

図 2. hMSC, HeLa S3, 及び HepG2 における c-myc の mRNA 発現

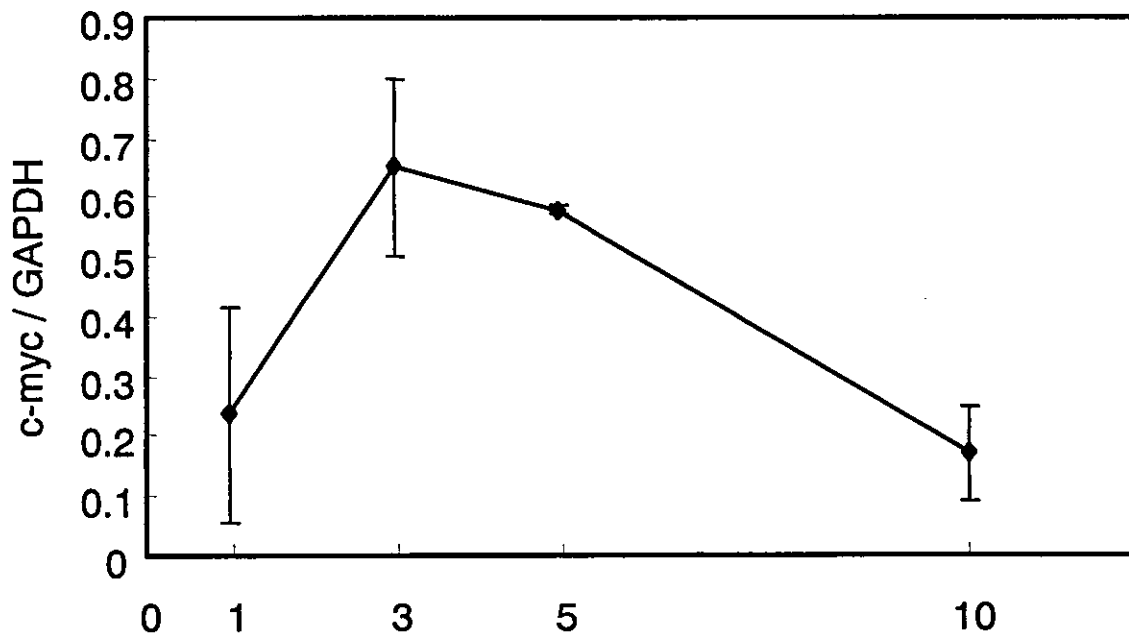


図 3. hMSC の c-myc mRNA 発現に及ぼす継代の影響

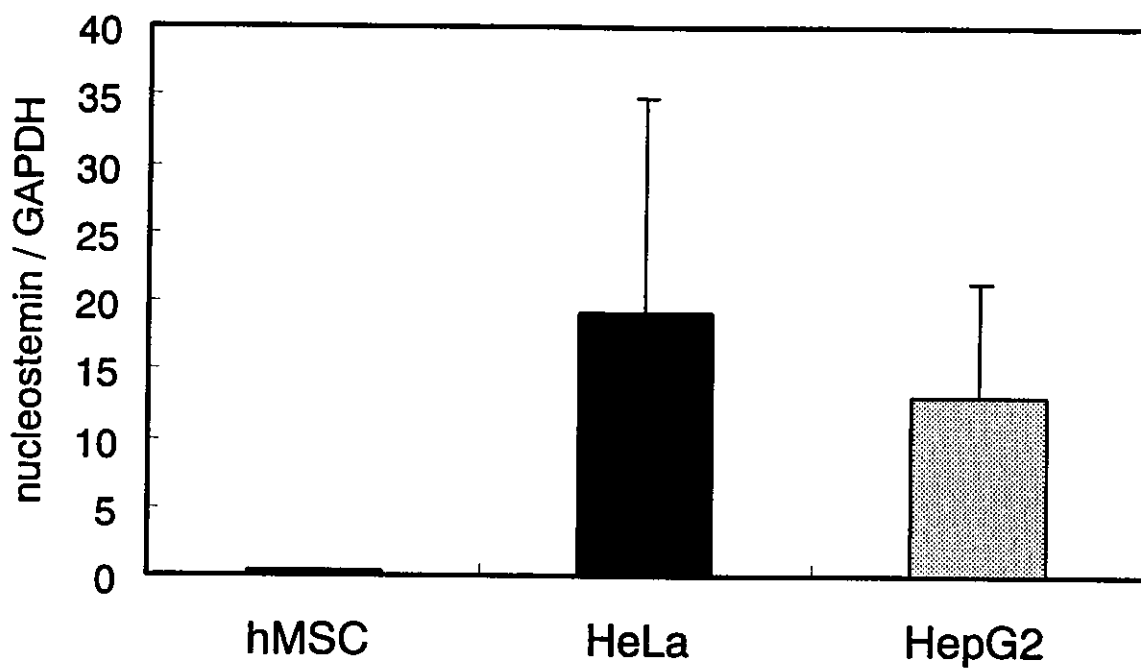


図 4. hMSC, HeLa S3, 及び HepG2 における nucleostemin の mRNA 発現

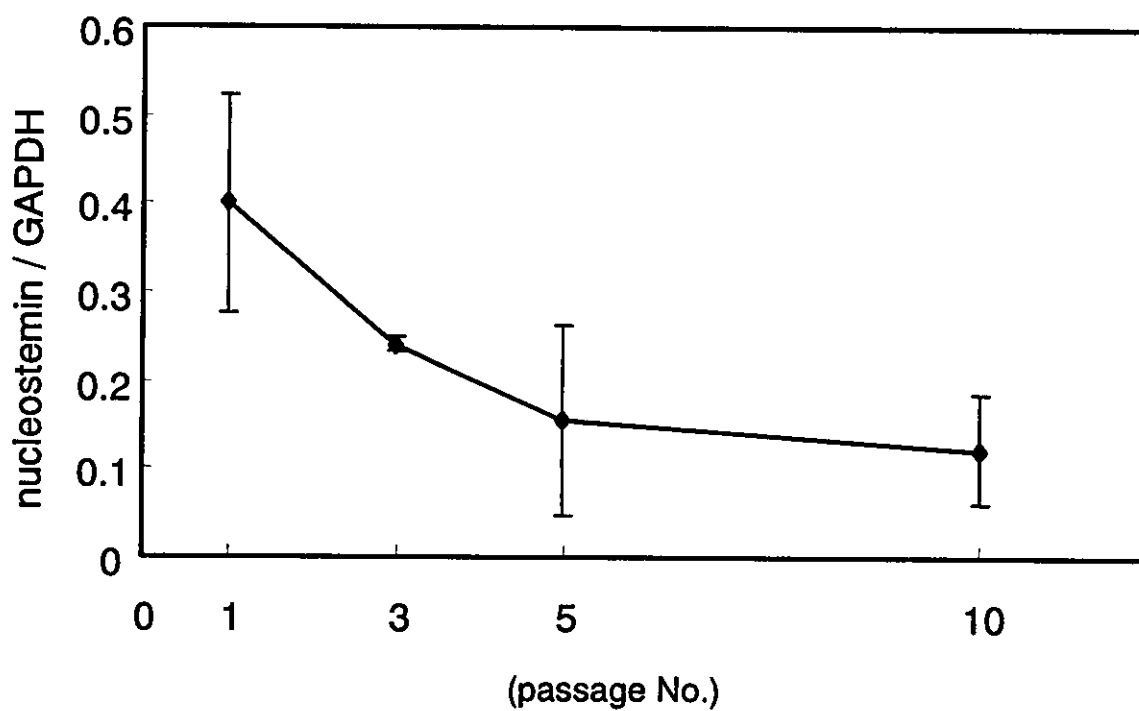


図 5. hMSC の nucleostemin mRNA 発現に及ぼす継代の影響

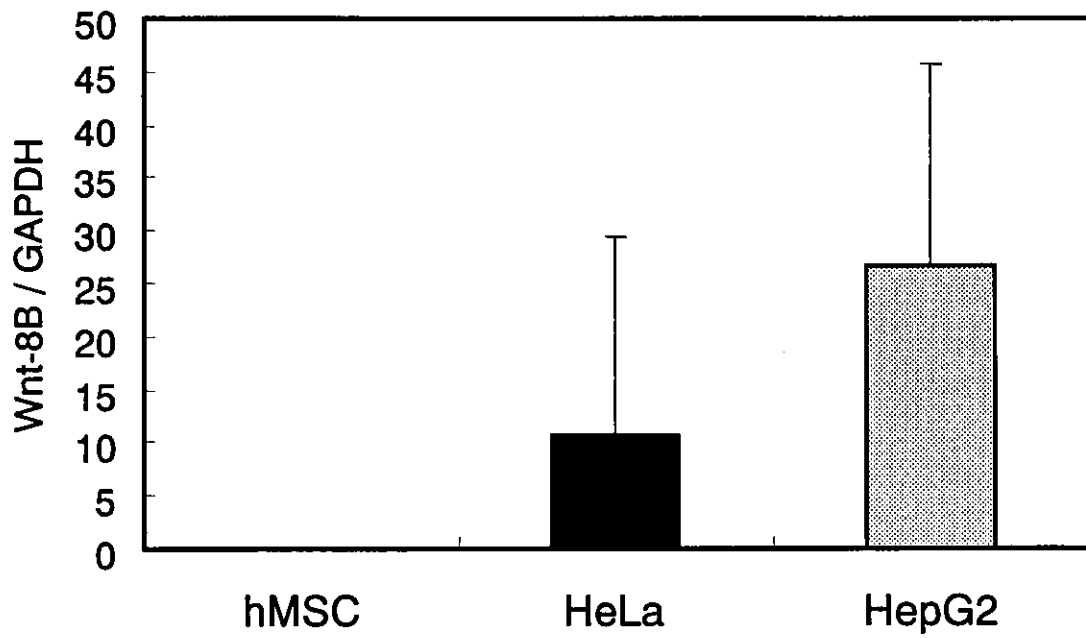


図 6. hMSC, HeLa S3, 及び HepG2 における Wnt-8B の mRNA 発現



A

BALB/cJ (Control)



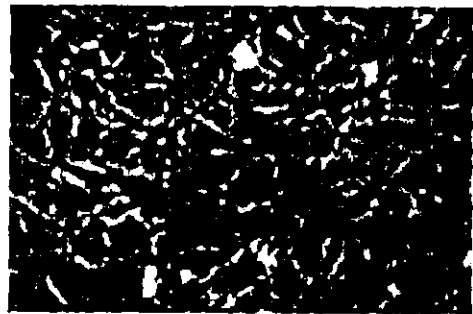
B

BALB/cJ (PLLA)



C

SJL/J (Control)



D

SJL/J (PLLA)

図 7. 細胞の形態

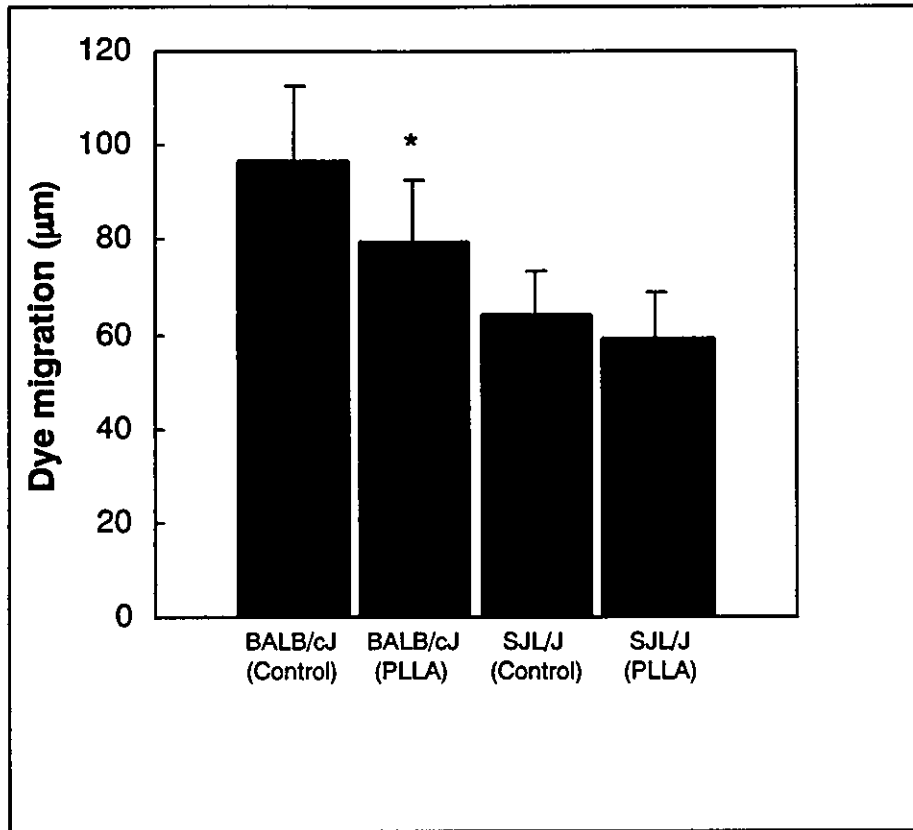


図 8. SLDT 測定

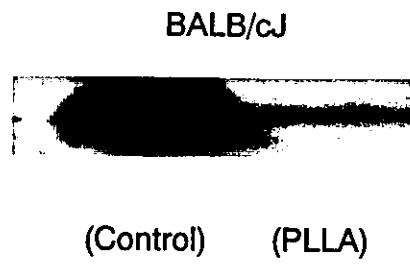


図9. Western Blot 法による Cx43 タンパク質の発現

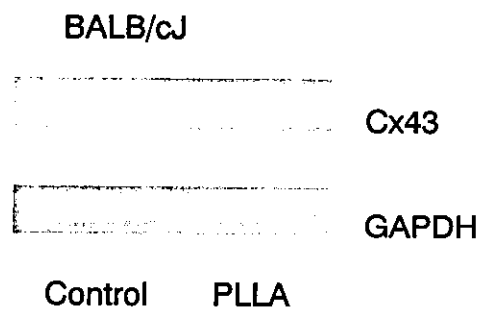


図 10. RT-PCR による Cx43 の mRNA 発現

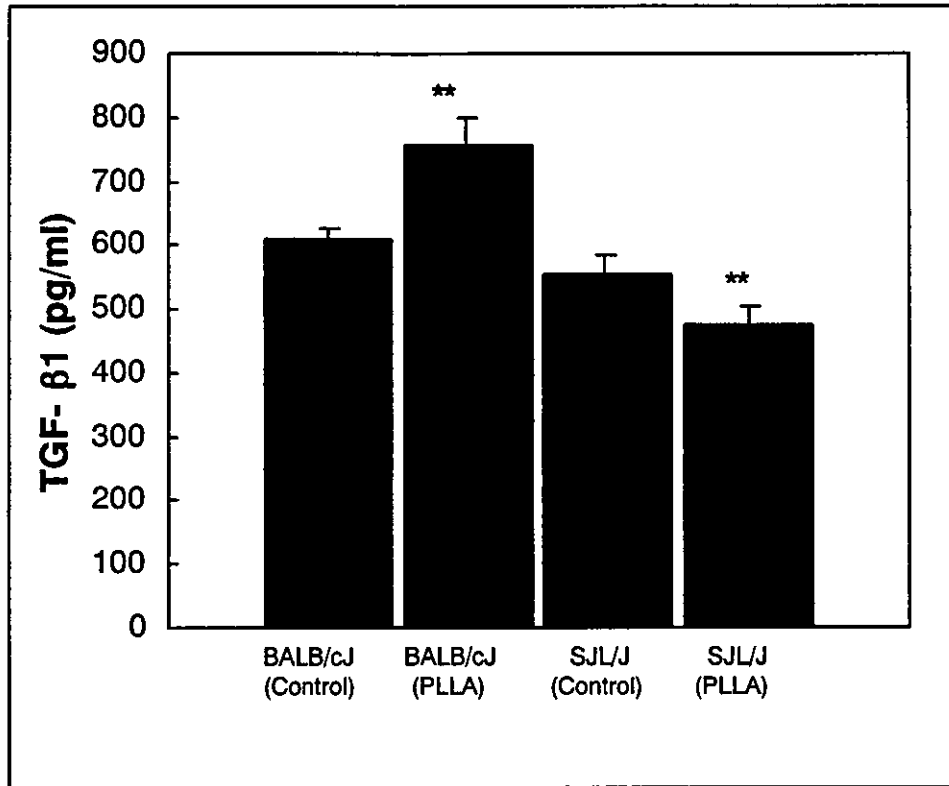


図 11. TGF-β1 分泌レベルについて

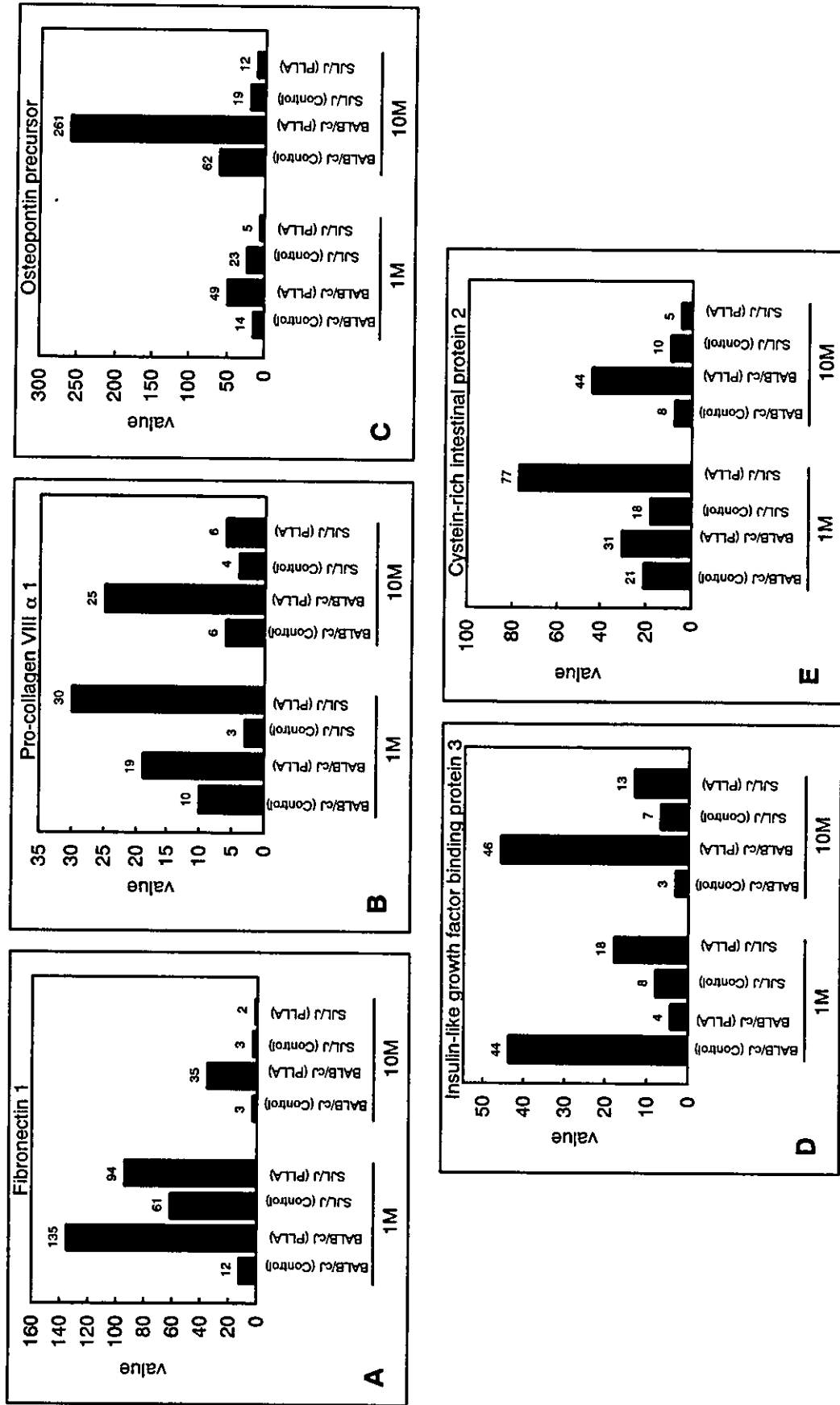
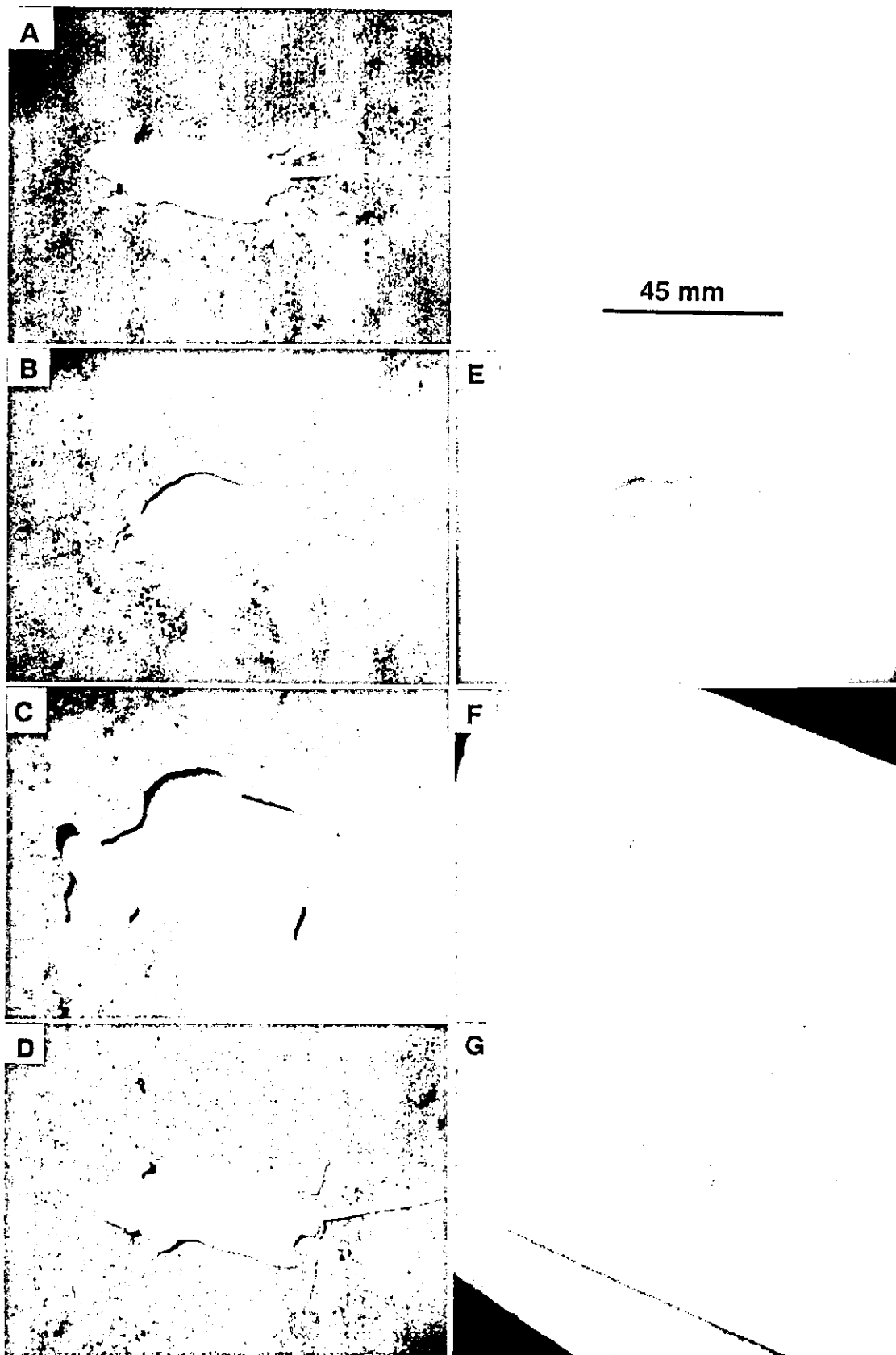


図 12. DNA チップ解析結果



図13. ノードマウスを用いた発癌検討



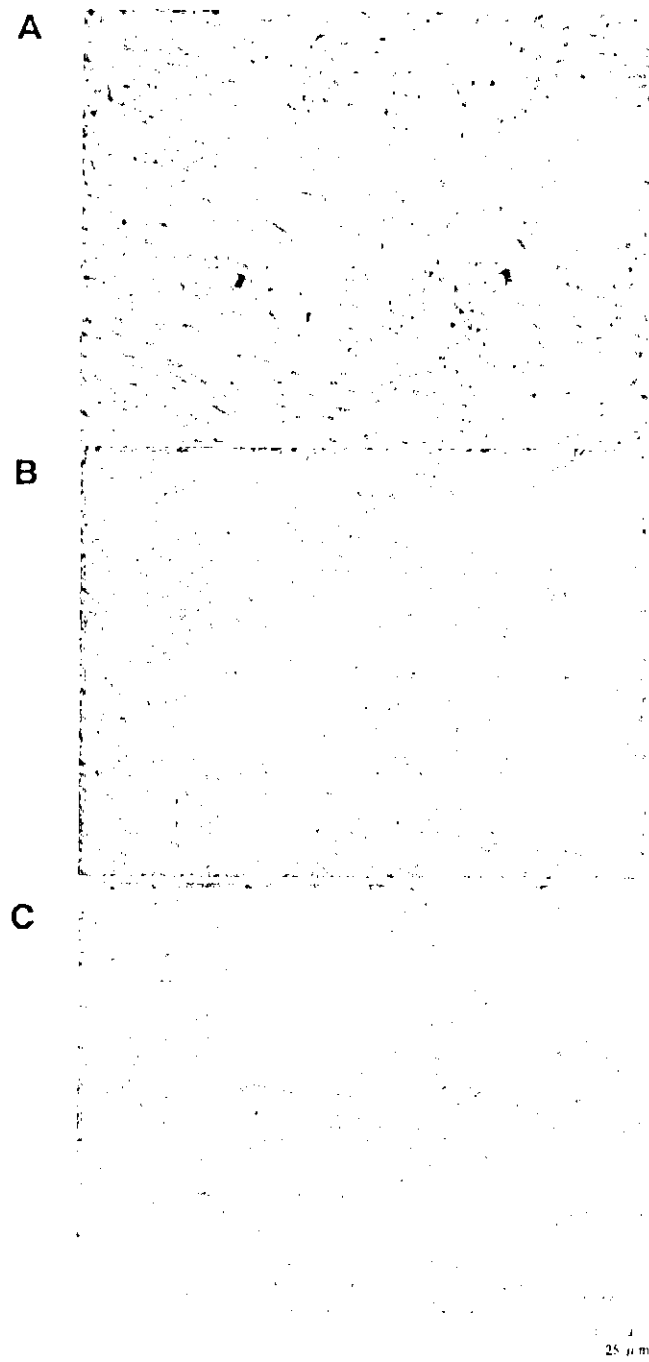


图14. 組織病理学的評価

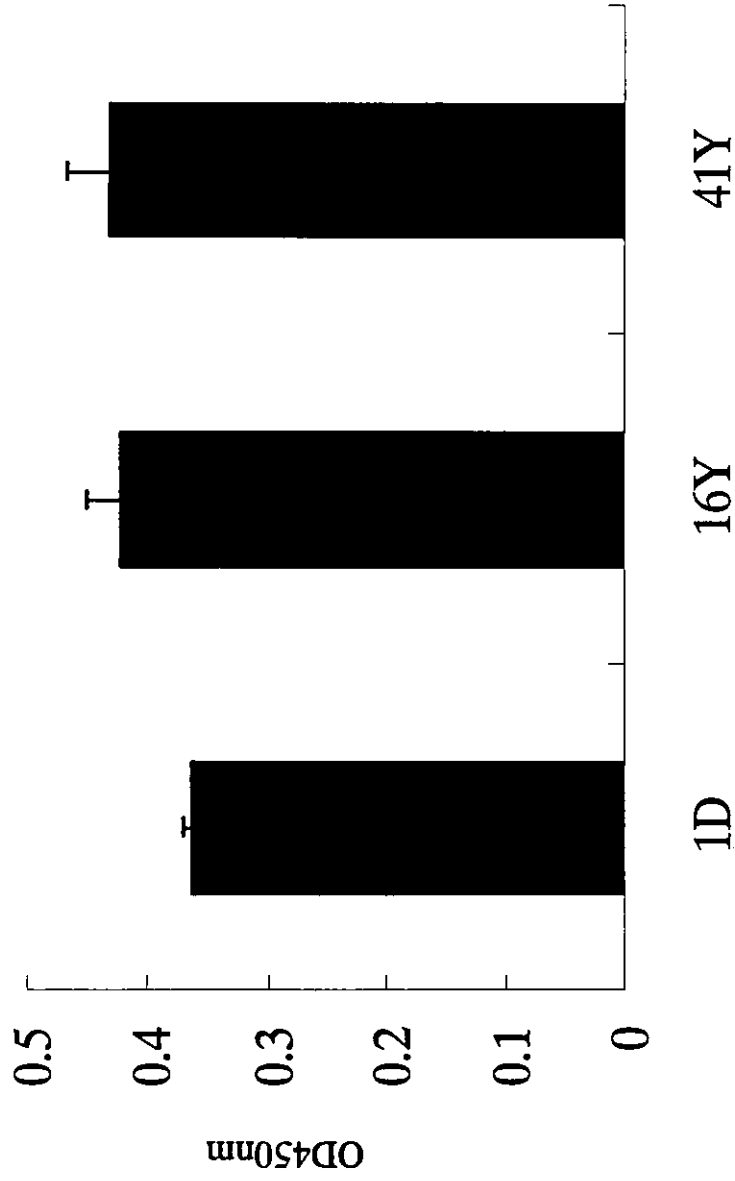


図15. 年齢の異なるヒト骨芽細胞の増殖性

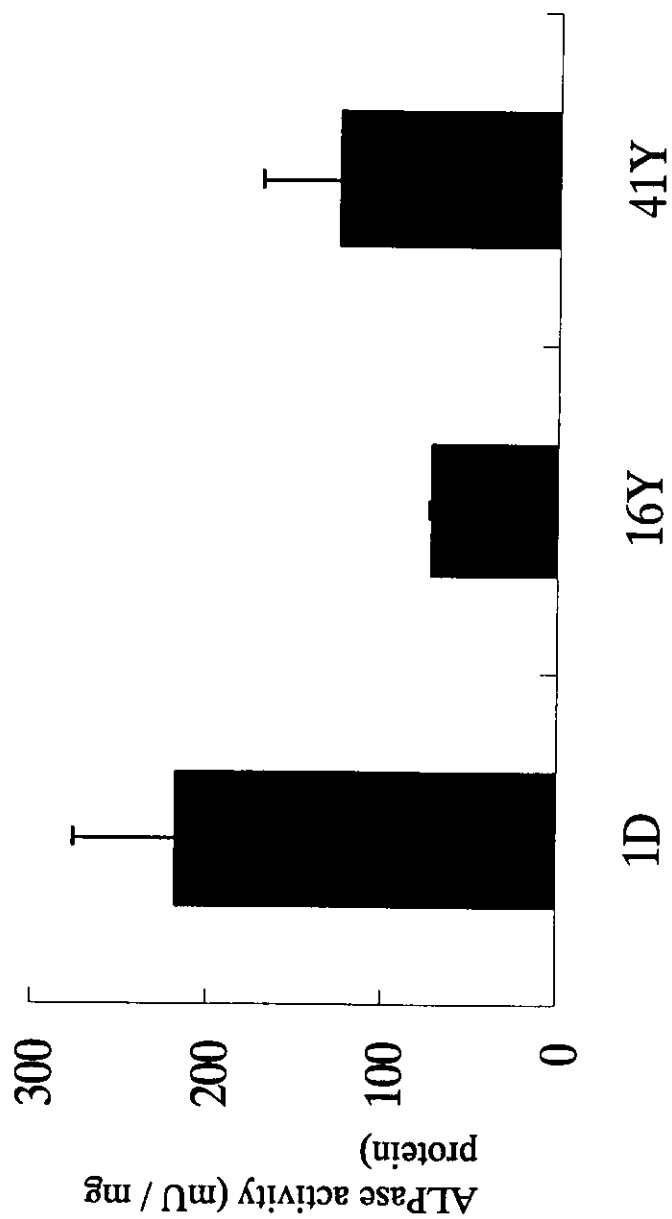


図 16. 年齢の異なるヒト骨芽細胞のALPase活性の違い

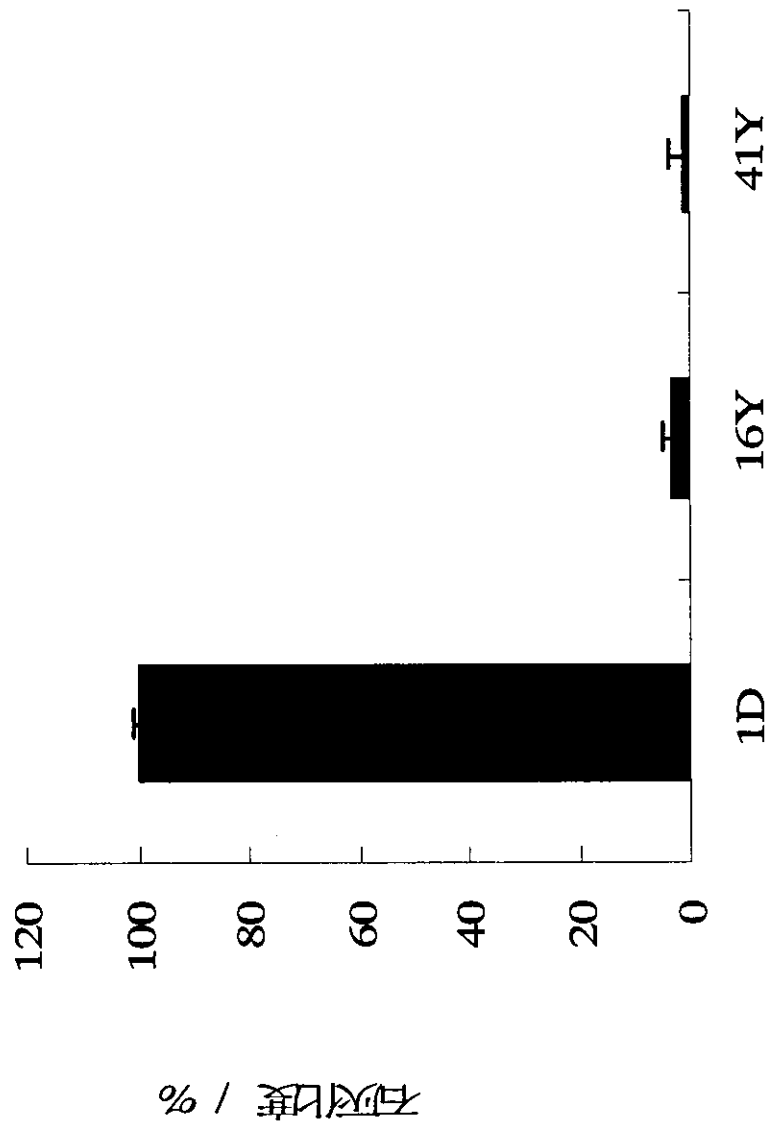


図17. 年齢の異なるヒト骨芽細胞の石灰化度の違い

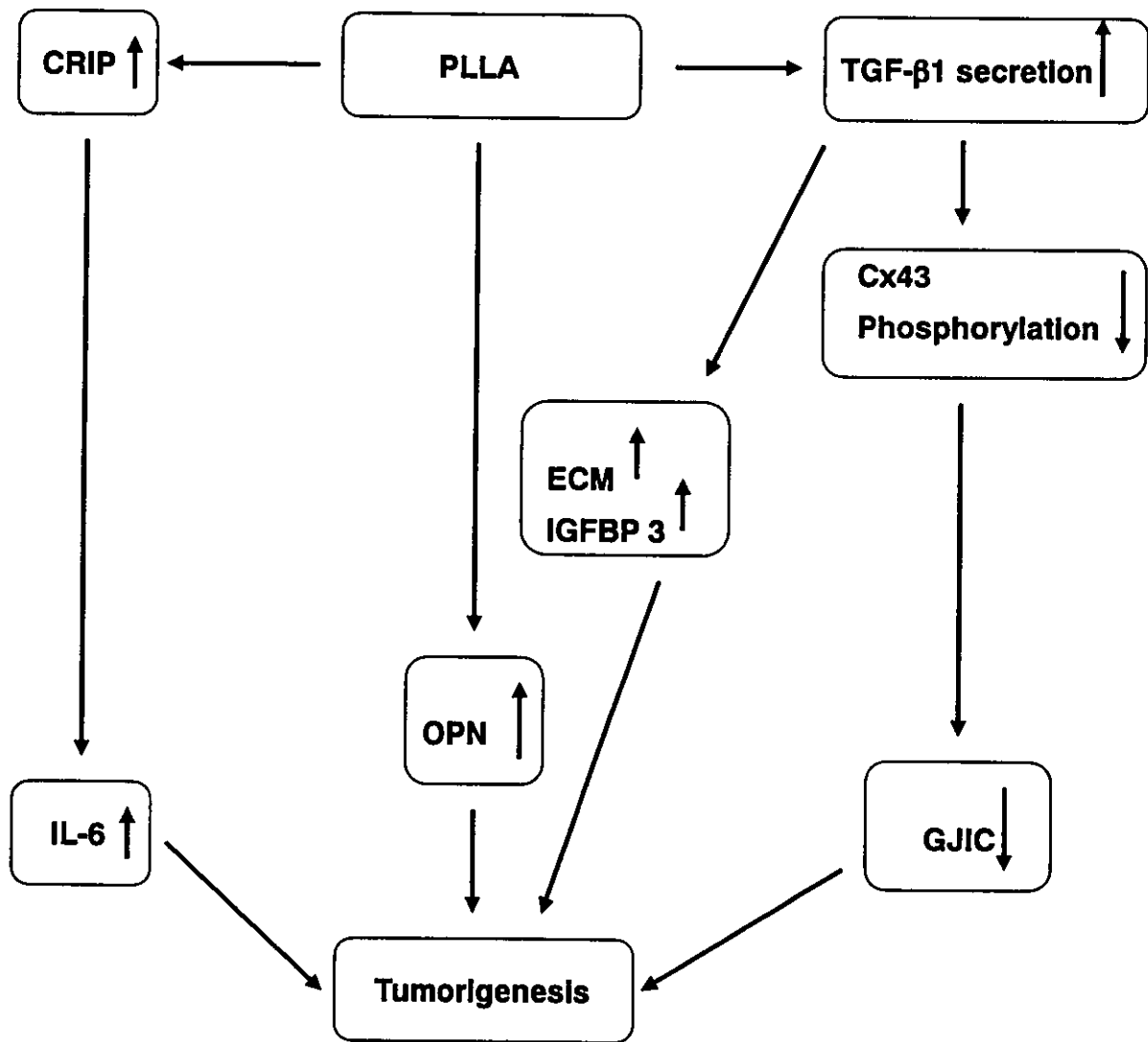


図 18. PLLA の発癌メカニズムの仮説

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

細胞組織利用医薬品の安全性等に関する研究

分担研究者 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所部長

【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のための基盤技術の開発や評価方法に関する研究として、新たに開発した PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮法の機構解析を行い、陽イオン解離基を高密度に持つ PEI が濃縮に有用であること、抗体が同時に濃縮されることなどを明らかにした。また、これらの解析結果の基づいて抗ウイルス抗体を添加して濃縮を行うことによりさらなる高感度化が可能なが明らかになった。(2) 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が明らかにした。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。(3) 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。(4) 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亜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。

研究協力者

内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所  
室長  
佐藤陽治 国立医薬品食品衛生研究所  
室長  
押澤 正 国立医薬品食品衛生研究所  
主任研究官  
豊田淑江 国立医薬品食品衛生研究所  
支援研究員

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。

**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

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。

本年度は、1) 新たに開発した PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法の機構解析と、解析結果に基づく本濃縮法の最適化についての検討を行うとともに、ヒト感染性ウイルスへの適応についても検討を行った。2) 細胞由来タンパク質プロフィールを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発の基礎として、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。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。4) 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。

## **B. 研究方法**

### **1. ウイルスのポリエチレンジアミンによる濃縮**

ポリエチレンジアミン (PEI) 磁気ビーズは、カルボキシル基を持つ磁気ビーズに、水溶性カルボジイミド存在下、平均分子量 70,000 の PEI をカップリングして作製した。

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-リジンと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. 細胞由来生理活性タンパク質の解析

### 2. 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。

### 2. 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。

### 2. 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℃、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℃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。

### 2. 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。

## 3. 血管内皮前駆細胞の特性解析に関する研究

### 3. 1 臍帯血と末梢血から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、リンフォブレップに重層し、2200回転、18℃、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、2mM 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  $\mu$ 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)を用い、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℃、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。

### 3. 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ンネクチン(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。

### 3. 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。一定期間バイヨシした後、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。

#### 4. P19細胞由来細胞株の心筋細胞への分化誘導

##### 4. 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。

##### 4. 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。

##### 4. 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。

##### 4. 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。

#### 4. 5 DNAマイクロアレイによる発現解析

P19細胞とCL6細胞、Neomycin耐性遺伝子を含む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例以下の場合に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