

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

細胞・組織加工医薬品・医療用具の品質等の確保に関する
研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 早川堯夫

平成14(2002)年4月

目次

I. 総括研究報告	
細胞・組織加工医薬品・医療用具の品質等の確保に関する研究	————— 1
早川堯夫	
II. 分担研究報告	
1. 細胞・組織加工医療用具の品質評価技術に関する研究	————— 9 3
土屋利江	
2. 細胞・組織加工医薬品等の安全性等に関する研究	————— 1 3 2
山口照英	
3. 細胞治療薬の新規体内動態解析技術の開発研究	————— 1 7 2
川西 徹	
4. 細胞・組織加工医薬品・医療用具の品質等の確保に関する基盤研究	————— 1 8 6
川崎ナナ	
5. 細胞・組織加工医薬品・医療用具の品質等の確保に関する基盤研究	————— 2 0 2
新見伸吾	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	————— 2 1 0
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

細胞・組織加工医薬品・医療用具の品質等の確保に関する研究

主任研究者 早川堯夫 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部・部長

【研究要旨】 細胞・組織加工医薬品等の品質や安全性等の確保のための基盤技術開発を目的として、以下のような研究を行った。(1) ウイルス等の感染性危険因子の高感度検出のための基盤技術の開発や評価方法に関する研究として、ポリエチレンイミン磁気ビーズ及びスルホン酸磁気ビーズを用いたウイルス濃縮技術に関する詳細な検討を行った。ポリエチレンイミン磁気ビーズは、主としてエンベロープウイルスに対して優れたウイルス濃縮効果を示すこと、また100倍から1000倍の濃縮効果が得られるとともに検出限界の大幅な高感度化が可能であることを見出した。また、複数のウイルスを同時に濃縮可能なことも明らかにした。一方、スルホン酸磁気ビーズは非エンベロープウイルスの濃縮にも適応可能であり、検出限界の高感度化も可能であった。これらのウイルス濃縮法は、遠心操作も必要なく短時間の操作でウイルスを濃縮することができるもので、簡便性・迅速性にも優れており、これらの濃縮法を組み合わせることにより、ウイルス検出のためのNATの高感度化が可能であることが示された。(2) 染色体解析による細胞の同一性・純度・遺伝的安定性評価技術の開発を目指して、モデル細胞としてHL-60細胞及びその亜株である高増殖性HL-60RG細胞を用いて検討した。G-バンド染色、マルチカラー-FISH (m-FISH)、CGH法を組み合わせた染色体解析により、HL-60RG細胞では、9番染色体9q13部位に8番染色体の一部が挿入されていることを昨年見出したが、c-mycプロンプとG-バンド解析を組み合わせることにより第8染色体のc-mycを含む領域が増幅して第9染色体に挿入されていることを明らかにした。以上の結果より、G-バンド解析、CGH解析、m-FISH解析、オンコ遺伝子FISH解析を組み合わせることにより、細胞の遺伝的変異を検出するのに非常に有用であると考えられた。(3) 細胞由来タンパク質プロフィールを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発として、モデル細胞を用い、培養上清に分泌される増殖因子等を濃縮し、イモビラン2次元電気泳動法により2次元上で分離したスポットを質量分析により解析する方法を確立した。さらに、キャピラリーLC/MSによる目的タンパク質の構造解析法は、細胞治療用細胞の品質評価法として有用であることが確認された。(4) 細胞・組織のがん化を予測する評価技術の開発に関する研究の一環として ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子(hTERT)のプロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子とをつないだレポーター遺伝子を作製し、正常細胞および様々ながん細胞株におけるhTERTプロモーターの転写活性化能について評価した。その結果、がん細胞特異的にレポーター遺伝子の活性化が起こることが確認され、その有用性が確認された。(5) 細胞等による望ましくない免

疫反応の検出技術開発に関する研究の一環として、修飾ポリウレタンをコートした免疫隔離膜が非特異的な免疫反応を防ぐことが明らかになり、液性免疫の影響を評価する上で有用であることが示唆された。(6) 細胞由来目的タンパク質の体内動態の新規評価法として、目的タンパク質に Fluorescein 誘導体 FIAsh 反応性のタグペプチドを結合させる方法を開発するとともに、モデルタンパク質として TNF- α にタグペプチドを導入してもその細胞からの分泌性や生物活性が保持されていることが確認された。(7) 幹細胞や前駆細胞を素材とする細胞・組織加工医薬品等の製造過程における品質・安全性確保技術や製品の評価方法に関する研究として、ヒト末梢血幹細胞及び臍帯血 AC133 細胞を用いた血管内皮細胞への分化誘導系を確立し、その分化誘導初期に出現する CD31 強陽性細胞が血管内皮への分化能を持つことを見出し、CD31 の発現が血管内皮分化能をもつ細胞の優れた特性指標となることを見いだした。また、肝幹細胞と細胞治療への応用が期待されている小型肝細胞の特性指標解析を行い、アネキシン III が有用な指標となる可能性が見出された。さらに、細胞培養におけるスカフォールドの生分解性ポリマーのラット及びヒト軟骨前駆細胞の分化・増殖に対する影響を調べたところ種間で異なる作用をもつことを見出した。この結果より、組織工学利用医療用具の評価を行う上で、動物モデルでの結果をヒト臨床効果の予測に利用するときは、その作用が種間で異なる可能性を考慮する必要性が示唆された。

分担研究者
 土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所
 部長
 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所
 室長
 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所
 室長
 川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所
 室長
 新見 伸吾 国立医薬品食品衛生研究所
 室長
 協力研究者
 佐藤 功栄 埼玉県赤十字血液センター
 室長
 掛樋 一晃 近畿大学薬学部
 教授
 白幡 実隆 九州大学大学院農業研究科
 教授

吉原なみ子 国立感染症研究所
 室長

A. 研究目的

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や再生医学の技術的進歩により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治療に用いる細胞・組織加工医薬品・医療用具（細胞・組織加工医薬品等）の開発が急速に進んでいる。このように細胞や組織を医療に用いることができれば、ガン、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞などの致死的な疾患、あるいは糖尿病、リウマチ、骨粗しょう症、重篤な肝疾患、神経疾患、熱傷、創傷等に対してきわめて有効な治療法になる可能性が高い。本邦においても、様々な形での細胞・組織加工医薬品等の開発が進められ

ているところであるが、本格的な実用化に至るためには検討すべき課題が多い。

本研究では、細胞・組織加工医薬品等の品質、安全性等を確保するために、1)ウイルス等の感染性危険因子を排除するための基盤技術の開発や評価方法に関する研究、2)多重標識FISH等を利用した染色体解析による細胞の同一性・純度・遺伝的安定性評価技術の開発研究、3)細胞由来タンパク質プロフィールを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発、4)細胞・組織のがん化を予測する評価技術の開発に関する研究、5)細胞等による望ましくない免疫反応の検出技術開発に関する研究、6)細胞・組織由来目的生理活性タンパク質の新規体内動態解析法の開発研究、7)幹細胞や前駆細胞を素材とする細胞・組織加工医薬品等の製造過程における品質・安全性確保技術や製品の評価方法に関する研究などを行う。

本年度は、1)核酸増幅法(NAT法)によるウイルス検出の高感度化を目指したウイルス濃縮法の開発とウイルス除去技術の開発、2)染色体解析による細胞の同一性・純度・遺伝的安定性評価技術の開発の基礎検討として、G-バンド解析、c-mycプローブを用いたFISH解析を組み合わせた染色体解析の有用性についての検討、3)細胞由来タンパク質プロフィールを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発の基礎として、イモビラン2次元電気泳動法による細胞培養上清の高解像度分離とペプチド・マス・フィンガープリンティング(PMF)を用いる細胞由来タンパク質プロフィールの解析手法に関する研究、細胞由来微量生理活性物質の構造解析や

翻訳後修飾による糖鎖の不均一性に関する迅速・高感度解析法として、キャピラリーLC/MSの有用性についての解析、4)細胞・組織のがん化を予測する評価技術の開発に関して、昨年度作製したヒトテロメラーゼ発現を制御する新規レポーター遺伝子の有用性についての詳細な検討、5)陰イオン性修飾ポリウレタンでコートした免疫隔離膜の性能についての検討、6)細胞・組織由来目的生理活性タンパク質の新規体内動態解析法としてのFlAsH[4',5'-bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl) fluorescein]の有用性についての検討、7)幹細胞や前駆細胞を素材とする細胞・組織加工医薬品等の製造過程における品質の評価方法に関して、生分解性ポリマーの細胞・組織等に及ぼす影響についての検討や、ヒトAC133陽性細胞の血管内皮細胞への誘導とその特性解析等を行った。

B. 研究方法

1. ウイルスのポリエチレンイミン及びスルホン酸磁気ビーズによる濃縮

ポリエチレンイミン磁気ビーズは、カルボキシル基を持つ磁気ビーズを、水溶性カルボジイミド存在下、平均分子量10,000のポリエチレンイミンをカップリングして作製した。同様にスルホン酸基の導入は、デキストラン硫酸を磁気ビーズに結合させて行った。

通常の実験では、100 μ l (5mgの磁気ビーズを含む)のポリエチレンイミン溶液を種々の濃度のウイルス液1mlないしは10mlに添加した。10分後に、磁気ビーズを含む懸濁液を磁性スタンドにセットし、10分間静置した。10分後、上清を分取し、

磁気ビーズを含む残液 100 μ l 及び磁気ビーズを添加する前のウイルス液 100 μ l の各液にウイルスゲノム抽出液 (EX-R&D、ゲノムサイエンス社) を加え、添付プロトコールに従ってウイルスゲノムを抽出した。

2. PCR 及び RT-PCR

抽出した DNA ウイルスゲノムの検出は、表 1 のプライマーの組み合わせを用いて 94 $^{\circ}$ C、30 秒、56 $^{\circ}$ C、45 秒、72 $^{\circ}$ C、60 秒を 35 サイクルする PCR 反応を行った。RNA ウイルスの場合には、抽出したウイルスゲノム全量を TE 液に溶解後、トリウイルス逆転写酵素を用いて 42 $^{\circ}$ C、45 分間の cDNA の合成を行った。合成した cDNA を上記と同様の PCR 反応を行い、増幅した。増幅産物は、アガロース電気泳動を行い、エチジウムブロミドないしはサイバークリーンによる染色後、目的バンドを確認した。

抽出したウイルスゲノムを定量するためにリアルタイム PCR 及びリアルタイム RT-PCR 反応を行った。用いたプライマーとプローブのセットは表 2 の通りである。プローブの記載されていないウイルスゲノム検出には、サイバークリーンを用いて定量した。

3. ウイルスの感染価の測定

ウイルス感染価は、それぞれ指向性のある細胞を用いて行った。Herpes Simplex virus、Polio virus、Visicular Stomatitis virus、Sindbis virus は Vero 細胞を用いて、Porcine Parvo virus は ESK 細胞を用いて、SV-40 virus は CV-1 細胞を用いて感染価を調べた。

4. ポリエチレンイミン 6 MB セファロー

スカルムによるウイルス除去

平均分子量 10,000 のポリエチレンイミンを BrCN 活性化セファロー 6 MB に固相化し、細胞懸濁液に各種モデルウイルスをスパイクし、ウイルス除去能の検討を行った。

5. G-バンド染色

HL-60 細胞及び HL-60RG 細胞を、10 μ g/ml コルセミド存在下に 1.5 時間培養した後、遠心して細胞を集めた。沈殿した細胞を、10ml の 0.075M KC1 低張液に懸濁し、30 分間静置した。カルノア液を 5ml 重層して転倒混和した。遠心して細胞を集め、15ml のカルノア液を添加した。再び遠心し、カルノア液での洗浄を上清が透明になるまで数回繰り返して細胞を固定した。この固定した細胞浮遊液を、スライドガラスの上に滴下し、火焰固定し染色体をスライドガラスの上に展開させた。染色体標本を、70 $^{\circ}$ C、1-3 時間処理した後、キナクリンマスタード染色液に 10 分間浸潤し染色した。染色したスライドを水洗した後、顕微鏡下で、G-バンドの観察を行った。

6. CGH 染色

ヒト正常 2 倍体細胞由来ゲノム DNA と、HL-60 細胞及び HL-60RG 細胞由来ゲノム DNA 各々 1 μ g を、DNA ポリメラーゼ及び DNase I 存在下、Sepctrum Green-dUTP または Spectrum Red-dUTP によるニックトランスレーションによるゲノム DNA の標識を行った。標識した、ヒト正常 2 倍体細胞由来ゲノム DNA と HL-60 細胞あるいは HL-60RG 細胞由来ゲノム DNA を Cot-I DNA 存在下に混合しプローブ液を作成した。一方、G-バンドの項で記載したのと同じ方法で

調製したヒト正常 2 倍体細胞由来染色体標本を、ホルムアルデヒド存在下、染色体 DNA を処理した後、熱変性させた。この熱変性させたスライド標本に、プローブ液を載せ、37°C、3-5 日間恒温槽内でハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、蛍光顕微鏡下で観察した。

7. m-FISH 染色

スライドガラスに展開・固定した HL-60 細胞及び HL-60RG 細胞の染色体標本を、2%NP-40 を含む 2X SSC 溶液に浸潤し、37°C、30 分間、静置した。スライドを、70%、85%、100%エタノールに段階的に浸潤し、脱水した。70%ホルムアルデヒドを含む 2X SSC 液に浸潤し、75°C、5 分間変性させた。さらに、先ほどと同様のアルコール系列を用いて脱水し、風乾した。マルチカラープローブを重層し、2 分間、45°Cに清置し、ハイブリダイゼーションを行った。

8. 培養上清の調製

HL-60RG 細胞を ASF104 (AJINOMOTO 社)中に 5×10^6 cells/ml に懸濁し、37°Cで 3 日間培養し(終濃度約 2×10^8 cells/ml)、上清を得た。上清 200ml を Sartorius 社製、限外ろ過装置(分画分子量 10,000)を用いて 2ml にまで濃縮した。濃縮液を、Isogen (和光純薬)を用いてたんぱく質を沈殿させ、塩等を除いた。各沈殿たんぱく質を、イモビランの 1 次元電気泳動用溶解液に懸濁し、不溶性物質を 100,000rpm の超遠心により除いた。

9. 2次元電気泳動による解析

1 次元目の等電点電気泳動には、Immobiline pH3-10NL (Amersham Pharmacia 社)を用いた。2次元目の

SDS-PAGE には、10-20%のグラジエントゲル(バイオクラフト社)を用いた。タンパク質の染色は Amersham Pharmacia 社の銀染色キットを使用した。質量分析用試料を調製する際は、泳動後、ゲルをクマジーブリリアントブルーで染色して各スポットを同定した。

10. 二次元電気泳動で分離した各スポットのトリプシンによるゲル内消化

ゲルからスポットを切り出し MilliQ 水 500 μ l を加え、室温で 10 分振盪して洗浄した。この操作をさらに 2 回繰り返した後、アセトニトリル 200 μ l を加え、室温で 10 分振盪した。アセトニトリルを除いた後、減圧濃縮遠心器で約 30 分ゲルを乾燥させた。乾燥したゲル片に 25ng/ μ l トリプシン (Promega 社) 溶液 (10mM Tris-HCl, pH8.8) を 10 μ l 加え、氷浴下で 45 分間静置ゲルを膨潤させた後、20 μ l の 10mM Tris-HCl バッファー (pH8.8) を加え、37°C で一晩インキュベーションした。pH 試験紙で溶液の pH が変化していないことを確認した後、酵素消化液を回収した。ゲル片に 5%ギ酸、50%アセトニトリル 20 μ l を加え、10 分振盪し、上清を再び回収した。この操作を 2 回繰り返して全ての上清を集め、減圧濃縮遠心器で約 5 μ l まで濃縮した。0.1%トリフルオロ酢酸溶液 20 μ l に可溶し、ピペットチップ型カラム ZipTip μ C18 (Millipore 社) で脱塩して質量分析用試料とした。

11. 質量分析とタンパク質の推定

トリプシン消化を行った質量分析用試料 0.5 μ l を MALDI target™ にアプライし、マトリックスとして α -シアノ- β -ヒドロキシクイ皮酸 (CHCA) の 0.1%トリフルオロ酢酸

/50%アセトニトリル飽和溶液を重層した。試料を、MALDI TOF-MS (AXIMA-CFR, 島津製作所)を用いて質量分析を行い、得られたペプチド断片の質量分析スペクトルより、Mascot データベース解析システム (Matrix Science 社) を用いて各スポットの帰属の推定を行った。

12. キャピラリーLC/MS

12-1 試薬

組換えヒトトロノボモジュリン (rhTM) は、CHO 細胞で産生させ、精製したものを旭化成工業株式会社より供与された。トリプシンは、シグマ社製を使用した。PNGase Fは Roche Diagnostic GmbH 社製を用いた。ギ酸及びヘプタフルオロ酪酸 (Heptafluorobutyric acid, HFBA)は、PIERCE 社製を用いた。PD-10 カラムは、Amersham Pharmacia 社製を使用した。

12-2 装置

HPLC : MAGIC 2002 システム (Michrom BioResource 社製)

MS : エレクトロスプレーイオン化トリプルステージ四重極 MS/MS システム TSQ 7000 (Finnigan 社製)

12-3 rhTMの糖鎖の調製

脱塩、凍結乾燥した rhTM (100 μ g) を、5unit の PNGaseF を含む 0.1% Triton X-100 及び 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中、37°Cで2日間消化させた。消化後、タンパク質をエタノール沈殿により除去した。遊離糖鎖を含む上清を乾固させ、水 100 μ l に溶解した後、0.5 M 水素化ホウ素ナトリウム水溶液 100 μ l を加え、室温で2時間放置した。反応溶液中の過剰の水素化ホウ素ナトリウムを希釈酢酸を

用いて分解させ、pH 7.0 に調整した後、ENVI-Carb(Supelco)で脱塩した。

12-4 rhTMのペプチド、及び糖ペプチドの調製

脱塩、凍結乾燥した rhTM (360 μ g) を 8 M グアニジン塩酸塩、5 mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl, pH 8.6 を 360 μ l に溶解した。さらに、2-メルカプトエタノール 2.6 μ l を加え、室温で2時間放置した。モノヨード酢酸ナトリウム 7.56 mg を試料溶解溶液 60 μ l に溶かし、試料溶液に加え、遮光下、室温にて2時間放置した。PD-10 カラムを用いて、脱試薬し、得られた試料溶液を凍結乾燥した。

還元カルボキシメチル化した TM (RCM-rhTM, rhTM 換算 120 μ g) を 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 μ l に溶かし、トリプシンを 2.4 μ g 加え、37°Cで1時間消化した。

12-5 糖鎖マッピング

rhTM 0.1 μ g に相当する糖鎖を用いて以下の条件で糖鎖マッピング (GCC-LC/MS) を行った。

HPLC :

カラム : Hypercarb (Michrom BioResource 社製, 0.2 \times 150 mm)

溶離液 A : 2%アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)

溶離液 B : 80%アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)

グラジエントプログラム :

B 液 : 15~45% (0~50 分)

流速 : ポンプ 100 μ l/分, スプリッター 2500/1000

UV 検出波長 : 206 nm

ESI-MS :

測定モード：ポジティブイオンモード
キャピラリー温度：175 °C
マルチプライヤー：1,200 V
ESI 電圧：2,000 V
スキャン範囲：700-2,400
スキャン回数：4 秒

12.6 ペプチド/糖ペプチドマッピング

RCM-rhTM のトリプシン消化物 0.2 μ g (rhTM 換算量) を用いて以下の条件でペプチドマッピング (LC/MS) を行った。

HPLC :

カラム：MAGIC C18 (Michrom BioResource 社製, 0.2 \times 50 mm, 5 μ)
溶離液 A: 0.1%ギ酸及び 0.005%HFBA を含む 2%アセトニトリル水溶液
溶離液 B: 0.1%ギ酸及び 0.005%HFBA を含む 80%アセトニトリル水溶液

グラジエントプログラム :

B 液 : 5~70% (0~60 分)

70~5% (60~61 分)

5% (61~70 分)

流速 : ポンプ 50 μ l/分, スプリッター 1200/400

UV 検出波長 : 206 nm

ESI-MS :

測定モード：ポジティブイオンモード
キャピラリー温度：175 °C
マルチプライヤー：1,200 V
ESI 電圧：1,800 V
スキャン範囲：400-2,400
スキャン回数：4 秒

12.7 糖ペプチド選択的解析

RCM-rhTM のトリプシン消化物 0.1 μ g (rhTM 換算量) を用いて以下の条件でプリカーサーイオンスキャン (LC/MS/MS) を行った。

HPLC : 12.6 に準ずる

ESI-MS :

測定モード：ポジティブイオンモード
キャピラリー温度：175 °C
マルチプライヤー：1,500 V
ESI 電圧：1,800 V
スキャン範囲：1,000-4,000
スキャン回数：6 秒
Collision energy : -20 eV
Collision Gas : Ar, 2.0 mTorr

1.3. テロメラーゼプロモーター領域の取得とレポーター遺伝子の構築、アッセイ

ヒトゲノムライブラリーより、ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット (hTERT) cDNA をプローブとし、hTERT 遺伝子の 5' 領域の取得を行った。塩基配列解析後、欠失変異体を作製し、がん細胞特異的プロモーター領域の同定を行った。がん細胞としては、A549 細胞 (ヒト肺癌上皮由来) は、5%FCS 含有 ERDF 培地を用いて培養した。HeLa (ヒト子宮頸癌由来)、HepG2 (ヒト肝癌由来)、SK-MEL-28 (ヒト黒色腫由来) および TIG-1 (正常繊維芽細胞) は、5%FBS 含有 MEM 培地を用いて培養した。トランスフェクション操作は、LipofectAMINE PLUS Reagent の製品プロトコールに従った。ルシフェラーゼアッセイに用いる細胞を、 1×10^5 cells/well の細胞密度で、24well プレート上に準備した。次の日、昨年報告した hTERT プロモーター-ルシフェラーゼコンストラクトおよび pRL-SV40 を無血清 ERDF 培地で希釈し、PLUS-Reagent を加え、最終容量が 25 μ l になるように無血清 ERDF 培地を加えた。次に、この DNA-PLUS Reagent 混合溶液を室温で 15 分間、イン

キュベートした。また、このとき使用した pRL-SV40 は、ウミシイタケルシフェラーゼを SV40 プロモーター制御下に組み込んだベクターであり、各 well におけるトランスフェクション効率を標準化するための内部対照用のベクターとして用いた。次に、LipofectAMINE を無血清 ERDF 培地で希釈し、上述の DNA-PLUS Reagent 混合溶液に等容量加え、室温で 15 分間インキュベートした。この間に、細胞の培養培地を血清を含まない新鮮な ERDF 培地と交換し、DNA-PLUS-LipofectAMINE 混合溶液を 50 μ l を各 well へ添加した。3 時間にわたり、細胞を 37°C にてインキュベートした。3 時間後 DNA-PLUS-LipofectAMINE 混合溶液を除き、5 %FBS 含有 ERDF 培地を各 well へ添加した。トランスフェクション 3 日後に、ルシフェラーゼアッセイを行った。上記のトランスフェクション操作は、A549 細胞において実施したものである。HeLa 細胞、HepG2 細胞 SK-MEL-28 細胞および TIG-1 細胞に関しては、トランスフェクション培地に変更して実施した。

細胞抽出液の調製およびルシフェラーゼ遺伝子発現量の測定は、Dual-Luciferase Reporter Assay System に従って実施した。細胞を充分量の PBS で洗浄後、余分な PBS を完全に除去し、Passive Lysis Buffer を各 well へ加え、プレートを室温で 15-30 分間振とうし、得られた細胞抽出液をエッペンドルフチューブへ移した。ガラス製のカルチャーチューブに LARII を分注した。細胞抽出液を LARII に加え、激しく混合し、ガラスチューブをルミノメーターにセット

し、ホタルルシフェラーゼ活性の発光量を測定した。引きつづき同サンプルに対し、1xStop&GloRegent を加え、激しく混合し、同様の方法にてウミシイタケルシフェラーゼの発光量を測定した。hTERT プロモーターの活性値は、ホタルルシフェラーゼ測定値をウミシイタケルシフェラーゼ測定値で除した値をそのプロモーターの比活性とし、平均値および標準偏差値を算出して評価した。

1.4. 免疫隔離膜の性能試験

ポリプロピレン (PP) 膜を袋状とし、その端を熱で閉じて成形した。この袋内に、Wistar-imamichi ラット胎児の胎齢 14 日および 15 日から肢芽器官を切り出し、袋内に入れた群と直接 F12-10% FCS 培地に入れて動的条件下で培養した。次に、F344 ラットの腹腔内に、同系ラットの肢芽器官を袋状 PP 膜内に入れたものを埋入し、1 週間飼育した。1 週間後、袋内の肢芽器官を取り出し、アルシアンブルー染色した。異系ラットや、異種マウスを F344 ラットの腹腔内に埋入するときは、陰イオン性修飾ポリウレタンで袋の外側を被覆コートした PP 膜も使用した。血中リンパ球サブセット (CD4/CD8) について、FACS で解析し、レシビエントの免疫応答を調べた。

1.5. タグ付き TNF- α 発現

15-1. 試薬

FlAsH は FlAsH-EDT2 (EDT:1,2-ethanedithiol) として Aurora Bioscience Corporation (San Diego, CA, USA) から購入した。pCMV-TNF および pShuttle は水口博士 (国立医薬品食品衛生研究所) から供与された。pEGFP-N1 は CLONTECH Laboratories から購入した。

15-2. プラスミドの作製

制限酵素による切断は約 1 μ g プラスミド溶液, 3 μ l 0.1%BSA, 3 μ l NEBuffer, 2~20unit 制限酵素 を含む全量 30 μ l の溶液をエッペンドルフチューブに入れ、37°Cで 2 時間インキュベートすることによって行った。作製した DNA フラグメントは 0.7%アガロースゲルで電気泳動し、目的のバンドを切り出し回収することによって精製した。

1 μ l 0.1% BSA, 1 μ l T4DNA Ligase Buffer, 1 μ l ベクター, 3 μ l インサート, 0.8 μ l T4DNA Ligase を加えた全量 10 μ l の超純水溶液中、17°Cで 2 時間以上インキュベートすることにより Ligation を行った。

15-3. 形質転換

Competent Cell high E.coli DH5 α (東洋紡績) 20 μ l と 15-2 で作られたプラスミド 5 μ l を滅菌チューブに取り、氷中に 30 分放置した。42°Cの水浴中で 30 秒間ヒートショックを行った後、2 分間氷中で冷却し、SOC medium(2% Bacto trypton, 0.5% Bacto yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl) を 180 μ l 加え、37°Cで 1 時間振盪培養した。次いでカナマイシンの入った LB/K プレートに播種し、37°Cインキュベーターで一晩培養した。培養後プレートから数個のコロニーを選択し、2~3ml の LB/K 液体培地で 37°C, 8 時間以上振盪培養した。

15-4. プラスミドの調製 (アルカリミニプレップ法)

15-3 の大腸菌培養液を 1.5ml とり、10,000 \times g で 1 分間遠心し上清を取り除いた後、100 μ l の solution A (50mM

glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl, pH8.0) で懸濁させ、氷中で 2~3 分冷却した。さらに 200 μ l の solution B (0.2N NaOH, 1%SDS) を加え軽く混ぜた後、150 μ l の solution C (5M potassium acetate, pH4.8) を加えよく攪拌し、氷中で 2~3 分冷却した。次に 10,000 \times g で 5 分間遠心し、上清をとり 300 μ l の Phenol/Chloroform を加え、攪拌後 10,000 \times g で 5 分間遠心した。この水層にエタノールを 900 μ l 加え、混和、さらに 10,000 \times g で 5 分間の遠心した後、上清を取り除き、70%エタノール 200 μ l を加え、再び 10,000 \times g で 2 分間遠心、上清を取り除いた後乾燥した。これを RNaseA を含む Tris-EDTA 緩衝液 (pH8.0) 20 μ l で均一に懸濁した。

15-5. 調製したプラスミドの確認

0.7%アガロースゲルで電気泳動し、そのサイズによって確認するとともに、シーケンスし、塩基配列を確認した。解析は ABI PRISM 310 Collection を用いて行った。

15-6. プラスミドの大量調整

QIAGEN Plasmid Maxi Kit を用いてより純度の高いプラスミドを精製した。操作はマニュアル通りに行った。

15-7. 融合タンパク質の発現

HeLa 細胞をペニシリン 100 units/ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml、グルコース 1g/L を含んだ 10%FCS-DMEM を培地として 60mm dish で 37°C、5%CO₂ / 95%気相下で培養した。継代には 0.25% Trypsin-1mM EDTA を用いた。調製したプラスミドを Effectene Transfection Reagent を用いて HeLa 細胞へトランスフ

エクトした。

15-8. ウェスタンブロット

トリクロロ酢酸沈殿法により培養液を濃縮したものをサンプルとした。15%アクリルアミドゲルを用いて、20mA で約1時間泳動を行った。プロットは常法に従って行った。検出は Amersham ECL Western blotting detection reagent を用いて行った。

15-9. 細胞障害活性測定

測定には TNF- α に強く感受性を示す、マウス L929 細胞を用いた。培養には 10% FCS-MEME を用い、他は 15-7 の HeLa 細胞の培養と同じ方法で培養した。TNF- α を発現させた細胞の培養液を 4 段階に希釈し 50 μ l ずつ分注した。これにアクチノマイシン D を 1 μ g/ml となるように加えた。60mm dish でサブコンフルエントに培養したマウス L929 細胞を、Trypsin-EDTA で処理して剥がしたものを、12ml に浮遊させた細胞培養液を 100 μ l ずつ分注し、37°C、5%CO₂/95%気相下で 12~20 時間培養した。顕微鏡で細胞の状態を確認した後、アラマブルーを 10w/v% となるように添加し、37 °C、5%CO₂/95%気相下で 3~4 時間培養した後、530nm 励起による 590nm 蛍光を測定した。

15-10. 蛍光スペクトルの測定

HeLa 細胞の培養液 をチューブに採り、13,000 \times g で遠心、上清のみ回収した。FlAsH による標識は β -メルカプトエタノール 1 mM、FlAsH-EDT₂ 1 μ M、EDT10 μ M となるように添加し、水中で約 10 分間反応させることによって行った。場合によっては培養液 を以下の様な処理をした後、標識した。即ち、緩衝液として 100 mM

Tris-HCl pH7.4 (at 4 °C) を用い分画分子量 12,000~14,000 の半透膜で dialysis を約 24 時間行い、その後分画分子量 5000 の限外濾過メンブレンで濃縮し、0.5M Tris-HCl pH7.2 で 200 μ l とした後、測定した。

16. ポリ乳酸と ϵ カプロラクトンとの共重合体のラット及びヒト軟骨前駆細胞の分化・増殖への影響

Wistar-imamichi ラットの胎齢 13 日胎児の四肢を切り出し、肢芽細胞を調製した。細胞を高密度にスポット状に well 内に播種し、2 時間後、F12-10%FCS 培地を加えた。翌日、試験物質を培地に加えて、更に 6 日間培養した。合計 1 週間培養後、培地を捨て、アラマブルーによる細胞増殖度測定、アルシアンブルー染色後、染色された proteoglycan をグアニジン溶液で溶出し、600nm の吸光度を測定した。ヒト細胞は、関節軟骨細胞をラットと同様、高密度にスポット状に well 内に播種し、2 時間後、市販のヒト軟骨培地を加えた。試験物質試験群では、試験物質を培地に溶かしてくわえた。ヒト細胞の場合は、4 週間培養した。培養終了後、ラット細胞と同様にアラマブルーによる細胞増殖度測定、アルシアンブルー染色による軟骨のプロテオグリカン量を 600nm での吸光度で測定し、コントロール群を 100% として試験物質の影響を評価した。

試験物質としては、L-乳酸- ϵ -カプロラクトン共重合体で乳酸と ϵ -カプロラクトンの配合比が 75:25 で分子量が 10000 の P(LA-CL)₂₅ 10000 と乳酸と ϵ -カプロラクトンの配合比が 50:50 で分子量が 18000 の P(LA-CL)₅₀ 18000、および水溶

性フラーレンである C60DMA を使用した。

1.7. AC133 陽性細胞の分離

1.2 l の血液より分離した約 40ml のバッフィーコートに 100mM EDTA を終濃度 2 mM となるように添加し、フィコールバック (比重 1.077) に静かに重層した。一方、臍帯血からの単核球を分離する際には、臍帯血を等量の 1mM EDTA を含む PBS と混合後、フィコールバックに静かに重層した。2200 回転、10°C、15 分間遠心後、単核球分画を分離し、0.5% BSA、2mM EDTA を含む PBS (分離バッファー) に浮遊させた。低速で遠心後、沈殿した細胞を再び 200 μ l の分離バッファーに再浮遊させた。この単核球分画より AC133 マイクロビーズ分離キット (Milteny Biotec) を用いて、キットのプロトコールにしたがって AC133 陽性細胞を分離した。まず、単核球分画に抗 AC133 抗体・マイクロビーズを添加し、4°C、30 min 間反応させた。反応液に、10ml の分離バッファーを添加して遠心を行った後、沈殿した細胞を 2ml の分離バッファーに再浮遊させた。この細胞浮遊液を、Auto MACS (Milteny Biotec) アプライし、陽性細胞を分離した。分離した AC133 陽性細胞は 20% 牛胎児血清 (FBS)、50 ng/ml 血管内皮細胞成長因子 (VEGF) を含む EBM-2 培地に浮遊させ、フィブロネクチンあるいはタイプ IV コラーゲンをコートした 24 穴あるいは 48 穴のマルチウェルに分注し、37°C、5% CO₂ 気相下にて培養した。

1.8. 免疫組織染色

内皮細胞の特異的表面抗原として、CD31、flk-1、Tie2 を、また細胞内指標と

して非誘導型 NO 合成酵素 (eNOS) の発現を、またマクロファージの特異的表面抗原として CD11b を選択した。培養した細胞を、細胞を -20°C のエタノールで固定した。固定後、適量の氷冷した PBS を用いて 3 回洗浄した。1% BSA-PBS で 4°C、1 時間ブロッキングを行った後、各種抗体を含む 1% BSA-PBS を添加し、4°C、1 時間反応させた。細胞を 1% BSA-PBS 接着で洗浄した後、抗 IgG 抗体-FITC あるいは抗 IgG 抗体-ローダミン存在下で 4°C、1 時間、反応させた。反応終了後、細胞を 1% BSA-PBS を用いて洗浄し、共焦点顕微鏡にて励起波長 488 nm、蛍光波長 530/30 nm あるいは 570/30 nm で観察した。

1.9. 分化誘導した AC133 陽性細胞の CD31 発現の免疫染色と細胞分画

AC133 陽性細胞をフィブロネクチンあるいはタイプ IV コラーゲンコートプレートを用いて、VEGF 存在下培養を行った。上清の細胞と接着細胞をラバーポリスマンを用いて回収し、-20°C のエタノールで固定した。固定後、免疫組織染色のため細胞を氷上に静置した後、PBS で洗浄した。1% BSA-PBS で 4°C、1 時間ブロッキングを行った後、FITC-標識抗 CD31 抗体 (Pharmlingen) を含む 1% BSA-PBS を添加し、4°C、1 時間抗原抗体反応させた。細胞浮遊液を PBS で洗浄し、CD31 の発現をフローサイトメーターを用いて解析した。一方、CD31 発現陰性、陽性及び強陽性細胞をセルソーターを用いて分取した。分取した各細胞を、フィブロネクチンコートプレートを用いて VEGF 存在下、さらに 1 週間培養した。

2.0. 成熟及び小型肝細胞の調製と 2 次元

電気泳動による分離

ラットよりコラゲナーゼ灌流法により調製した細胞懸濁液を50g×1分遠心した。沈殿として得られた肝細胞を培地にて懸濁後同様な遠心操作を3回繰り返して成熟肝細胞を得た。成熟肝細胞はその細胞懸濁液を45%パーコール密度勾配で50g×10分遠心し沈殿とすることにより更に精製を行った。一方、成熟肝細胞調製時の各遠心上清を集め、150g×5分遠心した。沈殿として得られた小型肝細胞と他の非実質細胞を培地にて懸濁後、同様な遠心操作を3回繰り返した。沈殿として得られた細胞を懸濁後50g×2分遠心し小型肝細胞に富む分画を得た。この細胞懸濁液を45%パーコール密度勾配で50g×24分遠心し沈殿とすることによりさらに精製された小型肝細胞懸濁液を得た。

沈殿として得られた成熟及び小型肝細胞をPBSで洗浄後、チオウレアを含む溶解バッファーで細胞を可溶化した。可溶化液を20,000g×60分遠心しその上清を回収した。上清は使用するまで-70℃で保存した。なお、個々のサンプルにおけるタンパク濃度はBiorad protein assay kitで測定した。

2次元電気泳動および目的タンパク質の質量分析による同定は、方法の9、10、および11により行った。

2.1. 倫理面への配慮

動物実験については、各施設の動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施し、倫理審査の承認を得て行った。また、ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を

含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で行った。

C. 結果

1. ポリエチレンイミン磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮

細胞・組織加工医薬品等の安全性に関する最大の関心事は、ウイルス等の感染性因子の混入をいかに防ぐかである。そのためには、最も感度よくかつ非特異的な反応を抑えてウイルス等の感染因子の検出を行う必要がある。昨年度は、ポリエチレンイミン磁気ビーズが、主としてエンベロープウイルスの濃縮に有効であることを見出した。本年度は、まずポリエチレンイミン磁気ビーズのウイルス濃縮作用について詳細な検討を行った。

Vero細胞に感染させた Sindbis virus、ESK細胞に感染させた Porcine Parvo virus、CV-1細胞に感染させた SV-40 virusの上清を段階希釈し、その100μlよりウイルスゲノムを抽出した。一方、それぞれのウイルス希釈液1mlに10mg/0.1mlのポリエチレン磁気ビーズを添加し、ビーズに結合したウイルスよりウイルスゲノムを抽出した。抽出したウイルスゲノムをPCRあるいはRT-PCR反応により検出した結果を図1に示す。SV-40ウイルスや Sindbis virusの場合、単なるウイルス培養上清の段階希釈液での検出限界に比較して、磁気ビーズでの検出限界は明らかに上まわっていた。すなわち、磁気ビーズに結合したウイルスから抽出し

た試料のほうがより薄く希釈した試料からでもウイルスゲノムが検出され、効率良くウイルスが濃縮されていることが示された。一方、PPV ウイルスではこのような磁気ビーズによる濃縮効果は認められなかった。

ついでウイルス感染価を指標としてポリエチレンイミン磁気ビーズによる濃縮を検討した。Vero 細胞に感染させた Herpes Simplex virus、 Polio virus、 Sindbis virus 及び Visicular Stomatitis virus の、培養上清、ESK 細胞に感染させた Porcine Parvo virus、 CV-1 細胞に感染させた SV-40 virus の各 1 ml の培養上清に、ポリエチレンイミン磁気ビーズを添加して磁気ビーズ結合分画とその上清に分けた。さらに、ポリエチレンイミンの濃縮を行った上清に残存するウイルス力価を培養上清の力価と比較した。その結果を表 3 に示す。ポリエチレンイミン処理を行った SV-40 virus、Herpes Simplex virus、Sindbis virus、及び Visicular Stomatish virus の上清のウイルス感染価は、もとの培養上清に比べ非常に低下していた。従って、これらのウイルスのほとんどがポリエチレンイミン磁気ビーズに結合したと考えられる。一方、Porcine Parvo virus 及び Polio virus では、PCR による検出同様、ポリエチレンイミンに結合していないことが明らかになった。

ポリエチレンイミン磁気ビーズのウイルス吸着能力を明らかにするために、ビーズの添加量と濃縮できるウイルス量との関係を調べた。 10^8 から 10^9 コピー数の HSV-1 及び Sindbis virus を含む培養液に種々の濃度のビーズを添加し、ビーズに結

合したウイルス量をリアルタイム PCR 及び RT-PCR により測定した (図 2)。添加したビーズ量が 0.1~10 μ l までは、用量依存的にビーズに結合するウイルス量は増加するが、10~100 μ l では殆ど変化が認められない。したがって、以下の検討では、100 μ l のビーズを添加することとした。

次に、濃縮に及ぼす血清の影響について検討した。種々の濃度の血清存在下に、HSV-1、SV-40 ウイルス及び Sindbis virus の濃縮を行った。図 3 に示すように、50%血清存在下に濃縮を行うとウイルス濃縮の顕著な低下が認められるものの通常よく用いられる血清範囲 (10%以下) では、濃縮効率の低下は認められなかった。

さらに、ポリエチレンイミン磁気ビーズを用いて定量的なウイルス濃縮の可能性と検出限界近くでのウイルス濃縮が可能かについて検討した。図 4 及び表 4 に、HSV-1 や Sindbis virus の培養上清の 1ml 及び 10ml から濃縮 (10 倍濃縮及び 100 倍濃縮) を行った場合のウイルス検出の結果を示している。種々の希釈を行ったこれらのウイルスをポリエチレンイミン磁気ビーズで濃縮すると期待通りのウイルス量が検出された。特に、RNA ウイルスである Sindbis virus では、100 倍濃縮を行った場合には 1000 倍以上の濃縮効果が得られ、これはウイルス濃縮中に RNase のような阻害物質が除去されたためではないかと推定された。さらに、検出限界以下になるような希釈を行った場合にも、ポリエチレンイミン磁気ビーズを用いることにより、検出限界の高感度化が可能であった。

一方、複数のウイルスが存在した場合にもポリエチレンイミン磁気ビーズによる

濃縮が可能か検討した。図5に示すように、SV-40 ウイルス、Sindbis ウイルス及び HSV-1 を混合し、ポリエチレンイミン磁気ビーズによる濃縮を行ったところ、それぞれのウイルスが効率よく濃縮されていることが確認された。

2. スルホン酸磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮

ポリエチレンイミンを用いてのウイルス濃縮において、結合しなかったウイルスは全て脂質膜を持たない非エンベロープウイルスである。従って、ポリエチレンイミンは主としてエンベロープウイルスを濃縮すると思われる。そこで、昨年度見出したスルホン酸磁気ビーズを用いた非エンベロープウイルスの濃縮作用についての詳細な検討を行った。ポリエチレンイミンの場合と同様に、各ウイルスを感染させた細胞 1 ml の培養上清に、100 μ l のスルホン酸磁気ビーズを添加し、さらに 5 mM CuSO₄ を添加した後、磁気ビーズ結合分画とその上清に分けた。培養上清 100 μ l 及びスルホン酸結合分画からウイルスゲノム DNA あるいは RNA を抽出し、限界希釈法によりそれぞれのウイルスゲノムの検出を行った。図6に示すように、Sindbis virus の培養上清では、10⁻⁴まで希釈するとウイルスバンドの検出ができなくなるが、スルホン酸磁気ビーズに結合した分画では、10⁻⁴希釈してもまだウイルスバンドは検出できた。また、Porcine Parvo virus でも同様に、10⁻⁶まで希釈するとウイルスバンドの検出ができなくなるが、スルホン酸磁気ビーズに結合した分画では、10⁻⁶希釈してもまだウイルスバンドが検出できた。さらに、Polio virus の

培養上清では 10⁻⁸ 希釈した場合にほとんどウイルスが検出できないが、スルホン酸磁気ビーズでは 10⁻⁴ 希釈してもウイルスゲノムの検出ができた。

一方、スルホン酸磁気ビーズの濃縮を行った上清に残存するウイルス力価を培養上清の力価と比較した。その結果を表5に示す。スルホン酸磁気ビーズ処理を行った Sindbis virus、Porcine Parvo virus、及び Polio virus の上清のウイルス感染価は、もとの培養上清に比べ非常に低下していることが確認された。

ついで、スルホン酸磁気ビーズによるウイルス濃縮の定量性と検出限界近くでのウイルス濃縮が可能か検討した。図7及び表6に、Poliovirus 及び PPV の培養上清を 1ml 及び 10ml から濃縮（10倍濃縮及び100倍濃縮）を行った場合のウイルス検出の結果を示している。Poliovirus は効率よく濃縮されることが示され、また、検出限界の高感度化も認められた。一方、PPV では10倍濃縮した場合には理論どおりの濃縮効果が認められたが100倍濃縮では目的とする濃縮効率は得られなかった。しかし、100倍濃縮した場合には、検出限界の顕著な高感度化が認められた。

病原性ウイルスについても検討を行った。ヒトサイトメガロウイルスをポリエチレンイミン及びスルホン酸磁気ビーズを用いて10倍濃縮を行った結果を図8に示す。培養上清のサイトメガロウイルスは、10⁻⁴希釈までしか検出できないが、ポリエチレンイミン磁気ビーズあるいはスルホン酸磁気ビーズを用いた場合にはいずれも10⁻⁵希釈しても検出が可能であった。

3. ポリエチレンイミン結合セファロース

6MBによるウイルス除去

ポリエチレンイミン磁気ビーズが、効率よくウイルスを濃縮可能なことより、ポリエチレンイミンを細胞分離用樹脂に結合させ、ウイルス除去を行うことを試みた。

図9に示すように、HSV、SV-40 virus、sindbis virus、PPVをHL-60細胞懸濁液にスパイクしてポリエチレンイミンセファロース6MBカラムにアブライした。その結果、HSV、SV-40 virus、PPVを効率よく除去できることが明らかになった。対照として用いたグリシンセファロース6MBカラムではウイルスの除去は認められなかった。一方、細胞の回収率に関しては、ポリエチレンイミン6MBにアブライした細胞の50~60%が吸着されることが明らかとなった。すなわち、ポリエチレンイミンセファロース6MBは、細胞とウイルスの両方を吸着するが、非常にウイルスを吸着しやすい性質を持つことが明らかになった。

4. HL-60細胞とHL-60RG細胞への各種染色体解析の組合わせの適応

HL-60細胞は急性前骨髄性白血病患者より樹立された株であり、骨髄系細胞への分化能を有し、血球系分化や白血病細胞のモデル細胞として用いられてきている。HL-60細胞は、樹立後、継代数の少ない間は倍加時間が非常に長いが、継代数が多くなると倍加時間が短くなることが知られており、このように倍加時間が非常に短くなった細胞としてHL-60RG細胞が樹立された。細胞治療用医薬品の遺伝的安定性の評価技術開発の一環として、昨年度はGバンド解析、m-FISH及びCGH解析を組合わせることによりモデル細胞として

取り上げたHL-60細胞とHL-60RG細胞の染色体変異の違いを的確に判定できることを明らかにした。その結果をまとめると、HL-60細胞では染色体数は45ないしは46であったが、HL-60RG細胞は13番染色体の欠失や18番染色体での過剰が消失するなど、その染色体数は43あるいは44で少なくなる傾向にあった。核型についてもHL-60細胞では非常に多様な変異が検出された。5番染色体長腕の部分欠失、9番染色体短腕の部分欠失、10番染色体短腕と13番染色体長腕の転座に由来する10番派生染色体、14番染色体長腕の部分欠失、16番染色体長腕部の付加、17番染色体の欠失が認められる他、第6染色体や第18染色体の過剰、X染色体の欠失等が認められた。

特に図10で示すように、HL-60RG細胞で、HL-60細胞と異なる遺伝的差異としては9番染色体q13に由来不明の染色体断片の挿入と、11番染色体長腕と13番染色体長腕の全腕転座に由来する派生染色体があげられる。言い換えれば、HL-60細胞とHL-60RG細胞の増殖性等の大きな差異は、9番染色体と11番染色体のこのような変化によってもたらされている可能性が考えられた。

このようなHL-60細胞とHL-60RG細胞との間で見出された染色体上の差異を明らかにする目的で、c-mycプローブを用いたFISH解析を行った。図11に示すように、c-mycプローブを用いたFISH解析より、HL-60細胞ではdmin(矢印)が多数見出されるが、HL-60RG細胞では殆どdminは見出されない。一方、両細胞の第8染色体末端にはc-mycが存在するが、

HL-60RG 細胞ではこれに加えて第9染色体に c-myc の強いシグナルの挿入が認められた。このことをさらに確認するために、G-バンド解析と c-myc プローブを組合わせた解析を行った。両細胞とも矢印で示す第8染色体末端に c-myc が存在するが、これに加えて HL-60RG 細胞では、c-myc プローブとの反応が第9染色体 q13 に見出された(図12)。

5. 細胞由来タンパク質プロフィールを指標とする細胞特性解析—培養上清の濃縮法の検討

モデル細胞として HL-60RG 細胞を用いて細胞由来タンパク質プロフィールのイモビラン2次元電気泳動法による解析を行った。

図13に HL-60RG 細胞の培養上清のタンパク質を二次元電気泳動で分離したスポットからトリプシン消化ペプチド混合物を質量分析した質量スペクトルの一例を示している。ここで得た各ペプチドの質量数から、マスショットデータベースを用いてタンパク質の推定を行い、本スポットを Statmin と推定した。

同様の解析を行うことにより、図14に示したように、17種類のタンパク質について PMS 法による帰属の推定ができた。また、昨年度ウェスタンブロットにより帰属の推定を行ったタンパク質を丸印で示した。

6. キャピラリーLC/MSを用いた目的タンパク質の特性解析法の開発

6-1. 糖鎖マッピング

我々はこれまで、グラファイトカーボンカラム(内径2.0mm)を用いた糖鎖マッピング法を開発し、バイオテクノロジー応用医薬品の品質評価に応用できることを示

してきた(Kawasaki, N., et al. Anal. Biochem. 2000)。本研究では、図15に示すように、内径0.2mmのキャピラリーカラムを用いたLC/MSを導入することによって、糖鎖マッピングの微量化を検討した。

モデル糖タンパク質 rhTM から糖鎖を切り出し、糖アルコールに還元した後、キャピラリーLC/MSにより糖鎖マッピングを行った。今回は、感度を高めるため、インターフェースとしてメタルニードルを用いた。その結果、rhTM 100 ng相当の糖鎖から、図16に示すような糖鎖マップを得ることができた。各ピークの m/z 値を糖鎖の理論値と照合することによって、rhTM に結合している主な糖鎖は図17に示すようなシアル酸結合複合型2本鎖糖鎖で、一部3本鎖糖鎖も含まれていること、また、すべての糖鎖にフコースが結合していることが明らかになった(表7)。

6-2. ペプチド/糖ペプチドマッピング、及び糖ペプチド選択的解析

昨年度はマイクロカラム(内径1.0mm)を用いたLC/MSによるペプチド/糖ペプチドマッピング、及びプリカーサーイオンキャン(LC/MS/MS)による糖ペプチド選択的解析法を検討し、目的タンパク質のペプチド鎖、糖鎖結合部位、予備的な糖鎖の構造解析法として有用であることを示した。本年度は、キャピラリーLC/MS、及びLC/MS/MSによるペプチド/糖ペプチドマッピング、及び糖ペプチド特異的解析法の微量化を検討した。モデルとして用いた rhTM の cDNA から予想されるトロンボモジュリンの一次構造、及びトリプシン消化によって生じるペプチド断片(K1~

K23)を図18に示す。

はじめに、トロンボモジュリンのトリプシン消化物 200 ng (トロンボモジュリン換算量) を用いて、キャピラリーLC/MSによるペプチド及び糖ペプチドマッピング検討した。カラムは C18 キャピラリーカラム (内径 0.2 mm), 検出にはエレクトロスプレーイオン化質量分析計を用い、流速約 2 μ l/min でポジティブイオン測定を行った。図19は得られたペプチド/糖ペプチドマップの UV クロマトグラム(A), 及び TIC クロマトグラム(B)である。マップ上のピークに便宜上 1~14 の番号をつけた。

つぎに、図19のペプチド/糖ペプチドマップの中から糖ペプチドを特定するため、プリカーサーイオン[HexNAc⁺]スキャンによる糖ペプチド選択的解析法を検討した。その結果、5つのブロードなピークが検出され (図19C), 図19A 及び 19B で検出されたピーク 6, 11, 及び 12, 並びに新たに検出されたピーク 15 及び 16 が糖ペプチドであることが明らかになった。尚、ペプチド/糖ペプチドマッピングにおいてピーク 15 及び 16 は、同じ位置に溶出されたペプチドピークの妨害によって検出されなかったが、プリカーサーイオンスキャンによる糖ペプチド選択的検出法によって検出されるようになったものと思われた。

図19上の各ピークのうち、糖鎖の結合していないペプチドに由来すると予想されるピークについて、マススペクトルから得られた分子量の計算値と、cDNA から予想されるペプチドの分子量の理論値を照合した。その結果、表8に示すようにすべて

のピークを帰属することができた。また、糖ペプチドと特定されたピーク 6, 11, 及び 12 は、m/z 値を表7に示した糖鎖の理論値とペプチドの理論値を合計した値と照合させることによって、それぞれ K9, K20, 及び K1 であり、いずれにも、図17に示すシアル酸結合複合型フコシル 2 または 3 本鎖糖鎖が主に結合していることが確認された。また、K16 にはヘキソース 1 分子が結合していることが確認された。プリカーサーイオンスキャンで検出されたピーク 15 及び 16 は分子量の大きい K21 及び K23 であると思われた。詳細構造は現在解析中である。

7. 細胞・組織のがん化を予測する評価技術の開発に関する研究

細胞・組織のがん化を予測する評価技術の開発に関する研究に関して、昨年度は、ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット (hTERT) プロモーターのがん化リスク評価系の確立に関する研究を行った。ヒトゲノムライブラリーより、ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット (hTERT) cDNA をプローブとし、hTERT 遺伝子の 5' 領域の取得を行ない、塩基配列解析後、欠失変異体を作製し、がん細胞特異的プロモーター領域の同定を行った。がん細胞としてはヒト肺がん細胞株(A549 細胞)を、正常細胞としてはヒト正常線維芽細胞 (TIG-1 細胞) を用い、hTERT プロモーターのがん特異性の評価を、ルシフェラーゼ法を用いて行った。

今年度は、hTERT プロモータールシフェラーゼコンストラクトおよび pL-SV40 を、LipofectAMINE PLUS reagent を加えて、各種がん細胞にトランスフェクシヨ

ンした。この時使用した pRL-SV40 は、ウミシイタケルシフェラーゼを SV40 プロモーター制御下に組み込んだベクターであり、各 well におけるトランスフェクション効率を標準化するための内部対照用のベクターとして用いた。

hTERT プロモータールシフェラーゼコンストラクトの構造を図 20 に示した。ATG 翻訳開始点の上流 25 塩基目を hTERT プロモーター領域の 3' 末端とし、図 20 に示したような様々な断片長のプロモーター欠失変異体を PCR により調製し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を有するプラスミド pGL3-basic に挿入し、それぞれのルシフェラーゼコンストラクトを構築した。

昨年報告したように、がん細胞株 A549 では hTERT mRNA の発現が確認されるが、正常線維芽細胞株 TIG-1 では hTERT mRNA の発現が認められなかった。この hTERT mRNA の発現を転写レベルで解析するために、hTERT プロモーター活性を評価した。まず、図 20 に示したように、hTERT の ATG の上流領域 (-1391bp ~ -25bp) を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミド (pGL3b-1391) を構築し、A549 がん細胞および TIG 正常細胞へトランスフェクションした。その結果、この -1391bp ~ -25bp の領域は、がん細胞に機能する hTERT のプロモーターであることが判明した。即ち、hTERT の発現制御は、mRNA の安定性のような転写後のレベルで制御されているのではなく、むしろ転写レベルで主に制御されていると考えている。また、pGL3b-1391 の hTERT プロモーター領域を一方向へ短縮した欠

失変異体についても、同様のレポーターアッセイを行い、転写活性化能について検討した。その結果、がん細胞株 A549、HeLa、HepG2、および SK-MEL-28 において、様々なプロモーター断片間で、転写活性化能の違いが示された。特に、pGL3-286 のコンストラクトにおいて最も高く転写活性が誘導された。一方、プロモーター領域が -286bp よりも長いコンストラクト (pGL3-1119~583) に関しては、pGL3-286 のプロモーター活性と比較し、最大で約 40% の転写抑制効果が認められた。従って、この -1119bp ~ -286bp の塩基配列内には、hTERT プロモーターを抑制しうるエレメントが存在しているものと推測された (図 20)。

hTERT mRNA は、A549 がん細胞で発現しており、hTERT のプロモーター活性化と一致した。TIG-1 正常細胞では、いずれも検出されなかったことより、hTERT は、主に転写レベルでその発現が制御されていると示唆された。また、様々な断片長の hTERT プロモーター欠失変異体を用いた実験より、hTERT の転写制御に関与すると推定されたシスエレメントの存在が確認された。特に、pGL3-1119 の転写活性化能が著しく低下しており、このプロモーター領域内 (-1119bp ~ -286bp) には、転写を抑制的に制御する転写因子が結合していると考えられる。

8. 細胞等による望ましくない免疫反応の検出技術開発に関する研究

Wistar-imamichi ラットの胎齢 13、14、15、16、17th の胎児前肢を切り出し固定し、アルシアンブルー染色をした標本を図