

サービス紹介



C3 チェックサービス

aCGH for Cultured Cells Check Service

培養工程（継代）における品質評価用アレイCGH法解析

【目的】

長期間培養を継続する際、それに伴う細胞の形質変化、ゲノム構造変化などの有無を調べることは再生医療へ臨床応用する上で非常に重要である。また、間葉系幹細胞は世界的にみて再生医療が先行して進んでいる。我々はアレイCGH解析を用いて、間葉系幹細胞に特化した品質評価の検討を行った。

癌関連遺伝子領域のコピー数異常を精度良く判別できるカスタムチップの開発、高解像度で個々の遺伝子レベルでのゲノム異常検出を可能にするプロトコルの構築を試みた。

【方法】

再生医療等製品の製造における品質評価では、最終製品の造腫瘍性の評価と管理が重要な課題となっていることから、癌関連遺伝子のコピー数異常が高精度に検出できるプローブデザインが望ましい。

そこで我々は既存のカタログアレイ (Agilent社SurePrint G3 Human CGH マイクロアレイ 8 x 60K) 上のプローブをベースにし、最新のデータベースから癌関連遺伝子 1376個を選択し、これらの遺伝子上に高密度にプローブを配置したカスタムアレイを新たに作製した。実験条件の最適化及び、データ解析について、様々な検討を行った。

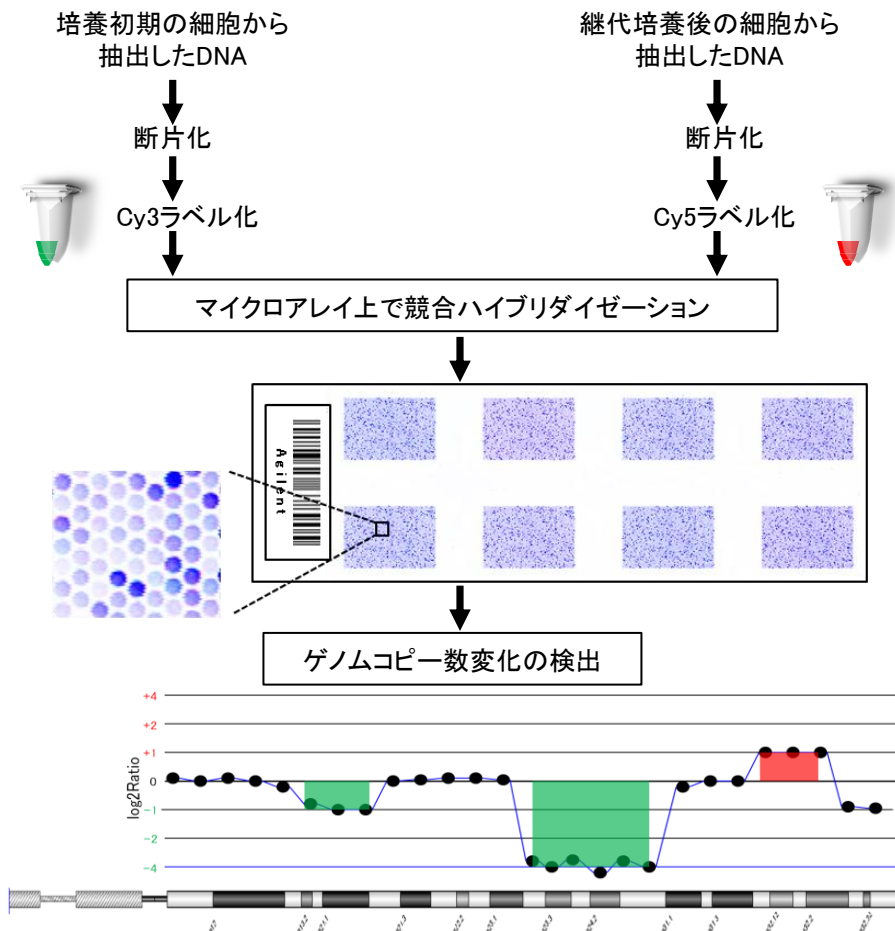


図1 C3チェックサービスの実験手順

【結果及び考察】

カスタムアレイは既存カタログアレイと比較して、同じ実験条件で再現性のあるデータが得られることがわかった。

我々は、間葉系幹細胞、骨髄幹細胞、軟骨細胞、胚性幹細胞、等様々な培養細胞で培養工程（継代）の比較を検討し、培養細胞に適したアルゴリズムの閾値、cut offの閾値、フィルターの設定値を決定した。またDye Swap（色素入れ替え検証）を実施し、擬陽性・擬陰性確認を行った。

図2に培養工程（継代）における品質評価用アレイCGH法解析結果の例を示す。胚性幹細胞の例では、通常のGバンド分染法では検出困難な1.3メガベースの欠失が検出されている。

本成果は、再生医療分野の研究開発における安全性・安定性のための重要な手法の1つとして用いられることが期待される。

【今後の展開】

平成27年10月より「C3チェッカーサービス」（aCGH for Cultured Cells Check Service）という名称で、品質評価用アレイCGH解析受託サービスを開始した。今後は検査対象の適用範囲を間葉系幹細胞だけではなく、ES細胞（胚性幹細胞）やiPS細胞（人工多能性幹細胞）に拡充していく計画である。

共同研究者の東海大学医学部 外科学系整形外科学 横山美由希先生、佐藤正人教授の本原理を応用した論文“Assessment of the Safety of Chondrocyte Sheet Implantation for Cartilage Regeneration.”がacceptされました。
TISSUE ENGINEERING: Part C
Volume 22, Number 1, 2016

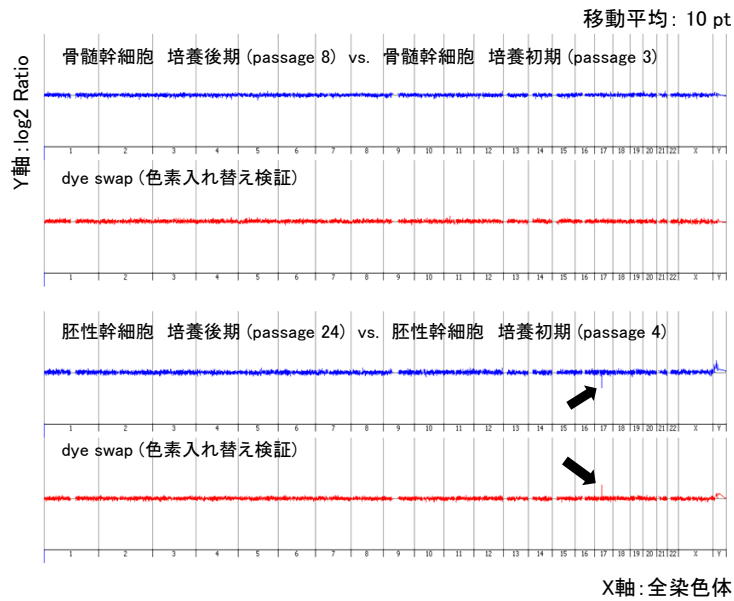


図2 培養工程（継代）における品質評価用アレイCGH法解析結果例

表1 核型解析（Gバンド分染法）とアレイCGH法の比較

	核型解析 Gバンド分染法	アレイCGH
細胞の量	1×10の6乗～3×10の6乗	1×10の5乗以上
解析	in vitro 20細胞の染色体を解析	in vitro 細胞から抽出したDNAを網羅的に解析
解像度	低解像度 (Mb)	高解像度 (Kb)
長所	5-10Mbの染色体の欠失、転座を判定	数Kbの微細な領域も判定可能 250ngのDNA量からスタート可能 8%の違いも判定可能
短所	微細な(5Mb以下)転座・逆位は分からない (FISH解析を行えば判別可能)	転座・逆位は分からない

本サービスは、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）「再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システムの開発」プロジェクトの成果になります。