

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

(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 100 μ l 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。

(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。

(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)。

D. 考察

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

の HCV 試料について検討したところ、濃縮効率に差があるもののいずれも PEI ビーズにより 1ml(10 倍量)からの濃縮で 5 倍以上に濃縮可能であることを確認した。理論値の 10 倍以上のウイルス濃縮効果が得られるケースもあったが、これはウイルス濃縮中に RNase のような阻害物質が試料から除去されるためではないかと推測される。

以上の結果より、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、これらウイルスの患者血漿を用いた高感度スクリーニング試験にも有用な方法であることが示唆された。

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 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した。その結果、PEI ビーズを用いたウイルス濃縮法はヒト肝炎ウイルスの 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効率よく濃縮可能であることから、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これらウイルスの高感度検出やスクリーニングに有用な方法であることが示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Eriko Uchida, Mieko Kogi, Tadashi

- Oshizawa, Koei Satoh, Akiko Iwata, Mitsuhiro Murata, Mikio Hikata, Teruhide Yamaguchi: Optimization of the virus concentration method using polyethyleneimine-conjugated magnetic beads and its application to the detection of human hepatitis A, B and C viruses, *Journal of Virological Methods* (in press)
- 2) TOSHIE KANAYASU-TOYODA, TAKAYOSHI SUZUKI, TADASHI OSHIZAWA, ERIKO UCHIDA, TAKAO HAYAKAWA AND TERUHIDE YAMAGUCHI: Granulocyte Colony-Stimulating Factor Promotes The Translocation of Protein Kinase C α in Neutrophilic Differentiation Cells, *Journal of Cellular Physiology* (in press)
- 3) Teruhide Yamaguchi, Eriko Uchida: Regulatory Aspects of Oncolytic Virus Products, *Current Cancer Drug Targets*, 7, 203-208 (2007)
- 4) 内田恵理子、石井（渡部）明子、山口照英：遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保，臨床とウイルス (in press)
- 5) 川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹：薬の名前 ステムを知られば薬がわかる 第9回、*Pharm Tech Japan*, (in press)
- 6) 川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹：薬の名前 ステムを知られば薬がわかる 第7回、*Pharm Tech Japan*, 23 (2), 283-289 (2007)
- 7) 内田恵理子、川崎ナナ、宮田直樹：薬の名前 ステムを知られば薬がわかる 第5回、*Pharm Tech Japan*, 22 (13), 2483-2491 (2006)
2. 学会発表
- 1) 内田恵理子、佐藤功栄、岩田明子、山口照英：パーフルオロオクタン酸 (PFOA) による新規ウイルス不活化法の開発；第54回日本ウイルス学会学術集会；2006年11月19日、名古屋
- 2) 内田恵理子、山口照英：バイオ医薬品／生物製品のウイルス安全性に関する国際動向；第6回日本医薬品等ウイルス安全性シンポジウム；2006年12月1日、東京
- 3) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：放射照射による Op9 細胞の造血支持能の誘導；第6回日本再生医療学会総会、2007年3月13日、横浜
- 4) 内田恵理子、小木美恵子、佐藤功栄、岩田明子、山口照英：生物製品のウイルス安全性確保：生物製品のウイルス除去のためのポリエチレンイミン結合カラムの開発、2007年3月28日、富山
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Table 1 ウイルス検出に用いたプライマー及びプローブ

HAV

F-Primer : 5'-GGTAGGCTACGGGTGAAAC-3'

R-Primer: 5'-AACAACTCACCAATATCCGC-3'

Probe : 5'- FAM-CTTAGGCTAATACTTCTATGAAGAGATGC- TAMRA-3'

HBV

F-Primer: 5'-GGACCCCTGCTCGTGTTACA-3'

R-Primer: 5'-GAGAGAAGTCCACCMCGAGTCTAGA-3'

Probe: 5'- FAM-TGTTGACAARAATCCTCACCATACCRCAGA- TAMRA-3'

HCV

F-Primer: 5'-TGCGGAACCGGTGAGTACA-3'

R-Primer: 5'-CTTAAGGTTTAGGATTCGTGCTCAT-3'

Probe: 5'-FAM-CACCCTATCAGGCAGTACCACAAGGCC-TAMRA-3'

HCV の 2 段階 PCR 検出

1 段階 F-Primer: 5'-CTGTGAGGAACTACTGTCTT-3'

R-Primer: 5'-AACACTACTCGGCTAGCAGT-3'

2 段階 F-Primer: 5'-TTCACGCAGAAAGCGTCTAG-3'

R-Primer: 5'-GTTGATCCAAGAAAGGACCC-3'

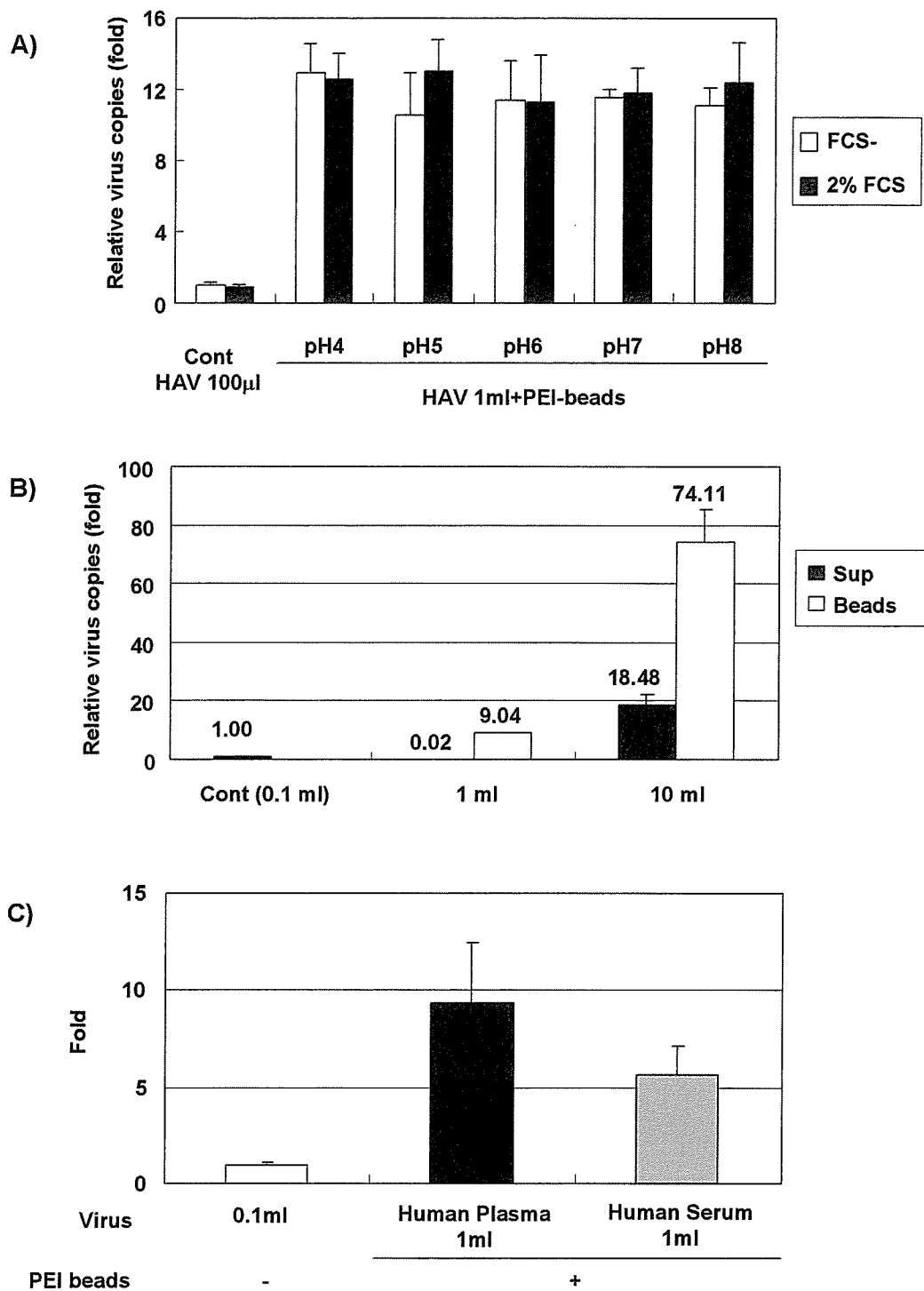


Fig.1 PEIビーズによるHAVの濃縮

A) pH, FCSの影響; B) 大容量からの濃縮; C) ヒト正常血漿、血清の影響

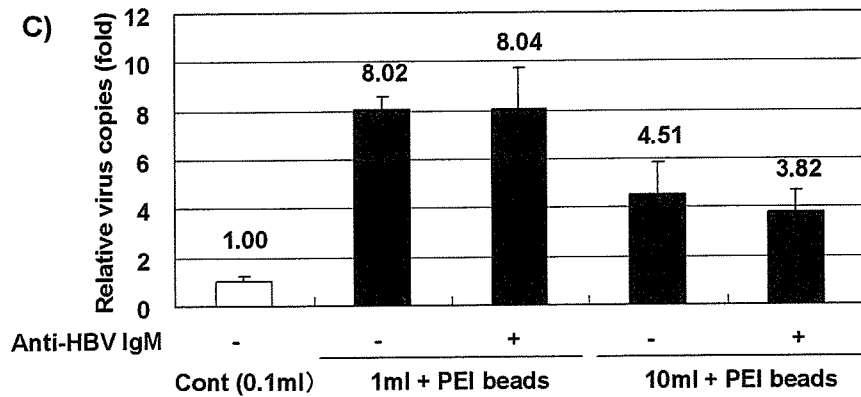
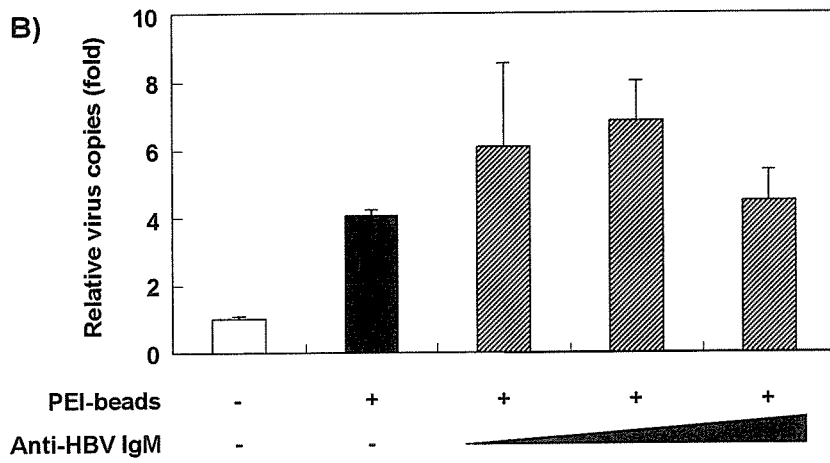
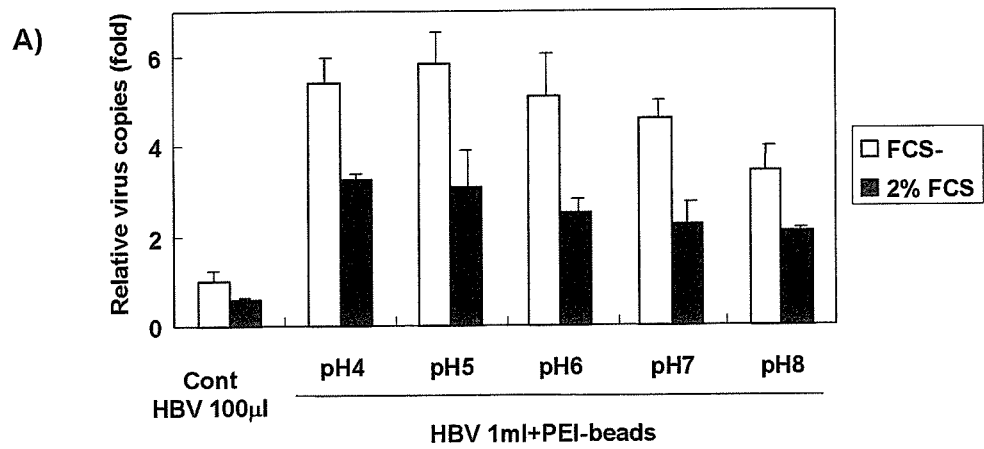


Fig.2 PEIビーズによるHBVの濃縮

A) pH, FCSの影響; B) 抗HBV-IgM抗体の影響; C) 大容量からの濃縮

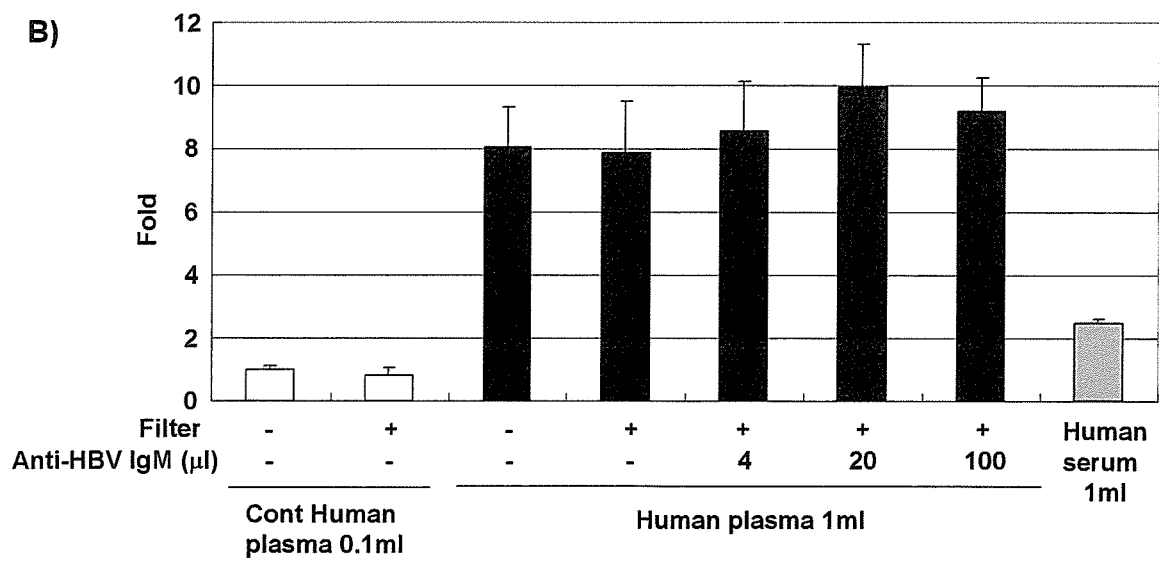
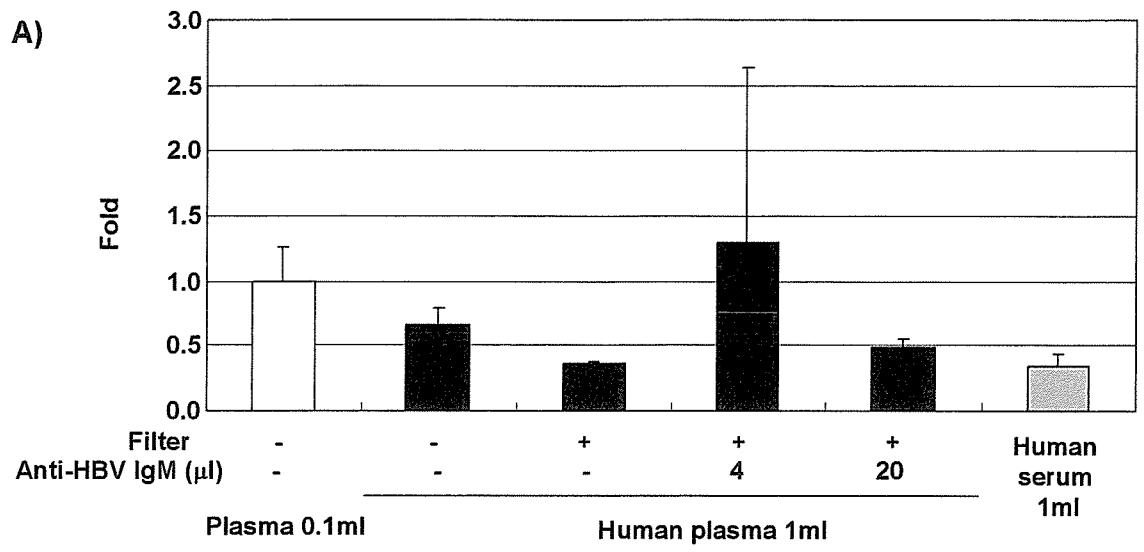


Fig.3 PEIビーズによるHBV濃縮に及ぼすヒト正常血漿、血清の影響

A) HBV標準品; B) HBVジェノタイプパネル

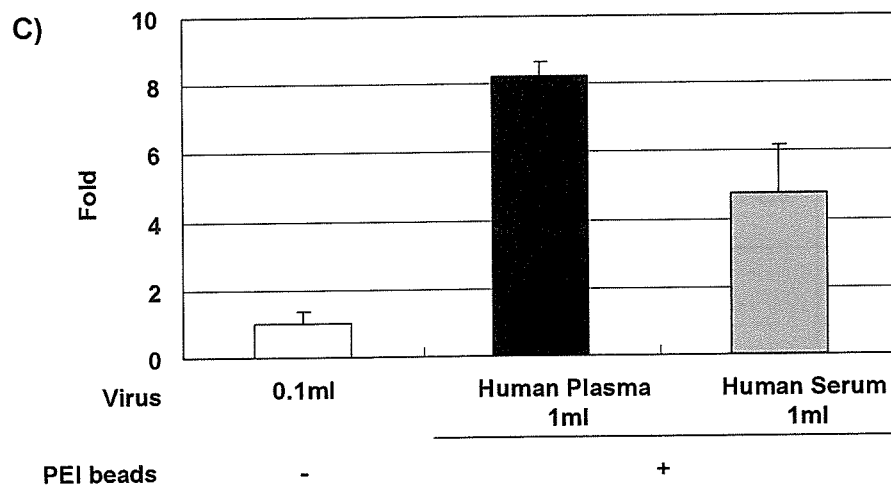
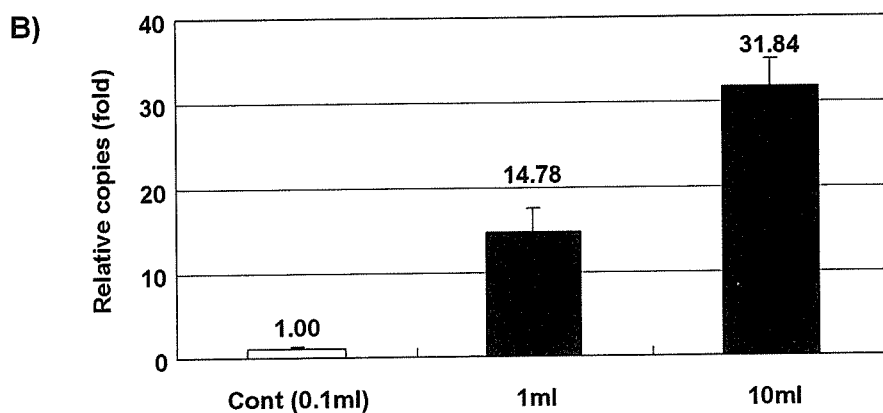
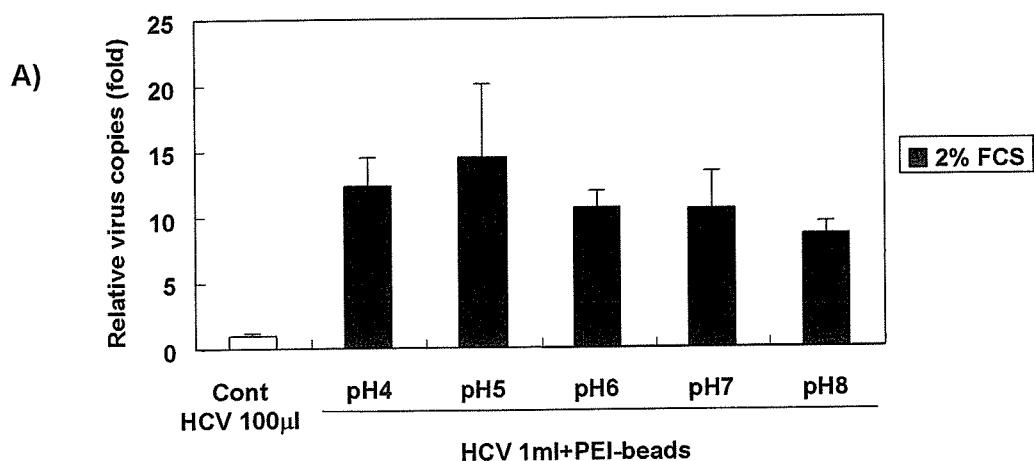
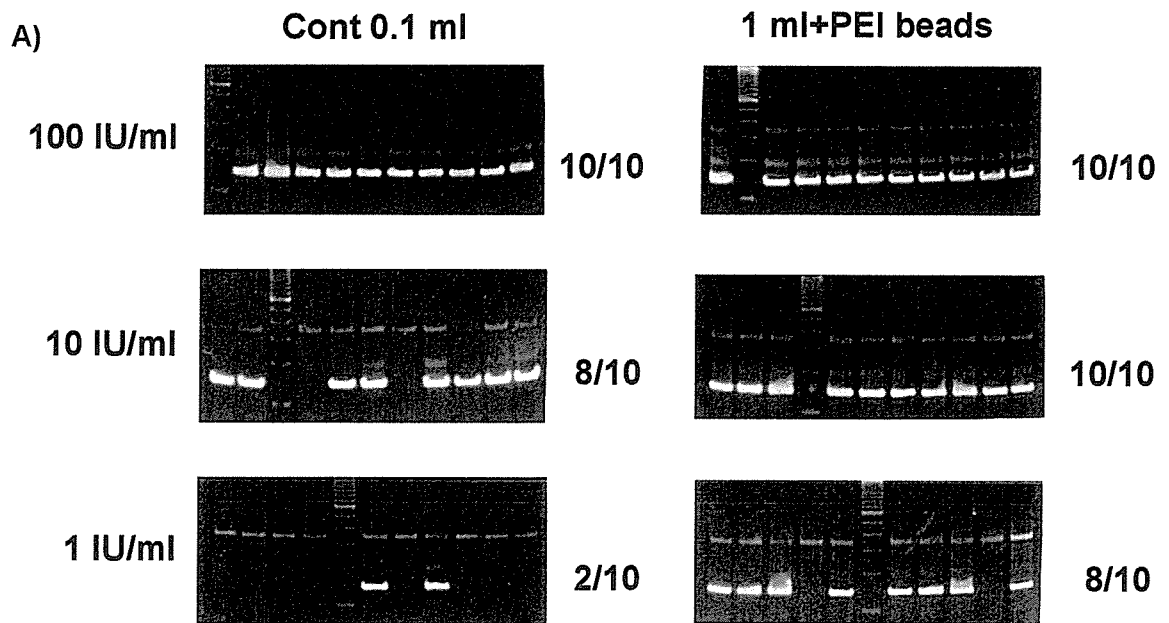


Fig.4 PEIビーズによるHCVの濃縮

A) pH, FCSの影響; B) 大容量からの濃縮; C) ヒト正常血漿、血清の影響

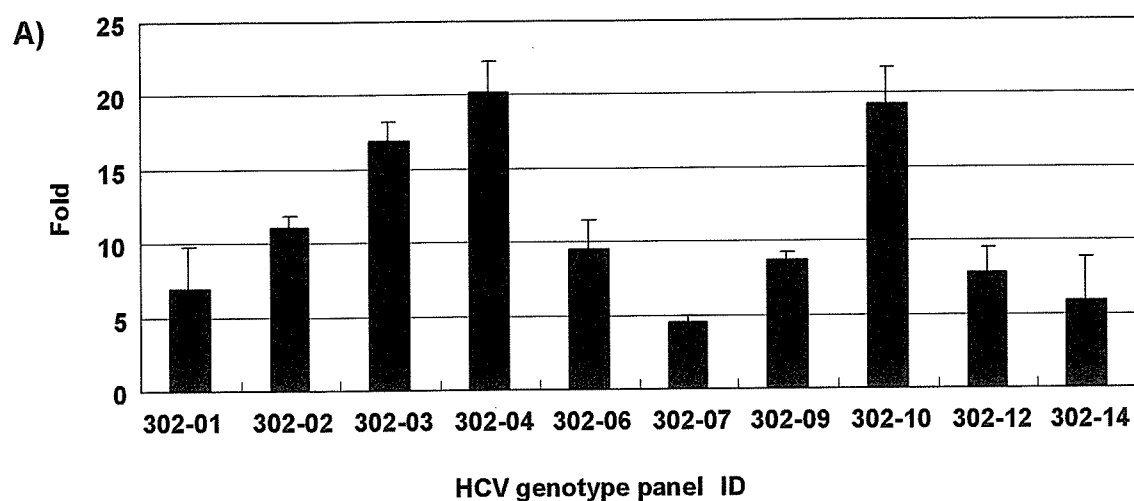


B)

HCV conc. (IU/ml)	Control 0.1ml			1ml + PEI beads		
	#1 (Copies)	#2 (Copies)	Mean (Copies)	#1 (Copies)	#2 (Copies)	Mean (Copies)
100	7.7×10^1	8.6×10^1	8.2×10^1	5.5×10^2	5.9×10^2	5.7×10^2
10	8.3×10^0	2.3×10^1	1.6×10^1	8.5×10^1	7.2×10^1	7.9×10^1
1	-	-	-	-	6.8×10^0	3.4×10^0

Fig.5 PEIビーズによるHCVの濃縮とHCV検出感度

A) Nested PCR; B) 定量的RT-PCR
HCVはヒト正常血漿で希釈して使用。



B)

Genotype ID	Origin	HCV genotyping	RNA copies/ml
302-01	China	1b	3.1×10^6
302-02	Thailand	1	1.1×10^6
302-03	South Africa	1b	4.0×10^5
302-04	China	2a	2.5×10^6
302-06	China	3b	6.6×10^6
302-07	USA	3a	8.2×10^5
302-09	Egypt	4a	1.0×10^6
302-10	Egypt	4	8.8×10^4
302-12	Unknown	5a	6.5×10^5
302-14	Unknown	6a	1.6×10^6

Fig.6 PEIビーズによるHCV ジェノタイプパネルの濃縮

A) ジェノタイプパネル 1mlからのPEI磁気ビーズ濃縮

B) ジェノタイプパネルの詳細

各試料はヒト正常血漿で希釈して使用。

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遺伝的同一性解析技術等に関する研究
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

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。我々はこれまでに、染色体レベルで遺伝的安定性を調べる目的で、マイクロアレイを使った CGH (Comparative Genome Hybridization) 法として、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 polymorphysm) を大規模に解析可能な GeneChip (SNP チップ) を用いた検討の有効性を示してきた。微細な染色体欠失や組み換え型の LOH など、従来の染色体解析および CGH 法や FISH 法も含めたこれまでの解析法では検出できなかった異常を検出することができた。今年度は、さらに詳細な CGH を可能とするオリゴヌクレオチドをプローブとした CGH アレイの有用性を評価するために、モデル細胞として HL60 細胞におけるがん遺伝子 c-myc の増幅様式に関して詳細に検討した。その結果、double minute (DM) 染色体としての増幅単位の完全構造を明らかにし、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検討し、7 番および 17 番染色体上に染色体コピー数の変化が検出され、さらに詳細な染色体解析を行うことにより、この二つの染色体間での、転座を伴う増幅を確認することが可能であった。

また、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。

協力研究者		スレッジ	国立医薬品食品衛生研究所
田邊思帆里	国立医薬品食品衛生研究所	ティルパッティ	遺伝子細胞医薬部 流動研究員
	遺伝子細胞医薬部		
	研究員	古田美玲	国立医薬品食品衛生研究所
欒 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
	遺伝子細胞医薬部		
	流動研究員		

プラバ 国立医薬品食品衛生研究所
ドクワイザー 遺伝子細胞医薬部
賃金職員

B 研究方法

1 HL60 細胞を用いた解析

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。各種生体由来の幹細胞などを培養、分化後に生体へ戻す場合など、培養過程における染色体変化や、がん遺伝子の活性化などの遺伝子変化が引き起こされる危険性があり、これらを十分にチェックすることが、細胞治療医薬品の安全を担保する上で重要な課題である。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、従来手法とくらべ BAC(bacterial artificial chromosome)クローンをスポットしたマイクロアレイおよび SNP を網羅的に検出する GeneChip 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。

さらに、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未クスの有用性について検討した。

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。

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表 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。

1-4. 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 $^{\circ}$ C にて変性し、氷冷後、100unit の Klenow fragment および dNTP (6 mM) と 37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C にて 5 分変性後 42 $^{\circ}$ 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ニ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。

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

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て継代を続けた。23 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。

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 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。

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 $^{\circ}$ 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ミスマッチプローブから

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。

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 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、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。

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。

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。

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。

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。

3. 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

3-1. 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。

3-2. 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 200µl を C18 モノリスカラムチップ (MonoTip® C18) にて脱塩濃縮 (2 倍) し、100µl としたサンプル溶液 4µl をそのまま LC-MS 解析用サンプルとした。

3-3. 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

3-4. 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。

倫理面への配慮

ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに採取された市販の試料を用いるとともに、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

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 をリファレンスに表 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図 1 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(図 1)。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、図 1 の 1a-7b 領域にお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、 T_m 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) を図 1 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(図 2)。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図 2 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図 3 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図 4 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。

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。図 5 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 箇所見つかかり、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 両株ともに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。

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 継代目の細胞とより 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強度のを用いて 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。図 6 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 1 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。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 (図 7)。

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図 8 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表 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図 9 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。

3. 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、図10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による3次元グラフ化を行った。その結果を図11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