

201335014A

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)

有害事象発生時の科学的な細胞検証を通じて細胞治療の安全性向上を目指す

臨床用細胞保管・検査拠点の構築

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川真田 伸

平成 25 (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

(再生医療関係研究分野)

有害事象発生時の科学的な細胞検証を通じて細胞治療の安全性向上を目指す

臨床用細胞保管・検査拠点の構築

平成25年度 総括・分担研究報告書

公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門

研究代表者 川真田 伸

目 次

I. 研究組織	1
II. 平成25年度 総括研究報告書	3
川真田 伸	
III. 平成25年度 分担研究報告書	
1. 細胞検査のための染色体解析技術の確立	7
郷 正博	
2. 移植後の保存検体(細胞・組織)からの細胞評価法の開発および ヒト幹細胞アーカイブ運用における細胞保管管理の体制の確立	9
西下 直希	
IV. 会 議 記 録	21
V. 研究成果の刊行物・印刷物	23

はじめに

本報告書は、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の再生医療関係研究分野の一つである「有害事象発生時の科学的な細胞検証を通じて細胞治療の安全性向上を目指す臨床用細胞保管・検査拠点の構築」研究班における平成25年度の研究成果をまとめたものである。

平成24年度にiPS細胞等の臨床研究安全基盤整備事業として、iPS細胞等を活用した細胞移植治療におけるヒト幹細胞アーカイブとが整備された。本研究は、移植に用いたヒト幹細胞の一部を「ヒト幹細胞アーカイブ」に保管しておき、移植から時間が経過した後に、移植に用いたヒト幹細胞について溯って調べることを可能にしておくことで、ヒト幹細胞移植の安全性・有効性を長期的にフォローアップでき、安全かつ有効な再生医療を実現、臨床研究が促進されることにつながる事を目的としている。本目的を達成するために、平成25年度では下記のテーマの分担研究を行い、「有害事象発生時の科学的な細胞検証を通じて細胞治療の安全性向上を目指す臨床用細胞保管・検査拠点の構築」に関する研究を実施した。

1. 移植検体の保管
2. 移植検体の細胞評価研究
3. 臨床的意義を示すための細胞検査の実施
4. 保管業務支援として事務局の設置

上記のテーマ別研究課題について、平成25年度時点 中間報告書（1年目）として作成したものであるが、関係者のご参考になれば幸いである。

また、iPS細胞を活用し臨床研究の実施を計画されている諸先生方の治療法が、より安全で国内外へ広く発展するための事業として、ヒト幹細胞アーカイブが成熟できるよう強く期待している。

I. 研究組織

平成25年度厚生科学研究「有害事象発生時の科学的な細胞検証を通じて細胞治療
の安全性向上を目指す臨床用細胞保管・検査拠点の構築」研究班

研究組織

	役 割	氏 名	所 属
研究代表者	研究総括	川真田 伸	公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業 部門
分担研究者	細胞検査 責任者	郷 正博	公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業 部門 細胞製造グループ
分担研究者	細胞保管/細胞評価研究責任者 (兼)細胞保管 事務局長	西下 直希	公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業 部門 細胞評価グループ
協力研究者		永田 洋二	臨床研究情報センター
協力研究者		川本 篤彦	先端医療センター病院 診療部 再生治療ユ ニット
協力研究者		橋本 尚子	先端医療センター病院 細胞管理センター
協力研究者		田口 明彦	先端医療センター研究所 再生医療研究部
協力研究者		高橋 政代	理化学研究所 発生・再生科学総合研究セン ター
協力研究者		金村 星余	公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業 部門 細胞評価グループ
協力研究者		鹿村 真之	公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業 部門 細胞評価グループ
協力研究者		村松 万里江	公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業 部門 細胞評価グループ
協力研究者		山本 貴子	公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業 部門 細胞評価グループ
協力研究者		竹中 ちえみ	公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業 部門 細胞評価グループ
	細胞保管事務局	清水 良雄	公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業 推進課
	細胞保管事務局	林 直哉	公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業 推進課
	細胞保管事務局	竹内 勝信	公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業 推進課
	細胞保管事務局	ジェイコブス いずみ	公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業 推進課

Ⅱ. 平成25年度 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（研究事業）

総括研究報告書

有害事象発生時の科学的な細胞検証を通じて細胞治療の安全性向上を目指す
臨床用細胞保管・検査拠点の構築

研究代表者：川真田 伸

（公財）先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 副事業統括

研究要旨

再生医療を普及させる上で重要な社会基盤の一つとして、「細胞移植治療の安全性、信頼性を担保する基盤構築」が挙げられる。移植に用いたヒト幹細胞の一部を「ヒト幹細胞アーカイブ」に保管しておき、移植から時間が経過した後に、移植に用いたヒト幹細胞について溯って調べることを可能にしておくことで、細胞移植の安全性・有効性を長期的にフォローアップでき、安全かつ有効な再生医療を実現できる。このような安全・安心な細胞治療の普及を目指す社会基盤構築として、先端医療振興財団ではヒト幹細胞アーカイブを活用し、将来的に細胞治療の安全性が損なわれないように、移植細胞の保管と情報管理および移植後の治療効果検証による再生医療産業化プラットフォーム作りを目指す。

本事業では上記の社会実現のために、1. 移植検体の保管 2. 移植検体の細胞評価研究 3. 臨床的意義を示すための細胞検査の実施，細胞検査技術の開発/細胞標準化・規格化 4. 細胞保管業務に関する運営管理基準および細胞寄託に対する事務業務を統合的に構築する必要がある。

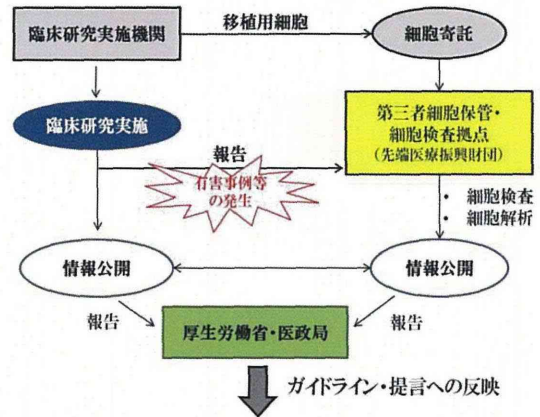
本年度の成果としては、細胞療法開発事業部門内にて細胞保管業務と細胞検査業務部隊を構築し、ヒト幹細胞アーカイブ用 HP の立ち上げ、細胞保管事務局を設置、保管寄託業務に対する運用基準を構築した。その他、細胞評価研究についても、オミックス解析を活用した細胞評価技術の構築を行った。また、細胞検査技術では、染色体解析業務を自施設で実施可能とし、M-FISH や M-BAND 等の検査体制を構築した。

【研究目的】

再生医療の普及は日本成長戦略の重要課題の一つであり、今年にはiPS細胞由来網膜色素上皮細胞を用いた加齢黄斑変性治療の臨床研究実施が予定されている。再生医療を普及させる上で、iPS細胞に関する分化誘導技術や細胞検査技術のような基礎医学的な研究技術、移植細胞に対する品質の安全性データ構築等に加えて、移植細胞の情報管理および移植後の治療効果検証による「細胞移植治療の安全性、信頼性を担保する社会基盤の構築」こそ、再生医療産業化における第一歩である。このような社会基盤構築のため、先端医療振興財団ではヒト幹細胞アーカイブを活用し、将来的に細胞治療の安全性が損なわれないような体制構築を目指している。

【研究方法】

本事業では、臨床研究実施機関に加え、第三者機関として移植細胞の保管・細胞検査を集約的に実施し、検査手法・結果判定の規格化と検査内容公開による情報共有の仕組みを作ることで、安全性向上に貢献することを課題としている。（図1）



細胞治療の安全性向上、検査・保管技術の向上、 幹細胞のback up 保管施設の構築

図1. 有害事象発生時の科学的な細胞検証をする細胞の保管、検査拠点の役割

事業実施にあたり当該年度では機関内で組織編成。保存検体の種類・管理方法・運用規定等を構築した。

【研究結果】

細胞療法開発事業部門内にて細胞保管業務と細胞検査業務部隊を構築し、細胞保管研究/細胞評価研究/細胞保管・管理業務と細胞検査の実施/細胞検査技術の開発/細胞標準化・規格化とに役割を分担した。加えて、細胞保管に対する契約/細胞情報保管/ホームページの運営管理等の業務を細胞保管業務内に事務局を設置し、保管業務に対する事務業務を支援する体制も同時に整えた。（図2）

ヒト幹細胞アーカイブの実施体制

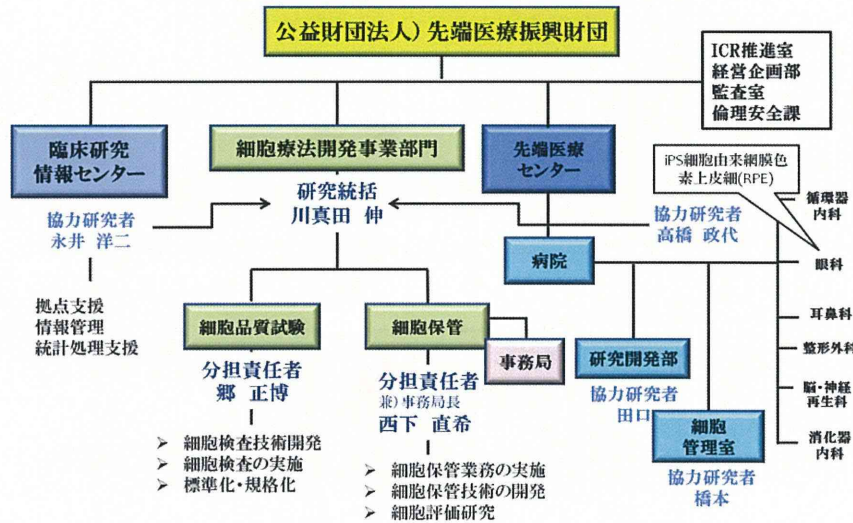


図2. 公益財団法人) 先端医療振興財団のヒト幹細胞アーカイブ実施体制図

また、万一の有害事例発生時に細胞検証
 するために必要な細胞保管体制として、iPS
 細胞由来網膜色素上皮細胞（加齢黄斑変性
 治療）の場合、Fibroblast細胞（細胞源:①）、
 Fibroblast細胞から樹立したiPS細胞（樹立
 iPS細胞:②）、iPS細胞から分化させたRPE細
 胞（iPS由来RPE細胞:③）、RPE細胞のマウ
 ス皮下移植試験後の組織細胞）造腫瘍性実
 施細胞:④）、移植使用したRPE細胞（最終分
 化細胞:⑤）の各ステップの細胞を保管する
 事を確定した。（図3）

【考察】

本事業は、幹細胞治療に使われた細胞の保
 管事業だけでなく、有害事象発生時の検査

を第三者機関として実施することで、細胞
 治療の安全性向上に大いに寄与すると考え
 る。

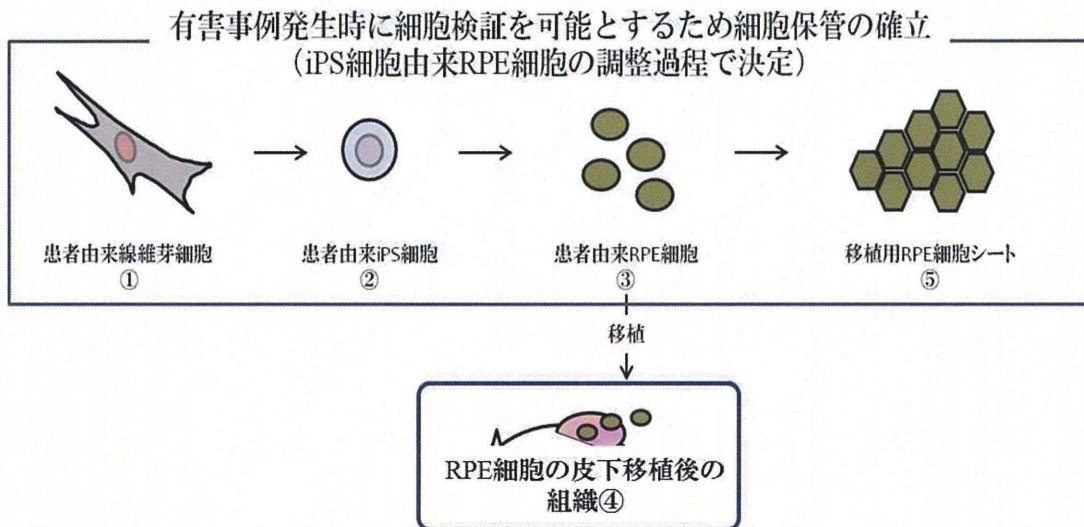


図3. 先端医療振興財団のヒト幹細胞アーカイブで細胞検証を可能とするための、検体保管体制

Ⅲ. 平成25年度 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（研究事業）

分担研究報告書

細胞検査のための染色体解析技術の確立

分担研究者：郷 正博

（公財）先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 細胞製造グループ

研究要旨

万一の有害事例発生時に細胞検証する際に、正しい細胞評価が行わなければ、原因探索や再発防止を考察するに十分な科学的結果が反映できず、細胞移植治療に対する安全性の検証ができない。臨床的知見を基に、細胞調整段階、あるいは移植直前の細胞を検証することも原因探索研究を行う上で、非常に重要である。

本研究では、細胞培養時、調整時に起きやすいとされる染色体異常(Hotspot)と臨床的有害事例を組み合わせた検査を実施するため、当該年度では染色体解析技術(M-FISH 法、M-BAND 法)を立ち上げ、染色体解析に対する早期解析評価できる技術を確立した。

【研究目的】

細胞の安全性評価については、細胞調整段階、移植直前、凍結前後の細胞の染色体解析が不可欠であり形態学的な染色体評価手技（G-band法、M-FISH、M-BAND技術）での検証は重要課題の一つである。当該年度では、染色体異常の検証を素早く実施可能とするため、染色体解析技術(M-FISH法、M-BAND法)を立ち上げ、染色体解析に対する早期解析評価できる技術を確立した。

【研究方法】

細胞検査技術開発として、当該年度ではG-band法に加え、M-FISH法、M-BAND法の解析を実施した。細胞は、ES細胞(khES-1株)を用いて評価した。

【結果】

M-FISH解析の結果、各クロモソーム別の染色が確認でき、正常細胞株である事がわかった。(図6) また、m-BAND解析を実施し、khES-1細胞のChr.1領域は、正常であることを確認した。

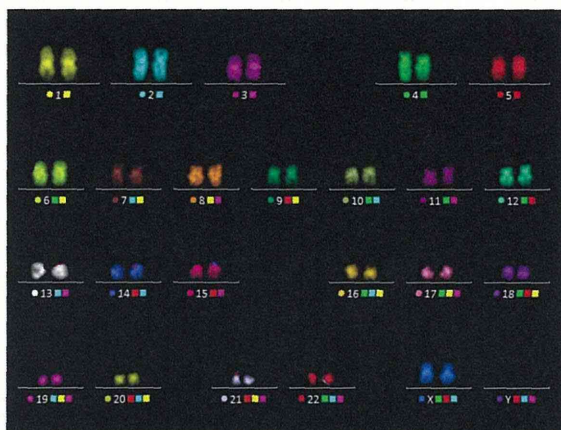


図6. M-FISH 解析 (khES-1 細胞株)

【考察】

当該年度では、形態学的な構造異常を検証できる染色体技術を確立した。次年度より、CGH array等のマイクロアレイ技術を用いた染色体解析技術を導入し、細胞凍結や継代培養におけるgene stabilityや造腫瘍性に関する検査法の開発を着手する予定である。

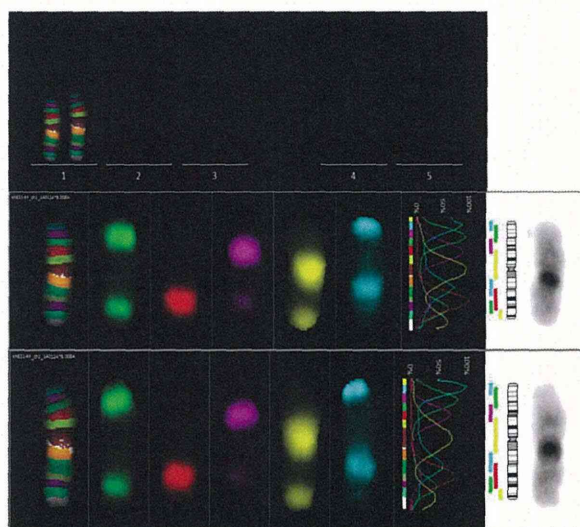


図7. khES-1細胞株のchr.1 のM-BAND

厚生労働科学研究費補助金（研究事業）

分担研究報告書

移植後の保存検体(細胞・組織)からの細胞評価法の開発および
ヒト幹細胞アーカイブ運用における細胞保管管理の体制の確立

分担研究者：西下 直希

(公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 細胞評価グループ

研究要旨

有害事例発生時に細胞検証する際に、正しい細胞評価より原因探索を行い、科学的結果を反映することが、細胞移植治療に対する安全性の検証となる。このような原因探索を検討するための細胞評価手法を考案するためには、最終産物に近い細胞、移植後の細胞あるいは組織から移植細胞の状況をフィードバックできる評価法を開発する必要がある。この技術開発こそ、細胞移植治療の安全性、有効性の検証に繋がり、細胞規格化・標準化になるものと考えられる。

当該年度の細胞評価研究課題としては、移植後の細胞・組織で検証可能とする細胞評価方法の確立、原因探索法に対する検討を行う。具体的には、移植細胞に（非腫瘍性）分化中間体の混入があるかを評価するために、皮下移植試験後の組織から DNA を回収後、メチル化解析情報を得た。結果として、移植後の組織から最終分化細胞のみを移植した事例なのか、分化中間体の混入がある事例なのか、移植時の細胞状況をフィードバックできる事が分かった。

また、細胞保管体制の構築として、ヒト幹細胞アーカイブ運用に対する運用規定の作成、細胞寄託促進のために HP の開設、細胞保管手順書の作成、細胞保管/管理システムを構築した。

【研究目的】

万一の有害事例発生時に細胞検証する際に、正しい細胞評価が行わなければ、原因探索や再発防止を考察するに十分な科学的結果が反映できず、細胞移植治療に対する安全性の検証ができない。このような原因探索のための細胞評価手法を考案するためには、最終産物に近い細胞あるいは移植後の細胞・組織から移植時の細胞情報をフィードバックできる評価法を開発する必要がある。当該年度の細胞評価研究では、移植後の細胞検証と原因追究を可能とする評価研究方法として、①メチル化解析、②オミックス解析 ③代謝解析を実施した。

【研究方法】

移植後の細胞組織から移植時の細胞情報をフィードバックできる評価法として、皮下移植試験後の組織から細胞情報を獲得、評価した。具体的には、昨年度のJST「多能性幹細胞由来移植細胞の安全性評価研究」実施時に得た3th RPE移植組織片（非造腫瘍性分化中間体混入が著明なRPE細胞）と4th RPE移植組織片（非造腫瘍性分化中間体混入が見られない最終RPE移植細胞）を提供

頂き、上記2種の組織からDNAを抽出し、Illumina Infinium HD Methylationにて比較解析した。

【結果】

Terminal differentiationした4th RPE細胞で非メチル化、3th RPE細胞でメチル化が確認できた領域を抽出した。(Table 1) PFKM, TNFSF8, LFNG, DMD, ETV1などの領域は、ヒトMSC細胞でもメチル化していることを確認し、さらにRPE細胞でメチル化されていると考えられるEpithelial cell transforing sequence 2 oncogene-like (ECT2L) は、3th RPE細胞と4th RPE細胞の両方でメチル化に差が見られなかった。PFKM, TNFSF8, LFNG, DMD, ETV1領域のMethylation評価(不純物混入を評価した手法)は、RPE細胞の移植後の経過観察試験として有効な評価系となる可能性を示唆した。

【考察】

今後、n数を増やして検証する必要性もあると考えている。以上の結果より、移植後の有害事例発生時における細胞検査項目としてMethylation解析は、有用な手段である可能性を示唆した。

Table 1. 非造腫瘍性分化中間体混入 RPE 細胞と最終分化 RPE 細胞とのメチル化の違い

UTR--Index	MSC	59G 3hrRPE	59G 4hrRPE	ProbeID	ENTREZ_GENEID	TYPE_OF_GENE	GENE_SYMBOL	DESCRIPTION	59G 3hrRPE VS 59G 4hrRPE		59G 3hrRPE VS MSC		59G 4hrRPE VS MSC		MSC:59G 3hrRPE:59G 4hrRPE:基 本値と最小 値の幅が指 定	59G 3hrRPEと59G 4hrRPEがm Cで混在して いるmCとmC 以内のmCの 割合
									59G 3hrRPEが mC大きい 割合	1.5 倍以内	59G 3hrRPEが mC大きい 割合	1.5 倍以内	59G 4hrRPEが mC大きい 割合	0		
									770	12648	0	8068	116			
									判定	判定	判定	判定	判定			
206	85.7	67.2	38.0	cg10508111;cg162	5213 protein-coding	PFKM	phosphofructokinase, muscle		0	1.3	0	2.3	47.7	0	0	
380	31.1	33.2	8.6	cg14725537	5354 protein-coding	PLP1	proteolipid protein 1		0	1.1	0	3.6	24.6	0	0	
522	32.3	31.4	10.7	cg05726661	1140 protein-coding	CHRN1	cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle)		0	1.0	0	3.0	21.7	0	0	
890	67.0	59.6	28.5	cg27631256	944 protein-coding	TNFSF8	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8		0	1.1	0	2.3	38.5	0	0	
1229	49.3	65.0	20.7	cg15016628	680 protein-coding	BRS3	bombesin-like receptor 3		0	1.3	0	2.4	44.3	0	0	
1268	56.1	51.6	20.8	cg12971694	971 protein-coding	CD72	CD72 molecule		0	1.1	0	2.7	35.3	0	0	
1542	60.5	82.8	51.3	cg19807685	3294 protein-coding	HSD17B2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2		0	1.4	0	1.2	31.5	0	0	
1650	84.0	81.0	46.5	cg20572537	3955 protein-coding	LFNG	LFNG O-fucosyltransferase 9-beta-N-acetylglucosaminyltransferase		0	1.0	0	1.8	37.5	0	0	
1762	53.0	52.8	14.2	cg20171297	4618 protein-coding	MYF6	myogenic factor 6 (herculin)		0	1.0	0	3.7	38.7	0	0	
1865	90.5	66.8	30.9	cg26266308	5150 protein-coding	PDE7A	phosphodiesterase 7A		0	1.4	0	2.9	59.6	0	0	
2222	77.4	80.3	52.7	cg01634964;cg023	6597 protein-coding	SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4		0	1.0	0	1.5	27.6	0	0	
2371	75.7	66.4	42.6	cg08485937	7134 protein-coding	TNNC1	troponin C type 1 (slow)		0	1.1	0	1.8	33.1	0	0	
2432	80.9	78.3	50.3	cg02399030;cg070	7378 protein-coding	UPP1	uridine phosphorylase 1		0	1.0	0	1.6	30.7	0	0	
2572	69.7	82.5	53.0	cg10533161	8428 protein-coding	STK24	serine/threonine kinase 24		0	1.2	0	1.3	29.5	0	0	
2879	57.8	73.1	42.0	cg02629615;cg261	1756 protein-coding	DMD	dystrophin		0	1.3	0	1.4	31.1	0	0	
3204	55.6	73.7	46.3	cg00346556;cg019	2059 protein-coding	EPS8	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8		0	1.3	0	1.2	27.4	0	0	
3546	54.5	65.7	34.5	cg02151632;cg047	9583 protein-coding	ENTPD4	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4		0	1.2	0	1.6	31.2	0	0	
3637	55.7	69.4	45.5	cg03512369;cg047	5358 protein-coding	PLS3	plasin 3		0	1.2	0	1.2	23.9	0	0	
3817	65.6	74.2	47.0	cg22148297	2841 protein-coding	GPR18	G protein-coupled receptor 18		0	1.1	0	1.4	27.2	0	0	
4000	50.7	68.3	43.4	cg04036101;cg040	3801 protein-coding	KIFC3	kinesin family member C3		0	1.3	0	1.2	24.9	0	0	
4414	49.0	38.5	25.4	cg21166775	10411 protein-coding	RAPGEF3	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3		0	1.3	0	1.9	23.6	0	0	
4905	54.3	39.0	14.1	cg17548735	10930 protein-coding	APOBEC2	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2		0	1.4	0	3.9	40.2	0	0	
5020	72.1	62.9	40.1	cg21673263	6536 protein-coding	SLC6A9	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9		0	1.1	0	1.8	32.0	0	0	
5234	40.2	33.7	11.6	cg23051598	11273 protein-coding	ATXN2L	ataxin 2-like		0	1.2	0	3.5	28.6	0	0	
5523	47.3	42.3	27.0	cg02294539;cg219	23548 protein-coding	TTC33	tetratricopeptide repeat domain 33		0	1.1	0	1.8	20.3	0	0	
5657	58.7	55.4	29.4	cg02290197;cg066	29887 protein-coding	SNX10	sorting nexin 10		0	1.1	0	2.0	29.2	0	0	
6041	44.1	59.0	34.7	cg25447894	27254 protein-coding	CSDC2	cold shock domain containing 2, RNA binding		0	1.3	0	1.3	24.3	0	0	
7106	55.9	39.1	25.2	cg03509901	51701 protein-coding	NLK	nemo-like kinase		0	1.4	0	2.2	30.7	0	0	
7179	67.9	61.5	40.6	cg02059867;cg027	51195 protein-coding	RAPGEFL1	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF)-like 1		0	1.1	0	1.7	27.3	0	0	
8382	27.9	39.7	14.7	cg01003803;cg068	26281 protein-coding	FGF20	fibroblast growth factor 20		0	1.4	0	1.9	24.9	0	0	

Table 1(続き).

非造腫瘍性分化中間体混入 RPE 細胞と最終分化 RPE 細胞とのメチル化の違い

8598	83.1	84.5	54.4	cg10565645	2589	protein-coding	GALNT1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetyl-galactosaminyltransferase 1 (GalNAc-T1)		0	1.0	0	1.5		30.1	0	0
8720	74.3	80.1	33.0	cg10576828	57554	protein-coding	LRRCT7	leucine rich repeat containing 7		0	1.1	0	2.3		47.1	0	0
9127	57.2	66.7	40.0	cg02458882;cg060	10133	protein-coding	OPTN	optineurin		0	1.2	0	1.4		26.7	0	0
10125	79.9	59.5	34.5	cg02218324;cg179	81492	protein-coding	RSPH6A	radial spoke head 6 homolog A (Chlamydomonas)		0	1.3	0	2.3		45.4	0	0
10624	80.8	86.0	52.5	cg11081809						0	1.1	0	1.5		33.6	0	0
10691	61.4	75.7	40.1	cg02391387;cg027	83943	protein-coding	IMP2L	IMP2 inner mitochondrial membrane peptidase-like (S. cerevisiae)		0	1.2	0	1.5		35.8	0	0
10722	65.6	62.7	41.1	cg00831247;cg089	84695	protein-coding	LOXL3	lysyl oxidase-like 3		0	1.0	0	1.6		24.6	0	0
10817	69.7	62.6	41.3	cg00677195	80760	protein-coding	ITHS	itrs-alpha-typsin inhibitor heavy chain family, member 5		0	1.1	0	1.7		28.4	0	0
11157	75.7	70.5	43.4	cg06494770;cg074	90293	protein-coding	KLHL13	kelch-like 13 (Drosophila)		0	1.1	0	1.7		32.3	0	0
11787	80.6	61.4	40.8	cg01513802	23345	protein-coding	SYNE1	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1		0	1.3	0	2.0		39.8	0	0
11972	83.1	86.6	54.8	cg04908300;cg161	5468	protein-coding	PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma		0	1.0	0	1.5		31.7	0	0
12056	87.0	67.1	44.1	cg02462253;cg182	5602	protein-coding	MMPK10	mitogen-activated protein kinase 10		0	1.3	0	2.0		42.8	0	0
12525	40.2	33.7	11.6	cg23051598	11273	protein-coding	ATXN2L	ataxin 2-like		0	1.2	0	3.5		28.6	0	0
12543	79.6	58.8	23.6	cg00609333;cg045	4257	protein-coding	MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1		0	1.4	0	3.4		56.0	0	0
12579	37.9	31.2	17.2	cg01745499;cg026	3159	protein-coding	HMGAI	high mobility group AT-hook 1		0	1.2	0	2.2		20.7	0	0
12580	37.9	31.2	17.2	cg01745499;cg026	3159	protein-coding	HMGAI	high mobility group AT-hook 1		0	1.2	0	2.2		20.7	0	0
12585	37.2	24.8	16.5	cg00561081;cg013	7571	protein-coding	ZNF23	zinc finger protein 23		0	1.5	0	2.2		20.7	0	0
12628	87.0	64.7	43.0	cg11395414	115290	protein-coding	FBXD17	F-box protein 17		0	1.3	0	2.0		44.0	0	0
12636	40.2	33.7	11.6	cg23051598	11273	protein-coding	ATXN2L	ataxin 2-like		0	1.2	0	3.5		28.6	0	0
12637	40.2	33.7	11.6	cg23051598	11273	protein-coding	ATXN2L	ataxin 2-like		0	1.2	0	3.5		28.6	0	0
12638	40.2	33.7	11.6	cg23051598	11273	protein-coding	ATXN2L	ataxin 2-like		0	1.2	0	3.5		28.6	0	0
13154	61.7	54.7	33.5	cg18953104	167838	protein-coding	TLXNB	taxilin beta		0	1.1	0	1.8		28.3	0	0
13406	75.6	60.2	33.3	cg26367031	27094	protein-coding	KCNMB3	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily Mbeta member 3		0	1.3	0	2.3		42.3	0	0
13705	56.7	46.2	23.1	cg00964137;cg021	285600	protein-coding	KIAM0825	KIAM0825		0	1.2	0	2.5		33.6	0	0
14584	50.3	68.9	38.6	cg00094817;cg004	1390	protein-coding	CREM	cAMP responsive element modulator		0	1.4	0	1.3		30.3	0	0
14587	50.3	68.9	38.6	cg00094817;cg004	1390	protein-coding	CREM	cAMP responsive element modulator		0	1.4	0	1.3		30.3	0	0
14801	48.3	37.9	24.9	cg03508235	84962	protein-coding	AJUBA	ajuba LIM protein		0	1.3	0	1.9		23.4	0	0
14805	42.7	43.1	10.1	cg11822785;cg180	358	protein-coding	AQP1	aquaporin 1 (Colton blood group)		0	1.0	0	4.2		33.0	0	0
15204	31.1	33.2	8.6	cg14725537	5354	protein-coding	PLP1	proteolipid protein 1		0	1.1	0	3.6		24.6	0	0
15313	72.1	62.9	40.1	cg21573263	6536	protein-coding	SLC6A9	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9		0	1.1	0	1.8		32.0	0	0
15646	86.5	83.4	49.6	cg05548349	401562	protein-coding	LCNL1	lipocalin-like 1		0	1.0	0	1.7		36.9	0	0
16243	57.2	66.7	40.0	cg02458882;cg060	10133	protein-coding	OPTN	optineurin		0	1.2	0	1.4		26.7	0	0
16244	57.2	66.7	40.0	cg02458882;cg060	10133	protein-coding	OPTN	optineurin		0	1.2	0	1.4		26.7	0	0
16245	57.2	66.7	40.0	cg02458882;cg060	10133	protein-coding	OPTN	optineurin		0	1.2	0	1.4		26.7	0	0
16449	68.6	79.5	33.6	cg03704673	388323	protein-coding	GLTPD2	glycolipid transfer protein domain containing 2		0	1.2	0	2.0		45.8	0	0
16939	53.4	42.8	25.8	cg16715129;cg236	272	protein-coding	AMPD3	adenosine monophosphate deaminase 3		0	1.2	0	2.1		27.6	0	0
16940	57.0	55.9	35.9	cg16715129;cg239	272	protein-coding	AMPD3	adenosine monophosphate deaminase 3		0	1.0	0	1.6		21.1	0	0
17842	75.4	89.6	56.9	cg15255042	345930	protein-coding	ECT2L	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene-like		0	1.2	0	1.3		32.7	0	0
17854	54.7	41.5	6.9	cg03309770;cg269	780776	protein-coding	FAM18A	family with sequence similarity 18, member A		0	1.3	0	8.0		47.9	0	0
18167	65.6	74.2	47.0	cg22148297	2841	protein-coding	GPR18	G protein-coupled receptor 18		0	1.1	0	1.4		27.2	0	0
18448	56.9	73.8	36.2	cg00556627;cg012	26010	protein-coding	SPATS2L	spermatogenesis associated, serine-rich 2-like		0	1.3	0	1.6		37.5	0	0
18450	56.9	73.8	36.2	cg00556627;cg012	26010	protein-coding	SPATS2L	spermatogenesis associated, serine-rich 2-like		0	1.3	0	1.6		37.5	0	0
18785	77.3	93.0	61.7	cg02634187	441054	protein-coding	C4orf47	chromosome 4 open reading frame 47		0	1.2	0	1.3		31.4	0	0
19202	77.4	80.3	52.7	cg01634964;cg023	6597	protein-coding	SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4		0	1.0	0	1.5		27.6	0	0
19335	50.7	68.3	43.4	cg04036101;cg040	3801	protein-coding	KIFC3	kinesin family member C3		0	1.3	0	1.2		24.9	0	0
19555	78.4	88.5	56.4	cg03392679;cg094	317649	protein-coding	EIF4E3	eukaryotic translation initiation factor 4E family member 3		0	1.1	0	1.4		32.1	0	0
19815	53.6	75.7	45.5	cg04956382;cg069	9499	protein-coding	MYOT	myosin		0	1.4	0	1.2		30.2	0	0
20317	56.7	48.2	23.1	cg03964137;cg021	285600	protein-coding	KIAM0825	KIAM0825		0	1.2	0	2.5		33.6	0	0
21301	75.1	72.3	41.3	cg21463790	2115	protein-coding	ETV1	ets variant 1		0	1.0	0	1.8		33.8	0	0
21302	75.1	72.3	41.3	cg21463790	2115	protein-coding	ETV1	ets variant 1		0	1.0	0	1.8		33.8	0	0
21303	75.1	72.3	41.3	cg21463790	2115	protein-coding	ETV1	ets variant 1		0	1.0	0	1.8		33.8	0	0
21348	75.6	60.2	33.3	cg26367031	27094	protein-coding	KCNMB3	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily Mbeta member 3		0	1.3	0	2.3		42.3	0	0
21758	87.5	73.4	45.4	cg27446233	5213	protein-coding	PFKM	phosphofructokinase, muscle		0	1.2	0	1.9		42.1	0	0
21759	87.5	73.4	45.4	cg27446233	5213	protein-coding	PFKM	phosphofructokinase, muscle		0	1.2	0	1.9		42.1	0	0
21867	69.2	58.6	25.8	cg00412554;cg064	90293	protein-coding	KLHL13	kelch-like 13 (Drosophila)		0	1.2	0	2.7		43.5	0	0

【研究方法】

次に、多能性幹細胞の細胞規格方法として、ヒトES細胞とヒトiPS細胞のHuman Genome U133 plus 2.0を用いた網羅的遺伝子解析の結果より、遺伝子同士の関連性ネットワークをオミックス解析した。多能性維持に必要となる代表的な遺伝子群およびリプログラミング化で使用した遺伝子群を抽出し、ヒトES細胞に強く発現し、多能性維持を保持する因子(OCT3/4, NANOG, SOX2, KLF4 c-Myc, Lin28A) 間のネットワーク形成の様子と前遺伝子に加え、iPS細胞の樹立効率を向上させると報告された Glis-1 遺伝子を加えた遺伝子間のネットワーク形成の様子を比較した。(図4)

【結果】

Glis-1 遺伝子の発現を経由するiPS細胞のシグナルは、NogginやBMP Familyのシグナル経路とリンクしていることを明示する判明、NANOGやPOU5F1など多能性維持遺伝子群のネットワーク構築とは直接的な関係性がないことが示唆された。従って分化誘導後でも残ると思われるGlis-1の恒常的

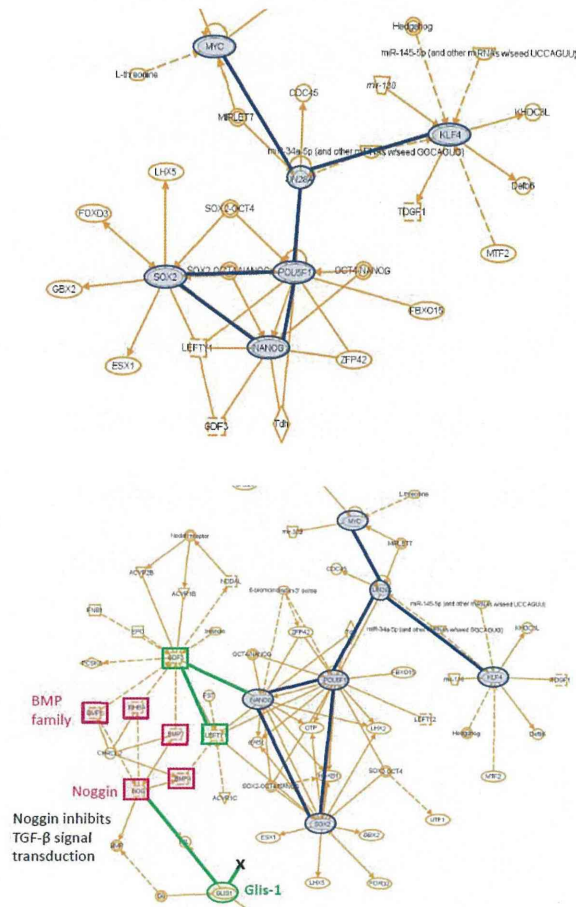


図4. 網羅的遺伝子発現データを用いた iPS多能性維持ネットワーク(NW)解析.

上) リプログラミング化 (POU5F1, NANOG, SOX2, Lin28A, KLF4, MCY)に利用されている主な遺伝子間の Controllability analysis.

下) Glis-1 を追加した場合の遺伝子間の Controllability analysis.

な発現は、分化誘導時にBMPやNogginシグナルの恒常的な活性を促し、中胚葉系への誘導促進と特定の分化段階での分化阻害をもたらす可能性が示唆された。

一方、RPE細胞自身も単一細胞で低密度培養を行うことで比較的緩和な培養条件下で中胚葉系細胞へと脱分化しやすいことが報告されている。¹⁾

Glis-1をリプログラミング化に使用することで、Fibroblastや間葉系幹細胞(MSC)からiPS細胞の樹立効率が向上すると報告²⁾されているものの、ヒト臍帯血を細胞源とした場合には、Glis-1を導入した場合でも、iPS細胞の樹立効率の向上は認められなかった。つまり、iPS細胞の樹立条件は、細胞源のエピゲノム状態と密接な関係があり、Glis-1を使用した場合のリプログラミング化とGlis-1を使用しないリプログラミング化では、リプログラミング経路が異なる事が推察できる。Glis-1は、特定細胞種に存在する遺伝領域のリプログラミング化を促進する役割を示すものの、Glis-1を使用して樹立したiPS細胞では、Glis-1が残存した場合、BMPやNongginシグナルの恒常的な活性を促し、中胚葉系への分化誘導の際は、中胚葉系中間体での分化異常細胞の出現が想定された。実際3次試験で出現した、MSCの性状と特性（脂肪、骨、軟骨分化）

X細胞の出現は、このOmics解析で予見できる可能性が示唆された。

【考察】

Glis-1を用いて樹立したiPS細胞をRPEに分化誘導した3th RPE移植組織片（非造腫瘍性分化中間体混入が著明なRPE細胞）で特異的に出現した（中胚葉系mesenchymal stem cellの性質を有した）細胞が、RPE細胞の脱分化系で起こるものかあるいは、iPS細胞のリプログラミングプロセスで発生するX細胞であるか、Omics解析を含めた多面的に検証することで、iPS細胞の分化抵抗性の予見や細胞規格化の検討が可能になることが考えられた。

参考文献)

1. Enrique Salero, et.al., “Adult Human RPE Can Be Activated into a Multipotent Stem Cell that Produces Mesenchymal Derivatives”, Cell Stem Cell, 10, 88–95 2012.
2. Momoko Maekawa, et.al. “Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1”, Nature, 474, 225-229, 2011.