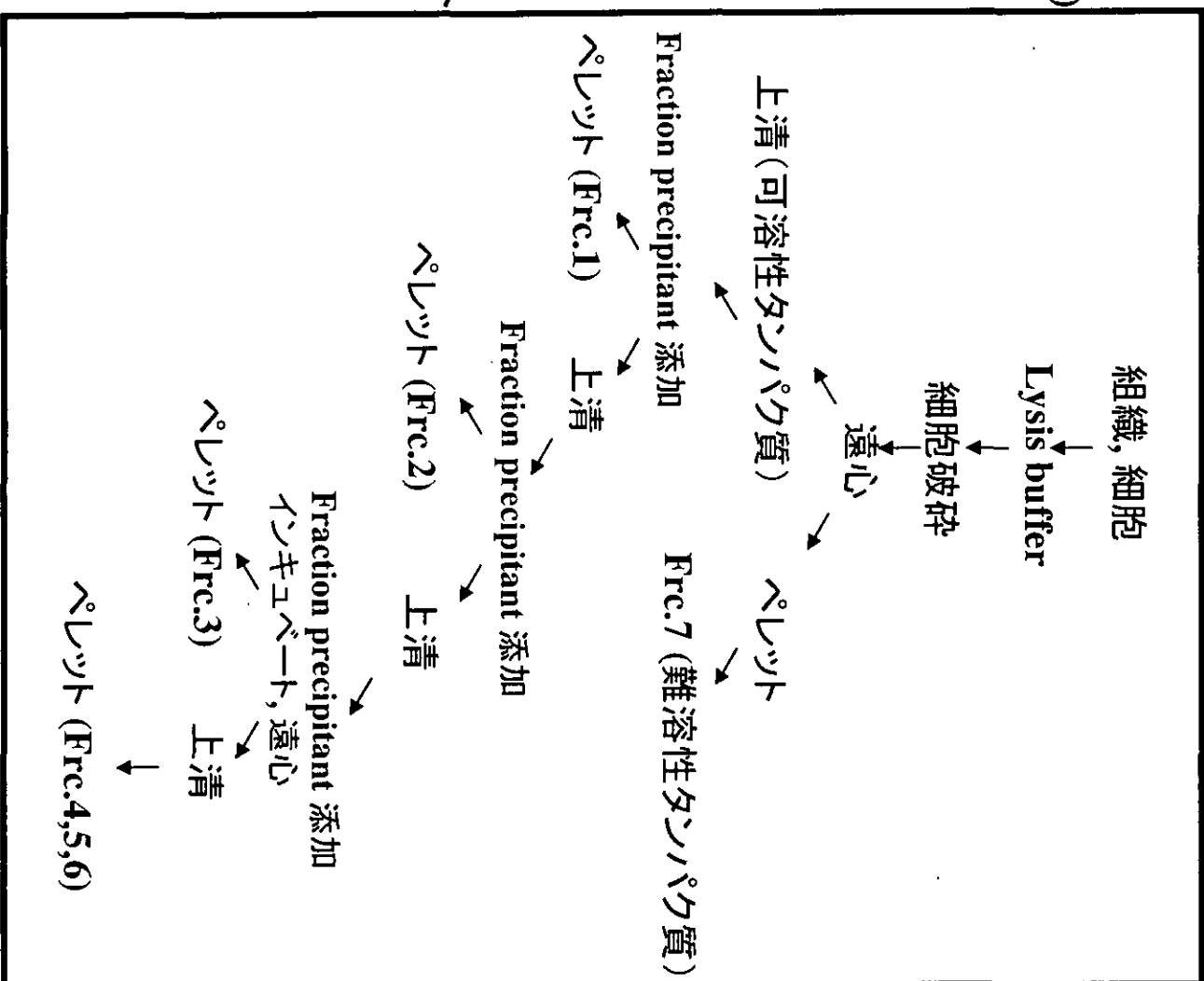
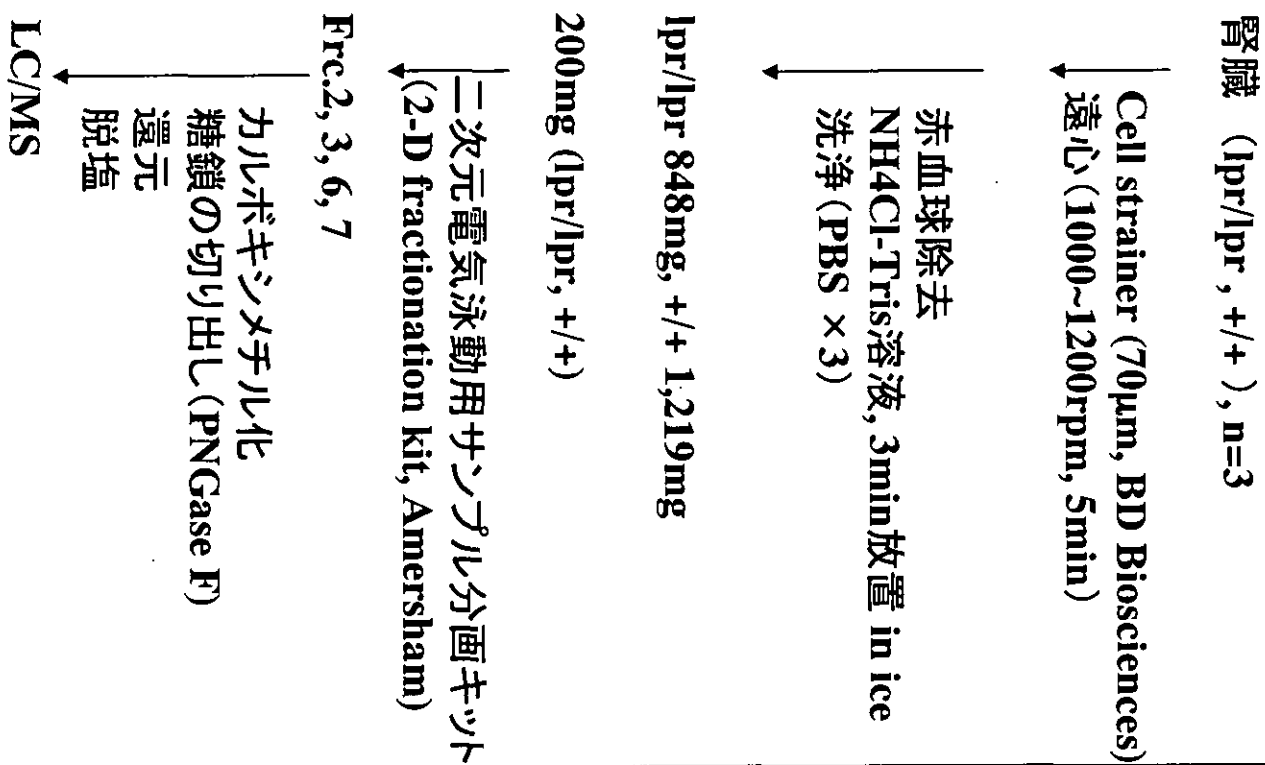


Fig. 9 腎臓由来細胞分画プロトコール



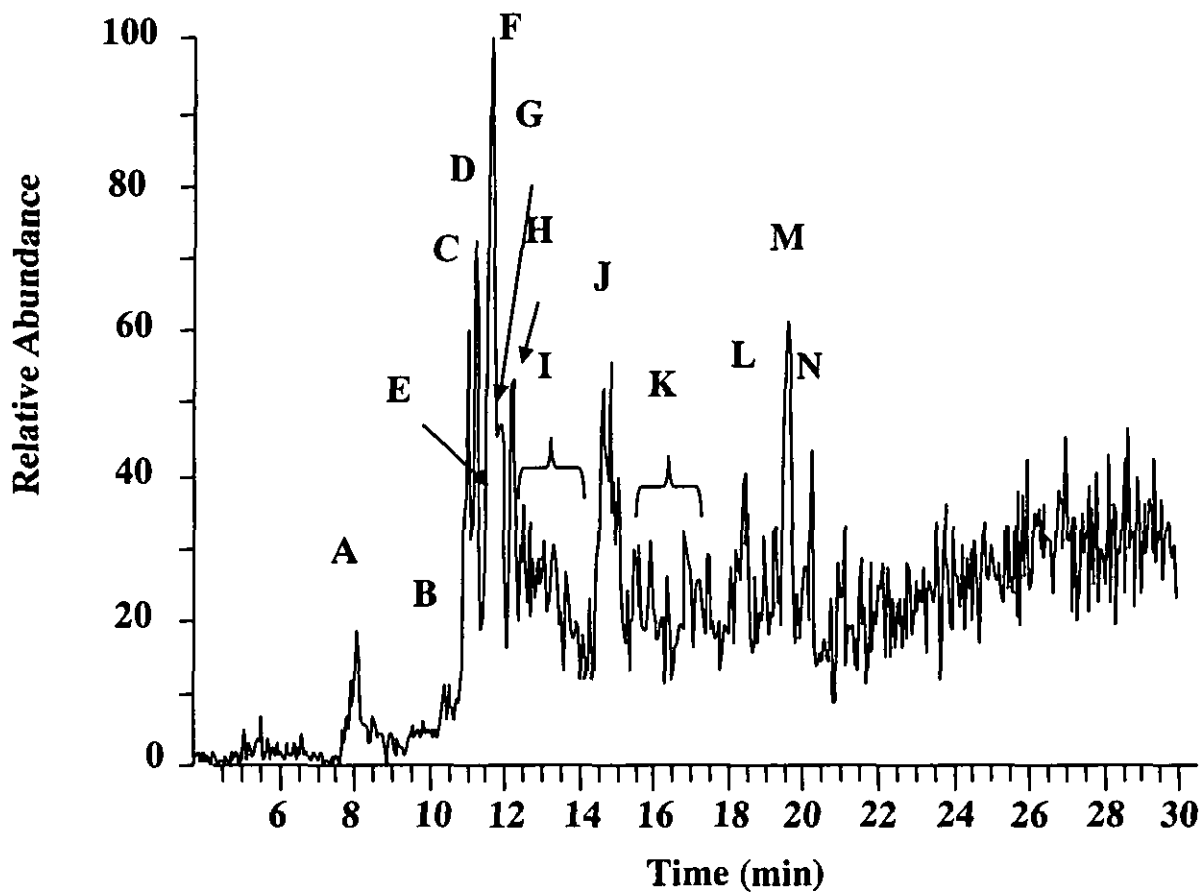


Fig. 10 N-linked oligosaccharide profile of glycoproteins in a mouse kidney

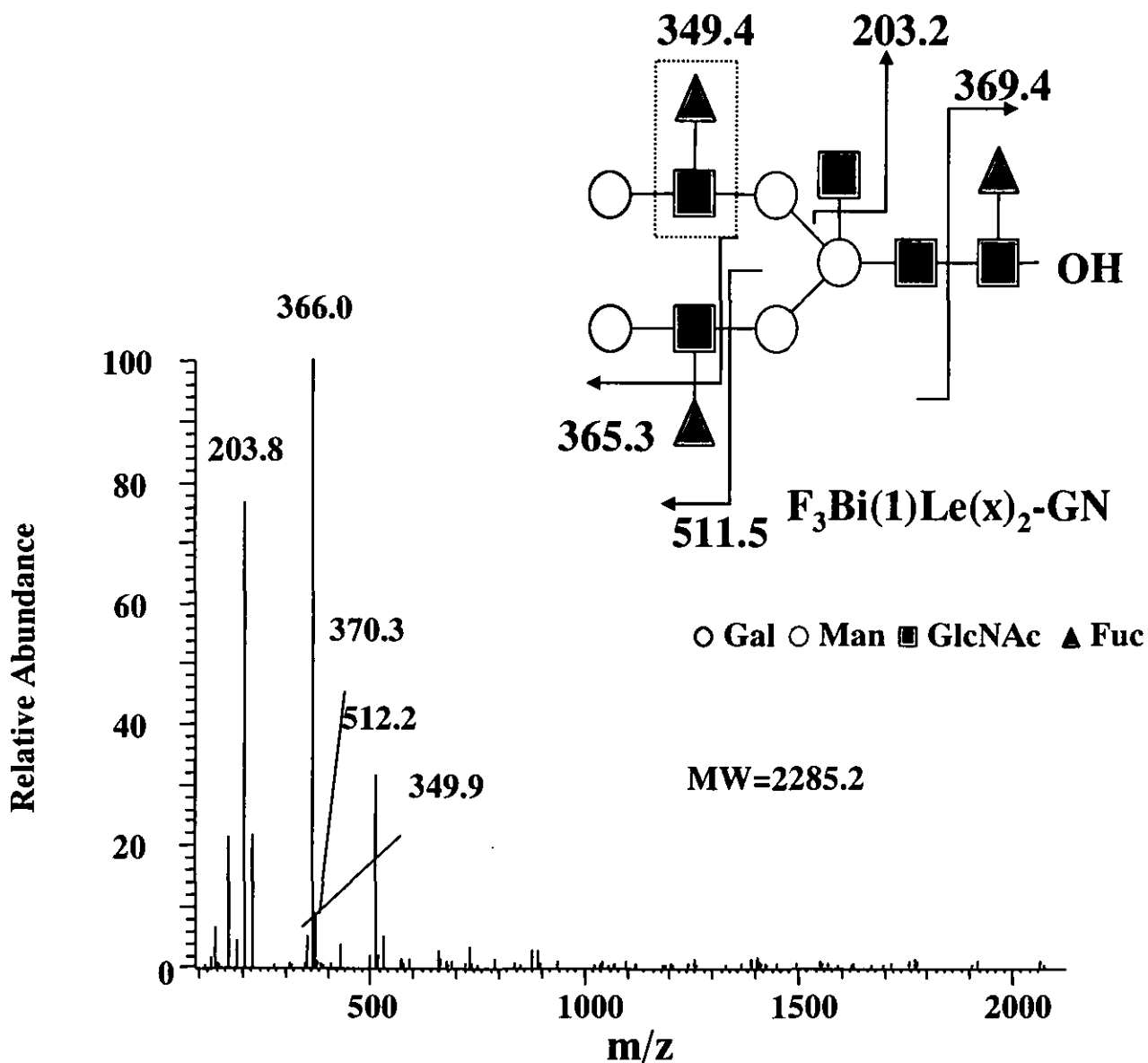
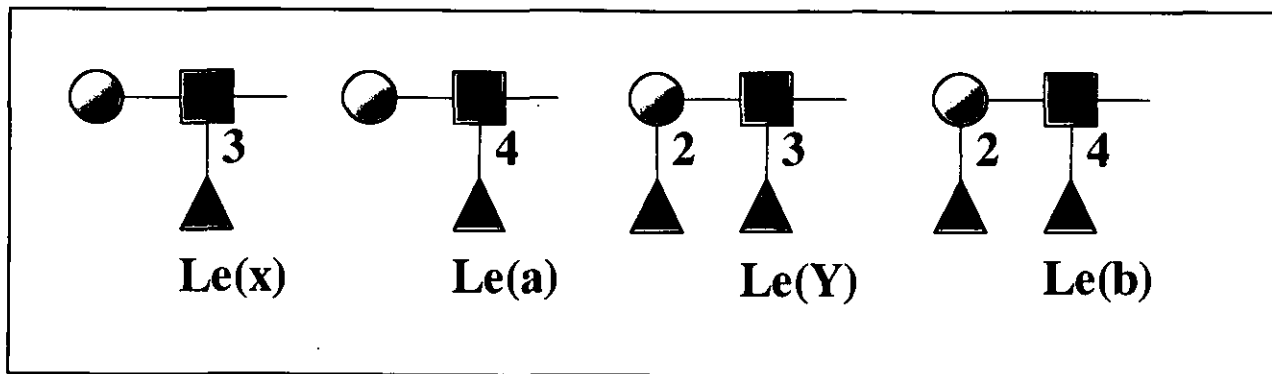


Fig. 11 Product ion spectrum of peak F
Peak F: $F_3Bi(1)Le(x)_2-GN$

Table 3. Carbohydrate compositions and theoretical and calculated masses

Peak No.	Carbohydrate composition	Deduced carbohydrate structure	Theoretical mass	Calculated mass	Charge state	Observed m/z	
A	A1	[Fuc] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅	Bi(2)	1830.7	1831.2	2-	914.6
		[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ Ac	FBi(1) Ac	1831.7			
A2		[Fuc] ₂ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅	F ₂ Bi(1)Le(x) ₁ -GN	2139.0	2139.0	2-	1068.5
		[Fuc] ₂ [Hex] ₆ [HexNAc] ₄ Ac	F ₂ Hybrid(1) Ac	2140.0			
B	B1	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	Bi(1)	1643.5	1643.6	2-	820.8
C	C1	[Hex] ₈ [HexNAc] ₂	Man ₈ GlcNAc ₂	1723.6	1723.6	2-	860.8
					1724.0	1-	1723.0
	C2	[Hex] ₇ [HexNAc] ₂	Man ₇ GlcNAc ₂	1561.4	1561.8	2-	779.9
D	D1						941.9
E	E1	[Hex] ₆ [HexNAc] ₂	Man ₆ GlcNAc ₂	1399.3	1398.7	1-	1397.7
		[Fuc] ₂ Hex ₄ [HexNAc] ₅	F ₂ Bi(2)Le(x)-GN	1976.9	1977.0	2-	987.5
E2		[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁ Ac	Bi(1)NA Ac	1976.7	2122.9	2-	1060.6
		[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁ Ac	FBi(1)NA Ac	2122.9			
F	F1	[Fuc] ₃ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅	F ₃ Bi(1)Le(x) ₂ -GN	2285.2	2285.6	2-	1141.7
		[Fuc] ₂ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅	F ₂ Bi(2) Le(x)-GN	1976.9	1977.6	2-	987.8
G	G1	[Fuc] ₂ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ Ac	Bi(1)NA Ac	1977.8			
H	H1	[Hex] ₆ [HexNAc] ₂	Man ₆ GlcNAc ₂	1399.3	1399.4	1-	1398.4
		[Hex] ₇ [HexNAc] ₂	Man ₇ GlcNAc ₂	1561.4	1562.2	2-	780.1
	H3						728.9
	H4						1023.1
I	I1	[Fuc] ₂ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅	F ₂ Bi(1)Le(x) ₁ -GN	2139.0	2139.4	2-	1068.7
		[Fuc] ₂ [Hex] ₆ [HexNAc] ₄ Ac	F ₂ Hybrid(1) Ac	2140.0			
I2		[Fuc] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅	Bi(2)	1830.7	1830.8	2-	914.4
		[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ Ac	FBi(1) Ac	1831.7			
I3		[Fuc] ₂ [Hex] ₇ [HexNAc] ₄	F ₂ Hybrid(2)	2260.1	2258.2	2-	1128.1
		[Hex] ₇ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	Hybrid(2)NA	2259.0			
I4		[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	FBi(1)	1789.7	1791.0	2-	894.5
		[Fuc] ₂ [Hex] ₅ [HexNAc] ₃	F ₂ Hybrid(3)	1732.6	1733.0	2-	865.5
I5		[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₅	FBi(1)-GN	1992.9	1993.6	2-	995.8
		[Fuc] ₁ [Hex] ₆ [HexNAc] ₃	Hybrid(3)	1748.6	1748.6	2-	873.3
							1324.5
J	J1	[Fuc] ₃ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	F ₃ Bi(1)Le(x) ₂	2082.0	2082.0	2-	1040.0
		[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁ Ac	FBi(1)NA Ac	2122.9	2123.0	2-	1060.5
J2		[Fuc] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [NeuNAc] ₁ Ac	FBi(2)NA Ac	2163.9	2164.6	2-	1081.3
		[Hex] ₅ [HexNAc] ₂	Man ₅ GlcNAc ₂	1237.1	1237.3	1-	1236.3
J3		[Fuc] ₃ [Hex] ₄ [HexNAc] ₄	F ₃ Bi(2)Le(x) ₂	1919.8	1919.8	2-	958.9
		[Fuc] ₁ [Hex] ₇ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	FHybrid(2)NA	2405.2	2404.8	2-	1201.4
K	K1	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	Bi(1)NA	1934.7	1935.2	2-	966.6
		[Fuc] ₁ [Hex] ₃ [HexNAc] ₂	FCore	1059.0	1059.0	1-	1058.0
K2		[Fuc] ₁ [Hex] ₇ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	FHybrid(2)NA	2405.2	2405.2	2-	1201.6
		[Fuc] ₃ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	F ₃ Bi(1)Le(x) ₂ NA	2373.2	2374.5	3-	790.5
K3		[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	FBi(1)NA ₂	2372.1	2374.0	2-	1186.0
		[Hex] ₇ [HexNAc] ₆	Tri(1)Lac, Tetra(1)	2374.2			
K4		[Fuc] ₃ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	F ₃ Bi(1)Le(x) ₂	2082.0	2081.4	2-	1039.7
		[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	FBi(1)	1789.7	1790.4	2-	894.2
K5		[Fuc] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₄	FBi(3)	1627.5	1828.2	2-	813.1
		[Fuc] ₃ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	F ₃ Bi(1)Le(x) ₂	2082.0	2081.4	2-	1039.7
L	L1	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	F Bi(1)Le(x)NA	2080.9	2081.4	2-	1039.7
		[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	Bi(1)NA ₂	2226.0	2226.0	2-	1112.0
L2		[Fuc] ₁ [Hex] ₈ [HexNAc] ₇	FTetra(1)Lac	2885.7	2885.7	3-	960.9
			FTri(1)Lac ₂	2885.7	2886.4	2-	1442.2
M	M1	[Fuc] ₃ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	F ₃ Bi(1)Le(x) ₂ NA	2373.2	2373.0	3-	790.0
		[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	FBi(1)NA ₂	2372.1	2373.2	2-	1185.6
M2		[Hex] ₇ [HexNAc] ₆	Tri(1)Lac, Tetra(1)	2374.2			
		[Fuc] ₁ [Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuNAc] ₃	F TriNA ₃	3028.7	3028.5	3-	1008.5
N	N1	[Fuc] ₃ [Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuNAc] ₂	F ₃ TriNA ₂	3029.7			
		[Fuc] ₃ [Hex] ₇ [HexNAc] ₆ [NeuNAc] ₃	F ₃ TriNA ₃	3686.4	3686.7	3-	1227.9
	N2						920.5

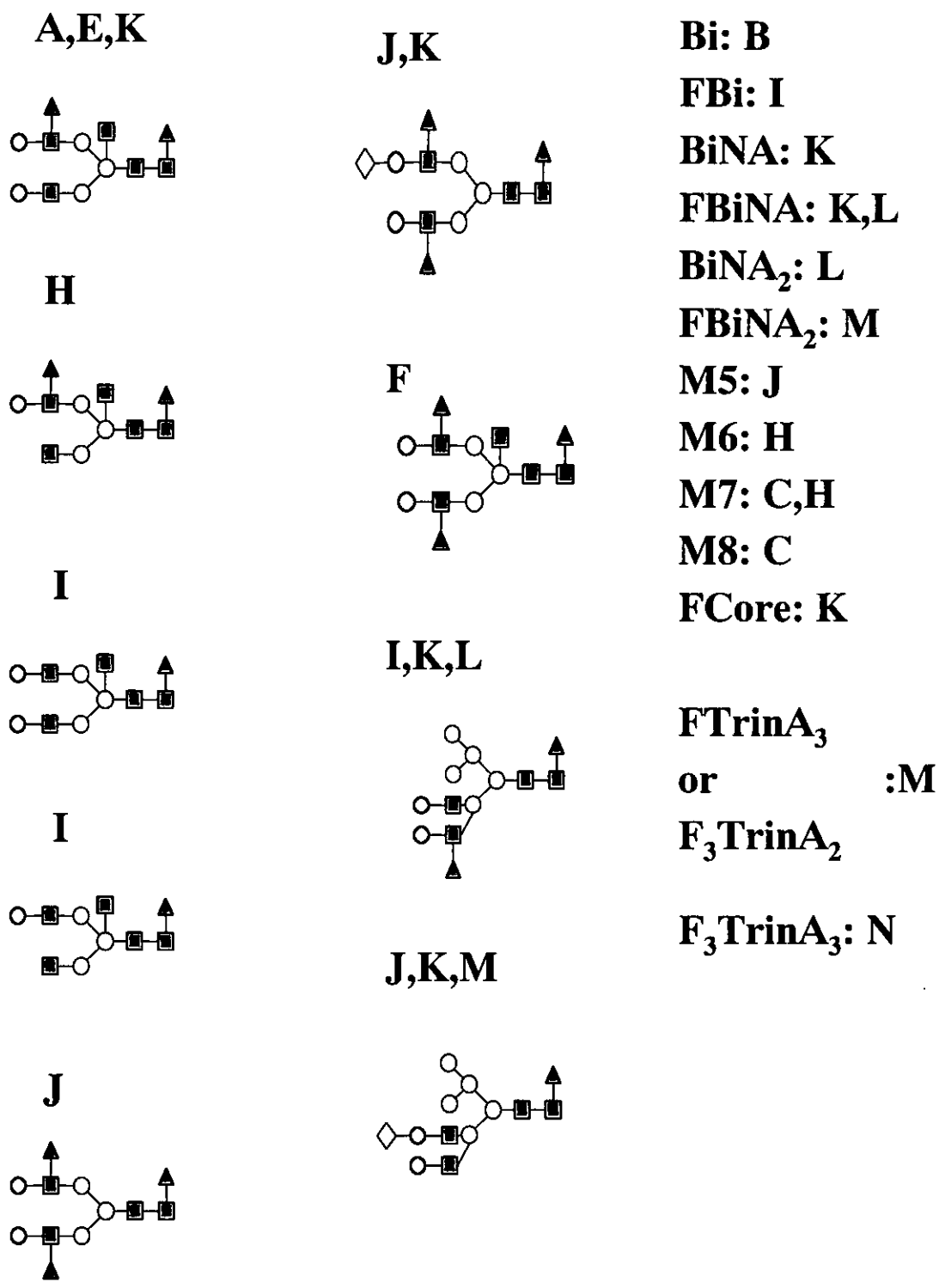


Fig. 12 Deduced oligosaccharide structure of peaks A-N in Fig. 11

細胞治療薬の新規体内動態解析技術の開発研究

分担研究者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長
協力研究者 小林 哲 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部主任研究官

研究要旨

タンパク質の体内動態を解析する方法の開発の一環として、血液中の微量タンパク質をMALDI-TOF MSによって質量分析によって解析する方法の検討を行った。第一に血液中からモデルタンパク：ヒトインスリンを粗精製するために、抗体結合ビーズを用いた遠心分離および抗体結合磁気粒子の利用を検討した。その結果後者において1 nMヒトインスリンを含む100 μ lの血清試料のヒトインスリンを質量分析可能な粗精製法を確立することができた。第二に微量タンパク質の質量分析において重要な課題である高感度化を目指した検討を行った。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と、MALDIを用いた質量分析においてタンパク質の測定感度が著明に改善される現象を見出し、さらにその条件の最適化を目指した結果、タンパク質によっては50倍以上の高感度化が可能であることを明らかにした。

A. 研究目的

細胞治療においては、疾病原因である生体機能異常を、治療用細胞によって合成される機能性タンパク質によって補うことによって、疾病治療を図ることが多い。そのため、細胞治療用細胞の評価においては、細胞を生体内に適用した場合の機能性タンパク質の発現を含めた体内動態は重要な評価項目の一つといえる。そこで、本研究では、目的タンパク質にフルオレッセイン誘導体（4',5'-bis (1,3,2-dithioarsolan-2-yl) fluorescein; FIAsH）と特異的に結合するペプチドタグを導入し、生体内で発現したタンパク質を簡便かつ特異的に蛍光標識する方法の開発を行い、タンパク質の体内動態評価法への応用を図ってきた。しかし血清中のタンパク質にFIAsHと反応性をもつ物質が少なからず存在し、タンパク

質の体内動態解析法への普遍的な応用には必ずしも適していないことが明らかとなってきた。そこで本年からは、体内動態解析への質量分析法の導入を図ることとした。

血液中のタンパク質を質量分析で解析する場合のハードルとしては主に2点考えられる。一つは血中に大量に存在するアルブミン等の夾雑物からいかに目的タンパク質を取り出すか、という問題。もう一つは微量タンパク質の解析手段として質量分析法の感度は現状では未だ十分ではなく、さらなる高感度化を図る必要がある、という問題である。そこで本研究は、この2点の課題の解決を目指して研究を行った。タンパク質を分析する質量分析法としてはマトリックス支援レーザー脱離イオン化・飛行時間型質量分析(matrix-assisted laser desorption/

ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)とエレクトロスプレーイオン化質量分析 (electrospray ionization mass spectrometry, ESI MS)が近年になって大きく発展してきた。これらの質量分析法は、生体試料を酵素消化して網羅的にペプチドの同定や定量解析を行うプロテオミクスなど、タンパク質化学の研究で広く用いられており、とくにMALDIは酵素消化していないタンパク質の定性的・定量的分析にも使われる。そこで、本研究では主としてMALDI-TOF MSを用いた。モデルタンパク質としては主としてヒトインスリンについて検討した。

B. 研究方法

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、 α -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。

2. 遠心によるBF分離：10 μ 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 μ 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て、得られた沈殿に90 μ lの50mM tris buffered saline (TBS, pH7.5)を添加して懸濁し、10 μ lずつ0.2mlチューブに分注した。10 μ 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 μ 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。

3. 磁気粒子によるBF分離：10 μ 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 μ 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 μ lのTBSを添加して懸濁し、0.2mlチューブに分注した。10 μ 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 μ 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。

4. 質量分析条件：分析試料2 μ lをスチール製ターゲットプレート各ウェルに滴下し、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。

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、適当に希釈して2 μ lをとって、10 μ 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。

C. 研究結果

1. 免疫学的手法による血清試料の精製

1-1. 遠心によるBF分離

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 μ 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 1)。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。

1-2. 磁気による BF 分離

免疫学的手法における BF 分離法としては、磁気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 2)。

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 μ l の血清からは 1nM のインスリンを検出することはできなかったが、100 μ 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 0.1nM 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ろう。

2. タンパク質によるシグナル増強

2-1. 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)。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 4a)。しかし、10、100、1000 ng/ μ l で検出感度を比較した場合には、100 ng/ μ 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/ μ l 前後でもっとも高かった(図 4b)。

2-2. 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 5a)。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 5b)。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。

2-3. 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1、図6）。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。

3. 合成高分子によるシグナル増強

3-1. 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にCHCAを添加した（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7）。

3-2. 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8）。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。

3-3. 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。

D. 考察

血液中の微量タンパク質を質量分析で解析するためには、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 μ lの血清から、適切なインスリンのシグナルを得ることができるような条件設定に成功している。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、更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効果が顕著に見られた。

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で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と、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。

このように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。この方法はプロテオミクス研究の展開の大きな原動力となる可能性がある。

E. 研究成果

1. 論文発表

- 1) Ishii-watabe, E. Uchida, A. Iwata, R. Nagata, K. Satoh, K. Fan, M. Murata, H. Mizuguchi, N. Kawasaki, T. Kawanishi, T. Yamaguchi, T. Hayakawa, Detection of Replication-Competent Adenovirus Spiked into Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR, *Mol. Therapy*, **8**, 1009-1016 (2003)
- 2) 川西 徹, 松木 滋, 品質に関するトピックの動向 -Q5E: バイオ医薬品のコンパラビリティ-, *医薬品研究*, **34**, 508-512 (2003)
- 3) Tetsu Kobayashi, Hiroshi Kawai, Takuo Suzuki, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa, Improved sensitivity of insulin in MALDI-TOF MS by premixing matrix CHCA with transferrin, *Rapid Communication in Mass Spectrometry* (in press)

2. 学会発表

- 1) 小林 哲, 河合 洋, 鈴木琢雄, 川西 徹, 早川 堯夫: MALDI-TOF MS におけるタンパク質のシグナル増強, 日本薬学会第 124 年会, 大阪 (2004, 3)
- 2) 小林 哲, 河合 洋, 鈴木琢雄, 川西 徹, 早

川 堯 夫 : Protein signal enhancement in
MALDI-TOF MS、第 52 回質量分析総合討論会、
名古屋 (2004, 6)

表 1. トランスフェリンあるいはアルブミン添加 CHCA から得られた各種ペプチドおよびタンパク質由来シグナルの強度

	ddw		Tf		BSA	
[Angiotensin II] +	27834	± 10757	17057	± 5021	19755	± 11237
[P14R] +	41689	± 15289	30675	± 8588	29237	± 13330
[ACTH 18-39] +	4371	± 1586	3801	± 2246	5458	± 3826
[hANP] +	5158	± 1323	6889	± 2879	9523	± 6384
[human glucagon] +	435	± 183	674	± 324	978	± 566
[insulin B chain] +	367	± 257	997	± 251	715	± 479
[bovine insulin] +	639	± 100	6266	± 2736	7498	± 5331
[human insulin] +	1267	± 130	13321	± 5070	12982	± 6863
[equine cytochrome C] 2+	166	± 83	5668	± 1975	3460	± 1442
[human IGF-I] +	459	± 81	7667	± 1808	6263	± 2872
[equine apomyoglobin] 2+		nd	2249	± 994	2217	± 1087
[equine cytochrome C] +	114	± 43	7629	± 1804	4006	± 1981
[BSA] 4+		nd	52	± 14	2459	± 604
[equine apomyoglobin] +		nd	1347	± 700	2090	± 1316
[BSA] 3+		nd	155	± 13	3721	± 1426
[BSA] 2+		nd	114	± 27	3624	± 1681
[BSA] +		nd	25	± 8	634	± 433

nd: no signal was detected

Each entry is the average of the most intense signal from four samples.

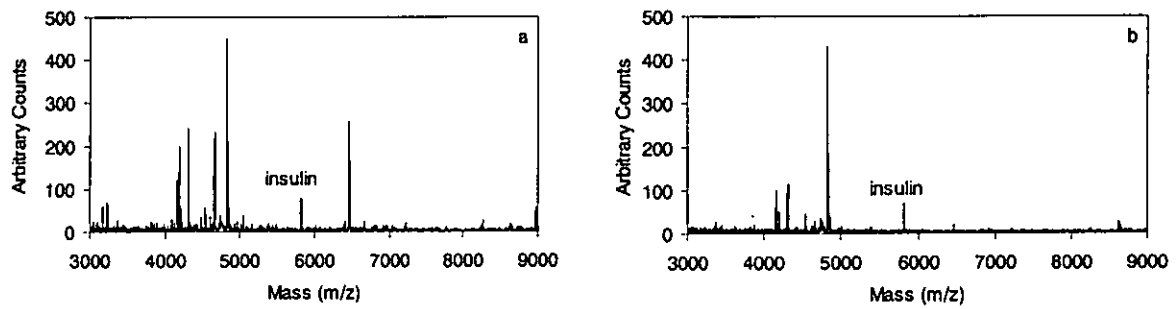


図1. インスリン添加ヒト血清を抗マウス IgG 抗体結合アガロースとインキュベートし、(a) TBS または (b) TBS-T で精製した場合における結合画分のマスペクトル

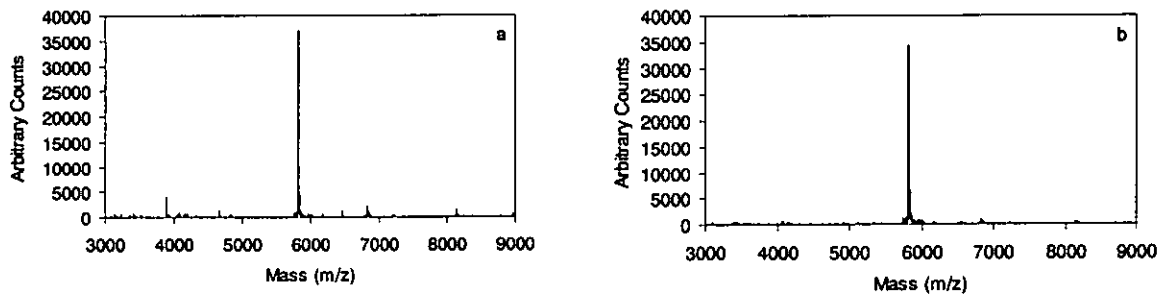


図2. インスリン添加ヒト血清を抗マウス IgG 抗体結合磁性粒子とインキュベートし、(a) TBS-0.1% BSA または (b) TBS-1% Triton X-100 で精製した場合における結合画分のマスペクトル

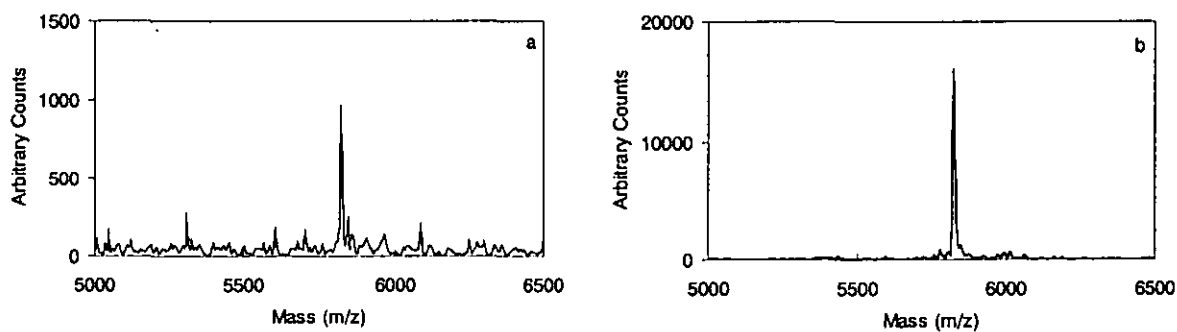


図3. (a)コントロール CHCA および(b)トランスフェリン添加 CHCA から得られたヒトインスリンのマススペクトル

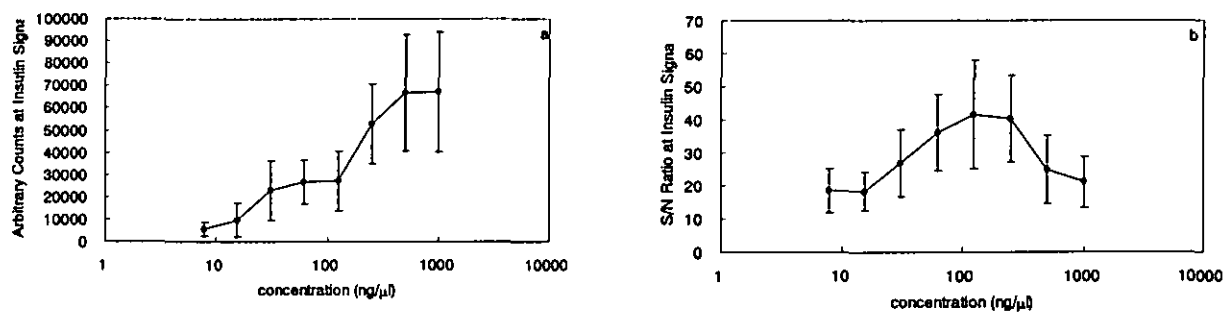


図4. トランスフェリンを系列希釈して添加した CHCA から得られたインスリンシグナルの(a)強度および(b) S/N 比

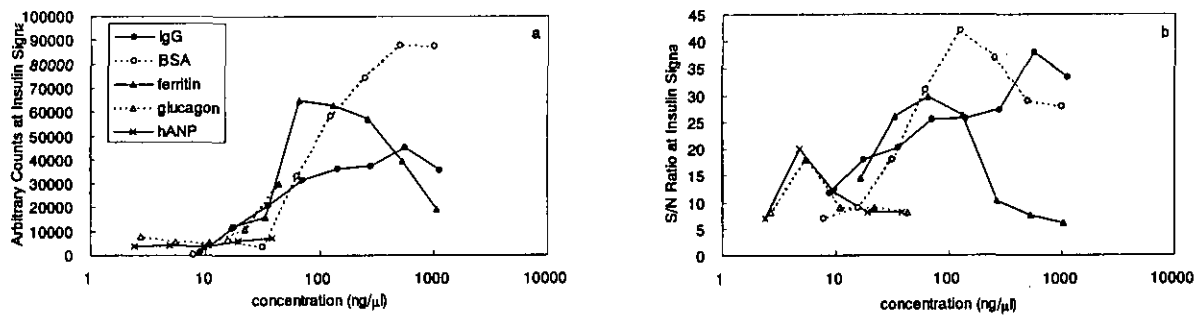


図5. 各種ペプチド・タンパク質を系列希釈して添加したCHCAから得られたインスリンシグナルの(a)強度および(b) S/N比

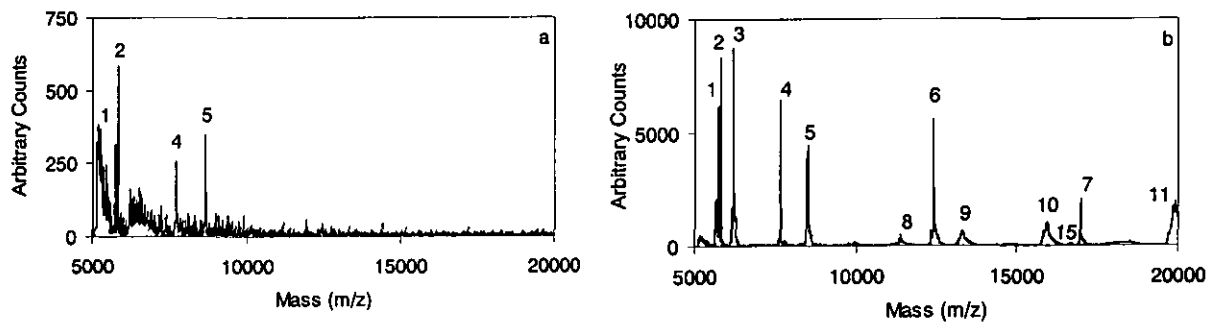


図6. (a)コントロールCHCAおよび(b)トランスフェリン添加CHCAから得られたペプチド・タンパク質混合試料のマススペクトル

Signal No.1, bovine insulin (5,730Da); No.2, [human insulin]⁺ (5,808Da); No.3, [cytochrome C]²⁺; No.4, IGF-I (7,649Da); No.5, [apomyoglobin]²⁺; No.6, [cytochrome C]⁺ (12,362Da); No.7, [apomyoglobin]⁺ (16,952Da); No.8, [Tf]⁷⁺; No.9, [Tf]⁶⁺; No.10, [Tf]⁵⁺; and No.11, [Tf]⁴⁺; and No.15, [BSA]⁴⁺.

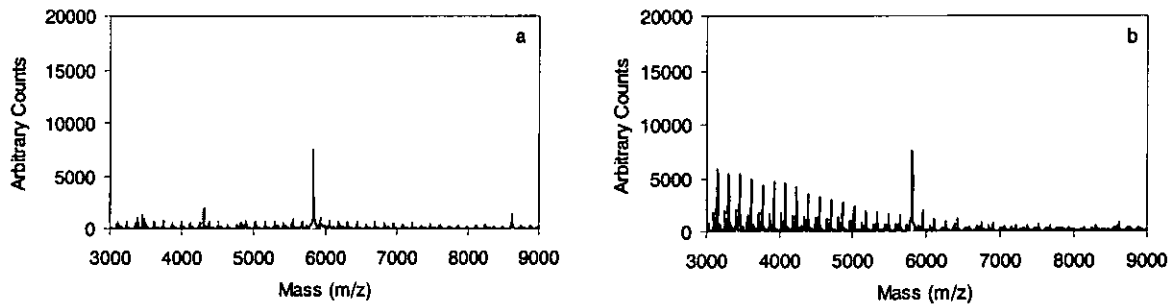


図7. (a)ポリ-L-リジン(MW 70,000-150,000)添加 CHCA および(b)ポリ-L-アルギニン(MW 70,000-150,000)添加 CHCA から得られたヒトインスリンのマススペクトル

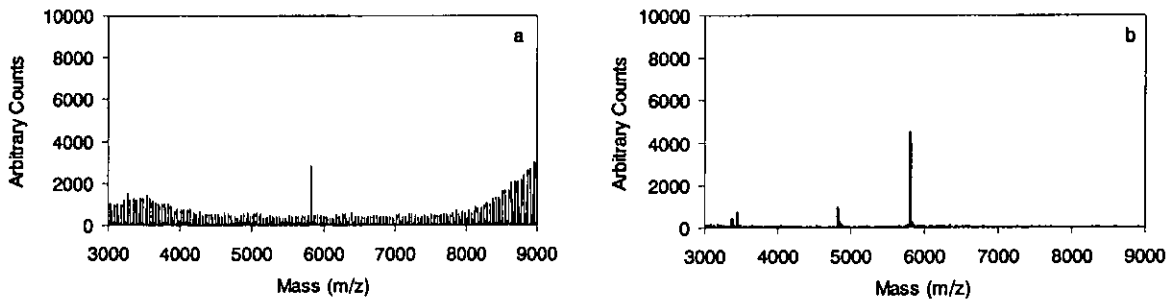


図8. (a) PEG (average MW 8,000)添加 CHCA および(b) PEG (MW 15,000-25,000)添加 CHCA から得られたヒトインスリンのマススペクトル

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
分担研究報告書

細胞組織加工医薬品の品質等の確保に関する研究

分担研究者 鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部室長

研究要旨

近年、バイオテクノロジーや再生医学の進歩により、細胞や組織を治療へ応用する細胞組織利用医薬品、医療用具の開発が進んでいる。このような細胞等を利用した医薬品は様々な疾病に対して有効な治療法となることが期待されるが、その品質や安全性確保に関しては未知の要素が多く、それらを検討するための新たな技術開発が重要である。細胞培養を利用した場合には、培養による細胞の性質の変化や、クロスカルチャーコンタミネーションなどの問題があるため、培養前後での遺伝的な同一性を補償することが重要である。そこで本研究では、細胞の遺伝的な同一性を補償するために最も有効であると考えられる、マイクロサテライトマーカである STR (Short Tandem Repeat) の多型を利用した解析の応用に関して検討を行った。モデル細胞として、ヒト株化細胞である promyeroïd HL-60 とその亜株である HL-60RG、lymphoblastoid TK6 とその p53 変異株である WTK-1 および肝由来の細胞株 FL-1 を用いて検討を行った。その結果、起源が同一の HL-60 と HL-60RG および TK6 と WTK-1 の間では 16 種類のマーカのうちほぼ全ての繰り返し数が一致したが、異なる細胞間では全く違うパターンを示した。さらに、同一細胞の場合には一部繰り返し数の異なるマーカも存在し、形質の変化および培養により変化した物であると考えられた。この結果より、培養細胞の起源の同一性を調べる上で、STR マーカは非常に有効であることが示されたとともに、培養中の形質の変化に伴い一部の STR マーカの繰り返し数が変化することが明らかになり、細胞の品質管理に利用可能であることが示唆された。

次に、遺伝子発現という観点から細胞の同一性を保証するために、GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析による、細胞の遺伝子発現について解析した。HL-60 および HL-60RG 細胞はその増殖性に大きな差があるが、遺伝子発現の比較により、全体としては大きな変化は見られなかった。一方で TK6 細胞でのデータと比較することにより、細胞株が違っていると発現の様式は大きく異なることがわかった。また、定常状態と対数増殖期の細胞の比較により、細胞状態が違っても同一細胞では全体として発現は一定であることがわかった。今後、細胞機能を利用した細胞医薬品を用いる場合、目的の機能が維持されているかを遺伝子発現の側からチェックすることも可能であ

り、細胞の同一性と共に、性質の変化および機能性の保証の意味でも、遺伝子発現の比較は有用であると考えられる。

A 研究目的

細胞組織利用医薬品等を治療に応用するに際して、その品質のチェックや機能性の保証などが、重要な課題であると考えられる。自己組織から培養した細胞を再び本人に戻して使用する場合など、免疫原性は問題にならないとも考えられるが、培養の途中でクロスカルチャーコンタミネーションが起こり、非自己の細胞に置き変わる危険性も考えられ、重篤な副作用を引き起こしかねない。そこで、治療に用いようとする細胞が確かに自己由来のものであることを事前に調べておくことは重要であり、その目的のためには、親子鑑定等で使われている、マイクロサテライトマーカー(STR)が最も有効であると考えられる。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クエ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1)。多型性をもつ STR マーカーを複数用いることにより、かなりの高確率で自己由来の細胞であることを保証することが可能であると考えられる。また、血縁者からの細胞移植というケースにおいても、その判定に有効であると考えられる。また、細胞を培養する過程において、癌化など性質が変化した際に遺伝子上にも何らかの変化が現れることも考えられ、遺伝的な安定性や同一性を保証する上で、STR マーカーの変化とい

うものも一つの指標となることが考えられる。そこで、これらの検証を行うために、同一細胞を起源にもつ近縁の重株を用いて、相互の STR マーカーのパターンを比較することにした。この際、市販のキットとして、既に多型性の高いことが知られている 16 のマーカーを用いて、同時に解析を行い、より信頼性の高い判定を試みるとともに、自らデザインした 17 番染色体の STR マーカーに関しても、同様にその繰り返しパターンの比較を行った。

STR は遺伝子配列の同一性により、細胞の同一性を調べるツールであるが、遺伝子配列上は全く同じ細胞であるにもかかわらず、発現する遺伝子やタンパク質が異なる場合には、異なった機能を持つことになる。実際に体の中の様々な組織においては、組織特異的な遺伝子群が発現しており、それらが、その組織としての機能を担っている。そこで、細胞の機能面での同一性の確認には、遺伝子発現の同等性を調べる必要がある。幸い、近年の遺伝子解析技術の進歩により、細胞のもつ膨大な数の遺伝子に対してその発現の程度を網羅的に解析可能なシステムである DNA マイクロアレイが利用可能となっていることから、この技術を細胞の機能的なキャラクタリゼーションに応用することを試みた。マイクロアレイとしては現在最も信頼性が高いとされる Affymetrix の GeneChip を用い、STR 解析に利用した細胞株をモデルに、その遺伝子発現を比較した。

B 研究方法

1. STR マーカーによる多型解析

1-1 STR マーカー

Promega 社より、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システムがキットとして市販されており、これを用いて解析を行うことにした。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1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。また一方で、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2)、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3に示す。

1-2 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の抽出を行った。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。

1-3 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 μ L
Gold Star 10 \times buffer	2.5 μ L
PowerPlexTM16	
10 \times Primer Pair mix	2.5 μ L
AmpliAq Gold	
DNA polymerase(4U)	0.8 μ L
Master mixの液量	20.0 μ L
<u>鑄型のDNA(sample)</u>	<u>5.0 μL</u>
合計反応液量	25.0 μ L

(ミニスケール)

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 μ Lにて増幅を行う。

1-4 DNA シークエンサーによる解析

PCR反応物1 μ 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。

2 GeneChip を用いた発現解析

2-1 cRNA の調製とハイブリダイゼーション

各種細胞約 10^6 個より、Quiagen 社 RNeasy Mini キットを用いて total RNA の抽出を行った。その 5 μ g を用いて、reverse transcriptase により cDNA を合成した。この際、プライマーとして、T7 プロモーターを結合させた poly dT を用いることにより、引き続き T7RNA polymerase による転写を行い、増幅された cRNA を合成した。cRNA 合成時にビオチンラベル化 dNTP を用いて標識した。これを断片化したのち、50 度にて 16 時間 GeneChip にハイブリさせた。

2-2 チップの洗浄、ラベル化とスキャナーによるシグナルの検出

ハイブリ溶液を除いた後、Affymetrix 社の GeneChip 用フルイディックステーションにて洗浄および、ストレプトアビジン-フィコエリスリンによる蛍光ラベル化を行った後、GeneChip 専用スキャナーにてスキャンを行い、チップの蛍光イメージを取得した。

2-3 チップイメージの解析

チップイメージを GeneChip 用データ解析ソフト Microarray Suite にて解析し、数値化するとともに、パーフェクトマッチお

よびミスマッチプローブ間の蛍光強度比か Presense/Marginal/Absence の判定を行った。その後、GeneSpring ソフトウェアにデータを取り込み、標準化を行った後、各細胞における遺伝子発現強度を算出するとともに、細胞間の比較を行った。

C. 結果

1. STR マーカーによる多型解析

各種細胞に関して、PowerPlex16 STR マーカーを用いた解析結果を表 4 に示す。HL60 細胞に関しては、独立したカルチャーから得られた 2 ロット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 とその亜株である 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) へ変化した LOH (Loss of Heterozygosity) が認められた (図 2)。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に気がつく。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