

の場合、追加されたアレルが染色体のどこにあるのかを調べることは容易ではなかった。今回 1 人のデータではあるものの、そのいくつかの場所を特定するばかりでなく、ブレイクポイント配列を塩基レベルで正確に決定することができた。これまでアジア人に欠失している遺伝子は多く知られているが、リファレンス配列に欠失している未知の配列も、今回得られた scaffold の中から探し出すことも可能であると考えている。これら構造多型は、可逆的な SNP に対し、不可逆な変異であるため、これまで SNP から描かれていた曖昧な系統樹を修正することができ、人類学への貢献も期待される成果である。今回は 1 サンプルのアセンブリ、5 サンプルのマッピングであったが、引き続きサンプル収集を行い、アノテーションも充実させ、日本人ゲノム標準リファレンス配列を、アレル頻度情報とともに完成させる予定である。

#### E. 結論

現在のリファレンス配列は、アジア人の SNP 情報が反映されているものの、そもそもの骨格は主としてヨーロッパおよびアフリカ由来のヒトゲノムを用いて組み立てられた配列である。日本人の由来については諸説あるが、日本列島への最後の大規模な人類の移動は約 2000 年前であると考えられており、それ以前は多くのアジア系民族の血が混じり合い、それ以後は比較的孤立した状態を保ってきたというユニークな遺伝的特徴を持つ。それゆえに日本人ゲノムには挿入、欠失、重複、反復配列伸張や短縮、

トランスポゾンの挿入や欠失、転座、遺伝子変換など共通し、かつ他の人種から区別されうる多くの構造多型があると考えても不思議ではない。エクソーム解析をはじめとする次世代シーケンサを用いたリシーケンシングにおいては、リファレンスと大きく異なるこれらの配列データは扱うことができないため無視されている。日本人を対象とした医療を考える場合、治療のための細胞品質評価も含め、*de novo* アセンブリと第 3 世代シーケンサを利用し、日本人ゲノムのリファレンス配列を用意することが有効であると考えられ、本研究においてその最初のデータを産出することができた。このデータが細胞を用いた再生医療、パーソナル医療を始めとする将来の医療に貢献することは間違いない。

#### F. 危険情報

なし

#### G. 研究発表

Fukawatase Y, Toyoda M, Okamura K, Nakamura K, Nakabayashi K, Takada S, Yamazaki-Inoue M, Masuda A, Nasu M, Hata K, Hanaoka K, Higuchi A, Takubo K, Umezawa A.

Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability.

Sci. Rep. 4, 5421 (2014)

Migita O, Maehara K, Kamura H, Miyakoshi

K, Tanaka M, Morokuma S, Fukushima K, Shimamoto T, Saito S, Sago H, Nishihama K, Abe K, Nakabayashi K, Umezawa A, Okamura K, Hata K.

Compilation of copy number variants identified in phenotypically normal and parous Japanese women.

J. Hum. Genet. 59, 326-331 (2014)

Hayashi K, Kawai YL, Yura K, Yoshida MA, Ogura A, Hata K, Nakabayashi K, Okamura

K.

Complete genome sequence of the mitochondrial DNA of the sparkling enope squid, *Watasenia scintillans*.

Mitochondrial DNA  
doi:10.3109/19401736.2014.971251 (2014)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

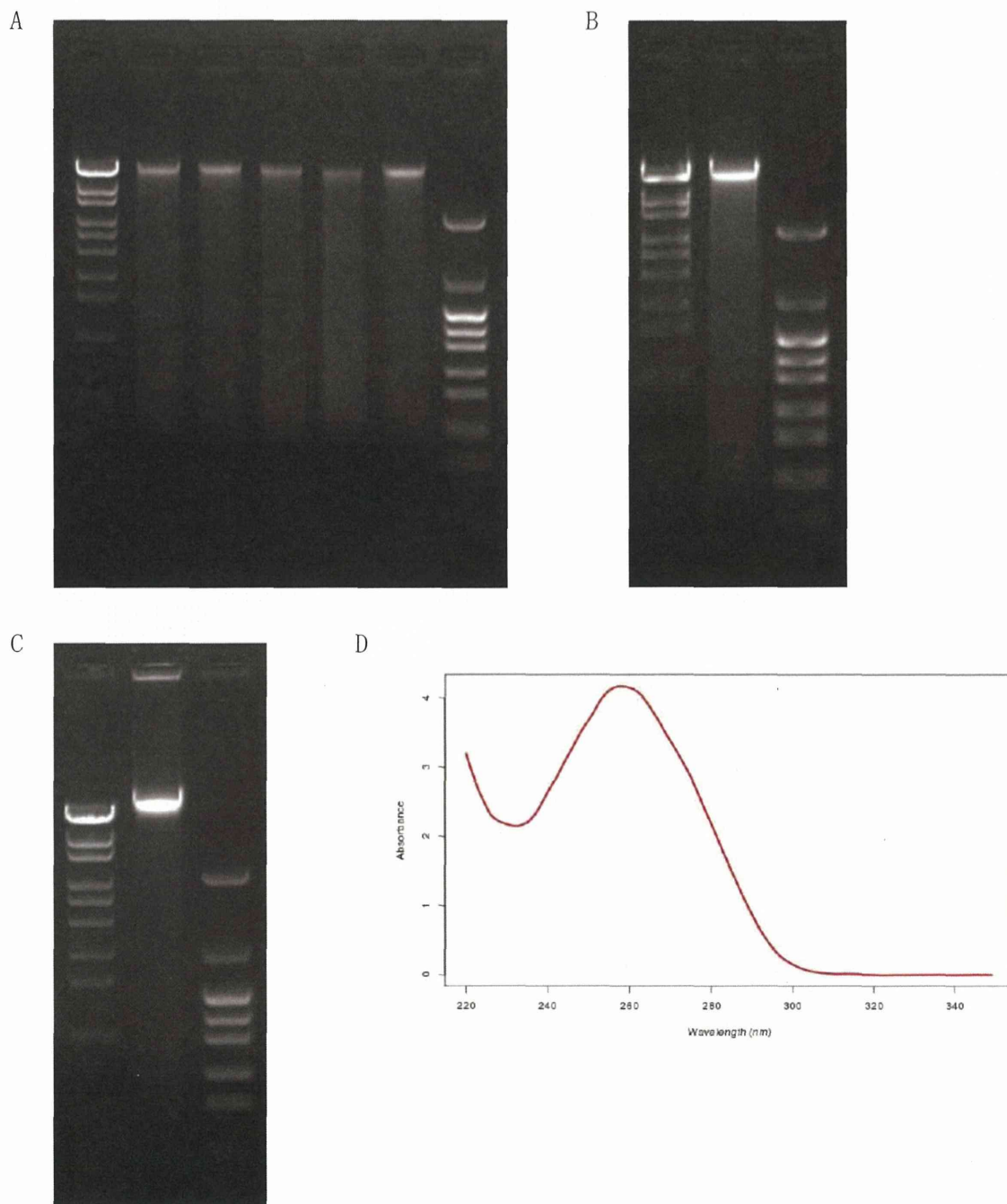


Figure 1. ゲノム DNA 抽出結果

(A, B) 6人の健常日本人男性(JOM001, JOM002, JOM003, JOM004, JOM005, JOM006)の精液 250  $\mu$ L から抽出したゲノム DNA の一部を電気泳動した。収量は左側の検体からそれぞれ、3.2  $\mu$ g、1.1  $\mu$ g、2.5  $\mu$ g、7.7  $\mu$ g、3.1  $\mu$ g、4.0  $\mu$ g であった。(C) 左から5番目の個人(JOM005)について、さらに 1750  $\mu$ L の精液から 73.0  $\mu$ g のゲノム DNA を得た。サイズマーカーは  $\lambda$ -EcoT14I および pHY を用いた。(D) C に示したサンプルに対して吸光定量を行い、品質の確認を行った。

Table 1. SNP タイピング 2, 294, 794 サイトの結果

ID	Homo (Ref/Ref)	Homo (Alt/Alt)	Hetero
JOM001	1, 599, 066	305, 672	385, 367
JOM002	1, 599, 828	307, 376	384, 500
JOM003	1, 600, 578	307, 857	383, 589
JOM004	1, 597, 215	307, 531	387, 059
JOM005	1, 600, 864	308, 225	381, 883

Table 2.

ID	SNPs1	SNPs2	SNPs3	SNPs4
JOM001	17	41	4	6
JOM002	19	37	12	1
JOM003	24	39	9	2
JOM004	13	23	7	1
JOM005	25	30	3	2

SNPs1: 全体と比較して日本人に稀な SNP 群

SNPs2: 欧州人と比較して日本人に稀な SNP 群

SNPs3: 東アジア人と比較して日本人に稀な SNP 群

SNPs4: 東アジア人には稀だが、日本人に多い SNP 群

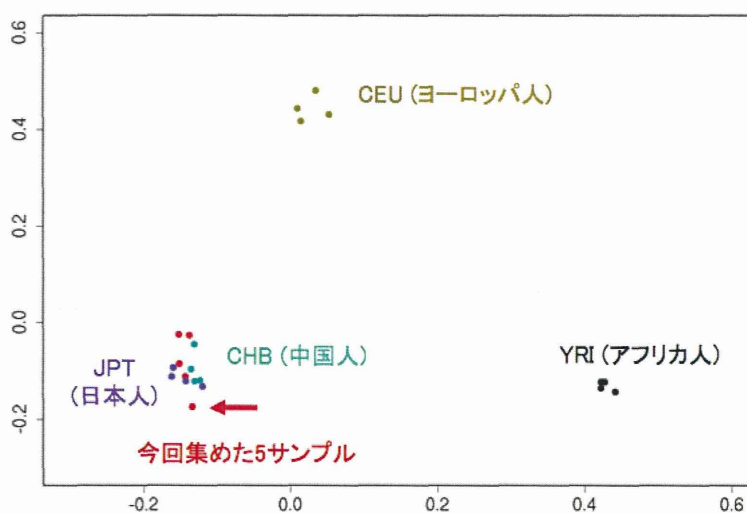


Figure 2. SNP タイピングのデータをもとに行った主成分分析

1000 人ゲノムから選んだ 16 サンプルと、今回 SNP タイピングを行った 5 サンプル(赤色)との比較。アセンブリ対象の Sample 5 を赤矢印で示した。

Table 3. Illumina HiSeq から得られた塩基数 (Mb: mega base)

Library type	Insert size	Mb	Mb (Q > 15)	Read length
Paired end	260 bp	269,140	261,298	150 nt × 2
Paired end	360 bp	137,934	132,559	125 nt × 2
Paired end	660 bp	161,552	154,689	150 nt × 2
Mate pair	2 kb	102,230	97,729	150 nt × 2
Mate pair	5 kb	45,245	43,738	150 nt × 2
Mate pair	9 kb	46,134	44,512	150 nt × 2
Total	N/a	762,235	601,966	N/a

Table 4. トリミング後の塩基数

Library type	Insert size	Trimmed Mb	Mb (Q > 15)	Actual size
Paired end	260 bp	259,596	257,686	240 bp
Paired end	360 bp	135,509	131,901	330 bp
Paired end	660 bp	154,125	152,814	640 bp
Mate pair	2 kb	59,506	58,999	1.6 kb
Mate pair	5 kb	27,084	26,920	4.6 kb
Mate pair	9 kb	27,584	27,410	8.6 kb
Total	N/a	663,404	655,730	N/a

Table 5. ALLPATHS-LG によるゲノムサイズ等の推定

一倍体ゲノムサイズ *	2,741,890,408 bp
G+C 含量	40.2%
反復配列の割合 (K = 25)	27.0%

\* GRCh37/hg19 の参考値: 3,137,161,264 bp

Table 6. ALLPATHS-LG による de novo アセンブリの結果

contig の最短長	1000 bp
全 contig 数	485,318
全 scaffold 数	333,852
総 contig 長	2,254,772,438 bp
総 scaffold 長 (gap を含む)	2,535,926,213 bp
N50 contig	9.3 kb
N50 scaffold	39 kb
N50 scaffold (gap を含む)	45 kb

Table 7. PacBio RS II から得られたデータ

PacBio RS II	ライブラリ S1	ライブラリ S2	S1 + S2
塩基数	9,146 Mb	35,694 Mb	44,840 Mb
リード数	757,979	3,673,817	4,431,796
平均リード長	12,066 bp	9716 bp	N/a
最長リード長	49,865 bp	53,506 bp	53,506 bp

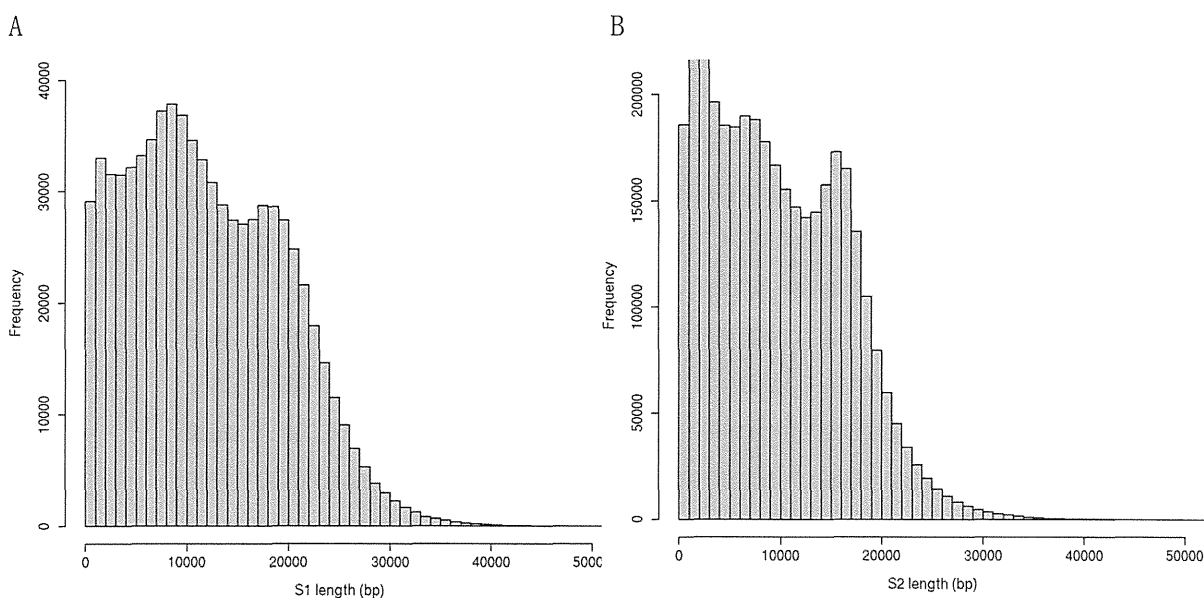


Figure 3. PacBio RS II から得られたロングリードの長さの分布

(A) ライブラリ S1 から得られたリード長の分布。(B) ライブラリ S2 から得られたリード長の分布。S2 から得られた配列データの方が多いため、縦軸のスケールが一致していないことに注意。

HiSeq	1748	AGGCGATAGAAATTGAAACCTGGCGCAATAGATATAGTACCG--CAAGGGAAAAGA-TG--	1802
PacBio	1824	AGGCGATAGAAATTGAAACCTGGCGCAATAGATATAGTACCGGCCAAGGG-AAGATTGAA	1882
HiSeq	1803	--AAAAATTATAACCAAGCA-TAATATA-GCAAGGACTAACCCCTATACCTTCTGCATAA	1858
PacBio	1883	AAAAAAATTATAACCA-GCATTAAATAGGCAAGGACTAACCCCTATACCTTCTGCATAA	1941
HiSeq	1859	TGAATT-AACTAGAAATAACTTTGCAAGGAGAGCCAAAGCTAAGACCCCGAAACCAGAC	1917
PacBio	1942	T-AATTAAGCTAGAAATAACTTTGCAAGGAGAGCC-AAGCTAAGACCCCGAAACCAGAC	1999
HiSeq	1918	GA-GCTACCTAAGAACAGCT--AAAAGAGCACACCCGTCTATGTAGCAAATAGT--GGG	1972
PacBio	2000	GAGGCTACCTAAGAACAGCTTAAAAGAGCACACCCGTCTATGTAGCAAATAGTGGGGG	2059
HiSeq	1973	AAGATTTATAGGT--A-GAGGCGACAAACCT-ACCGA-GCC-TGGTGATAGC-TGGTTGT	2025
PacBio	2060	AAGATTTATAGGTTTATGAGGCGACAAACCTTACCGAGGCCCTGGTGATAGCTTGGTTGT	2119
HiSeq	2026	CC-AAGATAGAATCTTAGTTCAAC-TTTAAATTTGCCACAGAACCCTCTAAATCCCCTT	2083
PacBio	2120	CCAAAGATAGAATCTTAGTTCAACTTTTAAATTTGCCACAGAACCCTCTAA-TGCCCTT	2178
HiSeq	2084	GTAAATTTAACTGTTAGTCCAAGAGGAACAGCTCTTTGGACACTAGG--AAAAACCTT	2141
PacBio	2179	GT-AATTTAACTGTTAGTCC-AAGAGGAACAGCTCTTTGGACACTAGGCGAAAAACCTT	2236
HiSeq	2142	-GTAGAGAGAGTAAAAATTTAACACCCATAGTAGGCCTAAAAGCAGCCACCAATTAAGA	2200
PacBio	2237	CGTAGAGAGAGTAAAAAATTAAACCCATAGTAGGCCT-AAAGCAGCCACCAATTAAGA	2295
HiSeq	2201	AAGCGTT-CAAGCTCAACACCCACTACCTAAAAATCCCAAACATATAA-CTG-AACTCC	2257
PacBio	2296	AAGCGTTC AAGCTCAACACCCACTACCTAAAAATCCCAAACATATAATCTGAAACTCC	2355
HiSeq	2258	TCACACCCAATTGGACCAA--TCTATCACC-C----TATAGAAGAACTAATGTTAGTATA	2310
PacBio	2356	TCACACCCAATTG-ACCAATTTCTATCACCTCTATGTATAGAAGAACTAATTTTAGTATA	2414
HiSeq	2311	AGTAACAT-GAAAACATTCTCCTCCGCAT AAGCCTGCGT---CAG-ATTA AAAA-CACTGA	2364
PacBio	2415	AGTAACATTGAAAAC-TTCTCCTCCGCAT AAGCCTGCGTTTTCCAGTATTA AACCACTGA	2473
HiSeq	2365	ACTGACAATTAACAGCCCAA-TATCT-ACAATCAACCAACAAGTCATTATTACCTCACT	2422
PacBio	2474	ACTGACATTAACAGCCCAATTATCTAACAATCAACCAACAAGTCATTATTACCTCACT	2533
HiSeq	2423	GTCAACCCAACACAGGC-ATGCTCATAAGGAAAGG--TTaaaaaaGTAAAGGAACT-C	2478
PacBio	2534	GTCAACCCAACACAGGCTATGCTCATAAGGAAAGGCTTTAAAAAAGTAAAGGAACTTC	2593
HiSeq	2479	GGCAAATCT--TACCCGCTGTTTACC-AAAAACAT-CA-CCTCTAGCATC-ACCAGTA	2532
PacBio	2594	GGCAAATCTGATA-CCCGCTGTTTACCCAAAAACATCCAGCCTCTAGCATCGACCAGTA	2652
HiSeq	2533	TTAGAGGCACCGCC-TGCCAGT-GACACATGTTTACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGC	2590
PacBio	2653	TTAGAGGCACCGCCCTGCCAGTGGAC-CATGTTTAA-GGCCGGGTACCTAAACCGTGC	2710
HiSeq	2591	AAAGGTA-GCATAATCACTTGTTCCCTTAAATAGGGACCTGT-ATGAAT-GGCTCCACGAG	2647
PacBio	2711	AAAGGTAGGCATAATCACTTGTTCCCTTAAATAGGGAC-TGTAATGAATGGCTCCACGAG	2769
HiSeq	2648	GG-TTCAGTGTCTCTTACTTTTAAACCAGTGAAATTGACCT-GCCCGTGAAGAGGCGGG-	2704
PacBio	2770	GGCTTCAGTGTCTCTTAC-TTAACCAGTGAAATTGACCTGGCCCGTGAAGAGGCGGGG	2827

Figure 4. HiSeq で得られたショートリードをアセンブルした結果と、PacBio から得られた 1 つのローングリッドを mtDNA の一部で比較。BLASTN によって計算された塩基の identity は mtDNA 全体で 92%であった。

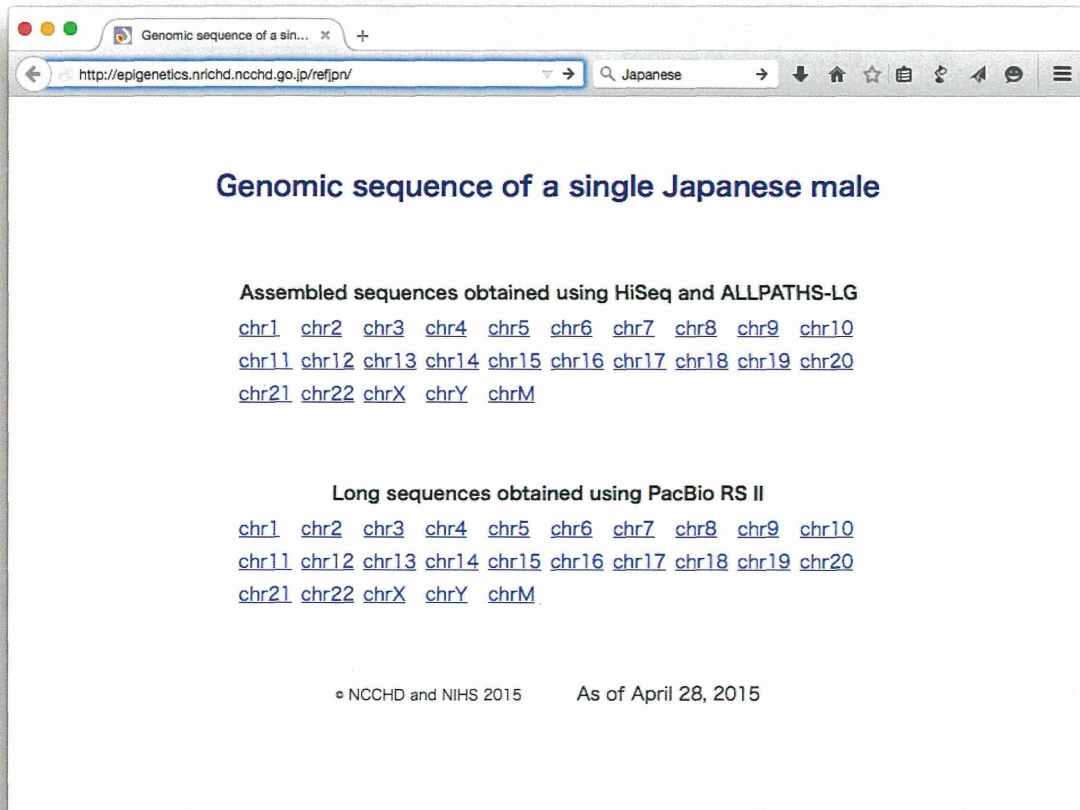


Figure 5. JOM005 配列データ公開サイト <http://epigenetics.nrichd.ncchd.go.jp/refjpn/>

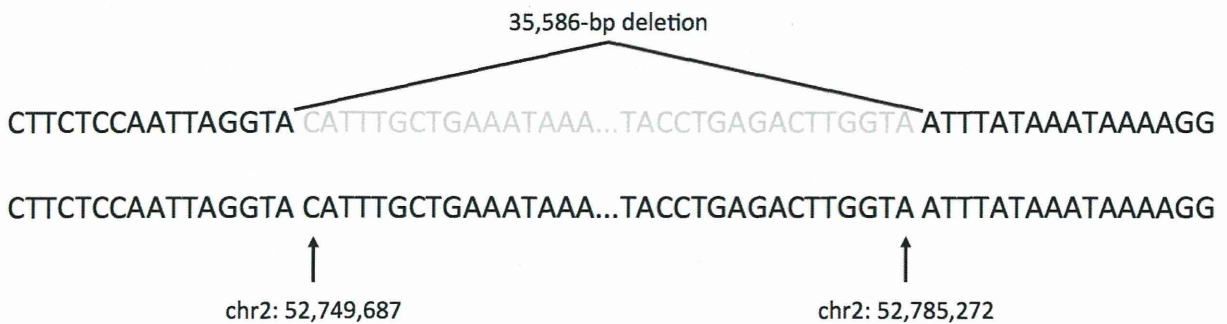


Figure 6. 多くの健常日本人が保有する第2番染色体短腕 52.77 Mb (2p16.2) 26 kb 欠失のブレイクポイントを JOM005 の配列データから決めることができた。



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

（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）

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

研究分担者：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室長

研究要旨【目的】iPS 細胞といった多能性幹細胞は、多分化能と自己増殖能を併せ持つため、再生医療等製品の原材料として大きな期待を担っている。多能性幹細胞利用製品の実用化促進には、多能性幹細胞から目的細胞への分化効率を上昇させ、目的外細胞の製品への混在をより低減する必要がある。多能性幹細胞は、分化における指向性（分化プロペンシティ）を持つことから、目的細胞への分化に最適な株を選定して製品化を行うことが重要である。本研究では、ヒト多能性幹細胞株の目的細胞への分化を適切に予測することを目標とし、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を行った。【方法】前年度までに報告したヒト iPS 細胞の内胚葉、中胚葉および外胚葉への分化プロペンシティと発現量の相関のある mRNA と miRNA を、今年度はさらに遺伝子ネットワーク・パスウェイ解析により絞り込んだ。これらの絞り込まれた 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た。【結果】三胚葉マーカー発現量により分化効率を比較し、同定した 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】本研究で報告したスクリーニング手法は、未分化状態のヒト iPS 細胞株における三胚葉系細胞への分化プロペンシティ予測マーカーの探索と、これらの予測マーカーのサロゲートマーカーとしての信頼性を確認する上で有用であると思われる。

## 研究協力者（順不同）

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 研究員
城 しおり	名古屋市立大学大学院薬学研究科 医薬品質保証学講座 修士課程終了
草川 森士	先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 研究員
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 研究員
中島 啓行	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

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）や胚性幹細胞（ES 細胞）といった多能性幹細胞は、再生医療を目的とした細胞・組織加工製品の原材料として大きな期待を担っている。人工多能性幹細胞は、様々な系譜の細胞に分化するという幅広い多能性と半永久的な自己増殖能を有するため、大量培養した細胞から目的細胞への分化を促すことにより、今まで入手困難であった様々な細胞を安定的に供給することができる。実際に米国では、Geron 社の脊髄損傷患者を対象としたヒト ES 細胞由来オリゴデンドロサイトの治験（経済的事由より中止）、アドバンスト・セル・テクノロジー社の加齢黄斑変性患者とスタルガルト病患者を対象としたヒト ES 細胞由来網膜色素上皮細胞の治験、バイアサイト社の I 型糖尿病患者を対象としたヒト ES 細胞を利用した膵β細胞の前駆細胞カプセルの治験が既に行われている。国内では、2014 年 9 月に理化学研究所と先端医療振興財団において、滲出性加齢黄斑変性患者を対象としたヒト自己 iPS 細胞由

来網膜色素上皮細胞の移植手術が初めて実施された。このような近年の再生医療の発展に伴い、2014 年 11 月には「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」および改正薬事法である「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」が施行された。

多能性幹細胞を利用した細胞・組織加工製品の臨床応用に当たり懸念されるのは、製品に混在する可能性のある造腫瘍性細胞による移植部位での腫瘍形成である。未分化の多能性幹細胞は、動物に移植することにより奇形腫（テラトーマ）を形成するという造腫瘍性を元来有する。製品中の未分化細胞は腫瘍形成を誘発する可能性があるため、製造工程における未分化細胞の残存に対する方策が強く望まれている。また未分化な多能性幹細胞を分化させることにより製品が製造されるため、目的とは異なった分化細胞などの製品への混在の可能性もある。これらの目的外細胞の製品への混在をより低減するには、多能性幹細胞から目的とした細胞への分化効率を上昇させる必

要があり、分化方法の改良が世界中の研究機関で精力的に行われている。

「分化プロペンシティ」とは、ある系譜の細胞への分化のしやすさのことである。

ヒト多能性幹細胞は、内胚葉、中胚葉および外胚葉系の細胞に分化することが可能であるが、その分化プロペンシティは細胞株間で大きく異なることが報告されている。

すなわちヒト多能性幹細胞の肝臓細胞、心筋細胞や神経細胞などへの分化プロペンシティは、細胞株に大きく依存する。したがって細胞・組織加工製品の品質・安全性を担保するためには、分化方法の改良だけではなく、目的細胞への分化効率が高い最適な株を選別し、最終製品に混入する目的外細胞の数をできるだけ少なくする必要がある。しかしながら製品に最適な多能性幹細胞株を選別する際に、すべての細胞株を分化させ、目的細胞に特異的に発現している遺伝子・タンパク質の量、細胞機能、細胞形態などで判別することは、時間的にも労力的にも負担が大きい。未分化状態における各々の多能性幹細胞株の特性から各々の株の分化プロペンシティが予測できれば、より少ない時間と労力で最適な株を選別することが可能になることが想定される。

本研究では、iPS 細胞株の目的細胞への分化を適切に予測することを目標とし、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を行った。前年度までに報告したヒト iPS 細胞の内胚葉、中胚葉および外胚葉への分化プロペンシティと発現量の相関のある mRNA と miRNA を、今年度はさ

らに遺伝子ネットワーク・パスウェイ解析により絞り込んだ。これらの絞り込まれた 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、同定した 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検討した。

## B. 研究方法

### B-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 デイッシュ (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-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 細胞培養デイッシュ (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, ELOSA 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-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  $\mu$ g/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  $\mu$ l (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  $\mu$ g/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-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/ $\square$  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® 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×Universal PCR MasterMix, No Amp Erase UNG (Applied Biosystems)

10.0  $\mu$ l

20×TaqMan RNA Assay mix

1.0  $\mu$ l

cDNA

1.33  $\mu$ l

Nuclease-free water

7.67  $\mu$ l

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-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 1 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 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  $\mu$ 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。分化誘導プロトコールを Table 2 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-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°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-8 定量 RT-PCR

QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)

を用いて行った。

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

MicroAmp Optical 96 well Reaction Plate (Applied Biosystems) に希釈した RNA 5  $\mu$ l を加えた後, Master Mix 20  $\mu$ 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°C	30 min	1 cycle
2	95°C	15 min	1 cycle
3	94°C	15 sec	40 cycles
	60°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。

### (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 IPA を用いた iPS 細胞分化プロペンシティブ予測マーカーの絞り込み

昨年度の研究報告書で示した分化プロペンシティブ予測マーカー候補の中から、細胞分化に機能的に関与している mRNA および miRNA を絞り込む目的で、外胚葉、中胚葉、および内胚葉で相関がみられた mRNA および miRNA の probe set について、IPA (Ingenuity) を用いて遺伝子ネットワーク・パスウェイ解析を行った。IPA では複数のデータベースを基に、miRNA のターゲットとなることが配列上予想される (またはターゲットであることが検証された) mRNA を、複数の予測データベース (Target Scan Human) をもとにして調べることがで

きる (miRNA - mRNA ペアリング解析)。この解析によって選別された、ペアをつくる miRNA - mRNA は、機能的に細胞分化に影響を及ぼしている可能性が高いと考えた。そこで、各胚葉において相関のあった mRNA と miRNA の間で、miRNA - mRNA ペアリング解析を行った (Tables 3-5)。その結果、外胚葉マーカーの第一主成分得点と相関のあった miRNA - mRNA ペアとして 3 種類の miRNA (miR-373, miR-371-5p, miR-371-3p)、中胚葉マーカーの第一主成分得点と相関のあった miRNA - mRNA ペアとして 1 種類の miRNA (miR-524-5p)、内胚葉マーカーの第一主成分得点と相関のあった miRNA - mRNA ペアとして 6 種類の miRNA (miR-4739, miR-4505, miR-4521, miR-520g, miR-3714, miR-367) が選別された。

### C-2 外胚葉分化における分化関連 miRNA の影響

ヒト iPS 細胞の外胚葉分化を負に制御すると予想される miRNA として、miR-373, miR-371-5p, miR-371-3p の 3 種類が同定された (Table 3, Fig. 1)。そこで、ヒト iPS 細胞株 253G1 を用いてこれらの miRNA を過剰発現させた細胞を作製し、外胚葉由来細胞の一つである神経に分化誘導させたときに、miRNA の発現が神経分化にどのような影響を及ぼすかを調べた。miR-373, miR-371-5p, および miR-371-3p をヒト iPS 細胞に過剰発現させるため、Biosettia 社の miRNA 発現レンチウイルス粒子を使用し

た. 本研究で用いたレンチウイルス粒子は, miR-373 と miR-371 (miR-371-3p, および miR-371-5p の両 miRNA 前駆体) の 2 種類の miRNA 前駆体を含む Human EF1 $\alpha$  promoter と puromycin 耐性遺伝子を持つものである (Fig. 2). このレンチウイルス粒子を MOI  $\approx$  50 の濃度で細胞培地に添加し, 253G1 株に感染させたのちに, 1  $\mu$ g/ml の puromycin を添加することによって, ① miR-373, ② miR-371-3p と miR-371-5p の miRNA を過剰発現させた 2 種類の 253G1 を作製した. また, control として miRNA 前駆体を含まないレンチウイルス粒子を用いて 253G1 を感染させて 253G1 の miR-control 細胞もあわせて作製した. 作製した 3 つの細胞の miRNA 発現量について, miRNA 定量 PCR を用いて定量した結果, control 株に比べ, miR-373 は約 3 倍, miR-371-3p は約 7 倍程度発現量が増加していることを確認した (Fig. 3). miR-371-5p については, miRNA の配列特異性が低く, TaqMan アッセイでのプライマー合成が不可能であったため, 本研究では発現量を定量することができなかった. このようにして作製した miRNA 過剰発現 iPS 細胞を用いて, 神経細胞への分化誘導実験を行った. miRNA 過剰発現 iPS 細胞をフィーダーレス条件下で培養後, Matrigel コートした 24 well プレート上に  $3.6 \times 10^4$  cells/well で播種した. 細胞がコンフルエントになるまで培養した後, Chambers らの報告を参考にして分化誘導を開始した. 分化誘導開始から 10 日後に細胞を回収し, total RNA を抽出した.

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* の発現を定量 PCR で測定した. その結果, miR-373 および miR-371-3p を過剰発現させても神経マーカーの発現に有意な差は認められなかった (Fig. 4).

### C-3 中胚葉分化における分化関連 miRNA の影響

ヒト iPS 細胞の中胚葉分化を正に制御すると予想される miRNA として同定した miR-524-5p (Fig. 5) についても, レンチウイルスとヒト iPS 細胞株 253G1 を用いて miRNA 過剰発現細胞を作製した. 作製した miRNA の発現量について, miRNA 定量 PCR を用いて定量した結果, control 株での発現量と比較して約 5 倍に増加したことを確認した (Fig. 6). miR-524-5p 過剰発現細胞を用いて, 中胚葉由来細胞の一つである心筋細胞に分化誘導させたときに, miRNA がどのような影響を及ぼすかを調べた. miRNA 過剰発現 iPS 細胞をフィーダーレス条件下で培養後, Matrigel コートした 6 well プレートに  $2.0 \times 10^5$  cells/well となるよう播種した. 本節でも, control として miRNA 前駆体を含まないレンチウイルス粒子を用いて作製した 253G1 の miR-control 細胞をあわせて使用した. 細胞がコンフルエントになるまで培養した後, Lian らの報告を参考にして分化誘導を開始した. 分化誘導開始から 15 日後に細胞を回収し, total RNA を抽出した. 心筋細胞への分化を確認する



ため、*TNNT2*, *GATA4*, *NKX2.5*, および *MYH6* の 4 種類の心筋マーカー遺伝子の発現量を定量 PCR で測定した。その結果、miR-524-5p を過剰発現させても心筋マーカーの発現に有意な差は認められなかった (Fig. 7)。

#### C-4 内胚葉分化における分化関連 miRNA の影響

ヒト iPS 細胞の内胚葉分化を正に制御すると予想される miRNA として同定した miR-4739, miR-4505, miR-4521, miR-520g, miR-3714, miR-367 (Fig. 8) についても、レンチウイルスとヒト iPS 細胞株 253G1 を用いて miRNA 過剰発現細胞の作製を試みた。その結果、miR-4505, miR-520g の過剰発現 iPS 細胞は作製することができた。作製できた 2 つの miRNA の発現量について、miRNA 定量 PCR を用いて定量した結果、control 株に比べ、miR-4505 は約 2 倍、miR-371-3p は約 9 倍程度発現量が増加していることを確認した。しかし、miR-4739, miR-4521, miR-3714, miR-367 の 4 種類の miRNA 過剰発現 iPS 細胞を作製することができなかった (Fig. 9)。これら miR-4505 および miR-371-3p の過剰発現細胞を用いて、胚葉体を形成させることにより、分化を促した。分化開始後 16 日目に胚葉体より total RNA を抽出し、内胚葉マーカーである AFP, SOX7, SOX17 の発現量を定量 PCR で測定した。その結果、miR-4505 および miR-371-3p を過剰発現させても内胚葉マーカーの発現に統計的に有意な差は認められ

なかった (Fig. 10)。

#### **D. 考察**

本研究は、再生医療等製品の原材料としての iPS 細胞の適格性の評価のために、iPS 細胞株の分化プロペンシティ予測マーカーを同定することを目的に研究を行っている。昨年度の報告において、ヒト iPS 細胞株 10 種類について、外胚葉、中胚葉、および内胚葉への分化のしやすさの順位と、未分化状態での mRNA および miRNA 発現量の順位を用いて、スピアマンの順位相関解析を行い、相関のある mRNA および miRNA を分化予測マーカー候補として同定した。本年度は、これらの分化予測マーカー候補である分化プロペンシティと相関のある mRNA と miRNA を、さらに遺伝子ネットワーク・パスウェイ解析により絞り込んだ。

IPA を用いた miRNA-mRNA ペアリング解析によって、Tables 3-5 に示す 10 種類の miRNA と、43 種類の mRNA が選別された。このうち、*BCLAF1*, *STXBP5L*, *APCDD1L*, *XPNPEP3*, *EFCAB2*, *RAB3B* はそれぞれ二つの miRNA のターゲットとして検出されており、外胚葉、および内胚葉分化との相関関係について信頼性が特に高いと考えられた。さらに本研究では、miRNA に注目し各胚葉への分化への影響を評価することを試みた。mRNA ではなく miRNA に注目した理由は、ペアリング解析で抽出された miRNA の中には複数の mRNA の発現に関わっていることが予想されたため、一つの因子で分化に対してより大きな影響が見ら

れるのではないかと推測したためである。ペアリング解析で抽出された miRNA について、これまでに得られている知見を以下に概説する。① miR-371~3 は ES/iPS 細胞において神経への分化傾向を予測するという報告がある (Kim et al. *Cell Stem Cell*. 2011;8: 695-706.)。② miR-371-5p は細胞周期の G1/S 移行を加速させることによって細胞増殖に関与するという報告がある (Liu et al. *Cancer Lett*. 2013;335:351-360.)。③ miR-367 は細胞のリプログラミングに関与するという報告がある (Kuo et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;417:11-16.)。その他全ての miRNA については機能未知である。

今回ヒト iPS 細胞である 253G1 にレンチウイルスを感染させた結果、miR-373, miR-371-3p, miR-524-5p, miR-4505, および miR-520g の 5 種類の miRNA 過剰発現細胞を作製することができた (Figs. 3, 6 and 9)。miRNA の増加量は、control での発現量を 1 とすると、少ない miRNA (miR-4505) で約 2 倍、多い miRNA (miR-520g) で約 9 倍と差がみられた。しかし、それぞれの miRNA を iPS 細胞株 10 種類のシグナル値 (Figs. 1, 5 and 8) でみると、miR-373 で 10 細胞株中 3 番目、miR-371-3p で 10 細胞株中 4 番目、miR-524-5p と miR-4505 で 10 細胞株中 1 番目に発現が多い細胞株となる計算になった。一方、miR-4739, miR-4521, miR-3714, および miR-367 の過剰発現細胞は作製できなかった。その原因として、これら 4 つの miRNA は細胞内においてプロセッシングされにくい miRNA である可能性

が考えられた。成熟型 miRNA の発現レベルは細胞内での miRNA のプロセッシングに依存することが知られている。本研究で用いた BiOSETTIA 社の miRNA 発現レンチウイルス粒子には、miRBase に登録されているネイティブな前駆体配列がクローニングされているため、細胞内で Drosha と Dicer によってプロセッシングされやすい miRNA もあれば、プロセッシングされにくい miRNA もあり、実際に miRNA 前駆体から成熟型への変換率は 10% から 90% とバラツキがあることが報告されている。

miR-373 および miR-371-3p の過剰発現細胞における神経細胞への分化誘導では、神経マーカー遺伝子の発現で比較したときに control との差は見られなかった (Fig. 4)。また、miR-524-5p の過剰発現細胞における心筋細胞への分化誘導においても、control と比較してマーカー遺伝子の発現量に差は見られなかった (Fig. 7)。また miR-4505 および miR-371-3p の過剰発現細胞における胚葉体形成による分化においても、内胚葉マーカーの発現量に差は見られなかった (Fig. 10)。

これらの結果に関して、いくつかの理由が考えられた。一つ目の理由として考えられたのは、miRNA の発現量不足である。今回作製した miRNA 過剰発現細胞における miRNA 発現量は、control に対し miR-373 で約 3 倍、miR-371-3p で約 7 倍、miR-524-5p で約 5 倍であったが、実際に分化に影響を及ぼすには、さらに多くの miRNA 量が必要である可能性が考えられた。また、一種

類の miRNA のみが細胞の分化状態に大きな変化を与えているとは限らない。Kim らの論文においても、miR-371~3 が神経分化に影響する唯一の因子ではなく、他にこの反応に寄与している因子の存在を示唆している。そのため、単独種の miRNA のほか、複数種の miRNA を過剰発現させた細胞での検討を行うことも必要であると考えられた。二つ目の理由として、分化誘導後にマーカー遺伝子発現量を比較した日数が遅すぎたために、発現量に差が見られないことが考えられた。心筋細胞への分化誘導の予備実験において、細胞に発現するマーカー遺伝子を継時的に定量したところ、TNNT2, NKX2.5, および MYH6 の発現量は分化誘導後5日目から10日目にかけて大きく増加していることが確認された。この結果から、miRNA が分化誘導の初期の段階に作用していた可能性も考えられる。これを確認するためには、タイムコースをとって分化誘導を行う必要があると思われた。三つ目の理由として考えられたのは、miRNA の発現が原因で目的細胞に分化しにくいのではなく、細胞へ分化しにくい細胞株では結果的に miRNA が多く発現しているという可能性である。細胞の分化プロペンシティと発現量との間で相関のある miRNA であるものの、実際の分化に機能的にはたっていない可能性も考えられる。

今回の実験では、残念ながら同定した miRNA が分化に機能的に関与していることを証明することができなかった。しかしながら、本研究課題で報告した目的細胞の

製造に適切な iPS 細胞マーカーをスクリーニングする手法は、未分化状態のヒト iPS 細胞株における三胚葉系細胞への分化プロペンシティ予測マーカーの探索と、これらの予測マーカーのサロゲートマーカーとしての信頼性を確認する上で有用であると思われる。目的細胞も様々で、その分化方法も様々である iPS 細胞加工製品において、我々が報告した方法は、最終製品に適切な株の評価に貢献することが期待される。

## E. 結論

多能性幹細胞株の目的細胞への分化を適切に予測することを目標とし、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を行った。分化プロペンシティ予測マーカー候補として絞り込まれた miRNA のヒト iPS 細胞安定発現株を樹立し、分化実験を行い、これらの 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検討した。今回報告した手法を利用することにより、最終製品に適したヒト iPS 細胞株の選択が可能になると思われる。

## F. 研究危険情報

なし

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

1. 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. *Regen Ther.*, in press.
2. 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.*, in press.
  3. Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y. A novel *in vitro* method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system. *PLoS One*. 2014;9:e110496.
  4. 佐藤陽治 再生医療と薬学 ファルマシア 2014;50:1213-5.
  5. 佐藤陽治 ヒト多能性幹細胞加工製品に残存する未分化多能性幹細胞の高感度検出法の開発 *再生医療* 2014;13:432-5.
  6. 村岡ひとみ, 佐藤陽治 再生医療・細胞治療の規制動向とレギュラトリーサイエンス *DDS*. 2014;29:207-16.
  7. 中島啓行, 佐藤陽治 薬事法改正と再生医療等安全性確保法を踏まえた再生医療／細胞治療の開発 *ファームステージ* 2014;10:1-5.
  8. 三浦巧, 佐藤陽治 再生医療・細胞治療に使用する細胞加工物の品質・安全性評価の原則と造腫瘍性の考え方 谷本学校毒性質問箱 2014;16:1-10.
  9. 佐藤陽治 再生医療／細胞治療における細胞培養に関する規制 『再生医療の細胞培養技術開発と応用展開』（監修：紀ノ岡正博）株式会社シーエムシー出版，東京（2014），pp. 27-36.
  10. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療製品の造腫瘍性評価 *最新医学* 2014;69(3) 増刊号:745-765.
  11. 佐藤大作, 佐藤陽治 規制関連 『再生医療用語集』（印刷中）
  12. 村岡ひとみ, 佐藤陽治 再生医療・細胞治療の臨床研究から実用化までの道のり *Geriatric Medicine (老年医学)* 2014;52(3):237-239.
  13. 佐藤陽治 ヒト iPS 細胞由来移植細胞中に混入する造腫瘍性細胞／未分化細胞の *in vitro* 検出法 *Cytometry*