

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 (図 6)。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. 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 (図 7)。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 (図 8)。細胞の増殖速度は徐々に低下しており (図 8 A, 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 (図 8 C, D)。

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 (図 9 A)。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 (図 9 B)、hMSCs 3 ロットにおける脂肪球蛍光面積を比較した (図 9 C)。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 (図 9 D)。

## D. 考察

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

LINE-1s は動く遺伝子、レトロトランスポゾン的一种で、ヒトゲノムの約 17% を占めている。現在、ヒトゲノム中の多くの LINE-1s は遺伝子の一部欠失や変異を受けており、ほとんどが転移活性を失っていると考えられている。今回、ヒトゲノムに対して、*in vitro* で転移活性が確認されている L1 <sub>$\beta$ -thal</sub>、L1<sub>RP</sub> 及び L1.3 配列の BLAST 検索を行ったところ、それぞれ、58166 個、58195 個、58490 個の LINE-1s 様配列が検

出された (図 1)。この中で、LINE-1s 全長 (約 6 kbp) に占める LINE-1s 様配列の割合が 99%以上かつ、配列の相同性が 99%以上のものはそれぞれ、262 個、134 個、187 個であった (data not shown)。ヒトゲノム中には転移活性が残っている LINE-1s は 80-100 コピー残っているとされており、今回の BLAST 解析の結果とおおよそ一致していることから、適切な検出が出来ていると考えられる。

APOBEC 蛋白は細胞内に存在するシチジン脱アミノ化酵素の一つで、ヒト免疫不全ウイルスを始めとするレトロウイルスの感染抑制因子として知られている<sup>5)</sup>。APOBEC 蛋白はレトロウイルスが逆転写反応時に作るウイルス DNA にシトシン (C) からウラシル (U) への変異を導入する事で、最終的にウイルスゲノムに多数のグアニン (G) からアデニン (A) への変異を導入し、ウイルスの複製を阻害する<sup>6)</sup>。最近、APOBEC 蛋白の一つ APOBEC3B (A3B) が *in vitro* の系で LINE-1s の転移を抑えると報告され<sup>4)</sup>、これによって幹細胞などでは LINE-1s のランダムな転移を抑えているのではないかと考えられた。A3B 遺伝子には欠失多型が存在し、日本人にその割合が多いと報告されている<sup>7)</sup>。A3B を発現しない日本人由来 hMSCs は LINE-1s の転移によってゲノムの安定性が損なわれる可能性が考えられたので、A3B 遺伝子型と LINE-1s の発現量について解析を行った。

昨年度の検討により、A3B 欠失型ホモ (Del/Del) 由来の hMSCs で転移可能な LINE-1s が多く残っている可能性が示唆された。しかし、今年度、次世代シーケンサーを用いて RNA 配列を網羅的に解析したところ、A3B 野生型ホモ (Ins/Ins) と

Del/Del で LINE-1s の発現量に大きな違いが見られなかった (図 6)。昨年度の解析では LINE-1s の一部の配列しか解析しておらず、また PCR 反応、大腸菌への形質転換操作などを行っており、実験的なバイアスがかかっていた可能性が考えられた。しかし、今回の次世代シーケンサー解析でも、100 bp 程度の RNA 配列を網羅的に解読して繋ぎ合わせているため、LINE-1s の全長 (約 6 kbp) をもった配列のみを解析した結果ではない。したがって、全長では違いがあるのに、全長を持たない RNA が多く存在するために、その違いが見られていない可能性は十分に考えられる。今後、次世代シーケンサーのロングリードが可能になった段階で、Ins/Ins と Del/Del 由来の hMSC における LINE-1s 配列をそれぞれ確認し、A3B 遺伝子型の違いによってゲノムの安定性に影響を与えるのかどうか再度検討する必要があるかもしれない。しかし、現在のところ、A3B mRNA と LINE-1s mRNA の発現に相関が見られない点 (昨年度報告書)、さらに技術的な検出の限界はあるものの、転移活性が残っていると考えられる LINE-1s の発現量において、Ins/Ins と Del/Del で大きな違いが見られなかった点から総合的に考えて、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。

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

LINE-1s などのレトロトランスポゾン は ES 細胞や 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、細胞の未分化性に関与する可能性も考えられる。本研究により hMSCs でも LINE-1s が発現しており、その発現量が iPS 細胞や HeLa 細胞よりも高いことが明らかとなった (図 7)。hMSCs は培養により、増殖能や分化能が低下することが知られている。本研究でも hMSCs の増殖速度は培養により徐々に低下しており、LINE-1s の発現量も低下していた (図 8)。増殖能と LINE-1s の発現との相関については、LINE-1s の発現が P=4 から P=6 の間で低下する一方、増殖はその間は低下おらず、また、P=6 から P=11 で増殖速度が低下していたが、LINE-1s の発現は大きく変化していなかった。以上の結果から、細胞の増殖能に依存した LINE-1s の発現量の変化は見られず、両者には明確な相関がないと示唆された。

次に、iPS 細胞や hMSC など幹細胞における LINE-1s の発現は確認できたが、分化した正常組織ではその発現がほとんど認められないことから、hMSC における LINE-1s の発現に及ぼす分化の影響について検討した。脂肪へ分化させた hMSCs は分化させていない hMSCs と比較して LINE-1s の発現が低下していた (図 9D)。また脂肪球面積が小さい (脂肪分化能が低い) hMSCs (Lot No. 295873) では他の脂肪分化能が高かった 2 ロットに比べて LINE-1s の発現が低かった (図 9C, D)。以上の結果から、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。今後は脂肪分化だけでなく、骨、軟骨などの分化との相関も解析し、LINE-1s の発現が多分化能を示す

マーカーになり得るか検討する必要がある。

## E. 結論

LINE-1s の転移を抑える細胞内因子として知られている A3B には、欠失多型が存在し、日本人にその割合が多いと報告されている。A3B を発現しない日本人由来 hMSCs は LINE-1s の転移によってゲノムの安定性が損なわれる可能性が考えられたので、A3B 遺伝子型と LINE-1s の発現量について解析を行った。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ず、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。

さらに、iPS 細胞や hMSC など幹細胞における LINE-1s の発現は確認できたが、分化した正常組織ではその発現がほとんど認められないことから、hMSC における LINE-1s の発現に及ぼす分化の影響について検討したところ、hMSC を脂肪分化させることにより、LINE-1s mRNA の発現量が低下することを確認した。このことから、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。

## 参考文献

- 1) Riggi N, Suvà ML, Suvà D, Cironi L, Provero P, Tercier S, Joseph JM, Stehle JC, Baumer K, Kindler V, Stamenkovic I:

EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2008, 68:2176-2185.

2) A. Macia, M. Munoz-Lopez, J.L. Cortes, R.K. Hastings, S. Morell, G. Lucena-Aguilar, J.A. Marchal, R.M. Badge, J.L. Garcia-Perez, Epigenetic control of retrotransposon expression in human embryonic stem cells, *Mol Cell Biol* 31 (2011) 300-316.

3) S. Wissing, M. Munoz-Lopez, A. Macia, Z. Yang, M. Montano, W. Collins, J.L. Garcia-Perez, J.V. Moran, W.C. Greene, Reprogramming somatic cells into iPS cells activates LINE-1 retroelement mobility, *Hum Mol Genet* 21 (2012) 208-218.

4) S. Wissing, M. Montano, J.L. Garcia-Perez, J.V. Moran, W.C. Greene, Endogenous APOBEC3B restricts LINE-1 retrotransposition in transformed cells and human embryonic stem cells, *J Biol Chem* 286 (2011) 36427-36437.

5) Y.L. Chiu, W.C. Greene, The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements, *Annu Rev Immunol* 26 (2008) 317-353.

6) K. Sato, T. Izumi, N. Misawa, T. Kobayashi, Y. Yamashita, M. Ohmichi, M. Ito, A. Takaori-Kondo, Y. Koyanagi, Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice, *J Virol* 84 (2010) 9546-9556.

7) J.M. Kidd, T.L. Newman, E. Tuzun, R. Kaul, E.E. Eichler, Population stratification of a common APOBEC gene deletion polymorphism, *PLoS Genet* 3 (2007) e63.

## F. 研究発表

### F-1 論文発表

1) Kono K., Takada N., Yasuda S., Sawada R., Niimi S., Matsuyama A., Sato Y. : Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells. *Biologicals*, 43, 146-149 (2015)

2) Kusakawa S., Machida K., Yasuda S., Takada N., Kuroda T., Sawada R., Okura H., Tsutsumi H., Kawamata S., Sato Y. : Characterization of in vivo tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *Regenerative Therapy*, 1, 30-37 (2015)

3) 澤田留美「再生医療等製品開発における動物実験—指針及び評価指標について—」*オベリスク*, 20(1), 25-31 (2015)

4) 澤田留美「再生医療等製品とバイオマテリアル, そして評価指標」*バイオマテリアル—生体材料—*, 33(1), 7-8 (2015)

5) Sasaki H., Takeuchi I., Okada M., Sawada R., Kanie K., Kiyota Y., Honda H., and Kato R.: Label-free morphology-based prediction of multiple differentiation potentials of human mesenchymal stem cells for early evaluation of intact cells. *PLOS ONE*, 9(4), e93952 (2014).

6) Kono K., Niimi S., and Sawada R. : Cyclin D2 promotes the proliferation of human mesenchymal stem cells. *J. Bone Marrow Res.*, 2: 136. 1000136 (2013).

F-2 学会発表

- 1) Kono K., Niimi S., Sawada R.;  
Analysis of Line1 expression in human mesenchymal stem cells, 12th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2014.6)
- 2) Sasaki H., Okada N., Kanie K., Kiyota Y., Honda H., Sawada R., Kato R.;  
Image-based profiling of mesenchymal stem cells using non-label images, TERMIS-EU 2014 (2014.6)
- 3) 澤田留美, 河野 健, 比留間瞳, 加藤玲子, 新見伸吾「生体親和性高分子材料によるヒト単球細胞の機能の制御について—遺伝子発現の網羅的解析による検討」第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11)
- 4) 加藤玲子, 薮島由二, 福井千恵, 比留間瞳, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾「ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性評価マーカの探索」第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11)
- 5) 河野 健, 新見伸吾, 澤田留美「間葉系幹細胞における細胞分化と LINE-1 の発現について」第 14 回日本再生医療学会総会 (2015.3)
- 6) 高田のぞみ, 河野健, 安田智, 澤田留美, 新見伸吾, 松山晃文, 佐藤陽治「細胞増殖特性を利用した不死化細胞検出試験法の性能評価」第 14 回日本再生医療学会総会 (2015.3)
- 7) 佐々木寛人, 高橋厚妃, 蟹江慧, 澤田留美, 本多裕之, 清田泰次郎, 加藤竜司「骨髄由来および脂肪組織由来間葉系幹細胞の継代培養における品質劣化モニタリング」第 14 回日本再生医療学会総会 (2015.3)

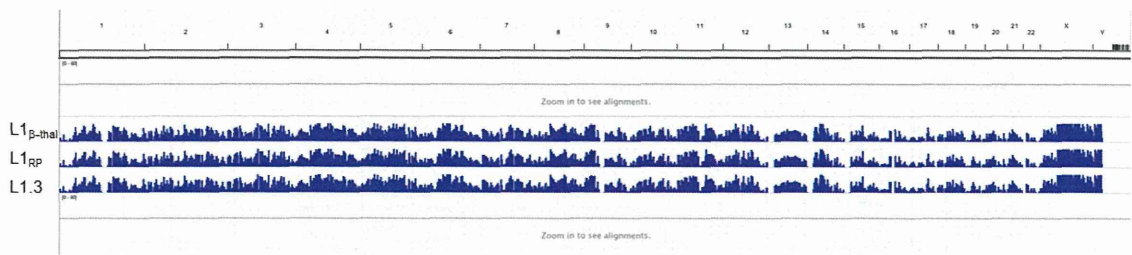


図1. ヒトゲノム中の転移可能な LINE-1s 配列の BLAST 検索  
 上段の数字は染色体番号。青棒はその領域に予測されたそれぞれの LINE-1s の数を示す。

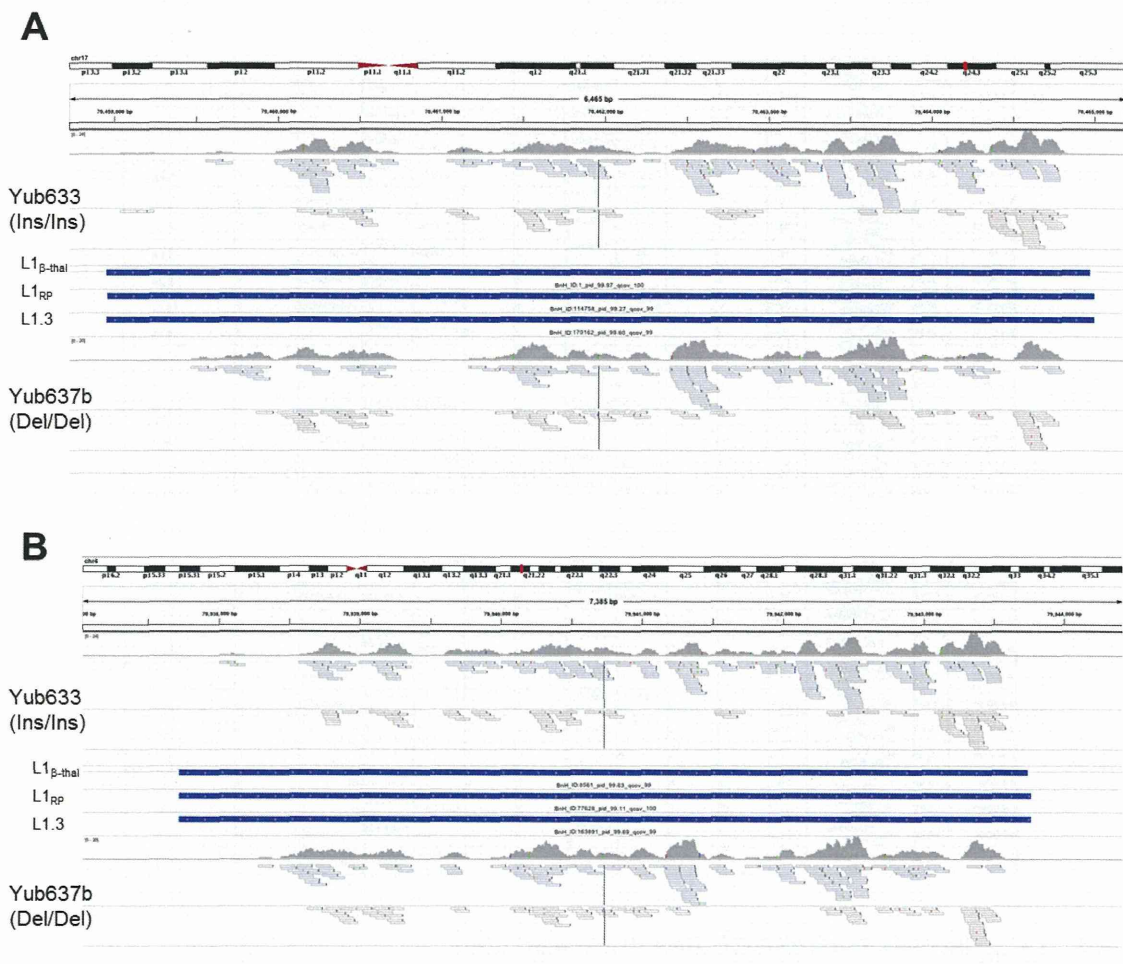


図2. L1 <sub>$\beta$ -thal</sub>、L1<sub>RP</sub> 及び L1.3 様配列にマッピングされたリードの例  
 (A) 17 番染色体 q24.3 70458956-70464974 におけるマッピング  
 (B) 4 番染色体 q21.22 19077884-19083928 におけるマッピング



trackingId	pid	qcov	locus	length	lr941_no_match			lr942_no_match			lr942_no_match		MAX unique read_count	MAX unique read_count	for IGV
					read_count	unique_read_count	norm_read_count	read_count	unique_read_count	norm_read_count	log2(Rd/chr)	LOCUS			
Bv+UD:1	59.97	100	17:70426936-7048974	6018	182	0	0.14499	0.0110237	130	0	0.412897	0.0089537	-0.30004869	0	0.133
Bv+UD:2	59.33	99	17:70544323-70550841	6018	186	0	0.308419	0.0108528	130	0	0.402205	0.0087219	-0.315328382	0	0.133
Bv+UD:3	59.17	100	17:9915993-9922004	6019	114	0	0.383209	0.0082121	110	2	2.27411	0.0493148	2.38918119	2	2.133
Bv+UD:4	59.05	99	17:88598393-8863392	3999	142	0	0.370087	0.0079309	142	0	0.285221	0.0081839	-0.338703251	0	0.133
Bv+UD:5	58.43	99	17:12449918-12455932	6018	134	0	0.411008	0.0088079	130	0	0.357942	0.0077829	-0.182380383	0	0.133
Bv+UD:6	57.96	99	17:32887138-32893151	6013	89	0	0.218188	0.0048328	96	0	0.703490	0.0152337	1.717291396	0	0.133
Bv+UD:7	57.85	99	17:80881433-80887474	6021	32	2	2.84792	0.0387449	84	0	0.841947	0.0182578	-1.835977799	2	2.133
Bv+UD:8	57.88	99	17:5501171-5501728	6011	82	0	0.280482	0.0090107	48	0	0.223384	0.0048480	-0.31014139	0	0.133
Bv+UD:9	57.86	99	17:32878271-32884272	6001	50	2	2.25514	0.0483278	42	0	0.128881	0.0027904	-1.142873509	2	2.133
Bv+UD:10	57.72	99	17:34229484-34235452	3988	80	0	0.270717	0.0058014	88	0	0.258881	0.0033889	-0.039728432	0	0.133
Bv+UD:11	57.54	99	17:41200890-41206898	6018	38	0	0.132448	0.0028383	42	0	0.113745	0.0024883	-0.202525172	0	0.133
Bv+UD:12	57.41	100	17:81110229-81116241	6012	44	0	0.389633	0.0128059	40	0	0.272431	0.0039077	-1.098635089	0	0.133
Bv+UD:13	57.49	99	17:5178531-51791344	6013	38	0	0.274902	0.0038911	30	0	0.125778	0.0027277	-1.110959512	0	0.133
Bv+UD:14	58.74	99	17:52403883-52409888	6003	34	0	0.28089	0.0055908	38	0	0.127148	0.0027572	-1.01983182	0	0.133
Bv+UD:15	58.89	99	17:88408137-88414142	6003	50	2	2.17838	0.0488827	34	2	2.13242	0.0483938	-0.008955988	2	2.133
Bv+UD:16	58.83	99	17:88599137-88605148	6007	34	0	0.121088	0.0023944	34	0	0.11938	0.0023931	-0.000782008	0	0.133
Bv+UD:17	58.18	99	17:3147980-3153409	6029	44	0	0.224608	0.0048004	38	0	0.102882	0.0022173	-1.142052025	0	0.133
Bv+UD:18	58.09	99	17:27099175-27105178	6001	4	0	0.0008900	0.0001193	4	0	0.0047943	0.0001039	-0.198930979	0	0.133
Bv+UD:19	58	100	17:53303049-53309943	3994	34	0	0.345193	0.0073794	22	0	0.0274883	0.0005974	-3.800259918	0	0.133
Bv+UD:20	58.7	92	17:71331973-71337498	5525	18	0	0.0732378	0.0018127	32	0	0.087878	0.0019013	-0.237486838	0	0.133
Bv+UD:21	58.51	87	17:11881040-11888885	3225	42	0	0.124778	0.0028739	30	0	0.108343	0.0023331	-0.184014587	0	0.133
Bv+UD:22	58.4	99	17:89811934-89817193	5239	28	0	0.039185	0.0008397	34	0	0.038828	0.0011839	-0.489884004	0	0.133
Bv+UD:23	58.71	99	17:34083035-34089289	5254	10	0	0.0025794	0.0005527	18	0	0.123392	0.0028737	2.273221329	0	0.133
Bv+UD:24	58.88	80	17:2744514-27451144	4833	8	0	0.0133282	0.0003284	14	0	0.0212477	0.0004807	-0.4881999	0	0.133
Bv+UD:25	59.98	97	17:3319389-3324807	5218	12	0	0.028004	0.0005572	8	0	0.0407441	0.0008532	-0.884938437	0	0.133
Bv+UD:26	59.88	97	17:8802495-8807718	5221	4	0	0.0118883	0.0002247	14	0	0.0147489	0.0003197	-0.327893422	0	0.133
Bv+UD:27	59.84	97	17:3378023-3383384	5221	4	0	0.0188079	0.0003359	2	0	0.012988	0.0003032	-0.230807134	0	0.133
Bv+UD:28	59.84	97	17:34031277-34037282	5243	6	0	0.0054101	0.0001158	8	0	0.0025071	3.50E-05	-1.084033733	0	0.133
Bv+UD:29	59.44	97	17:33009172-33084408	5238	4	0	0.0148417	0.0003180	4	0	0.0072075	0.0001582	1.004989021	0	0.133
Bv+UD:30	59.29	97	17:15353983-15388905	5242	0	0	0	0	2	0	0.0081538	0.0001344	0	0	0.133
Bv+UD:31	59.15	97	17:31781297-31788332	5233	2	0	0.0011785	2.32E-05	0	0	0	0	0	0	0.133
Bv+UD:32	59.24	87	17:28738817-28744844	5227	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.133
Bv+UD:33	59.78	87	17:834409-835885	5254	2	0	0.0000377	0.0001079	2	0	0.0081538	0.0001334	-0.300780802	0	0.133
Bv+UD:34	59.93	87	17:32840949-32848132	5183	2	0	0	0.02143	1	0	0.333333	0.0072284	-1.987883802	0	0.133
Bv+UD:35	58.28	78	17:3804020-3804889	4589	18	0	0.0302299	0.0009478	8	0	0.0055373	0.0001200	-2.431834518	0	0.133
Bv+UD:36	59.5	87	17:34259782-34214599	5237	2	0	0.0183488	0.0003932	1	4	0.0378337	0.0008189	1.054202347	2	0.133
Bv+UD:37	54.17	82	17:34181124-34188027	4903	4	0	0.0004775	3.09E-05	8	0	0.147325	0.0031991	-5.912958933	0	0.133
Bv+UD:38	52.23	87	17:43792510-43797541	5231	8	2	2.04902	0.0439105	0	0	0	0	0	2	2.133
Bv+UD:39	51.93	87	17:58848253-58851529	5248	8	0	0.0122815	0.0002801	2	0	0.0010298	2.30E-05	-3.174328885	0	0.133
Bv+UD:40	51.84	87	17:31884928-31870173	5247	2	0	0.181818	0.0038983	8	8	8	0.130111	3.081472147	8	8.133
Bv+UD:41	51.84	87	17:23496988-23501189	5220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.133
Bv+UD:42	51.79	87	17:41240001-41248003	5202	0	0	0	0	4	0	0.12381	0.0088494	0	0	0.133
Bv+UD:43	50.77	73	17:28382090-28388471	4381	8	0	0.0497459	0.0010880	20	14	14.0448	0.30438	8.13830758	18	14.133
Bv+UD:44	50.91	88	17:27250183-27255342	5179	2	0	0.0000377	0.0001079	8	2	0.0081538	0.0001334	-0.300780802	0	0.133
Bv+UD:45	50.88	88	17:3337288-3342472	5184	2	0	0.0002104	8.89E-05	0	0	0	0	0	0	0.133
Bv+UD:46	50.32	88	17:80781228-80788398	5170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.133
Bv+UD:47	89.83	88	17:58840151-58845311	5190	0	0	0	0	2	0	0.0000189	8.34E-05	0	0	0.133
Bv+UD:48	89.81	88	17:58831812-58838790	5178	0	0	0	0	2	0	0.0222222	0.0004818	0	0	0.133
Bv+UD:49	94.83	89	17:29897110-29901278	4188	8	0	0.0227038	0.0004883	2	0	0.08	0.0017348	1.834181588	0	0.133
Bv+UD:50	94.73	89	17:53914727-53918894	4187	8	0	0.0089473	0.0001917	2	0	0.0021299	4.82E-05	-2.053378404	0	0.133

図3. L1 <sub>$\beta$ -thal</sub> 様配列にマッピングされた RNA の発現解析 (一部)

lr941;Yub633(Ins/Ins), lr942;Yub637b(Del/Del), pid;BLASTの結果得られた L1 <sub>$\beta$ -thal</sub> との一致度(%), qcov; L1 <sub>$\beta$ -thal</sub> 全長に占める該当領域の割合, locus;該当領域の位置情報, length;該当領域の長さ, read\_count;当該領域にアライメントされている全リード数, unique\_read\_count;当該領域にアライメントされているリードの中で、一箇所のみアライメントされているリードの数, estimate\_read\_count;各リードのマルチマップ数を考慮して補正を行った、当該領域に含まれる予想リード数, norm\_read\_count;各検体間の総取得リード数を考慮して補正を行った検体間比較用の予想リード数

trackingId	pid	qcov	locus	length	Ir941_no_mismatch				Ir942_no_mismatch				Ir941_no_mismatch log2(RA1 change)	MAX unique read_count (Ir941_mismatch)	MAX unique read_count (Ir942_mismatch)	For IGV
					read_count	unique_read_count	estimate_read_count	norm_read_count	read_count	unique_read_count	estimate_read_count	norm_read_count				
BNHJUD:77823	99.9	99	4:19077884-19083928	8044	188	2	4.17805	0.084927	158	4	4.74053	0.100759	0.19998432	4	4	Link
BNHJUD:77824	99.7	99	4:74717542-74723588	8044	182	0	2.08308	0.0442548	181	0	0.893922	0.0150912	-1.552119894	0	0	Link
BNHJUD:77825	99.28	99	4:138293303-138299545	8042	172	0	0.342885	0.0118293	134	0	0.442235	0.0094903	-0.27810287	0	0	Link
BNHJUD:77826	99.24	99	4:21159394-21188430	8038	148	0	0.458302	0.0097328	124	0	0.449125	0.0097330	-0.008423418	0	0	Link
BNHJUD:77827	99.17	99	4:90937713-90981754	8041	152	0	0.847428	0.0181804	118	0	0.337873	0.0073286	-1.309305994	0	0	Link
BNHJUD:77828	99.11	100	4:79937713-79943782	8047	158	0	0.305784	0.0108389	132	0	0.322777	0.0113385	0.084738945	0	0	Link
BNHJUD:77829	99.12	100	4:37547109-37553147	8038	160	0	0.470935	0.0100921	128	0	0.399871	0.0088869	-0.21983012	0	0	Link
BNHJUD:77830	99.07	99	4:70347953-70354029	8048	192	0	1.37805	0.0293318	184	0	0.478419	0.0103312	-1.513231883	0	0	Link
BNHJUD:77831	99.09	99	4:81993923-81945981	8038	180	0	0.323088	0.0112097	110	0	0.320553	0.0089012	-0.889401238	0	0	Link
BNHJUD:77832	99.11	99	4:15841500-15847581	8031	184	0	0.878992	0.0188388	134	0	0.412353	0.0089419	-1.074890903	0	0	Link
BNHJUD:77833	99.09	99	4:7998910-79972939	8029	188	0	0.534324	0.0114308	128	0	0.424598	0.0092074	-0.314549833	0	0	Link
BNHJUD:77834	99.07	99	4:189315001-189321529	8028	184	0	0.497923	0.0108705	148	0	0.400372	0.0088821	-0.229700337	0	0	Link
BNHJUD:77835	99.02	99	4:30838302-3084433	8033	148	0	0.300187	0.0113819	100	0	0.388913	0.0084338	-0.429973344	0	0	Link
BNHJUD:77836	99.02	99	4:18898978-188978011	8033	134	0	0.384457	0.0078703	102	0	0.310228	0.0087273	-0.213347927	0	0	Link
BNHJUD:77837	99.07	99	4:188735900-188781922	8022	158	0	0.378122	0.0123891	128	0	0.392924	0.0083286	-0.340037884	0	0	Link
BNHJUD:77838	98.98	99	4:78181573-78111774	8039	142	0	0.357115	0.0112939	108	0	0.321428	0.0089701	-0.778412113	0	0	Link
BNHJUD:77839	98.98	99	4:91978215-91994251	8038	122	0	0.491812	0.0100393	90	0	0.320701	0.0089544	-0.39979393	0	0	Link
BNHJUD:77840	98.98	99	4:119948720-119954757	8037	172	0	0.326492	0.0112399	108	0	0.813373	0.0118423	0.85042381	0	0	Link
BNHJUD:77841	98.98	99	4:59078548-59084883	8033	130	0	0.392939	0.0084308	94	0	0.331833	0.0078252	-0.143133993	0	0	Link
BNHJUD:77842	98.91	99	4:79704553-79710297	8044	120	0	0.842892	0.0180832	100	0	0.287487	0.0082342	-1.354772525	0	0	Link
BNHJUD:77843	98.92	99	4:111884803-111908838	8033	122	0	0.470741	0.0100888	98	0	0.418971	0.0090421	-0.157910403	0	0	Link
BNHJUD:77844	98.91	99	4:189193088-189143119	8033	120	0	0.498239	0.0108083	98	0	0.314974	0.0089302	-0.838979748	0	0	Link
BNHJUD:77845	98.84	100	4:52818438-52822003	8047	122	0	0.473823	0.0101989	114	0	0.770823	0.0187153	0.715035889	0	0	Link
BNHJUD:77846	98.84	99	4:38392422-38395889	8038	108	0	0.294401	0.0083090	80	0	0.183864	0.0040288	-0.84778233	1	0	Link
BNHJUD:77847	98.87	99	4:14753118-14781149	8033	118	0	0.444093	0.0081881	88	0	0.251488	0.0054538	-0.803453833	0	0	Link
BNHJUD:77848	98.79	99	4:23814773-23820620	8047	120	0	0.329781	0.0113328	78	0	0.848283	0.0140382	0.308383724	0	0	Link
BNHJUD:77849	98.77	99	4:33819150-33823191	8038	120	0	0.38003	0.0081440	112	0	0.348339	0.0075338	-0.10842081	0	0	Link
BNHJUD:77850	98.73	99	4:27373872-27381718	8044	118	0	0.351908	0.0073413	104	0	0.445587	0.0088828	0.35758801	0	0	Link
BNHJUD:77851	98.89	100	4:143100259-143108307	8048	128	0	1.3841	0.0229812	100	0	0.331242	0.0071830	-0.204598303	0	0	Link
BNHJUD:77852	98.89	99	4:32358473-32364514	8041	180	0	0.879308	0.0145378	122	0	0.327418	0.0071000	-1.033883344	0	0	Link
BNHJUD:77853	98.89	99	4:57882309-57883348	8037	94	0	0.255702	0.0054798	88	0	0.153772	0.0030334	-0.718838217	0	0	Link
BNHJUD:77854	98.81	99	4:108571027-108577071	8044	42	0	0.143385	0.0030723	44	0	0.145553	0.0031983	0.038933398	0	0	Link
BNHJUD:77855	98.89	99	4:48037805-48037993	8028	144	0	0.865534	0.0129788	120	0	0.384831	0.0083472	-0.837378838	0	0	Link
BNHJUD:77856	98.48	99	4:128213790-128219823	8030	124	4	3.02184	0.107814	134	0	1.88883	0.0385749	-1.508939952	4	4	Link
BNHJUD:77857	98.39	99	4:82788930-82732884	8029	98	0	0.277777	0.0059327	92	0	0.381144	0.0082851	0.473448933	0	0	Link
BNHJUD:77858	98.31	99	4:90805297-90814533	8038	88	0	0.308123	0.0114891	94	0	0.200013	0.0044023	-1.383910204	0	0	Link
BNHJUD:77859	98.24	99	4:100000323-100008333	8028	42	0	0.188384	0.0038602	30	0	0.12938	0.0028052	-0.3851117	0	0	Link
BNHJUD:77860	98.18	99	4:148330022-148338032	8030	38	0	0.120553	0.0023834	24	0	0.077819	0.0018830	-0.813035278	0	0	Link
BNHJUD:77861	98.02	99	4:10284951-102819555	8024	38	0	0.801835	0.017175	70	0	0.192045	0.0041843	-2.044417004	0	0	Link
BNHJUD:77862	97.98	99	4:128928259-128904291	8032	34	0	0.138318	0.0029841	48	0	0.121735	0.0028936	-0.187182501	0	0	Link
BNHJUD:77863	97.78	99	4:84859122-84883188	8048	38	0	0.157577	0.0033789	92	0	1.453977	0.0312217	3.208790547	0	0	Link
BNHJUD:77864	97.77	99	4:102944410-102950449	8039	88	0	0.234421	0.0030208	82	0	0.111701	0.0024222	-1.032379354	0	0	Link
BNHJUD:77865	97.74	99	4:18140888-181414912	8027	82	0	0.188840	0.0038140	38	0	0.0832988	0.0018381	-0.98128787	0	0	Link
BNHJUD:77866	97.88	99	4:184533484-184539320	8038	88	0	0.178915	0.0037912	72	0	0.129911	0.0028171	-0.428452432	0	0	Link
BNHJUD:77867	98.04	99	4:127020371-127028328	2935	38	0	0.143232	0.0030713	42	0	0.0973343	0.0021107	-0.541183341	2	2	Link
BNHJUD:77868	97.8	99	4:119274083-119280124	8039	38	0	0.234411	0.0050234	34	0	0.198308	0.0043003	-0.2264202109	0	0	Link
BNHJUD:77869	97.88	99	4:87177043-87183338	8015	44	0	0.133913	0.0028897	34	0	0.149319	0.0032380	0.17418238	0	0	Link
BNHJUD:77870	97.47	99	4:184330751-184338793	8042	44	0	0.224894	0.0048194	48	0	0.738277	0.0159883	1.728080824	0	0	Link
BNHJUD:77871	97.73	99	4:145389389-145373389	2960	34	0	0.188022	0.0038174	80	0	0.189382	0.0041108	0.184415478	0	0	Link
BNHJUD:77872	97.51	99	4:18084231-180850383	8032	52	0	0.300824	0.0084488	82	2	2.08592	0.0454418	2.817398181	2	2	Link

図4. L1<sub>RP</sub> 様配列にマッピングされた RNA の発現解析 (一部)

Ir941;Yub633(Ins/Ins), Ir942;Yub637b(Del/Del), pid;BLASTの結果得られたL1<sub>RP</sub>との一致度(%), qcov; L1<sub>RP</sub> 全長に占める該当領域の割合, locus; 該当領域の位置情報, length; 該当領域の長さ, read\_count; 当該領域にアライメントされている全リード数, unique\_read\_count; 当該領域にアライメントされているリードの中で、一箇所のみアライメントされているリードの数, estimate\_read\_count; 各リードのマルチマップ数を考慮して補正を行った、当該領域に含まれる予想リード数, norm\_read\_count; 各検体間の総取得リード数を考慮して補正を行った検体間比較用の予想リード数



tracking_id	pid	qcov	locus	length	Ir941_no_mismatch				Ir942_no_mismatch				Ir942_no_mismatch log2(RA1,chr)	MAX unique read_count (%_aligned)	MAX unique read_count (%_aligned)	For EGV
					read_count	unique_read_count	estimate_read_count	norm_read_count	read_count	unique_read_count	estimate_read_count	norm_read_count				
IRFUD 15487 2	99.92	99	R:72875530-72881588	6049	178	0	1.1423	0.0244795	106	0	0.383262	0.0078776	-1.835700239	0		OutLink
IRFUD 15487 3	99.99	99	R:128425963-128439018	8033	180	0	0.493128	0.0105877	116	0	0.390029	0.0084378	-0.321298831	0		OutLink
IRFUD 15487 4	99.2	99	R:134070720-134076773	8033	154	0	0.428963	0.0091927	114	0	0.332201	0.0072103	-0.350422207	0		OutLink
IRFUD 15487 5	99.6	99	R:13592887-13598889	8002	178	0	0.517093	0.0110813	150	0	0.39813	0.0083355	-0.378986047	0		OutLink
IRFUD 15487 6	99.21	99	R:127113819-127119853	8034	144	0	0.412833	0.0088470	132	0	0.310407	0.0087312	-0.384317857	0		OutLink
IRFUD 15487 7	99.18	99	R:13220260-132208121	8041	120	0	0.330032	0.0075073	96	0	0.410294	0.0088973	-0.345085472	0		OutLink
IRFUD 15487 8	99.02	99	R:138436073-138444102	8027	92	0	0.342839	0.0073482	88	0	0.312183	0.0087897	-0.118298189	0		OutLink
IRFUD 15487 9	98.98	99	R:189148950-189157000	8035	138	0	0.978244	0.0209638	104	0	0.329642	0.0071528	-1.551342429	0		OutLink
IRFUD 15488 0	98.98	99	R:189863709-18991780	8031	128	0	0.332203	0.0071834	92	0	0.328877	0.0070884	-0.19209833	0		OutLink
IRFUD 15488 1	98.78	100	R:10452213-10453271	8038	130	0	0.880199	0.184341	96	0	0.280187	0.0084222	-1.708044714	0		OutLink
IRFUD 15488 2	98.81	99	R:133873883-133881907	8044	108	0	0.339507	0.0077042	104	0	0.328484	0.0071228	-0.113204287	0		OutLink
IRFUD 15488 3	98.78	99	R:130405813-130417985	8052	188	0	0.992728	0.0212742	118	0	0.38411	0.0083235	-1.332801348	0		OutLink
IRFUD 15488 4	98.79	99	R:14170982-14176908	8044	158	0	0.409883	0.0087837	138	0	0.388022	0.0127145	0.333329287	0		OutLink
IRFUD 15488 5	98.78	99	R:15158889-151594708	8037	124	0	0.30823	0.0086053	102	0	0.229987	0.0049888	-0.405301889	0		OutLink
IRFUD 15488 6	98.7	99	R:104739631-104748384	8043	98	0	0.388298	0.0082211	52	0	0.155339	0.0033883	-1.30483813	0		OutLink
IRFUD 15488 7	98.71	99	R:10552223-10553285	8042	92	0	0.482517	0.0095117	82	0	0.298784	0.0087493	-0.613419173	0		OutLink
IRFUD 15488 8	98.85	99	R:78821304-78827355	8051	128	0	0.459781	0.0098531	112	0	0.49748	0.0107875	0.130710935	0		OutLink
IRFUD 15488 9	98.18	99	R:125759803-12576854	8051	58	0	0.300475	0.0084591	74	0	0.192321	0.0042338	-0.80496175	4		OutLink
IRFUD 15489 0	98	99	R:188148849-188148890	8048	88	0	0.398578	0.0084988	52	0	0.0878859	0.0019011	-2.180371409	0		OutLink
IRFUD 15489 1	97.9	99	R:183797385-183805437	8052	34	0	0.428005	0.0091300	38	0	0.144379	0.0031312	-1.543917842	0		OutLink
IRFUD 15489 2	97.95	99	R:133297102-133305143	8040	82	0	0.292912	0.0082771	80	0	0.211503	0.0045884	-0.452707898	0		OutLink
IRFUD 15489 3	97.98	99	R:129152125-129158150	8025	90	0	0.979591	0.0209148	38	0	0.141718	0.0031915	-2.71218317	0		OutLink
IRFUD 15489 4	97.77	99	R:17408383-17412415	8052	92	0	0.349183	0.0074830	78	0	0.132111	0.0087703	-0.144390011	0		OutLink
IRFUD 15489 5	97.89	99	R:128159985-128189007	8022	83	0	0.273127	0.0088531	53	0	0.0909887	0.0019728	-1.889030312	1		OutLink
IRFUD 15489 6	98.02	99	R:1807578-1813320	5992	82	0	0.251011	0.0049505	58	0	0.310842	0.0080417	0.899924933	0		OutLink
IRFUD 15489 7	97.87	100	R:19814448-19820504	8038	94	0	0.798699	0.0157855	74	0	0.240203	0.0032110	-1.9889228	0		OutLink
IRFUD 15489 8	97.77	99	R:18088373-18094808	8035	40	0	0.487232	0.0104414	38	0	0.203008	0.0049883	-1.083871889	0		OutLink
IRFUD 15489 9	97.7	99	R:12147433-12153484	8031	48	0	0.209515	0.0044828	40	0	0.849192	0.0146935	1.851850625	0		OutLink
IRFUD 15490 0	97.88	99	R:13328040-133305071	8031	78	0	0.349732	0.0078451	78	0	0.482543	0.010484	0.432810183	0		OutLink
IRFUD 15490 1	97.59	99	R:13721785-137327829	8044	34	0	0.180138	0.0038803	28	0	0.042296	0.0009222	-1.974483509	0		OutLink
IRFUD 15490 2	97.54	100	R:125730318-125738354	8038	48	0	0.524432	0.0112388	52	0	0.248903	0.0035341	-1.089735381	2		OutLink
IRFUD 15490 3	97.5	99	R:136280278-13628910	8034	70	2	2.17187	0.0485432	48	0	0.184588	0.0038890	-3.70484828	2		OutLink
IRFUD 15490 4	97.51	99	R:14415044-14423573	8029	24	0	0.184374	0.0032223	44	0	0.38934	0.0129101	1.873818277	0		OutLink
IRFUD 15490 5	97.43	99	R:128891489-128897319	8030	42	0	2.80555	0.0388389	34	0	0.208049	0.0044882	-3.843449721	0		OutLink
IRFUD 15490 6	97.32	99	R:14942831-14948978	8045	34	0	0.181537	0.0034578	22	0	0.0388288	0.0008419	-2.038032209	0		OutLink
IRFUD 15490 7	97.45	99	R:119150395-119182410	8015	84	0	0.197371	0.0042298	54	0	0.18273	0.0039829	-0.09399851	0		OutLink
IRFUD 15490 8	97.28	99	R:15578281-15582333	8042	38	0	0.157388	0.0033720	28	0	0.15215	0.0032869	-0.031755728	0		OutLink
IRFUD 15490 9	97.29	99	R:18961097-18965119	8022	42	0	0.308393	0.0088088	44	0	0.183042	0.0035338	-0.90244837	0		OutLink
IRFUD 15491 0	97.53	99	R:13177090-131778924	5974	48	0	0.172947	0.0037082	38	0	0.107727	0.0023380	-0.883870319	0		OutLink
IRFUD 15491 1	97.11	99	R:18943989-18950025	8008	38	0	0.177377	0.0038054	70	0	0.483121	0.0104788	1.481024032	0		OutLink
IRFUD 15491 2	97.28	99	R:12472441-12482483	8022	34	0	0.31302	0.0087308	38	0	0.144188	0.0031283	-1.110814734	0		OutLink
IRFUD 15491 3	97.14	99	R:135171458-135177208	8049	44	0	0.132451	0.0028379	48	0	0.130849	0.0028331	-0.002482319	0		OutLink
IRFUD 15491 4	97.23	99	R:183447145-183453189	8024	34	0	0.108827	0.0022890	38	0	0.153108	0.0033201	0.538337544	0		OutLink
IRFUD 15491 5	97.21	99	R:12844182-12850187	8025	32	0	0.288853	0.0038829	88	0	0.198394	0.0042831	-0.417254081	0		OutLink
IRFUD 15491 6	97.18	99	R:112284008-112800030	8024	44	0	0.981939	0.0120423	40	0	0.0509234	0.0011042	-3.448953032	0		OutLink
IRFUD 15491 7	97.17	99	R:128759818-128802844	8028	40	0	0.121515	0.0028040	38	0	0.18979	0.0038819	0.498989388	0		OutLink
IRFUD 15491 8	97.09	99	R:48793901-48799930	8029	20	0	0.0287119	0.0008152	42	0	0.0957738	0.0020788	1.735008398	0		OutLink
IRFUD 15491 9	98.99	99	R:89254220-89260271	8051	38	0	0.242851	0.0052000	38	0	0.217278	0.0047118	-0.142272838	0		OutLink
IRFUD 15492 0	97.07	99	R:144841132-14470184	8032	48	0	0.832988	0.0132849	38	0	0.184815	0.0040077	-1.75901359	0		OutLink
IRFUD 15492 1	97.12	99	R:1488832-14872545	8023	38	0	0.0727181	0.0013383	88	0	0.0921003	0.0019972	0.337973983	0		OutLink

図5. L1.3 様配列にマッピングされた RNA の発現解析 (一部)

Ir941;Yub633(Ins/Ins), Ir942;Yub637b(Del/Del), pid;BLAST の結果得られた L1.3 との一致度(%), qcov; L1.3 全長に占める該当領域の割合, locus; 該当領域の位置情報, length; 該当領域の長さ, read\_count; 当該領域にアライメントされている全リード数, unique\_read\_count; 当該領域にアライメントされているリードの中で、一箇所のみアライメントされているリードの数, estimate\_read\_count; 各リードのマルチマップ数を考慮して補正を行った、当該領域に含まれる予想リード数, norm\_read\_count; 各検体間の総取得リード数を考慮して補正を行った検体間比較用の予想リード数

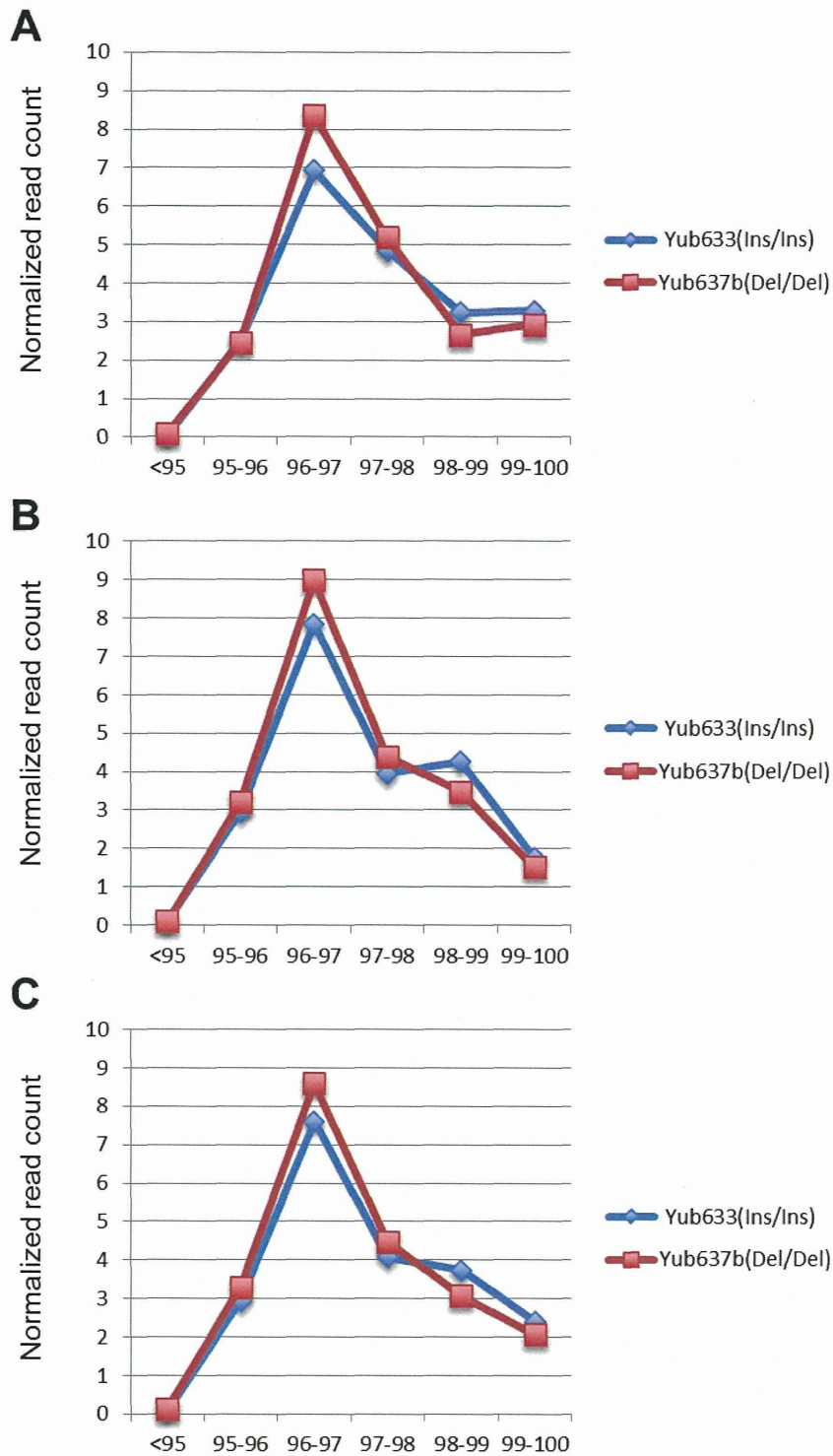


図6. LINE-1 配列との各一致度における normalized read count 数  
 (A) L1<sub>b-thal</sub> (B) L1<sub>RP</sub> (C) L1.3 全長に占める割合が 99%以上の LINE-1s 様配列を抽出し、各塩基配列の一致度におけるリード数を合計した。

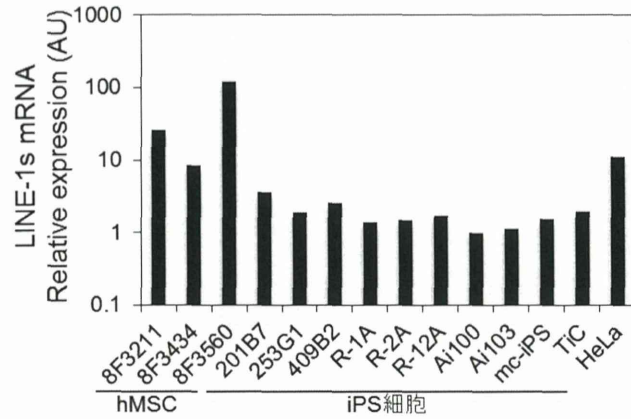


図7. hMSCs 及び iPS 細胞における LINE-1s mRNA の発現解析  
Ai103 の発現量を 1 とする。

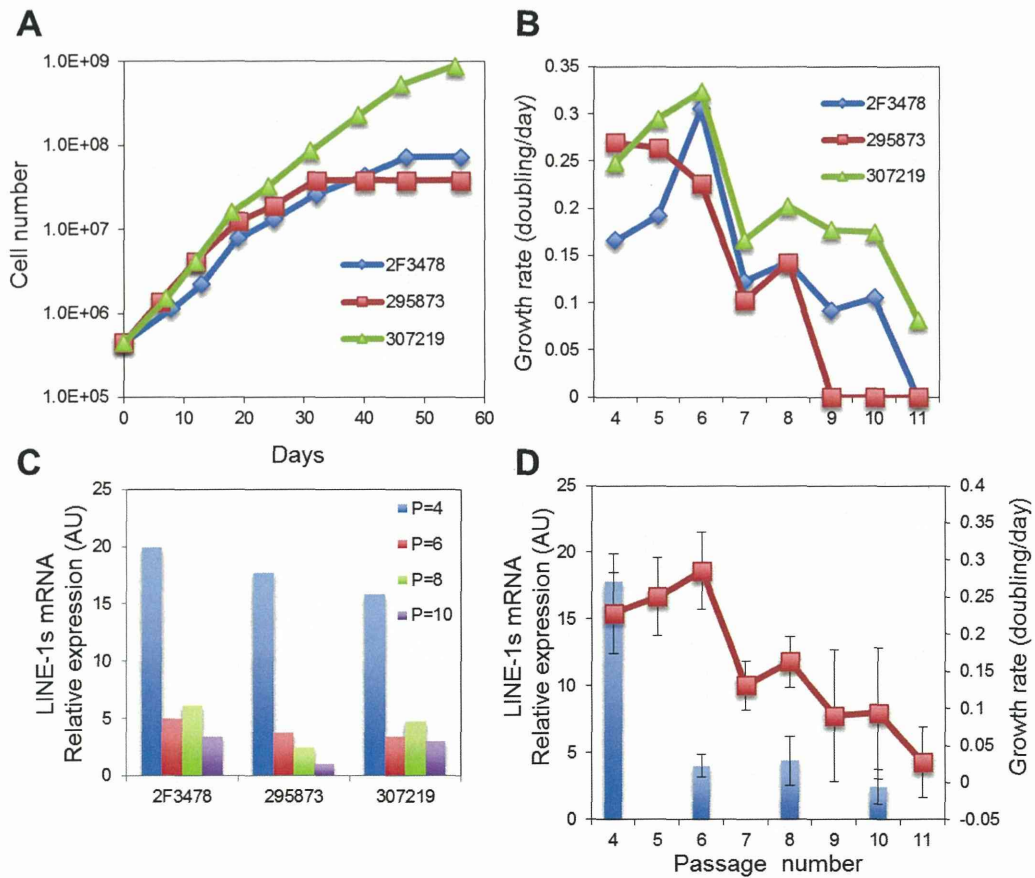


図8. hMSCs の増殖及び LINE-1s の発現解析

(A) hMSCs 3 ロットの増殖曲線. (B) 各継代間での増殖速度. (C) 各継代数における LINE-1s の発現比較(295873 P=10 の発現量を 1 とする). (D) (B)及び(C)の平均値

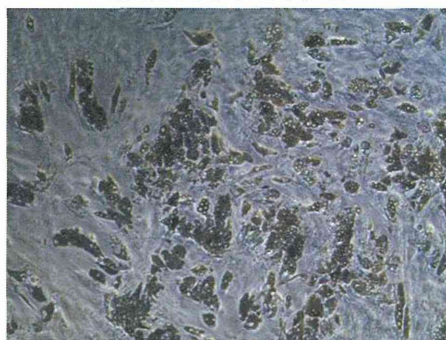


**A**

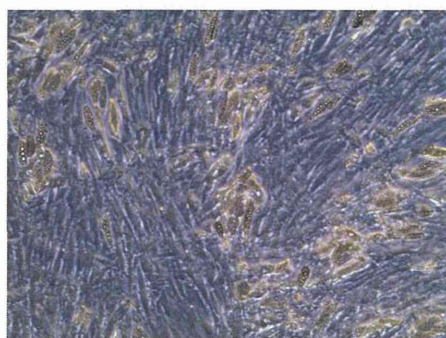
脂肪分化培地

增殖培地

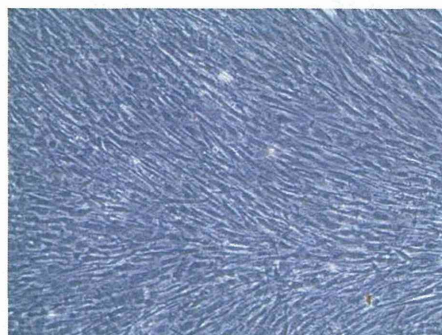
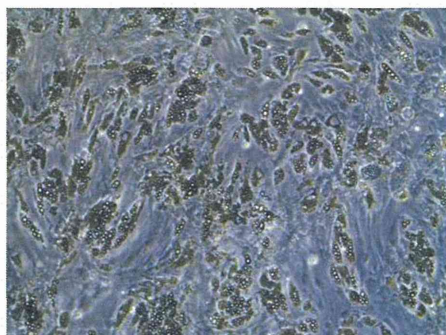
2F3478



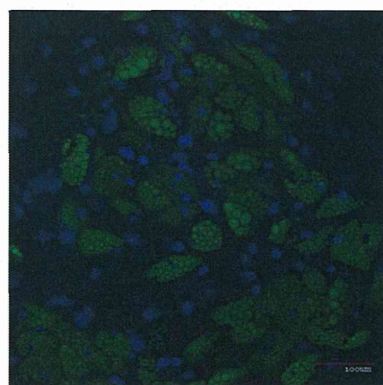
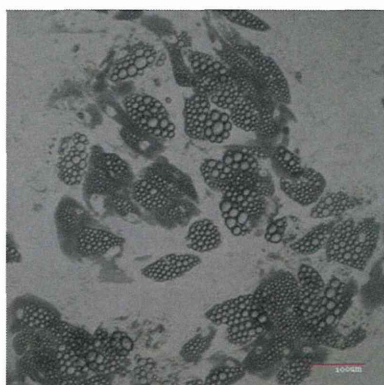
295873



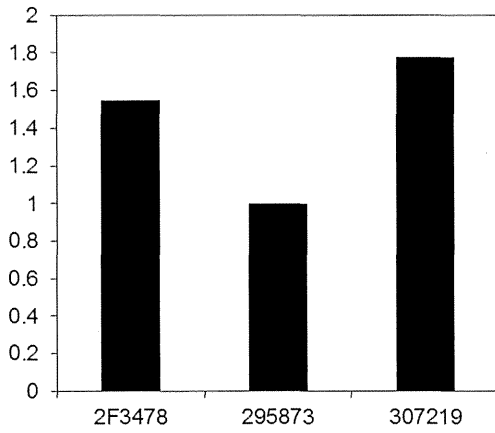
307219



**B**



C



D

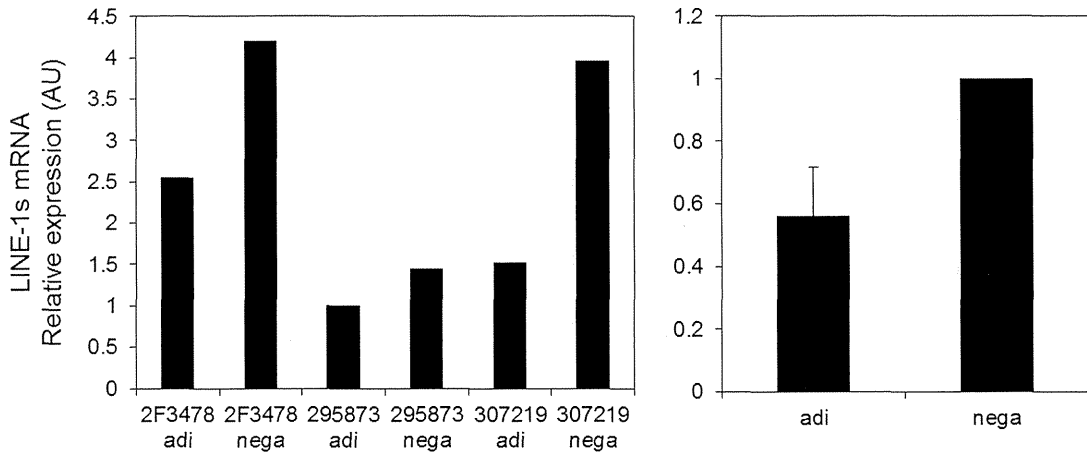


図9. hMSCs の脂肪分化と LINE-1s の発現解析

(A)脂肪分化培地及び増殖培地で培養した hMSCs 3 ロットの顕微鏡写真. (B) 脂肪分化培地で培養した hMSCs の脂肪球蛍光染色観察写真. 緑; 脂肪球. 青; 核(C) hMSCs 各ロットの脂肪球が染色された面積の比較 (295873 の面積を 1 とする). (D) 脂肪分化培地 (adi)及び増殖培地(nega)で培養した hMSCs 3 ロットの LINE-1 発現比較 (脂肪分化 295873 を 1 とする) (左パネル) とそれぞれの増殖培地 (nega) を 1 とした時の脂肪分化培地 hMSCs における LINE-1s 発現の平均値 (右パネル) .



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」  
分担研究報告書

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  
研究分担者：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

## 研究要旨

我々はこれまでに主に細胞の遺伝的安定性の評価という観点から、次世代型シーケンサーの活用に関して検討を行ってきた。そして、既知の遺伝子増幅や染色体のリアレンジメントを持つモデル細胞を用い、ゲノム変化をシーケンスレベルで解析可能であることを確認した。一方、未知のゲノムリアレンジメントに対しては、遺伝子増幅については比較的詳細に検出可能であることがわかったが、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にしており、これらを考慮した独自のアルゴリズムの確立が必要であることが明らかとなった。現在新たな開発された手法を元にその有効性を検証している。iPS 細胞を用いた継代培養では、培養中に比較的選択圧がかかりやすく、長期培養により増殖性のクローンが選択されてくる危険性が指摘されている。次世代型シーケンサーによるゲノム解析により、こうした培養環境を反映したポピュレーションジェネティクスの変化を追うことができ、細胞の形質が培養過程で変化していないことのチェックに有用である。

遺伝的不安定性のモデルとして、染色体の安定性に寄与する遺伝子（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、通常のホールゲノム解析においては、顕著な変化は検出されなかった。以前より進めていた一分子シーケンサーによる高感度変異検出法の検討においては、用いた PacBio シーケンサーのエラー率の高さから期待した感度は得られなかった。現在、解析条件の検討による改良を行うとともに、汎用性の高い Illumina 社シーケンサーを用いた non-PCR based paired-end consensus 法による変異の検出を試みている。

一方で、タンパク質発現プロファイルデータのデータベース化と標準化を目的に昨年度に構築した ProteoMap ソフトウェアを活用し、Web 上にて質量分析データを可視化するとともに、MS/MS スペクトル情報および同定結果を提供しうるサービス ProteoMap Online を構築した。今後、細胞のタンパク発現プロファイルの比較に有用なツールとして、当所 HP 上にて公開予定である。

## 研究協力者

三浦 巧

国立医薬品食品衛生研究所  
再生・細胞医療製品部 室長

本間 正充

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 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  
遺伝子細胞医薬

### A. 研究目的

iPS 細胞をはじめとして、細胞治療において最も懸念される問題は、移植後の細胞の癌化であり、事前にその安全性を担保しうる試験法の開発が求められている。免疫不全動物を用いて癌化形質を持った細胞の存在を高感度に検出する手法の開発も進められているが、より一般的に細胞の遺伝的安定性を調べる試験法の開発も重要である。従来型の試験法として、染色体異常試験や SNP アレイ解析、アレイ CGH などの方法が存在するが、より網羅性の高い、高感度な試験法が開発が望まれている。そのため新たな手法として、近年発展の著しい次世代型のシーケンサーを用いたゲノム解析法の応用が注目されている。近年の技術革新により大幅なコストダウンが図られ、いわゆる“1000ドルゲノム”、即ち全ゲノムを1000ドルで読むというのが既に現実的なものとなっている。このレベルまでコストダウンが進めば、標準的試験法として、細胞治療医薬品の品質評

価に用いることも可能になると考えられるため、こうした応用を意識した次世代シーケンサーによるシーケンス解析データの評価とその応用に向けた基礎的知見を得るための検討を進めた。次世代シーケンサーによるシーケンス解析は、従来法に比べてスループットの高さによる網羅性と、マイナーな変異の検出という点で優れている。我々は、これまでの検討により、すでに変異部位がある程度確かめられている細胞株をモデルとして、次世代シーケンサーから得られる配列情報の信頼性およびその評価基準の設定に向けた基礎検討を行った。そして、さらに高感度な低頻度変異の検出法としての一分子シーケンサーの応用に関して検討を行った。

一方で、細胞のタンパク質発現プロファイルは、細胞の遺伝子情報の反映のみならず、環境因子により変化するエピゲノムや翻訳後修飾によるシグナル伝達を反映する細胞の動的な表現形質の変化の指標として捉えることができる。細胞の動的な品質評価としてのタンパク質発現プロファイル情報の利用に向け、我々は LC-MS/MS によるショットガンプロテオミクスにより得られた網羅的ペプチド発現情報を可視化し、比較可能な形としてリファレンスデータを提供するための手段としてのデータビューワーとなるソフトウェアの開発を行った。そして、得られた質量分析データをリファレンスデータとしてウェブ上で提供するためのシステムの構築を行った。

### B. 研究方法

#### 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、以前の検討において、異常が認められたロット 4 F1560 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%コンフルエントの状態にて継代を続けた。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。

## 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  $1-2 \times 10^6$  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 ( $10K \times g$ ,  $4^\circ C$ , 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 ( $10K \times g$ ,  $4^\circ C$ , 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)  $37^\circ C$  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  $300 \mu l$  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 ( $10K \times g$ , 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 ( $10K \times g$ , 室温, 5 分間) した後、上清を除いた。

た。

- 11) 洗浄液 B を 1ml 加えて混合し、遠心分離 ( $10K \times g$ , 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.  $2-5 \times 10^7$  個の細胞を集め、5-10 ml の氷 PBS にて洗浄し、 $600 \times g$ 、5 分  $4^\circ C$  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、 $1000 \times g$  1 分間  $4^\circ C$  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、 $10,000 \times g$  10 分、 $4^\circ C$  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  $50 \mu l$  を加え、ピペッティングにより懸濁させた。
7. DNA Extraction solution II (A)  $50 \mu l$  および DNA Extraction solution II (B)  $50 \mu l$  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.  $75 \mu l$  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バッファに溶解し、-20°Cにて保存した。

### 3. 次世代シーケンサーを用いたシーケンス解析

#### 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、1 µg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 end 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。

#### 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。

### 5. 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、相同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。

また、発現タンパク質の変化についても、LC-MS/MS を用いたショットガンプロテオミクスの手法により比較した。

## 6. 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 ProteoMap Online 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。

### (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。

## C. 研究結果

### 1. ホールゲノムシーケンス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スデータを用

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ス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。

図 1 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スを元に、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、図 2 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

配列は、実際に切断点をまたがって異なるセグメント間に及ぶものが複数確認できるとともに、ペアーエンド同士のリードが隣接する異なるセグメント間にアラインメントされていた事実からも、予想された部位と順序でリアレンジメントが起こっていることが確認された。最終的に確認された切断点の配列を表 1 に示す。

次に、転座部位に関する正確な情報の得られていない TK6 細胞株を用いて WGS 解析により転座切断点の同定を試みた。TK6 細胞においてはこれまでの染色体解析より図 3 に示すように、正常に近い核型を持つが、3 番と 21 番、および 14 番と 20 番染色体間に転座を有することが、multicolor-FISH 解析によりわかっている。この転座点の配列を WGS データより決定するために、次のようなアルゴリズムを構築した。イルミナシーケンサーからのリードは、インサート配列を両端から読んでいるため、同一インサートフラグメント約数百 bp に対して、両端から読んだ約 100bp のリード情報がペアで存在し、これらをメイトペアと読んでいる。通常メイトペアは染色体上の近傍にマップされるが、切断点をまたぐフラグメントからのシーケンス情報は、それぞれ別の領域にマップされることになる。この点を利用して、メイトペアがそれぞれ、3 番と 21 番、および 14 番と 20 番染色体上にマップされたリードの情報を抽出した。切断点をまたぐリードは残念ながら通常のマッピング解析ではアラインメントされず捨てられてしまうが、その近傍のリードについてはそれぞれ異なる部位に完全にマッチするためマップされたリードとして存在するので、このアルゴリズムで検出可能となる。

このようにしてマッピングデータから該当するメイトペアを抽出したところ、膨大な数の切断点の候補が得られた。ランダムなアラインメントエラーも考慮し、抽出されたリードが集

中している領域に関して、そのゲノム配列を UCSC ゲノムブラウザにて確認したところ、そのほとんどが、LINE-1、LTR などのゲノム上に散在する繰り返し配列の位置と一致した。即ち、こうした繰り返し配列はその相同性のため本来とは別の染色体上の位置にミスアラインメントされる可能性が高く、こうした解析をする場合に偽陽性結果を与えることがわかった。ただし、一部には各染色体に固有の領域にマッピングされるペアが存在し、これらは転座切断点の候補となる。今後得られた位置情報よりプライマーを設計し、切断点の増幅によるクローニングを行い、シーケンスの確認を行う予定である。

一方、別のアプローチとして、新たなアルゴリズムによるシーケンスデータ解析からの検討も行っている。本来マッピング操作時に、リファレンスシーケンスにはアラインメントされずに捨てられているデータの中に切断点を含むリードが含まれているはずであるので、これかの中から、部分的に完全にマッチして異なる部位にマッピングされる配列を拾い上げるためのアルゴリズムの構築を行っている。

## 2. 1 分子シーケンサーを用いた高感度変異検出法の開発

TK6 細胞を代表的な変異原物質である ENU, MMS, γ線にて処理し、tk 遺伝子を用いた遺伝子突然変異試験により、変異の誘発を確認した。前回の検討から得られた DNA の品質に問題があったため、再び新しい細胞を用いて実験を繰り返した。その結果、概ね前回と同様の結果が得られた (表 3)。変異原物質処理による細胞の生存率は、2-8 割と処理により異なったが、tk 遺伝子の変異頻度はコントロールに比較して 40-100 倍と有意に増加した。これらの細胞から、今回は mtDNA エクスト