

iPS 細胞、および iPS 細胞由来分化細胞の規格化研究

分担研究者：西下 直希 田村 尚

(公財)先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター

研究要旨

多能性幹細胞を未分化培養状態で長期間培養すると染色体構造異常が高頻度で出現するので、それを迅速に検査できるシステムの構築が必要である。また検出された変異の意味づけを有意なものにするため、染色体異常と発癌との関係、ヒト癌データベースとの照合も必要である。

H26年度は、先端医療振興財団で樹立されたiPS細胞や分化神経幹細胞を用いた解析を行った。custom made CGH arrayのdesignが完成し、その試作品の機能解析を行った。今後は迅速に検査結果が判明するmulticolor BAND (mBAND)やFISH解析と合わせて、総合的に染色体の検査が実施できる基盤を構築した。

【目的】

多能性幹細胞由来分化細胞の移植において最大の懸念は、移植細胞の造腫瘍性評価である。造腫瘍性評価は被検細胞を免疫不全動物に当該臨床部位に移植し長期間観察する試験が必要であるが、移植前の被検細胞の細胞規格とりわけ、移植細胞中の未分化細胞の検出及び移植細胞中の未分化細胞の遺伝子変異の検出と検討が重要である。なぜならからは、未分化細胞の細胞特性に起因する腫瘍（奇形腫）の形成が懸念され、からは、多能性幹細胞の長期培養による染色体構造の変異とそれに基づく造腫瘍能獲得が懸念される。は、未分化細胞を高感度で検出出来る qRT-PCR 等の技術開発が課題であったが、については、遺伝子の構造は短期間の培養（1 - 2 か月）でも不安定になるため、多能性幹細胞由来分化細胞の遺伝子検査を2-3日のreal timeで検出出来る技術の開発が求められている。現在染色体構造検査の主流である G-band 法は検査に約1か月要するので、この試験期間を大幅に短縮し in house で検査が可能になるようなシステムの構築が必要である。

従って、本研究にて遺伝子の染色体構造や copy number variant (CNV) などの変異をほぼ real time (2-3日) で評価するための技術開発として、新規 CGH array のデザインとこの Array のデザイン機能の検証を行う。合わせて mFISH, mBAND 法の改良を行う。

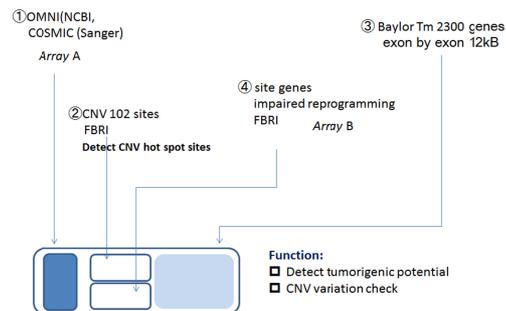
【試験概要】

今年度の研究では、まず custom made CGH array の design を行った。この CGH array と染色体多重の probe で hybrid する

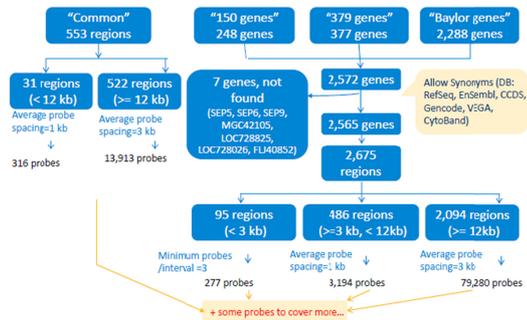
mBAND 法の開発と組み合わせ、2-3 日で結果が判明する有用な検査として使用可能であるかの検討を行った。

【試験方法】

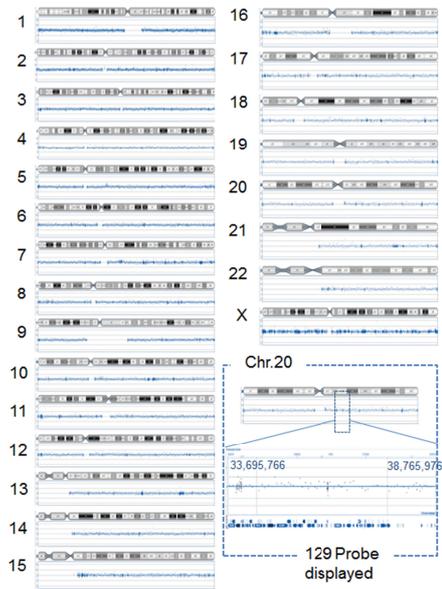
CGH custom array の作成：



デザインの流れ



Probe の design であるが、まず Baylor University の data base で公知になっている成人の癌責任遺伝子 2300 遺伝子を抽出し array panel に加えた。次に分化過程で分化能が阻害されている iPS 細胞由来分化細胞で発現が増強されていた遺伝子 377 個を抽出し probe を作成した。次に SANGER で公開されている家族性発癌遺伝子 COSMIC の 248 個を加え、probe を作成し、多能性幹細胞で報告されている copy number variants の hot spots 102 領域を選定し、probe を作成した。これらの癌遺伝子や CNV 領域を一つの chip に網羅的にデ



次年度京都大学CiRAから慶應大学に臨床用のhomo iPS細胞が送付され、神経幹細胞の分化誘導が慶應大学で行われ、当方に送付され造腫瘍性試験に使われるが、その細胞の遺伝子検査も品質規格試験の一環として実施する予定である。またmBANDやmFISHなどの検査がin houseで立ちあがったため、これらの検査も合わせて総合的に遺伝子検査を推進する。

(Nat Rev Gen 2012:13, 732-744)