

が見出され、この細胞を積極的に補充し治療することが実現可能な段階になりつつある。すなわち、肝幹細胞を移植し肝機能を一時的に回復させることで、生体肝移植までの橋渡しや、肝不全の際の代謝補助となることを期待した治療法である。さらに、細胞移植の効率を高めることで、代謝性疾患における全肝移植に置き換わる方法となりうると期待されている。したがって、細胞移植の成功の鍵は、安全かつ有効な治療用細胞を、十分量確保する方法を確立することである。また、肝幹細胞の調製法が確立されることで、人口肝臓補助装置の研究推進に寄与するものと期待される。

肝幹細胞として、oval cell、骨髄由来細胞、小型肝細胞などがあげられるが、これらの細胞を細胞治療薬として応用しようとする場合、細胞の品質評価法の確立は必須である。すなわち、目的の細胞を単離し増殖させる過程で生じうる目的外の細胞の混在には注意を要する。また、目的の細胞が期待される機能を有する、もしくは機能細胞へと分化しうることを担保することが求められつつあることから、治療用細胞を的確に位置付ける分子マーカーを同定し、適切な評価法を確立することが極めて重要となる。

最近、我々は分離直後の小型肝細胞および肝細胞におけるプロテオミクス、免疫化学的および RT-PCR を用いた解析により、annexin A3 (AnxA3) が小型肝細胞のみに発現することを見出し、AnxA3 が小型肝細胞のマーカーとして有用である可能性を示した。なお、この知見は世界で初めて小型肝細胞に特異的なタンパク質が同定された例である。現在、肝幹細胞マーカーとして

の AnxA3 の有用性が示唆されたのは小型肝細胞についてのみであり、他の幹細胞についてはその存在も含め不明である。

本研究では 2-acetylaminofluorine /carbon tetrachloride (2-AAF /CCl₄) 投与ラット肝臓における oval cell の出現および肝細胞への分化誘導モデルを用い、AnxA3 の肝幹細胞のマーカーとしての有用性について検討を行った。

B. 研究方法

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. 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。CCl₄ 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+CCl₄ 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 μ l の CCl₄ を経口投与した。その後 2-AAF の投与は毎日同様に続け、CCl₄ 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+CCl₄ 群の CCl₄ 投与の代わりに vehicle として olive oil を投与し、control 群は 2-AAF+CCl₄ 群の 2-AAF 投与と CCl₄ 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+CCl₄群のCCl₄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晩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回繰り返し、型を用いて包埋した。包埋した試料はマイクロトームで3µm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、10mM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10mM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。

C. 研究結果

図1および2における hematoxylin と eosin (H&E) 染色像および免疫組織染色像は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 を投与した場合におけるものをそれぞれ示している。図1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2においても図1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3は図1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4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ゾーンにわたり亜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5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6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7は図6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。

D. 考察

2-AAF/CCL₄ を用いたラット肝臓における oval cell の出現および肝細胞への分化誘導モデルを用いた検討から、特に中心静脈域で小型血球様細胞の顕著な出現の増加がみられ、この細胞は AnxA3 とアルブミンを強く発現していることが明らかになった。したがって、AnxA3 は肝幹細胞のマーカースとして有用である可能性が示唆された。

図1および3に示すように、AnxA3 は正常肝臓において肝細胞と異なる細胞において一部発現している。中心静脈域において AnxA3 陽性、アルブミン陰性の細胞は肝細胞索に沿って存在しているように観察されることから類洞内皮細胞の可能性が考えられる。門脈域においてもその周囲を取り囲むようにして少数の AnxA3 陽性アルブミン陰性の細胞が存在するが、この細胞と中心静脈域との異同については不明である。

一方、以下に述べる点から、今回その存

在を確認した小型血球様の肝幹細胞は一般的に提唱されている oval cell と同じではないように思われる。まず、oval cell の由来はヘリング管と考えられているが、今回観察された小型血球様の肝幹細胞は中心静脈域に強い局在がみられる。また、データは示していないが、2-AAF/CCL₄ 投与後出現する AnxA3 およびアルブミン共陽性の小型血球様細胞は造血幹細胞のマーカースである CD34 についても陽性であり、その消長はこの AnxA3 陽性細胞と同様である。したがって、この細胞は骨髄由来細胞である可能性が極めて高く、oval cell の一部は骨髄細胞に由来するという最近の知見と一致する。

肝幹細胞のマーカースとして AnxA3 を用いる場合、その局在は細胞表面であることが望ましい。なぜなら、細胞を破壊することなく抗体を用いたフローサイトメーターの解析によりその存在を確認できるからである。我々の小型肝細胞を用いた検討結果から、AnxA3 は主として肝細胞膜に局在することが確かめられている。また、他の Anx についても免疫化学的解析および抗体を用いた機能阻害の検討から細胞膜表面に存在することが明らかになっている。今後、小型血球様の肝幹細胞における AnxA3 の局在についても詳細に検討する必要がある。

AnxA3 が小型血球様の肝幹細胞の機能に及ぼす影響についても興味の対象である。これに関連し、我々は他の細胞も用いて AnxA3 が増殖を促進させる方向に作用することを示唆する結果を得ている。今回得られた結果から、2-AAF/CCL₄ 投与後出現する小型血球様の肝幹細胞は増殖・分裂を盛んに繰り返すことは明らかである。したがって、AnxA3 は小型血球様の肝幹細胞が有

する高い増殖能の賦与に寄与しているのかもしれない。

E. 結論

2-AAF/CCl₄ 投与ラット肝臓における oval cell の出現および肝細胞への分化誘導モデルを用いた検討から、AnxA3 は小型血球様の肝幹細胞のマーカーとして有用である可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Niimi, S., Harashima, M., Takayama, K., Hara, M., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T. (2005) Thrombomodulin enhances the invasive activity of mouse mammary tumor cells. *J. Biochem (Tokyo)* (in press)
- 2) Niimi, S., Harashima, M., Gamou, M., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T. (2005) Expression of annexin A3 in primary cultured parenchymal rat hepatocytes and inhibition of DNA synthesis by suppression of annexin A3 using RNA interference. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 424-428
- 3) Niimi, S., Hyuga, M., Harashima, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T. (2004) Isolated small hepatocytes express both annexin III and terminally differentiated

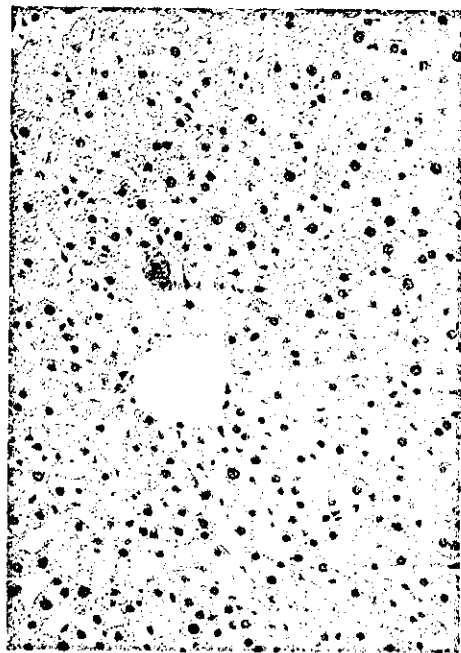
hepatocyte markers, tyrosine aminotransferase and tryptophan oxygenase at the mRNA level. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1864-1866

2. 学会発表

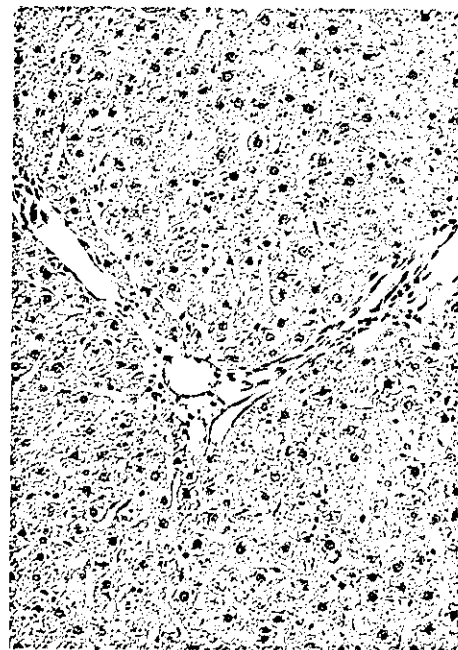
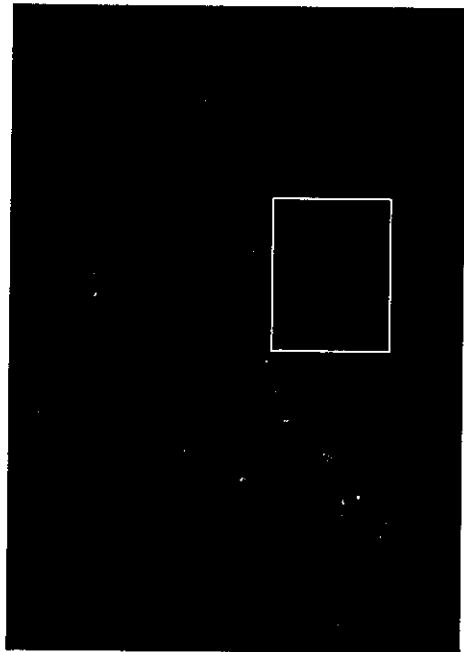
- 1) Shingo Niimi, Mizuho Harashima, Youko Nagaoka, Chieko Saito, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Mechanism of inhibition of dexamethasone-dependent induction of tyrosine aminotransferase activity by the proteasome inhibitor lactacystin. 第 77 回日本生化学会 (2004 年、横浜)
- 2) Mizuho Harashima, Shingo Niimi, Masaru Gamou, Masashi Hyuga, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Expression of annexin III in primary cultured rat hepatocytes and its role on DNA synthesis. 第 77 回日本生化学会 (2004 年、横浜)
- 3) Shingo Niimi, Mizuho Harashima, Masaru Gamou, Masashi Hyuga, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Expression of annexin III in primary cultured rat hepatocytes and its role on DNA synthesis. 第 3 回アネキシン国際会議 (2005 年、スイス)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



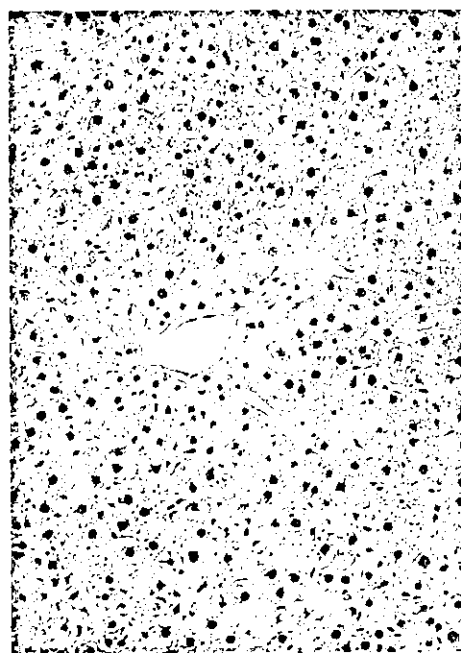
中心静脈域



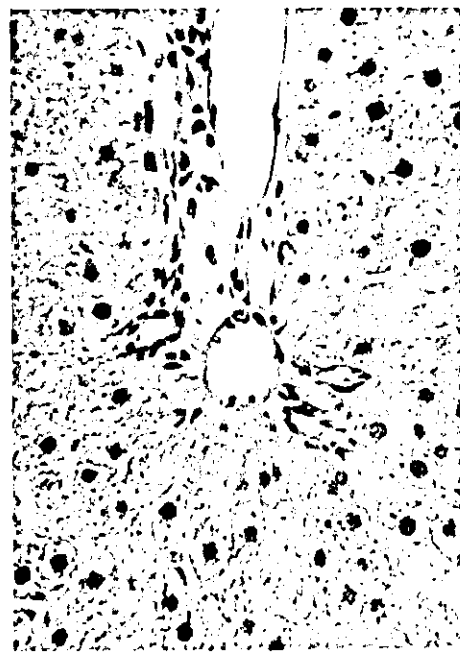
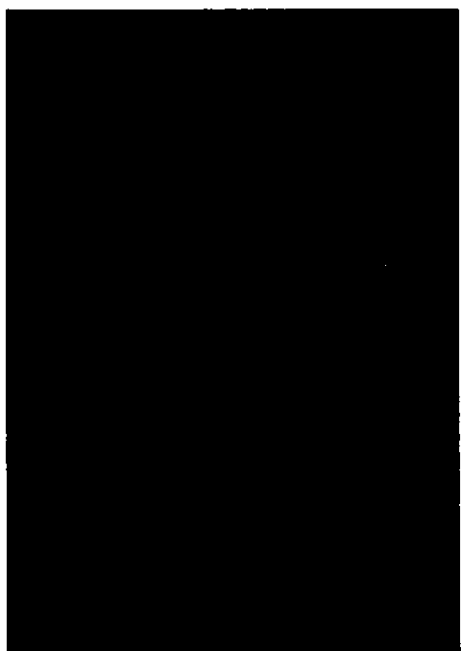
門脈域



図1. vehicleを投与したラット肝臓におけるH&E染色と免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在
左図:H&E染色、右図:免疫蛍光 AnxA3(緑)、アルブミン(赤)(倍率×200)



中心静脈域



門脈域

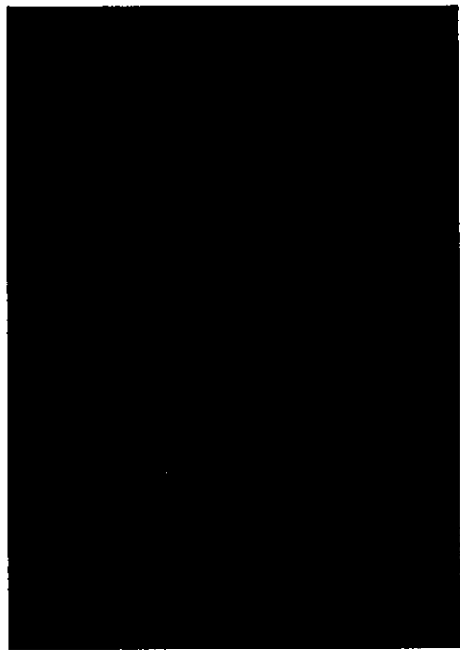


図2. 2-AAFを投与したラット肝臓におけるH&E染色と免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在

左図: H&E染色、右図: 免疫蛍光 AnxA3 (緑)、アルブミン (赤) (倍率 × 200)

中心静脈域

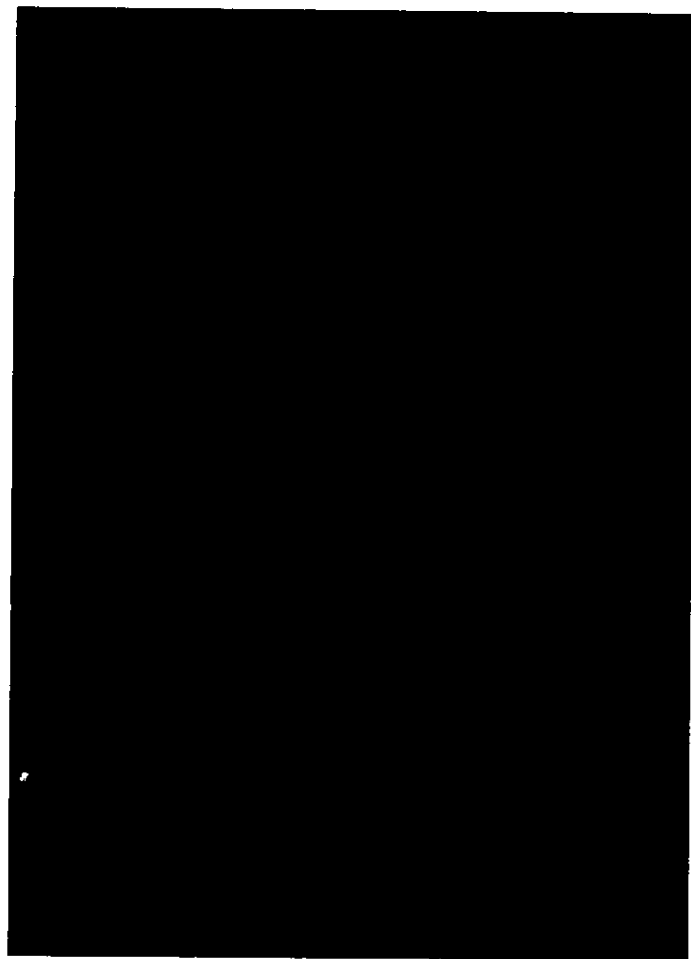
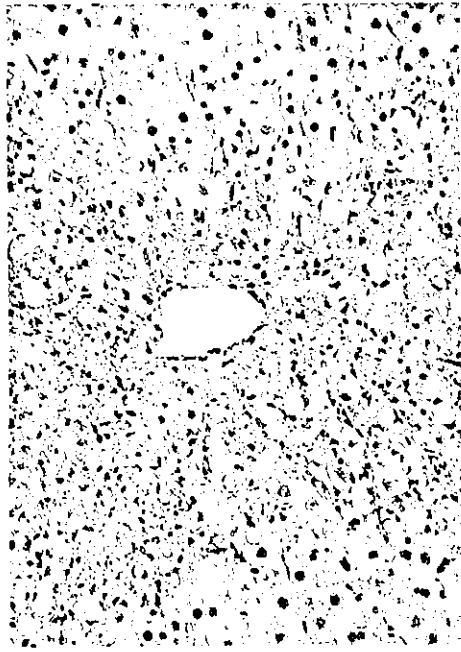
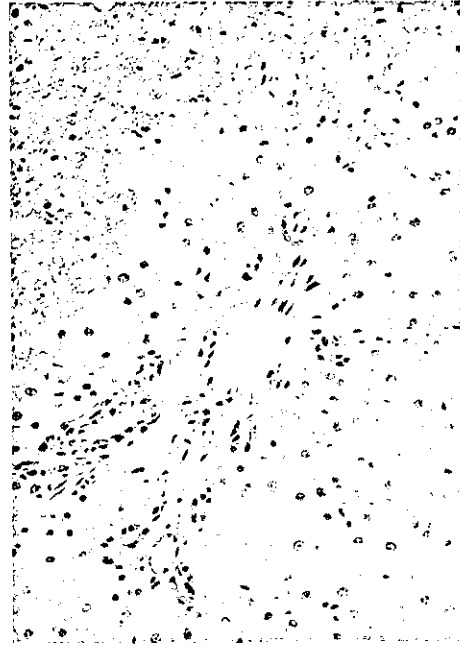


図3. vehicleを投与したラット肝臓における
免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在
免疫蛍光 AnxA3(緑)、アルブミン(赤)(倍率×1,000)



中心静脈域



門脈域

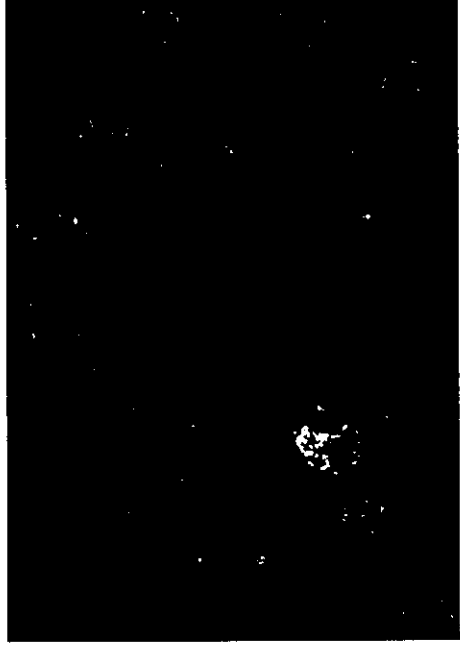
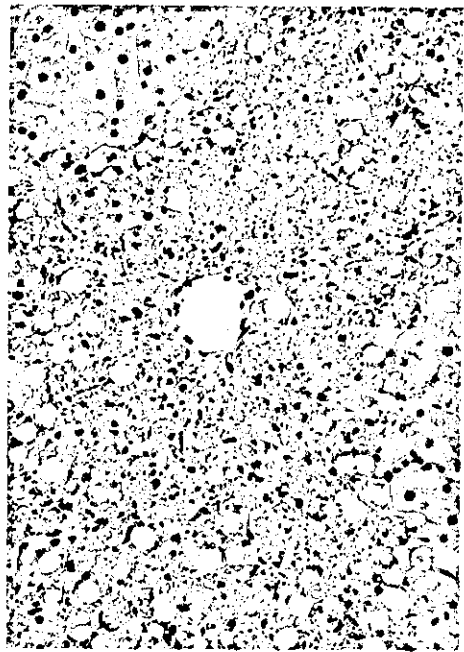


図4. 2-AAF/CCI₄投与2日目のラット肝臓における
H&E染色と免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在

左図:H&E染色、右図:免疫蛍光 AnxA3(緑)、アルブミン(赤)(倍率×200)



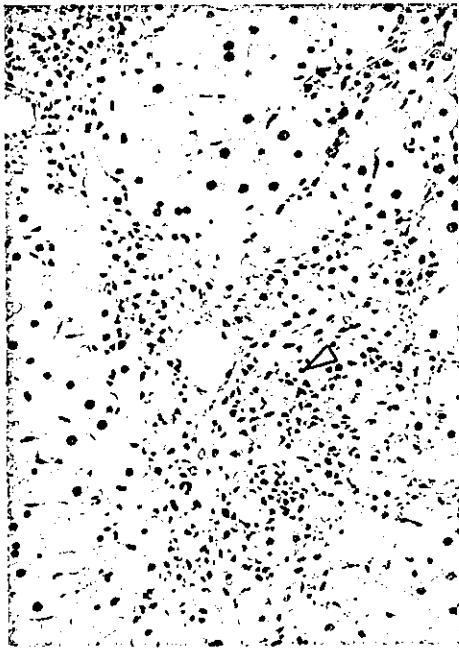
中心静脈域



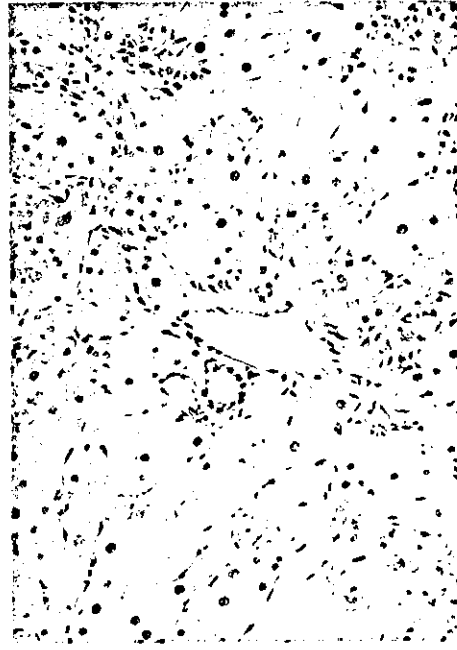
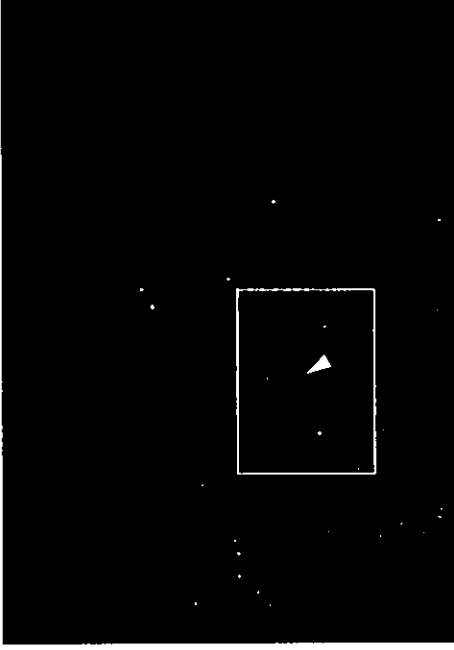
門脈域



図5. 2-AAF/CCl₄投与3日目のラット肝臓におけるH&E染色と免疫蛍光によるAnxA3及びアルブミンの局在
左図: H&E染色、右図: 免疫蛍光 AnxA3(緑)、アルブミン(赤) (倍率×200)



中心静脈域



門脈域



図6. 2-AAF/CCl₄投与4日目のラット肝臓における
H&E染色と免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在

左図: H&E染色、右図: 免疫蛍光 AnxA3(緑)、アルブミン(赤) (倍率×200)

中心静脈域

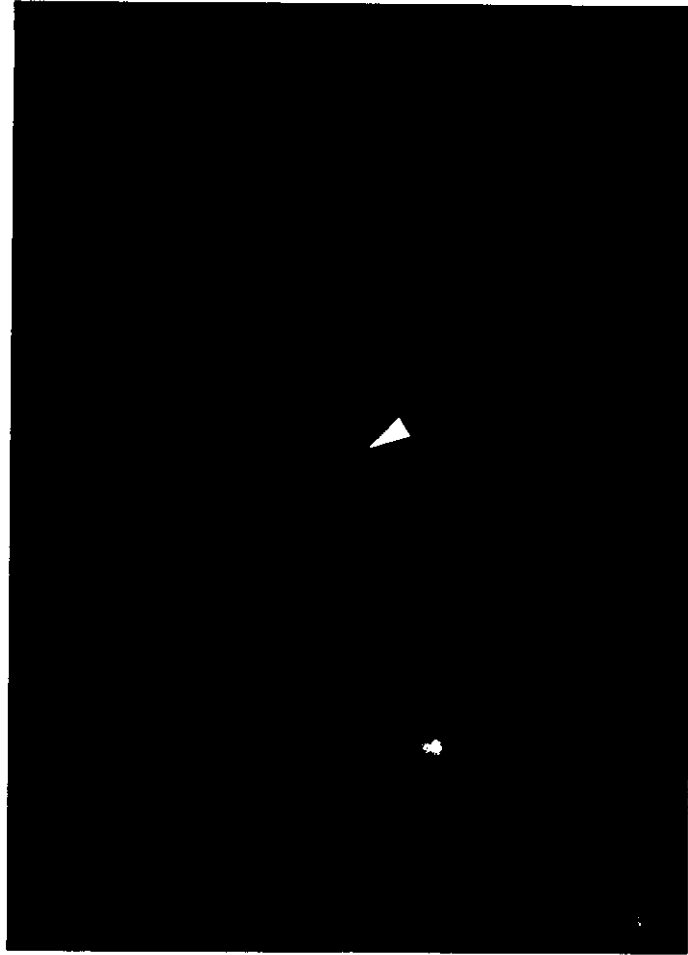


図7. 2-AAF/CCl₄投与4日目のラット肝臓における
免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在
免疫蛍光 AnxA3(緑)、アルブミン(赤)(倍率×1,000)

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
分担研究報告書

細胞・組織加工医療用具の品質等の確保に関する研究

分担研究者 鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部室長

研究要旨

近年、バイオテクノロジーや再生医学の進歩により、細胞や組織を治療へ応用する細胞組織利用医薬品、医療用具の開発が進んでいる。このような細胞等を利用した医薬品は様々な疾病に対して有効な治療法となることが期待されるが、その品質や安全性確保に関しては未知の要素が多く、それらを検討するための新たな技術開発が重要である。細胞培養を利用した場合には、培養による細胞の性質の変化や、クロスカルチャーコンタミネーションなどの問題があるため、培養前後での遺伝的な同一性を補償することが重要である。昨年度の本研究では、細胞の遺伝的な同一性を補償するために最も有効であると考えられる、マイクロサテライトマーカである STR (Short Tandem Repeat) の多型を利用した解析の応用に関して検討を行い、培養細胞の起源の同一性を調べる上で、STR マーカーは非常に有効であることがわかった。しかし、遺伝的に同一な細胞においても、培養の過程でその性質が変化することはよくある現象であり、細胞組織利用医薬品として目的とする機能が維持または発揮されるかどうかは、遺伝的同一性だけでは保証できず、エピジェネティックな変化である遺伝子発現や機能性タンパクの発現などの情報も重要である。クロスカルチャーコンタミネーションにより同一起源であることが示された3種のヒト膀胱由来細胞株を用い、GeneChip を使った網羅的遺伝子発現解析により、遺伝子発現という観点から細胞の同一性、および性状の変化を検討した。その結果、同一起源の細胞では、遺伝子発現パターンは似ているものの、培養状態の変化、subline 化などにより発現パターンに差ができることがわかった。こうした遺伝子発現の情報は、細胞の品質管理に利用可能であることが示唆され、関連遺伝子の発現に注目した場合には、機能性細胞としての有効性を評価する手段となることがわかった。

次に、細胞の遺伝的安定性は、癌関連遺伝子の増幅や欠失が直接細胞がん化の引き金になることもあり重要である。染色体レベルで遺伝的安定性を調べる目的で、CGH (Comparative Genome Hybridization) 法は有用なツールであるが、染色体標本の作成など熟練を要する技術である。比較的簡便かつより詳細な解析を可能とする技術として、最近マイクロアレイを用いた CGH 法が利用可能となったため、この手法を用いて既知の染色体変化を有する細胞の解析を行った。その結果、予想される領域に

遺伝子の増幅および欠失が見つかり、その有効性が検証されたとともに、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。

協力研究者

樂 洋 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
流動研究員
本間正充 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部
室長
小原有広 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部（細胞バンク）
研究員

A. 研究目的

細胞組織利用医薬品等を治療に応用するに際して、その品質のチェックや機能性の保証などが、重要な課題であると考えられる。自己組織から培養した細胞を再び本人に戻して使用する場合など、免疫原性は問題にならないとも考えられるが、培養の途中でクロスカルチャーコンタミネーションが起こり、非自己の細胞に置き変わる危険性も考えられ、重篤な副作用を引き起こしかねない。そこで、治療に用いようとする細胞が確かに自己由来のものであることを保証する目的には、親子鑑定等で使われている、マイクロサテライトマーカー（STR）の利用が有効であることを昨年度の検討で示した。しかし、遺伝的に同一性が示されても、例えば肝臓の細胞と神経細胞は全く機能が異なるように、発生分化の過程や、培養条件などにより細胞の性質は大きく変化し、それに伴い発現する遺伝子のパター

ンも変化する。また例えば同一起源（組織）由来の細胞であっても図 1 に示すように肉眼的形体が明らかに異なる場合もあり、培養の過程において異なる性質を持つ細胞へと変化していると考えられる。こうした細胞の性質、機能は、遺伝子の情報のみからは規定されず、遺伝子発現の調節などエピジェネティックな変化が重要となる。そこで、遺伝子発現の観点から細胞の同一性および機能を解析する目的で、昨年度に引き続き GeneChip を用いた網羅的発現解析の応用を試みた。

一方、細胞のがん化形質の獲得は、細胞を利用した医薬品を考える場合に常に問題となる点であり、細胞培養過程における品質チェックが望まれる。軟寒天コロニー形成法やヌードマウスに対する造腫瘍性などの試験法が存在するが、適応範囲の細胞が限定される、手法が煩雑であるなどの問題点が指摘されている。細胞の染色体レベルでの変化を捉える手法として、CGH 法があるが、従来の手法では染色体標本上にてハイブリを行い、専用のソフトウェアで解析をしなければいけないと言う煩雑さがあった。この問題を克服し、かつ解像度高く解析が可能なマイクロアレイを用いた手法が最近開発され、簡便な CGH 法として応用が期待されている。本研究でも、細胞の遺伝的安定性の検証のため、このアレイ CGH 法の有用性を検討することを目的とした。実験には、すでに 17 番染色体上に欠失のあることが予想されているヒトリンパ芽球細

胞の変異クローンおよび過去に CGH 解析を行ったことのある HL60 細胞株を用いて、予想される変化がアレイ CGH 法により検出可能かどうかを確かめる事を目的とした。

B 研究方法

1 GeneChip を用いた発現解析

1-1. 使用した細胞株

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、クロスカルチャーコンタミネーションであ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。

1-2. cRNA の調製とハイブリダイゼーション

各細胞約 10^6 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 μ 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。

1-3. 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。

1-4. 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が 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. CGH アレイを使った染色体解析

2-1. 使用した細胞株 (TK6)

ヒトリンパ芽球細胞 TK6 細胞株に、変異原物質 KBrO_3 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討を行った。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)

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。

2-2 CGH 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 にてスポット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。

2-3 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。

2-4 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 μ 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。

2-5. CGH 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°C で 15 min. 加熱変性させた後、37°C で 60 min. インキュベートした。この間に 40 μ l のプレハイブリダイゼーション溶液を、70°C で 10 分処理後氷冷して変性させ、アレイスライドの のスポットエリア上に 40 μ l 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 μ l 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°C, 48~72 hours 振とう (5~10 rpm) しながらインキュベートした。

2-6. 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°C, 15 分)、2X SSC, 0.1% SDS (46°C,

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。

1-6. 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 1-3 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。

C. 結果

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 1 に示す。この 3 種の細胞は図 2 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おける遺伝子を、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 3 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クアタープロットした

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 1)。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いことがわかった。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 2 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 4 に示すように、FXVD 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. 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 5 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 6 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、およびその亜株である 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 7 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 8 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 9 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 20.25 、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 10 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 11)。

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 12)。

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 13 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

14)。

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 9)。

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。

D. 考察

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 15)。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に変化し、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(Draper 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