

次にタグ付 ECFP の FAsH との反応時間を検討した。FAsH の処理濃度を 1.5 μM として検討したところ、インキュベーション時間は 30 分で一定となることから、インキュベーション時間を 30 分とした。

さらに FAsH のインキュベーション濃度の最適化を行った。検討した濃度領域は 0.25~1.5 μM である。PBS 溶液中で反応を行なった場合、1.0 μM でほぼ最大値を示し、それ以上濃度を増やしても結合量の増加はみられなかったが、血清存在下では 1.25 μM まで漸増する傾向がみられ、PBS 溶液より濃度を高めに設定する必要性を示唆した。この違いは血清中に共存するタンパク質の影響によるものと思われるが、標識時の FAsH の処理濃度は 1.5 μM と設定した。

1 1.3 FAsH による蛍光標識のタグ付き ECFP 濃度に対する直線性の検討

1.0mM 2-mercaptoethanol 30 分前処理、1.5 μM FAsH 30 分インキュベーションという条件で、結合溶液に添加するタグ付タンパク質濃度を 0.025~0.5 μM に変化させて、結合量を測定した。その結果 PBS 中では、全濃度領域に渡って直線的な結合量の増加が観察されたものの、血清存在下においては、低濃度になるにつれて測定値が大きくなる傾向が見られ、血清中に測定系に干渉する何らかの物質があることが示唆された (図 5 8)。

1 2. FAsH 結合性タグを利用した内因性 TNF- α の蛍光標識法の検討

1 2. 1 TNF- α への FAsH 結合性タグペプチドの導入の分子設計

TNF- α (tumor necrosis factor : 腫瘍壊死因子) は、三量体としてレセプターに結合し、細胞壊死作用を現す。そのため、生物活性に影響を及ぼすことなくタグを導入する部位としては、三量体となる場合に必要とされる部位及びレセプターとの結合部位は避けなければならない。また N-末端には分泌シグナルがある。したがって、タグペプチドの導入部位は C-末端及び EF-loop 領域が適していると考えられた。

C-末端への導入は TNF- α 配列の 3' 末端近くに BsrDI 部位及び KpnI 部位があるので、この間に以下の 2 種の FAsH 結合性配列を挿入した。

α ヘリックス型 :

AEAAAREACCRECCARA

ヘアピン型 : AEAAAREACCPGCCARA

α ヘリックス型は FAsH 結合性配列として始めて報告されたものであり (*Science*, **281**, 269-272 (1998))、ヘアピン型は最近になって、より親和性が高い配列として報告されたものである (*J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6063-6076 (2002))。

EF-loop への FAsH 結合性タグの挿入においては、EF-loop 中の 108 と 109 番目のアミノ酸の間に、以下の配列を挿入した。

α ヘリックス型 :

TGAEAAAREACCRECCARACT

ヘアピン型 :

TGAEAAAREACCPGCCARACT

1 2. 2 FAsH 結合性タグ導入 TNF- α 発現用プラスミドの作製及び発現

発現プラスミドの作製にあたっては、各段階ごとに 0.7% アガロースゲルで電気泳動を行いプラスミドや制限酵素切断フラグメントのサイズを確認するとともに、合

成オリゴヌクレオチドをリンカーとして組み込んだ際にはシーケンスを行ってその結果からも塩基配列を確認した。

C-末端へ α 型タグあるいはヘアピン型を導入した TNF- α (TNF-C-tag1 あるいは TNF-C-tag2) 発現用プラスミドを HeLa 細胞へトランスフェクトしたところ、24 時間後にすでに一部の細胞は浮遊死細胞となっていたが、無血清培地に交換後さらに 24 時間培養したところ、多くの細胞は浮遊死細胞となった。EF-loop へ α ヘリックス型タグあるいはヘアピン型タグを導入した TNF- α (TNF-EF-tag1 あるいは TNF-tag2) 発現用プラスミドを HeLa 細胞へトランスフェクトした後、24 時間後では dish いっぱい細胞が接着していたが、無血清培地に交換後さらに 24 時間培養したところ、一部浮遊死細胞が観察されるとともに、接着細胞においても細胞の萎縮が観察された。一方シャトルベクターをトランスフェクトした細胞では死細胞は観察されず、萎縮した細胞も観察されなかった。

上記培養液の上清について、抗 TNF- α 抗体を用いたウェスタンブロット法によって、TNF- α 関連タンパク質の発現、分泌を確認した。その結果、TNF-C-tag1 及び TNF-C-tag2 では TNF- α の分子量 (SDS-PAGE では 21kD 付近) よりやや大きい位置 (23kD 付近) に明瞭なスポットが観察された (図 5 9)。一方 FE-loop へのタグ挿入タイプの場合 (α ヘリックス型を TNF-EF-tag1、ヘアピン型を TNF-EF-tag2)、培養上清の原液では検出限界以下で分泌は確認されなかった。しかし分画分子量 5000 の限外濾過フィルターを用いて約 10 倍に濃縮したサンプルを用い

てウェスタンブロット法を用いて検出を試みたところ、TNF- α より分子量の大きいところに薄いながらバンドが検出された。

12.3 FIAsh 結合性タグペプチドを導入した TNF- α の特性

続いて、各種タグペプチド導入 TNF- α 発現細胞の培養上清について細胞障害活性を測定した。その結果、TNF-C-tag1 あるいは TNF-C-tag2 を発現させた HeLa 細胞の培養上清は、明瞭な細胞障害活性を示した。これらタグ付き TNF- α は TNF- α と等しく抗 TNF- α 抗体と結合すると仮定して、タグ付き TNF- α は TNF- α に比較すると約 1/3 の細胞障害活性を示すと概算された (図 6 0)。一方 TNF-EF-tag1、TNF-EF-tag2 を発現させた HeLa 細胞の培養上清の細胞障害性を検討してみたが、限外濾過を用いて濃縮した試料についても細胞障害作用は観察されなかった。

そこで、次にこれらタグペプチド導入 TNF- α について FIAsh との反応性を調べた。まず TNF-C-tag1 と TNF-C-tag2 に関するが、前者は FIAsh と反応させることにより、504nm 励起による蛍光強度の増加が確認できた。しかし TNF-C-tag2 については、現在までの所、蛍光強度の増加は検出されていない。一方 TNF-EF-tag1 あるいは TNF-EF-tag2 は、FIAsh との反応によって、弱いながら蛍光の増加が観察された。

12.4 TNF-C-tag1 の蛍光標識条件の検討

以上のように、FIAsh 反応性タグを導入した TNF- α の中で、C-末端に α ヘリク

ス型タグを付加したものが、生物活性〔細胞障害活性〕及び FLAsH との反応性という点で最も優れたものであった。しかしながら、その蛍光強度は、細胞内のタンパク質の体内動態の研究に応用するには、未だ不十分なものだった。そこで、TNF-C-tag1 の FLAsH 標識条件について、さらに検討を加えた。

まず tag と FLAsH との反応溶液に加えていた SH還元剤 EDT(10 μ M) に代えて 1mM 2-mercapto-ethanol (BME) 及び 1mM tris(2-carboxy-ethyl) phosphine (TCEP) を用いたところ、蛍光強度が大きく増加した。しかしこの場合、Shuttle ベクターを処置した control 細胞の上清も大きな蛍光強度を示すことが明らかとなった。そこで TNF-C-tag1 にさらにヒスチジンタグを付加した TNF- α を発現させ、培養上清から TALON Resin (Clontech) を使用して精製、流出液の imidazole を除いた後に FLAsH と同様の反応を行ったところ、60 倍以上の蛍光強度を示すと同時に、TNF-C-tag1 非存在時に比べて、約 5 倍の蛍光強度の増加として検出できることが明らかとなった (図 6 1)。

1 3. ヒト末梢血幹細胞の培養と血管内皮細胞の分化誘導

1 3. 1 末梢血 AC133 陽性細胞と CD34 陽性細胞の血管内皮細胞への分化能

血液幹細胞の細胞表面抗原としては CD34 陽性、CD38 陰性、lin⁻¹、c-kit 陽性など他の表面抗原との組み合わせることにより非常に純度の高い細胞集団として同定・分離されることが知られている。一方、血管内皮細胞前駆細胞は以上のような

細胞表面マーカーの組み合わせによる同定・分離法は十分に確立されていないが、少なくとも CD34 陽性細胞集団内に存在すると考えられている。最近、血液幹細胞の新規表面抗原として AC133 が有用であることが報告されるようになってきたが、同時に骨髄 AC133 陽性細胞から血管内皮細胞が出現するとの報告もある。そこで、この AC133 陽性細胞の血管内皮誘導能について検討するために、まず末梢血単核球における AC133 及び CD34 陽性細胞の比率をフローサイトメーターで解析したところ、両陽性細胞は末梢血単核球に約 0.3%それぞれ存在することが明らかになった。ヒト末梢血より AC133 及び CD34 陽性細胞を分離し、フィブロネクチン上に 2 週間培養し、血管内皮細胞への分化誘導を試みた。その結果 AC133 陽性細胞を培養した時の方が血管内皮細胞様の接着細胞を多く観察することができた (図 6 2)。これらの接着細胞が血管内皮細胞としての特性を備えているかを確認するために、血管内皮細胞機能としての DiI-アセチル LDL の取り込み活性 (図 6 3) や von Willebrand factor の発現 (図 6 4) を間接蛍光抗体法により解析したところ、AC133 陽性細胞のほうが CD34 陽性細胞に比べ、アセチル LDL を取り込む細胞や von Willebrand factor に染色される細胞がより多く出現してきた。さらに、AC133 陽性細胞から分化してきた接着細胞について血管内皮細胞の指標として考えられている CD31、flk-1、Tie2、eNOS の発現について間接蛍光抗体法により解析すると、図 6 5 に示すように、これらの分化指標の発現が確認され、AC133 陽性細胞か

ら分化した接着細胞は内皮細胞と同定された。

13.2 AC133 細胞の血管内皮細胞への分化誘導の時間経過

次に末梢血幹細胞として AC133 細胞を用いて血管内皮細胞へと分化誘導した際の、分化指標として考えられている CD31、flk-1 等の発現の経時変化を解析した。図 66 上段は蛍光画像、下段は蛍光高度を定量的に解析した結果を示しているが、CD31 は培養 1 週間後に有意に強い発現を示し ($p < 0.001$)、培養を続けるに従いむしろその発現は低下することが認められた。一方、flk-1 は培養 2 週間後に最も強い蛍光が観察された (図 67, $p < 0.001$)。eNOS の発現は 1 週間目から 3 週間目まで、比較的大きな変動は認められなかった (図 68)。マクロファージ・顆粒球系の表面抗原として知られている CD11b の発現は全培養期間を通じて殆ど観察されなかった (図 69)。従って、血液幹細胞分画と考えられる末梢血 AC133 陽性細胞を用いて VEGF 存在下に血管内皮細胞へと分化する系を確立することができた。

13.3 CD31 強陽性細胞の分画と培養

上記の結果より、ヒト末梢血及び臍帯血 AC133 細胞を VEGF 存在下に培養すると、CD31 が他のマーカーに先立って発現してくることから、CD31 が血管内皮前駆細胞としての分化能の指標となるのではないかと想定し、CD31 発現と分化能の関連について検討した。ヒト末梢血 AC133 陽性細胞をフィブロネクチンあるいはタイプ IV コラーゲンプレートを用いて VEGF

存在下、6 日間培養すると、両細胞とも殆どが浮遊細胞のままであり、一部の細胞が接着していた。特に、コラーゲンタイプ IV プレートを用いて培養した細胞の方が、フィブロネクチンプレートを用いて培養した細胞より伸展が弱い傾向が認められた (図 70-a)。しかし、接着細胞の CD31 の発現を調べたところ、フィブロネクチンプレートを用いた細胞とコラーゲンタイプ IV プレートを用いた細胞で大きな差異は認められなかった (図 70-b)。また、6 日目の細胞を回収し、CD31 の発現をフローサイトメーターを用いて解析すると、どちらのプレートを用いて培養した細胞も CD31 の発現強度は同程度であった (図 71-a)。培養初期の経時的な CD31 の発現を調べたところ、培養経過とともに CD31 の発現が増加し、特に強陽性の細胞の比率が増加してくることが明らかになった (図 71-b 上)。そこで、容易に細胞が回収できることから、コラーゲンタイプ IV コート上で 6 日間培養した AC133 陽性細胞を選び、CD31 の発現を指標として強陽性、陽性、陰性細胞を分離することにした。図 71-b 下に示すように、ヒト末梢血 AC133 陽性細胞をタイプ IV コラーゲン上で培養すると、CD31 の発現量の異なる細胞が出現する。これらの細胞をセルソーターで分画し、洗浄後、フィブロネクチンプレートを用いて VEGF 存在下 1 週間培養した。その結果、図 72 に示すように、CD31 強陽性細胞からは多くの接着細胞が出現し殆ど浮遊細胞は見られなかったが (図 72-上段左)、逆に CD31 陽性細胞では接着細胞が殆ど認められなかった (図 72-上段右)。さらに、CD31 強陽性細胞

から出現してくる接着細胞は KDR/flk-1 や eNOS を強く発現していた(図 7 2・中段・下段)。

1 4. ヒト臍帯血幹細胞の培養と血管内皮細胞の分化誘導

1 4. 1 臍帯血及び末梢血の AC133 及び CD34 陽性細胞の含有率の比較

臍帯血及び末梢血の単核球中に含まれる AC133 及び CD34 陽性細胞の比率についてフローサイトメーターで比較検討した。その結果、図 7 3 とその下の表に示すように、AC133⁺/CD34⁻細胞は臍帯血と末梢血でほぼ同程度の比率で存在し、AC133⁻/CD34⁺細胞は臍帯血の方が 3 倍多く存在し、特に幹細胞が多く含まれると考えられる

AC133⁺/CD34⁺細胞の比率は 11 倍も臍帯血に多く含まれることが明らかとなった。臍帯血は多能性幹細胞の比率が高く、この多能性幹細胞から血管内皮前駆細胞が多く得られる可能性が考えられた。

1 4. 2 臍帯血及び末梢血由来 AC133 陽性細胞の増殖の比較

臍帯血と末梢血の AC133 陽性細胞を同じ細胞密度 (図 7 4 中の点線に相当する数) にコラーゲンタイプ IV 上で VEGF、TPO、SCF 存在下 6 日間培養し、細胞増殖能を比較検討した。その結果、末梢血 AC133 陽性細胞はこれらの増殖因子が存在しても殆ど細胞数が増加しないにもかかわらず、臍帯血 AC133 陽性細胞では顕著な細胞の増加が認められた(図 7 4、 $p < 0.001$)。

1 4. 3 臍帯血 AC133 陽性細胞における CD31 及び KDR 発現の経時的変化

臍帯血の AC133 陽性細胞をフィブロネクチン上で培養し、CD31 発現の経時的変化を解析した。その結果、培養 5 日後に末梢血同様強い発現が観察され(図 7 5、上段及び下段)、その発現はその後徐々に減少したが、末梢血(図 6 6 下段)のグラフに示すような急激な減少は観察されなかった。このことは増殖能の高い臍帯血由来 AC133 細胞では血管内皮分化誘導と増殖が並行して起こっていることを示唆している。一方、臍帯血由来 AC133 陽性細胞をフィブロネクチン上で培養すると KDR は末梢血 AC133 陽性細胞と同様に 15 日後(末梢血では 2 週間目)に最も強い発現が観察された(図 7 6)。

1 4. 4 臍帯血 AC133 陽性細胞における 6 日間培養後の CD31 強陽性細胞の出現と血管内皮細胞への分化

臍帯血 AC133 陽性細胞をコラーゲンタイプ IV 上で 6 日間培養した時に出現してくる CD31 強陽性細胞の比率と 0 日の臍帯血 AC133 陽性細胞中の CD31 強陽性細胞の比率とをフローサイトメーターを用いて比較解析した。その結果、図 7 7 に示すように CD31 強陽性細胞の比率は培養 6 日で、0.25%から 10.79%に増加した。この CD31 強陽性細胞出現の比率は末梢血 AC133 陽性細胞と同様であった。

臍帯血 AC133 陽性細胞由来 CD31 陽性・強陽性細胞を分画し VEGF 存在下フィブロネクチン上で培養した結果、CD31 陽性細胞は殆ど接着する細胞が出現して来なかったのに対し、強陽性細胞では多くの接着細胞が観察され(図 7 8 上段)、これらの接着細胞が KDR 陽性、eNOS 陽性であった(図

78下段左)。さらに、この接着細胞をマトリゲル中で培養することにより管腔形成が認められることから接着してきた細胞は血管内皮細胞と考えられた。これらの結果より、臍帯血 CD31 強陽性細胞も末梢血と同様に血管内皮細胞前駆細胞であると考えられた。

15. 小型肝細胞特異的分子の同定

肝幹細胞と考えられている小型幹細胞の特性指標の探索を行った。図79は成熟肝細胞と小型肝細胞由来タンパク質の二次元電気泳動の蛋白質スポットを比較したものである。その結果、分子量 35kDa のやや酸性よりのスポットが成熟肝細胞においてはみられず、小型肝細胞において見られた。その他のスポットに関しては、有意な差異は見出されなかった。なお、異なる日に調製した成熟肝細胞と小型肝細胞においても同様な結果が得られた。

図80はそのタンパク質を還元 S-カルボキシメチル化後トリプシンで消化し、その断片化ペプチド混合物を MALDI-TOF/MS で測定した質量スペクトルを示している。

得られた質量値から Mascot システムを用いたペプチドマスフィンガープリンティング法によって得られた質量値は予測されるアネキシン III の質量値と極めてよく一致しており、本スポットはアネキシン III と同定された。

そこで、小型肝細胞及び成熟肝細胞の抗アネキシン III 抗体によるウエスタンブロットリング解析を行ったところ、図81に示すように小型肝細胞のみにアネキシン III が検出された。

16. 生分解ポリマーのラット軟骨前駆細胞の分化・増殖への影響

マウス軟骨前駆細胞株である ATDC5 細胞はインスリン存在下で14日間培養することで、アルシアンブルーで染色されるプロテオグリカン陽性の軟骨細胞へ分化することが知られている(図82)。一方、インスリン非存在下、ポリ乳酸 PLLA (MW=5,000) を培地に添加して14日間培養することにより、濃度依存的にアルシアンブルーで染色されるプロテオグリカン陽性軟骨細胞への分化が上昇が認められた(図82)。PLLA 添加で軟骨細胞の分化マーカーである II 型コラーゲン mRNA 発現が誘導されることも RT-PCR 法で確認された(図83)。これらの結果から PLLA 単独で ATDC5 の軟骨分化を誘導できることが示唆された。

インスリン、PLLA で分化誘導した ATDC5 細胞から分化誘導開始 0 日目、5 日目及び 11 日目に全 RNA を調製し、RT-PCR 法により II 型コラーゲン mRNA 発現の経時的変化を解析した。その結果、PLLA ではインスリンより早期に II 型コラーゲン mRNA 発現が観察され、またその発現量も多かった(図84)。一方、プロテオグリカンの産生はインスリンの方が PLLA よりも高いことが明らかになった(図82)。これらの結果から、PLLA とインスリンでは ATDC5 細胞の軟骨分化誘導作用機構が部分的に異なっていることが示唆された。

PLLA とインスリンでは ATDC5 細胞の軟骨分化誘導における作用が異なっているかどうか検討するために、インスリンによる軟骨分化誘導効果がプラトーになるインスリン濃度で PLLA を添加し、その

効果を見た。その結果、インスリン飽和状態でも PLLA 添加による軟骨分化促進効果が観察された(図 8 5)。この結果から、インスリンと PLLA は部分的に異なる機構で軟骨分化を誘導している可能性が示唆された。

D. 考察

現在、ウイルス検出法として最も高感度な方法は PCR 法などの NAT 法である。しかし、ウインドウ期の存在やサンプリング上の問題もあり NAT 法を用いても必ずしもすべてのウイルスを検出できるとは限らず、さらなる高感度化が求められている。ウイルスやウイルスゲノムの濃縮には、従来、超遠心法やポリエチレングリコール法あるいはアルコール沈殿法などが用いられているが、超遠心法は HCV や HGV 等のウイルスのようにウイルス粒子の比重が軽い場合などは適用が困難である。また、現在用いられている方法は操作が非常に煩雑であり、NAT 法のような高感度検出系においては目的試料以外からの汚染の可能性も多くなるという大きな欠点がある。さらに、HTLV-I、II のように対象とする細胞のごく一部にしかウイルスが感染していないようなケースにおいてもより適切な濃縮法の開発が望まれている。従って、出来る限り操作が簡便でかつ確実なウイルスあるいはウイルスゲノムの濃縮法は NAT 法の高感度化には必須のテーマである。そこで、本研究では、NAT 法によるウイルス検出の高感度化を目指してウイルス濃縮法の開発を行った。その結果、PEI 磁気ビーズやスルホン酸磁気ビーズを用いて、エンベロープウイルスや非エ

ンベロープウイルスを濃縮することができていることを明らかにした。さらに、定量的 PCR 解析より、PEI 磁気ビーズを用いると、100 倍から 1000 倍の濃縮が可能であることが示された。特に強調すべき点として、通常の操作では検出限界以下のウイルスしか存在しない場合にも、濃縮を行うことにより検出限界のさらなる高感度化が行えることが示されたことである。一方、PEI 磁気ビーズを用いて濃縮できなかった非エンベロープウイルスを 2 価イオン存在下にスルホン酸磁気ビーズを用いることにより、10・100 倍ほどの検出感度の高感度化が可能であった。この検出限界の高感度化は、ウイルス検出において最も重要な要素であり、培養上清にわずかにしか含まれないようなウイルスでも、濃縮により確実にウイルスが検出できれば、ウイルス安全性は飛躍的に向上することが期待される。

一方、ウイルスを濃縮することによる NAT の高感度化では、ウイルスの感染性についての情報は得られない。ウイルスの感染性の検出には、細胞変性を指標としたり、ウイルスによる細胞のプラーク形成、あるいは感染細胞内で作られるウイルス特異的抗原の検出など様々な手法が開発されている。しかしいずれの手法も、感染価の低いウイルスの検出には、陽性反応がでるまで長期にわたる培養を必要としたり、短時間の培養では十分な感度が得られないという欠点があった。

そこで、ウイルスの感染性を高感度に検出するための手法の開発を行った。このためにまず細胞からウイルスゲノムを迅速・高効率に抽出する技術を開発した。す

なわち、磁性球にポリスチレンコートした Gene Ball を用いて、ウイルスに感染させた細胞から核酸を抽出、沈殿させるとともに、核酸のゲル化による粘性の増加を引き起こすことなく核酸を Gene Ball に吸着させる方法を開発した。本法を用いることにより、大量の感染細胞からウイルスゲノムを含む核酸を迅速かつ高い収率で回収することが可能となった。この手法を用いて、指標性細胞にウイルスを感染させ、核酸を抽出後、PCR あるいはリアルタイム PCR を用いてウイルスゲノムを検出することにより、高感度、高精度に細胞内で複製されたウイルスゲノムを検出することが可能になった。本法を用いることにより 0.2 から 2 pfu という非常に少ない感染価のウイルスを検出することが可能であった。また、細胞変性を指標としたウイルス感染性の測定法に比較して、迅速・高感度にウイルスの感染性を測定できることが明らかになった。本法は、HSV-1、poliovirus、アデノウイルス、ブタバルボウイルスに適応可能であり、感染性ウイルスの検出に極めて有用と考えられる。

一方、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮を応用して、PEI 結合セファロースを用いて細胞懸濁液からウイルスを除去することを試みた。その結果、効率よく細胞懸濁液からウイルスの除去が可能であった。この PEI 結合セファロースは、細胞治療において潜在的に存在するウイルスを除去できる技術となる可能性があり、今後その有用性についてさらに検討を重ねていく予定である。

細胞の同一性や純度の試験に際して、あるいは培養等の製造過程において、目的と

する細胞の遺伝的性質の変化や望ましくない細胞特性の変化が生じていないかを的確に検出することは、細胞治療の安全性確保上極めて重要である。細胞の安全性確保のための遺伝的安定性の確認や同一性の確認には、核型分析、さらには多型配列解析が有用とされている。しかし、G-バンド解析、CGH 解析あるいは M-FISH それぞれ単独では特有の欠点が指摘されている。本研究では、これらの染色体解析法を相互補完的に駆使することにより細胞の遺伝的性質の解析にどの程度有用であるのか、モデル細胞を用いて検討し、これらの手法を組み合わせることによりより確実に転座等を検出できることを示した。

本研究では、骨髄系細胞の HL-60 細胞とその亜株で高増殖性の HL-60RG 細胞に G-バンド解析、CGH 解析、M-FISH を組み合わせることにより見出した遺伝的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。HL-60 細胞は白血病由来細胞であり染色体変異も多いことが明らかになったが HL-60RG 細胞との差異は比較的わずかであった。注目すべき差異としては、第 9 染色体への第 8 染色体の一部の挿入、第 11 染色体への第 13 染色体の転座が見出された。前者については、c-myc プローブによる FISH 解析と G-バンド解析を組み合わせることにより、第 9 染色体への第 8 染色体の挿入が、c-myc を含む領域の転座であることが示された。また、FISH 解析で検出される c-myc プローブのシグナル強度が非常に強いことより、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も示された。以上の結果より、G-バンド解析、CGH 解析、

M-FISH 解析に加えがん遺伝子プローブを組合わせた遺伝的解析手法が、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。

細胞・組織加工医薬品等の特性指標として細胞が産生する種々のサイトカインや増殖因子等のタンパク質プロファイルの解析が考えられる。本研究では、モデル細胞として HL-60RG 細胞を用いて、培養上清中に産生されるタンパク質を高分解能 2 次元電気泳動法で分離し、分離の良好なスポットを選び、各スポットをトリプシン消化して得られたペプチド断片混合物を MALDI-TOF-MS を用いたペプチドマスマフィンガープリンティング (PMF) 法によりタンパク質の帰属の決定を行った。その結果 17 種類のタンパク質の帰属を決定することができた。さらに、サイトカインや増殖因子がヘパリンに親和性を持つことから培養上清をヘパリンカラムで濃縮し、2 次元電気泳動と MFP 法を組合わせた解析をモデル細胞として HL-60 細胞と HL-60RG 細胞へ適応した。その結果、これら近縁の細胞株間でもそのプロファイルに明らかな差異が認められ、細胞特性の解析法としてのイモビリン 2 次元電気泳動/PMF 解析の有用性が示された。

細胞治療薬の評価において重要なことは、目的タンパク質の同定はもちろんのことであるが、目的タンパク質の詳細な構造やその変化を明らかにすることも重要である。本研究では、はじめに、モデルタンパク質として糖鎖含有タンパク質トロンボモジュリン及びフォリスタチンを用いて、マイクロカラム(内径 1 mm)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 LC/MS/MS による糖ペプチド選択的解析法の目的タンパク質の恒常性評価、糖鎖結合位置、及び予備的な糖鎖構造解析法としての有用性を評価した。

トロンボモジュリンでは、トリプシンによる断片化、LC/MS を用いたペプチド/糖ペプチドマッピング、並びに LC/MS/MS のプリカーサーイオンスキャンによる糖ペプチド選択的マッピングの結果、修飾アミノ酸を含む一次構造の確認、分子内に 4 本存在する N 結合糖鎖の構造と各部位における糖鎖の不均一性、1 ヘキソースの結合と結合位置、及び複数の O 結合糖鎖を有するペプチドの確認を行うことができた。

フォリスタチンについても、エンドプロテイナーゼ Asp-N 消化と LC/MS 及び LC/MS/MS によって、一次構造確認、糖鎖結合部位、糖鎖構造とその不均一性を明らかにし、糖鎖は部分的に結合していることを明らかにすることができた。フォリスタチンの糖鎖構造及び糖鎖結合位置に関してはまだ報告がない。我々の分析法は、構造未知のタンパク質の構造解析にも有用であることが明らかになった。

本分析法は、僅か 3~4 日で目的タンパク質の構造を確認することができることから、細胞治療薬が発現する目的タンパク質の評価に有用であると思われた。

つづいて、細胞分泌微量タンパク質の分析に応用することを目的として、マイクロ LC/MS よりも微量化が期待できる CapLC/MS の導入を検討した。まず、糖鎖部分の恒常性評価に応用することを目的として、CapLC/MS を用いた糖鎖プロファイル解析法を検討した。その結果、モデル

として用いたトロンボモジュリンの糖鎖構造を微量で簡単に解析することができた。ペプチド/糖ペプチドマッピングを用いて糖タンパク質を解析する際、糖鎖の不均一性によりペプチド/糖ペプチドマップや糖ペプチドのマスマスペクトルが複雑になり、解析が困難になる場合が多い。従って、糖鎖構造解析法の開発は、糖鎖部分の恒常性を評価するという点からだけでなく、ペプチド/糖ペプチドマッピングの解析を容易にさせるという点からも有用であると思われる。

さらに、CapLC/MSによるペプチド/糖ペプチドマッピング、及びCapLC/MS/MSによる糖ペプチド選択的解析法を検討し、マイクロボアカラムを用いた場合の10分の1量のトロンボモジュリンでマイクロLC/MSで得られたものと同様なペプチド/糖ペプチドマップ、及び糖ペプチドマップが得られることを確認した。開発した一連の操作、すなわち、CapLC/MSによる糖鎖プロフィール解析、及びペプチド/糖ペプチドマッピング、並びに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によって、細胞治療用医薬品が分泌する目的タンパク質の特性解析が可能になると期待された。

そこで、本研究において確立した分析法を実際、電気泳動法で分離されたゲル内糖タンパク質の特性解析に応用し、その有用性を評価した。

はじめに、t-PAをモデルタンパク質として用い、SDS-PAGE後、ゲル内消化を行い、ペプチド断片、及び糖鎖を回収し、CapLC/MSを用いた糖鎖プロフィール解析、及びペプチド/糖ペプチドマッピング

を行った。その結果、電気泳動前のt-PAと同様な糖鎖プロフィール、及びペプチド/糖ペプチドマップが得られることが確認された。

次に、細胞・組織のモデルとしてウシ脳を用い、膜に存在し、神経網形成等に関連する脳特異的タンパク質群のプロフィール解析と検出されたタンパク質の構造解析を行った。まず、SDS-PAGEに妨害を及ぼす脂質を除去し、界面活性剤処理によって、ハウスキーピング的に多量に存在するタンパク質を除去した。目的とする膜タンパク質可溶性画分を得て、SDS-PAGEを行い、複数のバンドが得られた。t-PAに準じてゲル内消化を行い、ペプチド断片、及び糖鎖を回収した。ペプチド断片を用いたCapLC/MS/MS及びデータベース検索により、複数のタンパク質が同定された。さらに、糖鎖プロフィール解析によって、構造未知の糖鎖構造が明らかにされた。以上のように、本分析法は、細胞・組織の複雑なタンパク質混合物から、細胞・組織に特異的なタンパク質のプロフィールを作成し、目的タンパク質の同定と詳細構造の解析に有用な方法であることが示唆された。今後は、様々な事例に対応できるように有用性の拡大を目指していきたいと考えている。

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様々な断片長のhTERTプロモーター欠失変異体を用いた検討より、hTERT遺伝子の5'上流286bpのプロモーター領域から構成されるレポーター遺伝子が有用であることが明らかになった。一方、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。hTERT プロモーターのシスエレメントの解析より、少なくとも c-Myc が hTERT の転写活性化に直接関与していることが明らかになった。さらに、c-Myc による hTERT の転写活性化機構は、コアプロモーター領域及び第 2 イントロン上に位置する E-box を介して誘導されていることも判明した。ガン細胞におけるテロメラーゼの活性化には、c-Myc の発現誘導が必要不可欠であると推察される。一方、最近 Myc スーパーファミリーに属する Mad1 が hTERT 遺伝子の転写抑制に関与していることが報告された。一般に、Mad1 は c-Myc の結合部位である E-box に結合して、c-Myc による転写を抑制していると考えられている。従って、c-Myc と Mad1 の発現量のバランスによって、hTERT の転写、さらにはテロメラーゼの活性化が制御されている可能性がある。

また、hTERT の転写制御に関して、c-Myc 以外の転写因子 (MyoD、IRF-1) の影響についても解析を行った。その結果、hTERT プロモーター上には MyoD 及び IRF-1 の潜在的結合部位が存在していたにも関わらず、MyoD、IRF-1 は hTERT プロモーターの転写制御には関与していないと推定された。しかしながら、今回検討したプロモーター領域 (-1391bp ~ -25bp) 以外に、これらの転写因子が作用する可能性も残されていることは否定できない。さらなる解析が必要であると考えられる。

ポリウレタン材料上で分離された二つの形質転換巣 (A5, A6) とポリ乳酸材料上で分離された二つの形質転換巣 (L11,

L21) と親株 (A3111) について DNA チップを用いる遺伝子発現解析を行った。分離した四つの形質転換巣由来細胞は明らかに形質転換能を維持しており、その強さは A5 < A6 < L21 < L11 の順であることが明らかとなった。

癌遺伝子及び癌抑制遺伝子についてその発現の変化が顕著であったのは、c-fos 癌原遺伝子、FBJ 骨肉腫癌遺伝子 B、及び Jun 癌遺伝子であったが、これらは、解析した遺伝子全体でも最も発現の変化が顕著なものであった。形質転換巣 L11 では親株の 10.9 倍、A5 では 7.8 倍の FBJ 骨肉腫癌遺伝子 B の発現亢進が認められたが、A6 及び L21 では発現の変化はなかった。pleiotrophin は、形質転換巣 L11 及び L21 において、親株の 1/25.2 倍の発現抑制を示した。

高分子材料の種類により、発現パターンに違いが認められるもののポリ乳酸上から分離された形質転換巣 L11 及び L21 とともに、骨肉腫の発生に関連する FBJ 骨肉腫癌遺伝子 B 及び c-fos の発現が高いこと、またポリウレタンから分離された A5 でもこれらの遺伝子の活性が高かった。In vivo ラットでの発癌実験でもポリ乳酸では 50 匹中 22 匹が腫瘍を発生し、腫瘍中の 6 例では骨肉腫が認められたという。ポリウレタンではポリ乳酸に比べて腫瘍発生率は低いものの、骨肉腫の発生が報告されており、in vitro で得られた形質転換巣の遺伝子発現プロファイルは、in vivo での腫瘍発生強度や、骨肉腫発生を裏付けるものであった。

高分子材料を足場として用いる細胞組織利用医療用具において、今回腫瘍形成に

伴って大きく変動することが明らかになったがん遺伝子やがん抑制遺伝子の動態を解析することにより腫瘍発生を評価できるかさらに検討を行う。

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、PP膜と修飾ポリウレタンでコートした膜の免疫隔離能の比較を行った。その結果、PP膜で、同系、異系、異種から採取した器官を埋入した群では、採取した器官の原形を留めず、著しい形態異常が観察されが、修飾ポリウレタンでコートした膜では、原形を留め、形態保持機能の著しい改善を認めたと。即ち、外からの免疫的な攻撃を防ぐ免疫隔離膜としての機能を示した。一方、埋植ラットでの CD4/CD8 サブセットの割合の変化に関して、PP膜単独処置群に比較してPP膜内に異系ラット、異種マウスの肢芽器官を埋入した群の方が、CD8陽性細胞の割合が高かった。しかし、修飾ポリウレタンコート膜を使用した場合には、PP膜単独と修飾ポリウレタンコート膜内器官埋入群との間でCD8陽性細胞の割合に有意な差はなかった。したがって、この新規免疫隔離膜を用いることにより、レシピエント動物からの補体等の非特異的反応による攻撃を受けることなく、細胞由来タンパク質等によって惹起される液性免疫反応の影響をモデル動物を用いて評価できる可能性が示された。

細胞から分泌される目的生理活性タンパク質の生体内の動態解析法の開発を目指して、2つの2連のシステイン間に2つのアミノ酸があるような一次構造(-CCXXCC-, Xはシステイン以外の任意のアミノ酸)を含む α -ヘリックスに特異

的に配位して、強い蛍光を生じる fluorescein 誘導体 FLAsH を利用した蛍光標識法の開発に関する検討を行った。この方法が成立するには、(1) 上記構造を含むタグペプチドを付加した目的タンパク質の FLAsH 標識が定量的であること、(2) 目的タンパク質へのタグペプチドの付加が、目的タンパク質の機能に影響を及ぼさないこと、(3) 目的タンパク質へのタグペプチドの付加が、目的タンパク質そのものの動態に影響を及ぼさないこと、という条件をクリアーすることが好ましい。

まず(1)についての検討を行い、以下のような血清中のタンパク質の定量的な標識条件を確立した。

- (1)血清を PBS(pH7.3)で 2 倍希釈 (ただし 目的タンパク質濃度 0.025~0.50mM)
- (2)1,2 Ethanedithiol 10 μ M 添加、15 分 以上 室温処置
- (3)2-Mercaptoethanol 1.0mM 添加
- (4)FLAsH 1.5mM 添加、30 分 以上室温処置

ただし、同時に血清中に測定に干渉する何らかの物質が存在することを示唆する結果も得た。

続いて TNF- α をモデルにして、機能に影響することなく FLAsH 結合性タグを導入する方法を検討した。まず、挿入の位置であるが、TNF- α の EF-loop へタグを挿入した場合、(1)タンパク質としての発現量、あるいは分泌量が少ない、及び(2)分泌されたタンパク質の生物活性が低い(あるいはない)、という可能性が考えられた。このことから、EF-loop は TNF- α の機能発現に直接かかわる領域ではないものの、その修飾により、細胞障害活性等の機能が妨げられる可能性が考えられた。一方、もう一

箇所、タグの導入で影響をうけにくいことが予想される C-末端の場合であるが、発現プラスミドを導入した HeLa 細胞において発現、分泌は容易に確認することができた。さらに生物活性（細胞障害活性）においても、TNF- α と同様の細胞障害活性を示すことが明らかとなった。

次に FIASH 親和性タグの種類を検討として、最近 Adams らによる α ヘリックス型タグよりむしろヘアピン型タグが FIASH とより安定的な結合を示すという報告 (*J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6063-6076 (2002)) を参考に、 α ヘリックス型タグとともにヘアピン型タグを導入した TNF- α を発現させ、その特性を調べた。その結果、C-末端へ導入した TNF- α において、ヘアピン型タグの場合も α ヘリックス型タグの場合とほぼ同じレベルで発現、分泌され、さらに細胞障害活性においても同等であることが確認された。しかしながら、FIASH との結合を蛍光の増加として確認したところ、 α ヘリックス型タグ導入 TNF- α では蛍光の増加が検出されたにもかかわらず、ヘアピン型タグ導入 TNF- α では確認できず、ヘアピン型タグの有用性は見出せなかった。この結果と Adams らの結果との相違の原因については今のところ説明できない。しかし、Adams らは、タグペプチド部分のみを用いて結合性を検討しており、TNF- α に結合させた本実験とは反応条件が異なっていることが、その原因であろう。

このように、FIASH 結合性タグの導入法としては C-末側に α ヘリックス型タグを導入した場合、最もよい結果が得られている。しかし、初年度に見出した FIASH と

の反応条件をもとに反応させても、蛍光強度の増加は 2 倍弱であり、また蛍光強度そのものも低いものであった。

そこで FIASH との反応条件の詳細な検討を行い、改善に成功した。即ち、SH 還元剤を変更し、SH の酸化還元状態を変化させたところ、蛍光が 60 倍にも増加することが明らかとなった。この条件では、HeLa 細胞の培養上清でも FIASH との反応によって高い蛍光が生じるが、培養上清を部分精製することにより、バックグラウンドを改善することができた。これらの結果から、(1) FIASH とタグとの結合（あるいは結合の結果生じる蛍光）は、SH 基の酸化還元条件によって大きく影響を受けるが、適切に調整することにより、大きな蛍光変化として検出可能である、(2) HeLa 細胞からは FIASH 反応性の物質が遊離されている、(3) したがって、FIASH 結合性タグを用いた蛍光標識法においては少なくとも試料の部分精製が必要、ということが示唆された。

本研究では、FIASH を用いた蛍光標識法について、分泌タンパク質の TNF- α とともに、膜タンパク質であるナトリウムカルシウム交換体の蛍光標識の可能性も検討した。その結果、交換活性に関与していないと思われる C-末端にタグを導入すれば、活性に影響することなく蛍光標識が可能なことを示唆する結果が得られた。しかし一方、目的タンパク質以外のものも蛍光染色されている可能性も同時に示唆する結果が得られた。

細胞治療薬・医療用具に用いられる細胞・組織は、幹細胞や前駆細胞を素材として、誘導剤による処理、遺伝子工学的改変、

あるいは他の細胞との相互作用などにより目的とする細胞へ分化等をさせ、治療目的に適した細胞・組織へと加工される場合が想定される。このような加工において、目的とした機能が付与されているか、さらには加工の過程において望ましくない細胞特性の変化や機能変化が起きていないかを明らかにすることが、細胞治療を安全に行うために必要となってくる。

本研究では、ヒト末梢血血液幹細胞及びヒト臍帯血幹細胞を分離し、その血管内皮細胞への分化誘導系を確立するとともに、その分化過程を詳細に解析することにより、血管内皮前駆細胞としての有用性をあらかじめ判定できるような細胞指標の提示を試みようとしている。まずヒト末梢血AC133陽性細胞より血管内皮細胞への誘導系を確立し、その経時的な血管内皮細胞の分化指標の解析より、分化初期にCD31が特異的に発現してくることより、このCD31が血管内皮前駆細胞の特性指標になるのではと想定し、解析を行った。培養6日目のCD31強陽性細胞や陽性細胞を分離し、その血管内皮細胞への分化能を比較したところ、CD31強陽性細胞から非常に多くの接着細胞が出現してくること、この接着細胞がKDRやeNOSなどの血管内皮細胞の指標を強く発現していることなどが明らかになり我々の想定が支持される結果が得られた。CD31強陽性細胞が血管内皮前駆細胞の特性指標となることを示唆した本結果は、初めてのものであり、バージャー病等、血管内皮細胞の誘導を目的として臨床研究が進められている細胞組織加工医薬品の特性指標として応用が期待される。

一方、臍帯血は末梢血に比べて血液幹細胞

が多く含まれていることが明らかにされており、血球系細胞の誘導や血管内皮細胞の誘導の解析にも臍帯血が用いられている。そこで、臍帯血を用いて血管内皮細胞への分化誘導系を確立し、その分化誘導時のマーカー発現の変化等を解析した。その結果、臍帯血は、AC133陽性細胞/CD34陽性細胞の比率が高いことが確認された。そこで臍帯血幹細胞を分離し血管内皮細胞に分化誘導系を確立することを試みた。同時に、より多量の血管内皮前駆細胞を誘導させるために、種々の増殖因子等の効果についても検討した。すなわち、臍帯血と末梢血をSCF、TPO、VEGF存在下で培養したところ、末梢血AC133陽性細胞は殆ど増加しないにもかかわらず、臍帯血AC133陽性細胞をこれらの増殖因子とともに培養すると6日間で5倍ほど細胞を増加させることができた。一方、臍帯血AC133陽性細胞を6日間培養することにより、CD31強陽性細胞の比率が、0.25%から約10%にまで増加することが明らかになった。臍帯血AC133細胞では培養6日間で全体の細胞数が5倍以上増加することから、このような増殖因子存在下で培養することにより血管内皮前駆細胞と想定しているCD31強陽性細胞数を約250倍にも増加させることができることになる。

臍帯血AC133陽性細胞もVEGF存在下に培養することにより血管内皮細胞が効率よく誘導されることも明らかになった。培養6日目でCD31強陽性細胞の出現が最も高いことは、末梢血AC133細胞を培養したときと同じであるが、末梢血ではその後急激にCD31強陽性細胞の発現が低下するのに対して、臍帯血ではその低下が非常に緩

やかであった。これは、臍帯血 AC133 陽性細胞が上記した増殖因子に反応して幹細胞が増幅するためかあるいは血管内皮前駆細胞そのものが増幅する可能性が考えられた。この CD31 強陽性細胞や CD31 陽性細胞をソーティングし、フィブロネクチン上で培養して、末梢血と同様の結論が得られるか解析したところ、CD31 強陽性細胞から多くの接着細胞が出現し、また血管内皮細胞の指標としての KDR や eNOS の高い発現が認められた。さらに、この CD31 強陽性細胞由来接着細胞をマトリゲル中で培養することにより管腔形成が認められることより、CD31 強陽性細胞から、血管内皮としての十分な機能を持つ細胞を誘導できることが明らかになった。

以上のように、臍帯血 AC133 陽性細胞を種々の増殖因子や VEGF 存在下に培養することにより血管内皮前駆細胞と想定している CD31 強陽性細胞の増幅と誘導を行う系を確立することができた。今後は、CD31 強陽性細胞の機能面での解析をさらに進め、血管内皮前駆細胞の特性指標としての有用性を確認していく必要がある。

近年、小型肝細胞が肝幹細胞として細胞治療薬への応用が期待されていることから、小型肝細胞と成熟肝細胞で発現が異なるタンパク質を探索し、その品質評価の指標としての応用を目指した研究が活発に行われている。それらの研究の多くは小型肝細胞を培養し、分化した成熟肝細胞特異的あるいは肝細胞において普遍的に発現する既知のマーカートンパク質の発現を検討しようというものである。その結果、アルブミン、トランスフェリン、サイトケラチン 8、サイトケラチン 18 など肝細胞に

おける普遍的なマーカーは全て小型肝細胞に存在することが明らかになっている。また、分化型肝細胞のマーカーである $\alpha 1$ -アンチトリプシン、コネキシン 32 は培養初期には発現がみられず、培養時間の経過に伴い発現細胞が増加する傾向がみられている。一方、小型肝細胞においてのみ発現がみられるタンパク質はこれまで同定されていない。

小型肝細胞と成熟肝細胞で発現が異なっているタンパク質の探索に関する研究が進んでいない理由の一つとして探索の対象となる既知のマーカートンパク質の数が限られていることが考えられる。そこで我々は肝細胞を成熟肝細胞と小型肝細胞に分画し、高分解能 2 次元電気泳動法を用いた解析を試みた。その結果、アネキシン III が小型肝細胞に特異的に発現していることが今回初めて明らかになった。本知見は小型肝細胞が今後細胞治療薬として応用される場合にその品質評価の指標としてアネキシン III が有用である可能性を示唆している。今後、ヒトの小型肝細胞においても同様な検討を行い、その品質評価の指標としての有用性について更に検討を行う必要がある。

今回小型肝細胞における特異的な発現が明らかになったアネキシン III は 10 種類のアネキシファミリーの 1 つである。アネキシンはクロマフィン細胞の分泌顆粒を Ca^{2+} 依存的に凝集させる因子として発見された因子である。その後、ホスホリパーゼ A2 活性阻害、顆粒凝集、膜融合作用が多くのアネキシンに共通の作用と推定され、膜輸送の制御、炎症反応、血液凝固反応、細胞情報伝達、癌、自己免疫疾

患等に関与することが示唆されている。しかしながら、種々のアネキシンの中でアネキシン III に特異的な機能は細胞からの各種生体内因子の分泌促進作用しか知られていない。今後、小型肝細胞におけるアネキシン III の特異的な発現の意義について、新たなアネキシン III の機能の探索も含めて詳細な検討が必要である。

組織工学に使用される生分解性材料を細胞の足場となる骨格材料としたとき、細胞が骨格材料に付着し、増殖する過程で材料を分解し、その結果、生成される低分子量ポリマーの影響を評価することが重要であると考える。しかし、この方面の研究は殆どなされていない。マウステラトカルシノーマ細胞株 AT805 由来の軟骨前駆細胞株 ATDC5 細胞は、インスリンによって軟骨細胞に分化することが知られている。インスリンによる ATDC5 細胞の軟骨細胞分化誘導では、細胞の増殖も促進され、細胞の凝集・軟骨結節の形成が見られる。このインスリンによる軟骨細胞分化誘導の過程で軟骨結節を形成しない細胞は軟骨細胞には分化しない。このことから、インスリンが直接軟骨分化を誘導するのではなく、インスリン刺激によって誘導される因子によって、軟骨分化が進行するものと考えられている。このことは、BMP-4 を添加することで、ATDC5 細胞は軟骨結節を形成することなく軟骨細胞へと分化することから支持される。本研究では、生分解性合成高分子であるポリ乳酸(PLLA)が ATDC5 の軟骨分化を誘導・促進することを明らかにした。PLLA を添加することにより、ATDC5 細胞は凝集し、軟骨結節を形成して軟骨細胞へと分化する。PLLA はインスリンと同様な ATDC5

細胞の軟骨分化を誘導するが、軟骨細胞の分化マーカーの発現時期や分化指標の発現に違いがみられることから、PLLA による軟骨分化誘導機構はインスリンによる軟骨分化誘導機構と部分的に異なる可能性が示唆された。このように培養基質である PLLA などの生分解性高分子からのシグナルによって細胞が分化・増殖を誘導することが明らかになったことより、分化誘導過程で共通して変化する因子を探索することにより軟骨前駆細胞の指標を明らかにすることができると期待される。

E. 結論

(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、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 1000 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 NAT の高感度化が可能であることが示された。さらに、新規ウイルス感染性の迅速・高感度検出法として infectivity PCR の開発を行った。

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、全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ヘパリンカラムにて濃縮し、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 LC/MS と CapLC/MS による目的タンパク質の構造解析の開発

を行い、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、タンパク質プロファイ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 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持つことを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表及び著書

- 1) Iwata, A., Satoh, K., Murata, M., Hikata, M., Hayakawa, T., Yamaguchi, T.: Virus concentration using sulfonated magnetic beads to improve sensitivity in nucleic acid amplification tests. *Biol. Pharm. Bull.*, (in press)
- 2) Satoh, K., Iwata, A., Murata, M., Hikata, M., Hayakawa, T., Yamaguchi, T.: Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *J. Virol. Method.* (in press)
- 3) Kanayasu-Toyoda, T., Yamaguchi, T., Oshizawa, T., Kogi, M., Uchida, E., Hayakawa, T.: The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells. *Biochem. Pharm.* (in press)
- 4) Kaneyasu-Toyoda, T., Yamaguchi, T., Oshizawa, T., Hayakawa, T.: CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells. *J. Cell Physiol.*, 195, 119-129 (2003)
- 5) Kawasaki, N., Itoh, S., Ohta, M., Hayakawa, T.: Microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein by capillary liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* (in press)
- 6) Kawasaki, N., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S., Hayakawa, T.: Usefulness of sugar mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products. *Biologicals*, 30, 113-123 (2002)
- 7) Ohta, M., Kawasaki, N., Itoh, S., Hayakawa, T.: Usefulness of glycopeptide mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessment of glycoprotein products. *Biologicals*,

- 30, 235-244 (2002)
- 8) Itoh, S., Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, M., Hyuga, S., Hayakawa, T.: Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 968, 89-100 (2002)
- 9) Itoh, S., Kawasaki, N., Ohta, M., Hayakawa, T.: Structural analysis of a glycoprotein by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Application to recombinant human thrombomodulin. *J. Chromatogr. A*, 978, 141-152 (2002)
- 10) Xu, Z., Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Mayumi, T., Hayakawa, T.: Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector. *J. Control Release*, 81, 155-163 (2002)
- 11) Omori, M., Mizuguchi, H., Ohsawa, K., Kohsaka, S., Hayakawa, T., Abe, K., Shibasaki, F.: Modification of a fiber protein in an adenovirus vector improves in vitro gene transfer efficiency to the microglial cell line. *Neurosci. Lett.*, 324, 145-148 (2002)
- 12) Kanayasu-Toyoda, T., Yamaguchi, T., Oshizawa, T., Kogi, M., Uchida, E., Hayakawa, T.: Role of the p70 S6 kinase cascade in neutrophilic differentiation and proliferation of HL-60 cells -A study of transferrin receptor-positive and -negative cells obtained from dimethyl sulfoxide- or retinoic acid-treated HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys.*, 405, 21-31 (2002)
- 13) Mizuguchi, H., Hayakawa, T.: Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes. *Gene*, 285, 69-77 (2002)
- 14) Takahashi, M., Seki, N., Ozaki, T., Kato, M., Kuno, T., Nakagawara, T., Watanabe, K., Miyazaki, K., Ohira, M., Hayashi, S., Hosoda, M., Tokita, H., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Todo, S., Nakagawara, A.: Identification of the p33^{ING1}-regulated genes which include *cyclin B1* and proto-oncogene *DEK* by using cDNA microarray in a mouse mammary epithelial cell line NmUMG. *Cancer Res.*, 62, 2203-2209 (2002)
- 15) Mizuguchi, H., Hayakawa, T. : Enhanced anti-tumor effect and reduced vector dissemination with fiber-modified adenovirus vectors expressing herpes simplex virus thymidine kinase. *Cancer Gene*

- Ther.*, 9, 236-242 (2002)
- 16) Mizuguchi, H., Hayakawa, T.: The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector. *J. Gene Med.*, 4, 240-247 (2002)
- 17) Nakagawa, T., Takahashi, M., Ozaki, T., Watanabe, K., Todo, S., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Nakagawara, A.: Autoinhibitory regulation of p73 by Δ Np73 to modulate cell survival and death through p73-specific target element within the Δ Np73 promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 2575-2585 (2002)
- 18) Nagayama, Y., Kita-Furuyama, M., Ando, T., Nakao, K., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Eguchi, K., Niwa, M.: A novel murine model of Graves' hyperthyroidism with intramuscular injection of adenovirus expressing the thyrotropin receptor. *J. Immunol.*, 168, 2789-2794 (2002)
- 19) Okada, Y., Okada, N., Nakagawa, S., Mizuguchi, H., Kanehira, M., Nishino, N., Takahashi, K., Mizuno, N., Hayakawa, T., Mayumi, T.: Fiber-mutant technique can augment gene transduction efficacy and anti-tumor effects against established murine melanoma by cytokine-gene therapy using adenovirus vectors. *Cancer Letter*, 177, 57-63 (2002)
- 20) Okada, Y., Okada, N., Nakagawa, S., Mizuguchi, H., Takahashi, K., Mizuno, N., Fujita, T., Yamamoto, A., Hayakawa, T., Mayumi, T.: Tumor necrosis factor α -gene therapy for an established murine melanoma using RGD (Arg-Gly-Asp) fiber-mutant adenovirus vectors. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93, 436-444 (2002)
- 21) Mizuguchi, H., Hayakawa, T.: Improvement of adenovirus vectors for gene transfer. *Animal Cell Technology : Basic and Applied Aspects*, 12, 1-5 (2002)
- 22) Hayakawa, T.: Perspective on assessing comparability of biotechnology products -A view from Japan-. *Biologics 2000*, Brown, F., Lubiniecki, A., Murano, G. (eds), *Dev. Biol. Stand.*, Basel, Karger, 109, 27-40 (2002)
- 23) Kawamata, Y., Nagayama, Y., Nakao, K., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Sato, T., Iahii, N.: Receptor-independent augmentation of adenovirus-mediated gene transfer with chitosan in vitro. *Biomaterials*, 23, 4573-4579 (2002)
- 24) Mizuguchi, H., Koizumi, N., Hosono, T., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Utoguchi, N., Watanabe, Y., Hayakawa, T.: CAR- or α integrin-binding ablated adenovirus