

200400178A

厚生労働科学研究費補助金

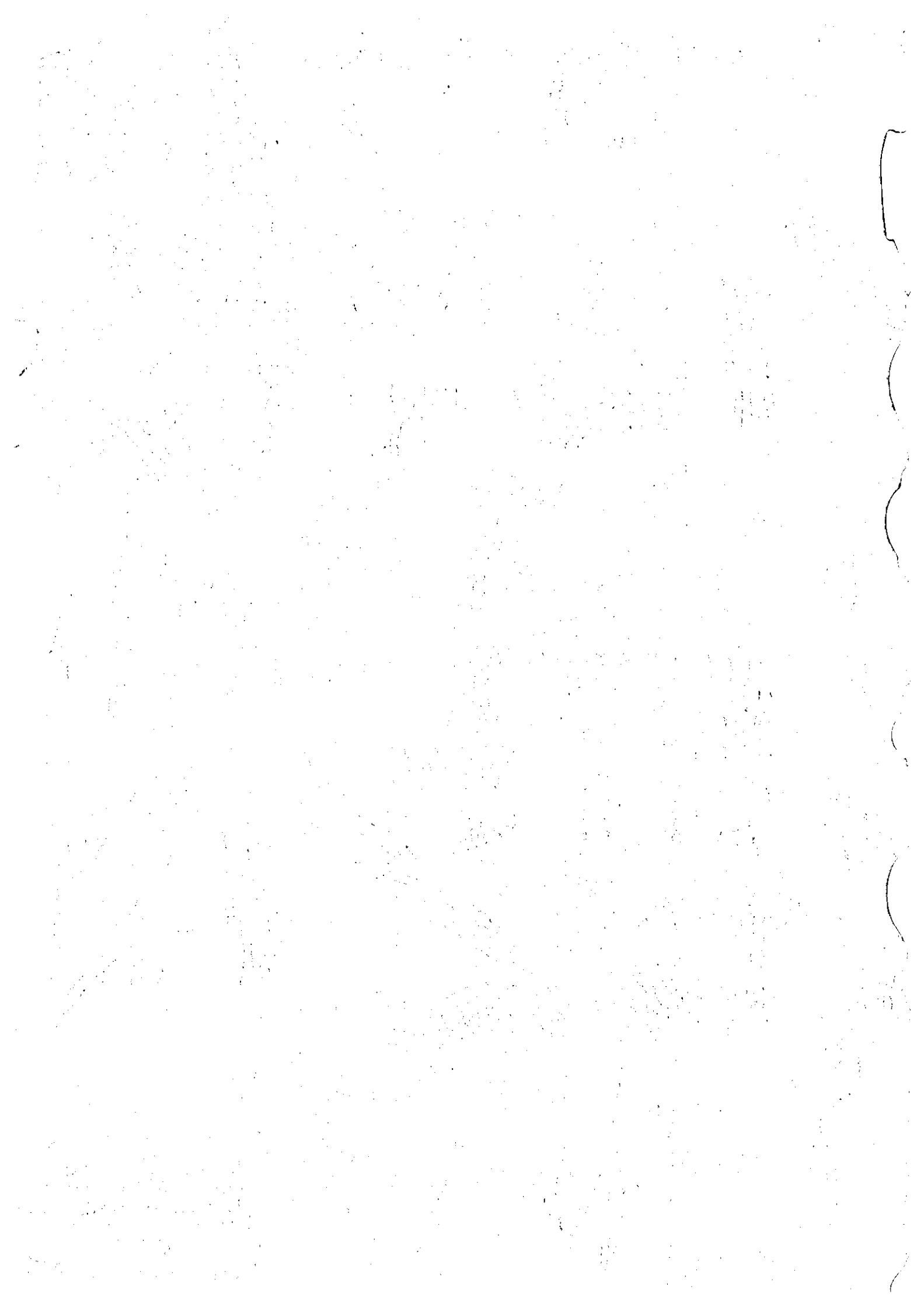
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

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

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 早川 堯 夫

平成17 (2005) 年 4月



厚生労働科学研究費補助金  
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

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

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 早川 堯夫

平成17（2005）年4月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

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

## II. 分担研究報告書

1. 細胞・組織加工医療用具の品質等の確保に関する研究・・・118  
土屋 利江
2. 細胞組織利用医薬品等の安全性等に関する研究・・・151  
山口 照英
3. 細胞治療薬の新規体内動態解析技術の開発研究・・・181  
川西 徹
4. 細胞タンパク質プロファイル評価技術の開発・・・197  
川崎 ナナ
5. 細胞・組織加工医薬品・医療用具の品質等の確保に関する研究・・・216  
新見 伸吾
6. 細胞・組織加工医療用具の品質等の確保に関する研究・・・229  
鈴木 孝昌

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・248

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
総括研究報告書

細胞組織利用医薬品・医療用具の品質・安全性等の確保に関する基盤技術開発研究

主任研究者 早川 堯夫 国立医薬品食品衛生研究所・副所長

【研究要旨】 細胞組織利用医薬品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が可能なが明らかになった。2) Gene Chip を用いた網羅的遺伝子発現解析により細胞の同一性の確認や、安定性の評価に適用できないか検討するために、モデル細胞として同一起源であることが示されている 3 種のヒト膀胱由来細胞株を用いた解析を行った。その結果、同一起源の細胞では、遺伝子発現パターンが似ているものの、subline 化の過程を反映したと考えられる発現パターンの差異が確認できた。従って、Gene Chip を用いて網羅的遺伝子発現解析が細胞の品質管理に利用可能であることが示唆された。染色体レベルで遺伝的安定性の評価法として用いられる CGH (Comparative Genome Hybridization) 法により普遍化、迅速化を図る目的で、マイクロアレイと組み合わせた CGH 法の有用性についてモデル細胞を用いて検討した。その結果、予想される領域に遺伝子の増幅および欠失の検出が可能であり、CGH のパターンが細胞の遺伝的同一性および安定性を評価する上で有用であることが示された。3) 細胞特性評価の一環として、無担体等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせることにより 2 次元電気泳動は解析できない塩基性タンパク質の分離が可能なることを明らかにした。これらの手法は、塩基性の高いサイトカインや増殖因子のプロファイリングに有用な手段となることが期待される。4) 細胞由来タンパク質プロファイリングや目的とするタンパク質の特性解析のための高感度タンパク質構造解析法を開発を目的として、電気泳動で分離した目的タンパク質の LC/MS による特性解析を検討した。インゲル酵素消化の改良やイオントラップ型質量分析法を利用して糖鎖を特異的に解析する方法を開発することにより、これまで解析が困難であったゲル内糖タンパク質の部位特異的糖鎖解析に成功した。5) BALB/cL マウスの易発癌系統と発癌しにくい系統の 2 種類のマウスを用いて、ポリ-L-乳酸 (PLLA) によるがん化について in vivo での解析を行った。その結果、易発癌系統のマウスでは、ギャップジャンクション依存性細胞間情報伝達及びコネキシン遺伝子の発現の抑制と TGF- $\beta$ 、細胞外マトリックス (ECM)、Insulin-like Growth Factor Binding Protein (IGFBP) 等の産生能の亢進が見られることを明らかにし、がん化の予測指標となる可能性を示唆することができた。6) 細胞由来目的タンパク質等の体内動態解析手法の開発を目的として、質量分析の血中微量タンパク質の分析への適用につ

いて検討した。熱応答性磁性ナノ粒子を利用した質量分析イムノアッセイ (MSIA) により、ナノモル濃度レベルの血中インスリンを検出できることを明らかにした。また、ポリリジンやデキストランなどの各種合成高分子をマトリックス溶液に添加することにより、それ自身のシグナルを出すことなく目的タンパク質のシグナルを増強することができ、質量分析の高感度化が可能であることを明らかにした。7) ヒト血液幹細胞からより多くの血管内皮前駆細胞への分化誘導する条件を明らかにした。また、血管内皮前駆細胞の細胞指標として、CD31 に加えコネキシン 37 が有用であることを明らかにした。8) 心筋細胞への分化能を有するマウス胚性腫瘍細胞及びその垂株を用いて心筋分化能の解析及びマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル解析を行い、心筋分化能に関連する遺伝子群を見出した。9) 肝幹細胞の特性指標として、アネキシン A3 (AnxA3) の有用性についてラット再生肝モデルを用いた検討を行い、再生肝中の中心静脈付近にアルブミンと AnxA3 共陽性の小型血球様細胞が出現することが明らかになり、肝幹細胞の特性指標としての有用性が明らかになった。10) ヒト骨芽細胞の増殖能と分化能の年齢による差異について解析し、増殖能は年齢による差異はないが分化能が加齢と共に低下することを見出し、骨芽細胞を用いた治療においては品質評価として分化能を考慮することが必要であると考えられる。

#### 分担研究者

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

#### サイフデイン・アーメド

	国立医薬品食品衛生研究所
原園 景	国立医薬品食品衛生研究所
橋井 則貴	国立医薬品食品衛生研究所
佐藤 陽治	国立医薬品食品衛生研究所
押澤 正	国立医薬品食品衛生研究所
小林 哲	国立医薬品食品衛生研究所
豊田 淑江	国立医薬品食品衛生研究所

#### 研究協力者

中西 真人	産業技術総合研究所
森田 育男	東京医科歯科大学・教授
有川稔多加	東京医科歯科大学
有賀 豊彦	日本大学・教授
佐藤 功栄	埼玉県赤十字血液センター 研究部・室長
岩田 明子	埼玉県赤十字血液センター
澤田 留美	国立医薬品食品衛生研究所
石黒 操	国立医薬品食品衛生研究所
伊藤 友美	国立医薬品食品衛生研究所

#### 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（細胞組織利用医薬品）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、心筋梗塞などの致命的な疾患、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利用医薬品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、細胞組織利用医薬品の品質、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利用医薬品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。

本研究では、細胞組織利用医薬品等の品質、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) 細胞の同一性・純度・遺伝的安定性評価技術の開発研究、3) 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、4) 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) 細胞組織由来目的生理活性タンパク質の新規体内動態解析法の開発研究、6) 幹細胞や前駆細胞を素材とする細胞組織利用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) Gene Chip を用いた細胞の同一性や遺伝的安定性の評価法の検討を行う共に、マイクロアレイ CGH

を染色体の欠失等の変異の検出に用いるための検討を行った。3) 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、無担体等電点電気泳動と SDS-PAGE の組み合わせた手法の有用性について検討した。4) 細胞由来微量生理活性糖タンパク質の迅速・高感度解析法の開発を目的として、電気泳動ゲルからの糖タンパク質抽出法の改良やリニアイオントラップ型質量分析装置を用いた検討を行った。5) 細胞のがん化指標の有用性確保に関する研究の一環として、PLLA による BALB/cJ マウスの発ガン誘導系を用いて、*in vivo* がん化が起こる前の非常に初期に起こっている変化について解析し、6) 細胞治療の有効成分としての目的タンパク質の分離及び MALDI-TOF-MS の高感度化のために熱応答性磁性ナノ粒子の有用性について検討した。7) 幹細胞や前駆細胞を素材とする細胞組織利用医薬品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った。心筋分化能を有するマウス胚性腫瘍細胞を用いて心筋分化能の特性指標の探索を行った。肝幹細胞の特性指標としてのアネキシンⅢの有用性について肝再生モデルを用いて評価した。ヒト骨芽細胞の年齢による増殖能や分化能の差異について解析した。

## B. 研究方法

### 1. ウイルスのポリエチレンイミンによる濃縮

ポリエチレンイミン (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。

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。

PEI の分子量の違いによるウイルス濃縮効果の違いについて解析するために、分子量 1800 及び 10,000 の PEI を磁気ビーズに結合させ、濃縮効率を比較した。また、他のポリカチオンのウイルス吸着能と比較するためにポリアリルアミン (1 級アミン)、ポリ L-リジンを結合した磁気ビーズを作成した。

### 1. 1 PEI 磁気ビーズにウイルスとともに濃縮される血清中のタンパク質の解析

ウイルスを含む培養上清と PEI 磁気ビーズを反応後、PEI 磁気ビーズに結合したタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分画した。PEI 磁気ビーズにより濃縮された各バンドを切り出してトリプシンを用いて in gel 加水分解後、抽出したペプチドを MALDI TOF-TOF を用いて質量分析した。得られたデータより Mascot システム (Matrix Science 社) を用いたデータベース検索を行い、タンパク質の帰属の推定を行った。

### 1. 2 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。

## 2. 細胞の同一性や安定性の評価手法

### 2. 1. GeneChip を用いた発現解析

#### ①解析に用いた細胞株

国立医薬品食品衛生研究所・細胞バンクより入手したヒト膀胱癌由来細胞株 ECV304 (JCRB0744)、EJ-1 (JCRB0710)、T24 (JCRB0711) を用いた。このうち、ECV304 細胞に関しては、当初臍帯内皮細胞として細胞バンクに登録されたが、その後 STR マーカーを使った解析から EJ-1/T24 細胞と同一であり、クロスコンタミネーションに由来することが判明した細胞である。EJ-1/T24 はヒト膀胱癌より樹立された同一細胞であることが STR 解析により判明している。ECV304 細胞は 10%牛胎児血清入り M199 培地、EJ-1 と T24 細胞は 10%牛胎児血清入り MEM 培地にて培養し、凍結保存されたサンプルの提供を受け、実験に使用した。

#### ②cRNA の調製とハイブリダイゼーション

各細胞約 10<sup>6</sup>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 $\mu$ 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。

### ③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。

### ④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。

## 2. 2. CGHアレイを使った染色体解析

### ①解析に用いた細胞株

#### (TK6)

ヒトリンパ芽球細胞TK6細胞株に、変異原物質KBrO<sub>3</sub> 2.5mMで4時間処理し、得られたtk(チミジンキナーゼ)変異体をtrifluorothymidineで選択した。Tk変異体は、その生成においてtk遺伝子の欠失、若しくはLOHが原因となっており、tk遺伝子を含む

17番染色体上の多型性マーカーを用いて検出を行った。まず、tk遺伝子のエクソン4から7を増幅したのち、多型性マーカーを用いて、tk遺伝子のLOHおよびdeletionを調べ、さらに17番染色体上のSTRマーカーを使い、multiplex PCRを行い、tk遺伝子を含む広い範囲でのLOHの状態を検索した結果、17番染色体上の広い範囲において欠失の可能性があることが判明したS-11およびS-15の2クローンをCGH解析に使用した。

#### (HL60)細胞

ヒト前骨髄球系白血病細胞株HL60細胞およびその亜株として増殖速度が亢進した株であるHL60-RG細胞を使用した。これらの細胞は既に染色体解析およびスタンダードCGH法にて解析が行われ、myc遺伝子の増幅を含む、特定領域の増幅および欠失が起きていることが調べられている。

### ②CGHマイクロアレイ (MAC Array™)

Macrogen社にて開発されたMAC Array™4Kスライドを使用した。これは、Macrogen社の所有する約4000個のヒトBAC DNAクローンをスライドガラス上にduplicateにてスポッティングしたもので、すべての染色体領域を平均1Mb以下の間隔でカバーする。

### ③細胞からのDNAの抽出

上記各培養細胞を遠心分離によって集め、培地を除いた後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。

### ④プローブのラベル化

テストDNAおよび対照ゲノムDNAを各0.5 $\mu$ g使用し、BioPrime DNA Labeling

Kit: (Invitrogen 社) により蛍光ラベル化を行った。この際、解析対象細胞由来 DNA を Cy3 にて、コントロール正常 DNA を Cy5 にて標識した。その後、Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen 社) にてプローブ溶液を精製し、余分な未反応色素等を除いた。最終的にエタノール沈殿にてハイブリ用標識プローブを調整した。

### ⑤CGH アレイへのハイブリダイゼーション

標識化調製したテストおよびコントロール DNA をハイブリ溶液に溶解し、70℃ で 15 min. 加熱変性させた後、37℃ で 60 min. インキュベートした。この間に 40 μl のプレハイブリダイゼーション溶液を、70℃ で 10 分処理後氷冷して変性させ、アレイスライドのスポットエリア上に 40 μl アプライし、室温の湿箱中で 30 min. インキュベートした。H2O を満たしたコプリンジャーの中でカバーガラスを静かに外し、スライドガラスをイソプロパノールで洗った後、550 rpm で 5 min. 遠心乾燥させた。こうしてプレハイブリダイゼーションを行ったアレイスライドに、調製したプローブ溶液 44 μl をアプライし、22 X 30 mm のカバーガラスを静かに掛け、遮光した湿箱中にて 37℃、48~72 hours 振とう (5~10 rpm) しながらインキュベートした。

### ⑥アレイスライドの洗浄

ハイブリダイゼーション後コプリンジャー中にてアレイスライドからカバーガラスを静かに外し、50% formamide, 2X SSC (46℃、15 分)、2X SSC, 0.1% SDS (46℃、30 分)、PN buffer (室温、15 分)、2X SSC (室温、5 分) で順次洗浄した。各濃度のエタノール (70%, 85%, 100%) にて、室温で 1 分間順番に洗浄した後、遠心 (550 rpm, 5 min.) で乾燥させた。

### ⑦スキャニングと解析

GenePix4000B マイクロアレイスキャナーにてマイクロアレイをスキャニングし、アレイイメージを取得し、Cy3,Cy5 各波長の蛍光強度を測定した。蛍光強度の補正を行った後、各スポットにおける Cy3/Cy5 の蛍光強度比を算出し、専用ソフトウェアによる解析を行った。

上記③以降の解析に関しては、CGH アレイの開発元である Macrogen 社にて依頼解析した。

## 3. 細胞由来生理活性タンパク質の解析

### 3. 1 細胞由来タンパク質解析のための細胞培養上清の調製

HL-60RG 細胞を ASF104 (AJINOMOTO 社) 中 37℃ で 2 日間培養し (終濃度約  $9 \times 10^5$  cells/mL)、培養上清を得た。上清 1 L を Amersham 社製、HiTrap Heparin HP カラムに添加し、1.5M 塩化ナトリウムを含む溶出バッファーで吸着画分を回収した。ヘパリンに結合した画分から、Isogen-LS (和光純薬) を用いてタンパク質を沈殿させ、塩等を除いた。

### 3. 2 無担体等電点電気泳動と SDS-PAGE によるタンパク質の分離

脱塩したタンパク質を ZOOM IEF Fractionator (Invitrogen 社) を用いた無担体等電点電気泳動により分画した。得られた各画分を限外濾過により約 10 倍濃縮した。更に 10-20% の グラジエントゲルを用いた SDS-PAGE により分離した。タンパク質の染色は CBB を使用した。

### 3. 3 タンパク質のトリプシンによるゲル内消化

ゲルからスポットを切り出し 30%アセトニトリルを含む 25mM 炭酸水素ナトリウムで脱

色した。アセトニトリル 100  $\mu$ L を加え、室温で 10 分振盪した。アセトニトリルを除いた後、減圧濃縮遠心器で約 20 分ゲルを乾燥させた。乾燥したゲル片に 10mM ジチオスレイトールを加え、56 $^{\circ}$ C, 1 時間振盪して還元した。25mM 炭酸水素ナトリウムで洗浄した後、55mM ヨードアセトアミドでアルキル化した。25mM 炭酸水素ナトリウムで洗浄した後、50%アセトニトリルで脱水し、減圧濃縮遠心器で約 20 分ゲルを乾燥させた。乾燥したゲル片に 25ng/ $\mu$ L トリプシン (Promega 社) 溶液 2ml を直接染み込ませ、更に 0.1%オクチルグリコシドを含む 25mM 炭酸水素ナトリウム 15ml を加え、氷浴下で 30 分間静置ゲルを膨潤させた。ゲルに染み込まなかった溶液を取り除いた後、37 $^{\circ}$ C で一晩インキュベーションした。反応後、ゲル片に 5%トリクロロ酢酸/50%アセトニトリル 50mL を加え、10 分振盪し、上清を回収した。この操作を 2 回繰り返して全ての上清を集め、減圧濃縮遠心器で約 5mL まで濃縮した。0.1%トリフルオロ酢酸 20mL に可溶し、ピペットチップ型カラム ZipTip mC18 (Millipore 社) で脱塩して質量分析用試料とした。

### 3. 4 質量分析とタンパク質の推定

上記抽出液 0.5ml を MALDI target にアプラインし、マトリックスとして  $\alpha$ -シアノ-3-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) の 0.1%トリフルオロ酢酸/50%アセトニトリル飽和溶液を重層した。MALDI TOF-TOF (Applied Biosystems 4700) を用いて質量分析、Mascot システム (Matrix Science 社) を用いたデータベース検索を行い、タンパク質の帰属の推定を行った。

### 4. 細胞由来生理活性タンパク質の高感度構

## 造解析手法の開発

### 4. 1 ラット脳膜画分の調製

ラット脳(生後 3 週齢, 湿重量約 1.4 g)1 匹分当たり冷アセトン 40 ml を加え、ポリトロンを用いて 1,000 rpm で氷冷しながら 1 分間均質化した。遠心分離後(1,000 rpm, 室温, 10 分), 上清を除去し, 再度, 冷アセトン 30 ml を加え, 同じ操作を繰り返した。遠心後, クロロホルム/メタノール混液(2/1, v/v)40 ml を加え, ポリトロンを用いて 1,000 rpm で 1 分間均質化後, 室温で 1 時間放置した。遠心分離後(3,000rpm, 室温, 10 分), 上清を除去し, 再度, クロロホルム/メタノール混液 40 ml を加え, 10 秒間均質化後, 室温で 30 分放置した。遠心分離後, 沈殿をメタノールで 2 回洗浄した。洗浄した沈殿に 0.15 M 塩化ナトリウム, 1 mM EDTA 及び 1 mM PMSF を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.4(均質化用緩衝液)30 ml を加え, ポリトロンを用いて 1000 rpm で 10 秒間均質化を行った。ラット脳 2 匹分をまとめて遠心分離し(10,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 20 分), 再度沈殿に均質化用緩衝液を加え(ラット脳, 2 匹分に対し 20 ml), ポリトロンを用いて 1,000 rpm で 20 秒間均質化後, 10%Triton X-114 を含む均質化用緩衝液 5 ml を加え, 4 $^{\circ}$ C で一晩攪拌し, 膜画分の可溶化を行った。可溶化溶液を遠心分離後(10,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 20 分), 上清を 37 $^{\circ}$ C で 10 分間放置後, 遠心分離し(3,000 rpm, 30 $^{\circ}$ C, 5 分), Triton X-114 相と水相に分離した。得られた Triton X-114 相に均質化用緩衝液を等容量加え洗浄し, 再び 37 $^{\circ}$ C で 10 分間放置後, 遠心分離した(3,000 rpm, 30 $^{\circ}$ C, 5 分)。得られた Triton X-114 相に冷アセトンを 4 倍容加え, -15 $^{\circ}$ C で一晩放置後, 遠心分離し(3,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 30 分), 膜画分を得た。

### 4. 2 可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分

## の調製

得られた膜画分(ラット脳, 2 匹分)を, 50 mM トリス塩酸緩衝液, pH7.4, 0.4 ml に懸濁し, PIPLC(Molecular Probe)1 unit を加え, 37°C で約 18 時間消化した. 50 mM トリス塩酸緩衝液, pH7.4, さらに, 全溶液の 1/4 倍容の 10% Triton X-114 を加え(最終 Triton X-114 濃度, 2%), 0°C に冷却後, よく攪拌した. 反応溶液を 37°C に保温後, 遠心分離し(3,000 rpm, 30°C, 5 分), Triton X-114/水相分離を行った. Triton X-114 相を除いた後, 水相に 10% Triton X-114-トリス塩酸緩衝液 pH 7.4 を 1/4 倍容加えて洗浄した. 水相に冷アセトンを 4 倍容加え, -15°C で一晩放置後, 遠心分離し(3,000 rpm, 4°C, 60 分), 可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分を得た.

### 4. 3 可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分の SDS-PAGE

可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分を 2-メルカプトエタノール及びヨードアセトアミドを用いて, 還元カルボキシアミドメチル化後, 12.5%ゲル(80×80×1 mm)を用いて, 25 mM トリス塩酸塩, 0.19 M グリシン, 0.1% SDS を含む泳動用緩衝液中, 20 mA で泳動させた. 分離された GPI アンカー型タンパク質は, Simply Blue™ SafeStain(Invitrogen)を用いて検出した.

### 4. 4 ゲルからのタンパク質の抽出

SDS-PAGE ゲルより, Thy-1 を含むバンドを切り取り, 低吸着性チューブに移した. 1% SDS を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液, pH 8.0(抽出バッファー)を加え, スパーテルを用いて, ゲル片を細かく砕いた後, 一晩, 激しく振とうした. 得られた抽出液を Ultrafree-MC(0.22 µm, Millipore Corporation)を用いてろ過し, 得られたろ液に 4 倍量の冷アセトンを加え, -15°C で約 2 時間放置した.

15,000 rpm で 15 分間遠心し, 上清を除いた後, 20 mM トリス塩酸緩衝液, pH 8.0 及び 4 倍量の冷アセトンを加え, -15°C で約 2 時間放置した. 再度, 15,000 rpm で 15 分間遠心し, 上清を除いた後, 沈殿を風乾した.

### 4. 5 タンパク質のプロテイナーゼ消化

ゲルより抽出された Thy-1 に, 0.1 M トリス塩酸緩衝液, pH 8.0 及びトリプシン, 1 µg を加え, 37°C で一晩消化した. また, 別途, 5 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.5, 及びエンドプロテイナーゼ Asp-N (和光純薬), 0.4 µg を加え, 37°C で一晩消化した.

### 4. 6 糖ペプチドの解析, LC/MS<sup>n</sup>

抽出された Thy-1 のプロテイナーゼ消化物を用いて, 以下の条件で LC/MS<sup>n</sup>を行った.

#### HPLC :

装置 : Paradigm MS4(Michrom BioResource 社)

カラム : MAGIC C18(Michrom BioResource 社製, 0.2×50 mm, 3µ)

溶離液 A : 0.1% ギ酸を含む 2% アセトニトリル水溶液

溶離液 B : 0.1% ギ酸を含む 90% アセトニトリル水溶液

グラジエントプログラム :

B 液 : 5% (0~10 分)

5~65% (10~50 分)

流速 : 3 µl/min

#### Liner ITMS :

装置 : LTQ(Thermo Electron 社)

イオン化 : nano-ESI

測定モード : ポジティブイオンモード

キャピラリー温度 : 200°C

キャピラリー電圧 : 2.0 kV

スキャン範囲(m/z) : 300-2,000

MS<sup>n</sup>, コリジョンエネルギー : 35%

In-source CID, コリジョンエネルギー: 50 V  
測定メソッド:

- ① Full MS scan( $m/z$  300-2000)
- ② In-source CID( $m/z$  80-500)
- ③ Data-dependent MS<sup>2</sup>
- ④ Data-dependent MS<sup>3</sup>
- ⑤ Data-dependent MS<sup>4</sup>

#### 4. 7 データベース検索(糖ペプチドの検出)

Thy-1 のトリプシン消化物について, LC/MS<sup>n</sup> 分析によりデータ依存的に得られたすべてのプロダクトイオンについて, 検索エンジン TurboSEQUENT(Thermo Electron)を用いてタンパク質同定を行った. 検索に使用するデータベースに, Cys 残基にカルボキシアミドメチル化修飾, また, 可変修飾として, Asn 残基に GlcNAc に相当する 203 Da の分子量増加を加え, 検索を行った.

### 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 動物

5 週齢の雌の BALB/cJ と SJL/J のマウス及び 5 週齢の雄の BALB/cAnCrj-nu ノードマウスを用いた. 標準の固形飼料及び水を自由摂取させた.

#### 5. 2 PLLA の埋植

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

の後, 埋植した PLLA プレートとそれに隣接した場所から皮下組織を摘出し, 培養した. 同時にシャムオペレーションを施した対照群についても, 皮下組織を取り出した.

#### 5. 3 皮下組織の培養と染色

皮下組織は, 10% FBS を添加した minimum essential medium (MEM) で培養した. 細胞が confluent になったら固定し, ギムザ染色を行い, 細胞の形態について検討した.

#### 5. 4 Scrape-loading and dye transfer (SLDT) 解析

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

#### 5. 5 Western blot 解析

直径 60mm の dish に confluent の状態の細胞を直接 100  $\mu$ L の 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) gel loading buffer で溶解した. 細胞溶解物のタンパク質量は, micro-plate BCA protein assay を用いて定量した. 7.5% SDS-PAGE 後, Hybond-ECL nitrocellulose membrane にトランスファーした. Cx43 タンパク質は抗 Cx43 ポリクローナル抗体を用いて検出した.

#### 5. 6 RT-PCR

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

Forward:

5'-ACAGTCTGCCTTTTCGCTCTAAC-3'

Reverse:

5'-GTAAGGATCGCTTCTTCCCTTC-3'

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

### 5. 7 TGF- $\beta_1$ の測定

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

### 5. 8 ノードマウスを用いた腫瘍形成の確認

それぞれの細胞 ( $2 \times 10^6 / 0.2\text{mL}$  PBS) をノードマウスの背部皮下に注入した。その後、腫瘍の形成について観察した。細胞注入後10週間以内に明らかな塊が現れ、その後そのサイズが大きくなったものを腫瘍が形成されたとみなした。腫瘍形成がなされないとの判断は、注入後少なくとも5ヶ月後に行った。

### 5. 9 軟寒天培養法

およそ  $10^5$  の細胞を2mLの0.3%軟寒天培養液で培養した。4週間培養後、*propidium iodide* で48時間染色し測定した。コロニーのサイズが  $10 \mu\text{m}^2$  以上のものを陽性とみなした。

## 6. 細胞が産生するタンパク質の体内動態解析法の開発に関する研究

### ①試薬

ヒトインスリン、血清、ビオチン標識抗マウス免疫グロブリンG (IgG)抗体、抗 $\beta_2$ -ミクログロブリンモノクローナル抗体 (クローン

BM-63由来)、CHCA、ヒトトランスフェリン、ウシ血清アルブミン(BSA)、ポリリジン、ポリグルタミン酸、ポリアルギニン、デキストランおよびポリエチレングリコール (平均分子量3350および8000) はSigma社から購入した。抗インスリンモノクローナル抗体、抗トランスフェリンモノクローナル抗体、ウサギ由来抗トランスフェリン抗体、抗 $\beta_2$ -ミクログロブリンモノクローナル抗体 (クローンGJ14由来)、抗インスリン様成長因子 (IGF) -Iモノクローナル抗体、抗IGF-IIモノクローナル抗体、抗フェリチンモノクローナル抗体、ウサギ由来抗フェリチン抗体、抗腫瘍細胞成長因子 (TGF) - $\beta_1$ モノクローナル抗体、および抗アクチビンAモノクローナル抗体はCosmoBio社より購入した。ストレプトアビジン結合磁性マイクロ粒子、抗マウスIgG抗体結合磁性マイクロ粒子、および抗ウサギIgG抗体結合磁性マイクロ粒子はQIAGEN社より購入した。ビオチン結合熱応答性磁性ナノ粒子 (Therma-Max) はチッソ(株)よりアビジン処理した状態で供与されたものを用いた。ヒトIgG、ポリビニルピロリドン、およびポリエチレングリコール(分子量15,000-25,000, 300,000-500,000, 1,500,000-2,000,000, 3,500,000-4,000,000) は和光純薬から、ポリビニルアルコールはAcros社からそれぞれ購入した。

### ②磁気によるBF分離

10  $\mu\text{l}$  の抗インスリンモノクローナル抗体溶液 (0.1 mg/ml) を1.5 mlチューブにとり、90  $\mu\text{l}$  の抗マウスIgG抗体結合磁性粒子懸濁液を添加して攪拌後、室温で10分間静置した。チューブに磁石を当てながら上清を除去して、得られた粒子に90  $\mu\text{l}$  のトリス緩衝液 (TBS) を添加して懸濁し、10  $\mu\text{l}$  ずつとって0.2 ml

チューブに分注した。90  $\mu\text{l}$  の TBS と 10-90  $\mu\text{l}$  の試料を添加して混和攪拌後、室温で 30 分間静置した。上清を除去し、粒子を洗浄した後、10  $\mu\text{l}$  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。なお、熱応答性磁性ナノ粒子には 37°C 以上に加熱すると凝集する型 (lower critical solution temperature: LCST) と 10°C 以下に冷却すると凝集する型 (upper critical solution temperature: UCST) がある。LCST を用いた場合には、42°C で 30 秒間の加温により粒子を凝集させてから上清を除去した。また、UCST を用いた場合には、氷浴上で 2 分間の冷却により粒子を凝集させてから上清を除去した。

### ③質量分析

分析試料 2  $\mu\text{l}$  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、MALDI TOF MS 装置 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。

### ④シグナル増強作用の検討

シグナル増強剤として、トランスフェリンその他の高分子をミリ Q 水 (脱イオン水) に溶解希釈し、2  $\mu\text{l}$  をとって 10  $\mu\text{l}$  の CHCA 溶液と混合後、さらにインスリン溶液またはその

他の試料溶液 2  $\mu\text{l}$  を添加、混合した。このうち 2  $\mu\text{l}$  を質量分析の試料として、シグナル強度を測定した。また、別の 2  $\mu\text{l}$  をカバーガラスに滴下して、室温で乾燥させ、顕微鏡観察の試料とした。

### ⑤蛍光顕微鏡観察

マトリックス結晶は共焦点レーザー走査顕微鏡 LSM510 (カールツァイス社) でノマルスキー微分干渉像として観察した。また CHCA は蛍光を発するので、アルゴンレーザー ((488nm) で励起し、BP505 蛍光フィルターを用いて観察した。結晶の粒径は、LSM ソフトウェア (V2.5、カールツァイス社) で計測した。

## 7. 血管内皮前駆細胞の特性解析に関する研究

### 7. 1 臍帯血と末梢血から CD31 強陽性血管内皮前駆細胞の誘導とその分離

ヒト末梢血あるいは臍帯血を 2 mM EDTA を含む PBS(-) で 2 倍希釈し、リンフォプレップに重層し、2200 回転、18°C、20 分、遠心することにより単核球分画を分離した。これを、0.5% BSA、2 mM EDTA を含む PBS(-) (分離バッファー) に浮遊させた。さらに遠心により分離バッファーを除去した後、再び 200  $\mu\text{l}$  の分離バッファーに再浮遊させた。AC133 マイクロビーズ分離キット (Milteny Biotec) を使い、キットのプロトコールに従って AC133 陽性細胞を分離した。まず、抗 AC133 抗体結合磁気ビーズと 4°C、30 min で反応させた。陽性細胞の分離は、Auto MACS (Milteny Biotec) を用いて行った。分離した臍帯血と末梢血 AC133 陽性細胞は、20% 牛胎児血清 (FBS)、50 ng/ml VEGF、50 ng/ml TPO、50 ng/ml 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、所定の期間培養した。EPCを分離する為に培養開始1週間後に細胞を回収し、分離バッファーにて洗浄後、抗CD31抗体-FITC (BD Pharmingen社)と4℃、30分、反応させた。ヴァンテージSEにより、CD31強陽性分画をソーティングした。

モノクローナル抗体を用いた磁気ビーズ分画での2次抗体はヤギ抗-マウスIgG-磁気ビーズを、ウサギポリクローナル抗体を用いた磁気ビーズ分画ではヤギ抗-ウサギIgG-磁気ビーズ(Milteny Biotec)を用いた。

## 7. 2 免疫組織染色

ヒト臍帯血及び末梢血由来CD31強陽性細胞やCx37陽性細胞を分離し、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播種し、1-2週間培養した。接着細胞の免疫組織染色は以下の手順で行った。所定の期間培養後、各々の細胞を-20℃のエタノールで固定し、観察する日まで-20℃で保存した。免疫組織染色のため細胞を氷上に静置し、PBS(-)で3回洗った。1%BSA-PBS(-)で4℃、1時間ブロッキングし、各種抗体(抗Cx37抗体、抗Cx40抗体、及び抗Cx43抗体 (Chemicon International Inc.)、抗Lox-1抗体、抗KDR抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)、抗eNOS抗体 (Cayman Chemical)を含む1%BSA-PBS(-)を添加し、4℃、1時間抗原抗体反応させた。接着した細胞を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℃、1時間反応させた。さらに、細胞を洗浄後、共焦点顕微鏡にて観察した。

## 7. 3 細胞の各種表面マーカー発現のフローサイトメーターによる解析

AC133陽性細胞をタイプIVコラーゲン上あるいはFN上にVEGF単独、あるいはTPOやSCF

存在下に培養した。一定期間バイヨした後、細胞を全て回収し、氷上に移した1%BSA-PBS(-)あるいは分離バッファーで4℃、ブロッキングし、それぞれの抗体を含む1%BSA-PBS(-)もしくは分離バッファーを添加し、4℃で抗原抗体反応させた。抗体は抗Lox-1抗体、抗AC133抗体-PE (Milteny Biotec)、抗CD34抗体-FITC (BD Pharmingen社)、抗CD11b抗体-PE (DakoCytomation)、抗CD14抗体-FITC (DakoCytomation)、VE-カドヘリン抗体-PE (Beckman Coulter)、抗Integrin  $\alpha v \beta 3$ 抗体-PE (Chemicon International Inc.)を用いた。抗体希釈液には死細胞を検出・排除するため7-amino-actinomycin (7AAD, BD Biosciences)を1%BSA-PBS(-)もしくは分離バッファーに添加し染色した。細胞浮遊液をPBS(-)で洗浄し、フローサイトメーター(FACS)にて解析した。

## 8. P19細胞由来細胞株の心筋細胞への分化誘導

### 8. 1 各細胞の培養と分化誘導

マウス胚性腫瘍細胞株P19細胞はAmerican Type Culture Collection (ATCC)より、CL6細胞はRIKEN Cell Bankより入手した。未分化な細胞の増殖には、基本培地として非働化ウシ胎児血清(FCS、終濃度10%)と2mM L-Glutamine (SIGMA)とペニシリンG (100unit/ml)及び硫酸ストレプトマイシン(100unit/ml)を含有した $\alpha$  Minimum Essential Medium (aMEM, SIGMA)を用い、直径100mmの細胞培養ディッシュに播種し、5%CO<sub>2</sub>存在下37℃、細胞がコンフルエントにならないように注意しながら培養した。

心筋細胞への分化誘導は、ディッシュ面積にたいして60~70%程度まで増殖させた状態の未分化な細胞を用いて行った。分化誘導処



理としてはまず基本培地を除去し、滅菌したリン酸緩衝生理食塩水(PBS, SIGMA)5mlで2回洗浄し、トリプシン-EDTA(Gibco)1mlで細胞全体を軽くぬらした後、直ちにトリプシン-EDTAを吸引し5%CO<sub>2</sub>存在下37℃で3分間、さらに室温で5分弱反応させた。反応停止のために分化培地(1% DMSOを含む基本培地)10mlを添加した。細胞懸濁液を適当な培養ディッシュに分注したのち、培養開始した。培地は2日おきに交換した。

### 8. 2 CL6細胞サブラインの樹立

マウス $\alpha$ MHCプロモーターを組み込んだpBluescript SK(+)ベクターはJeffery Robbins博士(Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, U.S.A.)から供与を受けた。 $\alpha$ MHCプロモーター配列の下流にあるmultiple cloning siteに、pEGFPベクター(Clontech)由来のgreen fluorescent protein(GFP)コード配列を導入したベクターを作成した。このベクターとNeomycin耐性遺伝子をもつベクターであるpcDNA3.1(+)をLipofectamine2000(Invitrogen)を用いてCL6細胞に同時導入し、Geneticine(G418, Sigma)でスクリーニングすることで、Neomycin耐性遺伝子を含むCL6細胞サブラインを複数得た。GFPの発現は細胞株をDMSOにより分化誘導した後、ARVO sx 1420 MULTILABEL COUNTER(Perkin Elmer)を用いてGFPの蛍光を測定することにより評価した。

### 8. 3 細胞株の違いによる心筋分化の相違

P19細胞とCL6細胞、Neomycin耐性遺伝子を含むCL6細胞サブラインのCL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52の6種類を心筋分化誘導処理し、6well細胞培養用マルチウェルプレート(Costar)に $1 \times 10^5$  cells/wellの密度で蒔いた。これを5%CO<sub>2</sub>存在下37℃分化培地中で培養し、培

地は2日おきに交換した。2日ごとにコロニーの収縮開始日、大きさ、数をCKX41またはCKX31培養顕微鏡(OLYMPUS)を用いて観察した。

### 8. 4 心筋分化マーカー遺伝子発現の測定

P19細胞とCL6細胞、Neomycin耐性遺伝子を含むCL6細胞サブラインのCL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52の6種類を心筋分化誘導処理し6well細胞培養用マルチウェルプレート(Falcon)に各細胞株6枚ずつ、 $1 \times 10^5$  cells/wellの密度に播種した。これを5%CO<sub>2</sub>存在下37℃分化培地中で培養し、培地は2日おきに交換した。8日目、12日目、16日目、20日目にSV Total RNA Isolation system(Promega)を用いて各細胞の回収とTotal RNAの抽出を行った。ポジティブコントロールとして9週齢の雄のC3H/He系マウスより心室筋を単離し、Sepazol(Nacalai Tesque)によりTotal RNAを抽出した。抽出した後に、TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagent(Applied Biosystems)と心筋細胞マーカー遺伝子特異的なTaqManプローブおよびABI Prism 7000 Sequence Detection Systemを使用して、RNA中の心筋細胞マーカー遺伝子の発現を定量的RT-PCRにより測定した。定量した心筋細胞マーカー遺伝子としては、心筋線維遺伝子としてMLC2a(ミオシン軽鎖2a)、MLC2v(ミオシン軽鎖2v)、 $\alpha$ MHC( $\alpha$ ミオシン重鎖)、 $\beta$ MHC( $\beta$ ミオシン重鎖)、心筋分化関連転写因子としてNkx2.5、GATA 4、MEF2Cを選択した。これらに加えて、各遺伝子の発現量を補正するために18S rRNAの発現量の測定を行った。補正したマーカー遺伝子のmRNA発現量は、統計ソフトウェアSYSTATにより主成分分析した。

### 8. 5 DNAマイクロアレイによる発現解析

P19細胞とCL6細胞、Neomycin耐性遺伝子

含むCL6細胞サブラインのCL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52の6種類について、分化誘導前に、細胞がコンフルエントにならないように注意しながらRNeasy Midi(QIAGEN)を用いてtotal RNAを抽出し、さらにRNeasy Mini(QIAGEN)を用いて不純物を除去した。

GeneChip (Affymetrix)により遺伝子発現を網羅的に解析するために、Affymetrix社のマニュアルに従い各RNAサンプルからcDNAを合成し、次いでcDNAをもとにしてビオチン化cRNA断片を合成した。GeneChip Hybridization Ovenを用いてビオチン化cRNA断片をGeneChipにハイブリダイズさせ、次いでハイブリダイズしたcRNAをGeneChip Fluidics Stationを用いてPE標識ストレプトアビジンで染色することにより可視化し、GeneChip Scanner 3000でスキャンした。得られた蛍光データはGCOSソフトウェア(Affymetrix)で解析した。GeneChipはMOE430A (Sequence Tag数22,626)とMOE430B (Sequence Tag数22,511)を用いた。抽出された遺伝子からシグナルの高い方から2%および低い方から2%を除き、残りのSequence Tagの平均値がデフォルトで500になるように補正した。これに次に示すような①から④のフィルターをかけて、各細胞株の心筋細胞分化と相関のある遺伝子を抽出した。

#### フィルター①

GCOSで解析された各Sequence TagのシグナルはAbsolute Analysis (発現の有無を判定する解析)の結果「発現があるもの:P (Present)」、「発現があるかわからないもの:M (Marginal)」あるいは「発現がないもの:A (Absent)」として判定がなされる。細胞株各群の5例の半数以上(つまり3例以上)でPと判定されたSequence Tagについては、当該細胞株においてそのSequence

Tagの塩基配列を含む遺伝子が発現していると判断した。逆に各群の5例のうちP判定されたものが2例以下の場合は当該細胞株においてそのSequence Tagの塩基配列を含む遺伝子の発現はないと判断した。細胞株のうち少なくとも1株以上において発現が見られるSequence Tagは次のフィルターをかけ、全ての細胞株で発現が見られないSequence Tagは除外した。

#### フィルター②

分散分析(ANOVA)で細胞株間の遺伝子発現の平均値の比較を行い、有意水準5%の条件で帰無仮説が除外できたもの、すなわち6細胞株の中で発現量が有意に異なる細胞株が少なくとも1つは存在する結果が出たSequence Tagは次のフィルターをかけ、全ての細胞株で有意な差が現れなかったSequence Tagは除外した。

#### フィルター③

細胞株間の遺伝子発現の差の平均値が50%以上のあるもの、すなわち6細胞株の最低の平均値と最高の平均値の差が2.5倍以上出るSequence Tagは次のフィルターをかけ、差が2.5より小さいものは除外した。

#### フィルター④

GeneChipで得られた各Sequence Tagの発現シグナルと自動拍動能出現までの日数、自動拍動する細胞コロニーの数、定量性リアルタイムRT-PCRによって得られた心筋遺伝子発現データの第1主成分もしくは第2主成分との間でスピアマンの順位相関係数を算出、有意水準5%の条件で有意差を検定し、有意な相関の認められたSequence Tagを抽出した。

## 9. 肝幹細胞の特性指標に関する研究

### ① 実験動物

F344系雌ラットを9週齢で購入し、1週間

予備飼育をした。飼料として CLEA Rodent Diet CE-2 を用い、オートクレーブしたイオン交換水を飲料水としてそれぞれ自由に摂取させた。飼育は 22±2℃、12 時間の明暗期（明期 8・20 時）の条件で行った。

## ②肝再生モデル動物の作製

2-AAF を最小容量の DMSO に溶解後、終濃度が 2 mg/ml となるように corn oil に懸濁させた。CCl<sub>4</sub> は 5 倍量の olive oil と混合した。肝幹細胞分化誘導モデルラットとして 2-AAF+CCl<sub>4</sub> 群を設定し、エーテル麻酔下で 1kg 体重当り 10 mg の 2-AAF を 5 日間経口投与した。5 日目には 2-AAF 投与 1 時間後に 100g 体重当り 55 μl の CCl<sub>4</sub> を経口投与した。その後 2-AAF の投与は毎日同様に続け、CCl<sub>4</sub> 投与 2 日後、3 日後、4 日後に屠殺した。対照群として、2-AAF 群、control 群を設定した。2-AAF 群は 2-AAF+CCl<sub>4</sub> 群の CCl<sub>4</sub> 投与の代わりに vehicle として olive oil を投与し、control 群は 2-AAF+CCl<sub>4</sub> 群の 2-AAF 投与と CCl<sub>4</sub> 投与の代わりに vehicle として、それぞれ corn oil、olive oil を投与した。そして、それぞれ 2-AAF+CCl<sub>4</sub> 群の CCl<sub>4</sub> 投与後 3 日目に相当する日に屠殺した。

## ③ラットの解剖

ラットはネブタール麻酔下で、四肢を解剖台にビニールテープで固定した。次に 頸静脈から採血をして、門脈にカニューレションをした後、冷 PBS (-) を注入し、下大静脈と大静脈を切断して肝臓を灌流した。

## ④組織の固定、包埋と薄切

PBS (-) 灌流後に摘出した肝臓は、適度な大きさに切断後、4 %パラホルムアルデヒド/PBS (-) 溶液中 4℃で固定した。固定後の臓器は包埋カセットに入れて、1 時間以上流水中で洗浄し、70%、80%、90%、100%エタノール

を用いて氷上で振とうしながら各々 1 時間 30 分以上脱水処理を行った。最後のエタノール処理の後、脱水 エタノールに入れ替えて一晚 4℃で脱水処理を行った。脱水後のエタノールを 3/4 捨て、残ったエタノールに対し約 3 倍量のトルエンを入れて、30 分間室温で振とうした。その後新しいトルエンに交換して、30 分間室温で振とう処理を 2 回行い、予め 65℃のウォーターバスで溶解したトルエン：パラフィン (1:1) の中にカセットごと移し変えた。パラフィン溶液を新しいパラフィン溶液に入れ替えた後、水浴中で 30 分 65℃静置するという操作を 3 回繰り返す、型を用いて包埋した。包埋した試料はマイクロームで 3 μm の厚さに薄切し、MAS コートスライドグラスに乗せて 37℃で一晩乾燥後、4℃で保存した。

## ⑤肝組織像の観察

切片を乗せたスライドグラスを染色籠に入れ、染色バットを用いて次の操作を行った。まず、トルエンで 10 分間処理を 2 回行い、脱パラフィンした。次に、100%エタノールで 3 分処理し、続いて 100%、90%、70%エタノールで 5 分処理した。その後、2 倍法マイヤーヘマトキシリンで 7 分処理して核を染色し、流水洗浄を約 17 分行って色出しを行った。さらに、1%エオジンで 2 分 30 秒間処理し細胞質を染色した。純水で洗浄後、70%、90%、100%エタノールで数秒間処理した後 100%エタノールで 2 分間処理し、トルエンで 5 分間、10 分間処理後標本封入剤で封入し光学顕微鏡 ECLIPSE E400 (Nikon) を用いて観察した。

## ⑥アルブミン、AnxA3 の免疫組織染色

切片を乗せたスライドグラスを染色籠に入れ、染色バットを用いて次の操作を行った。まず、キシレンで 5 分間処理を 3 回行い、脱パラフィンした。次に、100%エタノールで 5 分

間2回処理し、続いて90%、70%エタノール、超純水、TBSの順にそれぞれ5分間処理した。その後、10 mMクエン酸ナトリウムbuffer (pH 6.0) 中で95℃、5分間処理を2回行い、室温の10 mMクエン酸ナトリウムbuffer (pH 6.0) に移して20分間冷却した。その後、超純水で2分間処理後同様な操作を繰り返し、切片の周りを防水ペンで囲みTBSを10% 正常マウス血清と混合した溶液を用いて1時間室温の湿潤箱中でブロッキング反応を行った。ブロッキング終了後、血清を回収し、1% TBS-Tween 20 (1% TBS-T) で5分間3回洗浄操作を行い、1次抗体としてGoat anti-rat albumin IgGとRabbit anti-human AnxA3 serumを1%マウス血清含有TBSに添加して希釈した溶液を用い、1時間室温の湿潤箱中で静置した。その後、1% TBS-T で5分間3回洗浄した。次に、2次抗体としてCy3-conjugated mouse anti-goat IgG とFITC-conjugated sheep anti-rabbit IgG を1%マウス血清含有TBSに加えて希釈した溶液を遮光した湿潤箱中で添加し、30分間室温で静置した。その後、1% TBS-T で5分間3回洗浄した。最後に標本封入剤で封入して、蛍光顕微鏡Axioplan 2 and Axiophot 2 Universal Microscopes下でデジタルカメラAxio Cam MRm を用いて観察し、解析ソフトAxio Vision 3.1.2 を用いて解析した。

## 10. ヒト骨芽細胞の増殖能と分化能に関する研究

### ① 細胞の培養

採取年齢の異なる [生後1日 (1D), 16才 (16Y), 41才 (41Y)] 正常ヒト骨芽細胞 (Normal Human Osteoblast : NHost cells, ) は、10% fetal bovine serum (FBS) を含む

$\alpha$ MEM (GIBCO) 培地で培養した。 $2 \times 10^6$  cells/ml の細胞懸濁液 20  $\mu$ l を 24 well multiplate の各 well の中央にスポット状に播種した。細胞が接着した後、分化誘導培地 1ml を静かに添加し、14日間培養した。

### ② 細胞増殖

NHost cells の増殖は、Tetracolor ONE (Seikagaku Co., Tokyo, Japan) を用いて測定した。2週間培養後、2% TetraColor ONE を含む  $\alpha$ MEM 培地 1ml と交換して、2時間、37℃でインキュベートし、450nm (対照波長 600nm) での吸光度を測定して、細胞の増殖度を求めた。

### ③ 細胞溶解液の調整

2週間培養した NHost cells の総タンパク質量、alkaline phosphatase (ALPase) 活性は以下の方法に従って、細胞溶解液を用いて測定した。細胞を PBS で洗浄し、nonidet P-40 を含む 0.25 ml PBS を各 well に添加し、37℃でインキュベートした。懸濁液をホモジナイズした後、遠心を行った。この上澄み液を細胞溶液として、総タンパク質量は、Bio-Rad protein assay (protein assay, Bio-Rad Lab.) 法により、595nm の吸光度を EIA READER を使って測定した。細胞溶解液は、測定まで -20℃で保存した。

### ④ ALPase 活性

細胞溶解液の ALPase 活性は、以下の方法で測定した。細胞溶解液 50  $\mu$ l に、 $MgCl_2$  を含有する 0.1 M carbonate buffer (pH 10.2) 0.5 ml 及び p-nitrophenylphosphate 0.5 ml を加えて、30分間反応させ、NaOH 2ml を加えて反応を停止した後、410nm での吸光度を測定して求めた。

### ⑤ Calcium content

細胞内の石灰化度は、細胞をPBSで洗浄後、