

一方、染色体解析において欠失の見られた 11 番染色体短腕領域は、同様にしてヘテロ接合性の消失が見られるが(AA 若しくは BB call)、CGH の結果からもこの部位では染色体コピー数が半減していることより、それぞれ A0 または B0 という欠失型の LOH であると結論できる。SNP 解析用の GDAS ソフトウェアは染色体コピー数まで考慮していないため、A0 および B0 という判定はできず、AA または BB という call になったと推察できる。また、付属の LOH 解析機能は、SNP call を元にその予測が可能であったが、染色体の増減を伴う欠失型か、伴わない組換え型の LOH かを判定することはできない。そこで、染色体コピー数の増減に関しても検討を加えるため、SNP チップの各プローブのシグナル強度を元に Affymetrix 社より提供される CNAT および Web 上のフリーソフトとして利用可能な d-CHIP ソフトウェアを使って検討を行った。

CNAT では、正常ヒト由来のコントロールサンプルにおいても、コピー数比がコンスタントに 1 にならないなど、解析結果に信頼性がもてなかったが、d-CHIP を使った解析においては、図 16 に示すように BAC CGH とほぼ同様の結果が得られた。即ち、5 番染色体においては NG, RG 株とも同じ領域において染色体の欠失が検出でき、10 番染色体短腕部における欠失に関しては、RG 株の方がやや長い欠失領域を持つという CGH の結果が SNP チップでも再現された。以上の結果より、SNP チップは染色体の増減解析において CGH 解析と同様に使用することができ、その際に、dChip という解析ソフトウェアが有効であることが示

された。

さらに、c-myc の増幅領域に関する解析については、CGH アレイにて 8 番染色体 c-myc 遺伝子近傍にひとまとまりの増幅領域として観察されていたものが、SNP アレイによる解析により、3 つの独立したピークとして検出された。さらに驚くべき事に、c-myc 遺伝子はこの増幅領域に含まれていなかった。さらに、論文等にて報告されている myc co-amplified region (MCR) も含まれていなかったため、複雑なメカニズムにより少なくとも 5 箇所の領域が関与して、c-myc の増幅が起こっていると予想される。

2.2 遺伝子発現データとの比較による欠失アレルの検討

図 17 に GeneChip 解析により、HL60 細胞と HL60—RG 細胞の遺伝子発現を比較した結果、発現の変動が見られた遺伝子を各染色体上にマップした。この結果より、1 番染色体および 11 番染色体に比較的变化する遺伝子が多く見られることがわかった。SNP チップによる LOH 解析の結果、1 番染色体は uni-parental disomy となっている事が判明したが、この結果、この染色体上の遺伝子の発現に影響を与えた可能性が示唆される。

表 3 に 1 番染色体上で特に発現変化の多く見られた 1p36 と 1q21 の領域のデータを示す。このうち 1p36 領域はがん化と関連したインプリンティング領域としても注目されており、インプリンティングや CpG アイランドのメチル化状態に興味を持たれる。このうち特に発現変化の大きかった遺伝子として TNFRSF1B (TNF receptor 2) と TNFRSF8 (CD30) 遺伝子があげられる。前者はアポトーシスに関連した遺伝子とし

てその発現が RG 株で減少しており、後者は増殖性細胞の表面マーカーとしても知られ、その発現が上昇していた。これらは、メカニズム的に RG 細胞の増殖性を説明できるため、増殖性の形質を獲得した一つの要因となりうることが示唆された。また、この二つの遺伝子は図 18 に示すように 1 番染色体上非常に近接して存在し、全く逆の方向への発現変化を示していた。

ゲノム情報よりこの二つの遺伝子の間には CpG アイランドが存在するため、そのメチル化によりインプリンティングを受けているためにこのような発現調節を受けている可能性が考えられる。そこで、現在この部位のメチル化の解析を行っている。

一方、同じく発現変化の多く見られた 11 番染色体短腕部位においては、図 17 に示すようにスクアタープロットよりいくつかの遺伝子に発現の上下動が認められるが、この領域においてはインプリンティングを受けるとする遺伝子が複数存在するため、それらの動向を調べたところ、興味深いことに、INS、IGF 2 という父親由来アレルが発現する遺伝子に関しては変化が見られなかったが、その他母親由来の発現を示す CDKN1C、KCNQ1、TSSC4 といった遺伝子はいずれも発現の低下が認められた。この結果より、11p 領域において欠失したアレルは、母親由来のアレルであることが判明した。このように、遺伝子発現のデータと SNP チップによる LOH データの組み合わせにより、欠失した染色体アレルの由来にまで迫ることができ、本手法が染色体異常の詳細な解析において有効であることが示された。

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

TRF1 の核マトリックス結合ドメインを同定するために、SV40 核移行シグナル配列および EGFP を付加した TRF1 タンパク質、もしくは TRF1 中の 60 アミノ酸残基程度の配列に SV40 核移行シグナル配列および EGFP を付加したタンパク質 (図 19A) を細胞に過剰発現させ、各配列の核局在作用を検討した。図 19B に示すとおり、野生型 TRF1 に EGFP を付加したタンパク質 (EGFP-TRF1(1-439)) は細胞に発現させた場合、内因性 TRF1 と同様に核画分に局在した。SV40 核移行シグナル、EGFP および TRF1 中の 60 アミノ酸残基程度の配列よりなるタンパク質を細胞に発現させた場合、いずれの TRF1 配列を含むタンパク質も核膜を破壊する高張条件では可溶性画分に溶出されたが、低張条件では不溶性画分に局在しており可溶性画分に局在するものはなかった。

2.3.2 TRF1 プロモーター領域の転写活性の解析

図 20 に示すとおり、TRF1 は細胞の不死化に伴って誘導されるが、Telomerase 活性やテロメア配列の長さといった不死化の原因とは無関係である。そこで、TRF1 の発現制御の機構を明らかにする目的で、TRF1 遺伝子のプロモーター領域をクローニングしてその転写活性を評価した。

表 4 に示すとおり、Hela 細胞と初代培養の繊維芽細胞とを比較した場合、Hela 細胞における TRF1 遺伝子プロモーターの活性は初代培養繊維芽細胞よりも 10 倍上昇していた。Hela 細胞における TERT 遺伝子プ

ロモーターの活性は繊維芽細胞よりも 400 倍上昇していた。しかしながら、プロモーターを含むコンストラクトをトランスフェクションした細胞とプロモーターを含まないコンストラクトをトランスフェクションした細胞の間でルシフェラーゼ活性を比較することにより遺伝子プロモーターの挿入効果を算出した場合、TRF1 遺伝子プロモーター挿入によって初代培養繊維芽細胞ではルシフェラーゼ活性が 35 倍上昇していたのに対し、Hela 細胞においてはルシフェラーゼ活性が 8 倍しか上昇が見られなかった。一方、TERT 遺伝子プロモーターの挿入によって Hela 細胞におけるルシフェラーゼ活性は 47 倍上昇したのに対し、初代培養繊維芽細胞では 5 倍にとどまっていた。

2.3.3 CARF と TRF1 の結合の検討

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 抗体およびウサギ IgG による免疫沈降を行った後、抗 V5 抗体によるウェスタンブロッティングを行った結果、抗 TRF1 抗体処理をほどこした溶解液にのみ V5 の抗原性が確認された (図 21A)。図 21B に示すように、CARF の細胞内における局在は TRF1 とオーバーラップしていることが明らかとなった。

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 TPO による CD31 強陽性細胞増加

以前から我々は、CD31 強陽性細胞が VEcadherin 陰性の early EPC であることを報告してきた。AC133 陽性細胞に血管内皮

細胞成長因子(VEGF)存在下、スロンボポエチン (TPO) や幹細胞成長因子(SCF)を添加して培養すると、図 22 に示したように末梢血・臍帯血ともに全体の細胞数の増加が観察された。また、さらに両者を同時に加えた Mix はさらに細胞数が増加した。フローサイトメーターで CD31 強陽性部分に着目して解析したところ、SCF による CD31 強陽性細胞分画の増加は観察できなかった。一方、TPO は末梢血では対照の 0.46%から 2.3%に臍帯血では 0.35%から 2.6%に増加した。細胞数の増加とフローサイトメーターの結果から、CD31 強陽性細胞の絶対数を算出した結果、図 23 に示すように、有意な CD31 強陽性細胞数の増加が観察された。

3.1.2 Early EPC のサスペンション・アレイ・テクノロジーを用いた特性解析

サスペンション・アレイ・テクノロジーはわずか 50 μ l のサンプル量で、種々のサイトカイン量を同時に、定量的に測定できる有効な方法である。その原理は 2 種類の蛍光色素の量比を利用して、ビーズを 100 種類に色分けし、1 種類のビーズに 1 種類の抗体を結合させる。さらにビオチンつき二次抗体、アビジン蛍光物質を結合させる。最終的に、フローサイトメトリーの技術を利用し、ビーズを一つずつ、検出する (図 24)。

産生されたサイトカインを解析すると、GM-CSF、TNF- α 、bFGF、G-CSF の産生量はあまり高くないように思われた。VEGF の産生は高いが、末梢血も臍帯血も CD31 強陽性と陽性細胞の間での大きな差はなかった。一方、IL-8 は early EPC である CD31 強陽性細胞で末梢血由来及び臍帯血由来ではそれぞれ 20 万 pg/ml 以上、および 10 万 pg/ml

以上の産生が認められた。さらに、CD31 陽性細胞の方が CD31 陽性細胞より顕著に多かった (図 25)。

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 Le^x 糖鎖の MSⁿ

はじめに、Le^x糖鎖特異的検出法の開発を検討した。Le^x 抗原は、GlcNAc に Fuc と Gal がそれぞれ α 1-3 結合及び β 1-4 結合した糖鎖である。その位置異性体として、GlcNAc に Gal と Fuc が β 1-3 及び α 1-4 結合した Le^a が存在する。また、Le^x 及び Le^a の Gal に Fuc が α 1-2 結合した糖鎖は、それぞれ Le^y 及び Le^b と呼ばれる (図 26)。Le^x と Le^a、及び Le^y と Le^b は分子量と糖組成が同一であるため、MS による分子量測定や MS² による糖鎖配列解析では識別することができない。そこで、Le^x 結合糖鎖のみを特異的に検出する方法として、MSⁿ によって Le^a からは生じない GlcNAc のピラノース環開裂イオンを検出することを試みた。

ここではモデルとして図 27 に示す市販の Le^x 及び Le^a 構造を含む PA 糖鎖を用いた。糖鎖 I 及び II はそれぞれ Le^x 及び Le^a を含む糖鎖であり、糖鎖 III は、より複雑な構造を持つ Le^x 結合糖鎖である。一般に、環開裂イオンを含む様々なプロダクトイオンを得るためには、糖鎖をナトリウム付加体として解析するとよいことが知られている。そこで、モデル糖鎖は、10 μ M の塩化ナトリウムを含む溶媒に溶解して、MSⁿ に付した。

図 28 はモデル糖鎖 I の MS¹⁻⁴ スペクトルである。図 28A はフル MS¹ スキャンによって得られたマススペクトルで、ナトリ

ウム付加体が m/z 954 に検出されている。これを前駆イオンとして MS² を行った結果、図 28B に示すように Le^x の 3 糖構造のナトリウム付加体が m/z 534 に検出された。さらに、この m/z 534 を前駆イオンとして MS³ を行ったところ、Fuc が開裂した GalGlcNAc が m/z 388 に検出された (図 28C)。さらにこのイオンを前駆イオンとして MS⁴ を行ったところ、GlcNAc のピラノース環の C-3 及び C-4 間が開裂した ^{3,5}A₂ イオンが m/z 259 に検出された。この環開裂イオンは Gal が GlcNAc の 3 位ではなく 4 位に結合していることを示すイオンであり、Le^a からは生じないプロダクトイオンである。このように、MSⁿ によって、Le^x 糖鎖に特徴的なイオンを検出できることが確認された。

つぎに、Le^a モデルの糖鎖 II の MS¹⁻⁴ スペクトルを測定した (図 29)。MS¹ では Le^x と同様に m/z 954 にナトリウム付加体が検出された。また、MS² でも、Gal(Fuc)GlcNAc からなる m/z 534 のイオンが検出され、さらに MS³ でも m/z 388 のイオンが検出された。しかし、MS⁴ では、Le^x で検出された m/z 259 は検出されなかった。このことは、MS² によって生じた Gal(Fuc)GlcNAc⁺ を選択して MS³ を行い、さらに MS³ で生じた GalGlcNAc⁺ を選択して MS⁴ を行って、環開裂イオン (m/z 259) の有無を確認することによって、Le^a と Le^x を識別できることを示唆している (図 30)。

そこで、より複雑な構造を有する Le^x 糖鎖のモデル (糖鎖 III) を用いて、MS² において生じた Gal(Fuc)GlcNAc、さらに MS³ において生じた GalGlcNAc を前駆イオンとして MS⁴ を行った場合、Le^x に特徴的なイ

オンが生成されるかどうかを検証した。図 31 は糖鎖 III の MS²⁻⁴ スペクトルである。MS² で m/z 534, MS³ で m/z 388, さらに MS⁴ で m/z 259 が検出されることを確認した。このことから、この 3 つのプロダクトイオン (m/z 534, 388, 259) を, Le^x 構造の診断イオンとして利用することによって、Le^x のみを選択的に検出できることが実証された。

3.2.2 LC/MSⁿ による糖鎖のプロファイリングと Le^x 結合糖鎖特異的検出

つぎに、LC/MSⁿ を用いて、細胞組織由来糖鎖の網羅的解析を検討した。マウス腎臓由来のタンパク質に PNGase F を作用させて N 結合型糖鎖を切り出した。イオン化効率を高めるため糖鎖を PA 化した後、その糖鎖を LC/MSⁿ 装置を用いて分析した。ここでは、フル MS¹ スキャンに続いて(図 32A), データ依存的 MS² (図 32B) スキャンを行った。フル MS¹ スキャンで得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) にピーク a-j が検出された。これらは、分子量及び MS² スペクトルから、高マンノース型糖鎖及び複合型フコシル糖鎖と推定された。フコースが複数結合した糖鎖が検出されたことから、Le^x 糖鎖の存在が示唆された。

そこで、3.2.2 項で開発した Le^x 糖鎖の特異的検出法を用いて、マウス腎臓由来糖鎖の中から、Le^x 結合糖鎖だけを選択的に検出することを検討した。データ依存的 MS² スキャンで生じた m/z 534 イオンを前駆イオンとして MS³ (図 32C), さらに MS³ で生じた m/z 388 イオンを前駆イオンとして MS⁴ を行い、生じた m/z 259 イオンを検出した (図 32D)。その結果、ピーク a-j のうち、ピーク a, b, e, f 及び h の MS²⁻⁴ から

Le^x 診断イオンが検出され、この 5 つの糖鎖に Le^x が結合していることが示唆された。

Le^x 構造の存在が示唆された糖鎖の詳細構造は、データ依存的 MS²⁻⁴ スペクトルから解析した。代表的な MS²⁻⁴ スペクトルとして、図 33 にピーク f の MS²⁻⁴ スペクトルを示す。まず、フラグメントパターン及び分子量から、この糖鎖には Fuc が 3 分子結合していることが示唆された。また、データ依存的 MS² で m/z 534 のイオンが検出され (図 33A), m/z 534 イオンを前駆イオンとした MS³ で m/z 388 のイオンが観察され (図 32C), さらに m/z 388 イオンを前駆イオンとした MS⁴ で m/z 259 イオンが観察されることから、Le^x が結合していることが確認された。さらに、 m/z 1035 にバイセクティング糖鎖に特徴的な Y_{3α/3β} イオンが比較的強く検出されたことから、この糖鎖は、Le^x 構造を 2 つ有するフコシル糖鎖と予想された。しかし、 m/z 680 に検出されたプロダクトイオンから、Le^y (FucGal(Fuc)GlcNAc) 構造を有する可能性も示唆された。一般に、ナトリウム付加体の MS² スペクトルは、プロトン化イオンの MS² に比べて複雑になることが知られている。そこで、糖鎖配列を明らかにする目的で、ナトリウム塩を添加せずに MS を行い、生じたプロトン化イオンに対して MS² を行った (図 34)。その結果、 m/z 658 に Le^y 構造の存在を示唆する B3α イオンが検出されたことから、この糖鎖は Le^x ではなく、Le^y を部分構造として有することが示唆された。同様に、Le^x の存在が示唆された主な糖鎖について、MS²⁻⁴ スペクトルを基に糖鎖構造を推定した結果を表 5 にまとめる。マウス腎臓には Le^x 及び Le^y 糖鎖が存在する

ことが明らかになった。

このように、LC/MSⁿによって、細胞や組織に発現している糖タンパク質の糖鎖の分布と構造を解析できること、さらに、任意の糖鎖抗原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って、その糖鎖抗原のみを特異的に検出し、分布や詳細な構造を明らかにできることが示された。

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

造血幹細胞への高効率な遺伝子導入は、遺伝子治療のみならず細胞治療・再生医療の発展において必要不可欠である。これまで、造血幹細胞への遺伝子導入ではレトロウイルスベクターもしくはレンチウイルスベクターが主に用いられてきた。しかしながら、これらのベクターでは長期的な遺伝子発現が期待できる一方、ウイルスゲノムが細胞の染色体に組み込まれるため細胞が癌化する恐れがあること、遺伝子機能解析などの一過性の発現が望ましい場合には適さないことなどが問題となっている。そこで我々は遺伝子が染色体に組み込まれることなく遺伝子発現を示す Ad 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開発を試みた。

Ad ベクターとしては、従来汎用されている 5 型 Ad ベクター、ならびに血液細胞に対し親和性を有する 35 型 Ad を基本骨格とした 35 型 Ad ベクターを用いた。5 型 Ad ベクターは受容体として coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) を、35 型 Ad ベクターは CD46 を認識することが報告されている (図 35)。そこでまずヒト造血幹細胞

を含む画分である骨髓由来 CD34 陽性細胞における CAR ならびに CD46 の発現をフローサイトメーターにて検討した (図 36)。その結果、CD34 陽性細胞においては、5 型 Ad ベクターの受容体である CAR の発現はほとんど認められなかったものの、35 型 Ad ベクターの受容体である CD46 はほぼ全ての細胞が発現していた。

次に CD34 陽性細胞に対し、CMV プロモーターを搭載した GFP 発現 5 型ならびに 35 型 Ad ベクターを加え、48 時間共培養した。その結果、35 型 Ad ベクターは 5 型 Ad ベクターと比較し、有意に高い遺伝子発現効率を示した (図 37)。各 Ad ベクターを MOI (multiplicity of infection) 300 で作用させた場合では、5 型 Ad ベクターでは約 4.5% の細胞しか遺伝子発現を示さなかったのに対し、35 型 Ad ベクターでは約 59% もの細胞が遺伝子発現を示した。また平均蛍光強度においても、35 型 Ad ベクターは 5 型 Ad ベクターの約 10~60 倍高い値を示した。従って、35 型 Ad ベクターは 5 型 Ad ベクターよりもヒト造血幹細胞への優れた遺伝子導入用ベクターとなりうることが示された。

次に、CD34 陽性細胞においてどのプロモーターが最も優れているか検討するため、各種プロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターを作製して遺伝子発現効率を比較検討した。用いたプロモーターとしては、以下の 6 種類である：the human elongation factor 1 α promoter (EF1 α promoter)、the CMV immediate-early 1 gene enhancer/ β -actin promoter with β -actin intron (CA promoter)、the CMV promoter/enhancer with the largest intron of CMV (intron A)

(CMVi promoter) 、 the mouse phosphoglycerate kinase 1 promoter (PGK promoter) 、 the murine stem cell virus (MSCV) long terminal repeat (LTR) promoter (MSCV promoter)。これら各種プロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターをヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞に 6000VP/Cell で 6 時間のみ作用させたところ、EF1 α プロモーター、CMVi プロモーター、CA プロモーターが他のプロモーターと比較し、高い遺伝子発現効率を示した (図 38)。特に CA プロモーターでは約 54%の細胞が GFP 陽性であり、最も高い遺伝子発現効率を示した。以上の結果より、CD34 陽性細胞における遺伝子発現効率はプロモーターによって大きく異なり、今回調べたプロモーターの中では、CA プロモーターが最も活性が高いことが示された。

CA プロモーターを用いることで遺伝子発現効率の改善が認められたが、CD34 陽性細胞はほぼ全ての細胞が受容体である CD46 を発現しているにもかかわらず、遺伝子発現細胞の割合は 100%に到達していない。そこで遺伝子発現効率の更なる向上を目指して、ヒストン脱アセチル化 (HDAC) 阻害剤存在下での遺伝子発現効率を測定した。HDAC 阻害剤は、内在性および外来遺伝子の発現を転写レベルで増強することが知られている。ヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞に対し、HDAC 阻害剤 (FR901228、CAY10398) および GFP 発現 35 型 Ad ベクターを 6000VP/cell で 6 時間作用させたところ、HDAC 阻害剤非存在下においては、約 59%の細胞が遺伝子発現を示したのに対し、FR901228 濃度の増加とともに遺伝子発現効率の増大が観察され、FR901228 濃度 0.1ng/ml においては 71%

の細胞が遺伝子発現を示した (図 39B-E)。また、平均蛍光強度に関してはさらに顕著な改善が見られ、FR901228 濃度 0.1ng/ml では非存在下と比較し 3.5 倍の上昇が観察された。一方、もう一つの HDAC 阻害剤である CAY10398 では FR901228 の場合と比較し顕著な改善は認められなかった (図 39F-H)。両薬物ともに 0.01-0.1ng/ml の範囲では、明らかな細胞毒性は観察されなかった。以上の結果より、HDAC 阻害剤を用いることによりヒト CD34 陽性細胞へ高効率な遺伝子導入が可能となった。

5. 細胞特性指標の探索

5.1 ヒト臍帯血及び末梢血からの OEC の分離

5.1.1 ヒト臍帯血からの OEC の採取

ヒト臍帯血の単核球を FN コートしたプレート上で培養すると、14 日目ぐらいから、コロニーが形成されてくる。このコロニーは丸くひとつひとつの細胞は敷石状を呈しており、増殖能が高い (図 40)。OEC-3 は外側にコロニーを伸ばしていく、辺縁を示している。コロニーは播種した 6 穴のマルチウエルの 1 ウェルあたり 1 箇所以上観察された。

培養 15 日目にコロニーをトリプシン・EDTA で剥がし、細胞数を数えると 1.5×10^6 個あった。プレリミナリーではあるが、臍帯血由来 AC133 陽性細胞由来 earlyEPC より、150 倍の OEC が採取できることになる。得られた OEC を 48 穴プレートに再播種し、血管内皮細胞であるかを同定した。その結果、この OEC は CD31 陽性、eNOS 陽性、VEcadherin 陽性、KDR 陽性、CD11b 陰性、CD14 陰性 (図 41) であった。eNOS と CD31、VEcadherin、

KDR を 2 重染色すると(図 42)、すべての細胞が 2 重に染色されることから均一な細胞から構成されていると考えられた。

OEC が血管内皮細胞としての機能を持つかを検討するため、マトリゲル上の 3 次元培養を試みた。その結果、この OEC はマトリゲル上で、管腔を形成した(図 43)ことから、血管内皮細胞としての機能をもつことが確認できた。臍帯血では OEC の採取率は 50%であった。また、図 44 に示すように、非常に大きいスピンドルな形をした α -SM アクチン陽性の血管平滑筋細胞の混入が観察される場合があった。

5.1.2 末梢血からの OEC の採取

抹消血、バッフィーコートからも 10 例中 2 例のコロニーが観察された。図 45 は末梢血から単核球を分離して 22 日目に観察されたコロニーを示している。その細胞の同定を行うと CD31 陽性、eNOS 陽性であった(図 46)ことから、OEC であると考えられた。

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 CMP 遺伝子に対する RNAi

図 47 には P19 由来細胞株における「心筋細胞への分化のしやすさ」と CMP 遺伝子の発現の相関を示す。「心筋細胞への分化のしやすさ」は分化誘導後の心筋細胞マーカー遺伝子の発現を主成分解析した際の第 1 主成分によって表現される(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」山口の項参照)。今回我々は CMP 遺伝子群の中でもその発現量と「心筋細胞への分化のしやすさ」との間のスピアマンの順位相関係数において有意確率の高い(=P 値の低い)もの 5 遺

伝子(CMP1~CMP5)、および CMP 遺伝子群の中でも同一遺伝子をコードする複数の Sequence Tag によって相関の有意性認められた遺伝子(CMP2 および CMP13)について Loss-of-function (RNAi) の実験を行った。

遺伝子発現の低下が心筋細胞分化におよぼす影響の検出を容易にするために、Loss-of-function (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。RNAi の条件検討を行った結果、まず始めに行った標準プロトコールでは Stealth RNAi のトランスフェクションを行うと、ネガティブコントロールの群でも細胞が分化しなくなる現象が認められた。この問題を解決するためのプロトコールを探索した結果、細胞の密度がきわめて薄い状態(約 20%コンフルエンス)にした状態で RNAi 処置を施す事により、ネガティブコントロールの群における心筋分化能が維持されることが明らかとなった。この条件で、FITC 標識された Stealth RNAi (Block-iT; Invitrogen)を導入した細胞の蛍光顕微鏡像および位相差顕微鏡像を図 48 に示す。蛍光顕微鏡により観察したところ、FITC の蛍光の核への集積が認められた。

CMP 遺伝子の発現を Stealth RNAi でノックダウンした結果を図 49 に示す。対照群と比較して CMP1 の mRNA の発現は 45%減少していた。対照群と比較して CMP2 の mRNA の発現は 61%減少していた。CMP3 の発現は対照群と比較して 82%減少していた。CMP4 の発現は対照群と比較して発現の減少が認められなかった。CMP5 の発現は対照群と比較して 81%減少していた。

CMP13 の発現は対照群と比較して mRNA の発現が 72%減少していた。

CMP4 については遺伝子発現抑制がまったく認められなかったため、CMP1、CMP2、CMP3、CMP5、CMP13 について心筋分化の時間経過を検討した。結果を図 50 に示す。RNAi による発現低下によって、対照群と比較して自動拍動するノジュールの出現数の明らかな低下が認められた。

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 TRP チャネルを介した脂肪細胞分化

細胞内のカルシウムイオン濃度を調節する TRP カチオンチャネルタンパク質が脂肪細胞分化能を持つ細胞の特性指標になりうるかを明らかにする目的の一環として、まず、まず V1 タイプ TRP カチオンチャネル (TRPV1) のアゴニストであるカプサイシンを用いて脂肪細胞の分化に及ぼす影響を検討した。

カプサイシンによる 10T1/2 細胞の脂肪細胞への分化を図 51 に示す。図 51 に示すように、TRPV1 アゴニストであるカプサイシンは用量依存的に、10T1/2 細胞の脂肪細胞分化を誘導する作用を有することが明らかになった。カプサイシンの脂肪細胞誘導作用は PPAR γ アンタゴニストである GW9662 (3 μ M) によって阻害されなかった。一方、TRPV1 選択的アンタゴニストであるカプサゼピン (10 μ M) および TRPV ファミリーに属するカチオンチャネルのアンタゴニストであるルテニウムレッド (10 μ M) の存在下では、カプサイシン単独で用いた場合に比べて幹細胞から脂肪細胞への分化誘導作用が抑制された (表 6)。

次に、TRPV1 以外の TRP カルシウムチ

ヤネルタンパク質のアゴニストが、TRPV1 アゴニストと同様に、幹細胞から脂肪細胞への分化誘導作用を有することを確認する目的で、TRPM8 のアゴニストであるメンソール (100 μ M)、TRPA1 アゴニストであるアリルイソチオシアネート (10 μ M) およびシンナムアルデヒド (30 μ M)、TRPM8 と TRPA1 に対するアゴニストであるアイシリン (0.1 μ M) による、10T1/2 細胞の脂肪細胞分化誘導を検討した。表 7 に示すように、TRPM8 や TRPA1 のアゴニストは、10T1/2 細胞の脂肪細胞分化を誘導した。しかし、その作用はカプサイシンの場合と比較して弱いものであった。

TRPC ファミリーに属するカチオンチャネルのアンタゴニストである SKF96365 (1 μ M) では脂肪細胞分化は誘導されなかった。また、細胞膜上に存在する電位依存性 L 型カルシウムチャネルの阻害薬であるベラパミル (10 μ M) およびジルチアゼム (10 μ M) によってカプサイシン誘発性脂肪細胞分化は増強された。

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 組み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 評価に用いた組換え細胞接着タンパク質

本研究では、細胞接着タンパク質 Fibronectin の代替品としての活用が期待できる組換え人工タンパク質として、Pronectin F、Pronectin F PLUS、Pronectin L、Retronectin、Attachin を評価した (表 8)。

Pronectin F は、細胞接着配列 RGD と

silk fibroin 由来の繰り返し配列を持つ組換え人工タンパク質で、分子内に RGD 配列を 13 個有している。980 アミノ酸からなり、分子量は 72,738、アミノ酸配列は、fMDPVVLQRRDW ENPGVTQLNRLAAHPPFASDPMGAGS(GAGAGS)₆GAAVTGRGDSPASAAGY-[(GAGAGS)₉GAAVTGRGDSPASAAGY]₁₂-(GAGAGS)₂GAGAMDPGRYQLSAGRYHYQLVWCQK で、微生物の発現系で製造される。

Pronectin F PLUS は、Pronectin F にジメチルアミノエチルクロリドを反応させ、Ser 残基を 3 級アミンで修飾して水溶性を高めた組換え人工タンパク質。正電荷を有する。微生物の発現系で製造される。

Pronectin L は、ラミニン α 鎖の細胞接着配列 IKVAV を有する組換え人工タンパク質。1019 アミノ酸からなり、分子量は 75,639。アミノ酸配列は、fMDPVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASDPMGAGS(GAGAGS)₆GAAPGASIKVAVSAGPSAGY-[(GAGAGS)₉GAAPGASIKVAVSAGPSAGY]₁₂-(GAGAGS)₂GAGAMDPGRYQLSAGRYHYQLVWCQK で、微生物の発現系で製造される。

Retronectin は、Fibronectin の細胞接着ドメイン (Type III module, 8, 9, 10)、ヘパリン結合ドメイン II (Type III module, 12, 13, 14) および CS1 部位 (type III connecting segment; III CS の N 末端 25 残基) を含む 574 アミノ酸からなる組換えタンパク質。分子量 62,613。大腸菌で製造される。

Attachin は、培養細胞の接着を目的に作製された約 30kDa の組換え人工タンパク質である。Fibronectin 様の細胞接着ドメインを含む数種類のドメインを持つとされているが、アミノ酸配列は公開されていない。CHO-K1、MDBK、PK-15、L929、Vero、COS、U373、Swiss 3T3、MRC-5 など有効であるとされている。大腸菌で製造される。

6.1.2 細胞接着能の評価

ヒト血漿由来 Fibronectin および 5 種類の組換え細胞接着タンパク質 Pronectin F、Pronectin F PLUS、Pronectin L、Retronectin、Attachin を用いて、96 穴のノントリートメントディッシュをコーティングし、HUVEC の接着を評価した (図 52, 図 53)。組換え細胞接着タンパク質は 0.01、0.1、1、10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で用い、ネガティブコントロールとしてウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin; BSA) を用いた。コーティングに用いたタンパク質濃度が 10 $\mu\text{g/ml}$ (2 $\mu\text{g/cm}^2$) の場合は、Pronectin F、Pronectin F PLUS、Retronectin、Attachin がいずれも Fibronectin と同等の細胞接着能を示した。1 $\mu\text{g/ml}$ 以下では、Pronectin F および Pronectin F PLUS の細胞接着能が Fibronectin の細胞接着能を上回っていた。Pronectin F と同じ silk fibroin 由来の骨格構造を持つものの、細胞接着配列が異なる Pronectin L は、HUVEC の接着活性を示さなかった。

6.1.3 細胞増殖への影響

細胞接着タンパク質は、細胞に接着の場を与えるのみならず、細胞の生存・増殖、機能維持にも関わっている。接着後の細胞応答への影響として、まず、各種接着タン

パク質が細胞の増殖に与える影響を検討した。

組換え細胞接着タンパク質でコーティングしたディッシュに細胞を播種し、1～100ng/mlの濃度の増殖因子(塩基性線維芽細胞増殖因子 bFGF あるいは血管内皮細胞増殖因子 VEGF)を含有する無血清培地中で2日培養後、各 well の細胞数を比較した(図 54)。Fig.3A に bFGF 依存性の増殖を評価した結果を示すが、Pronectin F あるいは Pronectin F PLUS で接着させた場合は、いずれの bFGF 濃度においても、Fibronectin の場合と同程度の細胞数にまで増殖しており、Pronectin F、Pronectin F PLUS が Fibronectin と同等の増殖支持活性を示すことが分かった。これに対して Retronectin で接着させた場合の細胞数は、いずれの bFGF 濃度においても Fibronectin で接着させた場合の 70%程度、Attachin 接着させた場合は Fibronectin の 40%程度であり、Retronectin および Attachin の増殖支持能は低いと考えられた。増殖因子として VEGF を用いた場合も bFGF の場合と同様に、Pronectin F および Pronectin F PLUS が Fibronectin と同等の増殖支持活性を示すことが分かった(図 54B)。

6.1.4 接着タンパク質を介した作用

Fibronectin を介した接着では、Fibronectin 受容体として働くインテグリン(HUVEC ではインテグリン $\alpha 5\beta 1$ 及び $\alpha v\beta 3$) が活性化され、細胞応答が惹起される。そこで、インテグリンを介した接着に対する細胞応答の key signaling molecule である Focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化を指標に、組換え細胞

接着タンパク質の活性を Fibronectin と比較した。評価には、FAK の 397 番目のチロシン残基のリン酸化を検出できる抗体を用いたウエスタンブロットティングを用いたが、397 番目のチロシン残基は、FAK の唯一の自己リン酸化部位であり、リン酸化されることにより SH2 ドメインを形成し、c-Src、Fyn などの Src family kinase をリクルートすることが知られている。

血清入りの増殖培地中で培養していた細胞をトリプシンではがして回収し、浮遊培養することによって FAK リン酸化レベルを低下させた後、組換え細胞接着タンパク質でコーティングしたディッシュに播種して、FAK リン酸化レベルの変動を評価した。図 55 に示すように、ハーベスト前の細胞(レーン 1; Before harvesting)と比較して、浮遊培養後(レーン 2; Suspension)には FAK リン酸化のレベルが低下している。レーン 3 以降に、浮遊培養後にタンパク質をコーティングしたディッシュに播種した細胞の FAK リン酸化レベルを示すが、ネガティブコントロールの BSA(レーン 3)と比較して、Fibronectin(レーン 4)、Pronectin F(レーン 5)、Pronectin F PLUS(レーン 6)では、同様に FAK のリン酸化レベルが上昇していることが分かる。Retronectin(レーン 8)でも、レベルはやや低いながらも、FAK リン酸化の亢進が認められた。これに対して、Pronectin L(レーン 7)、Attachin(レーン 9)、タンパク質をコーティングしていない細胞培養用ディッシュ(レーン 10)では、FAK リン酸化レベルの上昇は認められなかった。この結果から、Pronectin F、および Pronectin F PLUS は、Fibronectin と同様にインテグリンを介し

た情報伝達系を活性化し得ると考えられた。

6.1.5 血管内皮細胞の機能に関する影響

次に、組換え細胞接着タンパク質が細胞機能に与える影響を調べるため、血管内皮細胞の主要な機能である抗血栓性において重要な Prostaglandin I₂ (PGI₂) および tissue plasminogen activator (t-PA) の産生能を指標に、種々の組換えタンパク質で接着させた場合の細胞機能の変化について検討した。

PGI₂は、VEGF やトロンビンなどの刺激に応じて血管内皮細胞から産生され、血小板凝集を抑制することによって血栓形成を抑制する働きを持つ。PGI₂の産生は刺激後速やかに起こる反応であり、細胞膜のリン脂質の構成成分であるアラキドン酸が phospholipase A₂ で切り出され、cyclooxygenase および PGI₂ synthetase といった一連の酵素が働くことにより行われる。PGI₂の水溶液中での半減期は約2分と短いため、PGI₂産生量の指標として、PGI₂の代謝物である 6-keto Prostaglandin F₁ αの濃度を測定した。一方、t-PAは、トロンビンなどの刺激に応じて新たなタンパク合成により産生が促進され、プラスミンの活性化を介してフィブリン血栓を溶解する働きを持つ。

図 56 に示すとおり、VEGF (図 56A) あるいはトロンビン (図 56B) で刺激した際の PGI₂ 産生能については、いずれの組換え細胞接着タンパク質を用いた場合も Fibronectin の場合と大きな差が認められなかった。血清入りの増殖培地で培養している細胞と比較すると、無血清培養系では、PGI₂の基礎分泌量が多く、刺激に応じた産生促進は少ない、という傾向があった。

トロンビンで刺激した際の t-PA 産生能については、Pronectin F PLUS が Fibronectin とほぼ同じ値を示したが、Pronectin F、Retronectin、Attachin では Fibronectin と比べて低かった (図 57)。血清入りの増殖培地で培養している細胞と比較すると、無血清培養系では、基礎分泌量が低いために、トロンビンの効果が明確であった。

図 56 および図 57 の実験を行う際に、Fibronectin と Pronectin F PLUS では問題がないものの、Pronectin F、Retronectin、Attachin で接着させた場合に、トロンビン刺激によって細胞がディッシュから剥離してしまうことが分かった (図 58)。図 55 までの検討で、ディッシュへのコーティングに用いた場合に、Pronectin F と Pronectin F PLUS には機能的な差異が検出されていなかったが、トロンビン刺激による細胞剥離の有無という差があることが分かった。Pronectin F に接着させた細胞の剥離の程度は、Retronectin や Attachin と比較すると少ないが、再現性よく認められる現象であり、Fibronectin や Pronectin F PLUS と比較して、Pronectin F PLUS への細胞の接着性が低いことを反映していると考えられた。

以下、図 58 に写真で示した結果を補足するためのデータを示す。HUVEC は付着細胞であるために、ディッシュからの剥離は生存率/細胞数の低下につながる。そこで、トロンビン刺激後の生細胞数の変化が、細胞剥離の指標になると考え、Fibronectin、Pronectin F、Pronectin F PLUS を用いた場合の培養上清中 t-PA 濃度と上清回収時の細胞数を、0.01、0.1、1 U/ml のトロン

ピンに対して検討した。用いたいずれの濃度のトロンピンでも、Pronectin F では細胞の部分的な剥離が観察された。

図 59A に示すように、細胞剥離が起こらない Fibronectin および Pronectin F PLUS では、トロンピンの用量に依存した t-PA の産生促進が認められたが、細胞剥離が起こる Pronectin F では、低濃度のトロンピンに対する t-PA 産生促進が小さい傾向が認められた。上清回収時の生細胞数は、Pronectin F でのみ、トロンピン非添加時と比較して低下しており、細胞の剥離がおこっていることを反映した数値を示すことができた (図 59B)。高濃度 (1U/ml) トロンピンでは、細胞剥離がおこっていながら、生細胞数減少がわずかであった理由は、トロンピンが血管内皮細胞の増殖促進効果を持つために、剥離による生細胞数減少と増殖促進による細胞数増加の効果が相殺されたためであると考えられる。細胞あたりの t-PA 産生量を、Fibronectin、Pronectin F、Pronectin F PLUS について比較した結果を図 58C に示すが、生細胞数で補正することで、Pronectin F と Pronectin F PLUS のトロンピンに対する t-PA 産生の用量依存性がほぼ等しいという結果となった。

この結果から、Pronectin F と Pronectin F PLUS では、トロンピン刺激から t-PA 産生に至るシグナルは同じように伝えられるが、細胞の接着強度に違いがあると考えられた。

Pronectin F と Pronectin F PLUS は、同じアミノ酸配列を持つが、Pronectin F の化学修飾により製造された Pronectin F PLUS は正電荷を有している。細胞の表面は負に荷電しているため、おそらく、この

正電荷のために細胞の接着性が高まり、トロンピン刺激によって細胞骨格系の変化が生じた場合でも細胞の接着性が保たれたのではないかと推測される。

D. 考察

1. 感染性因子の安全性評価技術開発

我々は、これまでに PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮法を開発し、種々のウイルス検出の高感度化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、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を行った。PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法の最適化については、分子量 70,000 の PEI を結合した磁気ビーズを用いて、pH6 付近で濃縮を行った場合が最も高いウイルス濃縮効率を得られることが判明した。PEI 磁気ビーズはカチオン性ポリマーで正に荷電し、細胞やウイルスは負に荷電しているために、液体中のウイルスは静電的な力により 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。

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、セルロプラスミン等が同定された。このことから、PEI 磁気ビーズによるウイルスの濃縮時に IgM 抗体や補体

を加えて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が考えられた。また、濃縮効率の低いウイルスの濃縮効率を改善できる可能性も示唆された。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を取り上げ、濃縮時に抗ポリオウイルスモノクローナル抗体(IgG)と抗マウス IgG・ウサギ IgM 抗体の添加、あるいは抗ポリオウイルスモノクローナル抗体と補体 C1、C4 の添加を試みた。その結果、IgM 存在下や補体の酵素反応が起こる条件で濃縮を行うことによりポリオウイルスの回収率が顕著に向上することが明らかになったことから、同様の手法でウイルス免疫複合体を形成させることにより、PEI 磁気ビーズを用いて全てのウイルスが濃縮できる可能性が示唆された。

モデルウイルスで得られた最適化条件を用いて、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についても検討を行い、HAV、HBV、HCV への適用が可能であることを明らかにした。今回検討した *in vitro* 培養で得られた HAV についてはほぼ完全な濃縮が可能であった。また、HBV 濃縮においては、pH により濃縮効率が大きく異なり、至適 pH は 5 であった。モデルウイルスの至適条件の pH6 よりもさらに酸性条件のほうが高い濃縮が得られ、ウイルスにより至適条件が異なることが示唆された。また、HBV では抗 HBV 抗体を添加することにより濃縮効率の向上が可能であり、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確認された。PEI 磁気ビーズによる濃縮が完全ではない他のウイルスも同様の手法で濃縮効率を向上できる可能性が示唆

された。

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

培養細胞、特に癌細胞株などは培養の長期化に伴って染色体が変化しやすいことが知られている。細胞治療に用いる細胞の遺伝的安定性を調べることは、その品質や同一性を保証する上で重要なファクターとなる。我々はこれまでに、細胞の同一性の検証のためには複数の STR マーカーを用いた解析が有効であることを示したが、同一起源の細胞においても、染色体転座や欠失、増幅、LOH といった異常を持つ可能性があり、特に細胞のがん化形質の獲得へとつながる可能性もあることから注意が必要である。染色体の欠失は、がん抑制遺伝子の不活性化を、増幅は *myc* 等のがん遺伝子の活性化を引き起こし、がん化の引き金になると考えられる。そこで、染色体の増減に関する情報を得る上で、従来メタフェーズ染色体を用いた CGH 法が使われていたが、これに変わる簡便でより詳細な方法として、BAC クローンを使った CGH アレイが有用であることを我々は既に示した。今回さらに SNP をゲノムワイドに解析することにより LOH を含めた異常に関して検討が可能であると考え、Affymetrix 社より提供される SNP 検出用の GeneChip を使用した検討を行った。このアレイは SNP を検出するためにデザインされているが、アレイへのハイブリシグナルを解析することにより、染色体のコピー数の解析、即ち CGH 的な使い方ができることが期待された。しかし、Affymetrix 社より提供されるコピー数解析

ツールでは満足した結果を得ることができなかった。これは、解析に用いるコントロール DNA の由来が不明なことにも起因すると考えられる。幸い、他の研究者によりコピー数を解析するためにデザインされた dChip というソフトが無償で利用可能であったことからこれを用いて解析を行ったところ、BAC CGH データとも一致するデータを得ることができた。この事より、SNP チップが CGH にも利用可能であることが示された。今回用いたの 10K アレイであり、SNP 数は約 1 万であり、4000 クローンの BAC CGH アレイと比べてやや詳細な解析が期待されたが、17 番染色体などはプローブの設計上、むしろ BAC データの方が切断点に関して有効な情報が得られた。しかし、SNP チップに関しては 100K さらには最近では 500K とより高密度なチップが利用可能となっており、さらに詳細な検討が期待できる。一方で、CGH アレイに関しても、最近では BAC クローンを用いたものに加えて、オリゴ DNA を用いたマイクロアレイが、agilent 社などから市販されており、これらは BAC アレイに比べてさらにプローブ数が増加しているため、より詳細に検討が可能であると予想される。SNP チップは本来多型を検出するためにデザインされたものであることから、コピー数に関しては、CGH アレイに比べると信頼性は低いと思われる。実際のデータをみても、ベースラインの安定性や、再現性と言った観点では CGH アレイの方が優れていることから、コピー数の増減に着目した解析には CGH アレイが向いていると言える。さらに、コピー数の増減に関しては、定量的リアルタイム PCR を用いた検証が有効である。

一方、SNP チップは染色体の増減を伴わない LOH を検出でき、より広範囲な異常を一つのアレイで検出できるという点で優れている。今回 HL60-RG 細胞においてこれまでは全く正常だと考えられていた 1 番染色体が全領域に渡って LOH を示すことが検出できたことより本法の有用性が示唆された。細胞治療の現場では、G-バンドイング等の標準的染色体検査を用いて核型が正常であることの確認が行われているが、一見正常に見える染色体も実は LOH 型の異常を持つ可能性があることが今回の解析より示された。より確実な検証のためには、今後 SNP チップの利用が有効であると考えられる。

さらに、SNP チップでは検出できない異常として、染色体転座があげられる。白血病の発生においては特定の染色体転座がその成因のメカニズムとなっており、これらを有効に検出するためには、m-FISH 等の方法を用いる必要がある。これら各染色体解析手法の持つ特徴とその応用性に関して表 9 にまとめた。今後は、これらの手法を有効に組み合わせて、より詳細に細胞の遺伝的安定性を検証することが重要だと考えられる。

2.2 GeneChip を使った遺伝子発現解析

さらに、今回遺伝子発現情報との比較により、ゲノムインプリンティングの可能性および欠失アレルの由来についても解析することができた。11 番染色体においては、インプリンティング遺伝子が既に知られており、それらの発現状態から RG 株において欠失したアレルが母親由来であることを同定できたが、1 番染色体に関しても現在検討中である。1p36 領域にあるがん抑制遺

伝子である p73 遺伝子がインプリンティングを受けることが過去の報告において示唆されているが、その詳細に関してはまだ明らかになっていないことと、HL60 細胞では p73 遺伝子の発現レベルが低く、GeneChip によりその発現変化が検出できなかった事から、結論を出すことができなかった。現在、1p36 領域において発現変化した遺伝子についてインプリンティングの可能性を検討しており、その解析により今後欠失アレルの由来が明らかになると期待される。この 1 番染色体は uni-parental disomy であるが、直接それが生成することは考えにくいと、おそらく trisomy を経て、生成したと考えられる。染色体の数的異常ががん化につながるという指摘もあり、こうした変化を的確に捉えることができるか、更に検討を進める予定である。

2.3 TRF1 の機能解析

TRF1 の核マトリックス結合ドメインは、60 アミノ酸残基程度の断片では検出できなかった。現在、全長の TRF1 から欠失変異を作るアプローチを実行中である。

TRF1 のプロモーター領域は弱い転写活性を示したが、プロモーター依存的なルシフェラーゼ活性の増幅は Hela 細胞よりもむしろ初代培養繊維芽細胞の方が大きかったことから、正常細胞よりも不死化細胞において TRF1 のプロモーターが活性化しているとは言い切れない。従って、TRF1 の遺伝子発現量は転写以外の機構で制御されている可能性もある。

本研究により TRF1 と CARF とが結合することが見いだされた。したがって、CARF は TRF1 との相互作用することにより細胞老化に関与する可能性がある。この相互作

用の詳しい生理的意義については今後検討する予定である。

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

Early EPC は増殖能は低いが、血管新生する患部に遊走し、多くのサイトカインを産生すると考えられる。この観点から、今回行ったサスペンション・アレイ・テクノロジーはわずかなサンプル量で種々の産生されたサイトカインを定量的に測定でき、EPC の機能、品質を評価するのに、有用な方法と考えられる。今回の測定結果から、CD31 強陽性細胞から VEGF と IL-8 が非常に多く産生されていることが明らかとなった。VEGF は古くから血管新生因子として知られているが、IL-8 は近年、非常に強力な血管新生因子作用があると知られるようになり、注目を浴びている。CD31 陽性細胞に比べ early EPC である CD31 強陽性細胞の IL-8 産生能が顕著に高いことは、その血管新生に重要な役割を果たしていることが考えられる。

3.2 細胞表面糖鎖の構造・不均一性の解析技術の開発

細胞表面には多くの糖タンパク質が存在し、その糖鎖は様々な生命現象や疾患に深く関わっていることが知られている。その中でも一部の糖鎖は、細胞の分化や癌化等に伴って変動することから、細胞分化マーカーや腫瘍マーカーとして利用されている。例えば、今回モデルとして用いた Le^x は、マウスの ES 細胞の分化マーカーとして広く利用されている糖鎖抗原である。また、

この糖鎖は脳など特定の組織に多く存在し、ヒトでは胎児期に多く見られることが知られている。さらに、シアル酸が結合したシアリル Le^x は癌関連糖鎖抗原として臨床診断に用いられている。このように分化・癌化に密接に関連している糖鎖、あるいは特定の組織や器官に存在する糖鎖は、今後、再生医療の評価研究においても、癌化や分化のマーカーとして利用されるものと思われる。

多くの糖鎖抗原は抗体で検出することができるが、糖鎖抗体の多くは IgM 抗体であるため、取扱いが難しい。また、抗体を用いた検出は、その糖鎖の有無を確認するには適しているが、微細な構造変化や、各糖鎖の結合量の変化を明らかにすることはできない。より確実に糖鎖の質的量的変動を解析できる技術として、本研究では、LC/MSⁿ を使った糖鎖プロファイリングを検討した。

まず、糖鎖プロファイリングは糖鎖の網羅的解析法として利用できることが確認された。この結果は、今後、細胞治療用医薬品の細胞表面の糖鎖解析や、サンプル間の糖鎖差異解析に利用できることを示唆するものである。また、本研究では、MSⁿ によって生じた糖鎖に特徴的なプロダクトイオンを診断イオンとして用いることによって、全糖鎖の中から、分化や癌化の指標となる任意の糖鎖抗原をもつ糖鎖を特異的に検出し、その詳細構造を明らかにできることを見出した。この方法は、Le^x 糖鎖だけではなく、例えば硫酸基、ジシアル酸、グルクロン酸結合糖鎖などの特異的検出にも応用可能と思われる。今後、分化レベルの異なる細胞間や正常・癌化細胞間の糖鎖差異解析

等に応用することによって、細胞組織利用医薬品の品質評価、特性解析、安全性評価、同一性評価等への応用可能性を評価していきたいと考えている。

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

造血幹細胞への遺伝子導入における最大の問題点は、遺伝子発現効率（遺伝子発現細胞の割合および遺伝子発現量）が不十分なことが挙げられる。Ad ベクターは、既存の遺伝子導入用ベクターの中で最も高い遺伝子導入活性を有すること、非分裂細胞にも遺伝子導入可能であることから、一過性の遺伝子発現が望ましい場合においては造血幹細胞への優れた遺伝子導入用ベクターになるものと思われる。そこで我々は臨床応用研究を含め一般に使用されている 5 型 Ad ベクター、ならびに血球細胞に親和性を有することが報告されている 35 型 Ad ベクターを用いて、ヒト造血幹細胞を含む細胞画分である骨髓由来 CD34 陽性細胞に遺伝子導入を試みた。その結果、5 型 Ad ベクターではほとんど遺伝子発現を示さなかったのに対し、35 型 Ad ベクターでは 50% 以上の細胞に遺伝子導入可能であった。これは CD34 陽性細胞における受容体の発現レベルを反映しているものと思われ、5 型 Ad ベクターの受容体である CAR の発現はほとんど認められなかったのに対し、35 型 Ad ベクターの受容体である CD46 はほぼ全ての細胞で発現していた。

さらにヒト造血幹細胞への遺伝子導入を最適化するため、各種プロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターを作製し、その遺伝

子発現効率を比較検討した。その結果、プロモーターにより遺伝子発現効率は大きく異なり、EF1 α 、CA、CMVi プロモーターが他と比較し優れていた。特に CA プロモーターは最も高い遺伝子発現効率を示した。我々は CA プロモーターが ES 細胞を初めとする各種の未分化細胞において高い転写活性を有することを明らかにしており、ヒト造血幹細胞においても CA プロモーターは有効であると思われる。

ほぼ全ての CD34 陽性細胞が受容体である CD46 を発現しているのにもかかわらず、遺伝子発現細胞の割合が 100%に到達しないことから、一部の細胞では 35 型 Ad ベクターが感染し遺伝子が細胞内に入っているにもかかわらず、遺伝子発現に至らないことが示唆された。そこでヒストンの脱アセチル化を阻害することで、内在性ならびに外来性遺伝子の発現を増強することが知られているヒストン脱アセチル化 (HDAC) 阻害剤を用い、CD34 陽性細胞における遺伝子発現の増強を試みた。HDAC 阻害剤として FR901228 ならびに CAY10398 を 0.01-0.1ng/ml の濃度で 35 型 Ad ベクターとともにヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に作用させたところ、FR901228 を 0.1ng/ml の濃度で加えることにより遺伝子発現効率の顕著な改善が見られた。HDAC 阻害剤は、ヒストンのアセチル化を促進することによりヌクレオソーム構造が緩み、転写因子が DNA と直接作用しやすくなって内在遺伝子の転写が活性化されると考えられている。これまでも癌細胞への従来型 (5 型) Ad ベクターによる遺伝子導入実験において、HDAC 阻害剤処理により 5 型 Ad ベクターの受容体である coxsackievirus and adenovirus

receptor (CAR)ならびにインテグリンの発現が上昇し、それによりベクター取り込み量が増加することで、最終的な遺伝子発現効率が上昇すると報告されている。一方で、HDAC 阻害剤は外来遺伝子の発現も転写レベルで増強することが知られており、プラスミドを用いた遺伝子導入系においても転写活性化による遺伝子発現効率の増大が報告されている。今回の検討においても、受容体の発現上昇によるベクター取り込み量の増加、もしくは転写レベルでの導入遺伝子の発現増大のどちらかのメカニズムにより最終的な遺伝子発現量が増加しているものと思われる。

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

EPC には 2 種類あると考えられており、OEC は early EPC とは対象的に高い増殖能をもつため、細胞数を確保でき、ドナーの単核球から確実に OEC が培養できる技術を確認することは、細胞治療の有用性確保において非常に重要である。今回、臍帯血より OEC の培養に成功し、early EPC に比べ 150 倍の細胞が得られる可能性を示すことができた。しかし、臍帯血では 50%、末梢血では 20%と未だ十分な確率で OEC を誘導できているとは言えず、今後の課題である。また、血管平滑筋細胞の混入などの問題点もある。今後、early EPC を採取する際と同様に幹細胞を分画することで、血管平滑筋細胞や予想される臍帯血管内皮細胞の混入を回避できるかもしれない。また、OEC をより多く採取するためには OEC を増加させるための有効な因子の添加、あるいは培養環境を変えていくことが重要と考えられ

た。またコロニー形成の過程で幹細胞の機能を持つ細胞が存在するのについても解析していく必要がある。

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

心筋分化誘導後の心筋細胞マーカー遺伝子の発現量、すなわち「心筋細胞への分化のしやすさ」と正に相関する遺伝子である CMP 遺伝子の中でも、特に相関の有意性が高い遺伝子 CMP1、CMP2、CMP3、CMP5 および CMP13 について、その発現を RNA 干渉により抑制し、その心筋細胞分化過程への影響を評価した。CMP1 はガン細胞においてその遺伝子発現が抑制されており、細胞増殖との関連が提唱されているが、その詳細な機能は不明である。CMP2 はインテグリン様の構造を示すドメインを含有することがアミノ酸配列から推定された。しかしその生理機能は現在のところ不明である。CMP3 および CMP5 も機能は未知である。アミノ酸配列から CMP13 は細胞膜上にある 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体であると考えられるが、その生理機能については十分な解析がなされていない。我々の結果は、検討したこれら機能未知の遺伝子すべてにおいて、分化誘導前に RNAi を施すことにより、CL6G52 細胞の DMSO による心筋細胞分化は抑制されることを示していた。因果関係の評価においては(a) 原因と着目している結果との相関関係、(b) 着目している結果に対する原因の時間的先行、(c) 原因を取り除いた条件下において着目している結果が消失すること、の 3 要件が必須である。今回検討した CMP 遺伝子は「心筋細胞分化」に関してこれらの要件を満足する。したがって、本研究の結果から

は CMP1、CMP2、CMP3、CMP5 および CMP13 は幹細胞の心筋細胞への分化において促進的な役割を果たしていることが示唆され、幹細胞におけるこれら遺伝子の発現量は心筋細胞分化能を予測する指標として有用であると考えられる。

特に CMP2 は CL6G52 細胞の分化を完全に抑制したことから、心筋細胞分化における重要なプレーヤーであることが示唆される。また、CMP13 は細胞膜上に発現すると予想されることから、その特異的抗体を作成し、フローサイトメトリーを用いれば、心筋細胞に分化するポテンシャルの高い幹細胞集団を分取することができる可能性がある。

CMP1 の発現量は他の CMP 遺伝子の発現量よりも心筋細胞分化との相関が高いが、RNAi による心筋分化抑制は期待に反して顕著なものではなかった。その原因は CMP1 遺伝子の発現に対する RNAi の効果が弱かったためである可能性が高い。今後、Stealth RNAi の配列を再検討し、より効率的な RNAi を実現する必要があると考えられる。

今後の課題として、①細胞膜に局在すると予想される CMP 遺伝子に対する特異的抗体により心筋細胞への分化能が高い細胞を分離することが可能かどうか、②心筋細胞分化と正に相関する CMP 遺伝子の過剰発現または心筋細胞分化と負に相関している CMP 遺伝子の発現抑制により、幹細胞からの心筋細胞分化の効率を上昇させることが可能かどうか、③CMP 遺伝子の心筋細胞分化との相関は P19 系の細胞株以外の幹細胞でも認められるかどうか、といったことを検討する必要がある。

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

幹細胞の脂肪細胞への分化能を応用した再生医療は、乳がんでの乳房再建治療等に適應される可能性がある。幹細胞を用いた再生医療において重要な点の一つとして、目的とする細胞に分化しやすい幹細胞の集団を分離することが挙げられる。特定の幹細胞集団を分離するためには特徴的なマーカータンパク質に対する特異的抗体を用いたフローサイトメトリーが用いられるが、このような目的に用いるマーカーとして適しているのは PPAR γ のような細胞内に存在するタンパク質ではなく、細胞膜上に発現するタンパク質である。

幹細胞の脂肪細胞への分化誘導時において、速い細胞内カルシウムイオン濃度上昇は脂肪細胞分化を抑制し、ゆっくりとした細胞内カルシウムイオン濃度上昇は脂肪細胞分化を促進することが明らかになっている。このことから、脂肪細胞の分化能の指標に TRP カチオンチャネルが有用ではないかと想定し、TRP カチオンチャネルのアゴニストの影響について検討した。その結果、TRP カチオンチャネルのアゴニスト、中でも TRPV1 チャンネルのアゴニストであるカプサイシンには幹細胞から脂肪細胞を誘導する作用があることが明らかとなった。したがって、TRPV1 の発現を指標とすれば脂肪細胞分化傾向の高い幹細胞集団の分離ができる可能性がある。また、従来知られていた分化に対して抑制性の速い細胞内カルシウム濃度上昇は電位依存性の L-型カルシウムチャンネルを介することが示唆された。

今後の課題として、①細胞膜に局在すると予想される TRPV1 に対する特異的抗体

により脂肪細胞への分化傾向が高い細胞を分離することが可能かどうか、②TRP チャンネルアゴニストによる脂肪細胞分化促進作用が 10T1/2 以外の幹細胞・脂肪前駆細胞でも認められるかどうか、を検討する必要がある。また、より効率的な脂肪細胞分化マーカーを得るためには TRP チャンネルアゴニストによる脂肪細胞分化促進作用の機序を解明する必要があると考えられる。

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 組み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

組織細胞利用医薬品においては、細胞の製造すなわち培養方法が製品の品質・安全性に直接的な影響を与える。特に、培地の組成や添加する血清によって、生産される細胞の特性の変化や、動物由来不純物の混入による感染・アレルギーの危険が生じることなどを考えると、適切な培養法の確立と評価が品質・安全性確保の中核を担っているとと言える。再生医療の分野で注目を浴びている胚性幹 (Embryonic stem; ES) 細胞の培養系においても、動物血清に由来する非ヒト型のシアル酸 (N-glycolylneuraminic acid) が ES 細胞表面の糖タンパク質糖鎖に含まれ、ヒトに対して抗原性を示す可能性が報告されている他、マウス由来のフィーダー細胞やウシ血清から未知ウイルスなどが ES 細胞に伝播することが懸念されており、安全性の高い細胞組織利用医薬品の製造方法の確立は今後の重要課題である。

組換えタンパク質は、大腸菌や酵母などで生産されるが、その製造工程から動物由