

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-5. 免疫原性の新規評価技術・新規免疫機能制御技術の開発

B-5-1. ペントンベース RGD 配列改変 35 型 Ad ベクタープラスミド (pAdMS19、-20) の作製

ペントンベース・RGD 配列を RGE に置換した 35 型 Ad ベクタープラスミドである pAdMS19、および RGD 配列を欠損させた 35 型 Ad ベクタープラスミド pAdMS20 は以下のように作製した。シャトルプラスミド pHM5.4 を *AscI/EcoRI* で処理したフラグメントと、同じく *AscI/EcoRI* で処理した 35 型 Ad ゲノム (bp7930-21944) のフラグメントをライゲーションすることにより pHM5.4-Ad35-2 を得た。次に、*PmeI/AscI/NheI/Bst1107I/Csp45I/PacI/NcoI* のマルチクローニングサイトを有するシャトルプラスミド pFS4 と pHM5.4-Ad35-2 をそれぞれ *SphI/Csp45I* で処理したフラグメントをライゲーションし、pFS4-Ad35-1 を得た。さらに、pFS4-Ad35-1 を *Bst1107I* と *Csp45I* で切断したフラグメント (35 型 Ad ゲノムの 14409 bp -15544 bp を含む) と、pFS4 を *Bst1107I* と *Csp45I* で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-2 を作製した。そして、pFS4-Ad35-2 を *PvuII/PstI* 処理したフラグメントと、ペントンベース・RGD 配列付近をコードした合成オリゴ DNA (5'-CTGCTGCAGAAGCTAAGGCAAAC

ATAGTTGCCAGCGACTCTACAAGGGT
TGCTAACGCTGGAGAGGTCAGAGGAG
AGAATTTTGCGCCAACACCTGTTCCG
ACTGCA-3',
5'-GTCGGAACAGGTGTTGGCGCAAAA
TTCTCTCCTCTGACCTCTCCAGCGTTA
GCAACCCTTG TAGAGTCGCTGGCAAC
TATGTTTTGCCTTAGCTTCTGCAGCAG-
3'、アンダーラインは RGE 配列に変更した部分) をライゲーションすることにより pFS4-Ad35-5 を作製した。次に、pFS4-Ad35-5 と pFS4-Ad35-1 を *SphI* と *PvuII* で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-6 を得た。pFS4-Ad35-7 は、pFS4-Ad35-6 と pHM5.4-Ad35-2 をそれぞれ *I-CeuI/BlpI* 処理した後ライゲーションすることによって作製した。さらに、pFS4-Ad35-7 を *SgrAI* と *PacI* で切断したフラグメントと、pHM5.4-Ad35-2 を *SgrAI* と *PacI* で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-9 を得た。そして最後に、pFS4-Ad35-9 を *AscI/PacI* で切断したものと *Bst1107I* で消化した pAdMS18 を混和させ、大腸菌 BJ5183 株にエレクトロポレーションし、大腸菌中での相同組み換えによりプラスミド pAdMS19 を得た。pAdMS20 も pAdMS19 と同様の手順で作製した。尚、pAdMS20 作成の際に使用した合成オリゴ DNA の配列は以下の通りである。
5'-CTGCTGCAGAAGCTAAGGCAAACAT
AGTTGCCAGCGACTCTACAAGGGTTG
CTAACGCTGGAGAGGTCAATTTTGC
CCAACACCTGTTCCGACTGCA-3'
5'-GTCGGAACAGGTGTTGGCGCAAAA
TTGACCTCTCCAGCGTTAGCAACCCTT

GTAGAGTCGCTGGCAACTATGTTTGC
CTTAGCTTCTGCAGCAG-3'

B-5-2. 35 型 Ad ベクターの作製

Green fluorescence protein (GFP)発現 35 型 Ad ベクターは以下のように作製した。pHMCAGFP を I-*CeuI* および PI-*SceI* 処理したフラグメントと、pAdMS18 を I-*CeuI* および PI-*SceI* 処理したフラグメントをライゲーションし、pAdMS18-GFP を得た。そして、pAdMS18-GFP を Ad ゲノムの両末端に存在する制限酵素 *SbfI* で消化することにより線状にし、SuperFect Transfection Reagent (キアゲン社より入手)を用いて 60 mm 培養ディッシュに播種した 293E1B 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後約 10 日間培養し、GFP 発現 35 型 Ad ベクター Ad35GFP を得た。ペントンベース・RGD 配列を RGE (Arg-Gly-Gln) に改変した 35 型 Ad ベクター Ad35RGEGFP および RGD 配列を欠損させた 35 型 Ad ベクター Ad35ΔRGDGFP は、ベクタープラスミド pAdMS19 および pAdMS20 を用いて Ad35GFP を同様に作製した。これらの 35 型 Ad ベクターの増幅および精製は常法に従い行った。精製した Ad ベクターの物理化学的力価は Maizel らの方法に従い測定した。

B-5-3. ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞におけるインテグリンの発現解析

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞は解凍後サイトカイン入り培地 (Stem Cell 社より入手、human Flt-3 ligand: 100 ng/ml, human stem cell factor: 100 ng/ml, human interleukin (IL)-3: 20 ng/ml, human IL-6: 20 ng/ml) に懸濁し 12~18

時間培養した後、実験に使用した。CD34 陽性細胞を 1% BSA-PBS (staining buffer) に懸濁し各種抗インテグリン抗体を添加後、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を staining buffer で 2 回洗浄後、phycoerythrin (PE) 標識した 2 次抗体 (anti-mouse immunoglobulin specific polyclonal antibody (Pharmingen 社より入手)および anti-rat IgG (H+L) antibody (Jackson ImmunoResearch 社より入手)) を添加し、氷上で 1 時間インキュベートした後、細胞を staining buffer で 2 回洗浄した。これらの細胞をフローサイトメーターを用いて解析した。抗 $\alpha_v\beta_3$ (LM609)、抗 $\alpha_v\beta_5$ (P1F6)、抗 α_5 (P1D6)、抗 β_1 (P4C10)、抗 β_2 インテグリン抗体 (P4H9-A11) は Chemicon International 社より、抗 α_4 インテグリン抗体 (HP2/1) は Immunotech 社、抗 α_6 インテグリン抗体 (GoH3) は R&D Systems 社より入手した。

B-5-4. RGD ペプチド存在下での 35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を 96 穴プレートにウェルあたり 1×10^4 個で播種し、4 °C、30 分間インキュベートした。次に、RGD または RGE ペプチドを各濃度になるように添加し、4 °C、1 時間インキュベートした。その後、Ad35GFP を 3000 VP/cell で作用させ、37 °C、3 時間培養後、新鮮培地に置換し 48 時間後の GFP 発現量をフローサイトメーターを用いて検討した。

B-5-5. 35 型 Ad ベクターのヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への取り込み

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞をウェルあたり 3×10^4 個で 48 穴プレートに播種し、Ad35GFP、Ad35RGEGFP および

Ad35ΔRGDGFP を細胞あたり 6000 VP で感染させ、37°C、3 時間培養後に細胞を回収した。細胞を冷 PBS で 5 回洗浄した後、35 型 Ad ベクターのゲノム DNA を含む total DNA を DNeasy Tissue Kit (キアゲン社より入手) を用いて回収した。DNA 量を picogreen (Invitrogen 社より入手) で測定した後、total DNA に含まれる Ad ゲノム DNA 量を ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems 社) を用いて測定した。測定条件は、25 ng サンプル DNA、0.5 μM プライマーセット、0.16 μM TaqMan probe、25 μL Real-time PCR Master Mix (TOYOBO 社より入手) を含む最終容量 50μL の混合液を反応させ、95 °C 15 秒、60 °C 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクルの条件で定量した。また、プライマーおよび蛍光標識プローブは 35 型 Ad ベクターの pIX 領域に設定した。配列を以下に示す。

Ad35 pIX-forward ; 5'-TGG ATG GAA GAC CCG TTC AA-3'

Ad35 pIX-reverse ; 5'-CGT CCA AAG GTG AAG AAC TTAAAG T-3'

蛍光標識プローブ ; 5'-FAM-CGC CAA TTC TTC AAC GCT GAC CTA TGC-TAMRA-3'

35 型 Ad ベクターのスタンダードとしては 35 型 Ad ベクターのプラスミド pAdMS4 を用いた。

B-5-6. 抗インテグリン抗体存在下での 35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を 96 穴プレートにウェルあたり 1×10⁴ 個で播種し、4 °C、30 分間インキュベートした。次に、抗

インテグリン抗体を 50 μg/mL で添加し、4 °C、1 時間インキュベートした。その後 Ad35GFP を細胞あたり 3000 VP で作用させ、37°C、3 時間培養した。新鮮培地に交換の後再度培養し、遺伝子導入 48 時間後にフローサイトメーターを用いて GFP 発現量を測定した。

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。また、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適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で研究を実施した。

C. 結果

C-1. 感染性因子の安全性評価技術開発

C-1-1. PEI ビーズによる HAV の濃縮

PEI ビーズによるウイルス濃縮の最適化条件のヒト肝炎ウイルスへの適用について検討した。まず、*in vitro* 培養系で増幅した A 型肝炎ウイルス (HAV) を対象に、PEI 磁気ビーズ濃縮に及ぼす pH と FCS の影響を検討した結果、pH の影響、FCS の影響は特に認められず、いずれの条件でも 1ml (10 倍量) のウイルス液からの濃縮で control の 100μl からの抽出と比較して約 10 倍のコピー数が回収されほぼ完全に濃縮された (Fig.1A)。次に、10ml(100 倍量) の大容量のウイルス液からの濃縮を検討した結果、PEI ビーズ画分に 74 倍と非常に高

率で HAV が回収され、上清画分に残存した量は 20%以下であった (Fig. 1B)。PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮をヒト血液試料に適用可能かどうか検討する目的で、ヒト正常血漿またはヒト正常血清で HAV を希釈した場合の PEI ビーズによる濃縮を検討した (Fig. 1C)。その結果、ヒト正常血漿で希釈した HAV はほぼ完全に回収されたが、ヒト正常血清で希釈した場合には回収率は 50%程度とやや劣っていた。

C-1-2. PEI ビーズによる HBV の濃縮

B 型肝炎ウイルス (HBV) の PEI ビーズ濃縮について、国内標準品を用いて検討した。まず、PEI ビーズ濃縮の pH と FCS の影響を検討した結果、無血清条件では濃縮率は 5 倍以上であったが HAV ほど高効率ではなく、さらに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 (Fig.2A)。また、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。昨年度の報告書に記載したように、PEI ビーズでの濃縮効率が劣る場合に、IgM 抗体を用いて免疫複合性を形成させることにより濃縮効率を向上させることができることが判明している。そこで、ウサギを用いて抗 HBV-IgM 抗体を作成し、PEI ビーズによる HBV の濃縮時に抗 HBV-IgM 抗体を添加したところ、添加量に依存して濃縮効率の向上が認められた (Fig.2B)。そこで、この条件を用いて大容量からの濃縮を検討したが、10ml(100 倍量)からの濃縮では、抗 HBV-IgM 抗体の有無にかかわらず 1ml (10 倍量) からの濃縮よりもさらに低い量のウイルスしか PEI ビーズには回収されなかった (Fig.2C)。

次に、ヒト血液試料中の HBV の濃縮を検討するため、HBV 国内標準品をヒト正常血漿及びヒト正常血清で希釈して PEI ビーズによる濃縮を検討した (Fig.3A)。その結果、ヒト正常血漿、ヒト正常血清のいずれで希釈した場合も PEI 磁気ビーズへの HBV の吸着は全く認められなかった。抗 HBV-IgM 抗体を添加しても回収率の向上には至らなかった。ウイルス濃縮効率はヒト正常血漿のロットにより差があり、ヒト正常血漿に乳糜が認められると濃縮効率が劣ること、乳糜の影響は 0.22 μ m のフィルターろ過で除くことができることが予備実験で確認されている。しかし、フィルターろ過したヒト正常血漿を用いても、濃縮効率は改善されなかった。同様の検討を HBV ジェノタイプパネルの中の 1 種類の試料を用いて同様の検討を行った (Fig.3B)。その結果、ヒト正常血漿で希釈すると、HAV と同様に効率よく濃縮され、抗 HBV-IgM 抗体の添加によりさらに濃縮率の向上が認められた。一方、ヒト正常血清で希釈したものはあまり濃縮が認められなかった。

C-1-3. PEI ビーズによる HCV の濃縮

C 型肝炎ウイルス (HCV) の PEI ビーズ濃縮について HCV 国内標準品を用いて検討した。その結果、HCV は 2%FCS 存在下でも PEI ビーズにより非常に効率よく濃縮可能であること、濃縮効率は弱酸性でより高い傾向が認められた (Fig.4A)。しかし、HCV の 10ml(100 倍量)からの濃縮を検討したところ、30 倍程度の濃縮に留まり、1ml (10 倍量) からの濃縮と比較してかなり効率が劣ることが判明した (Fig.4B)。また、ヒト血液試料中の HCV の濃縮について、ヒト正常血漿及びヒト正常血清で希釈して

検討したところ、HAVと同様、ヒト正常血漿では高効率で濃縮可能であるが、ヒト血清で希釈したものは濃縮効率が劣るという結果が得られた (Fig. 4 C)。

次に、PEI ビーズ濃縮による HCV の検出感度の向上を検討した。HCV をヒト正常血漿で希釈して 1, 10, 100 IU/ml となるように調製し、コントロールの 0.1ml 各 10本のチューブからの直接抽出と、1ml 各 10本のチューブからの PEI ビーズ濃縮を行った後、2段階 PCR によりウイルスを検出したところ、コントロールでは 1 IU/ml で 2/10 の低い確率でしか検出されず、10 IU/ml でも 8/10 の確率に留まるのに対して、PEI ビーズ濃縮では 1 IU/ml で 8/10 の確率で検出され、10 IU/ml では完全に検出が可能という結果が得られた (Fig. 5 A)。コントロールと 1ml からの PEI ビーズ抽出の試料各 2本ずつについて、定量 RT-PCR でコピー数を測定した結果、PEI ビーズ濃縮により 1 IU/ml の HCV が検出可能であり、濃縮により検出感度が 5~7 倍向上することが確認された (Fig. 5 B)。

さらに、これまで検討した HCV の国内標準品はジェノタイプ 1b であるが、ジェノタイプが異なる HCV も PEI ビーズで濃縮可能かどうかを検討した。HCV ジェノタイプパネルのうち、ジェノタイプと由来の異なる 10 種類の試料について、ヒト正常血漿で 40 倍に希釈後、ウイルス濃縮を検討した。その結果、濃縮効率はジェノタイプ 3a の約 5 倍からジェノタイプ 2a, 4 の約 20 倍までとジェノタイプの違いにより差は認められたものの、検討した全てのサンプルについて濃縮可能であることが明らかになった (Fig. 6 A, B)。

C-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

C-2-1. HL60 細胞の遺伝子増幅の解析

HL60 細胞より抽出したゲノム DNA を、コントロールの正常ゲノム DNA をリファレンスに Table 1 に従って作成した NANDEMO アレイ上に競合的にハイブリさせた結果得られた CGH データのうち、8q24 領域の *c-myc* 遺伝子近傍の部分のシグナルを Fig.7 に示す。図より、この領域において 6 つの独立した増幅領域が確認された。さらに詳しく見ると、5 番目の増幅領域に関しては、他と比べてコピー数の多い部分があり、この部分を独立した領域と考え、全 7 領域に関して、1-7 の番号をつけその両端をセントロメア側から a,b とした (Fig.7)。次に各増幅における末端部を決定するために、両端に外向きに PCR 増幅用のプライマーを設計した。プライマーの設計にあたっては、Fig.7 の 1a-7b 領域に於ける各プローブのシグナル強度の変化より、切断点と予想される領域から少し内側に百~数百塩基対入った場所に、ゲノムの配列情報を基に約 19-20bp のプライマーを設定した。プライマーの設計にあたっては、primer3 ソフトウェアを用いて、Tm 値や 2 次構造や相互の相補性の回避などを考慮して設計した。設計したプライマーのゲノムシーケンス上の位置 (UCSC ゲノムブラウザー) を Fig.7 に記した。赤矢印が設計したプライマーの位置であり、図中黒矢印は、シーケンス解析のためにより外側に設計したプライマーの位置である。なお、白矢印は、最終的に決定された切断点の位置である。

図中に示した赤矢印は、過去の報告によ

り用いられたプライマーの位置である。この報告では、HL60 細胞に対して、c-myc を含む領域と myc co-amplified region (MCR) の二つの領域の増幅が確認されており、今回の増幅領域においては、それぞれ 4a-b、および 5a-b に相当する。

こうして設計したプライマーを用いて、どの増幅領域とどの増幅領域がつながっているかを調べるために、1a-7b の 14 種類のプライマーを用いた総当たりの PCR を行った (Fig.8)。その結果、電気泳動の図に示したようにいくつかの組み合わせについて増幅が認められた。非特異的増幅によるバンドも含まれていると考えられたため、確認のため増幅が見られたバンドを切り出し、PCR 産物をゲルより精製した後、シーケンス解析を行った。その結果、ゲノム配列より予想される配列が得られたペアについて Fig.8 に示した。最終的に、2b,5a に関しては、目的のシーケンスが当初得られなかったが、ランダムプライマーを使ったウォーキング法により、この両者がつながっていることが確認できた。

以上の結果より、それぞれの増幅領域における配列の順序が Fig.9 のように決定でき、全ての領域がつながったことから、増幅領域は環状の構造をしていることが明らかとなった。HL60 細胞での遺伝子増幅領域は DM 染色体として存在するため、この結果より、DM 染色体が環状構造をしていることが証明できた。

各増幅単位の連結部分のシーケンス解析結果を Fig.10 に示すが、7b と 1a のジャンクション部分の配列解析の結果、7 と 1 の配列の間に約 200bp のどちらにも属さない新たな配列が確認できた。この由来を調

べるために、ヒトゲノムシーケンスに対して相同配列検索 (BLAST サーチ) を行ったところ、同じ 8 番染色体の 7b より約 6Mbp 下流 (テロメア側) の配列と一致した。この結果より、増幅単位は全てで 8 つあることが判明した。

C-2-2. HL60 および HL60-RG 細胞の oligo-CGH アレイによる解析結果の比較

すでに BacCGH および SNP チップを使った解析および m-FISH 解析から、HL60RG 株における親株 (NG) からの染色体変化についてはある程度判明していたが、親株自身を含めて変化の見られた領域に対して oligo-CGH 用プローブを設計し、両者のシグナルを比較した。Fig.11 に各染色体での CGH シグナルの変化と、BacCGH アレイおよび m-FISH での染色体像との比較をまとめた。

まず、11 番染色体においては RG 株で短腕の欠失が存在することが BacCGH および m-FISH のデータよりわかっていたが、今回 oligoCGH アレイを使った解析結果からは不思議なことに、短腕末端部においては、逆に RG 株は正常シグナルに戻っているのに対し、親(NG)株では末端の欠失が観察された。また、RG 株において、非常に狭い領域においてさらにシグナル値の低い部分が 2 箇所見つかると、テロメア側は、シグナル値が正常に戻る位置に存在した。他方、長腕側末端部では、RG 株においてロスが認められたが、テロメア近傍は正常なシグナル値に戻っていた。

次に、10 番染色体では、NG, RG 株ともに短腕部の欠失が存在するが、NG 株ではさらにコピー数の減少してると思われる領域が存在した。また、セントロメア側の切

断点には両者に差があり、RG 株の方が欠失の領域が広いことが確認された。

9 番染色体の欠失領域は、NG, RG 両株とも一致したシグナルを与え、breakpoint の特定が可能であった。

さらに、他の染色体領域に関して調べた結果を、m-FISH による染色体像と並べて比較した。18 番染色体については、NG 株でトリソミーが観察されたことと相関して、染色体全体のシグナル値が上昇していたが、RG 株についても、ある程度シグナルの上昇はみとめられた事より、一部トリソミーを持つ細胞集団が混在していると予想される。14 番および 5 番染色体については、転座に伴う欠失の breakpoint が特定でき、両株で一致した結果が得られた。16 番染色体では m-FISH 解析よりどちらの株も転座に伴うテロメア側のロスを持つことが予想されたが、oligoCGH シグナルは両者の間のシグナルの出方に差があり、NG 株ではさらにシグナル値の低い微小な欠失領域が認められた。

C-2-3. ヒト間葉系幹細胞の培養過程における染色体変化の解析

Cambrex 社より購入したヒト間葉系幹細胞 (Lot#4F1560) を、MSCGM 培地にて継代培養し、23 継代目の細胞と 5 継代目の細胞より DNA を抽出し、50K Human Mapping Array による SNP 解析およびそのシグナル強度を利用した CGH 解析を行った。

各プローブのシグナルを用いて CGH 解析を行った。CNAG および dCHIP フリーソフトウェアを利用して、使用説明に従って解析を行った。Fig.12 に 5 継代目をリファレンスとして 23 継代目のシグナル値の

増減を表した結果を示す。両ソフトウェアから得られた結果は一致し、7 番および 17 番染色体上にシグナル値の異常が観察された。7 番染色体は大きく 4 つのセグメントに分かれてシグナル値の変化があり、シグナルの増加している部分、正常部分、および減少している部分が認められた。長腕側の 2 箇所は小さな領域としてシグナルが 1 段階変わっており、また短腕テロメア部分も増加していたシグナル値が一段階戻っていた。17 番染色体の方は、さらに複雑な様式でシグナルの増減を示す領域が複数箇所認められた。

dCHIP を使った LOH (Loss of Heterozygosity) 解析の結果、有意な LOH 領域として、3 番染色体および 8 番染色体の一部にヘテロの SNP Call の消失が認められた (Fig.13)。この LOH は、23 継代とともに 5 継代目でも同様に見られており、培養過程で起こった LOH ではなく、この細胞が元から持っていた LOH であると考えられる。

以上の結果より、23 継代目の細胞には 7 番と 17 番染色体を含む何らかの染色体異常が起きている可能性が示唆されたため、これを確認するため Spectro Karyotyping (SKY) 法および G-banding による染色体解析を行った。24 継代目の凍結保存細胞を培養し、26 継代となった時点で染色体標本作製し SKY 解析を行った結果を Fig.14 に示す。予想された通り、7 番染色体に異常が認められ、一部 17 番染色体との転座を含んでセントロメア付近の部分のコピー数が増えていた事がわかった。また、これに対して、6 継代目の細胞を用いた結果は、正常核型を示しており、この世代間での培養

の途中において、染色体変化を持った細胞が増えたことになる。異常を持つ細胞の割合については、G-banding 法を用いてより多くの細胞について、核型を解析した結果を Table 2 に示した。10 細胞ずつを解析した結果、6 継代目については全て正常核型であったのに対し、26 継代目の細胞では、全てに 7 番および 17 番染色体を含む異常が観察されたほか、1 例について 21 番と 22 番染色体の転座による 2 動原体染色体が認められた。さらに各 50 メタフェーズに対して染色体数を計測した結果、6 世代目が全て正常の 46 本であったのに対し、26 継代目は 47 本を中心に 40 本まで染色体数が広く分布していた。現在、この間の経時変化について、7 番および 17 番染色体セントロメア特異的 FISH プローブを用いた追跡を行っている。

上記、染色体解析の結果得られた異常像を、CGH 解析の結果と比較したのが Fig.15 である。染色体解析の結果より、17 番染色体はセントロメア付近の領域のみをもつ短い染色体が 2 本少し異なるサイズにて余分に存在する。また、17 番染色体との転座融合染色体が 1 本存在する。これを CGH の結果と比較すると、ちょうどセントロメア付近でシグナルが最大になっている領域が染色体 4 本分、すなわち一番短い染色体の占める領域に相当し、2 番目に短い染色体に余分に存在する領域が、染色体 3 本分に相とすると考えられる。それ以外の部分は正常の 2 本分に相当するため、CGH で一見ロスがあるように見えた領域が、本来の正常 2 コピーに相当する領域であることがわかった。これはおそらく解析の過程で、本染色体が全体として増幅していたために、

ベースラインが低めに算出されたことに由来すると考えられる。このように考えると、CGH 解析結果は見事に 17 番染色体の部分的増加を予測しており、両者の結果は一致していた。17 番染色体に関しては、転座した染色体に増減を伴う複雑なリアレンジメントが存在することが予想され、G-banding のパターンからもそれが支持された。21 番と 22 番染色体の転座については、染色体の増減を伴っている可能性もあるが、転座を持つ細胞は一部の細胞に限られるため、全体の平均値としてのみ検出可能な CGH 解析においては、たとえ存在しても検出できないと考えられる。

C-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

C-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

一般に単層培養細胞の継代時には、細胞をトリプシン処理してカルチャーディッシュより剥がすという操作が必要となる。この際、トリプシン消化により、細胞表面にあるタンパク質は分解され、ペプチドが遊離する。通常この処理液は廃棄される事になるが、遊離ペプチドの情報から細胞表面のタンパク発現を推察できることから、細胞特性の指標として利用できる事が期待できる。そこで、この遊離ペプチドを網羅的に LC-MS を用いたプロテオーム解析手法により検討することにより、培養細胞の特性解析および品質評価の一助とすることを目的として、その解析手法の確立をめざした。

今回は、モデル実験として、造血幹細胞に対する造血支持能力の異なる 2 種のマウ

ス細胞 NIH3T3 細胞、および SWISS-3T3 細胞を使用し、表面ペプチドの差がその造血支持能に及ぼす影響についても考察を加える事を目的とした。

用いた実験系は、Fig.16 に示したようなナノ LC-MS/MS システムで、流速 300 nL/min という低速で、高感度なペプチド分析が可能となる。細胞をトリプシン処理した上清 200 μ l をモノリスカラムチップを用いて濃縮精製(脱塩)し、ペプチドを 100 μ l の 60%アセトニトリル 0.1%TFA 溶液にて溶出した。この溶出液 2 μ l を LC-MS にインジェクションしたところ十分な量のペプチドシグナルが観察された。検出されたペプチドの全貌を明らかにするため、LC-MS より得られる生データを、PeP-3D というフリーの可視化ソフトで処理できるように mzXML ファイルへと変換し、リテンションタイム、質量(m/z)値、ピークインテンシティーによる 3次元グラフ化を行った。その結果を Fig.17 に示す。

造血支持能力の低い NIH3T3 細胞を対照として、造血支持能をもつ SWISS3T3 細胞の独立したカルチャーより得られたトリプシン処理液 2種類を用い、LC-MS 解析にて得られたペプチドをマッピングしたところ、数多くのシグナルが検出された。SWISS3T3 由来の 2 サンプルは非常に類似したパターンを示し、NIH3T3 も全体として類似していたが、いくつかの異なるスポットが見られた。このペプチドマップは、LC-MS から得られる親イオンすなわち TOF-MS のデータをもとに作成されているが、データ依存的 MS/MS 解析を同時に行うことにより、タンパク(ペプチド)の同定を試みた。グラフ上で青色にマークされ

ているのは、MS/MS 測定が行われた親イオンを示す。得られた MS/MS データを元に、タンパク同定ソフトである MASCOT を用いて、プロテインデータベースに対して MS/MS イオンサーチを行い、同定されたタンパク質を各グラフの下に示した。

NIH3T3 細胞より同定されたタンパク数が最も数が多く、SWISS3T3 の 2 ロットはその半分程度であった。重複して同定されていたタンパクも多く、特に SWISS3T3 間での共通性は高かった。同定されたタンパク質の内容をみると、heat shock protein や actin などの膜タンパク以外のものも含まれており、壊れた細胞や分泌タンパク由来と考えられる。MASCOT 検索で有意性を持って同定されるタンパクは、複数のペプチドのヒットによるもので、膜表面など一部のペプチドが同定されたものは、有意性スコアの低い部分に現れる。実際に、シングルペプチドのみが検出されたものはさらに多くの数が存在することから、これらの中にも重要なペプチドが含まれると考えられ、トータルペプチドとしての変化を、3次元グラフ上から検出するアプローチが有効であると考えられる。

細胞間の差という観点から同定されたタンパクを眺めてみると、造血支持能が高かった SWISS3T3 細胞のみで同定されたタンパクとして、fibronectin が注目される。Fibronectin は細胞表面にあって、細胞間接着等に関わっていることから、このタンパク質が、造血幹細胞との相互作用により、その造血能を支持している可能性もある。

C-3-2. 細胞表面糖鎖の構造・不均一性の解析技術の開発

C-3-2-1. 製造工程由来不純物試験：NeuGc 定量法

1) nanoLC/ ITMS-FTMS による DMB-NeuAc 及び DMB-NeuGc の測定

シアル酸の定量法として、DMB 誘導体化と LC/蛍光検出法や MS を組み合わせた方法が用いられている。MS には、分子量やフラグメントからシアル酸分子種を同定できるという利点がある反面、DMB シアル酸の分子イオンは脱水しやすいために十分な検出感度が得られないという問題がある。そこで、脱水イオンの生成を抑えるためにイオンの取り込み量 (AGC 値) 及び脱水イオンの生成量の関係について調べたところ、FTMS のイオン取り込み量を $5E+04$ に設定することによって、脱水イオンの生成をほぼ抑えられることが明らかとなった (Fig.18)。本研究ではこの AGC 値を用いて DMB-NeuAc 及び DMB-NeuGc の分析を行った。

まず、nanoLC/FTMS 装置を用いて、DMB で標識した NeuGc 標準品 (MW 442.14) 及び NeuAc 標準品 (MW 426.15) (各 2 pmol) をポジティブイオンモードの Selected ion monitoring (SIM, m/z 400-450) により測定した。 m/z 442.12-442.16 及び m/z 426.13-426.17 のエクストラクテドイオンクロマトグラム (EIC) を描いたところ、Fig.19 に示すように、14 及び 15 分周辺に peak a 及び b が出現した。14 分に溶出された分子は、分子イオン ($[M + H]^+$) の m/z 値 (m/z 442.145) から、DMB-NeuGc であることが示唆された (Fig.20A)。さらに、 m/z

442.145 のイオンをプリカーサーイオンとして得られたプロダクトイオンスペクトル (Fig.20B) 上に、2 分子及び 3 分子の H_2O が解離したイオン (m/z 406 及び m/z 388)、 H_2O 3 分子及びグリコシル基が解離して生じたイオン (m/z 313)、並びに環開裂フラグメントイオン (m/z 229 及び m/z 283) が観測されたことから、この分子は DMB-NeuGc であることが確認された。同様に、peak b の分子は、 $[M + H]^+$ (m/z 426.150) 及びそれをプリカーサーイオンしたプロダクトイオン (m/z 390, 372, 313, 283 及び 229) から、DMB-NeuAc であることが確認された (Fig.20C 及び D)。

nanoLC/ESI-FTMS による DMB-シアル酸測定法の直線性について、500 pmol から 7.8 fmol の範囲で検討した。その結果、0.0078-50 pmol の範囲で直線性が確認された。DMB-NeuGc 及び NeuAc の回帰直線式はそれぞれ $Y=1.31 \times 10^6 X - 9028.5$ ($r=0.9998$) 及び $Y=2.03 \times 10^6 X - 21548.0$ ($r=0.9995$) であった (Fig.21)。また NeuGc の検出限界 (DL) 及び定量限界 (QL) は 8.6 fmol 及び 26.3 fmol、並びに NeuAc の DL 及び QL は 5.6 fmol 及び 16.9 fmol であった。NeuGc 分析の精度は 7.3%、また、真度は 92.4% であった。以上の結果から、nanoLC/FTMS により DMB-NeuGc 及び DMB-NeuAc の定量が可能であることが確認された。

2) HL-60 細胞膜画分由来 NeuGc 及び NeuAc の定量

モデル細胞として HL-60 細胞を用いて、細胞膜に存在する NeuGc 及び NeuAc の定量法としての本分析法の実行可能性を評価した。

FCS 添加培地で培養した細胞 (1×10^6 個) の膜画分を超遠心分離により調製し、酸処理 (2 M 酢酸, 80°C , 3 時間) によりシアル酸を遊離させた。DMB でシアル酸を標識した後、細胞 2.5×10^3 個分のシアル酸を用いて、nanoLC/FTMS 及び nanoLC/MS/MS を行った。Fig.22A に示すように、EIC (m/z 442.12-442.16) の 14 分にピークが出現した(peak c)。この位置に溶出された分子は、分子イオン (m/z 442.145) (Fig.22B)、及び $[\text{M} + \text{H}]^+$ (m/z 442.145) をプリカーサーイオンとして得られたプロダクトイオン(m/z 406, 388, 313, 283 及び 229)から (Fig.22C), DMB-NeuGc と同定された。同様に、EIC (m/z 426.13-426.17) 上に出現した 15 分付近のピーク(peak d) (Fig.23A) の分子は、分子イオン (m/z 426.150) 及びその分子イオンの MS/MS により得られたプロダクトイオン (m/z 390, 372, 313, 283 及び 229) から、DMB-NeuAc と同定された (Fig.23B 及 C)。

10% FCS 添加培地中で培養した HL-60 細胞 (2.5×10^3 個) 膜画分に存在する NeuGc 及び NeuAc 量は、Peak c 及び d のピーク面積から、それぞれ 55.4 ± 4.6 fmol 及び 13.5 ± 0.6 pmol と算出された (Fig.24)。

つぎに、ヒト血清添加培地中で HL-60 細胞を 10 日間培養 (培地交換 4 回) した後、本分析法を用いて、細胞膜画分に存在する NeuGc 及び NeuAc を定量した。ヒト血清を使用したにも関わらず、EIC (m/z 442.12-442.16) 上の DMB-NeuGc が溶出される 14 分付近にピーク (peak e) が確認された (Fig.25A)。Peak e の位置に溶出

された分子は、分子イオン (m/z 442.145) 及びその MS/MS から、DMB-NeuGc と同定された (Fig.25B 及 C)。細胞 (2.5×10^3 個) 膜画分に存在する NeuGc 及び NeuAc の含量は、それぞれ 29.2 ± 2.4 fmol 及び 21 ± 1.4 pmol であった (Fig.24)。これらの結果から、ヒト血清添加培地で培養しても、HL-60 細胞膜画分に NeuGc が存在することが明らかとなった。以上の結果から、nanoLC/FTMS を用いたシアル酸分析法によって、細胞膜に存在する微量の NeuGc を定量できることが実証された。

さらに、HL-60 細胞を無血清培地で培養し、膜画分に含まれるシアル酸分子の同定と定量を行った。その結果、EIC (m/z 442.12-442.16) 上に NeuGc に相当するピークは観察されなかった。尚、NeuAc 量は 20.5 ± 1.6 pmol であった (Fig.24)。以上のことから、NeuGc を含まない無血清培地で培養したヒト細胞には NeuGc は混入しないことが確認された。

C-3-2-2. 細胞特性確認試験: N結合型糖鎖のプロファイリング

はじめに、10% FCS を含む培地で培養した HL-60 細胞から N結合型糖鎖を酵素的に切り出し、 NaBH_4 で還元した後、細胞 1×10^6 個相当の糖鎖を用いて、ポジティブイオン FTMS、データ依存的 LC/MS/MS \sim MS/MS/MS/MS、並びにネガティブイオン FTMS、データ依存的 LC/MS/MS \sim MS/MS/MS/MS を行った。データ依存的 MS/MS \sim MS/MS/MS/MS は各スキャンで最も強度の高いイオンをプリカーサーイオンとして行った。Fig.26 の青で示す部分は、ポジティブイオン FTMS によって得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) で、

主に中性糖鎖とシアル酸結合数の小さい糖鎖のプロファイルを示している。赤で示す部分は、ネガティブイオン FTMS によって得られた TIC で、主にシアル酸結合数の大きい糖鎖のプロファイルを表している。主なピークの糖鎖構造は、プロダクトイオンスペクトルから、Fig.26 中に示すように推定された。以上のように、nanoLC/MS を利用することによって、 10^6 個程度の細胞の糖鎖プロファイリングが可能になることを確認した。

つぎに、ヒト血清を含む培地、及び無血清培地で培養した HL-60 細胞の糖鎖プロファイリングを行った。Fig.27A 及び B はそれぞれ、ヒト血清及び無血清培地で培養した HL-60 細胞由来高マンノース型糖鎖のプロファイルである。無血清培地で培養すると、Man9 糖鎖が増加することがわかる。Fig.27C 及び D は、ポジティブイオンモードで得られたヒト血清及び無血清培地で培養した細胞由来複合型糖鎖のプロファイルである。また、Fig.27E 及び F はネガティブイオンモードで得られた同糖鎖のプロファイルである。ヒト血清添加培地と無血清培地で培養した細胞の糖鎖プロファイルは全く異なること、特に、無血清培地ではバイセクテッド 2 本鎖糖鎖が著しく増加することが明らかとなった。以上の結果から、糖鎖プロファイリングは細胞の変化を検出する方法として利用可能であることが示唆された。

C-4. 細胞特性指標の探索

C-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用件の検討

C-4-1-1. AC133 陽性細胞由来 EPC の誘導

系における TPO の効果

我々はこれまで、ヒト末梢血あるいは臍帯血から分画した AC133 陽性細胞から EPC を分化・誘導する系を確立し、AC133 陽性細胞に由来する CD31 強陽性細胞が活性の高い EPC であることを報告してきた (Fig.28)。また、昨年度までの検討で、移植される患者の負担やリスクを軽減するため *in vitro* で EPC を増幅する物質を探索した結果、TPO が AC133 陽性細胞から分化する CD31 強陽性細胞画分を増加させることを見出した。今年度はその TPO の EPC 増幅効果を詳細に検討し、経時的変化と濃度依存性を明らかにした。

Fig.29A は AC133 陽性細胞を 1 週間培養後、抗 CD31 抗体-FITC で免疫染色し、フローサイトメーターで解析した結果である。最上段に示すように CD31 強陽性細胞は末梢血では 0.46%、臍帯血では 0.35% の部分に相当する。SCF を添加して培養した場合末梢血では 0.47%、臍帯血では 0.30% とあまり増加しないのに対し、TPO を添加して培養すると末梢血では 2.30%、臍帯血では 2.60% と増加する。細胞総数と FACS により示される割合から CD31 強陽性細胞の絶対数を計算すると、Fig.29B に示すようになり、TPO を添加することで CD31 強陽性細胞が 10 倍以上増加することが明らかとなった。

TPO を添加した際の細胞総数を経時的に検討してみると、3 日目まではほとんど変化しないのに対し、その後急速に増加する (Fig.30A)。この時の、すなわち、AC133 陽性細胞培養 3 日後の TPO 受容体の発現を解析してみると、末梢血 (Fig.30B パネル上段) においても臍帯血 (Fig.30B、パネル

下段)においても CD31 陽性細胞 (Fig.30B パネル左) と AC133 陽性細胞 (Fig.30B、パネル右) はともに TPO 受容体を発現していることから、TPO は AC133 陽性と CD31 陽性細胞の両方から、CD31 強陽性細胞への分化を促している可能性が考えられた。

次に、添加する TPO の濃度を検討した。その結果、5ng/ml の TPO により細胞総数が約 2 倍の上昇を示した (Fig.31 左)。TPO の濃度を 10ng/ml から 50ng/ml に上昇させても細胞総数の顕著な増加は観察されなかったが (Fig.31 左)、CD31 強陽性細胞の絶対数を計算すると末梢血では CD31^{bright}VEcad⁺細胞 (Fig.31 右上) が、臍帯血では CD31^{bright}VEcad⁺細胞と CD31⁺brightVEcad⁻細胞 (Fig.31 右下) が、TPO の濃度に依存して増加した。VE カドヘリン (VEcad) は EPC の分化段階のマーカーであり、EPC としての分化が進むと VEcad 発現が増加すると考えられることから、末梢血では、TPO によって分化の進んだ細胞の割合が高い EPC を調製できると考えられた。今後、TPO の細胞内のシグナル伝達機構について解析する予定である。

C-4-1-2. CD31 強陽性 EPC の特性指標である IL-8 の産生および分化誘導への影響

Fig.32 は、CD31 強陽性細胞および CD31 陽性細胞をソーティング後培養し、培地中に放出される IL-8 の量を示している。CD31 強陽性細胞は CD31 陽性細胞に比べ、大量の IL-8 を産生する。そこで、IL-8 がオートクラインにより EPC の分化を促進する可能性を考え、EPC の分化に対する IL-8 の影響を抗 IL-8 抗体を用いて解析した (Fig.33)。上段は AC133 陽性細胞に抗 IL-8 抗体をウェルあたり 10 μ g 加えて一週

間培養した時の顕微鏡写真である。対照群に比べて、ややコロニーが小さいように思われた。しかし、CD31 強陽性細胞数を細胞総数と FACS 解析をもとに算出すると (Fig.33 下段)、末梢血 (Fig.33 下段左) においても臍帯血 (Fig.33 下段右) においても、減少する傾向にはあったが、有意ではなく、IL-8 は EPC 分化に大きな影響を及ぼさないと考えられた。

C-4-1-3. 単核球由来 EPC の誘導に対する血小板の影響

単核球から AC133 陽性細胞を分離し、EPC を誘導する我々独自の系と並行して、最も一般的な単核球画分全体からの EPC 誘導系に関する検討も行った。臍帯血より Lymphoprep tube を用いて単核球を分離し、FN コートしたプレートに播種すると、単核球の一部の画分と共に血小板もプレートに接着し、培養開始 1 週間後ぐらいまではプレート上に存在する (Fig.34)。血小板は血管新生に促進的あるいは抑制的に働く多くの生理活性物質を含有していることから、FN への単核球の接着あるいは EPC への分化に血小板が影響している可能性が考えられた。そこで、Lymphoprep ($\rho=1.077$ g/ml) による分離で得られた単核球画分を、 $\rho=1.063$ g/ml に調整した細胞分離用高分子担体 Optiprep に上層して遠心することにより、単核球画分から血小板を除去したサンプルを用いて、血小板が EPC 分化に与える影響を解析した (Fig.35)。

血小板除去前、除去後、および、血小板除去後に血小板を添加したサンプルの 3 種類について、EPC 誘導条件下で培養を行い、1 週間後に AcLDL 取り込み陽性、抗 CD31 抗体染色陽性の細胞を蛍光顕微鏡で観察し

た。その結果、Fig.36 に示すように、血小板を除去することにより、EPCが大幅に減少することが明らかになった。一方で、血小板除去後に再度血小板を添加することにより、EPC数が回復したことから、血小板がEPCの誘導に促進的に働いていると考えられた。

EPC誘導系における血小板の作用が血小板由来の液性因子を介したものである可能性を検討するため、単核球と血小板が接触しないよう、単核球をFNコートプレート上に、血小板を多孔性のセルカルチャーインサート中に播種して、培養を行った。セルカルチャーインサートとしては、血小板（直径約2 μ m）が通過しないように、0.4 μ mのポアサイズのものを用い、ポア密度が通常のものより高いもの、および、ポア密度が通常でFNコートしてあるもの、の3種類を用いた。その結果、血小板をインサート内に隔離して培養した場合は、いずれの種類のインサートにおいてもEPC出現に対する血小板の促進効果が見られず、血小板がEPCの誘導を促進するには、血小板と単核球が接触できる環境にあることが必要であると考えられた (Fig.37)。実験に用いた培養系では、培養液の流れなど物理的刺激は与えていないが、FNコートプレート上の細胞を顕微鏡で観察すると、血小板が細かく動き、単核球に接触を繰り返す様子が観察された。血小板の動きはパラホルムアルデヒドで固定した場合も観察されたため、能動的なものではないと考えられるが、静置培養系においても単核球と血小板の接触が認められたことから、血小板との接触によって単核球内でのシグナル伝達経路が直接活性化される可能性、あるいは、血小

板と単核球の接触後に、どちらか、あるいは両方から、EPC誘導に関わる因子が放出され、EPCの誘導に関与している可能性などが考えられる。

血小板と単核球の接触によりEPCの誘導が促進されていることが明らかとなったため、血小板に存在する接着タンパク質P-selectinが、単核球由来EPCの分化誘導促進作用を持つ可能性について検討した。P-selectinは、789アミノ酸からなる膜貫通タンパク質で、細胞外部分にはレクチンドメインがあり、シアリルルイスX構造を持つ糖鎖をリガンドとしている。P-selectinの細胞外ドメイン730アミノ酸のみをCHO細胞で発現させた組換えP-selectinを用い、そのEPC誘導効果について検討した。

Optiprepを用いて血小板を除去した単核球をFNコートしたプレートに播種し、P-selectinを10ng/ml、100ng/ml、1 μ g/ml、10 μ g/mlの濃度で添加して培養した。培養開始1週間後に、DiI-Ac-LDLの取り込み、および、抗CD31抗体染色陽性の細胞数を計測した結果をFig.38に示す。その結果、P-selectin濃度が1 μ g/ml、10 μ g/mlの場合に、P-selectinを添加しない場合と比較してEPC数が多く、P-selectinがEPC誘導促進効果を持つことが明らかになった。

C-4-1-4. OEC誘導に関する解析

C-4-1-4-1. 血管内皮細胞用培地に添加される heparin, hydrocortisone の OEC 誘導への影響

OECは単核球の長期培養により得られる細胞であり、それ自身が管腔を形成し得ることから、血管再生療法への応用が期待されているが、その出現頻度は低く、幹細

胞が多く含まれる臍帯血由来単核球を用いても、多い場合で、 1×10^7 個の単核球から1個～数個のコロニーが出現する程度である。実際の治療に用いるには、臍帯血より幹細胞の少ない末梢血から確実に OEC を誘導する必要があるため、より効率的な OEC の誘導法が望まれている。

血管内皮細胞の培養には一般的に、基本培地として、MCDB131 の改変培地である Endothelial Basal Media-2 を用い、2% FCS, VEGF, bFGF, R3-IGF1, EGF, ascorbic acid, heparin, hydrocortisone が添加される。添加されるものはいずれも血管内皮細胞の増殖や機能維持に必要であるが、heparin は血管内皮細胞の種類（由来する組織）によっては添加しない方が適している場合があり、また、heparin と hydrocortisone には血管新生を抑制する作用があることが知られている。一方、培養による EPC の誘導を初めて報告した Asahara らの方法では、上記の培地添加物から heparin と hydrocortisone を除外したものが用いられている。このような経緯によるものと思われるが、これまでに報告されている OEC に関する論文では、heparin、hydrocortisone の扱いがまちまちである。Heparin も hydrocortisone も細胞の特性に影響を与えうる生理活性物質であることから、OEC 誘導系における heparin および hydrocortisone の影響について、誘導効率と細胞の特性に与える影響を評価することとし、本年度は、細胞の誘導効率に対する影響を検討した。

FN でコーティングした 6 ウェルプレートに lymphoprep で調製した単核球画分を播種し、heparin および hydrocortisone の

影響を調べるために両者を単独あるいは共に含む培地を調製して培養を行った。培地交換は、培養開始 1 週間後までは毎日、その後は 1 週間に 2 回行った。単核球のロット（ドナー）により差があるが、OEC コロニーは培養開始 10 日～2 週間後ぐらいから出現し始める。3 つのロットについて、培養開始 1 ヶ月後までに出現したコロニー数をカウントしたところ、Fig.39 のような結果となり、heparin を含み、hydrocortisone を含まない培地が OEC 誘導に適している可能性が考えられた。この実験では、1 つのウェルに複数のコロニーが出現することがあり、出現した OEC が新たなコロニーの出現を起こしている可能性も考えられたため、heparin や hydrocortisone が細胞分化に直接的に影響しているか否かについて、さらに検討を進めているところである。

C-4-1-4-2. 長期間培養後の形態の変化

OEC は増殖性の高い細胞であり、培養開始後 12 週間程度まで増殖すると報告されている (Hur J. et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, 288, 2004) が、培養開始 60 日後ぐらいに増殖が停止するとの報告もある (Untergasser G. et al., *Exp. Gerontol.* 41, 600, 2006)。我々の検討でも、やはり、培養開始 60 日ぐらいで増殖が止まり、一つ一つの細胞の面積が拡大するという senescence に特徴的な形態の変化が認められた (Fig.40)。この時点での population doubling level はおよそ 24 であった。血清濃度などの培養条件により OEC の寿命が異なる可能性については報告がなく今後の検討課題であり、細胞組織利用医薬品の品質評価指標として、培養開始後の population doubling level の他に、老化マ

ーカーなどを解析しておくことが必要であると考えられた。

C-4-1-4-3. 目的外の細胞の出現

OECを誘導するために、単核球をFNコートプレート上で血管内皮細胞用の培地で長期培養している際、OEC以外の細胞が出現することがある。その頻度や量は、細胞のロット（ドナー）や細胞播種密度により異なるが、脂肪細胞様の細胞が認められることがしばしばあった。OEC培養中に認められたこの細胞を脂肪染色に用いられるOil Red Oで染色したところ、Fig. 16に示すように赤く染色され、脂肪細胞であると考えられた。試みに単核球培養開始時の血小板含量を高くすると、出現する細胞のheterogeneityが高くなる傾向があり、酒石酸耐性アルカリホスファターゼ活性染色陽性で多核の破骨細胞様の細胞が認められることもあった（Fig.41）。

純度の高いOECを得るためには、これらの細胞の混入がない状態で細胞を調製することが重要であり、細胞の純度が品質評価の重要な項目となる。適正な播種数を設定することでheterogeneityは抑えられると思われるが、脂肪細胞様の細胞は比較的出現頻度が高いため、注意が必要であると思われた。ただし、出現した脂肪細胞の増殖はほとんど認められない。昨年度報告したようにOEC培養中に平滑筋細胞が出現することがあるが、その場合は増殖能が高くOECを覆い尽くしてしまうほどであるため、平滑筋細胞にも注意が必要である。

C-4-1-5. IL-8のOEC遊走促進効果

昨年度までに我々は、CD31強陽性EPCが大量（ng/mlレベル）のIL-8を分泌することを見出し（Fig.32）、EPCの特性指標

としてのIL-8の同定に成功している。一方、生体において、EPCとOECは協調的に働きながら血管形成を促進していると考えられるが、その機構は明らかでない。そこで、ケモカインであるIL-8がOECの遊走を促進する可能性を考え、OECにおけるIL-8受容体発現、および、OEC遊走に対するIL-8の効果を検討した。

臍帯血単核球を2週間培養すると、Fig.42Aに示すようにCD31陽性、eNOS陽性の均一な細胞集団OECが得られる。この細胞を非酵素的に剥離して細胞浮遊液とし、IL-8受容体の発現をその抗体を用いて解析した（Fig.42B）。その結果、OECはIL-8受容体を発現していることが明らかとなった。IL-8受容体はOECのみならず、代表的な組織由来血管内皮細胞であるHUVEC（臍帯静脈血管内皮細胞）でも発現しており、OECとHUVECで発現量に差は認められなかった。IL-8によるOECの遊走促進効果を検討したところ、Fig.43に示すように、0.1 ng/mlという低濃度のIL-8でOECの遊走が有意に促進され、1.0 ng/mlで最大効果を示した。10.0ng/mlでは遊走が促進されておらず、OEC遊走におけるIL-8の濃度依存性は遊走促進因子として典型的なベル・シェイプとなった。

C-4-1-6. EPC/OECのin vivoでの機能評価系確立のための予備検討

動物組織への移植によるEPC/OECの機能評価系確立のための予備検討として、in vitroで条件設定を行った。EPCを移植する目的でFig.44左に示すようなチューブの中に、蛍光染色したHUVECをBasement Membrane Extract (BME)に

浮遊させ、37°Cでゲル化し、2週間培地の中で培養した。右4枚の写真はチューブの外側から撮影した光顕写真である。このゲルの凍結切片を作製し抗CD31抗体で免疫染色すると、Fig.45左に示すように、予め赤く染色された細胞の一部が抗CD31抗体の緑に染色されている。移植した細胞がすべて赤く染色されていることから、今後マウスに移植した際に侵入してくる細胞と区別がつくと考えられた。一方、免疫していない対照血清を用いると全く染色されなかった (Fig.45右)。また、凍結切片の固定法をアセトン固定とホルマリン固定で検討したところ、免疫染色はどちらも良好に染色されたが、光顕画像はホルマリン固定の方が良好であった (Fig.46)。

C-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

C-4-2-1. P19系列細胞の心筋細胞分化

P19系列細胞の心筋細胞分化を観察した結果、分化誘導処理後、約4日でコンフルエントとなり、約10日で自律拍動する小結節が認められるようになった。この自律拍動する小結節は、時間とともにその数が増え、約16日でその数の増加がプラトーになった。CL6G52は、自律拍動する小結節の出現とともに、GFPの発現が認められた (Fig.47A-C)。小結節の数が、0.016個/cm²以上(6ウェル細胞培養用マルチプレート1枚につき1つ以上)ある時を「少ない」、0.098個/cm²以上(6ウェル細胞培養用マルチプレートのウェル1つにつき1つ以上)ある時を「中程度」、157個/cm²以上(顕微鏡視野(×200)を1面につき1つ以上)ある

時を「多い」と定性的に定義し、それぞれを1、2、3とした場合、分化誘導後の自律拍動する小結節数の時間変化は細胞株により異なっていた (Fig.47D)。

C-4-2-2. 分化誘導後の心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現

各細胞株の心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量を比較するために、分化誘導したP19細胞と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種類の細胞からtotal RNAを抽出し、定量リアルタイムRT-PCRを用いて心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量を測定した。このことにより、細胞株の違いによって心筋細胞特異的マーカー発現の時間経過や発現量に相違があることが確認された (Fig.48)。

心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現を心筋細胞分化と関連付けて解釈する際、個々の心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量にどの程度の重み付けをした上で解釈してよいかは明らかではない。そこで、得られた多くのデータをよりわかりやすくするために主成分分析し、これによって産出された主成分から細胞株による分化の違いについて比較検討した。心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量を主成分分析したところ、寄与率63%の第1主成分と寄与率17%を説明する第2主成分が算出された (Fig.49)。寄与率と変量プロットを見ると、資料の本質の約63%を説明する第1主成分は全ての変量の係数が正であり、資料の本質の約17%を説明する第2主成分は心筋細胞分化の比較的初期に発現が見られる心筋細胞特異的マーカー遺伝子の係数が負に、

比較的後期に見られる心筋細胞特異的マーカー遺伝子の係数が正に出ていた (Fig.49A および B)。個々のサンプルにおける各心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現を統合して主成分得点として表すと細胞株による心筋細胞への分化能の違いがより明確に見られるようになった (Fig.49C および D)。

C-4-2-3. 心筋細胞分化能と相関関係の認められた遺伝子の検出

P19 細胞と CL6 細胞、Neomycin 耐性遺伝子を含む CL6 細胞サブラインの CL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52 の 6 種類について、①分化誘導後の心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現の第 1 主成分の最大値、②第 2 主成分の最大値、③自律拍動する小結節出現までの日数および④出現した自律拍動する小結節の数、の 4 項目について、GeneChip の遺伝子発現シグナルとの間のスピアマンの順位相関とその有意確率を算出し、心筋細胞分化と相関する遺伝子を探索した。

その結果、第 1 主成分、自律拍動する小結節出現までの日数、出現した収縮小結節の数の 3 項目が発現シグナル値と相関するプローブセットが 24 個検出された (Table 3)。これには、第 2 主成分と有意に相関するものも含まれていた。

C-4-2-4. CMP 遺伝子発現阻害と心筋細胞分化効率

RNAi を行うことで、各 CMP 遺伝子をノックダウンし、心筋細胞分化効率への影響を検討した。

実際に各遺伝子が RNAi によりノックダウンされていることを確認するために、定量リアルタイム RT-PCR でノックダウン

効率を測定した。その結果、ネガティブコントロールと比較して、CMP1 で 45%、CMP2 で 13%、CMP3 で 43%、CMP4 で 45%、CMP5 で 27%、CMP6 で 19%、CMP7 で 30%、CMP8 で 25%、CMP9 で 15%、CMP10 で 12%、CMP11 で 86%、CMP12 で 51%、CMP13 で 51%、CMP14 で 60%、CMP15 で 37%、CMP16 で 53%、CMP17 で 19%、CMP18 で 35%、CMP19 で 28%、CMP20 で 46%、CMP21 で 55%、CMP22 で 86%、CMP23 で 29%、CMP24 で 34% まで発現を抑制することができた。t 検定の結果、11、19、22 を除く 19 個の CMP 遺伝子で有意な発現の抑制が認められた (Fig.50)。

これについて、CMP 遺伝子のノックダウンにより心筋細胞分化にどのような影響が出るかを、自律拍動する小結節数および心筋細胞特異的マーカー遺伝子 4 種類を測定することによって調べた。

まず、自律拍動する小結節数を測定した結果を Fig.51 に示す。Two-Way Repeated Measures ANOVA で検定した結果、CMP1、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP6、CMP9、CMP10、CMP13、CMP18、CMP24 のノックダウンにより、ネガティブコントロールと比較して有意な小結節数の減少が認められた。逆に、CMP7、CMP12、CMP16、CMP17、CMP21、CMP23 では有意な増加が認められた。また、CMP8、CMP14、CMP15、CMP20 では有意な変化が認められなかった。

次に、分化誘導後 14 日目における、心筋細胞特異的マーカー遺伝子を測定した結果を Fig.52-55 に示す。t 検定の結果、 α MHC では、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、

CMP10、CMP13、CMP18 で有意 ($P<0.05$) な減少が、CMP12、CMP23 で有意 ($P<0.05$) な増加が認められた。BMHC では、CMP2、CMP13 で有意な減少が、CMP16、CMP17、CMP23 で有意な増加が認められた。MLC2a では、CMP2、CMP4、CMP8、CMP10、CMP20、CMP23 で有意な減少が、CMP16 で有意な増加が認められた。MLC2v では、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP6、CMP10、CMP13 で有意な減少が、CMP7、CMP12、CMP16、CMP23 で有意な増加が認められた。

これらをまとめたものを、Table 4 に示す。

C-5. 免疫原性の新規評価技術・新規免疫機能制御技術の開発

まず初めに、ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞におけるインテグリンの発現をフローサイトメトリーにより検討したところ、 α_4 、 α_5 および β_2 インテグリンがほぼ 100% の細胞で発現していた (Fig.56)。また、発現レベルはやや低いものの 13% の細胞で $\alpha_v\beta_3$ インテグリンが、2% の細胞で $\alpha_v\beta_5$ インテグリンが発現していた。尚、CD34 陽性細胞におけるインテグリンの発現について 2 人のドナー由来の細胞を解析したが、どちらの細胞においても同程度の発現が得られた (data not shown)。

次に、35 型 Ad ペントンベース・RGD 配列の感染への関与について検討するために、RGD ペプチドによる 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入阻害実験を行った。Fig.57 に本研究で用いた 35 型 Ad ベクターを示す。検討した結果、インテグリンに結合しない RGE ペプチド作用群と比較して、RGD ペプチド存在下では濃度依存的

に有意な遺伝子導入阻害が見られた (Fig.58)。RGD ペプチド 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 存在下で 43% まで遺伝子導入効率が低下した。以上の結果より、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入にはペントンベース・RGD 配列が関与していることが示唆された。また本結果より、インテグリンの中でも RGD 配列を認識するインテグリンが関与していることが示唆された。

さらにペントンベースの RGD 配列の関与について検討するため、35 型 Ad ベクターのペントンベースに存在する RGD 配列を RGE に置換 (Ad35RGEGFP)、または欠損 (Ad35 Δ RGDGFP) させた 35 型 Ad ベクターを作製し、通常の 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率と比較した。その結果、通常の 35 型 Ad ベクターと比較して、Ad35RGEGFP および Ad35 Δ RGDGFP のいずれのベクターを作用させた場合においても遺伝子導入効率の有意な低下が観察され、それぞれ Ad35GFP の 20% または 17% まで遺伝子発現量が低下した (Fig.59)。従って、前節の RGD ペプチドを用いた 35 型 Ad ベクター遺伝子導入阻害実験および本実験の結果より、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入にペントンベース・RGD 配列とインテグリンの結合が関与していることが明らかとなった。

次に、ペントンベース・RGD 配列改変 35 型 Ad ベクターの細胞内取り込み量を Real-time PCR を用いて測定した。RGD 配列改変 35 型 Ad ベクターの細胞内ベクターコピー数は従来の 35 型 Ad ベクターと比較して、Ad35RGEGFP および Ad35 Δ RGDGFP とともに有意な差は認められなかった (Fig.60)。さらに CD34 陽性

細胞の細胞表面への結合量に関しても差は見られなかった (Fig.61)。以上の結果から、ペントンベース・RGD 配列改変による遺伝子発現量の低下は、35 型 Ad ベクターの細胞表面接着や細胞内取り込み過程ではなく、それ以降の細胞内輸送が妨げられたことに起因していることが示唆された。

さらに 35 型 Ad ベクターによる CD34 陽性細胞への遺伝子導入に関与しているインテグリン分子を同定するために、種々の抗インテグリン阻害抗体を用いて 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入阻害実験を行った。その結果、抗 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン抗体存在下でコントロール IgG 作用群と比較して 59%まで遺伝子導入効率が低下した (Fig.62)。しかし、その他の抗体を作用させた場合には有意な差は認められなかった。従って、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 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンが関与していることが示された。

D. 考察

D-1. 感染性因子の安全性評価技術開発

我々は、これまでに PEI 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。本年度は昨年度に引き続き、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 ビーズを用いたウイルス濃縮法のヒト肝炎ウイルスへの適用について検討を行った。

HAV の濃縮は pH や FCS に依存せず、10ml の大容量のウイルス液からでも高効率で濃縮可能であった。また、ヒト血液試

料中のウイルス濃縮を検討したところ、ヒト正常血漿で HAV を希釈しても高い濃縮効率が得られるが、ヒト正常血清では濃縮効率が劣ることが明らかになった。

HBV の濃縮は FCS で阻害され HAV よりも濃縮効率が劣るが、抗 HBV-IgM 抗体の添加で濃縮効率は改善された。これは昨年度報告したように、PEI ビーズが IgM 抗体を吸着する性質を持つため、IgM 抗体を介した免疫複合体形成によりウイルス濃縮効率が向上したものと考えられる。HBV をヒト正常血漿で希釈した場合、標準品とジェノタイプパネルの HBV では PEI ビーズによる濃縮に差が認められた。すなわち、標準品は濃縮できなかったが、ジェノタイプパネルは濃縮された。両者の違いのひとつに採血時期があり、標準品はウインドウ期から得られた HBV で抗 HBV 抗体陰性であるが、ジェノタイプパネルは抗 HBV 抗体陽性の試料であることから、試料中の抗 HBV 抗体が濃縮に影響する可能性が示唆された。ウインドウ期の HBV に PEI ビーズ濃縮を適用して高感度検出するためには、さらに濃縮条件を検討する必要がある。

HCV は PEI ビーズにより高効率の濃縮が認められ、大容量からもある程度の濃縮が可能であった。ヒト血液試料中のウイルス濃縮については HAV と同様、ヒト血漿中のウイルスは高効率での濃縮が可能であった。従って、HAV 及び HCV は、ヒト血漿試料を用いることにより PEI ビーズ濃縮で高感度に検出可能であることが示された。

HCV の検出感度を検討したところ、PEI ビーズで濃縮することにより、血漿中の HCV 1IU/ml を確実に検出可能であった。また、ジェノタイプと由来の異なる 10 種類