

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine
Projects for Technological Development

研究開発課題名： (日本語) iPS 細胞・体性幹細胞由来再生医療製剤の新規品質評価技術法の開発
(英語) Development of a novel technique to evaluate quality for cell products used for regenerative medicine which were derived from iPS cells or somatic stem cells.

研究開発担当者 (日本語) 東京医科歯科大学大学院 教授 森尾友宏
所属 役職 氏名： (英語) Tomohiro Morio Professor, Tokyo Medical and Dental University
Graduate School of Medical and Dental Sciences

実施期間： 平成 28 年 04 月 01 日から平成 29 年 03 月 31 日

分担研究 (日本語) iPS 細胞及び体性幹細胞由来再生医療製剤の臨床普及に向けた微生物検査法の開発
開発課題名： (英語) Development of a novel method to examine microbes for cell and tissue derived products derived from iPS cells or somatic stem cells to be widely used for regenerative medicine

研究開発分担者 (日本語) 東京医科歯科大学 再生医療研究センター 准教授 清水則夫
所属 役職 氏名： (英語) Norio Shimizu Associate professor, Tokyo Medical and Dental University
Center for Stem Cell and Regenerative Medicine

分担研究 (日本語) iPS 細胞製剤の臨床普及に向けた遺伝的安定性検証系の開発
開発課題名: (英語) Development of quality control system for genetic stability of iPS

研究開発分担者 (日本語) 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子細胞遺伝 教授 稲澤譲治
東京医科歯科大学 難治疾患研究所 ゲノム解析室 助教 谷本幸介
所属 役職 氏名: (英語) Johji Inazawa Professor, Department of Molecular Cytogenetics, Medical Research
Institute, Tokyo Medical and Dental University
Kohsuke Tanimoto Assistant Professor, Genome Laboratory, Medical Research
Institute, Tokyo Medical and Dental University

分担研究 (日本語) 腫瘍化バイオマーカー遺伝子変異及び発現喪失の高感度検出
開発課題名: (英語) Highly sensitive detection of gene mutation and deletion.

研究開発分担者 (日本語) 東京医科歯科大学茨城県小児周産期地域医療学講座 准教授 高木正稔
所属 役職 氏名: (英語) Masatoshi Takagi Associate professor, Department of Pediatrics and Developmental
Biology, Tokyo Medical and Dental University

II. 成果の概要（総括研究報告）

I. 再生医療の普及に向けた微生物検査法の開発

ウイルス検査としては新たに、13ウイルス検出系として島津製作所よりキットとして上市された。研究分担者（清水則夫）はウイルス株や臨床検体を用いた解析を行い、1ウイルス毎の解析と同等の検出力を有することを明らかにしている。また再生医療に用いる様々な検体を解析し、個々に検出されやすいウイルスリストの策定を進めている。マイコプラズマ解析系については既に上市し、実検体等を用いた既存キットとの比較検討をほぼ終了した。今後PMDA等との相談を継続する。細菌・真菌の生菌解析系の完成が課題になっている。現在は培養法と比較を行い、PCR系では100CFU程度の感度で検出可能となっている。pre-mRNA (rRNA)の検出系を主体として開発しているが、日本薬局方記載の無菌試験バリデーション用菌種に対する検出感度試験・特異性試験・頑健性試験を継続して実施した。本検査系は今後キット化の予定であり、興味を示す企業と相談を継続的に進めている。

II. iPS細胞製剤の臨床普及に向けた遺伝的安定性検証系の開発

本研究においてはかずさDNA研究所小原博士と連動し、小原博士が開発する低頻度アレル変異定量系を導入して、実データの処理と解析を実施した。定量系については、平成28年度課長通知を受け、COSMIC Cancer Gene Census（以後COSMIC）+PMDA柴田リストを融合した、造腫瘍性関連遺伝子パネルを新たに構築した。解析した検体は、NWプログラム古閑グループから供給された2名のドナーからのiPS細胞及び分化細胞である。具体的にはNKT細胞、NKT細胞由来iPS細胞、同iPS細胞由来NKT細胞を1つのラインとして、それぞれの元細胞、増幅細胞にて解析した。合計12サンプルの次世代シーケンサー解析（分子バーコーディングを付与した解析）はかずさDNA研究所にて実施し、東京医科歯科大学にて低頻度アレル検出解析を行った。1名のドナー（PBMC由来）のNKT-iPSの増幅においてRAD51 IVS及びEP300のcoding regionで変異細胞の増幅が認められたが、同一NKT-iPS→iPS-NKTとする段階で両者は消失しており、一方iPS-NKTの増幅過程でEP300の変異が出現した。造腫瘍性関連遺伝子のキャプチャーにおいては、偽遺伝子の存在及び、重複（類似）配列を有する遺伝子の存在がマッピングの質に大きく影響する。EP300はBLAST解析において、他遺伝子との重複配列を有する代表的な例である。いずれにせよ、最終的な頻度算定においては、元のライブラリーに戻って検証する必要がある。またEP300のような遺伝子においてはlong readにて検証する必要があることが明らかになった。本年度はまた山口大学（高見先生）から骨髄細胞及び培養間葉系幹細胞の提供を受け、2ドナーにおいて造腫瘍性関連遺伝子の定量解析を実施した。バーコードが付与され、同領域が3回以上読まれたもの($r \geq 3$)で、同一遺伝子が200回以上解析されたものは90%程度であった。元細胞と分化細胞の比較では、 $r \geq 3$ で解析されたものでは、有意な変異を認めなかった。これらは、AMED「染色体構造異常、造腫瘍性関連遺伝子解析の効率的なパイプラインの構築と、社会実装に向けたゲノム解析標準手法及びゲノム評価基準案の策定に関する研究」と連動して実施した。

また派生的な課題として、メチル化CDKN2 (P16)の定量解析系に続いて、がん抑制遺伝子である*TP53*遺伝子を標的とし欠失を同定するデジタルPCRに検査系を確立した。希釈系列実験からは1%頻度の*TP53*欠損細胞を検出できる可能性が示唆されたが、解析ドロップレットを増やす必要がある。変異蓄積系についてはKRAS変異iPS細胞のP0, P40, P70検体で検討した。それぞれのパスセージでそれぞれ115,875、113,820、113,019の数のバリエーションが検出され、PDL40またはPDL70時点で新たに獲得されたものは12,506であった。検出されたバリエーションのallele frequencyの経時変化から、一定速度で増殖する集団だけでなく、増殖の停止や消滅した細胞の存在も示唆された。

(English version)

1. Development of novel technique for detection of microbes in cells used for regenerative therapy

A detection kit for 13 viruses including herpes species was developed in TMDU and Shimazu and was commercialized. Dr. Norio Shimizu, a member of this project, has analyzed the detection limit, reliability, and other measures using each virus strain and clinical samples, and found the equal detection potential of the multiplex PCR system in comparison to the PCR system for each virus. We continued to examine cell products from various institutes and are to generate a list of viruses that can be detected and should be tested. Mycoplasma detection kit was already available; and we have finished comparative test using clinical samples and with currently available Mycoplasma detection systems. We are in a process of developing a realtime PCR system for rapid detection of live bacteria and fungi that quantitate pre-mRNA for rRNA. At present, in comparison with a surface plate method, the detection limit is 100CFU in the PCR system. We continued to perform various tests for species used in the validation of sterility test described in the Japanese pharmacopoeia. The system is to be developed as a commercialized kit; and we had several occasions of discussion with a company interested in this system.

2. Development of system to evaluate genetic stability of iPS cell derived product

Our team at TMDU introduced the barcode-based quantification system of rare mutation developed by Dr. Ohara at Kazusa DNA Research Institute (KDRI) and have analyzed the NGS data with our error-free mutation detection pipeline. In 2016, we re-designed the capture panel for about 600 genes listed in COSMIC Cancer Gene Census + PMDA Shibata list, and evaluated 12 samples provided by Dr. Koseki at RIKEN. The samples are NKT cells, NKT-cell derived iPS cells, and NKT cells differentiated from the NKT-iPS cells from two different donors. Each cells were amplified: and the original as well as expanded cells were subjected to barcode based NGS. The NGS was run at KDRI and the subsequent analysis was done at TMDU. Amplification of cells with two different potentially acquired mutations was detected at expanded NKT-iPS cells. One was in RAD51 IVS and the other was in a coding region of EP300. The former mutation was undetectable in NKT-iPS derived NKT cells; while the latter remained detectable at the iPS-derived NKT cells though in less frequency. The capture system itself harbors several issues to be solved. One is the wrong alignment due to the presence of pseudogene or similar sequences in other genes. One example is EP300; and BLAST search identifies more than five similar regions in other genes. At any event, re-evaluation of the frequency in the original pool (before the capture) is mandatory for precise estimation of the mutation frequency; and long-read sequencing would be required for elimination of mal-alignment issue. We also evaluated the MSCs derived from bone marrow mononuclear cells that were provided from Dr. Takami at Yamaguchi University. We did not detect any additional mutation in genes listed at the COSMIC/Shibata list in two different samples (total of four samples)

In this project, we have already established a digital PCR system to detect methylated CDKN2. We developed, this year, digital PCR system to quantitate the loss of TP53. At present, with serial dilution system, the detection limit is approaching to 1%, requiring more droplet counts to increase to ensure <1% detection limit. Accumulation of gene mutation in one cell leads to cancer development; and thus detection of multiple mutation in single cell population is important. iPS cell with known GOF KRAS mutation were expanded; and the gene mutation was evaluated at P0, P40, and P70. We detected more than 100,000 variants at each passage, and >10,000 additional new mutations at P40 or P70 stages. Mathematical model showed the presence of cells with growth potential as well as the cells that disappeared or stopped proliferation upon gene mutation accumulation.

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 3 件）

1. Nakano S, Sugita S, Tomaru Y, Hono A, Nakamuro T, Kubota T, Takase H, Mochizuki M, Takahashi M, Shimizu N. Establishment of Multiplex Solid-Phase Strip PCR Test for Detection of 24 Ocular Infectious Disease Pathogens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017, 58(3), 1553-1559.
2. Inazawa N, Hori T, Nojima M, Saito M, Igarashi K, Yamamoto M, Shimizu N, Yuto Y, Tsutsumi H. Virus reactivations after autologous hematopoietic stem cell transplantation detected by multiplex PCR assay. *J. Med. Virol*. 2017, 89(2), 358-362.
3. Inazawa N, Hori T, Yamamoto M, Hatakeyama N, Yoto Y, Nojima M, Yasui H, Suzuki N, Shimizu N, Tsutsumi H. HHV-6 encephalitis may complicate the early phase after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Detection by qualitative multiplex PCR and subsequent quantitative real-time PCR. *J Med Virol*. 2016, 88(2), 319-23.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

【国内招待講演】

1. 微生物の迅速検査法の開発と遺伝子検査への応用，口頭，清水則夫，第 25 回日本脳ドック学会総会，2016/06/09～10，国内.

【国内学会発表】

1. ゲノム解析技術を用いた品質・安全性管理の今後の課題，口頭，森尾友宏，日本環境変異原学会第 45 回大会，茨城，2016/11/18，国内
2. 移植医療応用のためのヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製と品質評価，口頭，高山和雄，秋田尚毅，関口清俊，森尾友宏，小原 収，櫻井文教，水口裕之，第 16 回日本再生医療学会学術集会，山形，2017/03/07 国内.
3. 環境モニタリングを活用した細胞培養加工施設の運用管理，ポスター，辻彩子，藤井静花，孫敏華，須藤絵里，子グレース，緒方勇亮，岡崎拓矢，片野尚子，水野満，赤澤智宏，関矢一郎，森尾友宏，第 16 回日本再生医療学会学術集会，山形，2017/03/07，国内.
4. ウイルススパイク試験法と迅速無菌試験法の開発，口頭，清水則夫，第 17 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム，2017/01/28，国内.
5. 眼感染症網羅的迅速検査「Direct PCR strip 検査」高速化，口頭，中野聡子，外丸靖浩，杉田直，中室隆子，高瀬 博，久保田 敏昭，清水則夫，第 70 回日本臨床眼科学会，2016/11/3～6，国内.
6. EBV 潜伏感染遺伝子 mRNA の網羅的定量による EBV 関連疾患の迅速診断，口頭，渡邊 健，今留謙一，外丸靖浩，小島尚美，森尾友宏，清水則夫，第 13 回 EB ウイルス研究会，2016/07/09，国内.
7. EB ウイルスゲノムコピー数の簡単迅速定量系の構築，口頭，外丸靖浩，渡邊 健，清水則夫，今留謙一，第 13 回 EB ウイルス研究会，2016/07/09，国内.

8. DNA 精製不要の眼感染症網羅的迅速検査「Direct PCR strip 検査」の開発, 口頭, 中野聡子, 外丸靖浩, 杉田直, 高瀬博, 中室隆子, 久保田敏昭, 清水則夫, フォーサム 2016 東京(第 53 回日本眼感染症学会), 2016/07/01~03, 国内.
9. 眼感染症網羅的迅速検査「Strip PCR」が有用であった梅毒性ぶどう膜炎の 1 例, 口頭, 中室隆子, 中野聡子, 阿部真保, 杉田直, 寶野阿佑美, 外丸靖浩, 高瀬博, 清水則夫, 久保田敏昭, フォーサム 2016 東京(第 53 回日本眼感染症学会), 2016/07/01~03, 国内.
10. 眼感染症網羅的 PCR strip 検査を用いた新しい眼感染症診断, 口頭, 中野聡子, 杉田直, 外丸靖浩, 中室隆子, 横山勝彦, 久保田敏昭, 高瀬博, 清水則夫, 第 10 回西日本オキュラーサーフェスクラブ, 2016/04/02, 国内.

【国際学会発表】

1. Establishment of a new comprehensive polymerase chain reaction (PCR) strip kit to diagnose infectious eye diseases. 口頭, Nakano S, Sugita S, Tomaru Y, Nakamuro T, Takase H, Shimizu N, Mochizuki M, Kubota T. ARVO 2016 Annual Meeting. May 1-5, 2016, Seattle.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当無し

(4) 特許出願

該当無し

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 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
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine
Projects for Technological Development

研究開発課題名： (日本語) iPS 細胞・体性幹細胞由来再生医療製剤の新規品質評価技術法の開発
(英語) Development of a novel technique to evaluate quality for cell products used for
regenerative medicine which were derived from iPS cells or somatic stem cells.

分担研究開発課題名： (日本語) iPS 細胞・体性幹細胞製剤の遺伝的安定性検証のための解析パイプ
ラインの開発
(英語) Development of quality control pipeline for validation of genetic stability of
iPS cells and somatic stem cells

研究開発担当者 (日本語) 副所長 小原 収
所属 役職 氏名： (英語) Deputy Director, Osamu Ohara

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

これまで解析に用いてきた異常増殖能獲得及びゲノム不安定性に関わる 596 種類の遺伝子パネルに代わり、再生医療関係者の議論の結果に従って、これまで選択していたいくつかの遺伝子に加えて Cosmic Census Gene Panel (<http://cancer.sanger.ac.uk/census/>) に依拠した新しい造腫瘍性遺伝子パネルをデザイン・作製した。この新規に作製された造腫瘍性遺伝子パネルとイルミナ社の次世代シーケンサーを用い、これまでに開発したプロトタイプのデュアル分子バーコード法によって、解析対象となった細胞集団における 0.1% (1000 細胞中の 1 細胞が有する変異までも検出) 程度の低頻度変異まで検出する実験条件を設定し、実際に希釈系列ゲノム DNA の解析によって内部標準として用いた 0.5% の既知 KRAS 変異が検出できることを確認した。このソフトウェアに依存しない計測法の改良による解析精度をさらに上げるため、人為的なエラーを生じるプロセスを再度洗い出し、それらに起因するエラーを除去するデータ解析パイプラインを構築した。このパイプラインを基礎として、経済的なシングル分子バーコード法で分化前後あるいは継代数の異なる iPS 細胞検体 18 種類、体性幹細胞検体 6 種類を解析し、低頻度体細胞変異の検出データを蓄積し、東京医科歯科グループにデータ提供するとともに、将来のこの解析系の社会実装に向けた分子バーコード法を用いた一次データ解析パイプラインの検討を進めた。

低頻度体細胞変異検出・染色体異常検出等のゲノム情報解析を、社会実装が可能なコストで提供できるパイプラインを創出することを最終目標として、次世代シーケンシングによる仮想的カリオタイピングモジュール、これまでに開発してきた「集合知」型の体細胞変異解析モジュールと分子バーコード法での変異検出モジュール、分子バーコード法によって見出された低頻度体細胞変異の確認モジュールなどのパイプライン化を進めた。また、今後の少数検体での解析にも対応できるように、短時間で結果が得られる HiSeq1500 以外の小規模なシーケンサーによる解析パフォーマンスの検討を行い、さらに検出された体細胞変異候補が統計的にも有意であるかどうかを実験的に確認するための単一遺伝子特異的プライマーを用いる変異確認系を構築した。

さらに、生じたゲノム構造変化が機能に与える影響を評価する最終目的に向けて、東京医科歯科大学を経由して分与された、上述のゲノム解析を実施したのと同じ分化前後の 14 種類の iPS 細胞の RNA シーケンシングによる発現プロファイル解析を実施し、遺伝子発現プロファイルによる細胞状態データの蓄積を進めた。

English Version

In this fiscal year, we designed and prepared a new biotinylated capture probe pool for enrichment of protein-coding exon sequences of genes listed in COSMIC cancer genes census panel (<http://cancer.sanger.ac.uk/census/>) and suggested by a group of the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency in Japan. Using this new gene panel and an Illumina HiSeq1500, we first examined the performance of this new gene enrichment system including a new bioinformatics pipeline for detection of low-frequency somatic mutation by dual “molecular-barcoding” technology, also known as “duplex sequencing” (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2012, 109(3):14508). In these preliminary experiments, we successfully confirmed the dual “molecular-barcoding” system enabled us to detect a low-frequency somatic mutation without interference of sequencing artifacts. However, because we came to notice some additional sources of artificial errors of somatic variant calling mainly because of mapping errors, we tried to develop a new pipeline to solve this problem. To accumulate more sequencing data of iPS cells/somatic stem cells before/after differentiation, and/or after increasing the passage number of cell culture, we run economical single “molecular-barcoding”

sequencing and analyzed the data in a collaboration framework with Dr. Morio's group at Tokyo Medical and Dental University (TMDU).

The second aim of our project is to develop an affordable experimental pipeline for social implementation of the quality control platform of cell products used for regenerative medicine which were derived from iPS cells and/or somatic stem cells. Toward this end, we made effort to seamlessly combine the following modules; library construction for next-generation sequencing (NGS) library with molecular barcode, virtual karyotyping by NGS, a "collective wisdom"-type bioinformatics module for detection of somatic mutation, an experimental variant detection module based on the molecular-barcoding technology, and an experimental validation module for candidates of ultra-low-rate somatic mutation. In these efforts, we also evaluated the performance of mutation detection based on the molecular-barcoding technology on a NextSeq500 sequencer, a short-read next-generation sequencer smaller than an Illumina HiSeq1500 and developed validation protocols of detected candidate of somatic mutation by using a single gene-specific primer and the original NGS library.

As the last step of evaluation of impact of detected somatic mutation(s), we accumulated the data of mRNA profiles of 14 iPS cells before and after differentiation, which were provided through TMDU and also examined by somatic mutation in this project, by RNA sequencing.

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 1 件、国際誌 0 件）

1. 齊藤大助、須山幹太、小原收、再生医療・細胞治療のための細胞加工物評価技術 第9章 次世代シーケンシングによる細胞のゲノム安定性評価、2016、シーエムシー出版 pp86-97.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 移植医療応用のためのヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製と品質評価、ポスター発表、高山和雄、秋田尚毅、関口清俊、森尾友宏、小原收、櫻井文教、水口裕之、第16回日本再生医療学会総会、仙台国際センター会議棟・展示棟、2017年3月 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし