

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

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。

### 10. マウスES細胞P19細胞の神経細胞への分化

#### ① 神経細胞への分化誘導法

P19細胞を $\alpha$ -MEM 10%FBS中37°Cで培養後トリプシン処理し、約 $1 \times 10^6$  cells/mlの濃度でDMSOに溶解させた $1 \mu\text{M}$  all-trans retinoic acid (ATRA)を添加した同じ培養液存在下バクテリア培養用プレートに植え、4日間培養した。途中1回培地を交換した。4日後、プレートにはりつかないで細胞塊を形成した細胞を集め、3回PBS(-)で洗浄後、ト

リプシンに懸濁し37°Cで15分間反応させ細胞をばらばらにし、同容量の $1 \text{ mg/ml}$  trypsin inhibitor (Invitrogen)を加えた。 $100 \text{ mm}$ の通常の培養プレートに $8 \times 10^6$  cellsをDMEM/F12にN2 supplement ( $5 \mu\text{g/ml}$  insulin,  $50 \mu\text{g/ml}$  human transferrin,  $20 \text{ nM}$  progesterone,  $60 \text{ mM}$  putrescine,  $30 \text{ nM}$  sodium selenite,  $1 \mu\text{g/ml}$  fibronectin (Invitrogen)を加えた分化培地に植え、数日間培養した。特にことわりのない試薬はSIGMA社のものを使用した。

#### ② サンプルの調製

ウェスタンブロッティング用のサンプル調製には、PBS(-)で2回洗浄した細胞をPBS(-)に懸濁し $2 \times$  SDS サンプルバッファーを等量加えて溶解させた。

2次元電気泳動用サンプルとしては、細胞をPBS(-)で2回洗浄後、BIO-RAD社のSequential Extraction Kitを用いた抽出を行った。実際には、試薬1 ( $40 \text{ mM}$  Trisにpepstatin, antipain, leupeptinを加えた)に細胞を懸濁後、氷中で8分間静置しdounce homogenizerでホモジナイズした。その遠心上清をstep1のサンプルとした。沈殿画分を試薬2 ( $8 \text{ M}$  Urea,  $4\%$  CHAPS,  $40 \text{ mM}$  Tris,  $0.2\%$  Bio-Lyte 3/10 ampholyte,  $1\%$  trybutyl phosphine)に溶解させ、シリンジを数回通して遠心した。その上清をstep2のサンプルとした。サンプルのタンパク量はBIO-RAD社のBradford法およびLowry法試薬を用いて決定した。

#### ③ ウェスタンブロッティング

サンプル ( $20 \mu\text{g}$ )を各種の濃度のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行い、セミドライブロッティング装置を用いてタンパク質をPVDF膜に転写した。5%ス

キムミルクを含む 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M NaCl (TBS-skimmilk) でブロッキング後、一次抗体を含む TBS-skimmilk で 2 時間室温で反応させた。洗浄後、POD-conjugate した二次抗体で 1 時間室温で反応させた。洗浄後、ECL-Plus (アマシャムバイオサイエンス社) を用い抗体と反応するタンパク質を発光させ、X 線フィルムで検出した。

#### ④ 2次元電気泳動

サンプル 100  $\mu$ g (容量は最大 50  $\mu$ l) を、8 M Urea、2% CHAPS、0.5% IPG buffer (3-10NL)、2.8 mg/ml DTT、BPB trace を加え 250  $\mu$ l に調製した。1次元目の電気泳動は Immobiline DryStrip pH 3-10NL, 13 cm (アマシャムバイオサイエンス社) を用い、先に調製した 250  $\mu$ l でゲルを一晩膨潤させた。その後、等電点電気泳動を指定の泳動条件で行った。泳動後、SDS 平衡化バッファー (50 mM Tris-HCl pH 6.8、6 M Urea、25% glycerol、2% SDS) に 2.5 mg/ml DTT を添加した溶液中で 15 分間反応後、SDS 平衡化バッファーに 45 mg/ml iodoacetamide、BPB trace を添加した溶液中でさらに 15 分間反応させてから、10% SDS-PAGE で 2次元目を行った。タンパク質の検出にはアマシャムバイオサイエンス社の銀染色キットを使用した。

### 1.1. 肝幹細胞の特性指標に関する研究

#### 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 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C、12 時間の明暗期 (明期 8-20 時) の条件で行った。

#### ② 肝再生モデル動物の作製

2-AAF を最小容量の DMSO に溶解後、最終濃度が 2 mg/ml となるように corn oil に懸濁させた。CCl<sub>4</sub> 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+CCl<sub>4</sub> 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  $\mu$ l の CCl<sub>4</sub> を経口投与した。その後 2-AAF の投与は毎日同様に続け、CCl<sub>4</sub> 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+CCl<sub>4</sub> 群の CCl<sub>4</sub> 投与の代わりに vehicle として olive oil を投与し、control 群は 2-AAF+CCl<sub>4</sub> 群の 2-AAF 投与と CCl<sub>4</sub> 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+CCl<sub>4</sub> 群の CCl<sub>4</sub> 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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ームで3µmの厚さに薄切し、MASコートスライドガラスに乗せて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ガ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ガ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、10 mM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10 mM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。

### 1.2. ヒト骨芽細胞の増殖能と分化能に関する研究

#### ① 細胞の培養

採取年齢の異なる[生後1日(1D), 16才(16Y), 41才(41Y)]正常ヒト骨芽細胞(Normal Human Osteoblast: NHOst cells, )は、10% fetal bovine serum (FBS)を含むαMEM(GIBCO)培地で培養した。2x10<sup>6</sup> cells/mlの細胞懸濁液20µlを24 well multiplateの各wellの中央にスポット状に播種した。細胞が接着した後、分化誘導培地1mlを静かに添加し、14日間培養した。

## ② 細胞増殖

NHOst cells の増殖は、Tetracolor ONE (Seikagaku Co., Tokyo, Japan)を用いて測定した。2週間培養後、2% TetraColor ONE を含む $\alpha$ MEM 培地 1ml と交換して、2時間、37°Cでインキュベートし、450nm (対照波長 600nm)での吸光度を測定して、細胞の増殖度を求めた。

## ③ 細胞溶解液の調整

2週間培養したNHOst cellsの総タンパク質量、alkaline phosphatase (ALPase) 活性は以下の方法に従って、細胞溶解液を用いて測定した。細胞をPBSで洗浄し、nonidet P-40を含む0.25 ml PBSを各wellに添加し、37°Cでインキュベートした。懸濁液をホモジナイズした後、遠心を行った。この上澄み液を細胞溶液として、総タンパク質量は、Bio-Rad protein assay (protein assay, Bio-Rad Lab.) 法により、595nmの吸光度をEIA READERを使って測定した。細胞溶解液は、測定まで-20°Cで保存した。

## ④ ALPase 活性

細胞溶解液のALPase活性は、以下の方法で測定した。細胞溶解液 50  $\mu$ l に、MgCl<sub>2</sub>を含む0.1 M carbonate buffer (pH 10.2) 0.5 ml 及び p-nitrophenylphosphate 0.5 ml を加えて、30 分間反応させ、NaOH 2ml を加えて反応を停止した後、410nmでの吸光度を測定して求めた。

## ⑤ Calcium content

細胞内の石灰化度は、細胞をPBSで洗浄後、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 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

## 1.3. 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5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を得られるが、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を得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。

PEI 磁気ビーズのウイルス濃縮法をヒト感染性ウイルスである HBV 及び HCV に適応してみた。図 7 に示すように、Vero 細胞の上清に HBV を添加し、PEI 磁気ビーズを用いて濃縮を試みたところ、1ml 及び 10ml の上清からウイルス濃縮することが可能であり、また、抗 HBV 抗体を添加したところその濃縮効率がさらに向上した。

また、図 8 に示すように PEI 磁気ビーズは HCV の濃縮にも適応可能であることが明らかになった。しかし、HCV に対する有用な抗体が無いため、抗 HCV 抗体添加による濃縮効率

の影響については確認できなかった。

## 2. 細胞の同一性や安定性の評価手法

### 2. 1 STR マーカーを利用した多型解析

STR 多型は、2 から 7 塩基を一単位とする繰り返し数に基づく多型であり、その全長がほぼ 300bp 以下であることから、PCR 法での増幅が容易であり、キャピラリー型シーケンサーを使って増幅産物の長さを測定することにより、リピート数を決定できる (図 9)。各種細胞に関して、PowerPlex16 STR マーカーを用いた解析結果を表 4 に示す。HL60 細胞に関しては、独立したカルチャーから得られた 2 ロットを用いて比較を行ったが、これらロット間では全てのマーカーの繰り返し数が一致した。一方、HL60 とその亜株である HL60-RG では、全 16 マーカー、30 アレルのうちほぼ全てが一致していたが、TH01 ローカスに関して、1 アレルの繰り返し数が 7 から 8 (または消失) へ変化し LOH(Loss of Heterozygosity)が認められた (図 10)。他の Fluorescein マーカーのアレルピークとの相対強度は余り変化していないことより、片側のアレルの消失が疑われる。すでに報告しているこの細胞の核型に関する情報より、RG 株は 11 番染色体の短腕に欠失が認められることより、11p15.5 に位置する TH01 ローカスが影響を受けたと考えられる。またピーク強度を詳しく見ると、HL60 細胞における D18S51 ローカスのリピート数 15 のピークの高さが 14 のピークの半分であることに気がつく。核型解析より HL60 細胞は 18 番染色体がトリソミーになっていることがわかっているため、14 側のアレルが重複しているために強度が 2 倍になったと考えられる。この結果は、STR マーカーにより、LOH や染色体の数の変化が

検出可能なことを示している。

同様に、起源を同じくする TK6 と WTK1 細胞の比較においても、ほぼ全てのマーカーが一致していたが、D18S51 ローカスと D7S820 ローカスにおいて、リピート数が 1 ユニット変化していた。これは、培養途中による繰り返しユニットの付加または欠失によるものと考えられる。

同一起源の細胞間では、ほぼ STR マーカーの繰り返しパターンは一致したが、異なる細胞間ではその一致率は極端に低くなった。これにより、細胞の同一性を確実に判別できた。例えば、HL60 細胞と TK6 細胞での一致率は、Amelogenin を除く 15 ローカス、30 アレルのうち、16 アレルで約 50%であった。また、肝臓由来の細胞株 FLC-4 細胞もこれらとは全く違ったパターンを示した。Amelogenin は性染色体を区別するマーカーであり、HL60 と FLC-4 細胞は女性由来、TK6 は男性由来であることがわかる。

次に、PowerPlex16 には含まれなかった 17 番染色体に関して、独自の複数の STR マーカーが利用可能であったため、これらを用いたマルチプレックスな多型解析を試みた。表 3 に示すように、10 個の STR マーカーに対して、その増幅産物が適当なサイズ分布を取るよう にプライマーをデザインし、6 FAM, HEX, TET の 3 種類の蛍光色素にてラベルした。HL60 細胞由来 DNA を使って PCR 反応を行い、増幅産物を同様に解析し、検出されたピークの位置を調べた。市販品に比べると PCR 反応産物はきれいなピークとなりにくいため判別がやや難しかったが、9 つのローカスに関しては、少なくとも片側のアレルのピークを検出できた。TK6 細胞に関しては既に個別に検討した結果があったため、これらの値と

比較して HL60 細胞での結果をまとめたのが表 7 である。HL60-RG 細胞のパターンは親株とほぼ一致したが、AFM044xg3 ローカスにおいて片側のアレルのバンドサイズが一塩基減少していた。一塩基の差の信頼性は解像度の点からも難しいが、一塩基欠失の可能性もある。一方、TK6 細胞との間の相同性は低かった。

通常、PowerPlex16 キットを用いた PCR 反応は全量 20 $\mu$ l にて行うが、試薬が高価なこともあり、スケールダウンを試みた。この際、通常の PCR 装置では反応液の蒸発が問題となるため、液量を減らすことは難しいが、キャピラリータイプのシーケンサーである LightCycler を用いることにより、5 $\mu$ l まで液量を減らしても正常にシグナルが検出できることが確認でき、後半の検討はスケールダウンした実験系で行った。

## 2. 2 GeneChip による遺伝子発現解析

HL60 と HL60-RG 細胞の遺伝子発現を比較するため、対数増殖期および定常期の細胞より total RNA を抽出し、GeneChip を用いた解析を行った。両者の比較により発現に差の見られた遺伝子を図 1 1 に示す。約 1 万 5 千の遺伝子のうち RG 細胞にて発現上昇した遺伝子は、対数期で 127、定常期で 190、減少していた遺伝子は、対数期で 341、定常期で 411 であった。対数期と定常期で共通性を持って変化した 176 遺伝子に関して、Gene annotation に基づく機能分類をすると、全体での分布に比べて、外部刺激に対して応答する遺伝子群の割合が増加していることがわかった。

対数期、定常期で共通性を持って変化の見られた遺伝子のうち、差の大きかった 20 遺伝子をリストアップしたものが表 8 である。RG

細胞で発現の高かった遺伝子として、Natural killer cell transcript 4 遺伝子が顕著であった。この遺伝子は NK 細胞に増殖刺激を与えた際に誘導のかかる遺伝子として知られており、RG 細胞での増殖性の高さとの関連性に興味を持たれる。また同様に細胞の増殖に関与すると考えられる Hepatocyte growth factor の発現が高い点も注目される。発現の低かった遺伝子としては、2 種の S100 calcium-binding protein A8 及び A9 が注目される。このうち A8 に関しては、我々の研究室で以前、HL60 細胞のレチノイン酸刺激による分化にともなって発現の増加するタンパク質として 2 次元電気泳動により検出されていたタンパク質であり、レチノイン酸により分化能を失った RG 株での発現が低下している点は注目される。なお、核型解析などより、HL60 細胞では Double minute (DM) 遺伝子の出現に伴い c-Myc 遺伝子の増幅が起きており、RG 株では DM 遺伝子が消失していることが知られていたが、遺伝子発現解析からは両細胞間に myc 遺伝子の発現量の差は見られなかった。このことより、DM 遺伝子上の myc 遺伝子は、通常状態では発現していないことが示唆された。

ここで、変化の見られた遺伝子を、その染色体上の位置に基づいてマップしてみると、図 1 2 のように分布した。変化の見られた遺伝子は、比較的特定の染色体に集中していることがわかり、1,6,11 番染色体に多く見られた。また、領域として同じ方向に変化した遺伝子が多いことが特徴であり、近傍の遺伝子が同様な発現制御を受けている可能性が示唆される。HL60-RG 細胞では、親株に比べて核型がかなり変化しており、遺伝子発現の変化にも影響を与えたことが考えられる。

さらに、別の検討にて得られたTK6の遺伝子発現データを加えて、異なる細胞間および培養状態の間での遺伝子発現強度の差をスクエータープロットにて表したのが図13である。細胞が異なる場合(TK6 vs HL60)には非常に分布が大きくなっていることから、遺伝子発現に差があることがわかる。対数増殖期と定常期の細胞の比較では、全体として非常に共通した遺伝子発現を示していた。

次に、由来が同一のヒト膀胱癌由来培養細胞株を用いた検討結果を示す。まず凍結融解した 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 15 に示す。この 3 種の細胞は図 14 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(図 15)。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 16 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エー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 9)。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 10

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したが、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(東京大学、システム生物医学データベース)上の EJ-1 と T24 の発現データを検討したところ、図 17 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するを示している。

## 2. 3 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 18 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  $\beta$  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 19 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 20 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 21 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 特異的変化として、6 番染色体の一部と 18 番

染色体全域の増幅が、HL60RG 細胞特異的変化としては、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 22 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<sup>0.25</sup>、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から、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 23 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 24)。

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 25)。

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 68 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 27)。メタフェーズ CGH 法では、HL60 細胞におけ 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 22)。

また、HL60 と HL60-RG 細胞間では、SKY 解析において 10 番染色体と 11 番、13 番染色体の転座様式に差が見られるが、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 ( $\log_2\text{Ratio}=0.58$ )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

#### 3. 1 モデル細胞を用いた解析

継代数を余り経ていない HL-60 細胞は、ダブリングタイムは 48 時間程度であるが、継代を重ねていくとダブリングタイムが早まる。ダブリングタイムが 35 時間になった HL-60 の培養上清では、サイトカインアレイで 6K の位置にある、Insulin-like growth factor binding proteins-2 の増加が認められた (表 1-1 及び図 28)。HL-60 細胞から樹立された高増殖株である HL-60 細胞でもこの Insulin-like growth factor binding proteins-2 の増加が認められた。また、Hepatocyte-growth factor (HGF) は、HL-60RG 細胞に特異的に発現していることが明らかになった。一方、いくつかのサイトカインについて、ELISA による定量を試みた。表 1-2 に示すように、IL-6、IL-8、HGF、VEGF が測定可能であったが、それ以外のサイトカインは検出限界以下であった。特に、HGF は

HL-60 細胞で特異的に発現しており、プロテインアレイの結果と良く一致していた。以上の結果より、サイトカインアレイを用いた培養上清のサイトカイン産生解析が、細胞の増殖能が変化したときにそれと呼応して産生量が変化するサイトカインを検出するに適用できることを意味しており、サイトカインアレイが細胞治療薬の産生するサイトカインプロファイルの解析に有用であることが示唆された。

### 3.2 血管内皮分化誘導系でのサイトカインアレイを用いた解析

次に、血管再生を目指した細胞治療で用いられることが期待されている血管内皮前駆細胞へサイトカインアレイが適応できるか検討した。すでに報告しているように、我々は、末梢血あるいは臍帯血 AC133 陽性細胞から血管内皮細胞を *in vitro* で誘導する系を確立している (J Cell Physiol. 2003, 195:119-129.)。図 2 9 に示すように、臍帯血 AC133 陽性細胞を TPO、VEGF、SCF を含む EBM2 培養液中で培養する *in vitro* 分化系では、培養開始 1 週間目には CD31 の強い発現が見られる。一方 KDR/flk-1 は培養 2 週間後に強い発現が観察された。培養 1 週間目の CD31 を強く発現している細胞は、種々の解析から血管内皮前駆細胞としての特質を良く表していることを報告している。また、2-3 週間目の細胞は分化した血管内皮の特質を持っていることを明らかにしている。この *in vitro* の培養下でその特性が変化するときの培養上清に産生されるサイトカインをアレイを用いて解析した (図 2 9 b)。

臍帯血由来 AC133 陽性細胞の血管内皮分化系の 1 週間目で発現しており、かつその後発現が減少したサイトカインは、Epithelial neutrophil-activating protein 78、GM-CSF、

Growth Related Oncogene、I-309、IL-1 $\beta$ 、IL-6、Monocyte Chemoattractant Protein 1、Macrophage Inflammatory Protein 1  $\beta$ 、B-lymphocyte chemoattractant、tissue inhibitor of metalloproteinases-1 の 10 種であった。

2 週目で最大となっていたのは、HGF、tissue inhibitor of metalloproteinases-2 であった。3 週目まで変わらなかったのは、IL-8 であった。Macrophage-derived Chemokine は、3 週まで徐々に増えていた。

一方、末梢血由来 AC133 陽性細胞の血管内皮への分化系で培養上清中のサイトカイン分泌の変化を解析したところ、1 週目に培養上清で検出され、その後培養経過とともに減少していたのは、Epithelial neutrophil-activating protein 78、GM-CSF、Growth Related Oncogene、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、Monocyte Chemoattractant Protein 1、Monocyte Chemoattractant Protein 2、Macrophage Inflammatory Protein 1  $\beta$ 、regulated upon activation, normal Tcell expressed, and presumably secreted、EGF、PDGF-B、B-lymphocyte chemoattractant の 13 種であった。2 週目で最大となっていたのは、Macrophage Inflammatory Protein 1  $\delta$ 、Oncostatin M、tissue inhibitor of metalloproteinases-1 であった。

HGF、Insulin-like growth factor binding proteins-2、tissue inhibitor of metalloproteinases-2 は、2 週目まで増えて 3 週目は 2 週目と同程度であった。

2 週まで変わらず 3 週目で減少していたのは、Neutrophil Activating Peptide 2 であった。また、3 週目まで変わらなかったのは、IL-8 と Pulmonary and Activation-

Regulated Chemokine であった。

3 週まで徐々に増えていたのは、Macrophage-derived Chemokine と MPIF-2 (Myeloid progenitor inhibitory factor-2) であった。

以上の結果より、臍帯血、末梢血由来の両者に共通した変化としては、1 週目でもっとも強く発現しており、その後減少したのは、Epithelial neutrophil-activating protein 78、GM-CSF、Growth Related Oncogene、IL-1 $\beta$ 、IL-6、Monocyte Chemoattractant Protein 1、Macrophage Inflammatory Protein 1 $\beta$ 、B-lymphocyte chemoattractant であることが示された。これらの、サイトカインは血管内皮前駆細胞と出現している時期に高い値を示していることになる。IL-8 は、培養期間を通じて高い発現が維持されていた。また、Macrophage-derived Chemokine は、3 週まで徐々に増えていくことが明らかになった。

### 3. 3 無担体電気泳動法の細胞由来タンパク質プロファイリング法への適用

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 3 0 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下段に示した。図中下段に\*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。

## 4. 細胞タンパク質プロファイル評価技術の開発

### 4. 1 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

平成 15 年度は、ペプチド/糖ペプチドマッピングにタンデム型質量分析装置を導入することによって、効率的に糖ペプチドを解析する方法を検討した。モデル糖タンパク質として、 $\alpha$ フェトプロテイン (図 3 1)、セルロプラスミン (図 3 2)、及びヒト血清を用いた。

#### ① $\alpha$ フェトプロテイン

$\alpha$ フェトプロテインを選元カルボキシメチル化した後、トリプシンで消化し、ペプチド・糖ペプチド断片とした。 $\alpha$ フェトプロテインには推定 N 結合糖鎖結合部位は一箇所しか存在しないので、酵素消化した場合、得られる糖ペプチドは 1 本となる (図 3 1)。この糖ペプチドを含む全ペプチド混合物を LC/MS で分析した結果、図 3 3 A に示すトータルイオンクロマトグラム(TIC)が得られた。このペプチドマップに現れているピークを構成する分子のイオンは自動的にデータ依存的な MS/MS 測定に付されている (図 3 3 B)。図 3 3 C は MS/MS の TIC の中から、糖鎖の指標となる  $m/z$  204 のフラグメントイオンだけを選択的に取り出したものである。尚、 $m/z$  204 は、糖鎖の構成単糖である GlcNAc または GalNAc の B イオンに相当する。この操作によって、ペプチドマップ中の糖ペプチドの位置を特定することが可能となった。

図 3 4 は糖ペプチドと特定された 2 つのピ

ークのうち、ピーク 1 ( $m/z$  1061.8<sup>3+</sup>)の MS/MS スペクトルの一つを示したものである。低分子量側に糖鎖に由来するイオン、[HexNAc]<sup>+</sup> ( $m/z$  204), [HexNAcHex]<sup>+</sup> ( $m/z$  366)に加えて、[HexNAc-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> ( $m/z$  186), [HexNAc-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> ( $m/z$  168)等のイオンが生成されているのが確認された。また、[NeuAc]<sup>+</sup> ( $m/z$  292), [NeuAc-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> ( $m/z$  274)が認められることからシアル酸が結合していることが推定された。さらに、高分子量側には糖鎖が完全に切れたペプチドに相当するイオン( $m/z$  978.5), 及びそのペプチドに[HexNAc]が 1 分子または 2 分子結合した分子のイオン、さらに[Hex]が 1~3 分子分増えたイオンが認められ、N 結合糖鎖のコア部分の配列に関する情報が MS/MS スペクトル上に現れていることがわかった。ペプチドに相当するイオンの  $m/z$  値から、この糖ペプチドは  $\alpha$ フェトプロテインのトリプシン消化によって得られることが予想される VNFTEIQK と推定された。さらに、中分子量領域にはペプチドに由来する b 及び y イオンが検出されていることがわかった。図 3 4 中の表はペプチド VNFTEIQK が開裂したときに得られることが予想されるフラグメントイオンを示したものである。網掛けした部分は図 3 4 のプロダクトイオンスペクトル内に存在を確認することができたフラグメントイオンであり、VNFTEIQK 配列を有するペプチドであることが確認された。

糖鎖構造は TOFMS で得られた糖ペプチドの分子量(3182.3Da)からペプチドの理論分子量(977.5Da)を差し引いて得られた分子量(2222.8Da)を基に、シアル酸が結合した 2 本鎖糖鎖であることが推定された。さらに、このイオンの近傍イオンの TOFMS データ及び MS/MS スペクトルを解析した結果、 $\alpha$ フェト

プロテインに付加している糖鎖を表 1 3 のように推定することができた。尚、ピーク 2 は解析の結果、一部切れ残った FTKVNFTEIQK ペプチドに糖鎖が付加したものであることが確認された。

## ② セルロプラスミン

セルロプラスミンには 7 箇所の推定 N 結合糖鎖結合部位が存在する(図 3 2)。 $\alpha$ フェトプロテインと同様にトリプシン消化し、7 箇所の推定 N 結合糖鎖結合部位を有するペプチドを含む全ペプチドを LC/MS で分析した。その結果、TOFMS TIC(図 3 5 A), MS/MS TIC(図 3 5 B), 及び  $m/z$  204 のマスクロマトグラム(図 3 5 C)が得られ、図 3 5 C 上に 4 つのピークが検出された。

図 3 6 はピーク 1 を構成する一つのイオンの MS/MS スペクトルである。 $\alpha$ フェトプロテイン同様に糖鎖に由来するフラグメントが検出され、 $m/z$  292 のイオンが認められることから、シアル酸結合糖鎖であることが確認された。また、ペプチドのフラグメントイオンから、ペプチド 129-146 と同定され、分子量 4096.6Da からペプチド分子量 1891.8Da を引いた値から糖鎖はジシアロ 2 本鎖糖鎖と推定された。同様に他の 3 つのピークについても解析を行った結果、ピーク 2 は Asn1202, ピーク 3 は Asn397, ピーク 4 は Asn358 を含む糖ペプチドと同定され、N 結合糖鎖はセルロプラスミンの 7 つの推定 N 結合糖鎖結合部位のうち、138, 358, 397, 及び 1202 位の Asn に結合していることが明らかになった。また、TOFMS で得られた分子量から各部位に結合している糖鎖の構造は表 1 4 のように推定された。別途行った LC/MS/MS 測定により、残りの 3 箇所の N 結合糖鎖結合部位を含むペプチドが検出されたことから、227, 588, 929 位

Asn には糖鎖が結合していないことが明らかになった。

### ③ 血清糖タンパク質

LC/MS/MS によって、糖タンパク質の一次構造及び糖鎖構造に関する情報が一度に得られることが明らかになったので、これを血清糖タンパク質の解析に応用した。血清 50 $\mu$ l から市販のカートリッジを用いてヒト血清アルブミンを 50%程度除去し、トリプシンで消化してペプチド・糖ペプチド断片とした。これを直接 LC/MS/MS で測定することによって、TOFMS TIC (図 3 7 A), MS/MS TIC (図 3 7 B) が得られることを確認し、これを血清タンパク質のプロファイルとした。つぎに、確実に糖ペプチドの位置を特定するため  $m/z$  204 のマスクロマトグラム (図 3 7 C) に加えて  $m/z$  366 のマスクロマトグラム (図 3 7 D) を描き、共通ピークが認められた時間を糖ペプチドの溶出時間と特定した。一番大きなピークを構成するイオン ( $m/z$  1221.7<sup>3+</sup>) の MS/MS スペクトルを図 3 8 に示した。ペプチドに由来するイオンからハプトグロビンに由来する糖ペプチドであることが同定され、糖鎖構造についてもジシアロ 2 本鎖糖鎖と推定された。

以上のように、糖タンパク質の消化物をタンデム型質量分析装置で分析することによって、糖ペプチドの特異的解析が可能となることが明らかとなった。

## 4. 2 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

平成 16 年度は、電気泳動ゲルから糖タンパク質を丸ごと抽出した後、プロテイナーゼ消化することによって、糖ペプチド回収率を向上させることを目指した。また、昨年度用いたデータ依存的 CID-MSMS に加えて、データ依存的 CID 多段階 MS 及び In-source CID の

同時分析が可能である liner ITMS を導入することによって、さらに糖ペプチド特異的なペプチド/糖ペプチドマッピングの開発を行った。

### 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 3 9)。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 を用いた連続スキューン分析 (full mass scan, in-source CID を用いた full mass scan, 及びデータ依存的 MS<sup>n</sup>) を行った。図 4 0 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。

### ② データベース検索

データ依存的 MS<sup>n</sup> 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。

### ③Asn74 結合糖鎖の解析(Val69-Lys76)

図 4 1 は, データベース検索で Val69-Lys78 と同定された糖ペプチド ( $m/z$  1,512.21<sup>2+</sup>, 検出時間 34.52 分, 測定範囲  $m/z$  405-2,000) の MS<sup>2</sup> 及び MS<sup>3</sup> プロダクトイオンスペクトルである。図 4 1 B にデータベース検索で同定された peptide (Val69-Lys78)+GlcNAc( $m/z$  1,310<sup>+</sup>)をプリカーサ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 ( $m/z$  1,512.21<sup>2+</sup> の MS<sup>3</sup> 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構造は, タンデム型質量分析装置を用いた糖ペプチド解析と同様に, プロダクトイオンスペクトルを基に解析した。まず, 単糖組成は糖鎖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, dHex<sub>2</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub> 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, dHex<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub> 及び dHex<sub>2</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub> に相当する B<sub>2α</sub><sup>+</sup>( $m/z$  512<sup>+</sup>), 及び B<sub>3α</sub><sup>+</sup>( $m/z$  674<sup>+</sup>) 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( $m/z$  1,008<sup>3+</sup>)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<sub>2α</sub>/Y<sub>5α</sub><sup>+</sup>(Fuc-GlcNAc<sup>+</sup>,  $m/z$  350<sup>+</sup>)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 dHex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>, dHex<sub>1</sub>HexNAc<sub>2</sub>, 及び dHex<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>2</sub> が結合した Y<sub>1α</sub><sup>+</sup>( $m/z$  1,456<sup>+</sup>), Y<sub>2α</sub><sup>+</sup>( $m/z$  1,660<sup>+</sup>), 及び Y<sub>3αβ/βγ</sub><sup>+</sup>( $m/z$  1,822<sup>+</sup>)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<sub>3γ</sub><sup>2+</sup>( $m/z$  1,411<sup>2+</sup>)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<sub>3α/1β/ββ</sub><sup>2+</sup>( $m/z$  940<sup>2+</sup>)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  $m/z$  1,512.21<sup>2+</sup> のイオンは, Fig. 11A 中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( $m/z$  1,512.21<sup>2+</sup>, 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 15)。

#### ④ 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 4 2 は、糖ペプチド( $m/z$  1,525.78<sup>2+</sup>, 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、dHex<sub>1</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>4</sub>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 dHex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>, dHex<sub>1</sub>HexNAc<sub>2</sub>, 及び dHex<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>2</sub> が結合した Y<sub>1 $\alpha$</sub> <sup>+</sup>( $m/z$  1,467<sup>+</sup>), Y<sub>2 $\alpha$</sub> <sup>+</sup>( $m/z$  1,670<sup>+</sup>), 及び Y<sub>3 $\alpha$ /3 $\beta$ /3 $\gamma$</sub> <sup>+</sup>( $m/z$  1,832<sup>+</sup>)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<sub>3 $\gamma$</sub> <sup>2+</sup>( $m/z$  1,423<sup>2+</sup>)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<sub>3 $\alpha$ /1 $\beta$ /3 $\beta$</sub> <sup>2+</sup>( $m/z$  945<sup>2+</sup>, 1,890<sup>+</sup>)が検出されたことから、トリマンノシルコア構造の Man に $\beta$ 1-4 結合する bisecting GlcNAc であることが示唆された。また、Hex<sub>3</sub>( $m/z$  487<sup>+</sup>, B<sub>2 $\beta$</sub> <sup>+</sup>), Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>1</sub>( $m/z$  853<sup>+</sup>, B<sub>4 $\alpha$</sub> /Y<sub>3 $\alpha$</sub> <sup>+</sup>), Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>( $m/z$  528<sup>+</sup>, B<sub>3 $\alpha$</sub> <sup>+</sup>), Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>1</sub>( $m/z$  690<sup>+</sup>, B<sub>4 $\alpha$</sub> /Y<sub>3 $\beta$ /3 $\gamma$</sub> <sup>+</sup>),

Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>( $m/z$  893<sup>+</sup>, B<sub>4 $\alpha$</sub> /Y<sub>3 $\beta$</sub> <sup>+</sup>), Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>2</sub>( $m/z$  1055<sup>+</sup>), Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub>( $m/z$  1217<sup>+</sup>), 及び Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>2</sub>( $m/z$  1380<sup>+</sup>, B<sub>4 $\alpha$</sub> <sup>+</sup>)が検出されたことから、結合糖鎖の構造は、図 4 2 中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、 $m/z$  1,525.78<sup>2+</sup>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 15)。

#### ⑤ 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 4 1 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<sup>+</sup> (HexNAc<sup>+</sup>)及び  $m/z$  292<sup>+</sup> (NeuAc<sup>+</sup>)のマスクロマトグラムである。 $m/z$  204<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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



4 1 E). In-source CID で得られた  $m/z$  204<sup>+</sup>のマスプ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 4 3 A は、ピーク T4 に溶出された糖ペプチド ( $m/z$  937.27<sup>3+</sup>, 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、 $m/z$  898<sup>2+</sup> 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  $m/z$  898<sup>2+</sup> 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 MS<sup>3</sup> 分析で得られた  $m/z$  898<sup>2+</sup> 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 (図 4 3 B)。

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、Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub> 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<sup>+</sup>, 528<sup>+</sup>) 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 (表 1 5)。

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 MS<sup>n</sup> 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。

#### ⑥ 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.

#### 4.3 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/MS<sup>n</sup>を行った.

図 4 4 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 Man-PO<sub>4</sub>-EtN<sup>+</sup> ( $m/z$  286<sup>+</sup>), 及び PO<sub>4</sub>-Inositol-GlcN<sup>+</sup> ( $m/z$  422<sup>+</sup>) 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 1 4 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<sup>+</sup>, 422<sup>+</sup> 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 4 5 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 ( $m/z$  1,050.89<sup>2+</sup>) 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<sup>+</sup>, 及び 422<sup>+</sup> の他に, PO<sub>4</sub>-Man-GlcN<sup>+</sup> ( $m/z$  404<sup>+</sup>), EtN-PO<sub>4</sub>-Man-GlcN<sup>+</sup> ( $m/z$  447<sup>+</sup>) 及び EtN-PO<sub>4</sub>-(GalNAc)-Man-GlcN<sup>+</sup> ( $m/z$  650<sup>+</sup>) 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, [peptide+EtN]<sup>+</sup> ( $m/z$  787<sup>+</sup>), [peptide+EtN-PO<sub>4</sub>]<sup>+</sup> ( $m/z$  867<sup>+</sup>), [peptide+EtN-PO<sub>4</sub>-Man-Man]<sup>+</sup> ( $m/z$  1,191<sup>+</sup>), [peptide+EtN-PO<sub>4</sub>-Man-Man-Man-PO<sub>4</sub>-EtN]<sup>+</sup> ( $m/z$  1,476<sup>+</sup>), [peptide+EtN-PO<sub>4</sub>-Man-Man-(GlcN)-Man-PO<sub>4</sub>-EtN]<sup>+</sup> ( $m/z$  1,637<sup>+</sup>), [peptide+EtN-PO<sub>4</sub>-Man-Man-(Ino-PO<sub>4</sub>-GlcN)-Man-PO<sub>4</sub>-EtN]<sup>+</sup> ( $m/z$  1,897<sup>+</sup>) から, この GPI 結合ペプチドは, Asp106-Cys111 に, 図 4 5 中に示す 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 ( $m/z$  1,132<sup>2+</sup>) の側鎖構造は, プロダクトイオンスペクトルから, R<sub>1</sub>=-Man, R<sub>2</sub>=-PO<sub>4</sub>-EtNH<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>=-H, R<sub>4</sub>=-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  $m/z$  1,151<sup>2+</sup>, 1,213<sup>2+</sup> から 図 4 5 中に示した 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  $m/z$  1,151<sup>2+</sup> 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  $m/z$  1,213<sup>2+</sup>の側鎖構造は、 $R_1=\text{Hex}$ ,  $R_2=-\text{PO}_4-\text{EtNH}_2$ ,  $R_3=-\text{H}$ ,  $R_4=-\text{HexNAc}-\text{Hex}$  (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<sup>+</sup>, 及び292<sup>+</sup>のマスキロマトグラム(図4 4D及びE), CID-MS/MSによる neutral loss 81 u のマスキロマトグラム(図4 4G)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, 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

### 5.1 マウスがん化モデルを用いた検討

#### ① ギムザ染色による細胞の形質の検討

BALB/cJにおいてPLLAプレートを埋植していない対照群の皮下組織の細胞ではほんの少シ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, 接触障害が減少した結果広範囲で pile up が観察された(図4 6 A, B). 反対に, SJL/J では, 皮下組織の細胞は平行方向に並び, 接触障害により平らで単層を示した(図4 6 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プレートを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4 7). 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4 7).

#### 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4 8, 4 9).

#### ④ TGF- $\beta_1$ 分泌について

TGF- $\beta_1$ 分泌レベルは, BALB/cJにおいてPLLAプレートを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- $\beta_1$ 分泌レベルは, PLLAプレートを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5 0).

#### ⑤ ジーンチップ解析

BALB/cJ において、主な ECM (ファイブロンネクチン、プロコラーゲン VIII $\alpha$ 1 サブユニット、オステオポンチン (OPN) 前駆体) (図 5 1-A, B, C) と、インスリン様増殖因子結合タンパク質 (IGFBP) 3 (図 5 1-D) と、cystein-rich intestinal protein (CRIP) (図 5 1 E) は、PLLA プレート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 ヌ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 5 2 A)。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 5 2-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 5 2 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 組織病理学的評価

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評価によって示された。また、Staghorn pattern (図 5 3-A) と Hering-bone-pattern (図 5 3-B, C) を持つ腫瘍細胞であることが分かった。

## 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

これまでの研究から、染色体の安定性はその末端の構造であるテロメアに依存していることが知られている。我々はそのテロメアの安定化機構としてテロメア結合タンパク質 TRF1 が最も重要な因子ではないかと考えている。これは、すでに発表したように不死化した細胞の中に、テロメア長が有限寿命細胞で細胞死が起こるとされるテロメアの長さ (約 5kbp) より遙かに短くなっている不死化細胞が存在していることによる。この考えは、テロメラーゼや DNA 組換えによってテロメア配列を長く保つことができる ALT (Alternative Lengthening of telomere) 機構によってテロメアの長さがある一定以上保たれていることが不死化につながるとする説の矛盾点を克服するための仮説である。すなわち、テロメア配列が充分長いか TRF1 の発現が充分に高いかいずれかの状態になれば細胞は不死化するという考えである。これは、不死化細胞と有限寿命細胞の TRF1 の発現、及びテロメア長を網羅的に解析した結果から導き出した仮説である。本年度は、細胞を不死化したときに TRF1 の発現がどのように変化するかを調べ、細胞不死化と TRF1 の関係を明らかにしようと試みた。

図 5 4 は、ヒト正常繊維芽細胞を種々の方法によって不死化したときの TRF1 の発現変化とテロメア長の変化について解析した結果を示す。FGF-1 結合タンパク質モータリン、SV-40、<sup>60</sup>Co による放射線照射を用いて細胞を不死化するとすべての細胞で TRF1 の発現が上昇していた。一方、テロメラーゼ活性は陽性対象とした HeLa-LT 細胞と同程度の発現誘導が見られた場合もあるが、全く誘導が認め