

士 (Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, U.S.A.) から供与を受けた。αMHC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。

4. 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 1×10^5 cells/wellの密度で蒔いた。これを5%CO₂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. 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し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、 1×10^5 cells/wellの密度に播種した。これを5%CO₂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、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)、αMHC(αミオシン重鎖)、βMHC(β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。

4. 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社のマニュアルに従い各RNAサンプルからcDNAを合成し、次いでcDNAをもとにしてピオチン化cRNA断片を合成した。GeneChip Hybridization Ovenを用いてピオチン化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、定量性リアルタイムRT-PCRによって得られた心筋遺伝子発現データの第1主成分もしくは第2主成分との間でスピアマンの順位相関係数を算出、有意水準5%の条件で有意差を検定し、有意な相関の認められたSequence Tagを抽出した。

5. マウスE S細胞 P19細胞の神経細胞への分化

5.1 神経細胞への分化誘導法

P19細胞を α -MEM 10%FBS 中 37°Cで培養後トリプシン処理し、約 1×10^6 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 mg/ml trypsin inhibitor (Invitrogen) を加えた。100 mm の通常の培養プレートに 8×10^6 cells を DMEM/F12 に N2 supplement ($5 \mu\text{g/ml}$

insulin, 50 µg/ml human transferrin, 20 nM progesterone, 60 mM putrescine, 30 nM sodium selenite, 1 µg/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。

5.2 サンプルの調製

ウェスタンブロット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 x 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 mM Tris に pepstatin, antipain, leupeptin を加えた) に細胞を懸濁後、水中で 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 M Urea, 4% CHAPS, 40 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。

5.3 ウェスタンブロットティング

サンプル (20 µg) 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、セミドライブロット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。

5.4 2次元電気泳動

サンプル 100 µg (容量は最大 50 µl) を、8 M Urea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer (3-10NL), 2.8 mg/ml DTT, BPB trace を加え 250 µl 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 µl でゲルを一晚膨潤させた。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。

6. 倫理面への配慮

ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で行った。

C. 結果

1. PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮機構の解析

我々は、ウイルス検出手法の高感度化を目的として PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法を開発し、広範なウイルスを濃縮可能であること、濃縮したウイルスゲノムを核酸増幅法 (NAT) で検出することにより、ウイルスの高感度検出法が可能であることを明らかにしてきた。表 2 にこれまでに検討したウイルスと PEI 磁気ビーズによる濃縮の可否を示す。しかしながら、PEI 磁気ビーズによるウイルスの濃縮機構については十分解明されていない。PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮の分子機構が明らかになれば、より最適な条件を設定することによって濃縮効率のさらなる向上が期待される。また、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮は一部の非エンベロー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、非エンベロー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、セルロプラスミン、IgM 等がウイルスと共に濃縮されることが明らかとなった (図 5)。この結果より、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮時に免疫複合体を形成させることでさらなる濃縮効率の向上が得られる可能性が示唆された。

そこで PEI 磁気ビーズで濃縮できなかったポリオウイルスを取り上げ、免疫複合体を形成させることにより濃縮できないか検討してみた。図 6 に示すように、抗ポリオウイルス単クローン抗体を添加して PEI 磁気ビーズ濃縮を行うと、少し濃縮されるが、さらに抗マウス IgG モルモット IgM 抗体を添加すると顕著な濃縮効果が認められた。

1. 3 ヒト感染性ウイルスへの適応

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上昇した。

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場合、抗 HCV 抗体添加による濃縮効率の高める実験はできなかった。

2. 細胞由来タンパク質の無担体等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせたプロファイリング技術の開発

2. 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 3 及び図 9)。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 4 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 10 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 10b)。

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 β 、IL-6、Monocyte Chemoattractant Protein 1、Macrophage Inflammatory Protein 1 β 、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 週目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 β 、IL-6、IL-10、Monocyte Chemoattractant Protein 1、Monocyte Chemoattractant Protein 2、Macrophage Inflammatory Protein 1 β 、regulated upon activation, normal T-cell 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 δ 、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 週目まで変わらず 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 週目まで徐々に増えていたのは、Macrophage-derived Chemokine と MIP1 γ (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 β 、IL-6、Monocyte Chemoattractant Protein 1、Macrophage Inflammatory Protein 1 β 、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 週目まで徐々に増えていくことが明らかになった。

2. 2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 1 1 に培養上清中のヘパリンへの親和性の高いタンパク質を液相の等電点電気泳動と SDS-PAGE で分離した泳動像を示した。図中の数字は、塩基性タンパク質に着目して、その同定を行うために質量分析で解析したバンドを示した。MS/MS 分析で推定されたタンパク質を表 2 に示した。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。

3. 血管内皮前駆細胞の特性指標の解析に関する研究

3. 1 臍帯血及び末梢血由来 AC133 陽性細胞の SCF、TPO 増殖促進作用の比較と出現する細胞の解析

我々はすでに末梢血の造血幹細胞を多く含むとされている AC133 陽性細胞を VEGF 存在下に培養することにより血管内皮前駆細胞 (EPC) へ誘導できること、その特性指標として CD31 強陽性であることなどを報告してきた。今回、SCF や TPO 等の増殖因子を添加することにより、EPC の誘導や増幅にどのような影響があるか、またそれ以外の細胞の誘導や増幅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 1 2)。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 8 A)。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 1 2 B 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 1 3)。その結果両細胞由来の殆どの接着細胞は、ともに eNOS や KDR 等を強く発現していることが明らかになった。VEGF 単独に比較して、VEGF に SCF 及び TPO を添加した場合の方が、より多くの eNOS や KDR 陽性細胞が出現した。一方、臍帯血由来 AC133 細胞では eNOS や KDR 陽性細胞のクラスター様の細胞増殖が認められ、そのクラスターに含まれる細胞数も VEGF に SCF 及び TPO を添加した場合の方が高かった。

3. 2 SCF や TPO で出現する EPC の解析

以上のように、VEGF 単独に比較し、SCF や TPO を添加することにより、より多くの EPC や血管内皮細胞の誘導が可能であることが示された。そこで、SCF と TPO のどちらがより EPC

の誘導に重要な働きをしているのかを明らかにする目的で、それぞれを単独で添加したときの CD31 強陽性細胞の誘導と細胞数の増加について検討した。図 1 4-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 1 4-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 1 4-A)、CD31 強陽性細胞の誘導に関しては末梢血 AC133 細胞と同様の結果が得られた(図は示さず)。

3.3 Cx37 を表面マーカーとした磁気ビーズ分画後の KDR 陽性細胞の解析

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 1 5、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(図 1 6)、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 1 6)。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(図 1 6)、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 1 6)。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 1 6)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。

Cx37 は血管内皮細胞への分化に伴い発現が消失することから、Cx37 発現を指標として EPC を分画できる可能性が考えられた。そこで、ヒト末梢血由来 AC133 陽性細胞を分離して、タイプIVコラーゲン上で培養し、7 日目に抗 CD31 抗体と抗 Cx37 抗体を用い磁気ビーズを用いて分画した。それぞれの陽性細胞分画を FN 上に培養し、一週間後に接着した細胞を抗 KDR 抗体を用いて免疫染色した。図 1 7A 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 1 8 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。

3. 4 臍帯血由来 AC133 陽性細胞における Lox-1 発現の経時変化と Lox-1 を表面マーカーとした磁気ビーズ分画後の CD31 発現解析

Lox-1 は血管内皮細胞に特異的に発現していることが知られているが、血管内皮細胞への分化過程での発現誘導については不明である。末梢血由来 AC133 陽性細胞を分画後、タイプ IV コラーゲン上で培養後 1 週間の Lox-1 発現をフローサイトメーターで解析した。図 1 9 A に示すように、Lox-1 の発現は経時的に増加するが、Lox-1 と CD31 を同時に免疫染色し、FACS で 2 カラー分析すると CD31 強陽性細胞は Lox-1 弱陽性細胞であることが明らかとなった(図 1 9 B)。そこで臍帯血由来 AC133 陽性細胞を培養 5 日目に Lox-1 を指標に磁気ビーズ分画し、Lox-1 陽性細胞分画と Lox-1 陰性細胞分画における CD31 強陽性細胞の存在を解析したところ、Lox-1 弱陽性分画に濃縮されていた(図 1 9 C)。一方、AC133 陽性細胞由来 CD31 強陽性細胞を分離し、培養すると、培養期間の経過とともに Lox-1 の発現は弱陽性から陽性へと変化した。

3. 5 EPC の VE-カドヘリンや CD45 の発現解析

EPC の VE-カドヘリンの発現について、抗 CD31 抗体と抗 VE-カドヘリン抗体を用いて 2 カラー分析を行った。図 2 0 は末梢血の解析結果を示しているが、CD31 強陽性細胞を示すドットは四角のフレームに含まれるが、全ての細胞が VE-カドヘリン陰性であることが明

らかになった。一方、白血球共通抗原である CD45 の発現について CD31 の発現との関係を調べたところ、誘導した CD31 強陽性細胞は全て、CD45 陽性であった(結果は示さず)。以上の結果から、CD31 強陽性細胞という特性指標を持つ細胞は、いわゆる early EPC の性質をもつものと考えられた。

4. P19 細胞由来細胞株の心筋細胞への分化誘導

4. 1 CL6G52 株における GFP 発現の時間経過

本研究では、CL6 細胞に GFP 遺伝子と Neomycin 耐性遺伝子を導入し、4 つのサブラインを分離したが、心筋細胞に分化した際に GFP を発現するのは CL6G52 株のみであった。この CL6G52 株の心筋分化と GFP の発現の時間経過を解析した。CL6G52 細胞では分化誘導後 6 日目にコンフルエントになり、10 日目には拍動を開始し、18 日目には拍動が弱っていたが、この拍動細胞の出現よりかなり遅れて GFP の発現が認められた(図 2 1)。そこで CL6G52 を含む遺伝子導入細胞 (CL6G26、CL6G36、CL6G45) と親株である P19 及び CL6 細胞の心筋分化と遺伝子発現の網羅的解析を行った。

4. 2 細胞株の差による心筋分化の差

P19、CL6、CL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52 の 6 種類の細胞株について自動拍動の出現と収縮コロニーの数および大きさを指標に分化効率の違いを評価した。

収縮コロニー数は、0.016 個/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22)。

その結果、CL6G52細胞が最も分化能が高く、CL6G32が最も低いこと、CL6細胞や他の遺伝子導入細胞はその中間的な発現を示した。

4.3 分化誘導後の心筋細胞マーカー遺伝子の発現

次に6種類の細胞を分化誘導し、分化過程での心筋特異的な遺伝子発現を定量性リアルタイムRT-PCRによって測定した。細胞株の違いによって心筋の分化能の違い、マーカー遺伝子発現より比較した(図23)。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24)。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25)。

4.4 心筋細胞への分化効率に影響する遺伝子

P19細胞とCL6細胞、Neomycin耐性遺伝子を含むCL6細胞サブラインのCL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52の6種類について、定量性リアルタイムRT-PCRで得られた第1主成分の最大値、第2主成分の最大値、自動拍動能出現までの日数、もしくは収縮コロニーの数のスコア、の4つの指標それぞれとGeneChipの遺伝子発現シグナルとの間のスピアマンの順位相関を算出し、心筋細胞分化と相関する遺伝子を探索した。

スピアマンの順位相関とその有意確率を算出した結果、第1主成分と相関があるSequence Tagは109個、第2主成分と相関があるSequence Tagは342個、自動拍動能出現までの日数と相関があるSequence Tagは122個、収縮コロニーの数と相関があるSequence Tagは274個抽出された。これらのうち、第1主成分(心筋分化の指標)、自動拍動能出現までの日数、収縮コロニーの数の3要素と有意な相関のあるSequence Tagは26個抽出された。これら26個のSequence Tagのなかには重複する遺伝子が2つあったため、計24個の遺伝子が抽出されたことになる(表5)。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。

5. 神経分化細胞の特性解析

5.1 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 2 6)。さらに 2 日ごとに培地交換を繰り返しながら培養を継続した。

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 2 7)。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伸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 2 8、3 日目)。形態的にも比較的均一な細胞集団であった (図 5 1)。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 2 8、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。

5.2 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 2 9)。

神経細胞に見られる N-cadherin, contactin

は、分化誘導中はレチノイン鎖を添加して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29, 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30)。PCNAは7日間目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31)。

5.3 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step1およびstep2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32)。step1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step2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。

D. 考察

1. PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮の検討

昨年度までの検討で、新たに開発したPEI磁気ビーズがウイルス濃縮に非常に有用であ

ることを示してきた。本年度は、ウイルス検出技術の高精度化・高感度化に関する研究として、開発した PEI 磁気ビーズによるウイルスの濃縮機構に解析を行った。分子量 70,000、10,000、1,800 の 3 種類の PEI では 70,000 が最も濃縮効率が高いこと、濃縮の至適 pH は 6 付近であること、カチオン性ポリマーの PAA、PLL、PEI を比較すると PEI が最も濃縮効率が高いことが判明した。PEI 磁気ビーズはカチオン性ポリマーで+に荷電しているが、細胞やウイルスは-に荷電しているために、静電的に液体中のウイルスは PEI ビーズに吸着されると考えられるが、分子量 70,000 の PEI が最も優れていたのは、分子量が大きいほど側鎖が増え、より静電的な力が大きいためと思われる。分子量 70,000 より大きい分子量の PEI を用いて磁気ビーズを作製することでさらに濃縮効率が向上する可能性も考えられる。またカチオン性ポリマーの構造も濃縮効率に影響し、1 級、2 級、3 級の全てのアミンを持つ PEI が最も濃縮効率が高いことより、複数のアミン構造が濃縮に寄与しているものと考えられた。また、PEI 磁気ビーズにウイルスと同時に濃縮される蛋白質としては血清中の補体成分の C3、C4、IgM、セルロプラスミンが同定された。さらに、ポリオウイルスは PEI 磁気ビーズ単独では濃縮できないにもかかわらず、抗ポリオウイルス単クローン抗体にマウス IgG に対する IgM を添加することによりポリオウイルスの濃縮が可能になったことより、ウイルスの免疫複合体を形成させることにより全てのウイルスの濃縮が可能ではないかと考えられた。また、このような免疫複合体の形成は、ウイルス濃縮のさらなる高感度化につながる可能性もあり、この点についても検討を続けていく。

PEI 磁気ビーズを用いてヒト感染性ウイルスへの適応についても検討を行い、HCV や HBV への適応が可能であることを明らかにした。また、HBV 濃縮においても抗 HBV 抗体を添加することにより濃縮効率が上昇することが明らかになり、PEI 磁気ビーズ濃縮において、抗ウイルス抗体の添加が非常に有用であることが明らかになった。しかし、抗ウイルス抗体を直接結合した磁気ビーズでは、PEI 磁気ビーズを用いるのに比べて遙かに低い濃縮効率しか得られなかった（データは示さず）。これは、PEI の高い枝分かれ構造や解離基の多さが加わり効率よくウイルスをトラップできるのに対して、抗体を直接つけたビーズではそういった効果が無いためではないかと想定される。

2. 細胞由来タンパク質プロファイリングによる特性解析法の開発

サイトカインアレイによる解析は、迅速・簡便な操作で少量の培養上清で一度に 79 種類のサイトカインの解析が出来る。細胞組織利用医薬品の特性解析法として有用な手法であると考えられる。実際に治療に用いられる可能性あるヒト血管内皮前駆細胞を用いて、分化誘導による特性の変化に応じたサイトカイン産生の変化を捉えることが可能であった。

しかし、現在のプロトコールでは定量範囲や検出感度についてさらに改良が必要と考えられる。同時に解析した、モデル細胞を用いた検討でいくつかのサイトカインの検出結果が ELISA による検出結果と異なっていた。例えば、ELISA を用いて HL-60 細胞と HL-60RG 細胞はともにかなりの VEGF を産生していることを明らかになったが、サイトカインアレイでは検出することができていな

い。また、ELISAによってHL-60RG細胞は検出限界以上のIL-6を産生していることが示されているが、サイトカインアレイでは検出できていない。TNF- α は、ELISAでは検出できないがサイトカインアレイではHL-60RG細胞で産生を認めている。これらの差異は、用いている抗体も異なっている可能性が高く、それぞれサイトカインに対する抗体の親和性も異なるためと想定される。

今後サイトカインアレイを細胞特性解析に適応していくためには、イメージ解析などによりそれぞれのシグナルを定量できるようにするとともに、シグナル強度からサイトカインの定量が可能のように改良をしていく必要があると考えられる。また、より高密度なプロテインアレイを構築することができれば、サイトカインばかりでなく、細胞産生タンパク質プロファイル解析に適応可能と考えられるので、今後高密度化にも取り組んでいく。

細胞由来タンパク質の網羅的解析手法開発の一環として、無担体等電点電気泳動とSDS-PAGEの組み合わせた手法の有用性について検討した。サイトカインや細胞増殖因子の多くが、ヘパリンカラム等への親和性を持つ塩基性のタンパク質である。このような塩基性の性質から、多くのサイトカイン等がゲル等電点電気泳動では分離できないことが知られている。本研究では、モデル細胞としてHL-60RG細胞を用いて、培養上清中に産生されるヘパリンへの親和性の高い塩基性タンパク質の網羅的解析に無担体等電点電気泳動を適用したが、血球系細胞に多くの塩基性タンパク質の帰属を明らかにすることができた。今回、無担体等電点電気泳動法で帰属を推定できた塩基性のタンパク質 Myeloperoxidase (theoretical pI 9.19)、peptidylprolyl

isomerase B (theoretical pI 9.33) などがあり、これらのタンパク質はSWISS-2DPAGEでは分離できない。本法は、サイトカインや増殖因子等の塩基性の細胞由来タンパク質のプロファイリングに有用な手法であることが明らかにできた。

3. 血管内皮前駆細胞の特性指標の解析に関する研究

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

まず臍帯血及び末梢血AC133陽性細胞からのin vitroでのEPC誘導に対する増殖因子の影響について解析した。特に、SCFやTPOなどのサイトカインの影響について解析したところ、VEGF単独に比較して、SCFやTPOを添加することにより細胞数の顕著な増加が認められ、さらにCD31強陽性細胞の比率の増加が認められた。細胞数の増幅に関してはSCFとTPOを相加的な影響を示すが、CD31強陽性細胞の出現に関して、SCFは殆ど影響しないにもかかわらず、TPOは顕著な促進効果を示した。これらの結果より、TPOはEPCの誘導に主な作用を持ち、SCFは血管内皮前駆細胞よりも造血幹細胞や多能性造血細胞の増幅に主たる作用を持つのではないかと考

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

次にEPCはCD31強陽性であることをすでに報告しているが、品質や有用性評価指標としてのより広範な特性指標の解析を行った。特に、CD31強陽性細胞のコネキシン37、VE-カドヘリン、Lox-1、CD45などの発現について解析を行った。その結果、CD31強陽性細胞はLox-1弱陽性であり、血管内皮細胞への分化誘導にともないその発現が増強すること、VE-カドヘリン陰性、CD45陽性であることが示された。また、Cx37陽性細胞を分画してさらに培養を続けると接着性のKDR陽性細胞が出現してくることから、Cx37の発現がCD31強陽性と同等に非常に有用な特性指標になる可能性が高いことが示された。また、VE-カドヘリン陰性でCD45陽性であることから、AC133陽性細胞から誘導されるCD31強陽性細胞はearly EPCとしての性質を持

っているものと推定された。すなわち、CD31強陽性細胞は、AC133陽性の造血幹細胞から誘導されてきた初期のEPCであり、まだ捉えられていない成熟したEPCを経て血管内皮細胞へと分化する能力を有しているものと考えられる。

4. P19細胞由来細胞株の心筋細胞への分化誘導と相関する遺伝子の探索

本研究に用いた各細胞株は、心筋分化誘導における自動拍動能出現までの日数、収縮コロニーの数・大きさの分化能に大きな差があることが確認された。これは分化誘導に伴う遺伝子発現の差を反映しているものと考えられた。そこで、分化誘導に伴う心筋特異的遺伝子発現や分化誘導を行う前の遺伝子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後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。

5. P19 細胞の神経細胞分化誘導過程における細胞特性解析

P19 細胞の神経細胞への分化誘導には、レチノイン酸と細胞の凝集が必要であることが知

られている。本研究から、細胞と培養するプレート面との接着度も効率的分化誘導に重要であることが示唆された。すなわち、P19細胞を効率よく、またより均一に神経細胞に分化した集団を得るため、レチノイン酸処理後、トリプシンで細胞をばらし、細胞間相互作用ができる程度の細胞密度で通常の培養用プレートで培養するという方法を確立した。

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できず、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。

E. 結論

(1) ウイルス等の感染性危険因子の高感度検出のための基盤技術の開発や評価方法に関する研究として、新たに開発した PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮法の機構解析を行い、陽イオン解離基を高密度に持つ PEI が濃縮に有用であること、抗体が同時に濃縮されることなどを明らかにした。また、これらの解析結果の応用として抗ウイルス抗体を添加して濃縮を行うことがさらなる高感度化につながることを明らかになった。さらに、PEI 磁気ビーズはヒトウイルスである HBV や HCV の濃縮にも適応可能であることを明らかにした。

(2) 細胞特性評価の一環として、無担体等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせた手法の有用性について検討を行い、これまでのゲル 2 次元電気泳動では分離できない塩基性のタンパク質の解析に有用であることを明らかにした。

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

(4) 心筋細胞への分化能を有するマウス胚性腫瘍細胞及びその垂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。

(5) マウス胚性腫瘍細胞 P19 細胞をモデルに、神経細胞および心筋細胞に効率的に分化させる技術を確立した。2 次元電気泳動によるプロテオーム解析より、分化誘導過程初期から変動のあるタンパク質を見だし、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。

F. 研究発表

1. 論文発表及び著書

- 1) Kanayasu-Toyoda T, Fujino T, Oshizawa, T., Suzuki, T., Nishimaki-Mogami, T., Sato, Y., Sawada, J., Inoue, K., Shudo, K., Ohno, Y., Yamaguchi T, *J. Steroid Biochem Mol* in press.
- 2) Hosono T., Mizuguchi H., Katayama K., Xu Z.L., Sakurai F., Ishii-Watabe A., Kawabata K., Yamaguchi T., Nakagawa S., Mayumi T., Hayakawa T. Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference. *Hum. Gene Ther.*, 15, 813-819 (2004)
- 3) Uchida, E., Sato, K., Iwata, A., Ishii-Watabe, A., Mizuguchi, H., Hikata, M., Murata, M., Yamaguchi, T., Hayakawa, T.: An improved method for detection of replication competent retrovirus in retrovirus vector products, *Biologicals*, 32, 139-146 (2004)
- 4) Kusui, K., Sasaki, H., Adachi, R., Matsui, S., Yamamoto, K., Yamaguchi, T., Kasahara, T., Suzuki, K.; Ribosomal protein S18 identified as a cofilin-binding protein by using phage display library. *Mol. Cell. Biochem.*, 262, 187-193 (2004)
- 5) Iwata, A. Sato, K., Yamaguchi, T., Yoshiake, N., Tomoda, A.: Suppression of proliferation of poliovirus and porcine parvovirus by novel phenoxazine, 2-amino-4,4a-dihydro-4a-7-dimethyl-3H-phenoxazine and 3-amino-1,4a-dihydro-4a-8-dimethyl-2H-phenoxazine-2-one. *Biol. Pharm. Bull.* In press
- 6) Hosono T, Mizuguchi H, Katayama K, Koizumi N, Kawabata K, Yamaguchi T, Nakagawa S, Watanabe Y, Mayumi T, Hayakawa T.; RNA interference of PPARgamma using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Gene*. 2005 in press.
- 7) Xu ZL, Mizuguchi H, Sakurai F, Koizumi N, Hosono T, Kawabata K, Watanabe Y, Yamaguchi T, Hayakawa T.; Approaches to improving the kinetics of adenovirus-delivered genes and gene products. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 781-802. (2005)
- 8) Kanayasu-Toyoda, T, Yamaguchi, T, Oshizawa, T, Uchida, E, Hayakawa, T: The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells. *Biochem. Pharmacol.* 66:133-140, (2003)

- 9) Iwata,A, Satoh,K, Murata,M, Hikata,M, Hayakawa,T, Yamaguchi,T; Virus concentration using sulfonated magnetic beads to improve sensitivity in nucleic acid amplification tests. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1065-1069 (2003)
- 10) Kanayasu-Toyoda,T, Yamaguchi,T, Oshizawa,T, Hayakawa,T; CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells. *J Cell. Physiol.* 195:119-129, (2003)
- 11) Niimi,S, Oshizawa,T, Yamaguchi,T, Harashima,M, Seki,T, Ariga,T, Kawanishi,T, Hayakawa,T; Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 300, 770-774 (2003)
- 12) Iwata,A, Satoh,K, Yamaguchi,T, Tomoda,A; Antiviral activity of 2-amino-4,4a-dihydro-4a-7-dimethyl-3H-phe-noxazine-3-one on polyiovirus. *Tohoku J. Exp. Med.* 200, 161-165, (2003)
- 13) Oshizawa,T, Yamaguchi,T, Suzuki,K, Yamamoto,Y, Hayakawa,T; Possible Involvement of Optimally Phosphorylated L-plastin in Activation of Superoxide Generating NADPH Oxidase. *J. Biochem.*, 134, 827-834 (2003)
- 14) Sakurai,F, Mizuguchi,H, Yamaguchi,T, Hayakawa,T; Characterization of in vitro and in vivo gene transfer properties of adenovirus serotype 35 vector. *Mol. Ther.*, 8, 813-821 (2003)
- 15) Koizumi,N, Mizuguchi,H, Sakurai,F, Yamaguchi,T, Watanabe,Y, Hayakawa,T; Reduction of natural adenovirus tropism to mice liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and v integrin-binding ablation. *J Virol.* 77, 13062-13072 (2003)
- 16) Satoh,K, Iwata,A, Murata,M, Hikata,M, Hayakawa,T, Yamaguchi,T; Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *J Virol. Methods*, 114, 11-19, (2003)
- 17) Ishii-Watabe,A, Uchida,E, Iwata,A, Nagata,R, Satoh,K, Fan,K, Murata,M, Mizuguchi,H, Kawasaki,N, Kawanishi,T, Yamaguchi,T, Hayakawa,T; Detection of Replication-Competent Adenoviruses Spiked into Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR Combined with Glass Beads-Based DNA Extraction. *Mol. Therapy*, 8, 1009-1016 (2003)
- 18) Tomofumi Fujino, Yoji Sato, Mizuho Une, Toshie Kanayasu-Toyoda, Teruhide Yamaguchi, Koichi Shudo, Kazuhide Inoue, and Tomoko Nishimaki-Mogami; In vitro farnesoid X receptor ligand sensor assay using surface plasmon resonance and based on ligand-induced coactivator association. *J Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 87, 247-252 (2003)
- 19) 山口照英、内田恵理子：生物薬品のウイルス安全性を目的とした核酸増幅検査 (NAT) のフィージビリティースタディー。医薬品研究、34, 763-769 (2003)

2. 学会発表

- 1) Kanayasu-Toyoda, T., Oshizawa, T., Suzuki, T., Uchida, E., Hayakawa, T. and Yamaguchi, T Effect of siRNA of PKC ζ on G-CSF signaling pathway in differentiating HL-60 cells into neutrophils. 第77回日本生化学大会 (2004. 10. 14、横浜)
- 2) Sato Y, Mori S, Nakamura R, Ishida S, Sawada J, Miyazawa H, Yamaguchi T, Inoue K, Ohno Y Microarray analysis of coronary artery smooth muscle cells stimulated by PPAR alpha and gamma ligands. 第77回日本薬理学会年会 (2004年3月)
- 3) Sato Y, Nakamura R, Yoshida H, Yamaguchi T, Ohno Y, Nagao T, Inoue K Thyroid hormone enhances calcification of vascular smooth muscle cells in vitro. XVIII World Congress International Society for Heart Research (2004年8月)
- 4) Nakamura RA, Satoh M, Fujishita K, Mori S, Ishida S, Yamaguchi T, Inoue K, Ohno Y, Nagao T, Sato Y Thyroid hormone regulates vascular smooth muscle calcification. 第78回日本薬理学会年会 (2005年3月)
- 5) Yoshida H, Tamehiro N, Hashimoto T, Nishimaki-Mogami T, Yamaguchi T, Ohno Y, Nagao T, Asakawa Y, Inoue K, Sato Y PPARgamma ligand activity of ginkglic acid-related compounds. 第78回日本薬理学会年会 (2005年3月)
- 6) 佐藤 光利, 中村 亮, 藤下 加代子, 森 聡子, 石田 誠一, 山口 照英, 井上 和秀, 長尾 拓, 大野 泰雄, 佐藤 陽治 血管平滑筋における甲状腺ホルモンのターゲットの同定 第125回日本薬学会年会 (2005年3月)
- 7) 宮澤 宏, 喜納 克仁, 宮澤 薫, 佐藤 陽治, 山口 照英 幹細胞からの神経分化を左右

- する因子の探索 第 125 回日本薬学会年会
(2005 年 3 月)
- 8) 藤野智史、宇根瑞穂、豊田淑江、山口照英、井上和秀、最上(西巻)知子: 表面プラズモン共鳴センサーを用いた核内受容体 FXR リガンド結合の測定. 日本薬学会 123 年会. (2003. 3. 23. 長崎)
- 9) Kanayasu-Toyoda, T., Oshizawa, T., Suzuki, T., Uchida, E., Hayakawa, T. and Yamaguchi, T: Role of PKC ϵ on G-CSF signaling pathway in differentiating HL-60 cells into neutrophils. The 6th World Congress on Inflammation. (2003. 8. 5 Vancouver, Canada).
- 10) Kanayasu-Toyoda, T., Oshizawa, T., Suzuki, T., Uchida, E., Hayakawa, T. and Yamaguchi, T Role of PKC ϵ on G-CSF signaling pathway in differentiating HL-60 cells into neutrophils. 第 76 回日本生化学大会. (2003. 10. 16. 横浜)
- 11) Fujino T, Sato Y, Une M, Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Shudo K, Inoue K and Nishimaki-Mogami T : In vitro FXR ligand sensor assay using surface plasmon resonance and based on ligand-induced coactivator association. 第 76 回日本生化学大会. (2003. 10. 17. 横浜)
- 12) 有川稔多加、豊田淑江、山口照英、小村健、早川堯夫、森田育男 ; 血管内皮細胞化に伴う各種コネクシンの発現変化 第 24 回日本炎症・再生医学会. (2003. 11. 26. 京都)