用に関する規程」）も整備され、機関全体として生命倫理及び医の倫理に基づき適切に行う（国立成育医療センターヒトES細胞研究倫理審査委員会：<http://www.ncchd.go.jp/essaibou/es.htm>）。申請者らは、当該センターが定期的（年2回以上）に開催している生命倫理に関する講演を受講し、適切な生命倫理観を身につけ常に配慮し研究を実施する。

国立成育医療センター研究所（機関内番号
ES倫2）

文部科学大臣確認番号:18諸文科振第832号

2. ヒト細胞を用いることに対する倫理的配慮

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されている。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療研究センターにおいては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療研究センター受付番号49、平成15年10月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認、受付番号197、平成18年6月承認、受付番号201、237、238、平成19年6月承認）。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないよう、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う予定である。

3. 実験動物を用いることに対する倫理的配慮

実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号2003-002,2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

今回実施した特性解析項目は、形態/増殖観察、奇形腫形成試験、核型分析、CGH解析、メチル化アレイ（Agilentメチル化解析チップ・Bisulfite sequence）、糖鎖アレイ（レクチン解析チップ）、未分化マーカータンパク発現解析（組織学的）、未分化マーカー遺伝子発現解析（mRNA）、胚様体形成試験（in vitro）、hTERT遺伝子発現解析、遺伝子発現チップ解析、エキソーム解析、DNA fingerprinting（STR）を設定し、凍結前、凍結後の比較検討を実施した。細胞純度試験として、無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ試験、ウイルス試験を実施し、凍結前ES細胞と凍結後ES細胞の違いを測定した。顕微鏡による形態観察及びギムザ染色等により定量を行った。

D. 考察

今回実施した特性解析項目は、細胞医療の実用化がなされた際に、有害事象発生があった場合のトレース時に示されるべき基本情報となる。本研究を実施することで、検体の保存技術の確保、特性解析を通じたトレーサビリティ体制のモデルケースを示すことになる。

E. 結論

再生医療における細胞の供給源として、胚性幹細胞（ES細胞）、体性幹細胞、人工多能性幹細胞（iPS細胞）があげられる。これらの原料細胞は、従来まで同じ指針のもとで運用されてきたが、細胞性状が多岐に渡るため、個別の指針として運用することが現実的であるという提言がなされ、現在、我が国の研究開発がその方向で進みつつある。本研究はそれらの指針を踏まえ、ES細胞の保管・保存に特化して研究を推進する。ES細胞はその増殖能、多分化能より、将来的に期待されており、最適のドナー細胞の選択肢となりつつある。また、iPS細胞の臨床応用を先導することができる再生医療技術となりうる。ヒトES細胞をはじめとする未分化性の非常に高いヒト細胞は、再生医療での重要な細胞ソースとなるばかりでなくその培養システムでは発生分化研究等のヒト発生メカニズム探求や創薬開発研究の基盤となる。

F. 健康機器情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K, Kume S. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci*. 126(Pt 23):5391-5399, 2013.
2. Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Poon SS, Arai T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Nakamura K, Takubo K. Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence in situ hybridization. *Tissue Cell*. 45(6):407-413, 2013.
3. Kami D, Watakabe K, Yamazaki-Inoue M, Minami K, Kitani T, Itakura Y, Toyoda M, Sakurai T, Umezawa A, Gojo S. Large-scale cell production of stem cells for clinical

- application using the automated cell processing machine. *BMC Biotechnol.* 13(1):102, 2013.
4. Yugawa T, Nishino K, Ohno S, Nakahara T, Fujita M, Goshima N, **Umezawa A**, Kiyono T. Noncanonical NOTCH signaling limits self-renewal of human epithelial and induced pluripotent stem cells through ROCK activation. *Mol Cell Biol.* 33(22):4434-4447, 2013.
 5. Nakamura H, Liao H, Minami K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, **Umezawa A**, Imadome K, Inoue N, Fujiwara S. Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Herpesviridae.* 4(1):2, 2013.
 6. Ishimine H, Yamakawa N, Sasao M, Tadokoro M, Kami D, Komazaki S, Tokuhara M, Takada H, Ito Y, Kuno S, Yoshimura K, **Umezawa A**, Ohgushi H, Asashima M, Kurisaki A. N-Cadherin is a prospective cell surface marker of human mesenchymal stem cells that have high ability for cardiomyocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 438(4):753-759, 2013.
 7. Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, **Umezawa A**, Nagata K, Matsunaga T. Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Functional Enterocyte-Like Cells Using a Simple Method. *Drug Metab Pharmacokinet.* 29(1):44-51, 2014.
 8. Okumura N, Akutsu H, Sugawara T, Miura T, Takezawa Y, Hosoda A, Yoshida K, Ichida JK, Yamada M, Hamatani T, Kuji N, Miyado K, Yoshimura Y, **Umezawa A**. β -catenin functions pleiotropically in differentiation and tumorigenesis in mouse embryo-derived stem cells. *PLoS One.* 8(5):e63265, 2013.
 9. Higuchi A, Ling QD, Chang Y, Hsu ST, **Umezawa A**. Physical cues of biomaterials guide stem cell differentiation fate. *Chem Rev.* 113(5):3297-3328, 2013.
 10. Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, **Umezawa A**, Arima T. Stability of genomic imprinting in human induced pluripotent stem cells. *BMC Genet.* 14:32, 2013.
 11. Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi M, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, Toyoda M, Akutsu H, **Umezawa A**, Asashima M, Hirabayashi J. Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. *Stem Cells Transl Med.* 2(4):265-273, 2013.
 12. Shiozaki Y, Kitajima T, Mazaki T, Yoshida A, Tanaka M, **Umezawa A**, Nakamura M, Yoshida Y, Ito Y, Ozaki T, Matsukawa A. Enhanced in vivo osteogenesis by nanocarrier-fused bone morphogenetic protein-4. *Int J Nanomedicine.* 8:1349-1360, 2013.
 13. Sekine W, Haraguchi Y, Shimizu T, Yamato M, **Umezawa A**, Okano T. Chondrocyte Differentiation of Human Endometrial Gland-Derived MSCs in Layered Cell Sheets. *ScientificWorldJournal.* 2013:359109, 2013.
2. 学会発表
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 取得特許
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告書

長期細胞保存施設の管理項目の設定と臨床情報の収集

研究分担者：松原洋一

独立行政法人国立成育医療研究センター 研究所長

研究要旨：長期細胞保存施設の管理項目の設定と臨床情報を収集する。特に、高アンモニア血症を生じる小児先天性代謝異常症に対する細胞治療に用いるヒト ES 細胞および ES 由来肝細胞について、保管・保存に関する検討を行う。エンドポイントにおける有効性を鑑みた上で、原材料及び製造関連物質の保管・保存、加工した細胞の保管・保存、最終製品の保管・保存を行う。移植に用いたヒト ES 細胞を遡って検証が可能となる体制を構築する。

A. 研究目的

本研究の目的は、移植に用いたヒト ES 細胞を保管・保存用タンクに保管し、移植から時間が経過した後に、移植に用いたヒト ES 細胞を遡って検証が可能となる体制を構築することである。1. 移植に用いたヒト ES 細胞の長期的保管体制、2. 他の医療機関等と連携し、ヒト ES 細胞をはじめとする各種細胞を受入する体制、3. 移植から時間が経過した後に移植に用いたヒト ES 細胞を検証する体制の 3 本柱を構築する。本研究では高アンモニア血症を生じる小児先天性代謝異常症に対する細胞治療に用いるヒト ES 細胞および ES 由来肝細胞について、保管・保存に関する検討を行う。エンドポイントにおける有効性を鑑みた上で、原材料及び製造関連物質の保管・保存、加工した細胞の保管・保存、最終製品の保管・保存を行う。

B. 研究方法

細胞・組織加工医薬品等の有効性を損なわない保管・保存技術の確立

ヒト ES 細胞の分化能検定システムの開発ならびに分化形質発現システムを通じた情報収集を行い、有効性を損なわないヒト ES 細胞の保管・保存技術を確立する。ヒト ES 細胞の分化能検定システムについては、細胞培養系での分化誘導法の決定と免疫不全動物への移植による生着、機能発揮、組織構築能に関する検討を開始する。

（倫理面への配慮）

1. ヒト ES 細胞に関する倫理

国立成育医療研究センターでは「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づきヒト

ES 細胞に関する医学研究が適正に行われるよう、ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会が組織されている。ヒト ES 細胞研究に関する各種規程（「ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会規程」、「ヒト ES 細胞樹立に関する規程」、「ヒト ES 細胞分配に関する規程」、「ヒト ES 細胞使用に関する規程」）も整備され、機関全体として生命倫理及び医の倫理に基づき適切に行う（国立成育医療センターヒト ES 細胞研究倫理審査委員会：<http://www.ncchd.go.jp/essaibou/es.htm>）。申請者らは、当該センターが定期的（年 2 回以上）に開催している生命倫理に関する講演を受講し、適切な生命倫理観を身につけ常に配慮し研究を実施する。

国立成育医療センター研究所（機関内番号 ES 倫 2）

文部科学大臣確認番号:18 諸文科振第 832 号

2. 実験動物を用いることに対する倫理的配慮

実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号 2003-002, 2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

今回実施した特性解析項目は、形態/増殖観察、奇形腫形成試験、核型分析、CGH 解析、メチル化アレイ (Agilent メチル化解析チップ・Bisulfite sequence)、糖鎖アレイ (レクチン解析チ

ップ)、未分化マーカータンパク発現解析(組織学的)、未分化マーカー遺伝子発現解析(mRNA)、胚様体形成試験(in vitro)、hTERT 遺伝子発現解析、遺伝子発現チップ解析、エキソーム解析、DNA fingerprinting(STR)を設定し、凍結前、凍結後の比較検討を実施した。細胞純度試験として、無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ試験、ウイルス試験を実施し、凍結前 ES 細胞と凍結後 ES 細胞の違いを測定した。顕微鏡による形態観察及びギムザ染色等により定量を行った。

D. 考察

今回実施した特性解析項目は、細胞医療の実用化がなされた際に、有害事象発生があった場合のトレース時に示されるべき基本情報となる。本研究を実施することで、検体の保存技術の確保、特性解析を通じたトレーサビリティ体制のモデルケースを示すことになる。

E. 結論

再生医療における細胞の供給源として、胚性幹細胞 (ES 細胞)、体性幹細胞、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) があげられる。これらの原料細胞は、従来まで同じ指針のもとで運用されてきたが、細胞性状が多岐に渡るため、個別の指針として運用することが現実的であるという提言がなされ、現在、我が国の研究開発がその方向で進みつつある。本研究はそれらの指針を踏まえ、ES 細胞の保管・保存に特化して研究を推進する。ES 細胞はその増殖能、多分化能より、将来的に期待されており、最適のドナー細胞の選択肢となりつつある。また、iPS 細胞の臨床応用を先導することができる再生医療技術となりうる。ヒト ES 細胞をはじめとする未分化性の非常に高いヒト細胞は、再生医療での重要な細胞ソースとなるばかりでなくその培養システムでは発生分化研究等のヒト発生メカニズム探求や創薬開発研究の基盤となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

エピゲノム変化に着目した細胞長期保存後における細胞特性の解析に関する研究

研究分担者 豊田 雅士

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所 研究副部長

研究要旨

ヒト ES 細胞をはじめとする幹細胞を用いた再生医療においては、移植時の細胞の安全性はもちろんのこと、移植後の細胞の動態を中長期的な視点で観察しておく必要がある。そのため移植に用いた幹細胞を保管し、移植後の時間経過に関わらず、移植時の幹細胞を検証することが可能となる体制の構築が必要である。本研究ではヒト ES 細胞の臨床研究を推進するため、細胞特性評価の一つとして細胞表層糖鎖解析によるプロファイリングを行う。具体的には再生医療製品の原材料および最終製品における長期保存による品質評価を行い、移植後の安全性や治療効果の判定に有用となる検証システムに必要となる幹細胞の保管体制の構築に還元していくことを目的とする。本年度は、ヒト ES 細胞の糖鎖プロファイリングの集積、ならびに凍結・融解が細胞に与える影響を同手法で検出可能かどうかについて検証した。

A. 研究目的

移植に用いたヒト ES 細胞を保管し、移植後の時間経過に関わらず移植時の幹細胞の検証が可能となる体制を構築することは、移植後の安全性や治療効果の判定に有用となる。そこで本研究では、幹細胞における特性評価として様々な検証がある中で、細胞表層糖鎖による糖鎖プロファイリング解析を行い、その情報に基づいた適切な幹細胞の長期保管体制構築へ還元していくことにある。

B. 研究方法

1) ヒト ES 細胞糖鎖プロファイリング

国立成育医療研究センターにおいてこれまでに樹立されたヒト ES 細胞からタンパク質を抽出してレクチンマイクロアレイ技術による糖鎖解析を行う。さらに得られたデータをバイオインフォマティクスによる解析を行う。

2) 凍結融解による影響と糖鎖

長期保凍結存において細胞がどの程度影響があるかについての十分な検証はない。そこで凍結融解における細胞特性への影響が、糖鎖によってどこまで検証可能かを、顕著な変化をもたらす初代培養で検討した。

（倫理面への配慮）

1) ヒト細胞を用いることに対する倫理的配慮

本研究では、ヒト検体由来組織細胞を使用するが、すでに機関の外部委員を含めた倫理審査委員会へ申請し承認されている。またバイオハザード取り扱いについては研究機関への実験計画の申請ならびに年度毎に実施報告を、研究

機関が設置しているバイオハザード委員会に行い、研究が適切に実施されているかを管理できる体制にある。

2) 実験動物を用いることに対する倫理的配慮

実験動物を用いる研究については、東京都健康長寿医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

1) ヒト ES 細胞糖鎖プロファイリング

国立成育医療研究センターで樹立・培養されているヒト ES 細胞株について糖鎖解析を行った。ここでは、一般的な培養条件で培養されている細胞について、継代毎にデータの集積を行った。さらに臨床応用に向けて開発している動物由来成分を排除した条件で継代培養した細胞についてもあわせて解析を行った。集積したデータを元に糖鎖プロファイリングを行い、形態、未分化マーカーの発現、ゲノム解析等のデータと合わせた細胞カタログ化を進めた。

2) 凍結融解による影響と糖鎖

凍結融解への影響が知られている初代繊維芽細胞において、凍結操作のない細胞と繰り返し凍結融解を行ったあとの細胞とで糖鎖プロファイリング解析を行った。増殖や細胞老化が表現型として表れる前段階において糖鎖プロ

ファイルは既に変化を起こしていることが明らかとなった。

D. 考察

臨床研究に向けたヒト ES 細胞製剤の研究開発が進んできている。ヒトへの移植においては一般的な培養条件で使用されている試薬等に制限があり、使用可能な代替品での培養が必要となる。こうした培養工程変更に伴う細胞特性への影響について、糖鎖プロファイルの面からデータを集積した。その結果、他の検証項目とあわせて臨床で使用可能な条件をほぼ確立するに至った。

E. 結論

凍結による細胞特性に与える影響について、細胞表層糖鎖解析によるプロファイリングが有効であることがわかった。今後臨床用ヒト ES 細胞でのデータの集積を行い、適切な保存管理体制の構築への還元していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

(原著論文)

Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi M, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Asashima M, Hirabayashi J. Podocalyxin is the predominant glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. *Stem Cells Trans. Med.*, 2(4):265-273, 2013.

Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, Arima T. Stability of genomic imprinting in human induced pluripotent stem cells. *BMC Genet.*, 14(1):32, 2013.

Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Poon SS, Arai T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Nakamura KI, Takubo K. Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence in situ hybridization. *Tissue Cell*, 45(6):407-413, 2013.

Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K, Kume S. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *J Cell Science*, 126(Pt 23):5391-5399, 2013.

(総説)

Sasaki N and Toyoda M. Glycoconjugates and related molecules in human vascular endothelial cells, *Int. J. Vasc. Med.* 2013:Article ID 963596, 2013.

豊田雅士、梅澤明弘. 再生医療に活かせる stem cell (SC) 研究の進歩. 腎と透析. 75(6):801-806, 2013.

2. 学会発表

板倉陽子、久野敦、平林淳、梅澤明弘、豊田雅士: ヒト胚性幹及び胎児性がん細胞におけるポドカリキシン上の比較糖鎖プロファイリング解析. 第 32 回日本糖質学会年会, 大阪, 2013.8.5-7

板倉陽子、久野敦、平林淳、梅澤明弘、豊田雅士: ポドカリキシンを用いた多能性幹細胞の腫瘍化識別を目指す比較糖鎖プロファイル解析. 第 86 回日本生化学会大会, 横浜, 2013.9.11-13

豊田雅士、梅澤明弘: 組織幹細胞治療における細胞の品質評価と安全性・有効性. 第 13 回日本再生医療学会総会, 京都, 2014.3.3-5

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

エピゲノム変化に着目した細胞長期保存後における細胞特性の解析に関する研究
研究分担者 西野 光一郎 宮崎大学准教授

研究要旨

網羅的エピゲノム解析を基盤としたヒト多能性幹細胞の移動および保管のバリデーション技術の確立をめざし、初年度として ES 細胞、iPS 細胞の網羅的 DNA メチル化情報の取得と解析を行った。

A. 研究目的

ヒト ES 細胞等を用いた臨床研究に対する安全基盤の確立の分担研究として、ヒト多能性幹細胞の移動および保管のバリデーション技術の確立を進める。特に本研究では初年度として DNA メチル化解析を基盤とした ES 細胞、iPS 細胞の網羅的 DNA メチル化情報の取得と解析を行い、バリデーション技術としての検証を行う。

B. 研究方法

イルミナ社の Humanmethylation450K bead chip による網羅的 DNA メチル化解析手法を用いた解析を基盤として、ヒト ES 細胞および iPS 細胞の DNA メチル化情報を取得する。本解析方法は、ゲノム上 45 万カ所のシングルベースリゾリューションを可能とし、さらに高い定量性を有する。解析する多能性幹細胞は、ES 細胞及び iPS 細胞を用い、継代数、移動方法、保存方法、保存期間の異なるサンプルについて解析を行い、バリデーションを行う。初年度である H25 年度は、DNA メチル化情報の取得方法およびバリデーションの比較検討等の検証を行った。

（倫理面への配慮）

研究総括と綿密に連絡、連携し「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。実験動物を用いる研究については、宮崎大学動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。

C. 研究結果

ヒト ES 細胞 4 株、iPS 細胞 22 株の網羅的 DNA メチル化情報を取得することができた。これらのビックデータをバイオインフォマティクスにより比較解析し、多能性幹細胞特異的 DNA メチル化可変領域の同定に成功した。

D. 考察

網羅的 DNA メチル化情報の比較横断的解析が可能であり、多能性幹細胞特異的 DNA メチル化可変領域が ES 細胞のバリデーションを可能にするエピジェネティックマーカーとして利用可能であることが示唆された。今後は継代数、移動方法、保存方法、保存期間の異なるサンプルを用いてバリデーションにより適した多能性幹細胞特異的 DNA メチル化可変領域の同定と遺伝子発現との相関を検証する必要がある。

E. 結論

網羅的 DNA メチル化情報が ES 細胞のバリデーションに有効であることが示された。今後、実用化に向けたより効率的なバリデーション方法の確立を目指し、実用に則したサンプルの解析および解析方法の効率化を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kaneko S, Bonasio R, Saldaña-Meyer R, Yoshida T, Son J, Nishino K, Umezawa A, Reinberg D. “Interactions between JARID2 and Noncoding RNAs Regulate PRC2 Recruitment to Chromatin”. *Mol Cell*. 53(2):290-300. 2014.

2. 学会発表

西野光一郎・豊田雅士・山崎-井上麻由・阿久津英憲・梅澤明弘「ヒト iPS 細胞の異常メチル化領域の解析」第 7 回 日本エピジェネティクス研究会年会（2013/5/30-31、奈良市）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kaneko S, Bonasio R, Saldaña-Meyer R, Yoshida T, Son J, <u>Nishino K</u> , <u>Umezawa A</u> , Reinberg D.	Interactions between JARID2 and noncoding RNAs regulate PRC2 recruitment to chromatin.	Mol Cell	53(2)	290-300	2014
Yamazoe T, Shiraki N, <u>Toyoda M</u> , Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, <u>Umezawa A</u> , Sasaki Y, Kume K, Kume S.	A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells.	J Cell Sci	126(Pt 23)	5391-5399	2013
Teraï M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Poon SS, Arai T, <u>Toyoda M</u> , Akutsu H, <u>Umezawa A</u> , Nakamura K, Takubo K.	Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence in situ hybridization.	Tissue Cell	45(6)	407-413	2013
Kami D, Watakabe K, Yamazaki-Inoue M, Minami K, Kitani T, Itakura Y, <u>Toyoda M</u> , Sakurai T, <u>Umezawa A</u> , Gojo S.	Large-scale cell production of stem cells for clinical application using the automated cell processing machine.	BMC Biotechnol.	13	102	2013
Yugawa T, <u>Nishino K</u> , Ohno S, Nakahara T, Fujita M, Goshima N, <u>Umezawa A</u> , Kiyono T.	Noncanonical NOTCH signaling limits self-renewal of human epithelial and induced pluripotent stem cells through ROCK activation.	Mol Cell Biol	33(22)	4434-4447	2013
Nakamura H, Liao H, Minami K, <u>Toyoda M</u> , Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, <u>Umezawa A</u> , Imadome K, Inoue N, Fujiwara S.	Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress.	Herpesviridae	4(1)	2	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishimine H, Yamakawa N, Sasao M, Tadokoro M, Kami D, Komazaki S, Tokuhara M, Takada H, Ito Y, Kuno S, Yoshimura K, <u>Umezawa A</u> , Ohgushi H, Asashima M, Kurisaki A.	N-Cadherin is a prospective cell surface marker of human mesenchymal stem cells that have high ability for cardiomyocyte differentiation.	Biochem Biophys Res Commun	438(4)	753-759	2013
Iwao T, <u>Toyota M</u> , Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, <u>Umezawa A</u> , Nagata K, Matsunaga T.	Differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional enterocyte-like cells using a simple method.	Drug Metab Pharmacokinet	29(1)	44-51	2014
Higuchi A, Ling QD, Chang Y, Hsu ST, <u>Umezawa A</u> .	Physical cues of biomaterials guide stem cell differentiation fate.	Chem Rev	113(5)	3297-3328	2013
Hiura H, <u>Toyoda M</u> , Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, <u>Umezawa A</u> , Arima T.	Stability of genomic imprinting in human induced pluripotent stem cells.	BMC Genet	14	32	2013
Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi M, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, <u>Toyoda M</u> , Akutsu H, <u>Umezawa A</u> , Asashima M, Hirabayashi J.	Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN.	Stem Cells Transl Med	2(4)	265-273	2013
Shiozaki Y, Kitajima T, Mazaki T, Yoshida A, Tanaka M, <u>Umezawa A</u> , Nakamura M, Yoshida Y, Ito Y, Ozaki T, Matsukawa A.	Enhanced in vivo osteogenesis by nanocarrier-fused bone morphogenetic protein-4.	Int J Nanomedicine	8	1349-1360	2013
Sasaki N, <u>Toyoda M</u> .	Glycoconjugates and related molecules in human vascular endothelial cells,	Int J Vasc Med	2013	963596	2013
<u>豊田雅士</u> 、 <u>梅澤明弘</u> .	再生医療に活かせるstem cell (SC) 研究の進歩.	腎と透析	75(6)	801-806	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Interactions between JARID2 and Noncoding RNAs Regulate PRC2 Recruitment to Chromatin

Syuzo Kaneko,^{1,5} Roberto Bonasio,^{1,4,5} Ricardo Saldaña-Meyer,¹ Takahaki Yoshida,² Jinsook Son,¹ Koichiro Nishino,³ Akihiro Umezawa,² and Danny Reinberg^{1,*}

¹Howard Hughes Medical Institute and NYU School of Medicine, Department of Molecular Pharmacology and Biochemistry, New York, NY 10016, USA

²National Research Institute for Child Health and Development, Department of Reproductive Biology, Tokyo 157-8535, Japan

³University of Miyazaki, Faculty of Agriculture, Laboratory of Veterinary Biochemistry and Molecular Biology, Miyazaki 889-2192, Japan

⁴Present address: Department of Cell and Developmental Biology, University of Pennsylvania Perelman School of Medicine, Philadelphia, PA 19104, USA

⁵These authors contributed equally to this work

*Correspondence: Danny.Reinberg@nyumc.org

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.012>

SUMMARY

JARID2 is an accessory component of *Polycomb* repressive complex-2 (PRC2) required for the differentiation of embryonic stem cells (ESCs). A role for JARID2 in the recruitment of PRC2 to target genes silenced during differentiation has been put forward, but the molecular details remain unclear. We identified a 30-amino-acid region of JARID2 that mediates interactions with long noncoding RNAs (lncRNAs) and found that the presence of lncRNAs stimulated JARID2-EZH2 interactions in vitro and JARID2-mediated recruitment of PRC2 to chromatin in vivo. Native and crosslinked RNA immunoprecipitations of JARID2 revealed that Meg3 and other lncRNAs from the imprinted *Dlk1-Dio3* locus, an important regulator of development, interacted with PRC2 via JARID2. Lack of *MEG3* expression in human induced pluripotent cells altered the chromatin distribution of JARID2, PRC2, and H3K27me3. Our findings show that lncRNAs facilitate JARID2-PRC2 interactions on chromatin and suggest a mechanism by which lncRNAs contribute to PRC2 recruitment.

INTRODUCTION

Polycomb group (PcG) genes are key epigenetic regulators in multicellular organisms, as they maintain transcriptional repression of lineage-specific genes throughout development, thus contributing to the stability of cell identity (Schwartz and Pirrotta, 2007). All mammalian PcG protein complexes identified so far perform their epigenetic function by acting on chromatin (Lanzuolo and Orlando, 2012); in particular, the *Polycomb* repressive complex 2 (PRC2) is responsible for di- and trimethylation of lysine 27 in histone H3 (H3K27me2/3) (Margueron and Reinberg, 2011), a hallmark of facultative heterochromatin (Trojer and Reinberg, 2007).

One of the outstanding questions regarding mammalian PRC2 function is that of specificity of action: how are certain genes selected for repression while others are unaffected? How can the same molecular machinery silence different genes in different cell lineages? Because none of the core components of PRC2 (EZH2, EED, SUZ12, RBBP4/7) possess a DNA binding domain (Margueron and Reinberg, 2011), it is believed that chromatin targeting must be specified elsewhere, by interactions with DNA-binding factors (Boulay et al., 2012; Kim et al., 2009), preexisting histone methylation (Margueron et al., 2009), chromatin-associated long noncoding RNAs (lncRNAs) (Rinn et al., 2007; Tsai et al., 2010), or a combination thereof (Margueron and Reinberg, 2011).

One essential factor for proper recruitment of PRC2 during the early phases of embryonic stem cell (ESC) differentiation is the Jumonji family, ARID domain-containing protein JARID2 (Landeira et al., 2010; Li et al., 2010; Pasini et al., 2010; Peng et al., 2009; Shen et al., 2009), which is often deleted in chronic myeloid malignancies (Puda et al., 2012). In the absence of JARID2, PRC2 is recruited late and incompletely to its target genes and its enzymatic function is diminished (Li et al., 2010; Son et al., 2013), which results in failure to follow the differentiation program. Although JARID2 target sites are enriched for CGG- and GA-containing sequences (Peng et al., 2009), its DNA binding preferences lack the specificity to explain its distribution on chromatin (Li et al., 2010). Therefore, the nature of the recruitment pathway for JARID2 and the mode by which JARID2 regulates downstream steps of PRC2 assembly and function remain unclear.

Noncoding RNAs have been implicated in the regulation of epigenetic pathways, from early work on the lncRNA Xist in X chromosome inactivation (Brockdorff et al., 1992; Brown et al., 1992) and antisense transcripts in imprinted loci (John and Surani, 1996) to the more recent discovery of HOTAIR (Rinn et al., 2007) and its proposed role as a scaffold for chromatin-modifying “supercomplexes” (Tsai et al., 2010). Mammalian genomes contain thousands of lncRNAs (Guttman et al., 2009), most of which remain functionally uncharacterized. Because of their large size, potential for tertiary structure formation, and ability to form sequence-specific interactions with DNA, lncRNAs appear well suited to exchange information between

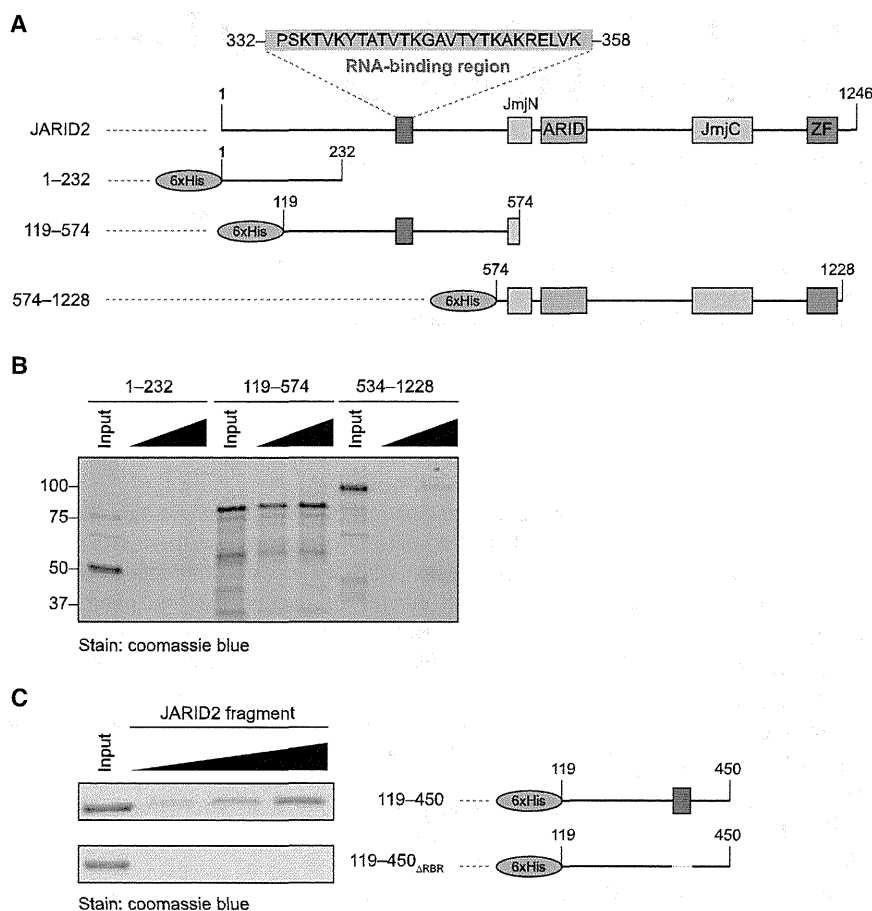


Figure 1. Identification of the RNA-Binding Region of JARID2

(A) Domain organization of human JARID2 and scheme of the 6xHis-fused truncations utilized in the mapping experiments.

(B) In vitro streptavidin pull-down after incubation of increasing concentrations of the indicated JARID2 recombinant fragments with biotinylated HOTAIR₁₋₃₃₃. Input, 2 µg; titration, 2 and 4 µg.

(C) High-resolution mapping of the residues of JARID2 necessary for RNA binding in vitro. The two indicated fragments (right) were incubated with HOTAIR₁₋₃₃₃ and assayed as in (B). Input, 2 µg; titration, 1, 2, and 4 µg. See also Figure S1.

during differentiation of mouse ESCs (Li et al., 2010; Pasini et al., 2010; Peng et al., 2009; Shen et al., 2009), the mechanisms by which JARID2 is targeted to chromatin and orchestrates PRC2 function remain poorly understood. Given that several PcG and PcG-associated proteins interact with lncRNAs, which in some cases regulate their recruitment to chromatin (Kanhare et al., 2010; Rinn et al., 2007; Yap et al., 2010), and based on our own preliminary observations in vitro (Kaneko et al., 2010), we hypothesized that lncRNAs might also regulate the function of JARID2.

We previously mapped an RNA-binding region (RBR) of EZH2, a core component of PRC2, and found that phosphorylation of a threonine within that region stimulated binding to lncRNAs (Kaneko et al., 2010).

We performed similar in vitro RNA-binding assays on JARID2 using a bait spanning nucleotides 1–333 of HOTAIR, a lncRNA that regulates PRC2 function (Tsai et al., 2010), and detected an affinity for RNA within an internal fragment of JARID2, but not in the N-terminal or C-terminal regions (Figures 1A and 1B). Further mapping experiments revealed that the deletion of residues 332–358 resulted in a severe decrease of RNA binding in vitro (Figure 1C; Figures S1A and S1B available online). The sequence spanning these residues is conserved strongly in vertebrates (Figure S1C), but only very weakly with *Drosophila* (Figure S1D), suggesting that JARID2 may have acquired an additional layer of regulation in vertebrates.

JARID2 binds to EZH2, the catalytic component of PRC2 (Margueron and Reinberg, 2011) and stimulates its histone methyltransferase activity (Li et al., 2010; Son et al., 2013). These functions require the same internal fragment that contains the RBR (Figure S1E) but can be uncoupled from the latter, given that deletion of residues 332–358 did not affect the ability of JARID2 to interact with PRC2 in vivo (Figure S1F) or to stimulate its enzymatic activity (Figure S1G), whereas the 349–574 fragment did not bind to RNA (Figure S1A) but retained the ability to interact with nucleosomes (Figure S1E) (Son et al., 2013).

chromatin-modifying complexes and the genomic sequence (Bonasio et al., 2010; Rinn and Chang, 2012). *Polycomb* repressive complex-1 (PRC1), PRC2, and the MLL complex interact with the lncRNAs ANRIL, HOTAIR, and HOTTIP, respectively, and these interactions facilitate their recruitment to chromatin (Rinn et al., 2007; Wang et al., 2011; Yap et al., 2010). However, the molecular details and downstream consequences of these RNA-protein interactions remain poorly understood. For example, the RNA-binding activity of PRC2 has been attributed to both EZH2 (Kaneko et al., 2010; Zhao et al., 2010) and SUZ12 (Kanhare et al., 2010), and, in unbiased analyses, large portions of the transcriptome were reported to bind to PRC2 (Kaneko et al., 2013; Khalil et al., 2009; Zhao et al., 2010), raising the question of how specificity is achieved in vivo.

Here, we show that the PRC2 accessory subunit JARID2 binds to lncRNAs in vivo and in vitro and that its interaction with MEG3, an lncRNA encoded by the imprinted *DLK1-DIO3* locus, is necessary for proper recruitment and assembly of PRC2 at a subset of target genes in pluripotent stem cells.

RESULTS

JARID2 Binds to RNA In Vitro

Despite a requirement for JARID2 during development (Takeuchi et al., 1995) and its key role in PRC2 recruitment and function

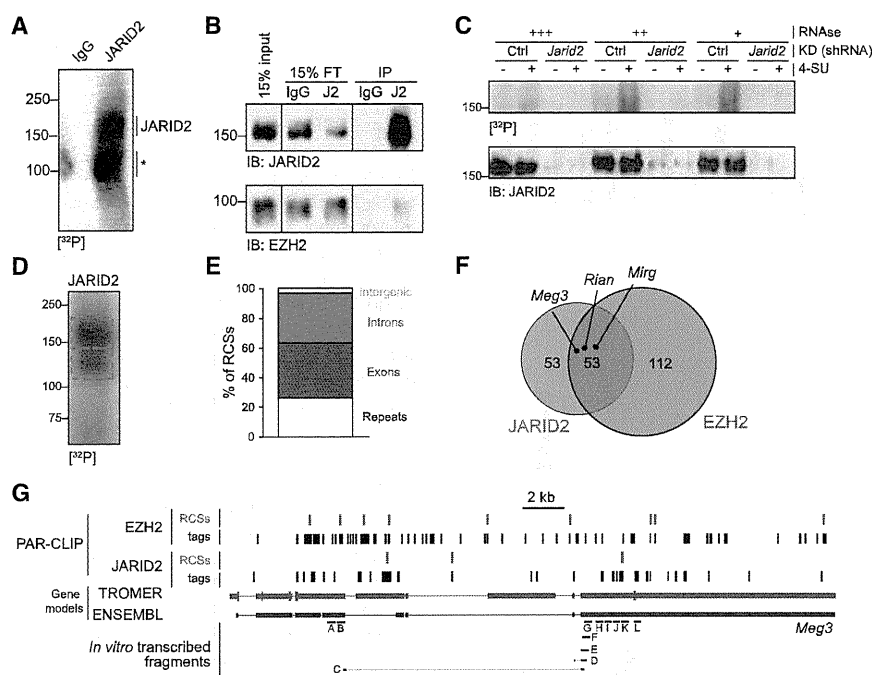


Figure 2. JARID2 and EZH2 Share Interacting lncRNAs In Vivo, Including Meg3

(A) PAR-CLIP with JARID2 antibodies or IgG in E14 ESC cells. The position of full-length JARID2 is indicated. The asterisk marks a presumed degradation product.

(B) Immunoblot on the same material utilized for the autoradiography in (A). J2, anti-JARID2 antibody. (C) PAR-CLIP (top) and immunoblot for JARID2 (bottom) performed in cells pulsed (+) or not pulsed (–) with 4-SU and stably transfected with an shRNA against *Jarid2* or a control shRNA. Extracts were treated with increasing concentration of a cocktail of DNase-free RNase A and T1.

(D) PAR-CLIP-seq blot for JARID2. (E) Distribution of JARID2 RCSs identified by PARalyzer in the genome. The stacked columns represent % of total RCSs. “Repeats” include all features listed in the RepMask database.

(F) Venn diagram of lncRNAs containing RCSs for JARID2, EZH2, or both. PAR-CLIP data for EZH2 were taken from GSE49433 (Kaneko et al., 2013). (G) Genome browser view of JARID2 and EZH2 CLIP tags (black bars) or RCSs identified by PARalyzer (red bars) mapping to the *Meg3* lncRNA. Gene models for *Meg3* according to both TROMER and ENSEMBL are shown. *Meg3* fragments tested for in vitro binding are indicated at the bottom.

See also Figure S2 and Table S1.

Therefore, although partially overlapping regions of JARID2 are required for these various functions, the only activity that we could uniquely attribute to the 332–358 fragment is that of binding RNA in vitro. Henceforth, we will refer to these residues as the RBR of JARID2 and to the mutant protein lacking these residues as JARID2 $_{\Delta RBR}$.

JARID2 and EZH2 Bind to lncRNAs In Vivo, Including Meg3

To determine whether JARID2 makes direct contacts with RNA in vivo, we utilized the photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation (PAR-CLIP) technique, which crosslinks RNA that has incorporated 4-thiouridine (4-SU) to proteins in vivo (Hafner et al., 2010). Consistent with our hypothesis, we detected a strong PAR-CLIP signal in immunoprecipitations (IPs) with our JARID2 antibody (Li et al., 2010) in extracts from embryonic day 14 (E14) ESCs (Figure 2A). These IPs were conducted in presence of 2% lauryldimethylbetaine, a zwitterionic detergent that almost completely abolished the PRC2-JARID2 interaction while preserving antibody reactivity (Figure 2B). Furthermore, the radioactive signal we observed must have originated from RNA crosslinked to JARID2, because it was dependent on the incorporation of 4-SU and was erased by treatment with increasing concentrations of RNase and by *Jarid2* knockdown (Figure 2C).

To identify the RNAs bound to JARID2 in vivo, we excised ^{32}P -labeled bands from the PAR-CLIP membranes (Figure 2D), eluted the crosslinked RNA, and sequenced it. In addition to the major, full-length band, we excised a faster migrating band that also reacted with JARID2 antibodies in WT but not in *Jarid2* $^{-/-}$ cells (data not shown). We obtained 90,000–200,000

unique CLIP tags in each replicate and analyzed their distribution using the PARalyzer software, which takes advantage of the T→C transitions caused by 4-SU crosslinking to discriminate signal from noise (Corcoran et al., 2011). PARalyzer identified 9,050 putative RNA-protein contact sites (RCSs) for JARID2, of which ~26% overlapped by more than 50% with repeats (Figure 2E) and were discarded. Among the 2,057 lncRNAs annotated in the mouse genome (ENSEMBL release 67), we identified 106 that contained at least one nonrepetitive RCS for JARID2 (Table S1). This bioinformatic pipeline applied to our previously generated EZH2 PAR-CLIP data (Kaneko et al., 2013) revealed that, in the same ESCs, EZH2 interacted with 165 lncRNAs, of which 53 were in common with JARID2 (Figure 2F; Table S1), including *Meg3*/*Gtl2*, *Rian*, and *Mirg*, three lncRNAs encoded within the imprinted *Dlk1-Dio3* locus.

We focused our attention on the lncRNA *Meg3* (also known as *Gtl2*), because of previous reports linking it to pluripotency (Stadtfield et al., 2010), imprinting (da Rocha et al., 2008), and PRC2 function (Zhao et al., 2010). Consistent with our PARalyzer analysis, several tags and RCSs from both JARID2 and EZH2 PAR-CLIP data mapped to *Meg3* (Figure 2G). Although some of the JARID2 CLIP tags mapped to a 5' region annotated as an intron by ENSEMBL (red track), the existence of an exon in this region is supported by the TROMER database (Benson et al., 2004) (green track), and our own RNA-seq (data not shown). Another cluster of JARID2 CLIP tags mapped to the 3' exon and accumulated in a region where PARalyzer identified an RCS (Figure 2G). Few CLIP tags mapped to highly expressed genes such as *Nanog* (Figure S2A) or *Gapdh* (Figure S2B), suggesting that the presence of *Meg3* tags reflected direct interactions in vivo.