

への分化は単位面積あたりの拍動するノジュール数によって判定した。

2. 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

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 1.5×10^4 cells/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。

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正規化した値を算出し、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。

<倫理面への配慮>

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することとした。

C. 結果

1. CMP 遺伝子に対する RNAi

図 1 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 2 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 3 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 4 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。

2. 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のアゴニストが、脂肪細胞の分化に関与するかどうかを調べるため、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 5 に示す。図 5 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нта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1)。

次に、TRPV1以外のTRPカルシウムチャ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)およびシナナムアルデヒド(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2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。

D. 考察

1. CMP遺伝子の心筋細胞分化への関与

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

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。

2. TRP チャンネルを介した脂肪細胞分化

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。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 カチオンチャンネルが有用であるという仮説を立て、これを検証する一環として TRP カチオンチャンネル制御剤の脂肪細胞分化に対する影響について検討した。

本研究により、TRP カチオンチャンネルのアゴニスト、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能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能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。

E. 結論

(1) 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。その結果、今回検討した CMP 遺伝子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た。

(2) TRP カチオンチャネルのアゴニスト、中でも TRPV1 チャ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、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の高い幹細胞集団の分離ができる可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 研究論文

- 1) Minamisawa S, Uemura N, Sato Y, Yokoyama U, Yamaguchi T, Inoue K, Nakagome M, Bai Y, Hori H, Shimizu M, Mochizuki S, Ishikawa Y. Post-transcriptional down-regulation of sarcolipin mRNA by triiodothyronine in the atrial myocardium. *FEBS Lett.* 2006 (in press)
- 2) Tamehiro N, Sato Y, Suzuki T, Hashimoto T, Asakawa Y, Yokoyama S, Kawanishi T, Ohno Y, Inoue K, Nagao T, Nishimaki-Mogami T. Riccardin C: a natural product that functions as a liver X receptor (LXR) α agonist and an LXR β antagonist. *FEBS Lett.* 2005; 579: 5299-304.
- 3) Sato Y, Nakamura R, Satoh M, Fujishita K, Mori S, Ishida S, Yamaguchi T, Inoue K, Nagao T, Ohno Y. Thyroid hormone targets matrix Gla protein gene associated with vascular smooth muscle calcification. *Circ Res.* 2005; 97: 550-7.
- 4) Kanayasu-Toyoda T, Fujino T, Oshizawa T, Suzuki T, Nishimaki-Mogami T, Sato Y, Sawada J, Inoue K, Shudo K, Ohno Y, Yamaguchi T. HX531, a retinoid X receptor antagonist, inhibited the 9-cis retinoic acid-induced binding with steroid receptor coactivator-1 as detected by surface plasmon resonance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005; 94:

303-9.

5) Nishida M, Tanabe S, Maruyama Y, Mangmool S, Urayama K, Nagamatsu Y, Takagahara S, Turner JH, Kozasa T, Kobayashi H, Sato Y, Kawanishi T, Inoue R, Nagao T, Kurose H. G alpha 12/13- and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase by angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2005; 280: 18434-41.

2. 学会発表

1) Sato Y, Nagao T. Matrix Gla Protein Gene Identified as a Direct Target of Thyroid Hormone in Vascular Smooth Muscle Cells. 第70回記念日本循環器学会総会・学術集会 (2006年3月)

2) 吉田ひろみ, 為広紀正, 最上知子, 井上和秀, 大野泰雄, 長尾拓, 佐藤陽治. CapsaicinによるPPAR γ とPPAR α 活性制御. 日本薬学会第126年会 (2006年3月)

3) Hiraiwa M, Saito M, Nakahara T, Sato Y, Nagao T, Sakamoto K, Ishii K. All-trans retinoic acid reduces neuronal cell death induced by intravitreal injection of NMDA in the rat retina. 第79回日本薬理学会年会 (2006年3月)

4) Yoshida H, Tamehiro N, Nishimaki-Mogami T, Inoue K, Ohno Y, Nagao T, Sato Y. PPAR γ partial agonist activity and PPAR α inverse agonist

activity of capsaicin. 第79回日本薬理学会年会 (2006年3月)

5) Yamazaki Y, Kawano Y, Yoshida H, Sato Y, Uebayashi M. Natural and synthetic phenolic amides and esters with adiponectin production enhancing activity in cultured human preadipocytes and diabetic mice. The 10th Adiposcience Symposium (2005年8月)

6) 佐藤光利, 中村亮, 藤下加代子, 森聡子, 石田誠一, 山口照英, 井上和秀, 長尾拓, 大野泰雄, 佐藤陽治. ラット血管平滑筋における甲状腺ホルモンの石灰化抑制作用. 第7回応用薬理学シンポジウム (2005年8月)

7) 南沢享, 横山詩子, 佐藤陽治, 岩本眞理, 横田俊平, 石川義弘. ビタミンAがラット動脈管遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響. 第4回小児心臓血管発生研究会 (2005年7月)

8) 吉田ひろみ, 為広紀正, 橋本敏弘, 最上知子, 山口照英, 大野泰雄, 長尾拓, 浅川義範, 井上和秀, 佐藤陽治. イチョウ成分ギンコール酸とその類似体のPPAR γ ならびにPPAR α 活性化に対する作用. 第112回日本薬理学会関東部会 (2005年6月)

9) 佐藤陽治. 血管石灰化と甲状腺ホルモン. 第112回日本薬理学会関東部会シンポジウム (2005年6月)

10) 山崎幸苗, 河野泰広, 吉田ひろみ, 佐藤陽治, 上林正巳. フェルラ酸アミド誘導体と不飽和脂肪酸によるアディポネクチンの産生増強. 日本農芸化学会2006年度大

会（2006年3月）

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 特記事項なし

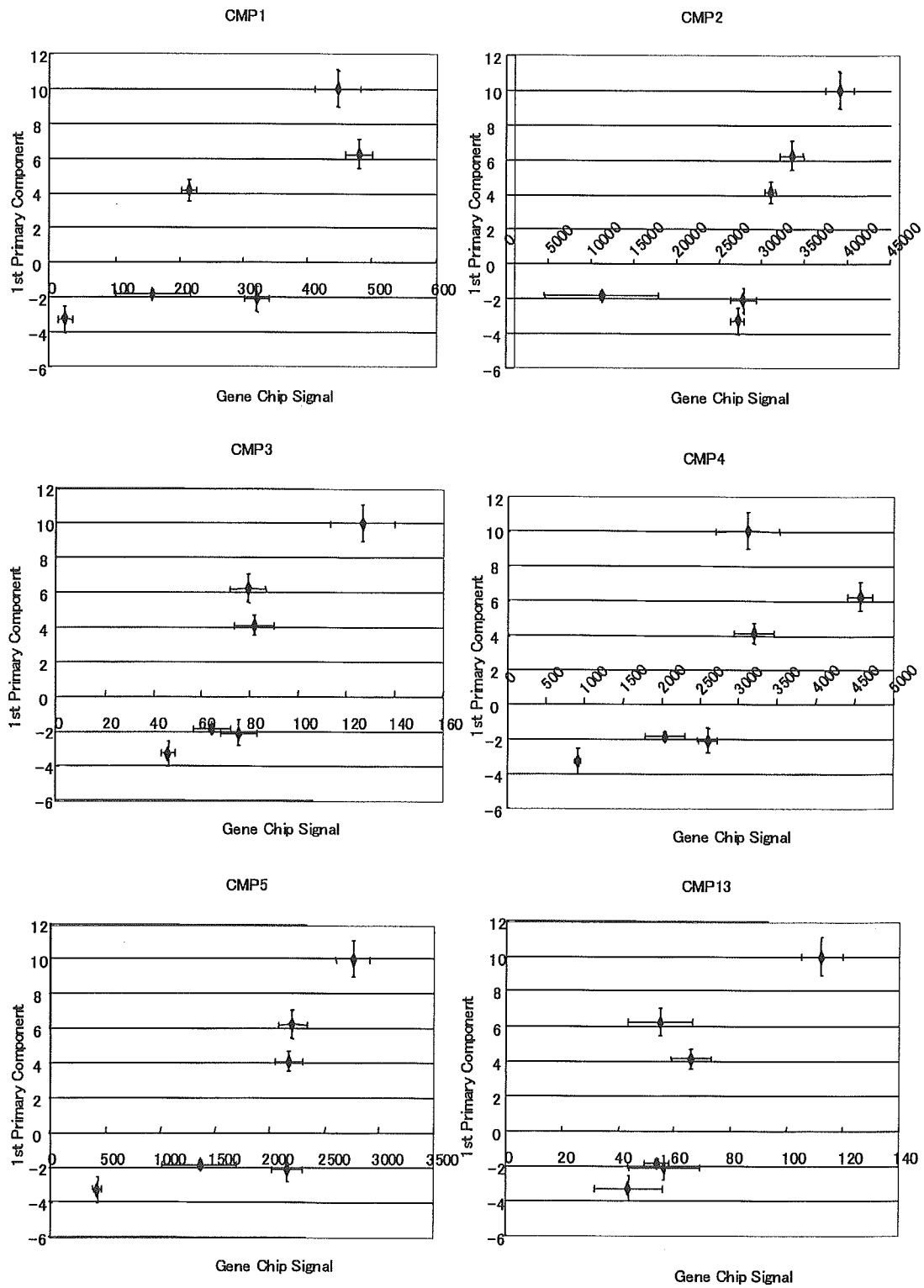
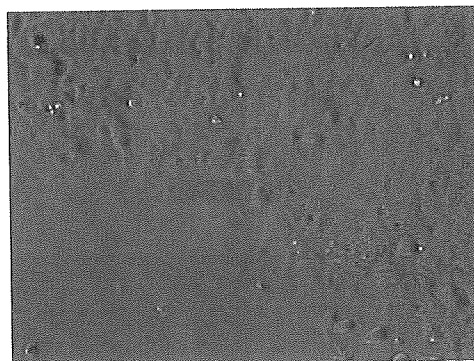


図1 CMP遺伝子の発現と細胞株の心筋分化傾向の相関
 [各細胞株の平均値±S. E. M. (n=5-6)]

蛍光像 (BLOCK-iT
= 蛍光StealthRNAi)



位相差像



重ね合わせ

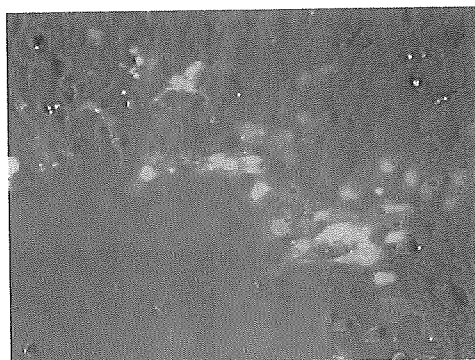


図2 CL6G52細胞へのStealth RNAiのトランスフェクション

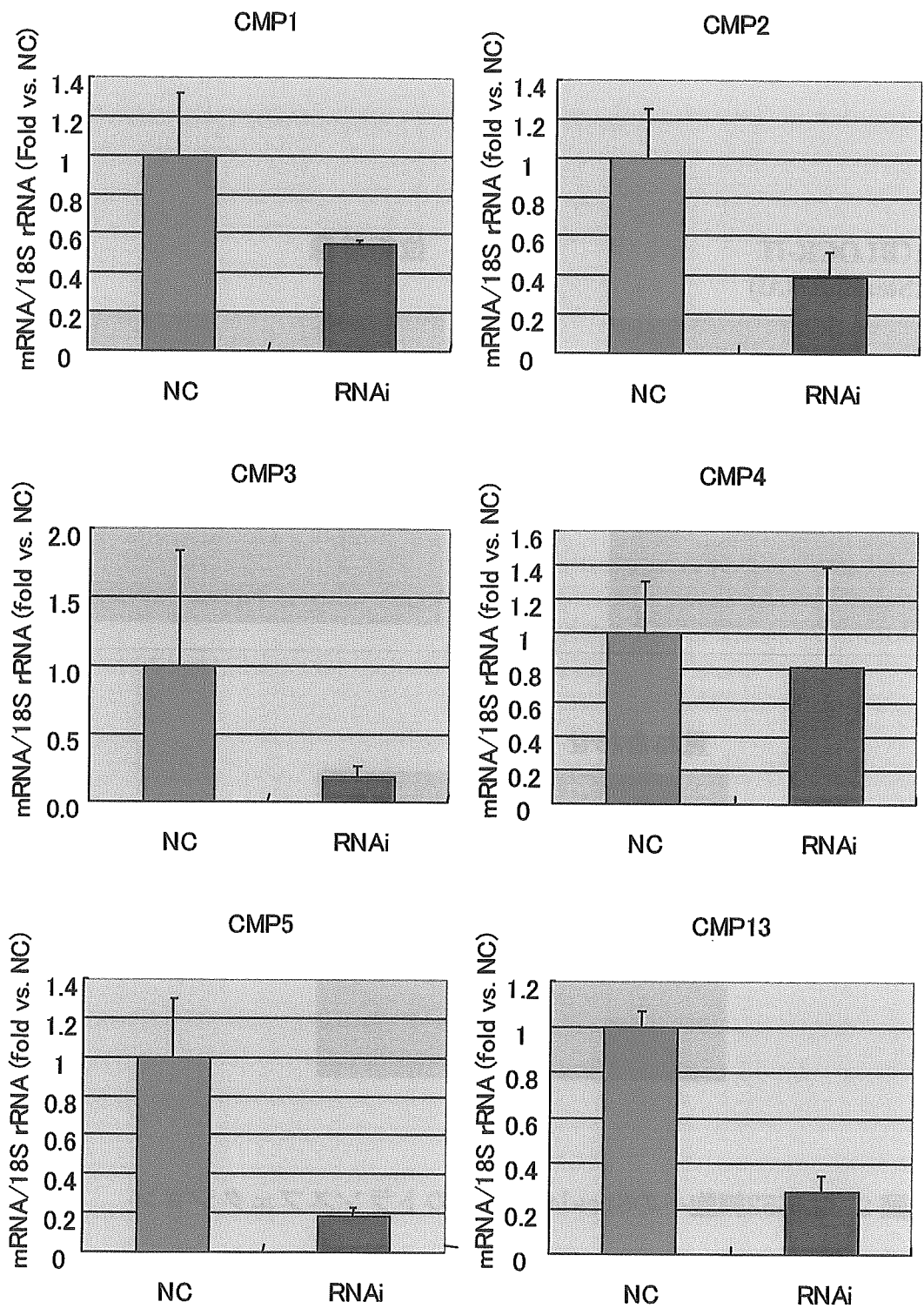


図3 CL6G52細胞におけるCMP遺伝子の発現に対するRNAi
 [平均値±S. E. M. (n=3)]

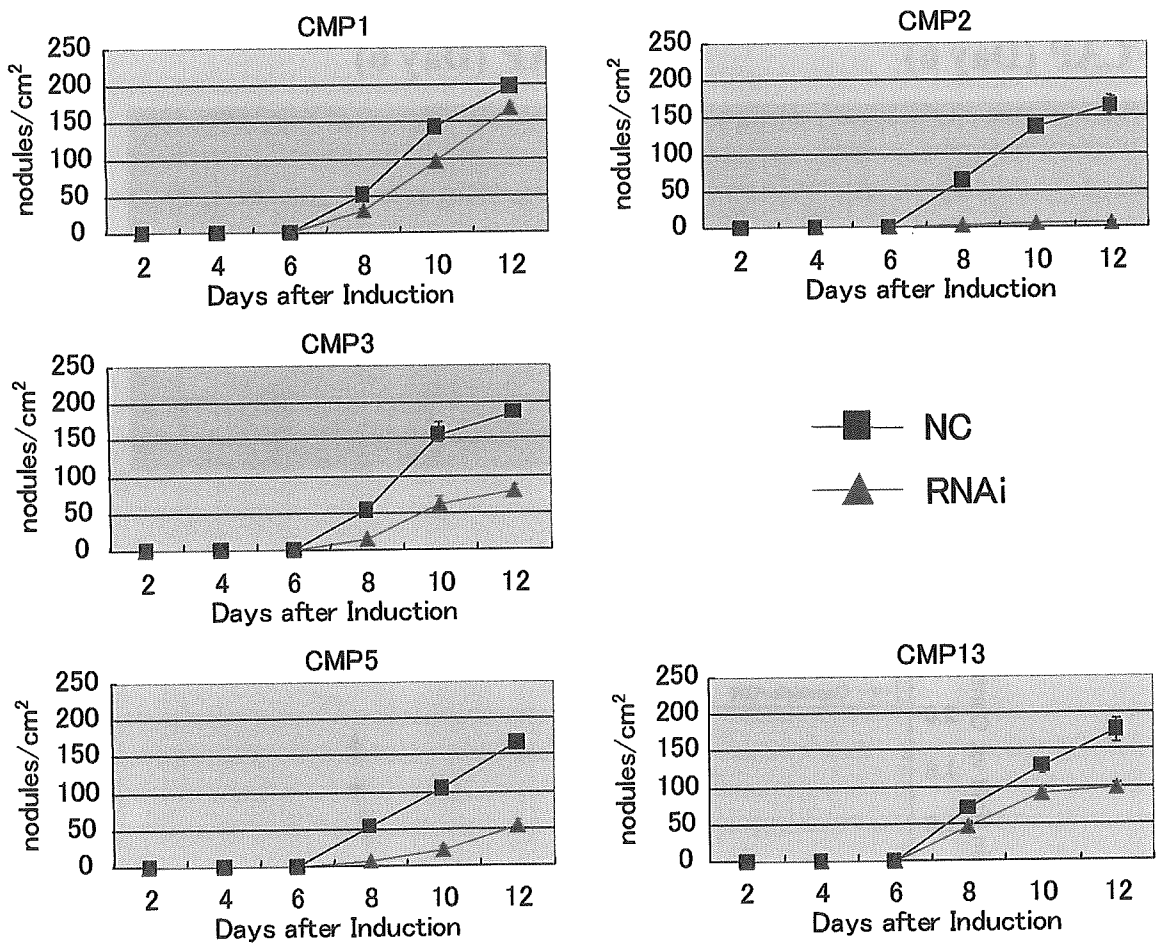


図4 CL6G52細胞の心筋細胞分化に対するCMP遺伝子発現のRNAi の効果
 [平均値±S. E. M. (n=4)]

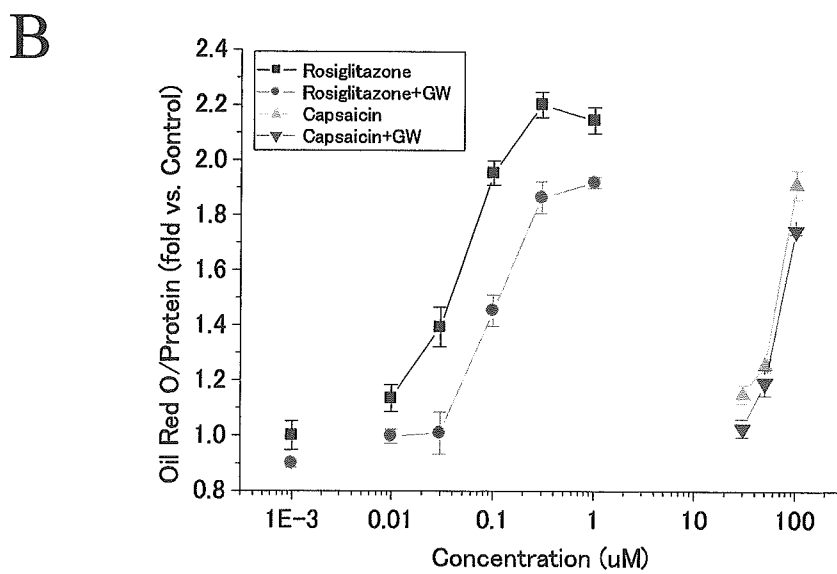
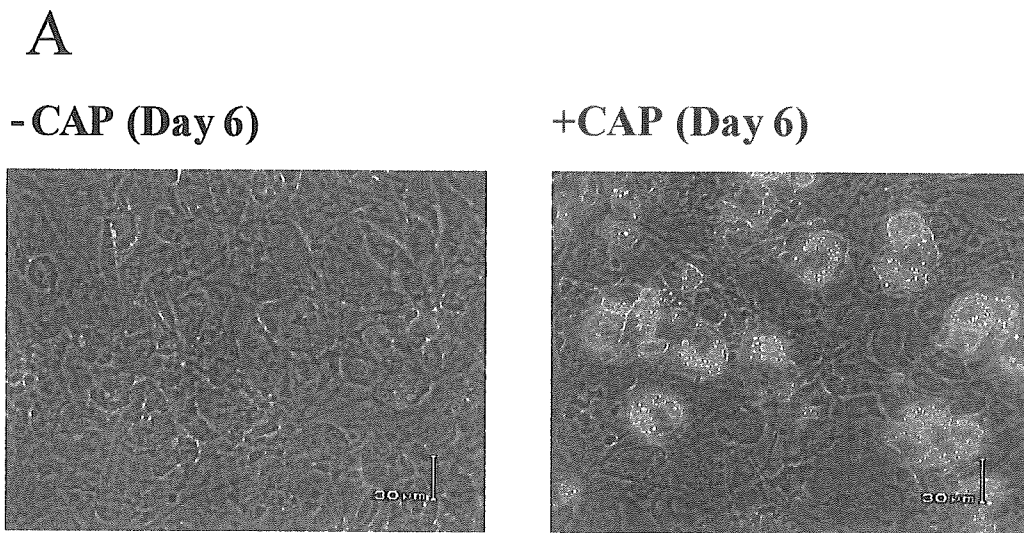


図5 カプサイシンの脂肪細胞誘導作用
 6日間のカプサイシン処理(100mM)により脂肪細胞に分化した10T1/2細胞 (A)
 10T1/2細胞をOilRed O染色した後に定量 (B)
 データは平均値±S. E. M. (n=3)で示す。

	Oil Red O/Protein (fold vs. NC)
NC(DMSO)	1.000±0.047
CAP(30 μM)	5.018±0.127
CAP(100 μM)	10.462±0.509
CAP(100 μM)+CPZ(10 μM)	3.527±0.036
CAP(100 μM)+RR(10 μM)	6.340±0.313

表1 カプサイシンの脂肪細胞誘導作用に対するTRPV阻害薬の効果
 10T1/2細胞におけるカプサイシン(CAP)処理による脂肪細胞分化に対する
 カプサゼピン(CPZ)およびルテニウムレッド(RR)の効果
 データは平均値±S.E.M.(n=4)で示す。

A.	Oil Red O/Protein (fold vs. NC)
NC(DMSO)	1.000±0.027
<i>l</i> -Menthol(100 μM)	1.285±0.076
Icilin(0.1 μM)	1.426±0.061

B.	Oil Red O/Protein (fold vs. NC)
NC(DMSO)	1.000±0.027
Allyl isothiocyanate(10 μM)	2.177±0.118
<i>t</i> -Cinnamaldehyde(30 μM)	2.838±0.158
Icilin(0.1 μM)	1.426±0.061

表2 TRPM8およびTRPA1に対するアゴニストの脂肪細胞誘導作用
 TRPM8アゴニスト(A)およびTRPA1アゴニスト(B)の10T1/2細胞における
 脂肪細胞分化誘導作用
 データは平均値±S.E.M.(n=4)で示す。

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
分担研究報告書

細胞・組織利用医薬品の品質等の確保に関する研究

分担研究者 鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部室長

研究要旨

近年、バイオテクノロジーや再生医学の進歩により、細胞や組織を治療へ応用する細胞組織利用医薬品、医療用具の開発が進んでいる。このような細胞等を利用した医薬品は様々な疾病に対して有効な治療法となることが期待されるが、その品質や安全性確保に関しては未知の要素が多く、それらを検討するための新たな技術開発が重要である。細胞培養を利用した場合には、培養による細胞の性質の変化や、クロスカルチャーコンタミネーションなどの問題があるため、培養前後での遺伝的な同一性を補償することが重要である。我々はこれまでに、細胞の遺伝的な同一性を保証するために最も有効であると考えられる、マイクロサテライトマーカである STR (Short Tandem Repeat) の多型を利用した解析の応用に関して検討を行い、培養細胞の起源の同一性を調べる上で、STR マーカーは非常に有効であること示した。また、細胞の遺伝的安定性は、癌関連遺伝子の増幅や欠失が直接細胞がん化の引き金になることもあり重要であることから、染色体レベルで遺伝的安定性を調べる目的で、CGH

(Comparative Genome Hybridization) 法に関する検討を行ってきたが、これまでの BAC クローンを用いたマイクロアレイ CGH に加え、一塩基多型 (SNP ; single nucleotide polymorphism) 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。SNP の解析より、染色体欠失や組み換えに伴うヘテロ接合性の消失 (LOH; loss of heterozygosity) をゲノムワイドに検出可能であり、特に組み換え型の LOH としては CGH 法や FISH 法も含めたこれまでの染色体解析法では検出できなかった異常を検出できた。また、突然変異に由来すると考えられる変化も低頻度ながら検出された。さらに、SNP チップでのシグナル強度のデータを元に、染色体のコピー数を検討することが可能であり、BAC CGH データと比較により、コピー数変化に対しても同等かつより詳細な検討が可能であることがわかった。さらに、得られたデータを GeneChip による遺伝子発現データと比較することにより、染色体のコピー数と発現強度の関係、さらにはインプリンティング遺伝子の動態に関して考察を加えることができた。これらの情報から、培養の過程で増殖形質を獲得した細胞株に関して、その形質変化のメカニズムを検討した。以上の結果より、SNP チップは細胞の遺伝的安定性を確認する上で大変有用なツールであることが示された。

協力研究者

巒 洋 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
流動研究員

A. 研究目的

細胞組織利用医薬品等を治療に応用するに際して、その品質のチェックや機能性の保証などが、重要な課題であると考えられる。自己組織から培養した細胞を再び本人に戻して使用する場合など、免疫原性は問題にならないとも考えられるが、培養の途中でクロスカルチャーコンタミネーションが起こり、非自己の細胞に置き変わる危険性も考えられ、重篤な副作用を引き起こしかねない。そこで、治療に用いようとする細胞が確かに自己由来のものであることを保証する目的には、親子鑑定等で使われているマイクロサテライトマーカー(STR)の利用が有効であることを既に示した。しかし、STRのみでは、染色体変化を含めた遺伝的な同一性を完全に保証することはできない。同一起源の細胞であっても、培養の過程でがん化形質を獲得する場合も考えられ、細胞を利用した医薬品を考える場合に常に問題となる点であり、細胞培養過程における品質チェックが望まれる。細胞の染色体レベルでの変化を捉える手法として、CGH法があるが、これまでに我々は、従来手法である染色体標本を用いる方法に加え、BAC(bacterial artificial chromosome)クローンをスポットしたマイクロアレイによるCGH法を用いることにより、簡便かつ解像度高い解析が可能であることを示した。本研究ではさらに検討を進め、SNPを網羅的に検出するGeneChipを用いて

同様の検討を行い、細胞の遺伝的安定性の検証への利用を検討した。実験にはヒト前骨髄球系白血病細胞株 HL60 細胞と培養の過程において増殖性を獲得した亜株である HL60-RG 細胞株をモデルとして用い、SNP解析の結果から得られる LOH を含めた染色体変化と、GeneChip を用いた遺伝子発現変化の情報もあわせて、増殖性(がん化)形質獲得のメカニズムに関して、検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1 GeneChip を用いた SNP 解析

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)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 法にて解析が行われ、myc 遺伝子の増幅を含む、特定領域の増幅および欠失が起きていることが調べられている。

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を用いた。これは、変異原物質 KBrO_3 2.5mM で 4 時間処理し、得られた tk (チミジンキナーゼ) 変異体を trifluorothymidine で選択したもので、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。

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集め、培地を除いた後 proteinaseK 溶液にて処理した後、通常の Phenol/chloroform 法にて

ゲノム DNA の抽出を行った。得られた DNA の沈殿を 70% Ethanol にて洗浄し、TE-4 バッファーに溶解させた。

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 mismatches プローブから成り、位置をずらして SNP 1 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う。

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。あります。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。

1-5. チップへのハイブリと、染色、洗浄およびシグナル検出

チップへのハイブリダイゼーションは、55 度にて一晩行い、ハイブリ溶液を除いた後、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。

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 領域が判定された。

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、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) というソフトウェアを使用した。

2. GeneChip を使った遺伝子発現解析

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 T7RNA 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 にハイブリさせた。

2-2. チップの洗浄、ラベル化とスキャナーによるシグナルの検出

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

2-3. チップイメージの解析

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

2-4. プローブのラベル化

テスト DNA および対照ゲノム DNA を各 0.5 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用標識プローブを調整した。

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 をハイブリ溶液に溶解し、70°C で 15 min. 加熱変性させた後、37°C で 60 min. インキュベートした。この間に 40 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 のスポットエリア上に 40 μ l アプライし、室温の湿箱中で 30 min. インキュベートした。H₂O を満たしたコプリンジャーの中でカバーガラスを静かに外し、スライド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、調製したプローブ溶液 44 μ l をアプライし、22 X 30 mm のカバーガラスを静かに掛け、遮光した湿箱中にて 37°C, 48~72 hours 振とう (5~10 rpm) しながらインキュベートした。

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。

2-7. 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1-3以降の解析に関しては、CGHアレイの開発元であるMacrogen社にて依頼解析した。

<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、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。

C. 結果

1. GeneChipを用いたSNP解析

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1)。今回SNPチップを用いて解析したSNP callの結果を見ると、図2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3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。

1-2. HL60および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4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5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。

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と言う判定はできず、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、伴わない組み換えがたの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6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、少なくとも5箇所領域が複雑に関与して、c-mycの増幅が

複雑なメカニズムにより起こっていると予想される。

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7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 1 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事が示唆された。また、この二つの遺伝子は図 8 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た点は非常に興味深い。

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 7 に示すようにスキッ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。

D. 考察

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、