

保証データとしてホールゲノム情報を取得しておくことは、十分に現実的な要求であるといえる。これにより、同一性の保障のみならず、遺伝的安定性の評価にも応用が可能となる。また、ガン関連遺伝子等の変異に関する情報は、細胞の腫瘍原性を評価する上でも重要である。機能的保障という意味においては、エクソンシーケンス、さらには、既知ガン関連遺伝子変異の検出のみでも十分であるかもしれないが、未知の変異やエクソンシーケンスでは検出できない、染色体の増幅、欠失やアレンジメントといった変化をゲノムワイドに評価できる点は意味が大きい。コスト面から最終製品でどこまでを要求するかという問題もあるが、汎用性を持つマスター細胞に関しては、ホールゲノムシーケンスを要求しても良いだろう。現状では、エクソンシーケンスをする際に、ターゲットのエンリッチメントに用いる前処理に比較的成本もかかるため、シーケンスコストが下がれば、むしろホールゲノム解析の方が優先される可能性もある。この場合の課題は、データ量の増加による解析の難しさにあるが、ソフトウェアを含めた技術革新により、その障壁が取り払われることが期待される。

シーケンス解析に関しては、癌化関連変異を獲得した細胞の検出という期待もかかるが、原理的に細胞集団全体の平均値としての解析という制限から、通常の重複度で解析をした場合には、異常細胞集団が少なくとも2割程度にならないと検出が不可能であるといえる。これを前提にシーケンスデータの利用を考えなければならないが、この限界を打破する現実的な手法として、一定期間細胞に培養を加えた後に解析を行うことを提唱したい。我々は過去に hMSC を用いて培養過程における新たな変異の固定を検出したが、詳細な解析の結果、オリジナルな細胞集団にあったごく微量の変異細胞が、長期培養課程で、細胞集団全体に広が

っていき最終的にはドミナントとなったことを確かめた。細胞培養過程では、常にある一定の確率で突然変異が起きていると考えられるが、大部分の変異はその後消えていくか、ポピュレーションを拡大することはないため、こうした無数にある微量な変異を通常のシーケンス解析で検出することは難しい。しかし、変異により細胞が増殖性を獲得した際、即ちガン化に関しての重要な形質の第一ステップを獲得した場合には、その後の培養により変異細胞集団が拡大し、見かけ上増幅されて検出可能となると期待できる。培養環境の工夫等で、さらにこうした変異細胞を積極的に選択できる可能性もあり、今後検討の余地が残されている。

一方で、細胞自身の形質としての変異の起こりやすさ、および細胞製品の製造過程における培養環境の変異誘発性の評価も重要な課題となっている。前述のシーケンサーの限界から、こうした観点においてシーケンスデータを利用するためには、マイナーな変異も検出して、真の変異頻度を評価できる試験系が必要とされるが、この観点において、我々は次々世代シーケンサーとして注目される 1 分子シーケンサーの利用に着目した。この系においては、シーケンス前処理としての PCR 反応を必要としないため、バックグラウンドノイズとしての PCR 反応による高いエラー率を回避でき、さらにサイクルリードを行い、重複度を増やすことにより、シーケンスのエラーを極小化し、高感度な変異検出を達成できるものと期待される。こうした低頻度突然変異の高感度検出に関しては、理論的には一分子シーケンサーを用いた *amplification free* の方法が最適であると考えこのアプローチをとったが、シーケンスエラー率が他のシーケンサーに比べて高かったため、十分な感度が得られなかった。インサートサイズを下げることにより、シーケンスリードの冗長度を上げ、さらにコンセンサス

配列に関する基準を厳しくすることによりこのエラー率を落とす必要があり、現在この観点から PacBio シークエンサーを用いた再検討を行っている。

また別のアプローチとして、スループットの高い Illumina シークエンサーを用いた PCR free 解析に、ペアエンドリードを用いたコンセンサス配列に利用するシーケンシングエラーの除去法を組み合わせた方法を試みている。

これまでの検討から、自然状態での DNA ポリメラーゼによる変異誘発率は 10^{-9} から 10^{-10} であると考えられており、1 細胞分裂あたり 3×10^{10} ゲノム上数個であると予想されている。このことから数 Kb 程度の遺伝子レベルでの突然変異率は 10^{-6} から 10^{-7} 程度であると予想され、今回の tk 遺伝子を用いた自然突然変異頻度とも一致する。よって、遺伝子あたりこの頻度の突然変異を検出するためには、通常の方法では少なくとも 10^7 個の細胞が必要となるが、ホールゲノムのシーケンシング情報が正確に得られれば、1 ホールゲノムすなわち 1 細胞でも 3×10^{10} bp のカバー率により、検出が可能となる。よって、クローニングした均一な細胞集団を用いることができれば、シングルコロニーアイソレーションをして、処理または培養前後での変異の誘発率を検討可能であるが、iPS 等のクローニングが難しい細胞に関しては、現在我々が用いているアプローチが必要となる。

通常クローニングを行わない NGS シークエンシング解析においては、得られる結果は hetero なる細胞集団の平均値(majority)を反映しており、新たな生じた変異は検出できないが、リード数を増やして、エラー率を落とすことによりクローニングなしでどこまでこの変異の検出が可能とできるかが、今後の課題となる。

一方、NGS 解析データでは均一に見える細胞集団も、ホールゲノムで考えれば、分裂が起こるごとに細胞間のバリエーションが起きる

こととなる。通常新たな変異は、ニュートラルか劣性となるため、細胞集団全体に拡大することはないが、過去に我々の経験した hMSC 細胞の変異株の例のように、増殖性を獲得して変異を持った細胞が細胞集団全体を置き換えることも起こりうる。特に iPS 細胞のように、培養が難しい細胞においては、培養環境からの選択圧により増殖性の変異細胞が選択されやすい状況が想定される。今回 iPS 細胞をシングルコロニーに近い状態でシーケンシング解析した結果から、今後細胞間の heterogeneity と変異率に関して有益な情報が得られると期待される。

今回癌細胞である HL60 細胞のホールゲノムシーケンシングデータを詳しく解析することにより、かなり小さな領域でのコピー数変化まで検出できたが、特筆すべきはその多くの領域に細胞の増殖とかかわる遺伝子など重要だと考えられる遺伝子が存在していたことである。既知の癌遺伝子 c-myc の増幅に加え、神経芽細胞腫にて異常の見つかった neuroblastoma breakpoint family member 8&9 (NBPF8&9)の増加、発がん物質処理により湯洗される染色体転座の共通した切断点となることが知られている fragile histidine triad (FHIT) 遺伝子座位の変化、myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (MLL) family の遺伝子である lysine (K)-specific methyltransferase 2C (KMT2C) の増幅、その過剰発現が急性骨髄性白血病と関連する annexin A8 (ANXA8)遺伝子の増加、低酸素ストレスにより誘導され腫瘍との関連性が注目されている hypoxia induced factor 1 (HIF1A) 遺伝子の欠失、細胞分裂に関与する cell division cycle27 (CDC27)の増加、TGFβ シグナルパスウェイに関与し、細胞の増殖分化とアポトーシスを制御する因子である SMAD2 遺伝子の増幅、遺伝子多型と癌との関連性が指摘されている glutathione S-transferase T1 (GSTT1)の欠失など、腫瘍との関連性が示唆

される多くの遺伝子がコピー数変化した領域に見いだされた。さらに、17番染色体の短腕(7p)は片側のアレルが完全にロスしているが、正常に残っていると思われるアレルにも微小な欠失領域があることが分かった。その一つは有名な癌抑制遺伝子である TP53 遺伝子であり、この遺伝子の完全欠失が HL60 細胞の癌化に大きく寄与していることを物語っている。7p のもう一つのホモ欠失領域には Rho GTPase-activating protein 44 (ARHGAP44) 遺伝子が存在し、この遺伝子の機能と癌との関連性が注目される。

また染色体全体に目を向けると、同様にホモ欠失している短い領域があり、この中には TGF β シグナルパスウェイに関与し、細胞の増殖分化やアポトーシスと関連する signal-regulatory protein beta 1 (SIRPB1) 遺伝子が含まれていた。また、大腸癌の予後との相関が報告されている Cytoplasmic poly(A) binding protein 4 (PABPC4) 遺伝子もホモ欠失しており、その機能との関連性が注目される。

以上のように、ホールゲノムシーケンス解析にて得られたコピー数変化領域を詳しく見てみることにより、そこに存在する遺伝子が何らかの癌の発生との関連性を示唆しており、複数の遺伝子の異常が複雑に絡み合って癌を発生させた、いわば細胞癌化のヒストリー(プロファイル)を物語っていると考えられる。各種の癌細胞に関してこうした癌化のプロファイルを蓄積していくことで、細胞癌化の共通したメカニズムおよび癌の個性に寄与する遺伝子を浮き彫りにできる可能性が示された。

コピー数変化の検討から得られたもう一つの有益な情報として、増減のおこっている領域には、 α -サテライトのような繰り返し配列、およびレトロトランスポゾンによる挿入配列が多く存在する点が見受けられた。特にレトロトランスポゾンの配列に関しては、CDC27 遺

子のように、元の遺伝子の部位も同様にコピー数の変化が起きている例もあり、染色体上の相同配列が引き金となって、遺伝子および染色体領域のコピー数の増減が起きていることが示唆された。

最終年度は、染色体転座などのゲノムリアレンジメントの検出および低頻度の突然変異の検出という観点において、次世代シーケンサーの応用に関して検討を行った。既知の遺伝子転座を持つ細胞株の切断点の解析より、WGS データ中に切断点を決定できるシーケンスリードの情報が存在することが確認できたが、通常のマッピング解析においては、こうした転座点をカバーするフラグメントはリファレンス配列への適合率が低く、アラインメントされない情報として利用できない。そこで、転座に特化したアルゴリズム、例えば全体としての合致率は高くないが、部分的には異なるゲノム上の配列に完全にマッチしている配列を拾い上げる方法により、転座のあるフラグメントのみを検出できる可能性がある。現在その有効性を検証している。

また、今回の結果から、別の方法として取りうるアプローチは、CGH データより切断点を探す方法である。今回の検討からも、ホールゲノムシーケンスは、そのゲノムカバー率(冗長度)の利用により、より詳細なコピー数変化の解析が可能となることから、コピー数が変化する点を可能な切断点として、可能性のあるリアレンジメント配列を人為的に作成し、この配列に対してマッピングすることにより実際の切断点を含むフラグメントを検出できる可能性が示された。今後これまでに得られたモデル細胞でのデータを用いて、この手法の有効性を検証していきたい。

さらに、もうひとつのアプローチとしては、かなり長いフラグメントを解析できる PacBio シーケンサーの利用が考えられる。残念ながら

ら現時点では PacBio シークエンサーのスループットはそれほど高くないため、全ゲノムをカバーできるデータを取得するのは費用的にも現実的でないが、既存のスループットの高い方法との組み合わせや、染色体分離を含めたターゲットエンリッチメントの手法を組み合わせることにより、検出は可能であると考えられる。

がん遺伝子の活性化のように融合遺伝子の特定が細胞の機能解析に重要な情報を与えることが期待されるが、細胞の品質評価という観点からは、定性的にリアレンジメントの有無を解析できれば十分であるという考え方もできる。こうした観点から、現時点で取りうる最も効率的なアプローチは、ホールゲノムシークエンス解析データを使ったゲノムワイド CGH によるコピー数変化を指標とした解析である。リアレンジメントは染色体の部分的増減を伴うことが多く、WGS データの利用によりかなり小さい領域の変化までが検出できることがわかっている。また、コピー数変化を伴わない相互転座のような場合にも、マッピングデータの部分的減少が観察されることから、カバー率を高めれば、ある程度の信頼性を持って検出が可能であると考えられる。

ただし、これらの検討を行う際に注意が必要なのは、ゲノム中に散在する繰り返し配列の取り扱いであり、こうした領域におけるコピー数変化の情報は、マッピング解析上のアーティファクトである可能性も高い。リピート配列をマスクした解析法や、その位置情報による検証が必要であると考えられる。(ただし、相同な繰り返し配列間でのリアレンジメントも当然起こりやすいと考えられるため、その検出は今後と課題となる)

他方、細胞の発現するタンパク質のプロファイルは、遺伝子異常のプロファイルと同様にその品質を規定する重要な情報となりうる。遺伝子解析に関しては、ホールゲノムシークエンス

という強力な解析ツールが存在するが、タンパク質発現解析に関しては、すべての発現タンパクを網羅できる完璧な手法はまだ存在しない。これはタンパク発現のダイナミックレンジがかなり大きいことに由来するが、近年の質量分析装置の進歩により、高感度化が図られ、ペプチドレベルでは数万、タンパクレベルでは数千のタンパク質の発現情報が得られるようになった。タンパク発現は最終的な細胞の表現形質につながるものであり、細胞のおかれた環境や状態の変化を反映して動的に変化する指標となる。細胞の標準化および品質評価においては、この動的に変化するプロテオームの情報をリファレンスと比較することにより品質の評価が可能であり、その意味で比較可能な形として細胞のタンパク発現プロファイル情報を提供することは有益だと考えられる。

我々はこれまでに LC-MS/MS を用いたショットガンプロテオミクス解析を通じた質量分析データの取り扱いに関する経験を生かし、プロテオームの発現プロファイルを視覚的に分かりやすい形で情報提供し、リファレンス情報の提供と比較解析を実現するためのツールとして、ProteoMap というオリジナルなソフトウェアの開発に着手した。そして、質量分析装置から得られた生データの取り込み、イメージデータへの変換、2次元マップとしてのデータ可視化、およびペプチドピークの認識と付随する MS/MS スペクトルおよびタンパク質同定結果の提供を同一マップ上で実現することができた。また、2次元マップ上でペプチドの存在量はバンドの濃さとして表現されるため、量的変化も視覚的にとらえることが可能となった。

現在 ProteomeMap ソフトウェアはスタンドアロンで、Thermo Scientific 社の質量分析装置 Q-Exactive より得られた raw 形式のデータに対して動作確認をしているが、各種細胞から得られたプロテオーム情報を Web 上でオンラ

インで情報提供するため、ProteoMap Online の開発を進めた。オンラインで各種細胞のリファレンスデータとなる情報を提供できれば、同定結果に対する情報を MS/MS スペクトルとともに同時提供でき、各ユーザーが得たデータに対して有益なリファレンス情報を与えることが可能になる。さらに将来的には、各ユーザーからのデータのアップロードを可能とし、リファレンスデータベースの充実を図るとともに、オンラインでのリファレンスデータとの定量比較を可能とすることにより、さらに有益な研究ツールを提供することを目標とする。

D-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

次世代シーケンサーは、従来のサンガー法とは異なり処理能力やコストの面で格段の進化を遂げ、たった一回のランで数億塩基以上も得ることが可能である。今現在も、次世代シーケンサーの性能は、すさまじい勢いで向上を続けており、今後数年の間で、個人のゲノム解読は1時間以内で終了し、数万円でできるようになると言われている。このような次世代シーケンサーの登場によって、ゲノム科学は加速度的に進展を遂げている。その一方で、リード（シーケンスの最小単位）の長さが短く、またベースコールのクオリティに問題があるなどの欠点も指摘されている。そのため、次世代シーケンサーによって得られたデータの質を評価するシステムを構築する必要がある。今回我々は、上述のような実態を把握するため、ショートリード配列の解析時に起こりうる読み間違いエラーに着目し（イルミナ社 HiSeq2500）、次世代シーケンサーの性能について検証することにした。まずエラー率の評価を厳密に行うために、ゲノム DNA のアレル頻度が正確に測定されている標準ゲノム DNA を準備し、量、質と

もに次世代シーケンサー解析における条件を満たしていることを確認した。このような標準ゲノム DNA におけるライブラリーを、独立して4種類作製し、各ライブラリーについて、40Gbase, 30Gbase, 15Gbase 相当のシーケンスを行ったところ、シーケンスデータ量が多いほど、測定値のバラツキは低減されることが判明した。さらに、解析の精度を評価する目的で、すべてのライブラリーから得られたシーケンスデータを統合し、それらシーケンスデータのサンプリングサイズの幅を 160Gbase, 120Gbase, 80Gbase, 40Gbase に設定し、解析精度の閾値を検討したところ、複数回のシーケンスデータを取得することで、マッピング量とは無関係にバラツキは低減されることが判明した。つまり、Fig. 26 で見られた各塩基間の CV 値のバラツキの程度は、Fig. 27 では低減していることから、ライブラリー間のバラツキが大きく影響していることが考えられた。即ち、実際の検体（診断用組織や細胞加工製品など）について得られたシーケンスデータを解析する場合には、複数回の独立した解析を行うことも重要であると考えられる。以上、次世代シーケンサーのエラー率評価のために標準ゲノム DNA を用いることは、標準ゲノム DNA をポジティブコントロールとして精度管理をすることが可能となるだけでなく、検出限界（Limit of Detection (LOD)）の検証、複数のプラットフォーム間での比較評価に役立つものと思われる。

D-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

3種類のペアエンド・ライブラリーともう3種類のメイトペア・ライブラリーを作製し、HiSeqを用いて片側 150 nt のペアエンドデータを取得した。これらに対し、最新の大規模メモリ搭載型計算機で *de novo* アセンブリを行い、N50 が 45 kb のデータを取得することができた。総

contig 長は 2,255 Mb に達し、反復配列を除いたゲノム領域をおおよそカバーすることができた。本研究ではまず mtDNA の完全長を決定し、*de novo* アセンブリを行う前に 6 種類の各ライブラリのインサート長を推定するという工夫を行った。実際に見積もったインサート長は、どれもライブラリ作製時に狙ったサイズよりも小さく、この正確さによりアセンブリの精度も上がったと考えている。その一方でまだ多くの gap が残っており、PacBio から得られたリードを、塩基配列そのものではなく、scaffold の並び換え目的で使用することにより全ゲノム配列決定に向けて作業を進めて行く予定である。

本研究グループが高解像度 SNP アレイを用いて日本人固有のコピー数多型を多数報告したが、欠失はともかく、コピー数獲得の場合、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。

D-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

本研究では、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た。iPS 細胞 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。さらに、これらの因子を IPA (Ingenuity) を用いた遺伝子ネットワーク・パスウェイ解析により絞り込んだ。

iPS 細胞株 10 種類において、三胚葉マーカー遺伝子の第一主成分得点ランキングを作成したところ、mc-iPS は外胚葉に分化しやすく、中胚葉および内胚葉には分化しにくい傾向があることを示し、同様に R-2A は中胚葉および内胚葉に分化しやすく、外胚葉には分化しにくい傾向があることを示唆する結果となった。この結果から、外胚葉への分化プロペンシティと中胚葉および内胚葉への分化プロペンシティは逆相関していると考えられた。

外胚葉へのなりやすさと、中胚葉および内胚葉へのなりやすさが逆相関している結果の妥当性を支持するデータとして、iPS 細胞の多能性維持に関する「シーソーモデル」という概念が報告されている (*Cell*. 2013; 153: 963-975)。このモデルによると、単独では外胚葉、または中内胚葉への分化の促進にはたらくとされる、相反する遺伝子群が相互にバランスをとる際に、細胞はリプログラミング (初期化) されて iPS 細胞のような多能性細胞となる。しかしながら、外胚葉遺伝子と、中内胚葉遺伝子のバランスが崩れた時にそれぞれ外胚葉、あるいは中内胚葉に分化する (Fig. 36)。すなわち、外胚葉と、中内胚葉には正反対の関係性があると考えられることができる。

以下に、本研究から得られた各胚葉への分化プロペンシティランキングが iPS 細胞の未分

化状態との関連を示唆した例を示す。2013年に報告された論文において、神経細胞へと分化誘導した際に未分化な細胞が残り、マウスの脳へ移植した際に腫瘍を形成する“質の悪い”iPS細胞株が存在することがわかった (*Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: 20569-74)。この報告をうけて、本研究で得られたデータからEB形成後の未分化マーカー遺伝子発現量におけるiPS細胞の第一主成分得点のランキングを作成した (Table 25)。外胚葉マーカー、中胚葉マーカー、内胚葉マーカー、未分化マーカーの各遺伝子発現の第一主成分得点からなる4変数 (Table 25 および 28) のうちの2変数間の組み合わせで遺伝子発現の第一主成分得点の順位相関を検討したところ、外胚葉マーカーでの第一主成分得点が低い細胞株において未分化マーカーの第一主成分得点有意に高かった (スピアマン順位相関係数: -0.891 [$p < 0.001$])。すなわち、外胚葉に分化しにくいとされる細胞株において、未分化状態を保ちやすいことが示唆された。この結果から、「EB形成後も未分化細胞が残りやすいiPS細胞株」は、すなわち、「EB形成後も外胚葉 (神経細胞等) に分化しにくい細胞株」であると考えられた。なお、本研究でのiPS細胞株における外胚葉マーカー遺伝子発現量の第一主成分得点順位と中胚葉マーカー遺伝子発現量の第一主成分得点順位と間のスピアマン相関係数は、 -0.661 [$p = 0.03$]であったことから、文献で示された“質の悪い” (= 外胚葉系に分化しにくい) iPS細胞株は、中胚葉へ分化しやすい傾向があることが予想された。また、中胚葉マーカー遺伝子発現量での第一主成分得点順位と内胚葉マーカー遺伝子発現量の第一主成分得点順位と間のスピアマン相関係数は 0.794 [$p = 0.004$] であったことから、中胚葉へ分化しやすいiPS細胞株は、内胚葉へも分化しやすい傾向があることも示唆された。

次に、マイクロアレイ解析の結果に3種類の

フィルターをかけて抽出した probe set と、各細胞株における外胚葉、中胚葉、および内胚葉への分化プロペンシティランキングを用いてスピアマンの順位相関係数を算出し、分化プロペンシティ順位と有意に相関のある遺伝子を選び出した。この結果、Table 27-29 に示す mRNA および miRNA が同定された。相関が正であれば、分化しやすい株ほどより発現が高く、一方、負の場合は、分化しやすい株でより発現が抑えられていることを意味している。さらにIPAを用いた miRNA-mRNA ペアリング解析によって、Tables 31-33 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。このことから、これらの mRNA および miRNA の発現を測定することにより、分化させる前の段階で分化プロペンシティを予測することができる可能性が期待される。

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

E-1 新規免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験法の開発

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。ヘアレス遺伝子が導入された 2系統 (NOG-hrおよびBRG-hr) は何れも異種細胞生着能が低下していた。

E-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

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されている Ewing's 肉腫を陽性対照として間葉系幹細胞 (hMSC) と比較検討し、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索を行ったところ、細胞のがん化の指標となり得る候補遺伝子として Cyclin D2, IGF2BP1 など 9 遺伝子を抽出した。さらに、hMSC への 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。Cyclin D2 の強制発現によって hMSC の増殖が亢進されることが確認され、遺伝子発現の網羅的解析から「細胞増殖」や「細胞周期」に関わる機能が有意に亢進されることがわかった。このことから、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。

細胞のがん化する主な原因は遺伝子の変異である。そこで、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 LINE-1s の hMSC での発現や転移について検討した。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ところ、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なり得る可能性が示唆された。

E-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

以上の検討を基に、現段階での NGS によるシーケンスタデータの利用に関しての提言を以下にまとめる。

1. CGH データを利用したゲノムワイドな品質評価
2. 細胞起源同一性の確認
3. がん遺伝子を含めた全遺伝子の変異確認
4. 培養過程における増殖性変異獲得のチェック

1. に関しては WGS データの取得が必要であるが、2-4 に関してはエクソーム解析のみでも検討が可能であり、今後目的に応じて品質評価への利用が期待される。4. に関してはあまりこれまでに意識されていなかったが、細胞の heterogeneity の維持という観点からも今後さらに検討が必要な課題である。

細胞のプロテオームデータに関して、PeroteomeMap ソフトウェアを利用して Web 上にて情報提供できるシステムを構築した。今後は、ユーザーからのプロテオームデータを受け入れることにより、細胞のプロテオームデータに関するリファレンスデータベースの構築が

可能となった。

E-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

本研究では、次世代シーケンサーの精度を理解するため、ショートリード配列の解析時に起こりうる読み間違いエラーに着目し（イルミナ社HiSeq2500）、次世代シーケンサーの性能について検証した。まず、我々は、参照配列に対する変異塩基の頻度が既に測定されているゲノム標品を準備し、この標準ゲノムDNAを用いてシーケンスを行った。実際にシーケンスされた塩基種類の頻度を測定したところ、シーケンスデータ量が多いほど、測定値のバラツキは低減されることが判明した。

一般的に、エキソーム解析における読み取り総塩基数は、通常 5Gbase 程度であるが、今回の実験のように、15~40Gbase のシーケンスデータ量を取得した場合でも、各ライブラリー間でのバラツキが散見された。その一方で、複数回の独立した解析を行うことで、シーケンスデータのバラツキは抑えられることが確認された。つまり、シーケンスの精度を高めるためには、カバレッジを深くすることの他に、独立した複数の解析を実施することも重要であることが示唆された。また、今回の解析のように、通常の 8 倍程度のカバレッジでシーケンスを行ったとしても、測定する塩基の位置においては、バラツキに差が現れることも観察された。このことは、現在のシーケンサー自体の性能の限界であると考えられるため、今後は、コスト面や解析速度など、目的に応じてシーケンサーの精度を理解し、解析方法を使い分けることが重要であると思われる。

E-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

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。

E-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

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。ヒト iPS 細胞 10 株から胚葉体を形成させ、三胚葉系細胞のマーカー遺伝子を定量し、主成分分析を行うことにより、各々の細胞株の内胚葉、中胚葉および外胚葉系細胞への分化プロペンシティを数値化した。さらに未分化状態でのヒト iPS 細胞株の網羅的なトランスクリプト

ーム解析を行い、発現量と分化プロペンシティとの相関のある mRNA と miRNA の同定を試みた。今回の結果は、未分化状態のヒト iPS 細胞株における内胚葉、中胚葉および外胚葉系細胞への分化プロペンシティ予測マーカーの同定に繋がるものと期待され、我々の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. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-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 α ^{null} mice for deection 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).
7. Sawada R., Kono K., Isama K., Haishima Y., and Matsuoka A. : Calcium-incorporated titanium surfaces influence the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 101(9), 2573-85, (2013).
8. Ito-Nagahata T., Kurihara C., Hasebe M., Ishii A., Yamashita K., Iwabuchi M., Sonoda M., Fukuhara K., Sawada R., Matsuoka A., Fujiwara Y. : Stilbene Analogs of Resveratrol Improve Insulin Resistance through Activation of AMPK. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77(6), 1229-1235, (2013).
9. Sato Y., Tsutsumi H., Sawada R., Suzuki T., Yasuda S. : Regulatory science research to facilitate the development of cell/tissue-proceed products. *Bull. Natl. Inst. Health. Sci.*, 131, 16-19, (2013).
10. 澤田留美 「再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の安全性評価の実際」 *再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み*,

- シーエムシー出版, 東京 (2012) pp. 28-37
11. 松岡厚子, 澤田留美, 加藤玲子「次世代医療機器評価指標作成事業—再生医療分野—」再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み, シーエムシー出版, 東京 (2012) pp. 38-46
 12. 鈴木孝昌 コンパニオン診断薬の現状と課題 「最先端バイオマーカーを用いた診断薬/診断装置開発と薬事対応」 p271-275 (技術情報協会) 2015
 13. Nishikawa K, Iwaya K, Kinoshita M, Fujiwara Y, Akao M, Sonoda M, Thirupathi S, Suzuki T, Hiroi S, Seki S, Sakamoto T. Resveratrol increases CD68⁺ Kupffer cells co-localized with adipose differentiation-related protein (ADFP) and ameliorates high-fat-diet-induced fatty liver in mice. *Mol Nutr Food Res.* 2015
 14. 鈴木孝昌 「網羅的な発現をみる マイクロアレイ解析との比較を例に」 実験医学別冊 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド (羊土社) 111-121. 2013
 15. T. Suzuki Unconscious Exposure to Radiation. *Genes and Environment*, 35, 63-68. 2013
 16. T. Suzuki “Scientific Considerations Regarding Radiation Risk” JEMS Open Symposium 2012. *Genes and Environment*, 35, 57-62. 2013
 17. 中村里香, 酒井信夫, 齋島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 安達玲子, 手島玲子 ショットガンプロテオミクスによる加水分解小麦とその原料であるグルテンに含まれるタンパク質の網羅的解析. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 131, 50-57. 2013
 18. 斎藤嘉朗, 前川京子, 齊藤公亮, 佐藤陽治, 鈴木孝昌 タンパク質・内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化にむけて. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 131, 20-24. 2013
 19. Suenaga K, Takasawa H, Watanabe T, Wako Y, Suzuki T, Hamada S, Furihata C. Differential gene expression profiling between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in young rat liver determined by quantitative real-time PCR and principal component analysis *Mutat Res.*, 751, 73-83. 2013i
 20. Watanabe T, Suzuki T, Natsume M, Nakajima M, Narumi K, Hamada S, Sakuma T, Koeda A, Oshida K, Miyamoto Y, Maeda A, Hirayama M, Sanada H, Honda H, Ohyama W, Okada E, Fujiishi Y, Sutou S, Tadakuma A, Ishikawa Y, Kido M, Minamiguchi R, Hanahara I, Furihata C. Discrimination of genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens by statistical analysis based on gene expression profiling in the mouse liver as determined by quantitative real-time PCR. *Mutat Res.*, 747, 164-175. 2012
 21. Wu Y, Qi X, Gong L, Xing G, Chen M, Miao L, Yao J, Suzuki T, Furihata C, Luan Y, Ren J,

- Identification of BC005512 as a DNA damage responsive murine endogenous retrovirus of GLN family involved in cell growth regulation. *PLoS One*. 7, e35010. 2012
22. Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggan K, Akutsu H, Umezawa A. The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice. *Nat Commun*. 2014, 5: 5464.
 23. 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)
 24. 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)
 25. 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.
 26. 佐藤陽治 再生医療と薬学 フアルマシア 2014;50:1213-5.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.
 30. 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.
 31. 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.
 32. 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.
 33. 佐藤大作, 佐藤陽治 規制関連 『再生医療用語集』（印刷中）
 34. 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.
35. 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 Research* 2014;24(1): 7-11.
 36. 安田智, 佐藤陽治 再生医療製品の品質関連規制と対応の留意点 『動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術』(編集: 技術情報協会) 技術情報協会, 東京 (2014), pp. 517-22.
 37. Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. In vitro detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Methods Mol. Biol.* 2014;1210:183-92.
 38. 田埜慶子, 草川森士, 佐藤陽治 細胞・組織加工製品の製造における造腫瘍性評価 「再生医療における臨床研究と製品開発～医工連携に向けた「自社技術」と「再生医療」の接点を探る～」(編集: 技術情報協会) 技術情報協会, 東京 (2013)
 39. 中島啓行, 安田智, 佐藤陽治 ヒト ES/iPS 細胞に由来する再生医療製品の造腫瘍性をどう見るか? *実験医学別冊* pp61-68 (2014), 羊土社
 40. Kanemura H, Go MJ, Nishishita N, Sakai N, Kamao H, Sato Y, Takahashi M, Kawamata S. Pigment epithelium-derived factor secreted from retinal pigment epithelium facilitates apoptotic cell death of iPSC. *Sci Rep.* 2013; 3: 2334.
 41. 田埜慶子, 佐藤陽治 再生医療製品の素材としての多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) の品質 レギュラトリーサイエンス学会誌. 2014; 4: 71-7.
 42. 五十嵐友香, 佐藤陽治 再生医療製品の造腫瘍性・悪性腫瘍形成能の評価 医学のあゆみ. 2013; 246: 1069-70.
 43. 安田智, 佐藤陽治 安全性評価の総論, 造腫瘍性試験の現状と展望「幹細胞医療の実用化技術と産業展望」 pp247-255 (2013), シーエムシー出版, 東京
 44. Nakaya M, Tajima M, Kosako H, Nakaya T, Hashimoto A, Watari K, Nishihara H, Ohba M, Komiya S, Tani N, Nishida M, Taniguchi H, Sato Y, Matsumoto M, Tsuda M, Kuroda M, Inoue K, Kurose H. GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance. *Nat Commun.* 2013;4:1532.
 45. Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products. *Biol. Pharm. Bull.* 2013;36(2):189-92.
 46. 佐藤陽治, 村岡ひとみ 再生医療分野の関連規制: FDA の動向「稀少疾患/難病の診断・治療と製品開発」(編集: 技術情報協会) pp330-335 (2012), 技術情報協会, 東京
 47. Nakaya M, Chikura S, Watari K, Mizuno N, Mochinaga K, Mangmool S, Koyanagi S, Ohdo S, Sato Y, Ide T, Nishida M, Kurose H. Induction of cardiac fibrosis by β -blocker in

G protein-independent and GRK5/ β -arrestin2-dependent signaling pathways. *J Biol Chem.* 2012;287(42):35669-77.

48. 安田智, 佐藤陽治 再生医療に対する規制・制度等について: 欧米の動向「幹細胞技術の標準化—再生医療への期待」(堀友繁・監修/田中正躬・編著) pp206-214 (2012), 日本規格協会, 東京
49. 安田智 再生医療における細胞・組織加工製品の品質・安全性の評価 *PHARMSTAGE* 2012;12(7):1-2.
50. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療における細胞・組織加工製品の治験とレギュレーション *実験医学増刊* 2012; 30(10): 1702-1707.
51. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S, Kawamata S, Sato Y. Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One.* 2012;7(5):e37342.
52. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療・細胞治療の規制と開発支援に関する国際比較「再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み」(編集: 岩田博夫, 岸田晶夫, 松岡厚子, シーエムシー出版, 東京) 2012, 20-27.

G-2 学会発表

1. 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)

2. Tsutsumi H., Machida K., Kusakawa S., Sawada R., Yasuda S., Ito M., and Sato Y. Quantitative Analysis on HeLa Engrafting Ability in NOG Mice. 12th FELASA SECAL Meeting, Barcelona, Spain (平成 25 年 6 月 10-13 日)
3. Mizushima T., Machida K., Inoue R., Kusakawa S., Sawada R., Sato Y. and Tsutsumi H. Analysis on Xeno-graft Susceptibility in NOG and NOG-hairless Mice. 4th International Workshop on Humanized Mice, Seoul, Korea (平成 25 年 9 月 30 日-10 月 2 日)
4. 町田一彦, 草川森士, 澤田留美, 安田智, 伊藤守, 堤秀樹, 佐藤陽治 NOG マウスにおける HeLa 細胞生着性の定量的検討 第 60 回日本実験動物学会総会, つくば(平成 25 年 5 月 15-17 日)
5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. 加藤玲子, 齧島由二, 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)
 9. 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)
 10. 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)
 11. 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)
 12. 河野 健, 澤田留美, 新見伸吾「間葉系幹細胞の増殖培養過程における品質評価のための遺伝子発現解析」第13回日本再生医療学会総会 (2014.3)
 13. 河野 健, 新見伸吾, 澤田留美「間葉系幹細胞におけるレトロトランスポジションの解析とその影響に関する研究」第13回日本再生医療学会総会 (2014.3)
 14. 齧島由二, 福井千恵, 澤田留美, 河野健, 野村祐介, 新見伸吾「ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の増殖能に対する抗酸化剤の影響評価」第13回日本再生医療学会総会 (2014.3)
 15. 佐々木寛人, 蟹江慧, 澤田留美, 清田泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司「間葉系幹細胞の継代培養における品質劣化の細胞形態と発現プロファイリングとの相関解析」第13回日本再生医療学会総会 (2014.3)
 16. 佐々木寛人, 高橋厚妃, 蟹江慧, 竹内一郎, 澤田留美, 清田泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司「細胞画像情報解析による間葉系幹細胞分化能の品質プロファイリング」第13回日本再生医療学会総会 (2014.3)
 17. 澤田留美, 河野 健, 加藤玲子, 新見伸吾「生体親和性高分子によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響(1): 遺伝子発現の網羅的解析」第35回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11)
 18. 加藤玲子, 齧島由二, 福井千恵, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾「生体親和性高分子によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響(2): タンパク質発現の網羅的解析」第35回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11)
 19. Sawada R., Kono K., Isama K., Haishima Y., Matsuoka A.; The effect of calcium-incorporated titanium surfaces on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)

20. Kono K., Sawada R., Matsuoka A.; Overexpression of cyclin D2 promotes cell proliferation of human mesenchymal stem cells, 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)
21. 澤田留美「再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の安全性評価法の確立を目指して」日本バイオマテリアル学会 2013 年度第 1 回セミナー (2013.5)
22. 松岡 厚子, 澤田 留美, 加藤 玲子, 河野 健 「次世代医療機器評価指標作成事業 —再生医療分野審査 WG 活動報告」日本バイオマテリアル学会 2013 年度第 1 回セミナー (2013.5)
23. 澤田留美, 齋島由二, 福井千恵, 河野 健, 松岡厚子「間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について—遺伝子発現の網羅的解析による検討—」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
24. 齋島由二, 澤田留美, 福井千恵, 松岡厚子 「間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について—蛋白質発現の網羅的解析による検討—」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
25. 河野 健, 澤田留美, 松岡厚子 「細胞・組織加工医療機器に用いられる間葉系幹細胞の品質評価」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
26. 澤田留美, 河野 健, 松岡厚子 「細胞・組織加工医療機器に用いられる間葉系幹細胞の品質評価—がん化の指標探索のための遺伝子発現解析—」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11)
27. 河野 健, 澤田留美, 伊佐間和郎, 齋島由二, 松岡厚子「チタン表面の化学処理による間葉系幹細胞の骨分化誘導」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11)
28. Sasaki, H., Matsuoka, F., Takahashi, A., Takeuchi, I., Sawada, R., Kiyota, Y., Honda, H., Kato, R.; Morphology-based prediction of differentiation potential of mesenchymal stem cells, 3rd TERMIS World Congress2012 (2012.9)
29. 澤田留美, 齋島由二, 福井千恵, 河野 健, 松岡厚子「間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすエンドトキシンの影響について(2) —遺伝子発現の網羅的解析による検討—」第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6)
30. 齋島由二, 福井千恵, 澤田留美, 松岡厚子 「間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすエンドトキシンの影響について(1) —蛋白質の網羅的発現解析による検討—」第 11 回日本再生医療学会 (2012.6)
31. 佐々木寛人, 澤田留美, 清田泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司「骨髓由来間葉系幹細胞の画像情報解析による劣化度評価」第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6)
32. 佐々木寛人, 高橋厚妃, 坪井泰樹, 澤田留美, 清田泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司「間葉系幹細胞画像の情報解析による細胞状態分類法の有効性」第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6)

33. Sasaki, H., Matsuoka, F., Takeuchi, I., Sawada, R., Honda, H., Kato, R.; Morphology-based cell quality assessment of differentiation potential of mesenchymal stem cells, 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2012.6)
34. Suresh T., Maekawa K., Saito Y., Sato Y., Suzuki T. Individual variations in the human urinary proteome in relation to rat. The 3rd International Conference on Personalized Medicine (2014.6) (Prague)
35. スレッシュ ティルパッティ, 齋藤嘉朗, 本間正充, 佐藤陽治, 鈴木孝昌 変異原暴露モニタリング手法としてのタンパクアダクトミクス日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014. 12) (東京)
36. Suzuki T., Suresh T. Protein adductome analysis for the human exposure monitoring to mutagens. The 4th Asian Conference on Environmental Mutagens (2014.12) (Kolkata)
37. 鈴木孝昌 医薬品開発においてヒト内在性物質を測定する際の定量分析法に関する留意点(案)の概要:規制の重要性と今後の課題 第 6 回 JBF シンポジウム (2015. 2) (東京)
38. 鈴木孝昌: 我々は既に被曝していた (放射線リスクに関する HP の紹介) 平成 24 年度 環境変異原学会公開シンポジウム (2012.5) (東京)
39. 鈴木孝昌: Omics approach for the biomarker of genotoxicity by aristolochic acid. 韓国毒性学会, 公衆衛生学会合同国際シンポジウム (2012.6) (ソウル)
40. 鈴木孝昌, 田邊思帆里, 山口鉄生, 鈴木和博: MYBPC2 はヒト骨格筋筋芽細胞の筋分化マーカーとなる. 第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6) (横浜)
41. 鈴木孝昌, 小原有弘, 松本真理子, 広瀬明彦, 林 真, 本間正充: ジメチルアニリン異性体のマウスでの変異原性. 日本環境変異原学会 第 41 回大会 (2012.11) (静岡)
42. Suresh T., Oshizawa T., Maekawa K., Saito Y., Sato Y., Suzuki T. Improvement of Rat Urinary Proteomics by a Differential Precipitation of Proteins. Human Proteome Organization 12th World Congress (2013.9) (横浜)
43. Suzuki T., Suresh T., Oshizawa T., Maekawa K., Saito Y., Sato Y. Basic factors that influence the rat urinary proteome. 第 13 回国際毒性学会 (2013.7) (ソウル)
44. 鈴木孝昌, Suresh Thirupathi, 本間正充, 鈴木和博, 佐藤陽治 次世代 DNA シークエンサーの染色体異常解析への応用 日本環境変異原学会第 42 回大会 (2013. 11) (岡山)
45. スレッシュ ティルパッティ, 齋藤嘉朗, 本間正充, 佐藤陽治, 鈴木孝昌 ヘモグロビンアダクトーム; 環境変異原に対する暴露マーカーとしての新しいアプローチ 日本環境変異原学会第 42 回大会 (2013. 11) (岡山)

46. 降旗千恵, 櫻井幹也, 渡辺貴志, 鈴木孝昌
Toxicogenomics/JEMS・MMS V: クリセン
投与 48 時間後までのマウス肝臓における
遺伝子発現変化 日本環境変異原学会第
42 回大会 (2013. 11) (岡山)
47. Suzuki T., Suresh T., Yamada M., Honma M.,
Suzuki K., Sato Y. Use of the next
generation sequencers for the evaluation of
genomic integrity of cellular therapy products.
11th International Conference on
Environmental Mutagens (2013.11) (Foz do
Iguaçu)
48. 阿久津 英憲, 菅原 亨, 三浦 巧, 梅澤 明
弘. mir-302 マイクロRNAファミリーによ
るヒト多能性幹細胞の中・内胚葉初期分化
制御. 第 14 回再生医療学会総会, 横浜
(2015 年 3 月 19~21 日)
49. Takumi Miura, Tohru Sugawara, Atsushi
Fukuda, Ryo Tamoto, Akihiro Umezawa,
Hidenori Akutsu. Generation of Committed
Neural Progenitors from Human Fibroblasts
by Defined Factors. The 12th Annual Meeting
International Society for Stem Cell Research,
Vancouver, Canada (2014 年 6 月 18-21 日)
50. 草川森士, 安田智, 黒田拓也, 川真田伸,
佐藤陽治 軟寒天コロニー形成試験を応
用した再生医療製品に混在する悪性形質
転換細胞の高感度検出法 第14回再生医
療学会総会, 横浜 (2015年3月19-21日)
51. 田埜慶子, 安田智, 黒田拓也, 梅澤明弘,
佐藤陽治 ヒト多能性幹細胞由来再生医
療製品中に残存する未分化細胞をダイレ
クトに検出する方法の開発 第14回再生
医療学会総会, 横浜 (2015年3月19-21日)
52. Sato Y. Tumorigenicity Tests for the Quality
and Safety of Cell-Based Therapeutic
Products. IABS Workshop, kyoto (2015年2
月18-19日)
53. Yasuda S. The New Japanese Regulatory
Framework for Regenerative Medicine & Cell
Therapy. World Stem Cell Summit 14, San
Antonio (2014年12月3-5日)
54. 佐藤陽治 ヒト/動物細胞加工製品の品
質確保に関する基本的考え方 レギュラ
トリーサイエンス学会シンポジウム~再
生医療等製品の承認審査と再生医療新法
~, 東京 (2014年11月25日)
55. 佐藤陽治 細胞技術の許認可の実情—再
生医療に関する日本の新しい規制の枠組
み— 第36回日本バイオマテリアル学会
大会, 東京 (2014年11月18日)
56. Kusakawa S, Yasuda S, Kuroda T, Kawamata
S, Sato Y. A new soft agar colony formation
assay based on high-content imaging for
sensitive detection of tumorigenic cellular
impurities in human cell-processed
therapeutic products. Global Controls in Stem
Cells, Singapore (2014年11月5-7日)
57. 佐藤陽治 ヒト由来移植細胞に混入する
多能性幹細胞・造腫瘍性細胞の検出法の性
能評価 第87回日本生化学大会, 京都
(2014年10月15-18日)

58. Kuroda T, Tachi S, Yasuda S, Kusakawa S, Sato Y. Profiling of Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines for Predicting the Differentiation Propensity. International Society for Stem Cell Research 12 th Annual Meeting, Vancouver (2014年6月18-21日)
59. Tano K, Yasuda S, Umezawa A, Sato Y. A highly efficient culture method for growth and detection of undifferentiated human pluripotent stem cells present as impurities in cell-processed therapeutic products. 20 th International Society for Cellular Therapy, Paris (2014年4月23-26日)
60. Sato Y. Tumorigenicity of Human Cell-Processed Therapeutic Products. IABS-JST Joint Workshop, kyoto (2014年3月7-8日)
61. 佐藤陽治 再生医療等製品の品質・安全性確保のための技術的課題 第13回再生医療学会総会, 京都 (2014年3月4-6日)
62. 城しおり, 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 佐藤陽治 ヒトiPS細胞の分化プロペンシティ予測のための細胞特性プロファイリング 第13回再生医療学会総会, 京都 (2014年3月4-6日)
63. 田埜慶子, 安田智, 梅澤明弘, 佐藤陽治 ヒト多能性幹細胞由来再生医療製品中に混入する未分化細胞の高効率培養法の開発 第13回再生医療学会総会, 京都 (2014年3月4-6日)
64. 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 松山さと子, 川真田伸, 澤芳樹, 佐藤陽治 デジタルPCRを用いたヒトiPS細胞由来分化細胞に残存する未分化iPS細胞の高感度検出法の開発 第13回再生医療学会総会, 京都 (2014年3月4-6日)
65. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Kawamata S, Sato Y. Application of droplet digital PCR technology to detection of residual undifferentiated cells in cardiomyocytes derived from human iPS cells. World Stem Cell Summit 2013, San Diego (2013年12月4-6日)
66. Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Matsuyama A, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y. Characterization of *in vivo* tumorigenicity test using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2r^{null} mice for quality assessment of human cell-processed therapeutic products. World Stem Cell Summit 2013, San Diego (2013年12月4-6日)
67. Sato Y. Japanese Regulatory Principles for Ensuring Quality and Safety of Cell/Tissue-Processed Products. World Summit on Regenerative Medicine 2013, 西安 (2013年10月19-22日)
68. Yasuda S. Application of digital PCR on quality assessment of products derived from human pluripotent stem cells. Second Annual Droplet Digital PCR User Meeting, Boston (2013年10月21日)
69. 佐藤陽治 ヒトiPS細胞由来移植細胞中に残存する未分化細胞の*in vitro*検出法の開発

- 発 第23回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京 (2013年6月23日)
70. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Current Japanese guidelines on ensuring quality and safety of products derived from processing of human stem cells. International Society for Stem Cell Research 11 th Annual Meeting, Boston (2013年6月12-15日)
71. Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Kuroda T, Sawada R, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y. Validation of in vivo tumorigenicity test for the process control of cell/tissue-engineered products using severe immunodeficient NOG mice. International Society for Stem Cell Research 11 th Annual Meeting, Boston (2013年6月12-15日)
72. 佐藤陽治 再生医療・細胞治療の規制に関する国際比較 日本バイオマテリアル学会2013年度第1回セミナー, 東京 (2013年5月10日)
73. 安田智 再生医療製品における品質・安全性試験の開発と評価 第1回軟骨再生医療レギュラトリーサイエンスフォーラム, 東京 (2013年4月2日)
74. 草川森士, 町田一彦, 安田智, 黒田拓也, 澤田留美, 伊藤守, 堤秀樹, 川真田伸, 佐藤陽治 細胞・組織加工製品の製造工程管理法としてのNOGマウス造腫瘍性試験系のバリデーション 第12回日本再生医療学会総会, 横浜 (2013年3月23日)
75. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. The final version of Japanese guidelines on ensuring quality and safety of products derived from processing of various stem cells. World Stem Cell Summit 2012, West Palm Beach, USA (2012年12月3-5日)
76. 草川森士, 船田正彦, 安田智, 黒田拓也, 山内淳司, 佐藤陽治 レポーター蛋白を利用した多能性幹細胞の神経分化の評価 第35回日本神経科学大会, 名古屋 (2012年9月18-21日)
77. 佐藤陽治 再生医療/細胞・組織加工製品の安全性評価 第39回日本毒性学会年会, 仙台 (2012年7月17日)
78. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Suzuki K, Kawamata S, Sato Y. Validation of in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research 10 th Annual Meeting, Yokohama (2012年6月14日)
79. 佐藤陽治 国際協調と日本のあるべき姿 第11回日本再生医療学会総会, 横浜 (2012年6月13日)
80. 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 鈴木和博, 川真田伸, 佐藤陽治 ヒトiPS 細胞由来網膜色素上皮細胞中に残存する未分化細胞のin vitro 高感度検出法の開発と評価 第11回日本再生医療学会総会, 横浜 (2012年6月13日)