

20020481

厚生労働科学研究費補助金
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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 早川 堯 夫

平成15 (2003) 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 早川堯夫	————— 1
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 土屋利江	————— 1 5 7
2. 細胞・組織加工医薬品等の安全性等に関する研究 山口照英	————— 2 4 2
3. 細胞治療薬の新規体内動態解析技術の開発研究 川西 徹	————— 3 0 3
4. 細胞タンパク質プロファイル評価技術の開発 川崎ナナ	————— 3 1 4
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研究 新見伸吾	————— 3 5 5
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	————— 3 6 5
IV. 研究成果の刊行物・	

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総合・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 副所長

【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 (PEI) 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検討を行った。PEI 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 1,000 倍の濃縮効果をもたらすと同時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。一方、スルホン酸磁気ビーズは PEI 磁気ビーズで濃縮できなかった非エンベロープウイルス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核酸増幅法 (PCR) の高感度化が可能であることが示された。さらに、ウイルス感染性の迅速・高感度検出法 (infectivity PCR) の新規開発を行った。本法は、指向性細胞にウイルスを感染させた後、新たに開発したポリスチレン球を用いた核酸抽出法と PCR を組み合わせることにより細胞内ウイルスゲノムを迅速・高感度に検出しようとするものである。数種のウイルスについて検討した結果、すべてのウイルスに関して細胞変性を指標とする方法に比べて非常に高感度に感染性ウイルスを検出できることを明らかにした。(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 細胞を用いて検討を行った。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見出した。さらに、c-myc プロンプと G-バンド解析を組み合わせることで、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 解析の組み合わせは、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ァイルを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発を目指して、モデル細胞を用い、培養上清に分泌される増殖因子等をヘパリンカラムで濃縮し、イモビリン 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、マイクロ液体クロマトグラフィー

質量分析法 (LC/MS) とキャピラリーLC/MS (CapLC/MS) による目的タンパク質の構造解析法の開発を行い、これにより迅速・高感度に細胞由来目的タンパク質の構造解析、糖鎖解析を行えることを明らかにした。また、ゲル電気泳動法による発現タンパク質の分取と CapLC/MS を組み合わせるタンパク質プロフィール解析法を確立した。(4) 細胞・組織のがん化を予測する評価技術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、正常細胞及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。さらに、本レポーター遺伝子のシスエレメントの解析を行い、少なくとも c-Myc がその活性化に関与することを明らかにした。(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を明らかにし、免疫隔離膜が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、目的タンパク質にフルオレセイン誘導体 FLAsH 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た 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を確認した。(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、ヒト末梢血及び臍帯血 AC133 陽性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細胞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持つ細胞の優れた特性指標となることを見出した。また、肝幹細胞として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を見出した。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がインスリンと異なる機構でヒト軟骨前駆細胞の分化誘導能を示すことを明らかにした。

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

有賀豊彦 日本大学生物資源科学部農
芸化学科教授

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、これらはがん、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検討すべき課題は多い。

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ァイルを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発に関する研究、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。

3年間の研究を通じて、1) 核酸増幅法（PCR）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、さらに、感染性ウイルスの高感度検出法の確立を目指し、指向性細胞にウイルスを感染させた後、新規核酸抽出法とPCRを組み合わせることでより細胞内ウイルスゲノムを高感度・高精度に検出する方法（infectivity PCR）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プロンプを用いた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ァイルを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発のための基礎として、イモビリン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ァイルの解析手法に関する研究、マイクロLC/MSとCapLC/MSを用いた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して、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 FIAsh（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、臍帯血や末梢血由来 AC133 陽性細胞の血管内皮細胞への誘導とその特性解析、小型肝細胞(肝幹細胞)の特性指標に関する研究、生分解性ポリマーの軟骨前駆細胞等の分化や細胞・組織等に及ぼす影響についての検討等を行った。

B. 研究方法

1. 試薬

CHO 細胞で生産し精製した遺伝子組換え型ヒトトロポモジュリンは、旭化成工業社より供与された。遺伝子組換え型ヒトフォリスタチンは、CHO 細胞で生産し精製した。ヒト黒色腫細胞由来 t-PA は和光純薬工業より購入した。ウシ脳アセトンパウダーは Sigma 社より購入した。抗ヒトフォリスタチン抗体は R&D systems 社より購入した。トリブシンはシグマ Sigma 社製を使用した。N-グリコシダーゼ F (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、それぞれ和光純薬工業社製及び Pierce 社製を用いた。ゲル染色液は Simply Blue SafeStain(Invitrogen 社製)を使用した。ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C (PIPLC) は Molecular Probes 社製を使用した。FLAsH は FLAsH-EDT₂ (EDT: 1,2-ethane-dithiol) として Aurora Bioscience 社 (San Diego, CA, USA) から購入した。pCMV-TNF 及び pShuttle は水口裕之博士 (国立医薬品食品

衛生研究所) から供与された。α-ヘリックス型及びヘアピン型タグ付き TNF-α作製のための合成ヌクレオチドは北海道システムサイエンス社から得た。制限酵素 *Dpn* I、*Not* I、*Age* I、*Bsr*G I は New England BioLabs 社から得た。

2. ウイルスのポリエチレンジイミン及びスルホン酸磁気ビーズによる濃縮

ポリエチレンジイミン (PEI) 磁気ビーズは、カルボキシル基を持つ磁気ビーズに、水溶性カルボジイミド存在下、平均分子量 10,000 の PEI 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、100μL (5mg の磁気ビーズを含む) の PEI 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 100μL 及び磁気ビーズを添加する前のウイルス液 100μL 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. 1 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°C、30 秒 ; 56°C、45 秒 ; 72°C、60 秒を 35 サイクルする PCR 反応で行った。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、トリウウイルス逆転写酵素を用いて 42°C、45 分間の cDNA 合成を行った。合成した cDNA を鋳型として上記と同様の 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の検出には、サイバークリーンを用いて定量した。

2. 2 ウイルスの感染価の測定

ウイルス感染価は、それぞれのウイルスの指向性細胞に感染させて解析した。単純ヘルペスウイルスタイプ 1 (HSV-1)、ポリオウイルス、水泡性口内炎ウイルス (VSV)、シンドビスウイルスは Vero 細胞を、ブタバルボウイルス (PPV) は ESK 細胞を、SV40 ウイルスは CV-1 細胞を用いて TCID₅₀ を求めた。

3. 感染性ウイルス検出のための Infectivity PCR の開発

3. 1 ウイルスゲノムの抽出

感染細胞からのウイルスゲノムの抽出は、ポリスチレンコートした磁性球を用いて行った。その原理は、細胞破砕液の中の核酸をポリスチレンコートした磁性球 (Gene Ball) が特異的に吸着することを原理としている (図 1)。Gene Ball による核酸の抽出操作の概略を図 2 に示している。細胞浮遊液あるいは細胞沈査に Gene Ball を添加した後、細胞破砕用の酵素液を添加して、20 分間反応させる。反応後、非極性溶媒を反応液に添加する。この時沈殿した核酸は Gene Ball に効率よく吸着させることができる。洗浄後、TE

液あるいは蒸留水で核酸を可溶化して PCR あるいは RT-PCR に供する。すべての反応時間は 1 時間ほどで終了し、他の様々な核酸抽出法に比較しても非常に短時間に抽出が可能である。

3. 2 PCR 及び RT-PCR

細胞より抽出した DNA ウイルスゲノムの検出は、方法 2. 1 に従って行った。

3. 3 ウイルスの感染性の測定

ウイルス感染価は、それぞれのウイルスの指向性細胞に感染させて解析した。単純ヘルペスウイルスタイプ 1 (HSV-1)、ポリオウイルスは Vero 細胞を、ブタバルボウイルス (PPV) は ESK 細胞を、アデノウイルスは HeLa 細胞を用いて細胞変性を指標として調べた。

4. PEI-6MB セファロースカラムによるウイルス除去

平均分子量 10,000 の PEI を BrCN 活性化セファロース 6MB 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. 染色体解析

5. 1 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 KCl 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、火焰固定した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°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。

5. 2 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 に対して、DNA ポリメラーゼ及び DNase I 存在下、Sepctrum Green-dUTP または Spectrum Red-dUTP を用いたニックトランスレーションによる標識を行った。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 存在下に混合してプローブ液を作製した。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で処理した後、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。

5. 3 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 2 \times 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 2 \times SSC 液に浸潤し、75°C、5 分間変性させた。さらに、上記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 に静置し、ハイブリダイゼーションを行っ

た。

6. 細胞由来生理活性タンパク質の解析

6. 1 培養上清の調製

HL-60RG 細胞を ASF104 (味の素社) 中に 5 \times 10⁵ 個/mL になるよう懸濁し、37°C で3日間培養し(細胞終濃度約 2 \times 10⁶ 個/mL)、培養上清を得た。上清 200mL を Sartorius 社製、限外濾過装置(分画分子量 10,000)を用いて 2mL にまで濃縮した。濃縮液から Isogen (和光純薬)を用いてタンパク質を沈殿させ、塩等を除いた。各沈殿たんぱく質をイモビリンの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。

6. 2 培養上清及びヘパリンカラム吸着画分の調製

HL-60 細胞及び HL-60RG 細胞を ASF104 (味の素社) 中 37°C で2日間培養し(細胞終濃度約 9 \times 10⁵ 個/mL)、培養上清を得た。上清 1L を Amersham 社製、HiTrap Heparin HP カラムに添加し、1.5M 塩化ナトリウムを含む溶出バッファーで吸着画分を回収した。ヘパリンに結合した画分から、Isogen-LS (和光純薬工業)を用いてタンパク質を沈殿させ、塩等を除いた。

6. 3 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 ~ 10 NL、13cm (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検出した。

6. 4 2 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 Milli-Q 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 分間静置して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 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。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 回繰り返してすべての上清を集め、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 で可溶化し、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。

6. 5 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 -ヒドロキシケイ皮酸 (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。この試料について、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。

7. 細胞由来タンパク質の特性解析法の開発

7. 1 トロンボモジュリンのペプチドの調製

①還元カルボキシメチル化

脱塩、凍結乾燥したトロンボモジュリン (360 μ g) に、8M グアニジン塩酸塩、5mM EDTA を含む 0.5M Tris-HCl (pH8.6) を 360 μ L 加えて溶解した。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 7.56mg 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。

②トリプシン消化

還元カルボキシメチル化したトロンボモジュリン 120 μ g (トロンボモジュリン換算量) を 0.1M Tris-HCl (pH8.0) 120 μ L に溶かし、トリプシンを 2.4 μ g 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間消化した。LC/MS を用いたペプチド及び糖ペプチドのマッピングには、還元カルボキシメチル化したトロンボモジュリンのトリプシン消化物 2 μ g (トロンボモジュリン換算量) を用いた。

③K16 のヘキサースの結合位置の確認

トロンボモジュリン K16 (ピーク 10) を分取し (60 μ g、トロンボモジュリン換算量)、凍結乾燥後、0.1M Tris-HCl (pH8.0) 60 μ L に溶解し、1 μ g のキモトリプシンを加え、37 $^{\circ}$ C、40 時間消化した。消化物の分子量を LC/MS で分析した。

7. 2 トロンボモジュリンの糖鎖の調製

脱塩、凍結乾燥したトロンボモジュリン

(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 (pH7.2) 中で 37 °C、2 日間消化した。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、0.5M 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で分解し、pH7.0 に調整した後、ENVI-Carb (Supelco 社製) で脱塩した。

7. 3 フォリスタチンのペプチドの調製

①還元カルボキシメチル化

脱塩、凍結乾燥したフォリスタチン (100 μ g) に、8M グアニジン塩酸塩、5mM EDTA を含む 0.5M Tris-HCl (pH 8.6) (試料溶解溶液) を 243 μ L 加えて溶解した。さらに、2-メルカプトエタノール 1.8 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 5.1mg を試料溶解溶液 40 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。

②エンドプロテアーゼ Asp-N 消化

還元カルボキシメチル化したフォリスタチン 100 μ g (フォリスタチン換算量) を 25mM 重炭酸アンモニウム (pH 8.0) 200 μ L に溶かし、エンドプロテアーゼ Asp-N を 2 μ g 加え、37 °C で 20 時間消化した。LC/MS を用いたペプチド及び糖ペプチドのマッピングには、還元カルボキシメチル化したフォリスタチンのエンドプロテアーゼ Asp-N 消化物 3 μ g (フォリスタチン換算量) を用いた。

7. 4 t-PA の SDS-PAGE

8%ゲル (80 \times 80 \times 1.5mm) を用いて、25mM トリス塩酸塩、0.19M グリシン、0.1% SDS を含む泳動用緩衝中、30 mA で泳動させた。分離された t-PA は Simply Blue SafeStain を用いて検出した。

7. 5 t-PA のゲル内アルキル化

SDS-PAGE 後、t-PA を含むゲル片を切り出し、30%アセトニトリルを含む 25mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いて脱色後、アセトニトリルを加え脱水した。アセトニトリルを除去後、減圧濃縮遠心エバポレーター (Speed Vac) を用いて、ゲル片を乾燥させた。乾燥ゲル片に 10mM DTT を含む 25mM 重炭酸アンモニウム溶液 150 μ L を加え、56°C で 1 時間反応させた後、室温に戻した。還元化溶液を除いた後、25 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いてゲル片を洗浄した。洗浄用溶液を除いた後、55mM モノヨード酢酸ナトリウムを含む 25mM 重炭酸アンモニウム溶液 150 μ L を加え、室温で遮光下 45 分間反応させた。反応後、アルキル化溶液を除き、洗浄用溶液を用いてゲル片を洗浄し、50%アセトニトリルを含む 25mM 重炭酸アンモニウム溶液 (脱水用溶液) を用いてゲル片を脱水し、Speed Vac を用いてゲル片を乾燥させた。

7. 6 t-PA の糖鎖の調製 (ゲル内消化)

ゲル内アルキル化を行った乾燥ゲル片に PNGase F (3unit) を含む 50mM リン酸緩衝液 (pH7.2) 120 μ L を加え、37°C で 16 時間反応させた。反応後、ゲル片を含む反応液を超音波処理 (30 分間) し、遊離糖鎖を抽出・回収した。さらに、水 200 μ L を加え、超音波処理による抽出・回収を 3 回繰り返した。抽出液をすべて合

わせ、Speed Vac を用いて乾固させた後、0.25M 水素化ホウ素ナトリウム水溶液 200 μ L を加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、希釈した酢酸を用いて過剰の試薬を分解し、Envi-Carb を用いて脱塩した。

7. 7 t-PA のペプチド/糖ペプチドの調製 (ゲル内消化)

ゲル内アルキル化を行った乾燥ゲル片にトリブシン溶液 (10 μ g/mL、50mM 重炭酸アンモニウム) を加え、氷上で 30 分間放置し、ゲル片にトリブシン溶液を染み込ませた。余分なトリブシン溶液を取り除き、37 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。50%アセトニトリル及び 5%トリフルオロ酢酸水溶液 (抽出溶液) 300 μ L を加え、室温で 30 分間振盪し、ペプチドを含む抽出液を回収した。再度抽出操作を行った後、抽出液をすべて回収し、Speed Vac を用いて濃縮した。

7. 8 ウシ脳膜画分の調製

ウシ脳アセトンパウダー 0.5g にクロロホルム/メタノール混液 (2/1、v/v) 30mL を加え、ポリトロンを用いて 1,000rpm で 20 秒間均質化後、クロロホルム/メタノール混液をさらに 10mL 加え、室温で 1 時間放置した。遠心分離後 (3,000rpm、室温、10 分)、上清を除去し、沈殿をメタノール 30mL で 2 回洗浄した。洗浄した沈殿に 0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA 及び 1mM PMSF を含む 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) (均質化用緩衝液) 30mL を加え、ポリトロンを用いて 1,500rpm で 30 秒間均質化を行った。ウシ脳アセトンパウダー 4g 相当分を一つにまとめ遠心分離した (10,000 \times g、37 $^{\circ}$ C、20 分)。再度沈殿に均質化用緩衝液を加え (ウシ脳アセトンパウダー 4g に対し 120mL)、ポリト

ロンを用いて 1,500 rpm で 30 秒間均質化後、10% Triton X-114 を含む均質化用緩衝液 30mL を加え、4 $^{\circ}$ C で一晩攪拌し、膜画分の可溶化を行った。可溶化溶液を遠心分離後 (10,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、20 分)、上清を 37 $^{\circ}$ C で 10 分間放置後、遠心分離し (3,000rpm、30 $^{\circ}$ C、5 分)、Triton X-114 相と水相に分離した。得られた Triton X-114 相に均質化用緩衝液を等量加えて洗浄し、再び 37 $^{\circ}$ C で 10 分間放置後、遠心分離した (3,000rpm、30 $^{\circ}$ C、5 分)。得られた Triton X-114 相に冷アセトンを 4 倍量加え、-15 $^{\circ}$ C で一晩放置後、遠心分離し (3,000rpm、4 $^{\circ}$ C、30 分)、膜画分を得た。

7. 9 可溶化膜タンパク質画分の調製

得られた膜画分を 1% Triton X-100 を含む 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) に溶かし、ウシ脳アセトンパウダー 1g 相当量に対し、PIPLC 0.5unit を加え、37 $^{\circ}$ C で 4 時間消化した。反応溶液の 1/4 倍容の 10% Triton X-114 を加え (最終 Triton X-114 濃度 2%)、0 $^{\circ}$ C に冷却後、よく攪拌した。反応溶液を 37 $^{\circ}$ C に保温後、遠心分離し (3,000rpm、30 $^{\circ}$ C、5 分)、Triton X-114/水相分離を行った。Triton X-114 相を除いた後、水相に 10% Triton X-114 トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) を 1/4 倍容加えて洗浄した。水相に冷アセトンを 4 倍容加え、-15 $^{\circ}$ C で一晩放置後、遠心分離し (3,000rpm、4 $^{\circ}$ C、60 分)、可溶化膜タンパク質画分を得た。可溶化膜タンパク質画分は、さらに SDS-PAGE を用いて分離した。

7. 10 可溶化膜タンパク質の SDS-PAGE

8%ゲル (80 \times 80 \times 1.5mm) を用いて、

25mM トリス塩酸塩、0.19M グリシン、0.1% SDS を含む泳動用緩衝液中 30mA で泳動させた。分離されたタンパク質は Simply Blue SafeStain を用いて検出した。

7. 1 1 可溶化膜タンパク質のペプチド調製

SDS-PAGE で分離された可溶化膜タンパク質を含むゲル片を切り出し、t-PA と同様にゲル内アルキル化を行った後、ゲル内 PNGase F 消化により糖鎖を遊離・抽出した。糖鎖を切り出したゲル片に脱水用溶液を加え、10 分間振盪し、脱水用溶液を除去後、遠心型真空乾燥機を用いてゲル片を乾燥させた。乾燥ゲル片にトリプシン溶液を加え、t-PA と同様にゲル内トリプシン消化を行い、抽出溶液を用いてペプチドを含む抽出液を回収・濃縮した。

7. 1 2 可溶化膜タンパク質の糖鎖調製

ゲル内 PNGase F 消化により遊離・抽出した糖鎖を、t-PA と同様に還元・精製した。

7. 1 3 ペプチド/糖ペプチドマッピング

①ミクロ LC/MS

LC :

装置 : MAGIC 2002 システム (Michrom BioResources 社製)

カラム : Magic C18 (1.0×150mm、5 μ)

流速 : 50 μ L/min

検出波長 : 206nm

溶離液 A : 0.05% TFA を含む 2%アセトニトリル

溶離液 B : 0.05% TFA を含む 80%アセトニトリル

グラジエントプログラム :

トロンボモジュリンの場合 :

B 液 5~45% (0~40 分)

フォリスタチンの場合 :

B 液 5~35% (0~40 分)

エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) :

装置 : ESI トリプルステージ四重極化 MS/MS システム、TSQ7000 (Finnigan 社製)

測定 : ポジティブ及びネガティブイオンモード

シースガス : 70psi

オグジュラリーガス : 10unit

キャピラリー温度 : 225°C

マルチプライヤー : 1,200V

ESI 電圧 : 4,500V

スキャン範囲 : 400~2,400 (low mass range)、

1,000~4,000 (high mass range)

スキャン回数 : 4 秒 (low mass range)、6 秒 (high mass range)

②CapLC/MS

LC :

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

カラム : Magic C18 (Michrom BioResource 社製、0.2×50mm、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：206nm

ESI-MS：

装置：TSQ 7000 (Finnigan 社製)

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：1,200V

ESI 電圧：1,800V

スキャン範囲：400~2,400

スキャン回数：4 秒

7. 1 4 糖ペプチド選択的解析

①マイクロ LC/MS/MS

LC：7. 1 3 の①に準ずる。

ESI-MS/MS：

測定：ポジティブイオンモード

Set mass：657 (SA-Hex-HexNAc) または
366 (Hex-HexNAc)

シーガス：70psi

オグジュラリーガス：10unit

キャピラリー温度：225°C

ESI 電圧：4,500V

マルチプライヤー：1,500V

スキャン範囲：1,000~4,000

(high mass range)

スキャン回数：6 秒

衝突ガス：Ar、2.0mTorr

衝突エネルギー：-20eV

② CapLC/MS/MS

LC：7. 1 3 の②に準ずる。

ESI-MS/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：1,500V

ESI 電圧：1,800V

スキャン範囲：1,000~4,000

スキャン回数：6 秒

衝突ガス：Ar、2.0mTorr

衝突エネルギー：-20eV

7. 1 5 糖鎖プロフィール解析

LC：

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

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

溶離液 A：2%アセトニトリルを含む 5mM
酢酸アンモニウム水溶液
(pH8.5)

溶離液 B：80%アセトニトリルを含む 5mM
酢酸アンモニウム水溶液
(pH8.5)

グラジエントプログラム：

B 液 7~70% (0~60分)

流速：ポンプ 100 μ L/分、スプリッター
2500/1000

UV 検出波長：206nm

ESI-MS/MS：

装置：TSQ 7000 (Finnigan 社製)

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：1,200V

ESI 電圧：2,000V

スキャン範囲：700~2,400

スキャン回数：4秒

7. 1 6 LC/MS/MS による可溶性膜タンパク質の同定

可溶性膜タンパク質画分(ウシ脳アセトンパウダー600mg 相当量)を SDS-PAGE により分離し、分離されたタンパク質からゲル内消化によりペプチドを調製し、LC/MS/MS によるシーケンシング及びデータベース検索を行い、タンパク質の同定を行った。

LC：

装置：Ultra-Plus MicroLC System

(MichroTech 社製)

カラム：Magic C₁₈ (0.2×50mm)

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 5~95% (0~30分)

95% (30~35分)

流速：3μL/分

ESI-Q/TOFMS：

装置：API QSTAR Pulsar I (Applied

Biosystems 社製)

データベース：Mascot (Matrix Science 社)

7. 1 7 可溶性膜タンパク質画分の糖鎖プロファイル解析

可溶性膜タンパク質画分(ウシ脳アセトンパウダー600mg 相当量)を電気泳動法により分離し、分離されたタンパク質からゲル内消化により糖鎖を調製し、t-PA と

同様に糖鎖プロファイル解析を行った。

8. 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

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、がん細胞特異的プロモーター領域を同定するために欠失変異体を作製した。がん細胞として、A549 細胞 (ヒト肺がん上皮由来) は 5% FCS 含有 ERDF 培地を用いて培養した。HeLa (ヒト子宮頸がん由来)、HepG2 (ヒト肝がん由来)、SK-MEL-28 (ヒト黒色腫由来) 及び TIG-1 (正常線維芽細胞) 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は、試験の前日に 1×10^5 個/ウェルの細胞密度で、24 ウェルプレート上に播種した。次の日、昨年度報告した hTERT プロモーター-ルシフェラーゼコンストラクト及び pRL-SV40 を無血清 ERDF 培地で希釈し、PLUS-Reagent を加え、最終容量が 25μL になるように無血清 ERDF 培地を加えた。次に、この DNA と LipofectAMINE との混合溶液を室温で 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、各ウェル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、上記の DNA と LipofectAMINE

との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、細胞の培地を、血清を含まない新鮮な ERDF 培地に交換し、DNA と Lipofect AMINE との混合溶液 50 μ L を各ウェルへ添加した。細胞を 37 $^{\circ}$ C、3 時間インキュベートした。3 時間後、DNA と Lipofect AMINE との混合溶液を除き、5% FBS 含有 ERDF 培地を各ウェルへ添加した。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。

細胞抽出液の調製及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 を各ウェルへ加え、プレートを室温で 15~30 分間振盪し、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。引き続き同サンプルに対し、1 \times Stop & Glo Regent 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、平均値及び標準偏差値を算出して評価した。

8. 1 プラスミドの構築

E-box クラスタールシフェラーゼレポータープラスミドの構築

hTERT 遺伝子の第 2 イントロン内には、c-Myc 結合部位である E-box が多数存在していることが明らかになっている。そこで、この E-box クラスタ領域の取得を PCR により試みた。プライマーを用い、hTERT のゲノム DNA を鋳型として、94 $^{\circ}$ C、1 分間の後、98 $^{\circ}$ C、20 秒；65 $^{\circ}$ C、2 分間を 30 サイクル、最後に 72 $^{\circ}$ C、10 分間の LA PCR 反応を行った。PCR 産物はそれぞれ E-box 1、2、3 と命名した。この時使用したプライマーの 5' 末端には無作為な 4 塩基に続き *Xba*I 認識配列を付加した。また、Taq ポリメラーゼは、LA Taq を使用した。次に、これらの PCR 産物を TA クローニング用のベクターである pGEM-T Easy vector へサブクローニングし、*Xba*I 消化により、E-box 1、2、3 の断片を取得した。このようにして得られた断片を、pGL3-Promoter (Promega 社) の *Nhe*I 部位へ挿入した。この時用いた pGL3-Promoter は、SV40 プロモーター制御下でホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現誘導できるため、エンハンサー領域の特定に適している。

8. 2 E-box 変異導入 hTERT プロモータールシフェラーゼレポータープラスミドの構築

hTERT コアプロモーター領域に存在する 2 個の E-box (-239bp 及び -34bp) への変異導入は、GeneEditor in vitro Site-directed Mutagenesis System を用いて行った。変異導入用オリゴヌクレオチドに、T₄ ポリヌクレオチドキナーゼと ATP を加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間、次に 70 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートし、変異導入用オリゴヌクレオチドの 5' 末端のリン酸化

を行った。ハイブリダイゼーション反応は、アルカリ変性させた2本鎖DNAテンプレート、新しい抗生物質耐性獲得用オリゴヌクレオチド、変異導入用オリゴヌクレオチド等を加え、75°Cで5分間、室温で30分間インキュベートして行った。さらに、T₄ DNAポリメラーゼ、T₄ DNAリガーゼ等を加え37°Cで90分間インキュベートして変異鎖の合成を行った。形質転換は、BMH71-18mutS コンピテントセルに対してプラスミドを加え、水中で30分間、42°Cで47秒間、再び水中に移し2分間インキュベートした後、培地を加え、37°Cで60分間振盪培養した。この培養液を抗生物質含有LB培地に加え、37°Cで16~18時間培養した。この培養液からプラスミドを抽出した。さらに、JM109 コンピテントセルに対して、プラスミドを加え、水中で30分間、42°Cで、47秒間、水中で2分間インキュベートした後、培地を加えて37°Cで60分間振盪培養した。抗生物質(アンピシリン等)含有LBプレートにプレーティングし、37°Cで12~14時間培養した。プラスミド抽出を行った後、シーケンスにより陽性クローンを選択した。目的断片をXba I消化により切り出し、pGL-3BasicのNhe I部位へ挿入し、pGL3b-286 (EboxMut)を構築した。

8. 3 エフェクタープラスミドの構築

c-mycのATGの上流側にEcoR I認識配列をPCRにより付加し、このc-mycのcDNAをpGEM-T Easy vectorにサブクローニングした。EcoR I消化によりc-myc cDNAを切り出し、pcDNA3/HAのEcoR I部位へ挿入した。このc-myc発現ベクターをpcDNA3/HA-c-mycと命名

した。PEMBL-hMyoDをEcoR Iで消化し、MyoD cDNAを切り出し精製した。このMyoD cDNAをpcDNA3のEcoR I部位へ挿入し、pcDNA3-MyoDと命名した。PUC-hIRF-1をBamH I、Xho Iで消化し、IRF-1cDNAを切り出し精製した。このIRF-1 cDNAをpcDNA3のBamH I、Xho I部位へ挿入し、pcDNA3-IRF-1と命名した。

8. 4 トランスフェクション

トランスフェクション操作は、Life Technologies社製の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100,000個/ウェルの細胞密度で、24ウェルプレート上に準備した。次の日、コンストラクトを無血清ERDF培地で希釈し、PLUS-Reagentを加えてプロトコールに従って実施した。PRL-TKは、ウミシイタケルシフェラーゼをチミジンキナーゼプロモーター制御下に組み込んだベクターであり、各ウェル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。

9. 生分解性高分子ポリ乳酸及びポリウレタン材料上で分離されたBALB/3T3細胞由来形質転換巢の遺伝子発現プロファイル解析

マウスBALB/3T3細胞のA31-1-1株を黒木登志夫博士(東京大学医科学研究所)より供与を受けた。細胞を10%牛胎児血清を添加したMEM培地で、5%炭酸ガス、37°C条件下で培養した。

高分子材料:ポリウレタン(MDI/PTMO 1,000/BD)、重量平均分子量40,000と80,000の2種)は三洋化成社より、ポリ

乳酸フィルム (PLLA; 厚さ 0.3mm、重量平均分子量 200,000) は島津製作所より入手した。

9. 1 トランスフォーメーション試験

材料をコートしたシャーレに、細胞を 1×10^4 /シャーレの細胞密度で播種し、1週間に2回培地交換を行いながら、6週間培養を続けた。誘発された形質転換巣を分離し、 -80°C で保存した。保存した複数の形質転換巣のうち、ポリウレタン (PU) 上で分離された2個 (A5、A6) と、PLLA 上で分離された2個 (L11、L21) を解凍、増殖させ、DNAチップを用いる遺伝子発現解析、トランスフォーメーションの確認実験、及び染色体数の解析を併行して実施した。トランスフォーメーションの確認実験では、3-メチルコランスレン (3-MC、 $0.5\mu\text{g/mL}$) を陽性対照物質として用い、細胞をプラスチックシャーレで培養し、6週間後の形質転換巣の数を計数した。

9. 2 DNAチップを用いる遺伝子発現解析

親株 (A3111) 及び4個の形質転換巣を増殖させ、 10^7 以上の細胞を回収し、すぐに液体窒素で凍結させた。RNAの抽出、精製、収量及び純度の測定、並びにcDNAプローブの合成は Atlas Pure Total RNA Labeling System を用いてプロトコールに従って実施した。 ^{32}P 標識プローブのDNAチップへのハイブリダイゼーション及び洗浄は Atlas cDNA Expression Arrays を用いて実施した。ハイブリダイゼーション後のDNAチップのシグナルはホスフォイメージで取り込んだ後、AtlasImage ソフトウェアを用いて解析した。より確実な発現の変化のみを検討対象

とするために、原則として親株に対して5倍以上の発現変化を示した遺伝子について比較検討を行った。

10. 望ましくない免疫反応の検出技術開発に関する研究

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日及び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。

次に、修飾ポリウレタンコート膜内に免疫担当器官である脾臓を埋入したときの長期 *in vivo* 免疫応答について、以下の4群を設けて、12週及び24週目に観察した。

第1群: シャムオペレーションのみを行った Lewis 系ラット群 (コントロール群)。

第2群: 修飾ポリウレタン被覆コートした (MPU-PP) 袋のみを Lewis 系ラットの腹腔内に埋入した群 (バッグ群)。

第3群: Brown-Norway ラット (ドナー) の脾臓をそのまま直接 Lewis 系ラット (レシビエント) の腹腔内に埋入した群 (脾臓群)。

第4群: 修飾ポリウレタン (MPU) で片面を被覆コートしたマイクロメンブレ

ン (MPU-PP) 袋に Brown-Norway 系ラット (ドナー) の脾臓器官を入れて、袋の口をシールし、Lewis 系ラット (レシビエント) の腹腔内へ埋入した群 (脾臓+バッグ群)。

各群 8 匹のラットを用い、埋入後 12 週目と 24 週目に各 4 匹ずつの Lewis ラットについて、以下の項目の解析・評価を実施した。血液中のリンパ球のサブセット (CD4/CD8) の FACS 解析、並びにレシビエントの血中リンパ球からの TNF- α 、INF γ 、IL-4 及び IL-13 を ELISA 法で測定し、各群間で比較し、レシビエントの免疫応答を調べた。

1 1. タグ付き ECFP を用いた血液存在下での FAsH 結合条件の検討

1 1. 1 タグ付き ECFP の作製

タグペプチド AEAAAREACCRECCARA の FAsH との結合性を簡便に調べるために、緑色蛍光タンパク質 (GFP) の改変型である ECFP の C-末端に上記タグペプチドを融合したタンパク質を作製した。タグ付きタンパク質遺伝子は、以下のプライマー : 5'-GCCGAATTCTTAGGCCCTGGCGCACTCCCTGCAGCAGGCCTCCC TGGCGGCGGCCTCGGCCTTGTACAG CTCGTCCATGCCG-3' 及び ECFP の更の下流のプライマーとのセットを用いて PCR 法で作製した。作製した遺伝子を、*Hind* III 及び *Eco*R I の制限酵素部位で pcDNA3 ベクター (Invitrogen 社) に挿入した (ECFP-TG pcDNA3)。タグ付きタンパク質は大腸菌中で発現させ、ポリヒスチジンタグを用いて精製し、さらに Ultrafree-4 フィルター (Millipore 社) で

脱塩し、100mM HEPES に再懸濁して用いた。

1 1. 2 タグ付タンパク質への FAsH の結合の測定

通常、タグ付タンパク質を PBS (pH7.3) で 2 倍希釈したラット血清及び PBS に 0.5 μ M の濃度で溶解した後、1,2-エタンジチオール (EDT) を加えた。この溶液を 15 分以上静置した後、2-メルカプトエタノール を添加し、さらに FAsH-EDT₂ を加え、440nm の励起光による 540nm の蛍光を測定した。

1 2. FAsH 結合性タグを付加した TNF- α の検討

1 2. 1 FAsH 結合性タグを付加した TNF- α 発現プラスミドの作製

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 NE 緩衝液、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 T₄ DNA Ligase Buffer、1 μ L ベクター、3 μ L インサート、0.8 μ L T₄ DNA リガーゼを加えた全量 10 μ L の超純水溶液中で 17°C、2 時間以上インキュベートすることによりライゲーションを行った。

1 2. 2 形質転換

Competent Cell high E.coli DH5 α (東洋紡績社) 20 μ L と TNF- α 発現プラスミド 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分間水中で冷却し、SOC培地(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。

1 2 . 3 発現用プラスミドの調製

1 2 . 2の大腸菌培養液からアルカリミニプレップ法により調製した発現用プラスミドを、0.7%アガロースゲルで電気泳動によるサイズの確認及び塩基配列の確認を行った。解析はABI PRISM 310 Collectionソフトで行った。

1 2 . 4 融合タンパク質の発現

HeLa細胞をペニシリン100units/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ディッシュで37°C、5% CO₂/95%空気相下で培養した。継代には0.25%トリプシン-1mM EDTAを用いた。用意したプラスミドをHeLa細胞へトランスフェクトした。トランスフェクトはQIAGEN Effectene Transfection Reagentを用いて行った。

1 2 . 5 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。プロットニング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。

1 2 . 6 細胞障害活性測定

測定にはTNF- α に強い感受性をもつマウスL929細胞を用い、10% FCS-MEMEで培養した。TNF- α を発現させた細胞の培養培地を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ディッシュでサブコンフルエントに培養したマウスL929細胞をトリプシン-EDTA処理して集めて、12mLの培地に浮遊した。これを100 μ Lずつ分注して、37°C、5% CO₂/95%空気相下で12~20時間培養した。顕微鏡で細胞の状態を確認した後、10分の1量のアラマブルーを添加し、37°C、5% CO₂/95%空気相下で3~4時間培養した後、530nm励起による590nm蛍光を測定した。

1 2 . 7 蛍光スペクトルの測定

トランスフェクトしたHeLa細胞の培養液をチューブに採り、13,000 \times gで遠心し、上清のみ回収した。FlAsHによる標識は通常は2-メルカプトエタノール1mM、FlAsH-EDT₂ 1 μ M、EDT(1,2-エタンジチオール) 10 μ Mとなるように添加し、反応を行った。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。すなわち、緩衝液として100mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4 at 4°C)に対して分画分子量12,000~14,000の半透膜で透析を約24時間行い、その後分画分子量5,000の限外濾過膜で濃縮し、0.5M Tris-HCl緩衝液(pH7.2)で200 μ Lに調整した後、測定した。

1 3 . 血管内皮前駆細胞の特性解析に関する研究

1 3 . 1 AC133とCD34の二重染色

1.2Lの血液より分離した約40mLのバ

フィーコートあるいは臍帯血を 2mM EDTA を含む PBS(-) で 2 倍希釈し、リンホプレップチューブを用いて、2,200rpm、18°C、20 分で遠心後、単核球分画を単離し、0.5% BSA、2mM EDTA を含む PBS(-) (分離バッファー) に浮遊させた。単核球を分離バッファーで洗浄後、再び 200 μ L の分離バッファーに再浮遊させた。フィコエリスリン標識抗 AC133 抗体 (Milteny Biotec 社) と FITC 標識抗 CD34 抗体 (Milteny Biotec 社) を用いて単核球懸濁液を 4°C、30 分間二重染色した。細胞を洗浄後、フローサイトメーターで解析した。

13.2 AC133 及び CD34 陽性細胞の分離

上記のように末梢血あるいは臍帯血の単核球分画を単離し、分離バッファーに浮遊させた。単核球を分離バッファーで洗浄後、再び 200 μ L の分離バッファーに再浮遊させた。AC133 陽性細胞を分離する場合は、AC133 マイクロビーズ分離キット (Milteny Biotec 社) を用い、抗 AC133 抗体・マイクロビーズと 4°C、30 分間反応させた。CD34 陽性細胞を分取する場合は、一次抗体 (ニチレイ社) と 4°C、15 分間反応させた後、細胞を洗浄した。ついで、二次抗体である抗 IgG 抗体・マイクロ磁気ビーズと、4°C、15 分間反応させた。各陽性細胞の分離は、Auto MACS (Milteny Biotec 社) を用いて行った。分離した AC133 あるいは CD34 陽性細胞は 20% ウシ胎児血清 (FBS)、50ng/mL 血管内皮細胞成長因子 (VEGF) を含む EBM-2 培地に浮遊させ、フィブロネクチンをコートした 24 穴あるいは 48 穴のマルチウエルに分注し、培養した。

13.3 DiI-アセチル LDL の取り込み

AC133 あるいは CD34 陽性細胞を 2 週間培養後、接着した細胞を PBS(-) で 3 回洗浄した。10 μ g/mL DiI-アセチル LDL を含む 1% BSA-PBS(-) を加え、37°C、1 時間インキュベートし、DiI-アセチル LDL を細胞内に取り込ませた。細胞を洗浄後、4%パラホルムアルデヒドを含む PBS(-) で固定し、共焦点顕微鏡にて励起波長 545nm、蛍光波長 560nm で観察した。

13.4 間接蛍光抗体染色

Von Willebrand 因子の観察では AC133 あるいは CD34 陽性細胞を 2 週間培養後、細胞を PBS(-) で 3 回洗浄した。1% BSA-PBS(-) で、4°C、1 時間ブロッキングし、FITC 標識抗 Von Willebrand 因子抗体を含む 1% BSA-PBS(-) を添加し、4°C、1 時間反応させた。細胞浮遊液を PBS(-) で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド-PBS(-) で固定した後、共焦点顕微鏡にて励起波長 488nm、蛍光波長 505~550nm で観察した。

内皮細胞の特異的表面抗原として CD31、flk-1、Tie2 を、細胞内指標として非誘導型血管内皮 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 を選び、各々発現の解析のために、細胞を-20°Cのエタノールで固定し、観察する日まで-20°Cで保存した。観察を行う日に、細胞を氷上に静置し、PBS(-) で 3 回洗浄した。1% BSA-PBS(-) で、4°C、1 時間ブロッキングし、各種抗体を含む 1% BSA-PBS(-) を添加し、4°C、1 時間反応させた。細胞浮遊液を PBS(-) で洗浄し、FITC 標識抗 IgG 抗体あるいはローダミン標識抗 IgG 抗体