

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7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8は図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。2日目と比べると、アルブミンおよびAnxA3共陽性の細胞に対して、アルブミンあるいはAnxA3のみ陽性の細胞の割合が増加していることがより明らかである。

D. 考察

1. 分離ラット小型肝細胞および成熟肝細胞におけるAnxA3、TAT、TO mRNAレベルの検討

近年小型肝細胞の細胞治療薬への応用が期待され、小型肝細胞と成熟肝細胞で発現が異なるタンパク質を探索し、その品質評価の指標としての応用を目指した研究が活発に行われている。それらの研究の多くは小型肝細胞を培養し、分化した成熟肝細胞

特異的あるいは肝細胞において普遍的に発現する既知のマーカートンパク質の発現を検討したものである。その結果、アルブミン、トランスフェリン、サイトケラチン8、サイトケラチン18など肝細胞における普遍的なマーカーは全て小型肝細胞に存在することが明らかになっている。また、分化型肝細胞のマーカーである α_1 -アンチトリプシン、コネクシン32は培養初期には発現がみられず、培養時間の経過に伴い発現細胞の増加する傾向がみられている。しかしながら小型肝細胞において特異的に発現するタンパク質はこれまで同定されていなかった。

最近、我々は肝細胞を成熟肝細胞と小型肝細胞に分画し、プロテオームによる網羅的解析および免疫化学的解析を試み、AnxA3が小型肝細胞において特異的に発現することを明らかにした。そこで、上記知見に基づき両細胞におけるAnxA3発現レベルの違いがmRNAレベルによるものかどうかRT-PCRにより調べた結果、その違いはmRNAレベルの違いによることが明らかになった。また、本結果からRT-PCRによるAnxA3 mRNAレベルの測定により小型肝細胞と成熟肝細胞の識別が可能であることが示されたが、本法は免疫化学的手法のように特異的な抗体を必要とせず、特異的なプライマーさえ設定すれば比較的簡便な操作でAnxA3 mRNAを高感度で検出可能である。したがって、本法は小型肝細胞の品質評価法として有用かもしれない。

一方、先ほど述べたように分化型肝細胞のマーカーは一般的に小型肝細胞の培養初期において発現がみられない。そこで分離小型肝細胞の分化度の指標としてまたネガ

タイプマーカーとしての有用性の可能性について典型的な肝細胞の分化マーカーである TAT と TO について発現を検討した。その結果、両細胞において同様な強度の PCR 産物がみられたことから、分離小型肝細胞は肝細胞と同等に分化していることが示唆された。これに関連し分化マーカーの 1 つである α -1 アンチトリプシンの小型肝細胞における発現は培養直後検出されるがその後培養に伴い検出されないことが明らかになっている。したがって、小型肝細胞は培養に伴い脱分化しその後および肝細胞に再度分化するのかもしれない。

2. ラット肝臓における oval cell の出現および肝細胞への分化誘導モデルを用いた AnxA3 の肝幹細胞のマーカーとしての有用性についての検討

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

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

一方、以下に述べる点から、今回その存在を確認した小型血球様の肝幹細胞は一般的に提唱されている oval cell と同じではないように思われる。まず、oval cell の由来はヘリング管と考えられているが、今回観察された小型血球様の肝幹細胞は中心静脈域に強い局在がみられる。また、データは示していないが、2-AAF/CCL₄ 投与後出現する AnxA3 およびアルブミン共陽性の小型血球様細胞は造血幹細胞のマーカーである CD34 についても陽性であり、その消長はこの AnxA3 陽性細胞と同様である。したがって、この細胞は骨髄由来細胞である可能性が極めて高く、oval cell の一部は骨髄細胞に由来するという最近の知見と一致する。

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

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

って、AnxA3 は小型血球様の肝幹細胞が有する高い増殖能の賦与に寄与しているのかもしれない。

E. 結論

①分離小型肝細胞および成熟肝細胞における AnxA3 発現の違いは mRNA レベルによることが示され、AnxA3 mRNA の小型肝細胞のマーカーとしての有用性が示唆された。②2-AAF/CCL₄ 投与ラット肝臓における oval cell の出現および肝細胞への分化誘導モデルを用いた検討から、AnxA3 は小型血球様の肝幹細胞のマーカーとして有用である可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

424-428

- 3) Niimi, S., Hyuga, M., Harashima, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T. (2004) Isolated small hepatocytes express both annexin III and terminally differentiated hepatocyte markers, tyrosine aminotransferase and tryptophan oxygenase at the mRNA level. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1864-1866
- 4) Gotoh, Y., Niimi, S., Hayakawa, T., Miyashita T. (2004) Preparation of lactose-silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocytes attachment. *Biomaterilas* 25 1131-1140

2. 学会発表

- 1) Shingo Niimi, Mizuho Harashima, Youko Nagaoka, Chieko Saito, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Mechanism of inhibition of dexamethasone-dependent induction of tyrosine aminotransferase activity by the proteasome inhibitor lactacystin. 第77回日本生化学会 (2004年、横浜)
- 2) Mizuho Harashima, Shingo Niimi, Masaru Gamou, Masashi Hyuga, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanishi, Takao

- Hayakawa: Expression of annexin III in primary cultured rat hepatocytes and its role on DNA synthesis. 第 77 回日本生化学会 (2004 年、横浜)
- 3) Shingo Niimi, Mizuho Harashima, Masaru Gamou, Masashi Hyuga, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Expression of annexin III in primary cultured rat hepatocytes and its role on DNA synthesis. 第 3 回アネキシン国際会議 (2005 年, スイス)
- 4) 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. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年 10 月)
- 5) Harashima M, Nagaoka Y, Niimi S, Seki T, Ariga T, Kawanishi T, Hayakawa T, The mechanism of inhibition of dexamethasone-dependent induction of tyrosine aminotransferase activity by lactacystin, a proteasome specific inhibitor. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年 10 月)
- 6) 新見伸吾、押澤 正、山口照英、原島 瑞、関泰一郎、有賀豊彦、川西徹、早川堯夫、ラット肝細胞におけるアネキシンⅢの特異的な発現 第 10 回 肝細胞研究会 (2003 年 7 月)
- 7) 原島 瑞、新見伸吾、長岡陽子、関泰一郎、有賀豊彦、川西 徹、早川堯夫、初代培養ラット肝細胞においてプロテアソーム特異的阻害剤であるラクタシスチンはグルココルチコイド依存的なチロシンアミノトランスフェラーゼの誘導を阻害する第 10 回 肝細胞研究会 (2003 年 7 月)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

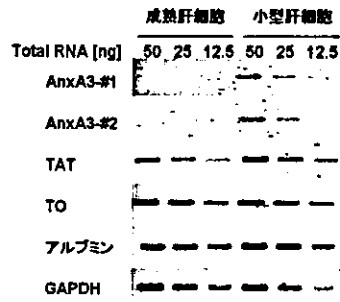


図1. 分離直後のラット小型肝細胞および成熟肝細胞における AnxA3、TAT、TOのRT-PCR解析

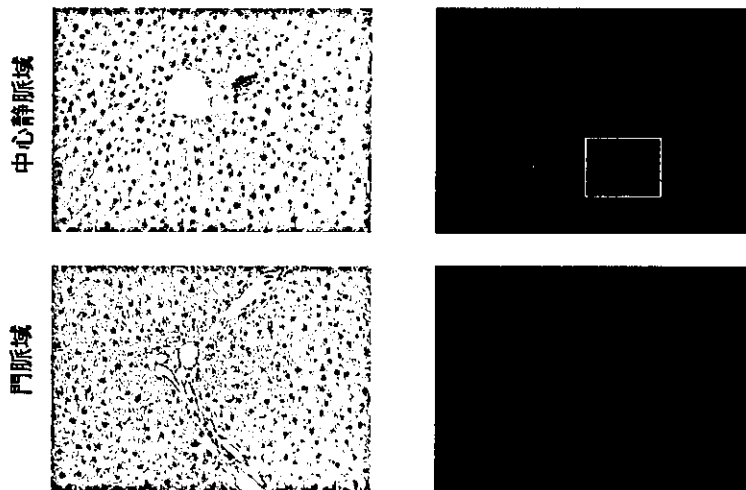


図2. vehicleを投与したラット肝臓における H&E染色と免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在
左図: H&E染色、右図: 免疫蛍光 AnxA3(緑)、アルブミン(赤) (倍率×200)

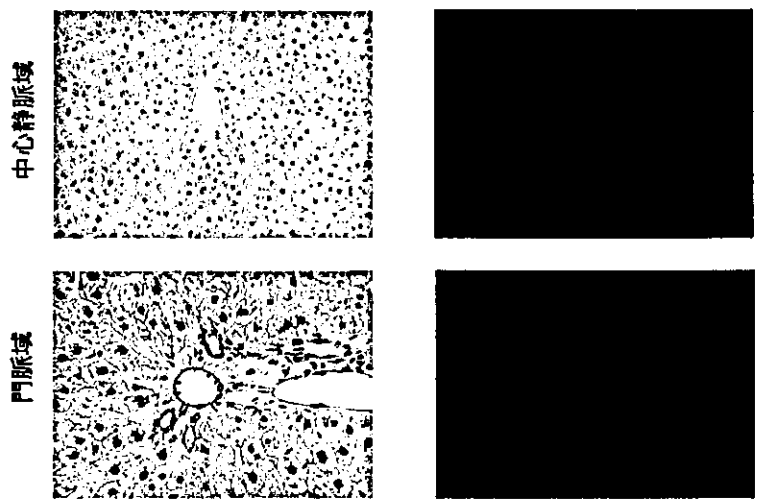


図3. 2-AAFを投与したラット肝臓における
H&E染色と免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在
左図: H&E染色、右図: 免疫蛍光 AnxA3(緑)、アルブミン(赤) (倍率×200)

中心静脈域

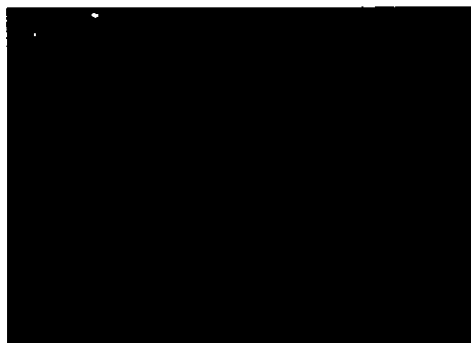


図4. vehicleを投与したラット肝臓における
免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在
免疫蛍光 AnxA3(緑)、アルブミン(赤) (倍率×1,000)

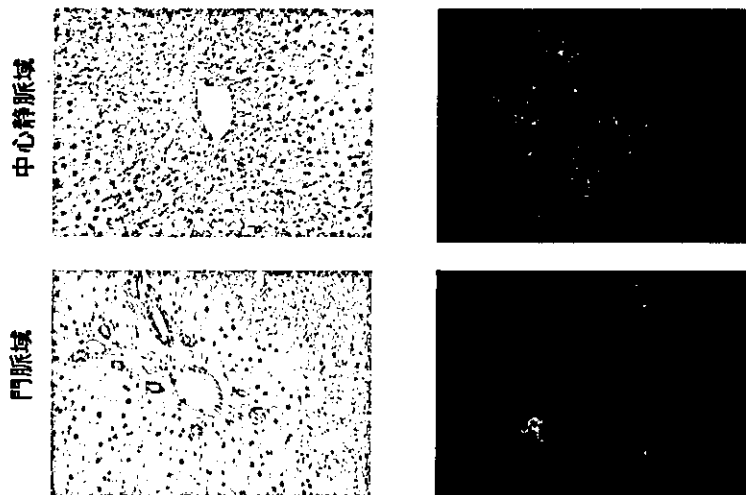


図5. 2-AAF/CCl₄投与2日目のラット肝臓における
H&E染色と免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在
左図: H&E染色、右図: 免疫蛍光 AnxA3(緑)、アルブミン(赤) (倍率×200)

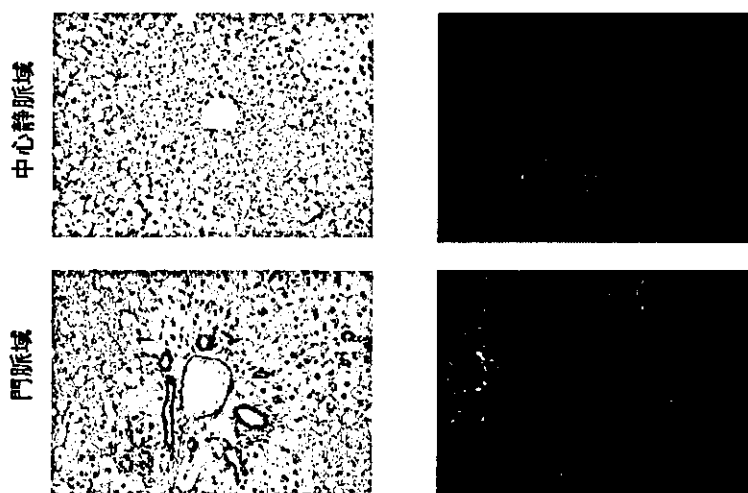


図6. 2-AAF/CCl₄投与3日目のラット肝臓における
H&E染色と免疫蛍光によるAnxA3及びアルブミンの局在
左図: H&E染色、右図: 免疫蛍光 AnxA3(緑)、アルブミン(赤) (倍率×200)

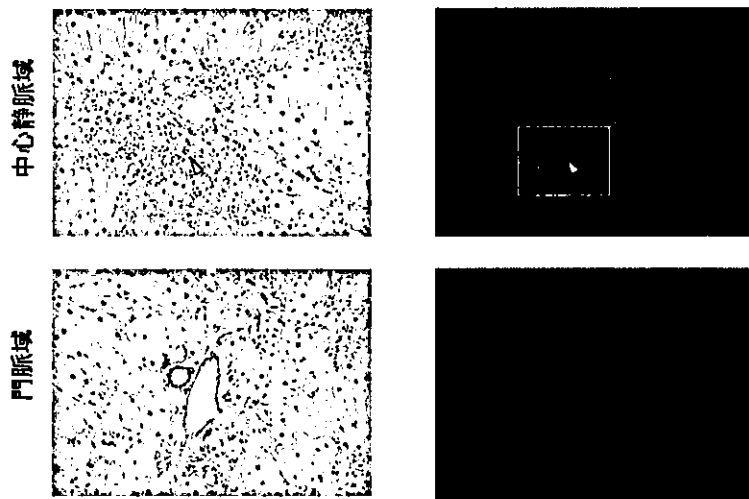


図7. 2-AAF/CCl₄投与4日目のラット肝臓におけるH&E染色と免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在
 左図:H&E染色、右図:免疫蛍光 AnxA3(緑)、アルブミン(赤) (倍率×200)

中心静脈域

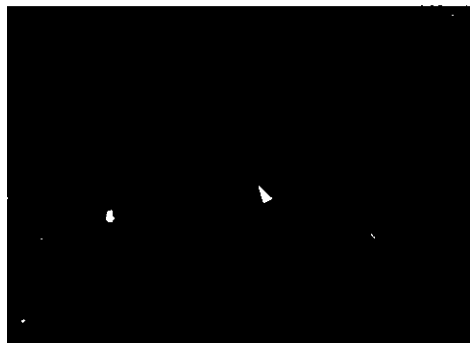


図8. 2-AAF/CCl₄投与4日目のラット肝臓における免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在
 免疫蛍光 AnxA3(緑)、アルブミン(赤) (倍率×1,000)

細胞・組織加工医療用具の品質等の確保に関する研究

分担研究者 鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部室長

研究要旨

近年、バイオテクノロジーや再生医学の進歩により、細胞や組織を治療へ応用する細胞組織利用医薬品、医療用具の開発が進んでいる。このような細胞等を利用した医薬品は様々な疾病に対して有効な治療法となることが期待されるが、その品質や安全性確保に関しては未知の要素が多く、それらを検討するための新たな技術開発が重要である。細胞培養を利用した場合には、培養による細胞の性質の変化や、クロスカルチャーコンタミネーションなどの問題があるため、培養前後での遺伝的な同一性を補償することが重要である。そこで本研究では、細胞の遺伝的な同一性を補償するために最も有効であると考えられる、マイクロサテライトマーカである STR (Short Tandem Repeat) の多型を利用した解析の応用に関して検討を行った。モデル細胞として、ヒト株化細胞である promyeroïd HL-60 とその亜株である HL-60RG、lymphoblastoid TK6 とその p53 変異株である WTK-1 および肝由来の細胞株 FL-1 を用いて検討を行った。その結果、起源が同一の HL-60 と HL-60RG および TK6 と WTK-1 の間では 16 種類のマーカーのうちほぼ全ての繰り返し数が一致したが、異なる細胞間では全く違うパターンを示した。さらに、同一細胞の場合には一部繰り返し数の異なるマーカーも存在し、形質の変化および培養により変化した物であると考えられた。この結果より、培養細胞の起源の同一性を調べる上で、STR マーカーは非常に有効であることが示されたとともに、培養中の形質の変化に伴い一部の STR マーカーの繰り返し数が変化することが明らかになり、細胞の品質管理に利用可能であることが示唆された。

一方、遺伝的に同一な細胞であっても、培養の過程でその性質が変化することは良くある現象であり、細胞組織利用医薬品として目的とする機能が維持または発揮されるかどうかは遺伝的同一性だけでは保証できず、エピジェネティックな変化である遺伝子発現や機能性タンパクの発現などの情報も重要である。そこで、遺伝子発現という観点から細胞の同一性を保証するために、GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析による細胞の遺伝子発現について解析した。クロスカルチャーコンタミネーションにより同一起源であることが示された 3 種のヒト膀胱由来細胞株、ヒト前骨髄芽球細胞 HL60 および増殖が盛んになった subline である HL60-RG 株、さらに、ヒトリン

パ種 TK6 およびその p53 変異株である WTK1 細胞を用いて解析を行った結果、同一起源の細胞では、遺伝子発現パターンは似ているものの、培養状態の変化、subline 化などにより発現パターンに差ができることがわかった。こうした遺伝子発現の情報は、細胞の品質管理に利用可能であることが示唆され、関連遺伝子の発現に注目した場合には、機能性細胞としての有効性を評価する手段となることがわかった。また、定常状態と対数増殖期の細胞の比較により、細胞状態が違って同一細胞では全体として発現は一定であることがわかった。今後、細胞機能を利用した細胞医療品を用いる場合、目的の機能が維持されているかを遺伝子発現の側からチェックすることも可能であり、細胞の同一性と共に、性質の変化および機能性の保証の意味でも、遺伝子発現の比較は有用であると考えられる。

さらに、細胞の遺伝的安定性は、癌関連遺伝子の増幅や欠失が直接細胞がん化の引き金になることもあり重要であるため、染色体レベルで遺伝的安定性を調べる目的で最新の技術であるマイクロアレイを用いた CGH (Comparative Genome Hybridization) 法を用いて既知の染色体変化を有する細胞の解析を行った。その結果、予想される領域に遺伝子の増幅および欠失が見つかり、その有効性が検証されたとともに、CGH のパターンが細胞の遺伝的同一性および安定性を評価する上で有用であることが示された。

研究協力者

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

A 研究目的

細胞組織利用医薬品等を治療に応用するに際して、その品質のチェックや機能性の保証は重要な課題であると考えられる。自己組織から培養した細胞を再び本人に戻して使用する場合など、免疫原性は問題にならないとも考えられるが、培養の途中でクロスカルチャーコンタミネーションが起こり、非自己の細胞に置き変わる危険性も考えられ、重篤な副作用を引き起こしかねない。そこで、治療に用いようとする細胞が確かに自己由来のものであることを事前に調べておくことは重要であり、その目的のためには、親子鑑定等で使われているマイクロサテライトマーカー (STR) が最も有効であると考えた。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 1)。多型性をもつ STR マーカーを複数用いることにより、かなりの高確率で自己由来の細胞であることを保証することが可能であると考えられる。また、血縁者からの細胞移植というケースにおいても、その判定に有効であると考えられる。また、細胞を培養する過程において、癌化など性質が変化した際に遺伝子上にも何らかの変化が現れることも考えられ、遺伝的な安定性や同一性を保証する上で、STR マーカーの変化というものも一つの指標となることが考えられる。そこで、これらの検証を行うために、同一細胞を起源にもつ近縁の垂株を用いて、相互の STR マーカーのパターンを比較することにした。この際、市販のキットとして、既に多型性の高いことが知られている 16 のマーカーを用いて同時に解析を行い、より信頼性の高い判定を試みるとともに、自らデザインした 17 番染色体の STR マーカーに関しても、同様にその繰り返しパターンの比較を行った。

STR は、遺伝子配列の同一性により細胞の同一性を調べるツールであるが、遺伝子配列上は全く同じ細胞であるにもかかわらず、発現する遺伝子やタンパク質が異なる場合には、異なった機能を持つことになる。実際に体の中の様々な組織においては、組織特異的な遺伝子群が発現しており、それらが、その組織としての機能を担っている。そこで、細胞の機能面での同一性の確認に

は、遺伝子発現の同等性を調べる必要がある。幸い、近年の遺伝子解析技術の進歩により、細胞のもつ膨大な数の遺伝子に対してその発現の程度を網羅的に解析可能なシステムである DNA マイクロアレイが利用可能となっていることから、この技術を細胞の機能的なキャラクタリゼーションに応用することを試みた。マイクロアレイとしては現在最も信頼性が高いとされる Affymetrix の GeneChip を用い、STR 解析に利用した細胞株をモデルに、その遺伝子発現を比較した。

一方、細胞のがん化形質の獲得は、細胞を利用した医薬品を考える場合に常に問題となる点であり、細胞培養過程における品質チェックが望まれる。軟寒天コロニー形成法やヌードマウスに対する造腫瘍性などの試験法が存在するが、適応範囲の細胞が限定される、或いは手法が煩雑であるなどの問題点が指摘されている。細胞の染色体レベルでの変化を捉える手法として CGH 法があるが、従来の手法では染色体標本上にてハイブリを行い、専用のソフトウェアで解析をしなければいけないという煩雑さがあった。この問題を克服し、かつ解像度高く解析が可能なマイクロアレイを用いた手法が最近開発され、簡便な CGH 法として応用が期待されている。本研究でも、細胞の遺伝的安定性の検証のため、このアレイ CGH 法の有用性を検討することを目的とした。実験には、すでに 17 番染色体上に欠失のあることが予想されているヒトリンパ芽球細胞の変異クローンおよび過去に CGH 解析を行ったことのある HL60 細胞株を用いて、予想される変化がアレイ CGH 法により検出可能かどうかを確かめる事を

目的とした。

B 研究方法

1. STR マーカーによる多型解析

1-1 STR マーカー

Promega 社より、4色の蛍光を用いて一度に16個の異なるSTRマーカーについて解析が可能なPowerPlex16システムがキットとして市販されており、これを用いて解析を行うことにした。PowerPlexシステムに含まれる16種のSTRマーカーに関する情報を表1に示す。これらのSTRマーカーを増幅するための適当な3色の蛍光色素によってラベルされたプライマーがデザインされ、増幅産物の長さをうまく組み合わせることにより、全STRマーカーの繰り返し数を同時に検出可能になっている。また一方で、独自のSTRマーカーとして、本研究所変異遺伝部の本間室長よりヒト17番染色体上のSTRマーカーの10種類の情報提供を受け(表2)、これらに関しても、多色蛍光ラベルプライマーを使った同時解析の検討を行った。増幅に用いたプライマーの配列を表3に示す。

1-2 細胞からのDNAの抽出

今回の検討には、以下に示すヒト培養細胞株を用いた。

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

・ FLC-4 肝臓由来細胞株

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

上記培養細胞 $5\sim 7.5 \times 10^6$ 個を遠心分離によって集め、proteinaseK溶液にて処理した後、通常のPhenol/chloroform法にてゲノムDNAの抽出を行った。得られたDNAの沈殿を70%Ethanolにて洗浄し、TE-4バッファーに溶解させた。

1-3 PCR増幅反応

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

(標準スケール)

Nuclease-Free Water	14.2 μ L
Gold Star 10 \times buffer	2.5 μ L
PowerPlexTM16	
10 \times Primer Pair mix	2.5 μ L
AmpliTag Gold	
DNA polymerase (4U)	0.8 μ L
Master mixの液量	20.0 μ L
<u>鋳型のDNA (sample)</u>	<u>5.0 μL</u>
合計反応液量	25.0 μ L

(ミニスケール)

上記反応組成の1/5量を用い、キャピラリー型PCR装置(Light Cycler)にて、液量5 μ Lにて増幅を行う。

1-4 DNAシーケンサーによる解析

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

2 GeneChip を用いた発現解析

2-1 cRNA の調製とハイブリダイゼーション

各種細胞約 10^6 個より、Quiagen 社 RNeasy Mini キットを用いて total RNA の抽出を行った。その 5 μ g を用いて、reverse transcriptase により cDNA を合成した。この際、プライマーとして、T7 プロモーターを結合させた poly dT を用いることにより、引き続き T7 RNA polymerase による転写を行い、増幅された cRNA を合成した。cRNA 合成時にピオチンラベル化 dNTP を用いて標識した。これを断片化したのち、50 度にて 16 時間 GeneChip にハイブリさせた。

2-2 チップの洗浄、ラベル化とスキャナーによるシグナルの検出

ハイブリ溶液を除いた後、Affymetrix 社の GeneChip 用フルイディックステーションにて洗浄および、ストレプトアビジン・フィコエリスリンによる蛍光ラベル化を行った後、GeneChip 専用スキャナーにてスキャンを行い、チップの蛍光イメージを取得した。

2-3 チップイメージの解析

チップイメージを GeneChip 用データ解析ソフト Microarray Suite にて解析し、数値化するとともに、パーフェクトマッチおよびミスマッチプローブ間の蛍光強度比か Presense/Marginal/Absence の判定を行った。その後、GeneSpring ソフトウェアにデータを取り込み、標準化を行った後、各細胞における遺伝子発現強度を算出するとともに、細胞間の比較を行った。

3. CGH アレイを使った染色体解析

3-1. 使用した細胞株

(TK6)

ヒトリンパ芽球細胞 TK6 細胞株に、変異原物質 KBrO_3 2.5mM で 4 時間処理し、得られた tk (チミジンキナーゼ) 変異体を trifluorothymidine で選択した。Tk 変異体は、その生成において tk 遺伝子の欠失、若しくは LOH が原因となっており、tk 遺伝子を含む 17 番染色体上の多型性マーカーを用いて検討を行った。まず、tk 遺伝子のエクソン 4 から 7 を増幅したのち、多型性マーカーを用いて、tk 遺伝子の LOH および deletion を調べ、さらに 17 番染色体上の STR マーカーを使い、multiplex PCR を行い、tk 遺伝子を含む広い範囲での LOH の状態を検索した結果、17 番染色体上の広い範囲において欠失の可能性があることが判明した S-11 および S-15 の 2 クローンを CGH 解析に使用した。

(HL60)

ヒト前骨髄球系白血病細胞株 HL60 細胞およびその亜株として増殖速度が亢進した株である HL60-RG 細胞を使用した。これらの細胞は既に染色体解析およびスタンダード CGH 法にて解析が行われ、myc 遺伝

子の増幅を含む、特定領域の増幅および欠失が起きていることが調べられている。

3-2 CGHマイクロアレイ (MAC Array™)

Macrogen 社にて開発された MAC Array™4K スライドを使用した。これは、Macrogen 社の所有する約 4000 個のヒト BAC DNA クローンをスライドガラス上に duplicate にてスポットティングしたもので、すべての染色体領域を平均 1Mb 以下の間隔でカバーする。

3-3 細胞からの DNA の抽出

上記各培養細胞を遠心分離によって集め、培地を除いた後 proteinaseK 溶液にて処理した後、通常の Phenol/chloroform 法にてゲノム DNA の抽出を行った。得られた DNA の沈殿を 70%Ethanol にて洗浄し、TE-4 バッファーに溶解させた。

3-4 プローブのラベル化

テスト DNA および対照ゲノム DNA を各 0.5 μg 使用し、BioPrime DNA Labeling Kit: (Invitrogen 社) により蛍光ラベル化を行った。この際、解析対象細胞由来 DNA を Cy3 にて、コントロール正常 DNA を Cy5 にて標識した。その後、Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen 社) にてプローブ溶液を精製し、余分な未反応色素等を除いた。最終的にエタノール沈殿にてハイブリ用標識プローブを調整した。

3-5 CGH アレイへのハイブリダイゼーション

標識化調製したテストおよびコントロー

ル DNA をハイブリ溶液に溶解し、70°C で 15 min. 加熱変性させた後、37°C で 60 min. インキュベートした。この間に 40 μl のプレハイブリダイゼーション溶液を、70°C で 10 分処理後氷冷して変性させ、アレイスライドの のスポットエリア上に 40 μl アプライし、室温の湿箱中で 30 min. インキュベートした。H₂O を満たしたコプリンジャーの中でカバーガラスを静かに外し、スライドガラスをイソプロパノールで洗った後、550 rpm で 5 min. 遠心乾燥させた。こうしてプレハイブリダイゼーションを行ったアレイスライドに、調製したプローブ溶液 44 μl をアプライし、22 X 30 mm のカバーガラスを静かに掛け、遮光した湿箱中にて 37°C, 48~72 hours 振とう (5~10 rpm) しながらインキュベートした。

3-6 アレイスライドの洗浄

ハイブリダイゼーション後コプリンジャー中にてアレイスライドからカバーガラスを静かに外し、50% formamide, 2X SSC (46°C, 15 分)、2X SSC, 0.1% SDS (46°C, 30 分)、PN buffer (室温, 15 分)、2X SSC (室温, 5 分) で順次洗浄した。各濃度のエタノール (70%, 85%, 100%) にて、室温で 1 分間順番に洗浄した後、遠心 (550 rpm, 5 min.) で乾燥させた。

3-7 スキャニングと解析

GenePix4000B マイクロアレイスキャナーにてマイクロアレイをスキャニングし、アレイイメージを取得し、Cy3, Cy5 各波長の蛍光強度を測定した。蛍光強度の補正を行った後、各スポットにおける Cy3/Cy5 の蛍光強度比を算出し、専用ソフトウェアに

よる解析を行った。

上記 1-3 以降の解析に関しては、CGH アレイの開発元である MacroGen 社にて依頼解析した。

C. 結果

1. STR マーカーによる多型解析

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 2)。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 2 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より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 5 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 μ 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クエンサーである LightCycler を用いることにより、5 μ 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. 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 3 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 6 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 A8,9 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 4 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アタープロットにて表したのが図 5 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 1 に示す。この 3 種の細胞は図 6 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 7)。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 8 に示す。両者の細胞にて判定が absence call になった遺伝子は除いてスクアタープロットしたが、同一起源の細胞であるにも関わらず、細胞間で発現強度が異なる遺伝子が多く見られた (表 7)。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 8 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 9 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、例えば遺伝的に同一起源の細胞であっても、

エピジェネティックなファクターにより特定遺伝子の発現強度は大きく変化しうることを示している。

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 10 に示す。いずれの場合にも、tk 遺伝子の正常側アレル由来のシグナルが消失していた。さらにコントロールである β グロビンの遺伝子由来のシグナルとの比較により、LOH はリコンビネーションではなく、欠失によるものであると考えられた。次に、この欠失による LOH が 17 番染色体のどれぐらいの領域に渡っているかを調べるため、17 番染色体上の 10 種の STR マーカーを使って multiplex PCR を行い、その存在状態をしらべた結果を図 11 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 12 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 13 である。HL60 および HL-60RG 株では、すでに知られている 8q23.12-13 領域に存在する myc 遺伝子の増幅が確認できる他、共通した変化として、5 番、9 番、10 番、14 番、16 番、17 番染色体の一部および Y 染色体全領域の欠失および 13 番染色体の部分増幅が認められた。一方、HL60 特異的变化として、6 番染色体の一部と 18 番染色体全域の増幅が、HL60RG 細胞特異的变化としては、13 染色体の部分増幅が見つかった。さらに染色体ごとに詳細な比較を行ない、TK6 (S15) と HL60 細胞の比較により、変化が見られた染色体を図 14 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 $2^{0.25}$ 、約 1.2 倍以内に収まっており、異なる細胞においてもほぼ同じばらつきを示したことから、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 15 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 16)。

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 17)。

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 18 に示す。CGH の結果より予想された変化はすべて今回のアレイ CGH 法で検出されており、その変化領域に関して詳細な情報が得られた (図 14)。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 14)。

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。

D. 考察

培養細胞の遺伝的同一性を基準として、細胞が同一個人から採取されたものであることを保証する上では、STR マーカーによる解析は非常に有用な手段であることがわかった。ただし、同一起源の細胞であっても、長い培養の過程で、染色体の変化や形質の変化を伴う様な場合に、STR マーカーの一部が変化する事例が認められた。このことは、STR マーカーによる解析がこうした細胞の性質の変化を検出しうることを示している。ただし、染色体の変化に関しては、以前の核型解析および m-FISH 解析により HL60-RG 細胞ではかなり大きな変化が起きていることから、欠失や増幅を伴う一部の染色体変化が検出できるにすぎない。また、細胞を用いた移植治療などの局面において、血縁者などから提供された細胞を用いるケースもでてくると考えられるが、この際に直接親子関係のある場合には、理論上全ての STR マーカーに関して少なくとも片側のアレルが一致することより、かなり高い確率にて同定が可能である。

細胞起源が同じでも、HL60-RG 細胞などのように、培養を続ける間に細胞の性質が変化する場合もあり、遺伝子配列の同一性だけでは、細胞の機能的な同一性は保証できない。また、幹細胞を分化させて機能性を持たせた細胞として治療に用いる場合などは、逆に細胞の性質が変わることが重要であり、目的にかなった機能を持った細胞であるかどうかを何らかの方法で検証する必要がある。その際に有効になると思われるのが、網羅的遺伝子発現解析法である。近年のゲノム解析技術の進歩により、一度に大量の遺伝子に関して発現比較が可能な

マイクロアレイのシステムが登場した。遺伝子発現は、細胞の機能を裏付けるものであり、より多くの遺伝子を解析することにより細胞間の性質の差をより詳細に検討できる。STR マーカーが細胞のもつ先天的な遺伝子指紋であるとすれば、遺伝子発現のパターンはダイナミックに変化する後天的な遺伝子発現指紋である。細胞機能の類推を含め、網羅的な遺伝子解析の結果を相互に比較することにより、細胞の機能的同等性を評価することができる。今回、HL60 とその増殖が亢進した亜株である HL60-RG 細胞の比較により、同一起源の細胞においても継代により性質が変化した場合に異なる遺伝子の発現パターンとして区別可能であることがわかった。また、TK6 という全く別の細胞株では、全体として非常に異なる発現パターンを示すこともわかった。

また、HL60 と HL60-RG 細胞の比較により変化のあった遺伝子の染色体上での分布を調べると、局在性をもったパターンが得られた。それぞれ核型の変化との対応を調べてみると、親株で見られた 6 番染色体のトリソミーを反映して、6 番染色体上の遺伝子はすべて RG 株にて発現量が低くなっている。また、RG 株では 11 番染色体短腕の欠失が認められるが、この部位で多くの遺伝子の発現量が減少していた。これらは、染色体の数的な変化を反映したものであるが、同様に親株で見られた 18 番染色体のトリソミーの影響は認められなかった。以上より、染色体の変化は部分的にまとまった領域での遺伝子発現変化として現れることが示されたが、当然染色体変化を伴わない発現変化も重要である。RG 株におい