

200400178B

厚生科学研究費補助金  
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15・16年度 総合研究報告書

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15・16年度 総合研究報告書

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・・・174  
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・・・253  
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・・・305  
川西 徹
4. 細胞タンパク質プロファイル評価技術の開発・・・317  
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・・・352  
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・・・366  
鈴木 孝昌

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・398

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

## 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になったことが明らかになった。ヒトウイルスを用いた検討を行い、濃縮条件の至適化を行った。(2) 複数の Short-tandem-repeat (STR) マーカーを組み合わせることでマイクロサテライト多型を検出することにより、細胞の同一性等の確認試験に非常に有用な手法になることを明らかにした。また、STR マーカーを利用することにより細胞の亜株間の遺伝的変異についても検出可能であることから、細胞の変異を検出する手法としても有用であることが明らかになった。Gene Chip を用いた網羅的遺伝子発現解析により、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、サイトカインアレイの細胞由来タンパク質プロファイリングへの有用性を評価するために、モデル細胞及び血管内皮前駆細胞等への適応について解析した。サイトカインアレイは細胞が産生するサイトカインの網羅的解析が可能であり、簡便・迅速性にも優れていることを明らかにした。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であ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) 細胞発現タンパク質プロファイリング、及び目的タンパク質の特性解析を基本とした細胞治療用医薬品の品質評価法を確立するため、2 次元電気泳動によるタンパク質プロファイリング、及びそのゲルから回収した目的タンパク質の LC/MS による特性解析を検討してきた。平成 15 及び 16 年度は、目的糖タンパク質をゲルから抽出した後に酵素消化する方法、及びタンデム型質量分析装置またはイオントラップ型質量分析装置を利用して糖鎖を特異的に解析する方法を開発し、これまで解析が困難であった電気泳動等で分離した単一バンドの糖タンパク質の部位特異的糖鎖解析に成功した。(5) テロメア結合タンパク質 (TRF1) が細胞の不死化と密

接に関連することを明らかにすることができ、TRF1 が細胞のがん化指標として非常に有用であることを示された。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) 新たに開発した免疫隔離膜を用いてドナー骨髄細胞とレシピエントリンパ球細胞との *in vitro* での相互作用の解析を行い、新規免疫隔離膜を用いることにより、ドナー細胞の生存率の上昇とレシピエントリンパ球による拒絶反応時によって惹起されるサイトカインの産生等を抑制することが可能であることが示され、開発した免疫隔離膜を用いることにより細胞性免疫反応を起こさず移植する細胞によって引き起こされる可能性のある液性免疫の評価が可能なが確認された。(7) 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。(8) 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。(9) 心筋細胞への分化能を有するマウス胚性腫瘍細胞 P19 細胞と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。(10) P19 細胞から神経細胞に効率的に分化誘導させる系を用いて2次元電気泳動によるプロテオーム解析を行い、分化誘導過程初期から変動のあるタンパク質を見いだした。これらの誘導初期に発現してくるタンパク質が神経前駆細胞の特性指標になる可能性が示された。(11) 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。(12) 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た。

分担研究者		川崎 ナナ	国立医薬品食品衛生研究所
土屋 利江	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
山口 照英	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
川西 徹	国立医薬品食品衛生研究所	宮澤 宏	国立医薬品食品衛生研究所

## 研究協力者

中西真人	産業総合科学研究所
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
サイフデザイン・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
伊藤さつき	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

## 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、心筋梗塞などの致死的な疾患、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) 細胞等による望ましくない免疫反応の検出技術開発に関する研究、7) 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) テロメア結合タンパク質 TRF1 のがん化指標としての有用性を検討した。また、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た。6) 細胞等による望ましくない免疫反応の検出技術開発を目的として、免疫隔離膜を用いた評価系の検討を行った。7) 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。8) 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 (1 級アミン及び 2 級アミン) 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°C、45 秒 ; 72°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°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 STR マーカーによる多型解析

#### ① STR マーカー

Promega 社より、4 色の蛍光を用いて一度に 16 個の異なる STR マーカーについて解析が可能な PowerPlex16 システムがキットとして市販されており、これを用いて解析を行うことにした。PowerPlex システムに含まれる 16 種の STR マーカーに関する情報を表 2 に示す。これらの STR マーカーを増幅するための適当な 3 色の蛍光色素によってラベルされたプライマーがデザインされ、増幅産物の長さをうまく組み合わせることにより、全 STR マーカーの繰り返し数を同時に検出可能になっている。また一方で、独自の STR マーカーとして、本研究所変異遺伝部の本間室長よりヒト 17 番染色体上の STR マーカーの 10 種類の情報提供をうけ (表 3)、これらに関しても、多色蛍光ラベルプライマーを使った同時

解析の検討を行った。増幅に用いたプライマーの配列を表 4 に示す。

#### ② 細胞からの DNA の抽出

今回の検討には、以下に示すヒト培養細胞株を用いた。

- HL-60 前骨髄球系白血病細胞株
- HL-60RG HL-60 の増殖速度が亢進した亜株
- TK6 リンパ芽球系白血病細胞株
- WTK-1 TK6 の p53 変異株
- FLC-4 肝臓由来細胞株

これらの細胞のうち、HL-60、HL-60RG と TK6、WTK-1 はそれぞれ同一の細胞に由来する亜株と考えられる。

上記培養細胞 5-7.5x10<sup>6</sup> 個を遠心分離によって集め、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。

#### ③ PCR 増幅反応

得られたゲノム DNA 2ng を用いて、STR マーカー増幅用 Primer mix により以下の Multiplex PCR 反応を行った。

(標準スケール)

Nuclease-Free Water	14.2 μL
Gold Star 10×buffer	2.5 μL
PowerPlex™16	
10×Primer Pair mix	2.5 μL
AmpliAq Gold	
DNA polymerase (4U)	0.8 μL
Master mix の 液量	20.0 μL
鋳型の DNA (sample)	5.0 μL
合計反応液量	25.0 μL

(ミニスケール)

上記反応組成の 1 / 5 量を用い、キャピラ



リー型 PCR 装置 (Light Cycler) にて、液量 5  $\mu$ L にて増幅を行う。

### ③ DNA シークエンサーによる解析

PCR 反応物 1  $\mu$ L を用いて、ABI310 ジェネティックアナライザーにて解析し、それぞれの蛍光波長における増幅産物の長さを、4 色目の蛍光でラベルしたサイズマーカーとの比較により算出し、各 STR マーカーの繰り返し数のパターンを求めた。データ解析には専用の解析ソフトである GeneScan 3.1.2 と Genotyper 2.5 を用いた。

## 2. 2 GeneChip を用いた発現解析

### ① cRNA の調製とハイブリダイゼーション

各種細胞約  $10^6$  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  $\mu$ 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。

### ② 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。

### ③ 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

Presence/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. 3 CGH アレイを使った染色体解析

### 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  $\text{KBrO}_3$  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 クロームを 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 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。

### 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 プロープのラベル化

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) にてプロープ溶液を精製し、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プを調整した。

### 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  $\mu$ 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、アレイスライドのスポットエリア上に 40  $\mu$ l アプライし、室温の湿箱中で 30 min. インキュベートした。H<sub>2</sub>O 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、調製したプロープ溶液 44  $\mu$ 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。

### 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。

### 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 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。

## 3. 細胞由来生理活性タンパク質の解析

### ① 細胞産生サイトカイン解析のための細胞培養上清の調製

HL-60, HL-60RG 細胞を 10% FBS を含む RPMI1640 中で 2 日間培養した。培養後の上清を集め、3,000 x rpm で 10 分間遠心した後、0.22  $\mu$ m フィルターのフィルターを用いて濾過を行い実験に供した。

血管内皮前駆細胞及び血管内皮細胞から分

泌されるサイトカインを測定するために、臍帯血及び末梢血の単核球細胞を得、さらに抗ヒト AC133 磁気ビーズを用いて AC133 陽性細胞を分離し、フィブリネクチンコート上、20%FBS、TPO、VEGF、SCF を含む EBM2 培養液中で培養した。一週間ごとに培養液を集め、上記同様に遠心操作と 0.22 $\mu$ m フィルターを用いて濾過した後、実験に供した。

血管内皮の分化とサイトカインの分泌との相関を解析するために、AC133 陽性細胞から分化した接着細胞について血管内皮細胞の指標として考えられている CD31、KDR/flk-1、eNOS の発現をフローサイトメーターを用いて解析した。

モデル細胞の細胞由来タンパク質解析のために、HL-60RG 細胞を ASF104 培地 (AJINOMOTO 社) 中 37 $^{\circ}$ C 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サイトカインアレイを用いた血管内皮サイトカインの解析

Ray 社のサイトカインアレイ V を用いて上記培養細胞が産生する 79 種のサイトカインを解析した。解析は添付文書に従って行い、各サイトカイン抗体を結合した膜に、培養上清 1ml を添加し、サイトカイン抗体と結合したサイトカインを、ビオチン標識したサイトカイン抗体、HRP 標識したアビジンでラベルして、ECL で検出した。ECL の強度をイメージ解析し、発現量の変化を解析した。

#### ③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。

#### ④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。

#### ⑤質量分析とタンパク質の推定

上記抽出液 0.5ml を MALDI target にアブライシ、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

##### ①試薬

$\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) は Advanced ImmunoChemical 社より、セルロプラスミン (CP) は Calbiochem 社より、ヒト血清は Sigma Aldrich 社より購入した。トリプシンは、Promega 社製の修飾トリプシンを使用した。ギ酸は、和光純薬株式会社製を用いた。PD-10 カラムは、Amersham Pharmacia 社製を使用した。ラット脳はより日本エスエルシー株式会社より購入した

##### ②血清のアルブミン除去

20  $\mu$ l のヒト血清から Millipore 社のアルブミン除去キットを用いて含有アルブミン量を低減させ、凍結乾燥を行った。

##### ③糖タンパク質の還元カルボキシル化

糖タンパク質サンプル (AFP および CP) 200  $\mu$ g またはアルブミン低減ヒト血清 (HS-Alb) 20  $\mu$ l 分 (血清換算) を 8 M グアニジン塩酸塩, 5 mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl, pH 8.6, 540  $\mu$ l に溶解した。2-メルカプトエタノール 4  $\mu$ l を加え、40°C で 2 時間放置した。モノヨード酢酸ナトリウム 11.3 mg を試料溶解溶液 90  $\mu$ l に溶かし、試料溶液に加え、遮光下 40°C にて 2 時間放置した。

PD-10 カラムを用いて脱試薬し、得られた試料溶液を凍結乾燥した。

##### ④糖タンパク質のトリプシン消化

還元カルボキシル化した糖タンパク質 (RCM-AFP および RCM-CP) およびアルブミン低減ヒト血清 (RCM-HS-Alb) を 50 mM 重炭酸アンモニウム, 200 $\mu$ l に溶かした。試料溶液 100  $\mu$ l をとり、1  $\mu$ g/ $\mu$ l の修飾トリプシン溶液を 1  $\mu$ l 加え、37°C で糖タンパク質サンプルは 12 時間、アルブミン低減ヒト血清は 24 時間消化した。消化後、測定まで-20°C に保存し酵素反応を停止させた。

##### ⑤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°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°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×g, 4°C, 20分), 上清を37°Cで10分間放置後, 遠心分離し(3,000 rpm, 30°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°Cで10分間放置後, 遠心分離した(3,000 rpm, 30°C, 5分)。得られたTriton X-114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, 30分), 膜画分を得た。

#### ⑥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。

#### ⑦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。

#### ⑧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。

#### ⑨Thy-1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。

#### ⑩タンデム型質量分析装置を用いたペプチド/糖ペプチドマッピング

分析条件は以下の通りである。

試料:

0.1%ギ酸水溶液で適度に希釈した。インジェクトしたサンプル量はそれぞれ以下の通りである。

AFP 0.2 µg (タンパク量換算)

CP 0.2 µg (m/z 400-2000)

1.0 µg (m/z 1000-2000)

(タンパク量換算)

HS-Alb 0.01 µl (試料血清換算)

HPLC:

装置 : Paradigm MS4 ( Michrom BioResource 社)

カラム : MAGIC C18

(Michrom BioResource 社製, 0.2×50 mm, 5μ)

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% (10~40 分)

流速 : ポンプ 2 μl/min

#### MS/MS

装置 : ハイブリッド型 LC/MS/MS システム Qstar Puler i ( Applied Biosystem 社)

イオン化 : ESI

測定モード : ポジティブイオンモード

スプレー電圧 : 2,500 V

スキャン範囲 (m/z) :

検出 : Q/TOF-MS

ペプチドマップ : 400-2,000

糖ペプチドマップ : 700-200

または 1000-2,000

MS/MS : 100-2,000

データ依存的に MS/MS 測定を行った。イオンの価数および大きさにより 50-80 eV のコリジョンエネルギーを与えた。

#### ⑩イオントラップ型質量分析装置を用いたペプチド/糖ペプチドマッピング

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(MichromBioResource 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>

#### ⑫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 マウスがん化モデルを用いた検討

#### 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。

#### 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。

#### 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。

#### 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℃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 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。

#### 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'-ACAGTCTGCCTTTCGCTCTAAC-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。

#### 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。

### ⑧ ヌードマウスを用いた腫瘍形成の確認

それぞれの細胞 ( $2 \times 10^6 / 0.2 \text{ mL PBS}$ ) をヌ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。

### ⑨ 軟寒天培養法

およそ  $10^5$  の細胞を 2 mL の 0.3% 軟寒天培養液で培養した。4 週間培養後、*γ*-iodotetrazolium violet 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。

## 5.2 TRF1 の細胞のがん化指標としての有用性に関する研究

### 細胞培養

TIG 3, TIG 7, MRC5, KMS6 は日本細胞バンクより入手し、推奨されている培養方法に従って維持した。MRC5 細胞を SV40 でトランスフォームした MRC/SV 細胞、TIG 細胞の p16INK4A をノックダウンして不死化した TIM 細胞は dMEM 培地を用いて培養した。

## 6. *in vitro* 系での免疫隔離膜の機能に関する研究

### ① 細胞の調製

Brown Norway (BN) ラットからリンパ球を採取し、RPMI 1640 培地で培養した。Lewis ラットの上腕骨と頸骨から採取した骨髓リンパ球 (BML) はナイロンメッシュでろ過した後 RPMI 1640 培地で培養した。 $2 \times 10^6$  cells/0.5 mL medium の BML を SPU コートしたバッグとしていないバッグにそれぞれ入れた。バッグを  $0.867 \times 10^6$  の BN リンパ球を含む 2 mL の培地で浸し、 $37^\circ \text{C}$  で 3 日間培養し

た。

### ② 細胞の生存率測定

バッグの内部の細胞 (BML) の生存率は、3 日間培養後、SPU コートしたバッグとしていないバッグの内部から同数の細胞をとり、24 穴の culture plate で培養した後、*Alamar blue* を用いて測定した。

### ③ サイトカイン測定

3 日間培養後、それぞれのバッグを dish から取出し、残った培養液中の細胞 (リンパ球) について、細胞中の IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  存在量を ELISA で測定した。

### ④ CD4 及び CD8 発現の分析

③と同様に、それぞれのバッグを取り出した後の培養液中の細胞 (リンパ球) について、CD8 陽性細胞と CD4 陽性細胞の細胞数についてフローサイトメトリーを用いて測定した。

## 7. 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。抗マウス IgG 抗体結合アガロース、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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l の 50mM tris buffered saline (TBS, pH7.5) を添加して懸濁し、10  $\mu$ l ずつとって 0.2 ml チューブに分注した。90  $\mu$ l の TBS と 10-90  $\mu$ 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  $\mu$ 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遠心による BF 分離

抗インスリン抗体溶液に抗マウス IgG 抗体

結合アガロース懸濁液を添加して攪拌後、室温で 30 分間静置した。遠心後に上清を除去して、得られた沈殿に TBS を添加して懸濁し、チューブに分注した。10  $\mu$ l のインスリン添加ヒト血清試料を混和して攪拌後、室温で 30 分間静置した。遠心で上清を除去し、沈殿を洗浄後、CHCA 溶液を添加して結合画分を溶出させ、質量分析の試料とした。

### ④質量分析

分析試料 2  $\mu$ 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。

### ⑤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  $\mu$ l をとって 10  $\mu$ 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  $\mu$ l を添加、混合した。このうち 2  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

### ⑥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。

## 8. 血管内皮前駆細胞の特性解析に関する研究

### 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℃、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 µl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、AutoMACS (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。

### 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。

### 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。一定期間培養した後、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。

## 9. P19細胞由来細胞株の心筋細胞への分化誘導

### 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°C、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°C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。

### 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。

### 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°C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 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

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°C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。

#### 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社のマニユ

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