

ONCOFOCUS PANEL V1.0 GENES AND MUTATIONS

| GENE | MUTATION   |
|------|--|
| BRAF | G469S, G469A, G469E, G469R, G469V, D594G, D594V, L597S, L597Q, L597V, L597R, T599_V600insT, T599_V600insTT, V600G, V600K, V600R, V600L, V600M, V600E, V600>YM  |
| EGFR | R108K, T263P, A289V, A289D, G598V, E709V, E709H, E709K, E709G, E709Q, E709A, G719S, G719D, G719C, G719A, K745_E749delKELRE, E746_S752>V, E746_A750>VP, E746_E749del, E746_A750>IP, E746_T751>V, E746_A750>DP, E746V, E746_P753>VQ, E746_T751>S, E746_T751>A, E746_T751delELREAT, E746_A750>QP, E746_P753>VS, E746_S752>I, E746_T751>VA, E746_S752>D, E746_S752delELREAS, E746K, E746_T751>L, E746_T751>I, E746_E749delELRE, E746_T751>IP, E746_T751>VP, E746_T751>Q, E746_S752>A, E746_P753>IS, E746_A750delELREA, E746_A750>RP, E746_P753>LS, L747_P753>Q, L747_T751>A, L747_K754>ST, L747_T751>P, L747_T751delLREAT, L747_S752>QH, L747_E749del, L747S, L747_P753>S, L747_A750>P, L747_T751>Q, L747_T751>S, L747_K754delLREATSPK, L747P, L747_S752>Q, L747_E749delLRE, L747_T751>PT, L747_S752delLREAS, L747_A750>AN, T751_I759>S, T751I, T751_I759>N, T751_E758delTSPKANKE, T751_I759>REA, S752P, S752_I759delSPKANKEI, S752Y, P753_I759del, P753S, P753Q, P753_I759delPKANKEI, I759N, D761N, D761Y, M766_A767insAI, A767_S768insTLA, S768N, S768I, S768T, S768_V769>IL, V769_D770insGSV, V769_D770insCV, V769_D770insGVV, V769_D770insASV, D770>GY, D770_N771insSVD, D770_N771insG, D770_P772>ASVDNR, D770_N771insGL, D770_N771insAPW, D770_N771insGF, D770N, D770_N771>AGG, D770_N771insMATP(5' Detection Only), D770_N771insGD, N771>GF, N771_P772insRH, N771_P772>SVDNR, N771>SH, N771>TH, N771>GY, H773_V774insH, H773_V774insNPH, H773_V774insQ, H773_V774insPH, V774M, V774_C775insHV, V774L, R776C, R776H, T790M, T854A, L858M, L858R, L858K, L861Q, L861R, E709fs*1, T751fs*4, H773>NPY(3' Detection Only) |
| KRAS | G12W, G12C, G12E, G12Y, G12D, G12F, G12R, G12N, G12G, G12S, G12A, G12T, G12V, G12I, G12P, G12_G13insA, G12L, G13A, G13D, G13R, G13N, G13S, G13V, G13I, G13_V14insG, G13C, A59T, Q61K, Q61E, Q61R, Q61H, Q61P, Q61L, A146G, A146T, A146V, A146P   |
| NRAS | G12C, G12Y, G12N, G12A, G12E, G12V, G12P, G13A, G13D, G13R, G13V, G13N, G13Y, Q61K, Q61R, Q61H, Q61P, Q61Q, Q61E, Q61L   |

図8: OncoFocus v1.0

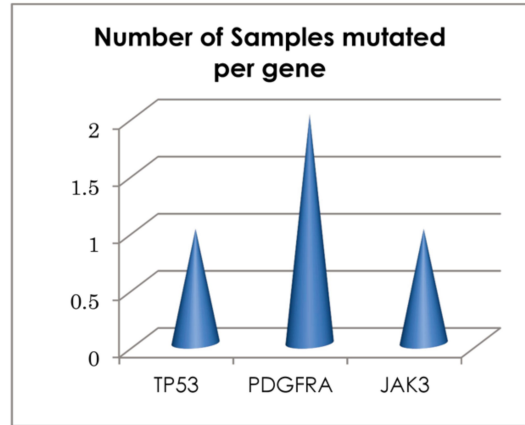


図9: SNP解析により同定された遺伝子変異

本年度の解析に用いた30検体中に見出された遺伝子変異



図 11: iPS-NPC における CNV 解析

継代ごとに iPS-NPC の CNV が異常化をきたすことが明らかとなった。Safe iPS-NPC である 201B7 由来 iPS-NPC においても長期間培養時には広領域にわたる欠失が観察された。

| Sample        | Gene   | Assay      | Mutation     | Allele | WT Frequency | Mutation Frequency |
|---------------|--------|------------|--------------|--------|--------------|--------------------|
| 1123GBM p20   | TP53   | TP53_107   | R273C        | A      | 0.307        | 0.693              |
| 253G1 iPS p32 | PDGFRA | PDGFRA_427 | D842_S847>EA | GGCC   | 0.864        | 0.136              |
| 201B7 iPS p29 | PDGFRA | PDGFRA_427 | D842_S847>EA | GGCC   | 0.882        | 0.118              |
| 0712GBM p7    | JAK3   | JAK3_401   | V722I        | T      | 0.345        | 0.655              |

図10: SNP解析により同定された遺伝子変異

本年度の解析に用いた30検体中に見出された遺伝子変異

MassArrayシステムによるSNPの検出に関しては、10%程度の変異率では偽陽性が出やすいこともわかり、本研究で目的とする少数の細胞集団へのアプローチとしては必ずしも最適でないことがわかった。また、全ゲノムSNPアレイによる造腫瘍性関連メカニズムの解析を目的として、OmniExpress-24 BeadChipを用いた解析を施行した。実験試料としてヒト線維芽細胞、iPS細胞(201B7及び253G1)、iPS-NPCを複数の継代数から得られたゲノムDNAを用いた。その結果、興味深いことにiPS細胞においてはCNVに関しては継代ごとに大きな変動はなく安定しているのに対し、iPS-NPCに関しては継代ごとにCNVに異常化を来すことがわかった。本研究拠点においては造腫瘍性が見出されなかった201B7由来のiPS-NPCにおいても、長期間培養後では特定の染色体の広範な領域に欠失が見出された(図11)。

今後CNVやSNPに関して詳細な解析をし、造腫瘍性を規定する因子を見出すことを予定している。一方造腫瘍性という観点から、iPS細胞での継代数よりも、iPS-NPCの培養期間は可能な限り短縮した方がゲノムの安定性という点において有利であることがわかった。融合遺伝子の検索に関しては、現在single readおよびpair endでのシーケンスの予備実験が終了したところであり、single read、pair endの両方に共通のデータ部分に焦点を当てて、今後解析を進めていく予定である。

#### **D . 考察**

本研究成果より、細胞株間による genome

instabilityの違いと、hiPS-NS/PCの passageにより genome instabilityが悪化することがわかった。さらに、腫瘍を高率に形成する253G1 iPS細胞株において、他の細胞株にはない特異的な構造変異があることもわかった。トランスクリプトーム解析のみでは、遺伝子発現量のカットオフ値の設定が困難であるため、造腫瘍性の評価系としては不十分であった。しかし、造腫瘍性を規定する構造変異及びDNAメチル化状態や癒合遺伝子などの評価系を組み合わせることや細胞の継代数を厳重に管理することにより、より精度の高いiPS-NPCの品質管理項目の作成が可能となると期待される。

#### **E . 結論**

iPS細胞およびiPS細胞由来神経幹細胞、ヒト脳腫瘍由来の細胞を用いて、その腫瘍原性を調べるべく、抽出DNAからSNP解析や融合遺伝子の検索を行った。これらの結果はヒトiPS細胞由来神経幹細胞の腫瘍形成能のメカニズム解明につながる可能性があり、安全性の確保のための項目として利用できると考えられる。

#### **F . 健康危険情報**

特になし。

#### **G . 研究発表**

( 原著論文 )

1. Itakura G, Kobayashi Y, Nishimura S, Iwai H, Takano M, Iwanami A, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Controlling immune rejection is a fail-safe system against potential tumorigenicity after human iPSC-derived neural stem cell transplantation. PLoS One. 2015 Feb 23;10(2):e0116413.
2. Iwanami A, Kobayashi Y, Takano M, Mikami S, Toyama Y, Nakamura M. Invasive dumbbell spinal meningiomas: report of four cases and a review of the literature. J Orthop Sci. 2014 Sep 8.
3. Qin Y, Fu M, Takahashi M, Iwanami A, Kuga D, Rao RG, Sudhakar D, Huang T, Kiyohara M, Torres K, Dillard C, Inagaki A, Kasahara N, Goodglick L, Braun J, Mischel PS, Gordon LK, Wadehra M. Epithelial membrane protein-2 (EMP2) activates Src protein and is a novel therapeutic target for glioblastoma. J Biol Chem. 2014 May 16;289(20):13974-85.

( 学会発表 )

1. Ozaki M, Itakura G, Iwai H, Kohyama J, Iwanami A, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Immunogenicity of human induced pluripotent stem cells-derived neural stem cells as a cell source of transplantation therapy for spinal cord injury. 44th annual meeting of Society for Neuroscience (Washington DC, USA, 2014, 11)
2. Hori K, Kohyama J, Matsubayashi K, Iwanami A, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Intracranial xenograft model as a validation system to assess tumorigenicity of NS/PCs for transplantation therapy. 44th annual meeting of

Society for Neuroscience (Washington DC, USA, 2014, 11)

3. Iida T, Kohyama J, Iwanami A, Yoshida R, Nishimura S, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Assessment of tumorigenic potential of induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells. 44th annual meeting of Society for Neuroscience (Washington DC, USA, 2014, 11)
5. Ozaki M, Itakura G, Iwai H, Kohyama J, Iwanami A, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Immunogenicity of human induced pluripotent stem cells-derived neural stem cells as a cell source for the treatment of spinal cord injury. Cervical Spine Research Society 42nd Annual Meeting (Orlando, USA, 2014, 12)
6. 尾崎正大, 板倉剛, 岩井宏樹, 吉田怜, 神山淳, 岩波明生, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 : ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植治療における免疫原性の検討. 第 33 回日本運動器移植・再生医学研究会 (2014,9)
7. 飯田剛, 神山淳, 岩波明生, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 : ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞における造腫瘍性評価項目の確立. 第33回日本運動器移植・再生医学研究会 (2014,9)
8. 尾崎正大, 板倉剛, 岩井宏樹, 吉田怜, 神山淳, 岩波明生, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 : ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植治療における免疫学的特性の検討.

第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会  
(2014,10)

評価系の確立.第29回日本整形外科学会基  
礎 学術集会 (2014,10)

9. 堀桂子, 神山淳, 坂野聡重, 岩波明生,  
岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: マウス  
脊髄損傷モデルにおけるエピジェネティ  
ック修飾関連因子の解析, 第 29 回日本整  
形外科学会基礎学術集会(2014,10)

#### **H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を 含む。)**

該当する記載なし

10. 飯田剛, 神山淳, 岩波明生, 吉田怜, 西  
村空也, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅  
也: iPS細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性