

HCl水溶液0.4 mlを各wellに添加し、静置して、塩酸抽出液を得た。塩酸抽出液10 μ lに monoethanolamine buffer (pH 11.0) 1mlを加え、つぎにo-cresolphthalein complexonと 8-hydroxyquinolineを含む発色試薬100 μ lを加えた。室温で反応後、570nmでの吸光度を測定し、細胞当たりのカルシウム含量を定量した。

1 1. 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、ウイルス検出手法の高感度化を目的として PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法を開発し、広範なウイルスを濃縮可能であること、濃縮したウイルスゲノムを核酸増幅法 (NAT) で検出することにより、ウイルスの高感度検出法が可能であることを明らかにしてきた。表 2 にこれまでに検討したウイルスと PEI 磁気ビーズによる濃縮の可否を示す。しかしながら、PEI 磁気ビーズによるウイルスの濃縮機構については十分解明されていない。PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮の分子機構が明らかになれば、より最適な条件を設定することによって濃縮効率のさらなる向上が期待される。また、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮は一部の非エンベロップ

ウイルスの濃縮には有効でないが、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮機構が解明されることで、非エンベロップウイルスを濃縮するための条件も明らかになる可能性がある。そこで、今年度は、PEI 磁気ビーズによるウイルスの濃縮機構について検討した。

まず、はじめに磁性粒子に結合している PEI の分子量の違いがウイルスの濃縮効果に及ぼす影響について検討した。分子量 70,000、10,000、1,800 の 3 種類の PEI を結合させた磁気ビーズをそれぞれ作製し、モデルウイルスとして単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) の濃縮を試みたところ、分子量 70,000 の PEI 磁気ビーズでは非常に高い濃縮効率が見られるが、分子量 1,800 の PEI 磁気ビーズでは濃縮効率が劣ることが明らかとなった (図 1)。これは他のモデルウイルスでも同じ結果であった (データは示さず)。また、濃縮時の pH がウイルスの濃縮効率に与える影響を検討した。その結果、どのウイルスの場合にも、pH6 付近において最も高い濃縮効率が見られることが明らかとなった (図 2)。また、PEI 以外のカチオン性ポリマーとしてポリアリルアミン (PAA)、ポリ-L-リジン (PLL) を結合した磁性粒子についてもウイルスの濃縮を検討したが、モデルウイルスとして用いたアデノウイルス、HSV-1、PPV、SV-40 のいずれの場合も PEI による濃縮効率が最も高いことが判明した (図 3)。ポリアリルアミン (MW >150,000) は 1 級アミンのみ、ポリ-L-リジン (MW >300,000) は 1 級、2 級アミンであるが、PEI (MW 70,000) は 1 級アミン、2 級アミン、3 級アミンのいずれも存在する (図 4)。以上の結果より、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮では陽荷電の密度が高いほど濃縮効率が高いこと、また 1 級アミンのみならず 2

級あるいは 3 級アミンがウイルスの濃縮に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

次に、PEI 磁気ビーズを用いて血清成分存在下でウイルスを濃縮する際、ウイルスと共に濃縮される分子について検討した。PEI 磁気ビーズ結合分画と濃縮前のタンパク質について、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で比較検討した結果、複数のタンパク質が PEI 磁気ビーズ上に濃縮されることを見いだした (図 5)。そこで、PEI 磁気ビーズ上に濃縮された分子を同定するために、濃縮画分を SDS-PAGE により分離後、得られた各バンドを切り出し、トリプシンを用いて加水分解した後、各分解物を抽出精製した。質量分析により各バンドの同定を行ったところ、血清中の補体第 3 成分や第 4 成分、セルロプラスミン、IgM 等がウイルスと共に濃縮されることが明らかとなった (図 5)。この結果より、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮時に免疫複合体を形成させることでさらなる濃縮効率の向上が得られる可能性が示唆された。

そこで PEI 磁気ビーズで濃縮できなかったポリオウイルスを取り上げ、免疫複合体を形成させることにより濃縮できないか検討してみた。図 6 に示すように、抗ポリオウイルス単クローン抗体を添加して PEI 磁気ビーズ濃縮を行うと、少し濃縮されるが、さらに抗マウス IgG モルモット IgM 抗体を添加すると顕著な濃縮効果が認められた。

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

凍結融解した ECV304、EJ-1、T24 の各細胞を、新鮮な MEM 培地にて培養後、2 継代目の細胞を位相差顕微鏡にて撮影した写真を図 7 に示す。この 3 種の細胞は図 8 に示すよう

に 9 種 STR マーカーを使った解析から遺伝的には同一起源である事がわかっているが、その外見は異なっている。EJ-1 細胞はその輪郭が他の細胞よりも明瞭であり、より扁平な形態をしている。これら細胞において発現されている遺伝子を、GeneChip を用いて網羅的に解析し、2 種の細胞どうしを比較した結果を図 9 に示す。両者の細胞にて判定が absence call になった遺伝子は除いてスカッタープロットしたが、同一起源の細胞であるにも関わらず、細胞間で発現強度が異なる遺伝子が多く見られた (表 3)。全体として T24 細胞における発現が高く ECV304 と EJ-1 が比較的近い発現を示した。次に、これらとは起源の異なるヒト前骨髄芽球細胞株 HL60 とヒトリンパ種細胞株 TK6 遺伝子の定常状態での遺伝子発現データとの比較を同様に比較したところ、由来の異なる細胞とはより発現の差が大きかった。すべての細胞にてデータが得られた遺伝子に関して、その発現強度の相関係数を計算して見ると、表 4 のように、膀胱由来の細胞株同志では相関が高いことがわかる。また、HL60-RG 細胞は HL60 細胞由来の細胞株であり、HL60 と高い相関を示した。TK6 と HL60-RG 細胞は由来が異なるが、増殖速度が速いという性質および同じ血球系の細胞であることを反映してか、高い相関が得られた。

このように、同種の細胞間での発現は全体として類似した傾向を示すが、個々に見ると発現が異なる遺伝子は多く存在する。その一例として、公開データベース上の、EJ-1 と T24 のデータを検討したところ、図 10 に示すように、FXFD domain containing ion transport regulator 2 と Keratin19 という遺伝子が見つかった。前者は EJ-1 のみで、後者

は T24 のみで発現している遺伝子であり、我々のデータに関してこれら遺伝子の発現を調べたところ、表に示すように EJ-1 と T24 で全く同じ傾向が得られた他、ECV304 では、FXVD domain containing ion transport regulator 2 に関しては EJ-1 と T24 の中間的な値、Keratin19 については EJ-1 と類似した低い発現を示した。これらの結果は、例え遺伝的に同一起源の細胞であっても、エピジェネティックなファクターにより特定遺伝子の発現強度は大きく変化しうることを示している。

2. 2 CGH アレイを使った染色体解析

TK6 細胞の tk 変異体の 17 番染色体上の STR マーカーによる LOH の解析結果を S-11 と S-15 に関して検討した結果を図 1 1 に示す。いずれの場合にも、tk 遺伝子の正常側アレル由来のシグナルが消失していた。さらにコントロールである β グロビンの遺伝子由来のシグナルとの比較により、LOH はリコンビネーションではなく、欠失によるものであると考えられた。次に、この欠失による LOH が 17 番染色体のどれぐらいの領域に渡っているかを調べるため、17 番染色体上の 10 種の STR マーカーを使って multiplex PCR を行い、その存在状態をしらべた結果を図 1 2 に示す。S-11 においては tk を含んでテロメア側の 4 マーカーおよび短腕の 1 マーカーに、S-15 においては長腕末端側 6 マーカーに LOH が確認され、この部分の欠失があると考えられた。

次に、HL60、およびその垂株である HL60-RG 細胞株に関しては、すでに以前にメタフェーズを用いた CGH 法による解析が行われていたが、今回マイクロアレイを用いた CGH 法によりさらに詳細に検討を行った。

CGH 解析においては、染色体上の位置がわ

かっている BAC クローン約 4000 種をスポットティングしたマイクロアレイを用い、細胞株由来 DNA をヒト正常 DNA (男性由来) と競合的にハイブリダイズさせた。この際、細胞株由来 DNA を Cy3 色素で、正常由来 DNA を Cy5 色素にて蛍光ラベルしているため。図 1 3 に示したハイブリパターンにおいて、細胞株にて増幅している部分では Cy3 が多くハイブリして緑色に、欠損している部分は Cy5 が多く赤色に見える。この画像を数値化し、各蛍光強度の値を標準化して補正後、それぞれの強度の比をとり染色体全領域に関してグラフに表したのが図 1 4 である。HL60 および HL-60RG 株では、すでに知られている 8q23.12-13 領域に存在する myc 遺伝子の増幅が確認できる他、共通した変化として、5 番、9 番、10 番、14 番、16 番、17 番染色体の一部および Y 染色体全領域の欠失および 13 番染色体の部分増幅が認められた。一方、HL60 特異的变化として、6 番染色体の一部と 18 番染色体全域の増幅が、HL60RG 細胞特異的变化としては、13 染色体の部分増幅が見つかった。さらに染色体ごとに詳細な比較を行ない、TK6 (S15) と HL60 細胞の比較により、変化が見られた染色体を図 1 5 に示す。バックグラウンドのシグナルはある程度の振れ幅を示すが、これはほぼ赤線のラインである $2^{0.25}$ 、約 1.2 倍以内に収まっており、異なる細胞においてもほぼ同じばらつきを示したことより、それぞれのプローブの特性を反映した固有のばらつきであると言える。よって、異種細胞どうしの比較により変化の見られる領域がより明確となり、HL60 と TK6(S15)との比較では、HL60 において、5q11.2-5q31.1、9p23-9p21.1、10pter-10p12.1、17pter-17p11.2 の欠失と 8q24.13-8q24.21 の増幅が、TK6-S15 細胞に

において、tk 遺伝子を含む 17q23.3-17qter の欠失が確認できた。また、6 番染色体に関しては、全体として HL60 細胞に増幅傾向が見られた。TK6 細胞の欠失領域に関しては、S-11 と S15 クローンどうしの比較では S11 における欠失が明らかではなかったが、HL60 細胞との比較で長腕末端部までの欠失が確認できたことより、両者のシグナルが重なる 17q25.1 から末端部までの欠失が起きていると考えられる。この結果は、事前に 17 番染色体上の STR マーカーを使ってしらべた LOH 領域の検索結果と一致し、さらにその領域を詳細に限定することができた。また、S11 クローンにおいて STR マーカーより予想された短腕部における欠失も、17pter-17p13.2 の領域に確かに存在することが明らかとなった。

図 16 に STR マーカーで予測された欠失の領域と CGH アレイの結果を示す。また、両者の比較より、S15 クローンにおいて X 染色体短腕末端部の増幅が検出された (図 17)。

TK6 細胞の核型に関しては既に Spectral Karyotype (SKY) 解析を行っており、13 番染色体のトリソミーおよび $t(14; 20)$, $t(3; 21)$ の転座があることがわかっている。この転座に伴う染色体の増減は SKY 解析からははっきりしなかったが、今回の CGH 解析の結果から、3q22.1-3qter、および 20q11.21-20qter 領域の増幅を伴っていることが明らかとなった (図 18)。

HL60 および HL60-RG 細胞に関しても同様な SKY(m-FISH) 解析および染色体標本を用いた CGH 解析を行い核型の分析をしており、その結果を図 19 に示す。CGH の結果より予想された変化はすべて今回のアレイ CGH 法で検出されており、その変化領域に関して詳細な情報が得られた (図 20)。

HL60 と HL60-RG 細胞間では、メタフェーズ CGH 法で HL60 細胞における 6 番染色体の部分的な増幅が示唆されたが、アレイ CGH 法の結果は、短腕、長腕末端部の一部でのみ増加が認められた。ただし、TK6 細胞との比較では 6 番染色体全域に増加傾向が認められている (図 15)。

また、10 番染色体と 11 番、13 番染色体の転座様式にも差が見られるが、10 番染色体短腕末端部で欠失している領域は RG 細胞の方が多く、11 番短腕では RG のみに欠出が認められた。13 番染色体については、全体に増加傾向が見られるが、これは 13 番トリソミーを持つ TK6 細胞と共通している。ただし、RG 細胞ではセントロメア近傍は正常であり、メタフェーズ CGH の結果とも一致する。この結果より、HL60 細胞の短くなっている 13 番染色体が重複部分で、短腕が 9 番末端に長腕が 10 番染色体上に転座したと予想した。一方、RG 細胞にて重複している部分は、10 番染色体に転座している部分で、これは HL60 での転座部分よりも少ないと予想される。

次に、18 番染色体に関しては、HL60 でトリソミーになっている影響で、全体として高い値を示している。ただし、トリソミー細胞は 100% ではないため、理論値 1.5 倍 ($\log_2 \text{Ration} = 0.58$) よりも低い値となっている。この他、図には示していないが、メタフェーズ CGH 法で、HL60 細胞に認められた欠失領域は 14q23.3-14q31.1 で、このうち 14q24.3-14q31.1 の領域に関して RG 株と差がみられることがわかった。この他、RG 株における 21 番染色体の部分欠失も確認できた。

3. 細胞由来タンパク質の無担体等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせたプロファ

イリング技術の開発

多くのサイトカインや増殖因子はヘパリン結合性を持っている。これは多くが塩基性タンパク質であるためと考えられている。このような塩基性の性質のために、多くのサイトカインや増殖因子がゲル等電点電気泳動での分離能を超えているために、2次元電気泳動による網羅的解析が困難である。そこで、無担体等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせてサイトカインや増殖因子の網羅的解析が可能か検討した。図 2 1 に培養上清中のヘパリンへの親和性の高いタンパク質を液相の等電点電気泳動と SDS-PAGE で分離した泳動像を示した。図中の数字は、塩基性タンパク質に着目して、その同定を行うために質量分析で解析したバンドを示した。MS/MS 分析で推定されたタンパク質を図の下段に示した。*印を付した 2 つのタンパク質は、血球系細胞に特異的な生理活性タンパク質であった。

4. 細胞タンパク質プロファイル評価技術の開発

4.1 ラット脳 Thy-1 トリプシン消化物の分析

ラット脳の膜画分を Triton X-114 を用いて可溶化した後、Triton X-114 の温度依存性相分離と膜画分の PIPLC 消化を組み合わせた手法を用いて、可溶性 GPI 結合タンパク質群を得た。この GPI 結合タンパク質群を SDS-PAGE によって分離した(図 2 2)。Thy-1 の分子量に相当する 20~25 kDa のバンドを切り取り、ゲルを細かく砕いた後、1% SDS を含む緩衝液でタンパク質を抽出した。アセトン沈殿によってタンパク質を回収した後、トリプシン消化を行った。その消化物について、実験 6)に準じて、liner ITMS を用いた連続スキャン分析(full mass scan, in-source CID を用い

た full mass scan, 及びデータ依存的 MSⁿ)を行った。図 2 3 A は、トリプシン消化物の full mass scan で得られたトータルイオンクロマトグラム(TIC, m/z 300-2,000)である。

① データベース検索

データ依存的 MSⁿ 分析で得られたすべてのプロダクトイオンを用いてデータベース検索を行った結果、このタンパク質は Thy-1 であることが確認された。しかし、通常の検索方法では、糖ペプチドを特定することはできなかった。検索に使用するデータベースに、結合糖鎖に関する情報を加えることによって、糖ペプチドが同定できることが報告されている。そこで、使用するデータベースに、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、再度検索を行った結果、その結果、先のペプチド同定の結果に加え、新たに、3.41, 3.45, 3.75, 及び 3.96 分に検出されたペプチドは、Asn98 に 203 Da が付加されたペプチド Val89-Lys99 であることが明らかになった。また、34.23, 及び 34.52 分に検出されたペプチドは、Asn74 に 203 Da が付加されたペプチド Val69-Lys78 と同定された。

② Asn74 結合糖鎖の解析(Val69-Lys76)

図 2 4 は、データベース検索で Val69-Lys78 と同定された糖ペプチド(m/z 1,512.21²⁺, 検出時間 34.52 分, 測定範囲 m/z 405-2,000)の MS² 及び MS³ プロダクトイオンスペクトルである。図 2 4 B にデータベース検索で同定された peptide (Val69-Lys78)+GlcNAc(m/z 1,310⁺)をブリーカーとしてデータ依存的に MS/MS 測定して得られたプロダクトイオンスペクトル(m/z 1,512.21²⁺の MS³ プロダクトイオンスペクトルに相当)を示す。Val69-Lys78 から予想されるフラグメントイオンの理論値と一致する

b, 及び y イオンが検出されていることから, 確かに Val69-Lys78 であることが確認された.

このペプチドに結合している糖鎖の単糖組成は, プリカーサーイオンから算出された糖ペプチドの分子量 3,022.40 から, ペプチド Val89-Lys99 の理論分子量 1,106.72 を差し引いた値 1,933.79 Da から, dHex₂Hex₅HexNAc₄ と推定された. この糖鎖には, Fuc が 2 分子結合していることが明らかとなった.

Fuc の結合位置を決めるため, このプロダクトイオンスペクトルを精査したところ, dHex₁Hex₁HexNAc₁ 及び dHex₂Hex₂HexNAc₁ に相当する B_{2α}⁺(*m/z* 512⁺), 及び B_{3α}⁺(*m/z* 674⁺) が検出されていることが判った. これらのイオンから, 結合する 2 分子の Fuc のうち, 少なくとも 1 分子は, ルイス a/x 構造 Gal-(Fuc-)GlcNAc-Man, または, 血液型 H 抗原構造 Fuc-Gal-GlcNAc-Man のように, 非還元末端側に結合していることが示唆された. 本糖ペプチドの 3 価のプリカーサーイオン(*m/z* 1,008³⁺)のプロダクトイオンスペクトル(測定範囲 *m/z* 265-2,000)に, Fuc が結合した二糖の B_{2α}/Y_{5α}⁺(Fuc-GlcNAc⁺, *m/z* 350⁺)が検出されたことから(データ示さず), この Fuc はガラクトースではなく, ルイス a/x 構造のように GlcNAc に結合していることが判った. また, ペプチドに dHex₁HexNAc₁, dHex₁HexNAc₂, 及び dHex₁Hex₁HexNAc₂ が結合した Y_{1α}⁺(*m/z* 1,456⁺), Y_{2α}⁺(*m/z* 1,660⁺), 及び Y_{3α/β/3γ}⁺(*m/z* 1,822⁺)が検出されたことから, 残りの Fuc は, トリマンノシルコア構造の還元末端側の GlcNAc に結合していることが明らかとなった.

さらに, この糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルには Y_{3γ}²⁺(*m/z* 1,411²⁺)が検出されたことから, 非還元末端側に未置換の HexNAc

が存在することが明らかになった. この未置換 HexNAc は, Y_{3α/1β/3β}²⁺(*m/z* 940²⁺)が検出されたことから, トリマンノシルコア構造の Man にβ1-4 結合する bisecting GlcNAc であることが示唆された.

以上のことから, 34.52 分に検出された *m/z* 1,512.21²⁺のイオンは, 図 2 4A 中の図に示すようなハイブリッド型糖鎖に由来するイオンであることが明らかとなった.

また, 34.52 分に検出された糖ペプチド(*m/z* 1,512.21²⁺, 検出時間)付近のプロダクトイオンスペクトルを調べることによって, 糖鎖に特徴的な B イオンを含む糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを複数得ることができた. これらの糖ペプチドプロダクトイオンスペクトルについて解析を行った結果, Asn74 に結合している糖鎖は, 高マンノース型糖鎖(M5), 部分構造として, コアフコース, bisecting GlcNAc, 及びルイス a/x 構造又は H 抗原構造を持つコンプレックス型糖鎖, 及びハイブリッド型糖鎖であることが明らかとなった (表 5).

③ Asn98 結合糖鎖の解析(Val89-Lys99)

データベース検索の結果, Asn98 を含むペプチド Val89-Lys99 は 3.41, 3.45, 3.75, 及び 3.96 分に溶出されていることが判った. 図 2 5 は糖ペプチド(*m/z* 1,525.78²⁺, 検出時間 3.47 分)のプロダクトイオンスペクトルである. 結合糖鎖の単糖組成は, プリカーサーイオンから計算された糖ペプチドの分子量 3,049.54 から, ペプチド Val89-Lys99 の理論分子量 1,117.54 を差し引くことによって得られた糖鎖分子量 1,950.01 Da から, dHex₁Hex₆HexNAc₄ であると推定された.

プロダクトイオンスペクトルには, dHex, Hex, 及び HexNAc の *m/z* 値に相当する間隔で

多数の Y イオンが検出された。dHex の結合位置は、ペプチドに dHex₁HexNAc₁, dHex₁HexNAc₂, 及び dHex₁Hex₁HexNAc₂ が結合した Y_{1α}⁺(*m/z* 1,467⁺), Y_{2α}⁺(*m/z* 1,670⁺), 及び Y_{3α/3β/3γ}⁺(*m/z* 1,832⁺)が検出されたことから、トリマンノシルコア構造の還元末端側の GlcNAc であることが判った。また、Y_{3γ}²⁺(*m/z* 1,423²⁺)が検出されたことから、結合糖鎖に未置換の HexNAc が存在することが判った。この未置換の HexNAc は、Y_{3α/1β/3β}²⁺(*m/z* 945²⁺, 1,890⁺)が検出されたことから、トリマンノシルコア構造の Man にβ1-4 結合する bisecting GlcNAc であることが示唆された。また、Hex₃(*m/z* 487⁺, B_{2β}⁺), Hex₄HexNAc₁(*m/z* 853⁺, B_{4α}/Y_{3α}⁺), Hex₂HexNAc₁(*m/z* 528⁺, B_{3α}⁺), Hex₃HexNAc₁(*m/z* 690⁺, B_{4α}/Y_{3β/3γ}⁺), Hex₃HexNAc₂(*m/z* 893⁺, B_{4α}/Y_{3β}⁺), Hex₄HexNAc₂(*m/z* 1055⁺), Hex₅HexNAc₂(*m/z* 1217⁺), 及び Hex₆HexNAc₂(*m/z* 1380⁺, B_{4α}⁺)が検出されたことから、結合糖鎖の構造は、図 2 5 中の図に示すようなハイブリッド型糖鎖であることが明らかになった。

また、*m/z* 1,525.78²⁺の糖ペプチドピーク近傍から、B イオンを指標に糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを選別し、解析した結果、Asn98 には、高マンノース型糖鎖、M5, bisecting GlcNAc や、ルイス a/x 構造を含むコンプレックス型及びハイブリッド型糖鎖が結合していることが推定された(表 5)。

④ Asn23 結合糖鎖の解析(His21-Phe33)

データベース検索によって、Asn24 を含む糖ペプチドを同定することはできなかった。そこで、in-source CID によって生成したオキシニウムマーカージオン、及び CID-MS/MS による糖鎖の neutral loss を用いて、糖ペプチドの溶出位置を推定した。

図 2 3 B 及び C は、トリプシン消化物の in-source CID によって生成したオキシニウムマーカージオン、*m/z* 204⁺ (HexNAc⁺)及び *m/z* 292⁺ (NeuAc⁺)のマスクロマトグラムである。*m/z* 204⁺のマスクロマトグラムでは、3.7, 9.7, 19.1, 27.2, 28.4, 34.4, 36.3, 37.8 分付近にピークが検出され、この時間に糖ペプチドが溶出していることが推定された。*m/z* 292⁺のマスクロマトグラムでは、3.7, 30.0, 36.4, 38.2 分にピークが検出され、この時間にシアロ糖鎖を含む糖ペプチドが溶出していることが推定された。また、データ依存的 CID-MS/MS によって得られたクロマトグラムから、Hex の 2 価イオンに相当する 81 u のニュートラルロスが生じたイオンのマスクロマトグラムを描き出すことによって、糖ペプチドの溶出時間を推定した(図 2 3 E)。In-source CID で得られた *m/z* 204⁺のマスクロマトグラムと同じ時間にピークが現れたことから、これらの時間に非還元末端側に Hex を持つ 2 価の糖ペプチドが溶出していることが推定された。推定された溶出時間付近のプロダクトイオンスペクトルを調べた結果、ピーク T1-7 のプロダクトイオンスペクトルに、糖鎖に特徴的な B イオンが検出され、ピーク T1-7 に糖ペプチドが溶出されていることが確認された。そのうちピーク T1 及び T6 は、データベース検索で同定された糖ペプチドである。そこで、新たに糖ペプチドと判定された 5 本の糖ペプチドピークを解析した。

図 2 6 A は、ピーク T4 に溶出された糖ペプチド (*m/z* 937.27³⁺, 検出時間 26.88 分)のプロダクトイオンスペクトルである。糖鎖の B イオンや、ペプチド部分を含む Y イオンが検出されていることがわかる。これらの Y イオンを高 *m/z* 側から低 *m/z* 側へ帰属していった結果、*m/z* 898²⁺に検出されたイオンは、ペプチドに

GlcNAc が結合したイオンであると推定された。この糖ペプチドのペプチド部分の分子量は、プロダクトイオン m/z 898²⁺から GlcNAc の分子量を差し引くことにより、1,593 であると計算された。そこで、Thy-1 中に、Asn23, 74, 98 を含むアミノ酸残基の合計分子量が 1,593 になる配列が存在するかどうかを、FindPept tool (<http://us.expasy.org/tools/findpept.html>, ExPASy Proteomics tools, Swiss Institute of Bioinformatics)を用いて検索したところ、このペプチドは Asn23 を含む His21-Phe33 であることが示唆された。データ依存的 MS³ 分析で得られた m/z 898²⁺のプロダクトイオンスペクトル上には、Asn23 に GlcNAc が結合したペプチド His21-Phe33 の理論フラグメントイオンに一致するイオンが多数検出されたことから、このペプチドは確かに His21-Phe33 であることが確認された。

結合糖鎖の単糖組成は、糖ペプチドの計算分子量 2,808.79 から、ペプチド His21-Phe33 の理論分子量 1,591.74 を差し引くことによって得られた糖鎖分子量 1,235.04 から、Hex₅HexNAc₂ と推定された。また、プロダクトイオンスペクトル中の、部分構造 Man-GlcNAc、及び Man-Man-GlcNAc に相当するフラグメントイオン(m/z 366⁺, 528⁺)や、多数の Y イオンから、この糖鎖は高マンノース型糖鎖 Man5 と示唆された。また、ピーク T4 付近のすべての糖ペプチドプロダクトイオンスペクトルを解析した結果、Asn23 には、高マンノース型糖鎖 M5-7 が結合していることが判った。

この糖ペプチドがデータベース検索によって同定されなかったのは、過剰量のトリプシンを用いたために、キモトリプシン様の消化が起こり、得られたペプチドがデータベース

検索条件と一致しなかったためと考えられる。このような糖ペプチドの場合も、in-source CID、及びCID-MS/MSによる neutral loss から推定された糖ペプチドの溶出時間付近のデータ依存的 MSⁿ プロダクトイオンスペクトルを確認することによって、結合糖鎖構造、糖鎖結合位置、及びペプチドのアミノ酸配列について解析できることが確認された。

⑤ ピーク T2, 3, 5, 7 の解析

残りの糖ペプチドピーク T2,3,5,7 についても、ピーク T4 の解析と同様に、糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトル中の Y イオンを帰属し、ペプチド部分のアミノ酸配列の推定を行うことによって、結合糖鎖を解析した。その結果、ピーク T2 は、Asn74 を含む糖ペプチド Ala73-Lys78 であり、結合糖鎖は、高マンノース型糖鎖 M5、及びコンプレックス型糖鎖であることが判った。ピーク T3 は、Asn23 を含む糖ペプチド His23-His31、及び His21-Glu32、Asn98 を含む糖ペプチド Ser96-Asp106 であり、それぞれ、Asn23 には高マンノース型 M5、6、及び Asn98 にはルイス a/x 構造を含む糖鎖が結合していることが判った。ピーク T5 は、高マンノース型 M6 が結合した Asn23 を含む糖ペプチド His21-Phe3 であることが判った。また、ピーク T7 は、Asn74 を含む糖ペプチド Val69-Lys78 であり、結合糖鎖はコアフコースや、ルイス a/x 構造を持つシアロ糖鎖(ハイブリッド型、及びコンプレックス型糖鎖)であることが判った。

4.2 ラット脳 Thy-1 の Asp-N 消化物の分析

① GPI 結合ペプチドの検出

Thy-1 のアミノ酸配列から、トリプシン消化では、GPI が結合したペプチドのアミノ酸は Cys 残基のみとなり、カラムに保持されるのが難しいことが予想された。そこで、適当なア

ミノ酸残基からなる GPI 結合ペプチドを得るために、Asp-N 消化を行い、LC/MSⁿを行った。

図 2 7 は Asp-N 消化物の full mass scan で得られた TIC (m/z 300-2,000) である。GPI 結合ペプチドを検出するために、in-source CID より GPI のコア構造に由来する $\text{Man-PO}_4\text{-EtN}^+$ (m/z 286⁺)、及び $\text{PO}_4\text{-Inositol-GlcN}^+$ (m/z 422⁺) のマスクロマトグラムを描かせたところ、4.2、及び 4.4 分にピークが検出された (図 2 7 B, C)。検出されたピーク付近のプロダクトイオンスペクトルを調べたところ、4.14、4.17 (ピーク A1-1)、4.27、4.31 分 (ピーク A1-2) のプロダクトイオンスペクトルに、フラグメントイオン m/z 286⁺、422⁺ が検出され、これらのスペクトルは、GPI 結合ペプチドのプロダクトイオンスペクトルであることが確認された。

②. GPI 構造の解析

図 2 8 は、4.31 分 (ピーク A1-2) に検出された GPI 結合ペプチドのプロダクトイオンスペクトルである。プリカーサーイオン (m/z 1,050.89²⁺) から、分子量は 2,099.76 と計算された。GPI コア構造に由来する m/z 286⁺、及び 422⁺ の他に、 $\text{PO}_4\text{-Man-GlcN}^+$ (m/z 404⁺)、 $\text{EtN-PO}_4\text{-Man-GlcN}^+$ (m/z 447⁺) 及び $\text{EtN-PO}_4\text{-(GalNAc)-Man-GlcN}^+$ (m/z 650⁺) の GPI 構造に由来するイオンが検出され (GlcN; グルコサミン, EtN; エタノールアミン)、このペプチドが GPI 結合ペプチドであることが確認された。ペプチド部分を含むフラグメントイオン、 $[\text{peptide+EtN}]^+$ (m/z 787⁺)、 $[\text{peptide+EtN-PO}_4]^+$ (m/z 867⁺)、 $[\text{peptide+EtN-PO}_4\text{-Man-Man}]^+$ (m/z 1,191⁺)、 $[\text{peptide+EtN-PO}_4\text{-Man-Man-Man-PO}_4\text{-EtN}]^+$ (m/z 1,476⁺)、 $[\text{peptide+EtN-PO}_4\text{-Man-Man-(GlcN)-Man-PO}_4\text{-EtN}]^+$ (m/z 1,637⁺)、

$[\text{peptide+EtN-PO}_4\text{-Man-Man-(Ino-PO}_4\text{-GlcN)-Man-PO}_4\text{-EtN}]^+$ (m/z 1,897⁺) から、この GPI 結合ペプチドは、Asp106-Cys111 に、図 2 8 中の図に示す GPI が結合したものであると推定された。また、4.17 分に検出された GPI 結合ペプチド (m/z 1,132²⁺) の側鎖構造は、プロダクトイオンスペクトルから、 $R_1=-\text{Man}$, $R_2=-\text{PO}_4\text{-EtNH}_2$, $R_3=-\text{H}$, $R_4=-\text{GalNAc}$ であることが確認された (データ示さず)。これらの 2 つの GPI 構造は、すでに報告されている構造と一致した。4.27 及び 4.14 分に検出された GPI 結合ペプチドは、プリカーサーイオン m/z 1,151²⁺、1,213²⁺ から図 2 8 中の図に示した GPI 構造に、HexNAc, 1 分子、及び Hex, 2 分子が、それぞれ結合したものであることが推定された。また、プロダクトイオンスペクトルから、糖ペプチド m/z 1,151²⁺ の GPI の側鎖構造は、 $R_1=-\text{HexNAc}$, $R_2=-\text{PO}_4\text{-EtNH}_2$, $R_3=-\text{H}$, $R_4=-\text{HexNAc}$ 、糖ペプチド m/z 1,213²⁺ の側鎖構造は、 $R_1=\text{Hex}$, $R_2=-\text{PO}_4\text{-EtNH}_2$, $R_3=-\text{H}$, $R_4=-\text{HexNAc-Hex}$ (または、 $R_3=-\text{Hex}$, $R_4=-\text{HexNAc}$) であると推定された (データ示さず)。Thy-1 の GPI 構造については、これまでに 2 構造しか報告されておらず、本分析法により、新たに 2 構造が発見されたことになる。

③. Asp-N によって得られた N 結合型糖鎖結合ペプチドの解析

つぎに、トリプシン消化物の場合と同様に、Asp-N 消化によって得られた糖ペプチドについても、in-source CID で得られた m/z 204⁺、及び 292⁺ のマスクロマトグラム (図 2 7 D 及び E)、CID-MS/MS による neutral loss 81 u のマスクロマトグラム (図 2 7 G) から、糖ペプチドの溶出時間を推定することができた。推定された糖ペプチドの溶出時間付近のプロダクトイオンスペクトルを調べた結果、ピーク A2-7 に、糖

鎖の B イオンが検出されたことから、これらは糖ペプチドピークであることが確認された。ピーク A2-7 の糖ペプチドプロダクトイオンスペクトルを選別し、結合糖鎖を解析した。その結果、表 5 に示すように、Asn23 には、トリプシン消化物の解析から結合が確認された高マンノース型糖鎖、M5-7 に加え、ルイス a/x 構造、又は bisecting GlcNAc を含むコンプレックス型、及びハイブリッド型糖鎖が結合していることが判った。Asn74 には、高マンノース型糖鎖、M5、コアフコース、bisecting GlcNAc、又はルイス a/x 構造を持つコンプレックス型糖鎖、及びコアフコースを持つハイブリッド型糖鎖等が結合していることが判った。また、Asn98 には、高マンノース型糖鎖、M5、ルイス a/x 又は H 抗原構造を持つハイブリッド型糖鎖等が結合しており、トリプシン消化物の解析から推定された糖鎖構造よりも多様であることが判った。

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

① ギムザ染色による細胞の形質の検討

BALB/cJ において PLLA プレートに埋植していない対照群の皮下組織の細胞ではほんの少くクロスが見られるのに対して PLLA 埋植群の皮下組織ではクロス模様が大量に見られ、また、接触阻害が減少した結果広範囲で pile up が観察された (図 29-A, B)。反対に、SJL/J では、皮下組織の細胞は平行方向に並び、接触阻害により平らで単層を示した (図 29-C, D)。

② GJIC 機能の評価

SLDT アッセイにて検討した。BALB/cJ において、PLLA プレートに埋植していない対照群と埋植した群間で GJIC 機能に有意な差

が見られた (図 30)。また、SJL/J は BALB/cJ に比べて、GJIC 機能が低い傾向が見られた (図 30)。

③ BALB/cJ マウスにおける Cx43 のタンパク質及び mRNA 発現について

Cx43 のタンパク質及び mRNA の発現は共に PLLA を埋植することによって低下した (図 31, 32)。

④ TGF- β_1 分泌について

TGF- β_1 分泌レベルは、BALB/cJ において PLLA プレートに埋植していない対照群に比べて埋植した群では有意に上昇した。反対に、SJL/J においては TGF- β_1 分泌レベルは、PLLA プレートに埋植していない対照群に比べて埋植した群では減少する傾向が見られた (図 33)。

⑤ ジーンチップ解析

BALB/cJ において、主な ECM (ファイブロネクチン、プロコラーゲン VIII α_1 サブユニット、オステオポンチン (OPN) 前駆体) (図 34-A, B, C) と、インスリン様増殖因子結合タンパク質 (IGFBP) 3 (図 34-D) と、cystein-rich intestinal protein (CRIP) (図 34-E) は、PLLA プレートに埋植していない対照群に比べて埋植した群では上昇した。SJL/J においては、PLLA プレート埋植によるそのような違いは見られなかった。

⑥ ノードマウスへの皮下組織細胞の移植による腫瘍形成の評価

PBS(-) を注入した陰性対照群では腫瘍形成は認められなかった (図 35-A)。PLLA プレートに埋植した BALB/cJ マウス由来の皮下組織の細胞を注入したノードマウスは、注入後 2 週間以内に急速にそして大きな腫瘍の形成が認められた (図 35-B, C, E, F)。HeLa 細胞を注入した陽性対照群では、細胞注入後 4 週

間後から徐々に腫瘍形成が認められた (図 3 5-D, G)。

⑦ 軟寒天培養法による発癌の評価

PLLA および陰性対照群では、軟寒天中に細胞のコロニー形成は認められなかった。HeLa 細胞は、軟寒天中で多数のコロニーを形成した。(data not shown)

⑧ 組織病理学的评价

PLLA プレートを埋植した BALB/cJ マウス由来の皮下組織の細胞を注入したヌードマウスにおいて形成された腫瘍は、monophasic fibrous synovial sarcoma であることが H&E と Keratin AE1/AE3 染色による組織病理学的评价によって示された。また、Staghorn pattern (図 3 6-A) と Hering-bone-pattern (図 3 6 4-B, C) を持つ腫瘍細胞であることが分かった。

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

6. 1 磁性マイクロ粒子を用いた MSIA による血清中微量タンパク質の検出

① 正常血清についての検討

磁性マイクロ粒子を用いた MSIA によって正常血清からどのようなタンパク質を検出できるか検討した。各種の抗体原液を系列希釈して抗 IgG 抗体結合磁性マイクロ粒子に結合させ、ヒト血清を 2 倍から 64 倍に TBS で希釈した試料とインキュベート後、洗浄して結合画分を質量分析で分析した。

まず、抗トランスフェリンモノクローナル抗体またはウサギ由来抗トランスフェリン抗体を用いた場合には、トランスフェリン (80 kDa) の 1 価イオンや 2 価イオン ($m/z = 80\,000, 40\,000$) に相当するシグナルをヒト血清から検出することができた (図 3 7)。血清濃度が

高いほどトランスフェリンのシグナルは強い傾向にあったが、夾雑物のアルブミンに由来するシグナル ($m/z = 66\,000, 33\,000$) 等も強くなるので、ある程度希釈したほうがよいと考えられる。なお、モノクローナル抗体溶液 (タンパク質として 35 mg/ml) とウサギ由来抗体溶液 (IgG として 9.0 mg/ml) はそれぞれ 40 倍と 160 倍に希釈した場合にもっとも強いトランスフェリンシグナルを得ることができたが、後者のポリクローナル抗体を用いたときにはアルブミンに由来するシグナルが強く検出され、IgG に由来するシグナル ($m/z = 75\,000$) も検出されたので、この場合は前者のモノクローナル抗体を用いたほうがよいと考えられた。ついで、抗 β_2 -ミクログロブリンモノクローナル抗体 (クローン BM-63 またはクローン GJ14 由来、IgG としてそれぞれ 1.6 または 1 mg/ml) を磁性マイクロ粒子に結合させた。その結果、それぞれ 40 倍と 20 倍に希釈した場合にもっとも強い β_2 -ミクログロブリン (11.8 kDa) に相当するシグナルをヒト血清から検出することができた (図 3 8)。

その他、リゾチームや IGF-I、IGF-II、フェリチン、TGF- β_1 、アクチビン A、インスリン等についても正常血清から検出できないか、それぞれの抗体を用いて検討した。リゾチーム (14.6 kDa) については相当するシグナルを検出することができたが (図 3 9 A)、その他の場合はトランスフェリン等と同様な条件では検出することができなかった。TGF- β_1 (12.8 kDa) に対する抗体を用いた場合を一例としてあげた (図 3 9 B)。

② 熱応答性磁性ナノ粒子を用いた検討

磁性マイクロ粒子よりも浮遊性が高く、表面積も大きい熱応答性磁性ナノ粒子を応用することで MSIA における目的タンパク質の分

離を改善できないか、インスリン添加血清 10 μl を試料として検討した。すなわち、アビジン処理したビオチン結合熱応答性磁性ナノ粒子 (LCST タイプまたは UCST タイプ) と、ビオチン標識抗インスリンモノクローナル抗体をインキュベートして、抗マウス IgG 抗体結合磁性粒子懸濁液を調製し、ストレプトアビジン結合磁性マイクロ粒子を同様に処理して調製した場合とインスリン検出感度を比較した。

その結果、LCST タイプの結合熱応答性磁性ナノ粒子を用いた場合は 10 nM 以下のインスリンを検出できなかったが、UCST タイプを用いた場合は、1 nM のインスリンを検出できた (図 4 0 A)。LCST タイプでは 42 $^{\circ}\text{C}$ まで加温して粒子を凝集させるため、インスリンタンパクの変性が加温によって促進されて検出できないと考えられた。逆に、UCST タイプでは氷浴で冷却して粒子を凝集させるため、インスリンの変性も抑制されている可能性がある。熱応答性ナノ粒子は貴重なサンプルであることから、まだ条件を十分検討できていないが、とくに UCST タイプの熱応答性磁性ナノ粒子については、血中微量タンパク質の前処理法として有望であると思われる。

一方、マイクロ粒子を用いた場合はインスリン以外のタンパク質によるシグナルが多数検出されるためにインスリンシグナルの検出が妨害されてしまい、粗精製法として不十分だった (図 4 0 B)。昨年度報告したように、血清試料によっては界面活性剤等の洗浄条件を工夫することで夾雑シグナルを除くこともできるが、今回用いたロットの血清では十分に除去できなかったことから、少なくともインスリンの検出に関しては UCST タイプの熱応答性磁性ナノ粒子のほうが磁性マイクロ粒

子よりも優れていると考えられた。

6. 2 高分子添加による質量分析でのシグナル増強

①タンパク質添加によるマスペクトルにおけるインスリンシグナルの増強メカニズムの検討

MALDI を利用した定量法について内部標準を用いた定量性の検討を進める過程で、内部標準としてウシインスリンをマトリックスに添加しておく、ヒトインスリンのシグナルが増強されることを見出し、トランスフェリンや血清アルブミンを添加した場合にとくに強く増強されることを昨年度報告した。そこでこのシグナル増強のメカニズムについて検討を行った。

MALDI におけるシグナル増強は、しばしばマトリックスの結晶構造の変化とリンクすることが知られている。そこでマトリックスの CHCA 溶液に 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ から 8 $\text{ng}/\mu\text{l}$ まで系列希釈したトランスフェリン溶液を 5 : 1 となるようにあらかじめ添加して乾燥させ、結晶を顕微鏡で観察した。その結果、添加したトランスフェリンの濃度に依存して結晶の粒径が小さくなっていることが明らかになった (図 4 1、図 4 2 A)。このとき、0.13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ までのトランスフェリン溶液を添加した場合はインスリンのシグナルもトランスフェリンの濃度に依存して増強され、CHCA に由来する蛍光もほぼすべての結晶に均一に分布した。

一方、0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以上のトランスフェリンを添加した場合にはシグナルは弱くなったが、同時に、蛍光性の不定形な塊と非蛍光性の結晶が増加していた。この蛍光性不定形塊と非蛍光性結晶は、それぞれ CHCA とトランスフェリンであると考えられることから、過剰量のトランスフェリンは、CHCA を析出させ、

CHCA とトランスフェリン、そしておそらくは分析対象となるインスリンの分布が非均一になる結果、インスリンシグナルの低下を招くことが示唆された。同様な変化は、トランスフェリンのかわりに BSA をマトリックスに添加した場合にも観察された (図 4 2 B)。

以上のように、インスリンシグナルの増強がタンパク質の添加によって引き起こされ、このとき、結晶の粒径は小さくなっていた。適当量の高分子を添加するとマトリックス結晶が小さくなり、結晶の表面積が増えることによって、インスリンの脱離イオン化反応が促進された結果、シグナルが増強されると考えられた。

②合成高分子添加によるトランスフェリンシグナルの増強

適切な量のトランスフェリンや BSA を添加してシグナルを増強することは、微量のタンパクやペプチドを解析するうえで有用だと考えられるが、そのもの自身によってシグナルが発生するため、目的タンパク質のマススペクトルを複雑にする等の不利益も考えられる。特に IgG 等の高分子を解析する際には目的タンパク質のシグナルを妨害する可能性が強い。そこで、トランスフェリンを試料として、合成高分子を CHCA に添加してシグナル増強剤として使えるかどうか検討した。インスリンシグナルと同様にトランスフェリンのシグナルも BSA の添加によって増強されるが、トランスフェリンの分子量は BSA の分子量に近いいため、添加した BSA 自体に由来するシグナルも目的タンパク質たるトランスフェリンのシグナルの近くに検出された (図 4 3 B)。一方、ポリリジンやデキストラン等の合成高分子を添加した場合には、添加した高分子に由来するシグナルは検出されなかった (図 4 3 C, D)。

そのため、これらの合成高分子は BSA よりも望ましいシグナル増強剤になると考えられた。次にこのような合成高分子によるシグナル増強現象が、結晶の大きさの変化で説明可能かどうか検討した (図 4 3 E, F)。ポリリジン (分子量 150-300 kDa) またはデキストラン (平均分子量 200 kDa) をマトリックスに添加した場合にもインスリンシグナルの増強と結晶の微細化は観察されたが、トランスフェリンや BSA を添加した場合に比べると、結晶の粒径の変化は小さく、シグナル増強に最適な濃度もはっきりしなかった。その理由としては、ここで用いたポリリジンやデキストランは分子量が一定ではなく、ある程度の幅を持っているために、濃度依存性も単一のタンパクを用いたときほどはっきり出なかったと考えられる。

③各種合成高分子化合物によるタンパク質シグナルの増強

フェリチン (20 kDa) や IgG (150 kDa) 等のタンパク質を試料として、ポリリジンやデキストランを含む各種の合成高分子を CHCA に添加してシグナルにどのような影響を与えるか、検討した。その結果、フェリチンについてはポリリジンやデキストランを含む多くの合成高分子がシグナルを増強した (表 6)。一方、IgG のシグナルを二倍以上増強した合成高分子は、高分子量のポリリジンと低分子量のポリエチレングリコールのみであった。IgG は T 字ないしは Y 字型の構造をとり、フェリチンや BSA (66 kDa)、トランスフェリン (80 kDa) よりも分子量が大きいだけでなく独特の高次構造ゆえに、シグナル増強を受けにくいのかもしれない。

低分子ペプチドである ACTH フラグメント (18-39) (2 465 Da) のシグナルは、BSA ま

たはトランスフェリンの添加では増強されなかったが、ポリリジンやデキストランの添加では増強された(表7)。この現象は結晶の微細化による表面積の増大だけでは説明できないが、BSAやトランスフェリンはACTHフラグメントの100倍以上ある巨大な球状タンパクであるため、物理的に低分子ペプチドの気化を妨害してしまう可能性がある。ポリリジンは分子全体がプラスの電荷を持ち、ジスルフィド結合を形成するシステイン残基などは持たないので、球状タンパクであるトランスフェリンやBSAとは異なる形状をとっていると考えられ、低分子ペプチドの気化を妨害しないのかもしれない。糖分子の重合体であるデキストランについても、同様なことが考えられる。

一方、インスリン(5808 Da)やシトクロムC(12362 Da)、アポミオグロビン(16952 Da)等は、トランスフェリンやBSAだけでなく、ポリリジンやデキストラン添加によってもシグナル増強を受けたが、ポリビニルアルコールやポリエチレングリコールによってはあまり強いシグナル増強を受けなかった。なお、ポリビニルピロリドンは実験に用いたすべてのタンパク質、ペプチドについてシグナルを抑制した。分析対象物の分子量だけでなく、コンフォメーションや疎水性、電荷などの特性も脱離イオン化においては重要な役割を果たすと考えられており、ポリビニルアルコールやポリエチレングリコールを添加した場合には分子量以外の特性がシグナル増強作用に大きな役割を果たすと思われる。

7. 血管内皮前駆細胞の特性指標の解析に関する研究

7.1 臍帯血及び末梢血由来AC133陽性細胞

のSCF、TPO増殖促進作用の比較と出現する細胞の解析

我々はすでに末梢血の造血幹細胞を多く含むとされているAC133陽性細胞をVEGF存在下に培養することにより血管内皮前駆細胞(EPC)へ誘導できること、その特性指標としてCD31強陽性であることなどを報告してきた。今回、SCFやTPO等の増殖因子を添加することにより、EPCの誘導や増幅にどのような影響があるか、またそれ以外の細胞の誘導や増幅にどのような影響があるかについて検討した。

臍帯血と末梢血のAC133陽性細胞を同じ密度にコラーゲンタイプIV上で6日間培養し、細胞増殖能とAC133陽性細胞とCD31強陽性細胞の出現頻度等について、VEGF単独を対照群(コントロール)とし、VEGFにTPOとSCFを添加して培養した群(Mix)と比較検討した(図44)。その結果、末梢血AC133陽性細胞も臍帯血AC133陽性細胞も対照群に比べTPO及びSCFが存在すると増殖が促進され、特に臍帯血AC133陽性細胞では顕著な細胞数の増加が認められた(図8A)。また、出現してくるCD31強陽性細胞は末梢血においても臍帯血においてもTPO及びSCF存在下に培養したときの方が高いことが分かった(図44B及びC)。一方、AC133陽性細胞の増加は末梢血で混合群が0.93%から1.37%に増加している。臍帯血ではAC133陽性細胞の出現は13.47%と13.03%とあまり変化がないが認められなかった。AC133陽性細胞には多能性細胞を多く含むと考えられ、これらの条件下では、EPCの誘導と同時に多能性造血細胞の増幅も起こっていると推定された。

次にVEGF単独、VEGFにSCF及びTPOを添加して培養したAC133細胞から誘導されてくる接着細胞の特性解析を行った。末梢血及び

臍帯血 AC133 細胞を、VEGF 単独、VEGF に SCF 及び TPO を添加して2週間培養し、接着している細胞の血管内皮細胞のマーカーの発現を調べた(図45)。その結果両細胞由来の殆どの接着細胞は、ともに eNOS や KDR 等を強く発現していることが明らかになった。VEGF 単独に比較して、VEGF に SCF 及び TPO を添加した場合の方が、より多くの eNOS や KDR 陽性細胞が出現した。一方、臍帯血由来 AC133 細胞では eNOS や KDR 陽性細胞のクラスター様の細胞増殖が認められ、そのクラスターに含まれる細胞数も VEGF に SCF 及び TPO を添加した場合の方が高かった。

7. 2 SCF や TPO で出現する EPC の解析

以上のように、VEGF 単独に比較し、SCF や TPO を添加することにより、より多くの EPC や血管内皮細胞の誘導が可能であることが示された。そこで、SCF と TPO のどちらがより EPC の誘導に重要な働きをしているのかを明らかにする目的で、それぞれを単独で添加したときの CD31 強陽性細胞の誘導と細胞数の増加について検討した。図46-A に示すように、末梢血と臍帯血の AC133 陽性細胞をコラーゲンタイプIVコートプレートで培養し、VEGF 単独を対照群(コントロール)とし、更に SCF あるいは TPO を加え6日間培養したところ、末梢血 AC133 細胞は、SCF 添加群の方が TPO 添加群よりも増殖促進が強く、また両者を同時に添加して培養するとより増殖が促進された。一方、各条件下で CD31 強陽性細胞の出現比率を解析したところ、SCF に比べ TPO を添加した方がより強い促進が認められた(図46-B)。この結果より、SCF は細胞数の増加に、TPO は EPC への分化により強い作用を持つ可能性が示唆された。臍帯血 AC133 細胞の場合には、細胞増殖に関しては SCF と TPO の差異は認め

られなかったが(図46-A)、CD31 強陽性細胞の誘導に関しては末梢血 AC133 細胞と同様の結果が得られた(図は示さず)。

7. 3 Cx37 を表面マーカーとした磁気ビーズ分画後の KDR 陽性細胞の解析

すでに我々は CD31 強陽性細胞分画に EPC が多く含まれるばかりでなく同時に Cx37 や Cx40 も発現していることを明らかにしている。Cx37 は血管内皮細胞への分化に伴い発現が消失することから、Cx37 発現を指標として EPC を分画できる可能性が考えられた。そこで、ヒト末梢血由来 AC133 陽性細胞を分離して、タイプIVコラーゲン上で培養し、7 日目に抗 CD31 抗体と抗 Cx37 抗体を用い磁気ビーズを用いて分画した。それぞれの陽性細胞分画を FN 上に培養し、一週間後に接着した細胞を抗 KDR 抗体を用いて免疫染色した。図47A に示すように CD31 陽性及び Cx37 陽性の両細胞とも多くの KDR 陽性接着細胞の出現が認められた。下の図47B のグラフは3回の実験から、KDR 陽性細胞を数え、定量化したもので、CD31 陽性及び Cx37 陽性の両細胞とも同じように効率よく KDR 陽性細胞が誘導可能であると考えられた。

7. 4 臍帯血由来 AC133 陽性細胞における Lox-1 発現の経時変化と Lox-1 を表面マーカーとした磁気ビーズ分画後の CD31 発現解析

Lox-1 は血管内皮細胞に特異的に発現していることが知られているが、血管内皮細胞への分化過程での発現誘導については不明である。末梢血由来 AC133 陽性細胞を分画後、タイプIVコラーゲン上で培養後1週間の Lox-1 発現をフローサイトメーターで解析した。図48-A に示すように、Lox-1 の発現は経時的に増加するが、Lox-1 と CD31 を同時に免疫染色し、FACS で2カラー分析すると CD31 強陽性

細胞は Lox-1 弱陽性細胞であることが明らかとなった(図 4 8-B)。そこで臍帯血由来 AC133 陽性細胞を培養 5 日目に Lox-1 を指標に磁気ビーズ分画し、Lox-1 陽性細胞分画と Lox-1 陰性細胞分画における CD31 強陽性細胞の存在を解析したところ、Lox-1 弱陽性分画に濃縮されていた(図 4 8-C)。一方、AC133 陽性細胞由来 CD31 強陽性細胞を分離し、培養すると、培養期間の経過とともに Lox-1 の発現は弱陽性から陽性へと変化した。

7. 5 EPC の VE-カドヘリンや CD45 の発現解析

EPC の VE-カドヘリンの発現について、抗 CD31 抗体と抗 VE-カドヘリン抗体を用いて 2 カラー分析を行った。図 4 9 は末梢血の解析結果を示しているが、CD31 強陽性細胞を示すドットは四角のフレームに含まれるが、全ての細胞が VE-カドヘリン陰性であることが明らかになった。一方、白血球共通抗原である CD45 の発現について CD31 の発現との関係を調べたところ、誘導した CD31 強陽性細胞は全て、CD45 陽性であった(結果は示さず)。以上の結果から、CD31 強陽性細胞という特性指標を持つ細胞は、いわゆる early EPC の性質をもつものと考えられた。

8. P19 細胞由来細胞株の心筋細胞への分化誘導

8. 1 CL6G52 株における GFP 発現の時間経過

本研究では、CL6 細胞に GFP 遺伝子と Neomycin 耐性遺伝子を導入し、4 つのサブラインを分離したが、心筋細胞に分化した際に GFP を発現するのは CL6G52 株のみであった。この CL6G52 株の心筋分化と GFP の発現の時間経過を解析した。CL6G52 細胞では分化誘導後 6 日目にコンフルエントになり、10 日目には

拍動を開始し、18 日目には拍動が弱っていたが、この拍動細胞の出現よりかなり遅れて GFP の発現が認められた(図 5 0)。そこで CL6G52 を含む遺伝子導入細胞 (CL6G26、CL6G36、CL6G45) と親株である P19 及び CL6 細胞の心筋分化と遺伝子発現の網羅的解析を行った。

8. 2 細胞株の差による心筋分化の差

P19、CL6、CL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52 の 6 種類の細胞株について自動拍動の出現と収縮コロニーの数および大きさを指標に分化効率の違いを評価した。

収縮コロニー数は、0.016 個/cm² 以上を「少ない」、0.098 個/cm² 以上を「中程度」、157 個/cm² 以上を「多い」と定義した。収縮コロニーの大きさは、6.36×10⁻⁵ cm² 以上の大きさのものを「小さい」、3.18×10⁻³ cm² 以上の大きさのものを「大きい」と定義した。

収縮コロニー数について、収縮が「ない」ものに 0、「少ない」ものに 1、「中程度」のものに 2、「多い」ものに 3 のスコアを与え、収縮コロニーの大きさについても、収縮が「ない」ものに 0、「小さい」ものに 1、「大きい」ものに 2 のスコアを与え、各細胞株における時間経過をグラフにし、細胞株ごとの心筋分化の違いを比較検討した(図 5 1)。

その結果、CL6G52 細胞が最も分化能が高く、CL6G32 が最も低いこと、CL6 細胞や他の遺伝子導入細胞はその中間的な発現を示した。

8. 3 分化誘導後の心筋細胞マーカー遺伝子の発現

次に 6 種類の細胞を分化誘導し、分化過程での心筋特異的な遺伝子発現を定量リアルタイム RT-PCR によって測定した。細胞株の違いによって心筋の分化能の違い、マーカー遺伝子発現より比較した(図 5 2)。心筋細胞マーカー遺伝子の発現を心筋細胞分化と関連

付けて解釈する際、個々のマーカー遺伝子の発現にどの程度の重み付けをした上で解釈してよいかは明らかではない。そこで、得られた多くのデータを主成分分析し、細胞株による分化の違いを比較した。このマーカー遺伝子の発現を主成分分析より、寄与率 65%の第 1 主成分と寄与率 15%の第 2 主成分が算出された (図 5 3)。変量プロットと寄与率を見ると、資料の本質の約 65%を説明する第 1 主成分は全ての変量が正に出ていることから心筋分化の指標と考えられ、また、資料の本質の約 15%を説明する第 2 主成分は発生の比較的初期に機能するマーカーが負に、発生の比較的後期に見られるマーカーが正に出ていることから成熟の段階の指標となると考えられた。そして、主成分から個々のサンプルを主成分得点として表すと細胞株による心筋細胞への分化の違いがより明確に見られるようになった (図 5 4)。

8. 4 心筋細胞への分化効率に影響する遺伝子

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 種類について、定量性リアルタイム RT-PCR で得られた第 1 主成分の最大値、第 2 主成分の最大値、自動拍動能出現までの日数、もしくは収縮コロニーの数のスコア、の 4 つの指標それぞれと GeneChip の遺伝子発現シグナルとの間のスピアマンの順位相関を算出し、心筋細胞分化と相関する遺伝子を探索した。

スピアマンの順位相関とその有意確率を算出した結果、第 1 主成分と相関がある Sequence Tag は 109 個、第 2 主成分と相関がある Sequence Tag は 342 個、自動拍動能出現までの日数と相関がある Sequence Tag は 122 個、

収縮コロニーの数と相関がある Sequence Tag は 274 個抽出された。これらのうち、第 1 主成分 (心筋分化の指標)、自動拍動能出現までの日数、収縮コロニーの数の 3 要素と有意な相関のある Sequence Tag は 26 個抽出された。これら 26 個の Sequence Tag のなかには重複する遺伝子が 2 つあったため、計 24 個の遺伝子が抽出されたことになる (表 8)。これら 24 個の遺伝子を我々は CPC1~CPC24 (cardiomyogenesis predictor candidates) と命名した。さらにこれらのうち第 1 主成分 (心筋細胞分化の指標)、第 2 主成分 (心筋細胞成熟の指標)、自動拍動能出現までの日数、収縮コロニーの数の 4 要素と有意な相関のある遺伝子は 9 個 (CPC1~6、8、11、12) であった。CPC 遺伝子はいずれもこれまで心筋分化との関連が報告されておらず、多くは機能未知の蛋白質をコードするものであった。CPC 遺伝子がコードするアミノ酸配列の膜結合性を SOSUI システム

(<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/frame0.html>) によって解析したところ、12 遺伝子が膜結合性蛋白質であり、10 遺伝子が可溶性蛋白質と判定された。2 遺伝子についてはその膜結合性が判定不可能であった。

9. 肝幹細胞の特性指標に関する研究

アネキシン 3A の特性指標としての有用性

2-AAF 及び CCl₄ をラットに投与し肝再生を引き起こしたときの hematoxylin と eosin (H&E) 染色像および免疫組織染色像を図 5 5 及び 5 6 に示している。コントロールとして 2-AAF および CCl₄ の代わりに oil を投与したものおよび 2-AAF を投与した。図 5 5 において肝臓全体で非常に少数の AnxA3 陽性の細胞が検出されたが、その細胞はアルブミン陰

性であった。図56においても図55と同等な免疫組織染色像が得られたが、AnxA3陽性の細胞の出現頻度は低下していた。なお、両H&E像において障害は観察されなかった。図57は図55の中心静脈域における免疫組織染色像を拡大したものであるが、アルブミン陽性細胞に比べて、AnxA3陽性の細胞はごく少数であることが明らかである。

図58は2-AAF/CCl₄投与2日後におけるH&E染色像および免疫組織染色像を示している。その結果、中心静脈域である第3ゾーンから第2ゾーンにわたりAnxA3およびアルブミン共陽性で小型の血球様細胞（小型血球様細胞）の顕著な出現が検出された。門脈域においても共陽性小型血球様細胞は検出されたが、その出現頻度は中心静脈域に比べ低かった。また、胆管の一部においてアルブミンあるいはAnxA3陽性の細胞が検出された。一方、H&E染色像において第3ゾーンから第2ゾーンにわたり垂広範の細胞壊死が観察された。その虚脱部位には血球系細胞様の形態を呈し、エオジンで赤く染色される小型の細胞が多数観察され、その局在はAnxA3およびアルブミン共陽性の小型血球様細胞と一致した。一方、門脈域では一部巣状細胞壊死が観察されたが、大部分は正常な肝組織像を呈した。

図59は2-AAF/CCl₄投与3日後におけるH&E染色像および免疫組織染色像を示している。その結果、2-AAF/CCl₄投与2日後の中心静脈域において多数観察されたAnxA3およびアルブミン共陽性の小型血球様細胞はその数が顕著に減少した。門脈域においては2-AAF/CCl₄投与2日後に一部巣状壊死部位に局在していた共陽性の小型血球様細胞はみられなくなった。一方、H&E染色像において第3ゾーンから第2ゾーンにわたり存在する

血球様細胞の一部に2日目とは異なる形状の変化が観察された。門脈域における染色像は2日目とほとんど変化がなかった。

図60は2-AAF/CCl₄投与4日後におけるH&E染色像および免疫組織染色像を示している。中心静脈域では3日目でAnxA3およびアルブミン共陽性であった小型血球様細胞が一部アルブミン陽性、AnxA3陰性に転換した。門脈域においてもアルブミン陽性、AnxA3陰性の細胞が観察された。一方、H&E染色像においては中心静脈域における障害が顕著に修復・改善され、2日目において第3ゾーンから第2ゾーンで観察されたエオジンで染色される赤色の小型血球様細胞はほとんど観察されなかった。また、それと置き換わるように明瞭な核を有する小型の細胞が観察された。図61は図60の中心静脈域における免疫組織染色像を拡大したものである。2日目と比べると、アルブミンおよびAnxA3共陽性の細胞に対して、アルブミンあるいはAnxA3のみ陽性の細胞の割合が増加していることがより明らかである。

10. ヒト骨芽細胞の増殖能や骨分化能の加齢による影響

本研究では採取年齢の異なる骨芽細胞の増殖能、ALPase活性や石灰化を指標とする分化能の差異について検討した。骨芽細胞の増殖は採取年齢の違いで大きな変化が見られず、1D、16Y、41Yはほぼ同程度の増殖度であった（図62）。図63に骨芽細胞の初期分化マーカーであるALPase活性の結果を示した。NH0st cellsのALPase活性は、採取年齢の違いによって、大きな変化が見られた。1Dの骨芽細胞はALPase活性が高い値を示したが、16Y、41Yは活性が低かった。骨芽細胞の石灰化度も、

ALPase 活性と同様に、年齢の差が大きく現れた(図6 4)。1D は石灰化度が高く、16Y、41Y は非常に低い値を示した。

D. 考察

1. PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮の検討

昨年度までの検討で、新たに開発した PEI 磁気ビーズがウイルス濃縮に非常に有用であることを示してきた。本年度は、ウイルス検出技術の高精度化・高感度化に関する研究として、開発した PEI 磁気ビーズによるウイルスの濃縮機構に解析を行った。分子量 70,000、10,000、1,800 の 3 種類の PEI では 70,000 が最も濃縮効率が高いこと、濃縮の至適 pH は 6 付近であること、カチオン性ポリマーの PAA、PLL、PEI を比較すると PEI が最も濃縮効率が高いことが判明した。PEI 磁気ビーズはカチオン性ポリマーで+に荷電しているが、細胞やウイルスは-に荷電しているために、静電的に液体中のウイルスは PEI ビーズに吸着されると考えられるが、分子量 70,000 の PEI が最も優れていたのは、分子量が大きいほど側鎖が増え、より静電的な力が大きいためと思われる。分子量 70,000 より大きい分子量の PEI を用いて磁気ビーズを作製することでさらに濃縮効率が向上する可能性も考えられる。またカチオン性ポリマーの構造も濃縮効率に影響し、1 級、2 級、3 級の全てのアミンを持つ PEI が最も濃縮効率が高いことより、複数のアミン構造が濃縮に寄与しているものと考えられた。また、PEI 磁気ビーズにウイルスと同時に濃縮される蛋白質としては血清中の補体成分の C3、C4、IgM、セルロプラスミンが同定された。さらに、ポリオウイルスは PEI 磁気ビーズ単独では濃縮できない

にもかかわらず、抗ポリオウイルス単クローン抗体にマウス IgG に対する IgM を添加することによりポリオウイルスの濃縮が可能になったことより、ウイルスの免疫複合体を形成させることにより全てのウイルスの濃縮が可能ではないかと考えられた。また、このような免疫複合体の形成は、ウイルス濃縮のさらなる高感度化につながる可能性もあり、この点についても検討を続けていく。

2. 細胞の同一性や安定性の評価手法

昨年度より引き続いて行った遺伝子発現解析による細胞の特性解析においては、遺伝的バックグラウンドが同一の細胞においてもその遺伝子発現は比較的異なることが明らかとなった。ただし、同種の細胞では異種間に比べて類似性は高いため、細胞の類似性の検討に使える可能性はある。事実、今回検討したすべての細胞に関して、発現強度をクラスタリング解析した結果、同一、および同種の細胞どうしが近縁にクラスタリングされた(図6 5)。一方、遺伝子発現強度は比較的培養条件にも影響されやすく、これまでの検討からも、全く同一の細胞であっても、異なる培養時にデータをとると定常状態での発現にバラツキが出てくる事がわかっている。実験操作上のバラツキや発現の変動が起きやすい遺伝子の影響などが考えられるが、遺伝子配列と違い、遺伝子発現は外的な環境の影響を受けやすい点に注意が必要である。今回の膀胱癌由来の細胞株においても、もともと膀胱で発現の高い遺伝子は必ずしも培養細胞で発現が高いわけではなく、機能性を期待して細胞を培養する場合などに、培養過程でその機能が失われる可能性は高い。目的遺伝子が発現しているかどうかという観点から、機能性をチェック

する事は、細胞の品質管理の上で有用であると考えられる。すべてに今回の様な網羅的解析をする必要はないが、目的とする機能関連遺伝子を絞り込み、定量的 RT-PCR など迅速簡便な手法にてその発現の度合いを確認することが期待される。

細胞の遺伝情報は、遺伝子発現に比べて安定なものであるとされているが、細胞培養においては染色体の変化が起きやすく、たとえ正常細胞由来でも培養中に遺伝子が増減し、癌化等の好まれざる形質変化につながる危険性がある。事実、最近の報告ではヒト胎児性幹細胞 (ES 細胞) の培養においても、特定染色体の増加による変化が起きやすいことが指摘されており (Drapper et al., 2004) 培養過程での遺伝的安定性にも注意を払う必要がある。癌遺伝子の増幅、癌抑制遺伝子の欠失は直接がん化の引き金となり、特定遺伝子の転座による融合遺伝子の生成も血液系の癌における主な要因となっている。よって染色体レベルでの安定性を確認することは重要であり、そのための技術として、マイクロアレイを使った CGH 法の有用性を検討した。

従来の CGH 法や、STR マーカーを使った LOH 解析から、すでに染色体の特定領域の増減が確認されている細胞をモデルとして用い、アレイ CGH による確認を行ったところ、予想された変化を確実に検出することができた。また、細胞間でのベースラインノイズの一致性から、この手法の再現性の高さが伺われ、従来の CGH 法にかわる簡便な手法として期待できる。特に、アレイ CGH 法においては、用いるプローブ数を増やすことにより、染色体領域をより詳細に解析可能で、変化ができていない領域をより詳細に限定できることから、その領域に存在する遺伝子候補を絞り込むこ

とが可能となる。これは、細胞の癌化などの形質変化のメカニズムを探る上で、原因遺伝子の究明に向けて有効な手がかりをあたえうると期待される。今回用いたアレイでは、約 4000 種類の BAC クローンがスポットされており、平均的に約 800kb の間隔で染色体領域をカバーできることになる。これは従来の CGH 法による解像度の限界が 30Mb 程度であるのに比べると、より詳細な検討が可能といえる。最近では、ゲノムの配列の情報を利用してオリゴヌクレオチドによる CGH アレイを作成することにより、より解像度をあげた解析も可能になりつつある。また、SNP 解析のためにデザインされた GeneChip を用いて CGH 的な解析を行うこともでき、現在では 100K の SNP を検出するチップが利用可能となっているため、さらに詳細な検討が可能となっている。SNP アレイに関しては LOH の情報も得られるため、遺伝子の増減のみならず、組み換え型の変化も検出できる系として染色体解析への応用が期待される。

今後に残された課題としては、染色体レベルの変化を伴わない点突然変異等の遺伝子異常を効率的に検出する試験法の開発、および低頻度に存在する異常細胞の検出法の開発が挙げられ、新たな原理、発想に基づいた研究の展開が必要である。

3. 細胞由来タンパク質の無担体等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせたプロファイリング技術の開発

細胞由来タンパク質の網羅的解析手法開発の一環として、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。サイトカインや細胞増殖因子の多くが、ヘパリンカラム等への親和性を持