

られなかった場合の方が多かった。種々の細胞株を不死化した場合 (図 5 4 下)、テロメア長が長くなることが多く認められたが MRC5 を SV-40 で不死化した場合など陽に逆にテロメア長が短くなった場合もあった。TIG3 及び TIG7 細胞に TRF1 をトランスフェクトしたときの細胞寿命の変化を解析した。その結果、トランスフェクトした細胞の TRF1 発現量に応じて細胞の寿命の延長が惹起された (図 5 5)。

6. in vitro 系での免疫隔離膜の機能に関する研究

6.1 骨髄リンパ球 (BML) 細胞の生存率

新たに開発した陰イオン修飾ウレタン (SPU) コートバッグの免疫隔離能の機能に関して、ドナーモデルとしてラットの骨髄細胞に対する同種リンパ球による作用を解析することにより評価した。図 5 6 に示したように、SPU コートしていないバッグ中に入れた骨髄リンパ球 (BML) 細胞は、SPU コートしたバッグ中に入れた細胞に比べて、生存率が有意に低下していた (74%, $p < 0.05$)。

6.2 リンパ球細胞中のサイトカイン産生

SPU コートしたバッグに封入した BML と共培養したリンパ球細胞と SPU コートしていないバッグに封入した BML 細胞と共培養したリンパ球の IL-4 の産生量を比較したところ、ほとんど差が見られなかった (図 3 1 (a))。一方、SPU コートしたバッグの BML 細胞と共培養したリンパ球の方が IL-13 産生量は高かった (図 5 6 (b))。反対に、TNF- α と IFN- γ の産生量は SPU コートしていないバッグを封入した BML 細胞と共培養したリンパ球細胞の方が高い傾向が見られた (図 3 1 (c,d))。

6.3 リンパ球細胞中の CD4 陽性細胞と CD8

陽性細胞の測定

SPU コートしたバッグ及びしていないバッグに封入した BML 細胞と共培養したリンパ球の CD4 と CD8 が陽性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 (図 5 8 に示した)。CD4 (図 5 8 (a)) 及び CD8 (図 5 8 (b)) 陽性細胞数は、SPU コートしたバッグに BML 細胞と共培養したリンパ球細胞の方が高いことが明らかになった。さらに、CD4 と CD8 ダブルポジティブの細胞数も同様の傾向が認められた (図 5 8 (c))。

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

7.1 磁性マイクロ粒子を用いた MSIA による血清中微量タンパク質の検出

① 正常血清についての検討

磁性マイクロ粒子を用いた MSIA によって正常血清からどのようなタンパク質を検出できるか検討した。まず、抗トランスフェリン抗体を用いた場合には、トランスフェリン (80 kDa) の 1 価イオンや 2 価イオン ($m/z = 80\,000, 40\,000$) に相当するシグナルをヒト血清から検出することができた (図 5 9 A)。血清濃度が高いほどトランスフェリンのシグナルは強い傾向にあったが、夾雑物のアルブミンに由来するシグナル ($m/z = 66\,000, 33\,000$) 等も強くなるので、ある程度希釈したほうがよいと考えられる。ついで、抗 β_2 -ミクログロブリン抗体を磁性マイクロ粒子に結合させて検討した場合には、 β_2 -ミクログロブリン (11.8 kDa) に相当するシグナルをヒト血清から検出することができた (図 5 9 B)。その他、リゾチームについても相当するシグナルを検出することができたが、IGF-I、IGF-II、フェリチン、TGF- β_1 、アクチビン A、インスリンはトランスフェリン

ン等と同様な条件では検出することができなかった。

② BF 分離に用いる固相の検討

磁性マイクロ粒子よりも浮遊性が高く、表面積も大きい熱応答性磁性ナノ粒子を応用することで MSIA における目的タンパク質の分離を改善できないか、インスリン添加血清 10 μl を試料として検討した。すなわち、アビジン処理したビオチン結合熱応答性磁性ナノ粒子と、ビオチン標識抗インスリンモノクローナル抗体をインキュベートして、抗マウス IgG 抗体結合磁性粒子懸濁液を調製し、ストレプトアビジン結合磁性マイクロ粒子を同様に処理して調製した場合とインスリン検出感度を比較した。

その結果、熱応答性磁性ナノ粒子を用いた場合は 1 nM のインスリンを検出できた (図 6 0A)。一方、マイクロ粒子を用いた場合はインスリン以外のタンパク質によるシグナルが多数検出されるためにインスリンシグナルの検出が妨害されてしまい、粗精製法として不十分だった (図 6 0B)。ちなみに、同様なサンプルを抗 IgG 抗体を結合したゲルを利用して遠心分離する免疫沈降法による粗精製を行い測定した場合は、検出感度は 10 nM レベルであった。

7. 2 高分子化合物添加によるシグナル増強

①タンパク質添加によるマススペクトルにおけるインスリンシグナルの増強メカニズムの検討

MALDI-TOF MS を利用した定量法について内部標準を用いた定量性の検討を進める過程で、内部標準としてウシインスリンをマトリックスに添加しておく、ヒトインスリンのシグナルが増強されることを見出した。そこで各種のタンパクを添加して検討したところ、

トランスフェリンや BSA を添加した場合に、とくに強く増強された (図 6 1)。

トランスフェリンや BSA は、インスリン以外にも、各種目的タンパク質のシグナルを増強し、場合によっては、数十倍のシグナル増強がみられた (表 1 6)。

MALDI-TOF MS におけるシグナル増強には、マトリックスの結晶構造の変化とリンクする可能性があることが報告されている。そこでマトリックスの CHCA 溶液に系列希釈したトランスフェリンまたは BSA 溶液を添加して乾燥させ、結晶を顕微鏡で観察した。その結果、添加したトランスフェリンなどの濃度に依存して結晶の粒径が小さくなっていることが明らかになった (図 6 2)。このとき、0.13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ までのトランスフェリン溶液を添加した場合はインスリンのシグナルもトランスフェリンの濃度に依存して増強され、CHCA に由来する蛍光もほぼすべての結晶に均一に分布した。一方、0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以上のトランスフェリンを添加した場合にはシグナルは弱くなったが、同時に、蛍光性の不定形な塊と非蛍光性の結晶が増加していたことから、CHCA とトランスフェリン、インスリンの分布が非均一になったためと考えられた。

以上の結果から、トランスフェリンや BSA 添加によるインスリンシグナルの増強は、マトリックス結晶が小さくなり、結晶の表面積が増えることによって、インスリンの脱離イオン化反応が促進されたためと考えられた。

②合成高分子添加によるトランスフェリンシグナルの増強

適切な量のトランスフェリンや BSA を添加してシグナルを増強することは、微量のタンパクやペプチドを解析するうえで有用だと考えられるが、そのもの自身によってもシグナ

ルが発生するため、目的タンパク質のマスペクトルを複雑にする等の不利益も考えられる。特に IgG 等の高分子を解析する際には目的タンパク質のシグナルを妨害する可能性が高い。そこで、トランスフェリンを目的タンパク質として、各種合成高分子を CHCA に添加してシグナル増強剤として使えるかどうか検討した。インスリンシグナルと同様にトランスフェリンのシグナルも BSA の添加によって増強されるが、添加した BSA 自体に由来するシグナルも目的タンパク質であるトランスフェリンのシグナルの近くに検出された (図 6 3B)。一方、デキストラン等の合成高分子の多くは、高分子に由来するシグナルを発生させない条件を容易に設定することができた (図 6 3C)。

③各種合成高分子化合物によるタンパク質シグナルの増強

フェリチンや IgG 等のタンパク質を試料として、ポリリジンやデキストランを含む各種の合成高分子を CHCA に添加してシグナルにどのような影響を与えるか検討した。その結果、フェリチンについてはポリリジンやデキストランを含む多くの合成高分子がシグナルを増強した (表 1 7)。一方、IgG のシグナルを二倍以上増強した合成高分子は、高分子量のポリリジンと低分子量のポリエチレングリコールのみであった。

低分子ペプチドである ACTH フラグメントのシグナルは、BSA またはトランスフェリンの添加では増強されなかったが、ポリリジンやデキストランの添加では増強された (表 1 8)。一方、インスリンやシトクロム C、アポミオグロビン等は、トランスフェリンや BSA だけでなく、ポリリジンやデキストラン添加によってもシグナル増強を受けたが、ポリビ

ニルアルコールやポリエチレングリコールによってはあまり強いシグナル増強を受けなかった。分析対象物の分子量だけでなく、コンフォメーションや疎水性、電荷などの特性も脱離イオン化においては重要な役割を果たすと考えられており、ポリビニルアルコールやポリエチレングリコールを添加した場合には分子量以外の特性がシグナル増強作用に大きな役割を果たすと思われる。

8. 血管内皮前駆細胞の特性指標の解析に関する研究

8. 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よう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 6 4)。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 6 4A)。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 6 4B 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 6 5)。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。

8. 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 6 6-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 6 6-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 6 6-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)。

8. 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

末梢血の AC133 陽性細胞を VEGF、TPO、SCF 存在下、一週間培養した後、蛍光標識抗 CD31 抗体を用いて細胞を染色し、CD31 強陽性細胞をソーティングした。この CD31 強陽性細胞はすでに報告したように血管内皮前駆細胞としての特性をもっているが、この細胞をフィブロネクチン(FN)上で更に 1 日あるいは 7 日間培養し、KDR の発現の変化を調べた。その結果、1 日目に比べ 7 日目に KDR が強く発現していた(図 6 7、上段は光顕画像、下段は同視野における蛍光画像)。この結果は、CD31 強陽性細胞は FN 上での培養初期には血管内皮の分化マーカーである KDR が殆ど発現しておらず、FN 上で 1 週間培養することにより分化マーカーが発現してくることを意味しており、CD31 強陽性細胞が EPC の特性を持っており、EPC を FN 上で培養することにより血管内皮細胞へと分化できると考えている我々の結論を支持し

ている。そこで、各種コネクシン (Cx) の発現の変化を解析した。CD31 強陽性細胞を FN 上に培養した 1 日目と 7 日目の Cx の発現を比較すると、培養 1 日目では Cx37 と Cx40 が強く発現し、7 日目では Cx40 の蛍光強度は殆ど変化しないかむしろ増強する傾向が認められた (図 6 8)。一方、Cx43 は FN 上で培養後 1 日目には殆ど発現が認められず、培養 7 日目には強く発現してくることが明らかになった (図 6 8)。対照としてヒト臍帯内皮細胞をこれらの Cx で免疫染色した結果、Cx37 の発現は殆ど認められないが、Cx40 と Cx43 が強く発現している (図 6 8) ことが明らかになった。このことより、2 つの Cx40 と Cx43 の発現と Cx37 が発現していないことが分化した血管内皮の指標と考えられた。また以上の結果から、血管内皮前駆細胞として我々が想定している CD31 強陽性細胞は、分化開始前には Cx37 と Cx40 を発現しているが分化成熟に従って、Cx37 の発現が消失し、代わりに Cx43 が発現してくるものと考えられた。

末梢血 AC133 細胞を VEGF 存在下に培養すると啓示的に Cx37 の発現が多くなる (図 6 9 A)。さらに、Cx37 陽性細胞をと陰性細胞を分画すると、Cx37 陽性細胞の分画に CD31 強陽性細胞が含まれることが明らかになった (図 6 9 B)。

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 7 0 A 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 7 0 B 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。

8. 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 7 1 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 7 1 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 7 1 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。

8. 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 7 2 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。

9. P19 細胞由来細胞株の心筋細胞への分化誘導

9. 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 7 3）。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。

9. 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/cm² 以上を「少ない」、0.098 個/cm² 以上を「中程度」、157 個/cm² 以上を「多い」と定義した。収縮コロニーの大きさは、 6.36×10^{-5} cm² 以上の大きさのものを「小さい」、 3.18×10^{-3} cm² 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 7 4）。

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。

9. 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 7 5）。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 7 6）。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 7 6)。

9. 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 1 9)。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。

1 0. 神経分化細胞の特性解析

1 0. 1 P19 細胞の効率的神経分化誘導法の確立

P19 細胞を効率よく神経細胞へ分化させるためには、細胞を胚様体 (embryoid body) のように凝集した状態にすることが重要である。そこで、1 μ M レチノイン酸存在下、接着面がコートされていないバクテリア培養用プレートで完全にばらばらな状態にした細胞を植え培養を行った。細胞は培養開始後数時間で凝集し始め、時間の経過とともに大きな細胞塊になった (図 7 8)。さらに 2 日ごとに培地交換を繰り返しながら培養を続けた。

最初に、分化培地へ移す時の細胞の形態による分化効率の検討を行った。細胞は 4 日間レチノイン酸存在下培養したものを使用した。凝集状態の細胞のまま分化培地に移すと数時間で神経突起を伸ばした。しかし、通常のプレートでは接着面からはがれやすく、はがれたものは神経突起伸長に続くネットワーク形成まで至らず分化は停止した。ポリリジンコートしたプレートでは細胞塊はしっかりはり付き、神経突起伸長と密なネットワーク形成に至った (図 7 9)。細胞をトリプシンでばらばらにしてから分化培地に移した場合、ポリリジンコートしたプレートでは神経突起をのばすものの長さが短く、またネットワーク形成にも至らなかった。通常の培養用プレート

では、ほぼどの細胞からも神経突起を伸ばし、時間が経過すると細胞が寄り添い小さな固まりに発展し、神経突起の数も増え複雑なネットワークを形成した(図80、3日目)。形態的にも比較的均一な細胞集団であった(図51)。レチノイン酸を加えないで同様の操作を行った場合は、近くに存在する細胞同士の寄り添いが観察されるが、神経突起は伸ばさなかった(図80、Control)。

次に、分化に要する至適日数の検討を行った。1 μ M レチノイン酸存在下1日目から8日目までそれぞれ培養し、分化誘導培地に換えて分化の度合いを比較した。その結果、3日間から5日間レチノイン酸存在下に培養した場合が最も効率よく神経細胞に分化した。7日以上培養すると、分化誘導培地に移さなくても神経突起を伸ばすが、凝集した細胞塊がトリプシンに耐性になり、分化能は低下した。

10.2 分化誘導時および誘導後の細胞の特性

レチノイン酸で分化したP19細胞由来神経様細胞の分化マーカーとなるタンパク質の発現について解析した。神経幹細胞はニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトなどに分化することが知られている。ニューロンのマーカーとしてのMAP2(microtubule-associated protein 2)の発現は、4日間レチノイン酸存在下で培養後、分化培地に移した場合、MAP2は翌日から強く発現していた。分化培地に移さなくてもレチノイン酸処理7日目で発現が誘導されたが、これは形態的観察による神経突起の伸長が起こる時期と一致していた。一方アストロサイトの分化マーカーとされるGFAP(glial fibrillary acidic protein)の発現は、いずれのステージにおいてもほとんど検出されなかった(図81)。

神経細胞に見られるN-cadherin、contactinは、分化誘導中はレチノイン酸を添加していない対照群と発現の差異は認められないかほとんど発現してなかったが、分化し始め神経突起の伸長とともに強い発現が認められるようになった(図81、陽性対照Lとの比較)。

細胞の分化は増殖シグナルと密接な関係があるので、増殖を制御する因子の分化誘導過程における変動を調べた。P19細胞は、使用する濃度のレチノイン酸では増殖速度がやや落ちたが、4日間でも増殖は止まらなかった。DNA複製に関連しているPCNAや、DNAポリメラーゼ ϵ のサブユニットDPE2、DPE4は分化誘導過程でほとんど変動がなかった(図82)。PCNAは7日間で減少が観察された。また、増殖抑制因子であるKip1とRB2は分化に伴い発現量が上昇した。しかし、同様の増殖抑制因子であるSkp1、p36、p16はあまり変動が見られなかった。細胞周期進行に関与するcdk4およびcyclin Dは、細胞凝集させるといったん発現が減少し、培養経過とともに発現が増加してくること、さらに、分化誘導培地に移すとやや発現の減少が見られた(図83)。

10.3 P19細胞のレチノイン酸による神経細胞分化誘導時のプロテオミクス解析

神経細胞へ分化し神経突起を伸ばした細胞は形態的にもダイナミックな変化が起きている。神経細胞の再生を目指す細胞治療では、分化した細胞ではなく神経幹細胞あるいは前駆細胞が用いられると想定される。そこで本研究では、神経に分化する前の細胞の分化指標となる分子の探索を行うことを目指している。このために、P19細胞をバクテリア培養用プレートでレチノイン酸存在下1日目から4日目まで経時的に細胞を回収し、2次元電

気泳動を行い、ゲルの銀染色にて分化誘導初期に出現するタンパク質の探索を行った。コントロールには、レチノイン酸の溶解液 DMSO のみを同量投与したものをを用いた。1枚のゲルで分離できるタンパク質は限られているので、より多くのタンパク質を解析する目的で、可溶性画分 (step1) 及び非可溶性画分 (step2) に含まれるそれぞれのタンパク質を解析した。

分化誘導 1 日目から step 1 および step 2 のサンプルで、コントロールと比較して変動したスポットが観察された。単独のスポットで増加あるいは減少しているもの、またタンパク修飾による pI 移動と思われる水平方向に移動が見られるもの、付近のスポットと比較して割合が変動しているものが観察された (図 8 4)。step 1 によるサンプル、すなわち可溶性で細胞質由来のタンパク質は 1 日目と 4 日目を比較して、あまり大きなスポットの相違は見られなかった。一方、核内タンパク質や可溶化しにくいタンパク質である step 2 のサンプルは、1 日目と 4 日目で大きく異なっていた。この現象はコントロールでも観察されることから長期間細胞を凝集状態におくことによると思われる。

スポットの質量分析を行うことでタンパク質の同定を試みた。感度は落ちるがグルタルアルデヒドを用いない銀染色を行ったゲルから変動の見られたスポットを抽出し、一部 MALDI-TOF MS で解析したが、まだ同定に至っていない。

1 1. 肝幹細胞の特性指標に関する研究 アネキシン 3A の特性指標としての有用性

2-AAF 及び CCl₄ をラットに投与し肝再生を引き起こしたときの hematoxylin と eosin

(H&E) 染色像および免疫組織染色像を図 8 5 及び 8 6 に示している。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。図 8 5 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 8 6 においても図 8 5 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 8 8 は図 8 7 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 8 9 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 9 0 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9-1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9-2は図9-1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。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。

1.2. ヒト骨芽細胞の増殖能や骨分化能の加齢による影響

本研究では採取年齢の異なる骨芽細胞の増殖能、ALPase活性や石灰化を指標とする分化能の差異について検討した。骨芽細胞の増殖は採取年齢の違いで大きな変化が見られず、1D、16Y、41Yはほぼ同程度の増殖度であった

(図9-3)。図9-4に骨芽細胞の初期分化マーカーであるALPase活性の結果を示した。NH0st cellsのALPase活性は、採取年齢の違いによって、大きな変化が見られた。1Dの骨芽細胞はALPase活性が高い値を示したが、16Y、41Yは活性が低かった。骨芽細胞の石灰化度も、ALPase活性と同様に、年齢の差が大きく現れた(図9-5)。1Dは石灰化度が高く、16Y、41Yは非常に低い値を示した。

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、セルロブ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。

2. 細胞の同一性や安定性の評価手法

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 9 6)。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 (Drapper 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 クローンがスポットされており、平均的に約 800kb の間隔で染色体領域をカバーできることになる。これは従来の CGH 法による解像度の限界が 30Mb 程度であるのに比べると、より詳細な検討が可能といえる。最近では、ゲノムの配列の情報を利用してオリゴヌクレオチドによる CGH アレイを作成することにより、より解像度をあげた解析も可能になりつつある。また、SNP 解析のためにデザインされた GeneChip を用いて CGH 的な解析を行うこともでき、現在では 100K の SNP を検出するチップが利用可能となっているため、さらに詳細な検討が可能となっている。SNP アレイに関しては LOH の情報も得られるため、遺伝子の増減のみならず、組み換え型の変化も検出できる系として染色体解析への応用が期待される。

今後に残された課題としては、染色体レベルの変化を伴わない点突然変異等の遺伝子異常を効率的に検出する試験法の開発、および低頻度に存在する異常細胞の検出法の開発が挙げられ、新たな原理、発想に基づいた研究の展開が必要である。

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

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。

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

細胞・組織由来タンパク質の約 50%は糖鎖付加を受けているといわれている。糖鎖は細胞表面に多く存在し、細胞接着や認識等の細胞間相互作用に係わっている他、タンパク質の機能を様々な形で調節していることが知られている。また、糖鎖は組織間で異なっていること、発生・加齢や癌等の疾患に関連して変化することが明らかにされていることから、細胞組織利用医薬品において、タンパク質プ

ロファイル評価はもちろん、糖鎖プロファイル評価、並びに糖鎖部分を含む目的タンパク質の特性解析は重要である。

我々は本研究において、タンパク質プロファイル評価のための 2D-GE、並びにゲルから回収された目的タンパク質の特性解析法の開発を行ってきた。一般に、電気泳動法で分離されたタンパク質は、ゲル内消化、ペプチド抽出、MS/MS 分析、及び得られたプロダクトイオンを利用したタンパク質データベース検索によって同定されている。糖タンパク質の部位特異的不均一性の解析を行う場合、各糖鎖結合位置を含む糖ペプチドを等しい回収率で抽出する必要があるが、ゲル内消化後、ペプチド/糖ペプチドを抽出する方法では、回収率が不十分なうえ、ペプチド/糖ペプチドによって回収率が異なる場合がある。そこで、本研究では、SDS-PAGE で分離された糖タンパク質をゲルより丸ごと抽出した後、プロテイナーゼ消化を行い、得られたペプチド/糖ペプチドを分析する方法を検討した。可溶性 GPI 結合タンパク質は、ラット脳より分画し、SDS-PAGE で分離した。20~25 kDa 付近に検出されたバンドを 1% SDS を含むトリス塩酸緩衝液中で一晩激しく振とうすることによって、Thy-1 を丸ごと抽出することができた。

抽出された Thy-1 は、トリプシン、又は Asp-N で消化後、LC/MS によるペプチド/糖ペプチド分析に附した。LC/MS/MS を用いたペプチド/糖ペプチドマッピングによって結合糖鎖を解析する場合、無数のペプチドイオンの中から、いかに糖ペプチドのプリカーサーイオンを取り出すか、また、多数のプロダクトイオンスペクトルの中から、いかに糖ペプチドプロダクトイオンスペクトルを選び出すかが鍵となる。本研究では、質量分析装置に多

段階 MS 測定が可能な IT 型装置を導入し、データベース検索、in-source CID、及び CID-MS/MS による neutral loss を利用することによって、糖ペプチドのスペクトルを見つけ出すことに成功した。

データベース検索を用いる方法では、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。ITMS による測定では、MS/MS によって peptide に GlcNAc が結合したプロダクトイオンが比較的強く検出され、さらに MS³ では peptide+GlcNAc のペプチド部分の解裂が生じる。そこで、可変修飾として Asn 残基への GlcNAc に相当する 203 Da の分子量増加を加え、MSⁿ で得られたすべてのプロダクトイオンについてデータベース検索を行った結果、糖鎖非結合ペプチドの同定結果に加え、糖ペプチドのアミノ酸配列、糖鎖結合位置、糖ペプチドのプリカーサーイオンの m/z 値、及び糖ペプチドの溶出時間に関する情報を得ることができた。この方法は、ペプチド同定結果に基づいたタンパク質検索結果も得ることができ、未同定の糖タンパク質の糖鎖解析にも有用である。

In-source CID を利用する方法では、 m/z 204⁺(HexNAc⁺)、及び m/z 292⁺(NeuAc⁺)のマスクロマトグラムによって、ペプチド/糖ペプチドマップ上の糖ペプチド溶出時間を推定することができた。 m/z 204⁺のマスクロマトグラムから、結合糖鎖の種類に関わらず糖ペプチドの溶出位置を推定することができ、また、 m/z 292⁺のマスクロマトグラムからは、シアル酸を含む糖ペプチドの溶出位置の推定に有用であることが判った。また、GPI コア構造に由来する m/z 286⁺、及び 422⁺のマスクロマトグラムを利用して GPI 結合ペプチドを検出することが

できた。このように、In-source CID は、糖鎖構造に由来する適切なオキシニウムイオンを利用することにより、目的とする糖ペプチドを検出するのに役立つことが確認された。さらに、推定された糖ペプチドの溶出時間付近から糖ペプチドプロダクトイオンスペクトルを選別することによって、糖ペプチドの結合糖鎖構造を明らかにすることができた。

CID-MS/MS を用いた neutral loss を利用する方法では、CID-MS/MS によって生じる糖鎖に相当するプリカーサーイオンとプロダクトイオンの差を用いて、糖ペプチドの検出を行った。Hex の 2 価イオンに相当する 81 u の neutral loss によって生じたプロダクトイオンを検出することによって、還元末端側に未置換の Hex を含む 2 価の糖ペプチドの溶出時間を推定することができた。さらに、推定溶出位置付近のプロダクトイオンスペクトルから糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを選別し、結合糖鎖について解析することができた。Neutral loss 81 u のマスクロマトグラムは、特に高マンノース型糖鎖を含む糖ペプチドの検出に有効であることが判った。また、HexNAc, NeuAc, 及び Fuc を非還元末端側に持つ糖鎖が結合した糖ペプチドについても、適切な neutral loss を設定することによって、検出することができると考えられる。

ここで示した糖ペプチドを検出するための 3 方法は、N-結合型糖鎖を含む糖ペプチドだけでなく、O-結合型糖鎖の検出にも応用可能である。特に、データベース検索を用いる方法は、糖鎖結合位置についての情報が得られるため、O-結合型糖鎖を含む糖ペプチドのように糖鎖結合のための consensus 配列を持たない糖ペプチドを検出するのに有用であると思われる。また、3 方法で得られた結果を合わせる

ことによって、糖ペプチドを見落とすことなく検出し、より完全に解析することが可能になると考えられる。

ラット脳 Thy-1 の部位特異的糖鎖構造は、精製された糖ペプチドから糖鎖を遊離後、ゲルろ過クロマトグラフィー、エキソグリコシダーゼ消化、及びメチル化分析等を行うことによってすでに解析されている。Asn23 には高マンノース型糖鎖(M5, 及び M6), Asn74 にはトリマンノシルコア構造に Fuc が結合したコンプレックス型糖鎖, 及び Asn98 には高マンノース型糖鎖(M5), 及びハイブリッド型糖鎖が結合していることが報告されている。最近、我々は、SDS-PAGE で分離された Thy-1 からゲル内 PNGase F 消化により糖鎖を遊離させ、還元後、LC/liner ITMS-FT ICRMS を用いて糖鎖プロファイリングを行うことにより、Thy-1 には報告されている以上に、非常に多種類の N-結合型糖鎖が結合していることを明らかにしている。本研究では、LC/liner ITMS による連続スキャン分析を用いて、これら N-結合型糖鎖の部位特異的不均一性を解析した。その結果、各結合位置において、報告されている構造を含む多種類の糖鎖が結合していることが明らかとなった。各結合位置において、トリプシン又は Asp-N 消化物のどちらかの糖ペプチドを解析することによってのみ確認された糖鎖構造があることから、部位特異的不均一性について解析する場合、試料量が許すならば、複数のプロテイナーゼを用いて別々に調製された消化物を用いて分析することが望ましいと考えられる。

GPI 構造は、In-source CID を用いて Asp-N 消化物のペプチド/糖ペプチドマップ上の GPI 結合ペプチドの溶出位置を推定し、そこから選び出したプロダクトイオンスペクトルを用

いて明らかにすることができた。すでに報告されている2種類のGPI構造が確認された他に、新たに2種類のGPI構造を見出した。

以上のように、電気泳動によって分離された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、及びイオントラップ型質量分析法を利用して糖鎖を特異的に解析する方法を用いることによって、これまで解析が困難であったゲル内糖タンパク質の糖鎖解析が可能となることを実証した。

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

①マウスがん化モデルを用いた検討

ポリラクチドは、広く臨床の場で用いられている生体吸収性のポリエステルである。本研究において、PLLAプレートを埋植することによってBALB/cJマウスではクロス模様を形成し接触阻害を抑制するといった細胞の形態に違いが出ることを明らかにした。その原因を確かめるために、GJIC機能への影響について調べた。ギャップジャンクションはCx分子のC末端領域の翻訳後のリン酸化によって制御されており、Cx分子のリン酸化はGJICの阻害と密接に関わっている。そのため、ギャップジャンクションはPLLA誘導性腫瘍形成において主な役割を果たしているようである。Cx43のタンパク質とmRNAの発現について検討を行ったところ、Cx43の発現はPLLAを埋植したBALB/cJマウス由来の細胞では対照のBALB/cJマウス由来の細胞に比べて抑制されており、Cx43mRNA発現も、PLLAを埋植したBALB/cJマウス由来の細胞では抑制された。Cx43の抑制が腫瘍形成に促進的に作用するとの報告もある。PLLAは、GJIC阻害効果とCx43タンパク質量の低下を誘導し、腫瘍

形成能を高めるのかもしれない。TGF- β 1はリン酸化型Cx43を減少させることによってGJIC機能を弱め、またECMの発現を上昇させると言われている。TGF- β 1分泌量はPLLAを埋植したBALB/cJマウス由来の細胞では対照のBALB/cJマウス由来の細胞に比べて有意に上昇した。しかし、SJL/JマウスではPLLA埋植によってTGF- β 1分泌量は逆に減少した。さらに、ジーンチップ解析より、主なECMタンパク質はPLLAを埋植したBALB/cJマウス由来の細胞では上昇することを見出した。

BALB/cJマウスにおいて、PLLAプレートを埋植10ヶ月後に埋植部位に増殖した組織が形成されるが、この増殖組織をヌードマウスを用いて腫瘍形成試験を行った。PLLAを埋植したBALB/cJマウス由来の細胞を注入したヌードマウスにおいて大きくて急速な腫瘍増殖が観察された。しかしながら、これらの腫瘍細胞は軟寒天培養法ではコロニー形成は認められなかった。

以上のことから、PLLAはTGF- β 1の分泌を上昇させ、GJICの阻害、ECMタンパク質とIGFBPの発現の上昇を引き起こし、腫瘍を形成することが示唆された。さらに、PLLAはCRIPとOPNの発現も上昇させた。最終的にこれら全ての因子が腫瘍形成を亢進させるのであろう(図97)。

② TRF1の細胞のがん化指標としての有用性に関する研究

細胞のがん化指標としてのTRF1の有用性について検討した。ヒト繊維芽細胞を種々の条件で不死化するとTRF1発現は全ての場合で顕著に亢進していたが、テロメラーゼ活性やテロメア長は不死化とは相関しない場合があった。また、TIG3細胞やTIG7細胞にTRF1をトランスフェクトするとTRF1の発現誘導

と細胞寿命の延長が非常に良く相関していた。以上の結果から、細胞の不死化には、一定以上のテロメア長の長さあるいは TRF1 の発現の亢進が必要とする我々の仮説を支持する結果が得られた。今回の結果より、TRF1 ががん化の指標として非常に有用である可能性が示された。

6. *in vitro*系での免疫隔離膜の機能に関する研究

TNF- α と IFN- γ は Th1 細胞が産生するサイトカインであり、細胞の免疫反応を伝達し、同種移植片に対する拒絶反応に関わることが示されている。これまでの研究から、TNF- α の血漿レベルは肝臓、心臓、腎臓での急性の拒絶反応時に上昇することが示されている。IFN- γ の上昇もまた、肝臓移植時に起こることが報告されている。一方、Th2 細胞が産生するサイトカインである IL-4は動物モデルにおいて移植片生着を上昇させる役割を果たすことが示されている。Th2 細胞が産生する別のサイトカインである IL-13 の産生量は拒絶反応との関係は一定の傾向が認められず、急性の肝臓の拒絶反応時には IL-13 の産生は低レベルであるという報告がある一方で、腎臓において同種移植による拒絶反応が起こらない時と起こる場合でその産生量に差がないことが示されている。本研究において、SPU コーティングしたバックに BML 細胞を封入することによりその生存率が高いことが示され、免疫隔離膜としての有用であることが確認できたが、この免疫隔離の状況とレシピエントのリンパ球との総合作用に関して各種サイトカインの産生や免疫担当細胞の量の変化から解析した。その結果、SPU コートしていないバッグに封入した BML 細胞と共培養したり

リンパ球細胞 (レシピエントリンパ球) は、SPU コートしたバッグに封入した BML 細胞と共培養したリンパ球細胞よりも TNF- α と IFN- γ の産生量が上昇傾向を示し、SPU コートしていないバッグを封入されたドナーBML 細胞に対してレシピエントリンパ球で強い免疫反応を起こしていることが考えられた。このことから、SPU コートはドナーとレシピエントのリンパ球の間の免疫反応を抑制する働きをしていると考えられた。CD4 はヘルパーT 細胞の表面に発現している分子であり、CD8 はキラーT 細胞の表面に発現している分子である。CD4 と CD8 はどちらも細胞同士が抗原情報のやり取りをするときに重要な働きをするといわれている。本研究の結果から、CD4 陽性と CD8 陽性細胞数は、SPU コートしたバッグに封入したドナー細胞と共培養したレシピエントリンパ球細胞の方が高い傾向が見られた。さらに、CD4 と CD8 の両者が同時に発現しているリンパ球細胞の数も同様の傾向が見られた。以上のことから、SPU コートによってドナーとレシピエントのリンパ球間の免疫反応を最小限に抑えられているためこれらの細胞数が高く維持されていると考えられた。SPU コートが移植時における拒絶反応を抑制することが確認され、細胞性免疫や非特異的免疫を抑制した条件で、ドナーとレシピエントの液性免疫の *in vitro* での評価にも有用な手段となることが期待された。

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

本研究では、まず目的タンパク質の粗精製に磁性マイクロ粒子を利用する MSIA によって、血液中の内在性タンパク質の質量分析による検出を試みた十分な感度は得られなかつ

た。細胞治療用細胞から分泌される生理活性タンパク質の多くが、生理的条件では通常 nM オーダー以下の血液中濃度と考えられるので、磁性マイクロ粒子を用いた MSIA では測定困難と思われる。そこで、さらにより大きな表面積を有し、精製濃縮効率の改善が期待される熱応答性磁性ナノ粒子の応用を試みた。その結果、nM オーダーの濃度のインスリンを検出することができた。

この熱応答性磁性ナノ粒子については十分な検討はできなかったが、測定条件を更に検討し、使用する抗体等をさらに精査、選別すれば、サブ nM という実用的なレベルの感度を実現できる可能性がある。

トランスフェリンあるいは BSA をマトリックス溶液に添加すると MALDI-TOF MS の各種目的タンパク質のシグナルが増強するという現象は、(1)シグナル増強メカニズムがどうであるかという基礎的な興味、(2)高分子タンパク質の質量分析の高感度化技術開発という実用的な興味、の両面から極めて意義深い発見である。

トランスフェリンや BSA 添加によるインスリンシグナル増強のメカニズムについては、マトリックスの結晶形の小型化によって説明可能であった。しかし一方、合成高分子の場合は、トランスフェリンや BSA ほど明瞭な結果は得られず、結晶形の小型化以外の要因もシグナル増強現象に関わる可能性も考えられ、今後の更なる検討が必要と思われた。

合成高分子化合物の添加により目的タンパク質シグナルを増強することが明らかとなった。この増強現象は、高分子化合物の種類の違い、あるいはシグナル増強をうけるタンパク質の違いによって全く異なったものとなる。今現在、この違いを統一的に解釈することが

可能な原理を見出すことはできていない。しかし、今後現象の整理をさらに進めることにより、例えば、特定のタンパク質シグナルを増強するようなシグナル増強剤の設計が可能となるだろう。あるいは今現在検出が困難な高分子量のタンパク質のシグナルを増強する高分子化合物が開発できれば、細胞が産生するタンパク質の高感度体内動態解析法の開発につながる可能性がある。

8. 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。

9. 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、 α MHC、 β 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 β MHC はマウスでは胎生期の心筋に発現し、出生後は α 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 v 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、 β MHC には α 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はその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。

1.0. P19 細胞の神経細胞分化誘導過程にお

る細胞特性解析

P19 細胞の神経細胞分化誘導系を用いた神経分化マーカーの解析から、オリゴデンドロサイトに関しては検討していないが、P19 細胞から分化誘導した神経細胞はアストロサイトではなくニューロンが主であることが判明した。また、一般に細胞は分化誘導に伴い増殖停止に向かうが、レチノイン酸存在下で7日間培養するとDNA複製関連因子PCNAが減少しニューロン特異的なMAP2Bが発現してくることから、6日目から7日目の間に増殖から分化へのスイッチングが起こったと考えられる。分化培地に移し誘導をかけた場合、神経細胞特異的タンパク質がすぐに発現してくるにもかかわらず、PCNAやDNAポリメラーゼのサブユニットの減少がすぐに観察されなかった。盛んに増殖している細胞集団が存在している可能性もあるが、分化誘導培地に移す場合には、スイッチングのシグナルが異なるのかもしれない。増殖制御に関わる因子に関しては、分化に伴い発現してくるものと、そうでないものがあった。Kip1、RB2の発現は分化進行と相関性があり、これらの遺伝子発現を調節する因子が分化を制御している可能性がある。

再生医療に用いられる細胞の遺伝子レベルの発現やタンパク質レベルの発現を網羅的に調べることにより、細胞特性の解明にもつながる。これらの解析から神経前駆細胞の細胞特性指標を明らかにすることができれば、細胞組織利用医薬品としての品質確保や有効性評価の面から非常に有用である。幹細胞の一種であるP19細胞から神経細胞へ分化誘導していく過程の遺伝子レベル・タンパク質レベルの発現の網羅的解析は、これまでにDNAマイクロアレイによる遺伝子発現の検討が行わ

れており、いくつかの知見が得られている。しかし、マイクロアレイ解析の弱点である発現量の少ないものでの検討がまだなされていない。また翻訳後修飾のあるタンパク質については適応できない。

本年度行った2次元電気泳動によるタンパク質レベルの網羅的解析では、P19細胞から神経細胞へ分化誘導していく過程の分化誘導初期(レチノイン酸処理後1日目)から分化能を備わった4日目までに注目して解析を行った。早い段階での変動を捉えることで鍵となるタンパク質を見いだすためである。P19細胞をレチノイン酸による分化誘導刺激すると1日目からコントロールと比較して細胞質のタンパク質、核や細胞内器官タンパク質いずれも明らかに相違した再現性あるスポットが観察された。いずれのスポットもタンパク質はまだ未同定であるが、分化の誘導に関わっている因子である可能性がある。ここで用いた細胞の段階的抽出法による解析では、可溶化しにくい細胞膜画分を完全に回収しきれず、分化を運命づけられた細胞を選別するのに有効な細胞表面マーカーの同定のためには、細胞抽出法を工夫する必要がある。タンパク質や機能はまだ不明であるが、変動のあるスポットは再現性があり、これらのスポットのタンパク質の解析から、細胞特性を評価できる可能性が示された。

1.1. 肝幹細胞の特性指標に関する研究

アネキシン3Aの特性指標としての有用性

2-AAF/CCl₄投与したoval cellの出現を伴うラット肝再生モデル肝臓における検討から、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