

の結果は、STR マーカーにより、LOH や染色体の数の変化が検出可能なことを示している。

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。これは、培養途中による繰り返しユニットの付加または欠失によるものと考えられる。

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。これにより、細胞の同一性を確実に判別できた。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 2 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はプライマーをデザインし、6 FAM, 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、くいたため判別がやや難

しかったが、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 5 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解像度の点からも難しいが、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。

通常、PowerPlex16 キットを用いた PCR 反応は全量 20 μ l にて行うが、試薬が高価なこともあり、スケールダウンを試みた。この際、通常の PCR 装置では反応液の蒸発が問題となるため、液量を減らすことは難しいが、キャピラリータイプのシークエンサーである LightCycler を用いることにより、5 μ l まで液量を減らしても正常にシグナルが検出できることが確認でき、後半の検討はスケールダウンした実験系で行った。

2. GeneChip による遺伝子発現解析

HL60 と HL60-RG 細胞の遺伝子発現を比較するため、対数増殖期および定常期の細胞より total RNA を抽出し、GeneChip を用いた解析を行った。両者の比較により発現に差の見られた遺伝子を図 3 に示す。約 1 万 5 千の遺伝子のうち RG 細胞にて発現上昇した遺伝子は、対数期で 127、定常期で 190、減少していた遺伝子は、対数期で 341、定常期で 411 であった。対数期と定常期で共通性を持って変化した 176 遺伝子に関して、Gene annotation に基づく機

能分類をすると、全体での分布に比べて、外部刺激に対して応答する遺伝子群の割合が増加していることがわかった。

対数期、定常期で共通性を持って変化の見られた遺伝子のうち、差の大きかった 20 遺伝子をリストアップしたものが表 6 である。RG 細胞で発現の高かった遺伝子として、Natural killer cell transcript 4 遺伝子が顕著であった。この遺伝子は NK 細胞に増殖刺激を与えた際に誘導のかかる遺伝子として知られており、RG 細胞での増殖性の高さとの関連性に興味を持たれる。また同様に細胞の増殖に関与すると考えられる Hepatocyte growth factor の発現が高い点も注目される。発現の低かった遺伝子としては、2 種の S100 calcium-binding protein A8,9 が注目される。このうち A8 に関しては、我々の研究室で以前、HL60 細胞のレチノイン酸刺激による分化にともなって発現の増加するタンパク質として 2 次元電気泳動により検出されていたタンパク質であり、レチノイン酸により分化能を失った RG 株での発現が低下している点は注目される。なお、核型解析などより、HL60 細胞では Double minute (DM) 遺伝子の出現に伴い c-Myc 遺伝子の増幅が起きており、RG 株では DM 遺伝子が消失していることが知られていたが、遺伝子発現解析からは両細胞間に myc 遺伝子の発現量の差は見られなかった。このことより、DM 遺伝子上の myc 遺伝子は、通常状態では発現していないことが示唆された。

ここで、変化の見られた遺伝子を、その染色体上の位置に基づいてマップしてみると、図 4 のように分布した。変化の見られた遺伝子は、比較的特定の染色体に集中し

ていることがわかり、1,6,11 番染色体に多く見られた。また、領域として同じ方向に変化した遺伝子が多いことが特徴であり、近傍の遺伝子が同様な発現制御を受けている可能性が示唆される。HL60-RG 細胞では、親株に比べて核型がかなり変化しており、遺伝子発現の変化にも影響を与えたことが考えられる。

さらに、別の検討にて得られた TK6 の遺伝子発現データを加えて、異なる細胞間および培養状態の間での遺伝子発現強度の差をスカッタープロットにて表したのが図 5 である。細胞が異なる場合 (TK6 vs HL60) には非常に分布が大きくなっていることから、遺伝子発現に差があることがわかる。対数増殖期と定常期の細胞の比較では、全体として非常に共通した遺伝子発現を示していた。

D. 考察

培養細胞の遺伝的同一性を基準として、細胞が同一個人から採取されたものであることを保証する上では、STR マーカーによる解析は非常に有用な手段であることがわかった。ただし、同一起源の細胞であっても、長い培養の過程で、染色体の変化や形質の変化を伴う様な場合に、STR マーカーの一部が変化する事例が認められた。このことは、STR マーカーによる解析がこうした細胞の性質の変化を検出しうることを示している。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。また、細胞を用いた移植治療などの局面に

において、血縁者などから提供された細胞を用いるケースもでてくると考えられるが、この際に直接親子関係のある場合には、理論上全ての STR マーカーに関して少なくとも片側のアレルが一致することより、かなり高い確率にて同定が可能である。

細胞起源が同じでも、HL60-RG 細胞などのように、培養を続ける間に細胞の性質が変化する場合もあり、遺伝子配列の同一性だけからは、細胞の機能的な同一性は保証できない。また、幹細胞を分化させて機能性を持たせた細胞として治療に用いる場合などは、逆に細胞の性質が変わることが重要であり、目的にかなった機能を持った細胞であるかどうかを何らかの方法で検証する必要がある。その際に有効になると思われるのが、網羅的遺伝子発現解析法である。近年のゲノム解析技術の進歩により、一度に大量の遺伝子に関して発現比較が可能なマイクロアレイのシステムが登場した。遺伝子発現は、細胞の機能を裏付けるものであり、より多くの遺伝子を解析することにより細胞間の性質の差をより詳細に検討できる。STR マーカーが細胞のもつ先天的な遺伝子指紋であるとすれば、遺伝子発現のパターンはダイナミックに変化する後天的な遺伝子発現指紋である。細胞機能の類推を含め、網羅的な遺伝子解析の結果を相互に比較することにより、細胞の機能的同等性を評価することができる。今回、HL60 とその増殖が亢進した亜株である HL60-RG 細胞の比較により、同一起源の細胞においても継代により性質が変化した場合に異なる遺伝子の発現パターンとして区別可能であることがわかった。また、TK6 という全く別の細胞株では、全体として非

常に異なる発現パターンを示すこともわかった。

また、HL60 と HL60-RG 細胞の比較により変化のあった遺伝子の染色体上での分布を調べると、局在性をもったパターンが得られた。それぞれ核型の変化との対応を調べてみると、親株で見られた 6 番染色体のトリソミーを反映して、6 番染色体上の遺伝子はすべて RG 株にて発現量が低くなっている。また、RG 株では 11 番染色体短腕の欠失が認められるが、この部位で多くの遺伝子の発現量が減少していた。これらは、染色体の数的な変化を反映したものであるが、同様に親株で見られた 18 番染色体のトリソミーの影響は認められなかった。以上より、染色体の変化は部分的にまとまった領域での遺伝子発現変化として現れることが示されたが、当然染色体変化を伴わない発現変化も重要である。RG 株においては、その増殖性の亢進と関連して、Natural killer cell transcript 4 や Hepatocyte growth factor などの遺伝子の発現が亢進していた点が注目される。原因か結果かを判断するのは難しいが、細胞増殖を亢進させることに寄与している可能性は高い。今後これらの遺伝子のタンパクレベルでの発現の変化を確認するとともに、RNAi などの手法を用いて、これらの標的遺伝子の発現を人為的に変化させた際に見られる細胞形質の変化を調べることにより、増殖促進への関与を明らかにしたい。

E. 結論

複数の STR マーカーを組み合わせて、マイクロサテライト多型を検出することによ

り、細胞起源の同一性を検証することができた。また、培養経過による形質の変化(核型変化)により、一部のSTRマーカーが変化することも確認できた。今後、血縁者の細胞利用を含めて、細胞の遺伝的なバックグラウンドを知り、その同一性を保証する上でSTRマーカーは非常に有用であることが示された。

一方で、遺伝的には同一でも細胞は由来組織や分化などにより様々な機能を有するが、そうした細胞の性質を評価する上では、マイクロアレイ(GeneChip)を用いた遺伝子発現解析は非常に有用な情報を与える。細胞、組織を利用した医薬品の評価において、細胞機能として必要とされる遺伝子群の発現の確認にも使うことができ、品質の評価という観点からも有用性は高いと予想される。また、細胞の機能的な同一性の評価の上でも、GeneChipは重要なツールとなることが示された。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1)Zhan L, Sakamoto H, Sakuraba M, Wu de S, Zhang LS, Suzuki T, Hayashi M, Honma M., Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat Res.*, 557, 1-6. (2004)
- 2)Yamada K, Suzuki T, Hakura A, Mizutani T, Saeki K. Metabolic activation of 10-aza-substituted benzo[a]pyrene by cytochrome P450 1A2 in human liver

microsomes. *Mutat Res.* 557, 159-165. (2004)

- 3)Thybaud V, Dean S, Nohmi T, de Boer J, Douglas GR, Glickman BW, Gorelick NJ, Heddle JA, Heflich RH, Lambert I, Martus HJ, Mirsalis JC, Suzuki T, Yajima N., In vivo transgenic mutation assays., *Mutat. Res.*, 540, 141-151 (2003)
- 4)Itoh T, Kuwahara T, Suzuki T, Hayashi M, Ohnishi Y., Regional mutagenicity of heterocyclic amines in the intestine: mutation analysis of the *cII* gene in lambda/lacZ transgenic mice, *Mutat. Res.*, 539, 99-108. (2003)
- 5)鈴木孝昌：変異原性(イニシエーター)から見たリスク評価: *Environ. Mutagen. Res.*, 25, 181-186 (2003).
- 6)鈴木孝昌：トランスジェニックマウス変異原性試験の有用性に関する研究. *Environ. Mutagen. Res.*, 25, 119-125 (2003)

3. 学会発表

- 1)山田勉也, 羽倉昌志, 鈴木孝昌, 加藤隆明, 竹本育世, 水谷隆治, 佐伯憲一. 一連の含窒素芳香族化合物の代謝活性化に関わるヒトCYP分子種. 日本薬学会第124年会(2004.3)
- 2)小原有弘, 鈴木孝昌, 鈴木孝禎, 宮田直樹, 二宮真一, 須藤哲司. GeneChip®を用いた薬剤曝露時の遺伝子発現解析(Toxicogenomicsへの応用を目指して)日本薬学会第124年会(2004.3)
- 3)小原有弘, 鈴木孝昌, 小貫慶昭, 佐藤陽美, 板井昭子, 鈴木孝禎, 宮田直樹, 二宮真一, 須藤哲司. チアゾリジンジオン誘導体曝露

- ヒトプライマリー肝細胞の GeneChip® 遺伝子発現解析 (KeyMolnet を用いた分子ネットワーク解析への展開. 日本薬学会第 124 年会 (2004.3))
- 4) 鈴木孝昌. トキシコゲノミクス研究から見た大集積アレイの有用性と臨床診断用の次世代カスタムアレイに求められるもの
- 5) 文部科学省科学技術振興調整費ゲノムフロンティア開拓研究シンポジウム. 一次世代のマイクロアレイ - カスタムアレイの展開 - (2004.3)
- 6) 戸部香織, 仲地豊, 近藤恭光, 中嶋圓, 浜田修一, 鈴木孝昌, 兵庫淳志, 田代英夫, 榊佳之, 降旗千恵. マウス肝発癌初期過程における遺伝子発現解析に用いる Oligonucleotide Microarray の開発. 日本分子生物学会 (2003.12)
- 7) 鈴木孝昌. 環境化学物質のリスク評価のためには, 現行遺伝毒性試験に何が欠けているか. 日本環境変異原学会微生物変異原性試験研究会第 31 回定例会 (2003.11)
- 8) JEMS/MMS マイクロアレイ共同研究グループ (世話人代表: 鈴木孝昌). DNA マイクロアレイの変異原性試験への応用に関する共同研究. 日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003.11)
- 9) パラニサミー・ラジャグル, 鈴木孝昌, 坂本浩子, 菅野 純, 林 真, 本間正充. ヒトリンパ腫由来 TK6 細胞における遺伝子傷害性物質による遺伝子発現変化の解析. 日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003.11)
- 10) Suzuki, T.; Toxicogenomics in the genetic toxicology. Annual Meeting of the Chinese Environmental Mutagen Society (2003.11)
- 11) 鈴木孝昌, 小原有弘, 山田勉也, 佐伯憲一, 本間正充, 山口照英, 林 真. ニトロソアミン類がマウスに誘発する突然変異の多様性. 第 62 回日本癌学会総会 (2003.9)
- 12) 山田勉也, 鈴木孝昌, 羽倉昌志, 佐伯憲一. 10 位窒素置換ベンズピレンのヒト肝 microsome を用いた Ames 試験での変異原性評価. 第 62 回日本癌学会総会 (2003.9)
- 13) T. Suzuki, P. Rajaguru, J. Kanno, H. Sakamoto, M. Hayashi, T. Yamaguchi, and M. Honma. GeneChip analysis on transcriptional changes induced in human lymphoblastoid (TK6) cells by six genotoxic chemicals. 33rd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2003.8)
- 14) T. Kanayasu-Toyoda, T. Oshizawa, T. Suzuki, E. Uchida, T. Hayakawa, T. Yamaguchi. Role of PKC ϵ on G-CSF signaling pathway in differentiating HL-60 cells into neutrophils. 6th World Congress on Inflammation (2003.8)
- 15) K. Tobe, K. Kawai, Y. Nakachi, Y. Kondoh, M. Nakajima, S. Hamada, T. Suzuki, A. Hyogo, T. Tashiro, H. Ito, Y. Sakaki, H. Tashiro, C. Furihata Oligonucleotide Microarray for Examining Gene Expression Clustering in Early Mouse Liver Chemical Carcinogenesis
- G. 知的所有権の取得状況
- なし

表1 PowerPlex16 STRマーカーの種類と染色体上の位置

Dye	Fluorescein				
STR marker	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	PentaE
Chromosomal location	3p	11p15.5	21q11-21q21	18q21.3	15q

Dye	JOE					
STR marker	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1P0	Penta D
Chromosomal location	5q23.3-32	13q22-q31	7q11.21-22	16q24-qter	5q33.3-34	21q

Dye	TMR				
STR marker	Amelogenin	vWA	D8S1179	TPOX	FGA
Chromosomal location	Xp22.1-22.3 and Y	12p12-pter	8q	2p23-2pter	4q28

表2 17番染色体上のオリジナルなSTRマーカー

Dye	6-FAM			
STR marker	115B3	THRA1	42D6	AFM044 xq3
Chromosomal location	17p13.3	17p11.2-12	17p21.3-22	17qter

Dye	HEX		
STR marker	CHLC	AFM234 xc9	AFM210 xa5
Chromosomal location	-	17q	17qter

Dye	TET		
STR marker	AFM248 yq9	AFM107 yb8	AFM049 xc1
Chromosomal location	17q21	17q	17q

表3 17番染色体STRマーカー増幅に用いたプライマー

		primer	primer sequence
Teromere	1	115B3-ca	AAAGATCCTTATTGCCACTTACTG
		115B3-gt2	CTCTACCTTGCTGGTGAGATTG
Centroromere	2	THRA1-AC	CTGCGCTTTGCACTATTGGG
		THRA1-TG	CGGGCAGCATAGCATTGCCT
	3	CHLC forward	GCCAACAGAGCAAGACTGTC
		CHLC reverse	GGAAACAGTTAAATGGCCAA
	4	AFM248yg9a	GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG
		AFM248yg9m	ACACAGAGTTGTCCTACTGCC
	5	42D6-CA	CCTGGTCTAGGAAGAGTGCA
		42D6-GT	GTGTAAGCATCTGTGTATACTAC
	6	AFM234xc9a	TCCACCTGTCCTGGTAAA
		AFM234xc9m	AGTGCTGCGTCTTACAACCT
TK-1 (17q23.2)	7	AFM107yb8a	ACTCCAATCAAGTTTGTACTGAGA
		AFM107yb8m	CTGCATACGAAGGGTAGGAC
	8	AFM049xc1a	ATCCCTGGAGAGTGAAAATG
		AFM049xc1m	AAGGCCAACCTGAAAACCTAA
	9	AFM210xa5a	GCCACCTGCCCTCAA
		AFM210xa5m	CTGCCAGCAGAGGCCA
	10	AFM044xg3a	GAGTCTCTAAATGCTGGGG
		AFM044xg3m	AGCTCCTGCACAGTTCTAAATA

表4 PowerPlex16を用いた各種細胞株のSTRマーカーリポート数の解析結果

A. The fluorescein-labeled allele designations

	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	PentaE
HL60-1	16	7, 8	29**, 30	14, 15**	13, 14
HL60-2	16	7, 8	29**, 30	14, 15**	13, 14
HL60-RG-1	16	8	29**, 30	14, 15	13, 14
FLC-4	15**, 16	6**, 8*, 9	31.2, 32.2	13	12
WTK1	16	8, 9.3	29	11, 15	5, 7
TK6	16	8, 9.3	29	11, 16	5, 7

* smaller peak than **

** a half of allele peak

B. The JOE-labeled allele designations

	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1P0	Penta D
HL60-1	12, 13	8**, 11	11, 12	11	13, 14	10, 12
HL60-2	12, 13	8**, 11	11, 12	11	13, 14	10, 12
HL60-RG-1	12, 13	8**, 11	11, 12	11	13, 14	10, 12
FLC-4	9**, 13	11*, 12	10*, 12	12**, 13	11, 12*	9, 12*
WTK1	12, 13	11	9, 12	11, 12	11, 13	11, 12
TK6	12, 13	11	9, 11	11, 12	11, 12	11, 12

* smaller peak than **

** a half of allele peak

JOE = 6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein

C. The TMR-labeled allele designations

	Amelogenin	vWA	D8S1179	TPOX	FGA
HL60-1	X	16	12, 13	8, 11	22, 24
HL60-2	X	16	12, 13	8, 11	22, 24
HL60-RG-1	X	16	12, 13	8, 11	22, 24
FLC-4	X	14, 16**, 17	17	8, 11	22
WTK1	X, Y	16**, 17, 20	10, 13	8, 11	22, 24
TK6	X, Y	16**, 17, 20	10, 13	8, 11	22, 24

* smaller peak than **

** a half of allele peak

TMR = carboxy-tetramethylrhodamine

表5 17番染色体上のSTRマーカーを用いた解析結果

STRマーカー	label	サイズ範囲		TK6		HL60/HL60-RG	
		min	max	allele-1	allele-2	allele-1	allele-2
115B3	6FAM	179	209	189-190	198-200	189	-
THRA1	6FAM	158	176	165-166	173-176	165	169
CHLC	HEX	200		195	199	196	200
AFM248yg9	TET	143	155	143	147	148	154
42D6	6FAM	154	174	138	155	138	-
AFM234xc9	HEX	114	138	109	130	116	-
AFM107yb8	TET	154	170	151-153	157-161	156	164
AFM049xc1	TET	181	207	183-185	187-189	-	192
AFM210xa5	HEX	166	188	172	180	-	-
AFM044xg3	6FAM	226	238	225	235	236	238 (RG 237)

(表中の数字はバンドサイズ)

- ; no peak

表6 対数増殖期、定常期で共通性を持って差の見られた遺伝子TOP20

(HL60-RGで発現が高い遺伝子)

Gene	Ratio	
	Log	Stationary
Natural killer cell transcript 4	469.1	157.7
Jun dimerization protein P21sft	27.1	13.3
Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	14.7	20.3
Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1	17.0	11.7
Adiponectin O-II	5.5	18.0
Charcot-Leyden crystal protein	12.3	10.9
Melanoma antigen, family B, 2	10.5	11.6
Neurogranin	13.5	8.3
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	14.1	6.1
Amino-terminal enhancer of split	12.1	7.0
TNF receptor superfamily, member 8	9.6	6.3
Galactosylceramidase	7.7	6.3
Interferon induced transmembrane protein 1	6.5	5.3
Potassium voltage-gated channel, subfamily H, member 2	6.3	4.5
T cell receptor delta locus	4.7	5.7
Fibroblast growth factor receptor 1	4.0	6.2
Hepatocyte growth factor	5.0	5.0
Galarin	5.6	4.2
Serine proteinase inhibitor, clade B, member 2	5.9	3.8
Lectin, galactoside-binding, soluble, 1	5.5	4.2

(HL60-RGで発現が低い遺伝子)

Gene	Ratio	
	Log	Stationary
Bactericidal/permeability-increasing protein	0.01	0.01
Elastase 2, neutrophil	0.01	0.01
Chromosome 20 open reading frame 103	0.01	0.01
S100 calcium-binding protein A8 (calgranulin A)	0.01	0.02
Poly(A) binding protein, cytoplasmic 4	0.02	0.01
Defensin, alpha 1, myeloid-related sequence	0.01	0.02
Chitinase 3-like 1	0.01	0.02
Coagulation factor C homolog, coaglin	0.04	0.02
S100 calcium-binding protein A9 (calgranulin B)	0.04	0.02
Prostaglandin E receptor 4	0.08	0.03
Mesoderm specific transcript homolog (mouse)	0.05	0.07
Major histocompatibility complex, class I, B	0.06	0.07
TYRO protein tyrosine kinase binding protein	0.08	0.06
Hypothetical protein FLJ10349	0.07	0.08
Fatty acid desaturase 2	0.07	0.08
Heavy chain, Human MHC class I HLA-J gene	0.11	0.05
t-complex-associated-testis-expressed 1-like	0.06	0.10
Cytochrome b-245, beta polypeptide	0.06	0.12
Grancalgin, EF-hand calcium binding protein	0.10	0.08
Meglenocephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts	0.07	0.12

図1 STRマーカーを使ったDNA多型の検出法

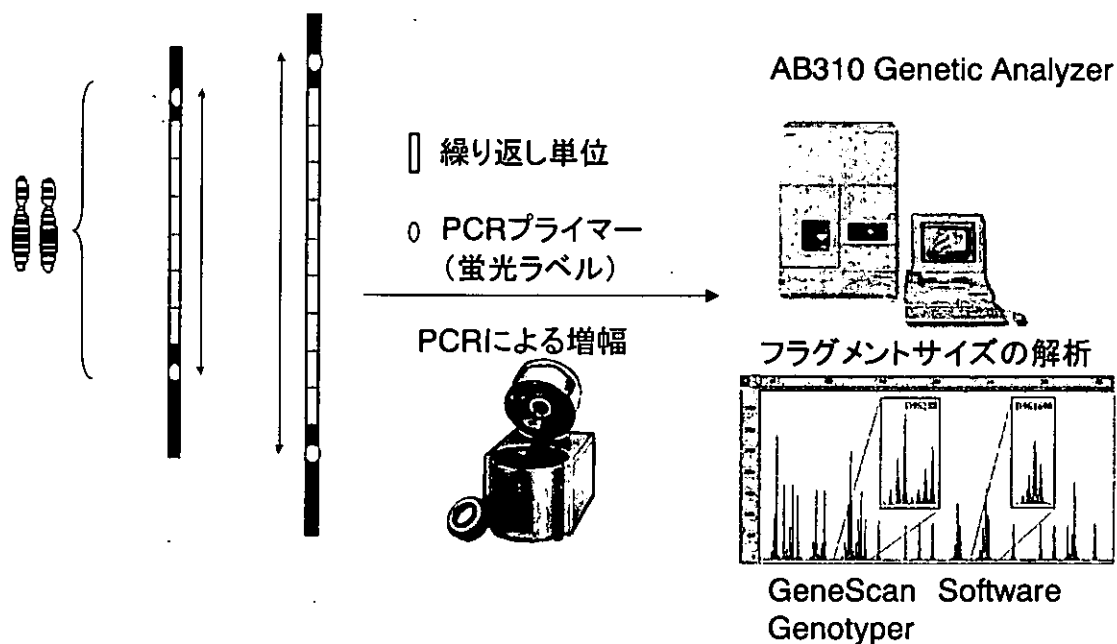


図2 STRマーカー解析例

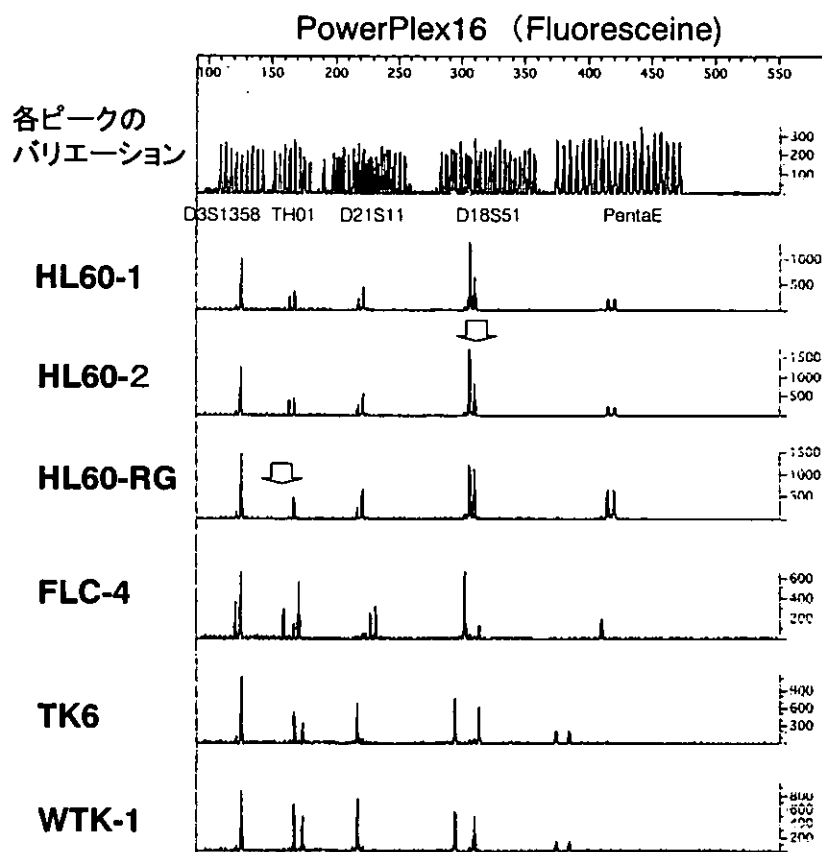


図3 HL60とHL-60RG細胞間で発現差のあった遺伝子と、対数増殖期と定常において共通性のあった遺伝子の機能による分類

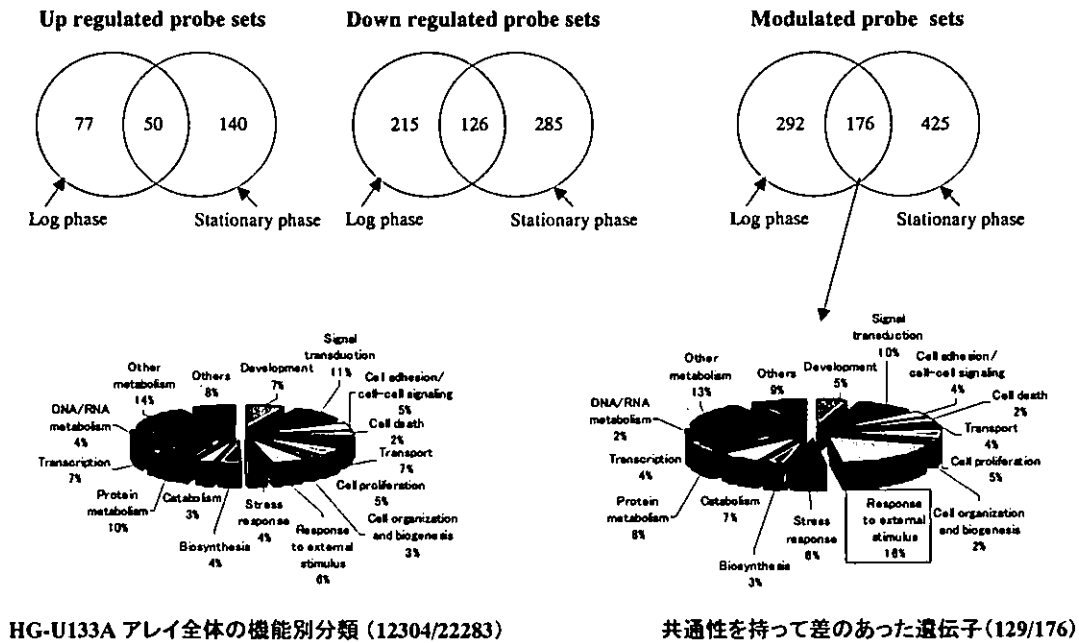


図4 HL-60RG株にて発現変化の見たれた遺伝子の染色体上の分布

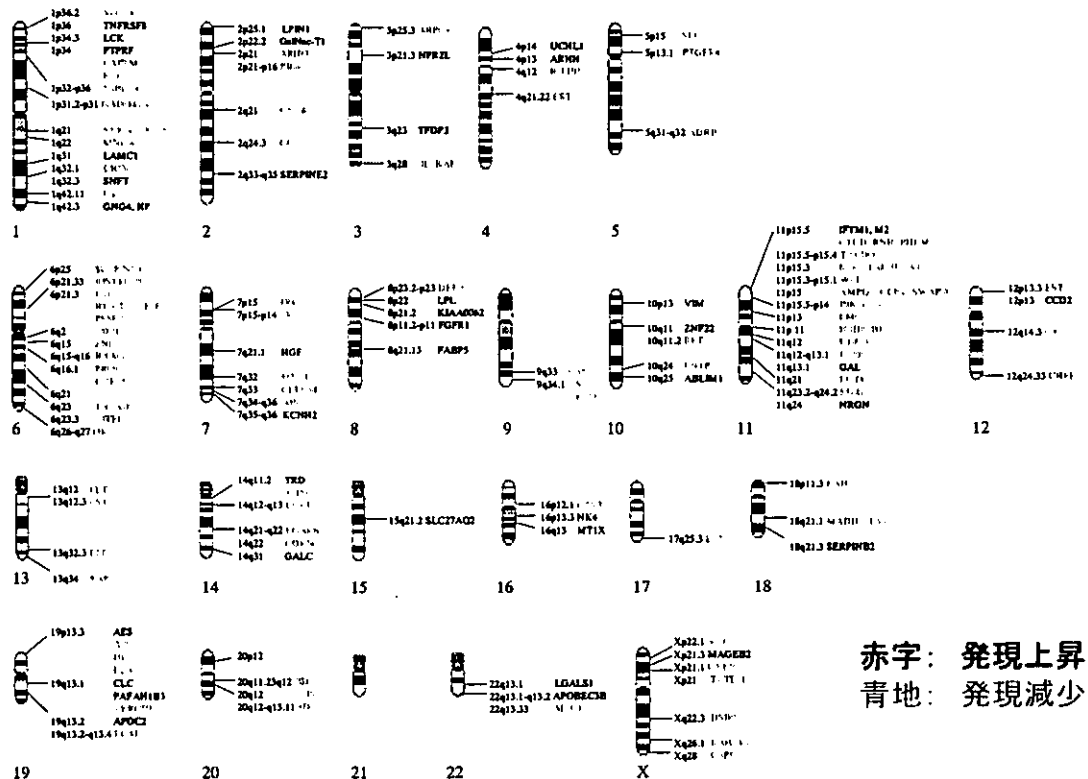
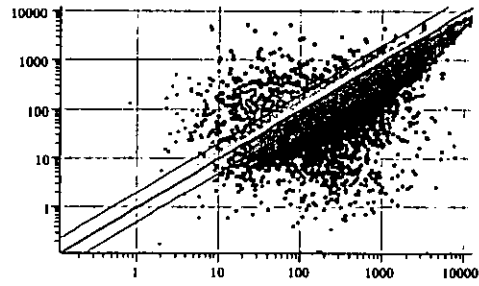
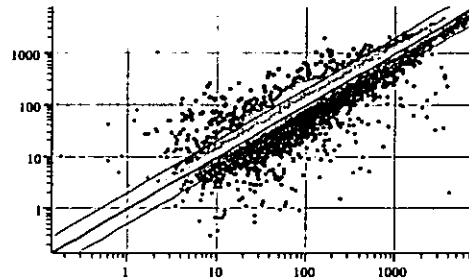


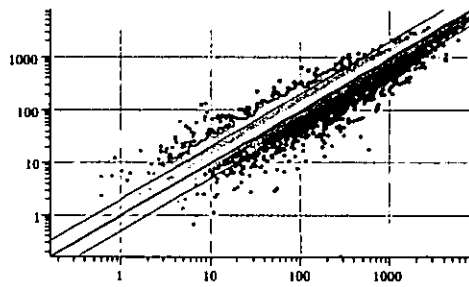
図5 各種細胞(培養状態)間での遺伝子発現強度の比較



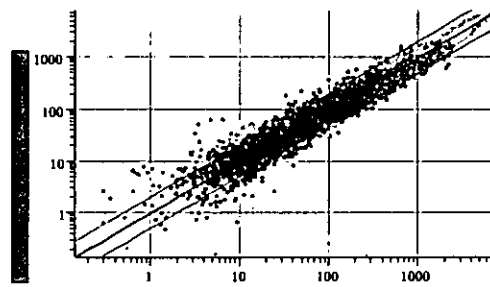
TK6 vs HL60 (Log Phase)



HL60 vs HL60-RG (Log Phase)



HL60 (Log Phase) vs (Stationary Phase)



HL60-RG (Log Phase) vs (Stationary Phase)

細胞の特性解析技術の開発

分担研究者 宮澤 宏 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部第二室長

〔研究要旨〕 細胞組織利用医薬品の品質・安全性の確保のために必要な細胞特性評価を行う技術を開発する目的で、以下のような研究を行った。幹細胞から分化する細胞の特性解析を行うために、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。神経細胞に分化誘導した細胞はウェスタンブロットングの解析から主としてニューロンに分化した。2次元電気泳動によるプロテオーム解析を行い、分化誘導過程初期から変動のあるタンパク質を見いだした。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。

協力研究者

佐藤陽治 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

疾患や事故により損なわれた組織の機能を回復させるための方法として、臓器移植技術や人工臓器の開発が進んできている。しかし、臓器提供のドナー数が圧倒的に少ないこと、十分に機能を果たす人工臓器開発が遅れていることのため、誰もが容易に享受できる医療とはなっていない。近年のバイオテクノロジーをはじめとした科学技術の進歩により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養し、加工した細胞を損なわれた組織に移植することで本来の機能を回復させるという再生医療が誕生してきた。幹細胞技術の進歩によりいかなる組織にも対応した細胞に分化誘導できる可能性が示され、また自己の細胞を用いれば、移植による拒絶反応も回避することができるという夢の医療法として注目されている。現在、培養皮膚や樹状細胞などを用いた火傷やガン治療に関しては、臨床試験段階にすでに入っており、実用化が現実迫ってきている。

しかしながら、治療に用いられる細胞の品質や安全性に関して、必ずしも十分な検討が行われているとはいえない。細胞を生体外で培養加工するために混入の可能性のある感染性物質の排除はもとより、細胞の安定性や腫瘍原性の問題、目的細胞の評価法、目的外細胞の混入や挙動など、検討すべき課題は多い。また幹細胞技術は進歩したが、幹細胞から目的細胞への分化機構が分子レベルで完全に解明されていない。そのため、医薬品としての細胞が治療に用いたとき、生体という環境の中で予期せぬ挙動をする細胞が出現する可能性や、他の細胞や組織に悪影響を及ぼす可能性などがある。またこうした副作用を制御する方法を開発するにも科学的根拠が必要不可欠である。

本研究では、細胞・組織利用医薬品に用いられる細胞の品質や安全性を確保するため、細胞の特性を迅速かつ高精度に評価する方法の開発を行う。具体的には、分化誘導過程の細胞のトランスクリプトームやプロテオーム解析を行い、分化に至るために重要な役割を果たすマーカー遺伝子やタンパク質、目的の方向に分化する細胞を識別する指標となるマーカー遺伝子およびタンパク

質を探索する。そして、標的細胞の特性を代表するマーカー遺伝子群およびマーカータンパク質群を同定し、複数のマーカー群の発現解析により細胞特性を評価するシステムを構築できるか検討する。

細胞特性解析システムを構築するためのモデルとして用いる幹細胞には、レチノイン酸で神経細胞へ分化する胚性腫瘍細胞 P19（マウス）と Ntera2 Clone D1（NT2、ヒト）を選択した。P19 細胞は、DMSO により心筋細胞にも分化するという多分化能をもつ細胞である。一般に、胚性幹細胞（ES 細胞）や組織幹細胞は分化誘導のために、レチノイン酸などの誘導剤の他にフィーダー細胞が必要であるが、ここで用いる細胞はフィーダー細胞を必要とせず、分化過程の解析から複雑な要因を排除できるとともに、操作上も容易であり分化誘導も長時間を要さず解析できるという利点がある。

具体的に行う研究は、まず P19 細胞を効率よく神経細胞および心筋細胞に分化誘導する技術を開発する。また NT2 細胞を効率よく神経細胞に分化誘導する技術を開発する。次に、分化した細胞および分化誘導されている細胞の特性を解析する。特性解析には DNA マイクロアレイや SAGE（Serial Analysis of Gene Expression）による網羅的遺伝子発現解析とリアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析、ウェスタンブロットティングや 2 次元電気泳動によるプロテオーム解析、さらに細胞生物学的解析、電気生理学的解析などを用いる。そして、多様な解析から P19 細胞や NT2 細胞の分化指標マーカーおよび分化過程に重要な役割を担う因子を探索する。見いだされたマーカー因子の神経幹細胞や心筋幹細胞における挙動および役割を検証し、分化制御の可能性を検討する。

そのうち本年度は、マウス胚性腫瘍細胞 P19 から効率的に神経細胞および心筋細胞へ分化誘導する技術を確立した。神経細胞へ分化誘導する過程の細胞特性を解析する目的で、ウェスタンブ

ロットティングによる細胞の評価および増殖との関連の検討、2 次元電気泳動によるタンパク質の発現変動の検討を行った。また、分化誘導した心筋細胞の特性解析をリアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析、電気生理学的解析を行った。

B. 研究方法

1. P19 細胞の神経細胞への分化

1) 神経細胞への分化誘導法

P19 細胞を α -MEM 10%FBS 中 37°C で培養後トリプシン処理し、約 1×10^6 cells/ml の濃度で DMSO に溶解させた all-trans retinoic acid (1 μ M) 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。retinoic acid は、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 1 mg/ml trypsin inhibitor (Invitrogen) を加えた。100 mm の通常の培養プレートに 8×10^6 cells を DMEM/F12 に N2 supplement (5 μ g/ml insulin, 50 μ g/ml human transferrin, 20 nM progesterone, 60 mM putrescine, 30 nM sodium selenite, 1 μ 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。

2) サンプルの調製

ウェスタンブロット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。

3) ウェスタンブロッティング

サンプル (20 μ g) 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。

4) 二次元電気泳動

サンプル 100 μ g (容量は最大 50 μ l) を、8 M Urea、2% CHAPS、0.5% IPG buffer(3-10NL)、2.8 mg/ml DTT、BPB trace を加え 250 μ l 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 μ l 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 pH 6.8、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。

2. P19 細胞のサブクローン CL6 細胞の心筋様細胞への分化

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。

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と直接反応させた。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。

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。

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、 α -MEM (10% FCS 含有) を加えて懸濁したのち、細胞外液を Nomarl Tyrode solution (pH 7.4) 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。

C. 結果

1. 神経分化細胞の特性解析

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 μ 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1)。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2)。細胞をトリプシンで1個1個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の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。形態的にも比較的均一な細胞集団であった(図3)。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。

次に、分化に要する至適日数の検討を行った。1 μM 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日間培養した場合が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、分化誘導効率は落ちた。

2) 分化誘導時および誘導後の細胞の特性

P19細胞がレチノイン酸で分化した細胞がどのような性質を持っているかを調べる目的で、ウ

エステンブロット解析を行い主なタンパク質の変動を解析した。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が見られた。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に一致していた。一方アストロサイトのマーカータンパク質の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4)。

神経細胞に見られるN-cadherin、contactinは、分化誘導中は発現がほとんど見られないが、分化し始め神経突起の伸長とともに検出された。

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日間では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 ϵ 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)。PCNAは7日間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、細胞凝集後いったん発現が減少し、また増加し、分化によってやや減少傾向が見られた(図6)。

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変化が大きい。タンパク質発現においても大きく変化することが予想される。本研究では、分化した細胞ではなく分化していく細胞の分

化指標マーカータンパク質を見いだすことを目的としているため、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、ゲルの銀染色にてタンパク質を検出した。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、分離能を良くする目的で細胞からの抽出を段階的に行い、それぞれの抽出液ごとの解析を行った。step 1の抽出液は主に細胞質由来で、step 2のものは核内タンパク質やstep 1で抽出されない細胞内骨格タンパク質および一部膜タンパク質が含まれている。

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。

2. 心筋分化細胞の特性解析

1) P19 CL6細胞の心筋細胞への分化誘導法の確立

CL6細胞を通常の培養用プレートに密に増殖

しないように気をつけ培養し続けた細胞を、トリプシン処理後1% DMSOを加えた血清入り培地によって反応を止め、新しい培地に植え込んだ。2日ごとにDMSO入りの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ことで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、心筋細胞のマーカーとして知られているミオシン軽鎖2a遺伝子(心房筋マーカー)とミオシン軽鎖2v遺伝子(心室筋マーカー)の発現をリアルタイムRT-PCRにより定量した結果、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8)。

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Ca²⁺-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Ca²⁺-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9)。

3) マーカー遺伝子の発現解析

これまで心筋細胞のうち、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1)。CL6細胞から分化した心筋細胞がどのタイプに属するかを解析するため、それぞれのマーカー遺伝子の発現解析を行った(図10)。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、心房筋マーカー)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、心房筋マーカー)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、心室筋マーカー)のCL6細胞での発現は成獣心房筋に近いものであった。値は18 SrRNAの量で補正したものである。心房筋マーカーであるMLC2aの心室筋マーカーMLC2vに対するの発現比は成獣心房筋の9倍であった。また別の心房筋マーカーSLNの場合は成獣心房筋の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11)。したがって、CL6細胞は心房筋型の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、 α ミオシン重鎖遺伝子(α MHC、成熟心筋マーカー)、 β ミオシン重鎖遺伝子(β MHC、幼若心筋マーカー)、平滑筋型 α アクチン(Sm actin、幼若心筋マーカー)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 α 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 β MHCの α 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12)。以上より、幼若な心筋の表現型であった。

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(APD₃₀、APD₅₀)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、APD₃₀、APD₅₀が50ms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13)。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。

D. 考察

再生医療を担う細胞治療は、目的の機能を果たすように分化した細胞や前駆細胞を用いる。その点で疾病や傷害により損なわれた組織や器官の機能回復に絶大な効果が予想される。自己の細胞

を材料にすれば拒絶反応も回避でき、回復のスピードにおいても優れた治療法と考えられる。しかし、実用化に向けた細胞治療で最大の問題は安全性に確保にあると思われる。生体から採取した細胞を培養、加工することによる感染物質混入や細胞の品質低下の可能性、細胞を完全に制御できるほどの科学的知見と技術の欠如のため、新たな疾病への罹患や別の細胞種への分化、腫瘍化など予期せぬ悪影響が出ることも考えられる。

細胞治療の安全性を確保するためには、感染物質の混入を排除するための施設や技術、品質を落とさない培養技術、そして用いる細胞の十分な特性解析研究が必要不可欠である。本研究は、細胞特性を解析する技術を、幹細胞からの細胞分化誘導系を使って開発することを目指している。

本研究で用いたP19細胞は神経細胞にも心筋細胞にも分化可能な一種の幹細胞である。P19細胞による神経細胞や心筋細胞への分化は1980年代から研究されており、P19細胞は、10nM程度の低濃度のレチノイン酸では心筋細胞遺伝子が優位に発現される。1 μ M程度の高濃度では神経系遺伝子が優位に発現する。1% DMSOによる心筋細胞遺伝子の発現誘導のメカニズムは不明だが、低濃度のレチノイン酸と同様の効果をするのか、あるいは細胞内シグナル伝達系に直接影響を及ぼしているかと考えられる。レチノイン酸は以前より分化誘導活性があることが知られ、細胞に取り込まれると核に移行する。核内レセプターであるRAR(α , β , γ)およびRXR(α , β , γ)を介して転写因子を調節することで、分化誘導や細胞増殖、形態形成、アポトーシスなどの活性を発現する。これらの活性に関連のある因子を含め、分化誘導過程で変動してくる因子の研究は興味深いものがある。

1. P19細胞の神経細胞分化誘導過程における細胞特性解析

P19細胞の神経細胞への分化誘導には、レチノイン酸と細胞の凝集が必要であることが知られ

ている。本研究から、細胞と培養するプレート面との接着度も効率的分化誘導に重要であることが示唆された。細胞をレチノイン酸存在下凝集状態で培養後、凝集したまま分化培地に移す場合には、ポリリジンコートしたプレートが分化に必要であり、細胞をトリプシンで1個1個ばらしてから分化培地に移した場合には通常の培養用プレートで効率的な神経細胞誘導ができた。凝集した細胞塊の場合、接着面が細胞塊の体積に比べ小さい。神経突起を伸ばすためには培養プレート面にはり付くことが重要で、通常の培養用プレートでは十分にはり付くことは容易ではないが、ポリリジンコートしたプレートでは面積は小さいがしっかりと接着できる。そのため神経突起が伸長できたと思われる。1個1個ばらばらな状態にした細胞では、容易に培養プレート面に接着できることから神経突起を伸ばすことができるが、コートされたポリリジンによって細胞の動きが制約されるほど固定されてしまうと隣の細胞との相互作用ができず、さらなる神経細胞への分化が阻害されネットワーク形成まで至らなかったと考えられる。通常の培養用プレートでは培養面との接着度は強固なものではなく、細胞がある程度移動でき細胞同士が寄り添うことができ、すなわち細胞間相互作用ができ神経突起を伸ばしながら分化段階をさらに進めて複雑なネットワーク形成にまで至ったものと思われる。

以上から、P19細胞を効率よく、またより均一に神経細胞に分化した集団を得るため、レチノイン酸処理後、トリプシンで細胞をばらし、細胞間相互作用ができる程度の細胞密度で通常の培養用プレートで培養するという方法を確立した。

ウェスタンブロット解析から、オリゴデンドロサイトに関しては検討していないが、P19細胞から分化誘導した神経細胞はアストロサイトではなくニューロンが主であることが判明した。また、一般に細胞は分化誘導に伴い増殖停止に向かう。レチノイン酸存在下で7日間培養するとDNA複製関連因子PCNAが減少しニュー

ロン特異的なMAP2Bが発現してくることから、6日目から7日目の間に増殖から分化へのスイッチングが起こったと考えられる。分化培地に移し誘導をかけた場合、神経細胞特異的タンパク質がすぐに発現してくるにもかかわらず、PCNAやDNAポリメラーゼのサブユニットの減少がすぐに観察されなかった。盛んに増殖している細胞集団が存在している可能性もあるが、この場合スイッチングのシグナルが異なるのかもしれない。細胞一つ一つの挙動を確認するために、免疫蛍光抗体法による細胞観察が今後必要である。増殖制御因子に関しては、分化に伴い発現してくるものと、そうでないものがあった。Kip1、RB2は分化とカップルしており、これらの遺伝子発現を調節する因子が分化のシグナル系に関与している可能性がある。

再生医療に用いられる細胞の遺伝子レベルの発現やタンパク質レベルの発現を網羅的に調べることは、細胞の目的とする機能の評価や目的外の異常な挙動の予測などにとって多大な情報を提供する。使用する細胞の特性をあらかじめ詳細に検討しておくことは、臨床応用に用いる細胞の評価に寄与することになる。幹細胞の一種であるP19細胞から神経細胞へ分化誘導していく過程の遺伝子レベル・タンパク質レベルの発現の網羅的解析は、これまでにDNAマイクロアレイによる遺伝子発現の検討が行われており、いくつかの知見が得られている。しかし、マイクロアレイ解析の弱点である発現量の少ないものでの検討がまだなされていない。またタンパク質レベルでも、詳細に行われていないのが現状である。

本研究では、遺伝子発現の微量なものでもまた、未知の遺伝子でも探索できるSAGEによる解析を行う予定である。本年度行った2次元電気泳動によるタンパク質レベルの網羅的解析では、P19細胞から神経細胞へ分化誘導していく過程の分化誘導初期(レチノイン酸処理後1日目)から分化能を備わった4日目までに注目して解析を行った。早い段階での変動を捉えることで鍵となる

タンパク質を見いだすためである。P19 細胞をレチノイン酸による分化誘導刺激すると1日目からコントロールと比較して細胞質のタンパク質、核や細胞内器官タンパク質いずれも明らかに相違した再現性あるスポットが観察された。いずれのスポットもタンパク質はまだ未同定であるが、分化の誘導に関わっている因子である可能性がある。ここで用いた細胞の段階的抽出法による解析では、可溶化しにくい細胞膜画分を完全に回収しきれず、分化を運命づけられた細胞を選別するのに有効な細胞表面マーカーの同定のためには、細胞抽出法を工夫する必要がある。

タンパク質や機能はまだ不明であるが、変動のあるスポットは再現性があり、これらのスポットのタンパク質の変動解析をすることによって、細胞特性を評価できる可能性が示された。

また、ここでは報告していないが、レチノイン酸で同じく神経細胞に分化するヒト胚性腫瘍細胞 NT2 でも、分化誘導させる方法を確立しており、ヒトとマウスでの比較評価の検討が期待できる。

2. P19 CL6 細胞の心筋分化細胞の特性解析

心筋細胞は出生前には分裂増殖能を持つが、出生と同時に速やかにその分裂能は消失する。また、心筋細胞は骨格筋細胞と異なり近傍に衛星細胞のような未分化細胞を持つことはない。したがって心筋梗塞等でひとたび心筋細胞が失われた場合には傷害部位の筋細胞は再生せず、直接心機能不全に結びつく。再生医療として最近、幹細胞を *in vitro* で心筋細胞へ分化させた上で傷害部位に移植することにより心機能を回復させる方法が提唱されている。心筋細胞の移植は心筋梗塞治療における一つの breakthrough の可能性として現在脚光を浴びているが、心筋細胞移植を実用化するには、幹細胞から目的とする細胞種 (=心筋細胞) への効率的な分化誘導の技術が不可欠であり、また細胞移植の安全性を評価・確保するためには心筋細胞分化の機序をより詳細に

理解する必要がある。

通常幹細胞から心筋細胞を誘導させる場合は、分化誘導剤の他に細胞塊 (embryoid body) を分化誘導初期に形成させる必要がある。しかし、CL6 細胞は embryoid body を形成させる必要がなく心筋細胞に分化できる。また、feeder 細胞も必要としないことから、初期の心筋分化機構の解析をより簡単に行うことができると期待されている。しかしこれまで分化誘導後の CL6 細胞の表現型の詳細は十分には明らかではなかった。本研究における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から、CL6 細胞を DMSO 存在下 16 日間培養することで得られた自動能を持つ心筋様細胞の表現型は、幼若度の高い心筋細胞に類似した特徴を持つことが初めて明らかとなった。なお、通常的心筋細胞では稀とされる早期後脱分極を高頻度で生ずることが判明した。早期後脱分極は QT 延長症候群と密接に関連することが知られている。したがって、CL6 細胞は心筋分化研究のみならず QT 延長および不整脈研究のツールとしても有用である可能性も考えられる。

今後は、分化初期の細胞系譜決定過程 (4 日間) まで、あるいはその後の分化効率を高めるのに必要な時期での遺伝子レベルおよびタンパク質レベルの解析を行うことで、分化誘導に必要な因子、分化指標となる因子、分化効率を高める因子などの同定が心筋分化細胞の特性評価のために必要になってくる。

F. 研究発表

学会発表

1. Watanabe, K., Ono, K., Miyazawa, H., Kikuchi, Y., Yamaguchi, T., Shimizu, S., and Sato, Y.: Myosin isoform expression in murine embryonal carcinoma cells after cardiac differentiation. 第 76 回日本薬理学会年会 (2003 年 3 月)
2. Mori, S., Ishida, S., Shinozaki, Y., Sawada, J., Miyazawa, H., Yamaguchi, T., Inoue, K. and Sato,

Y. : Microarray analysis of thyroid hormone actions in rat aortic smooth muscle cells. 第 76 回日本薬理学会年会 (2003 年 3 月)

3. 渡邊圭、小野景義、宮澤宏、木内祐二、山口照英、清水俊一、佐藤陽治：心筋へ分化した胎児

性癌化細胞の表現型の検討 第 123 回日本薬学会年会 (2003 年 3 月)

4. 宮澤宏、山口照英：P19 細胞神経分化誘導時のタンパク質プロファイルの解析 第 26 回日本分子生物学会年会 (2003 年 12 月)