

ークのうち、ピーク 1 ( $m/z$  1061.8<sup>3+</sup>)の MS/MS スペクトルの一つを示したものである。低分子量側に糖鎖に由来するイオン、[HexNAc]<sup>+</sup> ( $m/z$  204)、[HexNAcHex]<sup>+</sup> ( $m/z$  366)に加えて、[HexNAc-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> ( $m/z$  186)、[HexNAc-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> ( $m/z$  168)等のイオンが生成されているのが確認された。また、[NeuAc]<sup>+</sup> ( $m/z$  292)、[NeuAc-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> ( $m/z$  274)が認められることからシアル酸が結合していることが推定された。さらに、高分子量側には糖鎖が完全に切れたペプチドに相当するイオン( $m/z$  978.5)、及びそのペプチドに[HexNAc]が1分子または2分子結合した分子のイオン、さらに[Hex]が1~3分子分増えたイオンが認められ、N結合糖鎖のコア部分の配列に関する情報が MS/MS スペクトル上に現れていることがわかった。ペプチドに相当するイオンの  $m/z$  値から、この糖ペプチドは $\alpha$ フェトプロテインのトリプシン消化によって得られることが予想される VNFTEIQK と推定された。さらに、中分子量領域にはペプチドに由来する b 及び y イオンが検出されていることがわかった。図 1 4 中の表はペプチド VNFTEIQK が開裂したときに得られることが予想されるフラグメントイオンを示したものである。網掛けした部分は図 1 4 のプロダクトイオンスペクトル内に存在を確認することができたフラグメントイオンであり、VNFTEIQK 配列を有するペプチドであることが確認された。

糖鎖構造は TOFMS で得られた糖ペプチドの分子量(3182.3Da)からペプチドの理論分子量(977.5Da)を差し引いて得られた分子量(2222.8Da)を基に、シアル酸が結合した2本鎖糖鎖であることが推定された。さらに、このイオンの近傍イオンの TOFMS データ及び MS/MS スペクトルを解析した結果、 $\alpha$ フェト

プロテインに付加している糖鎖を表 1 0 のように推定することができた。尚、ピーク 2 は解析の結果、一部切れ残った FTKVNFTEIQK ペプチドに糖鎖が付加したものであることが確認された。

## (2) セルロプラスミン

セルロプラスミンには7箇所(7糖鎖)の推定N結合糖鎖結合部位が存在する(図 1 2)。 $\alpha$ フェトプロテインと同様にトリプシン消化し、7箇所(7糖鎖)の推定N結合糖鎖結合部位を有するペプチドを含む全ペプチドを LC/MS で分析した。その結果、TOFMS TIC (図 1 5 A)、MS/MS TIC (図 1 5 B)、及び  $m/z$  204 のマスクロマトグラム (図 1 5 C)が得られ、図 1 5 C 上に4つのピークが検出された。

図 1 6 はピーク 1 を構成する一つのイオンの MS/MS スペクトルである。 $\alpha$ フェトプロテイン同様に糖鎖に由来するフラグメントが検出され、 $m/z$  292 のイオンが認められることから、シアル酸結合糖鎖であることが確認された。また、ペプチドのフラグメントイオンから、ペプチド 129-146 と同定され、分子量 4096.6Da からペプチド分子量 1891.8Da を引いた値から糖鎖はジシアロ 2 本鎖糖鎖と推定された。同様に他の3つのピークについても解析を行った結果、ピーク 2 は Asn1202、ピーク 3 は Asn397、ピーク 4 は Asn358 を含む糖ペプチドと同定され、N結合糖鎖はセルロプラスミンの7つの推定N結合糖鎖結合部位のうち、138、358、397、及び 1202 位の Asn に結合していることが明らかになった。また、TOFMS で得られた分子量から各部位に結合している糖鎖の構造は表 1 1 のように推定された。別途行った LC/MS/MS 測定により、残りの3箇所(3糖鎖)のN結合糖鎖結合部位を含むペプチドが検出されたことから、227、588、929

位 Asn には糖鎖が結合していないことが明らかになった。

### (3) 血清糖タンパク質

LC/MS/MS によって、糖タンパク質の一次構造及び糖鎖構造に関する情報が一度に得られることが明らかになったので、これを血清糖タンパク質の解析に応用した。血清 50 $\mu$ l から市販のカートリッジを用いてヒト血清アルブミンを 50%程度除去し、トリプシンで消化してペプチド・糖ペプチド断片とした。これを直接 LC/MS/MS で測定することによって、TOFMS TIC (図 1 7 A)、MS/MS TIC (図 1 7 B) が得られることを確認し、これを血清タンパク質のプロファイルとした。つぎに、確実に糖ペプチドの位置を特定するため  $m/z$  204 のマスクロマトグラム (図 1 7 C) に加えて  $m/z$  366 のマスクロマトグラム (図 1 7 D) を描き、共通ピークが認められた時間を糖ペプチドの溶出時間と特定した。一番大きなピークを構成するイオン ( $m/z$  1221.7<sup>+</sup>) の MS/MS スペクトルを図 1 8 に示した。ペプチドに由来するイオンからハプトグロビンに由来する糖ペプチドであることが同定され、糖鎖構造についてもジシアロ 2 本鎖糖鎖と推定された。

以上のように、発現タンパク質の消化物を LC/MS/MS で解析することによって、LC/TOFMS 部分でプロファイル評価を行うと同時に MS/MS 部分で特性解析ができることが明らかとなった。

## 4.2 LC/MS による細胞・組織由来糖タンパク質の糖鎖プロファイリング

図 1 9 に示したプロトコールに従ってマウス腎臓由来細胞を複数のフラクションに分画し、還元アルキル化した後、PNGase F を作用させて N 結合糖鎖を切り出した。NaBH<sub>4</sub> で還

元した後、カーボン系固相抽出カラムを用いて脱塩し、平成 1 4 年度本研究において開発した CapGCC-LC/MS による糖鎖のプロファイリングを行った。その結果、図 2 0 に示す TIC が得られ、組織由来糖タンパク質であっても、精製糖タンパク質の場合と同様に糖鎖プロファイルが得られることが確認された。

糖鎖の溶出位置と分子量から、腎臓由来タンパク質に付加している糖鎖は比較的サイズの小さいものであることが明らかになった。最も結合量の多い糖鎖 (ピーク F) は、分子量 2285.6Da からフコースが 3 分子結合した糖鎖 [Fuc]<sub>3</sub>[Hex]<sub>5</sub>[HexNAc]<sub>5</sub> であることが推定された。この糖組成から推定できる糖鎖として図 2 1 に示すような Lewis X、Lewis a、Lewis Y、及び Lewis b を部分構造とする糖鎖が挙げられる。そこで、フコースの位置を MS/MS 分析により調べたところ、図 2 1 のようなプロダクトイオンスペクトルが得られた。 $m/z$  349.4、511.5 のイオンが検出され、[Fuc][Gal] に相当するイオンは検出されなかったことから、ピーク F は非還元末端側の GlcNAc にフコースが結合した Lewis X または Lewis a タイプの糖鎖であると推定された。

同様にして各ピークの MS スペクトルを解析した結果、腎臓由来糖タンパク質の糖鎖構造として、表 1 2 及び図 2 2 に示す構造が推定された。今回の分析により、腎臓に発現しているタンパク質にはシアル酸が結合していない中性糖鎖が多いこと、また、複合型糖鎖には複数のフコースが結合していることが明らかになった。

今回、糖鎖プロファイル作成に要したサンプル量はマウス腎臓わずか 0.2 個分で、操作に要した日数は一週間程度であった。本分析法は、細胞・組織利用医薬品の糖鎖プロファ

イル評価法として、充分応用可能であると思われる。

## 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ギャップジャンクション依存性細胞間情報伝達 (GJIC) に対する PLLA 埋植の影響

これまでの検討で PLLA プレート を 10 ヶ月間埋植した *in vivo* 実験で、SJL/J マウスではがんの発生は認められないが BALB/cJ マウスでは 100%腫瘍が形成されることを見いだしている。がん化の要因の一つとして細胞間シグナル伝達の異常が想定されており、そのようなシグナル伝達機構として膜結合性タンパク質チャンネル (ギャップ結合) もあげられている。ギャップジャンクション依存性細胞間情報伝達 (GJIC) は、低分子化合物の細胞間輸送をする膜通過性チャンネルであり、また、コネクシンとして知られるたんぱく質がサブユニットとして含まれる。少なくとも 19 種類のコネクシンが存在し、それらは細胞や発達段階に特異的に発現している。GJIC はまた、細胞の恒常性の保持や細胞の成長の制御においても重要な役割を果たしている。そのため、GJIC の喪失は発達異常や腫瘍形成などを引き起こすと考えられる。いくつかの癌プロモーターは、ギャップ結合チャンネルを形成するのに必須なタンパク質であるコネクシン 43 といったコネクシンタンパク質のリン酸化によって GJIC を抑制することが示されている。そこで、PLLA による BALB/cJ マウスの腫瘍形成の過程でどのような変化が起こっているかを明らかにする目的で、腫瘍形成の早い段階における GJIC に対する阻害効果を調べた。GJIC の機能について検討す

るために、SLDT 解析 (色素拡散法) を行った。その結果、30 日間 PLLA を埋植した BALB/cJ マウスから分離・培養した皮下組織細胞では対照の BALB/cJ マウス由来の細胞に比べて GJIC が有意に阻害されていた。一方、SJL/J マウスでは PLLA を埋植したものとしないもので GJIC についての変化は見られなかった (図 2 3)。また、蛍光物質の移動 (dye migration) が SJL/J マウスに比べて BALB/cJ マウスの方が高い傾向が見られた。

#### ② コネクシン (Cx) 43 の発現に対する PLLA 埋植の影響

ギャップ結合を構成する Cx 分子に関して、特に Cx43 に着目して解析を行った。まず、Cx43 の mRNA とタンパク質発現について検討を行った。Cx43 mRNA 発現は PLLA を埋植した BALB/cJ マウス由来の細胞では対照の BALB/cJ マウス由来の細胞に比べて抑制されていた (図 2 4(A))。一方、SJL/J マウスでは PLLA を埋植したものとしないもので mRNA 発現について変化は見られなかった (図 2 4(B))。Cx43 のタンパク質レベルもまた PLLA を埋植した BALB/cJ マウス由来の細胞では対照の BALB/cJ マウス由来の細胞に比べて有意に減少していた (図 2 5)。

#### ③ TGF- $\beta_1$ 分泌に対する PLLA 埋植の影響及び *in vitro* の系における TGF- $\beta_1$ 処理の作用について

TGF- $\beta_1$  は、Cx43 のリン酸化型を減少させることによって GJIC を阻害し、また Cx43 のリン酸化はギャップ結合集合にも深く関わっていることが知られていることから、TGF- $\beta_1$  が PLLA 埋植 BALB/cJ マウスにおいて重要な役割を果たしている可能性が高いと考え、TGF- $\beta_1$  レベルについて検討した。

TGF- $\beta_1$  の分泌レベルは、PLLA を埋植した BALB/cJ マウスの皮下組織細胞では対照の BALB/cJ マウス由来の細胞に比べて有意に増加していた (図 2 6)。一方、SJL/J マウスでは PLLA を埋植したものとしなかったもので TGF- $\beta_1$  の分泌レベルの変化は見られなかった (図 2 6)。TGF- $\beta_2$  と TGF- $\beta_3$  についても検討したが、TGF- $\beta_2$  分泌には PLLA 埋植による影響は見られず、また TGF- $\beta_3$  については検出限界以下であった (data not shown)。さらに、in vitro の実験系で、PLLA 埋植していない BALB/cJ マウスの皮下組織細胞を TGF- $\beta_1$  処理の影響について検討したところ、細胞間情報伝達と Cx43 mRNA 発現が有意に抑制されたことを示した (図 2 7)。

## 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

これまでの研究から、染色体の安定性はその末端の構造であるテロメアに依存していることが知られている。我々はそのテロメアの安定化機構としてテロメア結合タンパク質 TRF1 が最も重要な因子ではないかと考えている。これは、すでに発表したように不死化した細胞の中に、テロメア長が有限寿命細胞で細胞死が起こるとされるテロメアの長さ (約 5kbp) より遙かに短くなっている不死化細胞が存在していることによる。この考えは、テロメラーゼや DNA 組換えによってテロメア配列を長く保つことができる ALT (Alternative Lengthening of telomere) 機構によってテロメアの長さがある一定以上保たれていることが不死化につながるという説の矛盾点を克服するための仮説である。すなわち、テロメア配列が充分長いか TRF1 の発現が充分に高いかいずれかの状態になれば細胞は不死化するという考えである。これは、

不死化細胞と有限寿命細胞の TRF1 の発現、及びテロメア長を網羅的に解析した結果から導き出した仮説である。本年度は、細胞を不死化したときに TRF1 の発現がどのように変化するかを調べ、細胞不死化と TRF1 の関係を明らかにしようと試みた。

図 2 8 は、ヒト正常繊維芽細胞を種々の方法によって不死化したときの TRF1 の発現変化とテロメア長の変化について解析した結果を示す。FGF-1 結合タンパク質モーター、SV-40、 $^{60}\text{Co}$  による放射線照射を用いて細胞を不死化するとすべての細胞で TRF1 の発現が上昇していた。一方、テロメラーゼ活性は陽性対象とした HeLa-LT 細胞と同程度の発現誘導が見られた場合もあるが、全く誘導が認められなかった場合の方が多かった。種々の細胞株を不死化した場合 (図 2 8 下)、テロメア長が長くなることが多く認められたが MRC5 を SV-40 で不死化した場合など陽に逆にテロメア長が短くなった場合もあった。

TIG3 及び TIG7 細胞に TRF1 をトランスフェクトしたときの細胞寿命の変化を解析した。その結果、トランスフェクトした細胞の TRF1 発現量に応じて細胞の寿命の延長が惹起された (図 2 9)。

## 6. in vitro 系での免疫隔離膜の機能に関する研究

### 6.1 骨髄リンパ球 (BML) 細胞の生存率

新たに開発した陰イオン修飾ウレタン (SPU) コートバッグの免疫隔離能の機能に関して、ドナーモデルとしてラットの骨髄細胞に対する同種リンパ球による作用を解析することにより評価した。図 3 0 に示したように、SPU コートしていないバッグ中に入れた骨髄リンパ球 (BML) 細胞は、SPU コートし

たバッグ中に入れた細胞に比べて、生存率が有意に低下していた (74%,  $p < 0.05$ )。

## 6.2 リンパ球細胞中のサイトカイン産生

SPU コートしたバッグに封入した BML と共培養したリンパ球細胞と SPU コートしていないバッグに封入した BML 細胞と共培養したリンパ球の IL-4 の産生量を比較したところ、ほとんど差が見られなかった (図 3 1 (a))。一方、SPU コートしたバッグの BML 細胞と共培養したリンパ球の方が IL-13 産生量は高かった (図 3 1 (b))。反対に、TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  の産生量は SPU コートしていないバッグを封入した BML 細胞と共培養したリンパ球細胞の方が高い傾向が見られた (図 3 1 (c,d))。

## 6.3 リンパ球細胞中の CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の測定

SPU コートしたバック及びしていないバックに封入した BML 細胞と共培養したリンパ球の CD4 と CD8 が陽性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 (図 3 2) に示した。CD4 (図 3 2 (a)) 及び CD8 (図 3 2 (b)) 陽性細胞数は、SPU コートしたバッグに BML 細胞と共培養したリンパ球細胞の方が高いことが明らかになった。さらに、CD4 と CD8 ダブルポジティブの細胞数も同様の傾向が認められた (図 3 2 (c))。

## 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 免疫学的手法による血清試料から目的タンパク質の精製

#### (1) 遠心による抗体結合画分 (BF) 分離

細胞組織両医薬品の産生する目的タンパク質の体内動態解析法として質量分析法を適用するための諸条件の解析を行った。モデルタ

ンパク質としてインスリンを選び、血清中のインスリンを質量分析法を用いて分析するための精製条件や試料の調製法について検討を行った。まず、免疫学的手法を用いてインスリンを血清より分離することを試みた。免疫学的手法における BF 分離法としてよく用いられるのは、プロテイン A や抗 IgG 抗体を結合したゲルを利用して遠心分離する免疫沈降法であるが、血清試料には大量の免疫グロブリンが含まれるため、プロテイン A の使用は適切でない。そこで、抗インスリンモノクローナル抗体を結合した抗マウス IgG 抗体結合アガロース懸濁液をインスリン添加血清とインキュベートして、水、50mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)、TBS、または TBS-T (0.1% Tween20 含有) を使用して洗浄し、結合画分の MS スペクトルを比較した。

蒸留水やトリス塩酸緩衝液を洗浄に用いた場合には 10nM のインスリンを 10  $\mu$ l の血清から検出することはできなかったが、TBS および TBS-T を用いた場合にはインスリンシグナルが検出され、とくに TBS-T を用いると夾雑シグナルが減少した (図 3 3)。しかしながら、血清試料の容量を多くしてもインスリンの検出感度を上げることはできず、これは固相のアガロースがインキュベート中、容易に沈殿してしまうために試料中のインスリンを濃縮できないと考えられた。

#### (2) 磁気ビーズを用いた BF 分離

免疫学的手法における BF 分離法としては、抗体磁気ビーズによる方法も多く用いられるようになってきた。この方法では固相の粒子を磁石によって集めるため、磁石の存在しない状態ではインキュベート中にも容易に沈殿することなく分散していることから、遠心を用いる方法に比べてインスリンを濃縮しやす

いと考えられた。磁気を用いた BF 分離においては、非特異的な吸着を抑えるために、BSA や Triton X-100 がよく使われている。そこで、抗インスリンモノクローナル抗体を結合した抗マウス IgG 抗体結合磁性粒子懸濁液をインスリン添加血清とインキュベートし、TBS、TBS-T、TBS-0.1% BSA、または TBS-1% Triton X-100 を使用して磁性粒子を洗浄した場合における結合画分の MS スペクトルを比較した。その結果、BSA 等を使用したときに比べて、Triton を使用したときには夾雑シグナルが顕著に減少した (図 3 4)。

しかし、インスリン自体のシグナルもかなり減少することがしばしばあった。Triton は MALDI において自分自身のシグナルが強く出してしまうために目的試料のシグナルを抑制することが知られているので、磁性粒子を TBS-1% Triton X-100 で洗浄後、Triton を含まない TBS で洗浄する操作をさらに追加することによって改善できることがわかった。この洗浄条件を用いて血清中インスリンの検出限界を検討したところ、10  $\mu$ l の血清からは 1 nM のインスリンを検出することはできなかったが、100  $\mu$ l の血清を用いることによって、この濃度のインスリンを検出することができた。ちなみに血清中におけるインスリンその他のホルモンやサイトカイン類の濃度は 0.1 nM 程度あるいはそれ以下であり、血清試料の容量をさらに多くして濃縮する必要がある。

## 7.2 タンパク質によるシグナル増強

### (1) トランスフェリンによるインスリンシグナルの増強

MALDI におけるシグナル強度は結晶化やイオン化の条件等により変動しやすいため、これを定量に用いる場合には、目的物質とイ

オンのによく似た挙動を示す内部標準が必須とされている。そこでヒトインスリンを定量するために、内部標準としてウシインスリンをマトリックスの CHCA 溶液に添加して定量性の予備的検討を行った。その結果、ウシインスリンはヒトインスリンの内部標準として使えることが確認できたが、その際、ヒトインスリンのシグナル強度が高くなる傾向を認めた。

次にトランスフェリンを CHCA 溶液に添加してみたところ、インスリンシグナルの強度が 10 倍以上になることを見出した (図 3 5)。この現象はシグナル増強に使うことができると考えられたので、さらにシグナル増強作用について検討を加えた。

まず、トランスフェリンの濃度を変えて CHCA 溶液に添加してみた。その結果、トランスフェリンの濃度が高いほどシグナルが増強された (図 3 6 a)。しかし、10、100、1000 ng/ $\mu$ l で検出感度を比較した場合には、100 ng/ $\mu$ l のときにもっとも感度が高かった。シグナルノイズ比 (S/N) も 100 ng/ $\mu$ l 前後でもっとも高かった (図 3 6 b)。

### (2) BSA 等によるインスリンシグナルの増強

このようなトランスフェリンによるヒトインスリン (分子量 5,808) のシグナルに対する増強作用が、ウシインスリン (分子量 5,730) やトランスフェリン (分子量 約 80,000) の組み合わせに特異的なものであるかどうかを検討するため、hANP (分子量 3,080)、グルカゴン (分子量 3,483)、フェリチン (分子量 約 20,000)、BSA (分子量 約 66,000)、または IgG (分子量 約 150,000) を系列希釈してマトリックスに添加し、インスリンシグナルへの影響を調べた。その結果、いずれの場合にもインスリンのシグナルは増強されたが、

その作用の強さは異なり、hANP、グルカゴン<フェリチン<BSA、トランスフェリン、IgGの順であった(図37a)。また、S/Nが最適であったときの添加濃度は大きく異なったが、分子量の近いhANP、グルカゴンとBSA、トランスフェリンはそれぞれ至適濃度も近かった(図37b)。ターゲットプレートの各ウェルにのせたモル量を算出すると、いずれも0.26-0.62 pmolの範囲にあった。

### (3) トランスフェリン、BSAによる各種ペプチド・タンパク質シグナルの増強

さらに、トランスフェリン等によるシグナル増強がインスリンに特異的なものかどうか検討するため、hANP、グルカゴンとIGF-Iも添加したペプチド・タンパク質混合溶液を試料として、トランスフェリンまたはBSAを添加したCHCAをマトリックスに用い、MSスペクトルを測定した。その結果、ACTH(分子量2,465)よりも小さいシグナルはほとんど変化しなかったが、hANP(分子量3,080)よりも大きいシグナルは増強され、とくにインスリンよりも分子量の大きいIGF-IやシトクロムCについては、インスリンよりもさらに強くシグナルが増強されていた(表13、図38)。また、コントロールでは検出されなかったミオグロビンのシグナルも検出され、トランスフェリンを添加した場合にはペプチド・タンパク質混合溶液に含まれているBSAも検出された。

## 7.3 合成高分子によるシグナル増強

### (1) ポリリジンによるインスリンシグナルの増強

トランスフェリンやアルブミンはインスリン等のシグナルを増強するが、それ自体のシグナルが検出されてしまうという欠点を有するので、合成高分子を添加することによって

この欠点を改善できないかどうか、検討した。

まず、分子量70,000-150,000のポリリジンやポリアルギニンをCHCAに添加した(各ウェルに約0.2 fmol)。その結果、インスリンのシグナルが5から7倍に増強されており、また、分子量70,000-150,000の領域にはこれらに由来するシグナルは検出されなかった。しかし、低分子領域には不純物によると思われるノイズが多数出現しているため、シグナル増強剤としては不適と思われた(図39)。

### (2) PEGによるインスリンシグナルの増強

ついで、平均分子量8,000または20,000のPEGをCHCAに添加した(各ウェルに約1 fmol)。その結果、いずれの場合にもインスリンのシグナル増強は認められた(図40)。しかし、平均分子量8,000のPEGを添加した場合には、PEG自体に由来するシグナルも検出され、増強作用も3倍程度と低かった。

平均分子量20,000のPEGを添加した場合には、分子量20,000前後にPEG由来のシグナルは検出されなかった。また、低分子領域にもほとんどノイズは検出されず、シグナル増強作用も約6倍でトランスフェリンやポリリジンなどと同程度であったことから、高分子量のPEGはシグナル増強剤として優れていると考えられた。

### (3) ポリリジンまたはPEGによるシトクロムCシグナルの増強

インスリン以外のタンパク質に由来するシグナルに対する合成高分子の作用を検討するため、高分子量のPEGまたはポリリジンをCHCAに添加して、シトクロムCのシグナル強度を定量した。その結果、シトクロムCのシグナルは40倍から60倍に増強されており、PEGやポリリジンが添加された場合も、トランスフェリンやBSAと同様に、シトクロムC

のシグナルはインスリンより強く増強されることが示された（データは示さず）。

## 8. 血管内皮前駆細胞の特性指標の解析に関する研究

### 8.1 末梢血 AC133 陽性細胞から血管内皮細胞分化過程における Cx 発現

末梢血の AC133 陽性細胞を VEGF、TPO、SCF 存在下、一週間培養した後、蛍光標識抗 CD31 抗体を用いて細胞を染色し、CD31 強陽性細胞をソーティングした。この CD31 強陽性細胞はすでに報告したように血管内皮前駆細胞としての特性をもっているが、この細胞をフィブロネクチン（FN）上で更に 1 日あるいは 7 日間培養し、KDR の発現の変化を調べた。その結果、1 日目に比べ 7 日目に KDR が強く発現していた（図 4 1、上段は顕微鏡画像、下段は同視野における蛍光画像）。この結果から、CD31 強陽性細胞は FN 上での培養初期には血管内皮の分化マーカーである KDR が殆ど発現しておらず、FN 上で 1 週間培養することにより分化マーカーが発現してくることを意味しており、CD31 強陽性細胞が血管内皮前駆細胞の特性を持つと考えている我々の結論を支持している。次に、各種コネクシン（Cx）の発現の変化を解析した。CD31 強陽性細胞を FN 上に培養した 1 日目と 7 日目の Cx の発現を比較すると、培養 1 日目では Cx37 と Cx40 が強く発現し（図 4 2）、7 日目では Cx40 の蛍光強度は殆ど変化しないかむしろ増強する傾向が認められた（図 4 3）。一方、Cx43 は FN 上で培養後 1 日目には殆ど発現が認められず（図 4 2）、培養 7 日目には強く発現してくることが明らかになった（図 4 3）。対照としてヒト臍帯内皮細胞をこれらの Cx で免疫染色した結果、Cx37 の発現は殆ど認められないが、

Cx40 と Cx43 が強く発現している（図 4 4）ことが明らかになった。このことより、2 つの Cx40 と Cx43 の発現と Cx37 が発現していないことが分化した血管内皮の指標と考えられた。また以上の結果から、血管内皮前駆細胞として我々が想定している CD31 強陽性細胞は、分化開始前には Cx37 と Cx40 を発現しているが分化成熟に従って、Cx37 の発現が消失し、代わりに Cx43 が発現してくるものと考えられた。これまでの結果から、血管内皮前駆細胞の特性指標としての細胞表面マーカーの発現は  $CD34^{bri}/KDR^{-}/Cx37^{+}/Cx40^{+}/Cx43^{-}$  と規定することができる。

### 8.2 末梢血由来 AC133 陽性細胞における Cx37 発現の経時変化と Cx37 を表面マーカーとした磁気ビーズ分画後の CD31 発現解析

Cx37 が血管内皮前駆細胞に発現していることが明らかとなり、Cx37 が血管内皮前駆細胞を分画する新たな表面マーカーになる可能性が考えられた。末梢血由来 AC133 陽性細胞を分画後、タイプ IV コラーゲン上で培養し、血管内皮前駆細胞になるまでの 1 週間の Cx37 発現をフローサイトメーターで解析した。図 4 3 左に示すように、Cx37 の発現は経時的に増加することが明らかになった。次に末梢血由来 AC133 陽性細胞を 7 日間培養した細胞を Cx37 陽性細胞と Cx37 陰性細胞に磁気ビーズを利用して分画し、分画した細胞の CD31 の発現を調べた。その結果、どちらの分画も CD31 陰性細胞を含むが、Cx37 陽性細胞分画の方が、遙かに多くに CD31 陽性細胞が含まれることが明らかになった（図 4 5、右）。

### 8.3 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 4 6 に示すように、AC133<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>細胞は臍帯血と末梢血でほぼ同程度の比率で存在し、AC133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>細胞は 3 倍であるが、幹細胞をもっとも多く含むと考えられる AC133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞の比率は臍帯血の方が 11 倍高いという結果が得られた。これは、臍帯血の多能性幹細胞の比率が末梢血に比べて多いとされる結果とよく一致している。

#### 8. 4 臍帯血及び末梢血由来 AC133 陽性細胞の増殖能と CD31 強陽性細胞の出現能

臍帯血及び末梢血の AC133 陽性細胞からどの程度血管内皮前駆細胞が誘導されるかの明らかにする目的で、両細胞を同じ密度 (図 4 7 に点線で示す) にコラーゲンタイプ IV をコートしたディッシュに播種し、VEGF、TPO、SCF 存在下に 6 日間培養し、細胞増殖能及び CD31 強陽性細胞の出現率を比較検討した。

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 陽性細胞では顕著に細胞数が増加することが明らかになった (図 4 7、 $p < 0.001$ )。

次に、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、出現してくる CD31 強陽性細胞を 0 日の臍帯血 AC133 陽性細胞と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 4 8 に示すように CD31 強陽性細胞は 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 陽性細胞を用いても同様の結果が得られた。

臍帯血 AC133 陽性細胞由来 CD31 陽性・強陽性細胞を分画し VEGF 存在下ファイブロンクチン上で培養した結果、陽性細胞は殆ど接着する細胞が観察されなかったのに対し、強陽

性細胞では多くの接着細胞が観察され (図 4 9、上段)、これらの接着細胞が KDR 陽性、eNOS 陽性である (図 4 9、下段) ことから接着細胞は血管内皮細胞と考えられた。これらの結果から、臍帯血を用いても末梢血と同様に CD31 強陽性細胞が血管内皮細胞前駆細胞と考えられた。また、臍帯血ではその増殖能が高いことに比例して血管内皮前駆細胞誘導能が高いことが明らかになった。

#### 8. 5 臍帯血由来 AC133 陽性細胞における Lox-1 発現の経時変化と Lox-1 を表面マーカーとした磁気ビーズ分画後の CD31 発現解析

Lox-1 は酸化 LDL の内皮細胞上のレセプターとして同定された分子であり血管内皮細胞に特異的に発現していることが知られている。そこで、血管内皮細胞への分化過程での発現変化について解析し、有用な指標となりうるかを検討した。末梢血由来 AC133 陽性細胞を分離後、タイプ IV コラーゲン上で培養し CD31 強陽性細胞が多く出現してくるまでの培養後 8 日間の Lox-1 発現をフローサイトメーターで解析した。図 5 0 左に示すように、Lox-1 の発現は経時的に増加し、培養 4 日目に最大に達した。更に Lox-1 と CD31 の 2 重免疫染色を行いフローサイトメーターで解析すると、Lox-1 の発現と CD31 の発現が相関しており、Lox-1 陽性細胞/CD31 強陽性細胞の集団が存在することが明らかとなった (図 5 0、右上)。従って、Lox-1 も Cx37 と同様に血管内皮前駆細胞の特性指標となる可能性が考えられた。そこで末梢血由来 AC133 陽性細胞を 5 日間培養し、Lox-1 に対する抗体を用いて磁気ビーズ分画を行い、Lox-1 陽性細胞分画と Lox-1 陰性細胞分画を分離した。その結果、Lox-1 陽性分画には CD31 強陽性細胞の比率が非常に高いことが明らかになり、Lox-1 は特性指

標として有用なばかりでなく血管内皮前駆細胞の分離のも有用であることが示唆された(図50、右下)。

## 9. 神経分化細胞の特性解析

### 9.1 P19 細胞の効率的神経分化誘導法の確立

P19 細胞を効率よく神経細胞へ分化させるためには、細胞を胚様体 (embryoid body) のように凝集した状態にすることが重要である。そこで、1  $\mu$ M レチノイン酸存在下、接着面がコートされていないバクテリア培養用プレートで完全にばらばらな状態にした細胞を植え培養を行った。細胞は培養開始後数時間で凝集し始め、時間の経過とともに大きな細胞塊になった(図51)。さらに2日ごとに培地交換を繰り返しながら培養を継続した。

最初に、分化培地へ移す時の細胞の形態による分化効率の検討を行った。細胞は4日間レチノイン酸存在下培養したものを使用した。凝集状態の細胞のまま分化培地に移すと数時間で神経突起を伸ばした。しかし、通常のプレートでは接着面からはがれやすく、はがれたものは神経突起伸長に続くネットワーク形成まで至らず分化は停止した。ポリリジンコートしたプレートでは細胞塊はしっかりはり付き、神経突起伸長と密なネットワーク形成に至った(図52)。細胞をトリプシンでばらばらにしてから分化培地に移した場合、ポリリジンコートしたプレートでは神経突起を伸ばすものの長さが短く、またネットワーク形成にも至らなかった。通常の培養用プレートでは、ほぼどの細胞からも神経突起を伸ばし、時間が経過すると細胞が寄り添い小さな固まりに発展し、神経突起の数も増え複雑なネットワークを形成した(図53、3日目)。形態

的にも比較的均一な細胞集団であった(図51)。レチノイン酸を加えないで同様の操作を行った場合は、近くに存在する細胞同士の寄り添いが観察されるが、神経突起は伸ばさなかった(図53、Control)。

次に、分化に要する至適日数の検討を行った。1  $\mu$ M レチノイン酸存在下1日目から8日目までそれぞれ培養し、分化誘導培地に換えて分化の度合いを比較した。その結果、3日間から5日間レチノイン酸存在下に培養した場合が最も効率よく神経細胞に分化した。7日以上培養すると、分化誘導培地に移さなくても神経突起を伸ばすが、凝集した細胞塊がトリプシンに耐性になり、分化能は低下した。

### 9.2 分化誘導時および誘導後の細胞の特性

レチノイン酸で分化したP19細胞由来神経様細胞の分化マーカーとなるタンパク質の発現について解析した。神経幹細胞はニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトなどに分化することが知られている。ニューロンのマーカーとしてのMAP2 (microtubule-associated protein 2) の発現は、4日間レチノイン酸存在下で培養後、分化培地に移した場合、MAP2は翌日から強く発現していた。分化培地に移さなくてもレチノイン酸処理7日目で発現が誘導されたが、これは形態的観察による神経突起の伸長が起こる時期と一致していた。一方アストロサイトの分化マーカーとされるGFAP (glial fibrillary acidic protein) の発現は、いずれのステージにおいてもほとんど検出されなかった(図54)。

神経細胞に見られるN-cadherin、contactinは、分化誘導中はレチノイン酸を添加していない対照群と発現の差異は認められないかほとんど発現してなかったが、分化し始め神経突

起の伸長とともに強い発現が認められるようになった(図5 4、陽性対照Lとの比較)。

細胞の分化は増殖シグナルと密接な関係があるので、増殖を制御する因子の分化誘導過程における変動を調べた。P19 細胞は、使用する濃度のレチノイン酸では増殖速度がやや落ちたが、4日間でも増殖は止まらなかった。DNA複製に関連しているPCNAや、DNAポリメラーゼ $\epsilon$ のサブユニットDPE2、DPE4は分化誘導過程でほとんど変動がなかった(図5 5)。PCNAは7日間目で減少が観察された。また、増殖抑制因子であるKip1とRB2は分化に伴い発現量が上昇した。しかし、同様の増殖抑制因子であるSkp1、p36、p16はあまり変動が見られなかった。細胞周期進行に関与するcdk4およびcyclin Dは、細胞凝集させるといったん発現が減少し、培養経過とともに発現が増加してくること、さらに、分化誘導培地に移すとやや発現の減少が見られた(図5 6)。

### 9.3 P19 細胞のレチノイン酸による神経細胞分化誘導時のプロテオミクス解析

神経細胞へ分化し神経突起を伸ばした細胞は形態的にもダイナミックな変化が起きている。神経細胞の再生を目指す細胞治療では、分化した細胞ではなく神経幹細胞あるいは前駆細胞が用いられると想定される。そこで本研究では、神経に分化する前の細胞の分化指標となる分子の探索を行うことを目指している。このために、P19 細胞をバクテリア培養用プレートでレチノイン酸存在下1日目から4日目まで経時的に細胞を回収し、2次元電気泳動を行い、ゲルの銀染色にて分化誘導初期に出現するタンパク質の探索を行った。コントロールには、レチノイン酸の溶解液DMSOのみを同量投与したものをを用いた。1

枚のゲルで分離できるタンパク質は限られているので、より多くのタンパク質を解析する目的で、可溶性画分(step1)及び非可溶性画分(step2)に含まれるそれぞれのタンパク質を解析した。

分化誘導1日目からstep 1およびstep 2のサンプルで、コントロールと比較して変動したスポットが観察された。単独のスポットで増加あるいは減少しているもの、またタンパク修飾によるpI移動と思われる水平方向に移動が見られるもの、付近のスポットと比較して割合が変動しているものが観察された(図5 7)。step 1によるサンプル、すなわち可溶性で細胞質由来のタンパク質は1日目と4日目を比較して、あまり大きなスポットの相違は見られなかった。一方、核内タンパク質や可溶化しにくいタンパク質であるstep 2のサンプルは、1日目と4日目で大きく異なっていた。この現象はコントロールでも観察されることから長期間細胞を凝集状態におくことによると思われる。

スポットの質量分析を行うことでタンパク質の同定を試みた。感度は落ちるがグルタルアルデヒドを用いない銀染色を行ったゲルから変動の見られたスポットを抽出し、一部MALDI-TOF MSで解析したが、まだ同定に至っていない。

## 10. 心筋分化細胞の特性解析

### 10.1 P19 CL6 細胞の心筋細胞への分化誘導法の確立

P19細胞の亜株であるCL6細胞を通常の培養用プレートに細胞密度が高くないように調整しながら培養し続けた細胞を、トリプシン処理で回収後、1% DMSOを加えた血清入り培地に植え込んだ。2日ごとにDMSOを

添加した新しい培地に換えて培養すると、11~12日目から自発的拍動をする細胞が観察された。さらに培養を続けると自発的拍動をする領域が増加した。8日目から細胞を経時的に回収し、心筋細胞のマーカ―として知られているミオシン軽鎖 2a 遺伝子(心房筋マーカ―)とミオシン軽鎖 2v 遺伝子(心室筋マーカ―)の発現をリアルタイム RT-PCR により定量した結果、両 mRNA とも8日目にはほとんど見られなかった発現が、13日目に発現のピークがあり、その後も発現が続いた(図58)。

#### 10.2 CL6細胞の免疫組織学的解析

分化した CL6 細胞は HCN2 チャネル(心臓のペースメーカー機構の構成要素の一つ)、筋小胞体  $Ca^{2+}$ -ATPase 2、トロポニン T、デスミン特異的抗体およびファロイジン(F-actin に特異的に結合するペプチド)により蛍光染色され、特にファロイジンと筋小胞体  $Ca^{2+}$ -ATPase 2 抗体を用いた染色では明瞭な筋節(サルコメア)構造が観察された(図59)。

#### 10.3 マーカ―遺伝子の発現解析

これまでに心筋細胞のうち、心房筋と心室筋で収縮タンパク質のアイソフォームの違いが報告されている(表14)。CL6細胞から分化した心筋細胞がどのタイプに属すかを解析するため、それぞれのマーカ―遺伝子の発現解析を行った(図60)。16日間の DMSO 処理により分化した CL6 細胞と成獣心房筋、成獣心室筋、新生仔心室筋で発現の比較を行った。ミオシン軽鎖 2a 遺伝子(MLC2a、心房筋マーカ―)の発現は、成獣心房筋で高く、CL6細胞もほぼ同程度であった。サルコリピン遺伝子(SLN、心房筋マーカ―)成獣心房筋で発現は高いが、CL6細胞では心室筋並み

の発現であった。一方、ミオシン軽鎖 2v 遺伝子(MLC2v、心室筋マーカ―)の CL6 細胞での発現は成獣心室筋に近いものであった。値は 18 S rRNA の量で補正したものである。心房筋マーカ―である MLC2a の心室筋マーカ―MLC2v に対するの発現比は成獣心室筋の 9 倍であった。また別の心房筋マーカ―SLN の場合は成獣心室筋の 30%であったが、成獣心室筋および新生仔心室筋の 100 倍以上であった(図61)。したがって、CL6細胞は心房筋型的心筋細胞であることが明らかとなった。さらに、幼若心筋か成熟心筋か検討する目的で、 $\alpha$ ミオシン重鎖遺伝子( $\alpha$ MHC、成熟心筋マーカ―)、 $\beta$ ミオシン重鎖遺伝子( $\beta$ MHC、幼若心筋マーカ―)、平滑筋型  $\alpha$ アクチン(Sm actin、幼若心筋マーカ―)の発現を同様に調べた。16日間の DMSO 処理により分化した CL6 細胞における Sm actin の  $\alpha$ MHC に対する発現比は、成獣心室筋および成獣心房筋の 4 倍、新生仔心室筋の 60%であった。同 CL6 細胞における  $\beta$ MHC の  $\alpha$ MHC に対する発現比は成獣心房筋より 30 倍高く、成獣心室筋と同程度、新生仔心室筋の 10%であった(図62)。以上の結果は CL6 細胞より誘導される心筋細胞は、幼若な心筋の表現型であると結論された。

#### 10.4 CL6細胞の電気生理学的解析

自動能を獲得した CL6細胞の静止膜電位および 30%および 50%活動電位持続時間( $APD_{30}$ 、 $APD_{50}$ )を測定した結果、MDP(maximum diastolic potential)は心室筋型のものより高いこと、 $APD_{30}$ 、 $APD_{50}$ が 50 ms 以上の心室筋型のものに比べ短く、心房筋細胞との類似性が認められた(図63)。また、QT 延長や不整脈との関連が深いとされる早期後脱分極(EAD, early after

depolarization) が 75% の細胞で観察された。

### 1.1. 幹肝細胞の特性指標の解析

図 6 4 は成熟肝細胞及び小型肝細胞由来の Total RNA を用いて RT-PCR により検出した mRNA の発現解析結果を示している。なお、これら全ての PCR 産物において、用いた各プライマーから予想されるサイズの位置にバンドが検出された。小型肝細胞において Anx III PCR 産物が検出され、その強度は添加した cDNA 量に依存して増加した。一方、成熟肝細胞において Anx III PCR 産物は検出されなかった。同様な結果が異なるプライマーを用いた場合においても得られた。チロシンアミノトランスフェラーゼ (TAT) 及びトリプトファンオキシゲナーゼ (TO) については両細胞において PCR 産物が得られ、その強度は添加した cDNA 量に依存して増加し、両細胞においてほぼ同等であった。アルブミンについては、昨年度両細胞においてタンパク質レベルで同様な発現がみられることを報告したが、PCR 産物についてもほぼ同様な強度で検出された。なお、コントロールとして用いた GAPDH の PCR 産物については両細胞において、添加した cDNA に依存して増加し、その強度は両細胞においてほぼ同様であった。

## 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 ヒト軟骨細胞の形態に及ぼす液性因子等の影響について

細胞を高密度でディッシュにスポットし微小集積培養を 2 時間行うことにより細胞は凝集したまま接着させた (図 6 5 a)。その後、種々の培地で 4 週間培養することによって、軟骨細胞は顕著に均一な薄板状の軟骨形成細

胞となった。control 細胞はクラスター形成がほとんど見られなかった (図 6 5 b)。軟骨の小塊は、通常、微小集積培養用のスポットをしてから 1 週間以内に視覚化される。bFGF を添加した細胞は、細胞外マトリックス (ECM) 成分がわずかに高かった。FeSO<sub>4</sub> を添加した細胞 (図 6 5 c) 及び bFGF+FeSO<sub>4</sub> を添加した細胞 (図 6 5 d) は ECM 成分がより高密度に存在した。また細胞の形態に対してもこれらの因子は影響を与えず、細胞は丸みのある形を保っていた。全ての群において、微小集積培養の端から細胞が広がっており、広がった部分の細胞は細長い形をしていた。

### 1.2.2 ヒト軟骨細胞の増殖に及ぼす液性因子等の影響について

ヒト軟骨細胞の増殖は、4 週間細胞培養後 alamar blue を用いて測定し、その結果を図 6 6 に示した。Control を 100% として表した。bFGF と FeSO<sub>4</sub> をそれぞれ単独または両者同時に添加すると、細胞の増殖は多少下がる傾向はあるものの、顕著な低下ではなかった。

### 1.2.3 ヒト軟骨細胞の分化に及ぼす液性因子等の影響について

alcian blue と結合した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された。その量について control を 100% として示した (図 6 7)。液性因子を加えることによって、プロテオグリカン産生量が高まっており、細胞の分化が促進されることがわかった。bFGF 添加によってわずかにプロテオグリカン産生量が高まった (115.9%) もの、control と比べて有意な差ではなかった。一方、FeSO<sub>4</sub> と bFGF +FeSO<sub>4</sub> を添加することによってプロテオグリカン産生量は control に比べて、それぞれ 195.5% と 218.1% と有意に上昇した。

ただし、FeSO<sub>4</sub>添加とbFGF +FeSO<sub>4</sub>添加の間では有意差は見られなかった。

#### 1 2.4 細胞の分化 index の検討

Control、bFGF、FeSO<sub>4</sub>、bFGF +FeSO<sub>4</sub> 添加培養細胞の分化 index (細胞分化/細胞増殖) は、それぞれ 1, 1.38, 2.09, 2.40 であった (図 6 8)。FeSO<sub>4</sub> または bFGF +FeSO<sub>4</sub> 添加により、分化 index は control に比べて顕著に上昇していた。

### D. 考察

#### 1. PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮の検討

昨年度までの検討で、新たに開発した PEI 磁気ビーズがウイルス濃縮に非常に有用であることを示してきた。しかし、PEI 磁気ビーズはいくつかの非エンベロープウイルスには適応不能であることから、2価イオンとスルホン酸磁気ビーズを用いた手法を開発した。しかし、複数の手法を用いるより一つの手法でウイルス濃縮が可能であれば操作も簡便になると期待される。また、PEI 磁気ビーズの濃縮機構を明らかにすることができれば、より最適な濃縮条件を設定することが可能となり、ひいては濃縮効率の上昇が期待された。本年度は、この PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮に及ぼす pH の影響や PEI の分子量の違いについて検討を行った。その結果、pH が低いと濃縮効率が低下すること、高分子量の PEI を用いる方が濃縮効率が高いことが明らかになった。これらの結果より、PEI の陽イオン解離基が重要な役割を果たしていること、またその解離基の密度が高いほど濃縮効率が高いと考えられた。

一方、PEI 磁気ビーズに結合する血清タンパク質の解析から、IgG がウイルスとともに

濃縮されることが明らかになった。そこで、抗ウイルス抗体を添加して PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮を検討したところ、抗ウイルス抗体添加によりウイルス濃縮効率が飛躍的に向上することが明らかになった。

PEI 磁気ビーズを用いてヒト感染性ウイルスへの適応についても検討を行い、HCV や HBV への適応が可能であることを明らかにした。また、HBV 濃縮においても抗 HBV 抗体を添加することにより濃縮効率が上昇することが明らかになり、PEI 磁気ビーズ濃縮において、抗ウイルス抗体の添加が非常に有用であることが明らかになった。しかし、抗ウイルス抗体を直接結合した磁気ビーズでは、PEI 磁気ビーズを用いるのに比べて遙かに低い濃縮効率しか得られなかった (データは示さず)。これは、PEI の高い枝分かれ構造や解離基の多さが加わり効率よくウイルスをトラップできるのに対して、抗体を直接つけたビーズではそういった効果が無いためではないかと想定される。今後、抗ウイルス抗体添加によって PEI 磁気ビーズを用いて非エンベロープウイルスの濃縮も可能か検討を行う予定である。

#### 2. STR マーカーを利用した細胞の遺伝的同一性の解析

細胞組織利用医薬品等の同一性や純度の判定へ STR マーカーを利用することの有用性について検討した。細胞確認試験としては、STR が非常に有用であることが確認された。また、由来の同じ細胞であっても遺伝的性質が異なることが知られている亜株の間で一部の STR の繰り返し数やシグナル強度に差異が認められることも明らかになり、STR が遺伝的変異が生じた場合の検出にも利用できる

可能性が示唆された。ただし、染色体の変化に関しては、以前の核型解析および m-FISH 解析により HL60-RG 細胞ではかなり大きな変化が起きていることから、欠失や増幅を伴う一部の染色体変化が検出できるにすぎないことは留意する必要がある。このような点を今度改良していく必要がある。

また、細胞組織利用医薬品の臨床適用において、投与された細胞とレシピエント自身の細胞とのキメリズムを解析する必要が生じた場合や、投与された細胞のレシピエントにおける体内動態のモニター等にこの STR マーカーを利用した解析が有用な手段となることが期待される。

### 3. サイトカインアレイにより細胞由来サイトカインプロファイル測定への適応

サイトカインアレイによる解析は、迅速・簡便な操作で少量の培養上清で一度に 79 種類のサイトカインの解析が出来る。細胞組織利用医薬品の特性解析法として有用な手法であると考えられる。実際に治療に用いられる可能性あるヒト血管内皮前駆細胞を用いて、分化誘導による特性の変化に応じたサイトカイン産生の変化を捉えることが可能であった。

しかし、現在のプロトコールでは定量範囲や検出感度についてさらに改良が必要と考えられる。同時に解析した、モデル細胞を用いた検討でいくつかのサイトカインの検出結果が ELISA による検出結果と異なっていた。例えば、ELISA を用いて HL-60 細胞と HL-60RG 細胞はともにかなりの VEGF を産生していることを明らかになったが、サイトカインアレイでは検出することができていない。また、ELISA によって HL-60RG 細胞は検出限界以上の IL-6 を産生していることが

示されているが、サイトカインアレイでは検出できていない。TNF- $\alpha$  は、ELISA では検出できないがサイトカインアレイでは HL-60RG 細胞で産生を認めている。これらの差異は、用いている抗体も異なっている可能性が高く、それぞれサイトカインに対する抗体の親和性も異なるためと想定される。

今後サイトカインアレイを細胞特性解析に適応していくためには、イメージ解析などによりそれぞれのシグナルを定量できるようにするとともに、シグナル強度からサイトカインの定量が可能ないように改良をしていく必要があると考えられる。また、より高密度なプロテインアレイを構築することができれば、サイトカインばかりでなく、細胞産生タンパク質プロファイル解析に適応可能と考えられるので、今後高密度化にも取り組んでいく。

### 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

細胞・組織由来タンパク質の約 50% は糖鎖付加を受けているといわれている。糖鎖は細胞表面に多く存在し、細胞接着や認識等の細胞間相互作用に係わっている他、タンパク質の機能を様々な形で調節していることが知られている。また、糖鎖は組織間で異なっていること、発生・加齢や癌等の疾患に関連して変化することが明らかにされていることから、細胞組織利用医薬品において、タンパク質プロファイル評価はもちろん、糖鎖プロファイル評価、並びに糖鎖部分を含む目的タンパク質の解析は細胞特性解析の一環として非常に重要である。

糖タンパク質特性解析法として、各種 HPLC や電気泳動法などが利用されているが、我々はこれまで、MS、特に、LC/MS に着目し、

LC/MS を用いた糖タンパク質特性解析法の開発を行ってきた。独自の糖ペプチドプロファイリング法や CapGCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法を開発し、様々な糖タンパク質の構造解析に応用してきた。本年度は、これらの方法をプロテオーム・グライコプロテオーム解析法として発展させることによって、細胞組織利用医薬品の特性・品質解析につなげることを目指した。

簡便、迅速にタンパク質発現解析ができる多次元 LC/MS/MS 法は、糖タンパク質に適用する場合、糖ペプチドの MS/MS 分析では糖鎖部分が先に開裂するため、一次構造に関する情報が得られにくいことや、糖鎖解析に対応した検索ソフトが確立されていないなどの理由により、殆ど開発が進んでいなかった。

そこで、はじめに我々は LC/MS/MS を用いた糖ペプチド解析を検討した。糖タンパク質のトリプシン消化物の LC/MS/MS における第一の課題は、ペプチド混合物の中からいかに糖ペプチドを特定するか、である。現在、インソースフラグメンテーションやプリカーサーイオンスキャンにより糖鎖に特徴的な分子イオン ( $m/z$  204, 366 など) を確認することで糖ペプチド由来のイオンを判別する方法が用いられているが、それだけで正確な部位特異的な糖鎖構造解析を行うのは難しい。今回我々は、MS/MS スペクトルを解析することで糖ペプチド由来イオンをより正確に選択することに成功した。

糖ペプチドの LC/MS/MS 分析のもう一つの課題は、CID において優先的に糖鎖部分が単糖や二糖にまで壊されてしまい、タンパク質一次構造や糖鎖配列に関する情報が乏しいため、タンパク質同定や糖鎖構造解析に利用することが難しいといわれていることである。

しかし我々は、 $\alpha$ フェトプロテインを用いた MS/MS 分析により、今回用いたコリジョンエネルギーの条件で部分的ではあるが糖鎖の配列が確認できること、また、ペプチドの一次構造情報が得られることを確認した。実際、LC/MS/MS を用いて、分子量 130K と比較的大きいセルロプラスミンの 4 本の糖ペプチドの特定も可能であり、血清のトリプシン消化物のプロダクトイオンスペクトルを詳細に読みとることによって、ペプチドの同定と結合糖鎖の構造を明らかにすることができた。今後、今回用いたシステムよりもスキャン速度が速く、高分解能 MS が測定可能な機器を利用することによって、細胞組織発現糖タンパク質のプロファイル評価、及び目的タンパク質の特性解析につなげていきたいと考えている。

つぎに、CapGCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングをグライコーム解析に応用することを検討した。マウス腎臓から切り出した糖鎖を LC/MS で分析することによって、実行可能なサンプル量で、腎臓に特徴的な糖鎖プロファイルを得ることができた。腎臓発現糖タンパク質糖鎖の構造に関しては、最近、Lewis X 型糖鎖が多いという報告が出されているが、今回、LC/MS 及び LC/MS/MS で解析した結果も、これを支持するものであった。

我々は腎臓の糖鎖プロファイリングとは別に、CHO 細胞膜画分の糖鎖プロファイリングを行っているが、CHO 細胞の糖鎖分布はマウス腎臓とは全く異なるものであった。近年、糖鎖はタンパク質ではなく組織特異的に付加されることによって、組織を特徴づけているのではないかという考え方が提唱されていること、また、糖鎖部分は培養条件の変更の影響を最も受けやすい部分であることから、糖

鎖差異を簡単に識別できる CapGCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法は細胞組織利用医薬品の品質を糖鎖の面から評価するのに優れた方法であると思われる。

## 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

### ①マウスがん化モデルを用いた検討

多くのプラスチックはラットやマウスの皮下に埋植した際に悪性腫瘍を引き起こすことがすでに報告されている。PLLA はゆっくりと分解していくため、骨折時に使用するプレート、釘、ネジといった整形外科用の医療用具用の生体適合材料として用いられている。ラットで、PLLA によって腫瘍を形成したといういくつかの報告がある。これまでに、SJL/J マウスでは腫瘍の発生が認められないにもかかわらず PLLA プレートを 10 ヶ月間埋植した BALB/cJ マウスでは 100%腫瘍が形成されることを見だしている。PLLA による腫瘍形成の機構を明らかにするために、腫瘍形成の早い段階で BALB/cJ マウスの皮下細胞を分離し、GJIC の変化を解析した。SLDT 解析により GJIC の機能を調べたところ、30 日間 PLLA を埋植した BALB/cJ マウス由来の細胞は対照の無処理 BALB/cJ マウス由来の細胞に比べて GJIC が有意に阻害されていた。一方、SJL/J マウスでは PLLA を埋植したものとしなかったもので GJIC についての変化は見られなかった。また、ギャップ形成にかかわる分子である Cx43 の mRNA とタンパク質発現について検討を行ったところ、Cx43 mRNA とタンパク質発現はともに PLLA を埋植した BALB/cJ マウス由来の細胞では対照の BALB/cJ マウス由来の細胞に比べて抑制されていた。一方、SJL/J マウス

では PLLA を埋植したものとしなかったもので mRNA 発現について変化は見られなかった。このことから、腫瘍形成に感受性の高い動物は GJIC 機能と Cx 発現の両方の抑制が容易に起こる動物である可能性が考えられた。このギャップ結合の不安定さは PLLA 誘導性の腫瘍形成において主要な役割を果たしているであろう。Cx43 タンパク質における遺伝子レベルでの変化や翻訳後の制限は GJIC の機能低下や腫瘍形成と関わりと考えられる。PLLA による GJIC の阻害効果は Cx43 タンパク質の変化を引き起こし、その結果腫瘍形成が高まったと考えられる。

一方、TGF- $\beta_1$  は、Cx43 のリン酸化型を減少させることによって GJIC を阻害することが知られており、また Cx43 のリン酸化はギャップ結合集合などに関連していると考えられていることから、TGF- $\beta_1$  の発現の変化が PLLA 埋植 BALB/cJ マウスにおいて重要な役割を果たしている可能性が高いと考え、TGF- $\beta_1$  レベルについて検討したところ、TGF- $\beta_1$  の分泌レベルは、PLLA を埋植した BALB/cJ マウスの皮下組織細胞では対照の BALB/cJ マウス由来の細胞に比べて有意に増加した。さらに、in vitro の実験系で、PLLA 埋植していない BALB/cJ マウスの皮下組織細胞に対する TGF- $\beta_1$  添加の影響について検討したところ、細胞間情報伝達と Cx43 mRNA 発現が有意に抑制されることも確認された。以上の結果から BALB/cJ マウスの皮下に PLLA を埋植した後の早い段階で、TGF- $\beta_1$  の分泌レベルの増加に依存してギャップ結合タンパク質 Cx43 の発現が抑制された結果、GJIC の機能が低下したと考えられた。以上のように、腫瘍を起こしやすいマウス系では腫瘍形成の早期から、TGF- $\beta_1$  の発現

増加、Cx43 発現の低下、GJIC の抑制が起こっていることから、これらががん化の指標となる可能性が示唆された。

## ② TRF1 の細胞のがん化指標としての有用性に関する研究

細胞のがん化指標としての TRF1 の有用性について検討した。ヒト繊維芽細胞を種々の条件で不死化すると TRF1 発現は全ての場合で顕著に亢進していたが、テロメラーゼ活性やテロメア長は不死化とは相関しない場合があった。また、TIG3 細胞や TIG7 細胞に TRF1 をトランスフェクトすると TRF1 の発現誘導と細胞寿命の延長が非常に良く相関していた。以上の結果から、細胞の不死化には、一定以上のテロメア長の長さあるいは TRF1 の発現の亢進が必要とする我々の仮説を支持する結果が得られた。今回の結果より、TRF1 ががん化の指標として非常に有用である可能性が示された。

## 6. in vitro 系での免疫隔離膜の機能に関する研究

TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  は Th1 細胞が産生するサイトカインであり、細胞の免疫反応を伝達し、同種移植片に対する拒絶反応に関わることが示されている。これまでの研究から、TNF- $\alpha$  の血漿レベルは肝臓、心臓、腎臓での急性の拒絶反応時に上昇することが示されている。IFN- $\gamma$  の上昇もまた、肝臓移植時に起こることが報告されている。一方、Th2 細胞が産生するサイトカインである IL-4 は動物モデルにおいて移植片生着を上昇させる役割を果たすことが示されている。Th2 細胞が産生する別のサイトカインである IL-13 の産生量は拒絶反応との関係は一定の傾向が認められず、急性の肝臓の拒絶反応時には IL-13 の産生は低

レベルであるという報告がある一方で、腎臓において同種移植による拒絶反応が起こらない時と起こる場合でその産生量に差がないことが示されている。本研究において、SPU コーティングしたバッグに BML 細胞を封入することによりその生存率が高いことが示され、免疫隔離膜としての有用であることが確認できたが、この免疫隔離の状況とレシピエントのリンパ球との総合作用に関して各種サイトカインの産生や免疫担当細胞の量の変化から解析した。その結果、SPU コートしていないバッグに封入した BML 細胞と共培養したリンパ球細胞 (レシピエントリンパ球) は、SPU コートしたバッグに封入した BML 細胞と共培養したリンパ球細胞よりも TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  の産生量が上昇傾向を示し、SPU コートしていないバッグを封入されたドナー BML 細胞に対してレシピエントリンパ球で強い免疫反応を起こしていることが考えられた。このことから、SPU コートはドナーとレシピエントのリンパ球の間の免疫反応を抑制する働きをしていると考えられた。CD4 はヘルパー T 細胞の表面に発現している分子であり、CD8 はキラー T 細胞の表面に発現している分子である。CD4 と CD8 はどちらも細胞同士が抗原情報のやり取りをするときに重要な働きをするといわれている。本研究の結果から、CD4 陽性と CD8 陽性細胞数は、SPU コートしたバッグに封入したドナー細胞と共培養したレシピエントリンパ球細胞の方が高い傾向が見られた。さらに、CD4 と CD8 の両者が同時に発現しているリンパ球細胞の数も同様の傾向が見られた。以上のことから、SPU コートによってドナーとレシピエントのリンパ球間の免疫反応を最小限に抑えられているためこれらの細胞数が高く維持されていると考えら

れた。SPU コートが移植時における拒絶反応を抑制することが確認され、細胞性免疫や非特異的免疫を抑制した条件で、ドナーとレシピエントの液性免疫の *in vitro* での評価にも有用な手段となることが期待された。

## 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

血液中の微量タンパク質としてインスリンをモデルタンパク質として取り上げ、細胞組織利用医薬品の産生する目的タンパク質の体内動態を質量分析で解析する手法の確立を目指した検討を行った。こためには、血液中に大量に存在するアルブミン等のタンパク質の妨害を防ぐための血液の前処理が必須である。本実験では、始めに血液中の目的タンパク質を質量分析可能なまでに粗精製する方法の検討を行った。モデル目的タンパク質としてはヒトインスリンを用い、はじめに抗体ビーズを使用した目的タンパク質の遠心分離法を試みたが、実用可能なレベルまでの精製は困難と考えられた。

一方抗体を結合させた磁気粒子を用いたところ、1nM のヒトインスリンを含む 100 $\mu$ l の血清から、十分なインスリンのシグナルを得ることができるような諸条件の設定を行うことができた。血中の微量生理活性タンパク質の分析のためには、実用的には 0.1nM レベルのペプチドあるいはタンパク質の測定が必要と考えられることから、さらなる改善の必要がある。今後、現在使用している磁気粒子よりさらに効率的に分離できる可能性のある温度感受性磁性ナノ粒子等も採用し、簡便で実用的な前処理法の確立をめざす予定である。

血液中の微量タンパク質を質量分析するについてのもう一つの課題として、分析の高感

度化が挙げられる。この点では、本研究の実施過程において、非常に興味深い現象を見出した。即ち、MALDI TOF MS において、マトリックス溶液に予めタンパク質を添加することによって、目的タンパク質のシグナルを大きく増強できるという事実である。測定原理から考えると、異種のタンパク質が混在すれば目的タンパク質のシグナルは減弱すると考えるのが自然であるが、実際は測定感度においても、シグナルの強さにおいても、S/N 比においても混在するタンパク質があると大きな改善が得られる場合があることが明らかとなった。特に異種タンパク質としてはトランスフェリンにその顕著な効果が見られた。

さらに興味深いことは、このようなタンパク質のみならず、合成高分子化合物（ポリリジン、ポリアルギニン、PEG 類）にも同様なシグナル増強作用がみられたことであった。タンパク質の場合、シグナル増強のために添加したタンパク質からもシグナルが出るので、目的タンパク質の分析を妨げる場合が少ない。しかし上記合成高分子化合物の中で特に高分子 PEG はそのもの自身から出るシグナルは極めて小さく、タンパク質の MALDI TOF MS において普遍的なシグナル増強物質として使える可能性がある。

このようなシグナル増強のメカニズムについては、MALDI のメカニズムそのものが完全には明らかにされていない現在では、今のところ不明である。しかし以下のようなことが生じていると推測される。マトリックスはレーザーの熱エネルギーを吸収、試料タンパク質にマイルドに受け渡すことによって、試料タンパクを分解することなく気化する役割を持つと考えられているが、トランスフェリン等の高分子はマトリックスと試料タンパク質

の間に入って試料タンパク質の気化を容易にしている可能性がある。すなわちトランスフェリンや PEG 等、親水性の高い高分子化合物をあらかじめ CHCA 溶液に添加しておく、これら高分子はインスリン等の微量タンパクと近接しうる。そのため CHCA がレーザーから受け取った熱エネルギーを高分子化合物が一時的にも吸収することにより、インスリン等の分解を防ぎ、一方気化は促進する結果、シグナルが増強されているとすれば、タンパク質の分子量が大きいほどシグナル増強作用が強いことが理解されやすい。

このような MALDI TOF MS のタンパク質シグナルの増強現象としては、文献的にはマトリックスの溶媒として揮発性のアセトンを用いた場合、マトリックスにあらかじめ糖など別種の低分子化合物を添加した場合、ターゲットプレートとしてテフロンを用いた場合などが報告されている。これらの条件ではマトリックスが微細な結晶を形成してシグナルを増強するとされているが、結晶の微細化だけで、本実験でみられた添加したタンパク質の分子量により増強作用が違ったことは説明できない。

現在のところシグナル増強のメカニズムは不明であるが、今回見出したシグナル増強の現象は分子量 3000 以上のペプチド、タンパク質に対してより顕著である。したがって、それ自身はシグナルを出さずに目的タンパク質のシグナル増強を生じる高分子化合物の最適化を行うことにより、MALDI TOF MS を用いたタンパク質の分析すべてに応用が可能な高感度化技術が出来上がるものと考えられる。

#### 8. 血管内皮前駆細胞の特性指標の解析に関

#### する研究

本研究では、末梢血あるいは臍帯血の血液幹細胞を分離し、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、血液幹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。これまでの研究成果から、末梢血においても臍帯血においても AC133 陽性細胞から血管内皮細胞に分化する過程で CD31 が比較的初期に発現してくることを明らかにした。さらに、この培養後 1 週間ほどで出現してくる CD31 強陽性細胞が血管内皮前駆細胞の特性を持っているとの仮説を立てて検討を行っている。

本年度は、末梢血 AC133 陽性細胞から誘導した CD31 強陽性細胞の分化誘導過程におけるコネクシン (Cx) の発現変化を解析した。特に、ギャップ結合を構成するタンパク質 Cx のなかで血管内皮細胞に発現するとされている Cx37、Cx40、Cx43 の発現変化を詳細に検討した。その結果、Cx37 及び Cx40 は FN 上で分化誘導直後にすでに発現しており、その後、Cx37 は培養時間が経過するとともに発現が低下することが明らかになった。一方、Cx43 は分化誘導直後は発現が認められないが、培養後 1 週間で発現してくることが明らかになった(図 42、43)。培養後 1 週間の細胞では、Cx40 と Cx43 が発現している点は、ヒト臍帯血管内皮細胞とも一致している(図 44)。これらの結果より、培養初期の Cx37 と Cx40 が発現している細胞は血管内皮前駆細胞としての性質をもち、1 週間目の細胞は分化した血管内皮の性質を示しているものと想定された。Cx37 と Cx40 をダブルで欠損したマウスが血管障害のため生後 2 日で致死する Alexander らの報告 (Develop. Biol. 2002) もあり、Cx37 と Cx40