

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。

### 5. 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7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表2に示した。表2に\*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。

## 3. 血管内皮前駆細胞の特性指標の解析に関する研究

### 3.1 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殖にど

の様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8)。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8B 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9)。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。

### 3. 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10-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10-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10-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)。

### 3. 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 1 1A 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 4B 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。

### 3. 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 1 2-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 1 2-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 1 2-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。

### 3. 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 1 3 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。

## 4. P19 細胞由来細胞株の心筋細胞への分化誘導

### 4. 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 1 4)。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。

### 4. 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/cm<sup>2</sup>以上を「少ない」、0.098 個/cm<sup>2</sup>以上を「中程度」、157 個/cm<sup>2</sup>以上を「多い」と定義した。収縮コロニーの大きさは、 $6.36 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>以上の大きさのものを「小さい」、 $3.18 \times 10^{-3}$  cm<sup>2</sup>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15)。

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。

#### 4.3 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性リアルタイム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16)。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17)。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18)。

#### 4.4 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3)。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。

#### 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。

##### 3. 2 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つ塩基性のタンパク質である。このような塩基性の性質から、多くのサイトカイン等がゲル等電点電気泳動では分離できないことが知られている。本研究では、モデル細胞としてHL-60RG細胞を用いて、培養上清中に産生されるヘパリンへの親和性の高い塩基性タンパク質の網羅的解析に無担体等電点電気泳動を

適用したが、血球系細胞に多くの塩基性タンパク質の帰属を明らかにすることができた。今回、無担体等電点電気泳動法で帰属を推定できた塩基性のタンパク質 Myeloperoxidase (theoretical pI 9.19)、peptidylprolyl isomerase B (theoretical pI 9.33) などがあり、これらのタンパク質は SWISS-2DPAGE では分離できない。本法は、サイトカインや増殖因子等の塩基性の細胞由来タンパク質のプロファイリングに有用な手法であることが明らかにできた。

### 3. 血管内皮前駆細胞の特性指標の解析に関する研究

幹細胞や前駆細胞を用いた細胞治療においてはその品質の確保や有効性の担保に細胞特性解析データに基づいた規格設定が必要となる。本研究では、末梢血あるいは臍帯血の造血幹細胞を分離し、その血管内皮前駆細胞 (EPC) への分化誘導系を確立するとともに、その分化過程を詳細に解析することにより、EPCとしての有用性をあらかじめ判定できるような細胞指標の提示を試みようとしている。すでに報告した末梢血AC133陽性細胞からCD31強陽性のEPC誘導系を用いて、このCD31強陽性細胞のEPCとしての特性解析を行うとともにその品質や有効性の指標を明らかにすることを試みた。

まず臍帯血及び末梢血AC133陽性細胞からの *in vitro*でのEPC誘導に対する増殖因子の影響について解析した。特に、SCFやTPOなどのサイトカインの影響について解析したところ、VEGF単独に比較して、SCFやTPOを添加することにより細胞数の顕著な増加が認められ、さらにCD31強陽性細胞の比率の増加が認められた。細胞数の増幅に関してはSCFとTPOを相加的な影響を示すが、CD31強陽性細胞の出現に関して、SCF

は殆ど影響しないにもかかわらず、TPOは顕著な促進効果を示した。これらの結果より、TPOはEPCの誘導に主な作用を持ち、SCFは血管内皮前駆細胞よりも造血幹細胞や多能性造血細胞の増幅に主たる作用を持つのではないかと考えられた。両因子を同時に添加することにより、細胞数の増加と血管内皮前駆細胞の誘導の両方が亢進されると想定された。このTPOとSCFの作用をさらに解析するために、VEGF単独とSCF及びTPO存在下での血管内皮前駆細胞から血管内皮細胞への分化を解析したところ、SCFやTPOを添加したときにより強いeNOSやKDR陽性の接着細胞の誘導が認められた。また、臍帯血ACA133陽性細胞を培養した場合にはクラスター様の増幅が認められ、TPOとSCF添加によりeNOSやKDRの発現ばかりでなくクラスター数及びクラスターの大きさ(細胞数)も顕著に亢進していた。この結果から、AC133細胞から *in vitro*でのEPCの誘導にSCFやTPOが重要な働きをすることが明らかになった。EPCを血管再生治療に用いる場合、*in vitro*で増幅できればより高い治療効果が期待でき、本研究で示された結果はEPCの有用性確保のために重要な結果と考えられる。今後、増幅されたEPC機能的解析を行う予定である。

次にEPCはCD31強陽性であることをすでに報告しているが、品質や有用性評価指標としてのより広範な特性指標の解析を行った。特に、CD31強陽性細胞のコネキシン37、VE-カドヘリン、Lox-1、CD45などの発現について解析を行った。その結果、CD31強陽性細胞はLox-1弱陽性であり、血管内皮細胞への分化誘導にともないその発現が増強すること、VE-カドヘリン陰性、CD45陽性であることが示された。また、Cx37陽性細胞を分画してさらに培養を続けると接着性のKDR陽性細胞が出現してくることから、

Cx37の発現がCD31強陽性と同様に非常に有用な特性指標になる可能性が高いことが示された。また、VE-カドヘリン陰性でCD45陽性であることから、AC133陽性細胞から誘導されるCD31強陽性細胞はearly EPCとしての性質を持っているものと推定された。すなわち、CD31強陽性細胞は、AC133陽性の造血幹細胞から誘導されてきた初期のEPCであり、まだ捉えられていない成熟したEPCを経て血管内皮細胞へと分化する能力を有しているものと考えられる。

#### 4. P19細胞由来細胞株の心筋細胞への分化誘導と相関する遺伝子の探索

本研究に用いた各細胞株は、心筋分化誘導における自動拍動能出現までの日数、収縮コロニーの数・大きさの分化能に大きな差があることが確認された。これは分化誘導に伴う遺伝子発現の差を反映しているものと考えられた。そこで、分化誘導に伴う心筋特異的遺伝子発現や分化誘導を行う前の遺伝発現の網羅的解析を行うとともに、分化能を決定づけている遺伝子群の探索を行った。

まず、分化誘導後の心筋特異的遺伝子発現解析を行った。得られた7種の心筋特異的遺伝子発現の主成分分析を行った。主成分の寄与率は、算出された主成分が資料の情報をどれくらい説明しているかの目安を与える。すなわち主成分の妥当性を表す寄与率を見ると、第1主成分は7個ある資料のうち約4.5個の情報すなわち資料の本質の約65%を説明しており、第2主成分は約1.2個の情報すなわち資料の本質の約15%を説明し、この2つの主成分で資料の本質の80%以上が説明されると解釈される。算出された主成分の式を視覚化した図である変量プロットを見ると、第1主成分は各変量の係数全てが正に出ていることから心筋分化の指標となることが考えられる。

GATA4とMEF2CとNkx2.5は心筋分化の比較的初期に機能する遺伝子であり、心筋線維遺伝子のMLC2a、MLC2v、 $\alpha$ MHC、 $\beta$ MHCは心筋分化の比較的后期に発現が見られることが知られている。なかでも $\beta$ MHCはマウスでは胎生期の心筋に発現し、出生後は $\alpha$ MHCに置換される。また、心室筋においても胎生期には心房筋タイプのMLC2aの発現が認められるが、出生と共にすべてのMLC2が $\nu$ タイプとなる。第2主成分ではGATA4、MEF2CおよびNkx2.5の係数は負の値であり、心筋線維遺伝子の係数はすべて正の値である上、 $\beta$ MHCには $\alpha$ MHCよりも低い係数を割り当てられ、MLC2aもMLC2vより低い係数を割り当てられている。従って、第2主成分は心筋の発達段階の指標となることが考えられる。この主成分から各々のデータを見たものが主成分得点であり、これを心筋細胞分化の指標とした。

次に分化誘導を行う前の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイを用いて解析した。得られたデータにフィルターをかけて心筋細胞分化との相関のあるものを抽出した。まず、遺伝子の発現が見られるSequence Tagを選ぶためにフィルター①をかけた。次に、細胞株による遺伝子発現の差を比較するためには細胞株間で差があるものを選ぶ必要があるのでフィルター②をかけた。その次に、細胞株間での差が小さいと相関がないものまで相関があるとして抽出されてしまう危険性があるので細胞株間での差が平均で50%ずつあれば大きな差が出ると仮定、すなわち最大の平均値と最小の平均値に2.5倍の差があればよいと仮定しフィルター③をかけた。最後に、フィルター④をとし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、さらに自動拍動能出現までの日数、収縮コロニーの数に対してスピアマンの順位相関係数を算出し、有意な相関があるものを選び出した。ここで、相関係数として順位相関を選択した理由は、分化前における特定の遺伝子発現が心筋分化に影響する場合、分化前の遺伝子発現量と分化効率は必ずしも線形の相関を示すとは限らないためであり、また、いくつかの飛離れた値が存在する場合には、例えば相関が線形であったとしても、ピアソンの積率相関係数などの間隔尺度・比尺度間の相関係数の場合はそれらの値に引きずられて不当に高い相関係数が得られてしまうからである。

スピアマンの順位相関係数を評価した結果、表1に示すようなCPCと名付けた24遺伝子が抽出された。これらCPC遺伝子群の発現量は、分化誘導刺激が存在しない状態にあるP19細胞由来細胞株における心筋細胞分化ポテンシャルの指標となる。また、同時に、CPC遺伝子群は各種幹細胞もしくは前駆細胞における心筋細胞分化ポテンシャルの指標となる可能性がある。CPC遺伝子の多くは心筋細胞分化と直接関連付けられた報告がこれまでなされていない、機能未知の蛋白質をコードするものであった。本研究における遺伝子探索では分化誘導前の遺伝子プロファイルの差異に基づいて心筋細胞分化予測マーカー遺伝子を抽出している点に特徴がある。細胞組織利用医薬品として心筋細胞に分化する前の前駆細胞等を用いて治療を行う場合に、今回明らかにした遺伝子群の産物がある特性指標として利用できるものと期待される。さらに、探索された遺伝子の多くが膜タンパク質であることから前駆細胞の分離にも有用である可能性がある。

## E. 結論

(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応用として抗ウイルス抗体を添加して濃縮を行うことがさらなる高感度化につながる事が明らかになった。さらに、PEI磁気ビーズはヒトウイルスであるHBVやHCVの濃縮にも適応可能であることを明らかにした。

(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を組み合わせた手法の有用性について検討を行い、これまでのゲル2次元電気泳動では分離できない塩基性のタンパク質の解析に有用であることを明らかにした。

(3) ヒト血液幹細胞からより多くの血管内皮前駆細胞を分化誘導する条件を明らかにするとともに、血管内皮前駆細胞の細胞指標として、CD31に加えCx37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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表及び著書

- 1) Kanayasu-Toyoda T, Fujino T, Oshizawa T, Suzuki T, Nishimaki-Mogami T, Sato Y, Sawada J, Inoue K, Shudo K, Ohno Y, Yamaguchi T, J. Steroid Biochem Mol in press.

- 2) Hosono T., Mizuguchi H., Katayama K., Xu Z.L., Sakurai F., Ishii-Watabe A., Kawabata K., Yamaguchi T., Nakagawa S., Mayumi T., Hayakawa T. Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference. *Hum. Gene Ther.*, 15, 813-819 (2004)
- 3) Uchida,E., Sato,K., Iwata,A., Ishii-Watabe,A., Mizuguchi,H., Hikata,M., Murata,M., Yamaguchi,T., Hayakawa,T.: An improved method for detection of replication competent retrovirus in retrovirus vector products, *Biologicals*, 32, 139-146 (2004)
- 4) Kusui,K., Sasaki,H., Adachi,R., Matsui,S., Yamamoto,K., Yamaguchi,T., Kasahara,T., Suzuki,K.; Ribosomal protein S18 identified as a cofilin-binding protein by using phage display library. *Mol. Cell. Biochem.*, 262, 187-193 (2004)
- 3) Sato Y, Nakamura R, Yoshida H, Yamaguchi T, Ohno Y, Nagao T, Inoue K Thyroid hormone enhances calcification of vascular smooth muscle cells in vitro. XVIII World Congress International Society for Heart Research (2004年8月)
- 4) Nakamura RA, Satoh M, Fujishita K, Mori S, Ishida S, Yamaguchi T, Inoue K, Ohno Y, Nagao T, Sato Y Thyroid hormone regulates vascular smooth muscle calcification. 第78回日本薬理学会年会 (2005年3月)
- 5) Yoshida H, Tamehiro N, Hashimoto T, Nishimaki-Mogami T, Yamaguchi T, Ohno Y, Nagao T, Asakawa Y, Inoue K, Sato Y PPARgamma ligand activity of ginkglic acid-related compounds. 第78回日本薬理学会年会 (2005年3月)

#### 学会発表

- 1) Kanayasu-Toyoda, T., Oshizawa, T., Suzuki, T., Uchida, E., Hayakawa, T. and Yamaguchi, T Effect of siRNA of PKC $\epsilon$  on G-CSF signaling pathway in differentiating HL-60 cells into neutrophils. 第77回日本生化学大会 (2004.10.14, 横浜)
- 2) Sato Y, Mori S, Nakamura R, Ishida S, Sawada J, Miyazawa H, Yamaguchi T, Inoue K, Ohno Y Microarray analysis of coronary artery smooth muscle cells stimulated by PPAR alpha and gamma ligands. 第77回日本薬理学会年会 (2004年3月)
- 6) 佐藤 光利, 中村 亮, 藤下 加代子, 森 聡子, 石田 誠一, 山口 照英, 井上 和秀, 長尾 拓, 大野 泰雄, 佐藤 陽治 血管平滑筋における甲状腺ホルモンのターゲットの同定 第125回日本薬学会年会 (2005年3月)
- 7) 宮澤 宏, 喜納 克仁, 宮澤 薫, 佐藤 陽治, 山口 照英 幹細胞からの神経分化を左右する因子の探索 第125回日本薬学会年会 (2005年3月)

表1. プライマー及びプローブ

---

Sindbis virus

5'-CAGGACGTCTATAACGCTCC-3'

5'-GAGAACCTGAACTGGGTGGTGTC-3'

HSV-1

5'-GCGTCATGGTACTGGCAAG-3'

5'-TTGACTCTACGGAGCTGGCC-3'

5'-TGGAGCTGATGCCGTAGTCGG-3' (TaqMAN Probe)

SV-40

5'-GACATTCCTAGGCTCACCTCAC-3'

5'-ACCTTGCCAAACTGTCCCTTAAA-3'

5'-CTTGAAAGAAGAACCCTAAAGA-3' (TaqMAN Probe)

Adenovirus

5'-TCCGGTCCTTCTAACACACCTC-3'

5'-ACGGCAACTGGTTTAATGGG-3'

TGAGATACACCCGGTGGTCCCGC-3' (TaqMAN Probe)

Poliovirus

5'-CCCGAGAAATGGGACGACTA-3'

5'-TGGAGCTGTTCCGTAGGTGTAA-3'

5'-ACATGGCAAACCTCATCAAATCCATCAATC-3' (TaqMAN Probe)

PPV

5'-AACAACTACGCAGCAACTCCAATA-3'

5'-ACGGCTCCAAGGCTAAAGC-3'

5'-AGGAGGACCTGGATTT-3' (TaqMAN Probe)

---

Real-time PCR/TR-PCR で用いたプライマーとプローブ。Sindbis virus の場合は Syber green を用いた。

表2. PEI 磁気ビーズによって濃縮されるウイルス

ウイルス	宿主	ウイルス ゲノム	脂質膜	PEI磁気 ビーズ濃縮
ヘルペスウイルス1型(HSV-1)	ヒト	DNA	+	+
ポリオウイルス	ヒト	RNA	-	-
ブタパルボウイルス(PPV)	ブタ	DNA	-	-
水疱性口内炎ウイルス(VSV)	ウシ	RNA	+	+
Sindbisウイルス	ヒト	RNA	+	+
SV-40ウイルス	サル	DNA	-	+
サイトメガロウイルス	サル	DNA	+	+
マウス白血病ウイルス	マウス	RNA	+	+
アデノウイルス	ヒト	DNA	-	+
B型肝炎ウイルス(HBV)	ヒト	DNA	+	+
C型肝炎ウイルス(HCV)	ヒト	RNA	+	+
ヒト免疫不全ウイルス(HIV)	ヒト	RNA	+	+
A型肝炎ウイルス(HAV)	ヒト	RNA	-	-

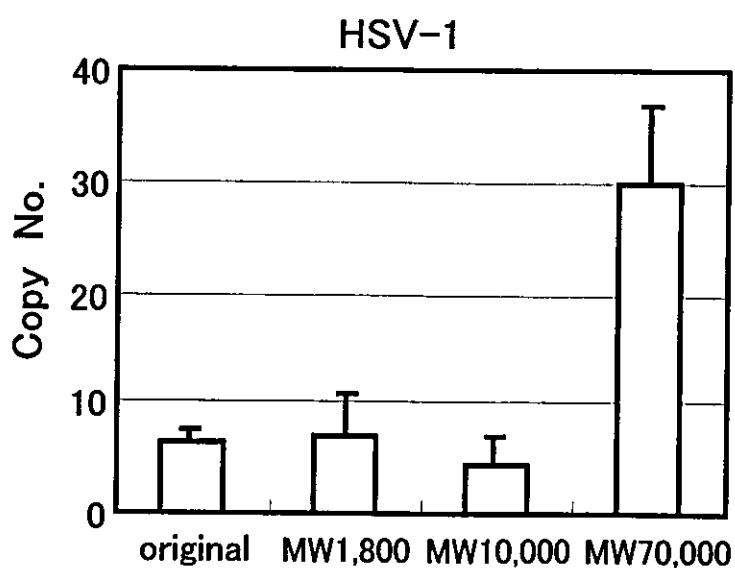


図1 ポリエチレンイミンの分子量とウイルス濃縮効率

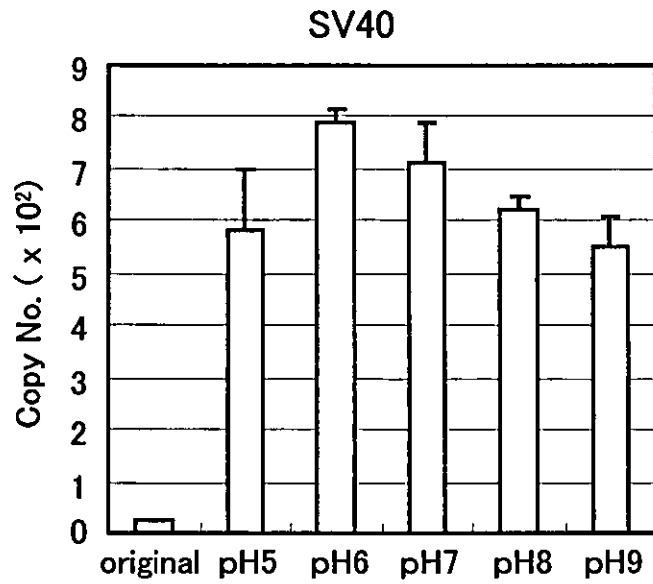


図2. PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮効率の pH による変化

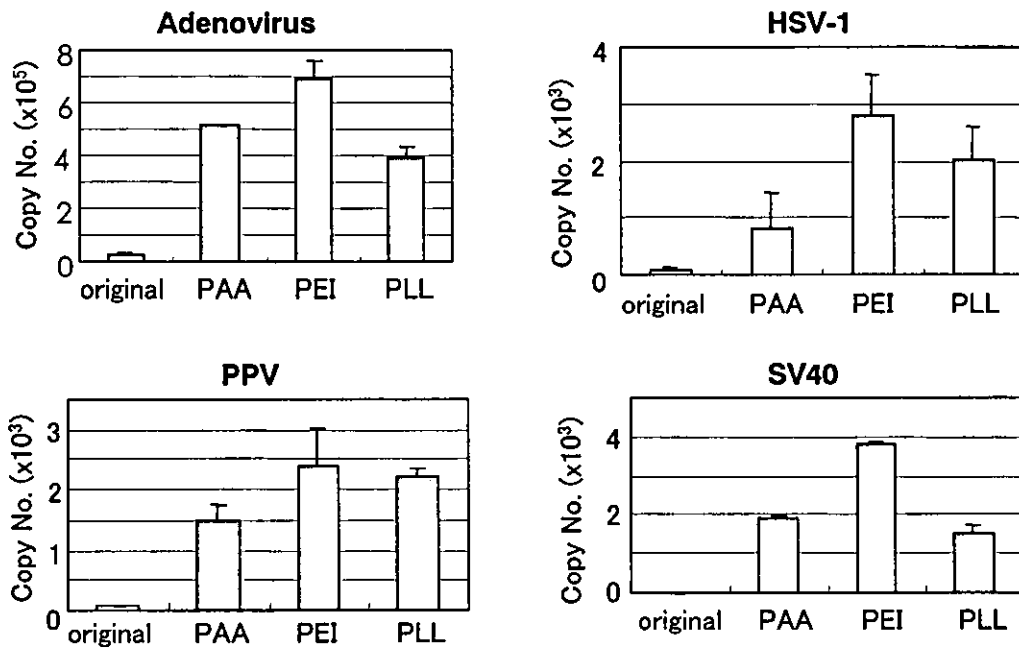


図3. 磁性粒子に結合するカチオン性ポリマーの違いによるウイルス濃縮効率の変化

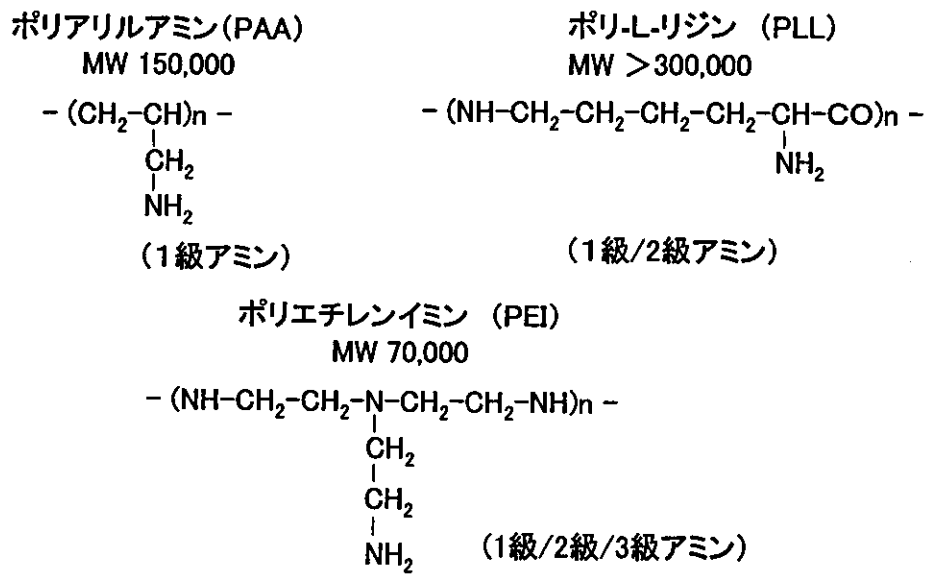


図4. ウイルス濃縮に用いたカチオン性ポリマーの構造式

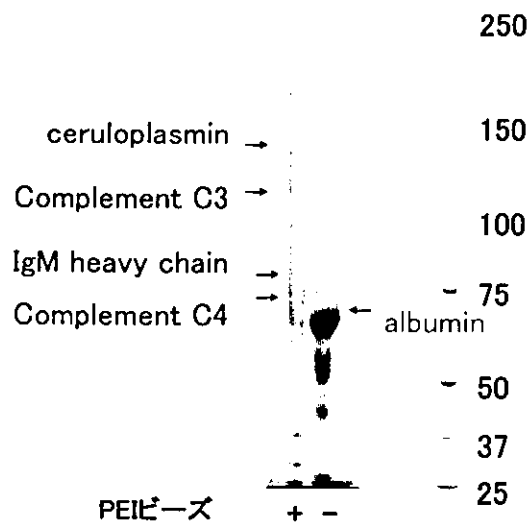


図5. PEI磁気ビーズにウイルスとともに濃縮される血清成分中の蛋白質のMS/MSによる同定

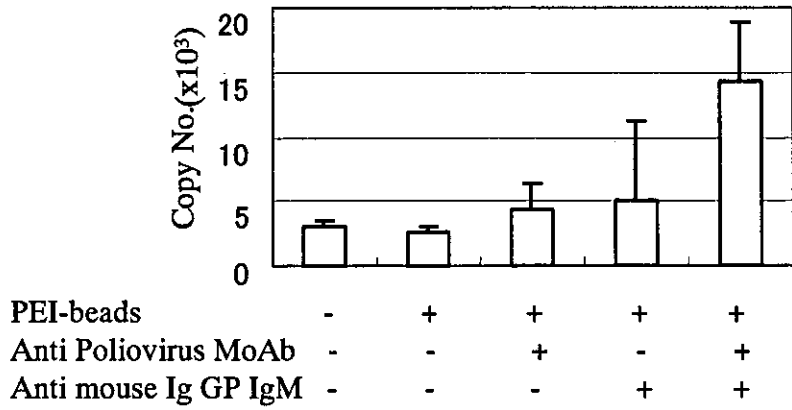


図6. 抗体存在下でのPEI磁気ビーズによるポリオウイルスの濃縮

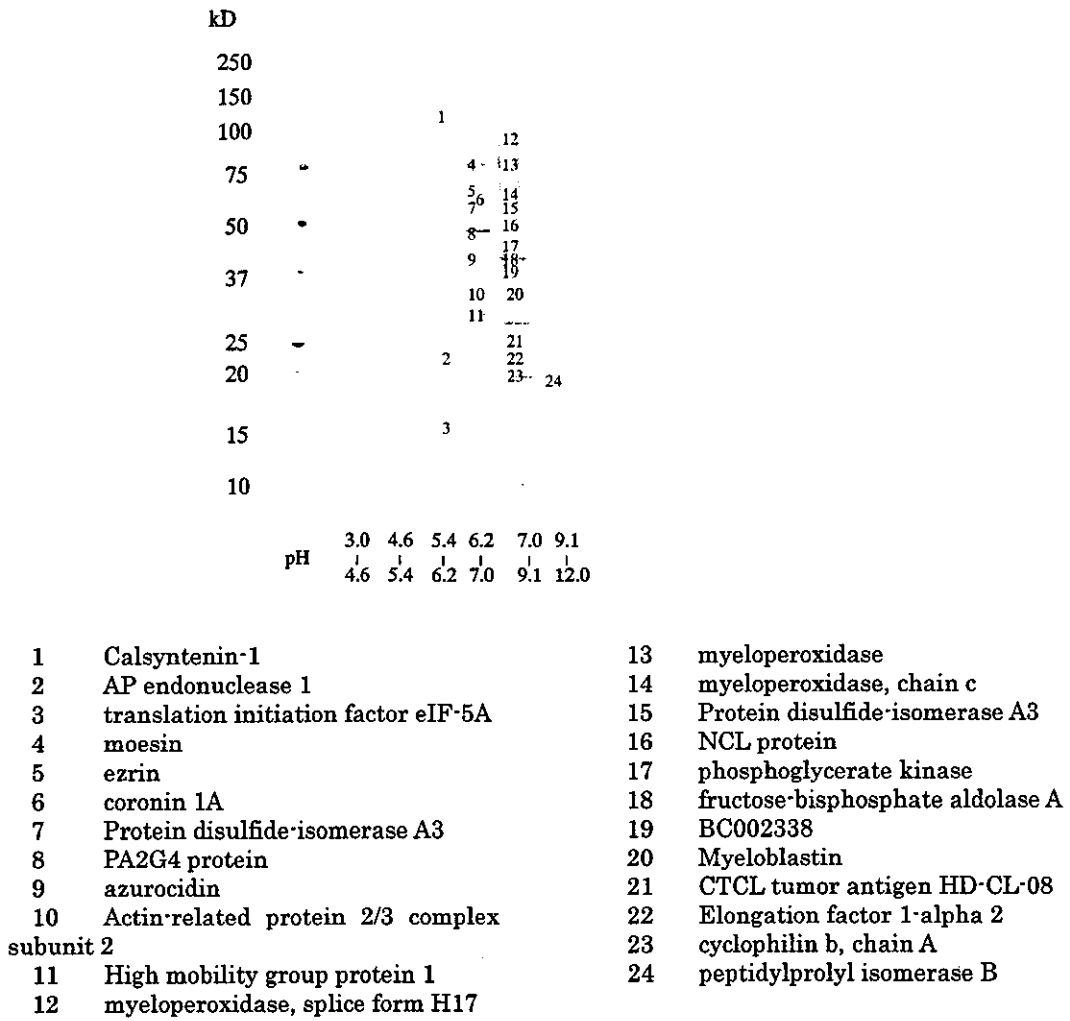


図7 無担体等電点電気泳動/SDS-PAGEによる細胞由来タンパク質の分離と同定

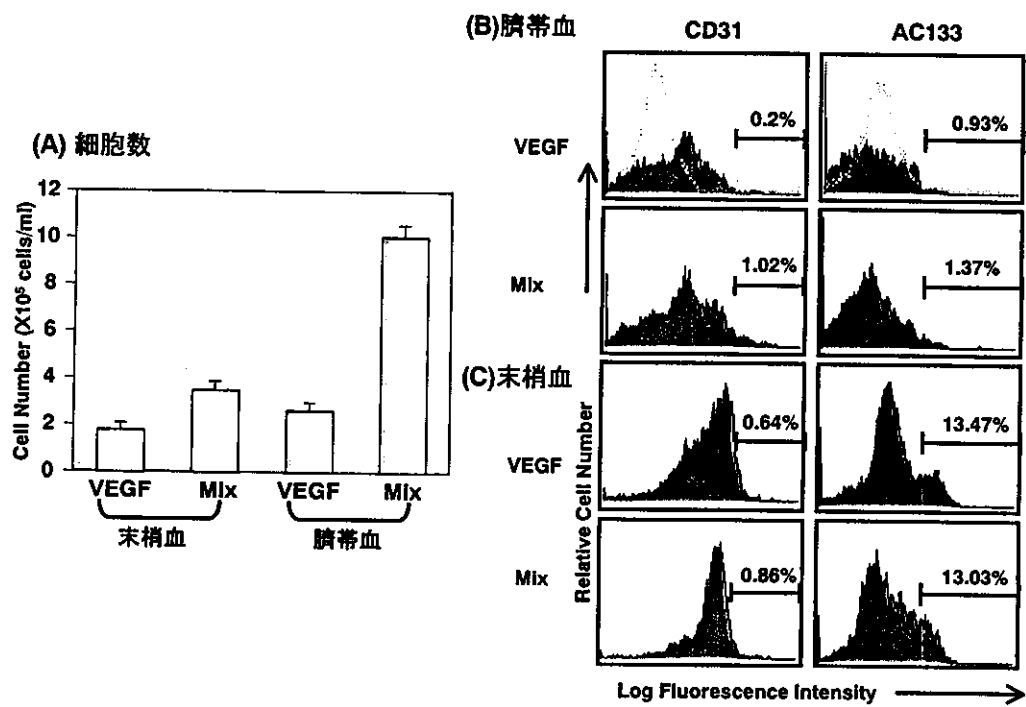


図 8. AC133 陽性細胞を SCF や TPO 存在下で培養した時に一週間後に出現する CD31 強陽性細胞と AC133 陽性細胞

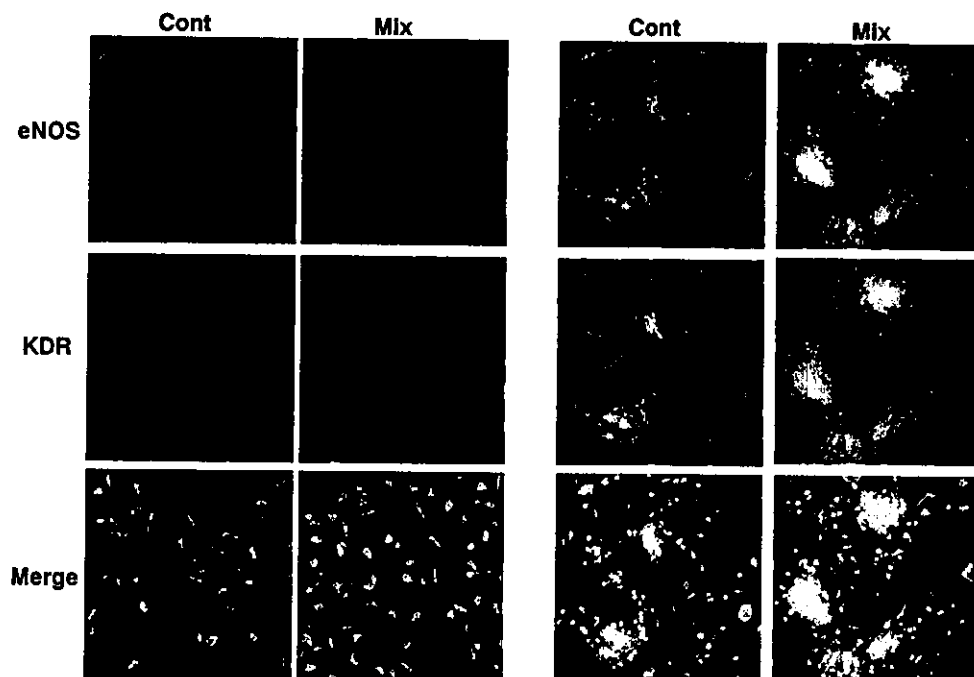


図 9. AC133 陽性細胞を SCF や TPO 存在下に培養した時に出現してくる接着細胞



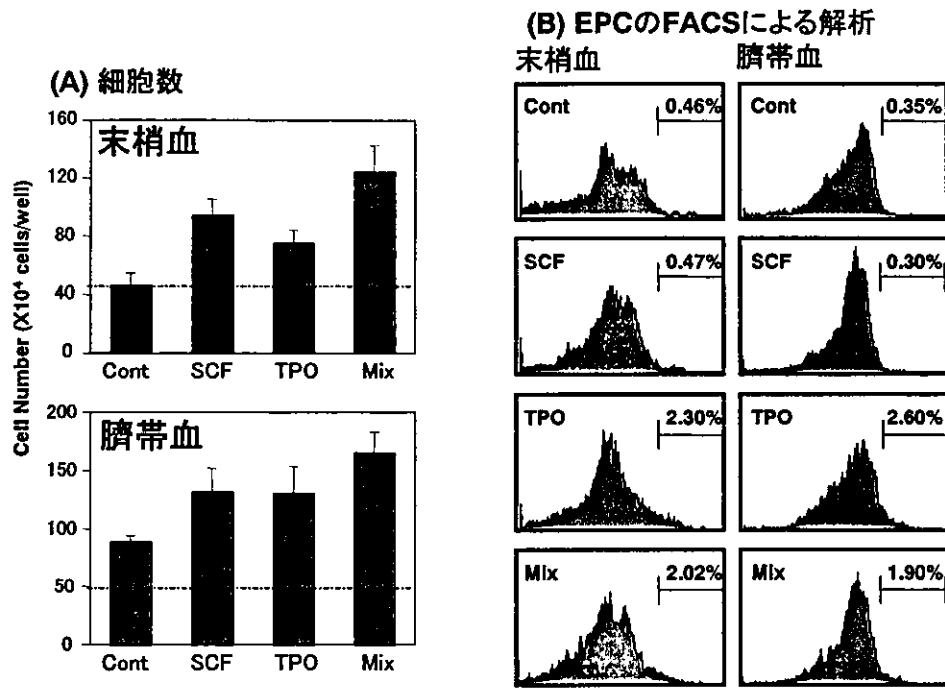


図 10. AC133 陽性細胞を SCF や TPO 存在下に培養した時の細胞増殖と出現してくる CD31 強陽性細胞の比率

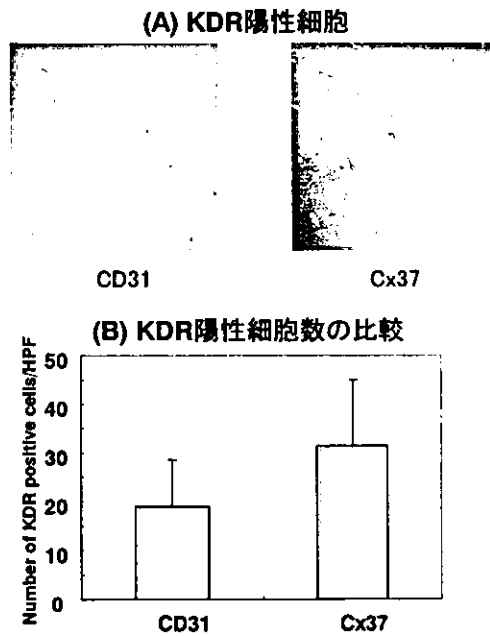


図 11. AC133 由来 CD31 及び Cx37 陽性細胞を培養した時の KDR 陽性接着細胞

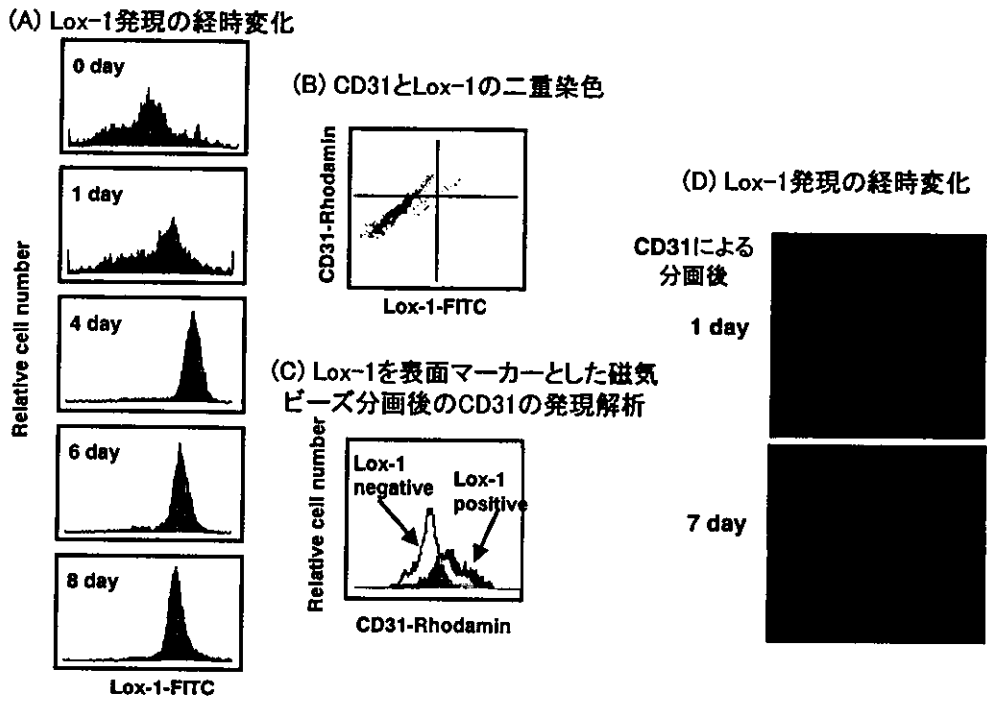


図 1 2. 臍帯血 AC133 陽性細胞を培養したときの Lox-1 発現の経時変化と Lox-1 陽性細胞を磁気ビーズ分画後の CD31 の発現解析

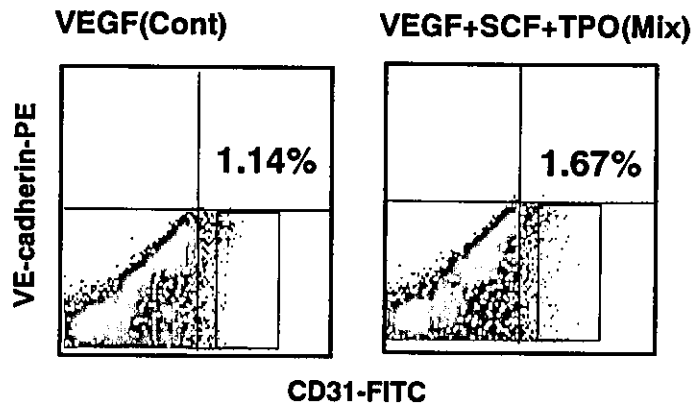


図 1 3. EPC の CD31 と VE-cadherin の二重染色

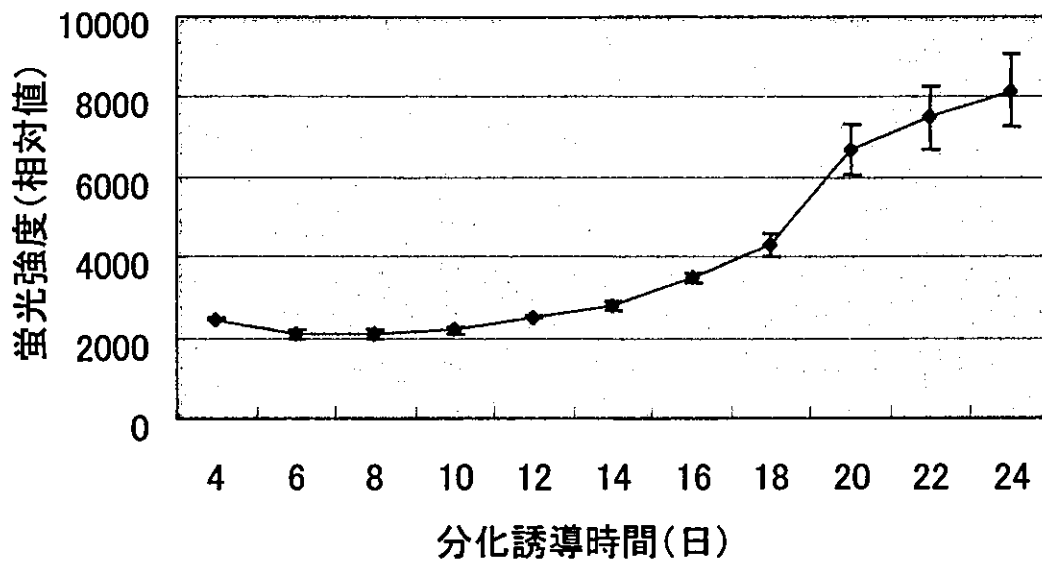
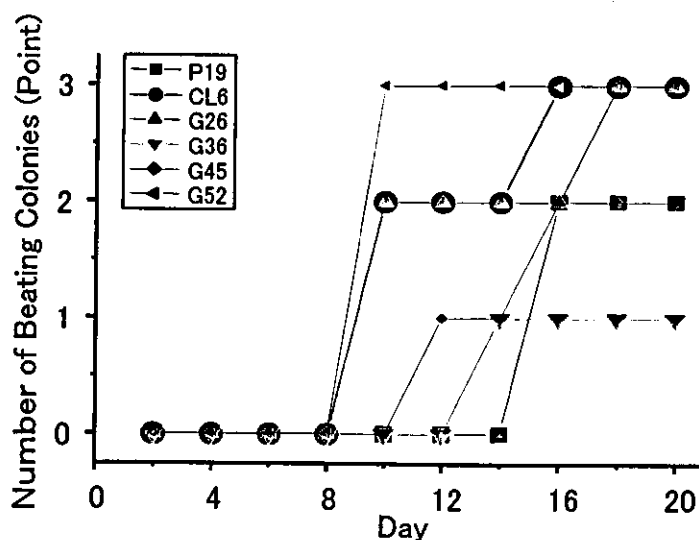


図14. CL6G52株の蛍光強度の時間変化

GFPの励起光によるCL6G52細胞の蛍光強度の時間変化を示す。サブコンフルエントのCL6G52株をトリプシン-EDTA処理により分散した後、1% DMSOを含むMEM $\alpha$ 溶液中で培養して心筋細胞分化を誘導した。分化誘導開始の約2週間後より蛍光強度が増加した。値は平均値 $\pm$ S.E.M. (n=12)を示す。

### A. 収縮コロニー数



### B. 収縮コロニーサイズ

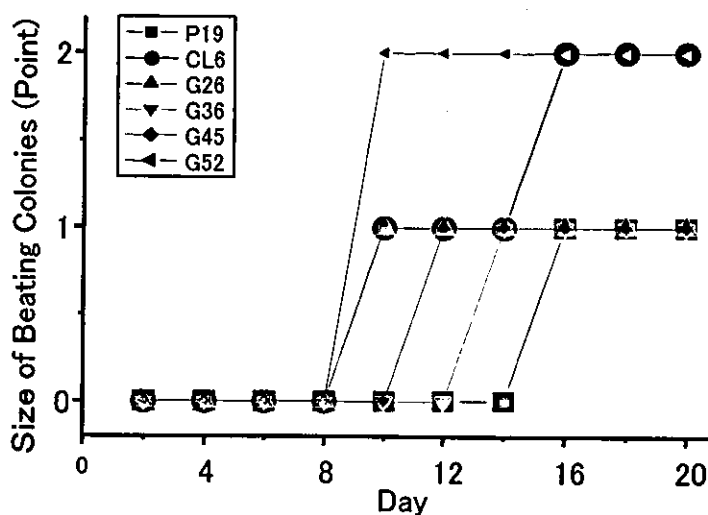


図15. P19由来細胞株の心筋細胞分化の定性的時間経過

サブコンフルエントのP19由来細胞株をトリプシン-EDTA処理により分散した後、1% DMSOを含むMEM  $\alpha$  溶液中で培養して心筋細胞分化を誘導した。A)各細胞株の収縮コロニー数の時間経過を示す。収縮が見られないものに「0」、6穴細胞培養プレート1枚に対して1つ以上の収縮があるものに「1」、プレートのウェル1つに対して1つ以上の収縮があるものに「2」、顕微鏡の視野( $\times 200$ )に対して1つ以上の収縮があるものに「3」のスコアを与えた。B)各細胞株の収縮コロニーサイズの時間経過を示す。収縮が見られないものに「0」、顕微鏡の視野( $\times 200$ )の1/100程度の大きさの点状の収縮に対して「1」、顕微鏡の視野( $\times 200$ )の1/2程度の大きさのシート状の収縮に「2」のスコアを与えた。横軸は心筋分化誘導後の日数を示す。CL6G52株の自動能はGFPの蛍光増加(図1)よりも4日ほど早くの出現している。