

81. 佐藤陽治 ヒト多能性幹細胞加工製品の製造における造腫瘍性評価 第11回日本再生医療学会総会, 横浜 (2012年6月12日)

## **H. 知的財産権の出願・登録状況**

### **H-1. 特許取得**

発明者 草川森士, 安田智, 佐藤陽治

出願人【識別番号】803000056

【名称】公益財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

特許出願番号 特願2014-176861

特許出願日 平成26年9月1日

### **H-2. 実用新案登録**

なし

### **H-3. その他**

特記事項なし

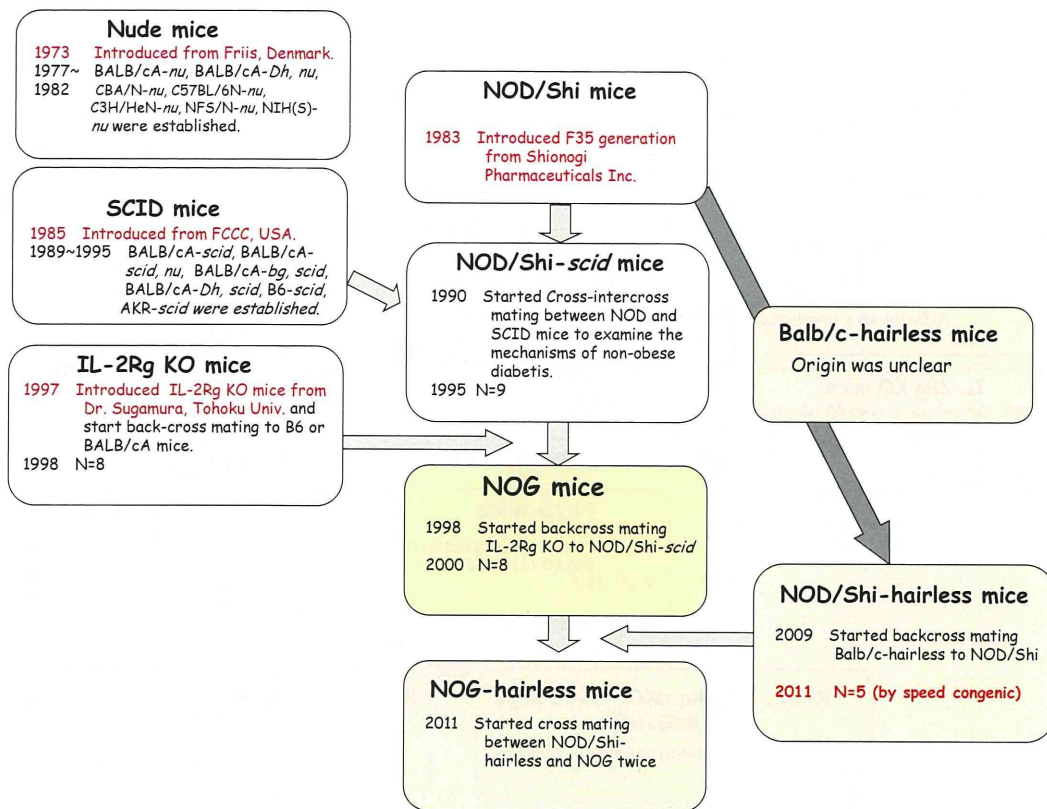


Fig. 1 NOG-hr マウスの開発過程

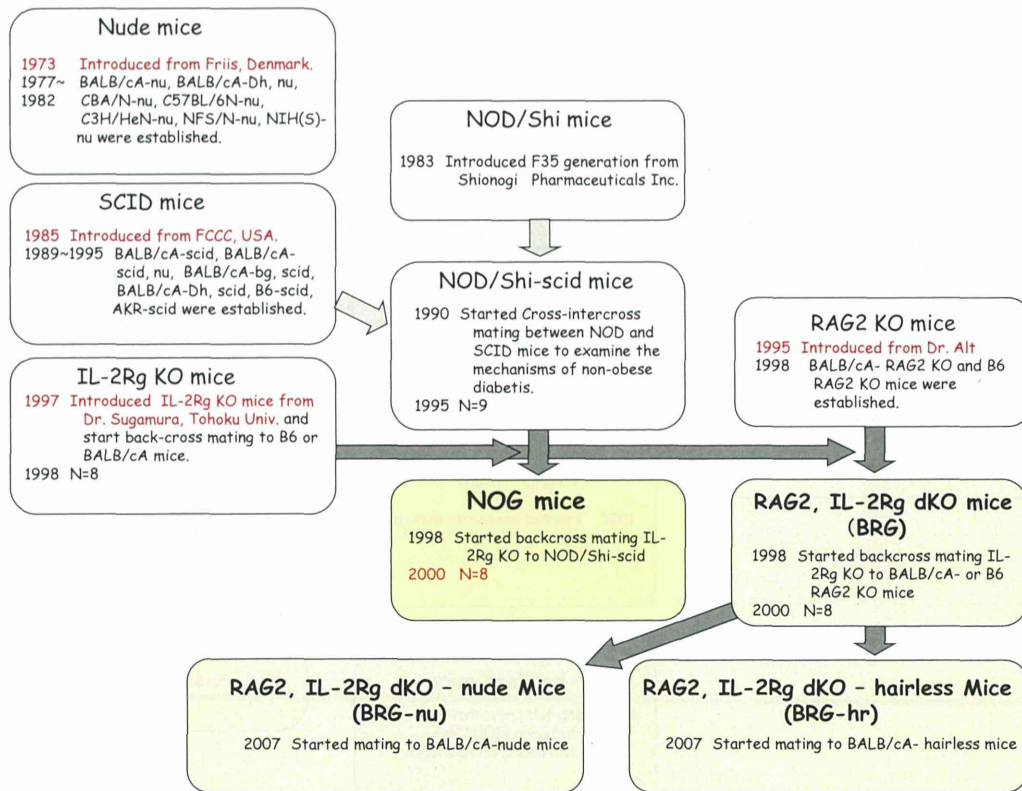


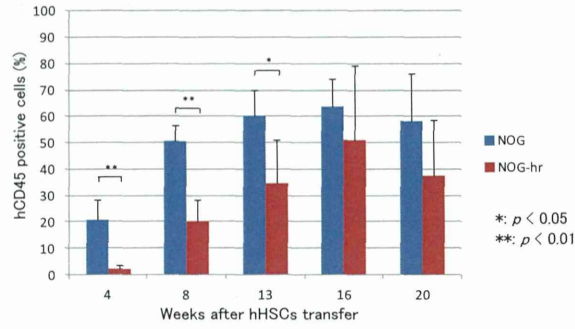
Fig. 2 BRG, BRG-nu および BRG-hr マウスの開発過程

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

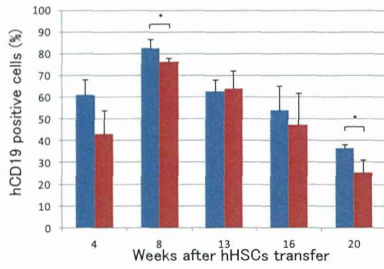
移植細胞	背景遺伝子 系統 項目	BALB/c		NOD/Shi								
		Nude		Scid <sup>a</sup>			NOG			NOG-hr		
		TPD50	TPD50	vs. Nude	マトリゲル 増強効果	TPD50	vs. Nude	マトリゲル 増強効果	TPD50	vs. Nude	マトリゲル 増強効果	
HeLa細胞		0.68~4.21 x 10 <sup>5</sup>	2.16 x 10 <sup>5</sup>	1/1.5	x 1	1.29 x 10 <sup>4</sup>	1/33	x 1	3.74 x 10 <sup>4</sup>	1/13	x 1	
HeLa細胞+マトリゲル		-	-	-	-	7.76 x 10 <sup>1</sup>	1/5431	x 165	2.07 x 10 <sup>2</sup>	1/2040	x 152	

a: 移植後10週におけるデータ

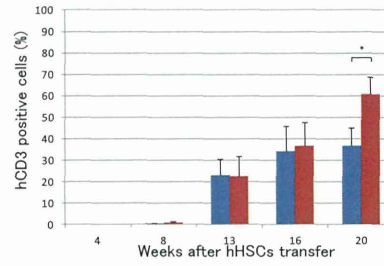
A. 末梢血全白血球中における hCD45 陽性細胞率



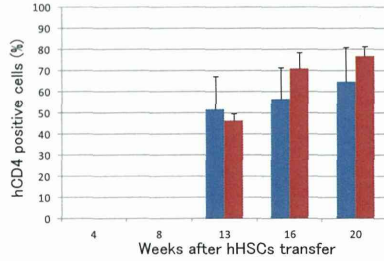
B. hCD45 陽性細胞中の hCD19 陽性細胞率 (B 細胞)



C. hCD45 陽性細胞中の hCD3 陽性細胞率 (T 細胞)



D. hCD3 陽性細胞中の hCD4 陽性細胞率 (ヘルパー T 細胞)



E. hCD3 陽性細胞中の hCD8 陽性細胞率 (細胞障害 T 細胞)

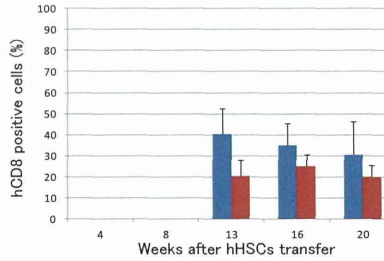


Fig. 3 NOG および NOG-hr マウスにおけるヒト臍帯血造血幹細胞分化の推移

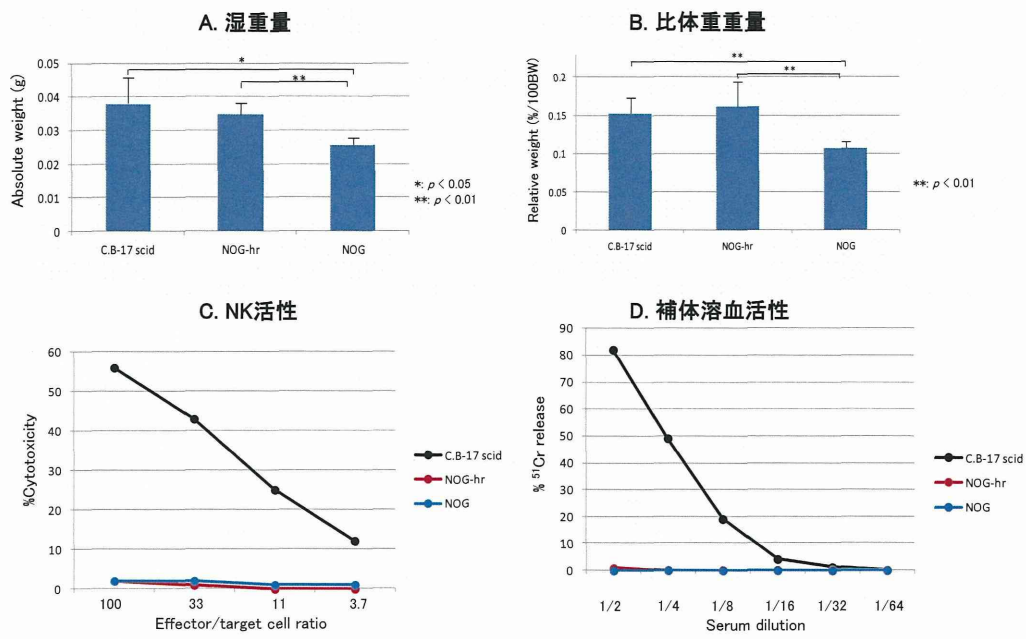
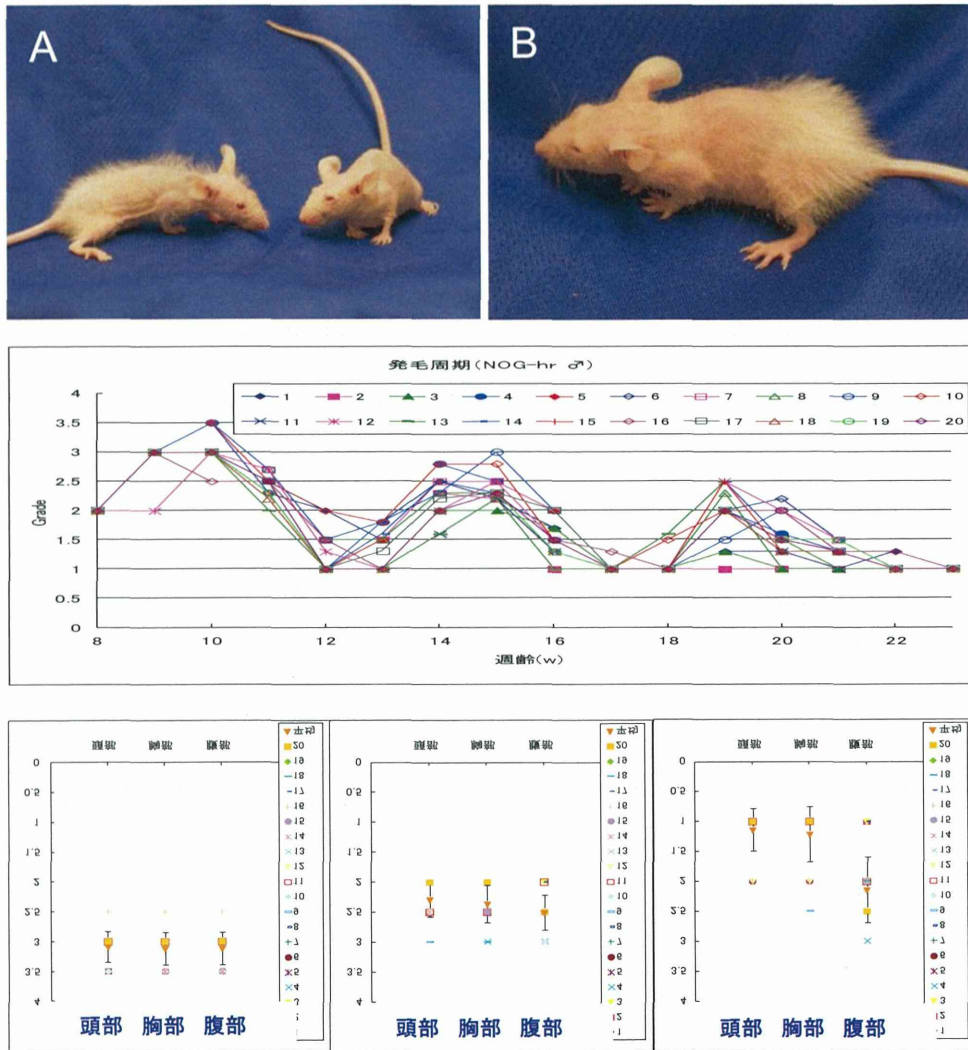


Fig. 4 NOG および NOG-hr マウスの脾臓重量, NK 活性および補体溶血活性

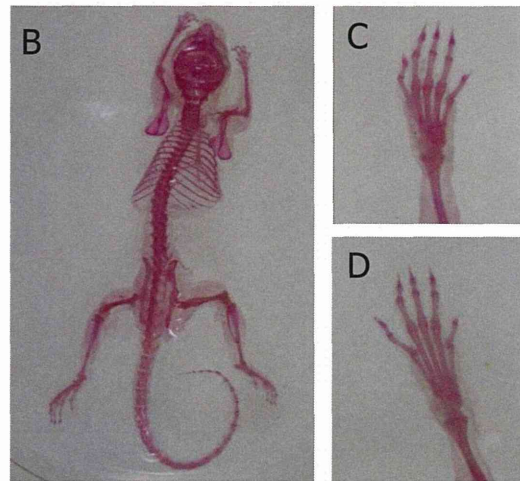


**Fig. 5 NOG-hr マウスにおける外貌特性 (被毛)**

周期的換毛により個体間の被毛の状態が異なる (写真 A),

全頭とも同じ周期で換毛を繰り返す (中段グラフ),

第 3 ピーク時には腹部 (下半身) を中心に発毛する (写真 B, 下段グラフ)



**Fig. 6 NOG-hr マウスにおける外貌特性（過長爪，目脂，眼球白濁）**

前後肢ともに過長爪が観察されるが（写真 A），  
全身骨格を含め指骨には異常は観察されない（写真 B, C, D）  
多くの動物に眼脂や眼球白濁化が観察される（写真 E, F）



**Table 2 移植後 16 週における TPD50, 対ヌードマウス比およびマトリゲル増強効果**

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

a: 移植後10週におけるデータ

Table 3 hMSC と比較して Ewing 肉腫細胞全てにおいて mRNA 発現が 10 倍以上変化した遺伝子とその変化

	Hs822.T	Hs863.T	RD-ES	SK-ES-1
BEND5	-16.7	-14.8	27.3	26.7
CCND2	38.1	37.7	67.7	247.7
FBLN1	-19.0	-24.4	-36.8	-198.5
HAPLN1	-22.5	-11.7	-26.7	-110.1
IGF2BP1	22.8	22.4	288.6	207.5
SLC24A3	38.9	75.6	324.3	173.8
SSTR1	79.6	14.8	22.4	28.8
STEAP4	-24.5	-18.8	-21.7	-33.2
TMEFF2	37.6	10.5	34.4	197.8

Table 4 Cyclin D2 導入により 2 倍以上発現量が変化した遺伝子が関与する細胞機能 (TOP5)

Top 5 functional category	Function annotation	p-Value	Activation z-score	No. of genes
Cellular Movement	cell movement of prostate cancer	7.94E-06	0.918	14
	migration of prostate cancer cells	1.54E-05	1.339	12
	recruitment of cells	6.57E-05	1.55	28
Cellular Development	proliferation of tumor cell lines	9.04E-06	1.15	92
	proliferation of cancer cells	1.96E-05	1.302	30
	differentiation of connective tissues	4.35E-05	-0.379	41
	proliferation of tumor cells	4.61E-05	1.036	37
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of tumor cell lines	9.04E-06	1.15	92
	proliferation of cancer cells	1.96E-05	1.302	30
	proliferation of tumor cells	4.61E-05	1.036	37
	proliferation of cells	9.27E-05	3.142	186
Cell Cycle	interphase	1.34E-05	2.19	50
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	recruitment leukocytes	7.13E-05	1.159	26

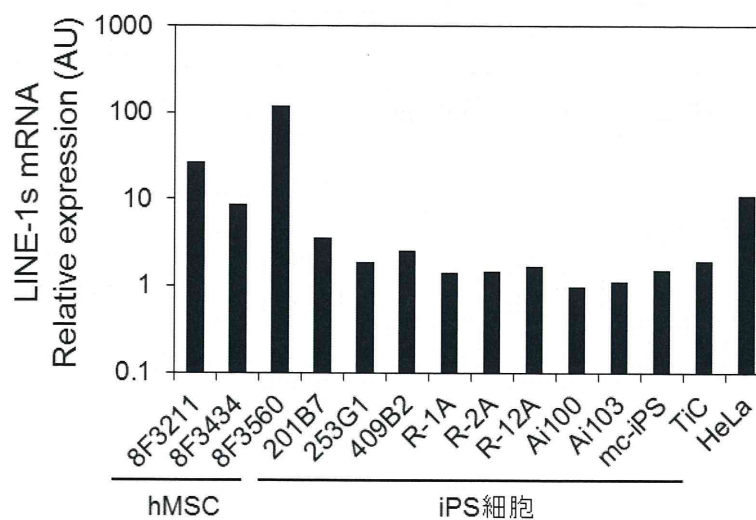


Fig. 7 hMSCs 及び iPS 細胞における LINE-1s mRNA の発現解析

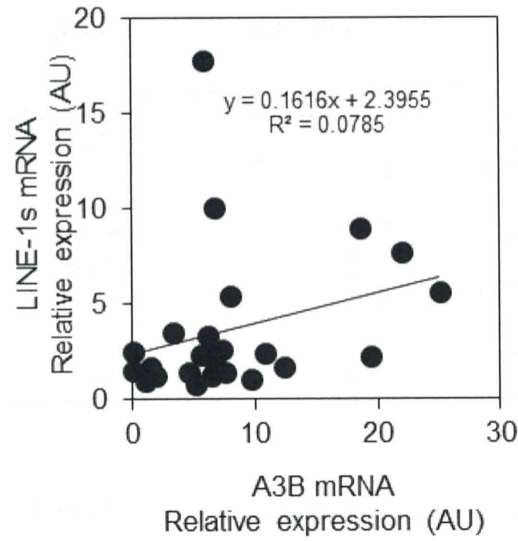


Fig. 8 hMSCにおけるA3B, LINE-1s mRNA発現の相関

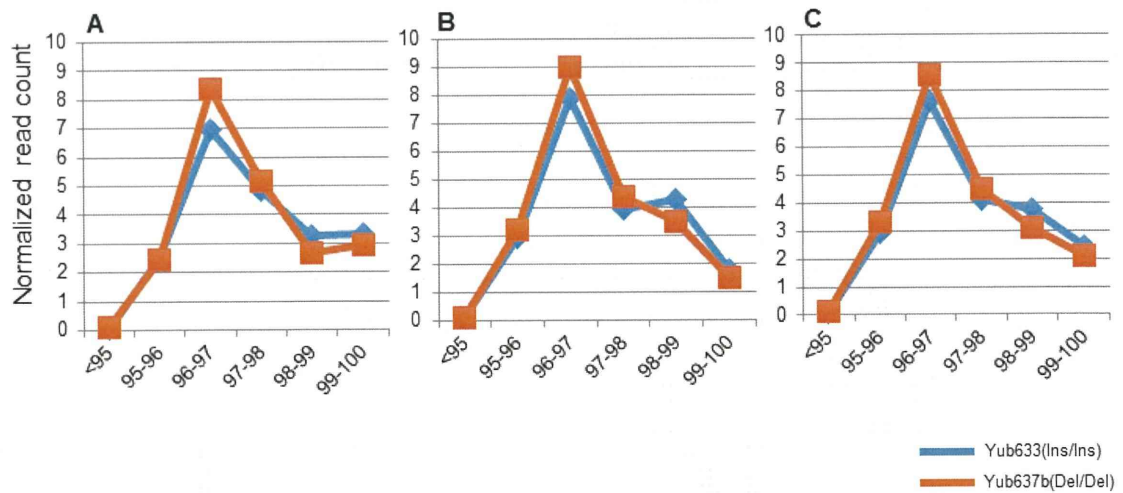


Fig. 9 LINE-1 配列との各一致度における normalized read count 数

(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。

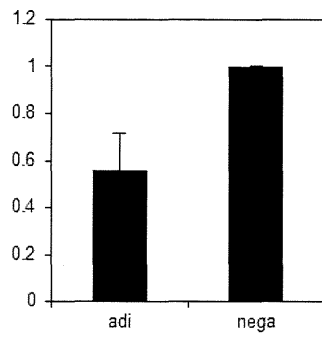


Fig. 10 脂肪分化培地 (adi)及び増殖培地 (nega)で培養した hMSC 3 ロットの LINE-1 発現比較

Table 5 HL60 細胞における既知のガン関連遺伝子変異の検出

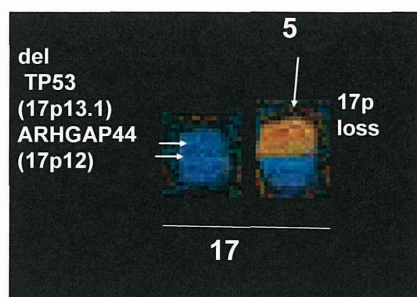
#chr	start	end	ref	alt	hom/het	snp_quality	tot_depth	alt_depth	region	gene
chr01	115220467	115220474	CTTCC	-	hom	214	14	14	intronic	AMPD1
chr01	115228609	115228609	C	T	hom	222	51	51	intronic	AMPD1
chr01	115231254	115231254	G	A	hom	222	70	70	exonic	AMPD1
chr01	115235785	115235788	ATAA	-	hom	186	12	12	intronic	AMPD1
chr01	115236057	115236057	G	A	hom	222	47	47	exonic;splicing	AMPD1
chr01	115253684	115253684	A	G	hom	190	45	45	intronic	NRAS
chr01	115255710	115255711	TT	-	hom	214	62	62	intronic	NRAS
<b>chr01</b>	<b>115256529</b>	<b>115256529</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>hom</b>	<b>222</b>	<b>49</b>	<b>49</b>	<b>exonic</b>	<b>NRAS</b>
chr01	115290340	115290340	A	G	hom	222	55	55	intronic	CSDE1
chr01	115296984	115296984	G	C	hom	201	49	49	intronic	CSDE1
}										
<b>chr09</b>	<b>21970916</b>	<b>21970916</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>hom</b>	<b>222</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>exonic</b>	<b>CDKN2A</b>
chr09	21971120	21971120	G	A	hom	176	15	15	exonic	CDKN2A
chr09	21971989	21971989	C	G	hom	222	32	32	intronic	CDKN2A
chr09	21973422	21973422	G	T	hom	207	35	35	intronic	CDKN2A
chr09	21975319	21975319	T	A	hom	201	33	33	intronic	CDKN2A
chr09	21976402	21976402	G	A	hom	163	19	19	intronic	CDKN2A
chr09	21978979	21978979	C	T	hom	222	46	46	intronic	CDKN2A
chr09	21980990	21980990	-	GT	hom	214	9	9	intronic	CDKN2A
chr09	21981018	21981018	T	C	het	38	16	5	intronic	CDKN2A
chr09	21981052	21981052	T	C	het	97	23	9	intronic	CDKN2A
chr09	21981086	21981087	TA	-	het	74.5	17	7	intronic	CDKN2A
chr09	21987455	21987456	GA	-	hom	101	4	4	intronic	CDKN2A
chr09	21991923	21991923	C	T	hom	210	37	37	intronic	CDKN2A
chr09	21993842	21993845	GTGT	-	hom	81.2	2	2	intronic	CDKN2A

Table 6 HL60-RG 細胞における c-myc 増幅領域のジャンクションの配列

Junction	breakpoint position (hg19)		Junction sequence		inserted sequence
	left segment	right segment	left end	right start	
6b-4a	130086178	128689007	CCTCAGGGTCTC	CTGTCCTGA	None
4b-5a	128772037	130000919	CTTCCTCCA	GAGAAGCCTG	None
5b-7a	130215269	130367023	ACACACTTGT	AGAGGGTGGG	None
7b-8	130698147	136580808	CATTCCAACAC	TCTTAACTCC(r)	None
8-1a	136580616	126224548	ATG AATTTG(r)	GAGACGTCTC	None
1b-3b	126547448	128344474	CACCT AATTA	AAGGCAGCAG(r)	ATAACTTG
3a-2a	128068264	126710881	ATGTGCCCT(r)	GGAGGCTCTG	AAAACATA
2b-6a	not analyzed				

赤字: 重複配列 (r): 逆向き配列

Table 7 HL60-RG 細胞 17 番染色体上の遺伝子欠失領域



Invisible deletions were detected!

chromosome	start	end	size(kb)	copy #	type	Gene	description
17	0	7490000	7490	1	loss	many	
17	7490000	7580000	90	0	loss	<b>TP53</b>	tumor protein p53
17	7580000	12820000	5240	1	loss	many	middle of short arm
17	12820000	12850000	30	0	loss	<b>ARHGAP44</b>	Rho GTPase activating protein 44
17	12850000	20680000	7830	1	loss	many	middle of short arm
17	21200000	21330000	130	4	gain	<b>MAP2K3</b>	mitogen-activated protein kinase kinase 3
17	34450000	34480000	30	3	gain	<b>retro-GOLM1</b>	golgi membrane protein 1
17	41390000	41400000	10	4	gain	none	
17	41400000	41410000	10	8	gain	none	
17	44210000	44280000	70	4	gain	<b>KANSL1</b>	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1
17	44340000	44350000	10	6	gain	none	
17	45210000	45220000	10	4	gain	<b>CDC27</b>	cell division cycle 27
17	45220000	45250000	30	3	gain	<b>CDC27</b>	cell division cycle 27

Table 8 TK6 細胞の変異原処理による tk 遺伝子突然変異試験

Mutation frequency

検体名	Positive well no.			Total well no.	Negative well no.	PE3	Mut. freq. ( $\times 10^{-6}$ )			%SG
	N	S	Total				N-MF	S-MF	T-MF	
control	2	5	7	384	377	0.9	0.1	0.4	0.5	71.6
MMS (6ug/ml)	25	8	33	192	159	0.2	14.3	5.0	19.3	26.0
ENU (12ug/ml)	139	16	155	192	37	0.8	38.3	10.7	49.0	21.8
$\gamma$ -ray 2Gy	2	82	84	192	108	0.5	0.6	30.7	31.3	98.2

Comments:

PE: Plating efficiency

RS: Relative survival

RSG: Relative suspension growth

RTG: Relative total growth

MF: Mutation frequency; N: Normally growing colony; S: Slowly growing colony; T: Total

%SG: Ratio of S-MF to T-MF

Table 9 PacBio シークエンサーにて検出された mtDNA 変異

Sample	Mapped Read	Mapped bp	Mutations
TK6_cont_1st	9258	6,685,859	31
TK6_cont_2nd	6,647	5,102,372	33
TK6_ENU	14,018	12,469,403	32
TK6_MMS	1,272	1,089,609	28
TK6_γ -ray	2,361	2,409,918	36
HL60_RG	292	2,999,400	17

Table 10 TK6/BLM 細胞にて発現変化を示したタンパク

Protein Candidates after removing peptides with score < 10								
Accession	Peptide c	Unique peptides	Confidence	Anova (p)	Max fold	Highest	Lowest	Description
CD20	8	7	446.44	0.0106	3.20	BLM	TK6	B-lymphocyte antigen CD20
BRWD3	2	1	32.15	0.0158	2.06	TK6	BLM	Bromodomain and WD repeat-containing protein 3
CCL3	1	1	17.37	0.0253	4.32	BLM	TK6	C-C motif chemokine 3
CHD3	9	1	226.66	0.0273	2.06	TK6	BLM	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3
IGKC	8	8	433.31	0.0056	3.28	TK6	BLM	Ig kappa chain C region
KV402 and KV401	4	4	210.12	0.0305	3.18	TK6	BLM	Ig kappa chain V-IV region Len
IGHM;MUCB	15	13	630.79	0.0158	7.29	TK6	BLM	Ig mu chain C region
NUCB1	6	2	164.57	0.0204	2.42	TK6	BLM	Nucleobindin-1
SCAM1	2	2	54.25	0.0068	3.20	TK6	BLM	Secretory carrier-associated membrane protein 1
SPTB1	13	1	309.44	0.0485	2.03	TK6	BLM	Spectrin beta chain, erythrocytic
PUR2	3	2	56.74	0.0457	2.16	TK6	BLM	Trifunctional purine bi
CN166	3	2	118.78	0.0025	2.05	BLM	TK6	UPF0568 protein C14orf166

Fig. 11 HL60-RG 細胞ホールゲノムシーケンスデータの冗長度

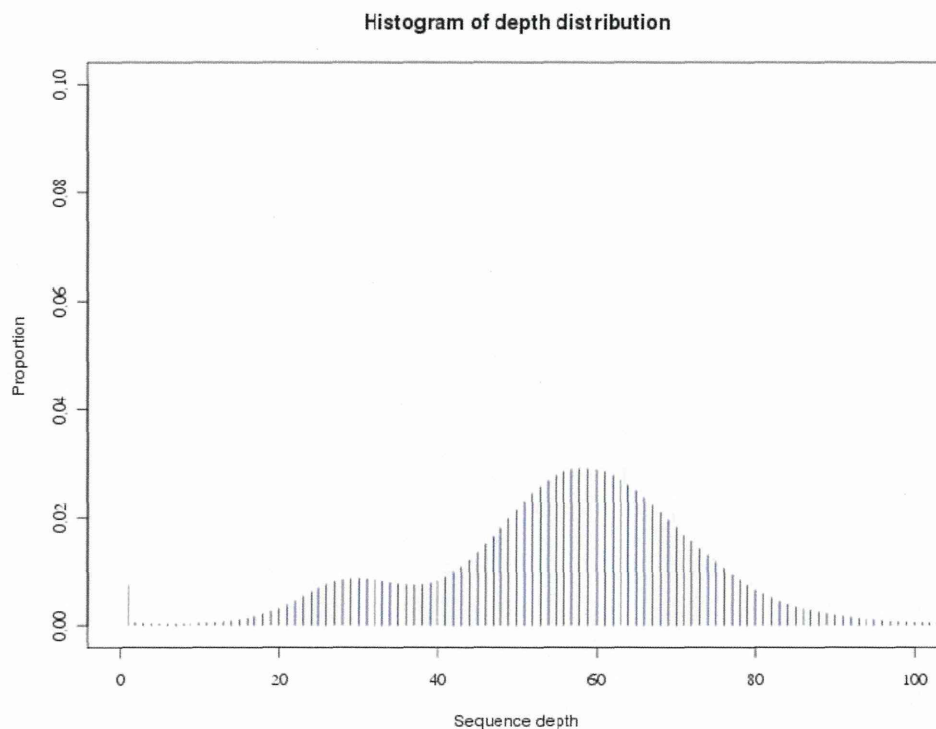


Fig. 12 HL60-RG 細胞 22 番染色体の Homo SNP Call 一致率

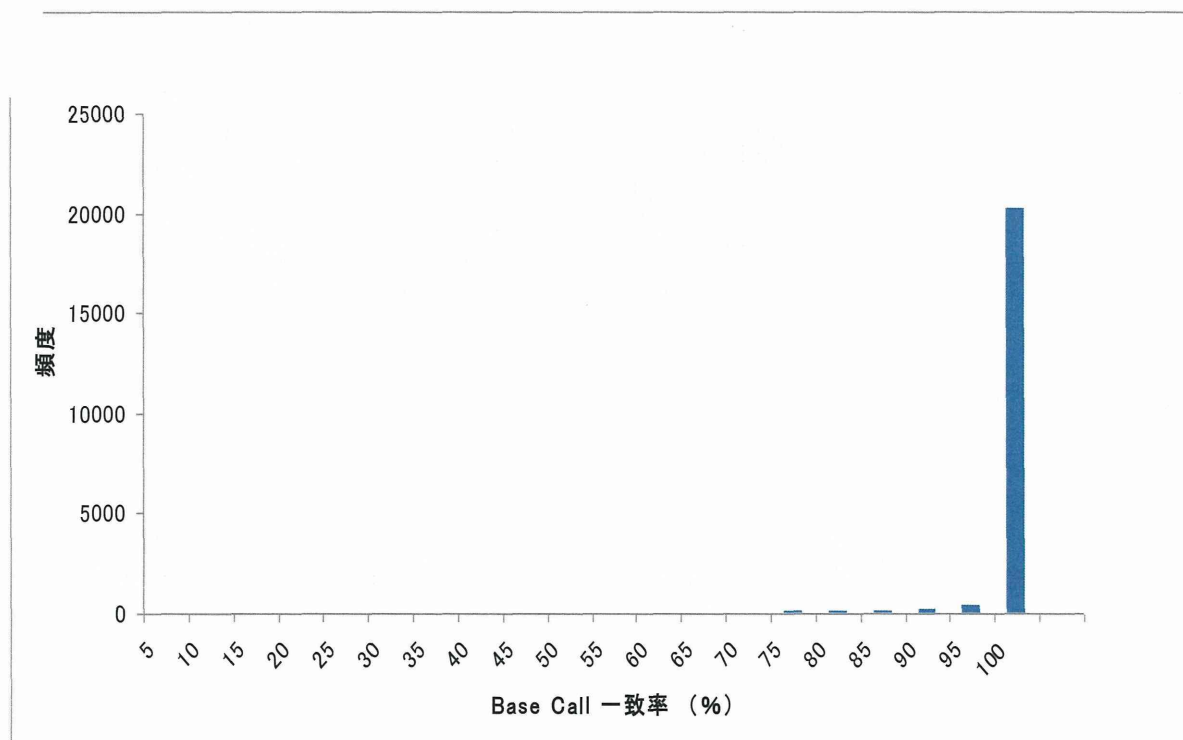




Fig. 13 HL60-RG 細胞 22 番染色体の Hetero SNP Call 率

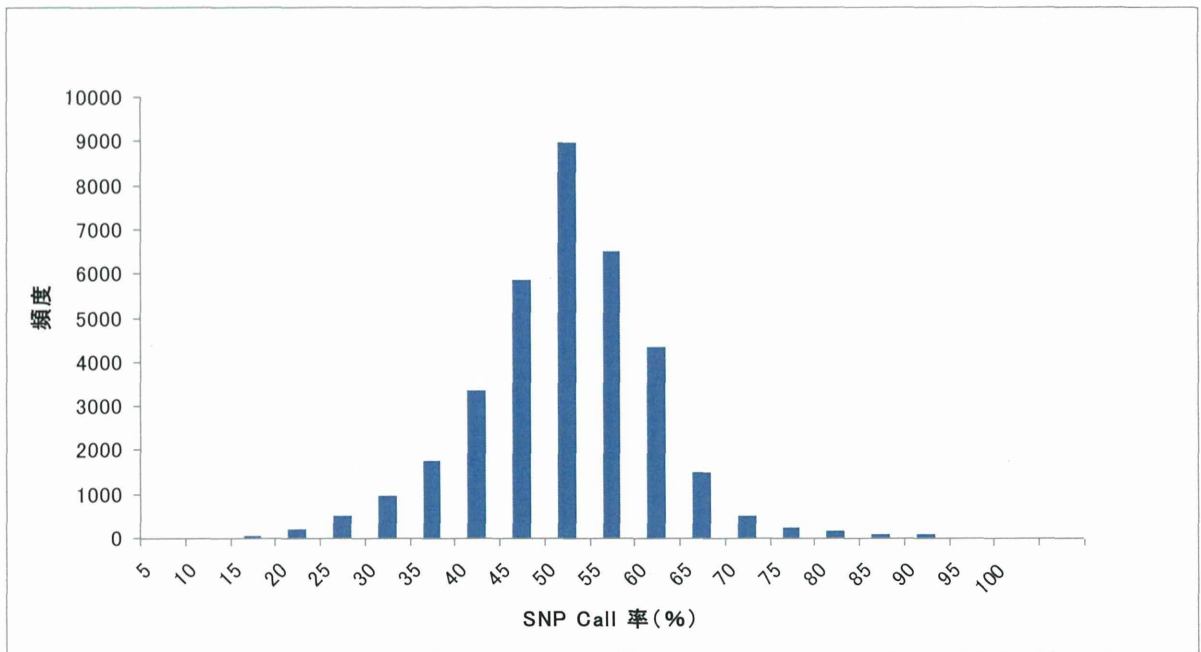
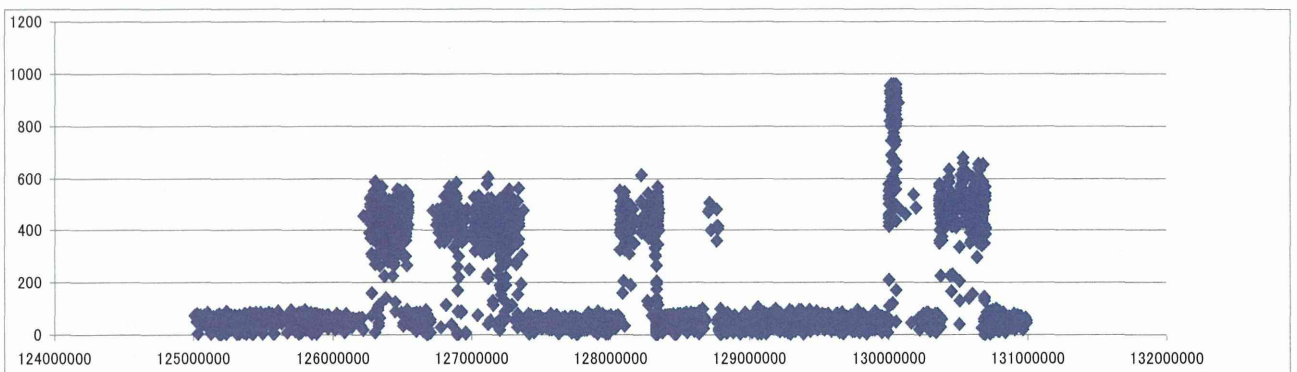


Fig. 14 シークエンスデータを利用した 8 番染色体 c-myc 領域のコピー数変化の解析



(以前得られた CGH アレイデータによる同一領域のコピー数変化)

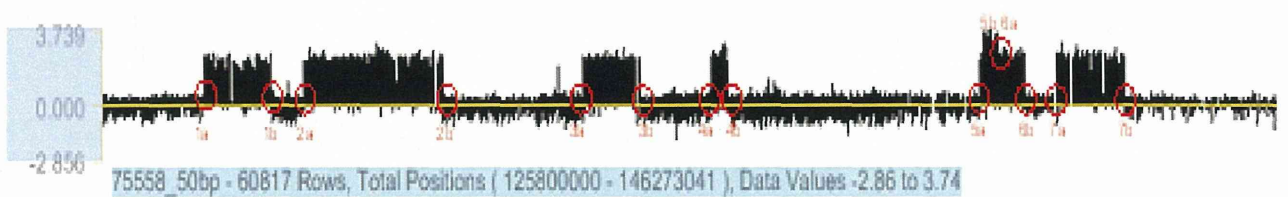


Fig. 15 増幅領域のリアレンジメントに関する解析による予想配列

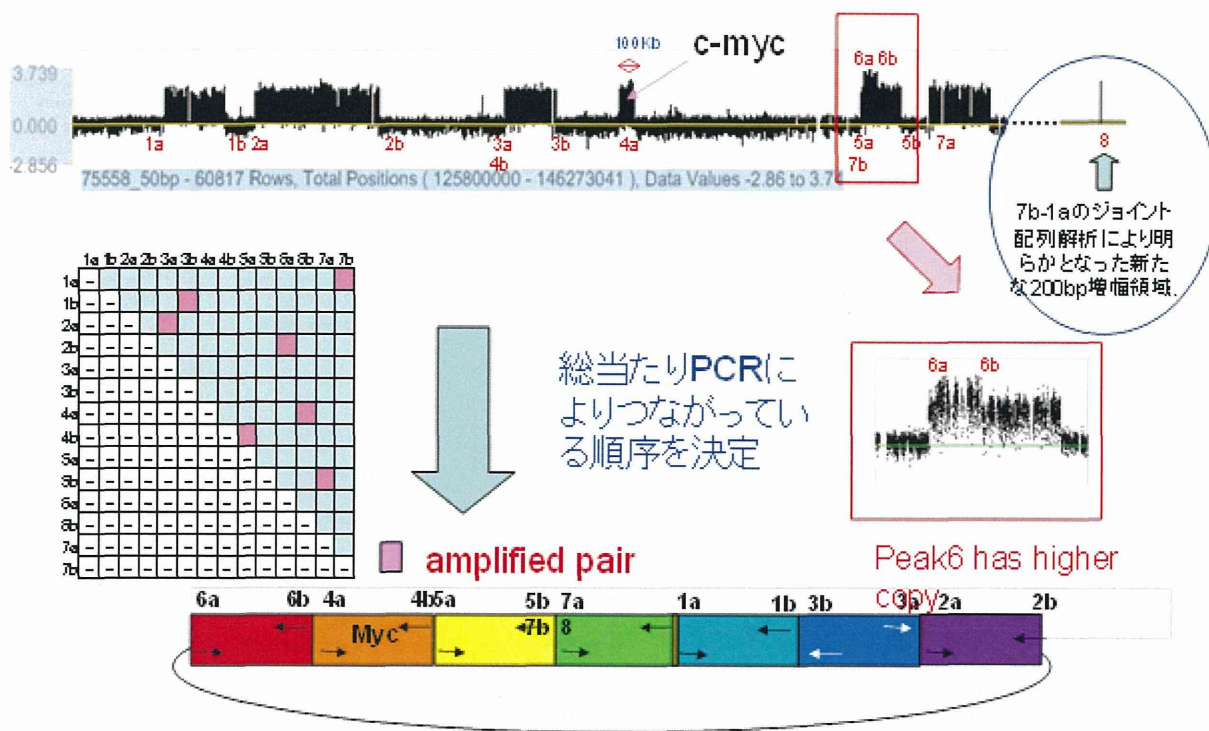


Fig. 16 hMSC 細胞ホールゲノムシーケンスデータの冗長度

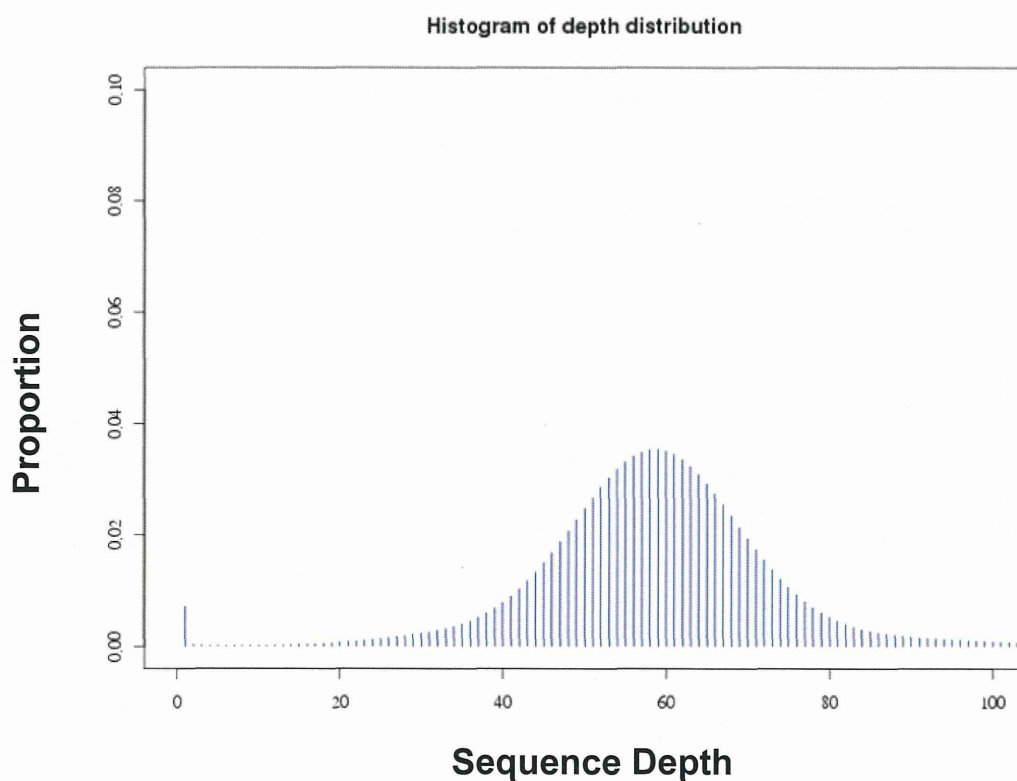


Fig. 17 hMSC 細胞のシーケンスデータの冗長度を用いた CGH (コピー数異常) 解析

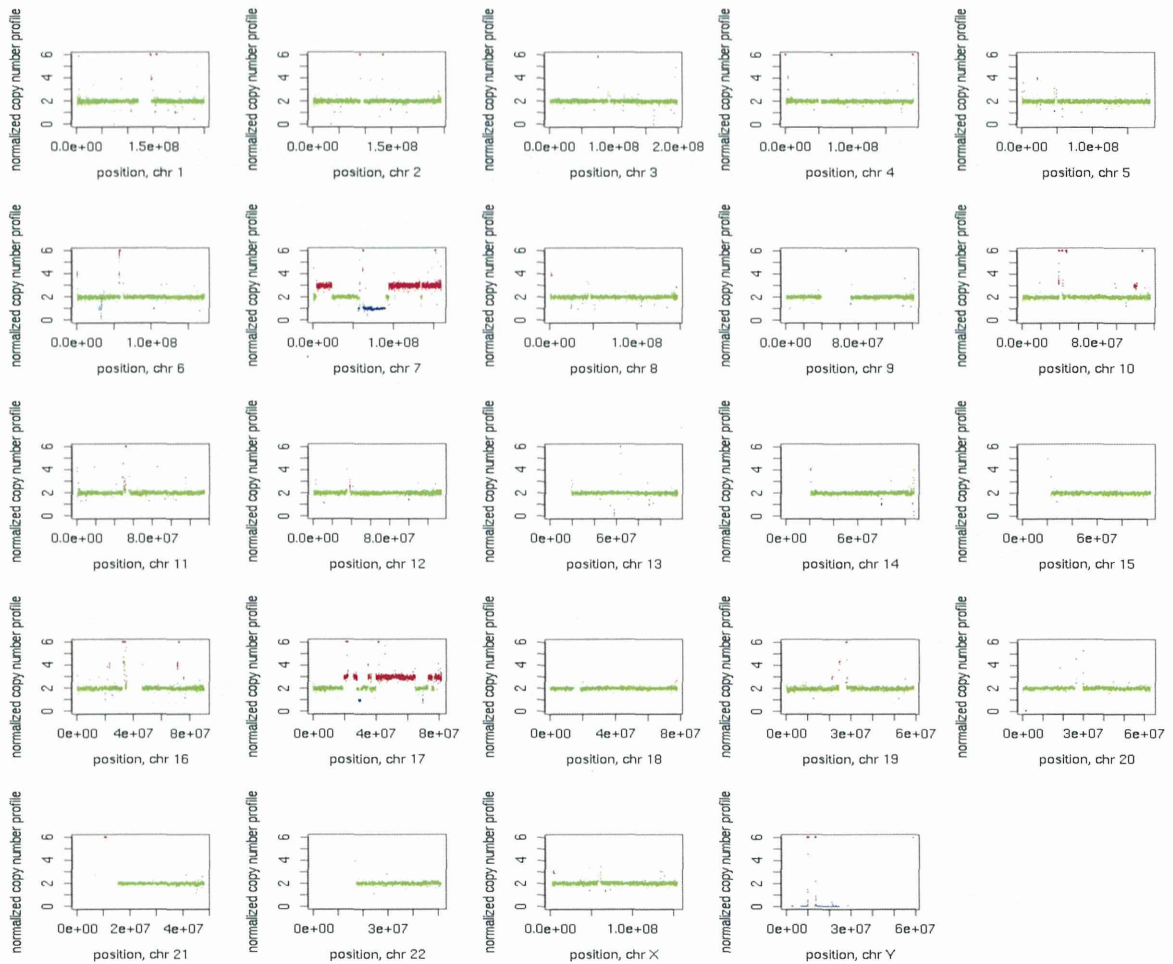


Fig. 18 HL60-RG 細胞 c-myc 増幅領域の融合点を含む配列の検出

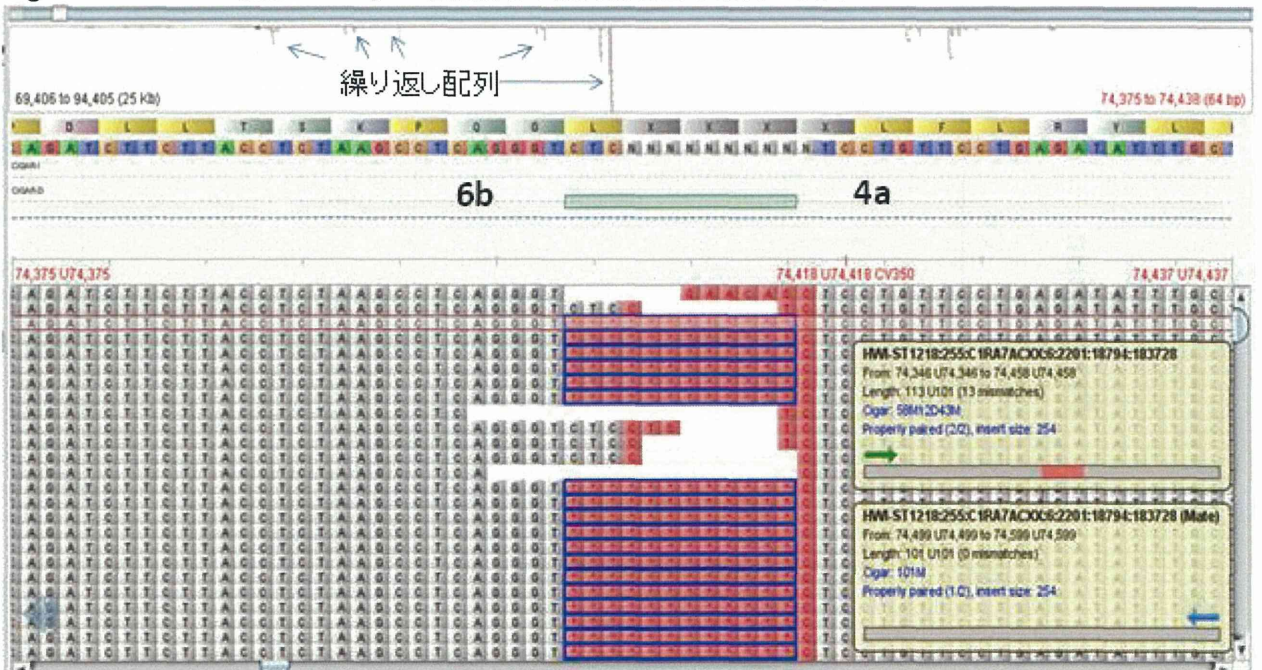


Fig. 19 TK6 細胞の核型および染色体解析

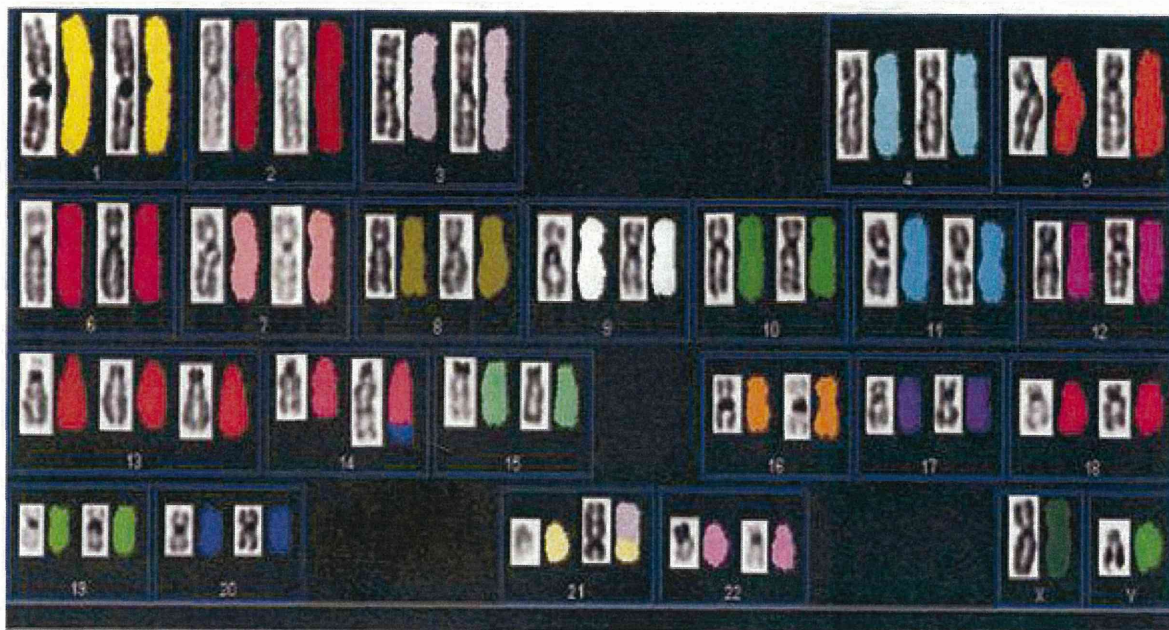
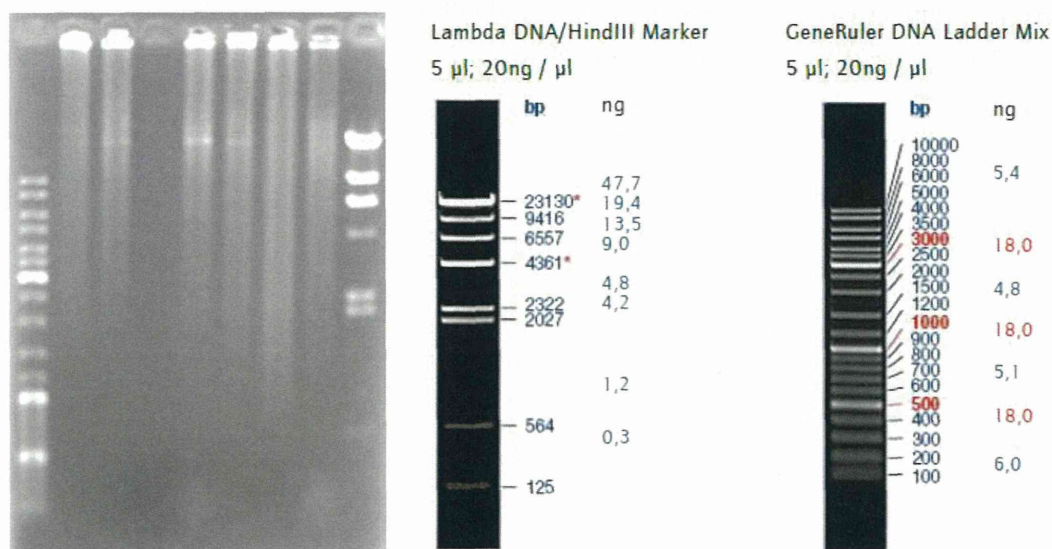


Fig. 20 抽出した mtDNA の品質チェック



Qubit

Sample No.	Sample Name	Conc. [ng/μl]	Total volume[μl]
1	TK6_cont	11,4	100
2	TK6_ENU	7,13	100
3	TK6_MMS	2,23	100
4	TK6_MMS_2	6,06	100
5	TK6_RAY	11,2	100
6	HL60_RG	5,24	100
7	HL60_RG_2	13,7	100