

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

細胞組織利用医薬品・医療用具の品質・安全性等の  
確保に関する基盤技術開発研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 早川 堯 夫

平成16（2004）年4月

## 目次

### I. 総括研究報告

細胞組織利用医薬品・医療用具の品質・安全性等の確保に関する基盤技術開発研究 — 1

早川堯夫

### II. 分担研究報告

1. 細胞・組織加工医薬品等の安全性等に関する研究 — 115

山口照英

2. 細胞・組織加工医療用具の品質等の確保に関する研究 — 142

土屋利江

3. 細胞タンパク質プロファイル評価技術の開発 — 178

川崎ナナ

4. 細胞治療薬の新規体内動態解析技術の開発研究 — 204

川西 徹

5. 細胞組織加工医薬品の品質等の確保に関する研究 — 215

鈴木孝昌

6. 細胞の特性解析技術の開発 — 230

宮澤 宏

7. 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 — 247

新見伸吾

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 — 253

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

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）

総括研究報告書

細胞組織利用医薬品・医療用具の品質・安全性等の確保に関する基盤技術開発研究

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、新たに開発したPEI磁気ビーズによるウイルス濃縮法の機構解析を行い、陽イオン解離基を高密度に持つPEIが濃縮に有用であること、抗体が同時に濃縮されることなどを明らかにした。また、これらの解析結果の応用として抗ウイルス抗体を添加してウイルス濃縮を行うことでさらなる高感度化が可能なことを明らかにした。さらに、PEI磁気ビーズはヒトウイルスであるHBVやHCVの濃縮にも適応可能であることを明らかにした。(2) 複数のSTRマーカーを組合わせてマイクロサテライト多型を検出することにより、細胞の同一性等の確認試験に非常に有用であることを明らかにすることができた。また、STRマーカーを利用することにより細胞亜株間の遺伝的変異も検出可能なことを示すことができ、細胞の変異を検出するのにも有用な手法となり得る可能性が示された。(3) 細胞特性評価の一環として、サイトカインアレイの細胞由来タンパク質プロファイリングへの有用性を評価するために、モデル細胞及び血管内皮前駆細胞等への適応について解析した。サイトカインアレイは細胞が産生するサイトカインの網羅的解析が可能であり、簡便・迅速性にも優れていることを明らかにした。(4) 細胞治療の有効成分としてのタンパク質プロファイル評価と糖鎖修飾を含むタンパク質の特性解析法としてタンパク質のトリプシン消化物をLC/MS/MSで分析する手法の開発を行い、タンパク質一次構造、糖鎖結合部位、及び部位特異的糖鎖構造の解析が可能なことを示した。CapGCC-LC/MSを用いた糖鎖プロファイリング法をマウス腎臓からN-グリコナーゼで切り出した糖鎖解析に適用しその有用性を明らかにした。(5) ポリ-L-乳酸 (PLLA) によるBALB/cLマウスのがん系を用いて非常に初期の皮下細胞においてギャップジャンクション依存性細胞間情報伝達及びコネキシン遺伝子の発現の抑制とTGF- $\beta$ の産生能の亢進が見られることを明らかにし、がん化の予測指標となる可能性を示唆することができた。また、テロメア結合タンパク質 (TRF1) が細胞の不死化と密接に関連することを明らかにすることができ、TRF1が細胞のがん化指標として非常に有用であることを示された。(6) 新たに開発した免疫隔離膜を用いてドナー骨髄細胞とレシピエントリンパ球細胞とのin vitroでの相互作用の解析を行い、新規免疫隔離膜を用いることにより、ドナー細胞の生存率の上昇とレシピエントリンパ球による拒絶反応時によって惹起されるサイトカインの産生等を抑制することが可能であることが示された。これらの結果より、開発した免疫隔離膜を用いることにより細胞性免疫反応を起こさず移植する細胞によって引き起こされる可能性のある液性免疫の評価が可能であることが確認された。(7) 細胞治療の有効成分としての目的タンパク質の分離および

MALDI-TOF-MSの高感度化のために磁性ナノ粒子が有用であることを明らかにし、目的タンパク質の体内動態解析への有用性が示唆された。さらに、トランスフェリンやポリエチレングリコール等の高分子をあらかじめマトリックスに添加することにより質量分析の高感度化が可能なことを明らかにした。(8) ヒト血液幹細胞から血管内皮前駆細胞への分化誘導系の解析より、血管内皮前駆細胞の細胞指標として、CD31に加えLox-1やコネキシン37、コネキシン40が有用であることを明らかにした。(9) マウス胚性腫瘍細胞P19細胞をモデルに、神経細胞および心筋細胞に効率的に分化させる技術を確立した。種々の分化マーカーの解析から、神経細胞に分化誘導したP19細胞は主としてニューロンに分化することが明らかになった。2次元電気泳動によるプロテオーム解析より、分化誘導過程初期から変動のあるタンパク質を見だし、これらの誘導初期に発現してくるタンパク質が神経前駆細胞の特性指標になる可能性が示された。また、P19細胞のサブクローンCL6細胞の心筋細胞分化モデルとしての特性を明らかにする目的で、CL6細胞から自動能を持つ心筋様細胞に分化させた細胞の心筋マーカー遺伝子の発現、蛍光抗体染色、および活動電位の検討を行い、心筋様細胞の表現型は、幼若度の高い心房筋細胞に類似した特徴を持つことを初めて明らかにした。(10) 小型肝細胞に特異的なアネキシンⅢの発現は転写レベルで制御されていることを明らかにし、肝幹細胞指標としての有用性が確認された。(11) ヒトの関節の軟骨細胞 (HAC) の増殖や分化に及ぼす塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) と硫化第一鉄 (FeSO<sub>4</sub>) の影響について検討を行い、FeSO<sub>4</sub>がHACの軟骨形成への顕著な促進効果を持つことを初めて明らかにした。

#### 分担研究者

土屋 利江	国立医薬品食品衛生研究所
山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所
川西 徹	国立医薬品食品衛生研究所
川崎 ナナ	国立医薬品食品衛生研究所
新見 伸吾	国立医薬品食品衛生研究所
宮澤 宏	国立医薬品食品衛生研究所
鈴木 孝昌	国立医薬品食品衛生研究所)

岩田 明子	埼玉県赤十字血液センター
澤田 留美	国立医薬品食品衛生研究所
原園 景	国立医薬品食品衛生研究所
橋井 則貴	国立医薬品食品衛生研究所
佐藤 陽治	国立医薬品食品衛生研究所
押澤 正	国立医薬品食品衛生研究所
小林 哲	国立医薬品食品衛生研究所
豊田 淑江	国立医薬品食品衛生研究所

#### 研究協力者

白畑 実隆	九州大学大学院農学研究院 教授
吉原なみ子	国立感染症研究所・室長
森田 育男	東京医科歯科大学・教授
有川稔多加	東京医科歯科大学
有賀 豊彦	日本大学・教授
佐藤 功栄	埼玉県赤十字血液センター 研究部・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は多い。

本年度は、1) 新たに開発したPEI磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法の機構解析と、解析結果に基づくPEI磁気ビーズ濃縮法の最適化についての検討を行うとともに、ヒト感染性ウイルスへの適応についても検討を行った。2) 多型性をもつSTRのマーカー16種類及び独自に開発した17番染色体に対するSTRマーカーを用いて細胞の遺伝的同一性等の評価への適応について血球系細胞をモデル細胞として選り比較検討を行った。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の基礎として、サイトカインアレイを用いた細胞由来サイトカインの解析への適応について検討を行った。4) 細胞発現タンパク質消化物をLC/MS/MSで直接解析する方法に基づく細胞タンパク質プロファイル評価、及び糖鎖を含む特性解析法の開発を目的に、LC/MS/MSによる糖ペプチド解析法の有用性について検討するとともに、CapGCC-LC/MSを用いて細胞組織由来タンパク質のNグリカナーゼ消化物に直接応用することによって、糖鎖プロファイリング法の実行可能性を検討した。5) 細胞のがん化指標の有用性確保に関する研究の一環として、PLLAによるBALB/cJマウスの発ガン誘導系を用いて、*in vivo*がん化が起こる前の非常に初期に起こっている変化について解析し、特にギャップジャンクション機能やコネキシン (Cx) の

発現ががん化指標として有用性であるか検討した。また、TRF1の細胞不死化との関連について検討を行い、TRF1の細胞がん化指標としての有用性について検討した。6) 新規免疫隔離膜の機能を*in vitro*免疫反応系を用いて評価を行った。7) 細胞治療の有効成分としての目的タンパク質の分離及びMALDI-TOF-MSの高感度化のために磁性ナノ粒子の有用性について検討した。8) 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、ヒト臍帯血及び末梢血由来AC133陽性細胞の血管内皮細胞への誘導系を用いた検討、胚性多能性幹細胞P19やその亜株であるCL6の神経細胞や心筋細胞への分化誘導系の解析を行い、特性指標の探索、機能誘導された細胞の特性解析を行った。肝幹細胞の特性指標としてのアネキシンⅢの有用性について評価した。FeSO<sub>4</sub>やbFGFのヒト軟骨細胞の分化誘導における役割について解析した。

## B. 研究方法

### 1. ウイルスのポリエチレンジアミン及びスルホン酸磁気ビーズによる濃縮

ポリエチレンジアミン (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 70,000 の PEI をカップリングして作製した。また、PEI の分子量がウイルス濃縮効率に及ぼす影響を解析するために、平均分子量 1,800 の PEI を同様の方法でカルボキシル基を持つ磁気ビーズに結合させた。

通常の実験では、100 $\mu$ L (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 100 $\mu$ L 及び磁気ビーズを添加する前のウイルス液 100 $\mu$ 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。

また、抗ウイルス抗体の濃縮効率への影響を調べるために、ウイルス液にアフィニティ精製した抗 HSV-1 ポリクローナル抗体あるいは抗 HBV ポリクローナル抗体を添加し、ついで上記と同様に 100  $\mu$ l の PEI 磁気ビーズ溶液を添加し、その後は同様の操作でウイルスの濃縮、ウイルスゲノムの抽出を行った。

### 1.1 PCR 及び RT-PCR

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 1 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、サイバーグリーンを用いて定量した。

### 1.2 PEI 磁気ビーズで濃縮した分画のイムノグロブリンの解析

PEI 磁気ビーズによって濃縮されたウイルス分画にはどのような血清タンパク質が濃縮されているのかを解析する目的で、PEI 磁気ビーズ結合分画と濃縮前のタンパク質の解析を行った。その結果予備的な検討から複数のタンパク質が濃縮されることが見いだされた。特に、280K、245K、150K、55K、26K 付近のタンパク質が濃縮されていることが明らかになった。特に、55K 及び 26K 付近のタンパク質がイムノグロブリンではないかと想定し、濃縮前の分画と濃縮後の分画に含まれるイムノグロブリンの量をウエスタンブロッティングによる解析した。

## 2. STR マーカーによる多型解析

### 2.1 STR マーカー

4 色の蛍光を用いて一度に 16 個の異なる STR マーカーについて解析が可能な PowerPlex16 システムを Promega 社より購入した。PowerPlex システムに含まれる 16 種の STR マーカーに関する情報を表 2 に示す。これらの STR マーカーを増幅するための適当な 3 色の蛍光色素によってラベルされたプライマーがデザインされ、増幅産物の長さをうまく組み合わせることにより、全 STR マーカーの繰り返し数を同時に検出可能になっている。また、独自の STR マーカーとして、本研究所変異遺伝部の本間室長よりヒト 17 番染色体上の STR マーカーの 10 種類の情報提供を受け (表 3)、これらに関しても、多色蛍光ラベルプライマーを使った同時解析の検討を行った。増幅に用いたプライマーの配列を表 4 に示す。

### 2.2 細胞からの DNA の抽出

今回の検討には、以下に示すヒト培養細胞株を用いた。

- HL-60 前骨髄球系白血病細胞株
- HL-60RG HL-60 の増殖速度が亢進した亜株
- TK6 リンパ芽球系白血病細胞株
- WTK-1 TK6 の p53 変異株
- FLC-4 肝臓由来細胞株

これらの細胞のうち、HL-60、HL-60RG と TK6、WTK-1 はそれぞれ同一の細胞に由来する亜株と考えられる。

上記培養細胞 5-7.5 $\times 10^6$  個を遠心分離によって集め、proteinaseK 溶液にて処理した後、通常の Phenol/chloroform 法にてゲノム DNA を抽出した。得られた DNA の沈殿を

70%Ethanolにて洗浄し、TE-4バッファーに溶解させた。

### 2.3 PCR増幅反応

得られたゲノム DNA 2ng を用いて、STR マーカー増幅用 Primer mix により以下の Multiplex PCR 反応を行った。

(標準スケール)

Nuclease-Free Water	14.2 $\mu$ L
Gold Star 10 $\times$ buffer	2.5 $\mu$ L
PowerPlexTM16	
10 $\times$ Primer Pair mix	2.5 $\mu$ L
AmpliAq Gold	
DNA polymerase (4U)	0.8 $\mu$ L
Master mix の 液量	20.0 $\mu$ L
<u>鑄型の DNA (sample)</u>	<u>5.0 <math>\mu</math>L</u>
合計反応液量	25.0 $\mu$ L

ただし、ミニスケールによる反応系では上記反応組成の 1 / 5 量を用い、キャピラリー型 PCR 装置 (Light Cycler) にて、液量 5  $\mu$  L にて増幅を行った。

### 2.4 DNA シークエンサーによる解析

PCR 反応物 1  $\mu$ L を用いて、ABI310 ジェネティックアナライザーにて解析し、それぞれの蛍光波長における増幅産物の長さを、4 色目の蛍光でラベルしたサイズマーカーとの比較により算出し、各 STR マーカーの繰り返し数のパターンを求めた。データ解析には専用の解析ソフトである GeneScan 3.1.2 と Genotyper 2.5 を用いた。

## 3. 細胞由来生理活性タンパク質の解析

### 3.1 細胞産生サイトカイン解析のための細胞培養上清の調製

HL-60、HL-60RG 細胞を 10%FBS を含む

RPMI1640 中で 2 日間培養した。培養後の上清を集め、3,000 x rpm で 10 分間遠心した後、0.22  $\mu$ m フィルターのフィルターを用いて濾過を行い実験に供した。

血管内皮前駆細胞及び血管内皮細胞から分泌されるサイトカインを測定するために、臍帯血及び末梢血の単核球細胞を分離し、さらに抗ヒト AC133 磁気ビーズを用いて AC133 陽性細胞を精製した。この細胞をファイブロネクチン(FN)上、20%FBS、TPO、VEGF、SCF を含む EBM2 培養液中で培養した。一週間ごとに培養液を集め、上記同様に遠心操作と 0.22  $\mu$ m フィルターを用いて濾過した後、実験に供した。

### 3.2 血管内皮分化マーカーの解析

血管内皮の分化とサイトカインの分泌との相関を解析するために、AC133 陽性細胞から分化し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、KDR/flk-1、eNOS の発現をフローサイトメーターを用いて解析した。

### 3.3 サイトカインアレイを用いた血管内皮サイトカインの解析

Ray 社のサイトカインアレイ V を用いて上記培養細胞が産生する 79 種のサイトカインを解析した。解析は添付文書に従って行い、各サイトカイン抗体を結合した膜に、培養上清 1ml を添加し、サイトカイン抗体と結合したサイトカインを、ビオチン標識したサイトカイン抗体、HRP 標識したアビジンでラベルして、ECL で検出した。ECL の強度をイメージ解析し、発現量の変化を解析した。

## 4. 細胞由来タンパク質の高感度プロファイリング技術の開発

### 4.1 試薬

$\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) は Advanced ImmunoChemical 社より、セルロプラスミン (CP) は Calbiochem 社より、ヒト血清は Sigma Aldrich 社より購入した。トリプシンは、Promega 社製の修飾トリプシンを使用した。ギ酸は、和光純薬社製を用いた。PD-10 カラムは、Amersham Pharmacia 社製を使用した。

#### 4.2 血清のアルブミン除去

20  $\mu$ l のヒト血清から Millipore 社のアルブミン除去キットを用いて含有アルブミン量を低減させ、凍結乾燥を行った。

#### 4.3 糖タンパク質の還元カルボキシル化

糖タンパク質サンプル (AFP および CP) 200  $\mu$ g またはアルブミン低減ヒト血清 (HS-Alb) 20  $\mu$ l 分 (血清換算) 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、540  $\mu$ l に溶解した。2-メルカプトエタノール 4  $\mu$ l を加え、40 $^{\circ}$ C で 2 時間放置した。モノヨード酢酸ナトリウム 11.3 mg を試料溶解溶液 90  $\mu$ l に溶かし、試料溶液に加え、遮光下 40 $^{\circ}$ C 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。

#### 4.4 試料のトリプシン消化

還元カルボキシメチル化した糖タンパク質 (RCM-AFP および RCM-CP) およびアルブミン低減ヒト血清 (RCM-HS-Alb) を 50 mM 重炭酸アンモニウム、200 $\mu$ l に溶かした。試料溶液 100  $\mu$ l をとり、1  $\mu$ g/ $\mu$ l の修飾トリプシン溶液を 1  $\mu$ l 加え、37 $^{\circ}$ C で糖タンパク質サンプルは 12 時間、アルブミン低減ヒト血清は 24 時間消化した。消化後、測定まで -20 $^{\circ}$ C に保存し酵素反応を停止させた。

#### 4.5 ペプチド/糖ペプチドマッピング

糖タンパク質のトリプシン消化産物を用いて以下の条件で LC/MS/MS を行った。

試料は、0.1%ギ酸水溶液で適度に希釈した。インジェクトしたサンプル量はそれぞれ以下の通りである。

AFP	0.2 $\mu$ g (タンパク量換算)
CP	0.2 $\mu$ g (m/z 400-2000)
	1.0 $\mu$ g (m/z 1000-2000)
	(タンパク量換算)
HS-Alb	0.01 $\mu$ l (試料血清換算)

HPLC :

装置 : Paradigm MS4 ( Michrom BioResource 社)

カラム : MAGIC C18

(Michrom BioResource 社製、0.2 $\times$ 50 mm、5 $\mu$ )

溶離液 A : 0.1%ギ酸を含む 2%アセトニトリル水溶液

溶離液 B : 0.1%ギ酸を含む 90%アセトニトリル水溶液

グラジエントプログラム :

B 液 : 5% (0~10 分)

5~65% (10~40 分)

流速 : ポンプ 2  $\mu$ l/min、スプリッター

MS

装置 : ハイブリッド型 LC/MS/MS システム Qstar Puler i (Applied Biosystem 社)

イオン化 : ESI

測定モード : ポジティブイオンモード

スプレー電圧 : 2,500 V

スキャン範囲 (m/z) :

検出 : Q/TOF-MS

ペプチドマップ : 400-2,000

糖ペプチドマップ : 700-200

または 1000-2,000

MS/MS : 100-2,000

データ依存的に MS/MS 測定を行った。イオンの価数および大きさにより 50-80 eV の コリジョンエネルギーを与えた。

#### 4.6 マウス腎臓難溶性タンパク質画分の糖鎖の調製

##### 腎臓由来細胞の調整

18 週齢の MRL/Mp<sup>+/+</sup> マウスの腎臓は日本エスエルシー株式会社より購入した。腎臓は Cell strainer (70 $\mu$ m, BD Biosciences, USA)で濾した後、遠心分離 (1000~1200rpm, 5min) により細胞を分画した。得られた画分を 10 倍量の 135 mM NH<sub>4</sub>Cl/17mM Tris-HCl (NH<sub>4</sub>Cl-Tris 溶液、pH 7.2) 溶液中室温で 3 分間処理して混在する赤血球を破壊した。反応は NH<sub>4</sub>Cl-Tris 溶液の 10 倍量の PBS を加えて停止させた後、遠心分離により破壊した赤血球を除去した。さらに沈殿させた細胞は PBS で 3 回洗浄した。

#### 4.7 難溶性タンパク質画分の分画

タンパク質の分画にはサンプル分画キット (2-D Fractionation kit, Amersham Biosciences, USA) を使用し、プロトコールに従い腎臓 100mg 相当の細胞から難溶性タンパク質を分画した。

#### 4.8 糖鎖の切り出し

脱塩、乾燥させたサンプルに、8M グアニジン塩酸塩、5mM EDTA を含む 0.5M Tris-HCl (pH8.6) を 1.0ml を加えて溶解した。さらに、2-メルカプトエタノール 7.2 $\mu$ l を加えて室温で 2 時間放置した。

モノヨード酢酸ナトリウム 21mg を試料溶解溶液 167 $\mu$ l に溶かし、試料溶液に加え、遮光下、室温で 2 時間放置した。反応終了後、PD-10 カラム (Amersham Biosciences, USA) を用いて脱塩し、得られた試料溶液を凍結乾燥した。

凍結乾燥したサンプルに、PNGase F (15 unit) を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH7.2)、500  $\mu$ l を加え、37°C で 96 時間反応させた。反応液はエタノール沈殿によってタンパク質を除去した後、上清を濃縮、凍結乾燥した。得られた糖鎖は 0.5 M 水素化ホウ素ナトリウム水溶液 500  $\mu$ l を加え、室温で 16 時間還元した。反応後、10% (v/v) 酢酸を用いて過剰の試薬を分解させ、Envi-Carb (Supelco, Bellefonte, USA) を用いて脱塩した。

#### 4.9 糖鎖プロファイリング

##### HPLC :

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

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 5~20% (0~15 分)

20~70% (15~35 分)

流速 : ポンプ 100  $\mu$ l/分、

スプリッター 2500/1000

##### ESI-MS :

装置 : 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)

測定モード : ネガ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：2,000 V  
ESI 電圧：1,500 V  
スキャン範囲：700-2,000  
スキャン回数：3 秒

#### 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：2,000 V  
ESI 電圧：2,000 V  
スキャン範囲：100-2,100  
スキャン回数：4 秒  
Collision Gas：Ar, 2.0mTorr  
Collision energy：-25V

### 5. 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

#### 5.1 マウスがん化モデルを用いた検討

##### ①動物

5 週齢の雌の BALB/cJ と SJL/J のマウスを用いた。標準の固形飼料及び水を自由摂取させた。

##### ② PLLA の埋植

PLLA は均一なプレート状のものを用いた。インプラント (20×10×1mm, MW 200,000) は使用前に酸化エチレンガスで滅菌した。ペントバルビタールナトリウム (4mg/Kg) を腹腔内投与して麻酔をかけた後、マウスの皮膚に約 2cm の切込みを入れ、皮下に平らなポケットを作成し、その中に PLLA プレートを一枚ずつ入れ、その後、切開部分を縫い合わせた。両系列とも、対照群にはシャムオペレーションを施した。手術後 30 日間飼育し、その後、埋植した PLLA プレートとそれに隣接した場所から皮下組織を摘出し、培養した。同時にシャムオペレーションを施した対照群に

についても、皮下組織を取り出した。

##### ③ 皮下組織の培養

皮下組織は、10% FBS を添加した minimum essential medium (MEM) で培養した。

##### ④ Scrape-loading and dye transfer (SLDT) 解析

SLDT は、El-Fouly らの方法で行った。直径 35mm の dish にコンフルエントの状態の単層の細胞を実験に供した。PBS(+)で洗浄後、dish 上の細胞をかみそりの刃で傷をつけ、直ちに 0.1% の Lucifer Yellow を入れた。37°C で 5 分間インキュベート後、PBS(+)で 3 回洗浄したものを蛍光顕微鏡で観察した。

##### ⑤ Western blot 解析

直径 60mm の dish にコンフルエントの状態の細胞を直接 100 μL の 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) gel loading buffer (50mM Tris-HCl, pH 6.8、100mM 20mercaptoethanol, 2% SDS、0.1% bromophenol blue、10% glycerol) で溶解した。細胞溶解物のタンパク質量は、micro-plate BCA protein assay を用いて定量した。7.5% SDS-PAGE 後、Hybond-ECL nitrocellulose membrane にトランスファーした。Cx43 タンパク質は抗 Cx43 ポリクローナル抗体を用いて検出した。

##### ⑥ RT-PCR

Cx43 mRNA 発現について RT-PCR を用いて検討した。細胞中の total RNA は Trizol 試薬を用いて抽出した。cDNA は First-Strand cDNA synthesis kit を用いて作成した。Taq polymerase を用いて以下のプライマーを使用して PCR を行った。

Forward:

5'-ACAGTCTGCCTTTTCGCTCTAAC-3'

Reverse:

5'-GTAAGGATCGCTTCTCCCTTC-3'

PCRの条件は、94℃、5分間に続いて、94℃、1分間；60℃、1分間；72℃、1分間を25サイクルの後、72℃、7分間で行った。PCR産物を1.5%アガロースゲル電気泳動し、SYBR Green Iで可視化した。内部標準としてGAPDHを測定した。

#### ⑦ TGF- $\beta_1$ の測定

直径60mmのdishに播種した細胞を用いた。BALB/cJの対照群の細胞をTGF- $\beta_1$  (2ng/mLと10ng/mL)処理した。培養液中のTGF- $\beta_1$ レベルはEnzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)で測定した。

### 5.2 TRF1の細胞のがん化指標としての有用性に関する研究

#### 細胞培養

TIG 3、TIG 7、MRC5、KMS6は日本細胞バンクより入手し、推奨されている培養方法に従って維持した。MRC5細胞をSV40でトランスフォームしたMRC/SV細胞、TIG細胞のp16INK4Aをノックダウンして不死化したTIM細胞はdMEM培地を用いて培養した。

### 6. in vitro系での免疫隔離膜の機能に関する研究

#### 6.1 細胞の調製

Brown Norway (BN) ラットからリンパ球を採取し、RPMI 1640培地で培養した。Lewisラットの上腕骨と頸骨から採取した骨髓リンパ球(BML)はナイロンメッシュでろ過した後RPMI 1640培地で培養した。2×10<sup>6</sup> cells/0.5 mL mediumのBMLをSPUコートしたバッグとしていないバッグにそれぞれ入れた。バッグを0.867×10<sup>6</sup>のBNリンパ球を含む2mLの培地で浸し、37℃で3日間培養

した。

#### 6.2 細胞の生存率測定

バッグの内部の細胞(BML)の生存率は、3日間培養後、SPUコートしたバッグとしていないバッグの内部から同数の細胞をとり、24穴のculture plateで培養した後、alamar blueを用いて測定した。

#### 6.3 サイトカイン測定

3日間培養後、それぞれのバッグをdishから取出し、残った培養液中の細胞(リンパ球)について、細胞中のIL-4、IL-13、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 存在量をELISAで測定した。

#### 6.4 CD4及びCD8発現の分析

6.3と同様に、それぞれのバッグを取り出した後の培養液中の細胞(リンパ球)について、CD8陽性細胞とCD4陽性細胞の細胞数についてフローサイトメトリーを用いて測定した。

### 7. 細胞治療薬の質量分析を用いた新規体内動態解析技術の開発

#### 7.1 試薬

ヒトインスリン、血清、心房性ナトリウム利尿因子(hANP)、グルカゴン、インスリン様成長因子(IGF-I)、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン(BSA)、ウマ脾臓フェリチン、 $\alpha$ -cyano 4-hydroxycinnamic acid (CHCA)、ペプチド・タンパク質混合試料(ProteoMass Peptide & Protein)、ポリリジン、ポリアルギニン、および平均分子量8,000のポリエチレングリコール(PEG)はSigma社から購入した。抗インスリンモノクローナル抗体は日本バイオテスト研究所より購入した。抗マウス免疫グロブリンG(IgG)抗体結合アガロース、抗マウスIgG抗体結合磁性粒子は、それぞれコスモバイオ社およびQIAGEN社より購入した。ヒトIgGおよび平均分子量20,000のPEGは

和光純薬から購入した。

## 7.2 遠心による抗体結合画分 (BF) の分離

10  $\mu$ l の抗インスリンモノクローナル抗体溶液を 1.5ml チューブにとり、90  $\mu$ l の抗マウス IgG 抗体結合アガロース懸濁液を添加して攪拌後、室温で 30 分間静置した。遠心後に上清を除去し、得られた沈殿に 90  $\mu$ l の 50mM tris buffered saline (TBS, pH7.5) を添加して懸濁し、10  $\mu$ l ずつ 0.2ml チューブに分注した。10  $\mu$ l のインスリン添加ヒト血清試料を混和して攪拌後、室温で 30 分間静置した。遠心で上清を除去し、沈殿を洗浄後、10  $\mu$ l の CHCA 溶液 (10 mg/ml in 50% acetonitrile, 50% 0.1% TFA) を添加して結合画分を溶出させ、質量分析の試料とした。

## 7.3 磁気粒子による BF 分離

10  $\mu$ l の抗インスリンモノクローナル抗体溶液を 1.5ml チューブにとり、90  $\mu$ l の抗マウス IgG 抗体結合磁性粒子懸濁液を添加して攪拌後、室温で 10 分間静置した。チューブに磁石を当てながら上清を除去して、得られた粒子に 90  $\mu$ l の TBS を添加して懸濁し、0.2ml チューブに分注した。10  $\mu$ l のインスリン添加ヒト血清試料を混和して攪拌後、室温で 10 分間静置した。上清を除去し、粒子を洗浄した後、10  $\mu$ l の CHCA 溶液を添加して結合画分を溶出させ、質量分析の試料とした。

## 7.4 質量分析条件

分析試料 2  $\mu$ l をスチール製ターゲットプレートの各ウェルに滴下し、室温で乾燥後、AB4700 (アプライドバイオシステム社) にて質量分析を行った。レーザーは neodymium: yttrium aluminum garnet (Nd:YAG; 355nm) を使用し、リニアモードで、ポジティブイオンを検出した。50 回のレーザーショットの平均を取ってスペクトルを生成した。

得られたスペクトルはデータプロセッサアプリケーション (アプライドバイオシステム社) によってバックグラウンド補正とノイズ低減化をかけてからシグナル強度を得た。このアプリケーションは、検出限界の決定にも用いた。

## 7.5 各種高分子のシグナル増強作用の検討

各種高分子溶液を 10mg/ml となるようにミリ Q 水(脱イオン水)に溶解し、適当に希釈した後、2  $\mu$ l をとって、10  $\mu$ l の CHCA 溶液と混合した。これにインスリン溶液あるいはペプチド・タンパク質混合溶液を添加、混合して質量分析の試料とした。

## 8. 血管内皮前駆細胞の特性解析に関する研究

### 8.1 臍帯血及び末梢血 AC133 陽性細胞由来 CD31 強陽性細胞の分画

臍帯血と末梢血の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い、再び 200  $\mu$ 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ため、AC133 マイクロビーズ分離キット (Milteny Biotec) を用い抗 AC133 抗体-マイクロビーズと 4°C、30 min で抗原抗体反応させた。陽性細胞の分離は、Auto MACS (Milteny Biotec) を用いて行った。臍帯血と末梢血 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)、50 ng/ml トロンボポエチン(TPO)、50 ng/ml 幹細胞成長因子(SCF)を含む EBM-2 培地に浮遊させ、タイプIVコラーゲンをコートした 24 穴のマルチウェルに分注し、1 週間培養した。

1 週間後、細胞を回収し、FITC 標識抗 CD31 抗体と 4°C、30 分、反応させた。ヴァンテー

ジ SE を用いて、CD31 強陽性分画をソーティングした。

## 8.2 間接蛍光抗体染色

上述のように臍帯血と末梢血 AC133 細胞由来 CD31 強陽性細胞を分画し、VEGF を含む 20%FBS-EBM-2 に浮遊させ FN をコートしたプレート上に培養し、接着した細胞の免疫組織染色を行った。Cx37、Cx40、Cx43、KDR、eNOS の発現を解析するために、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、細胞を氷上に移し、PBS(-)で3回洗浄した。1%BSA-PBS(-)で4°C、1時間ブロッキングした後、各種抗体を含む1%BSA-PBS(-)を添加し、4°C、1時間抗原抗体反応させた。さらに細胞をPBS(-)で洗浄し、FITC 標識抗 IgG 抗体あるいは抗 IgG 抗体-ローダミンを4°C、1時間反応させた。また対照として、ヒト臍帯内皮細胞を同様の操作により蛍光染色し、観察に用いた。染色した細胞は共焦点顕微鏡にて観察した。

## 8.3 浮遊細胞のCxあるいはLox-1発現の免疫染色

AC133 陽性細胞をタイプIVコラーゲン上に VEGF、TPO、SCF 存在下培養した。上清の細胞を回収し、免疫組織染色のため細胞を氷上に静置し、PBS(-)で洗浄した。1%BSA-PBS(-)で4°C、1時間ブロッキングし、それぞれの抗 Cx 抗体あるいは抗 Lox-1 抗体を含む1%BSA-PBS(-)を添加し、4°C、1時間抗原抗体反応させた。その後、FITC 標識抗 IgG 抗体あるいはローダミン標識抗 IgG 抗体を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にて解析した。

Cx37 あるいは Lox-1 を表面マーカーとし

て磁気ビーズ法で分画する際は、2次抗体として抗 IgG 抗体-マイクロビーズを用いた。分画後、各分画の細胞に FITC 標識抗 CD31 抗体と反応させ、洗浄後、フローサイトメーターにて解析した。

## 8.4 末梢血及び臍帯血単核細胞のAC133とCD34の二重染色

末梢血バッフィーコート分画及び臍帯血より得られた単核球分画を、0.5% BSA、2mM EDTA を含む PBS(-)(分離バッファー)に浮遊させ、洗浄後再び 200  $\mu$ l の分離バッファーに懸濁した。フィコエリスリン標識抗 AC133 抗体(Milteny Biotec)と FITC 標識抗 CD34 抗体(Milteny Biotec)を用いて単核球懸濁液を4°C、30分反応させ、フローサイトメーターで解析した。

## 9. マウスES細胞P19細胞の神経細胞への分化

### 9.1 神経細胞への分化誘導法

P19細胞を $\alpha$ -MEM 10%FBS中37°Cで培養後トリプシン処理し、約  $1 \times 10^6$  cells/ml の濃度で DMSO に溶解させた 1  $\mu$ M all-trans retinoic acid (ATRA) を添加した同じ培養液存在下バクテリア培養用プレートに植え、4日間培養した。途中1回培地を交換した。4日後、プレートにはりつかないで細胞塊を形成した細胞を集め、3回PBS(-)で洗浄後、トリプシンに懸濁し37°Cで15分間反応させ細胞をばらばらにし、同容量の1mg/ml trypsin inhibitor (Invitrogen) を加えた。100mmの通常の培養プレートに  $8 \times 10^6$  cells を DMEM/F12 に N2 supplement (5  $\mu$ g/ml insulin, 50  $\mu$ g/ml human transferrin, 20 nM progesterone, 60 mM putrescine, 30 nM sodium selenite, 1  $\mu$ g/ml fibronectin

(Invitrogen) を加えた分化培地に植え、数日間培養した。特にことわりのない試薬は SIGMA 社のものを使用した。

## 9.2 サンプルの調製

ウェスタンブロッティング用のサンプル調製には、PBS(-)で2回洗浄した細胞を PBS(-) に懸濁し 2 x SDS サンプルバッファーを等量加えて溶解させた。

2次元電気泳動用サンプルとしては、細胞を PBS(-)で2回洗浄後、BIO-RAD 社の Sequential Extraction Kit を用いた抽出を行った。実際には、試薬 1 (40 mM Tris に pepstatin、antipain、leupeptin を加えた) に細胞を懸濁後、水中で8分間静置し dounce homogenizer でホモジナイズした。その遠心上清を step1 のサンプルとした。沈殿画分を試薬 2 (8 M Urea, 4% CHAPS, 40 mM Tris, 0.2% Bio-Lyte 3/10 ampholyte, 1% trybutyl phosphine) に溶解させ、シリンジを数回通して遠心した。その上清を step2 のサンプルとした。

サンプルのタンパク量は BIO-RAD 社の Bradford 法および Lowry 法試薬を用いて決定した。

## 9.3 ウェスタンブロッティング

サンプル (20 µg) を各種の濃度の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE) を行い、セミドライブロッティング装置を用いてタンパク質を PVDF 膜に転写した。5% スキムミルクを含む 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M NaCl (TBS-skim milk) でブロッキング後、一次抗体を含む TBS-skim milk で2時間室温で反応させた。洗浄後、POD-conjugate した二次抗体で1時間室温で反応させた。洗浄後、ECL-Plus (アマシャムバイオサイエンス社)を用い抗体と反応する

タンパク質を発光させ、X 線フィルムで検出した。

## 9.4 2次元電気泳動

サンプル 100 µg (容量は最大 50 µl) を、8 M Urea、2% CHAPS、0.5% IPG buffer(3-10NL)、2.8 mg/ml DTT、BPB trace を加え 250 µl に調製した。1次元目の電気泳動は Immobiline DryStrip pH 3-10NL, 13 cm (アマシャムバイオサイエンス社)を用い、先に調製した 250 µl でゲルを一晩膨潤させた。その後、等電点電気泳動を指定の泳動条件で行った。泳動後、SDS 平衡化バッファー (50 mM Tris-HCl pH6.8、6 M Urea、25% glycerol、2% SDS) に 2.5 mg/ml DTT を添加した溶液中で 15 分間反応後、SDS 平衡化バッファーに 45 mg/ml iodoacetamide、BPB trace を添加した溶液中でさらに 15 分間反応させてから、10% SDS-PAGE で2次元目を行った。タンパク質の検出にはアマシャムバイオサイエンス社の銀染色キットを使用した。

## 1.0. P19 細胞のサブクローン CL6 細胞の心筋様細胞への分化

### 1.0.1 CL6 細胞の心筋様細胞への分化誘導法

CL6 細胞は P19 細胞のサブクローンで P19 細胞より心筋細胞へ分化しやすい細胞である。CL6 細胞を α-MEM (SIGMA 社) 10% FBS 中 37°C で培養後、トリプシンで細胞をばらばらにし、トリプシンの反応を止める培地から 1% DMSO を加えて培養を続ける。2日ごとに培地を交換した。

### 1.0.2 CL6 細胞の免疫組織学的解析

細胞をホルマリン固定し、各抗体で反応後、蛍光標識された 2 次抗体と反応させ、あるい

は蛍光標識されたファロイジンを直接反応させた。乾燥後、シールド液を添加しカバーガラスをのせ共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

### 1 0.3 心筋表現型のマーカー遺伝子の定量

CL6 細胞を 16 日間 1% DMSO 存在下培養し、自発的拍動をしている細胞を集め、RNA を抽出し、TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagent (アプライドバイオシステムズ社) とマーカー遺伝子それぞれの TaqMan プローブを使用して、ABI PRISM 7000 でリアルタイム RT-PCR により定量した。また、マウスの各心筋組織 (成獣心室筋、成獣心房筋、1 日齢新生仔心室筋) からの抽出した RNA を用いて、同様にリアルタイム RT-PCR を行った。

### 1 0.4 CL6 細胞の電気生理学的解析

DMSO 1% 存在下の培養により自動能を獲得した CL6 細胞を PBS で洗浄した後、Collagenase A (Roche) で消化した。遠心分離により細胞を回収し、 $\alpha$ -MEM (10% FCS 含有) を加えて懸濁したのち、細胞外液を Nomarl Tyrode solution (pH7.4) に置換した。単離細胞の活動電位は whole cell patch clamp 法により測定した。

## 1 1. 幹細胞の特性指標に探索

### 1 1.1 成熟及び小型肝細胞の調製

コラゲナーゼ灌流法により調製した細胞懸濁液を 50×g、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 50×g、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、150×g、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 50×g、2 分遠心し小型肝細胞を得た。小型肝細胞はその細胞懸濁液を 45% パーコール密度勾配で 50×g、24 分遠心し沈殿とすることにより更に精製を行った。

### 1 1.2 RT-PCR による mRNA 発現の解析

Total RNA は QuickPrep<sup>®</sup> Total RNA Extraction kit (アマシャム バイオサイエンス) を用いて、添付の操作法に従い調製した。cDNA は ThermoScript<sup>™</sup> RT-PCR System (インビトロジェン) を用い、Oligo (dT)<sub>20</sub> をプライマーとして Total RNA より調製した。

PCR 反応は ThermoScript<sup>™</sup> RT-PCR System (インビトロジェン) を用いて PCR 反応 (熱変性: 94℃、30 秒、アニーリング: 60℃、30 秒、伸長反応: 72℃、1 分、サイクル数: 20) を行った。PCR に用いたプライマーの塩基配列、および予想される PCR 産物の塩基数は以下の通りである。

Anx III primers#1:

5'-TTGAGAGCAAGGTGGACAGC-3' (sense strand),

5'-GCAGCTGTTGGAAGCCATCT-3'

(antisense strand); 1019 bp.

Anx III primers#2:

5'-CAAATTCACCGAGATCCTGT-3' (sense strand),

5'-TGCTGGAGTGCTGTACGAAA-3'

(antisense strand); 472 bp.

TAT primers:

5'-GTCTAGCTGTGTTGGCCAAT-3' (sense strand),

5'-GTTTCGCTGAAGGATGCTCTT-3'

(antisense strand); 550 bp.

TO primers:

5'-AGAGTACCTGTCTCCAGCAT-3' (sense strand),

5'-ACCAGGTACGATGAGAGGTT-3' (antisense strand); 687 bp.

Albumin primers:

5'-AAGGCACCCCGATTACTCCG-3' (sense strand),

5'-TGCGAAGTCACCCATCACCG-3' (antisense strand); 652 bp.

GAPDH primers:

5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (sense strand),

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (antisense strand); 452 bp.

PCR 産物は 2%アガロースゲル電気泳動で分離後、SYBR Green I で染色し、蛍光画像解析装置 (Fluor Imager 595、Molecular Dynamics 社) で検出した。

## 1 2. ヒト軟骨細胞の分化に及ぼす液性因子等についての評価

### 1 2.1 細胞の調製

股関節 (約 85%) と肩関節 (約 15%) の関節軟骨からの初代培養のヒト関節軟骨細胞 (HAC) を実験に供した。培地に添加するために、滅菌済みの bFGF を蒸留水に溶解して使用し、FeSO<sub>4</sub> は蒸留水に溶解後、ろ過滅菌して使用した。サブコンフルエントの状態の HAC を 2 回継代し、3 代目の細胞を実験に供した。20 μL 中に 4×10<sup>5</sup> cells になるように調製した細胞を 24 穴のプレートにスポットし、高密度の微小集積培養を行った。細胞がプレートにきちんと接着させるために 2 時間 37℃ でインキュベーションした。その後、その上に bFGF (終濃度 10ng/mL) または FeSO<sub>4</sub>

(終濃度 50 μg/mL) もしくは bFGF+FeSO<sub>4</sub> 両者を添加した培養液を 1mL 入れた。培養液のみをいれたものを control とした。その後、37℃ で 4 週間培養した。2-3 日毎に培地交換を行った。

### 1 2.2 細胞の増殖に関する検討

細胞増殖については、4 週間の細胞培養後、alamer blue を用いて測定した。培養液を取り除いた後 alamer blue 溶液を入れ、37℃ で 4 時間インキュベーションした後、吸光度を測定した。

### 1 2.3 細胞の分化に関する検討

プロテオグリカン は軟骨の基質に含まれる典型的な成分である。軟骨形成の程度は alcian blue を用いて軟骨特異的なプロテオグリカンを染めることによって測定した。1% の alcian blue 溶液 (pH 1.0) を 0.5mL/well 入れ、4℃ で一晩インキュベーションした。その後、alcian blue 溶液を取り除き、3% 酢酸と蒸留水で洗浄した。軟骨のプロテオグリカンは 4M のグアニジン塩酸塩によって抽出し、吸光度を測定した。

## 1 3. 倫理面への配慮

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. 研究結果

### 1. PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮機構の解析

我々は新規ウイルス濃縮法として PEI 磁気

ビーズ法を開発したが、本年度は PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮の機構を明らかにするとともに、明らかにした機構に基づいて濃縮法としてのより適切な条件を解析した。PEI 磁気ビーズに HSV-1 や sindbis virus を吸着させ吸着分画に含まれるウイルスゲノム量を定量すると、図 1 のように濃縮されることが再確認された。

PEI はそれぞれ分子量の異なる製品が市販されている。そこで、PEI の分子量の違いが濃縮効果に及ぼす影響について検討した。表 5 に示すように、分子量 70,000 の PEI と分子量 1,800 の PEI を結合させた磁気ビーズを用いて  $5 \times 10^4$  copy/0.1ml の HSV-1 を濃縮したところ、分子量 70,000 の PEI 磁気ビーズを用いた方が高い濃縮効率を得られることが明らかになった。

次に、濃縮時の pH の影響について検討した。図 2 に示すように、低い pH では濃縮効率が低下することが明らかになった。ただ、pH9.0 では pH 調整を行っただけでウイルスゲノムコピーの低下が観測され、高 pH によるウイルスの破壊が起こったものと考えられた。従って、高 pH ではウイルスコピー数が低下した点を考慮するとより高い濃縮効率を得られたことになる。以上の結果は、高い pH でウイルスの破壊がなければ pH が高いほど PEI 磁気ビーズの濃縮効率は高いと考えられる。

### 1.1 PEI によるイムノグロブリンの濃縮

予備的検討から PEI 磁気ビーズの濃縮では IgG が濃縮されている可能性が想定されたことより、濃縮前と濃縮後で IgG 含量が変化しているか検討した。図 3 に示すように、濃縮前に比べて培養に用いている胎仔牛血清の IgG が濃縮されていることが示された。

そこで、PEI 磁気ビーズの濃縮時に抗ウイルス抗体を添加することにより濃縮効率が上昇するか検討した。図 4 に示すように、HSV-1 の濃縮時に抗 HSV-1 抗体を添加するとその濃縮効率が飛躍的に向上した。

### 1.2 ヒト感染性ウイルスへの適応

PEI 磁気ビーズのウイルス濃縮法をヒト感染性ウイルスである HBV 及び HCV に適応してみた。図 5 に示すように、Vero 細胞の上清に HBV を添加し、PEI 磁気ビーズを用いて濃縮を試みたところ、1ml 及び 10ml の上清からウイルス濃縮することが可能であり、また、抗 HBV 抗体を添加したところその濃縮効率がさらに向上した。

また、図 6 に示すように PEI 磁気ビーズは HCV の濃縮にも適応可能であることが明らかになった。しかし、HCV に対する有用な抗体が無い場合、抗 HCV 抗体添加による濃縮効率の影響については確認できなかった。

## 2. STR マーカーによる多型解析

STR 多型は、2 から 7 塩基を一単位とする繰り返し数に基づく多型であり、その全長がほぼ 300bp 以下であることから、PCR 法での増幅が容易であり、キャピラリー型シーケンサーを使って増幅産物の長さを測定することにより、リピート数を決定できる (図 7)。

各種細胞に関して、PowerPlex16 STR マーカーを用いた解析結果を表 6 に示す。HL60 細胞に関しては、独立した培養した 2 ロットの細胞を用いて比較を行ったが、これらロット間では全てのマーカーの繰り返し数が一致した。一方、HL60 とその垂株である HL60-RG では、全 16 マーカー、30 アレルのうちほぼ全てが一致していたが、TH01 ローカスに関して、1 アレルの繰り返し数が 7 か

ら8（または消失）へ変化し LOH(Loss of Heterozygosity)が認められた(図8)。他の Fluorescein マーカーのアレルピークとの相対強度は余り変化していないことより、片側のアレルの消失が疑われる。すでに報告しているこの細胞の核型に関する情報より、RG株は11番染色体の短腕に欠失が認められることより、11p15.5に位置する TH01 ローカスが影響を受けたと考えられる。またピーク強度を詳しく見ると、HL60細胞における D18S51 ローカスのリピート数15のピークの高さが14のピークの半分であることが確認できた。核型解析より HL60細胞は18番染色体がトリソミーになっていることがわかっているため、14側のアレルが重複しているために強度が2倍になったと考えられる。この結果から、STRマーカーを利用することにより、LOHや染色体の数の変化を検出することが可能と考えられる。

同様に、起源を同じくする TK6 と WTK1細胞の比較においても、ほぼ全てのマーカーが一致していたが、D18S51 ローカスと D7S820 ローカスにおいて、リピート数が1ユニット変化していた(表6)。これは、よる繰り返しユニットの付加または欠失によるものと想定される。

同一起源の細胞間では、ほぼSTRマーカーの繰り返しパターンは一致したが、異なる細胞間ではその一致率は極端に低くなった。すなわち、STRマーカーが細胞の同一性を確認する試験として有用であることを示す結果である。例えば、HL60細胞とTK6細胞での一致率は、Amelogeninを除く15ローカス、30アレルのうち、16アレルで約50%であった。また、肝臓由来の細胞株 FLC-4細胞もこれらとは全く違ったパターンを示した。

Amelogenin は性染色体を区別するマーカーであり、HL60とFLC-4細胞は女性由来、TK6は男性由来であることがわかる。

次に、PowerPlex16には含まれなかった17番染色体に関して、独自の複数のSTRマーカーが利用可能であったため、これらを用いたマルチプレックスな多型解析を試みた。表3に示すように、10個のSTRマーカーに対して、その増幅産物が適当なサイズ分布を取るようによりプライマーをデザインし、6FAM, HEX, TETの3種類の蛍光色素にてラベルした。HL60細胞由来DNAを使ってPCR反応を行い、増幅産物を同様に解析し、検出されたピークの位置を調べた。市販品に比べるとPCR反応産物はきれいなピークとなりにくいため判別が困難な点もあるが、9つのローカスに関しては、少なくとも片側のアレルのピークを検出することができた。TK6細胞に関しては既に個別に検討した結果があったため、これらの値と比較してHL60細胞での結果をまとめたのが表7である。HL60-RG細胞のパターンは親株とほぼ一致したが、AFM044xg3ローカスにおいて片側のアレルのバンドサイズが一塩基減少していた。一塩基の差の信頼性は今回の解像度では確実な判定は難しいが、一塩基欠失の可能性もある。一方、TK6細胞との間の相同性は低かった。

### 3. サイトカインアレイを用いた細胞由来タンパク質解析

#### 3.1 モデル細胞を用いた解析

継代数を余り経ていない HL-60細胞は、ダブリングタイムは48時間程度であるが、継代を重ねていくとダブリングタイムが早まる。ダブリングタイムが35時間になった HL-60の培養上清では、サイトカインアレイで6K

の位置にある、Insulin-like growth factor binding proteins-2 の増加が認められた(表 8 及び図 9)。HL-60 細胞から樹立された高増殖株である HL-60 細胞でもこの Insulin-like growth factor binding proteins-2 の増加が認められた。また、Hepatocyte-growth factor (HGF) は、HL-60RG 細胞に特異的に発現していることが明らかになった。一方、いくつかのサイトカインについて、ELISA による定量を試みた。表 9 に示すように、IL-6、IL-8、HGF、VEGF が測定可能であったが、それ以外のサイトカインは検出限界以下であった。特に、HGF は HL-60 細胞で特異的に発現しており、プロテインアレイの結果と良く一致していた。以上の結果より、サイトカインアレイを用いた培養上清のサイトカイン産生解析が、細胞の増殖能が変化したときにそれと対応して産生量が変化するサイトカインを検出するに適用できることを意味しており、サイトカインアレイが細胞治療薬の産生するサイトカインプロファイルの解析に有用であることが示唆された。

### 3.2 血管内皮分化誘導系でのサイトカインアレイを用いた解析

次に、血管再生を目指した細胞治療で用いられることが期待されている血管内皮前駆細胞へサイトカインアレイが適応できるか検討した。すでに報告しているように、我々は、末梢血あるいは臍帯血 AC133 陽性細胞から血管内皮細胞を *in vitro* で誘導する系を確立している (J Cell Physiol. 2003, 195:119-129.)。図 10 に示すように、臍帯血 AC133 陽性細胞を TPO、VEGF、SCF を含む EBM2 培養液中で培養する *in vitro* 分化系では、培養開始 1 週間目には CD31 の強い発現が見られる。一方 KDR/flk-1 は培養 2 週間

後に強い発現が観察された。培養 1 週間目の CD31 を強く発現している細胞は、種々の解析から血管内皮前駆細胞としての特徴を良く表していることを報告している。また、2-3 週間目の細胞は分化した血管内皮の特徴を持っていることを明らかにしている。この *in vitro* の培養下でその特性が変化するときの培養上清に産生されるサイトカインをアレイを用いて解析した(図 10b)。

臍帯血由来 AC133 陽性細胞の血管内皮分化系の 1 週間目で発現しており、かつその後発現が減少したサイトカインは、Epithelial neutrophil-activating protein 78、GM-CSF、Growth Related Oncogene、I-309、IL-1 $\beta$ 、IL-6、Monocyte Chemoattractant Protein 1、Macrophage Inflammatory Protein 1  $\beta$ 、B-lymphocyte chemoattractant、tissue inhibitor of metalloproteinases-1 の 10 種であった。

2 週目で最大となっていたのは、HGF、tissue inhibitor of metalloproteinases-2 であった。3 週目まで変わらなかったのは、IL-8 であった。Macrophage-derived Chemokine は、3 週まで徐々に増えていた。

一方、末梢血由来 AC133 陽性細胞の血管内皮への分化系で培養上清中のサイトカイン分泌の変化を解析したところ、1 週目に培養上清で検出され、その後培養経過とともに減少していたのは、Epithelial neutrophil-activating protein 78、GM-CSF、Growth Related Oncogene、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、Monocyte Chemoattractant Protein 1、Monocyte Chemoattractant Protein 2、Macrophage Inflammatory Protein 1  $\beta$ 、regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted、EGF、

PDGF-B、 B-lymphocyte chemoattractant の 13 種であった。

2週目で最大となっていたのは、 Macrophage Inflammatory Protein 1  $\delta$ 、 Oncostatin M、 tissue inhibitor of metalloproteinases-1 であった。

HGF、 Insulin-like growth factor binding proteins-2、 tissue inhibitor of metalloproteinases-2 は、2週目まで増えて 3週目は2週目と同程度であった。

2週まで変わらず 3週目で減少していたのは、 Neutrophil Activating Peptide 2 であった。また、3週目まで変わらなかったのは、 IL-8 と Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine であった。

3週まで徐々に増えていたのは、 Macrophage-derived Chemokine と MIP1-2 (Myeloid progenitor inhibitory factor-2) であった。

以上の結果より、臍帯血、末梢血由来の両者に共通した変化としては、1週目でもっとも強く発現しており、その後減少したのは、 Epithelial neutrophil-activating protein 78、 GM-CSF、 Growth Related Oncogene、 IL-1  $\beta$ 、 IL-6、 Monocyte Chemoattractant Protein 1、 Macrophage Inflammatory Protein 1  $\beta$ 、 B-lymphocyte chemoattractant であることが示された。これらの、サイトカインは血管内皮前駆細胞と出現している時期に高い値を示していることになる。IL-8は、培養期間を通じて高い発現が維持されていた。また、 Macrophage-derived Chemokine は、3週まで徐々に増えていくことが明らかになった。

#### 4. 細胞由来タンパク質の高感度プロファイリング技術の開発

糖タンパク質のモデルとして代表的血清糖タンパク質である  $\alpha$ フェトプロテイン、セルロプラスミン、及び糖タンパク質混合物であるヒト血清を選んだ。 $\alpha$ フェトプロテインは N結合糖鎖結合部位が1箇所存在し(図11)、肝臓癌患者では糖鎖構造が変化することから診断マーカーの一つとして検討されている分子である。また、セルロプラスミンは7つの Potential Glycosylation Site が存在し(図12)、複合型糖鎖が結合していることが報告されているが、結合位置と部位特異的な糖鎖構造に関しては不明である。糖鎖プロファイル評価のためのモデル組織としては、マウス腎臓を選択した。

#### 4.1 LC/MS/MSによる糖ペプチド解析

##### (1) $\alpha$ フェトプロテイン

$\alpha$ フェトプロテインを還元カルボキシメチル化した後、トリプシンで消化し、ペプチド・糖ペプチド断片とした。 $\alpha$ フェトプロテインには推定 N結合糖鎖結合部位は一箇所しか存在しないので、酵素消化した場合、得られる糖ペプチドは1本となる(図11)。この糖ペプチドを含む全ペプチド混合物を LC/MS で分析した結果、図13Aに示すトータルイオンクロマトグラム(TIC)が得られた。このペプチドマップに現れているピークを構成する分子イオンは自動的にデータ依存的な MS/MS 測定に付されている(図13B)。図13Cは MS/MS の TIC の中から、糖鎖の指標となる  $m/z$  204 のフラグメントイオンだけを選択的に取り出したものである。尚、 $m/z$  204 は、糖鎖の構成単糖である GlcNAc または GalNAc の B イオンに相当する。この操作によって、ペプチドマップ中の糖ペプチドの位置を特定することが可能となった。

図14は糖ペプチドと特定された2つのピ