

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

細胞組織利用医薬品の品質・安全性等の
評価に関する基盤技術開発研究

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山 口 照 英

平成 19 (2007) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書	
細胞組織利用医薬品の品質・安全性等の評価に関する基盤技術開発研究	1
山口 照英	
II. 分担研究報告書	
1. 細胞組織利用医薬品のウイルス安全性に関する研究	116
内田恵理子	
2. 細胞組織利用医薬品の遺伝的同一性解析技術等に関する研究	130
鈴木 孝昌	
3. 細胞由来生理活性物質のプロファイリング技術及び構造解析技術の開発	156
川崎 ナナ	
4. 細胞組織利用医薬品の品質・安全性確保に関する研究	177
石井 明子	
5. 細胞特性解析技術の開発に関する研究	201
佐藤 陽治	
6. 移植効率向上を目指したヒト造血幹細胞への高効率な遺伝子導入法の開発	231
水口 裕之	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	243
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

細胞組織利用医薬品の品質・安全性等の評価に関する基盤技術開発研究

主任研究者 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・部長

〔研究要旨〕細胞組織利用医薬品の品質・安全性等の評価に関する基盤技術開発を目的として、以下の研究を行った。①ウイルス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目的として、ウイルスの高感度検出のためのポリエチレンイミン結合磁気ビーズ（PEI ビーズ）を用いたウイルス濃縮法の開発と本法のヒト肝炎ウイルスへの適用について検討を行った。その結果、PEI 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 HAV、HBV、HCV にも適用可能であること、特に HAV、HCV はヒト血漿試料からも効率よく濃縮可能であることから、これらウイルスの血液試料を用いた高感度スクリーニング検査にも有用な方法であることが示唆された。②細胞組織利用医薬品の染色体レベルで遺伝的安定性評価法としてのオリゴヌクレオチドをプローブとした CGH（Comparative Genome Hybridization）アレイの有用性を評価するために、モデル細胞として HL60 細胞のがん遺伝子 *c-myc* の増幅様式を詳細に検討した。その結果、double minute（DM）染色体が環状構造を持つことを明らかにできることが示され、その有用性が示唆された。さらに、ヒト間葉系幹細胞の長期間培養での染色体の安定性の評価への SNP アレイの適用について解析した。③細胞のトリプシン処理により得られるペプチドを用いたペプチドミクスの細胞特性解析法としての有用性を示唆する結果を得た。また、液体クロマトグラフィー/質量分析（LC/MS）装置を用いて、細胞治療薬の製造工程由来不純物として懸念されている *N*-グリコシルノイラミン酸（NeuGc）の微量定量法を開発し、モデルヒト細胞中に含まれている微量の NeuGc を定量できることを確認した。さらに、独自に開発した糖鎖プロファイリング法を用いてモデル細胞の糖鎖を解析し、糖鎖プロファイリング法は細胞特性解析法としての応用可能性が高いことを確認した。④血管再生療法での応用が期待される血管内皮前駆細胞（Endothelial Progenitor Cells: EPC および Outgrowth Endothelial Cells: OEC）の効率的な誘導法の確立、ならびに品質・安全性確保に必要な製造工程関連の要件を明らかにすることを目的に、血液由来細胞からの分離増幅法に関する検討を行い、EPC の誘導系において、Thrombopoietin や血小板が EPC 誘導促進作用を持つことを明らかにした。また、OEC 誘導系において、OEC コロニー出現数への培地組成の影響、継代に伴う細胞形態の変化、目的以外の細胞の出現に関する検討を行った。さらに、血管内皮前駆細胞の特性指標と細胞機能の関連に関する解析を進め、CD31 強陽性 EPC の特性指標として同定した IL-8 が OEC の遊走促進効果を持つことを明らかにした。また、細胞治療薬への未分化細胞の適用の一環として、分化能評価手法の確立を

目指して、未分化細胞中に存在すると同時に特定の細胞種への分化に寄与する遺伝子の同定法の開発を、心筋細胞分化を例にして行った。その結果、P19 細胞由来細胞株において分化誘導前の発現量と心筋細胞分化能との有意な相関性を示す 24 個の遺伝子が見出された。RNAi を用いてこれらの各遺伝子についてその発現を阻害することにより心筋細胞分化への関与を評価した結果、これらの遺伝子の中には未分化細胞の心筋細胞への分化に有意に寄与するものが存在することが示唆された。⑤細胞治療薬のヒトでの免疫原性の評価法開発を目指し、造血幹細胞の移植効率を向上させるために、ヒト造血幹細胞に対し骨髄 niche への接着に関与する分子などを強制発現させるベクターの開発を行った。まず、アデノウイルス (Ad) ベクターによるヒト造血幹細胞への遺伝子導入機構を検討した結果、Subgroup B に属する 35 型 Ad ベクターによるヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入には、CD34 陽性細胞に発現した $\alpha_v\beta_3$ インテグリンと 35 型 Ad ベクターのペントンベース・RGD 配列との結合が重要であること、および $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとペントンベース・RGD 配列との結合は、35 型 Ad ベクターの細胞表面への吸着や細胞内取り込みよりも細胞内在化後の輸送過程に関与していることが示唆された。

分担研究者

石井明子 国立医薬品食品衛生研究所
 内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所
 川崎ナナ 国立医薬品食品衛生研究所
 佐藤陽治 国立医薬品食品衛生研究所
 鈴木孝昌 国立医薬品食品衛生研究所
 水口裕之 (独) 医薬基盤研究所

協力研究者

岩田明子 埼玉県赤十字血液センター
 (独) 医薬基盤研究所
 川端健二 金沢工業大学
 小木美恵子 (独) 医薬基盤研究所
 櫻井文教 埼玉県赤十字血液センター
 佐藤功栄 東邦大学薬学部
 佐藤光利 国立医薬品食品衛生研究所
 スレッシュ・ティルパッティ
 田邊思帆里 国立医薬品食品衛生研究所
 豊田淑江 国立医薬品食品衛生研究所
 橋井則貴 国立医薬品食品衛生研究所
 長谷川哲也 国立医薬品食品衛生研究所
 プラバ・ドゥラバシー
 古田美玲 国立医薬品食品衛生研究所
 細野哲司 国立医薬品食品衛生研究所
 村上さやか 京都薬科大学大学院
 薬洋 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や再生医学の技術的進歩により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、様々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、心筋梗塞などの致死的な疾患、あるいは糖尿病、リウマチ、骨粗しょう症、重篤な肝疾患、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。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。特に、細胞組織利用医薬品等の特性評価技術や品質・安全性を適切に評価可能な技術の開発が望まれている。

本課題は細胞・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、1) 感染性因子の安全性評価技術開発、2) 細胞の同一性や遺伝的安定性評価手法の開発および細胞のガン化予測指標の探索に関する研究、3) 細胞由来生理活性物質のプロファイリング技術や構造解析技術の開発、4) 細胞特性指標の探索、5) 免疫原性の新規評価技術の開発、6) 細胞組織利用医薬品の製造方法や規格設定の評価方法の開発に関する研究を行うことを目的とし、本年度は以下の研究を行った。

①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目的として、ウイルスの高感度検出のためのポリエチレン

イミン結合磁気ビーズ（PEI ビーズ）を用いたウイルス濃縮法の開発と本法のヒト肝炎ウイルスへの適用について検討を行った。

②細胞の染色体レベルでの変化を捉える手法として、従来の手法よりも詳細な検討が可能となる、合成オリゴヌクレオチドを用いた CGH アレイの有用性について、モデル細胞として HL60 細胞を用いた検討を行った。また、細胞の染色体レベルでの変化を捉えるための手法として SNP アレイの有用性を評価するために、ヒト間葉系幹細胞（HMSC）を用いて検討を行った。③細胞の特性解析法開発の一環として、細胞のトリプシン処理により得られるペプチドを用いたペプチドミクスの有用性について検討した。また、製造工程において血清やフィーダー細胞から混入されることが懸念され、ヒトに対して抗原性を示す *N*-グリコシルノイラミン酸（NeuGc）の微量定量について、ナノフロー液体クロマトグラフィー/質量分析（nanoLC/MS）装置を用いた方法を検討し、さらにその分析法をモデルヒト細胞中に存在する NeuGc の定量に応用することによって、細胞治療薬の製造工程由来不純物試験としての応用可能性を評価した。また、独自に開発した糖鎖プロファイリング法を用いてモデル細胞の糖鎖解析を行い、糖鎖プロファイリング法の細胞特性解析法としての有用性を検証した。

④心筋虚血や重症下肢虚血における血管再生療法に用いられる血管内皮前駆細胞 Endothelial Progenitor Cells（EPC）および Outgrowth Endothelial Cells（OEC）の効率のよい誘導法の確立、細胞の品質特性に影響を与える製造工程中の因子の解明、生体内での EPC/OEC の機能解析法の確

立等の課題解決に向けて、a) AC133 陽性細胞からの EPC 誘導系における Thrombopoietin (TPO) の効果、b) CD31 強陽性 EPC の特性指標としての高 IL-8 産生能と分化誘導への影響、c) 単核球由来 EPC の誘導に対する血小板の影響、d) OEC 誘導効率に対する培地添加物の影響、長期間培養後の形態の変化、OEC 以外の細胞の出現、e) IL-8 の OEC 遊走に対する効果、f) EPC/OEC の *in vivo* での機能評価系、に関する検討を行った。また、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マーカータンパク質、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の同定を目指し、細胞特性解析システム構築のモデルケースとして未分化細胞からの心筋細胞分化系を取り上げ、未分化細胞中に存在し、かつ心筋細胞への分化に寄与する遺伝子同定法の検討を行った。

⑤ヒト造血幹細胞に対し骨髄 niche への接着に関与する分子などを強制発現させることによって造血幹細胞の移植効率を向上させる目的で、まずアデノウイルス (Ad) ベクターによるヒト造血幹細胞への遺伝子導入機構を検討した。

B. 研究方法

B-1. 感染性因子の安全性評価技術開発

B-1-1. ウイルス

A 型肝炎ウイルス (HAV) は、ATCC (strain HM175/18f) より入手後、FRhK-4 細胞を用いて *in vitro* 培養系で 9-11 日間増幅した培養上清を試料として用いた。B 型肝炎ウイルス (HBV) は HBV DNA 第 1 次国内標準品 (genotype C, 力価: 4.4×10^5

IU/ml) 及び市販の HBV ジェノタイプパネル (BBI Diagnostics; Hepatitis B Virus DNA Genotype Performance Panel PHD201(M)) を用いた。C 型肝炎ウイルス (HCV) は第 1 次国内標準品 (genotype HCV-1b, 力価: 10^5 IU/ml) 及び市販の HCV ジェノタイプパネル (BBI Diagnostics; Worldwide HCV Performance Panel WWHV 302) のうちの 10 種類の試料を用いた。尚使用した HCV ジェノタイプパネルの詳細は Fig. 6B に記載した。

B-1-2. ウイルスの PEI ビーズによる濃縮

PEI ビーズは、カルボキシル基を持つ磁気ビーズ (粒径 0.8 μm) 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) あるいはウシ胎児血清添加培地 (DMEM + 2% FCS) で希釈したウイルス液 1mL もしくは 10mL を用いて行った。ウイルス液に PEI ビーズ溶液 100 μL (5mg の磁気ビーズを含む) を添加混合し、10 分間反応後、PEI 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 PEI ビーズ画分あるいは PEI ビーズ処理をしていないオリジナルのウイルス液 100 μL にウイルスゲノム抽出液 (スマイテスト EX-R&D、(株)医学生物学研究所) を加え、添付プロトコールに従ってウイルス核酸を抽出した。なお、PEI ビーズは PCR 反応を阻害するため、抽出の途中で遠心ろ過フィルター (孔径 0.22 μm) を用いて除去した。

B-1-3. ウイルスゲノムの定量

抽出したウイルス核酸は 10mM

Tris/1mM EDTA (TE) 50 μ L あるいは 100 μ L に溶解し、そのうちの 10 μ 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。HAV, HCV のリアルタイム定量 RT-PCR には Quantitect Probe RT-PCR kit (Qiagen 社) を、HBV のリアルタイム定量 PCR には Platinum Quantitative PCR Super Mix-UDG with ROX (Invitrogen 社)を用いた。また、HCV の検出感度を検討する際には 2 段階 PCR を行った。

B-1-4. 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 + 2%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 pH4~8 の 5 種類の pH の異なる培地でウイルスを希釈後、常法に従って PEI ビーズによる濃縮を行った。

B-1-5. 抗 HBV-IgM 抗体の作成

adr サブタイプ及び adw サブタイプの 2 種類の組換え HBV 表面抗原 (HBVsAg; Advanced ImmunoChemical より入手) を混合してウサギに免疫した。IgM タイターが上昇した免疫 10 日目に採血し、抗 HBVsAg-ウサギ抗血清を得た。抗血清は等量の PBS で希釈後、PEI セファロース 6MB カラムにアプライし、20ml の PBS で素通り画分を溶出後、1.4M NaCl/100mM HEPES (pH 7.0) でカラム結合画分を溶出した。結合画分を回収し、PD-10 カラムで脱塩後、Immuno Pure IgM purification kit (Pierce 社)を用いて IgM を濃縮し、抗 HBV-IgM 抗体として使用した。

B-1-6. ヒト血液試料からのウイルス濃縮

ヒト正常血漿またはヒト正常血清でウイ

ルス希釈し、常法に従って PEI 磁気ビーズでの濃縮を行った。ヒト正常血漿及びヒト正常血清は Sigma 社で購入したものを用いた。ヒト正常血清をフィルターろ過する場合は 0.22 μ m の PVDF 膜でろ過して使用した。

B-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

B-2-1. HL60 細胞を用いた検討

B-2-1-1. 使用した細胞株

国立医薬品食品衛生研究所、細胞バンク (当時) より入手したヒト前骨髄球系白血病細胞株 HL60 細胞およびその増殖性変異株である HL60-RG 株を使用した。こ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 DM 染色体および HSR として持つことが知られている。

B-2-1-2. 細胞からの DNA の抽出

上記各培養細胞を遠心分離によって集め、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。

B-2-1-3. 使用したオリゴ CGH アレイ

アレイ一枚あたり 39 万個のオリゴヌクレオチド (50mer) プローブをカスタムデザイン可能である Nimblegen 社 NANDEMO アレイを用いた。用いたアレイ上のプローブデザインを Table 1 に示す。これまでの BacCGH および SNP アレイを使った解析から、増幅が予想される 8 番染色体 8q24 領域に対して、連続的に 50mer のプローブを配置し、その外側の領域には

一定間隔をおいて、プローブを配置した。また、これまでに HL60 細胞とその増殖性の *subline* である HL60-RG 株との間に変化の見られた染色体領域に関しても、一定間隔で残りのプローブを配置した。このデザインに基づいて、Nimblegen 社においてオリゴマーがアレイ上にデジタルミラーを用いたマスクレス法により固層合成され、カスタムメイドマイクロアレイを得た。

B-2-1-3. CGH 解析

細胞より抽出したゲノム DNA1 μ g を、超音波処理によりランダムに 500-200bp のサイズに断片化した。その後、Cy3 (HL60) または Cy5 (正常ヒト由来コントロール DNA) ラベルしたランダム nonamer の存在下 98°C にて変性し、氷冷後、100unit の Klenow fragment および dNTP (6 mM) と 37°C 2 時間インキュベーションしてラベル化した。0.5M EDTA(pH8.0) を用いて反応を止め、イソプロパノールにて沈殿後水に再懸濁したのち、二つの溶液 15 μ g 相当を混合した。遠心濃縮機にて乾固後、40 μ l の NimbleGen Hybridization Buffer に溶解し、95°C にて 5 分変性後 42°C にし、18 時間マイクロアレイスライドにハイブリダイズさせた。アレイは NimbleGen Wash Buffer System にて洗浄後、遠心によりただちに乾燥させた。

GenePix4000B マイクロアレイスキャナーを用いて 5 μ m の解像度にてスキャンングを行いイメージデータを取得し、NimbleScan 2.0 extraction software にて、数値データとした。データ解析には、専用の SignalMap ソフトウェアを用いて、染色体上の 2 サンプル間のシグナル比を可視化し、増減の判定を行った。

B-2-2. ヒト間葉系幹細胞の *in vitro* エイジングによる染色体変化の解析

B-2-2-1. 使用した細胞株

Cambrex 社より入手した正常ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 (hMSC) を使用した。2 継代目にて入手後、間葉系幹細胞培養用基本培地 Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM) に間葉系幹細胞添加因子セット (MSCGM SingleQuots、TAKARA) および 10%FBS を添加し培養を行い、50-70%コンフルエントの状態に継代を続けた。23 回継代した細胞と、5 継代目の細胞を用いて CGH 解析を行った。

B-2-2-2. 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。

B-2-2-3. 使用した SNP チップ

ヒト約 5 万 SNP サイトを網羅した GeneChip® Human Mapping 50K Array Xba にて解析を行った。アレイには、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が、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 SNP1 個あたりの 25 bp オリゴヌクレオチド合計 40 種類により判定を行う。

B-2-2-4. 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 DNA250ng 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、用いた PCR 条件は 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最適化した。次に、増幅した DNA を断片化し、ビオチン標識した後、GeneChip Mapping 50K Array にハイブリダイズさせた。

B-2-2-5. SNP チップを用いた解析

SNP チップへのハイブリダイゼーションは、55°Cにて一晩行い、反応液を除去した後、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。

B-2-2-6. 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。

B-2-2-7. ゲノムコピー数の解析

ゲノムコピー数の解析のため、フリーウェアとして利用可能であった、dCHIP (Lin et al., 2004) および CNAG (Nannya et al.,

2005) というソフトウェアを使用した。

B-2-2-8. 染色体解析

hMSC23 継代目の凍結保存細胞を再培養し、24 継代目の細胞を用いて Spectral Karyotyping 法による染色体解析および G-banding による染色体解析を、SRL 社に委託解析した。また、コントロールとして 4 継代目の細胞についても、同様に再培養し、5 継代目の細胞を G-banding による染色体解析に供した。

B-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

B-3-1. トリプシン消化細胞表面ペプチドを指標とした細胞特性解析

B-3-1-1. 使用した細胞

造血幹細胞の増殖や機能細胞への分化誘導に有用なストローマ細胞の特性解析のためのモデル系として、造血支持能力の異なるマウス NIH3T3 細胞、および SWISS-3T3 細胞を使用した。

B-3-1-2. 細胞からのペプチド溶液調整

細胞継代時のトリプシン処理により得られる上清を回収し、このうち 200 μ l を C18 モノリスカラムチップ (MonoTip® C18) にて脱塩濃縮 (2 倍) し、100 μ l としたサンプル溶液 4 μ l をそのまま LC-MS 解析用サンプルとした。

B-3-1-3. LC-MS/MS による解析

本研究にはナノ LC として Splitless Nano HPLC System DiNa (KYA テクノロジーズ)を使用した。配管には内径 50 μ m のヒューズドキャピラリーチューブを用い、C-18 逆相カラム (KYA, W-3) およびトラップカラムを使用した。移動相は A (2% アセトニトリル, 0.1% ギ酸) ,B(80% アセト

ニトリル、0.1% ギ酸)の2種類の組成の溶媒を用い、A100%からB100%へのグラジエントをかけてペプチドを順次カラムより溶出させた。また、使用した質量分析装置は、ESI-Q/TOF型LC-MS/MS QSTAR-XL-PF (Applied Biosystems) であり、前述のナノLCとオンライン接続し、LC-MSとしての測定を行った。ESI ナノスプレー用チップとして、PicoTip™ (New Objective社製FS360-75-15-D) を使用した。Valco社製チタニウムユニオンを使ってチップをカラムと接続し、ナノスプレーインターフェースにて質量分析装置へと挿入した。

以下に LC-MS/MS による測定条件を示す。

Precursor Ion

TOF Masses (amu): Min = 250.0000

Max = 1400.0000

Accumulation Time (sec): 1.0000

Scan Type: Positive TOF MS

IS volt: 1400.00

Product Ion

Switch Criteria

For ions greater than:

250.000 m/z

For ions smaller than:

1400.000 m/z

With charge state: 2 to 5

Which exceeds: 10 counts

Switch after: 1 spectra

Exclude former target ions for:

30 seconds

LC Condition

Solvent A: 2% Acetonitrile and

0.1% Formic acid

Solvent B: 80% Acetonitrile and

0.1% Formic acid

Flow rate: 300 nL/min

Gradient: 0 to 100% B solvent in 100 min,

100% B for 15 min and last 5 min 100% A

B-3-1-4. LC-MS データの可視化とタンパク同定

QSTAR-XLによる質量分析データは、基本的に付属のソフトウェアであるAnalystQSを用いて解析される。この際、MS/MS測定はデータ依存的に行い、一度のTOFマス測定に対し自動的に二つの親イオンを選択し、それぞれ積算時間1秒にてMS/MSの測定を行った。

Rawデータの解析のため、Analystにて作成されるWiff形式ファイルの加工のため、mzXMLへの変換ツールとして、Systems Biology Instituteより提供されているmzStarというソフトウェアを利用した。さらに、mzXML形式ファイルを、Pep3Dというソフトウェアを利用することで、LC-MSデータとしての3Dグラフによる可視化を行った。

MS/MSデータを用いたタンパク質の同定には、タンパク同定ソフトウェアであるMASCOTを用い、NCBIプロテインデータベース検索によるMS/MSサーチを行った。

B-3-2. 細胞表面糖鎖の構造・不均一性の解析技術の開発

B-3-2-1. 試薬

Rapid Growth HL-60細胞(ヒト前骨髄性白血病細胞)はセルバンクより分与された。NeuAc及びNeuGc標準品はナカライテスク(Kyoto, Japan)より購入した。1,2-diamino-4,5-methylene-

dioxybenzene (DMB)標識試薬 (シアル酸蛍光標識用キット) は Takara (Tokyo, Japan) より購入した。ウシ胎児血清 (FCS) 及びヒト血清は大日本住友製薬株式会社 (Japan) より購入した。RPMI1640 培地, 及び ASF104 培地は Sigma (Mo, USA) 及び味の素 (Tokyo, Japan) より購入した。

B-3-2-2. 細胞培養

Rapid Growth HL-60細胞は 10% FCS、ペニシリン (100 unit/ml)、ストレプトマイシン (100 µg/ml) 添加 RPMI1640 培地で培養した (5% CO₂, 37 °C)。セミコンフルエントまで培養した後、その 2x10⁵ 個ずつの細胞を FCS 及びヒト血清 RPMI1640 培地、及び無血清 ASF104 培地を用いてそれぞれ培養した。培地交換を 4 回行った後に、セミコンフルエントまで細胞を培養した。回収した細胞をプロテアーゼインヒビター (protease inhibitor mix DMSO solution, Wako, Japan) 添加 PBS で 3 回洗浄した。

B-3-2-3. 膜画分の調製

洗浄済み細胞 (1x10⁶ 個) をプロテアーゼインヒビター添加 0.25 M ショ糖/10 mM Tris-HCl 緩衝液 (100 µl, pH 7.4) に懸濁させ、4°C で 30 秒間の超音波処理 (40W, 2 回) を行った。核を遠心分離 (4 °C, 450 xg, 10 分) により除去した後、再度遠心分離 (4 °C, 20,000 xg, 10 分) によりミトコンドリア、リソゾーム画分を除去した。細胞膜画分は、超遠心分離 (4°C, 100,000 xg, 60 分) により沈殿させた。膜画分は 150 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (100 µl, pH7.4) に懸濁させて、超音波処理及び超遠心分離を行いショ糖を除去した。得られ

た沈殿物に残存する酢酸アンモニウムは Speed Vac で除去した。

B-3-2-4. NeuAc 及び NeuGc の切り出し及び DMB 誘導体化

膜画分に 250 µl の H₂O を添加し、超音波で懸濁させた。さらに 250 µl の 4 M 酢酸を加え (終末 2 M 酢酸溶液)、80°C で 3 時間加温し、NeuAc 及び NeuGc を遊離させた。シアル酸を含む液をメタノール/アセトニトリル/H₂O (3/1/10) 溶液で活性化した SepPak C-18 カートリッジ (Waters, MA, USA) にアプライした後、素通り画分及び H₂O (2 ml) で溶出した画分を回収し蒸発乾燥させた。得られた NeuAc 及び NeuGc は、シアル酸蛍光標識キットを用いて DMB 誘導体とし、0.2 mm フィルター (Millex-LG, Milipore, MA, USA) を装着した EnviCarb カートリッジ (Supelco, PA, USA) を用いて精製した。尚、反応溶液は、3 ml の 5 mM 酢酸アンモニウム (pH9.6) で平衡化したカートリッジにアプライした後、2.5 ml の 5 mM 酢酸アンモニウム (pH9.6) で脱試薬した。カートリッジに吸着した DMB-NeuAc 及び DMB-NeuGc は 3 ml の 45% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム (pH9.6) で回収した。得られた溶液は蒸発乾燥させた。

B-3-2-5. N 結合型糖鎖の切り出し

1x10⁷ 個の HL-60RG 細胞を 500 µl の 8 M グアニジン塩酸/0.5 Tris-HCl (pH 8.6) に溶解させた。この溶液に 20 µl の 1 M DTT (終末 40 mM) を加えて 65°C で 30 分間加熱し、タンパク質を還元した。つぎに、48 µl の 1 M モノヨード酢酸ナトリウム (終末 96 mM) を加えて室温(暗所)で

40 分間インキュベートし、システイン残基のチオール基をカルボキシメチル化した。シスチン溶液 (終末 40 mM) を加えて反応を停止させ、反応溶液の 5 倍量の H₂O で希釈した後、サーモリシン (20 µg/ml, 5 µl) を添加して 65°C で 1 時間加温し、タンパク質を断片化した。反応液を 100 °C で 5 分間加熱して反応を停止させた後、4 倍量の 0.2 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.5) を加えて反応液を希釈した。溶液に 1.5 mU (3 µg) のアーモンド由来グリコペプチダーゼ A (生化学工業, 東京) を加えて、37°C で 2 日間、インキュベートし、N 結合型糖鎖を切り出した。反応溶液中の糖鎖を ENVI Carb C カートリッジ (Supelco, PA, USA) を用いて回収した後 (1.5 ml, 40% CH₃CN/5mM AcONH₄), 1ml の 0.5 M NaBH₄ 溶液中で還元した (室温, 16 時間)。還元糖鎖は、ENVI Carb C カートリッジを用いて精製した。

B-3-2-6. nanoLC/ESI-FTMS

シアル酸分析:

ナノ液体クロマトグラフィー (nanoLC) は Paradigm MS4 (Michrom BioResource, CA, USA) を使用した。カラムは逆相系 C18 カラム (Magic C18, 0.1 x 50 mm, 3 µ) を用いた。溶離液として、2% アセトニトリルを含む 0.1 % ギ酸溶液 (A 溶媒) 及び 80 % アセトニトリルを含む 0.1 % ギ酸溶液 (B 溶媒) を使用した。DMB-NeuAc 及び DMB-NeuGc は流速 0.75 µl で 10-90 % B 緩衝液 (20 分) のグラジュエント条件で溶出した。DMB-NeuAc 及び DMB-NeuGc の分析はナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源 (AMR, Tokyo, Japan) を接続したイ

オントラップ型 MS-イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (ITMS-FTMS) 装置 (LTQ-FT, ThermoElectron, CA, USA) を用いて行った。測定はポジティブイオンモードで行い、選択イオン検出 (SIM) モードで行った。キャピラリー温度は 200 °C、スプレー電圧は 1.8 ekV、スキャン範囲は *m/z* 400-450 に設定した。Tandem MS (MS/MS) 衝突エネルギー (コリジョンエネルギー) は 35 % に設定した。また、イオンの取り込み量を調節する AGC セッティングの値は 5E+04~5E+06 の範囲に設定して最適値を確認した。FT モードのイオンの取り込み時間を調節する Maximum injection time は 1250 ms、FT の分解能は 12,500 に設定した。

N 結合型糖鎖のプロファイリング:

装置は、nanoLC/ESI-FTMS 装置を利用した。カラムはグラファイトカーボンカラム (HyperCarb, 0.1 x 150 mm, 3 µ, Michrom BioResource) を用いた。溶離液として、2% アセトニトリルを含む 5mM AcONH₄ 溶液 (pH 9.6, A 溶媒) 及び 80 % アセトニトリルを含む 5mM AcONH₄ 溶液 (pH 9.6, B 溶媒) を使用した。還元糖鎖は流速 0.4 µl、10-40 % B 緩衝液 (60 分) のグラジュエント条件で溶出した。測定はポジティブ及びネガティブイオンモードで行った。キャピラリー温度は 275 °C、スプレー電圧は 1.8 ekV、スキャン範囲は *m/z* 800-2000 に設定した。多段階 MS (MS²⁻⁴) の コリジョンエネルギーは 35% に設定した。

B-3-2-7. シアル酸分析法のバリデーション

分析法の直線性は NeuAc 及び NeuGc

標準品を用いて 0.0078-500 pmol の範囲で検討した。分析法の検出限界(DL)及び定量限界(QL)は $DL=3.3 \cdot \sigma / \text{slope}$ (σ =マスキロマトグラムの平均ノイズ) 及び $QL=10 \cdot \sigma / \text{slope}$ を用いて算出した。分析法の真度及び精度は、無血清培地で培養した細胞の膜面分に 10 及び 100 fmol の NeuGc を添加した試料を 3 回測定して求めた。真度は回帰直線を用いて計算した NeuGc 量と既知量の比較により示した。精度は NeuGc 添加試料の測定により得られた実測値の相対標準偏差により求めた。

B-4. 細胞特性指標の探索

B-4-1. 血管内皮細胞の効率的誘導法の確立および製造工程関連要件の検討

B-4-1-1. 臍帯血あるいは末梢血 AC133 陽性細胞から CD31 強陽性細胞の調製

1.2L の血液より分離した約 40ml のバッファーコートあるいは臍帯血を 2mM EDTA を含む PBS(-)で 2 倍希釈し、Lymphoprep tube を用いて、2200rpm、18°C、20 分で遠心後、単核球分画を単離し、0.5% BSA、2mM EDTA を含む PBS(-)(分離バッファー)に浮遊させた。単核球を分離バッファーで洗浄し、500 μ l の分離バッファーに再浮遊させた。AC133 陽性細胞を分離するため、AC133 マイクロビーズ分離キット (Milteny Biotec) を用い抗 AC133 抗体・マイクロビーズと 4°C、30 min で抗原抗体反応させた。陽性細胞の分離は、Auto MACS (Milteny Biotec) を用いて行った。臍帯血と末梢血 AC133 陽性細胞は 20% 牛胎児血清 (FBS)、50 ng/ml VEGF、50 ng/ml TPO、50 ng/ml SCF を含む EBM-2 培地に浮遊させ、タイプIVコラーゲンでコートし

た 24 穴のマルチウェルに分注し、1 週間培養した。細胞を回収し、洗浄後、抗 CD31 抗体-FITC (BD Biosciences PharMingen)、抗 CD110 (TPO 受容体) 抗体-APC (BD Biosciences PharMingen)、抗 CD133/2 抗体-PE (Milteny Biotec)、抗 VE-Cadherin (CD144) 抗体-PE (Beckman Coulter) を用いて免疫染色し、フローサイトメーターにより解析した。なお、すべての検体は 7-amino actinomycin D (7-AAD) で染色し、陽性の細胞は死細胞として、解析の際に除去した。

B-4-1-2. 臍帯血あるいは末梢血由来 CD31 強陽性・陽性細胞における各種サイトカインの産生

FACS (Aria) により分画した CD31 強陽性・陽性細胞を 20% FBS-EBM2 培地に浮遊し、96 穴のマルチウェルに培養した。培養 4 日後に培養上清を集め、-20°C で保存した。培養上清中のサイトカインの測定は Bio-Plex サイトカインアッセイのプロトコールに従った。

B-4-1-3. 臍帯血からの単核球調製と血小板の除去

理研より購入した臍帯血由来細胞 (10% DMSO, 1% Dextran, 0.8% Hespan 中で凍結保存されたもの)、あるいは、東京都赤十字血液センターより分与された臍帯血 (クエン酸添加された全血) を 2mM EDTA を含む PBS(-)で 2 倍に希釈して Lymphoprep tube (AXIS SHILD 社製) ($\rho=1.077\text{g/ml}$) に重層し、18°C、1000g (日立冷却遠心機 CF7DS、ローター RT3S3、2200rpm) で 20 分間遠心した。単核球の層を新しいチューブに移し、2mM EDTA を含む PBS(-)で 2 倍に希釈して、350g (1300rpm) で 5 分

遠心して、細胞を回収した。

さらに、血小板を除去する場合は、5 容量の Optiprep (AXIS SHILD 社製) と 22 容量の希釈液 (0.85% NaCl, 20mM HEPES-NaOH pH 7.4, 1mM EDTA) を混合して $\rho=1.063\text{g/ml}$ に調整した Optiprep 溶液に、培地に懸濁した単核球を上層した。20°C、350g (1300rpm) で 15 分遠心し、沈澱画分として単核球を回収した。

B-4-1-4. 血小板の調製

全血を室温、140 x g (1000rpm) で 10 分間遠心し、Platelet Rich Plasma (PRP) を得た。PRP を 2mM EDTA を含む PBS(-) で 2 倍に希釈して、室温、1500g (3000rpm) で 10 分遠心し、血小板を沈澱として回収。2mM EDTA を含む PBS(-) に懸濁後、再度、室温、1500g (3000rpm) で 10 分間遠心した後、培地に懸濁した。血小板数は自動血球計数装置 SYSMEX F820 を用いて測定した。なお、これまでの検討では、HEPES-Tyrode buffer を用いる血小板洗浄方法を用いても、血小板の EPC 誘導促進効果は同様に見られており、洗浄法が血小板の EPC 誘導促進効果に影響する可能性は小さいようである。

B-4-1-5. 単核球の培養

臍帯血から調製した単核球を培地 (Endothelial Basal Medium-2, 2% FCS, VEGF, bFGF, EGF, R3-IGF1, ascorbic acid, hydrocortisone, heparin) に懸濁し、FN コート 6 ウェルプレート (ベクトン・ディッキンソン社製) に播種した。播種細胞数は、ウェルあたり 1×10^7 個程度とした。培養開始 1 日後に、培地を除いて PBS(-) で 1 回洗浄し、新鮮培地を添加した。その後、OEC を誘導する場合は、培養開始 7 日目ま

では毎日培地交換を行い、以降は 1 週間に 2 回、培地を交換した。

B-4-1-6. EPC の同定

1,1-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindole-3-carbocyanine perchlorate 標識したアセチル LDL (DiI-Ac-LDL、Biomedical Technologies 社製) を培地で希釈して添加 (4ug/ml) し、1 時間培養した。PBS(-) で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで 1 時間固定、PBS(-) で 3 回洗浄し、1% BSA を含む PBS(-) で 4°C、1 時間ブロッキングした。FITC 標識した抗ヒト CD31 抗体 (ファーマンジェン社製、No.555455) を 1% BSA を含む PBS(-) で 100 倍希釈して 4°C で 1 時間、反応させた。PBS(-) で 3 回洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss 社製) で蛍光画像および位相差像を観察し、各ウェルについて 5 枚ずつ写真を撮り、視野にある DiI-Ac-LDL 取り込みおよび抗 CD31 抗体染色陽性の細胞をカウントした。

B-4-1-7. 血小板の隔離培養

セルカルチャーインサート (ベクトン・ディッキンソン社製) を用い、血小板を単核球と接触しない条件で添加した場合の影響を検討した。用いたセルカルチャーインサートは、ポアサイズ 0.4 μm /ポア密度 1.6 $\times 10^6/\text{cm}^2$ のもの、ポアサイズ 0.4 μm /ポア密度 1.0 $\times 10^8/\text{cm}^2$ のもの、ポアサイズ 0.4 μm /ポア密度 1.6 $\times 10^6/\text{cm}^2$ で FN コートされたもの、の 3 種類である。

B-4-1-8. OEC の培養

末梢血あるいは臍帯血から単核球を分離後、2%FBS-EGM2 培地 (三光純薬) に浮遊させ、FN コートした 6 ウェルのマルチプレートに播種した。一週間、毎日培地交換し、その後週 2 回培地交換を行った。OEC

のコロニーを形成後、顕微鏡画像を撮影した。

B-4-1-9. OECの免疫染色

OECの同定を行うため、コロニーをトリプシン・EDTAではがし、FNコート製の48マルチウェルに播種した。2日後、細胞層を洗い、1%パラホルムアルデヒドで固定した。細胞の固定・透過性のため20°Cのエタノールを加えた。1%BSA-PBS(-)でブロッキング後、それぞれの抗体を含む1%BSA-PBS(-)を添加し、4°Cで抗原抗体反応させた。抗体は抗endothelial NO合成酵素(eNOS, Cayman Chemical)抗体、抗CD31抗体を用いた。接着した細胞をPBS(-)で洗浄し、抗IgG抗体-FITCあるいは抗IgG抗体-ローダミンを4°C、1時間反応させた。細胞は共焦点レーザー顕微鏡LSM510で観察した。

B-4-1-10. OEC及びHUVECのIL-8受容体発現の解析

OECあるいはHUVECを非酵素的にはがし、洗浄後、浮遊細胞と抗IL-8受容体抗体を4°C、30分で抗原抗体反応させた。細胞を1%BSA-PBS(-)で洗浄し、抗IgG抗体-FITCを4°C、30分反応させ洗浄後、フローサイトメーターで解析した。

B-4-1-11. 細胞遊走

細胞遊走はボイデンチャンバー法を用いた。48穴のマイクロウェルの下室に種々の濃度のIL-8を含んだ27µlの2%EBM-2培地を加えた。上室には50µlのOECの細胞浮遊液を1ウェルあたり 2×10^4 /well個播種した。上室と下室の間に0.8µmのポアがあるフィルターを用いた。37°C、4時間CO₂インキュベーター内で遊走させた後、フィルター上部についた細胞をはがし、遊走してきた下側の細胞を固定・染色し、細胞数

を数えた。

B-4-1-12. 移植チューブを用いたHUVECの培養と細胞の免疫染色

移植するEPCと侵入してくるであろう血管細胞を区別するため、あらかじめ移植する細胞を蛍光色素PKH26(Sigma)で染色することとした。今回はHUVECを用いて試験的に行った。HUVECをSigma社のプロトコールに従い、蛍光染色した。移植用チューブおよびBasement Membrane Extract(BME)として、Angioreactor Kit(Trevigen, Inc.)を用いた。BMEに蛍光染色したHUVECを混合し、1チューブあたり20µl、 1×10^4 個の細胞を播種した。37°Cで1時間インキュベートしてゲル化した。24穴に1ml/wellの2%EGM2培地を分注し、その中にゲル化した移植チューブを入れ2週間培養した。顕微鏡写真を撮影後、凍結切片を作成した。サンプルは-20°Cのアセトン固定と4%ホルマリン固定の2種類を免疫染色し、比較検討した。抗体は抗CD31抗体-FITCを用い、対照として免疫していないIgG₁分画の対照血清-FITCと比較した。

B-4-2. 分化予測バイオマーカーの同定法の検討および心筋細胞分化予測マーカーの探索

B-4-2-1. 使用細胞

マウス由来の胚性癌細胞P19細胞はAmerican Type Culture Collection(ATCC)より、P19細胞由来の細胞株であるCL6細胞はRIKEN Cell Bankより入手した。

さらに、このCL6細胞由来の細胞株であるCL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52は、筆者らによって作製された。

すなわち、マウス α ミオシン重鎖 (α MHC) プロモーターおよびヒト成長ホルモンポリアデニレーションシグナルを組み込んだ pBluescript SK (+) ベクターは Jeffery Robbins 博士 (Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, U.S.A) から供与を受けた。 α MHC プロモーター配列の下流かつヒト成長ホルモンのポリアデニレーションシグナルの上流にある Sal I サイトと HindIII サイトの間に pEGFP ベクター (Clontech) 由来の green fluorescent protein (GFP) コード配列を導入したベクターを定法により作製した。このベクター 21.6 μ g と Neomycin 耐性遺伝子をもつベクターである pcDNA3.1 (+) 2.4 μ g を血清および抗生物質を含まない Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification (α MEM, Sigma) 1.5ml に穏やかに希釈した。一方、Lipofectamine2000 (Invitrogen) 60 μ l を血清および抗生物質を含まない α MEM 1.5ml に穏やかに希釈した。Lipofectamine2000 の希釈液を 5 分間室温で放置した後、DNA ベクターの希釈液と穏やかに混和し、20 分間室温で放置することにより DNA と Lipofectamine2000 との複合体を形成させた。次段落で詳説する基本培地 10ml を用いて CL6 細胞を直径 100mm のディッシュ上で 40~50% のコンフルエンスとなるように培養し、これに DNA と Lipofectamine2000 との複合体希釈液 (計 3ml) を添加することにより DNA をトランスフェクションした。トランスフェクション後 2 日経過した時点より Geneticine (G418, Sigma) (濃度 1mg/ml) 存在下で培養し、単一コロニーを単離することにより、Neomycin 耐性遺伝子を含む

CL6 細胞サブラインをクローニングした。分化誘導後の GFP の発現を ARVO sx MULTILABEL COUNTER を用いて GFP の蛍光を測定することにより評価したところ、本研究で用いた CL6 のサブラインのうち、心筋細胞分化誘導後に GFP の発現が認められたのは CL6G52 のみであった。

B-4-2-2. 細胞の培養法および分化誘導法

未分化な状態での細胞の培養には基本培地を用い、直径 100mm の細胞培養ディッシュ (Falcon または Corning) 上、5%CO₂ 存在下 37°C で、コンフルエントにならないように注意しながら行った。基本培地の組成は、 α MEM に非働化したウシ胎仔血清 (FCS, Lot No. 29080306, Cell Culture Technologies) を 10%、L-glutamine (Sigma) を 2mM、Penicillin-Streptomycin (Gibco) を 100unit/ml の濃度になるようにそれぞれ添加したものである。

心筋細胞への分化誘導は、ディッシュ面積に対して 50~70% 程度まで増殖させた未分化な細胞を用いて行った。まず、基本培地を除去し、Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS, Sigma) 5ml で 2 回洗浄した。次に、trypsin-EDTA (Gibco) 1ml で細胞全体を軽く濡らして、直ちに除去、5%CO₂ 存在下 37°C で 3 分間、その後、室温で 5 分弱インキュベートし、分化培地 5ml に懸濁した。この細胞懸濁液を細胞培養容器に分注した後、5%CO₂ 存在下 37°C で培養し、これを用いて各実験を行った。分化培地は基本培地に dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) を 1% の濃度になるように添加したものである。

B-4-2-3. 培養細胞からの Total RNA の抽出

培養細胞からの Total RNA の抽出は、SV Total RNA Isolation System (Promega)、RNesay Midi (QIAGEN)、RNesay Mini (QIAGEN)、BioRobot M48 Workstation (QIAGEN) のいずれかを用い、各社のマニュアルに従って行った。RNA サンプルの濃度は 260nm の吸光度を測定することで評価し、260nm の吸光度と 280nm の吸光度の比を指標に純度を確認した。抽出したサンプルは -80°C で冷凍保存した。

B-4-2-4. 心筋組織からの Total RNA の抽出

心筋組織からの Total RNA の抽出は以下のように行った。まず、9 週齢の雄の C3H / He マウス 4 匹より心室筋を取り出し 1ml Sepazol (Nacalai Tesque) / Heart を加えて Polytron ホモジナイザーを用いてホモジナイズし (氷冷下, 最高速度で 10 秒回転 \times 3 回)、4 匹分を合わせてから 1ml ずつ分注した。次に、クロロホルム 200 μl / tube を添加し、緩く攪拌した後、室温で 2~3 分放置し、12,000 \times g、 4°C で 15 分間遠心分離した。上層 500 μl / tube を 500 μl / tube のイソプロパノールと混ぜて攪拌し、室温で 10 分以上放置し、12,000 \times g、 4°C で 10 分間遠心分離した。上清を除去し、沈殿に 75%エタノールを 500 μl / tube 加えて攪拌し、7,500 \times g、 4°C で 5 分遠心分離した後、沈殿を風乾 (5 分未満) した。続いて沈殿を DNase I ($\text{H}_2\text{O}+10\times$ buffer + DNase I [Promega]) 溶液 30 μl / tube で溶解させ、 37°C で 30 分インキュベーションした。この後、フェノール / クロロホルム / イソアミルアルコール混合液 (Gibco) を 30 μl / tube 添加し、

緩く攪拌した後、室温で 2~3 分放置し、12,000 \times g、 4°C で 15 分遠心分離した。上層 27 μl / tube をイソプロパノール 27 μl / tube と混ぜて攪拌した後、室温で 10 分以上放置し、12,000 \times g、 4°C で 10 分遠心分離した。沈殿に 75%エタノールを 54 μl / tube 加えて攪拌し、7,500 \times g、 4°C で 5 分遠心分離し、沈殿を風乾した後に、40U / μl RNase Inhibitor 入り H_2O (30 μl / tube) で沈殿を溶解した。濃度が均一になるように 4 本を混ぜて、10 μl ずつ分注、これらの吸光度 (260nm) を測定することで濃度を測定した。抽出したサンプルは -80°C で冷凍保存した。

B-4-2-5. 分化誘導後の心筋細胞特異的マーカー遺伝子発現の測定

P19 細胞、CL6 細胞、および CL6 細胞サブラインの CL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52 の 6 種類の細胞を分化誘導処理し、6 ウェル細胞培養用マルチプレート (Falcon) に各細胞株を 6 枚ずつウェルあたり 1×10^5 個の細胞密度で蒔いた。これを、5% CO_2 存在下、 37°C で 20 日間培養し、培地は 2 日毎に交換した。分化誘導後、8 日目、12 日目、16 日目、20 日目に SV Total RNA Isolation System (Promega) を用いて、Total RNA を抽出した。

測定した心筋細胞特異的マーカー遺伝子は、Nkx 2.5、GATA4、MEF2C、 α MHC、 β MHC、MLC2a、MLC2v の 7 種類。これらに加え、各遺伝子の発現量を補正するために、内部標準として 18S rRNA の発現量を測定した。

精製した各細胞の Total RNA は、測定するマーカーごとに検量線が成り立つ範囲に入るような濃度で希釈した。また、検量線

用サンプルとして、B-4で精製したマウス心筋由来のTotal RNAを用いた。

遺伝子発現の定量のために、TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems) およびABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いてRT-PCRを行い、PCRの時間経過をリアルタイムで取得した。

3~15 サイクルの間に検出されたシグナルからベースラインを設定し、これをもとに増幅が指数関数的に起こる領域でシグナルの閾値を設定した。シグナルの閾値に到達するサイクル数 (Threshold Cycle: Ct 値) を縦軸に、初期のRNA量の対数を横軸にプロットし、検量線を作成した。目的の遺伝子のサンプルについても、Ct値を求めることにより検量線からサンプル中の目的のRNA量を算出した。心筋細胞特異的マーカー遺伝子のRNA発現量はサンプルの平均値と標準偏差により標準化した後、統計ソフトウェア SYSTAT (SYSTAT Software)により主成分分析し、心筋細胞分化の指標となる主成分を得た。

B-4-2-6. 分化誘導前における各細胞株の遺伝子プロファイルの取得

P19細胞、CL6細胞、およびNeomycin耐性遺伝子を含むCL6細胞サブラインのCL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52の6種類を分化誘導処理せず、6ウェル細胞培養用マルチプレート (Falcon) に8枚ずつ 1×10^5 cells /wellの密度になるように蒔いた。これを5%CO₂存在下37°Cで培養し、コンフルエントになる前にRNeasy Midi (QIAGEN)で細胞を回収し、その細胞の6ウェル分を1つにまとめた後、RNAを抽出

した。

これをRNeasy Mini (QIAGEN)で2回精製した後、260nmの吸光度を測定することで濃度を測定し、260nm/280nmの比から純度を確認した。GeneChip (Affymetrix)により遺伝子発現を網羅的に解析するために、まず各細胞株について濃度が高く、かつ純度の高いサンプル5個ずつを選択した。Affymetrix社のマニュアルに従い、各RNAサンプルからcDNAを合成し、次いでcDNAをもとにしてビオチン化cRNA断片を合成した。GeneChip Hybridization Ovenを用いてビオチン化cRNA断片をGeneChipにハイブリダイズさせ、次いでハイブリダイズしたcRNAをGeneChip Fluidics Stationを用いてストレプトアビジン-フィコエリスリンで染色することにより可視化し、GeneChip Scanner 3000で走査した。得られた蛍光データはGCOSソフトウェア (Affymetrix)で解析した。GeneChipはMOE430A (Probe Set数22,626)とMOE430B (Probe Set数22,511)を用いた。検出された遺伝子からシグナルの高い方から2%および低い方から2%を除いた時の、残りのProbe Setの平均値が500になるようにスケーリングした。これに次に示すようなフィルターをかけて、各細胞株の心筋細胞分化能と関連のある遺伝子を検出した。ここで検出された遺伝子を、Cardiomyogenesis Predictor Candidate (CMP)と名づけた。

フィルター①: GCOSで解析された各Probe SetのシグナルはAbsolute Analysis (発現の有無を判定する解析)の結果「発現があるもの:P (Present)」、「発現があるかわからないもの:M (Marginal)」あるいは

「発現がないもの:A (Absent)」として判定がなされる。細胞株各群の 5 例の半数以上 (つまり 3 例以上) で P と判定された Probe Set については、当該細胞株においてその Probe Set がコードする遺伝子が発現していると判断した。逆に各群の 5 例のうち P 判定されたものが 2 例以下の場合には当該細胞株においてその Probe Set をコードする遺伝子の発現はないと判断した。

細胞株のうち少なくとも 1 株以上において発現が見られる Probe Set は次のフィルターをかけ、全ての細胞株で発現が見られない Probe Set は棄却した。

フィルター② : 一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) で細胞株間の遺伝子発現の平均値の比較を行い、有意水準 5% の条件で帰無仮説が棄却できたもの、すなわち 6 細胞株の中で発現が飛びぬけて多いもしくは少ないものが少なくとも 1 つは存在する結果が出た Probe Set は次のフィルターをかけ、いずれの細胞株間でも有意差が認められなかった Probe Set は棄却した。

フィルター③ : 細胞株間の遺伝子発現の差の平均値が 50% 以上のあるもの、すなわち 6 細胞株の最低の平均値と最高の平均値の差が 2.5 倍以上ある Probe Set は次のフィルターをかけ、差が 2.5 より小さいものは棄却した。

フィルター④ : GeneChip で得られた各 Probe Set の発現シグナルと自律拍動する小結節出現までの日数、自律拍動する小結節数、定量性リアルタイム RT-PCR によって得られた分化後の心筋遺伝子発現データの第 1 主成分もしくは第 2 主成分との間でスピアマンの順位相関係数を算出、有意水準 5% の条件で有意性を検討し、有意な相

関がある Probe Set を抽出した。スピアマンの順位相関係数および有意確率 (P 値) の算出は Glantz, S.A による著書 (Primer of Biostatistics [Fifth Edition], McGraw-Hill, 2002, pp.273-277) および群馬大学社会情報学部・青木繁伸「統計学自習ノート」の「スピアマンの順位相関係数」の項 <http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/lecture/Soukan/spearman.html> に基づき、マイクロソフトエクセルを用いて行った。

B-4-2-7. RNAi による CMP 遺伝子の機能阻害

Neomycin 耐性遺伝子を含む CL6 細胞サブラインのうち、最も効率よく心筋細胞に分化する株である CL6G52 細胞を分化誘導処理せず、24 ウェル細胞培養用マルチプレート (Falcon) にウェルあたり 1×10^4 個となるように蒔いた。これを 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で一晩培養後、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて各 CMP 遺伝子特異的な Stealth RNAi (Invitrogen) (CMP11 については QIAGEN 社製 siRNA) を導入し、B-4-2-6 項において心筋細胞分化能と関連の得られた遺伝子をノックダウンした。

まず、各細胞を抗生物質不含の基本培地 $500 \mu\text{l}$ で 2 回洗浄し、各ウェルに同培地 $400 \mu\text{l}$ を加えた。次に、1 ウェル当たりの siRNA が 40pmol となるように、蛍光オリゴとして BLOCK-iT (Invitrogen) (ウェルあたり最終濃度 10pmol) を含む、OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (Gibco) で希釈した。また、ネガティブコントロールとして、Stealth RNAi Negative Control Duplexes (Invitrogen) を同様に希釈した。その後、Lipofectamine 2000 をウェルあたり $1.5 \mu\text{l}$ となるように、

OPTI-MEM I Reduced Serum Medium で希釈し、室温で 5 分インキュベートした。このようにして希釈した siRNA 溶液またはネガティブコントロール溶液 50 μ l と Lipofectamine 2000 溶液 50 μ l を緩やかに混和し、複合体を形成させるために室温で 20 分間インキュベートした。この複合体を 100 μ l ずつ各ウェルに加えて緩やかに振盪しながら混ぜ、5%CO₂条件下 37°Cで 48 時間インキュベートした。

B-4-2-8. CMP 遺伝子のノックダウン効率の測定

RNAi を行った各遺伝子が、実際にノックダウンされているかどうかについて、定量リアルタイム RT-PCR を用いて測定した。

B-4-2-7 項に示すように、RNAi を行った後、細胞から RNesay Mini (QIAGEN) または BioRobot M48 Workstation (QIAGEN)を用いて、Total RNA を抽出した。これを、検量線が成り立つ範囲に入るように、2ng/ μ l に希釈し、未知サンプルとした。スタンダードサンプルとして、未分化な CL6G52 を直径 100mm の細胞培養ディッシュ (Falcon) でコンフルエントにならないように培養し、これから BioRobot M48 Workstation (QIAGEN)を用いて、Total RNA を抽出した。

この RNA サンプルについて TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems) および ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて B-4-2-5 項と同様に RT-PCR を行った。CMP19 については、RNAi 群で遺伝子の検出ができなかったため、予備的な検討において

TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems) よりも検出感度が優れていた QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて再度測定した。得られた結果は、18S rRNA の発現値を用いて補正し、各サンプルの補正値をネガティブコントロールの補正値と比較することで、各遺伝子の発現量の変動を解析した。

B-4-2-9. CMP 遺伝子の機能阻害後における心筋細胞分化効率の測定

RNAi を用いて機能阻害を行った CL6G52 を用いて、CMP 遺伝子が心筋細胞への分化効率にどのように影響するかを評価するために、自律拍動する小結節数の計測および心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現を測定した。まず、B-4-2-7 項に述べたように RNAi を行った後、CL6G52 細胞を分化誘導処理した。これを 5%CO₂条件下 37°Cで培養し、2 日毎に培地交換および自律拍動する小結節数を計測した。計測された小結節数は、統計ソフトウェア SigmaStat (SYSTAT Software) を用いて、反復測定二元配置分散分析 (Two-Way Repeated Measures ANOVA) で解析した。また、分化誘導後 14 日目に、RNesay Mini (QIAGEN) または BioRobot M48 Workstation (QIAGEN)を用いて、細胞から Total RNA を抽出し、心筋細胞特異的マーカー遺伝子である α MHC、 β MHC、MLC2a、MLC2v の発現を定量した。

発現の定量は抽出した total RNA を鋳型として、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム RT-PCR をすることにより行った。