

201427030A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品等規制調和・評価研究事業

細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けた

レギュラトリーサイエンス研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤陽治

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品等規制調和・評価研究事業

細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けた

レギュラトリーサイエンス研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 陽治

平成 27 (2015) 年 3 月

# 目 次

<b>I. 総括研究報告書</b>	頁
細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究 . . . . .	1
佐藤 陽治	
<b>II. 分担研究報告書</b>	
1. 新規免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験法の開発 . . . . .	88
堤 秀樹	
2. 幹細胞の <i>in vitro</i> 培養工程における遺伝子発現の動態解析による品質評価技術の開発 . . . . .	94
澤田 留美	
3. 次世代シーケンサーを用いた細胞の遺伝的安定性評価指標の開発 . . . . .	111
鈴木 孝昌	
4. 遺伝的安定性評価ツールとしての次世代シーケンサーの性能評価 . . . . .	132
三浦 巧	
5. 遺伝的安定性評価リファレンスとしての日本人ゲノムの <i>de novo</i> 配列決定 . . . . .	150
梅澤 明弘	
6. 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 . . . . .	166
安田 智	
<b>III. 学会等発表実績 . . . . .</b>	194
<b>IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . .</b>	201

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等規制調和・評価研究事業）  
「細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究」  
総括研究報告書

研究代表者：佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長

## 研究要旨

【目的】本研究は、新たなガイドライン作成に資する細胞・組織加工製品、特に幹細胞加工製品の品質・安全性評価法の開発を行うことを目的とする。【方法】①幹細胞製品の造腫瘍性試験法の開発、②細胞のがん化指標の設定、③-1 次世代シーケンサーを用いた細胞の遺伝的安定性評価指標の開発、③-2 遺伝的安定性評価ツールとしての次世代シーケンサーの性能評価と遺伝的安定性評価リファレンスとしての日本人ゲノムの *de novo* 配列決定、④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、に関する研究を実施した。【結果】①我々は Rag2 遺伝子と IL-2R $\gamma$  遺伝子をダブルノックアウトし、BALB/c 系に遺伝子置換した免疫不全マウス（BRG マウス）を開発・維持しており、さらにヌード化あるいはヘアレス化した系統（BRG-nu マウス、BRG-hr マウス）も作出している。新たな造腫瘍性試験用動物としての適性を判断するために、これらの系統の HeLa 細胞を用いての TPD<sub>50</sub> によるヒト細胞生着能評価を行った。BRG-nu マウスが造腫瘍性試験用動物として NOG マウスや BRG マウスよりも優位であった。②ヒト間葉系幹細胞(hMSCs)において、レトロトランスポゾン LINE-1s の発現とさらにその抑制因子と報告されている A3B の遺伝子型との関連や、さらに幹細胞の未分化性と LINE-1s の発現との関連についても検討を行った。次世代シーケンサーを用いて A3B 野生型ホモと A3B 欠失型ホモの RNA 配列を網羅的に解析し比較したところ、両方で転移活性の残った LINE-1s の発現量には大きな違いが見られなかった。また、hMSC を脂肪へ分化させることにより、LINE-1s mRNA の発現量が低下した。③-1 次世代シーケンサーによって、未知のゲノムリアレンジメントにおける遺伝子増幅は比較的詳細に検出可能であった。しかし染色体転座などの切断点の同定には、通常のアラインメント解析結果の利用は難しく、特にゲノム上に顕在する単純なリピート配列が解析を困難とした。また、遺伝的不安定性のモデルとして BLM を破壊した細胞を用い、次世代シーケンサーによる変異の検出に関する検討を開始した結果、通常のアラインメント解析においては、顕著な変化は検出されなかった。③-2 品質管理や医療診断などに次世代シーケンサーを用いる場合には、各種解析ごとにエラー率を考慮する必要がある、そのエラー頻度を正確に予測する技術が要求される。そこで、標準ゲノム DNA の読み間違いエラー率を各変異箇所において検証し、それら解析結果についてのバラツキの程度を CV 値（変動係数）によって評価した。一方、それぞれの人種は、さまざまな多型を保持していること知られ、既存のリファレンス配列とは大きく異なる構造多型等を検出するためには、リファレンス配列に頼ることなく、*de novo* アセンブリを行う必要がある。日本人を対象とした再生医療を念頭に、第一段階として一人の健康日本人男性を選び、既存のリファレンス配列を用いずに全ゲノム配列決定を行った。④遺伝子ネットワーク・パスウェイ解析により絞り込んだ分化プロペンシティと発現量との相関のある miRNA のヒト iPS 細胞安定発現株を樹立し、神経細胞/心筋細胞の分化実験および胚葉体形成に供し、分化効率を比較し、これら miRNA がヒト iPS 細胞の分化において機能的な役割を果たしているのかを確認した。【結論】本研究の成果により、細胞・組織加工製品の有効性・安全性に関する品質評価に必要な指標・評価法が示され、迅速で適切な製品開発・審査および再生医療の実用化推進に貢献できると考えられる。

## 研究分担者（順不同）

堤 秀樹	(公財)実験動物中央研究所 試験事業部 部長
澤田 留美	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 第2室 室長
鈴木 孝昌	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 第4室 室長
三浦 巧	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 第1室 室長
梅澤 明弘	国立成育医療研究センター 再生医療センター センター長
安田 智	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 第3室 室長

## 研究協力者（順不同）

草川 森士	(公財)先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 研究員
浦野 耕司	(公財)実験動物中央研究所 試験事業部
水島 友子	(公財)実験動物中央研究所 試験事業部
西銘 千代子	(公財)実験動物中央研究所 試験事業部
西中 栄子	(公財)実験動物中央研究所 試験事業部
伊東 一昭	(公財)実験動物中央研究所 試験事業部
河野 健	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 第2室 主任研究官
本間 正光	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長
山田 雅巳	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 第1室 室長
スレッシュ ティルパッティ	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 第4室
岡村 浩司	国立成育医療研究センター システム発生・再生医学研究部 組織工学研究室 室長
井原 千琴	国立成育医療研究センター 小児がん疫学臨床研究センター 登録データ管理室
中林 一彦	国立成育医療研究センター 周産期病態研究部 周産期ゲノミクス研究室 室長
秦 健一郎	国立成育医療研究センター 周産期病態研究部 部長
黒田 拓也	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 第3室 研究員
城 しおり	名古屋市立大学大学院薬学研究科 医薬品質保証学分野 修士課程修了
田埜 慶子	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 第1室 研究員
中島 啓行	(公財)先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 研究員
高田 のぞみ	医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 研究員
松山 さと子	国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 技術補佐員

## A. 研究目的

再生医療は、身体の一部の機能不全や欠損による重篤な疾患や障害を治療できる革新的な方法として注目されており、総合科学技術会議の提言やなどにおいても最重要課題とされている。また再生医療の実用化促進に向けて、平成25年4月に「再生医療推進法（再生医療を国民が迅速かつ安全に受け入れられるようにするための施策の総合的な推進に関する法律）」が成立し、さらに平成26年11月には「薬事法等の一部を改正する法律」および「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」が施行された。再生医療（や細胞治療）に使用することを目的に生きた細胞を加工して製造される製品は細胞・組織加工製品（再生医療製品）と呼ばれ、国内外で活発に研究・開発が行われている。細胞ソースとしてはヒト体細胞に加え、近年ではヒト体性幹細胞、胚性幹細胞（ES細胞）などの幹細胞が対象とされてきている。また最近、生命倫理的な問題や免疫学的な拒絶をクリアできると考えられる人工多能性幹細胞（iPS細胞）が登場し、再生医療が社会的に大きな期待を集めている。しかしながら細胞・組織加工製品は、臨床使用経験が少ないために知見の蓄積も乏しく、国内指針やICH、WHOなどの生物製剤製造国際ガイドライン等にある従来の品質・安全性評価法が役立たないケースが頻出しており、新たに適切な評価技術を樹立することが火急の課題となっている。本研究では、新たなガイドライン作成に資する細胞・組織加工製品、特に幹細胞加工製品の品質・安全性評価法の開発を行うことを最終目的とする。幹細胞の加工過程における未分化細胞／異常細胞の混入は、幹組織加工製品においてがん化を引き起こすとして最も懸念される。しかしながら、最終製品に含まれるこれらの細胞の高感度かつ定量的な測定方法は開発が遅れている。そこで本研究では、汎用性・定量性のある幹細胞加

工製品の造腫瘍性試験法の開発を目指した実験研究を展開する。また細胞の培養・加工過程での細胞の形質安定性も考慮に入れる必要があることから、培養工程での遺伝子発現の動態解析による品質評価法および遺伝子安定性評価法の開発に関する研究を行う。さらに安全性上の懸念として、ヒト多能性幹細胞株間での各種目的細胞への分化のし易さ（分化プロペンシティ）のバラツキがあり、その情報は原材料である細胞株の選択に必要不可欠である。未分化細胞において分化プロペンシティの評価系を含んだ細胞特性解析を実施する。

平成26年度の研究としては、①「幹細胞製品の造腫瘍性試験法の開発」として、BRGマウス、BRG-nuマウス、BRG-hrマウスの新たな造腫瘍性試験用動物としての適性を判断するために、これらの系統のHeLa細胞を用いてのTPD<sub>50</sub>によるヒト細胞生着能評価を行った。②「細胞のがん化指標の設定」として、ヒト間葉系幹細胞において、レトロトランスポゾンLINE-1sの発現とさらにその抑制因子と報告されているA3Bの遺伝子型との関連や、さらに幹細胞の未分化性とLINE-1sの発現との関連についても検討を行った。③-1「次世代シーケンサーを用いた細胞の遺伝的安定性評価指標の開発」として、次世代シーケンサーによる未知のゲノムリアレンジメントの解析を行った。また、遺伝的不安定性モデル細胞を用い、ホールゲノム解析を行った。③-2「遺伝的安定性評価ツールとしての次世代シーケンサーの性能評価と遺伝的安定性評価リファレンスとしての日本人ゲノムの*de novo*配列決定」として、標準ゲノムDNAを用いて次世代シーケンサーの読み取りエラー率の計測と、日本人リファレンス配列確立を目的とした次世代シーケンサーによる全ゲノム*de novo*アセンブリを行った。④「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」として、分化

プロペンシティと発現量との相関のある miRNA のヒト iPS 細胞安定発現株を樹立し、各種細胞への分化効率を比較した。

## B. 研究方法

### B-1 新規免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験法の開発

#### B-1-1 BRG, BRG-nu および BRG-hr マウスにおけるヒト細胞生着能の定量的評価

##### B-1-1-1 使用動物

BRGマウス雄60匹（細胞移植時 7週齢），BRG-nuマウス雄54匹（細胞移植時 7週齢），および BRG-hrマウス雄60匹（細胞移植時 7週齢）は、実中研、実験動物基盤技術センターにて保有していた凍結受精卵をSPF仮親（Jcl:ICR）マウスに移植し、移植後19日に帝王切開により無菌的に摘出、SPF里親（IQI/Jic）マウスに哺育・育成させた動物を用いた。比較対照用のヌードマウス雄24匹およびScidマウス雄30匹（細胞移植時 7週齢）は日本クレア㈱から購入した。

全ての動物は1週間の馴化後全頭体重測定を行い、平均値が等しくなる様「汎用群分けシステム（ヴィジョンズ）」により各系統とも6匹/群（一部の群は5匹/群）に分けた。個体識別は耳パンチ/カット法により行った。

##### B-1-1-2 使用細胞，実験群構成および細胞移植

HeLa細胞（JCRB9004，（財）ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンク）は推奨プロトコールにしたがい、培地10%FBSおよびペニシリン/ストレプトマイシンを添加したMEM中にて培養・継代し所定数に調整後、培地（MEM+10%ウシ胎児血清+ペニシリン/ストレプトマイシン）またはマトリゲル（LONZA Group Ltd., Basel, Switzerland）に懸濁したものをを用いた。

群分した動物は以下の実験群構成とした。

#### 群構成

- BRG, HeLa 移植：0,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  (cells/匹)
- BRG, HeLa+マトリゲル移植：0,  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  (cells/匹)
- BRG-nu, HeLa 移植：0,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  (cells/匹)
- BRG-nu, HeLa+マトリゲル移植：0,  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  (cells/匹)
- BRG-hr, HeLa 移植：0,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  (cells/匹)
- BRG-hr, HeLa+マトリゲル移植：0,  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  (cells/匹)
- ヌード, HeLa 移植：0,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  (cells/匹)
- Scid, HeLa 移植：0,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  (cells/匹)

細胞移植は 25G 注射針付ツベルクリン用シリンジに各群の細胞懸濁液を充填し、100 $\mu$ L/匹を無麻酔下で後背部皮下に移植した。

##### B-1-1-3 結節形成確認

細胞移植後、毎週 1 回体重測定および触診および視診による結節形成の確認を行った。結節が確認されたらノギスで長径(L)と短径(W)を測定し、結節体積(V)を「ヌードマウスと抗癌剤評価」(野村達次, 櫻井欽夫, 稲葉實編著, 蟹書房, 1991) の腫瘍体積簡易計算式にしたがい、計算式  $V=LW^2/2$  で算出した。この結節体積は比重 1 として結節重量とし、体重の 10% を超過した際は、人道的エンドポイントとして観察を終了し、イソフルラン吸入麻酔下で安楽死させ、移植部位を採材し、10%中性緩衝ホルマリンにより固定した。

##### B-1-1-4 TPD<sub>50</sub> (Tumor producing dose at the 50%) の計算

Prism (Ver. 6, GraphPad Software, Inc.) を使用し、

4 パラメータのロジスティック回帰分析の結果より算出した。

#### B-1-2 倫理面への配慮

本動物試験の全ては「公益財団法人実験動物中央研究所 動物実験等に関する規程」に則り計画され、同所動物実験委員会の審査を受け承認された後に、「公益財団法人実験動物中央研究所 実験動物ならびに施設等管理細則」にしたがい実施された。

使用された HeLa 細胞は提供者の国立医薬品食品衛生研究所内において同所研究倫理委員会規程に基づき適切に培養され、作業者に直接触れることなく動物に移植された。

### B-2 幹細胞の *in vitro* 培養工程における遺伝子発現の動態解析による品質評価技術の開発

#### B-2-1 A3B 遺伝子型による転移可能な LINE-1s の発現解析

##### B-2-1-1 RNA シークエンス解析

hMSCs から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し、TruSeq Strand mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina) を用いて RNA シークエンス用ライブラリ調製を行った。次世代シーケンサー (Illumina HiSeq) を使用し、Paired-End 法 100 塩基読み取りにより塩基配列データを取得した。

##### B-2-1-2 ヒトゲノム中の LINE-1s 様配列の抽出および RNA 塩基配列のマッピングと定量

マルチマップを無制限に許容する条件に設定した Bowtie により次世代シーケンサーにより取得した RNA 塩基配列をヒトゲノム配列 (GRCh38) へマッピングを行った。GRCh38 に存在する LINE-1<sub>β-thal</sub> (L1<sub>β-thal</sub>; Genbank Accession No.AF148856), LINE-1<sub>RP</sub> (L1<sub>RP</sub>; AF149422) 及び LINE-1.3 (L1.3; L19088) 配列の BLAST 検索を行い、その領域にマッピン

グされたリード数をカウントした。各リードのマルチマップ数を考慮して補正を行い、該当領域に含まれるリード数を予想した (estimated read count)。各検体の総取得リード数を考慮して補正を行い、検体間で比較可能な予想リード数を算出した (normalized read count)。

[normalized read count] = [estimated read count]/[マッピングに使用した全リード数] x 1,000,000 (総取得リード数を 100 万本あると想定した)。

#### B-2-2 hMSCs の未分化性と LINE-1s 発現との関連について

##### B-2-2-1 細胞培養

hMSCs (Lonza) は、Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を加えた培地 (MSCGM) で培養した。日本人指由来間葉系幹細胞: Yub633 (医薬基盤研究所) は POWEREDBY10 (GP バイオサイエンス), Yub637b (医薬基盤研究所) は M061101 (GP バイオサイエンス) で培養した。

##### B-2-2-2 細胞増殖解析

継代数 3 (P=3) の hMSCs 4.5 x 10<sup>5</sup> 個を T75 フラスコ (corning) に播種し、MSCGM で 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。90%コンフレント状態に達したら、継代を行い、細胞数を測定後、再び 4.5 x 10<sup>5</sup> 個の hMSCs を T75 フラスコに播種し、継代数 11 (P=11) まで繰り返した。P=4,6,8,10 の際に一部細胞を回収し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。各継代間の細胞増殖速度 ( $R_n$ ) は下記式により算出した。

$R_n = [\log_2(N_n - N_{n-1})] / (D_n - D_{n-1})$ ;  $N_k$  と  $D_k$  はそれぞれ  $P=k$  のときの細胞数と日付。

##### B-2-2-3 定量 Reverse transcription (RT)-PCR

(qRT-PCR) による LINE-1s mRNA 発現量の定量解析

細胞から抽出した total RNA を ReverTra Ace qPCR RT Kit (ToYoBo) を用いて逆転写反応を行い cDNA へ変換した。得られた cDNA を使い LINE-1s mRNA 発現量を qRT-PCR 法により定量した。プライマー及びプローブは Forward 5'-GAGAACAAGACACCACATACC-3', Reverse 5'-GGCATTTAGTGCTATAAATTTCCC-3', FAM-5'-TCTCTGGGACGCATTCAAAGCAGT-3'-BHQ1 を使用した。PCR 反応は LightCycler TaqMan Master (Roche Applied Science) を用いて Roche LightCycler (version 4.0) で行った。ハウスキーピング遺伝子として GAPDH を使い、PCR 反応はライトサイクラー専用ヒト mRNA 定量プライマーセットを用いて行った。

#### B-2-2-4 脂肪分化

hMSCs の脂肪への分化は  $4 \times 10^5$  個の hMSCs を 60 mm Dish (IWAKI) に播種し、100%コンフレントになるまで MSCGM で培養した。100%コンフレントに達した後、Adipogenic Induction Medium (Lonza) で 3 日間、Adipogenic Maintenance Medium (Lonza) で 1-3 日間の培養を 3 回繰り返し、最後に Adipogenic Maintenance Medium で 7 日間培養した。

#### B-2-2-5 脂肪球の蛍光染色

脂肪分化後の hMSCs を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、10  $\mu$ g/ml BODIPY Lipid Probes (Molecular Probes) 室温 20 分間で脂肪球を染色した。その後、10  $\mu$ M Hoechst (Molecular Probes) 室温 15 分間で核を染色した。脂肪球の蛍光染色面積は Volocity (PerkinElmer) を用いて算出した。

#### B-2-3 倫理面への配慮

本研究において用いたヒト由来間葉系幹細胞は全て市販品であり、倫理的問題はないと思われる。

#### B-3 次世代シーケンサーを用いた細胞の遺伝的安定性評価指標の開発

##### B-3-1 使用した細胞株

- ・ヒト白血病細胞株 HL60 (RG)

国立医薬品食品衛生研究所、細胞バンク (当時) より入手したヒト前骨髄球系白血病細胞株 HL60 細胞およびその増殖性変異株である HL60-RG 株を使用した。この細胞は既に染色体解析および CGH 法にて解析が行われ、myc 遺伝子の増幅を Double Minute (DM)染色体および Homologous Staining Region (HSR)として持つことが知られている。HL60 細胞は、10%牛胎児血清添加 RPMI1640 培地にて培養をした。

- ・ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 (hMSC)

Cambrex 社より入手した正常ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 (hMSC) のうち、以前の検出において、異常が認められたロット 4F1560 と同一ロットを使用した。hMSC は、間葉系幹細胞培養用基本培地培地 Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM) に間葉系幹細胞添加因子セット (MSCGM SingleQuots, TAKARA) および 10%FBS を添加し培養を行い、70-80%コンフレントの状態を継代を続けた。18-19 世代再培養し、凍結保存した細胞を使用した。

- ・ヒトリンパ芽球細胞株 TK6

国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部より入手。正常 p53 遺伝子を持ち、EB ウイルスにて不死化された細胞株で、thymidine kinase (TK)遺伝子の変異をヘテロに持つことで、この遺伝子を指標とした突然変異の検出が可能と

なっている。細胞は 10% (v/v)馬血清を含む RPMI-1640 培地 (Nacalai Tesque)にて培養。

ゲノム不安定性を持つモデル細胞として、ブルーム症候群の原因遺伝子である、DNA の複製・修復に関与するヘリカーゼタンパク BLM をコードする blm 遺伝子をジーンターゲットイングの手法によりホモに破壊した TK6/BLM 細胞株を検討に用いた。

#### ・ヒト iPS 細胞株

ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSCs) は理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。購入した細胞株は 454E2 であった。hiPSCs の培養は、mTeSR1 (STEMCELL Technologies 社) の基礎培地 400mL に、専用のサプリメント (5X Supplement) 100mL を加え、0.1% ペニシリン / ストレプトマイシンを含む培地を調製し、マトリゲル (Corning 社) でコートされたディッシュを使用し、炭酸ガス濃度 5%、温度 37°C の条件下のもと培養を行った。細胞の継代は、細胞を D-PBS (-) で 2 回洗浄後、Dissociation Solution for human ES/iPS Cells 溶液

(ReproCELL 社) を添加し、37°C、炭酸ガスインキュベーターで 5 分程度加温し、hiPSCs のコロニーの周辺が剥がれかけた状態を確認後、さらに D-PBS (-) で 3 回洗浄をおこない、STEMPRO EZPassage (Life Technologies 社) を用いて hiPSCs のコロニーを剪断し、セルスクレーパーにて細胞を細胞塊が細かくならないように剥離し、遊離した細胞を回収した。マトリゲルコートディッシュ上に、適切な希釈割合で細胞塊を播種し、37°C、5%炭酸ガスインキュベーターで一晩培養を行い、翌々日から毎日 1 回、mTeSR1 で培地交換を行った。細胞のクローニングは、Accutase 処理によって iPS 細胞を剥がし、単一細胞になるようにピペッティングをおこない、6 cm ディッシュで数十個/dish

程度のコロニーが出来るように段階希釈し、マトリゲルがコートされた 6 cm ディッシュ上へ細胞を播種した。この時、10 $\mu$ M Y-27632 (和光純薬工業) を mTeSR1 培地に添加した。その後、コロニーが目視で見えるようになるまで培養をおこない、Dissociation Solution for human ES/iPS Cells 溶液を添加し、hiPSCs のコロニーの周辺が剥がれかけた状態を確認後、P10 のピペットマンを用いてコロニーをピックし、マトリゲルがコートされた 24 ウェルプレートへ播種した。その後の継代は、上述と同様の方法にて実施した。

#### B-3-2 DNA の抽出

次世代シーケンサー解析用のサンプル調整を行うため、DNA Extractor WB キット (和光純薬工業) を用いて DNA 抽出を行った。本キットは、フェノールやクロロホルムといった有毒な有機溶媒を用いず、ヨウ化ナトリウムとイソプロパノールにて、細胞より DNA のみを抽出する簡便な方法である。また、核分離を行った後 DNA の抽出を行うため、比較的純度の高い DNA を得ることができる。以下の操作にしたがって、細胞よりゲノム DNA を抽出した。

(細胞の溶解と核分離)

- 1) 凍結保存細胞 1-2 $\times$ 10<sup>6</sup> 個に溶解液を 0.5ml 加えて、チューブを数回転倒混和した。
- 2) 遠心分離 (10K $\times$ g, 4°C, 20 秒間) した後、上清を除いた。
- 3) 再び溶解液を 1ml 加えて、30 秒間激しく攪拌し、遠心分離 (10K $\times$ g, 4°C, 20 秒間) した後、上清を除いた。
- 4) ステップ 3) をもう一度繰り返した。

(核膜の破壊とタンパク変性)

- 5) 酵素反応液 200 $\mu$ l とタンパク質分解酵素 10 $\mu$ l (使用前に酵素 10mg を 0.6ml の滅菌蒸留水に溶解) を加えて混合した。

6) 37°C で1時間反応させた。(途中2~3回軽く振り混ぜた)

7) よう化ナトリウム溶液を 300µl 加えて混合した。

(DNA の精製)

8) イソプロパノールを 0.5ml 加えて、白い綿状の DNA が完全に見えてくるまで混合した。

9) 遠心分離 (10K×g, 室温,10 分間) した後、上清をゆっくり除き、容器をろ紙の上に逆さに置き、器壁に残った溶液を十分に除いた。

10) 洗浄液 A を 1ml 加えて混合し、遠心分離 (10K×g, 室温, 5 分間) した後、上清を除いた。

11) 洗浄液 B を 1ml 加えて混合し、遠心分離 (10K×g, 室温, 5 分間) した後、上清を除いた。

12) DNA 沈殿を風乾し、TE バッファーに溶解させた。

また、一分子シーケンサーを用いた高感度変異検出のためのサンプルとしては、ミトコンドリア DNA をターゲットとして解析を行うため、市販の mtDNA エキストラクターCT キット (WAKO) を使用し、以下のプロトコールに従って抽出を行った。

1. 2-5 x 10<sup>7</sup> 個の細胞を集め、5-10 ml の氷 PBS にて洗浄し、600 x g, 5 分 4°C にて遠心分離し、上清を除いた。..

2. 細胞を 1 ml の Buffer for homogenate に懸濁した。..

3. 細胞を氷冷した dounce tissue grinder にて、5 回ピストルを上下させ、マイルドにホモジナイズした。

4. ホモジネートを 1.5 ml のマイクロチューブに移し、1000 x g 1 分間 4°C にて遠心分離し、核および細胞の破片を沈殿させた。

5. 上清を新しい 1.5 ml のマイクロチューブに移し、10,000 x g 10 分、4°C にて遠心分離し。ミトコンドリアを沈殿させた。

6. 上清を除き、ペレットに DNA Extraction solution I 50µl を加え、ピペッティングにより

懸濁させた。

7. DNA Extraction solution II (A) 50µl および DNA Extraction solution II (B) 50µl を別のマイクロチューブにて混合後上記に加え、ボルテックスミキサーにて混合後、5 分間、氷上で静置した。

8. 75 µl の氷冷した DNA Extraction solution III を加え。ボルテックスミキサーにて混合後、5 分間、氷上で静置した。

9. 4°C にて 12,000 x g 5 分、遠心分離し。上清約 200 µl を新しいマイクロチューブに移した。

10. 300µl の Sodium Iodide Solution を加えて混合し、500µl のイソプロパノールを加えて混合し、DNA を沈殿させた。

11. 室温で 10 分間遠心 (12,000g) した後、上清を除き、1ml の Washing Solution を加え混合した。

12. 室温で 10 分間遠心 (12,000g) した後、上清を除き、この操作を 1 回繰り返した。

13. ペレットを乾燥後、DNA を 20 µl の TE バッファーに溶解し、-20°C にて保存した。

### B-3-3 次世代シーケンサーを用いたシーケンス解析

B-3-3-1 イルミナ社シーケンサーを用いたホールゲノムシーケンス解析

シーケンス用のサンプルは、Illumina TruSeq DNA sample preparation guide に従い、1µg のゲノム DNA を covaris system にて断片化し 300-400bp のインサートサイズを持つライブラリーを作成した。3'または 5'エンドにオーバーハングを持つ二本鎖 DNA フラグメントを End Repair Mix にて blunt エンドに変換して、3'末端に A を一塩基追加し、T を 3'末端に一塩基追加したアダプター配列とライゲーションした。ライゲーションプロダクトのうち約 300-400bp のインサートサイズを持つものを選択し、次のクラスター生成に用いた。こうして

エンリッチした DNA ライブラリーを用い、アダプター配列に相補的プライマーによる PCR にて増幅しシーケンス解析用サンプルとした。Illumina HiSeq2000 シーケンサーにて、Sequencing-by-Synthesis 法にて、数百万のクラスターを持つフローセル内での独自の架橋増幅反応と一塩基伸長ごとのイメージングにより、各クラスターごとの配列情報を読み取った。

読み取ったデータを、BWA ソフトウェアにてヒトリファレンスゲノム UCSC hg19 に対してマッピングした。そして、SNP 等のリファレンスゲノムに対する変化を SAMTOOLS ソフトウェアを用いて解析した。

なお、シーケンス解析に関しては、株式会社アプロサイエンスに委託した。

#### B-3-3-2 1 分子シーケンサーによる変異解析

次々世代シーケンサーとして注目される Pacific Biosciences 社の PacBio RS 1 分子シーケンサーにより、ミトコンドリアゲノムの変異解析を行った。サンプルとしてミトコンドリア 2 本鎖 DNA を準備し、DNA を断片化、SMRTbell アダプター（ヘアピン状のアダプター）を 2 本鎖 DNA の両端に付加した。アダプターの一方の末端には、DNA 合成開始に必要なプライマーが付加されており、PacBio RS ではシーケンスセル（SMRT Cell）内において、1 分子の DNA ポリメラーゼは、ライブラリーの SMRTbell アダプターに結合し、DNA 配列を順に合成する。合計 150,000 の ZMW(穴)があり、この中で、1 分子の DNA ポリメラーゼによる DNA 合成を行う。右図は、ZMW の拡大図です。穴の下方に固定されているものが、1 分子の DNA ポリメラーゼが ZMW の底部に固定され、ヌクレオチドが取り込まれるときに、リン酸についた蛍光が自動的に切り離され、そのと

きレーザーで励起されて、A,T,G,C に特徴的な波形データが得られる。これらの反応をリアルタイムに継続的に動画として記録し、配列を解析する。

#### B-3-4 遺伝的不安定性モデルとしての BLM 欠損 TK6 細胞の利用

ブルーム症候群の原因遺伝子である BLM を、相動的組み換えを利用して薬剤耐性遺伝子と置き換えることにより破壊した TK6 BLM-TSCER2 株を国立医薬品食品衛生研究所、変異遺伝部より入手し、ホールゲノムシーケンス解析データを親株の TK6 と比較することにより、遺伝的不安定性の検出の可能性を検討した。シーケンス解析に関しては、株式会社アプロサイエンスに委託した。

#### B-3-5 タンパク質プロファイル情報提供のための可視化ツールとしての Proteome Map ソフトウェアの開発

LC-MS/MS を用いたショットガンプロテオミクス解析より得られた生データを用い、検出されたペプチドをイメージデータに変換して 2 次元マップ上に記載するとともに、MS/MS データやタンパク同定結果に関する情報をマップ上にて提供するためのソフトウェアとして「ProteoMap Online」の開発を行った。ソフトウェアのプログラミングに関しては、インド Rushmore 社に委託した。

#### B-3-6 倫理面への配慮

使用した iPS 細胞は、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会での審査を経て、理化学研究所細胞バンクより入手したものを使用した。

#### B-4 遺伝的安定性評価ツールとしての次世代シーケンサーの性能評価

#### B-4-1 標準ゲノム DNA の調製

特定のゲノム領域上に変異をもつ細胞から得られたゲノム DNA、あるいは人工的に変異を導入したゲノム DNA と、それら変異箇所に変異がないゲノム DNA とを混合し、それらアレール比率が正確に測定されたゲノム溶液を標準ゲノム DNA とした (Table 8) (Horizon Diagnostics 社)。

#### B-4-2 次世代シーケンサーによる解析

ゲノム DNA の品質を電気泳動および濃度測定により確認後、ゲノム DNA を 4 つに分け、それぞれ独立して数百 bp に物理的に断片化を行い、二本鎖 DNA の両末端にアダプターを付加したフラグメントライブラリーを作製した。Sureselect Target Enrichment システム (Agilent Technologies 社) を用いてターゲット領域を濃縮し、タグ配列を有するプライマーを用いて PCR 増幅を行い、シーケンスの鋳型となる DNA ライブラリーを作製した。イルミナ社シーケンサーを用いて、シーケンスを行い、シーケンサー付属のソフトウェアにより塩基配列 (リード配列) を取得し、得られたシーケンスデータを参照配列にマッピングした。それら標準ゲノム DNA のマッピングは、各ライブラリーあたり 40Gbase, 30Gbase, 15Gbase 程度のシーケンスデータを用いて行った (3 種のシーケンス量 × 4 種のライブラリー)。さらにそれら標準ゲノム DNA のマッピングをすべてまとめた後、160Gbase, 120Gbase, 80Gbase, 40Gbase 程度のデータを取得して解析を行った (4 種のシーケンス量 × 1 種のライブラリー)。情報処理については、標準ゲノム DNA 中の塩基比率が保証されている塩基位置について、各マッピング結果から標準塩基と変異塩基のリード数のカウントを行った。

#### B-4-3 リードマッピングと塩基頻度カウント

##### B-4-3-1 リードクリーニング

シーケンスにより得られた塩基配列 (以下リード) から、変異検出に影響を及ぼすと思われる低品質領域を除去した。まず、シーケンスアダプター配列由来の領域がリードの 3'末端にある場合は除去し、続いて塩基品質が低い領域がリードの 3'末端にある場合はその領域を除去した。なお、除去後のリード長が短くなり過ぎた場合はリード全体を破棄した。さらに、除去後のリードに一定の割合の低品質塩基が存在する場合はリード全体を破棄した。上記の処理は、ペアリードのリード 1 とリード 2 のそれぞれに対して行った。最後に、除去ならびに破棄後のリードの内、対応するリード 1 とリード 2 が存在するペアを抽出し、それをクリーンリードとした。

##### B-4-3-2 マッピング

クリーンリードを参照配列にマッピングし、マッピング結果を変異検出に適した状態に調整した。まず、クリーンリードを参照配列にマッピングした。次に、各マッピング結果のダウンサンプリングを実施した。ダウンサンプリングは、各マッピング結果を 40Gbase, 30Gbase, 15Gbase 相当のデータとなるようにダウンサンプリングした。また、全てのマッピング結果をひとつにまとめ、160Gbase, 120Gbase, 80Gbase, 40Gbase 相当のデータとなるようにダウンサンプリングした。さらに、ダウンサンプリングしたマッピング結果のうち、アライメントの疑わしい領域に対して再アライメントを実施し、再アライメントしたマッピング結果を用いて変異塩基の検出を行った (プレコール)。最後に、再アライメント結果から、参照配列と各位置にアライメントされたリードの塩基配列を比較し、シーケンス時に得られた塩基品質をより正確な値へと再調整した。なお、塩基品質の再調整は、参照配列とリードの塩基

配列の一致性に基づき処理が行われた。再アライメントしたマッピング結果から検出した変異塩基リスト（プレコール）ならびに既知変異データ（dbSNP など、存在する場合のみに使用）を利用し、参照配列とリードの塩基配列が一致する領域を判断した。

#### B-4-3-3 塩基頻度の算出

サンプリングした各マッピング結果から、参照配列の既知変異位置におけるシーケンスされた塩基種類の頻度を数え上げた。短い挿入・欠失配列がある場合も同様に数え上げた。その内、最も頻度の高かった塩基種類と二番目に頻度の高かった塩基種類に関してはピックアップし、一覧表内の独立したカラムにまとめた（データ省略）。また、各検体の変異塩基の頻度一覧表を横並びにすることで、検体間比較に使用できる一覧表を作成した（データ省略）。

#### B-4-4 倫理面への配慮

ヒト由来の生体試料に関しては、試料提供者に一切不利益および危険性が伴わない、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに採取された試料を用いた。また、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について国立医薬品食品衛生研究所・研究倫理委員会による審査・承認を得た上で研究を実施した。

#### B-5 遺伝的安定性評価リファレンスとしての日本人ゲノムの *de novo* 配列決定

国立成育医療研究センター倫理委員会において承認を得た後、ポスター掲示等により検体提供のボランティアを募った。ボランティアの方々からは 3 日以上禁欲期間後に精液を採取、リサーチコーディネーター宛てに提出していただいた。提供者にはできる限り 3 回の採取と提供、さらに採取日、先祖の国籍、先祖の出身地、実子がいる場合は全ての実子の年齢につ

いて記入をお願いした。実験に直接関与しないリサーチコーディネーターが連結不可能匿名化を行い、凍結した検体と回答情報を実験担当者に渡した。

1 回目の提供 6 検体(JOM001, JOM002, JOM003, JOM004, JOM005, JOM006)全てに対して DNA 抽出を行った。精液 250  $\mu$ L に 10 mL の PBS を加えて 10 秒間激しく攪拌し、2000 $\times$ g にて 10 分間遠心した後、約 1 ml を残してデカンテーションした。攪拌後、2 ml のチューブに移し、0.5 ml の PBS を加えてさらに攪拌し、遠心機の最高速度で 2 分間遠心、マイクロピペットを用いて注意深く液体を取り除き、Macherey-Nagel 社製の lysis buffer 325  $\mu$ L, 65 $^{\circ}$ C, 約 10 時間の Proteinase K 処理によりタンパク質分解を行った。その後の処理は Macherey-Nagel 社製のイオン交換樹脂カラムである NucleoBond AXG 100 を用い、説明書の指示に従い、その後の処理に用いるゲノム DNA を精製した。

アンケートの回答無関係に、6 検体から無作為に 5 検体を選び、Illumina 社製のビーズアレイ HumanOmni2.5-8 BeadChip を用いて SNP タイピングを行った。1000 人ゲノムデータから、全体と比較して日本人に稀な SNP を 17,201、欧州人と比較して日本人に稀な SNP を 1531、東アジア人と比較して日本人に稀な SNP を 4483、東アジア人にはまれだが日本人に比較的多い SNP を 827 選び、5 検体分のデータと比較した。

また、ヒト第 18 番染色体から 4000 の SNP を選び、主成分分析を行った。1000 人ゲノムから番号が 10 の倍数となっているヨーロッパ人(CEU)4 名、アフリカ人(YRI)4 名、中国人(CHB)4 名、日本人(JPT)4 名を選び、これらに今回得られた 5 検体のデータを加えた合計 21 人分のデータを用いて解析を行った。実際の解

析は EIGENSTRAT 6.0.1 を Red Hat enterprise Linux 6.1 (Linux 2.6.32) にインストールしたものを用いた。また、SNP タイピングの結果は、最終的に得られた配列の検証にも用いた。

SNP 解析を行った 5 人から JOM005 を選び、Illumina HiSeq のプラットフォームでシーケンシングを行うためのライブラリ作製を行った。まず、ゲノム DNA をアコースティックソルビライザー Covaris を用いて物理的に数百 bp に断片化し、酵素処理により両末端の平滑化、およびリン酸化を行った。サイズ選別後に 3'-dA 突出末端処理を行い、インデックス付きアダプタを付加することで 3 種類のペアエンド・ライブラリを作成した。試薬は Illumina TruSeq DNA PCR-Free LT Sample Prep Kit を用いた。メイトペア・ライブラリは Illumina Nextera Mate Pair Sample Prep Kit を用い、最長 9 kb の 3 種類のライブラリを作製した。片側のリード長は 150 nt とした。第 3 世代シーケンサは、タカラバイオ社が保有する PacificBio Science 社製 PacBio RS II を用いた。同検体から得られたゲノム DNA を AMPure XP を用いて精製後、g-TUBE により約 20 kb に断片化、両端を平滑化し、SMRTbell 一本鎖アダプタをライゲーシオンすることでライブラリを作製した。パルスフィールド電気泳動によってサイズ分布を確認の上、BluePippin を利用してサイズ選別、2 分して S1 および S2 の 2 ライブラリを作製した。シーケンシングには P6/C3 試薬を用いた。その他 5 サンプル (JOM001, JOM002, JOM003, JOM004, JOM006) についても平均インサート長が 360 bp 程度のペアエンド・ライブラリを作製し、HiSeq にて片側 125 nt のシーケンシングを行った。

得られたリードデータは FASTQ 形式で出力し、独自のスクリプトによりフォーマットチェックとフィルタリングを行った後、Cutadapt 1.7.1 により、インサート長が長い場合に 3'末

端に現れるアダプタ配列を取り除いた。さらに独自のスクリプトを用い、5'および3'両端の低品質塩基(Q スコア 16 未満)を取り除き、対の少なくとも一方が 36 nt 以上のリードペアをその後の解析に用いた。

3 つのペアエンド・ライブラリ、また 3 つのメイトペア・ライブラリの正確なインサート長を推定する目的で、まずミトコンドリア DNA のゲノム配列を決定した。決定には、ヒトとマウスで保存されている配列 5'-CCG TGC AAA GGT AGC ATA ATC ACT TGT TCC T-3'のみを利用し、本研究グループが独自に開発した DNA 配列アセンブラ GrepWalk 0.6 を用いた (<http://epigenetics.nrichd.ncchd.go.jp/grepwalk/>)。完全決定された 16,570 bp の JOM005 ミトコンドリア DNA をリファレンスとし、今回得られたペアエンド・ライブラリおよびメイトペア・ライブラリのリードデータを BWA 0.7.12 を用いてマッピングし、各ライブラリにおける平均インサート長およびその標準偏差を決定した。プログラムおよびスクリプトは C または Perl を用いて記述した。

本研究におけるデータ処理は主に、国立成育医療研究センターが所有する 35 ノードからなる計算機クラスター Hitachi HA8000/RS210 を用いた。また、本研究の中心となる大規模な *de novo* アセンブリを遂行するため、4 テラバイトの大規模メモリを搭載する計算機 Dell PowerEdge R920 を新規に購入した。最初、OS として Fedora 21 (Linux 3.17.4) をインストールして運用を開始したが、*de novo* アセンブリのためのプログラム ALLPATHS-LG 52188 が動作しなかったため、後に OS を CentOS 7.1 (Linux 3.10.0) に入れ替えた。アセンブリは主に ALLPATHS-LG を用いて行ったが、他にも SOAPdenovo2 r240, ABySS 1.5.2, Trinity r20140413p1, GrepWalk 0.6 を組み合わせて行った。PacBio RS II から得られたロングリード

は BLASR および PBjelly を用いて処理した。

## **B-6 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**

### **B-6-1 ヒト iPS 細胞**

ヒト iPS 細胞株 253G1 は、理化学研究所バイオリソースセンターより入手した。ヒト iPS 細胞の培養は、37°C、5%CO<sub>2</sub>/95%air 条件下で行った。培地は mTeSR1 (STEMCELL Technologies) を使用し、継代翌日を除いて毎日交換を行った。60 mm ディッシュ (BD Bioscience) を、50 µg/ml Matrigel (BD Bioscience) を含む DMEM nutrient mixture F-12 HAM 培地 (Sigma-Aldrich) でコートし、培養に用いた。細胞を、CTK 溶液 (リプロセル) 処理し、StemPro EZPassage (Life Technologies) とセルスクレーパー (Iwaki) で剥離させることにより、継代を行った。

### **B-6-2 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 (QIAGEN) 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、ELOS 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-6-3 miRNA 安定発現ヒト iPS 細胞株の分離**

miRNA 安定発現ヒト iPS 細胞株は、以下に示す方法により、miRNA 発現用レンチウイルス粒子 (BiOSETTIA) を導入することにより得た。ヒト iPS 細胞株 253G1 を、Matrigel コートした 24 well 細胞培養プレートに細胞塊として、 $4 \times 10^4$  cells/well となるように播種した。翌日、6 µg/ml hexadimethrine bromide (Sigma-Aldrich) を含む mTeSR1 で、37°C、15 分間培養した。続いて、それぞれの miRNA レンチウイルスを 50 µl (MOI=50) ずつ添加し、培養 24 時間後に培地交換を行った。その後、70 ~ 80%コンフルエントになるまで培養し、培地交換は mTeSR1 を用いて毎日行った。細胞が 70 ~ 80%コンフルエントに達した well は、CTK 溶液を用い、Matrigel コートした 6 well 細胞培養プレートに細胞塊として継代し、未分化 iPS 細胞と同様の方法で培養した。継代 3 日後に、1 µg/ml puromycin を含む mTeSR1 培地に交換し、37°C で 16 時間培養することでウイルスベクターが導入されていない細胞を死滅させた。ウイルスベクターの導入は、puromycin 耐性遺伝子がコードするタンパク質に付加されている RFP の発現を、蛍光顕微鏡 (オリンパス, IX71) で U-MWIG3 フィルターを用いて観察することにより確認した。

### **B-6-4 miRNA 定量 PCR**

iPS 細胞から抽出した miRNA を含む total RNA を、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用い、2 ステップで行った。まず、第一ステップである cDNA の作製に用いる Master Mix は以下のよ

うに調整した。

100 mM dNTPs (with dTTP)	0.15 $\mu$ l
Multi Scribe Reverse Transcriptase	1.0 $\mu$ l
10 $\times$ Reverse Transcription Buffer	1.5 $\mu$ l
RNase inhibitor (20 U/ $\mu$ l)	0.19 $\mu$ l
<u>Nuclease-free water</u>	<u>4.16 <math>\mu</math>l</u>
Total	7.0 $\mu$ l / sample

1.5 ml チューブに、2 ng/ $\square$ l に調製した total RNA 5  $\mu$ l および Master Mix 7  $\mu$ l を加え、よくピペッティングし、8 連チューブに加えたあと、RT Primer 3  $\mu$ l を加えてよく混ぜた。その後、Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて cDNA を作成した。サーマルサイクラーの設定条件を以下に示す。

サーマルサイクラーの設定条件 (逆転写)

ステージ	反応温度	反応時間	サイクル数
1	16°C	30 min	1 cycle
2	42°C	30 min	1 cycle
3	85°C	5 min	1 cycle

反応終了後、第二ステップである定量 PCR を行う際に用いる Master Mix は以下のように調整した。

TaqMan 2 $\times$ Universal PCR MasterMix, No Amp Erase UNG (Applied Biosystems)	10.0 $\mu$ l
20 $\times$ TaqMan RNA Assay mix	1.0 $\mu$ l
cDNA	1.33 $\mu$ l
<u>Nuclease-free water</u>	<u>7.67 <math>\mu</math>l</u>
Total	20.0 $\mu$ l / well

MicroAmp Optical 96 well Reaction Plate (Applied Biosystems) によくピペッティングした Master Mix を 20  $\mu$ l ずつ分注した。同様に、

Non-template control として Master Mix に Nuclease-free water を加えたものをプレートに分注した。プレートは MicroAmp Optical Adhesive Film でシールし、2000 rpm で 2 分間遠心分離を行った。その後、PCR7300 System を用いて定量 PCR を行った。それぞれの miRNA の発現量を補正するために、内部標準として 18S rRNA の発現量を測定した。サーマルサイクラーの設定条件を以下に示す。

サーマルサイクラーの設定条件 (PCR)

ステージ	反応温度	反応時間	サイクル数
1	95°C	10 min	1 cycle
2	94°C	15 sec	40 cycles
	60°C	1 min	

#### B-6-5 ヒト iPS 細胞の神経細胞分化誘導

ヒト iPS 細胞を 5 日間培養後、10  $\mu$ M Y-27632 (Wako) を添加し、1 時間培養した。Accutase (Gibco) で細胞をシングルセルにし、Matrigel コートした 24 well プレート (BD Bioscience) 上に  $3.6 \times 10^4$  cells/well で播種した。培地は 10  $\mu$ M Y-27632 を添加した mTeSR1 を用いて 24 時間培養した。その後、コンフルエントになるまで毎日 mTeSR1 で培地交換し、Chambers ら (*Nat Biotechnol.* 2009; 27: 275-280.) の方法に従って分化誘導を行った。分化誘導プロトコルを Table 20 に示す。神経細胞への分化を確認するため、神経マーカー遺伝子である PAX6, SOX1, NCAM1, TH, TUBB3 および NES の発現量を定量 PCR で測定した。各遺伝子の発現量は GAPDH の発現量で補正した。RNA 抽出は、RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて行った。

#### B-6-6 ヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導

ヒト iPS 細胞を神経細胞分化誘導時と同様の手順でシングルセルに分離し、Matrigel コー

トした 6 well プレート (BD Bioscience) に  $2.0 \times 10^5$  cells/well となるよう播種した。培地は  $10 \mu\text{M}$  Y-27632 を添加した mTeSR1 を用い、24 時間培養した。その後、コンフルエントになるまで毎日培地交換し、Lian らの方法 (*Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109: 1848-1857.) に従って分化誘導を行った。分化誘導プロトコルを Table 21 に示す。心筋細胞への分化を確認するため、心筋マーカー遺伝子である TNNT2, GATA4, NKX2.5 および MYH6 の発現量を定量 PCR で測定した。各遺伝子の発現量は GAPDH の発現量で補正した。RNA 抽出は、RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて行った。

#### B-6-7 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  $37^\circ\text{C}$  , 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 (QIAGEN) を用いて行った。

#### B-6-8 定量 RT-PCR

QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて行った。

RT Mix	0.25 $\mu\text{l}$
Probe RT-PCR Master Mix	12.5 $\mu\text{l}$
100 $\mu\text{M}$ Forward primer	0.1 $\mu\text{l}$
100 $\mu\text{M}$ Reverse primer	0.1 $\mu\text{l}$
20 $\mu\text{M}$ Taqman	0.125 $\mu\text{l}$
<u>Nuclease-free water</u>	<u>6.93 <math>\mu\text{l}</math></u>
Total	20 $\mu\text{l}$ / well

MicroAmp Optical 96 well Reaction Plate (Applied Biosystems) に希釈した RNA 5  $\mu\text{l}$  を加

えた後、Master Mix 20  $\mu\text{l}$  を加え、よくピペッティングした。プレートは MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) でシールし、2000 rpm で 2 分間遠心分離を行った。その後、PCR7300 System (Applied Biosystems) を用いて定量 RT-PCR を行った。サーマルサイクラーの設定条件を以下に示す。

#### PCR サーマルサイクラーの設定条件

ステージ	反応温度	反応時間	サイクル数
1	$50^\circ\text{C}$	30 min	1 cycle
2	$95^\circ\text{C}$	15 min	1 cycle
3	$94^\circ\text{C}$	15 sec	40 cycles
	$60^\circ\text{C}$	1 min	

反応終了後、3~15 サイクルの間に検出されたシグナルからベースラインを設定し、これをもとに増幅が指数関数的に起こる領域でシグナルの閾値を設定した。シグナルの閾値に到達するサイクル数 (Threshold Cycle : Ct 値) を縦軸に、初期の RNA 量の対数を横軸にプロットし、検量線を作成した。目的の遺伝子サンプルについても、Ct 値を求めることにより検量線からサンプル中の目的の RNA 量を算出した。

#### B-6-9 倫理面への配慮

ヒト iPS 細胞を用いる場合は、国立医薬品食品衛生研究所「研究倫理審査委員会規程」を遵守した上で研究を実施した。遺伝子組換え実験に関しては、国立医薬品食品衛生研究所「遺伝子組換え実験安全管理規則」に基づき、遺伝子組換え実験計画書の承認を得た上で研究を実施した。

### C. 研究結果

#### C-1 新規免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験法の開発

### C-1-1 BRG, BRG-nu および BRG-hr マウスにおけるヒト細胞生着能の定量的評価

移植後16週における BRGマウスのHeLa細胞単体移植あるいはマトリゲルとの混合移植でのTPD50はそれぞれヌードマウスの 1/7 ( $1.00 \times 10^4 / 6.83 \times 10^5$ ), 1/2157 ( $3.2 \times 10^1 / 6.83 \times 10^5$ ) であり, BRG-nu マウスでは 1/83 ( $1.78 \times 10^3 / 1.47 \times 10^5$ ), 1/2163 ( $6.8 \times 10^1 / 1.47 \times 10^5$ ) であった. また, 移植後10週における BRG-hr マウスのHeLa細胞単体移植あるいはマトリゲルとの混合移植でのTPD50はそれぞれヌードマウスの 1/10 ( $3.17 \times 10^4 / 3.17 \times 10^5$ ), 1/682 ( $4.65 \times 10^2 / 3.17 \times 10^5$ ) であった. マトリゲルによる生着性増強効果は 3系統間で26~317倍の開きがあった (Table 1) .

### C-2 幹細胞の *in vitro* 培養工程における遺伝子発現の動態解析による品質評価技術の開発

#### C-2-1 A3B 遺伝子型による転移可能な LINE-1s の発現解析

A3B 野生型ホモ (Ins/Ins) 由来の hMSCs (Yub633) 及び欠失型ホモ (Del/Del) 由来の hMSCs (Yub637b) における転移可能な LINE-1s の発現解析を行うため, まず, ヒトゲノム配列 (GRCh38) に対して, *in vitro* で転移活性が確認されている LINE-1 $_{\beta}$ -thal (L1 $_{\beta}$ -thal; Genbank Accession No.AF148856), LINE-1 $_{RP}$  (L1 $_{RP}$ ; AF149422) 及び LINE-1.3 (L1.3; L19088) 配列の BLAST 検索を行い, ヒトゲノム配列中に存在する転移可能な LINE-1s 配列領域を予測した. Fig. 2 に BLAST 検索で予想された L1 $_{\beta}$ -thal, L1 $_{RP}$  及び L1.3 様配列領域を示す. GRCh38 中の L1 $_{\beta}$ -thal, L1 $_{RP}$  及び L1.3 様配列はそれぞれ, 58166 個, 58195 個, 58490 個であった. RNA シークエンス解析により取得した Yub633 (Ins/Ins) 及び Yub637b (Del/Del) から抽出した total RNA の配列データを GRCh38 にマッピングし, BLAST 検索により予想された L1 $_{\beta}$ -thal,

L1 $_{RP}$  及び L1.3 様配列にマッピングされた (Fig. 3) リード数をカウントすることで, 転移可能な LINE-1s 配列の発現量を算出した. Figs. 4-6 にそれぞれ L1 $_{\beta}$ -thal, L1 $_{RP}$  及び L1.3 様配列にマッピングされた RNA 発現解析の一部を示した. 58166 個の L1 $_{\beta}$ -thal 様配列の normalized read count (各検体の総取得リード数を考慮し補正を行った検体間比較用の予想リード数) の合計は Yub633 (Ins/Ins) が 241.0167, Yub637b (Del/Del) が 249.5887 であった. また, 58195 個の L1 $_{RP}$  様配列の normalized read count の合計は Yub633 (Ins/Ins) が 240.8315, Yub637b (Del/Del) が 248.8003 であった. 58490 個の L1.3 様配列の normalized read count の合計は Yub633 (Ins/Ins) が 240.8571, Yub637b (Del/Del) が 249.2632 であった.

LINE-1s の変異の中で塩基の欠失はフレームシフトを起こし, LINE-1s の転移活性に負の影響を与えると考えられる. 本研究では転移活性の残った LINE-1s の発現解析を行うため, LINE-1 全長に占める割合 (qcov) が 99%以上のものを抽出し, さらに LINE-1 との一致度 (pid) がそれぞれ 95%未満, 95%以上 96%未満, 96%以上 97%未満, 97%以上 98%未満, 98%以上 99%未満, 99%以上における normalized read count の量を解析した (Fig. 7). 塩基配列の一致度 95-98%までの LINE-1s の発現は Yub633 (Ins/Ins) に比べて Yub637b (Del/Del) の方が高く, 98-100%でそれが逆転していたが, 全体として両者における LINE-1s の発現量に大きな違いは見られなかった.

#### C-2-2 hMSCs の未分化性と LINE-1s 発現との関連について

これまで iPS 細胞やがん細胞で LINE-1s の発現が確認されていたが, hMSCs での発現については報告がなかった. そこで, ヒト iPS 細胞 (201B7, 253G1, 409B2, R-1A, R-2A, R-12A,

Ai100, Ai103, mc-iPS, TiC), HeLa 細胞を陽性対照とし, Lonza 社から購入した骨髄由来 hMSCs (8F3211, 8F3434, 8F3560) における LINE-1s 発現を qRT-PCR により調べた (Fig. 8). その結果, 解析した hMSCs のすべてのロットで LINE-1s は発現しており, その発現量は iPS 細胞や HeLa 細胞以上であった.

次に, *in vitro* での細胞培養による LINE-1s 発現への影響を調べるために, 継代数 3 (P=3) から継代数 11 (P=11) まで hMSCs を培養し, 細胞数, 増殖速度及びその時の LINE-1s の発現を解析した (Fig. 9). 細胞の増殖速度は徐々に低下しており (Figs. 9A and B), 一方 P=4, 6, 8, 10 における LINE-1s の発現は P=4 から P=6 で大きく低下し, その後はロットによって異なっていたが, 平均して低下していた (Figs. 9C and 9D).

さらに, 細胞の分化による LINE-1s 発現への影響を調べるために, 脂肪分化培地で hMSCs を培養することにより hMSCs を脂肪に分化させた (Fig. 10A). 陰性対象として増殖培地で培養した hMSCs を用いた. BODIPY Lipid Probes により脂肪球を蛍光染色し (Fig. 10B), hMSCs 3 ロットにおける脂肪球蛍光面積を比較した (Fig. 10C). また, 脂肪分化培地及び増殖培地で培養した hMSCs 3 ロットにおける LINE-1s 発現を qRT-PCR で調べたところ, 脂肪分化させた hMSCs で LINE-1s の発現が低下していた (Fig. 10D).

### **C-3 次世代シーケンサーを用いた細胞の遺伝的安定性評価指標の開発**

#### **C-3-1 ホールゲノムシーケンズデータによる細胞の遺伝子増幅およびリアレンジメントの解析**

これまでに得られた, HL60 細胞および TK6 細胞のホールゲノムシーケンズデータを用い, これら細胞における遺伝子増幅および染色

体転座のシーケンズレベルでの詳細な解析を行った.

まず, HL60 細胞においては, 8 番染色体の *c-myc* 領域における複雑な遺伝子増幅と染色体のリアレンジメントに関して, CGH アレイを用いた解析から転座予想部位の同定を行ったが, このデータを元にして, WGS データのアラインメントを行うことにより, 転座点の配列情報と再配列の様式に関して確認を行った.

Fig. 11 に示した各増幅単位の切断部位の予想配列 (hg18 由来) に相当する hg19 でのリファレンスシーケンズを元に, 転座リファレンス配列を合成した. この際, これまでの検討から, 融合部位に余分な配列を含む場合があったため, 各セグメント間に 10 個程度の未知塩基 (N) を人為的に挿入した配列を合成し, この配列をリファレンス配列として WGS データのアラインメントを行った.

その結果, Fig. 12 に示すようにこの配列に相補的なリードのアラインメントが得られたが, 配列上で部分的に高頻度のアラインメントが得られている箇所が複数あり, これらは, LINE1 等のゲノム上の単純繰り返し配列に由来することがわかった. 通常のアラインメントにおいては, これら繰り返し配列は, ゲノム上に均一に分散しているために結果として, 平均化して元来のコピー数 (2) を反映した冗長度がいずれの部位でも得られるが, 特定の部分的な配列のみを取り出してアラインメントをした場合には, 全ゲノム上の繰り返し配列由来のリードが集中して張り付くため, 見かけ上極端に冗長度が高い部位となって現れることになる. これは元々のコピー数を反映するものではなくアラインメント上のアーティファクトであるため, 類似の解析を行う場合には注意が必要であることがわかった.

リファレンス配列にアラインメントされた