

图52 Adhesion of HUVECs to recombinant cell adhesive proteins.

HUVECs were plated into wells previously coated with Fibronectin, Pronectin F, Pronectin F PLUS, Pronectin L, Retronectin, Attachin, or BSA, and then incubated for 1hr at 37°C. Attached cells were fixed and stained with crystal violet and quantified by absorbance reading. Results are expressed as mean value \pm S.D. of triplicate determinations.

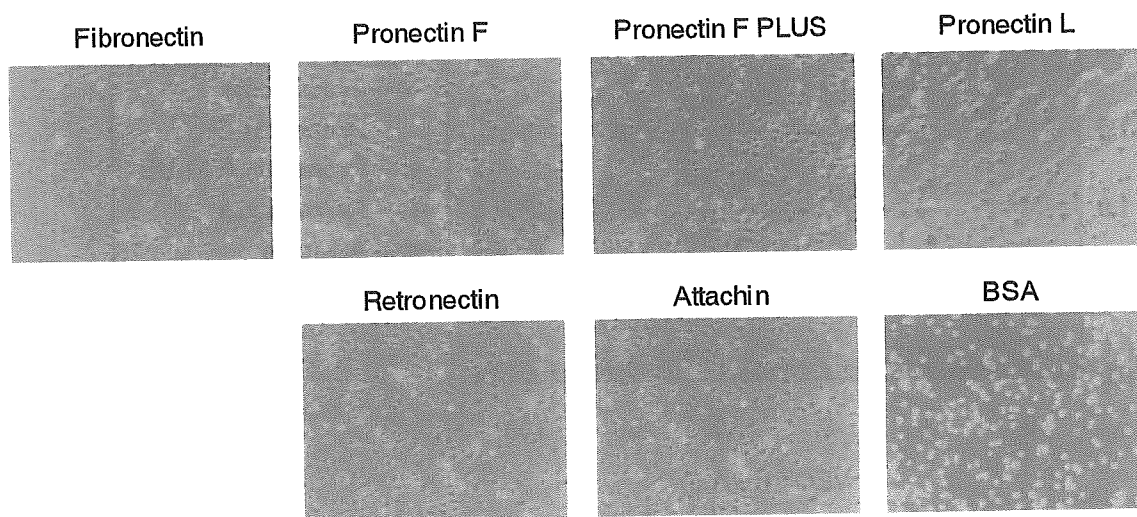


图53 The phase contrast images of cell attachment and spreading on recombinant cell adhesive proteins.

HUVECs were seeded into wells previously coated with 10 μ g/ml of Fibronectin, Pronectin F, Pronectin F PLUS, Pronectin L, Retronectin, Attachin, or BSA. After 1 hr incubation at 37°C, cells were photographed with an inverted microscope.

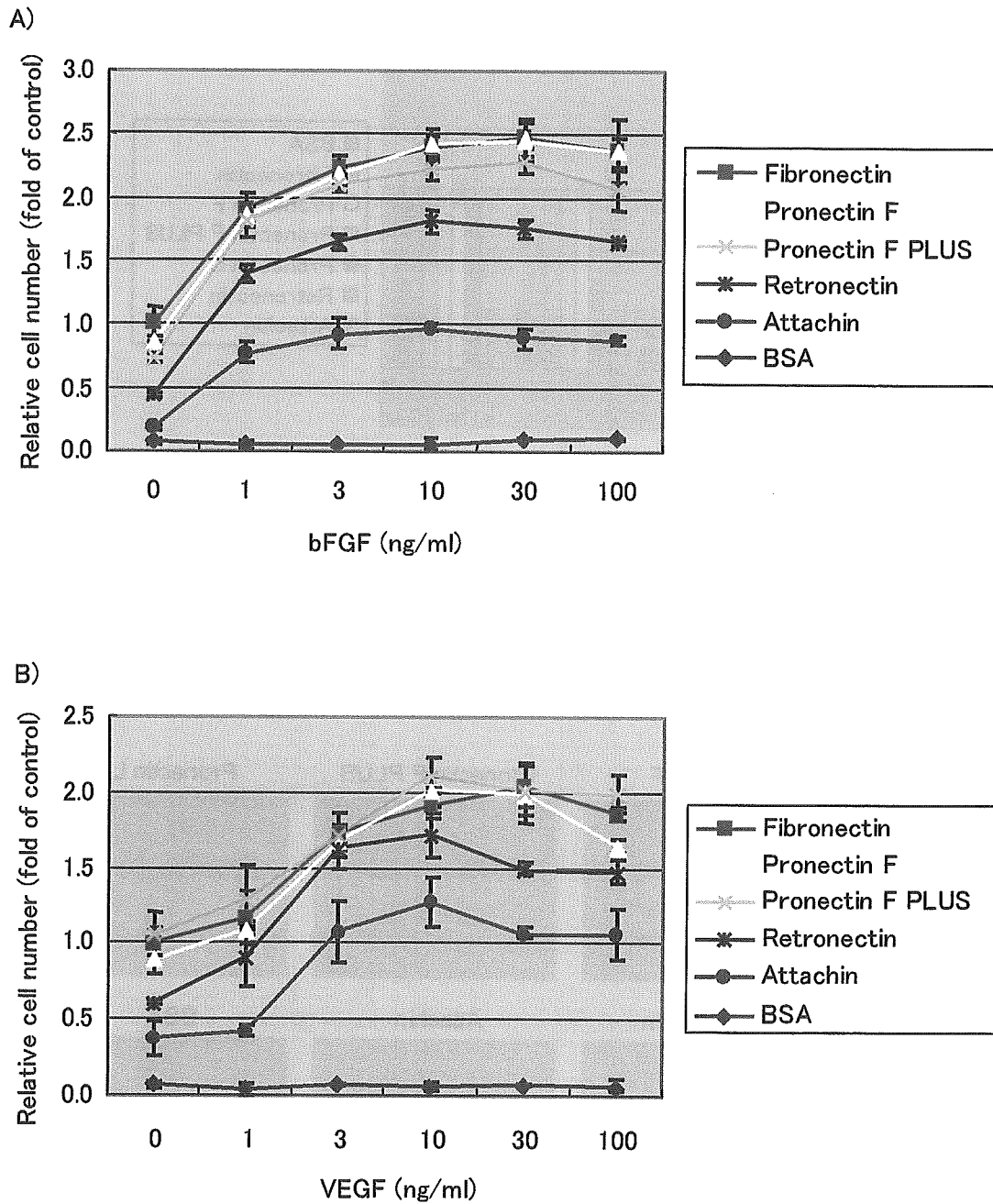


图54 Effects of recombinant cell adhesive proteins on the VEGF- or bFGF-induced cell proliferation.

HUVECs were seeded into wells previously coated with 10 μ g/ml of Fibronectin, Pronectin F, Pronectin F PLUS, Retronectin, Attachin, or BSA, and cultured for 2 days in the presence or absence of bFGF (A) or VEGF (B) at the indicated concentrations. The relative cell number was examined using cell counting kit-8. Results are expressed as mean value \pm S.D. of triplicate determinations.

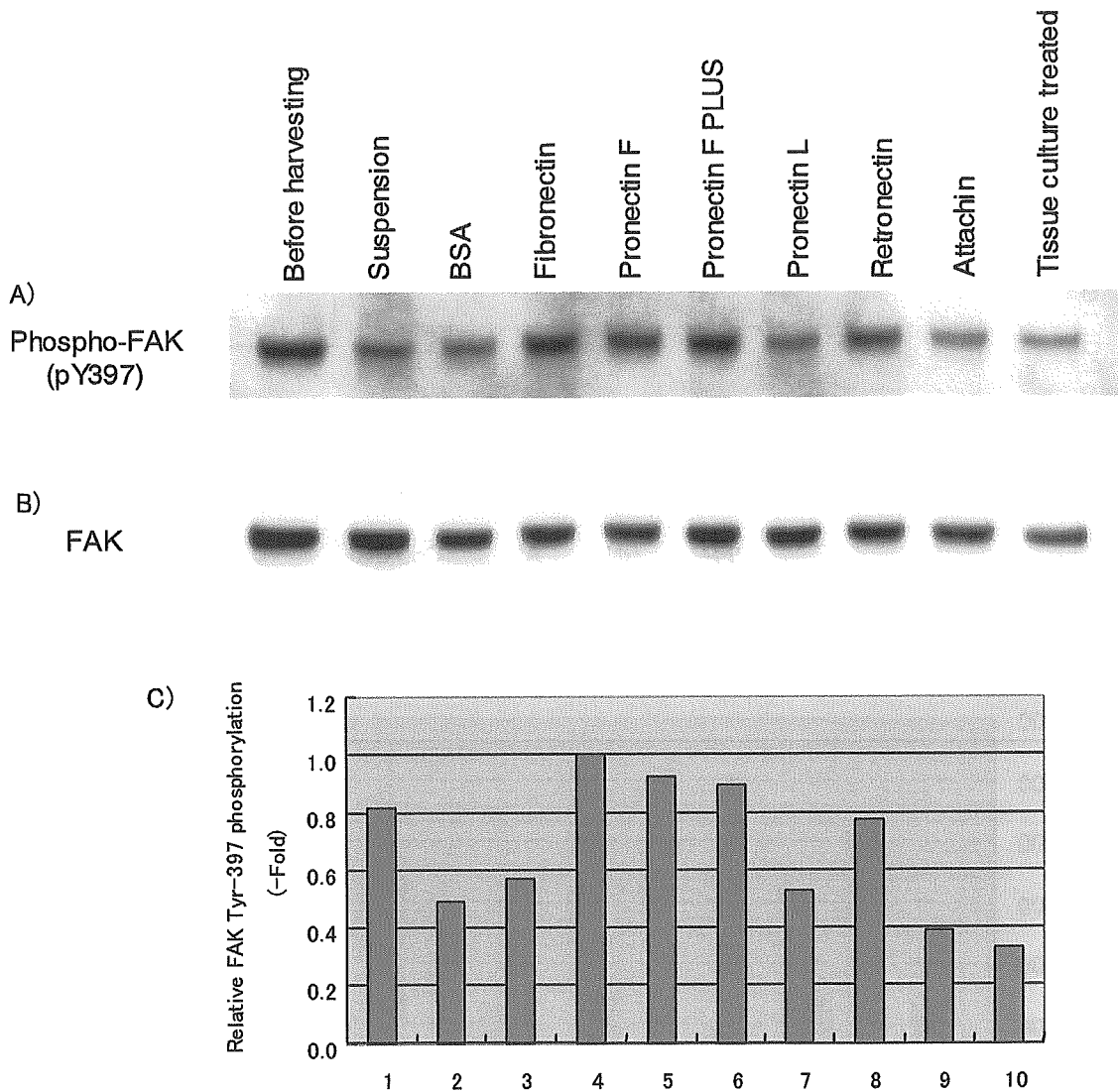


Figure 55 FAK activation in HUVECs adhered to recombinant cell adhesive proteins. HUVECs, cultured in serum-containing EGM-2 media on collagen-coated plates, were harvested and held in suspension for 2hr at 37 °C, then plated onto precoated plates with 10 μ g/ml of Fibronectin, Pronectin F, Pronectin F PLUS, Pronectin L, Retronectin, or Attachin. After 2hr incubation at 37 °C, cell lysate were prepared using RIPA buffer. The cell extracts were analyzed for the phosphorylation (A) and protein levels of focal adhesion kinase (B) by Western Blotting. The amount of detected proteins was analyzed using MultiGauge software (C). Lane 1; before harvesting, lane 2; after suspension, lane 3; BSA, lane 4; Fibronectin, lane 5; Pronectin F, lane 6; Pronectin F PLUS, lane 7; Pronectin L, lane 8; Retronectin, lane 9; Attachin, lane 10; tissue culture-treatment dish. Similar results were obtained in two independent experiments. Representative blots are shown.

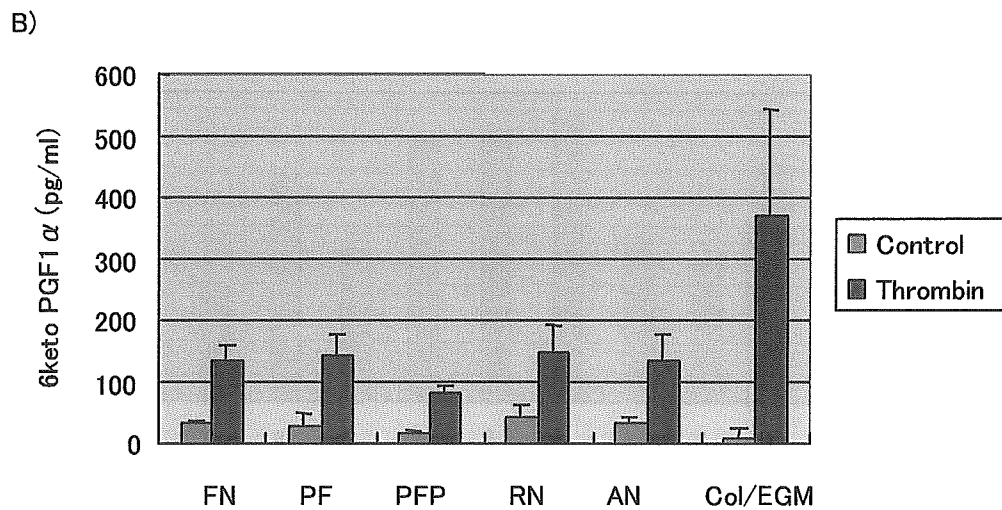
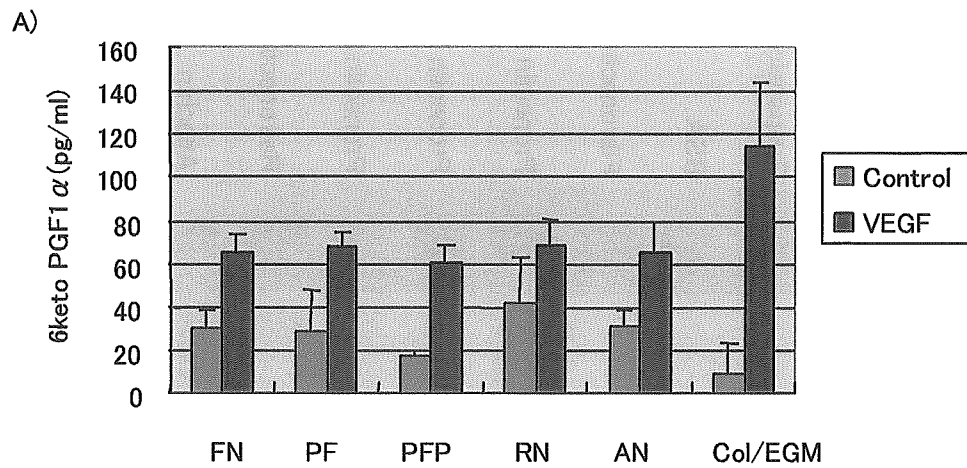


Figure 56 Effects of cell adhesive proteins on the VEGF- or thrombin- stimulated production of Prostaglandin I₂.

HUVECs were seeded at 7×10^4 cells/well on 24-well plates previously coated with Fibronectin (FN), Pronectin F (PF), Pronectin F PLUS (PFP), Retonectin (RN), Attachin (AN). After culturing for 1 day, cells were stimulated with 30 ng/ml of VEGF (A) or 1U/ml of thrombin (B). 1 hr later, conditioned media were collected and 6-keto PGF1 α concentration was determined by enzyme immunoassay. Results are expressed as picogram of PGF1 α /ml of supernatant and represent the mean \pm S.D. of triplicate determinations. 6-keto PGF1 α production from HUVECs cultured in serum-containing growing media (EGM-2) plated on collagen-coated dish was also examined (Col/EGM).

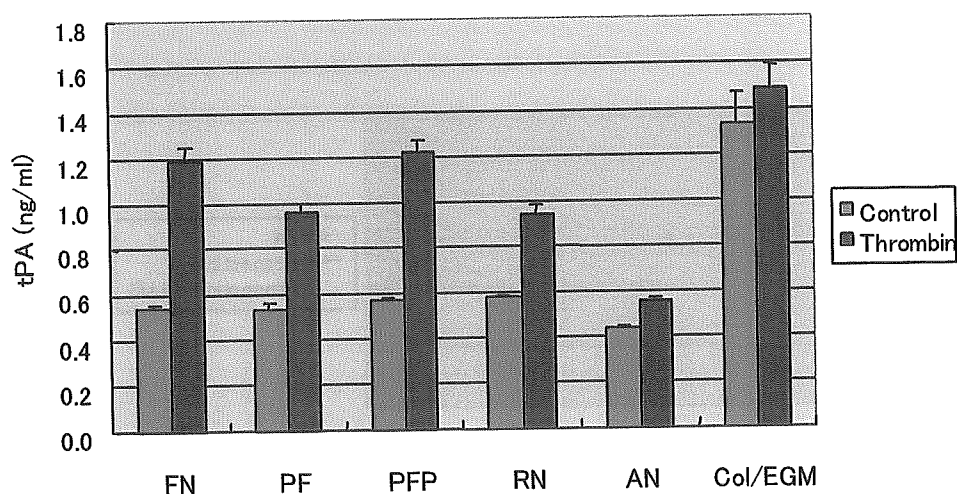


Fig 57 Effects of cell adhesive proteins on the thrombin- stimulated production of tissue plasminogen activator.

HUVECs were seeded at 7×10^4 cells/well on 24-well plates previously coated with Fibronectin (FN), Pronectin F (PF), Pronectin F PLUS (PFP), Retonectin (RN), Attachin (AN). After culturing for 1 day, cells were stimulated with 1U/ml of thrombin. After 24 hr incubation, conditioned media were collected and t-PA concentration was determined by enzyme immunoassay. Results are expressed as nanogram of t-PA /ml of supernatant and represent the mean \pm S.D. of triplicate determinations. T-PA production from HUVECs cultured in serum containing growing media (EGM-2) plated on collagen-coated dish was also examined(Col/EGM).

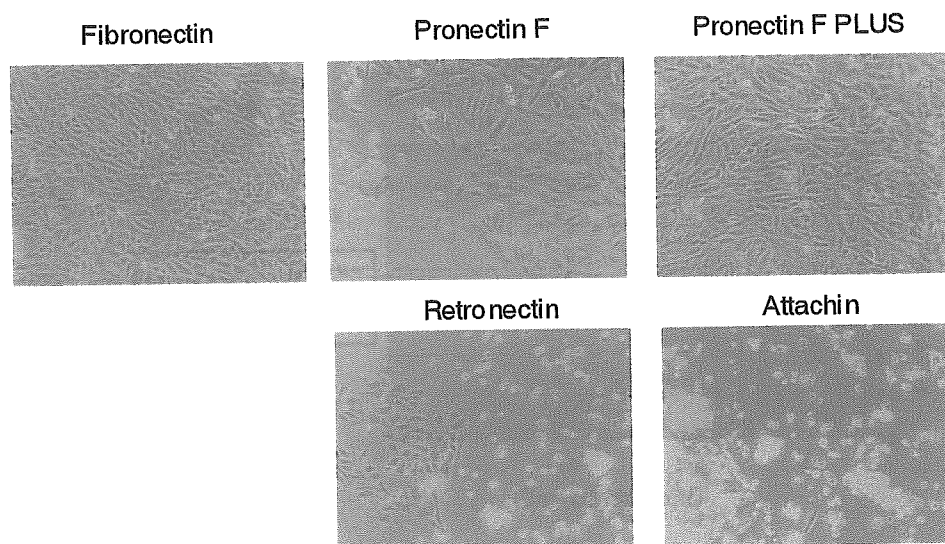


Fig 58 Detachment of HUVECs cultured in the presence of thrombin.

Cells were plated on the plates previously coated with Fibronectin, Pronectin F, Pronectin F PLUS, Retronectin, or Attachin, and cultured for 24 hr in the presence of 1U/ml of thrombin. The cells were photographed before harvesting the supernatant which is provided for the measurement of t-PA concentration.

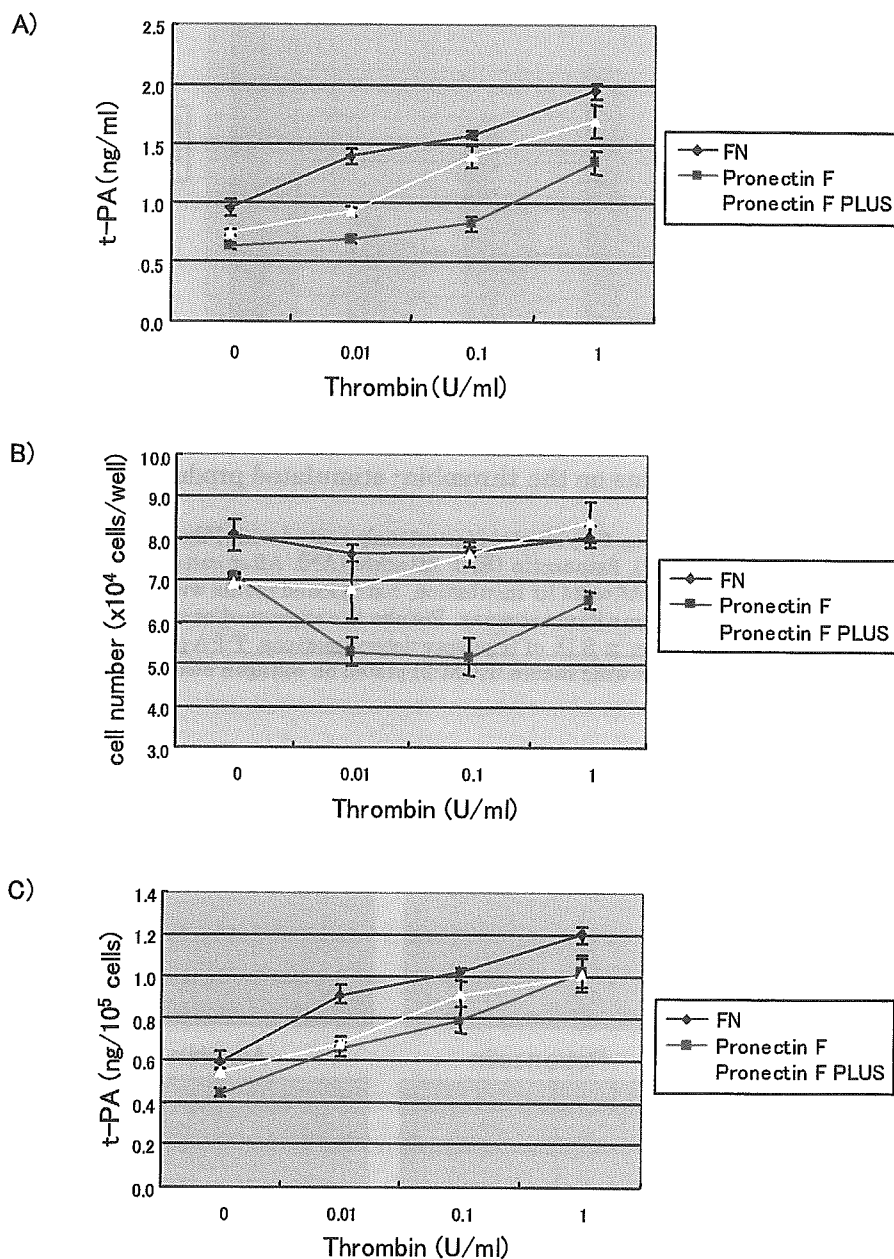


Figure 59 Thrombin induced production of t-PA and decrease in viability of HUVECs adhered on Pronectin F.

HUVECs were seeded at 7×10^4 cells/well on 24-well plates previously coated with Fibronectin, Pronectin F or Pronectin F PLUS. After culturing for 1 day, cells were stimulated with thrombin at the indicated concentrations. After 24 hr incubation, conditioned media were collected and t-PA concentration was determined by enzyme immunoassay (A). Cell number was determined using cell counting kit-8 (B). Production of t-PA per 10^5 cells were calculated (C). Each data represents the mean \pm S.D. of triplicate determinations.

表9 各種染色体解析手法とその応用性に関するまとめ

| 解析手法 | 構造異常 (量的変化なし) | 染色体の欠失増幅 | | 転座 | 細胞型 LOH | 数的異常 | 点突然変異 | 個人識別 | コスト | 難易度 | 信頼性 |
|-----------------------|------------------|----------|--------|----|------------|------|-------|------|-----|-----|-----|
| | | 大きなサイズ | 小さなサイズ | | | | | | | | |
| G-banding | ○ | ○ | △ | △ | × | ○ | × | × | L | H | L |
| multicolor-FISH | ○ | ○ | △ | ○ | × | ○ | × | × | H | H | M |
| microsatellite marker | × | × | × | × | △ | △ | × | ○ | M | L | H |
| metaphase CGH | × | ○ | △/× | × | × | ○ | × | × | H | H | M |
| CGH array | × | ○ | △ | × | × | ○ | × | × | H | M | H |
| SNP array | × | ○ | ○ | × | ○ | ○ | △ | ○ | H | L | H |
| sequencing | × | × | ○ | × | △ | × | ○ | ○ | M | L | H |

○ 可能
 △ 一部可能
 × 不可能
 最もとられる方法

細胞組織利用医薬品の品質・安全性確保に関する研究

分担研究者 川西 徹（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長）

協力研究者 石井明子（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部第二室長）

細胞組織利用医薬品の安全性確保においては、感染性物質等の混入の危険を排除するため、細胞の無血清培養系の確立が重要課題の一つとなっている。無血清培地には多くの場合、血清の機能を代替するためにタンパク質成分が添加されるが、それらについても生体成分に由来しない組換えタンパク質であることが望ましい。本研究では、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の無血清培養系を用い、細胞接着活性を持つ組換え人工タンパク質 Pronectin F、Pronectin F PLUS、Pronectin L、Retronectin、Attachin について、ヒト血漿由来 Fibronectin の代替品としての有用性を検討した。ポリスチレンディッシュへのコーティングに用いて評価した組換えタンパク質のうち、細胞接着配列 RGD と silk fibroin 由来の繰り返し配列を持つ人工タンパク質 Pronectin F を親水性を増すために化学処理して得られる Pronectin F PLUS が、細胞の接着、増殖、機能のいずれにおいても Fibronectin に最も近い性質を示した。

A. 研究目的

バイオテクノロジーを応用して製造する医薬品では一般に、最終製品の構造や機能を人工的に完全に制御することが難しく、また、混入する不純物の完全な分離が困難であるため、製品の品質・安全性が製造方法の影響を受けやすい。バイオ医薬品の中でも、細胞組織利用医薬品は多くの場合生きた細胞であり、ウイルス除去や不活化の工程を製造工程に組み入れることが現実的でないため、その品質・安全性確保においては、製造段階からの安全設計、すなわち、感染性因子や動物由来原料等を製造系から極力排除しつつ、目的とする機能を持つ医薬品を製造する方法の確立が重要となる。

細胞培養には通常、細胞の接着、生存、増殖、機能維持等に関わる種々の因子を含む極めて有効な添加物として動物由来血清が用いられ

るが、血清にはウイルスやプリオンといった感染性因子混入の危険があると指摘されている。また、血清はタンパク質、糖質、脂質、ビタミン、無機塩類など多くの複雑な成分を含むため、採取した動物の遺伝的性質や生育環境による構成成分比率の違いが大きく、ロットごとに品質の差が生じやすいことから、用いる血清のロットによって培養される細胞の性質に差異が生じることが懸念される。従って、細胞組織利用医薬品の安全性、および、品質の一定性確保の観点からは、培養系に血清を添加しない無血清培養系の利用が望ましいと考えられる。

無血清培地には、血清の機能を代替するためにタンパク質成分が添加されることが多い。しかし、生体由来試料から精製したタンパク質を用いた場合は、依然として感染性因子混入の懸念や品質の一定性で問題が残るため、更にそれ

らについても生体成分に由来しない組換えタンパク質であることが望ましい。

本研究では、培養系への細胞接着タンパク質 Fibronectin の添加が必須である血管内皮細胞の無血清培養系について、ヒト血漿由来 Fibronectin の代替品として、細胞接着活性を持つ組換え人工タンパク質が利用可能か検討した。

細胞外マトリックスの構成成分である Fibronectin は、血液中や結合組織中に存在する細胞接着性タンパク質で、血漿中では分子量約 230,000 の A 鎖と B 鎖が S-S 結合により結合したヘテロ 2 量体として存在している。各鎖は、約 45 個のアミノ酸からなる I 型モジュール 12 個、約 60 個のアミノ酸からなる II 型モジュール 2 個、約 90 個のアミノ酸からなる III 型モジュール 18 個（血漿 Fibronectin では alternative splicing のため A 鎖で 16 個、B 鎖で 15 個）の 3 種類のモジュール構造を持ち、数個のモジュールが集まって計 7 つのドメインを形成している。各ドメインは、ヘパリン、コラーゲン、細胞、フィブリンなどへの結合活性を有している。

Fibronectin の生理的な機能としては、細胞を接着および伸展させる作用の他、接着・伸展を介した細胞移動の促進、細胞形態の変化、細胞の分化・増殖の調節作用などがある。その他に、細胞外マトリックス分子であるコラーゲン、フィブリン、グリコサミノグリカンなどに結合する活性を持ち、それにより、細胞の組織特定部位への保持、血液凝固の調節、発生における組織構築、組織維持、創傷治癒など、生体において多彩な生理機能を発揮している。ヒト血漿中の Fibronectin 濃度は約 0.3mg/ml、血清中では約 0.2mg/ml、細胞培養に用いられるウシ胎児血清中では約 0.03mg/ml とされている。

B. 研究方法

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。

2) ディッシュのコーティング

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。

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。

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。

5) FAKリン酸化の測定

トリプシンではがして回収した細胞を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ティングした。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) を用いてウェスタンブロッティ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ジアナライザー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) 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 F₁αの濃度を、6-keto Prostaglandin F₁α EIA Kit (Cayman社) を用いて定量した。

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国立医薬品食品衛生研

研究所の研究倫理委員会による審査・承認を得た上で行った。

C. 研究結果

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 (Table 1)。

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、fMDPVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASDPMGAGS(GAGAGS)₆GAAVTGRGDSPASAAGY-[(GAGAGS)₉GAAVTGRGDSPASAAGY]₁₂-(GAGAGS)₂GAGAMDPGRYQLSAGRYHYQLVWCQK。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。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; IIICS 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。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。

C-1. 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 (Fig. 1, 2)。組換え細胞接着タンパク質は 0.01、0.1、1、10 μ 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 μ g/ml (2 μ g/cm²) 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 μ 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。

C-2. 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（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（Fig.3）。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（Fig.3B）。

C-3. 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。Fig.4 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。

C-4. 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 I_2 （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 やトロンピ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、トロンピ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。

Fig.5に示すとおり、VEGF (Fig.5A)あるいはトロンピン(Fig.5B)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。

トロンピンで刺激した際の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 (Fig.6)。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、トロンピンの効果が明確であった。

Fig.5 および Fig.6 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、トロンピ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 (Fig.7)。Fig.4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、トロンピ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、Fig.7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、トロンピ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。

Fig.8A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 (Fig.8B)。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Fig.7C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

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-glycolyl neuraminic 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来原料を

排除することが可能であり、ヒト由来原料で懸念されるヒトに感染性を有するウイルス等の混入の危険もない。従って、細胞組織利用医薬品の製造に必要なタンパク質性の因子を組換えタンパク質として供給することは、安全性確保のために非常に有効な手段であると考えられる。また、組換えタンパク質は目的に応じて人為的に構造を改変することができるという利点を持っている。改変型組換えタンパク質が関連する天然型タンパク質を上回る効果を示すという例も少なからずあり、一例を挙げれば、細胞接着を評価した本実験では優れた効果が認められなかった Retronectin (Fibronectin の構造の一部を持つ改変型 Fibronectin) は、レトロウイルスベクターを用いた幹細胞への遺伝子導入において Fibronectin 以上の導入促進効果を有し、レトロウイルスを用いた遺伝子治療に汎用されているものである。

本実験では、低濃度でポリスチレンディッシュへのコーティングに用いた場合に Pronectin F および Pronectin F PLUS が、Fibronectin を上回る細胞接着能を示した。これは Fibronectin が分子内に細胞接着配列 RGD を 1 箇所持つのに対して、Pronectin F および Pronectin F PLUS では分子内に多数 (13 個) の RGD 配列を持つためではないかと考えられる。しかしながら、低濃度条件下における細胞接着の効率以外は、組換え人工タンパク質がヒト血漿由来 Fibronectin より優れているという結果はこれまでのところ得られていない。

ディッシュへのコーティングに用いて評価した場合に、Pronectin F PLUS が Fibronectin に近い性質を示したことを述べたが、培地中に添加して用いた場合には、両者の性質に差異が認められた。Fibronectin は血清と同様、培地に添加した場合も細胞接着タンパク質として有効に作用するのに対して、Pronectin F PLUS は、培地に添加した場合は無効であった

(data not shown)。Pronectin F PLUS は、培地に添加した場合は細胞側に優先的に結合してしまい、その状態で培養ディッシュへの結合がおこらず、接着タンパク質として機能しないためではないかと考えられる。

Pronectin F PLUS を製造するための Pronectin F への化学処理は、最初に専用の溶媒に溶解する必要のある Pronectin F の水溶性を増し、水への溶解を可能にする目的で施されている。その結果、培養液中への添加による利用ができなくなっていたが、本実験で明らかになったように、おそらくはその正電荷のために、細胞の接着性が増強されていた。トロンピン刺激以外に、細胞に shear stress を負荷した場合などにも、Pronectin F と Pronectin P PLUS への細胞の接着強度の違いが現れるのではないかとと思われる。

血管内皮細胞に関連する細胞組織利用医薬品あるいは再生医療では、血管内皮前駆細胞を用いた血管形成が大きな注目を集めている。本実験でモデルとして用いたような分化成熟した血管内皮細胞自体が細胞組織利用医薬品として用いられる例は少ないが、米国では、支持体上に培養した血管内皮細胞を心臓バイパス手術等における血管の再狭窄、血栓形成の防止のための各種生理活性物質の産生源として利用する試みが臨床で行われているとの報告がある。また、厚みのある組織を *in vitro* で構築する場合には組織内に血管を形成させる必要があるが、その際には分化成熟した血管内皮細胞を用いることができると報告されている。従って、上記のような用途に用いられる血管内皮細胞を Pronectin F PLUS を用いた無血清培養系で供給することで、安全性の向上を計ることが可能であると思われる。血管内皮以外の細胞への応用については未検討であるが、その他の細胞への適用を検討することにより、応用の可能性が広がると思われる。

製品の安全性と一定性確保の観点から使用が望ましいと考えられる無血清培養系であるが、株化細胞の場合と異なり、細胞組織利用医薬品として用いられるような正常細胞の培養が可能な無血清培地の確立は難しく、細胞組織利用医薬品を安全なものとしていくために乗り越えなければならない大きなハードルの 1 つとなっている。本実験で用いた血管内皮細胞用無血清培地は、製品として市販されているものであるが、血管内皮細胞の機能の指標として PGI₂ 産生能を評価した場合に、接着タンパク質として Fibronectin を用いた場合でも、培養 2 日目以降はトロンピン刺激に応じた PGI₂ 産生促進が認められず、無血清培養を行うことで、トロンピン刺激から PGI₂ 産生に至る過程のいずれかのステップが働かなくなっていることが示唆された。無血清培地の問題点として、本系に特有の現象であるか、あるいは、他の無血清培養系においても同様の現象がみられるのか、特定の成分を培地に添加することによって PGI₂ 産生能が回復するか等について、今後検討が必要と考えられる。

組換え人工タンパク質は、目的に合わせた設計が可能な機能性高分子として、大きな可能性を秘めている。本実験で明らかになった Pronectin F PLUS の Fibronectin 代替品としての有用性については、長期間培養を続けた場合の血管内皮細胞への影響や、他の細胞系での効果の検討など、さらなる検証を重ねることが望ましいと考える。また、Fibronectin 以上に有用な組換え人工タンパク質の創製にも興味を持たれるところである。

E. 結論

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の無血清培養系を用いて、細胞接着活性を持つ組換え人工タン

パク質のヒト血漿由来 Fibronectin の代替品としての有用性を検討し、細胞接着配列 RGD と silk fibroin 由来の繰り返し配列を持つ人工タンパク質に親水性を増すための化学処理が施された Pronectin F PLUS が、細胞の接着、増殖、機能のいずれにおいても Fibronectin に近い性質を示すことを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akiko Ishii-Watabe, Takuo Suzuki, Tetsu Kobayashi, Teruhide Yamaguchi, Toru Kawanishi: Evaluation of fibronectin-like cell adhesive proteins in serum-free culture of human endothelial cells. (in preparation)
- 2) Takuo Suzuki, Tomoko Nishimaki-Mogami, Hiroshi Kawai, Tetsu Kobayashi, Youichi Shinozaki, Yoji Sato, Toshihiro Hashimoto, Yoshinori Asakawa, Kazuhide Inoue, Yasuo Ohno, Takao Hayakawa, and Toru Kawanishi: Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using GFP derivatives, *Phytomedicine* (in press)
- 3) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki Satsuki Itoh, Masashi Hyuga, Toru Kawanishi and Takao Hayakawa: Glycoproteomic analysis by LC/MS: Analysis of glycan structure alteration in the cells. *Proteomics*, (in press)
- 4) Akira Harazono, Nana Kawanishi, Satsuki Itoh, Noritake Hashii, Akiko Ishii-watabe, Toru KAWANISHI, and Takao Hayakawa: Site-specific N-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, 348, 259-268 (2006)
- 5) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Yukari Matsuishi, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: N-linked oligosaccharide analysis of rat brain Thy-1 by liquid chromatography with graphitized carbon column/ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes. *J Chromatogr A*. 1103(2), 296-306. (2006)
- 6) Shingo NIIMI, Mizuho HARASHIMA, Masaru GAMOU, Masashi HYUGA, Taiichiro SEKI, Toyohiko ARIGA, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Expression of Annexin A3 in Primary Cultured Parenchymal Rat Hepatocytes and Inhibition of DNA Synthesis by Suppression of Annexin A3 Expression Using RNA Interference, *Biol. Pharm. Bull*, 28, 4242-428 (2005)
- 7) Akira HARAZONO, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA : Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using high-performance liquid chromatography / electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Glycobiology*. 15, 447-462 (2005)
- 8) Hiroshi. Kawai, Takuo Suzuki, Tetsu Kobayashi, Haruna Sakurai, Hisayuki Ohata, Kazuo Honda, Kazutaka Momose, I Namekata, Hikaru Tanaka,

- Koki Shigenobu, Ryu. Nakamura, Takao Hayakawa, and Toru Kawanishi: Simultaneous real-time detection of initiator and effector-caspase activation by double FRET analysis. *J. Pharmacol.Sci.* 97: 361-368 (2005)
- 9) J. Yuan, N. Hashii, N. Kawasaki, S. Itoh, T. Kawanishi, and T. Hayakawa: Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography/ mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1067, 145-152 (2005)
- 10) Niimi, S., Harashima, M., Takayama, K., Hara, M., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T. and Hayakawa, T: Thrombomodulin enhances the invasive activity of mouse mammary tumor cells, *J.Biochem (Tokyo)*, 137, 579-586 (2005)
- 11) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Akira Harazono, Notritake Hashii, Yukari Matsuishi, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Characterization of a gel-separated unknown glycoprotein by liquid chromatography/multiple tandem mass spectrometry. Analysis of rat brain Thy-1 separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Chromatogr A* 1094, 105-1017 (2005)
- 12) Noritake Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Yukari Matsuishi, Takao Hayakawa and Toru Kawanishi: Specific detection of Lewis x-carbohydrates in biological samples using liquid chromatography /multiple-stage tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 3315-3321 (2005)
- 13) 川西 徹: バイオロジクスのトランスレーショナルリサーチ 日薬理誌 126, 427 (2005)
- 14) 新見伸吾、原島瑞、川西徹 早川堯夫、抗体医薬の現状と展望 医薬品研究 36, 163-193 (2005)
- 15) 新見伸吾、原島瑞、日向昌司、野間誠司、川西徹、早川堯夫：肝幹細胞に関する研究の現状と肝疾患の細胞治療への応用の展望 医薬品研究 36, 481-496 (2005)
2. 学会発表
- 1) 石井明子、鈴木琢雄、小林 哲、山口照英、川西 徹：細胞接着活性を持つ組換え人工タンパク質の有用性評価 日本薬学会 第126年会 仙台 (2006, 3)
- 2) 小林 哲、鈴木琢雄、石井明子、川西 徹：MALDI-TOF MS におけるタンパク質のシグナル増強 Part3 日本薬学会 第126年会 仙台 (2006, 3)
- 3) 鈴木琢雄、桜井教美、河合 洋、石井明子、小林 哲、大幡久之、本田一男、川西 徹：Bioimaging of caspase activation during ER stress-induced cell death. 第79回日本薬理学会年会 横浜 (2006, 3)
- 4) 鈴木琢雄、桜井教美、河合 洋、石井明子、小林 哲、大幡久之、本田一男、川西 徹：小胞体ストレスによるカスパーゼ活性化のイメージング 第14回 日本バイオイメージング学会 東京 (2005, 10)
- 5) 小林哲、河合洋、鈴木琢雄、石井明子、早川堯夫、川西 徹：MALDI-TOF MS におけるタンパク質シグナルの増強 Part 2 質量分析総合討論会 埼玉 (2005, 5)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

Table 1. Fibronectin and recombinant cell adhesive proteins used in this study

| Proteins | Structure | Molecular Weight |
|------------------|---|------------------|
| Fibronectin | | 230K x 2 |
| ProNectin F | Head-[(GAGAGS) ₉ GAAVT★GRGDSPPASAAGY] ₁₂ -Tail ★ | 73K |
| ProNectin F Plus | Positively charged, water-soluble variant of Pronectin F | 73K |
| ProNectin L | Head-[(GAGAGS) ₉ GAAPGASIK★VAVSAGPSAGY] ₁₂ -Tail ◆ | 76K |
| RetroNectin | Chimeric peptide of human fibronectin fragment NH ₂ -□□★□□□□-COOH | 63K |
| Attachin | A fusion protein constructed by molecular biotechnology | 30K |

Fibronectin

- ▮ Type I module
- Type II module
- Type III module

- ★: cell attachment sequence derived from fibronectin
- ◆: cell attachment sequence derived from laminin

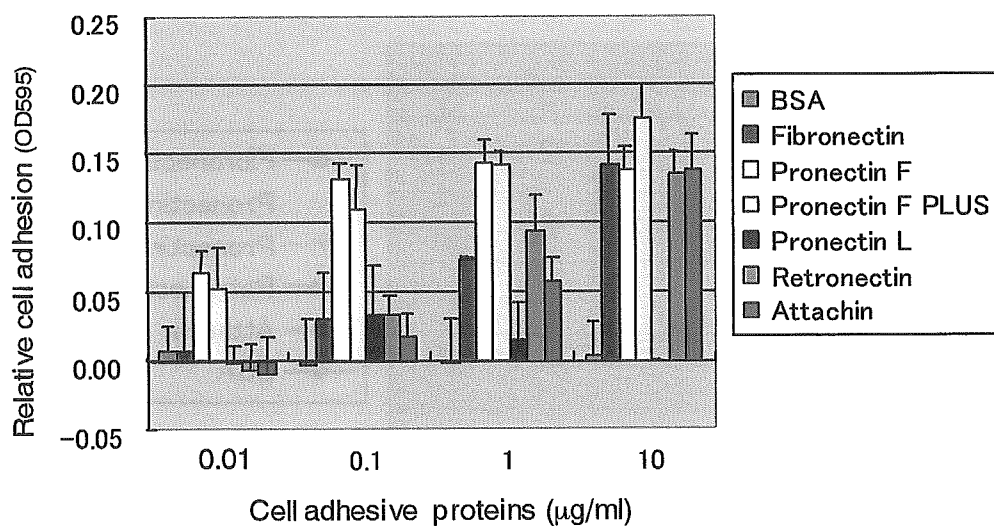


Fig. 1 Adhesion of HUVECs to recombinant cell adhesive proteins. HUVECs were plated into wells previously coated with Fibronectin, Pronectin F, Pronectin F PLUS, Pronectin L, Retronectin, Attachin, or BSA, and then incubated for 1hr at 37°C. Attached cells were fixed and stained with crystal violet and quantified by absorbance reading. Results are expressed as mean value \pm S.D. of triplicate determinations.

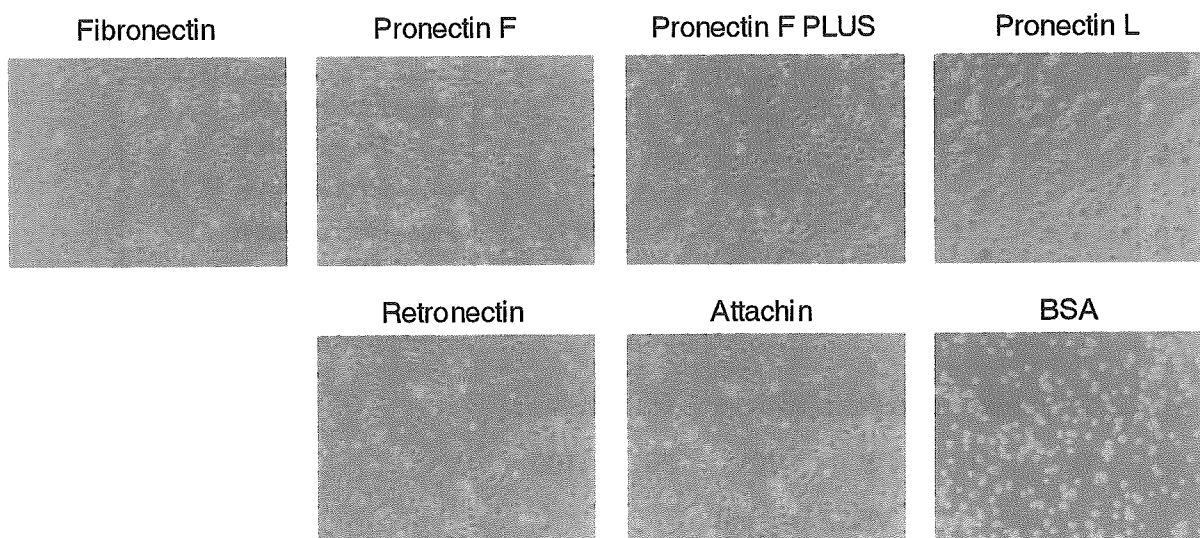


Fig. 2 The phase contrast images of cell attachment and spreading on recombinant cell adhesive proteins.

HUVECs were seeded into wells previously coated with 10 μ g/ml of Fibronectin, Pronectin F, Pronectin F PLUS, Pronectin L, Retronectin, Attachin, or BSA. After 1 hr incubation at 37°C, cells were photographed with an inverted microscope.

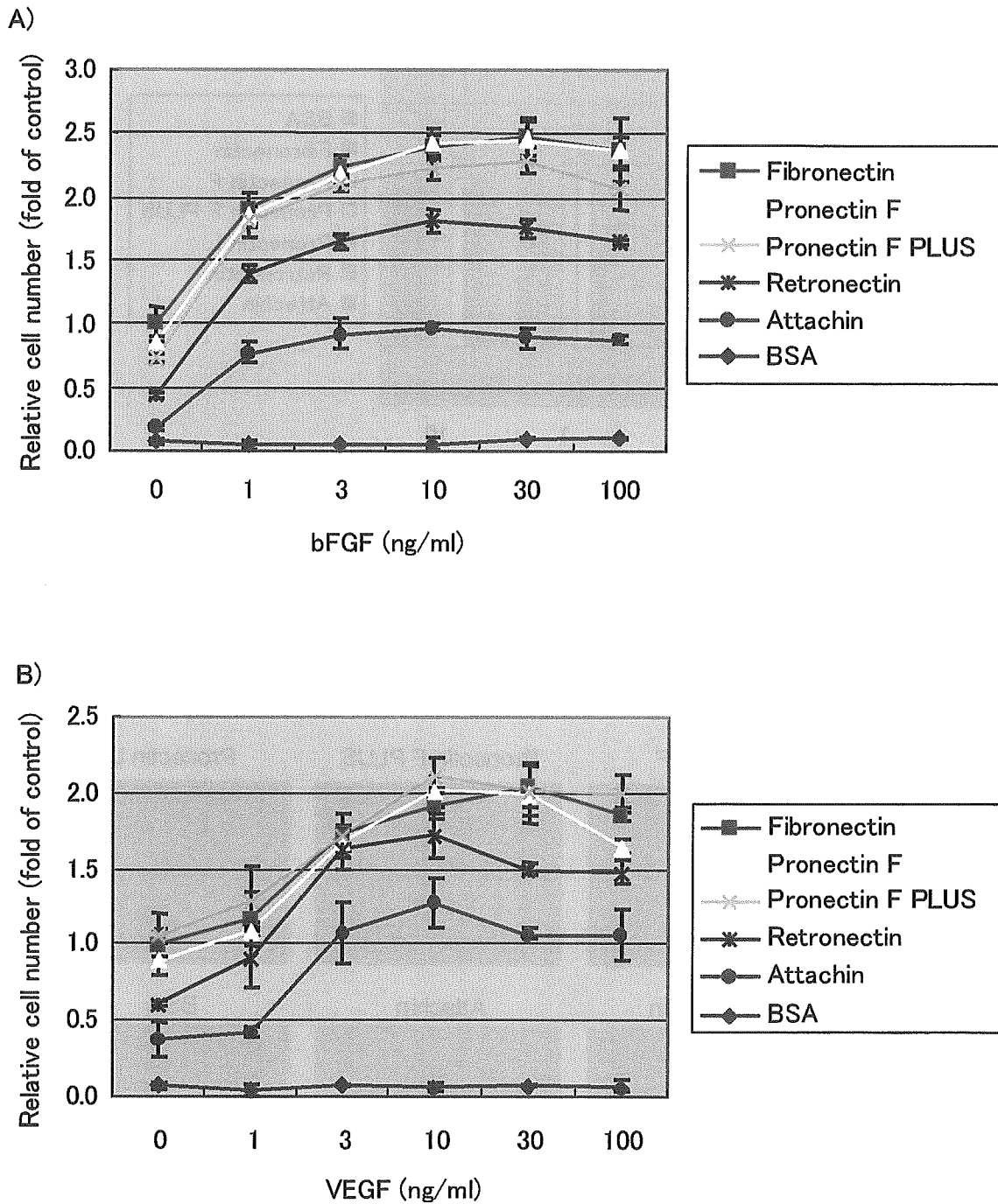


Fig.3 Effects of recombinant cell adhesive proteins on the VEGF- or bFGF-induced cell proliferation.

HUVECs were seeded into wells previously coated with 10 μ g/ml of Fibronectin, Pronectin F, Pronectin F PLUS, Retronectin, Attachin, or BSA, and cultured for 2 days in the presence or absence of bFGF (A) or VEGF(B) at the indicated concentrations.

The relative cell number was examined using cell counting kit-8. Results are expressed as mean value \pm S.D. of triplicate determinations.