

Fig. 31 miRNA 過剰発現 iPS 細胞作製のために用いたレンチウイルス粒子

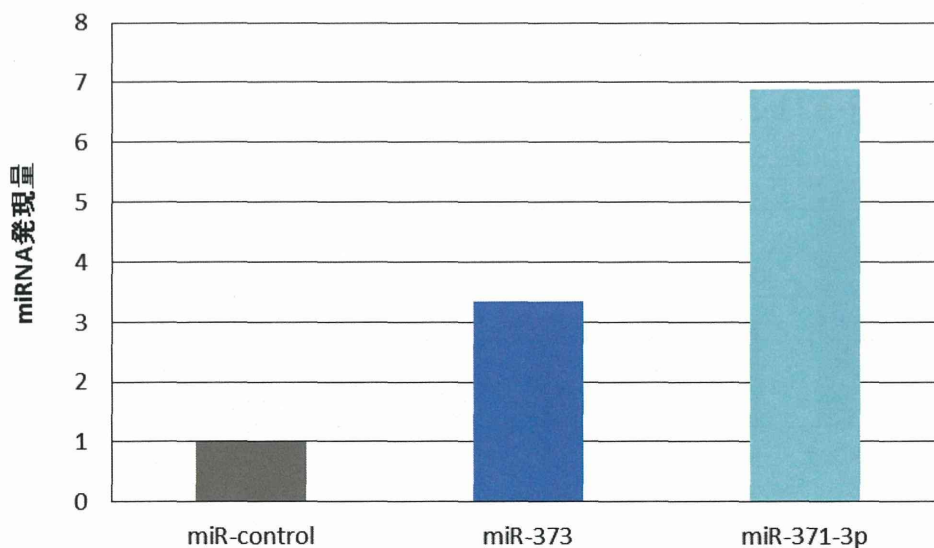
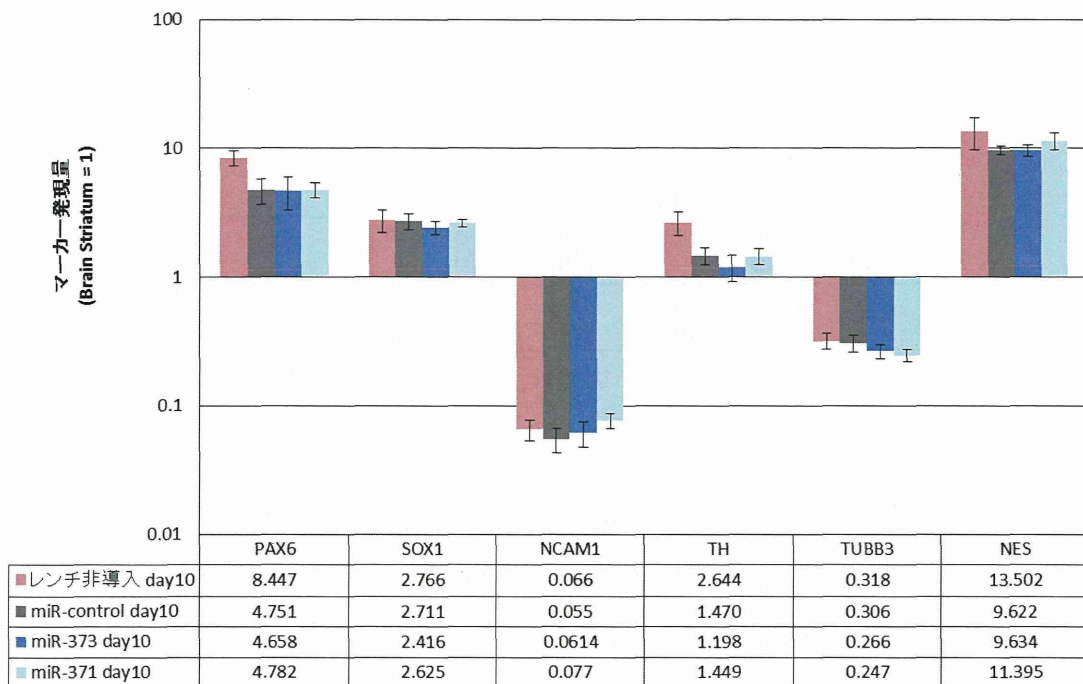


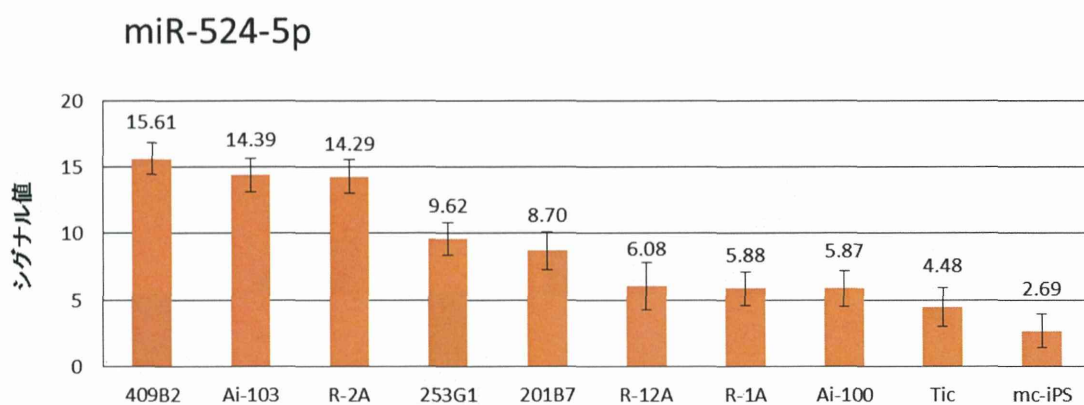
Fig. 32 miR-373 および miR-371miRNA 過剰発現 iPS 細胞の miRNA 発現量

レンチウイルスを感染させることにより，miR-373 および miR-371-3p を過剰発現させた 253G1 を得た．この細胞から miRNA を含む total RNA を抽出し，定量 PCR で miRNA 発現量を測定した．発現量は 18S rRNA の発現量で補正した．縦軸に control での発現を 1 としたときの miRNA 発現量，横軸に過剰発現させた miRNA を示した．



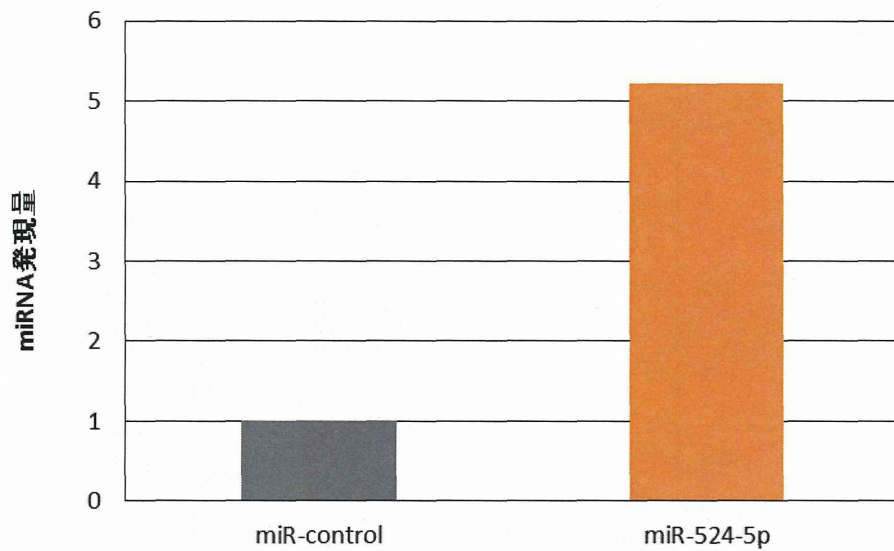
**Fig. 33 miRNA 過剰発現 iPS 細胞の神経分化誘導後における神経マーカー遺伝子発現量**

miR-373 および miR-371 を過剰発現させた iPS 細胞を神経細胞分化プロトコールに従って 10 日間培養した後、細胞を回収、RNA を抽出した。上記の神経マーカー遺伝子 6 種類の定量 PCR を行い、発現量は *GAPDH* で補正した。Standard sample としてヒト脳線条体 (human brain striatum) の total RNA を用いた。縦軸に human brain striatum での発現量を 1 としたときの各マーカー遺伝子の発現量、横軸に各マーカー遺伝子を示した。データは平均値±SEM ( $n=5$ ) で示した。



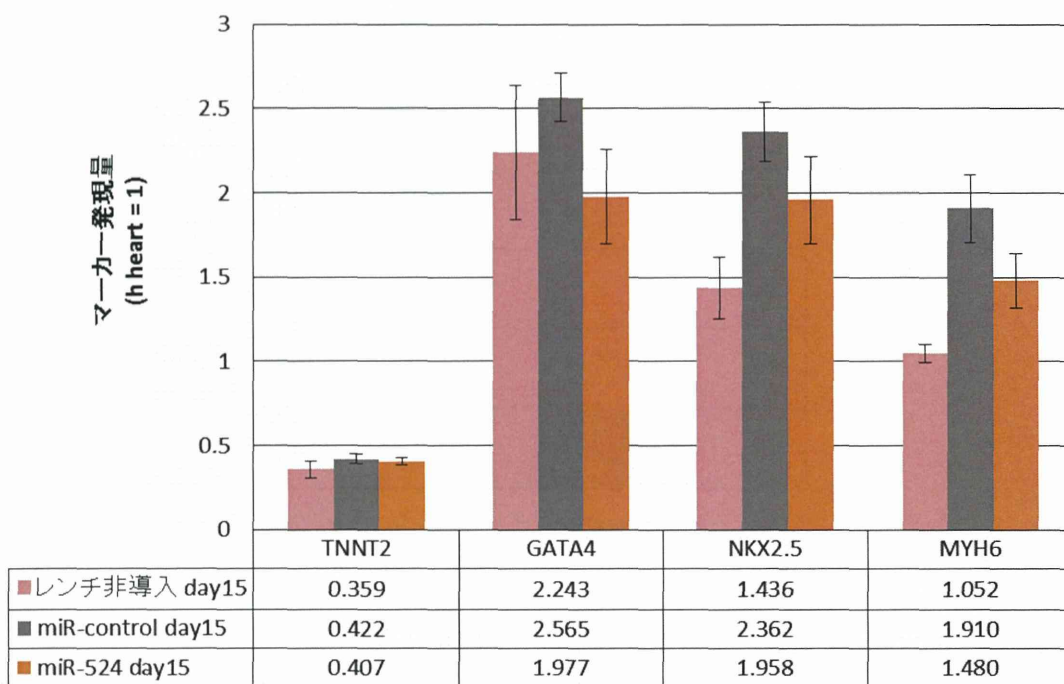
**Fig. 34 中胚葉分化プロペンシティ予測マーカーmiRNAの発現量**

縦軸にマイクロアレイ解析から得た遺伝子発現シグナル値, 横軸にヒト iPS 細胞株を示した。データは平均値±SEM ( $n=6$ ) で示した。



**Fig. 35 miR-524-5p 過剰発現 iPS 細胞の miRNA 発現量**

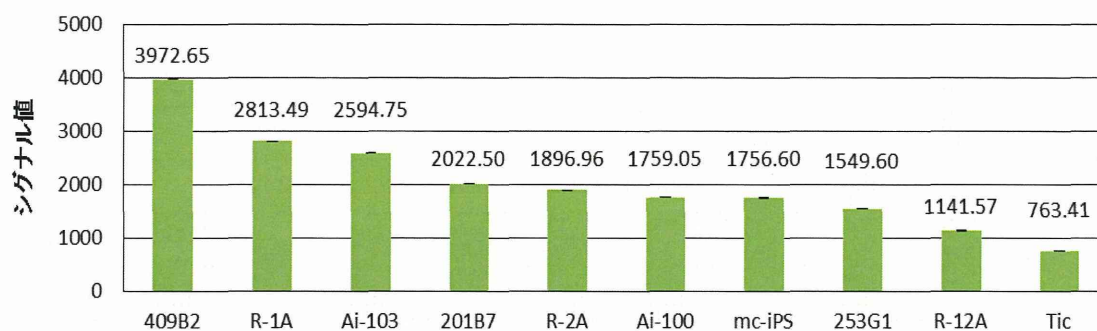
レンチウイルスを感染させることにより，miR-524-5p を過剰発現させた 253G1 を得た．この細胞から miRNA を含む total RNA を抽出し，定量 PCR で miRNA 発現量を測定した．発現量は 18S rRNA の発現量で補正した．縦軸に control での発現を 1 としたときの miRNA 発現量，横軸に過剰発現させた miRNA を示した．



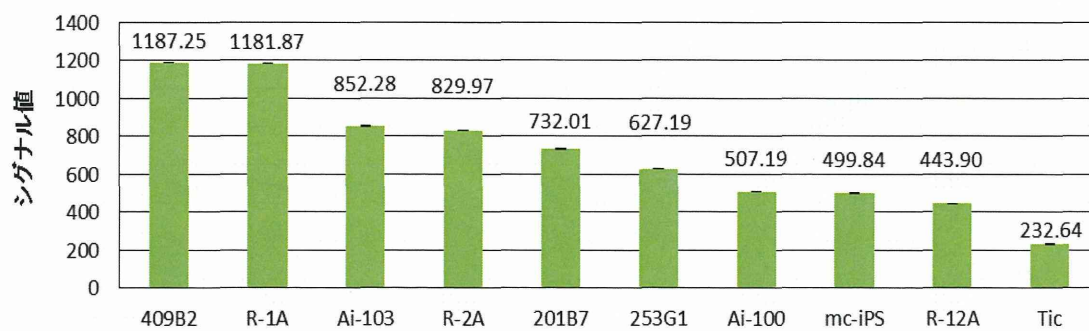
**Fig. 36 miRNA 過剰発現 iPS 細胞の心筋分化誘導後における心筋マーカー遺伝子発現量**

miR-524-5p を過剰発現させた iPS 細胞を心筋細胞分化プロトコールに従って培養した後、細胞を 15 日目に回収、RNA を抽出した。上記の心筋マーカー遺伝子 4 種類の定量 PCR を行い、発現量は *GAPDH* で補正した。Standard sample として human heart の total RNA を用いた。縦軸に human heart での発現量を 1 としたときの各マーカー遺伝子の発現量、横軸に各マーカー遺伝子を示した。データは平均値±SEM ( $n=3$ ) で示した。

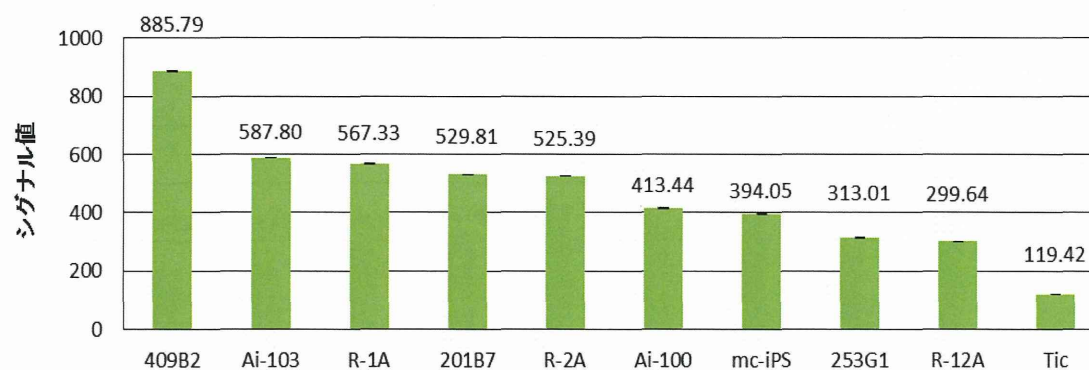
### miR-4739



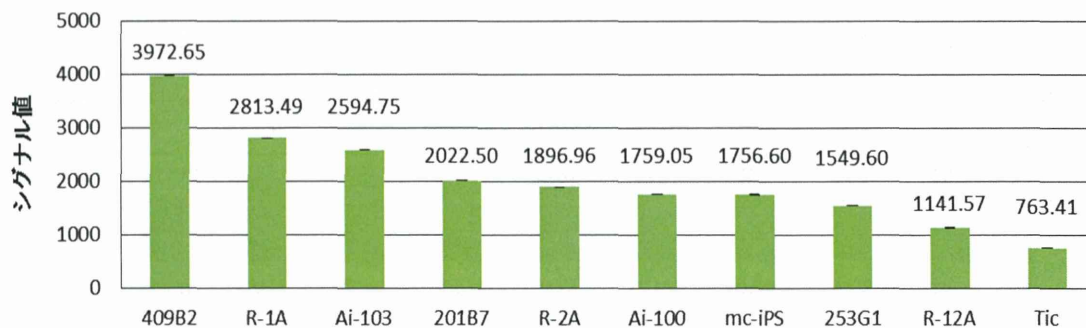
### miR-4505



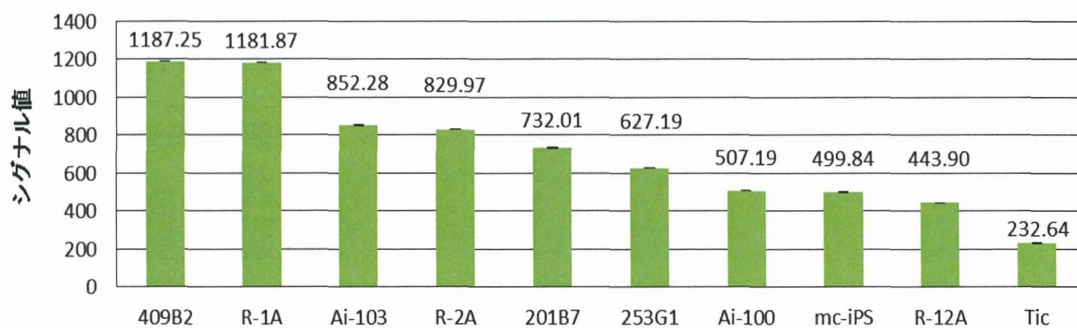
### miR-4521



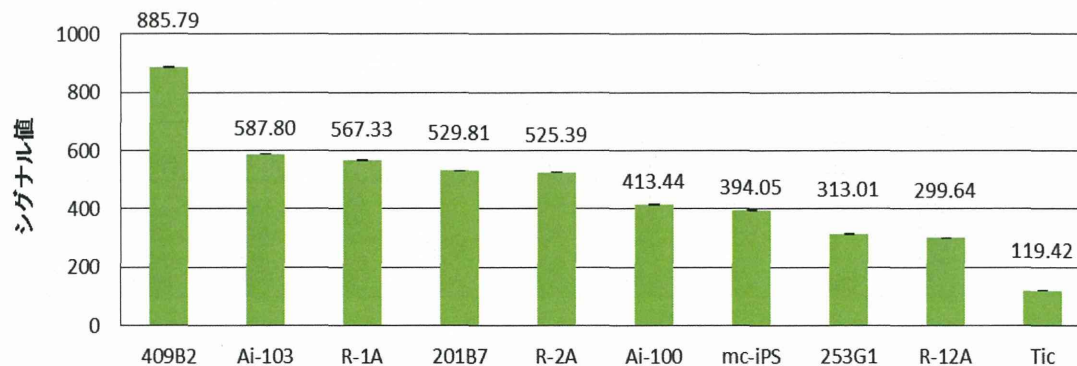
### miR-4739



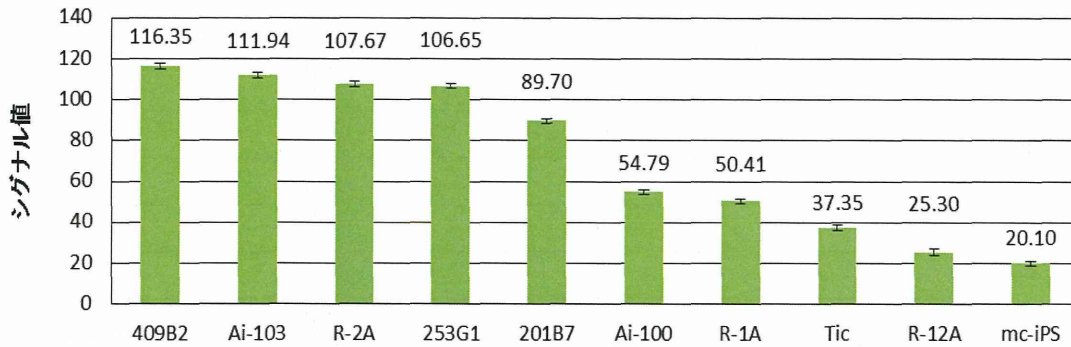
### miR-4505



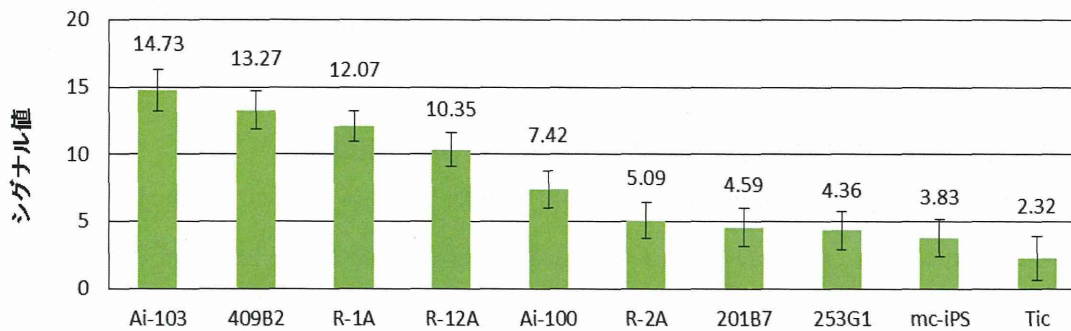
### miR-4521



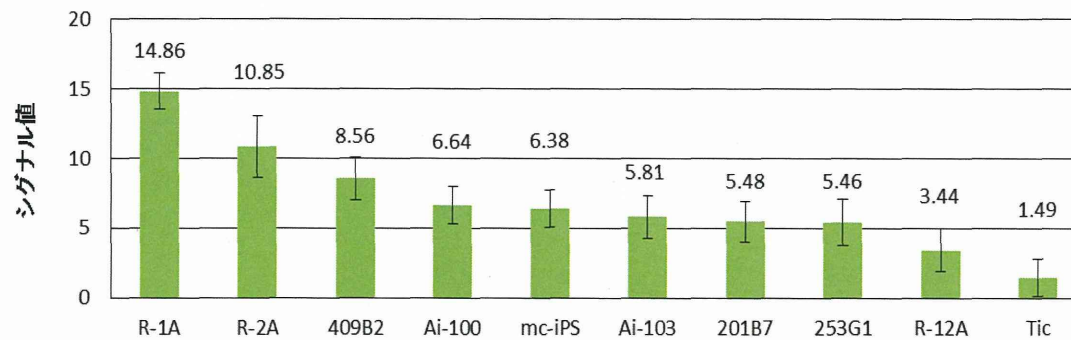
### miR-520g



### miR-3714



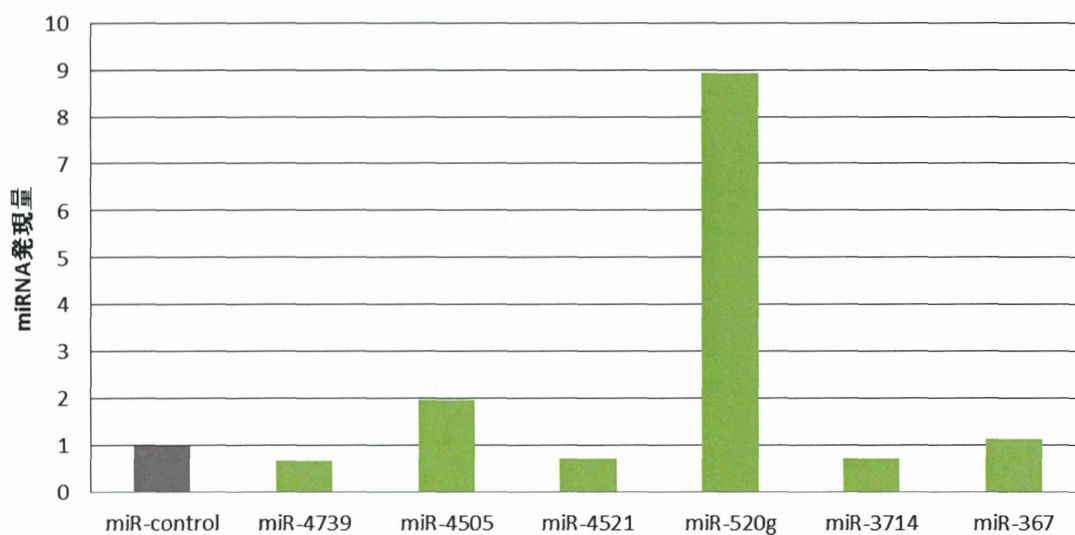
### miR-367



**Fig. 37 内胚葉分化プロペンシティ予測マーカーmiRNAの発現量**

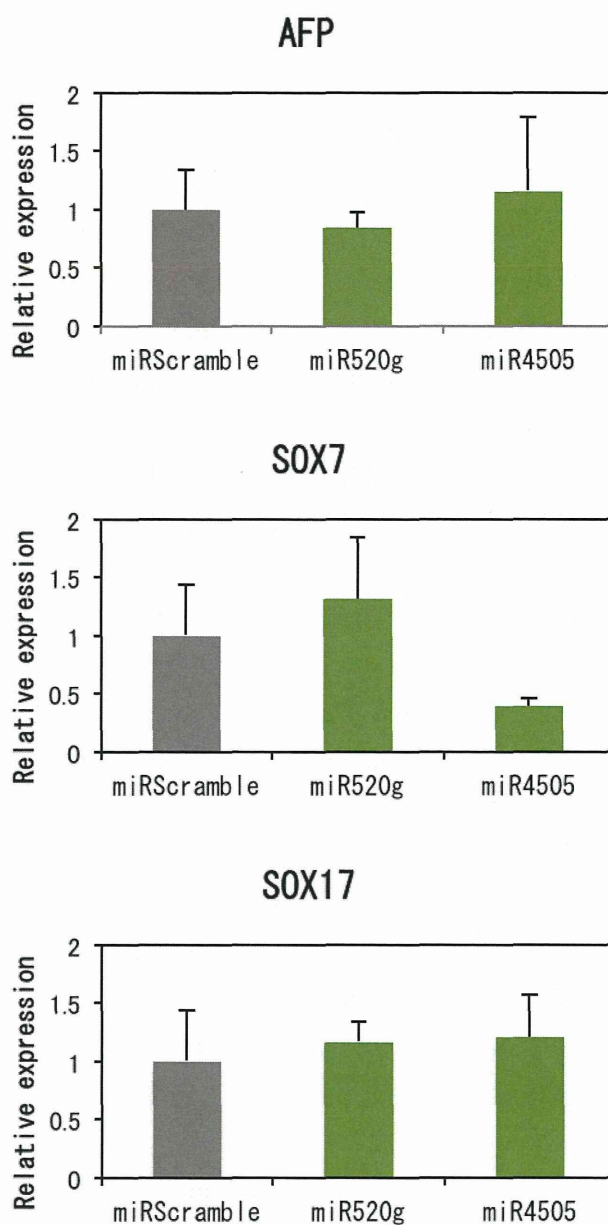
縦軸にマイクロアレイ解析から得た遺伝子発現シグナル値, 横軸にヒト iPS 細胞株を示した。データは平均値±SEM ( $n = 6$ ) で示した。





**Fig. 38 作製した miRNA 過剰発現 iPS 細胞の miRNA 発現量**

レンチウイルスを感染させた後に puromycin を添加することにより, miR-4739, miR-4505, miR-4521, miR-520g, miR-3714, および miR-367 を過剰発現させた 253G1 を得た. この細胞から miRNA を含む total RNA を抽出しリアルタイム定量 PCR で miRNA 発現量を測定した. 発現量は 18S rRNA の発現量で補正した. 縦軸に control での発現を 1 としたときの miRNA 発現量, 横軸に過剰発現させた miRNA を示した.



**Fig. 39 miRNA 過剰発現 iPS 細胞から形成した胚葉体における内胚葉マーカー遺伝子発現量**

miR-520g および miR4505 を過剰発現させた iPS 細胞から胚葉体を形成させた後、16 日目に RNA を抽出した。上記の内胚葉マーカー遺伝子 3 種類の定量 PCR を行い、発現量は *GAPDH* で補正した。縦軸に miRScramble での発現量を 1 としたときの各マーカー遺伝子の発現量を示した。データは平均値±SEM ( $n = 4$ ) で示した。

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 年度分担研究報告書

（新規免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験法の開発）

研究分担者 堤 秀樹 公益財団法人実験動物中央研究所、試験事業部  
研究協力者 草川 森士 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部  
研究協力者 浦野 耕司 公益財団法人実験動物中央研究所、試験事業部  
研究協力者 水島 友子 公益財団法人実験動物中央研究所、試験事業部  
研究協力者 西銘 千代子 公益財団法人実験動物中央研究所、試験事業部  
研究協力者 西中 栄子 公益財団法人実験動物中央研究所、試験事業部  
研究協力者 伊東 一昭 公益財団法人実験動物中央研究所、試験事業部

研究要旨【目的】NOGマウスの遺伝的背景は NOD/Shi であるが、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。本研究では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、これらの系統の表現型解析を行った。【方法】HeLa細胞を用いての TPD50 (Tumor producing dose at the 50%) によるヒト細胞生着能評価 【結果】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、BRG-hrマウスでは 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。【結論】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。

#### A. 研究目的

再生医療等製品の造腫瘍性を含む非臨床 *in vivo* 安全性評価には免疫不全動物の利用が不可欠である。われわれは既に NOD.Cg-*Prkdc<sup>scid</sup> Il2r $\gamma$ <sup>tm1Sug</sup>/Jic*, (簡略名 NOD/Shi-*scid* IL2R $\gamma$ <sup>null</sup>, 以下 NOG) マウスおよびヘアレス化した系統 (NOD/Shi-*scid* IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> *Hr<sup>hr</sup>*, 以下 NOG-hr マウス) について、① HeLa 細胞を用いての TPD50 (Tumor producing dose at the 50%) によるヒト細胞

生着能定量的評価、② ヒト臍帯血由来造血幹細胞 (hCD34 陽性細胞) 移入後の血球細胞分化能、③ NK 活性や補体溶血活性等の免疫学的検査、を実施している。

今年度は Rag2 遺伝子と IL-2R $\gamma$  遺伝子をダブルノックアウトし、BALB/cA 系に遺伝子置換した新たな免疫不全動物である BALB/c-*Rag2<sup>tm1Fwa</sup> Il2r $\gamma$ <sup>tm1Sug</sup>/ShiJic* (簡略名 BALB/c-*Rag2<sup>null</sup> IL-2R $\gamma$ <sup>null</sup>*, 以下 BRG) マウス、さらにはヌード化 (BALB/c- *Rag2<sup>null</sup>*

*I12R $\gamma^{null}$  nude*、以下 BRG-nu マウス)あるいはヘアレス化 (BALB/c-*Rag2^{null}* *I12R $\gamma^{null}$  Hr<sup>hr</sup>*、以下 BRG-hr マウス)した系統について HeLa 細胞を用いての TPD50 (Tumor producing dose at the 50%) によるヒト細胞生着能定量的評価を実施した (図 1)。

## B. 研究方法

### B-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 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 (株) 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-1-2 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-1-3 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-1-4 TPD50 (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。

#### (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、作業者に直接接触することなく動物に移植された。

### C. 研究結果

#### C-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1. 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(表1)。

### D. 考察

BRGマウスにおけるHeLa細胞単体移植時のTPD50はNOGマウスと同等であり、BRG-nuマウスにおいてはNOGマウスを凌ぐ成績であった。BRG-hrマウスにおけるHeLa細胞単体移植時のTPD50はNOG-hrマウスに近似であり、異種細胞生着感度の点からヌード化(nu遺伝子導入)した系統が優位であることが考えられた。

なお、マトリゲル増強効果はNOGおよびNOG-hrマウスよりも低く、背景遺伝子の違い(NOD/Shi と BALB/c)による影響が示唆された。

### E. 結論

異種細胞生着能および被毛がないことによる実験操作性から判断した場合、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。

### F. 研究発表

#### F-1 論文発表

なし

#### F-2 学会発表

町田一彦、草川森士、澤田留美、安田智、佐藤陽治、堤秀樹 NOGへアレスマウスにおける免疫不全能の定量的解析  
日本実験動物科学技術さっぽろ 2014

札幌（平成26年5月15-17日）

G. 知的財産権の出願・登録状況

G-1 特許取得

なし

G-2 実用新案登録

なし

G-3 その他

なし

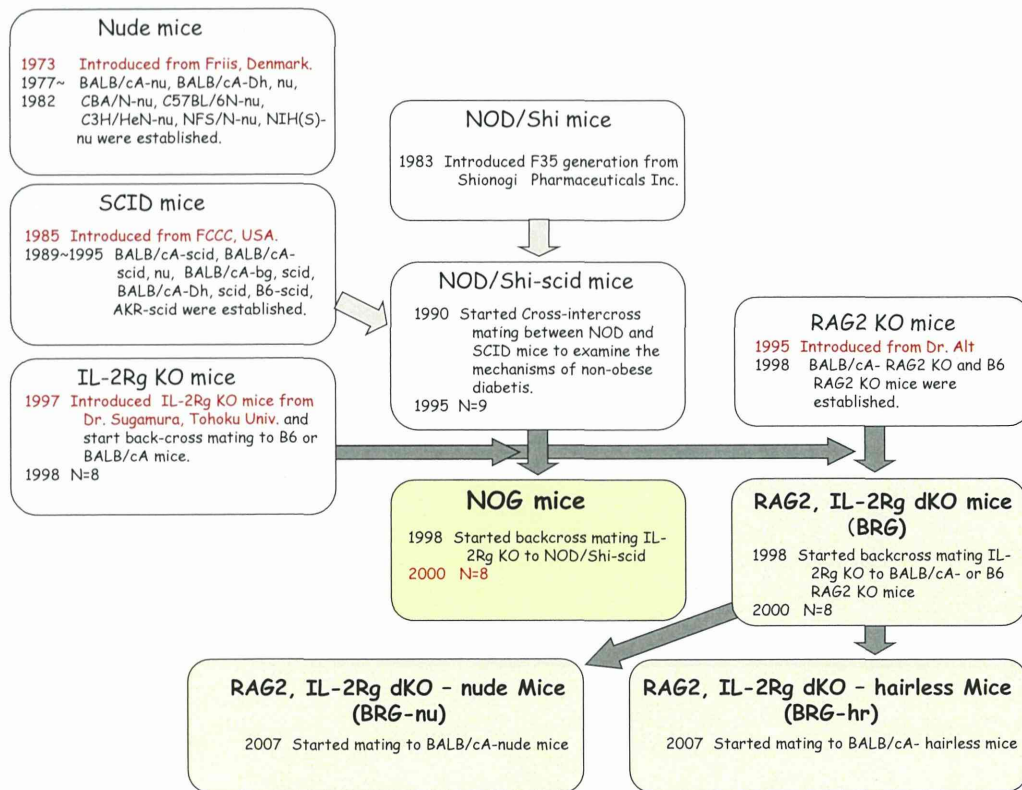


図1 BRG, BRG-nu および BRG-hr マウスの開発過程

表1 移植後16週におけるTPD50、対ヌードマウス比、およびマトリゲル増強効果

移植細胞	背景遺伝子 系統 項目	BALB/c									
		Nude		BRG		BRG <sup>nu</sup>			BRG <sup>hr</sup> <sup>a</sup>		
		TPD50	TPD50	vs. Nude	マトリゲル 増強効果	TPD50	vs. Nude	マトリゲル 増強効果	TPD50	vs. Nude	マトリゲル 増強効果
HeLa細胞		0.68~4.21 x 10 <sup>5</sup>	1.00 x 10 <sup>4</sup>	1/7	x 1	1.78 x 10 <sup>3</sup>	1/83	x 1	3.17 x 10 <sup>4</sup>	1/10	x 1
HeLa細胞+マトリゲル		-	3.2 x 10 <sup>1</sup>	1/2157	x 317	6.8 x 10 <sup>1</sup>	1/2163	x 26	4.64 x 10 <sup>2</sup>	1/682	x 68

a: 移植後10週におけるデータ



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 年度分担研究報告書

（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）

研究分担者 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  
第二室・室長  
研究協力者 河野 健 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部  
第二室・主任研究官

#### 研究要旨

【目的】本研究では、幹細胞の安全性と品質の確保に関する新規評価手法の開発を目的として、遺伝子発現解析技術により、バイオマーカーを検索することによって幹細胞の品質を確保する許容変動域の設定を目指す。遺伝子の不安定化を引き起こすと考えられている転移因子であるレトロトランスポゾン Long interspersed nuclear element 1s (LINE-1s) に着目し、ヒト間葉系幹細胞 (hMSCs) での発現や転移について検討するために、LINE-1s の発現とさらにその抑制因子と報告されている APOBEC3B (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。【方法】A3B 遺伝子型による転移可能な LINE-1s の発現については、次世代シーケンサーを用いて LINE-1s mRNA 配列を網羅的に解析した。hMSCs の未分化性と LINE-1s 発現との関連については、hMSCs を脂肪へ分化させることによる LINE-1s の発現への影響について検討した。【結果】次世代シーケンサーを用いて A3B 野生型ホモ (Ins/Ins) と A3B 欠失型ホモ (Del/Del) の RNA 配列を網羅的に解析し比較したところ、Ins/Ins と Del/Del 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 の発現量が低下することが確認された。【結論】日本人に多いとされる A3B 欠失により hMSC における LINE-1s の転移によるゲノムの安定性を損なう危険性は示されなかった。また、LINE-1s の発現と分化能には関連が見られ、LINE-1s の発現が hMSCs の分化能を示すマーカーの一つとになり得る可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

間葉系幹細胞は、胚葉を越えた分化も可能な細胞であり、再生医療への応用を目指

してすでに多くの臨床研究が行われている。幹細胞は多分化能と同時に自己複製能を持つ細胞であるため、正常細胞でありながら

増殖能力を持つ。また、幹細胞を細胞組織加工製品に利用するためには、細胞を生体内から取り出して *in vitro* で培養して増殖させるという工程を経る場合が多い。しかし、*in vitro* 培養中の自己複製能が正常に制御されていない場合、がん化のような好ましくない変化が起きる可能性も否定できない。また、幹細胞の長期培養による影響の全貌は未だ把握されていない。このため、幹細胞の *in vitro* 培養中の性質の変化に着目し、その品質を検査することは非常に重要であると思われる。再生医療の健全かつ迅速な発展には細胞及び細胞製品の安全性や品質を担保することが必須であり、少なくとも一定期間の培養において幹細胞の品質が維持されているかを評価・判定する指標が求められる。

そこで本研究では、幹細胞の安全性と品質の確保に関する新規評価手法の開発を目的として、遺伝子発現解析技術により、バイオマーカーを検査することによって幹細胞の品質を確保する許容変動域の設定を目指す。我々はこれまでに、幹細胞の安全性を評価するための遺伝子レベルにおけるマーカーの検査を行うために、幹細胞の培養時の安全性として最も懸念されるがん化について、近年その由来が間葉系幹細胞であろうと報告<sup>3)</sup>されている Ewing 肉腫 4 種類を陽性対照として間葉系幹細胞と比較検討した。その結果、マーカー候補遺伝子として Cyclin D2, IGF2BP1 など 9 遺伝子を抽出し、さらにヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) に Cyclin D2, IGF2BP1 の過剰発現などを行いがん化のマーカーとしての妥当性を調べたところ、Cyclin D2 は細胞増殖やがん化等に関わる遺伝子群の発現に影響を及ぼす事によって hMSC の増殖亢進に寄与する事が示唆された。

細胞ががん化する主な原因は遺伝子の変異である。したがって、*in vitro* 培養中の幹細胞の genome integrity を担保することは非常に重要である。そこで昨年度から、遺伝子の不安定化を引き起こすと考えられている転移因子に着目し、ヒトの転移因子の中で唯一転移活性を残しているレトロトランスポゾン Long interspersed nuclear element 1s (LINE-1s) の hMSCs での発現や転移について検討した。LINE-1s は Embryonic stem cells (ES 細胞) や induced pluripotent stem cells (iPS 細胞)<sup>2,3)</sup>、がん細胞では発現が認められ、正常組織においては発現がほとんど認められていないことから、幹細胞の未分化性やがん化に関与する可能性も考えられるが、hMSCs における LINE-1s の影響について全く解明されていない。昨年度、hMSCs における LINE-1s の発現とさらにその抑制因子と報告されている APOBEC3B (A3B)<sup>4)</sup> との関係について解析を行ったところ、A3B 欠失型ホモ (Del/Del) 由来の hMSCs では野生型ホモ (Ins/Ins) と比較して転移可能な LINE-1s が多く残っている可能性が示唆された。しかし、昨年度は LINE-1s mRNA の一部の配列しか解析していなかったため、今年度は次世代シーケンサーを用い LINE-1s mRNA 配列を網羅的に解析し、hMSCs (Del/Del) に転移可能な LINE-1s が多く残存しているのか、さらなる検討を行った。また、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。

## B. 研究方法

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

#### B-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-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>$\beta$ -thal</sub> ( L1 <sub>$\beta$ -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. hMSCs の未分化性と LINE-1s 発現との関連について

B-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. 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-2-3. 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'-GAGAACAAAGACACCACATACC-3', Reverse 5'-GGCATTAGTGCTATAAATTTCCC-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 を用い、  
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-2-4. 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-2-5. 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。

(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。

## C. 研究結果

### C-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。図 1 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  
(図 2) 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。図 3、4、5 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)