

図41. ファイブロネクチン上で培養した末梢血由来血管内皮前駆細胞のKDR発現の変化

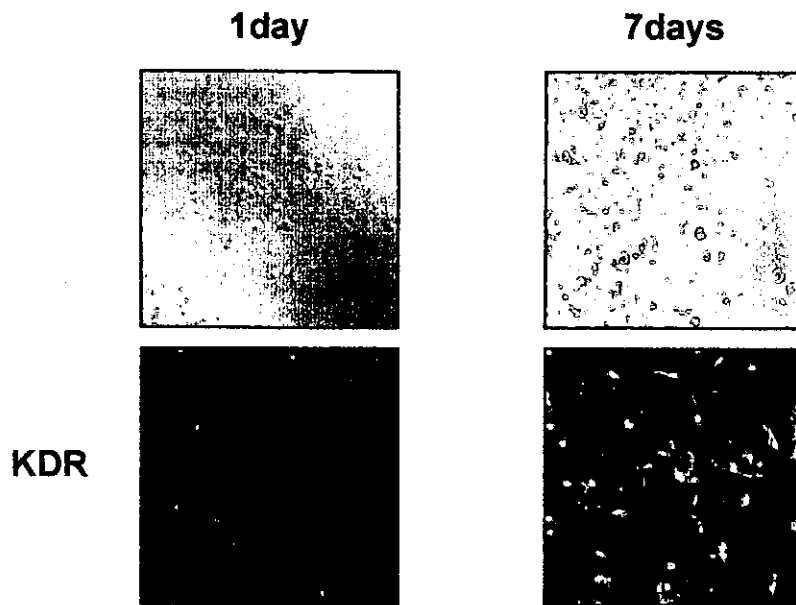
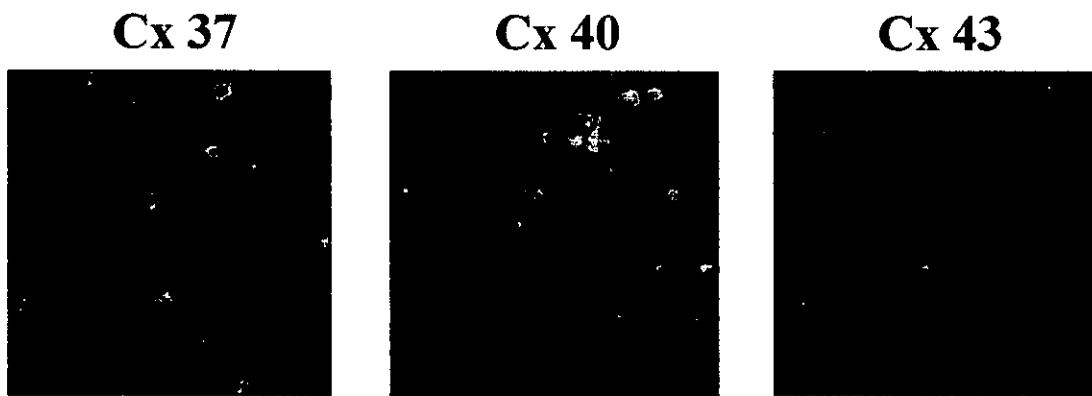


図42. 末梢血由来血管内皮前駆細胞の培養1日目におけるCx37、Cx40、Cx43の発現

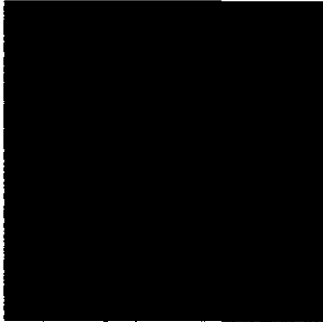
免疫染色 (1day):



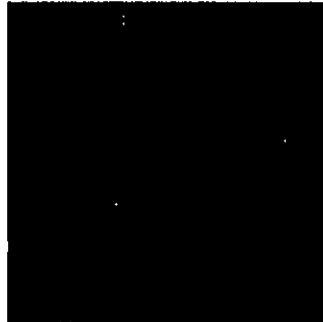
**図43. 末梢血由来血管内皮前駆細胞から分化した  
内皮細胞のCx37、Cx40、Cx43の発現**

**免疫染色 (7day):**

**Cx 37**



**Cx 40**



**Cx 43**



**図44. ヒト臍帯内皮細胞における  
Cx37、Cx40、Cx43の発現**

**免疫染色 :**

**Cx 37**



**Cx 40**



**Cx 43**



図45. 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

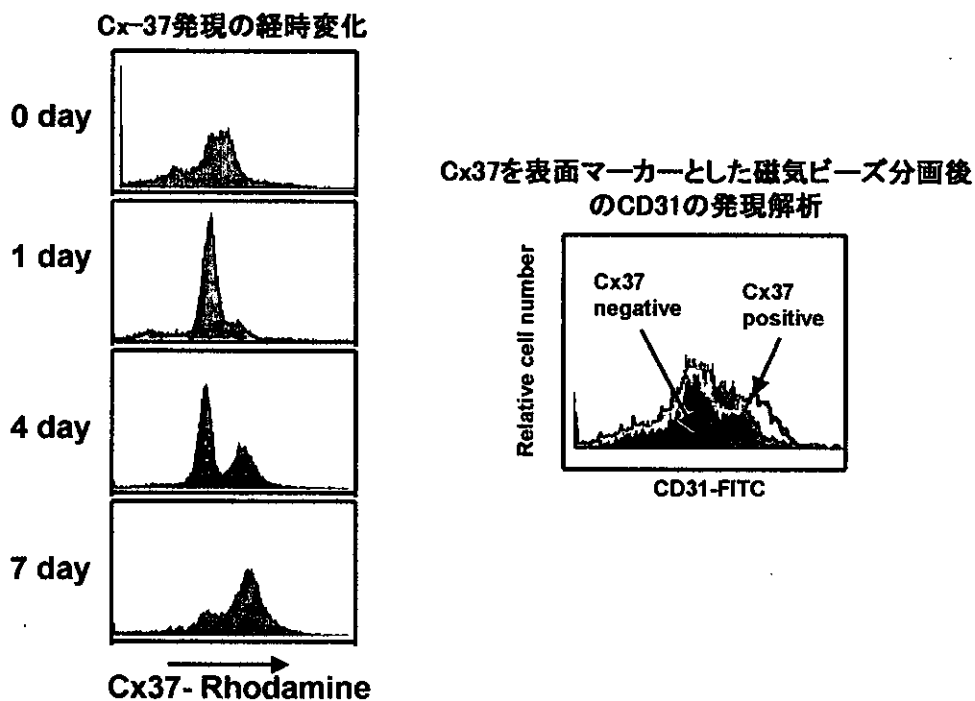


図46. 臍帯血及び末梢血のAC133及びCD34陽性  
細胞の含有率の比較

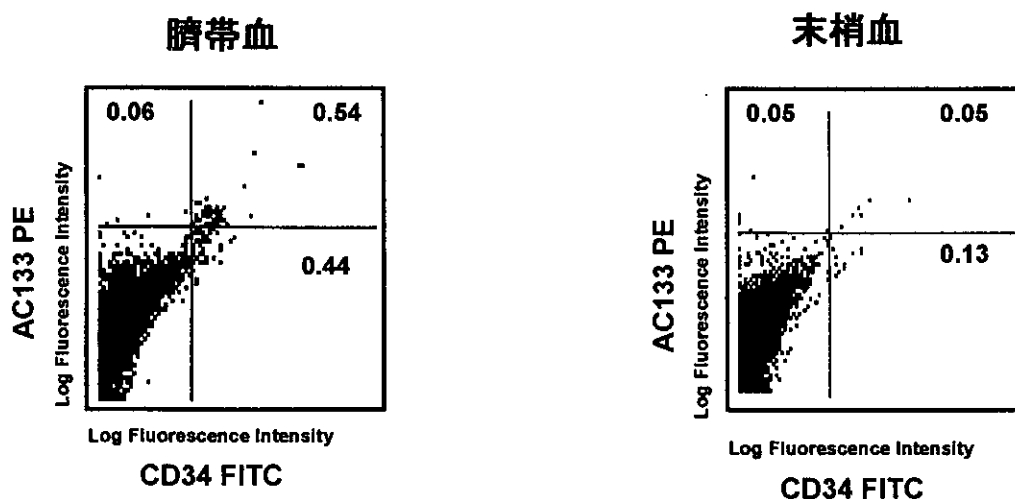


図47. 臍帯血及び末梢血由来AC133陽性細胞の増殖の比較

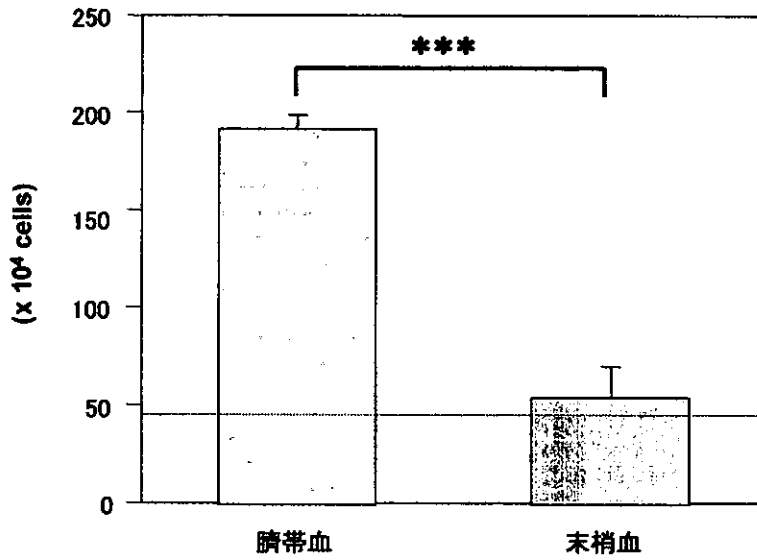


図48. 臍帯血AC133陽性細胞における6日間培養後のCD31強陽性細胞の出現

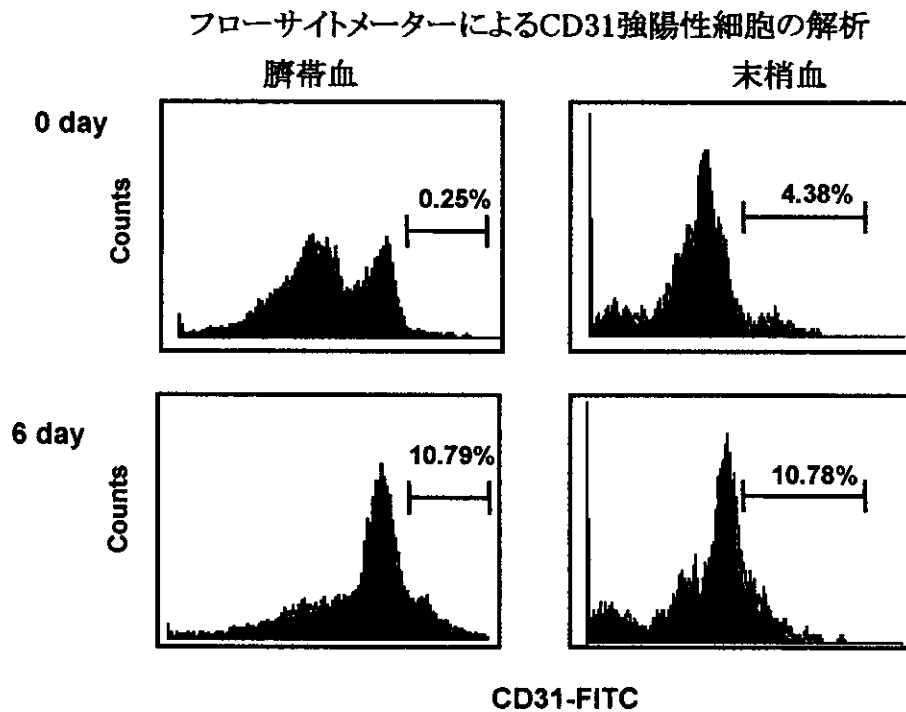


図49. 臍帯血AC133陽性細胞由来CD31強陽性細胞及び陽性細胞の  
 ファイブロネクチン上での血管内皮細胞への分化

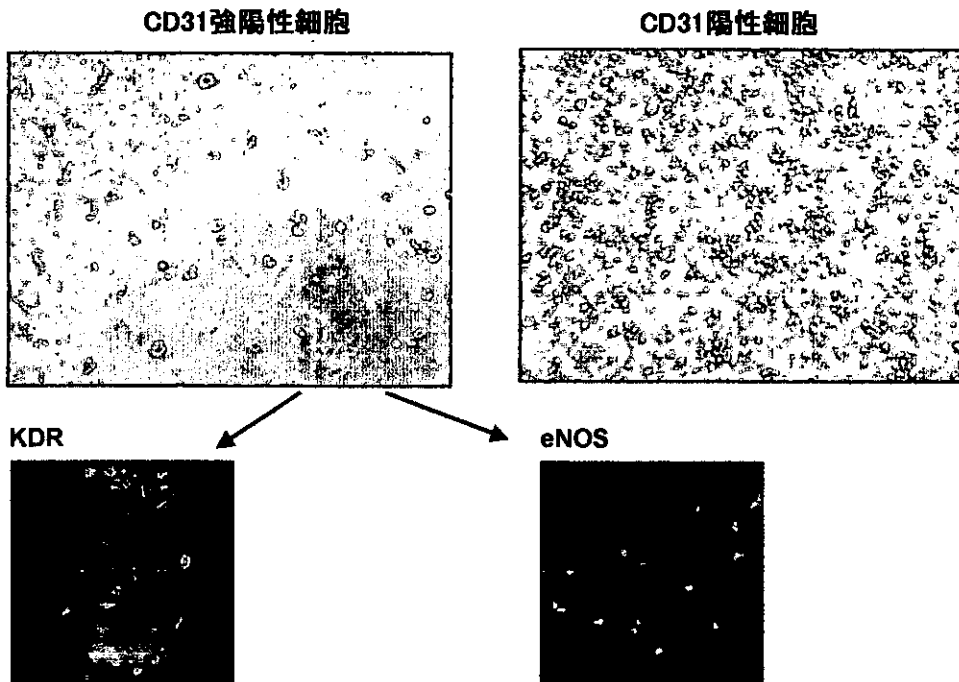


図50. 臍帯血AC133陽性細胞におけるLox-1発現の経時変化  
 とLox-1を表面マーカーとした磁気ビーズ分画後のCD31の発現解析

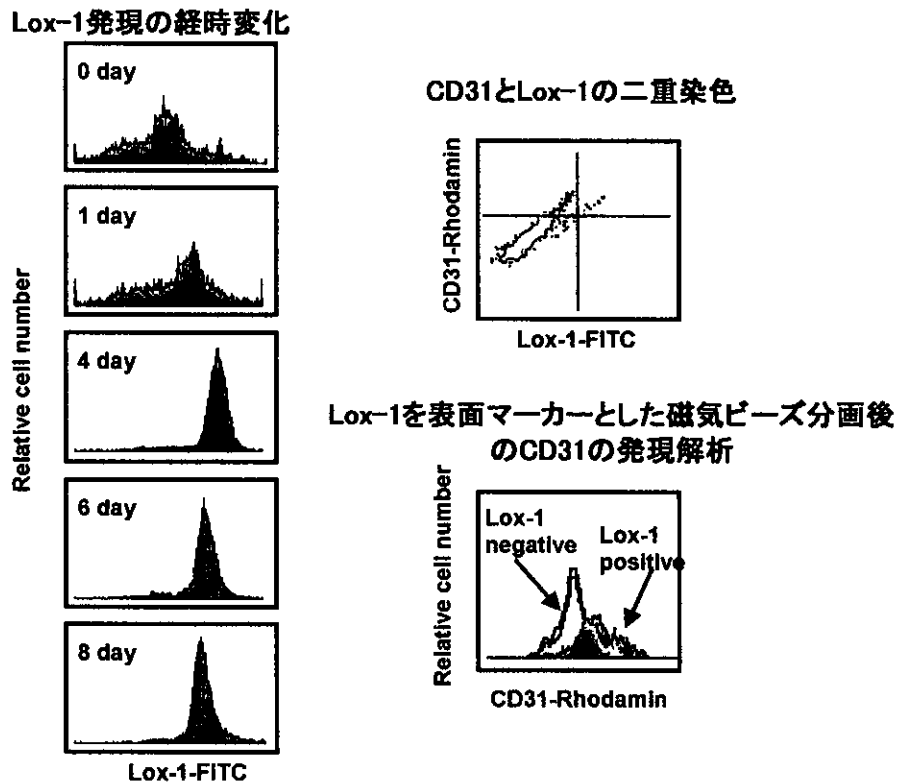
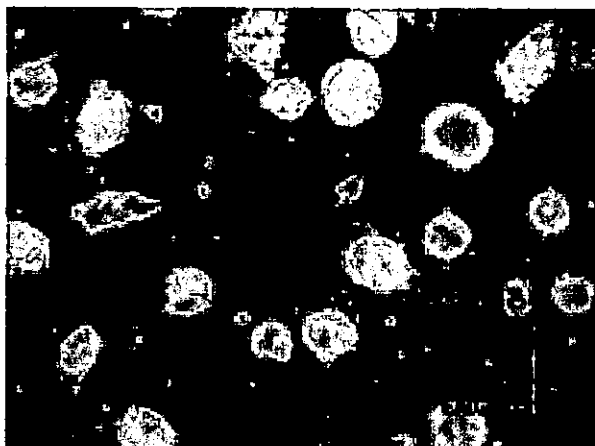


図51 P19細胞をレチノイン酸存在下細菌用プレートで1日間培養し、凝集状態の細胞

Control (DMSO 0.1%)



Retinoic acid (1  $\mu$ M)

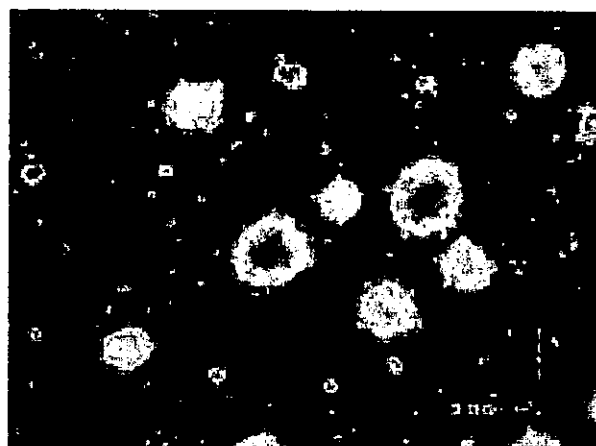


図52 P19細胞をレチノイン酸存在下4日間培養し、分化培地に移し3日目の分化した細胞

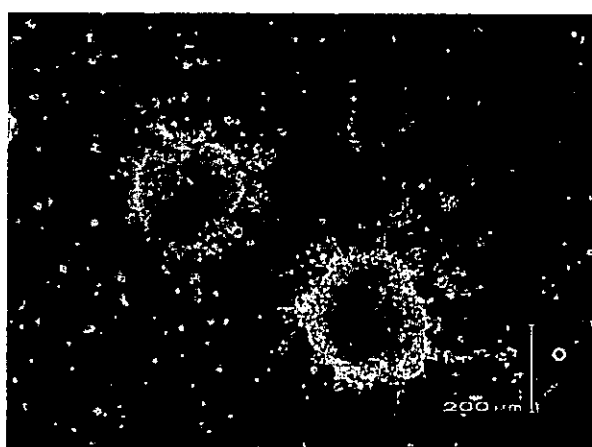
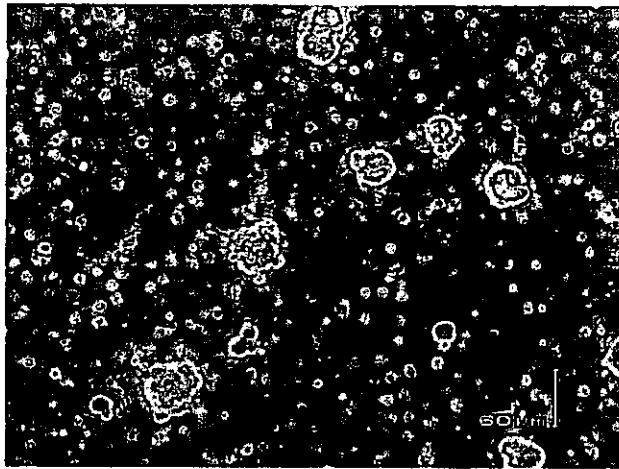
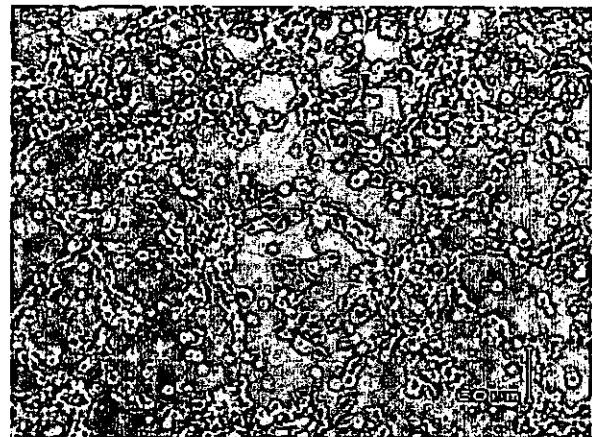
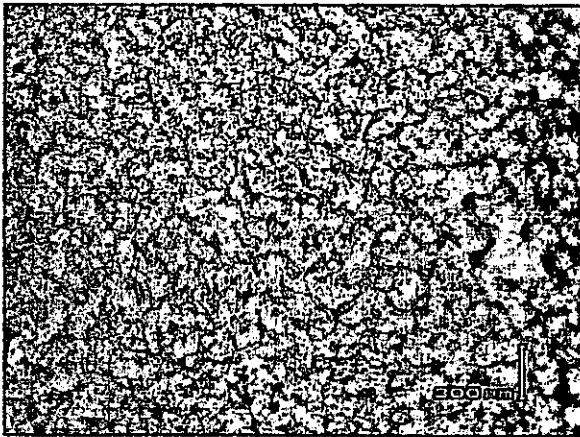


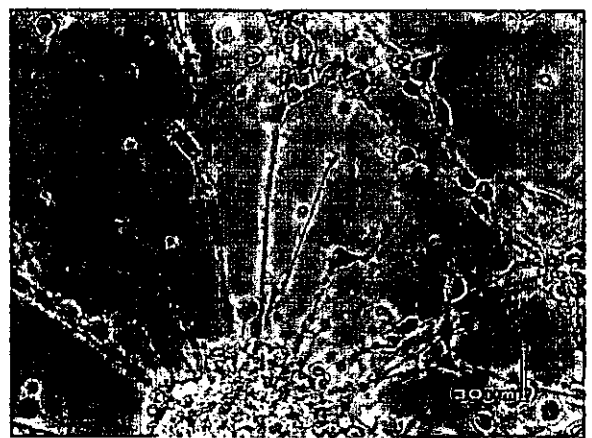
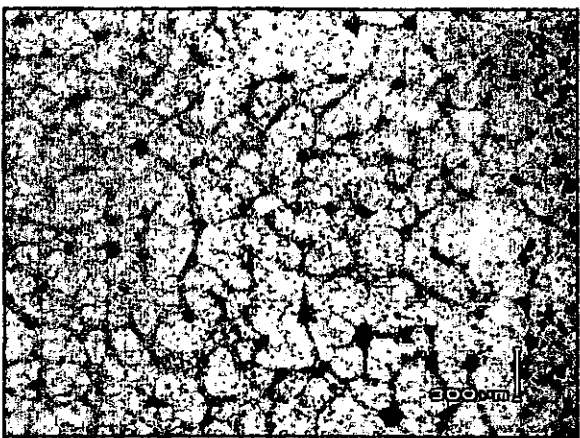
図53 分化誘導後細胞をトリプシンでばらし分化培地で培養した細胞



Control (レチノイン酸を加えないで培養したもの)



1日目 細胞が集まりはじめ、神経突起を伸ばす



3日目 密にネットワークを形成

図54 P19細胞はレチノイン酸でニューロンタイプの神経細胞に分化する

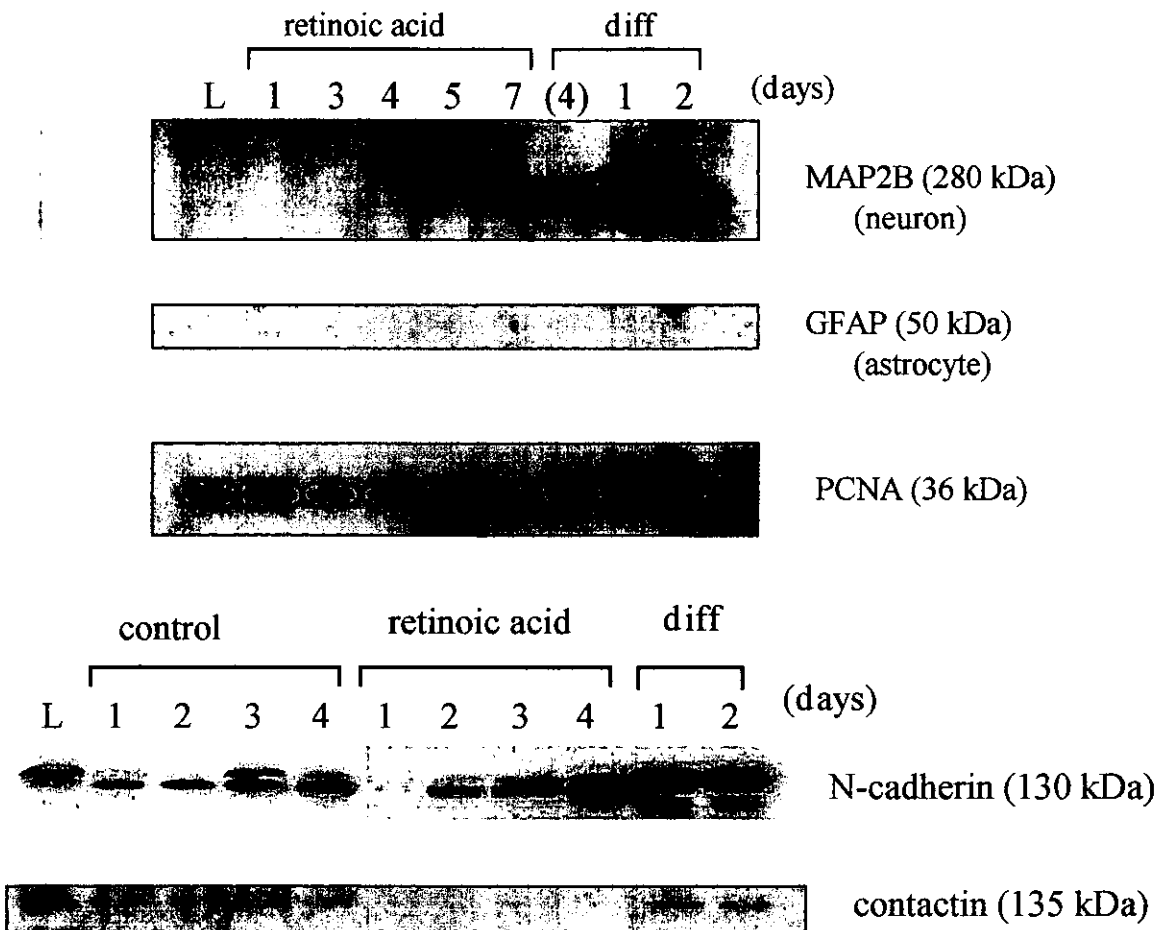


図55 P19細胞の分化誘導時のDNA複製関連因子の挙動

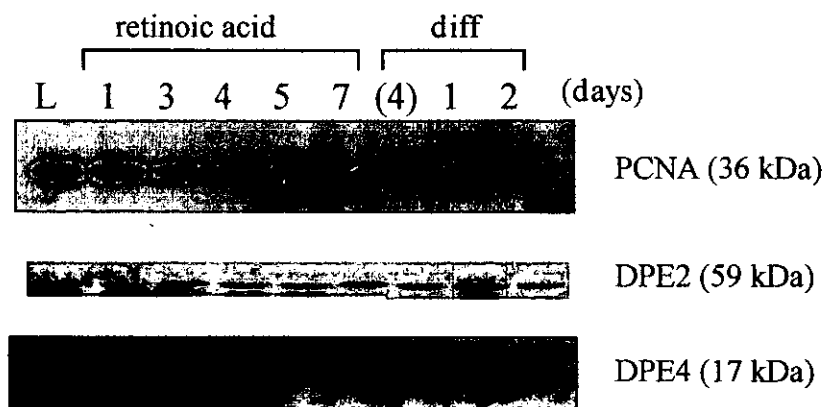




図56 P19細胞の分化誘導時の増殖関連因子の挙動

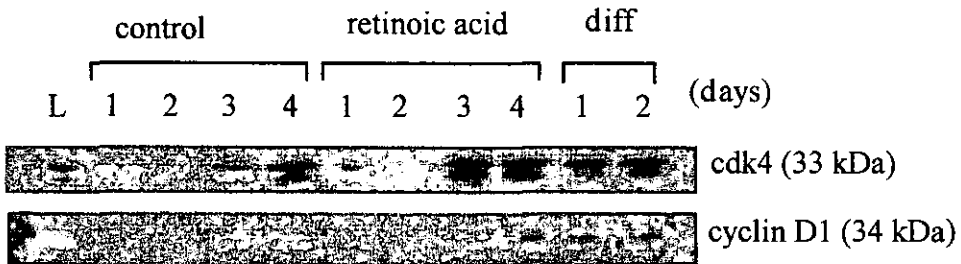
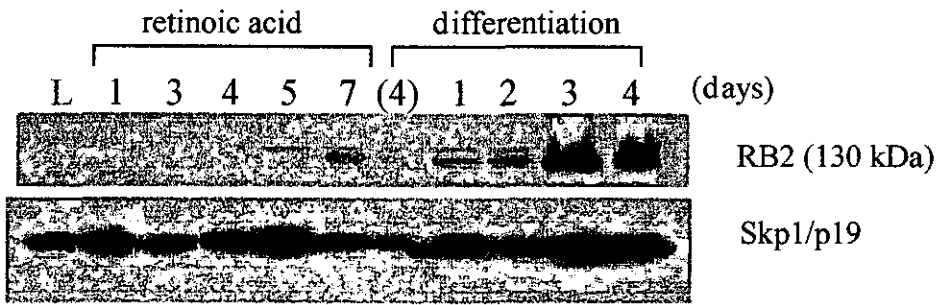
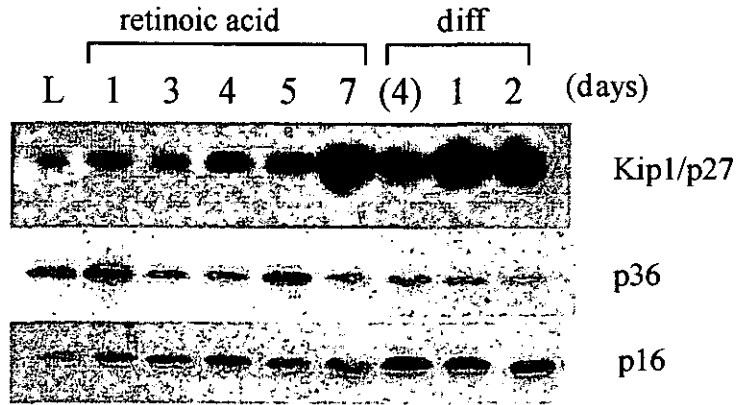


図57 P19細胞の神経細胞分化誘導時のプロテインプロファイル  
 (A --- control, B --- + retinoic acid)

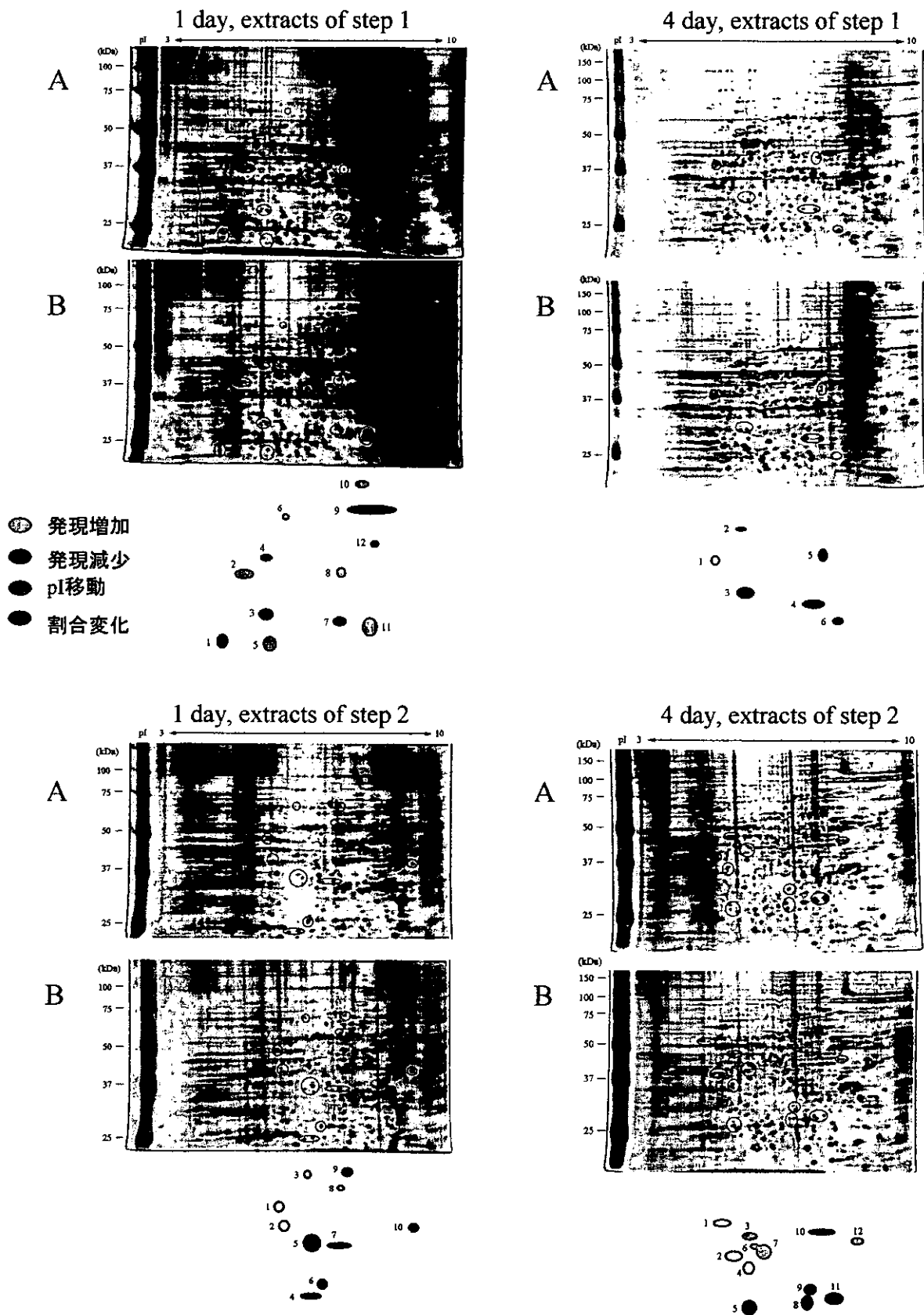


図58 ミオシン軽鎖の発現

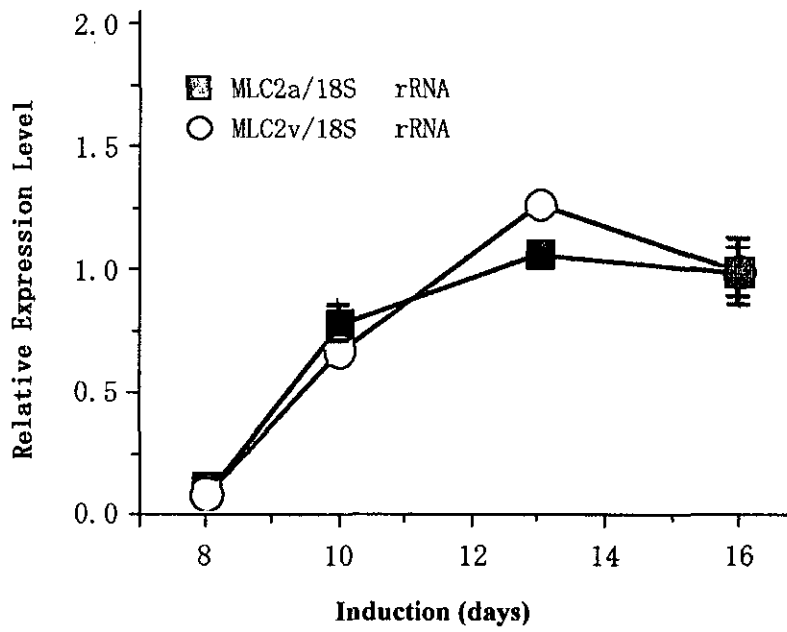
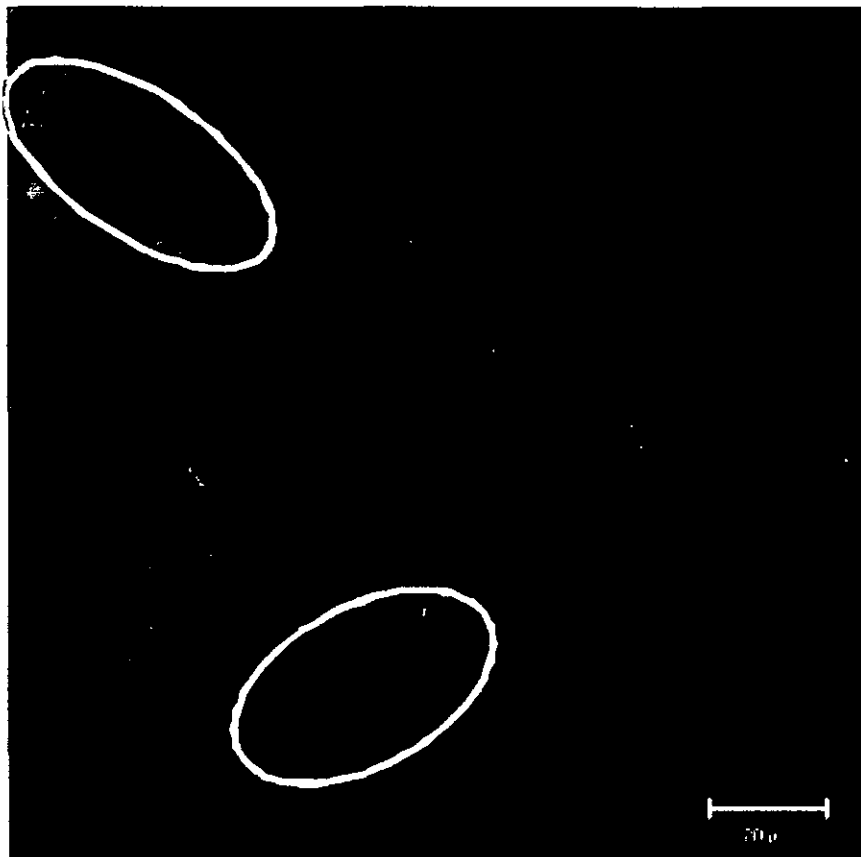


図59 心筋細胞分化後のP19 CL6細胞



ファロイジン染色(免疫蛍光抗体法)

表14 収縮タンパク質のアイソフォームからみた心筋細胞の表現型

発達段階	心房筋		心室筋		
	胎仔型	成獣型	胎仔型	新生仔型	成獣型
ミオシン重鎖	$\beta < \alpha$	$\alpha$	$\beta > \alpha$	$\beta < \alpha$	$\alpha$
平滑筋型 $\alpha$ アクチン	++	-	++	+	-
ミオシン軽鎖	2a	2a	$2a < 2v$	2v	2v
心房性ナトリウム利尿ペプチド	++	++	+	-	-
サルコリピン	+	++	-	-	-

図60 心房筋・心室筋の指標の定量

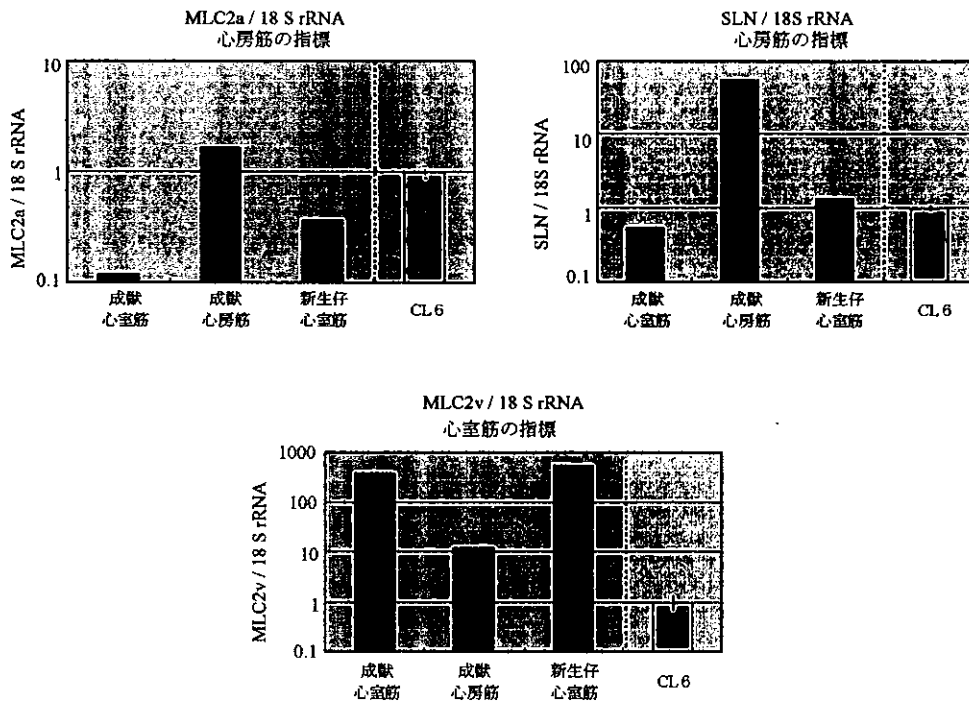


図61 CL6細胞は心房筋型発現をする

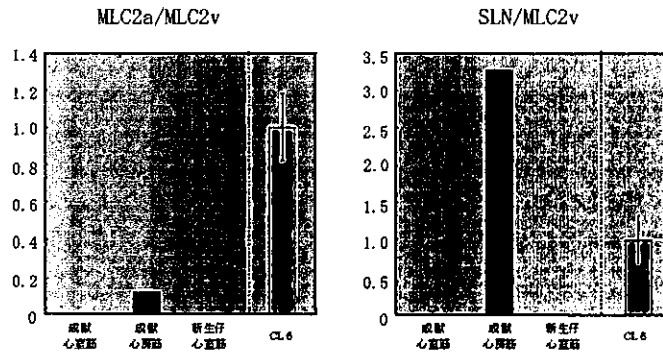


図62 幼若な心筋／成熟な心筋

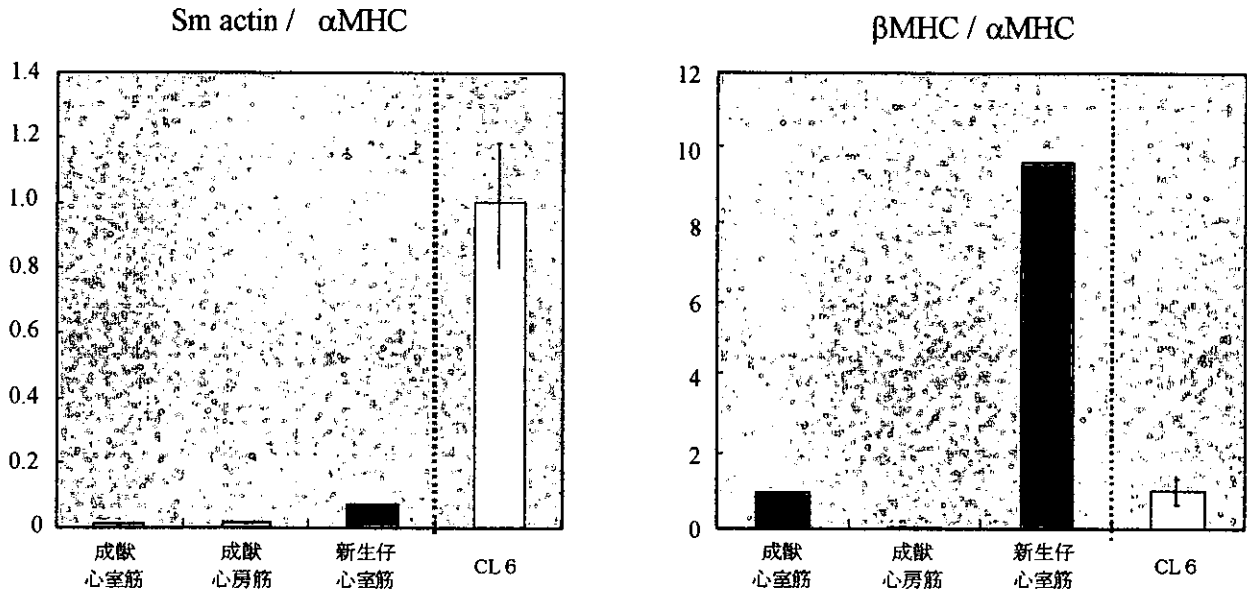
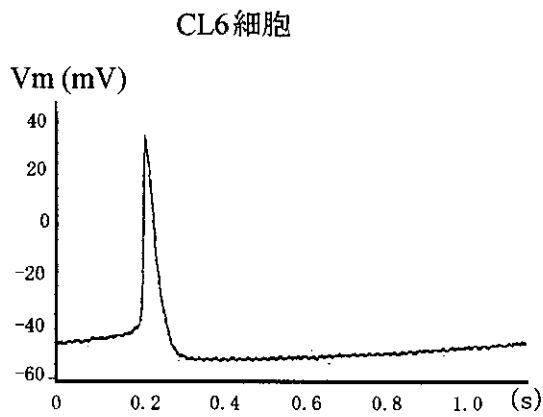
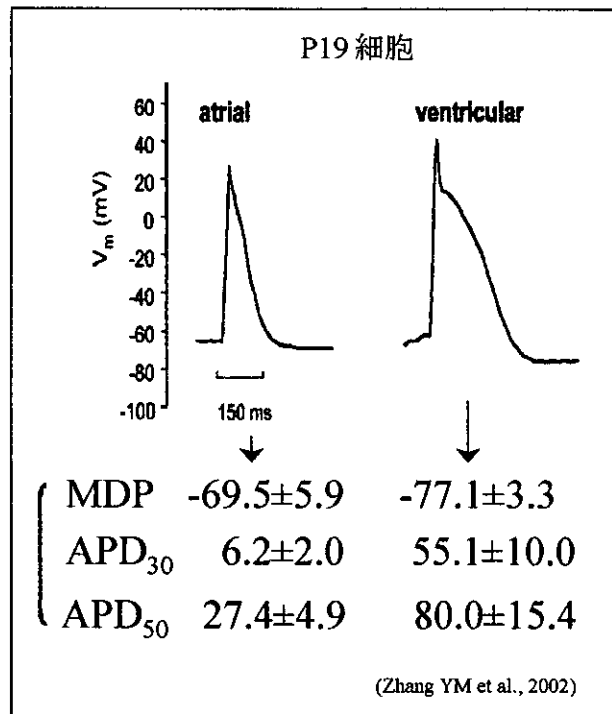


図63 活動電位の測定



$\left\{ \begin{array}{l} \text{MDP} \quad -58.9 \pm 2.0 \text{ mV} \\ \text{APD}_{30} \quad 13.6 \pm 1.6 \text{ ms} \\ \text{APD}_{50} \quad 23.0 \pm 1.2 \text{ ms} \end{array} \right.$

**P19 心房筋型  
と類似性高い**



心房筋型

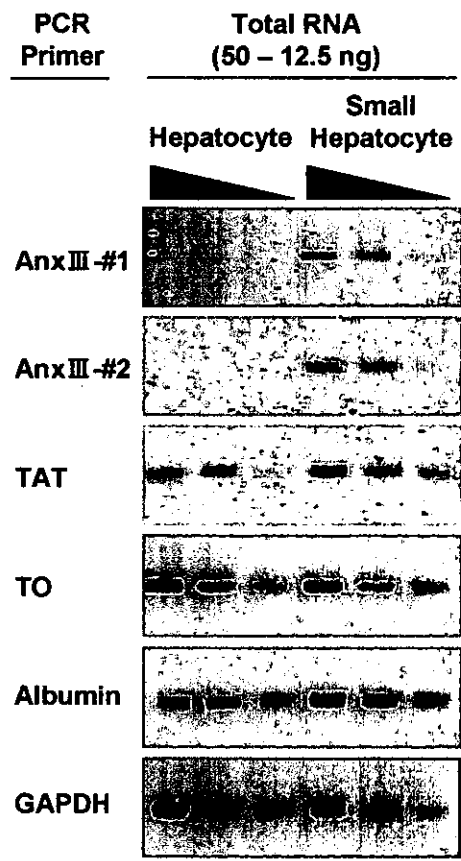


図 6 4. 成熟肝細胞及び小型肝細胞における RT-PCR を用いた各種 mRNA レベルの検討

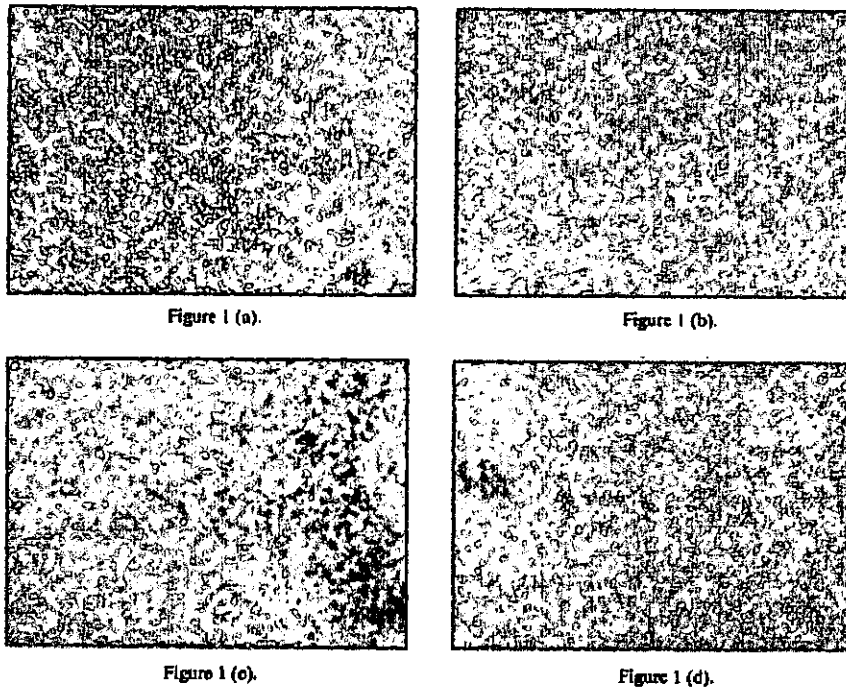


図65 ヒト軟骨細胞の形態に及ぼす液性因子等の影響

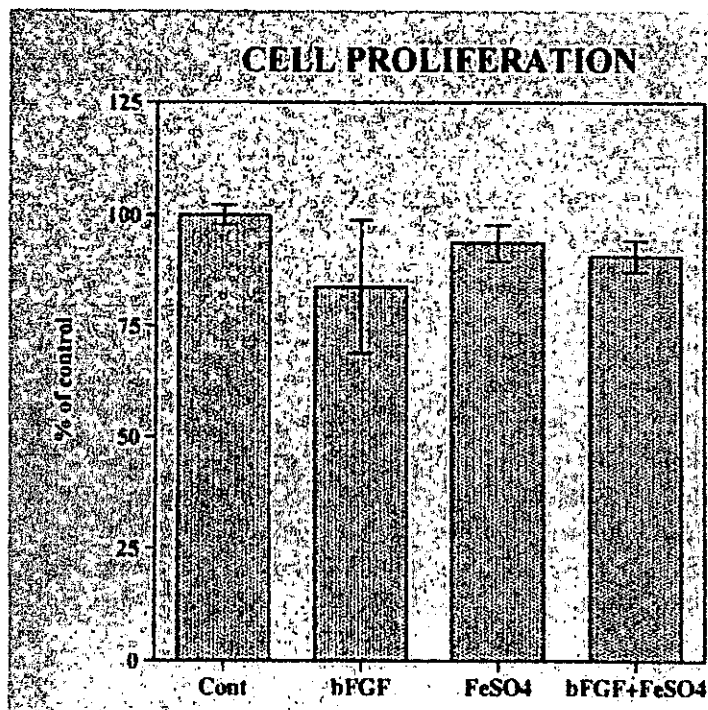


図66 ヒト軟骨細胞の増殖に及ぼす液性因子等の影響について

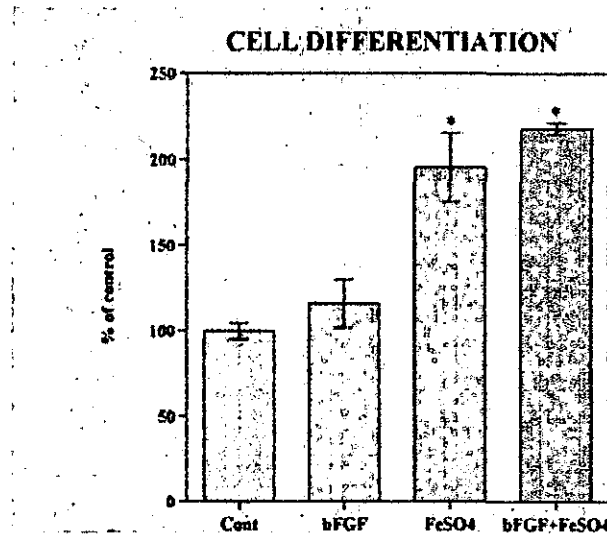


図67 ヒト軟骨細胞の分化に及ぼす液性因子等の影響について

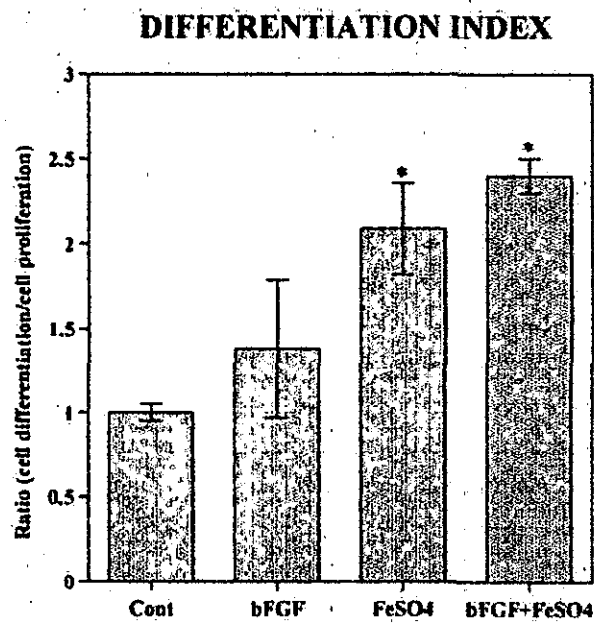


図68 細胞の分化index



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）  
分担研究報告書

細胞・組織加工医薬品等の安全性等に関する研究

分担研究者 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部長

【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基づいて抗ウイルス抗体を添加して濃縮を行うことによりさらなる高感度化につながる事が明らかになった。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な条件を明らかにした。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。しかし、細胞特性解析法としては、定量性や個々のサイトカインの検出感度等を評価等さらなる改良が必要であることも明らかになった。(3) 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。

研究協力者

内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所  
室長

押澤 正 国立医薬品食品衛生研究所  
主任研究官

豊田淑江 国立医薬品食品衛生研究所  
支援研究員

岩田明子 埼玉県赤十字血液センター  
研究員

佐藤功栄 埼玉県赤十字血液センター  
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

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、様々な形での細胞・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。

本研究では、細胞・組織加工医薬品等の品質、安全性等を確保するために、1) ウイルス等の感染性危険因子を排除するための基盤技術の開発や評価方法に関する研究、2) 細胞由来タンパク質プロフィールを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発、3) 幹細胞や前駆細胞を素材とする細胞・組織加工医薬品等の製造過程における品質・安全性確保技術や製品の評価方法に関する研究などを行う。

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、解析結果に基づく本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) 細胞由来タンパク質プロフィー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。3) 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て、その分化過程で出現する血管内皮前駆細胞の特性指標のさらなる検討を行い、コネキシン (Cx) や血管内皮特異的酸化 LDL レセプター、Lox-1 の特性指標としての有用性を明らかにした。

## 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 DNA ウイルスゲノムの検出は、表 1 のプライマーの組み合わせを用いて 94 $^{\circ}$ C、30 秒; 56 $^{\circ}$ C、45 秒; 72 $^{\circ}$ C、60 秒を 35 サイクルする PCR 反応で行った。RNA ウイルスの場合には、抽出したウイルスゲノム全量を TE 液に溶解後、トリウイルス逆転写酵素を用いて 42 $^{\circ}$ C、45 分間の cDNA 合成を行った。合成した cDNA を鋳型として上記と同様の PCR 反応を行い、増幅した。増幅産物は、アガロース電気泳動を行い、エチジウムブロミドないしはサイバークリーンによる染色後、目的バンドを確認した。抽出したウイルスゲノムを定量するためにリ

アルタイムPCR及びリアルタイムRT-PCR反応を行った。用いたプライマーとプローブのセットは表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、サイバークリーンを用いて定量した。

### 1. 2PEI 磁気ビーズで濃縮した分画のイムノグロブリンの解析

EI 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を行った。

### 2. 細胞由来生理活性タンパク質の解析

#### 2. 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得、さらに抗ヒト AC133 磁気ビーズを用いて AC133 陽性細胞を分離し、フィブリネクチンコート上、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。

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。

### 2. 2 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。

### 3. 血管内皮前駆細胞の特性解析に関する研究

#### 3. 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、抗CD31抗体-FITC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。

### 3. 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 に浮遊させファイブロネクチン(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、抗IgG抗体-FITC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。

### 3. 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(-)で洗った。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、抗IgG抗体-FITCあるいは抗IgG抗体-ローダミンを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した際は、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、各分画の細胞に抗CD31抗体-FITCと反応させ、洗浄後、フローサイトメーターにて解析した。

### 3. 4 末梢血及び臍帯血単核細胞の AC133 と CD34 の二重染色

末梢血パuffy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、2mMEDTAを含むPBS(-)(分離バッファー)に浮遊させ、洗浄後再び200µl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。

## 4. 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. 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