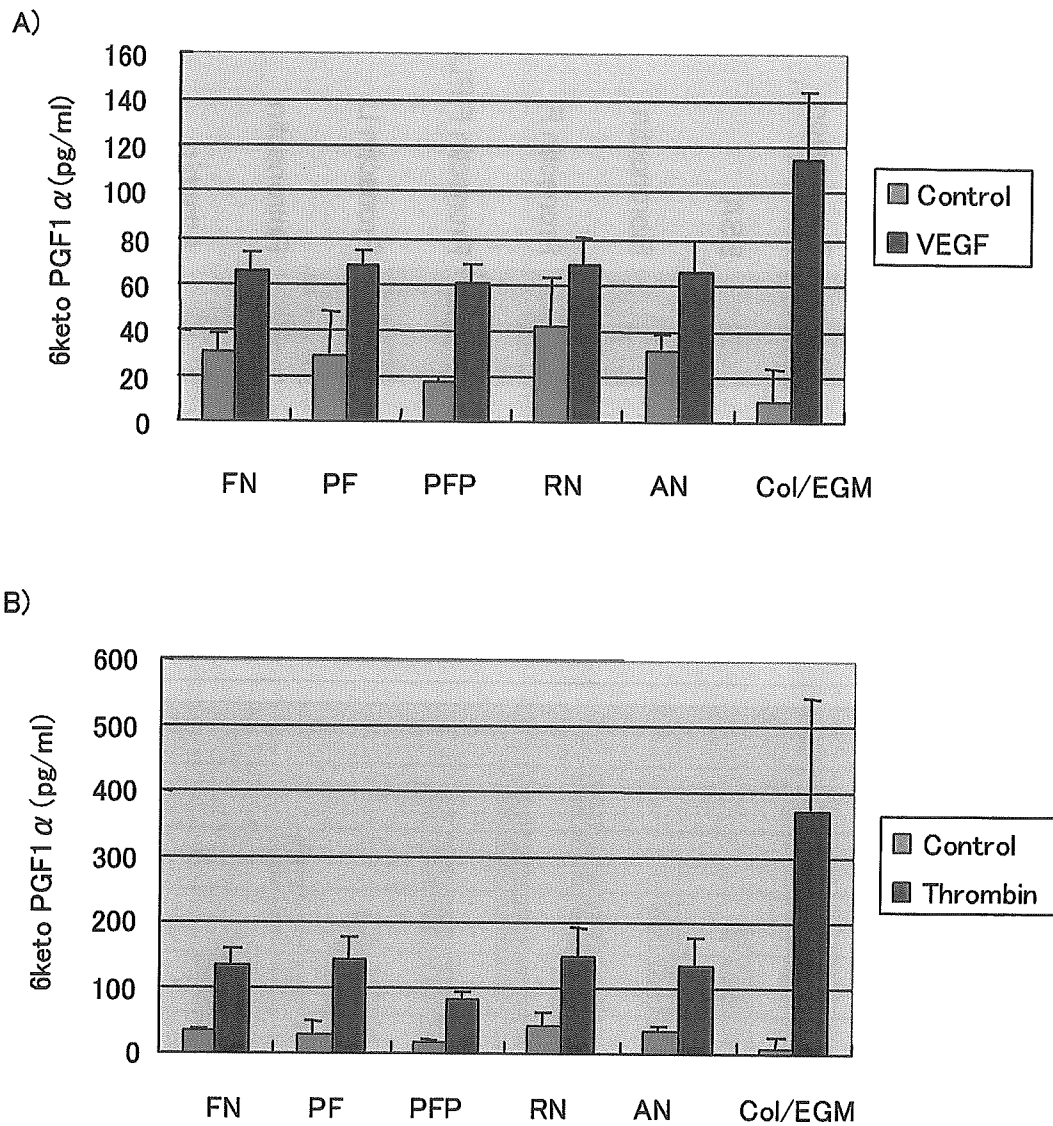
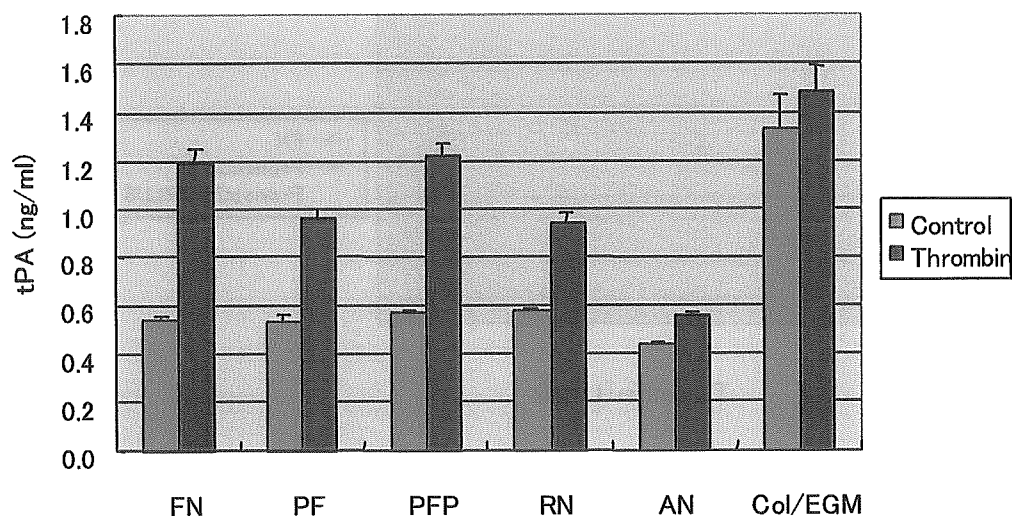


**Fig. 4 FAK activation in HUVECs adhered to recombinant cell adhesive proteins.** HUVECs, cultured in serum-containing EGM-2 media on collagen-coated plates, were harvested and held in suspension for 2hr at 37 °C, then plated onto precoated plates with 10  $\mu$ g/ml of Fibronectin, Pronectin F, Pronectin 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.



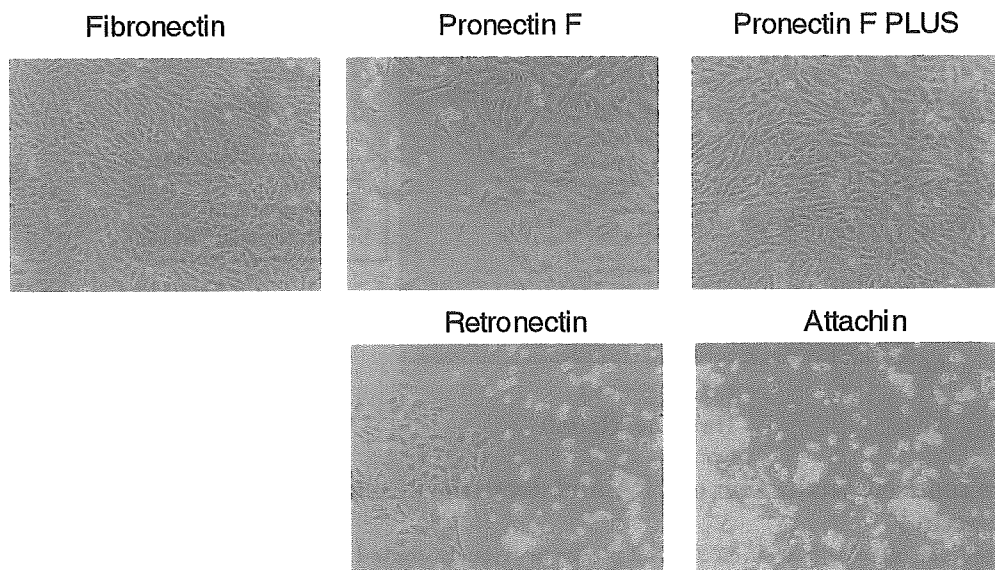
**Fig. 5 Effects of cell adhesive proteins on the VEGF- or thrombin- stimulated production of Prostaglandin I<sub>2</sub>.**

HUVECs were seeded at  $7 \times 10^4$  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  $\alpha$  concentration was determined by enzyme immunoassay. Results are expressed as picogram of PGF1  $\alpha$  /ml of supernatant and represent the mean  $\pm$  S.D. of triplicate determinations. 6-keto PGF1  $\alpha$  production from HUVECs cultured in serum-containing growing media (EGM-2) plated on collagen-coated dish was also examined (Col/EGM).



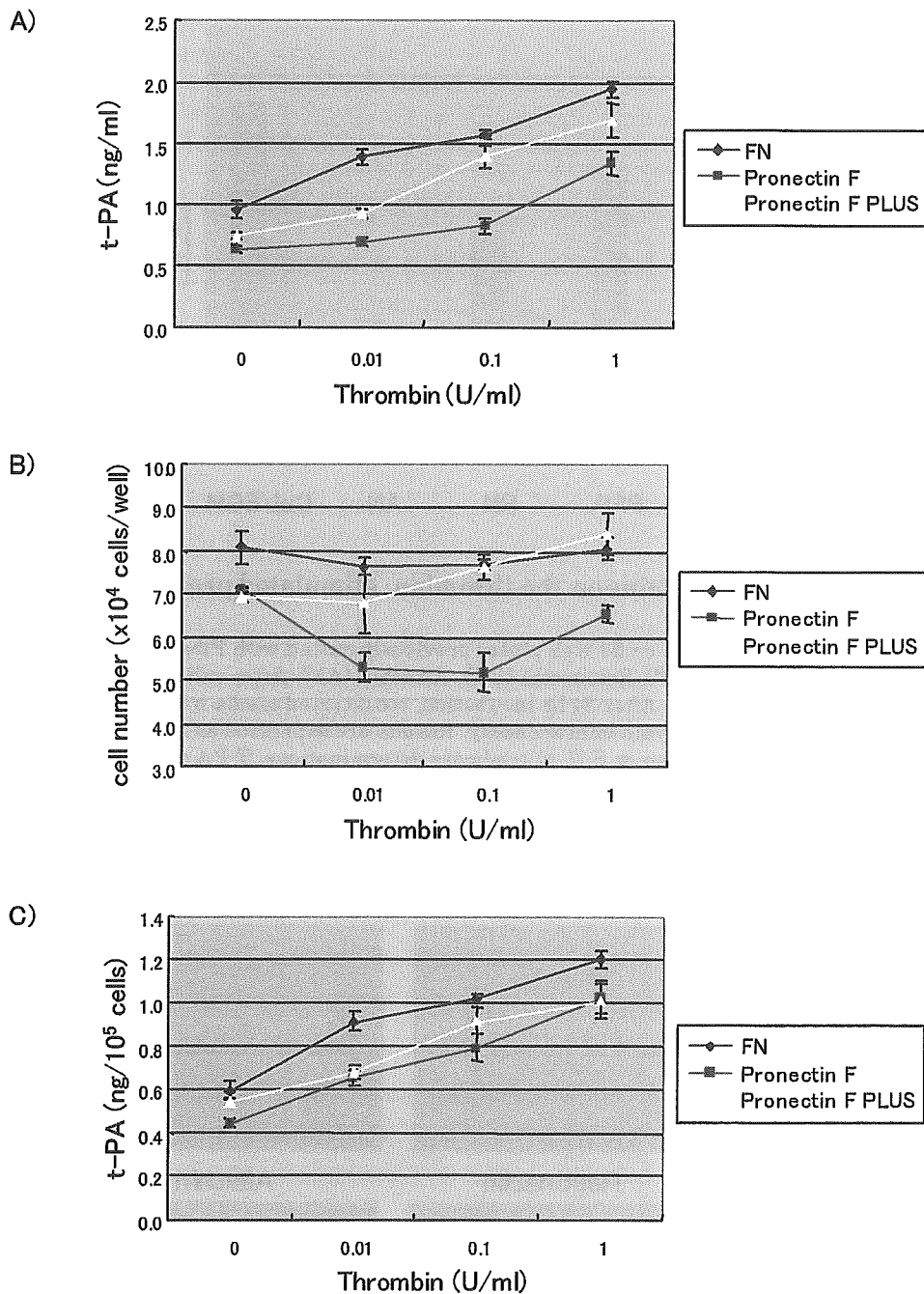
**Fig. 6 Effects of cell adhesive proteins on the thrombin-stimulated production of tissue plasminogen activator.**

HUVECs were seeded at  $7 \times 10^4$  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. 7 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.



**Fig. 8 Thrombin induced production of t-PA and decrease in viability of HUVECs adhered on Pronectin F.**

HUVECs were seeded at  $7 \times 10^4$  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.

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）  
分担研究報告書

細胞組織利用医薬品のウイルス安全性に関する研究

分担研究者 内田 恵理子 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部第1室長

細胞組織利用医薬品のウイルス安全性に関する研究として、ウイルス等の感染性因子の高感度検出のための基盤技術の開発を検討した。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、ポリエチレンイミン（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。ウイルス濃縮法の最適化条件としては、分子量 70,000 の PEI 磁気ビーズを用いて弱酸性条件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、血清中のウイルス濃縮時に補体や IgM 抗体が同時に濃縮されることなどを明らかにした。また、これらの結果に基づいて、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮時に IgM 抗体や補体を添加したところ、PEI 磁気ビーズ単独では濃縮されないポリオウイルスも濃縮可能となった。さらにこれらの最適化条件を用いてヒト感染性ウイルスへの適用を検討した結果、A 型肝炎ウイルス（HAV）、B 型肝炎ウイルス（HBV）、C 型肝炎ウイルス（HCV）の濃縮に適用可能であり、HBV については抗ウイルス抗体の利用によりさらに濃縮効率の向上が可能であった。これらの結果より、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮法は、細胞組織利用医薬品のウイルス安全性確保上問題となるヒト感染性ウイルスの高感度検出にも有用な方法であることが明らかとなった。

研究協力者

米須 杏子 国立医薬品食品衛生研究所  
小木美恵子 金沢工業大学  
佐藤 功栄 埼玉県赤十字血液センター  
研究部  
岩田 明子 埼玉県赤十字血液センター  
研究部

な疾患の治療に用いる細胞・組織加工医薬品・医療用具（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薬品として用いる治療法はガン、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞などの致命的な疾患、あるいは糖尿病、リウマチ、骨粗しょう症、重篤な肝疾患、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の開発が進められているが、本格的な実用化に至るためには検討すべき課題は多い。

**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、加工し、様々

なかでも重要な課題となるのが細胞組織利用医薬品の品質、安全性の確保である。細胞組織利用医薬品の安全性面での最重要課題はウイルス等の感染症の伝播をいかに防止するかである。細胞組織利用医薬品には原料である細胞、組織に由来するウイルス等の感染性因子や製造工程で用いる血清や添加剤等から迷入する感染性因子による汚染のリスクが存在する。しかし、細胞組織利用医薬品はその性質上、ウイルス等の感染性因子を不活化・除去するための滅菌や高度な精製といった処理を行うことが困難であるため、ウイルス等の感染性因子が混入していると患者や患者の家族等に感染が広がる危険性がある。従って細胞組織利用医薬品ではドナースクリーニング等の検査を行うことによる原材料の安全性確保、及び製造工程中での生物由来原料に由来する汚染リスクの低減が求められる。

本研究では、細胞組織利用医薬品のウイルス安全性に関する研究として、ウイルス等の感染性因子の高感度検出技術の開発及び安全性評価技術の開発に関する研究を行うことを目的とする。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を開発を目的として、ポリエチレンイミン (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を行った。

## B. 研究方法

### (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、ブタバルボウイルス (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。

### (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 $\mu\text{L}$  (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オリジナルのウイルス液 100 $\mu\text{L}$  の各液にウイルスゲノム抽出液 (スマイテスト EX-R&D、(株)医学微生物学研究所) 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。

### (3) ウイルスゲノムの定量

抽出したウイルス核酸は TE 50 $\mu\text{L}$  あるいは 100 $\mu\text{L}$  に溶解し、10 $\mu\text{L}$  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 Table 1 に示す。

#### (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。

#### (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について、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。

#### (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) で分画した。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。

#### (7) PEI 結合カラムの作成とカラムへのタンパク質の吸着

ブ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 抗体について、1~1.5mg/ml の濃度の溶液を調製し、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。

#### (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。

#### (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 $\mu$ L を加え、定法に従い濃縮操作を行った。

#### 倫理面への配慮

動物実験を行う際には、動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施した。

## C. 結果

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) 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を得られるが、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 (Fig.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

縮効率を得られることが明らかとなった (Fig.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 (Fig.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 (Fig.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 (Fig.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 (Fig.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 (Fig.6)。

## (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 (Fig.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 (Fig.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 (Fig.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 (Fig.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 Table 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。

## D. 考察

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の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。

## E. 結論

細胞組織利用医薬品のウイルス安全性に関する研究として、ウイルスの高感度検出のための 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、分子量 70,000 の PEI 磁気ビーズを用いて弱酸性条件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、ウイルス濃縮時に補体や 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 にも適用可能であり、細胞組織利用医薬品のウイルス安全性確保上問題となるヒト感染性ウイルスの高感度検出にも有用な方法であることを明らかにした。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 内田恵理子、小木美恵子、米須杏子、永田龍二、村田充弘、日方幹雄、佐藤功栄、岩田明子、山口照英：医薬品のウイルス安全性確保のための高感度ウイルス検出法の開発ーポリエチレンイミン結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法のヒトウイルスへの適用ー；日本薬学会第 126 年会 2006 年 3 月
- 2) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：造血支持能を持つフィーダー細胞の解析について；第 5 回日本再生医療学会総会；2006 年 3 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

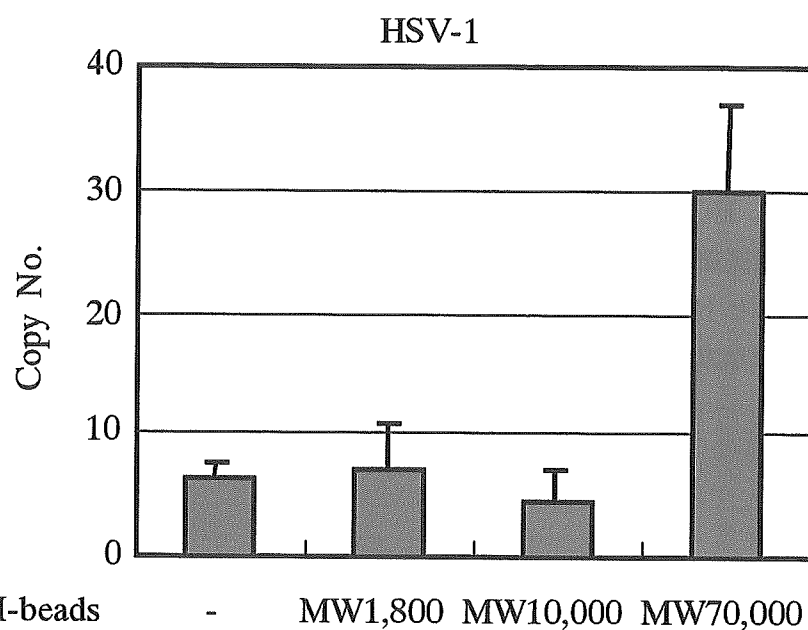


Fig.1 ポリエチレンイミンの分子量とウイルス濃縮効率

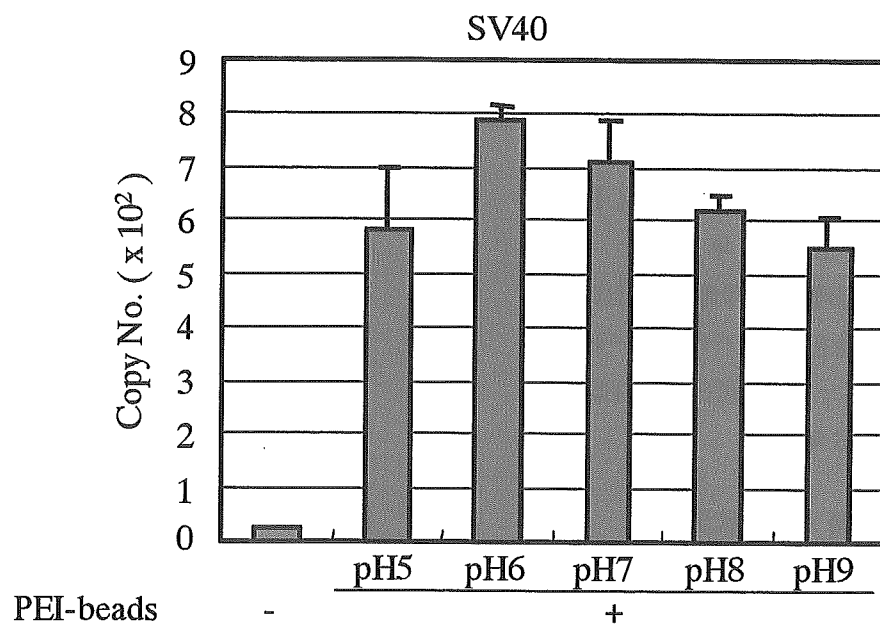


Fig.2 PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮効率のpHによる変化

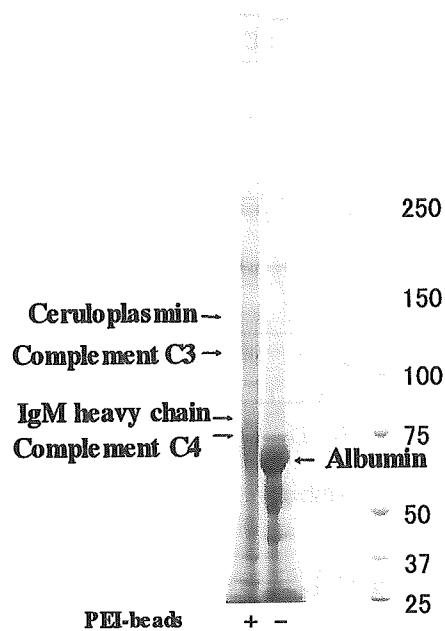


Fig.3 PEI磁気ビーズにウイルスと共に濃縮される血清成分中の蛋白質のMS/MSによる同定

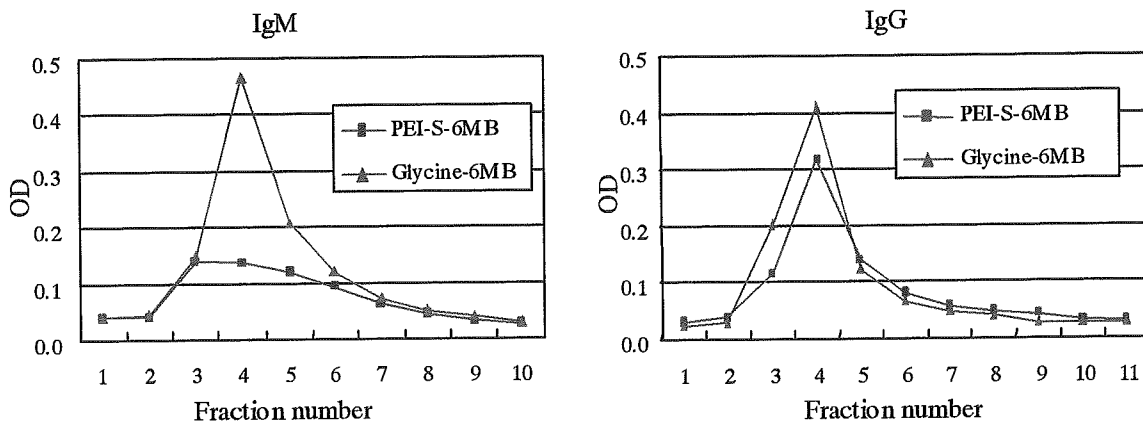


Fig.4 PEI-セファロースカラムへの抗体の吸着

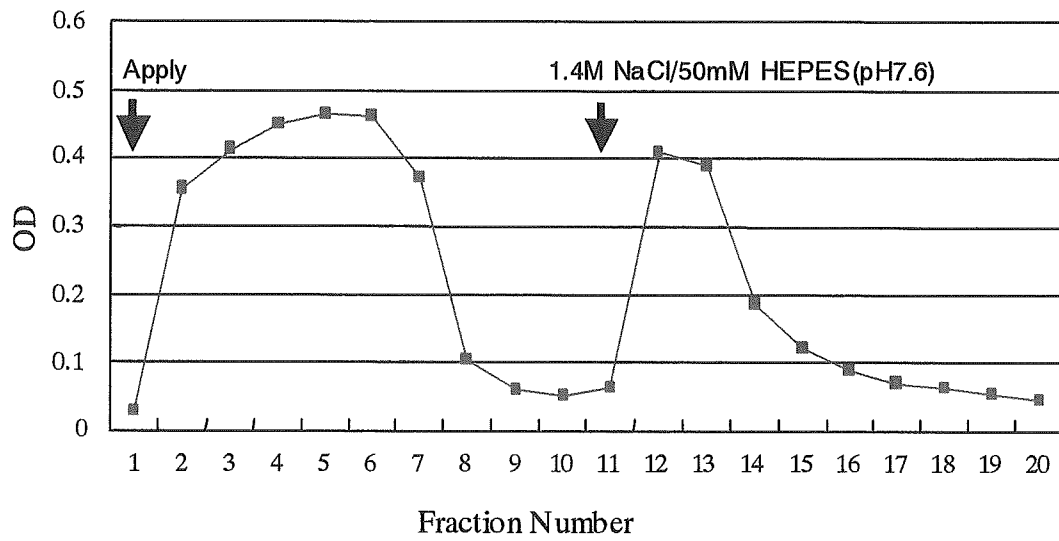


Fig.5 PEI-セファロースカラムによる抗マウスIgG-ウサギIgM抗体の精製

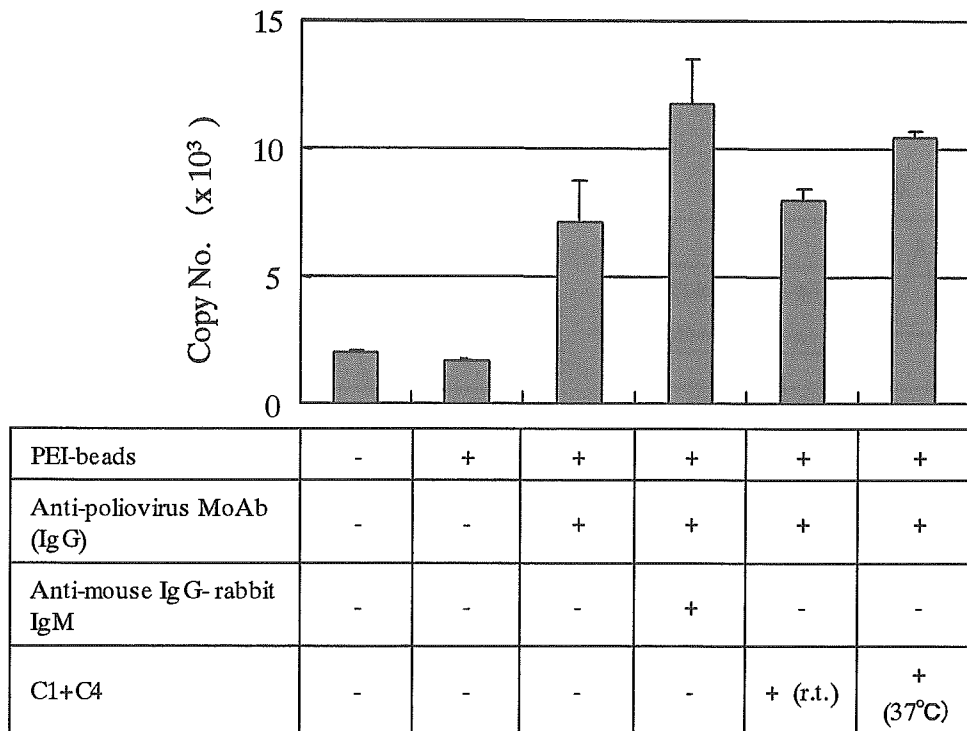


Fig.6 抗体、補体存在下でのPEI磁気ビーズによるポリオウイルスの濃縮

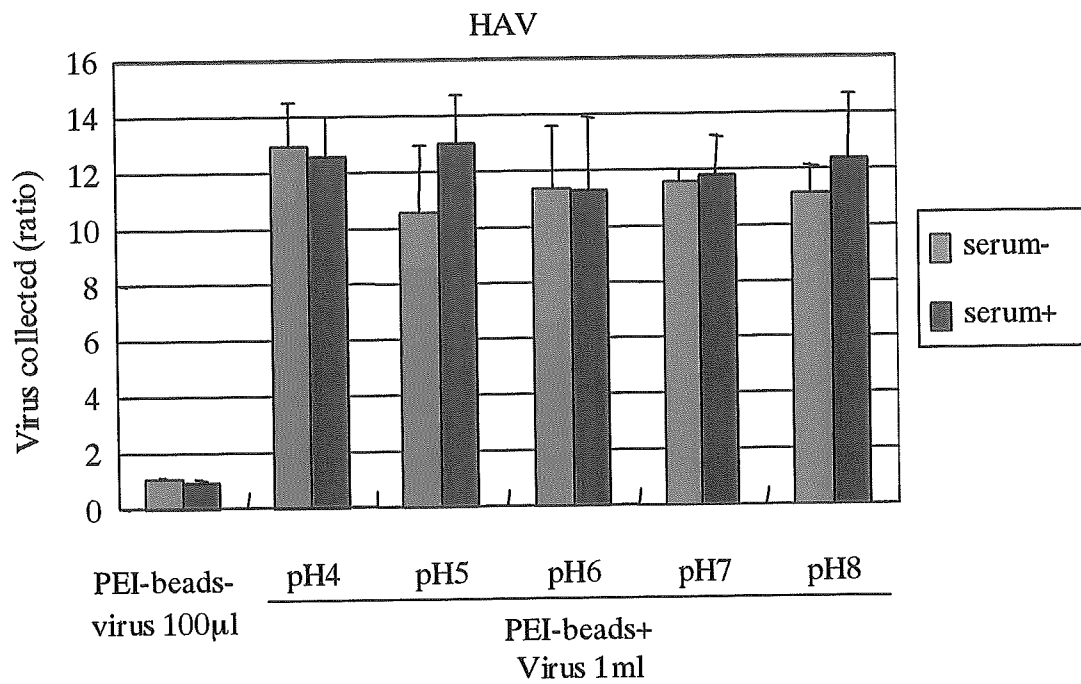


Fig.7 PEI磁気ビーズによるHAVの濃縮

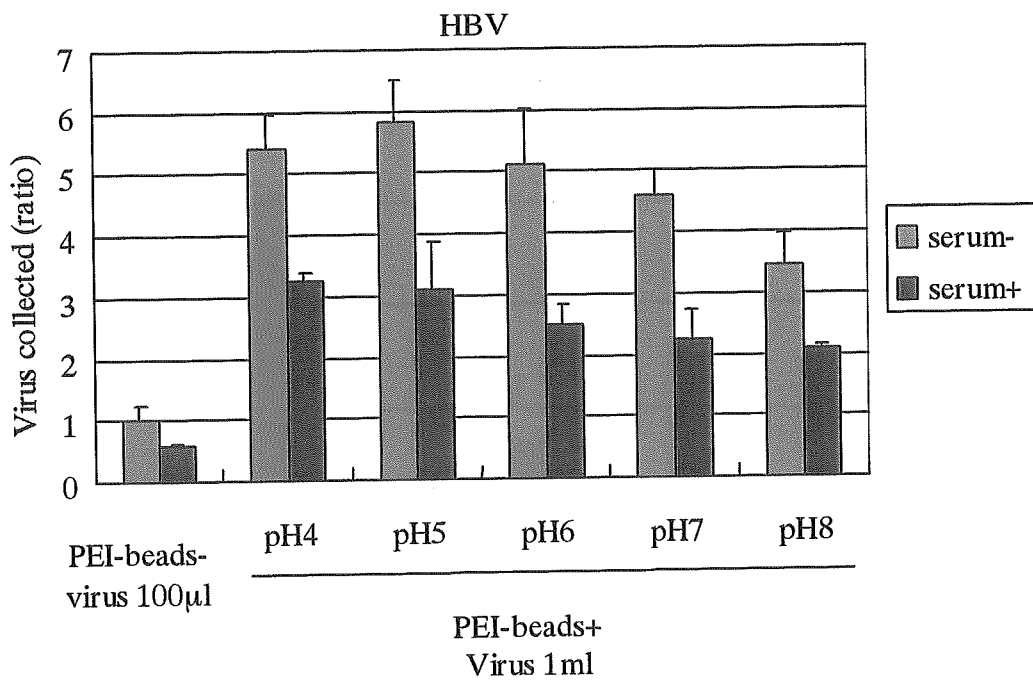


Fig.8 PEI磁気ビーズによるHBVの濃縮

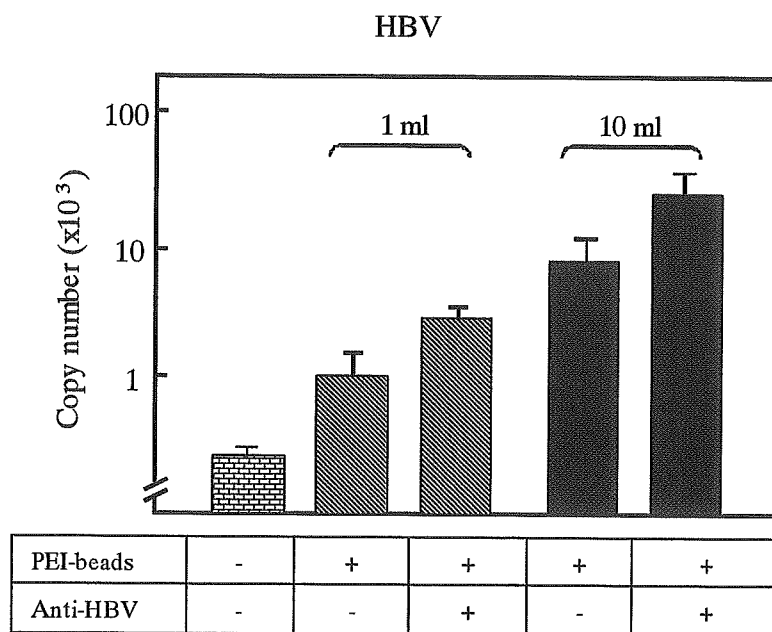


Fig.9 PEI磁気ビーズによるHBVの濃縮に対する抗HBV抗体の影響

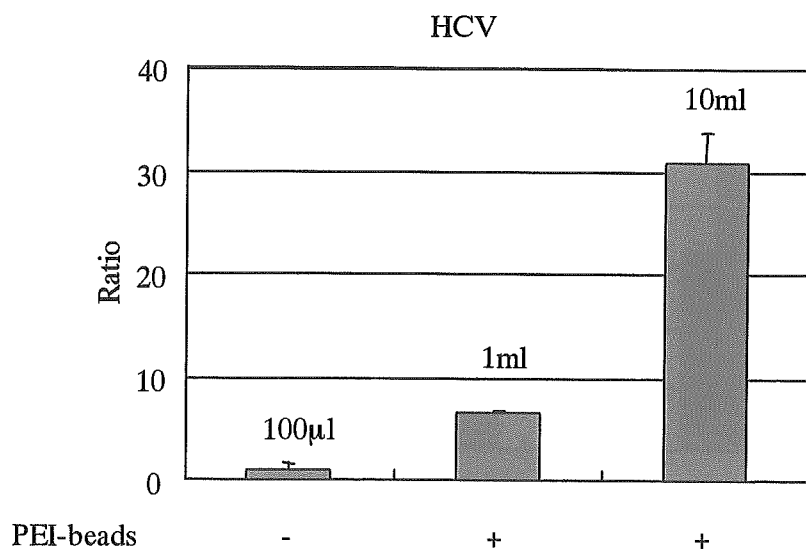


Fig.10 PEI磁気ビーズによるHCVの濃縮



細胞特性解析技術の開発

分担研究者 佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部・第二室・室長

〔研究要旨〕細胞組織利用医薬品の品質・安全性の確保のために必要な細胞特性評価を行う技術を開発する目的で、以下のような研究を行った。幹細胞から分化する細胞の特性解析を行うためにマウス幹細胞株 P19 細胞および P19 細胞由来のサブラインをモデルにして、多能性細胞のなかでも心筋細胞に効率的に分化する細胞を特徴付ける遺伝子発現のプロファイリングを行った。得られたプロファイルをもとに、心筋細胞への分化と相関する遺伝子の発現に対して RNA 干渉 (RNAi) を行い、特定の遺伝子の発現と心筋細胞分化との因果関係を検討し、その細胞特性指標としての有用性を評価した。また、幹細胞における脂肪細胞分化に必要な因子をマウス幹細胞株 10T1/2 細胞を用いて探索した。脂肪細胞分化においては細胞内カルシウムが重要な働きをすることが知られているが、カルシウムの細胞質への流入経路は不明であった。本研究の結果、TRP カチオンチャネル (transient receptor potential cation channel) が脂肪細胞分化を誘導するカルシウム流入の経路となりうることが明らかとなり、これら TRP チャネルの発現が細胞指標として有用であることが示唆された。

**A. 研究目的**

疾患や事故により損なわれた細胞の機能を回復させるための方法として、臓器移植技術や人工臓器の技術が進んでいる。しかし、臓器移植には臓器提供者の不足、脳死判定の難しさ、拒絶反応、医療費などの多くの問題があり、また人工臓器も十分に機能を果たすものの開発が遅れているため、誰もが容易に享受できる医療とはなっていない。近年のバイオテクノロジーをはじめとした科学技術の進歩により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養・加工した後に損傷部位に移植することで本来の機能を回復させる、いわゆる再生医療が誕生してきた。幹細胞技術の進歩により、いかなる組織の

細胞にも幹細胞を分化誘導できる可能性が示され、また自己の細胞を用いれば移植による拒絶反応も回避することが出来、致命的疾患や不可逆的組織損傷の治療への応用に大きな期待が寄せられている。細胞移植治療としては、培養皮膚の移植による熱傷などの治療、培養羊膜および培養角膜の移植による眼疾患治療、閉塞性動脈硬化症および心筋梗塞病巣に対する幹細胞移植による血管再生、非荷重部軟骨細胞および間葉系幹細胞による関節軟骨欠損部の治療など、著明な臨床的有効性がすでに報告されている例も数多く存在する。しかしながら、積極的に細胞移植治療の様々な方法が開発されつつある一方、医薬品としての細胞治療

薬の品質および安全性の確保を行うための評価技術に関して、必ずしも十分な検討が行われているとは言えない。細胞を生体外で培養・加工するために混入の可能性がある感染性物質や汚染物質の排除はもとより、細胞の安定性や腫瘍原性の問題、免疫原性、細胞の純度・同一性の評価方法など、検討すべき課題は多い。また、幹細胞技術は進歩したものの、幹細胞から目的細胞までの分化機構が分子レベルで完全に解明されてはいない。そのため、医薬品としての細胞が治療に用いられた場合に生体内で予期せぬ、かつ生体に悪影響を及ぼす挙動を示す副作用の可能性、あるいは生着せず効果が認められない可能性がある。こうした可能性を予測および制御する方法を開発するにも科学的な根拠が不可欠である。

本研究では細胞・組織利用医薬品に用いられる細胞の品質や安全性を確保するため、細胞の特性を迅速かつ高精度に評価する方法の開発を行う。具体的には、分化に至るために重要な役割を果たすマーカー遺伝子やタンパク質、目的の方向に分化する細胞を識別する指標となるマーカー遺伝子およびタンパク質を探索する。標的細胞の特性を代表するマーカー遺伝子群およびマーカータンパク質群を同定し、複数のマーカー群の発現解析により構築される細胞特性の評価システムの妥当性および応用可能性を検討する。

細胞特性解析システムを構築するためのモデルとして用いる細胞にはジメチルスルホキシド (DMSO) による処理で心筋細胞に分化するマウス胚性腫瘍細胞株、P19 細胞およびそのサブラインを選択した。P19

細胞はレチノイン酸処理により神経細胞にも分化する多分化能をもつ細胞である。一般に胚性幹細胞 (ES 細胞) や組織幹細胞の培養ではフィーダー細胞が必要であるなど培養系が煩雑となることが多いが、本研究で採用した細胞の培養にはフィーダー細胞が必要ではなく、分化過程の解析から複雑な要因を排除できるとともに操作が容易であり、また分化誘導も長時間を要せずに解析できる利点がある。P19 細胞のサブラインである CL6 細胞も P19 細胞と同様に多分化能を有しているが、接着培養条件下で DMSO 処理することのみで、P19 細胞に比してより効率的に心筋細胞へと分化させることが可能なことが明らかにされている。

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」において我々は CL6 細胞から更なるサブラインを樹立し、P19 細胞と CL6 細胞、および CL6 細胞由来の数種の細胞株における「分化誘導後」の心筋細胞マーカーの発現を解析することにより、それぞれの心筋分化効率を検討した。また、P19 細胞と CL6 細胞、および CL6 細胞由来の 4 種の細胞株における「分化誘導前」の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより解析し、細胞の心筋細胞への分化過程と相関する遺伝子群 (心筋分化予測マーカー候補遺伝子、*cardiomyogenesis predictor candidate genes*、CMP 遺伝子群\*) を同定することに成功した。そこで本年度は、同定された CMP 遺伝子について RNA 干渉 (RNAi) によりその発現を抑制することを試み、未分化状態における CMP 遺伝子の発現が心

筋細胞分化に及ぼす影響について検討を行った。(\*注：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」において同遺伝子群をCPCと略したが、“cell processing center”あるいは“circulating progenitor cell”などが再生医療分野および幹細胞研究分野で同様に略称されるため、混乱を避けるために本年度は同遺伝子群をCMP遺伝子群と略す。)

さらに細胞特性指標の解明の一環として、本年度は心筋細胞に加え、脂肪細胞の分化に関する研究を行った。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応される可能性がある。また、糖尿病をはじめとするメタボリックシンドロームの病態の本質が、生活習慣病による脂肪細胞や血管構成細胞の機能異常にあると捉えられるようになってきており、これに伴って幹細胞の脂肪細胞への分化能を応用した再生医療は形成外科的目的以外に、脂肪細胞から分泌されるホルモン(アディポサイトカイン)の供給源として肥満及び生活習慣病の治療のために臨床応用されることも期待されている。インスリン抵抗性改善薬として知られているチアゾリジン系薬剤は、脂肪細胞分化のマスターキー因子としてペルオキシゾーム増殖薬活性化受容体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )に結合し、PPAR $\gamma$ の活性を上昇させて前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を促進し、インスリン抵抗性を改善させる作用を有することが知られている。一方、幹細胞および脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化誘導初期において短時間に細胞内のカルシウムイオン濃

度が上昇すると脂肪細胞への分化は抑制されるが、分化誘導後期に細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇すると脂肪細胞分化は促進されることが明らかになっている。そこで本研究では脂肪細胞分化に促進的に作用するイオンチャネルを同定し、それを脂肪細胞の分化能の指標することを目的とし、まずは、TRPカチオンチャネル(transient receptor potential cation channel)が脂肪細胞の分化能の指標に有用ではないか、という仮説を立て、TRPカチオンチャネルの制御剤の脂肪細胞分化に対する影響について検討した。その結果、TRPカチオンチャネルの制御剤が幹細胞からの脂肪細胞分化を誘導することを初めて明らかにすることに成功した。

## B. 実験材料と方法

1. 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

### 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 $\alpha$ 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 $\alpha$  Minimum Essential Medium [ $\alpha$ MEM, SIGMA]を用い、直径100mmの細胞培養ディッシュ(Falcon)上で、5%CO<sub>2</sub>存在下37°C、サブコンフルエントの状態を培養した。

## 2) P19細胞由来細胞株に対するRNA干渉

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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>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100 $\mu$ L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<sub>2</sub>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の量により正規化した。

## 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回洗浄し、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<sub>2</sub>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