

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：再生医療実現拠点ネットワークプログラム／技術開発個別課題  
Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine/  
Projects for Technological Development

研究開発課題名：再生医療のための細胞システム制御遺伝子発現リソースの構築  
Construction of resources for cell system-control gene expression for regenerative  
medicine.

研究開発担当者 所属 役職 氏名：

国立研究開発法人産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター 研  
究チーム長 五島直樹  
Leader, Team, Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, National Institute of  
Advanced Industrial Science and Technology, Naoki Goshima

実施期間：平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究開発課題名：

再生医療における移植細胞の品質管理と移植後の安全性評価  
Quality control of transplanted cells and safety evaluation after transplantation in  
regenerative medicine.

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

国立研究開発法人産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター 主  
任研究員 鍵和田晴美  
Senior Researcher, Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery,  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,  
Harumi Kagiwada.

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

国立研究開発法人産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター 研究員 福田枝里子

Researcher, Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery,  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,  
Eriko Fukuda.

## II. 成果の概要（総括研究報告）

産業技術総合研究所及びバイオ産業情報化コンソーシアムは、基盤技術である①ヒト遺伝子発現リソースと②プロテイン・アクティブアレイについて、H27年度までに①は細胞システム制御遺伝子約1,500種類を追加し、②は約14,000タンパク質/基板の高密度アレイ作製による高スループット化を達成した。再生医療研究における機能的プロテオミクス解析の実施体制が整い、H28年度から、細胞移植における細胞の品質評価および移植患者の免疫応答モニタリング技術の開発を実施している。これらの技術により、細胞移植の安全性を、移植前から移植後まで全般に渡って支援することを目指す。具体的な研究開発内容は以下の通りである。

### 研究項目 1: プロテインアレイによる細胞移植の安全性評価（移植後の評価）

#### 1-1. プロテインアレイの検出効率の最適化

検出シグナルのSN比の改善を目的に、血清検体とプロテインアレイの効率的な反応条件を検討した。血清にブロッキング材を添加して抗コムギヒトIgGを吸収することにより、コントロール抗原検出のCV値10%未満の目標に対して5.7%を達成した。

#### 1-2. プロテインアレイの性能評価及び細胞移植の安全性評価

約2万種のヒトタンパク質を、活性を維持したまま搭載したプロテイン・アクティブアレイを用いて、京都府立医大木下教授らと角膜内皮培養細胞移植患者血清検体、京大高橋教授らとiPS細胞由来神経細胞移植カニクイザル血清検体中の自己抗体の網羅的解析を実施した。何れも陽性抗体が検出され、その治療前後の検出強度の変動も評価でき、本アレイで生体の免疫応答が評価できることを確認した。特に後者に関してはヒトタンパク質搭載アレイでカニクイザル血清の抗体評価系が構築できた。また、網羅的アレイ解析での陽性抗原を搭載したELISA様式抗原結合プレートを作製し、多検体評価系を構築した。

### 研究項目 2: プロテインアレイによる移植細胞の品質管理（移植前の評価）

#### 2-1. 細胞プロファイリングによる移植細胞の品質管理系の構築

プロテインアレイを用いて、細胞抽出液中の酵素によるリン酸化反応を検出する技術を開発した。肝細胞分化誘導システム（タカラバイオ社）を用いて各分化段階の細胞を調製し、リン酸化活性プロファイリングを測定し、分化に特徴的なリン酸化活性の検出に成功した。

#### 2-2. 血清成分を利用した非目的細胞亜集団の選別

京都府立医大木下教授らと移植細胞の品質の違いを血清成分の染色によって区別する技術を開発している。H28年度はプロテインアレイを用いて、血中に含まれる培養角膜内皮細胞品質分別因子（抗体）の抗原探索を実施した。

### 2-3. 脱細胞マトリクス残存タンパク質の定量プロテオミクス

慶應義塾大八木講師らとの共同研究により、ブタ肝臓脱細胞マトリクスを用いて、質量分析用サンプル調製法を確立した。本法にて約 25 種類の脱細胞マトリクス残存タンパク質を同定した。

#### 研究項目 3：疾患・再生医療関連遺伝子クローンリソースの提供

阪大高倉教授らとの共同研究「Huvec から血管内皮幹細胞へのダイレクトリプログラミング因子の探索」にて、血管内皮幹細胞で発現が亢進しているマウス遺伝子 47 種類について、ヒトホモログ遺伝子を選出した。産総研-JBIC のリソースにて未取得であった 36 クローン中 28 クローンの作製を完了した。

また、京大井上教授らとの共同研究「神経変性疾患タンパク質が結合する受容体・GPCR・チャネル探索への cDNA リソースの供給」において、GPCR 遺伝子約 300 クローンを選出した。実験系の検証のために HcRed を融合した muscarinic 受容体の 4 つの発現クローンを作製し、供給した。

In 2015, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) and Japan Biological Informatics Consortium (JBIC) additively cloned about 1,500 clones of cellular system control genes and constructed the high density protein array system (14,000 proteins / array plate). In 2016, we have implemented functional proteomics analyses in regenerative medicine research. By using these technologies, we aim to support the safety of cell transplantation from pre-transplant to post-transplantation. The research and development contents are as follows.

#### Chapter I: Safety evaluation of cell transplantation by protein array (Evaluation after transplantation)

##### 1-1. Optimization of protein array detection efficiency

Efficient reaction conditions of serum samples and protein arrays were studied for the purpose of improving the S/N ratio of detection signals. By adding blocking material to serum to absorb anti-wheat IgG, we achieved 5.7% against the target of C/V value of less than 10% for control antigen detection.

##### 1-2. Performance evaluation of protein array and safety evaluation of cell transplantation

With Professor Kinoshita *et al.* in Kyoto Prefectural University of Medicine (KPUM), comprehensive analyses of autoantibodies in sera of patient transplanted corneal endothelial cultured cells were performed. With Prof. Takahashi *et al.* in Kyoto University, autoantibody analysis in serum of cynomolgus monkey transplanted neural cells derived from iPS cells was also done. Positive antigens were detected in both cases, and change in the intensity of antibody before and after the treatment could be evaluated. Especially for the latter, an antibody evaluation system for the serum of cynomolgus monkey could be constructed with our human protein array. In addition, antigen binding plate such as ELISA carrying antigens which were positive antigens in 1<sup>st</sup> screening with comprehensive protein array (about 20,000 proteins) were prepared, and a multi-analyte evaluation system was constructed. Then we were able to construct an evaluation system of multiple serum-samples with these plates.

#### Chapter 2: Evaluation of cell quality for transplantation by protein array (Evaluation before transplantation)

##### 2-1. Construction of cell quality evaluation system for transplantation by cell profiling

We developed a technology to detect phosphorylation by enzymes (kinases) in cell extracts on protein arrays and constructed phosphorylation activity profiling system. Cells at each differentiation stage were prepared using Cellartis Hepatocyte Diff Kit (TAKARA BIO inc.), phosphorylation activity profiling was

measured, and the phosphorylation activity characteristic of differentiation stage was successfully detected.

#### 2-2. Selection of non-purpose cell subpopulations using serum components

By collaborating with Professor Kinoshita *et al.* in KPUM. We have developed a technique to distinguish the quality difference of transplanted cells by staining of serum components.

#### 2-3. Quantitative proteomic analysis of proteins remaining in decellular matrix

By collaborating with Dr. Yagi in Keio University, we established a sample preparation method for mass spectrometry using porcine liver decellular matrix. Approximately 25 proteins of remaining decellular matrix were identified by this method.

### **Chapter 3: Construction and supply of clone resources of gene for diseases & regenerative medicine.**

By collaborating with Prof. Takakura in Osaka University, human homolog genes were selected for 47 mouse genes whose expressions were enhanced in vascular endothelial stem cells. We completed the preparation of 32 clones out of 36 clones that had not been acquired at our resources.

By collaborating with Professor Inoue in Kyoto University, approximately 300 clones of GPCR were also selected. For verification of experimental system, 4 expression clones of muscarinic receptor fused with HcRed were prepared and supplied.

### **Ⅲ. 成果の外部への発表**

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 8 件）

1. Matsui A, Fujimoto J, Ishikawa K, Ito E, Goshima N, Watanabe S, Semba K. Hepatocyte nuclear factor 1 beta induces transformation and epithelial-to-mesenchymal transition. *FEBS Lett.* 2016, 590, 1211-21.
2. Kawakami T, Ogawa K, Hatta T, Goshima N, Natsume T. Directed Evolution of a Cyclized Peptoid-Peptide Chimera against a Cell-Free Expressed Protein and Proteomic Profiling of the Interacting Proteins to Create a Protein-Protein Interaction Inhibitor. *ACS Chem Biol.* 2016, 11, 1569-77.
3. Kitazawa K, Hikichi T, Nakamura T, Mitsunaga K, Tanaka A, Nakamura M, Yamakawa T, Furukawa S, Takasaka M, Goshima N, Watanabe A, Okita K, Kawasaki S, Ueno M, Kinoshita S, Masui S. OVOL2 Maintains the Transcriptional Program of Human Corneal Epithelium by Suppressing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cell Rep.* 2016, 15, 1359-68.
4. Yamakawa T, Sato Y, Matsumura Y, Kobayashi Y, Kawamura Y, Goshima N, Yamanaka S, Okita K. Screening of Human cDNA Library Reveals Two differentiation-Related Genes, HHEX and HLX, as Promoters of Early Phase Reprogramming toward Pluripotency. *Stem Cells.* 2016, 34, 2661-2669.
5. Mannen T, Yamashita S, Tomita K, Goshima N, Hirose T. The Sam68 nuclear body is composed of two RNase-sensitive substructures joined by the adaptor HNRNPL. *J Cell Biol.* 2016, 214, 45-59.

6. Sugiyama Y, Yamashita S, Uezato Y, Senga Y, Katayama S, Goshima N, Shigeri Y, Sueyoshi N, Kameshita I. Phosphorylated TandemMBP: A unique protein substrate for protein phosphatase assay. *Anal Biochem.* 2016, 15, 47-53.
7. Hoshi H, Hiyama G, Ishikawa K, Inageda K, Fujimoto J, Wakamatsu A, Togashi T, Kawamura Y, Takahashi N, Higa A, Goshima N, Semba K, Watanabe S, Takagi M. Construction of a novel cell-based assay for the evaluation of anti-EGFR drug efficacy against EGFR mutation. *Oncol Rep.* 2017, 37, 66-76.
8. Matsumoto M, Matsuzaki F, Oshikawa K, Goshima N, Mori M, Kawamura Y, Ogawa K, Fukuda E, Nakatsumi H, Natsume T, Fukui K, Horimoto K, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakayama KI. A large-scale targeted proteomics assay resource based on an in vitro human proteome. *Nat. Methods.* 2017, 14, 251-258.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 脱リン酸化解析用タンパク質基質（リン酸化 TandemMBP）の開発，口頭，上里裕樹，山下翔，千賀由佳子，片山将一，五島直樹，茂里康，末吉 紀行，亀下勇，杉山康憲，第 57 回 日本生化学会 中国・四国支部例会，2016/5/28，国内。
2. Sam68 核内構造体は、HNRNPL アダプターを介して 2 つの RNase 感受性サブ構造体が融合してつくられる，ポスター，萬年太郎，山下征輔，富田耕造，五島直樹，廣瀬哲郎，第 39 回分子生物学会年会，2016/12/1，国内。
3. リンカー設計およびタンパク質翻訳過程の至適化による試験管内進化技術（cDNA ディスプレイ法）の改良と抗 VEGF-3 本指ペプチドの創製，ポスター，久保泰，Mohammed Naimuddin，多田耕平，大橋澄子，平家勇司，五島直樹，第 39 回分子生物学会年会，2016/12/2，国内。
4. 網羅的遺伝子発現解析による神経堤細胞への直接転換に関係する転写因子の同定，口頭，本橋力，渡邊奈月，河村徳人，中武悠樹，洪実，五島直樹，國貞隆弘，第 39 回分子生物学会年会，2016/12/2，国内。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 再生医療のための細胞システム制御遺伝子発現リソース，口頭，五島直樹，再生医療プログラム間連携のための情報交換会，2016/5/31，国内。
2. 再生医療のための細胞システム制御遺伝子発現リソース，ポスター，福田枝里子，鍵和田晴美，高坂美恵子，再生医療プログラム間連携のための情報交換会，2016/5/31，国内。
3. 生体防御系を解析し、体の状態をモニタリングする，ポスター，五島直樹，福田枝里子，鍵和田晴美，福井一彦，堀本勝久，テクノブリッジフェア関西 2016，2016/12/6，国内。
4. 再生医療におけるヒトタンパク質発現リソースの役割～分化誘導から移植免疫まで～，口頭，五島直樹，プロジェクト研究成果報告会，2016/12/9，国内。

5. プロテインアレイによるリン酸化活性のプロファイリング, ポスター, 鍵和田晴美、高坂美恵子, 福田枝里子, 五島直樹, 堀本勝久, LS-BT, 2017/1/31, 国内.

平成28年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名：再生医療実現拠点ネットワークプログラム／技術開発個別課題  
Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine/  
Projects for Technological Development

研究開発課題名：再生医療のための細胞システム制御遺伝子発現リソースの構築  
Construction of Resources for Cell System-control Gene Expression for  
Regenerative Medicine

研究開発担当者 所属 役職 氏名：  
一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム  
JBIC 研究所 部長 杉田奈巳  
General Manager, JBIC Research Institute, Japan Biological Informatics  
Consortium, Nami Sugita

実施期間：平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究開発課題名：  
iPS 細胞関連研究を加速するバイオリソースの構築と提供  
Construction and Supply of Clone Resources of Gene for Diseases & Regenerative  
Medicine

研究開発分担者 所属 役職 氏名：  
一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム  
JBIC 研究所 研究員 大槻和重  
Researcher, JBIC Research Institute, Japan Biological Informatics Consortium,  
Kazushige Ootsuki

## II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：国立研究開発法人産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター  
研究チーム長 五島直樹 総括研究報告を参照。

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

1. Kitazawa K, Hikichi T, Nakamura T, Mitsunaga K, Tanaka A, Nakamura M, Yamakawa T, Furukawa S, Takasaka M, Goshima N, Watanabe A, Okita K, Kawasaki S, Ueno M, Kinoshita S, Masui S. OVOL2 Maintains the Transcriptional Program of Human Corneal Epithelium by Suppressing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. Cell Rep. 2016, 15, 1359-68.
2. Yamakawa T, Sato Y, Matsumura Y, Kobayashi Y, Kawamura Y, Goshima N, Yamanaka S, Okita K. Screening of Human cDNA Library Reveals Two differentiation-Related Genes, HHEX and HLX, as Promoters of Early Phase Reprogramming toward Pluripotency. Stem Cells. 2016, 34, 2661-2669.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

無し

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 再生医療のための細胞システム制御遺伝子発現リソース，ポスター，福田枝里子，鍵和田晴美，高坂美恵子，再生医療プログラム間連携のための情報交換会，2016/5/31，国内.
2. 再生医療のための細胞システム制御遺伝子発現リソース，ポスター，大槻和重，東久美子，久保葉子，中村明日香，高坂美恵子，福田枝里子，鍵和田晴美，プロジェクト研究成果報告会，2016/12/9，国内.