

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

細胞組織利用医薬品の品質・安全性等の評価に
関する基盤技術開発研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山口 照 英

平成18(2006)年4月

目 次

I. 総括研究報告書	
細胞組織利用医薬品の品質・安全性等の評価に関する基盤技術開発研究	1
山口 照英	
II. 分担研究報告書	
1. 細胞組織利用医薬品の品質・安全性確保に関する研究	106
川西 徹	
2. 細胞組織利用医薬品のウイルス安全性に関する研究	123
内田恵理子	
3. 細胞の特性解析・特性指標解析技術の開発	135
佐藤 陽治	
4. 細胞の遺伝的同一性解析技術に関する研究	152
鈴木 孝昌	
5. 細胞由来生理活性物質のプロファイリング技術および構造解析技術の開発	169
川崎 ナナ	
6. 細胞組織利用医薬品の安全性評価技術に関する研究	187
水口 裕之	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	198
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

細胞組織利用医薬品の品質・安全性等の評価に関する基盤技術開発研究

主任研究者 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部・部長

【研究要旨】 細胞組織利用医薬品の品質・安全性等の評価に関する基盤技術開発を目的として、以下の研究を行った。1) ウイルスの高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発を目的として、ポリエチレンジアミン(PEI)を結合した磁性粒子 (PEI 磁気ビーズ) を用いたウイルス濃縮法の最適化条件の検討を行い、最も高いウイルス濃縮効率を得られる条件を明らかにした。さらに、ウイルス濃縮時に血清中の補体や IgM 抗体が同時に濃縮されること、PEI 磁気ビーズ単独で濃縮できないウイルスも IgM 抗体や補体を添加して免疫複合体を形成させることにより濃縮可能であることを明らかにした。また、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮法がヒト感染性ウイルスである HAV、HBV、HCV にも適用可能な方法であることを明らかにした。2) 細胞の遺伝的安定性評価技術開発を目的として、BAC クローンを用いたマイクロアレイ CGH(Comparative Genome Hybridization)に加え、一塩基多型を大規模に解析可能な GeneChip (SNP チップ) を用いた検討を行い、SNP チップが、LOH 解析とともに染色体コピー数の変化の検出に有効であることを明らかにした。また、遺伝子発現などのデータとの組み合わせにより、染色体異常の生成に関しより詳細な検討を加えることが可能となることを示した。3) 細胞ガン化指標の探索の一環として、細胞の不死化と密接に相関するテロメア結合タンパク質 (TRF1) について、その細胞内局在、発現制御および生理機能の解析を行い、p53 の制御を介してアポトーシスに関与する CARF が TRF1 と相互作用することにより細胞老化に関わる可能性を示した。4) ヒト臍帯血および末梢血由来 AC133 陽性細胞から出現する CD31 強陽性の血管内皮前駆細胞 (early EPC) におけるサイトカイン産生プロファイルの検討を行い、治療に用いられるようなヒト細胞の産生する生理活性物質のプロファイリングに本法が有用なことを確認した。また、本法を適用することにより early EPC は強い血管内皮細胞誘導作用を持つ IL-8 の高い産生能を有することを明らかにした。5) マウス腎臓をモデル細胞組織として用いて、液体クロマトグラフィー/多段階質量分析法 (LC/MSⁿ) を用いた糖鎖プロファイリング法が細胞組織発現糖タンパク質由来糖鎖の網羅的解析に応用可能であることを示した。また、MSⁿ によって生じた任意の糖鎖構造に特徴的なイオンを診断イオンとして利用することにより、全糖鎖の中から、その糖鎖構造を持つ糖鎖のみを特異的に検出し、詳細構造を明らかにできることを見出した。さらに、マウス ES 細胞の分化マーカーとして利用されている Lewis x (Lex)糖鎖抗原をモデル糖鎖として、Lex 診断イオンを用いて、マウス腎臓由来糖鎖の中から Lex 結合糖鎖のみを選択的に検出し、その構造を明らかにできることを示した。6) ヒト造

血系をモデル動物内に効率よく再構築することを目標に、アデノウイルスベクター (Ad) によるヒト造血幹細胞への高効率な遺伝子導入法の最適化を行い、35 型 Ad を基盤とした遺伝子導入用ベクターは、造血幹細胞を含む画分である CD34 陽性細胞に対し優れた遺伝子導入効率を示すことを明らかにした。またヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤を用いることで、さらに高効率な遺伝子発現を可能にした。7) 幹細胞や前駆細胞を素材とする細胞組織利用医薬品の製造過程における品質の評価方法に関して、ヒト臍帯血および末梢血の単核球から増殖能の高い血管内皮前駆細胞 (outgrowth EPC, OEC) の分離・培養条件の検討を行い、サイトカイン等を組み合わせることにより高い確率で OEC を誘導できることを明らかにした。8) 心筋分化能を有するマウス胚性腫瘍細胞株を用いて心筋分化能の特性指標の探索を行い、幹細胞の心筋細胞への分化において促進的な役割を持つ遺伝子を同定した。9) TRP カチオンチャネルのアゴニストには幹細胞から脂肪細胞を誘導する作用があることを明らかにし、TRP カチオンチャネルの発現を指標として脂肪細胞分化能を持つ幹細胞集団を分離することができる可能性を示した。10) 血管内皮細胞・血管内皮前駆細胞の培養時に必要とされる Fibronectin の代替品として、動物成分に由来しない組換え人工タンパク質の有用性について検討を行い、Pronectin F PLUS が、細胞の接着、増殖、機能のいずれにおいても Fibronectin と同等の性質を示すことを明らかにした。

分担研究者		研究協力者	
川西 徹	国立医薬品食品衛生研究所	中西 真人	(独) 産業技術総合研究所
内田恵理子	国立医薬品食品衛生研究所	佐藤 功栄	埼玉県赤十字血液センター
佐藤 陽治	国立医薬品食品衛生研究所	岩田 明子	埼玉県赤十字血液センター
鈴木 孝昌	国立医薬品食品衛生研究所	小木美恵子	金沢工業大学
川崎 ナナ	国立医薬品食品衛生研究所	川端 健二	(独) 医薬基盤研究所
水口 裕之	(独) 医薬基盤研究所	櫻井 文教	(独) 医薬基盤研究所
		押澤 正	国立医薬品食品衛生研究所
		石井 明子	国立医薬品食品衛生研究所
		橋井 則貴	国立医薬品食品衛生研究所
		豊田 淑江	国立医薬品食品衛生研究所
		米須 杏子	国立医薬品食品衛生研究所
		薬 洋	国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や再生医学の技術的進歩により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養および／または加工し、様々な疾患の治療に用いる細胞治療薬（細胞組織利用医薬品）の開発が急速に進んでいる。このように細胞や組織を医療に用いることができれば、がん・筋ジストロフィー・再生不良性貧血・心筋梗塞等の致死的な疾患、あるいは糖尿病・リウマチ・骨粗しょう症・重篤な幹疾患・神経疾患・熱傷・創傷等に対してきわめて有効な治療法になる可能性が高い。本邦においても様々な形での細胞組織利用医薬品等の開発が進められているところであるが、本格的な実用化に至るためには検討すべき課題は多い。その重要課題は、細胞組織利用医薬品等の品質・安全性・有効性を確保することである。特に、細胞組織利用医薬品等の特性評価技術や品質・安全性を適切に評価可能な技術の開発が望まれている。

本研究では、細胞や組織を利用した医薬品・医療機器の品質・安全性等を確保するために、1) 感染性因子の安全性評価技術開発、2) 細胞の同一性や遺伝的安定性評価手法の開発および細胞のガン化予測指標の探索に関する研究、3) 細胞由来生理活性物質のプロファイリング技術や構造解析技術の開発、4) 免疫原性の新規評価技術の開発、5) 細胞特性指標の探索、6) 細胞組織利用医薬品の製造方法や規格設定の評価方法の開発に関する研究を行う。

本年度は1) ウイルスの高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発を目的として、ポリエチエンイミン(PEI)を結合した磁性粒子(PEI 磁気ビーズ)を用いたウイルス

濃縮法の最適化の検討を行うとともに、ヒト感染性ウイルスへの適用についても検討した。2) 細胞の遺伝的な安定性を染色体レベルで調べる目的で、BAC クローンを用いたマイクロアレイ CGH(Comparative Genome Hybridization)に加え、一塩基多型 (SNP; single nucleotide polymorphysm) を大規模に解析可能な GeneChip (SNP チップ) を用いた検討を行った。また、細胞のガン化指標の探索の一環として、細胞の不死化と密接に相関するテロメア結合タンパク質 (TRF1) について、その細胞内局在、発現制御および生理機能の解析を行った。3) ヒト臍帯血および末梢血由来 AC133 陽性細胞から出現する CD31 強陽性の血管内皮前駆細胞 (early EPC) のサイトカイン産生プロファイリングへのフローサイトメトリーの適用についての検討を行うとともに、細胞表面糖鎖の構造や不均一性などの解析技術の開発を目的として液体クロマトグラフィー/多段階質量分析法 (LC/MSⁿ) を用いた細胞組織由来糖鎖の網羅的解析の確立を行った。また、本法を用いて分化・ガン化と密接な関係のある任意の糖鎖構造をもつ糖鎖の特異的検出・解析を行った。4) ヒト造血系をモデル動物内に効率よく再構築することを目標に、アデノウイルスベクターによるヒト造血幹細胞への高効率な遺伝子導入法の最適化を行った。5) 幹細胞や前駆細胞を素材とする細胞組織利用医薬品の製造過程における品質の評価方法に関して、ヒト臍帯血および末梢血の単核球から CD34 陽性・AC133 陽性・CD14 陰性画分由来の血管内皮前駆細胞 (outgrowth EPC) を分離・培養する条件の検討をおこなった。また、心筋分化能

を有するマウス胚性腫瘍細胞株を用いた心筋分化能の特性指標の探索を行った。また、細胞膜に存在するイオンチャネルの、脂肪細胞分化能を持つ幹細胞の特性指標としての有用性について評価した。6) 血管内皮細胞・血管内皮前駆細胞の培養に必要とされるファイブロネクチンの代替品として、動物成分に由来しない組換え人工タンパク質の有用性について検討を行った。

B. 研究方法

1. 感染性因子の安全性評価技術開発

1.1 ウイルス

モデルウイルスとして単純ヘルペス I 型 (HSV-1)、SV-40、アデノウイルス 5 型、ブタパルボウイルス (PPV)、ポリオウイルス sabin 1 型を用いた。また、ヒト感染性ウイルスとして、A 型肝炎ウイルス (HAV ; FRhk-4細胞を用いて *in vitro* 培養系で増幅したもの)、B 型肝炎ウイルス (HBV ; 国内標準品) 及び C 型肝炎ウイルス (HCV ; 国内標準品) を用いた。

1.2 ウイルスの PEI 磁気ビーズによる濃縮

ポリエチレンイミン (PEI) 磁気ビーズは、カルボキシル基を持つ磁気ビーズ (粒径 $0.8 \mu\text{m}$) に、平均分子量 70,000 の PEI を水溶性カルボジイミド存在下でカップリングして作製した。

ウイルスの濃縮は、通常、無血清培地 (DMEM) あるいは血清添加培地 (DMEM + 5%FCS) で希釈したウイルス液 1mL もしくは 10mL に PEI 磁気ビーズ溶液 100 μL (5mg の磁気ビーズを含む) を添加混合し、10 分間反応後、磁気ビーズを含む懸濁液を磁性スタンドにセットして 5 分間の磁気分離を行った。上清を除去した磁気ビー

ズ画分または磁気ビーズを添加する前の希釈ウイルス液 100 μL の各液にウイルスゲノム抽出液 (スマイテスト EX-R&D、(株)医学生物学研究所) を加え、添付プロトコールに従ってウイルス核酸を抽出した。なお、磁気ビーズは抽出の途中で遠心ろ過フィルター (孔径 $0.22 \mu\text{m}$) を用いて除去した。

1.3 ウイルスゲノムの定量

抽出したウイルス核酸は TE 50 μL あるいは 100 μL に溶解し、10 μL を PRISM 7000 (Applied Biosystems) を用いたリアルタイム定量 PCR あるいはリアルタイム定量 RT-PCR により定量した。各ウイルスの検出に用いたプライマー、プローブの組み合わせを表 1 に示す。

1.4 磁気ビーズに固相化する PEI の分子量の検討

3 種類の分子量の異なる PEI (分子量 70,000、10,000、1,800) を磁気ビーズに固相化して用いた。各磁気ビーズを用いて常法によりモデルウイルスを濃縮し、濃縮効率を比較した。

1.5 ウイルス濃縮時の pH の影響

無血清培地 (DMEM) あるいは血清添加培地 (DMEM + 5%FCS) に pH の異なる Good's buffer を添加し、最終濃度 20mM に調整した。作製した 5 種類の pH の異なる培地 (pH4~8) で希釈したウイルスから、常法により PEI 磁気ビーズによる濃縮を行い、濃縮効率を比較した。

1.6 PEI 磁気ビーズにウイルスとともに濃縮される血清中のタンパク質の解析

血清添加培地で希釈したウイルス液と PEI 磁気ビーズを反応後、PEI 磁気ビーズ結合画分を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で画分した。PEI

磁気ビーズにより濃縮された各バンドを切り出してトリプシンを用いて in gel 加水分解を行った後、抽出したペプチドをMS/MSにより解析、同定した。

1.7 PEI 結合カラムの作成とカラムへのタンパク質の吸着

プロムシアン活性化セファロース 6 MB に PEI を結合させて PEI-セファロース 6MB(PEI-S-6MB)カラムを作成した。IgG 抗体及び IgM 抗体を、1~1.5mg/ml の濃度の溶液に調製し、PEI-S-6MB カラムおよび対照カラムとして PEI を結合していない Glycine-6MB カラムにアプライし、各カラムより得た溶出フラクションの吸光度によりカラムへの吸着の有無を判定した。

1.8 抗マウス IgG ウサギ IgM 抗体の調製

マウス IgG 抗体をウサギに免疫後、IgM タイターが高くなった 11 日目に採血し、抗マウス IgG-ウサギ抗血清を作成した。抗マウス IgG-ウサギ抗血清はマウス IgG 抗体結合アフィニティーカラムで精製後、PEI-S-6MB カラムにアプライした。PBS(-)を用いて素通り画分を溶出後、1.4M NaCl/50mM HEPES (pH 7.6)を用いてカラム結合画分を溶出し、濃縮した。濃縮した溶液を抗マウス IgG-ウサギ IgM 抗体として用いた。

1.9 PEI 磁気ビーズと IgM 抗体、補体を用いたウイルス濃縮

ポリオウイルスのウイルス液にポリオウイルス Type I に対するマウスモノクローナル抗体 (IgG) を加え、さらに抗マウス IgG-ウサギ IgM 抗体あるいは補体第 1 成分 (C1) と補体第 4 成分 (C4) を添加後、PEI 磁気ビーズ溶液 100 μ L を加え、定法に従い濃縮操作を行った。

2. 細胞の同一性や遺伝的安定性評価手法の開発および細胞のガン化予測指標の探索

2.1 GeneChip を用いた SNP 解析

2.1.1 使用した細胞株

国立医薬品食品衛生研究所・細胞バンク (当時、現・(独) 医薬基盤研究所) より入手した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亜株である 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 CGH 法にて解析を行い、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を確認している。

また同時に、ヒトリンパ芽球細胞 TK6 細胞株の tk 遺伝子変異クローンを用いた。これは、変異原物質 KBrO₃ 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 で選択したもので、その生成において 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、CGH 解析にも使用した S-11 および S-15 の 2 クローンを SNP 解析に使用した。

2.1.2 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回収した。細胞を 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 バッファーに溶解して実験に用いた。

2.1.3 使用した SNP チップ

ヒト約 1 万 SNP サイトを網羅した HuSNP 10K 2.0 array (Affymetrix) を用いた。アレイには、420,000 以上のプローブセルが含まれ、各プローブセルは、フォトリソグラフィ製造法により同時合成され

た、配列の明らかな 25 bp オリゴヌクレオチドプローブ、1 種類あたり 100 万コピー以上から構成される。各 SNP には、1 組が 4 つのプローブからなる 5 組のプローブが対応し、各組は、4 対のパーフェクトマッチプローブとミスマッチプローブから成り、位置をずらして SNP1 個あたりの 25 bp オリゴヌクレオチド合計 40 種類により判定を行った。

2.1.4 ゲノム DNA の制限酵素による消化とラベル化

細胞より抽出したゲノム DNA 250ng を制限酵素 XbaI で消化し、XbaI シークエンスと続く PCR 増幅用のプライマー配列を持つアダプターをライゲーションした。その後、アダプター配列を認識する一種類のプライマーを用いて、アダプターを付加した DNA フラグメントを増幅した。この際、250~1,000 bp のサイズのフラグメントを優先的に増幅するよう PCR 条件を最適化した。次に、増幅した DNA を断片化し、ビオチン標識した後、GeneChip Mapping 10K 2.0 Array にハイブリダイズさせた。

2.1.5 チップへのハイブリダイゼーション、染色、洗浄及びシグナル検出

チップへのハイブリダイゼーションは、55°C にて一晩行い、反応溶液を除いた後、発現解析用チップと同様に 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。その後、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。

2.1.6 SNP の判定と LOH 解析

SNP の判定には、各 40 プローブずつのシグナル強度データを、専用の解析ソフトウェアである GeneChip DNA Analysis Software (GDAS) ソフトウェアで解析した。SNP 判定を元に、GDAS により LOH 領域を判定した。

2.1.7 ゲノムコピー数の解析

ゲノムコピー数の解析のため、Affymetrix 社より提供された、Copy Number Analysis Tool (CNAG) を当初用いた。しかし、精度等に関して満足な結果が得られなかったため、フリーウェアとして利用可能であった、dCHIP (Lin et al., 2004) ソフトウェアを使用した。

2.2 GeneChip を使った遺伝子発現解析

2.2.1 cRNA の調製とハイブリダイゼーション

各細胞約 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 合成時にビオチンラベル化 dNTP を用いて標識した。これを断片化したのち、50 度にて 16 時間 GeneChip と反応させた。

2.2.2 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

反応溶液を除いた後、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。

2.2.3 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 ソフトウェアを用いて標準化を行った後、各細胞における遺伝子発現強度を算出するとともに、細胞間の比較を行った。

2.2.4 プローブの標識

テスト DNA および対照ゲノム DNA を各 0.5 μ g 使用し、BioPrime DNA Labeling Kit: (Invitrogen 社) により蛍光ラベル化を行った。この際、解析対象細胞由来 DNA を Cy3 にて、コントロール正常 DNA を Cy5 にて標識した。その後、Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen 社) にてプローブ溶液を精製し、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ダイゼーション用標識プローブを調整した。

2.2.5 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 を反応溶液に溶解し、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 μ l のプレハイブリダイゼーション溶液を 70°C で 10 分処理後、氷冷して変性させ、アレイスライドのスポットエリア上に 40 μ l 添加し、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、スライドグラ

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、別に調製したプローブ溶液 44 μ l を添加し、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。

2.2.6 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。

2.2.7 スキャンニングと解析

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ンニングし、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 2.2.7 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。

2.3 TRF1 の機能解析

2.3.1 TRF1 の核マトリックス結合ドメインの探索

培養細胞を低張条件で処理し核を単離した。単離した核を、0.5% NP40 と種々の濃度の NaCl (10 mM ~ 200 mM) 存在下で抽出し、15,000 rpm, 5 min の遠心分離で上

清と沈殿とに分けてウェスタンブロッティングにより TRF1 を検出した。

2.3.2 TRF1 プロモーター領域の転写活性の解析

TRF1 のプロモーター領域のうち転写開始点の上流 2200 番目から下流 13 番目 (TRF1 promoter (-2200 ~ +13bp)) もしくはテロメラーゼ逆転写酵素(TERT)のプロモーター領域のうち上流 1375 番目から下流 78 番目 (TERT promoter (-1375 ~ +78bp)) より成る配列を pGL4.12 (Promega)ベクターにクローニングした。これらのコンストラクトを細胞に transfection し、24 時間後における luciferase 活性を測定することにより、各遺伝子プロモーターの活性を評価した。用いたガン細胞は HeLa 細胞を、また正常細胞として初代培養繊維芽細胞を用いた。

2.3.3 CARF と TRF1 の結合の検討

CARF (Collaborator of ARF)は p19ARF (p14ARF) 結合タンパク質として、two-hybrid system で単離されたタンパク質である (Hasan, et al. JBC, 277, 37765-37770, 2002)。しかし CARF は ARF だけでなく、p53 や MDM2 とも結合すること、および ARF と協調して p53 を活性化することが明らかとなっている。p53 が過剰に存在する場合、HDM2 (マウスでは MDM2) が誘導されるが、HDM2 はユビキチンリガーゼ(E3)活性を持ち、細胞内の p53 および CARF の活性を抑制する。すなわち、p53 および CARF と HDM2 との間ではネガティブフィードバック調節系が存在し、細胞のアポトーシス制御の一機構を構成している。一方、CARF は初代培養繊維芽細胞が細胞老化を起こす際に誘導され、

また逆に初代培養繊維芽細胞において CARF を過剰発現すると細胞老化が誘導されることも明らかとなっている。そこで、CARF がテロメア中の TRF1 とも相互作用する可能性を検証する目的で、V5 エピトープタグを付加した CARF を過剰発現した細胞の溶解液に対して抗 TRF1 抗体によるブルダウンを行った後、抗 V5 抗体によるウェスタンブロッティングを行った。また CARF と TRF1 の細胞内における局在を免疫組織学的に検討した。

3. 細胞由来生理活性物質のプロファイリング技術や構造解析技術の開発

3.1 Early EPC のサイトカイン産生プロファイル解析

3.1.1 臍帯血と末梢血の CD31 強陽性細胞の分画

1.2L の血液より分離した約 40ml のバッフィーコートあるいは臍帯血を 2 mM EDTA を含む PBS(-)で 2 倍希釈し、リンフオプレップチューブを用いて、2200 回転、18°C、20 分で遠心後、単核球分画を単離した。得られた細胞を 0.5% BSA、2mM EDTA を含む PBS(-)(分離バッファー)に浮遊させた。

単核球を分離バッファーで洗い、再び 200 μ l の分離バッファーに再浮遊させた。AC133 陽性細胞を分離するため、AC133 マイクロビーズ分離キット (Milteny Biotec)を用い抗 AC133 抗体-マイクロビーズと 4°C、30 min で抗原抗体反応させた。陽性細胞の分離は、Auto MACS (Milteny Biotec)を用いて行った。臍帯血と末梢血 AC133 陽性細胞は 20%牛胎児血清(FBS)、50 ng/ml VEGF、50 ng/ml TPO、50 ng/ml

SCF を含む EBM-2 培地に浮遊させ、タイプIVコラーゲンをコートした 24 穴プレートに分注し、1 週間培養した。細胞を回収し、洗浄後、抗 CD31 抗体-FITC (BD Pharmingen 社)と 4°C、30 分、反応させた。セルソーター (FACSAria) を用いて、CD31 強陽性および CD31 陽性分画をソーティングした。

3.1.2 臍帯血と末梢血の CD31 強陽性・陽性細胞における各種サイトカインの産生

セルソーターにより分画した CD31 強陽性・陽性細胞を 20% FBS-EBM2 培地に浮遊し、96 穴プレートを用いて培養した。培養 4 日後に培養上清を集め、サイトカインの測定を Bio-Plex サイトカインアッセイ法のプロトコールに従って行った。

3.2 細胞表面糖鎖の構造・不均一性の解析技術の開発

3.2.1 試薬

Le^x 及び ルイス a (Le^a) 結合ピリジリアミノ化(PA)糖鎖, 及び Le^x 結合複合型 3 本鎖 PA 糖鎖はタカラより購入した。

3.2.2 マウス腎臓糖鎖の調製

マウス (MRL/MpJ-+/+) 腎臓は日本エスエルシー株式会社より購入した。腎臓から難溶性結合組織を Cell strainer (70mm, BD Biosciences) を用いて除去した後、組織細胞中に混在する赤血球を NH₄Cl-Tris 溶液処理により除去した。細胞を 7 M ウレア, 2 M チオウレア, 2% CHAPS, 30 mM Tris-HCl を含む緩衝液に溶解させてタンパク質を可溶化した後、7 倍量の冷アセトンを加えてタンパク質を沈殿させた。還元カルボキシメチル化したタンパク質 (200 μg) を 200 mM リン酸緩衝液 (500 μl, pH 7.2) に溶解し、PNGase F 処理 (10 unit, 37 °C, 48 時

間) により N 結合型糖鎖を切り出した。反応液に冷エタノール (1.2 ml, 終末 70%) を加えてタンパク質を沈殿除去した後、得られた上清を濃縮, 凍結乾燥により糖鎖を回収した。

3.2.3 糖鎖の PA 化

10 μl のカップリング試薬 (12.8 M 2-アミノピリジン-酢酸溶液) を糖鎖に加えて 90°C で 60 分間反応させた。反応液に 10 μl の還元試薬 (3.3 M ボランジメチルアミン複合体-酢酸溶液) を加えて 80°C で 60 分加熱して還元した。反応液にトリエチルアミン-メタノール (20 μl) 及びトルエン (40 μl) を加えた後、窒素気流下減圧乾固した (60°C, 10 分間, 1 回)。過剰の未反応試薬は残渣にメタノール (20 μl) 及びトルエン (40 μl) を加えた後、窒素気流下減圧除去し (60°C, 10 分間, 2 回), さらに 50 μl のトルエンを残渣に加えた後、窒素気流下減圧乾固した (50°C, 10 分間, 1 回)。得られた PA 糖鎖は Envi-Carb C カートリッジ (Supelco) を用いて脱塩した後、凍結乾燥させた。

3.2.4 Le^a 及び Le^x 結合 PA 糖鎖の MSⁿ

PA 糖鎖を 1 pmol/μl になるように 10 μM NaCl を含む 50% アセトニトリル/5 mM 酢酸アンモニウム溶液 (pH 9.6) に溶解し、LC/MS に注入した。

MSⁿ :

装置 : LTQ linear ion trap / Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (Finnigan LTQ-FT, Thermo Electron)

イオン源 : nanoESI (AMR)

スプレー電圧 : 2.0 kV

イオンモード:ポジティブ
キャピラリー温度: 200°C
MSⁿの衝突エネルギー: 20-30%
流速: 2.0 µl/min

ion mode)

③ MS^{3,4}: Target ion scan (positive ion mode)

MS³: *m/z* 534

MS⁴: *m/z* 388

3.2.5 マウス腎臓由来糖鎖の LC/MSⁿ

以下の条件で糖鎖の LC/MSⁿを行った。

HPLC:

装置: Magic 2002 system (Michrom BioResource)

カラム: Hypercarb (Thermo electron, 0.2x150 mm, 5 µ)

溶離液 A: 2% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)

溶離液 B: 80% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)

グラジエントプログラム:

B液: 10-70% (0-60分)

流速: 2 µl/min

ポストカラム: 10 µM NaCl 溶液、流速 2 µl/min

MSⁿ:

装置: LTQ-FT

イオン源: nanoESI

キャピラリー温度: 200°C

キャピラリー電圧: 2.0 kV

スキャン範囲 (*m/z*): 750-2,000

衝突エネルギー: 25%

測定方法:

① MS¹: Full scan (positive ion mode)

② MS²: Data-dependent scan (positive

4. 免疫原性の新規評価技術の開発

4.1 アデノウイルスベクターによるヒト造血幹細胞への高効率な遺伝子導入法

4.1.1 アデノウイルスベクターの作製

5型ならびに35型 Ad ベクターの作製は improved in vitro ligation 法により行った。シャトルプラスミド pHMCMV5 のマルチクローニングサイトに Enhanced Green Fluorescence Protein (GFP) 遺伝子を挿入した pHMCMV-GFP を I-CeuI, PI-SceI で消化し、同酵素で消化した 5型ならびに 35型 Ad ベクタープラスミド pAdHM4 および pAdMS4 と Ligation することにより、GFP 発現ベクタープラスミド pAdHM4-CMVGFP および pAdMS4-CMVGFP を得た。作製したプラスミドを PacI もしくは SbfI で消化し、Superfect (キアゲン社) を用いて 293 細胞もしくは 35型 E1B 発現 293 細胞にトランスフェクションすることで GFP 発現 5型ベクター Ad5GFP ならびに 35型 Ad ベクター Ad35GFP を得た。Ad ベクターの増幅ならびに精製は定法に従い行った。精製した Ad ベクターの物理化学的力価ならびに生物学的力価は Maizel らの方法、および鐘ヶ江らの方法に従い測定した。また、各種プロモーターの比較検討においては、pHMCMV5 のかわりに各種プロモーターを搭載したシャトルプラスミドを用いた。

4.1.2 35 型 E1B 発現 293 細胞の作製

35 型 Ad の E1B-55K 遺伝子を含む 1911-3413 塩基からなるフラグメントは、35 型 Ad ゲノムの 1-7930 塩基からなるフラグメントを有するプラスミド pFS2-Ad35-1 を鋳型としてプライマー 1 (5' -GAT AAA TGG ATC CCG CAG AC-3') とプライマー 2 (5' -CCC AAT ACT CAC CTT AGT CAG-3') を用いて PCR を行い作製した。このフラグメントを pEF/myc/nuc (Invitrogen 社) のマルチクローニングサイトに挿入することで、pEF-Ad35E1B を作製した。このプラスミドを 293 細胞に Superfect を用いてトランスフェクションし、G418 (500 μ g/ml, Invitrogen 社) 存在下で培養することにより、35 型 Ad の E1B-55K タンパク安定発現 293 細胞を得た。

4.1.3 CD34 陽性細胞における Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) ならびに CD46 の発現解析

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞 (Cambrex 社) を抗ヒト CAR 抗体 (RmcB、Upstate Biotechnology 社) を含む staining buffer (1% BSA 含有 PBS) に懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄後、phycoerythrin (PE) 標識された抗マウス IgG 抗体 (Pharmingen 社) を含む staining buffer に懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄後、フローサイトメーター (FACScalibur flow cytometer; Beckton Dickinson) を用いて解析した。CD46 発現解析においては、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識された抗 CD46 抗体 (E4.3、Pharmingen 社) を用いて同様に解析した。

4.1.4 アデノウイルスベクターによる CD34 陽性細胞への遺伝子導入実験

CD34 陽性細胞は、解凍後サイトカイン入り培地 (human Flt-3 ligand: 100 ng/ml, human stem cell factor; 100 ng/ml, human interleukin (IL)-3; 20 ng/ml, human IL-6; 20 ng/ml, Stem Cell 社) に懸濁し、16-18 時間培養した後、 1×10^4 cells/well となるよう 96 穴プレートに播種した。その後、同じくサイトカイン入り培地で調製した GFP 発現 5 型ならびに 35 型 Ad ベクターを作用させた。合計 48 時間培養後、GFP の発現をフローサイトメーターにて解析した。

4.1.5 ヒストン脱アセチル化阻害剤による遺伝子発現効率の上昇

4.1.4 項と同様に CD34 陽性細胞を調製、播種した。その後、同じくサイトカイン入り培地で調製した CA プロモーターを搭載した GFP 発現 35 型 Ad ベクターを 6000VP/cell で 6 時間作用させた。同時にヒストン脱アセチル化阻害剤 (HDAC 阻害剤) として FR901228 (アステラス製薬より供与)、および CAY10398 (Cayman 社) を各濃度で 6 時間作用させた。その後、細胞を回収・遠心して 35 型 Ad ベクターおよび HDAC 阻害剤を取り除いた後、再び細胞を培地に懸濁し培養した。合計 48 時間培養後、GFP の発現をフローサイトメーターにて解析した。

5. 細胞特性指標の探索

5.1 臍帯血及び末梢血からの OEC の分離

5.1.1 OEC の培養

ヒト末梢血・臍帯血の単核球を分離後、2% FBS-EGM2 培地 (三光純薬) に浮遊させ、ファイブロネクチン (FN) コートした 6 穴プレートに播種した。一週間、毎日培地交換

し、その後週 2 回培地交換を行った。OEC のコロニーを形成後、顕微鏡画像を撮影した。

5.1.2 浮遊細胞の種々の表面マーカー発現の免疫染色

OEC の同定を行うため、トリプシン・EDTA を用いてコロニーから細胞を回収し、FN コートの 48 穴プレートに播種した。2 日後、細胞層を洗い、1% パラホルムアルデヒドで固定した。細胞の固定・透過性のため -20°C のエタノールを加えた。1% BSA-PBS(-) でブロッキング後、それぞれの抗体を含む 1% BSA-PBS(-) を添加し、4°C で抗原抗体反応させた。抗体は抗 lectin-like oxidized-LDL receptor (Lox-1) 抗体、抗 endothelial NO 合成酵素(eNOS, Cayman Chemical)、抗 kinase insert domain protein receptor(KDR) 抗体 (Santa Cruz 社)、抗 CD11b 抗体 (BD PharMingen)、抗 CD14 抗体 (BD PharMingen)、V E-cadherin 抗体 (BD PharMingen) を用いた。接着した細胞を PBS(-) で洗浄し、抗 IgG 抗体-FITC あるいは抗 IgG 抗体-ローダミンを 4°C、1 時間反応させた。細胞は共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

5.1.3 OEC の管腔形成

マトリゲル (BD Biosciences) を無血清 EBM2 培地 (1:1, vol:vol) と水中で混合し、24 穴のマルチウェルに 0.4 ml/well 分注し、37°C でゲル化した。2% FBS EBM2 培地に浮遊した OEC をゲル上に播種し、24 時間培養後、顕微鏡画像を撮影した。

5.2 未分化状態における CMP 遺伝子の発現と心筋細胞分化における役割の検討

5.2.1 P19 細胞由来細胞株の培養

マウス由来の胎児性癌細胞 P19 細胞は

American Type Culture Collection (ATCC) より、CL6 細胞は理化学研究所バイオリソースセンターより入手した。CL6 細胞のサブラインはマウス心筋 α ミオシン重鎖の遺伝子プロモーターにより発現制御される GFP 遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子を同時にトランスフェクションし、G418 による選択によってクローニングした (平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金「細胞組織利用医薬品・医療用具の品質安全性等の確保に関する基盤技術開発研究」報告書参照)。

未分化な細胞の増殖には、増殖培地 (基本培地として非働化 (56°C、30 分熱処理することで補体成分を不活化) したウシ胎児血清 [FCS, fetal calf serum] 10% と 2mM L-Glutamine [SIGMA] と ペニシリン G [100unit/ml] および硫酸ストレプトマイシン [100unit/ml] を含有した α Minimum Essential Medium [α MEM, SIGMA]) を用い、直径 100mm の細胞培養ディッシュ (Falcon) 上で、5% CO 存在下 37°C、サブコンフルエントの状態 で細胞を培養した。

5.2.2 P19 細胞由来細胞株に対する RNAi

RNA 干渉 (RNAi) の実験には P19 細胞由来細胞株の中でも最も心筋分化しやすい細胞株、CL6G52 細胞を用いた。100mm ディッシュ上にサブコンフルエントに培養した CL6G52 細胞を滅菌したリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS, SIGMA) 5ml で 2 回洗浄し、トリプシン・EDTA (Gibco) 1.5ml で細胞全体を軽くぬらした後、直ちにトリプシン・EDTA を吸引し 5% CO 存在下 37°C で 3 分間、さらに室温で 5 分弱インキュベートし、反応停止のため増殖培地に懸濁した。分散した CL6G52 細胞を 24 穴細胞培養プレートに 10,000 個

0.5mL/well の濃度で細胞を播種し、5%CO 存在下 37°Cで培養した。16 時間後、抗生物質不含の増殖培地で 2 度洗浄し、同培地をウェルあたり 400ul 加えた。OptiMEM(Invitrogen)に溶解した Stealth RNAi (Invitrogen)を Lipofectamine 2000 (Invitrogen)と混合してウェルあたり 100μL 添加することによりトランスフェクションした。対照群としては Stealth RNAi Negative Control Medium GC (Invitrogen) を用いた。トランスフェクションした細胞は、5%CO 存在下 37°Cで 48 時間培養した。トランスフェクションの 48 時間後における標的遺伝子の発現量は定量的 RT-PCR により測定した。定量的 RT-PCR に用いる total RNA の抽出は RLT バッファー(QIAGEN)に細胞を溶解したのち MagAttract RNA Cell Mini M48 Kit (QIAGEN)および BioRobot M48 Workstation (QIAGEN) を用いて行った。定量的 RT-PCR は、TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagent (Applied Biosystems) と標的遺伝子特異的な TaqMan プローブ・プライマーセットおよび ABI Prism 7000 Sequence Detection System を使用して行った。mRNA 量はサンプル中の 18S rRNA 量でノーマライズした。

5.2.3 P19 細胞由来細胞株の心筋細胞分化誘導

Stealth RNAi のトランスフェクションの 48 時間後に CL6G52 細胞を培養した容器より基本培地を除去し、滅菌した PBS 5ml で 2 回洗浄、トリプシン-EDTA 1ml で細胞全体を軽くぬらした後、直ちにトリプシン-EDTA を吸引し 5%CO 存在下 37°Cで

3 分間、さらに室温で 5 分弱インキュベートし、消化反応停止および分化誘導開始のために分化培地(1% DMSO を含む増殖培地)10ml に懸濁した。細胞懸濁液を細胞培養容器に分注・培養し、心筋細胞への分化を評価した。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。心筋細胞への分化は単位面積あたりの拍動するジュール数によって判定した。

5.3 幹細胞からの脂肪細胞分化を誘導するイオンチャネルの同定

5.3.1 C3H10T1/2 幹細胞の脂肪細胞分化誘導

C3H10T1/2 幹細胞は理化学研究所バイオリソースセンターから供与を受けた。C3H10T1/2 幹細胞をゼラチンコート済みの 24 穴細胞培養プレートに 1.5 × 10⁴cells/0.5ml/well の密度で撒き、10% ウシ胎児血清を含む BME (SIGMA) 培地中で細胞がコンフルエントになるまで、37°C、5% 炭酸ガス存在下で培養した。細胞がコンフルエントな状態になった後、さらに 3 日間培養し、TRP カチオンチャネル制御剤を添加してさらに 6 日間培養した。培地交換は毎日行った。

5.3.2 C3H10T1/2 からの脂肪細胞分化の定量

TRP カチオンチャネル制御剤を添加して 6 日間培養した細胞を 10% ホルマリンによって固定し、Oil Red O (SIGMA 社製) で染色した。染色後、細胞中の Oil Red O を 100% イソプロパノールにより抽出し、波長 550nm で吸光度を測定して細胞に取り込まれた Oil Red O を定量した。また、

Oil Red O を抽出した後の細胞を、0.3N 水酸化ナトリウム及び 0.1% ラウリル硫酸ナトリウムを含む溶液で可溶化し、細胞に含まれるタンパク質量を、ウシ血清アルブミンを標準として BioRad Protein Assay により測定した。その後、細胞に取り込まれた Oil Red O の量を細胞に含まれるタンパク質量でノーマライズした値を算出し、これを幹細胞から脂肪細胞への分化誘導能の指標とした。また、TRP カチオンチャネル制御剤を添加して 6 日間培養した細胞を RLT バッファー (QIAGEN) によって溶解し、MagAttract RNA Cell Mini M48 Kit (QIAGEN) および BioRobot M48 Workstation (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し、定量的 RT-PCR により脂肪細胞マーカー遺伝子である Fatty acid-binding protein-4 (Fabp4, aP2) およびアディポネクチンの発現を測定した。定量的 RT-PCR は、TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagent (Applied Biosystems) と標的遺伝子特異的な TaqMan プロブ・プライマーセットおよび ABI Prism 7000 Sequence Detection System を使用して行った。mRNA 量はサンプル中の 18S rRNA の量でノーマライズした。

6. 細胞組織利用医薬品の製造方法や規格設定の評価方法の開発に関する研究

6.1 組換え人工細胞外マトリクスを用いたヒト血管内皮細胞培養法の開発

6.1.1 細胞および試薬

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell; HUVEC) は三光純薬より購入した。細胞

の継代は、EGM-2 培地 (三光純薬) を用いてコラーゲンコートディッシュ (岩城硝子) 上で行い、継代数 3 から 5 までの細胞を実験に用いた。

無血清培地は、Human Endothelial SFM (Invitrogen) を基本として、細胞接着タンパク質として Fibronectin あるいは組換え細胞接着タンパク質、増殖因子として 10ng/ml の上皮細胞増殖因子 (Epidermal Growth Factor; EGF、Invitrogen)、20ng/ml の線維芽細胞増殖因子 (basic Fibroblast Growth Factor; bFGF、Invitrogen) を添加して用いた。

細胞接着活性を持つ組換え人工タンパク質として、Pronectin F、Pronectin F PLUS、Pronectin L (いずれも三洋化成工業)、Retronectin (TAKARA)、Attachin (Bio999) を用いた。

6.1.2 ディッシュのコートティング

ポリスチレン製ノントリートメントディッシュ (日本ベクトン・ディッキンソン) にリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline; PBS(-)) で希釈した組換え細胞接着タンパク質を添加し、室温で 2 時間静置した後、希釈液を除去し、PBS(-) でディッシュを洗浄した。組換え細胞接着タンパク質の濃度は、特に記載のない場合は 10 μ g/ml (2 μ g/cm²) とした。

6.1.3 細胞接着能の測定

トリプシン処理により回収、PBS(-) で 2 回洗浄した細胞を無血清培地に懸濁し、あらかじめ組換え細胞接着タンパク質をコートティングした 96 穴プレートに 1 ウェルあたり 1x10⁴ 個播種した。5%CO₂ 存在下、37°C で 60 分間インキュベーションした後、上清を除去、PBS(-) で洗浄後、固定液 (4%パラ

ホルムアルデヒドリン酸緩衝液) を添加して室温で 10 分静置した。固定液を捨て、蒸留水で洗浄した後、0.5% (w/v) のクリスタルバイオレットを添加し、室温で 20 分静置した。蒸留水で 5 回洗浄後、0.5% SDS で色素を抽出し、595nm の吸光度を測定した。

6.4 細胞増殖の測定

組換え細胞接着タンパク質をコーティングした 96 穴プレートに、無血清培地に懸濁した細胞を播種し、VEGF (R&D systems) あるいは bFGF (Invitrogen) を 1~100ng/ml の濃度で添加した。37°C で 2 日間培養後、Cell counting kit-8 (同仁化学) を用いて各 well の細胞数を比較した。

6.5 FAK リン酸化の測定

トリプシン処理により回収した細胞を PBS(-) で洗浄後、培地に懸濁し、37°C で 2 時間、浮遊状態でインキュベーションした。その後、組換え細胞接着タンパク質をコーティングした 24 穴プレートに播種して、5%CO₂ 存在下、37°C で 2 時間インキュベーションした。RIPA buffer (50mM Tris-HCl (pH7.6), 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate) を用いて cell lysate を調製し、1 レーンあたり 4μg のタンパク質を用いて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、PVDF メンブレンにブロッキングした。Focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化は、FAK の 397 番目のチロシン残基のリン酸化ペプチドに対する抗体 (Upstate 社) を用いてウエスタンブロットリングにより検出した。各レーンにトランスファーされた FAK タンパク量のばらつきを補正するため、リン酸化 FAK を検出した後、Re-Blot Plus Western Blot

Recycling Kit (CHEMICON) を用いてプローブを除去し、抗 FAK 抗体 (Upstate 社) を用いて FAK を検出した。化学発光の検出にはルミノイメーリアナライザー LAS3000 (富士フィルム) を用い、検出されたバンドの定量は MultiGauge ソフトウェアを用いて行った。

6.6 Prostaglandin I₂ (PGI₂) 産生の測定

組換え細胞接着タンパク質をコーティングした 24 穴プレートに、無血清培地に懸濁した細胞を 7x10⁴ / well の密度で播種した。1 日間培養した後、1U/ml のトロンピンあるいは 30ng/ml の VEGF で刺激して、5% CO₂ 存在下、37°C で 60 分間インキュベーションし、上清を回収した。上清に含まれる PGI₂ の代謝物である 6-keto Prostaglandin F₁ α の濃度を、6-keto Prostaglandin F₁ α EIA Kit (Cayman 社) を用いて定量した。

6.7 tissue-Plasminogen Activator (t-PA) 産生の測定

組換え細胞接着タンパク質をコーティングした 24 穴プレートに、無血清培地に懸濁した細胞を 7x10⁴ / well の密度で播種した。1 日間培養した後、0.01~1U/ml のトロンピンを添加してさらに 24 時間培養し、上清を回収した。上清に存在する t-PA 量を、AssayMax Human Tissue-Type Plasminogen Activator ELISA Kit (Assay Pro 社) を用いて定量した。上清をサンプリングする直前に、位相差顕微鏡像を撮影した。

8. 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。動物実験を行う際は国立医薬品食品衛生研究所の動物実験指針を遵守した。

C. 結果

1. 感染性因子の安全性評価技術開発

細胞組織利用医薬品のウイルス安全性確保には、ウイルス等の感染性因子の高感度検出技術の開発が非常に重要である。我々は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、ウイルスゲノムの高感度検出が可能であることを明らかにしてきた。しかし、PEI磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法は一部の非エンベロープウイルスには有効でないこと、また濃縮効率が低いウイルスも見られることから、PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮法の最適化による濃縮効率の向上と全てのウイルスを濃縮できる方法の開発について検討した。さらにヒト感染性ウイルスへの適用についても検討を行った。

1.1 PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮の最適化

最初に、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

に高い濃縮効率が得られるが、分子量1,800、10,000のPEI磁気ビーズでは濃縮がほとんど見られないことが明らかとなった(図1)。データは示さないが、他のモデルウイルスでも同じ結果が得られた。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、どのモデルウイルスの場合でも、pH6付近において最も高い濃縮効率が得られることが明らかとなった(図2; 図はSV40のみ示した)。

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磁気ビーズ結合画分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が見いだされた。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成分や補体第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3)。この結果より、PEI磁気ビーズによるウイルスの濃縮時に免疫複合体を形成させることにより、濃縮できないウイルスを濃縮できる可能性や濃縮効率を向上させられる可能性が示された。

そこでPEI磁気ビーズ単独では濃縮できないポリオウイルスについて、補体やIgM抗体と免疫複合体を形成させることにより濃縮できるかどうか検討した。この際、ポリオウイルスに対するIgM抗体は入手が困

難であるため、抗ポリオウイルスマウスモノクローナル抗体 (IgG) と抗マウス IgG-ウサギ IgM 抗体を利用することにした。そこで、マウス IgG 抗体をウサギに免疫して抗血清を作成し、マウス IgG 抗体結合アフィニティーカラムと PEI-セファロース 6MB (PEI-S-6MB) カラムを用いて 2 段階精製を行った。IgM 抗体は PEI-S-6MB カラムに吸着するが、IgG 抗体は吸着がみられないことを確認している (図 4)。マウス IgG 抗体結合アフィニティーカラム結合画分を PEI-S-6MB カラムにアプライし、結合画分を回収して抗マウス IgG-ウサギ IgM 抗体として使用した (図 5)。この抗マウス IgG-ウサギ IgM 抗体と抗ポリオウイルスモノクローナル抗体 (IgG) をウイルス液に添加した後、PEI 磁気ビーズによるポリオウイルスの濃縮を行った。その結果、抗ポリオウイルスモノクローナル抗体単独の添加でもウイルスの濃縮が認められたが、抗マウス IgG-ウサギ IgM 抗体を添加することにより、濃縮効率がさらに向上した (図 6)。また、抗ポリオウイルスモノクローナル抗体と補体第 1 成分 (C1) 及び補体第 4 成分 (C4) をウイルス液に添加し、室温あるいは 37°C でインキュベート後に PEI 磁気ビーズによりポリオウイルスの濃縮を行った結果、室温の反応ではポリオウイルスの濃縮効率は抗ポリオウイルスモノクローナル抗体単独とほとんど変わらなかったが、補体系が働く 37°C で反応した場合にはウイルス濃縮効率の向上が認められた (図 6)。

1.2 PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮のヒト感染性ウイルスへの適用

PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮の最適化条件のヒト感染性ウイルスへの適用に

ついて検討した。まず、A 型肝炎ウイルス (HAV) について、*in vitro* 培養系で増幅した HAV を用いて検討した結果、PEI 磁気ビーズを用いてほぼ完全に濃縮することが可能であった (図 7)。血清の有無は HAV の濃縮効率には影響が認められなかった。また pH の影響も特に認められず、いずれの pH でも高い濃縮率が得られた。

B 型肝炎ウイルス (HBV) については、国内標準品 (ウインドウ期の血漿より調製したもの) を用いて検討した (図 8)。その結果、無血清条件では濃縮率は 5 倍以上であったが、血清含有条件では濃縮率が最大で 3 倍程度と低いものであった。HBV ではウイルス濃縮時の pH の影響が大きく、pH5 前後の弱酸性条件において濃縮率が 6 倍程度と最も効率のよい濃縮が得られた。また、PEI 磁気ビーズによる HBV の濃縮時に抗 HBV 抗体 (抗血清) を添加したところ、濃縮効率の向上が認められた (図 9)。

C 型肝炎ウイルス (HCV) についても国内標準品を用いて検討した。その結果、PEI 磁気ビーズにより HCV は効率よく濃縮可能であることが明らかになった (図 10)。HCV の場合、*in vitro* で HCV と反応することが明らかな抗体はこれまで見出されておらず、抗 HCV 抗体添加によりさらに濃縮効率を高めることが可能かどうかの検討は行えなかった。

これまでの検討により PEI 磁気ビーズで濃縮可能なウイルスを表 2 にまとめた。最適化条件を利用することにより、PEI 磁気ビーズで小型の非エンベロープウイルスやヒト感染性ウイルスを含めて、極めて広範なウイルスを効率よく濃縮可能であることが明らかとなった。

2. 細胞の同一性や遺伝的安定性評価手法の開発および細胞のガン化予測指標の探索

2.1 GeneChip を用いた SNP 解析

2.1.1 TK6 細胞変異体に関する解析

TK6、S-11、S-15 クローンはいずれも同一細胞由来であるが、KbrO3 処理により tk 遺伝子に欠失変異を起こしている。この欠失については、既に STR マーカーおよび BAC CGH を用いた解析により、その 17 番染色体上の存在と大きさが予測できていた (図 11)。今回 SNP チップを用いて解析した SNP call の結果を見ると、図 12 の様にいずれのクローンも tk 遺伝子近傍においてヘテロ接合性の消失、すなわち親株において異なるアレル call を持つ部位が連続して消失していた。また、S11 クローンにおいて予測された短腕末端部の欠失部位においても同様に LOH が観察された。この部位における SNP 判定は AA または BB となっているが、各プローブのシグナル強度を見ると強度それぞれ A または B 単一アレルの場合の強度とほぼ同じであり、片側のアレルが消失し、A0 もしくは B0 タイプであると判断できた。GDAS ソフトウェアは SNP call の際にシグナル強度まで考慮できないため、異なった判定がされることがわかった。SNP チップの解析結果より予測される切断点の位置を、BAC を用いた CGH 解析で得られた結果と比較したのが図 13 である。この際参考のために、より高密度である 100KSNP チップでのプローブの位置とも比較した。BAC CGH では全染色体を約 4000BAC クローンでカバーするのに対し、10K SNP チップでは 100,000 個の SNP で行うため単純には 2.5 倍ほど詳細な検討が可能であるが。実際には 17 番染

色体上のプローブがそれほど多くないため、位置情報としては、むしろ CGH アレイでのデータが切断点に近かった。100KSNP チップのデータのプローブ情報を見ると、この領域により詳細に設計されており、今後 100K チップを用いることによりさらに詳細な検討が可能となる。また、アプライドバイオシステム社より提供される既存 SNP を TaqMan プローブ法にて検出する Assay on demand Genotyping アッセイを利用すればかなり詳細に検討可能であり、今後切断点を同定する際には有効であると考えられる。

2.1.2 HL60 及び HL60-RG 株を用いた解析

SNP call に基づく LOH 解析の結果、全く予想できなかった 1 番染色体の全体の LOH が新たに見いだされた。HL60-RG 細胞においては、図 14 に示した m-FISH の結果からも、11 番染色体短腕の欠失などを含む染色体異常が検出されていたが、1 番染色体に関しては全く正常だと考えられた。しかし、図 15 に示したように、RG 株における SNP 解析結果は、染色全領域においてヘテロ接合性 (AB の call) が消失していた。一方、親株では全域に渡ってヘテロの call が存在するため、RG 株が形成された過程において、ヘテロ接合性が消失したと考えられる。CGH 解析の結果からも染色体の量的変化は起こっていないため、父もしくは母由来の染色体の片側が消失し、片親由来の染色体に置き換わった uniparental disomy が起きていると結論できる。これは、おそらく、いったん片側に染色体が一本増えた trisomy 状態から、反対側のアレルの染色体が脱落して 2 本に戻るにより生成したと予想される。