

と反応させた。さらに、細胞浮遊液を洗浄後、共焦点顕微鏡にて観察した。得られたそれぞれの画像の蛍光強度はシオンイメージソフトを用いて定量的に解析した。

### 13.5 臍帯血と末梢血由来 AC133 陽性細胞の増殖能の比較

臍帯血と末梢血より得た AC133 陽性細胞を、20%ウシ胎児血清 (FBS)、50ng/mL 血管内皮細胞成長因子 (VEGF)、50ng/mL トロンボポエチン (TPO)、50ng/mL 幹細胞成長因子 (SCF) を含む EBM-2 培地に同じ密度になるように浮遊させ、コラーゲンタイプ IV をコートした 24 穴のマルチウェルに分注し、6 日間培養した。細胞数は血球計算盤を用いて計測した。

### 13.6 浮遊細胞の CD31 発現の免疫染色と細胞分画

AC133 陽性細胞をコラーゲンタイプ IV 上で、VEGF、TPO、SCF 存在下、培養を行った。細胞を回収して、氷上に静置し、PBS(-)で洗浄した。1% BSA-PBS(-)で、4°C、1 時間ブロッキングし、FITC 標識抗 CD31 抗体 (Pharmingen 社) 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、フローサイトメーターで CD31 の発現を解析した。さらに、セルソーターを用いて、CD31 強陽性細胞、陽性細胞、陰性細胞を分画した。なお、分画した細胞はフィブロネクチンをコートしたディッシュ上で VEGF 存在下、さらに 1 週間培養した。

### 13.7 管腔形成

臍帯血 AC133 陽性細胞由来 CD31 強陽性細胞をフィブロネクチンコートしたディッシュで VEGF 存在下 1 週間培養した。接着細胞をトリプシン処理して集め、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 培地に浮遊させた。EBM-2 培地を等量に混合し、37°C、4 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内でゲル化したマトリゲル (BD Pharmingen 社) 上に細胞浮遊液を加えて、VEGF 存在下 2 週間培養した。

### 14. 肝幹細胞 (小型肝細胞) の特性指標に関する研究

#### 14.1 成熟及び小型肝細胞の調製とその発現タンパク質の分析

コラゲナーゼ灌流法により調製した細胞懸濁液を 50g×1 分間遠心した。沈殿した肝細胞を培地に懸濁後、同様な遠心操作を 3 回繰り返して洗浄し、成熟肝細胞を得た。成熟肝細胞懸濁液を 45%パーコール密度勾配で 50g×10 分間遠心して細胞を沈殿させ、精製した。一方、成熟肝細胞調製時の各遠心上清を集め、150g×5 分間遠心した。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懸濁後、同様な遠心操作を 3 回繰り返した。沈殿した細胞を懸濁後、50g×2 分間遠心して小型肝細胞を得た。小型肝細胞懸濁液を 45%パーコール密度勾配で 50g×24 分間遠心して細胞を沈殿させ、精製した。

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°C 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 次元電気泳動及び目的タンパク質の質量分析による同定は、方法の 6 により行

った。

#### 14.2 細胞質画の調製

小型及び成熟肝細胞を2倍量(v/v)の細胞破碎用緩衝液(50mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、1/100量(v/v)プロテアーゼ阻害剤カクテル、10mM EDTA、0.5% Triton X-100)に懸濁し、室温で15分間あるいは4℃で3時間振盪した。細胞懸濁液を氷水中で15秒5回超音波処理し、100,000×g、1時間遠心することにより細胞質画分を調製した。サンプルは使用するまで-70℃で保存した。なお、サンプルのタンパク質濃度は Biorad protein assay kit で測定した。

#### 14.3 ウェスタンブロット解析

細胞質画分(25µg)をSDS・ポリアクリルアミド電気泳動し、セミドライブロットティング装置を用いてPVDF膜に転写した。5%スキムミルクで膜をブロッキング後、ヒト抗アネキシンIIIウサギ抗血清(抗アネキシンIII抗体、Russo-Marie博士から供与)を用いてウェスタンブロットティングを行い、アネキシンIIIの検出を行った。

#### 15. ポリ乳酸とεカプロラク톤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

マウス胚性幹細胞株であるATDC5細胞10,000個/ウェルの24ウェルプレートを用いて、維持培地中で37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養した。3日後、軟骨分化誘導のため、分化培地(10µg/mL牛シインスリン含有維持培地)に切り替えて、さらに11~14日間培養した。ポリ乳酸もこのタイミングによりインスリン存在下・非存在下で添加した。2日に一度培地交換を行った。軟骨分化の程度はアルシアンブルー染色

とRT-PCRを用いて評価した。培養終了後、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。

#### 15.1 RT-PCR

ATDC5細胞から全RNAをTRIzol試薬を用いて抽出し、SuperScriptIIを用いて逆転写反応を行った。コラーゲンタイプII遺伝子とGAPDH遺伝子についてPCRを行い、PCR産物について2%アガロースゲル電気泳動を行った。

#### 15.2 トランスグルタミナーゼ活性測定

分化誘導処理を行ったATDC5をPBSで洗浄後、回収し、超音波破碎した。遠心して不溶性膜画分を除去し、細胞質画分を得た。トランスグルタミナーゼ活性は固相マイクロタイタープレートアッセイで測定した。

#### 16. 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。本研究では、ポリエチレンイミン (PEI) 磁気ビーズが、主としてエンペロブウイルスの濃縮に有効であることを見出した。

Vero 細胞に感染させたシンドビスウイルス、ESK 細胞に感染させたブタバルボウイルス (PPV)、CV-1 細胞に感染させた SV40 ウイルスの上清を段階希釈し、その 100 $\mu$ L 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 1 mL に 10mg/0.1mL のポリエチレンイミ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 3 に示す。SV40 ウイルスやシンドビスウイルスの場合、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回っていた。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方が、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、効率よくウイルスが濃縮されていることが示された。一方、PPV 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。

次いで、ウイルス感染価を指標として PEI 磁気ビーズによる濃縮を検討した。Vero 細胞に感染させた単純ヘルペスウイルス (HSV)、ポリオウイルス、シンドビ

スウイルス及び水泡性口内炎ウイルス (VSV) の培養上清、並びに ESK 細胞に感染させたブタバルボウイルス (PPV)、CV-1 細胞に感染させた SV40 ウイルスの各 1 mL の培養上清に、PEI 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、PEI 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。PEI 処理を行った SV40 ウイルス、HSV、VSV 及びシンドビスウイルスの上清のウイルス感染価は、元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殆どが PEI 磁気ビーズに結合したと考えられる。一方、PPV 及びポリオウイルスでは、PCR による検出同様、PEI に結合していないことが明らかになった。

PEI 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<sup>8</sup> から 10<sup>9</sup> コピー数の HSV-1 及びシンドビスウイルス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 4)。添加したビーズ量が 0.1~10 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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、SV40 ウイルス及びシンドビスウイルスの濃縮を行った。図 5 に示すように、50%血清存在下で濃縮を行うとウイルス濃縮効率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、PEI 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の可能性について検討した。図 6 に、HSV-1 やシンドビスウイルスの培養上清の 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 PEI 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 ウイルスであるシンドビスウイルスでは、100 倍濃縮を行った場合に 1,000 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、PEI 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、複数のウイルスが共存した場合にも PEI 磁気ビーズによる濃縮が可能か検討した。図 7 に示すように、SV40 ウイルス、シンドビスウイルス及び HSV-1 を混合し、PEI 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

PEI 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、脂質膜を持たない非エンベローブウイルスである。そこで、スルホン酸磁気ビーズを用いた非エンベローブウイルスの濃縮作用について検

討を行った。PEI の場合と同様に、各ウイルスを感染させた細胞 1mL の培養上清に 100 $\mu$ L のスルホン酸磁気ビーズを添加し、さらに 5mM CuSO<sub>4</sub> 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 $\mu$ 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 8 に示すように、シンドビスウイルスの培養上清では 10<sup>-4</sup> 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<sup>-4</sup> 希釈してもまだウイルスバンドは検出できた。また、PPV でも同様に、10<sup>-6</sup> 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<sup>-6</sup> 希釈してもまだウイルスバンドが検出できた。さらに、ポリオウイルスの培養上清では 10<sup>-8</sup> 希釈した場合に殆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<sup>-4</sup> 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 4 に示す。スルホン酸磁気ビーズ処理を行ったシンドビスウイルス、PPV 及びポリオウイルスの上清のウイルス感染価は、元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。

次いで、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の可能性について検討した。図 9 に、ポリオウイルス及び 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。ポリオウイルス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通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 PEI 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 10 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、PEI 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. ウイルスの感染性の迅速・高感度検出法の開発

感染性ウイルスを高感度に検出するために、まず指向性細胞へウイルスを感染させた後、細胞内で増幅したウイルスゲノムを迅速かつ効率よく抽出し、抽出したウイルスゲノムを PCR によって増幅し検出する技術開発を目指した。このために、まず細胞に感染させたウイルスゲノムを迅速かつ高効率に抽出する手法を開発した。従来の有機溶媒等を用いる核酸抽出法を細胞からのウイルスゲノム調製に適用しようとしても、タンパク質の妨害、あるいは染色体 DNA が抽出の過程でゲル化等を起こし粘性が増加してしまうためなどの理由から大量の細胞を処理することが不可

能であった。また、細胞内にわずかにしか存在しないウイルスゲノムに対して従来の核酸抽出法では十分な回収率が得られなかった。そこで、Gene Ball を用いた核酸抽出法を開発した (図 1)。本法では、細胞懸濁液ないしは沈殿させた細胞に Gene Ball を入れ、酵素液を加えて細胞の破碎を行い、核酸を抽出する。Gene Ball 存在下に、抽出した DNA/RNA 溶液中に非極性溶媒を添加することにより DNA/RNA を沈殿・不溶化させると同時に Gene Ball への吸着を起こさせるものである (図 2)。すなわち、核酸の抽出/沈殿/吸着操作を 1 つのチューブの中で一連の操作として行うことにより、核酸のゲル化による粘性の増加を起こさず、すばやく DNA/RNA を Gene Ball に吸着させるものである。まず、本法の核酸回収法としての有用性について検討を行った。表 5 は、Gene Ball の吸着能の安定性を示すデータである。白血球からの DNA 抽出を 10 回繰り返したところ、DNA の回収率、 $OD_{260nm}$  と  $280nm$  の比、 $OD_{260nm}$  と  $230nm$  の比のいずれの値も非常に安定していた。また、同様に Gene Ball を用いて白血球から抽出した DNA を 1% アガロース電気泳動で分離したところ、6 回の繰り返し実験でも同様の泳動パターンを示し、質的にも安定した DNA 回収が可能であった (図 11)。さらに、抽出に供した細胞数と回収された DNA 量は非常によく相関しており、また、少量の細胞からでも定量的に DNA を回収できることが明らかになった (図 12)。

次に、他の市販の核酸抽出キットと本法の比較を行った。表 6 に示すように、4 種

類の市販キットに比べてDNAの回収率にして2~8倍程度高いことが示された。また、それぞれの方法で回収したDNAの純度をOD260nmと280nmの比から比較したところ、本法を用いて回収されたDNAが最も高い値であった。さらに、各市販キット及びフェノール/クロロホルム抽出、あるいはガラス棒を用いる方法等を用いて抽出したDNAをパルスフィールド電気泳動して、そのサイズを比較した(図13)。その結果、複数の核酸抽出キットでは非常に断片化したDNAのみが回収されていることが明らかになった。これらのキットは抽出操作のなかで機械刺激による細胞破碎等を行っており、これらのキットでは、抽出操作中にDNAの断片化を起こしているものと考えられた。以上の結果より、Gene Ballを用いる核酸抽出法はDNAを断片化することなく純度の高いDNAを高い回収率で得ることができる方法であることが示された。また、RNAの回収についても同様の結果が得られている。最も重要な点は、細胞からの核酸の抽出操作を一連の操作として行うために粘性の増加やDNAのゲル化を起こさず、大量の細胞から一度に核酸を回収することが可能な点である。特に、非常に感染価の低いウイルス試料を用いてその感染性を調べる場合には、できるだけ多くの細胞に試料を感染させることが感度を高めることになり、大量の細胞から核酸を抽出できることは非常に重要な要素である。Gene Ball法では、 $1 \times 10^7$ 細胞からの核酸抽出も全く問題なく行うことが可能であった。

図14は、Vero細胞にポリオウイルスを感染させたときの細胞内ウイルスゲノム

の増幅をリアルタイム RT-PCRにより時間を追って定量した結果である。細胞内のウイルスゲノムコピー数は、感染直後では比較的低かったが、感染後3時間前後から急激に増加し、24時間後にはプラトーに達した。同様の結果はHSV-1についても得られている。図15は種々の感染価のHSV-1を感染させたVero細胞より核酸を抽出しリアルタイムPCRで定量した結果(infectivity PCR)と細胞変性を指標とする手法(CPE)の比較を行った結果である。図15左は、種々の力価のHSV-1を感染させた後、1日、2日、4日目の細胞からウイルスゲノムを抽出しリアルタイムPCRで陽性となった比率を示している。3/3はすべてが陽性になったことを示し、0/3は3検体すべてが陰性であることを示している。図から明らかのように、20pfuのウイルスを感染させた場合には、1日目でもすべての試料でウイルスが検出できた。また、0.2pfuでも4日目にはすべてが陽性になった。一方、CPEでは感染後4日目でも検出限界は20pfuであった(図15右)。以上の結果から、Gene Ball法を用いたinfectivity PCRによりHSV-1の感染性を迅速・高感度に検出できることが示された。一方、RNAウイルスであるポリオウイルスについての解析結果を図16に示したが、RNAウイルスの場合にもCPEによる測定に比較して、非常に迅速・高感度にウイルス感染価を測定することが可能であった。また、同様の結果は、ブタバルボウイルスやアデノウイルスについても得られており、Gene Ball法を利用したinfectivity PCRによるウイルス感染性の測定法の有用性が示された。

#### 4. 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

PEI 磁気ビーズが効率よくウイルスを濃縮可能なことより、PEI 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 17 に示すように、HSV、SV40 ウイルス、シンドビスウイルス、PPV を HL-60 細胞懸濁液にスパイクして PEI セファロース 6MB カラムにアプライした。その結果、本法により HSV、SV40 ウイルス、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、PEI セファロース 6MB にアプライした細胞の 50~60%が吸着されることが明らかとなった。すなわち、PEI 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もつことが明らかになった。

#### 5. モデル細胞への各種染色体解析の組み合わせの適応

##### 5. 1 細胞の G-バンド解析

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ですが、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。

この HL-60 細胞と HL-60RG 細胞の遺伝的性質の差異を明らかにすることは、白血病細胞の増悪化の変化過程を解明することにもつながる可能性があり遺伝的性質の解析モデルとして有用と考えられた。そこで、HL-60 細胞と HL-60RG 細胞の G-バンド染色による染色体解析を行った。図 18 に示すように、HL-60 細胞では染色体数は 45 ないしは 46 であったが、HL-60RG 細胞では 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、染色体数は 43 あるいは 44 と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 HL-60 細胞では認められた。一方、HL-60RG 細胞において、HL-60 細胞と異なる特徴的な G-バンド染色結果としては、9 番染色体 q13 に由来不明の染色体断片の挿入、及び 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認められた。言い換えば、この G-バンド解析から、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。

##### 5. 2 CGH 解析による細胞の染色体解析

CGH 法は、染色体すべての領域についてゲノムコピー数の変化を検出する測定

法である。この CGH 法による解析を HL-60 細胞と HL-60RG 細胞に適用したところ、図 19 に示すように、HL-60 細胞では 5 番染色体長腕の部分欠失、8 番染色体末端部の顕著な増幅、9 番及び 10 番染色体短腕の部分欠失、13 番染色体の長腕の増幅、17 番染色体短腕の部分欠失が認められた。G-バンド解析からは 17 番染色体は 1 本しか認められないことから、CGH 解析の結果と併せて考えると、その一部が他の染色体に転座していることが推測された。一方、HL-60RG 細胞の CGH 解析で HL-60 細胞と大きく異なる点は、8 番染色体末端の増幅がきわめて小さくなっていること、及び 9 番染色体の部分欠失幅の増大化と 11 番染色体短腕の部分欠失であった。9 番、11 番染色体の変化は G-バンド染色による結果とよく一致していた。

### 5.3 マルチカラー-FISH (m-FISH) 解析による細胞の染色体解析

各染色体のプローブを複数の蛍光色素の組み合わせにより染色し、各染色体を疑似カラーで分別染色する染色体解析法が m-FISH である。HL-60 細胞及び HL-60RG 細胞の m-FISH 解析を行った。図 20 に示すように、HL-60 細胞の 5 番染色体が部分欠失し、そこに 17 番染色体の一部が転座していることが認められた。9 番染色体、14 番染色体及び 16 番染色体の末端に複数の染色体の転座が認められた。10 番染色体と 13 番染色体の転座に由来する 10 番派生染色体が認められた。また、18 番染色体の過剰が認められることもあった。一方、HL-60RG 細胞において HL-60 細胞と異なる点は、9 番染色体に 8

番染色体の一部が挿入されていること、及び 11 番染色体と 13 番染色体の転座に由来する 11 番派生染色体であった。

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 21 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 プローブを組み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 22)。

### 6. 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解析

モデル細胞として HL-60RG 細胞を用いて、イモビリン 2 次元電気泳動法による細胞由来タンパク質プロファイルの解析を行った。図 23 に HL-60RG 細胞の培養上清のタンパク質を 2 次元電気泳動で分離したスポットから得た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。ここで得られた各ペプチドの質量数から Mascot 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 24 に示した

ように、17種類のタンパク質についてPMF法による帰属の推定に成功した。

サイトカインや増殖因子はヘパリンに親和性をもつことから、HL-60細胞とその亜株であるHL-60RG細胞を採り上げ、それぞれの細胞の培養上清中にあるヘパリンへの親和性の高いタンパク質を2次元電気泳動で分離することを試みた。その結果、図25に示すように、それぞれの泳動パターンに明らかな差異が認められた。また、PMF法による帰属の推定を行ったタンパク質を図中に丸印で示した。aはHL-60、HL-60RG共通に認められ、プロテインジスルフィドイソメラーゼと推定された。bはHL-60の培養上清にはあるが、HL-60RGではみられないタンパク質である。このタンパク質はPMF法により補体D因子と推定された。cはHL-60RGでのみ認められ、モエシンと推定された。さらに、PMF法により帰属の推定をした17種類のタンパク質は、その位置を図25中に数字で示した。また、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の位置を星印で示した。

## 7. 細胞由来タンパク質の特性解析法の開発

### 7.1 ミクロLC/MSを用いたペプチド/糖ペプチドマッピング

#### 7.1.1 ミクロLC/MSによるトロンボモジュリンのペプチド/糖ペプチドマッピング

cDNAから予想されるトロンボモジュリンの1次構造を図26に示す。アミノ酸配列から、Asn29、97、98、364、391にN-結合型糖鎖が付加している可能性が考

えられる。また、トロンボモジュリンのC末端側には複数のO-結合型糖鎖が結合していることが知られている。これらの点を踏まえて、ペプチド/糖ペプチドマッピングを行うにあたっては、1つのペプチドに糖鎖結合部位が複数含まれないように消化酵素としてトリプシンを選択した。トリプシン消化によって得られることが予想されるK1~K23のペプチド断片は、図26の通りである。

トロンボモジュリンには多数のS-S結合が存在し、プロテアーゼの作用を受けにくいことから、まずS-S結合を還元カルボキシメチル化により切断・保護した。次にトリプシン消化を行ったが、この際、長時間反応させると予期しない分解が進み、得られるクロマトグラムが複雑になり、ピークの帰属が困難となることが判明した。そこで、トリプシンによる反応時間は1時間と設定した。

次に、得られたトロンボモジュリンのトリプシン消化物2 $\mu$ g(トロンボモジュリン換算量)を用いてペプチド及び糖ペプチドマッピングを行った。カラムはC18マイクロカラム、流速は50 $\mu$ L/min、検出にはESI-MSを用い、ポジティブイオン測定を行った。図27AはTotal ion current(TIC)クロマトグラムである。得られたピークに溶出順に1~18の番号を便宜上つけ、各ピークのマスマ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、ピーク1、2、3、4、6、8、9、14、16、17及び18のペプチドを、それぞれペプチドK17、K10、K2、K8、K15、K14、K18、K13、K12、K11及びK3と特定す

ることができた (表 7)。ピーク 12 は分子量の計算値が 3917.0Da であり、K19 より 16Da 大きいことから、K19 の一部アミノ酸が水酸化されていることが示唆された。この結果は、トロンボモジュリンの Asn324 がヒドロキシアスパラギンに置換されているという報告に一致するものである。

#### 7. 1. 2 LC/MS/MS による糖ペプチド選択的マッピング

マススペクトルより得られた分子量からは、ピーク 5、7、10、13、15 及び 20 のペプチドを特定することができなかった。この理由として、ペプチドが翻訳後修飾を受けていることが考えられた。最も可能性が高いのは糖鎖の付加である。糖鎖が結合すると、糖鎖の構造が未知であることに加え、付加している糖鎖の不均一性によりマススペクトルが複雑になり、アサインが困難になることが予想される。そこで、数多くのピークの中から、糖ペプチドのいを判別することを目的として、LC/MS/MS のプリカーサーイオンスキャンという手法を検討した。プリカーサーイオンスキャンとは、ある特定のフラグメントを持つ親イオンだけを検出するというもので、今回は N-結合型糖鎖の断片である NeuAc-Gal-GlcNAc ( $m/z$  657) と Gal-GlcNAc ( $m/z$  366) を有するペプチドの検出を試みた。その結果、図 27B 及び 27C に示すように、どちらの糖配列を設定しても、4本のピーク、すなわちピーク 7、11、13 及び 15 が検出されたことから、これらのピークは N-結合型糖鎖をもつ糖ペプチドであることが判明した。

図 28 は、ピーク 7、11、13 及び 15 の

マススペクトルである。糖鎖の不均一性のために、複雑なマススペクトルを示しているが、N-結合型糖鎖付加配列を有する 4 つのペプチドに一般的な糖鎖の分子量を加算して得られた理論値を各イオンの  $m/z$  値と照合した結果、それぞれ K9、K20、K1 及び K21 のペプチドであることが判明した。また、結合している糖鎖はいずれも表 8 に示すようなフコシル複合型 2 本鎖糖鎖であること、さらに、シアル酸結合数に不均一性があることが明らかになった (表 7)。

#### 7. 1. 3 トロンボモジュリンの O-結合型糖鎖結合ペプチドの特定

プリカーサーイオンスキャンで検出されないピーク 5 及び 10 は N-結合型糖鎖以外の修飾を受けていることが考えられた。まずピーク 10 は、分子量が 4,516.5Da と計算され、ペプチド K16 (Ser261-Arg297) よりも 162Da 大きいことから、K16 にヘキソースが 1 個結合したものであることが推定された。そこで、ペプチドの確認及び糖鎖付加位置を決定することを目的として、ピーク 10 を分取後、さらにキモトリプシンで消化し、再度 LC/MS を行うことにより、消化物の分析を行った。その結果、得られた消化物のうち、Cys278-Tyr288 のペプチド (分子量 1,234.3Da) にヘキソース (180.2Da) が結合した分子量 (1,396.3Da) に一致するピーク (分子量 1,396.0Da) が得られたことから、ヘキソースの結合位置は Ser287 であることが判明した。ピーク 5 は分子量が 7,785Da 前後と計算されること、また、分子量が大きい割には保持時間が短く親水性の高いペプチドであること

が推測されることから、ピーク 5 は特定できていないペプチド K23 に複数の O-結合型糖鎖が結合しているものであることが推定された。O-結合型糖鎖の構造は、糖鎖を切り出し、糖鎖プロファイル解析を行うことによって決定できると期待される。

#### 7. 1. 4 フォリスタチンのペプチド/糖ペプチドマッピング

フォリスタチンにはフォリスタチン・315 とフォリスタチン・288 のアイソフォームが存在する。本研究ではフォリスタチン・288 をモデルタンパク質として用いた。フォリスタチン・288 の cDNA から予想される一次構造を図 29 に示す。Asn95 及び Asn259 に N-結合型糖鎖が付加する配列が存在する。

まず、フォリスタチン分子内にも S-S 結合が多数存在することが予想されることから、還元カルボキシメチル化した後、プロテアーゼ消化を行った。この際、エンドプロテイナーゼ Lys-C は基質特異性に問題があり、予想外の分解が進むためクロマトグラムが複雑になり、アサインが難しくなることが判明した。それに対して、エンドプロテイナーゼ Asp-N は基質特異性が高く、得られるピークの数も少ないので、フォリスタチンのペプチドマッピングに適していることがわかった。エンドプロテイナーゼ Asp-N によって得られると予想される K1~K15 のペプチドは図 29 に示す通りである。

フォリスタチンのエンドプロテイナーゼ Asp-N 消化物 3 µg (フォリスタチン換算量)を用いてペプチド及び糖ペプチドマッピングを行った結果、図 30A の TIC クロマトグラムが得られた。各ピークのマ

ススペクトルから、表 9 に示すようにピーク 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 及び 13 のペプチドを、それぞれ K4, K14, K11, K6, K8 と K10, K1, K7, K9, 及び K3 と特定することができた。また、ピーク 10 はマスペクトルから分子量 1608Da と計算され、ペプチド K5 の分子量の理論値と一致することから、このピークは N-結合型糖鎖の付加していない K5 であることが明らかになった。さらに、ピーク 3 及び 12 は、C 末端側のペプチド K15 (Asp258-Asn288) が Glu280 の N 末端側で切断された結果生じた Asp258-Leu279 (K15①) 及び Glu280-Asn288 (K15②) であることが判明した。従って、糖鎖が付加していない Asn259 が存在することが明らかになった。

#### 7. 1. 5 フォリスタチンの糖ペプチド選択的マッピング

以上、K1~K15 すべてのペプチド断片のピークを特定することができたが、Asn95 と Asn259 に部分的に糖鎖が付加していることも考えられるので、LC/MS/MS のプリカーサーイオンキャンによって糖ペプチドの有無を確認した。その結果、図 30B に示すように 2 本のピーク、すなわちピーク 7 及び 9 が検出された。これらのピークのマスペクトルを図 31 に示す。ピーク 7 の分子量は K5 にフコシル複合型 2 本鎖糖鎖が結合したもので、また、ピーク 9 の分子量は K15①にフコシル複合型 2 本鎖糖鎖が付加したものに一致した(表 9)。以上のことから、フォリスタチンには N 結合糖鎖結合部位が 2 カ所 (Asn95, 259) 存在し、どちらに

も部分的にフコシル複合型 2 本鎖糖鎖が結合し、シアル酸結合数に不均一性があることが明らかになった。また、O 結合糖鎖やその他の翻訳後修飾は検出されなかった。我々は、先に、高性能イオン交換クロマトグラフィーバルストアンペロメトリー検出法(HPAEC-PAD)を用いてフォリスチンの単糖組成分析を行っているが、本結果はその結果とよく一致するものであった。

## 7. 2 CapLC/MS を用いた目的タンパク質のペプチド/糖ペプチドマッピング法、及び糖鎖プロファイル解析法の開発

### 7. 2. 1 CapLC/MS を用いたトロンボモジュリンの糖鎖プロファイル解析

目的タンパク質の特性解析法の微量化を進めるため、図 3 2 に示すような内径 0.2 mm のキャピラリーグラフアイトカーボンカラムを用いた LC/MS (CapGCC-LC/MS) の導入を検討した。

糖鎖の割合が高い糖タンパク質を MS で解析する場合、糖鎖構造に関する情報なしに、ペプチド/糖ペプチドマップ上のピークをアサインすることは難しい。そこで、最初に糖鎖プロファイル解析法の検討を行った。モデル糖タンパク質としたトロンボモジュリンから糖鎖を切り出し、アノマーの分離を避けるため  $\text{NaBH}_4$  を用いて還元し、キャピラリー LC/MS による糖鎖プロファイル解析を行った。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、トロンボモジュリン 100 ng 相当の糖鎖から、図 3 3 に示すような糖鎖プロファイル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、トロンボモジュリ

ンに結合している主な糖鎖は、表 8 において  $\text{FBiNA}_{0-2}$ 、 $\text{FTriNA}_{0-3}$  として示されているようなフコースが結合したシアル酸結合複合型 2 本鎖糖鎖、及び 3 本鎖糖鎖であることが明らかになった(表 1 0)。

### 7. 2. 2 CapLC/MS/MS を用いたトロンボモジュリンのペプチド/糖ペプチドマッピング、及び糖ペプチド選択的解析

つぎに、トロンボモジュリンを用いて、CapLC/MS、及び CapLC/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。

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、CapLC/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 ESI-MS を用い、流速約 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  でポジティブイオン測定を行った。図 3 4 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溶出順に 1~14 の番号を便宜上つけた。

つぎに、図 3 4 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 3 4 C)、図 3 4 A 及び 3 4 B 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

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推測された。

図34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11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10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、表8に示すシアル酸結合フコシル複合型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K23及びK21であると推定された。

7. 3 電気泳動法を用いた発現タンパク質のプロフィール解析と、CapLC/MSを用いたゲル内目的タンパク質の特性解析

7. 3. 1 ゲル内 t-PA の糖鎖プロフィール解析

CapLC/MSを用いたペプチド/糖ペプチドマッピング、及び糖鎖プロフィール解析を、SDS-PAGEで分離したモデルタンパク質 t-PA (図35)に応用した。t-PAを電気泳動した結果、図36のような泳動パターンが得られた。65kDa付近に検出されたバンドを切り取り、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させ、糖鎖プロフィール解析

を行った。図37は得られた糖鎖プロフィールである。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、ピーク1~3はそれぞれ高マンノース型糖鎖のM5, M6, 及びM7であることが確認された(表12, 構造は表8参照)。また、ピーク3~8(ピーク3は共通ピーク)はフコースが結合した複合型シアロ2本鎖糖鎖(FBiNA<sub>0-2</sub>)であることがわかった。結合量は少ないが、複合型3本鎖糖鎖(ピーク3, 7)も検出された(表12)。

先に我々は、マイクログラファイトカーボンカラムを用いたLC/MSによってt-PA結合糖鎖のプロフィール解析を行い、報告しているが(Itoh, S., et al., *J. Chromatogr. A*, 2002), 今回得られた糖鎖プロフィールは、その際に報告したプロフィールとよく一致していることが確認された。以上のことから、ゲル電気泳動法とCapGCC-LC/MSを用いた糖鎖プロフィール解析によって、タンパク質混合物中のある特定のタンパク質の糖鎖構造が解析できることが実証された。

7. 3. 2 ゲル t-PA のペプチド/糖ペプチドマッピング

ゲル内アルキル化されたt-PAをゲル内トリプシン消化してペプチド及び糖ペプチドを得て(ペプチドの開裂位置は図35参照)、C18カラムを用いたCapLC/MSによるペプチド/糖ペプチドマッピングを行った(図38)。その結果、親水性が高くアミノ酸残基数の少ない2ペプチド(Cys83-Arg89, Ser379-Arg383)を除くすべてのペプチドを検出することができた(表13)。また、t-PAのThr61には、フコースが結合していることが知られて

いるが、フコースが結合したペプチド (Cys56-Lys82) の質量と一致するペプチドが検出された (ピーク 18)。

t-PA には、N-結合型糖鎖の結合可能配列が 4 ヶ所存在し、そのうち 3 箇所 (Asn117, Asn184, Asn448) に糖鎖が結合した type I と、2 箇所 (Asn117, Asn448) に結合した type II が存在することが知られている。今回、糖鎖プロフィール解析で確認された糖鎖の分子量とペプチドの理論値を基に各ピークをアサインし、ピーク 12 が Asn117 に高マンノース型糖鎖 (M5, M6, M7) が結合した糖ペプチド (Gly102-Arg129) であると同定することができた。この結果、糖鎖プロフィール解析で検出された高マンノース型糖鎖は、Asn117 に結合していることが明らかとなった。Asn184 及び Asn448 に糖鎖が結合した糖ペプチドを確認することはできなかったが、これは糖ペプチドの分子量が大きくてイオン化され難かったこと、あるいは、糖鎖の不均一性が高く、一つのピークとして検出され難かったことが原因であると考えられる。このような糖ペプチドの検出には、前述したプリカーサーイオンキャンが効果的であると思われるので、今後検討したいと考えている。尚、type I の Asn184 に糖鎖の結合していないペプチド (Tyr163-Arg189) は、検出することが可能であった (ピーク 13)。

以上のように、SDS-PAGE と CapLC/MS を用いたペプチド/糖ペプチドマッピングは、ゲル内タンパク質の一次構造確認、糖鎖結合部位と糖鎖の不均一性解析、及び糖鎖以外の翻訳後修飾の解析についても有用であることが示された。

### 7. 3. 3 細胞・組織への応用

電気泳動法を用いた細胞・組織が発現するタンパク質のプロフィール解析と目的タンパク質の単離、及び CapLC/MS を用いた目的タンパク質の構造解析法の可能性を、ウシ脳を細胞・組織のモデルとして用いて評価した。今回は、膜タンパク質の可溶化画分のプロフィール解析と特定タンパク質の構造解析に絞って行った。

細胞・組織中にはハウスキーピングタンパク質が多く存在し、抽出物をそのまま 2D-GE にアプライした場合、それらの妨害により、目的タンパク質及び関連タンパク質のプロフィールを作成できないケースが想定される。また、2D-GE にアプライできるサンプル量も限られていることから、分析前にある程度評価対象タンパク質を絞って、粗精製を行っておくことにより特定の分画にターゲットとしたプロフィールが作製できると考えられる。本研究では、ウシ脳膜画分を SDS-PAGE で分離するにあたって、脂質を除去した後、界面活性剤で膜を可溶化し、タンパク質画分を回収する簡単な操作を検討した (図 39)。すなわち、ウシ脳アセトンパウダーを脱脂後、非イオン性界面活性剤 Triton X-114 を用いて膜画分の可溶化を行い、さらに Triton X-114 の温度依存性相分離を行うことによって、膜画分 (Triton X-114 可溶性画分) が得られた。この膜画分を PIPLC 消化し、膜タンパク質可溶化部分を遊離させた。

可溶化膜タンパク質画分を SDS-PAGE で分離したところ、数本のバンドが検出された (図 40)。これらのバンドは粗精製

を行わずに SDS-PAGE を行った場合は検出されなかったバンドである。分離されたタンパク質を含むゲル片を切り出し、ゲル内アルキル化を行った。さらにゲル内 PNGase F 消化により結合糖鎖を遊離させた後、ゲル内トリプシン消化を行い、ペプチドを調製した。

得られたペプチド混合物について CapLC/MS/MS を用いたアミノ酸配列解析を行った後、データベース検索によるタンパク質同定を行った。その結果、120K に検出されたバンドは NCAM, 50K 付近に検出された複数のバンドは LAMP, OBCAM, 及び Kilon, また、低分子タンパク質はプリオン, 及び Thy-1 と同定された (図 4 0)。これらは神経組織に発現している膜タンパク質で、神経網形成等に重要な役割を担っていると考えられているタンパク質群である。なかでも、LAMP, OBCAM, Kilon は、Ig ドメインを 3 個持つ GPI アンカー型タンパク質 IgLON スーパーファミリーと呼ばれるタンパク質群に属し、一次構造の相同性が高いことから、個々に単離するのは難しく、詳細構造は明らかにされていない分子である。今回、粗精製後、SDS-PAGE を行うことによって、神経網形成等に関連する一連のタンパク質のプロフィール解析を行い、さらに各タンパク質を回収し、同定することができた。

つぎに、CapLC/MS を用いて、同定されたタンパク質について、特に分子量の約 40% を占める糖鎖の構造解析を行った。ゲル内 PNGase F 消化により遊離された糖鎖を用いて、CapGCC-LC/MS による糖鎖プロフィール解析を行った。代表例として、図 4 1 に、Kilon の糖鎖プロフィール

を示す。各ピークの  $m/z$  値をもとに糖鎖構造を解析した結果、主要なピークであるピーク 2 は、主に脳特異的に発現していることが報告されている BA-2 糖鎖であることが示唆された。また、ピーク 7 は高マンノース型糖鎖 (M5) であると推定された (表 1 4)。その他、高マンノース型糖鎖 (M6, M7, 及び M9)、ハイブリッド型、及び複合型糖鎖も検出された。検出された糖鎖の中には、フコースを 2 分子以上含むと推定されるものもあり、非還元末端側にフコース残基を持つことが示唆された。脳には  $Le^x$  構造を有する糖鎖が多く存在することが報告されており、今回の結果はそれらの報告によく一致していた。また、硫酸基が結合していると推定される糖鎖も検出された。

以上のように、粗精製後 SDS-PAGE を行うことによって、その細胞・組織に特有のタンパク質群のプロフィール解析が可能であること、また、分離ゲルから抽出したペプチド断片、及び糖鎖を CapLC/MS で分析することによって、タンパク質同定、及び詳細構造解析が可能であることが確認された。尚、今回解析した Kilon の糖鎖構造に関する報告はなく、本研究によって初めて明らかにされた。以上のように、我々の方法は、細胞・組織が発現するタンパク質混合物のプロフィール解析とその中の特定のタンパク質の構造解析に応用可能であり、構造未知のタンパク質にも対応できることが実証された。現在、ペプチド/糖ペプチドマッピングによる糖鎖以外の翻訳後修飾の解析を行っている。

## 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

細胞・組織のがん化を予測する評価技術の開発を目的として、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) を用いた。hTERT プロモーターのがん特異性を評価するために、hTERT プロモータールシフェラーゼコンストラクト及び 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ョンした。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。

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 4 2 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 4 2 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。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 がん細胞及び 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。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、ガン細胞株 A549、HeLa、HepG2、及び 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するエレメントが存在しているものと推測された (図 4 2)。

hTERT コアプロモーター領域内 (-286bp ~ -25bp) に c-Myc 結合部位である E-box が 2ヶ所存在した。そこで、この E-box を介した c-Myc による hTERT プロモーター活性化機構の解析を行った (図 4 3)。c-Myc の発現ベクターを A549 細胞へトランスフェクションし、hTERT コアプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼコンストラクト (pGL3b-286) におけるルシフェラーゼの発現量を評価した。その結果、c-Myc の発現誘導により、hTERT の転写活性が著しく増強した (図 4 3)。次に、2つの E-box に変異を導入

したルシフェラーゼコンストラクト (pGL3b-286(EboxMut)) について hTERT の転写活性化を評価した。その結果、E-box に変異を導入したことにより hTERT の転写活性は約 80%抑制された。更に、c-Myc の応答性も消失していた (図 4 3)。

次に、第 2 イントロン上に存在する E-box クラスター領域の hTERT 転写活性化への関与について評価した。E-box クラスターは図 4 4 に示したように、ATG より下流の+2.7kb~+5.5kb に位置しており、E-box を含む約 30bp の長さの配列がタンダムに繰り返されている。従って、この領域は c-Myc による hTERT の転写活性化に関与していると推測される。E-box クラスター領域は、hTERT のコアプロモーターを含んでいないため、SV40 プロモーター制御下でルシフェラーゼ遺伝子を恒常的に発現させるベクター (pGL3-Promoter) 内にこの領域を挿入した。この E-box クラスター領域に対する c-Myc の転写活性化効果を評価するために、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、すべての E-box クラスター (E-box1、E-box2、E-box3) について、c-Myc の強制発現によりその転写が活性化された (図 4 4)。

hTERT プロモーター内には、様々な転写因子の結合部位と考えられる配列が多数存在していた。その中でも特に、細胞の分化、増殖と深く関係のある転写因子 MyoD の結合部位 (E-box、CANNTG) は非常に多く存在していた。また、-729bp にはガン抑制因子として機能する IRF-1 の結合部位も確認された。テロメラーゼ活性

は細胞の分化に伴ってその抑制が認められ、一方がん細胞特異的に発現していることから、上述の転写因子 MyoD 及び IRF-1 が hTERT の転写抑制に深く関与している可能性が考えられた。そこで、MyoD 及び IRF-1 の hTERT 転写制御への関与を解明するため、A549 細胞及び HepG2 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイによりその解析を行った (図 4 5)。A549 細胞、HepG2 細胞に対し、hTERT のコアプロモーター領域を含んだルシフェラーゼコンストラクト (pGL3b-1391、pGL3b-801、pGL3b-164) 及び MyoD 発現ベクターまたは IRF-1 発現ベクターを共導入したところ、hTERT の転写活性には変化が認められなかった (図 4 5、4 6)。つまり、MyoD 及び IRF-1 は、hTERT の転写には関与していないと示唆された。しかしながら、今回検討したプロモーター領域以外に、これら転写因子が作用する可能性も残されている。

## 9. DNA チップを用いた遺伝子発現解析のがん化指標としての適応に関する研究

げっ歯類で腫瘍の発生が報告されている医用材料 (ポリウレタン及びポリ乳酸) について、in vitro トランスフォーメーション試験を実施し、得られた形質転換巢の遺伝子発現の変化を DNA チップを用いて解析した。

表 1 5 に示すように、親株マウス BALB/3T3 A3111 株でプレートあたり 0.3 個のフォーカス が、陽性対照の 3-MC 処理で 30 個のフォーカスが観察されたのに対して、各形質転換巢では 2.3 個から 114.1 個のフォーカス が観察され、ポリ

乳酸上で分離された形質転換巣 (L11 及び L21) の方がポリウレタン上で分離された形質転換巣 (A5 及び A6) に比べて、悪性度が高いことが明らかとなった。A5 及び A6 のフォーカスは 3-MC で形成されたフォーカスにその形状は似ていたが、L11 及び L21 のフォーカスは細胞外マトリックスが溶解されたような形態を呈していた。

次に、合計 1176 の癌関連遺伝子を搭載した DNA チップを用いてこれら 4 種類の細胞の遺伝子発現の亢進と抑制を調べた。その発現がいずれかの形質転換巣で親株の 5 倍以上亢進していた 14 種の遺伝子を図 4 7 に示す。図中では、コード番号で遺伝子を示しているが、その名称は表 1 6 に示している。発現の亢進が顕著な遺伝子は、c-fos 癌原遺伝子、FBJ 骨肉腫癌遺伝子 B、及び Jun 癌遺伝子の 3 種であった。特に形質転換巣 L11 はこれら 3 種の遺伝子すべてにおいて、4 個の形質転換巣のうちで最も強くその発現が亢進していた。形質転換巣 A6 は他の形質転換巣と異なり、これら 3 種の遺伝子の発現の変化は顕著ではなかった。

その発現がいずれかの形質転換巣で親株の 5 倍以上抑制されていた 25 種の遺伝子を図 4 8 に示す。コード番号と遺伝子名の対応表を表 1 7 示す。発現抑制が顕著であった遺伝子は pleiotrophin、histidine triad nucleotide binding protein、protein kinase C iota、及び large multifunctional protease 7 をコードしている遺伝子であった。形質転換巣 L11 は最後の遺伝子以外の 3 種の遺伝子において 4 個の形質転換巣のうちで最も強くそ

の発現が抑制されていた。発現亢進が著しかった遺伝子群でその変化が小さかった形質転換巣 A6 が、発現抑制が見られた遺伝子群のうち large multifunctional protease 7 については約 20 倍も変化していた。

親株に対して、5 倍以上の発現の変化が認められた遺伝子を、形質転換巣ごとに表 1 8 にまとめた。その中でも、10 倍以上の変化が認められたものは赤で記載し、その変化の程度も括弧内に示した。いずれかの形質転換巣で、親株の 5 倍以上の発現亢進が認められた遺伝子は 14 種で、5 倍以上の発現抑制が認められた遺伝子 25 種であった。形質転換巣 A5 では 7 種の遺伝子の発現亢進が認められたが、発現の抑制が明らかであったのは、large multifunctional protease 7 だけであった。Large multifunctional protease 7 は、今回解析した形質転換巣すべてについて共通して発現の変化が見られたただ一つの遺伝子である。形質転換巣 A6 の発現亢進遺伝子は 4 個の形質転換巣中最も特異的で、他の 3 個の形質転換巣で共通に発現亢進が認められた c-fos 癌原遺伝子、Jun 癌遺伝子で有意な変化が認められなかった。また、proliferin は発現亢進で、thrombospondin 1 は発現抑制で、親株の 10 倍以上の変化が認められた。他の形質転換巣では、この 2 種の遺伝子について 10 倍以上の発現変化は認められなかった。Large multifunctional protease 7 は A6 において最も強くその発現が抑制されていた。形質転換巣 L11 は発現の変化を示した遺伝子数が最も多く、またその変化の程度も強かった。特に発現の抑制が認め

られた遺伝子数は 24 種もあった。c-fos 癌原遺伝子及び Jun 癌遺伝子は最も強く発現が亢進され、histidine triad nucleotide-binding protein, protein kinase C iota は最も強く発現が抑制されていた。形質転換巣 L21 では、c-fos 癌原遺伝子、Jun 癌遺伝子の発現が特に強く亢進され、pleiotrophin、histidine triad nucleotide-binding protein、proteinkinase C iota、及び large multifunctional protease 7 の発現が抑制されていた。

#### 10. 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 49 に示した。15th の肢芽器官で濃染された軟骨像が観察される(図 49)。

胎齢 14th 及び 15th 前肢を培地が入った培養ボトルにそれぞれ直接加えて回転培養すると、指に相当する部分は、元に比べて細くなっていき、付け根の部分は、濃染された軟骨像が観察されたものの、機械的刺激により形態は変形していた(図 50)。次に、袋状 PP 膜内に胎児から切りだした前肢をいれて、袋の口をシーラーで閉じて、培地の入った培養ボトル内にいれて、回転培養すると、形状は袋なしの場合に比べて正常に近い形を残し、かつ、付け根部分は濃染した軟骨像が観察された(図 50)。この袋状 PP 膜には形態維持能が期待されたので、in vivo 埋入試験に使用することとした。

図 51 は、Naive F344 ラットの血液

中の CD4 と CD8 陽性 T リンパ球サブセットの割合を示した。コントロール群は、袋状 PP 膜のみを F344 ラットの腹腔内に埋入した結果であり、Test 群は、胎児肢芽器官を袋状内にいれ、埋入した時の結果である。Test 群では、CD8 陽性細胞が増加する傾向がみられた(図 51)。

14th の肢芽器官を袋状 PP 膜内に入れて F344 ラットの腹腔内に埋入し、1 週間後、袋をとりだし、内部の肢芽器官を固定し、アルシアンブルー染色したところ、形態は埋入時の原型を留めていなかった(図 52)。

この袋状 PP 膜は、内部器官の形態維持能が劣ることから、修飾ポリウレタンで袋の外面を被覆化した後、異系 (Brown-Norway) ラットの肢芽器官を袋内にいれて、F344 ラットの腹腔内に埋入した結果を図 53、図 54 に示した。

図 53 の黒バーの test 群は、修飾ポリウレタンコート膜を用いた結果である。この場合、修飾ポリウレタン膜は、内部に組織を含む場合と入っていないもの (=含んでいないもの) との間で、CD8 が増加する傾向はなかった。しかし、PP 膜 (白抜きのバー) では、対照群に比べて、内部に組織を含む場合には、CD8 陽性細胞が増加した(図 53)。

CD4 に関しては群間で大きな差異はなかった(図 53)。袋内部の器官は、PP 膜内では、原型を留めていなかったが、修飾ポリウレタン膜内部の器官では、元の形態を維持していた(図 54)。

次に異種動物である ICR マウスについて同様に PP 膜及び修飾ポリウレタン膜を用いて解析した。その結果、CD4 細胞

の T リンパ球はいずれの群でも変化はなかったが、PP 膜では、袋内に ICR マウスの肢芽器官をいれて埋入すると CD8 陽性 T リンパ球が増加する傾向がみられた (図 5 5)。しかし、修飾ポリウレタン膜での実験では (黒バー)、対照群に比べ、試験群では CD 8 陽性細胞が減少していた。一方、袋内部の器官を固定し、アルシアンブルー染色した結果、やはり、PP 膜に比べて、修飾ポリウレタン膜の方が、形態維持能が高いことが確認された (図 5 6)。

次に、免疫担当器官である脾臓をこの免疫隔離膜に埋入してレシビエントに移植したときの免疫反応を解析することにより、修飾ポリウレタン膜の免疫隔離の程度を評価した。脾臓を直接アロ移植すると、埋植 12 週で顕著な CD4 と CD8 のリンパ球が減少した (図 5 7)。MPU-PP 膜に埋入した脾臓を移植した場合も、直接アロ移植した場合に比べ若干の抑制は認められるものの、対照群に比べて有意にリンパ球数の低下を引き起こした (図 5 7)。一方、直接脾臓をレシビエントにアロ移植した場合には強い TNF- $\alpha$  の産生が認められるのに対して、MPU-PP 膜に脾臓をいれて埋入した場合には、TNF- $\alpha$  の産生は認められるが、その程度は直接移植した場合に比較して抑制され (表 1 9)、非特異的な炎症反応はこの膜の使用により防御できることが明らかになった。IL-13 はいずれの群においてもコントロール群との間に大きな差異はみとめられなかったが、IL-4 は、MPU-PP 膜に埋入した脾臓を移植した群で増加していた (表 1 9)。

## 1 1. 血液存在下での FIAsh 結合性タグ付 ECFP の FIAsh による蛍光標識の検討

### 1 1. 1 標識の解析法

タグペプチド付 ECFP は 440nm 付近の励起光をあてると 480nm 前後の蛍光を示す。一方 FIAsh はタグペプチドに配位すると 510nm 付近に最大励起波長、540nm 付近に最大蛍光波長を示す蛍光発色団となる物質であるが、440nm の励起光で励起すると ECFP からの蛍光エネルギーが FIAsh に遷移して (Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): 蛍光共鳴エネルギー遷移) 540nm 周辺の蛍光を示すようになる。したがって、540nm の蛍光を測定することにより、FIAsh の配位の程度を簡便に測定することができる。この測定系を用いて以下の検討を行った。

### 1 1. 2 血液存在下でのタグ付 ECFP への FIAsh 結合の最適化

FIAsh をタグペプチドに配位させるにあたっては、配位されるタグペプチドの 4 つのシステイン残基の SH 基を還元状態におく必要がある。しかし一方、FIAsh 処理溶液に過剰 (mM レベル) の EDT が存在すると FIAsh のタグペプチドへの結合が阻害されることが予想される。そこで EDT 処理の最適濃度を検討し、タグ付き ECFP のシステイン残基の還元には 10 $\mu$ M の EDT が適当であることを明らかにした。

FIAsh でタグペプチドのチオールを十分に標識するために 2-mercaptoethanol のような一価のチオール化合物が必要であるとされているが、2-mercaptoethanol の添加至適濃度を検討し、1.0mM の添加が適当であることを明らかにした。