

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。

D. 考察

細胞治療に用いる細胞の遺伝的安定性の確認は、その品質や安全性確保の観点から非常に重要である。特に、種々の幹細胞を増殖、分化させた後生体に戻すという治療においては、*in vitro* での培養や細胞の処理によって染色体異常等の遺伝的変化が起こらないことを確認することは重要である。そこで、遺伝的な安定性を治療前に確認しておくことが必要となり、そのために有効な試験法に関して検討してきた。我々は既に、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、増幅、LOH といった異常を持つ可能性があり、特に細胞のがん化形質の獲得へとつながる可能性もあることから注意が必要である。染色体の欠失は、がん抑制遺伝子の不活性化を、増幅は *myc* 等のがん遺伝子の活性化を引き起こし、がん化へとつながる引き金になると考えられる。染色体の増減に関する情報を得る上で、簡便でより詳細な方法として、BAC クローンを使った CGH アレイや SNP 検出用の GeneChip が有用であることを我々は既に

示した。今回さらに詳細な検討が可能となるカスタムメイドの oligoCGH アレイを用いて、遺伝子増幅のメカニズムに迫るとともに、さらに高密度の SNP 検出用の GeneChip を使用した間葉系幹細胞の培養過程での染色体安定性の確認への適用について検討を行った。

モデル細胞として HL60 細胞を取り上げ、c-myc 遺伝子の増幅領域の解析においては、これまでの解析で完全に解明できなかった DM の構造の全貌を明らかにすることができた。各増幅領域のジャンクションについては、CGH アレイからの詳細なデータを元に設計した PCR プライマーにより、シーケンズレベルでの解明に成功した。図 11 にそのジャンクション配列の特徴を示した。まず、その一つとしてジャンクションの部分の短い相同配列が見られた。これは非相対的組み換えがおきる引き金となっていると予想される。また、もう一つの特徴として、ジャンクションの近傍に回文構造や、相補的配列が認められ、これらが立体的に高次構造を取るための原因となっていると考えられ、離れた増幅領域を結びつけるための一助になっていると考えられる。実際に得られた増幅領域のゲノム上の位置を元にモデルを作成し、各ジャンクション同志を立体的に近傍に持ってきた際には、比較的小さいコンパクトにまとまったタマネギ状のバブル構造を取らせることができ、増幅領域がループアウトしたような立体構造を作ることができた。こうした、ループアウトした高次構造が、組み換えにより切り出される、若しくはこの構造の中で、ジャンクション部分で乗り越えを起こしながら DNA 複製が行われることにより、全体として約

2Mb からなる閉じた環状の DNA

構造単位がゲノムより切り出され、これが DM 染色体の起源となったと予想される。通常、余分な DNA 断片は DNA 分解酵素により速やかに消化されると考えられるが、環状の比較的大きな構造体として生成したためにそうした分解を受けず、細胞の中に残り、DM 染色体になっていったと考えられる。そして、はじめは一つの単位であった DM 染色体が、複製、細胞分裂の過程で不均等に分配されていき、コピー数の多い細胞が増殖的優位性を持ったために、DM 染色体の数が増える方向で蓄積して行ったと考えている。また、環状の構造のために、一つの鋳型から複数コピーの複製が行われ増幅が起きたと考える事もできる。セントロメアを持たない構造でどうして DM 染色体として安定に保たれるかは謎であるが、CGH アレイの有用性を示す重要な結果である。構造単位としての DM 染色体の全貌が明らかになった意義は大きい。

oligoCGH を使った詳細な増幅単位の解析は、こうしたメカニズムを解析する上で有用であることがわかったが、細胞全体としての評価をする場合には、ゲノム全体を網羅的に解析可能な CGH アレイが必要となる。今回、そのツールとして、5 万箇所 SNP を同時に検出可能な GeneChip を使って、ヒト間葉系幹細胞の培養過程における染色体変化を検討した。まず、遺伝的変化が起きうるかを調べるために、長期培養したロットに関して、その最初と最後でのゲノム変化を解析してみた。すると、二つの染色体において明らかな CGH シグナルの変化（異常）が検出され、その後のマルチカラー-FISH による染色体解析により、染

色体異常が確認された。CGH アレイで検出されるためにはその異常がある程度の範囲の細胞に及んでいる必要があり、実際に G-banding による核型解析からも、26 継代目の細胞ではほぼ全ての細胞が染色体異常を持つことが確認された。6 継代目の細胞には 50 細胞の観察からは異常が確認されておらず、この間の 20 世代の間に一部に起きた異常が全体へと広がったと考えられる。そのため、この異常細胞が増殖優位性を持つと考えられるとともに、全体のポピュレーションを占めるまでにはある程度の時間がかかるため、比較的早い段階で（最初からの可能性を含め）異常が発生したと考えることもできる。現在、この経時変化を追うために、凍結保存してあった継代途中の細胞を用いて FISH 解析による検討を行っている。また、増殖優位性に関して考察するため、増加が起きていた染色体領域に含まれる遺伝子が注目されるが、一つの候補として既に乳癌等で増幅が知られている EGFR が 7 番染色体セントロメア付近の 7q12 ローカスに存在し、その関与が示唆される。

継代時のトリプシン処理液を用いたプロテオーム解析は、非破壊的な手法として貴重な細胞等での特性解析に役立つと考えられる。今回オンラインナノ LC-MS/MS を用いた解析により、非常に高感度にペプチドを検出可能であることがわかり、この手法が有望であることが示唆された。細胞膜表面のタンパク質由来のペプチドが特性解析として期待されるが、MS/MS 測定による同定を同時に行う解析では、ヒットするペプチド数があまり多くないため、想定される膜タンパク質は一部を除き同定されなかつ

た。今後は、MS/MS 測定に頼らず、親イオン (TOF-MS) データにおいてペプチドを網羅的に検出し、そのパターンの比較から発現の差および細胞固有のシグナルを検出していきたい。このためには、それに適したデータ解析手法が必要であり、現在オリジナルなソフトウェアの開発を進めている。また、試験的な段階ではあるが、今回 2 種のフィーダー細胞の特性の要因となっている発現差のあるタンパク質として、フィブロネクチンが捕まった。今後は、その発現量に関して、タンパクレベルでの確認を行うとともに、機能的な役割についても検討を行いたい。

E. 結論

SNP チップを用いた解析により、LOH 解析とともに染色体コピー数の変化の検出に有効であることが示され、細胞治療に用いる培養細胞の遺伝的安定性の検証法として、その利用が期待できる。また、oligoCGH アレイはカスタムデザインが可能なアレイとして、より詳細な解析が可能であり、がん遺伝子増幅の解析にも有効であることが示された。また、ヒト間葉系幹細胞の長期培養で、染色体変化が観察され、SNP アレイの有用性が示された。

また、細胞継代時のトリプシン処理液を用いたプロテオーム解析が細胞特性解析に有用であることが示された。

G. 健康危険情報

特になし

H. 研究発表

1. 論文発表

Kanayasu-Toyoda, T., Suzuki, T., Oshizawa, T., Uchida, E., Hayakawa, T., Yamaguchi, T. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase Ci in neutrophilic differentiation cells. *J. Cell Physiol.*, 211: 189-196, 2007.

Zhan, L., Honma, M., Wang, L., Hayashi, M., Wu, D., Zhang, L., Rajaguru, P., Suzuki, T. Microcystin-LR is not Mutagenic in vivo in the λ /lacZ Transgenic Mouse (MutaTMMouse). *Genes and Environment*, 28: 68-73, 2006.

Dertinger, S.D., Bishop, M.E., McNamee, J.P., Hayashi, M., Suzuki, T., Asano, N., Nakajima, M., Saito, J., Moore, M., Torous, D.K., Macgregor, J.T. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring. *Toxicol Sci.* 94: 83-91, 2006.

2. 学会発表

田邊思帆里, 佐藤陽治, 鈴木孝昌, 長尾拓, 山口照英

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の品質管理に関するゲノムプロファイリング

日本薬学会第 127 年会 (2007 年 3 月)

豊田淑江, 押澤正, 石井明子, 鈴木孝昌, 山口照英 Thrombopoietin(TPO) による AC133 陽性細胞より分化する血管内皮前駆細胞(EPC)の分化促進作用
日本薬学会第 127 年会 (2007 年 3 月)

鈴木孝昌, 欒 洋, 田邊思帆里, 佐藤陽治, 小木美恵子, 山口照英 ヒト間葉系幹細胞培養時の染色体安定性の解析
第 5 回日本再生医療学会総会(2007 年 3 月)

Takayoshi Suzuki Toxicogenomic approach in mutation research
International conference on Biomarkers in Health and Environmental Management and XXXII EMSI Annual Meeting (2007 年 1 月)

鈴木孝昌, スレッシュ ティルパッティ, 小木美恵子, 山口照英, 本間正充, 欒 洋 染色体を観ずに染色体を診る技術としての CGH および SNP アレイの有用性
日本環境変異原学会第 35 回大会 (2006 年 11 月)

スレッシュ ティルパッティ, 押澤 正, 山田勉也, 佐伯憲一, 山口照英, 鈴木孝昌 プロテオミクスを用いた変異原研究に有用なバイオマーカーの探索
日本環境変異原学会第 35 回大会 (2006 年 11 月)

T. Suzuki , Y. Luan, M. Honma, S. Thirupathi, M. Kogi, T. Yamaguchi CGH AND SNP ARRAYS ARE POWERFUL TOOLS FOR

CHROMOSOME ANALYSIS EMS Annual Meeting
2006 (2006年9月)

C. Furihata, K. Tobe, T. Watanabe, S.
Maeda, M. Hirayama, M. Harada, M. Nakajima,
S. Hamada, C. Namiki, T. Suzuki, Y.
Nakachi, Y. Kondoh, T. Tashiro and C.
Furihata Differentially expressed genes
in mouse liver induced by N-nitroso
carcinogenic compounds, phenobarbital
and ethanol. 第20回国際生化学・分子生
物学会 (2006年6月)

S. Yokokawa, D. Mulhern, Y. Ohshima, Y.
Adachi, A. Kohara, T. Suzuki, H. Okuda, N.
Miyata, S. Ninomiya T. Sudo
Environmental factors outweigh
drug-response factors at early time
points in toxicogenomic experiments. 第
33回日本トキシコロジー学会学術年会
(2006年7月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1 カスタム oligo-CGH アレイのプローブデザイン

	Physical position	Size (Mb)	No. of probes	Interval (kb)
MYC amplification area				
1	sense: 125,800,000-130,950,000	5.15	46577	continuous
2	sense: 130,950,000-137,800,000	6.85	5341	1
3	sense: 137,800,000-138,000,000	0.2	1688	continuous
4	sense: 138,000,000-146,214,826	8.27	6326	1
5	sense: 146,214,826-146,274,826(telomere)	0.06	181	continuous
6	antisense: 125,822,452-127,032,094	1.21	11230	continuous
7	antisense: 127,252,004-127,923,887	0.67	5187	continuous
8	antisense: 128,116,770-128,139,631	0.02	239	continuous
9	antisense: 128,306,003-128,519,403	0.21	2031	continuous
10	antisense: 129,909,921-130,328,321	0.62	5955	continuous
11	antisense: 130,591,690-130,945,617	0.35	2633	continuous
total			87408	
Chr.10				
1	25,000,000-26,000,000	1	8995	continuous
2	1-200,000	0.2	1166	continuous
3	200,000-25,000,000; 26,000,000-38,000,000	36.8	28389	1
total			38550	
Chr.5				
1	53,310,000-53,360,000	0.05	573	continuous
2	139,300,000-139,600,000	0.3	3285	continuous
3	53,360,000-139,300,000	85.94	15122	5
total			18980	
Chr.9				
1	11,600,000-12,000,000	0.4	3422	continuous
2	32,500,000-32,900,000	0.4	3515	continuous
3	12,000,000-32,500,000	20.5	3609	5
4	101,000,000-104,500,000 (Novel small deletion)	3.5	32446	continuous
total			42992	
Chr.11				
1	1-200,000	0.2	1292	continuous
2	2,380,000-2,880,000	0.5	5906	continuous
3	44,800,000-45,200,000	0.4	4072	continuous
total			11270	
Chr.16				
1	83,500,000-84,500,000	1	11583	continuous
2	88,767,254-88,827,254	0.06	557	continuous
3	84,500,000-88,767,254	4.27	3575	1
total			15715	
Chr.17				
1	1-60,000	0.06	639	continuous
2	60,000-20,000,000	19.94	3655	5
3	20,000,000-22,500,000	2.5	20759	continuous
total			25053	
Chr.15				
1	28,200,000-29,200,000	1	9861	continuous
total			9861	
Chr.14				
1	62,600,000-64,600,000	2	19386	continuous
2	80,500,000-81,000,000	0.5	4661	continuous
3	64,600,000-80,500,000	15.9	2890	5
total			26937	
Chr.18 (1-76,117,153)				
1	sense	-	13468	5
2	antisense	-	13468	5
total			26936	
Chr.22				
1	sense		6365	5
total			6365	
Chr.X				
1	sense		23884	5
total			23884	
Total:333951				

*Chr10 および Chr11 の末端領域を、1-200,000 に変更して設計しました。

*Chr22 および ChrX を、5kbp のインターバルにて追加設計しました。

表2 6 継代および 26 継代目の hMSC 細胞の G-banding による核型解析

Mode	40	41	42	43	44	45	46	47	Total
Cell No. of Passage-6							50		50
Cell No. of Passage-26	1	3	1	2	2	6	14	21	50

		Cell No
Passage-6	46 XX	10
Passage-26	A 47, XX, +7, +der(7) del (7)(p?)del(7)(q?), der(7) (7pter→7p15::7?:cen::17?),	9
	B 46, idem, dic(21,22)(p13;p11)	1

表 3 hMSC の LOH 領域に存在する遺伝子群

Sl.No.	Gene Name	Description	Sl.No.	Gene Name	Description
Ch 3 LOH region genes			Ch 8 - LOH region genes		
1	NYD-SPI7	testes development-related NYD-SPI7	1	BC009633	TFCP2L3 protein
2	CD47	CD47 antigen (Rb-related antigen, integrin-associated signal transducer)	2	TFCP2L3	transcription factor CP2-like 3
3	ESRRBL1	estrogen-related receptor beta like 1	3	NCALD	neurocalin delta
4	HLA2	HERV-HLTR-associating 2	4	AB036063	Hypothetical protein DKFZp686M05248
5	AB040957	Hypothetical protein FLJ12850	5	FRRM2B	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)
6	KIAA1524	p90 autoantigen	6	AB163437	P53-inducible ribonucleotide reductase small subunit 2 short form gamma
7	AY227654	Splice isoform 2 of Q86Y13	7	AB166669	P53-inducible ribonucleotide reductase small subunit 2 short form beta
8	RETNLB	colon and small intestine-specific cysteine-rich	8	EDD	progesterin-induced protein
9	DZIP3	zinc finger DAZ-interacting protein 3	9	ODF1	outer dense fiber of sperm tails 1
10	AF276948	Hypothetical protein FLJ27117	10	KLF10	Kruppel-like factor 10
11	AF454941	Hypothetical protein FLJ2291	11	BC095399	Transforming growth factor-beta-inducible early growth response protein 1 (TGF-beta-inducible early growth response protein 1)(TIEG-1) (Kruppel-like factor 10) (EGF alpha)
12	BBX	HMGBOX transcription factor BBX	12	AZINI	ornithine decarboxylase antizyme inhibitor
13	AK130343	Hypothetical protein FLJ26833	13	ATP6V1C1	ATPase, H ⁺ -transporting, lysosomal 42kDa, VI
14	AK130627	Hypothetical protein FLJ27117	14	BC029562	MGC39526 protein
15	TRAF1	T-cell receptor interacting molecule	15	BC035038	BAALC isoform 1-8 (BAALC protein) (BAALC 1-8)
16	GUCA1C	guanylate cyclase activator 1C	16	AK125733	Hypothetical protein FLJ43745
17	MRCC	microchidia homolog	17	AB209734	Putative G-protein coupled receptor
			18	C1HFC1	collagen triple helix repeat containing 1
			19	AK027799	Hypothetical protein FLJ11012
			20	WDSOF1	hypothetical protein LOC25879
			21	AF161549	HSP0064
			22	FZD6	frizzled 6
			23	MFTC	mitochondrial folate transporter/carrier
			24	RIMS2	regulating synaptic membrane exocytosis 2
			25	TM/SF4	dendritic cell-specific transmembrane protein
			26	AF090901	FR00195
			27	DPYS	dihydropyrimidinase
			28	AY203950	LP2209
			29	BC017381	LFP12 protein

図1 HL60 細胞 8 番染色体 8q24 c-myc 近傍領域の CGH 解析の結果

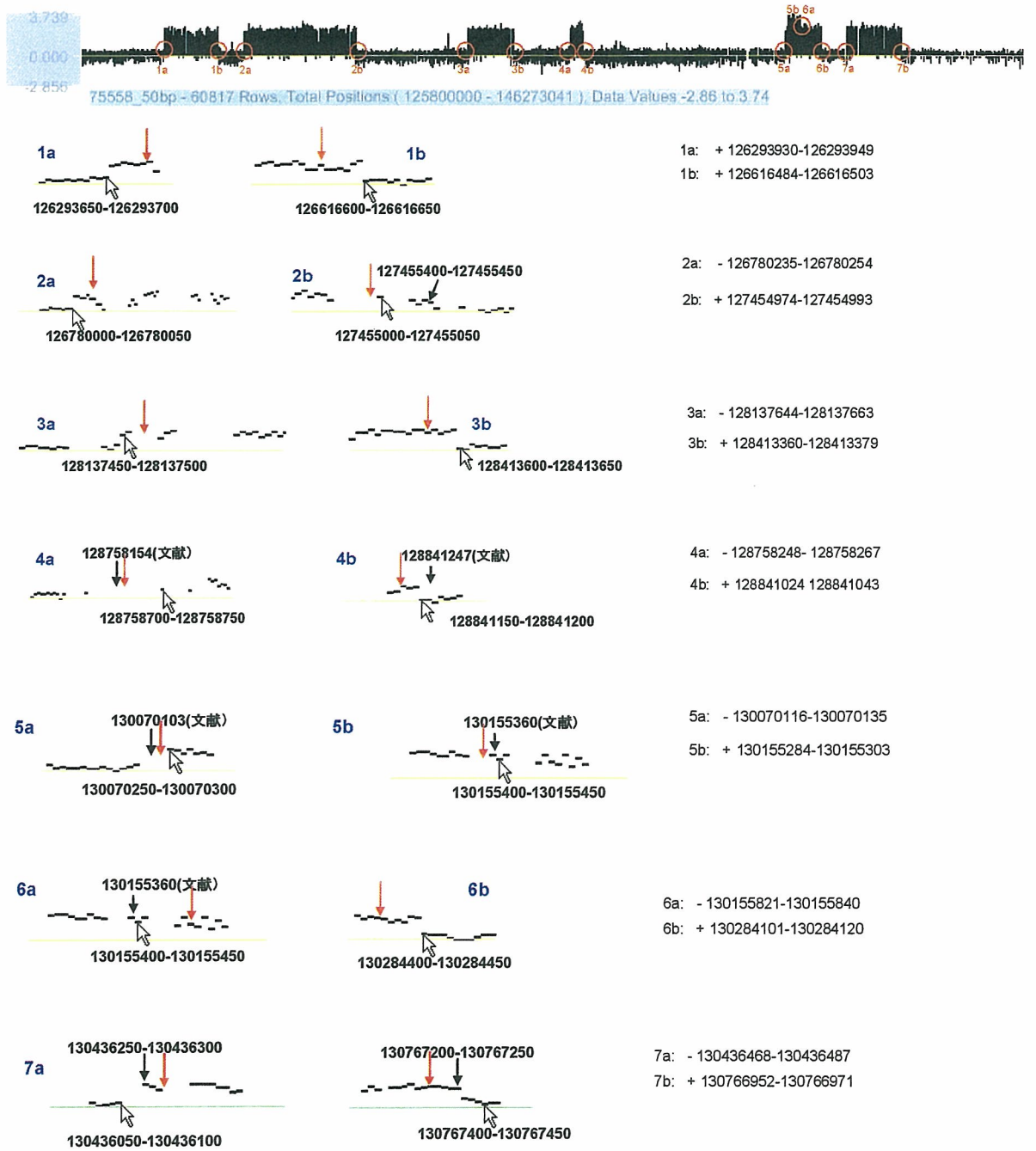
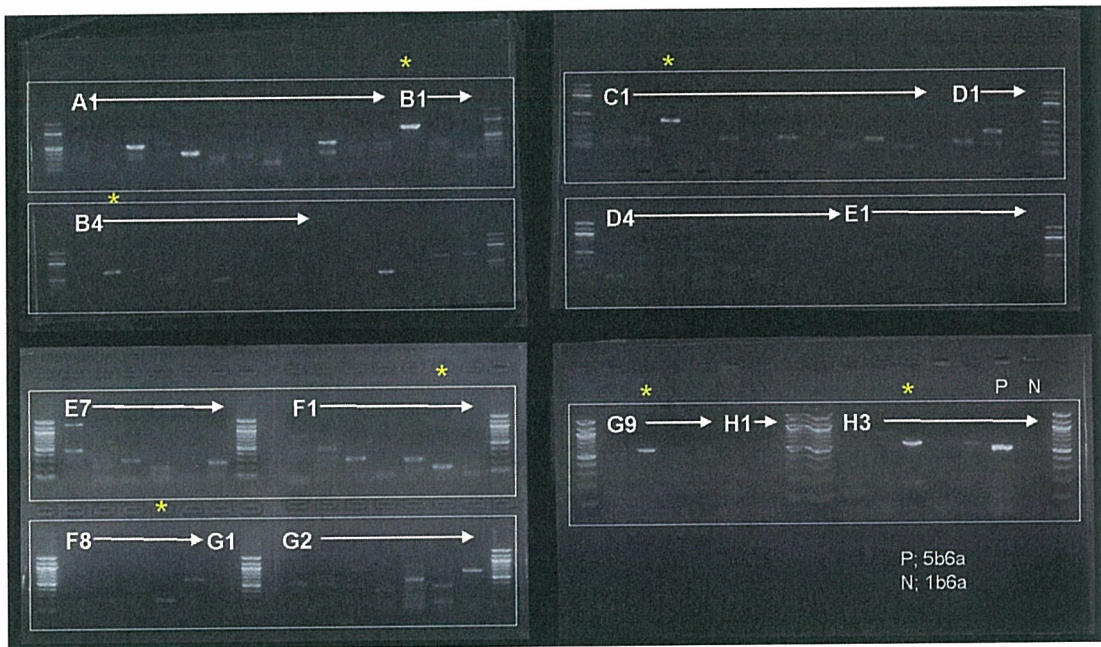


図2 総当たり PCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1a1b	1a2a	1a2b	1a3a	1a3b	1a4a	1a4b	1a5a	1a5b	1a6a	1a6b	1a7a
B	1a7b	1b2a	1b2b	1b3a	1b3b	1b4a	1b4b	1b5a	1b5b	1b6a	1b6b	1b7a
C	1b7b	2a2b	2a3a	2a3b	2a4a	2a4b	2a5a	2a5b	2a6a	2a6b	2a7a	2a7b
D	2b3a	2b3b	2b4a	2b4b	2b5a	2b5b	2b6a	2b6b	2b7a	2b7b	3a3b	3a4a
E	3a4b	3a5a	3a5b	3a6a	3a6b	3a7a	3a7b	3b4a	3b4b	3b5a	3b5b	3b6a
F	3b6b	3b7a	3b7b	4a4b	4a5a	4a5b	4a6a	4a6b	4a7a	4a7b	4b5a	4b5b
G	4b6a	4b6b	4b7a	4b7b	5a5b	5a6a	5a6b	5a7a	5a7b	5b6a	5b6b	5b7a
H	5b7b	6a6b	6a7a	6a7b	7a7b							



	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	7a	7b
1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■
1b	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-
2a	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2b	-	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-
3a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-
4b	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-
5a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-
6a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-
7a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

■ シークエンス解析の結果、正しい増幅が認められたプライマーペア

図3 HL60細胞における増幅単位の構造

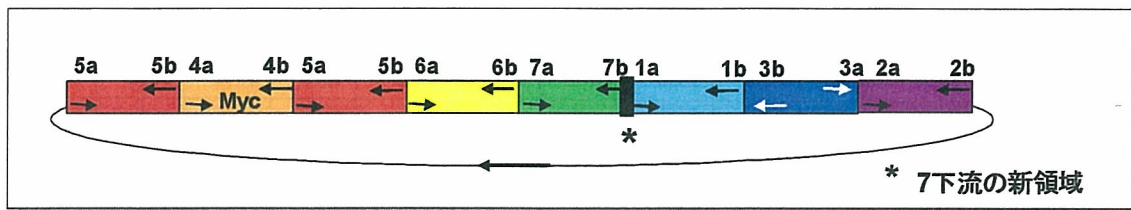


図4 各増幅単位のつながり

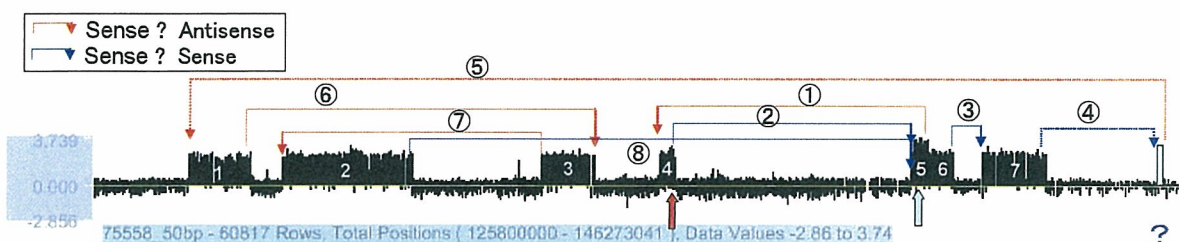
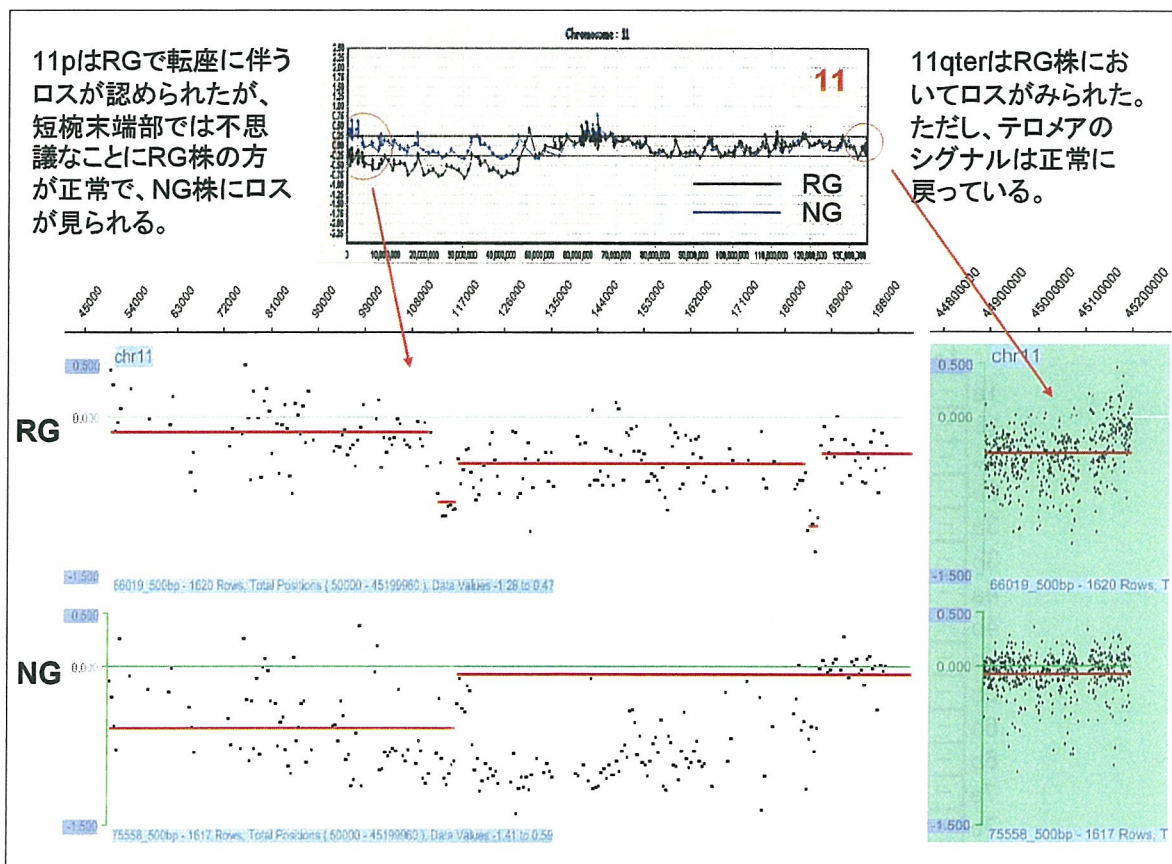
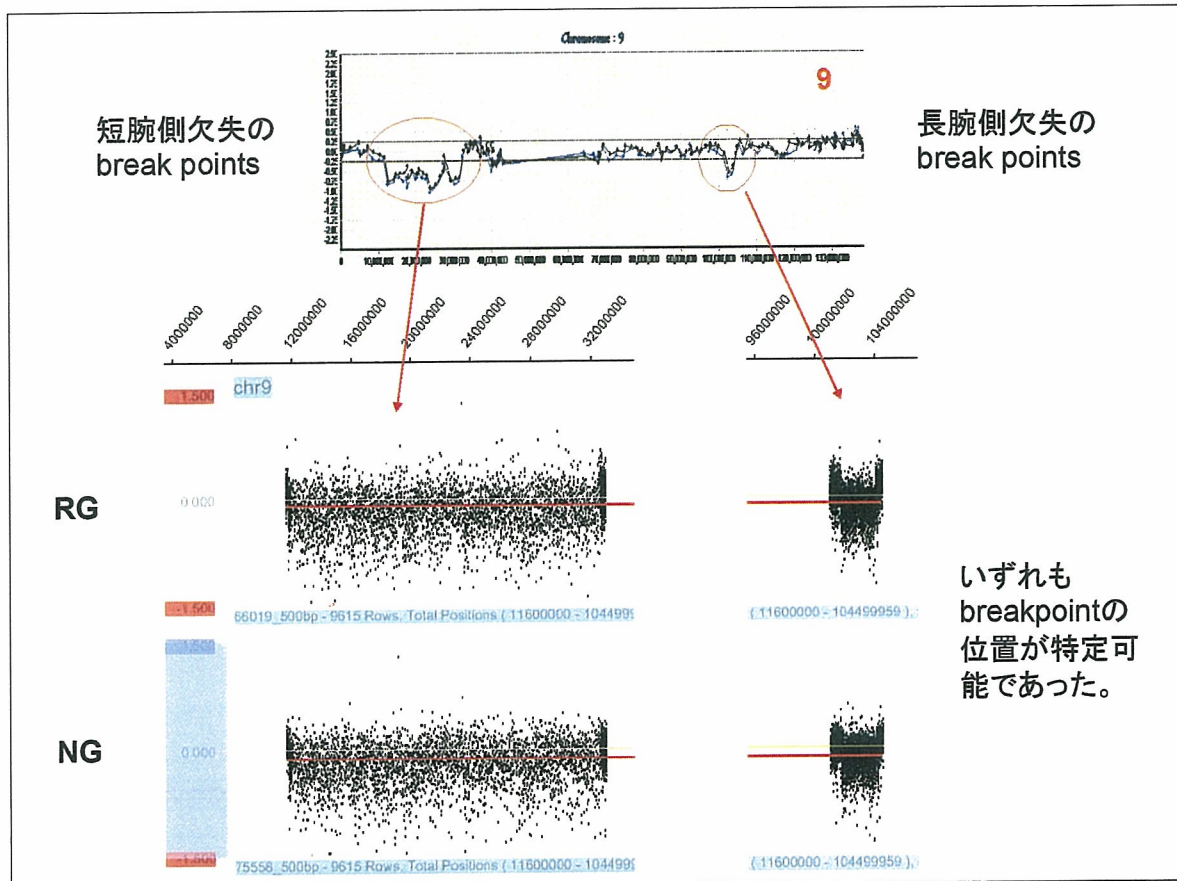
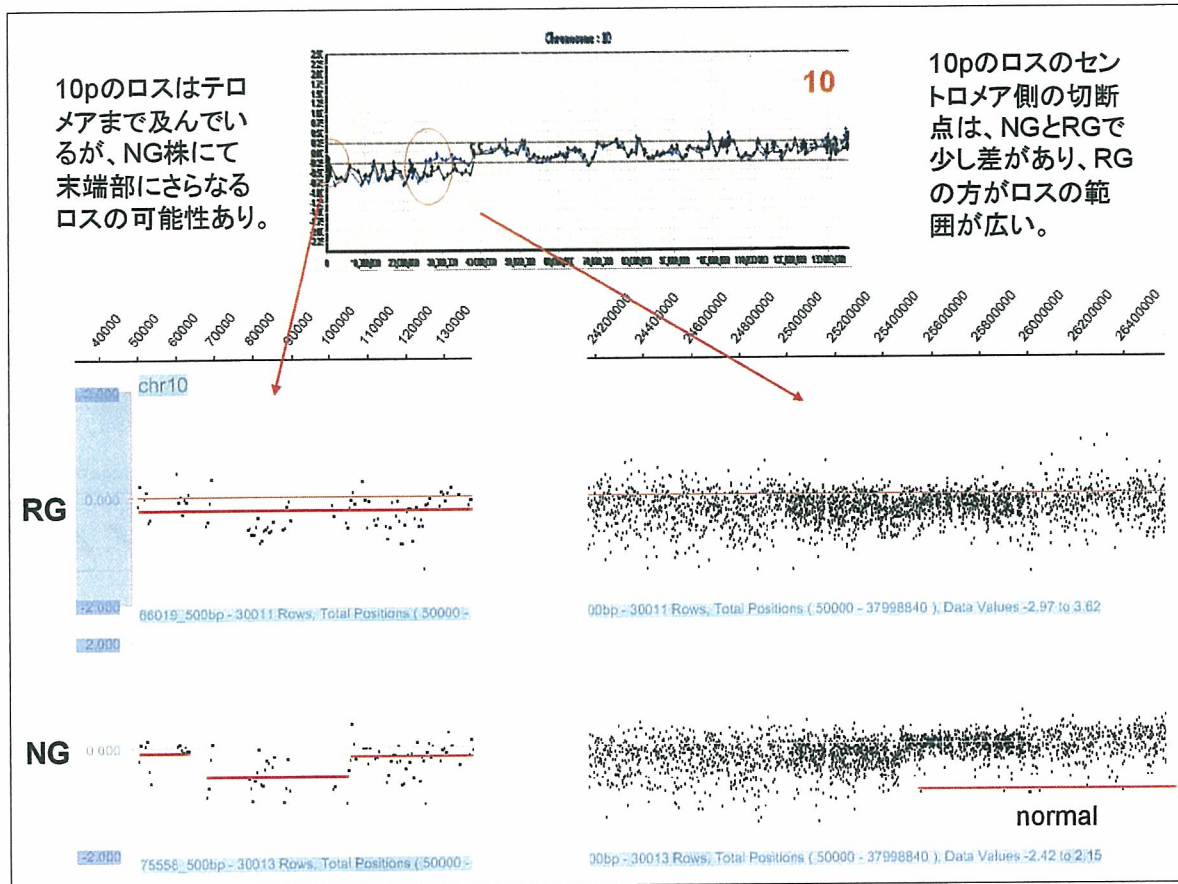


図5 oligoCGHによるHL60細胞とHL60-RG株の比較





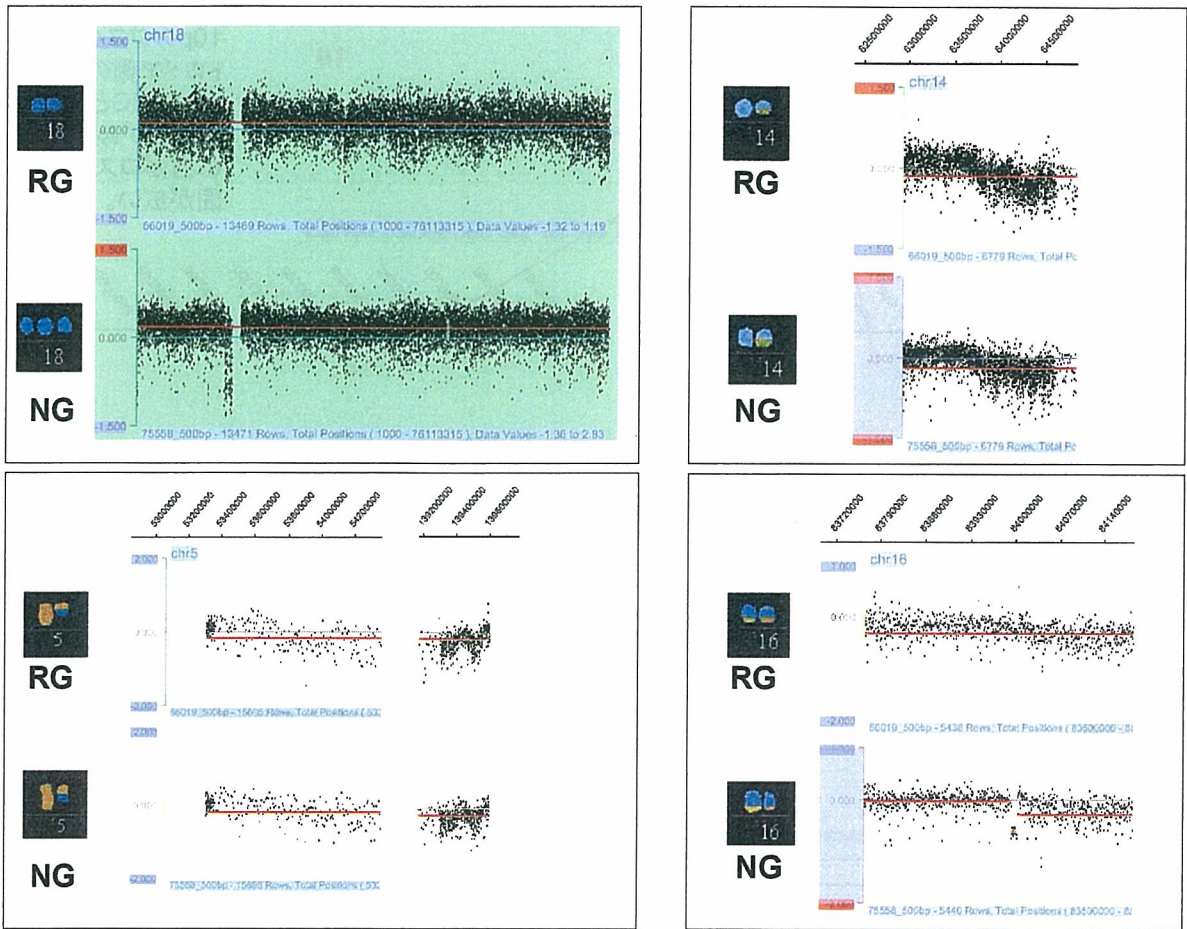
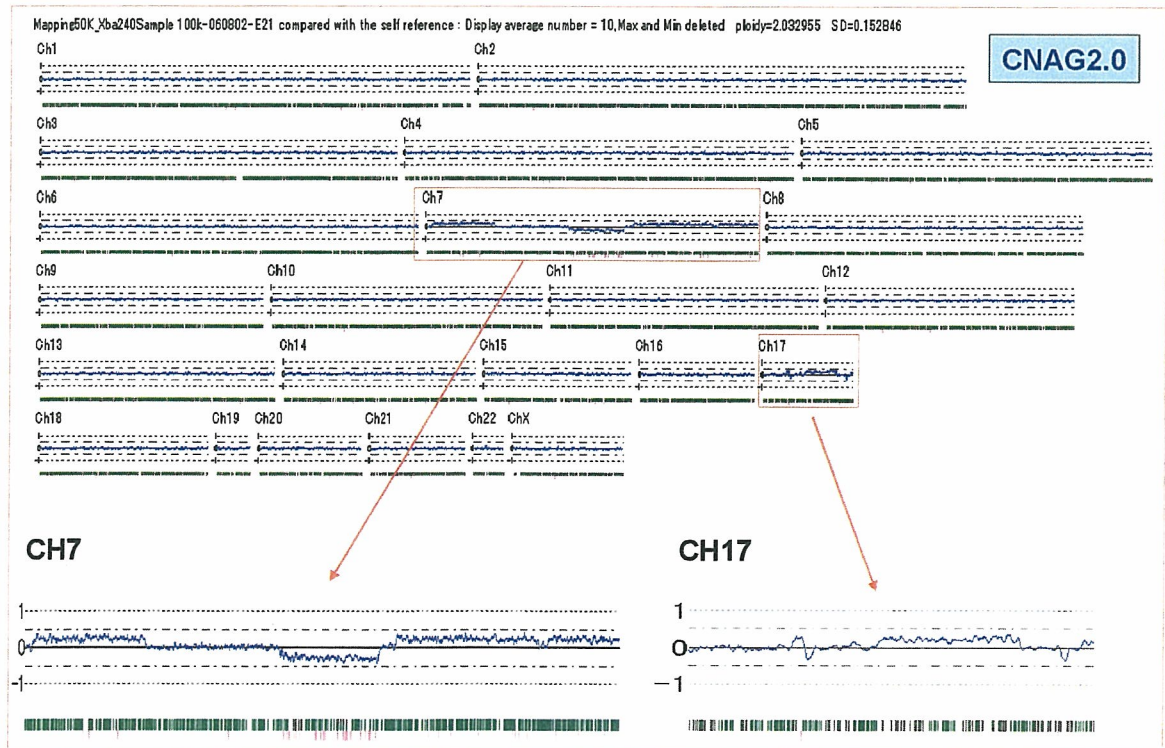


図6 ヒト間葉系幹細胞の50K SNPチップによるCGH解析



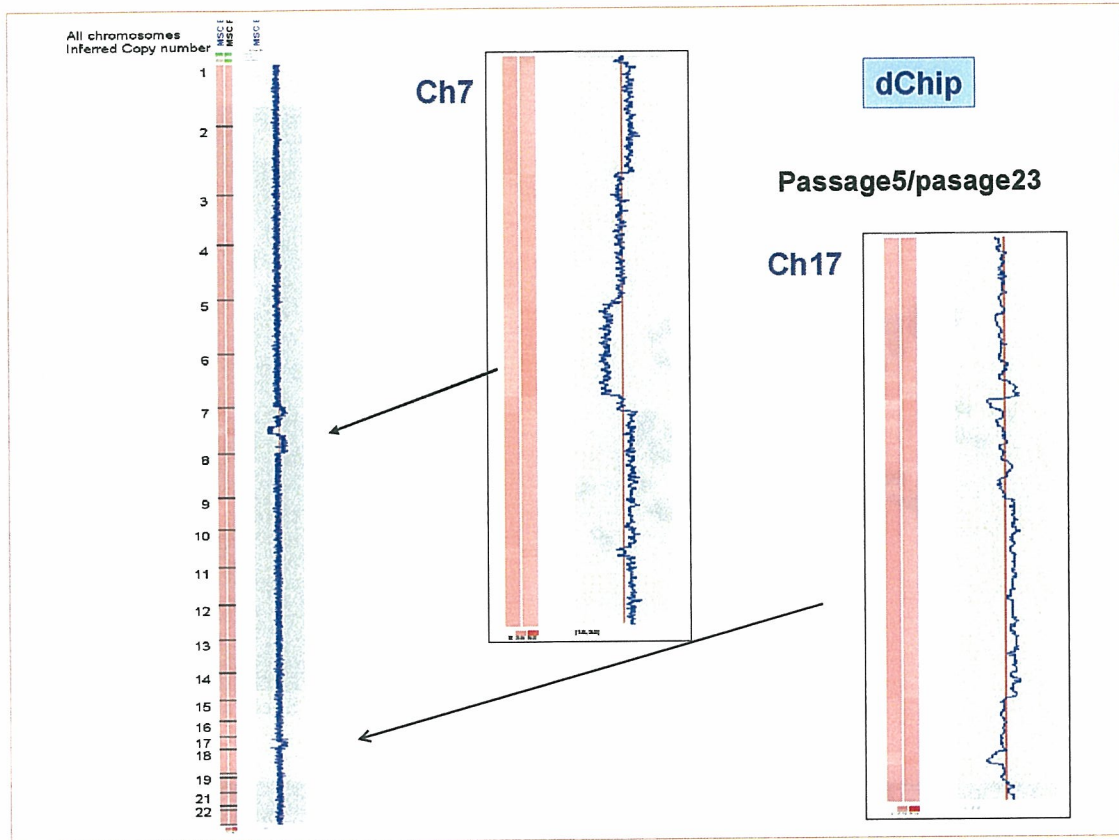


図7 ヒト間葉系幹細胞の50K SNPチップによるLOH解析

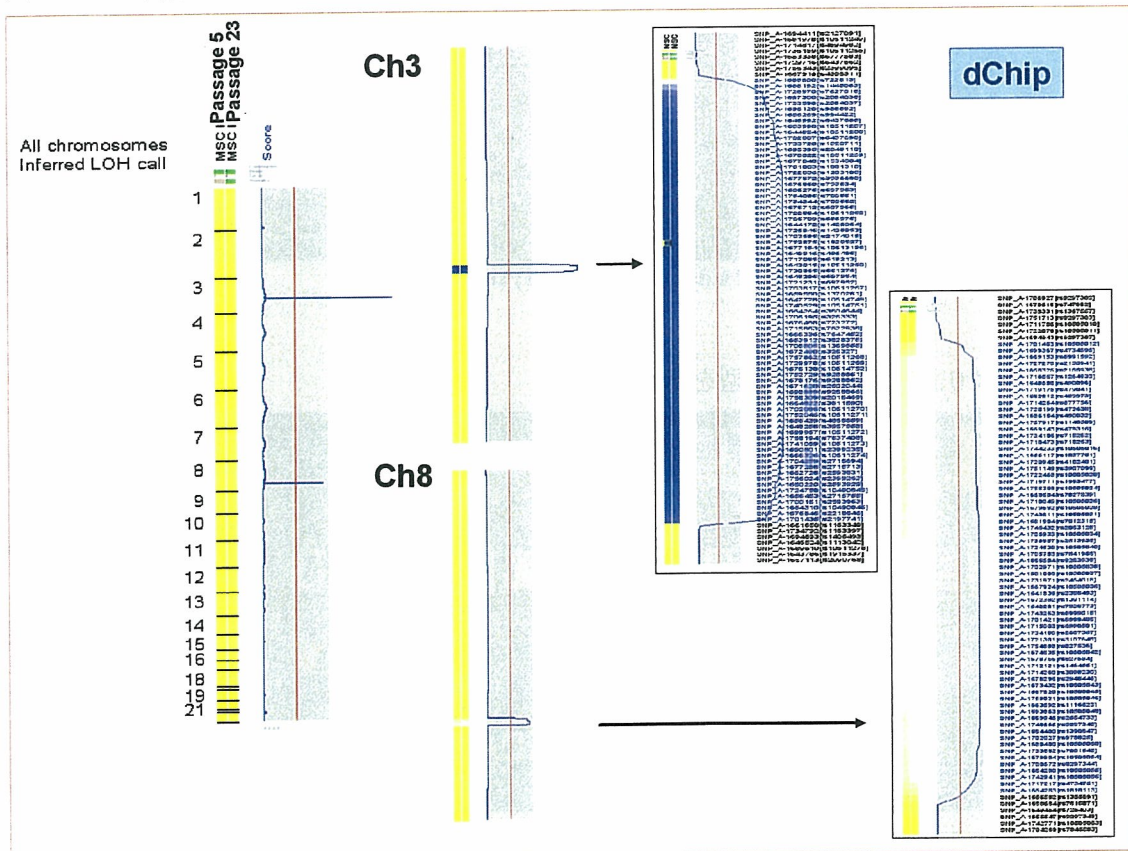
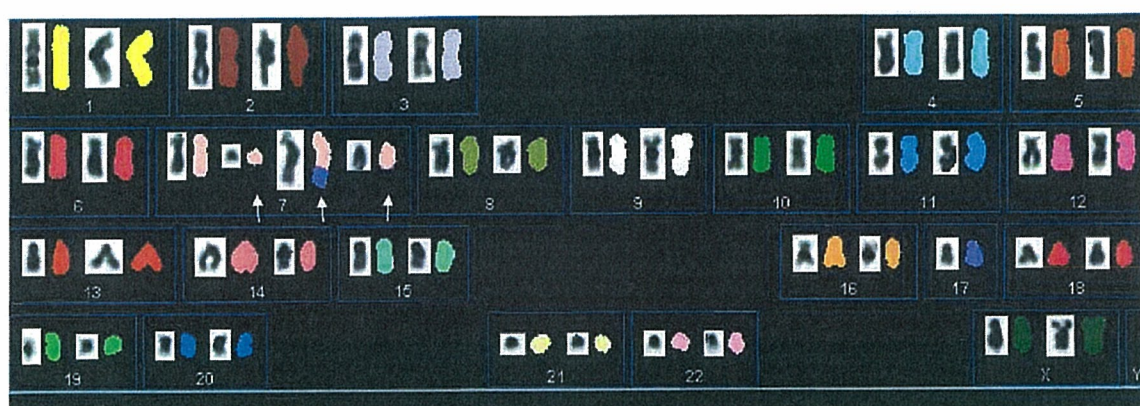
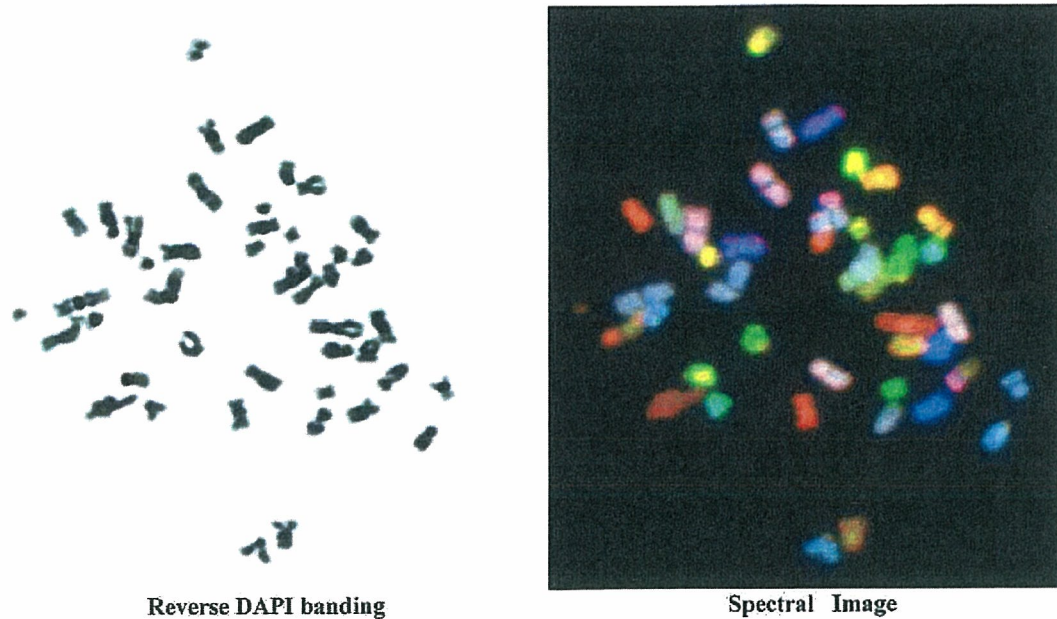


図 8 25 継代目 hMSC 細胞の Spectro Karyotyping 解析結果



Comprehensive Karyotyping (left side: reverse DAPI; right side: SKY)

(同一継代6 継代目の正常核型を示した細胞)

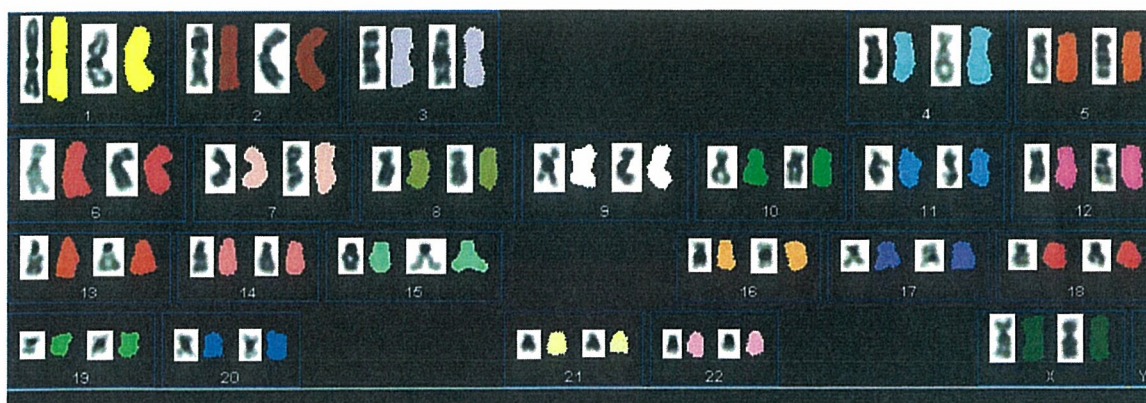


図9 核型解析の結果と CGH 解析結果の比較

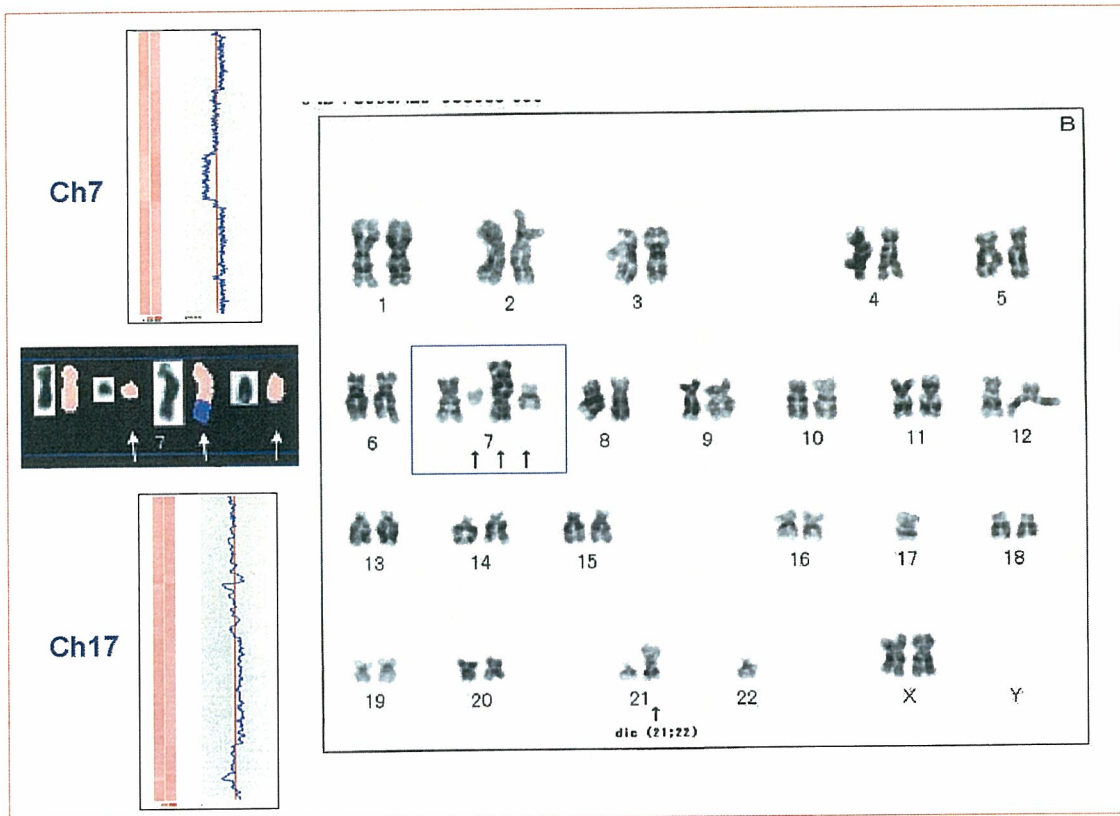


図10 オンラインナノ LC-MS/MS システム

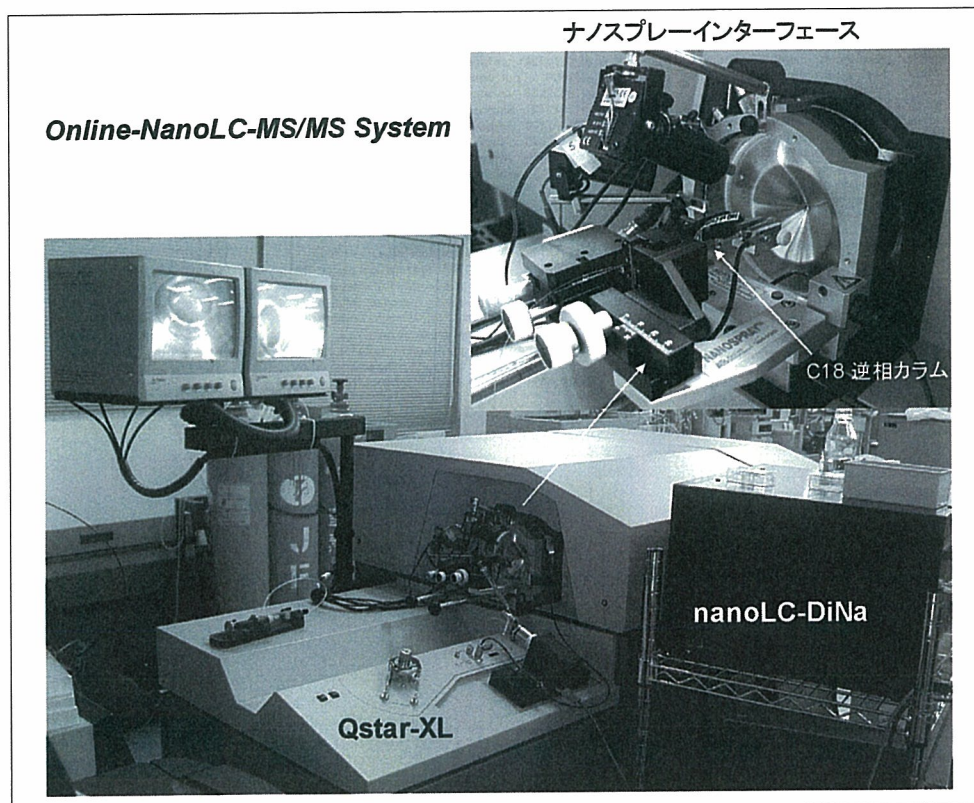
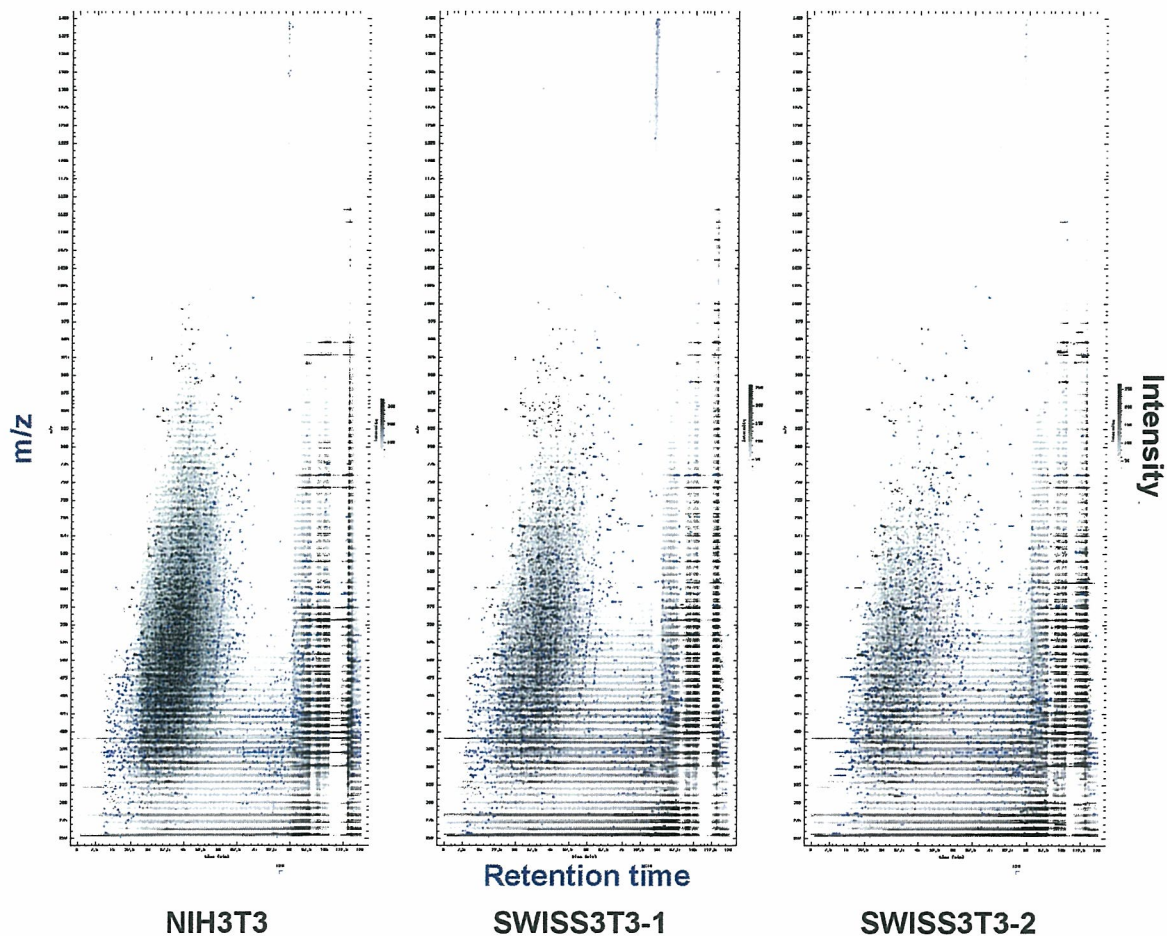


図 11 トリプシン処理細胞上清を用いたペプチドーム解析結果の3次元グラフ化



gi|1405933 M2-type pyruvate kinase [Mus musc
gi|123681 Heat shock protein HSP 90-beta (HSP
gi|194027 heat-shock protein hsp94
gi|309317 84 kD heat shock protein
gi|74178273 unnamed protein product [Mus musc
gi|74213524 unnamed protein product [Mus musc
gi|74177708 unnamed protein product [Mus musc
gi|74223027 put. beta-actin (aa 27-375) [Mus musc
gi|49868 put. beta-actin (aa 27-375) [Mus musc
gi|3156030 tropomyosin 1, alpha [Mus musculus]
gi|74181043 unnamed protein product [Mus musc
gi|6752952 actin, gamma 2, smooth muscle, enter
gi|94392330 PREDICTED: similar to Actin, cytopla
gi|55291 unnamed protein product [Mus musc
gi|54912 unnamed protein product [Mus musc
gi|20178336 Tropomyosin alpha-3 chain (Tropomy
gi|6681273 eukaryotic translation elongation facto
gi|6679439 peptidylprolyl isomerase A [Mus musc
gi|74197965 unnamed protein product [Mus musc
gi|37675525 AHNAK [Mus musculus]
gi|61743961 AHNAK nucleoprotein isoform 1 [Mus
gi|30425250 hypothetical protein LOC238880 [Mus
gi|29437296 Act2 protein [Mus musculus]
gi|13529413 Fbln2 protein [Mus musculus]
gi|12846159 unnamed protein product [Mus musc
gi|118600845 Unknown (protein for IMAGE:534593E
gi|14165437 heterogeneous nuclear ribonucleoprot
gi|11875203 tropomyosin 2, beta [Mus musculus]
gi|6647752 Heterogeneous nuclear ribonucleoprot
gi|33563250 desmin [Mus musculus]
gi|695638 M-TAXREB107 [Mus musculus]
gi|220474 lamin A [Mus musculus]
gi|12963491 enolase 1, alpha non-neuron [Mus mu
gi|50815 unnamed protein product [Mus musc
gi|26331354 unnamed protein product [Mus musc
gi|28173554 histone H2B [Homo sapiens]
gi|200785 ribosomal protein L7
gi|94390118 PREDICTED: similar to ribosomal prot
gi|49753 unnamed protein product [Mus musc
gi|83745120 ribosomal protein, large P2 [Mus musc
gi|13430890 histone 1, H1e [Mus musculus]
gi|51304 unnamed protein product [Mus musc
gi|94370417 PREDICTED: similar to H2A histone f
gi|74195793 unnamed protein product [Mus musc
gi|6755392 S100 calcium binding protein A6 Calc
gi|47847498 mFL000279 protein [Mus musculus]
gi|28972888 mKIAA3005 protein [Mus musculus]
gi|6755350 ribosomal protein L10A [Mus musculus]
gi|33859624 S100 calcium binding protein A4 [Mus
gi|191765 alpha-fetoprotein
gi|4507729 tubulin, beta 2 [Homo sapiens]
gi|74211311 unnamed protein product [Mus musc

gi|74178273 unnamed protein product [Mus musc
gi|74213524 unnamed protein product [Mus musc
gi|49868 put. beta-actin (aa 27-375) [Mus musc
gi|12852068 unnamed protein product [Mus musc
gi|1181242 fibronectin [Mus musculus]
gi|94392330 PREDICTED: similar to Actin, cytopla
gi|29437296 Act2 protein [Mus musculus]
gi|30425250 hypothetical protein LOC238880 [Mus
gi|50797 unnamed protein product [Mus musc
gi|55291 unnamed protein product [Mus musc
gi|13529413 Fbln2 protein [Mus musculus]
gi|202210 alpha-tubulin isotype M-alpha-2
gi|191765 alpha-fetoprotein
gi|117167791 Cdc112 protein [Mus musculus]
gi|94404435 PREDICTED: hypothetical protein [Mt
gi|484531 H3.3 like histone MH321 - mouse
gi|12847552 unnamed protein product [Mus musc
gi|28892871 SET and MYND domain containing 4 [H
gi|309317 84 kD heat shock protein
gi|40556608 heat shock protein 1, beta [Mus musc
gi|6680177 hemoglobin Y, beta-like embryonic chi
gi|12833514 unnamed protein product [Mus musc

gi|387082 skeletal muscle alpha-actin
gi|94366797 PREDICTED: similar to Actin, alpha ca
gi|387090 alpha-cardiac actin
gi|74213524 unnamed protein product [Mus musc
gi|49868 put. beta-actin (aa 27-375) [Mus musc
gi|74178273 unnamed protein product [Mus musc
gi|6681273 eukaryotic translation elongation facto
gi|94392330 PREDICTED: similar to Actin, cytopla
gi|1181242 fibronectin [Mus musculus]
gi|94404435 PREDICTED: hypothetical protein [Mu
gi|202210 alpha-tubulin isotype M-alpha-2
gi|12833514 unnamed protein product [Mus musc
gi|6754254 heat shock protein 1, alpha [Mus musc
gi|123681 Heat shock protein HSP 90-beta (HSP
gi|6754254 heat shock protein 1, alpha [Mus musc
gi|6680177 hemoglobin Y, beta-like embryonic cha
gi|50511223 mKIAA1991 protein [Mus musculus]
gi|74197965 unnamed protein product [Mus musc
gi|34147288 hypothetical protein LOC226118 [Mus
gi|51304 unnamed protein product [Mus musc
gi|13529413 Fbln2 protein [Mus musculus]
gi|12963491 enolase 1, alpha non-neuron [Mus mus
gi|9910228 FK506 binding protein 12-rapamycin as
gi|82894062 PREDICTED: hypothetical protein [Mu

MS/MS 測定データより MASCOT 検索にて
Significant hit として同定されたタンパク

図 11 HL60 細胞 c-myc 増幅領域のジャンクション配列の特徴

Short homology

6b-4a

```

5'→
ACCTTTAATG TTGCATCTGG ACACCAAGATC TTCTTAOCTC TAAGCTCTGG GGTCTGCTCCA OCTGAOOCGA CTGAATOOCCA CTGGCOCTTAG TCAGTGTGAC AGAGTCACAG CCOOCTATTT 130155424 6
ACCTTTAATG TTGCATCTGG ACACCAAGATC TTCTTAOCTC TAAGCTCTGG GGTCTGCTCCA OCTGAOOCGA CTGAATOOCCA CTGGCOCTTAG TCAGTGTGAC AGAGTCACAG CCOOCTATTT HL60
TGFTOCTGGA ACATCTTAAG CATGCOCTTCA ACTGAGCAGC TTTCOCTOCT GATTTCTGTGCTGCTGAGATA TTTCOCTTAG TTTATATGTT ATATGTTTAT AGCCAAAGCT GTACCAOCCAG 128758252 4
5'→

```

JOINT部分に2bpのShort Homology。

4b-5a

```

3'←
TTCAOCTATGA CATCAGACT AGGAAAGCAC AGAGTCAGGG TTGAAACCCA GCTTCTCTG GATCCATAT TTGCTCTTTC CCTTCTGCC TTTTGAAG ACTTCAAGT GGTCCACATT 130070039 5
TTCAOCTATGA CATCAGACT AGGAAAGCAC AGAGTCAGGG TTGAAACCCA GCTTCTCTG GATCCATAT TTGCTCTTTC CCTTCTGCC TTTTGAAG ACTTCAAGT GGTCCACATT HL60
GCACACTGAC ATCCATACAC ATAGGCTTCC CCTTAACTG TCATTCAGG OGGAAATG TTAGCAAGAA AGAAAAAGG GAGCAAGGT GGTGSGGAG CAGGAAGAGA AAGCCTCTC 128841158 4
3'←

```

JOINT部分に3bpのShort Homology。両側にも6bpのShort Homology。

3a-2a

```

3'←
ACCCCAACT ACCTGTCCC AAAAGCTCAA ATGGGATCAT CAGAGAGCTC CCCCAGGTGA CTTGCOCTTG TCTTTACAC AGAAGCTTAG CATCCOCTG CACAGAGAT TTGGACAAGG 126779995 2
ACCCCAACT ACCTGTCCC AAAAGCTCAA ATGGGATCAT CAGAGAGCTC CCCCAGGTGA CTTGCOCTTG TCTTTACAC AGAAGCTTAG CATCCOCTG CACAGAGAT TTGGACAAGG HL60
ATAAAGAAG CAGGATTACA GTTGTGTTG GAAAGAGAC CTTGAGTAAA TTTACTAAGA CAGGGGACCA TTTGGTATG TTTGCAAAAT TTCAAGTGA GAAATATGA CTTGACTGTG 128137504 3
5'→

```

JOINT部分にあるTATGTTTTは後ろの部分が重複した。

7b-8-1a

```

3'←
CTAACTCAOC CAGCTCTGCA GAGTGAACOC AGAAAAGCTC TATCCTGGC TACCAAAAA CAGTTCATAA AATCTTATG ATACCTTTAA ATGAATATGT GTTCCOCTTG CTAACAAGT 126293633 1
CTAACTCAOC CAGCTCTGCA GAGTGAACOC AGAAAAGCTC TATCCTGGC TACCAAAAA CAGTTCATAA AATCTTATG ATACCTTTAA ATGAATATGT GTTCCOCTTG CTAACAAGT HL60
AATCAAGAAG CTTACTTTCA GAGTCTCTTA TCAATGACC CTCTTTCOC CTAATTCOA CTAATGAGT GAAAAAAT GTTTAAAT CTGTAAGCT ACTGAAAT ATTAAATAC TAAATGTAAG 8
5'→
GTTTTTCTCA AACACATTA AGTTGAGCA AGCCTGGAG GAGCCTCAGG AAGTCTOCT TTCTGTGAC TCCGGGCTC GGAAGCCTG TTTGAATGOC CTTGCOCTG GCTTCTCTC 130767297 7
ACATTTCTG AGAGAAAA GTGATGGAC TAAATGACA AGAACATCG AGAATATCG ATTAATAAG CTTGCCAGG AGTTAAGGT GTTAAATGCC CCTGCCOCT GGTCTCTC HL60
ACATTTCTG AGAGAAAA GTGATGGAC TAAATGACA AGAACATCG AGAATATCG ATTAATAAG CTTGCCAGG AGTTAAGGT GTTAAATGCC CCTGCCOCT GGTCTCTC 136650022 5'→

```

7-3'と1-5'は逆方向の8を挟む。1のBREAKPOINTは回文構造で8とShort Homologyを持つ。8と7のJOINTもGTGTTの5塩基が重なっている。

Complementary Sequence

1b-3b

```

5'→
CCTTTCTGCA TTGCAGTCA CTTCTTTTAC TTACTTACC TCTGCTGGT GATCTTCTC TOCCTTACT ATTCACCTCA TTTCAATCCA ATGTCTTGA CCAACAAAT GAAACAACTGG 128413727 3
CCTTTCTGCA TTGCAGTCA CTTCTTTTAC TTACTTACC TCTGCTGGT GATCTTCTC TOCCTTACT ATTCACCTCA TTTCAATCCA ATGTCTTGA CCAACAAAT GAAACAACTGG HL60
ACAAGTGTCT CCTTCAGAAA CAAGTGCAAA TATGAATCA CTTTTTAAAG TCAACACATG TGTATGTAT AATTAGGTC ACATGCTATC TATGAGCCA GAGAAAGCA GCAGAGATA 126616579 1
3'←

```

3-3'のBREAKPOINTに一つ回文構造。1-3'のBREAKPOINTの下流に8塩基の回文構造がある。挟んだ19塩基の由来は分からないが、両端のCATAとTATGはLOOP構造を作りうる

2b-6a

```

5'→
GAGTCTCTC CTTCTGAAAT GGTAAAGT AAAACAATTT GGGAAATAA AGCTTGAAG TAGTGTGTTA ACCAGACTA GGATTTATGC TTTCTGAGT ATCCAGACT TTTTAACTAT 127455529 2
GAGTCTCTC CTTCTGAAAT GGTAAAGT AAAACAATTT GGGAAATAA AGCTTGAAG TAGTGTGTTA ACCAGACTA GGATTTATGC TTTCTGAGT ATCCAGACT TTTTAACTAT HL60
AAGGAAATC CAATTTGTA CAGATAACTG CCACTCATTG GGATGCTGTG TTAGAAGAA CTACACAGTT CATTTTTGTA AGCAAGACA CACATACACA CATAATACA TACACACAGC 130081014 6
5'→

```

JOINT部分の両側に相補配列。

5b-7a

```

5'→
TCATGCTCA CCCCAGGTT TGTTTAAATG CCTCTTTAT GCTTTCTTT CTACACACT GTTTTCTCT CTTCTCTAG TACAAAAAT GGCCTACTC TAATCCAAA ATTCACATGC 130284510 5
TCATGCTCA CCCCAGGTT TGTTTAAATG CCTCTTTAT GCTTTCTTT CTACACACT GAGGGGTGG CCTTCTCAT CTTAATGACT TGTGCAAGT CCTGAGACG CAATAATATA HL60
TTGTTTAAA TTATTGTGA TGTACTAT CTGCTCTCC ACTAAGATAT AAGTCTAGT AGAGGGTGG CCTTCTCAT CTTAATGACT TGTGCAAGT CCTGAGACG CAATAATATA 130436264 7
5'→

```

JOINT近傍に7bpのShort Homology。その近傍に回文構造。

7b-8-1a

```

3'←
CTAACTCAOC CAGCTCTGCA GAGTGAACOC AGAAAAGCTC TATCCTGGC TACCAAAAA CAGTTCATAA AATCTTATG ATACCTTTAA ATGAATATGT GTTCCOCTTG CTAACAAGT 126293633 1
CTAACTCAOC CAGCTCTGCA GAGTGAACOC AGAAAAGCTC TATCCTGGC TACCAAAAA CAGTTCATAA AATCTTATG ATACCTTTAA ATGAATATGT GTTCCOCTTG CTAACAAGT HL60
AATCAAGAAG CTTACTTTCA GAGTCTCTTA TCAATGACC CTCTTTCOC CTAATTCOA CTAATGAGT GAAAAAAT GTTTAAAT CTGTAAGCT ACTGAAAT ATTAAATAC TAAATGTAAG 8
5'→
GTTTTTCTCA AACACATTA AGTTGAGCA AGCCTGGAG GAGCCTCAGG AAGTCTOCT TTCTGTGAC TCCGGGCTC GGAAGCCTG TTTGAATGOC CTTGCOCTG GCTTCTCTC 130767297 7
ACATTTCTG AGAGAAAA GTGATGGAC TAAATGACA AGAACATCG AGAATATCG ATTAATAAG CTTGCCAGG AGTTAAGGT GTTAAATGCC CCTGCCOCT GGTCTCTC HL60
ACATTTCTG AGAGAAAA GTGATGGAC TAAATGACA AGAACATCG AGAATATCG ATTAATAAG CTTGCCAGG AGTTAAGGT GTTAAATGCC CCTGCCOCT GGTCTCTC 136650022 5'→

```

7-3'と1-5'は逆方向の8を挟む。1のBREAKPOINTは回文構造で8とShort Homologyを持つ。8と7のJOINTもGTGTTの5塩基が重なっている。

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

分担研究者 川崎ナナ （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部室長）

協力研究者 橋井則貴 （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部）

研究要旨 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*-グリコリルノイラミン酸 (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。また、分担研究者らが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。

A. 研究目的

細胞治療薬とは、細胞治療を目的として、自己、同種、あるいは異種の細胞を生体外で選別し、加工し、あるいは増殖した後にヒトに投与する医薬品のことで、近年、細胞治療薬の開発は企業活動として活発化してきた。今後の本格的な実用化に向けて、現在、細胞治療薬の有効性確保と特性解析及び品質・安全性評価技術の開発が求められている。

厚生労働省は、表 1 のような細胞治療薬に関する指針や通知を出している。細胞治療薬の品質及び安全性の確保に関する基本的な考え方は、特に医薬発第 1314 号に示されている。表 2 及び 3 は医薬発第 1314 号に記載されている品質・安全性確保のための製造工程評価と工程内管理試験、及び細胞特性解析と特性解析に基づく製品の規格・試験方法の設定に関する事項の要点をそれぞれまとめたものである。

表 3 中の製造工程由来不純物とは、医薬品製造中に血清、培地、及び試薬等から混入し、品質・有効性・安全性に影響を及ぼすおそれがある

物質のことで、最終製品中に含まれる対象分子の定量試験を設定し、存在を否定するか、もしくは予め規定した存在許容量以下であることを確認する必要がある。現在、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ている物質の一つに、シアル酸の一種である *N*-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) がある。NeuGc は、ウシなど様々な動物で産生されるが、ヒトでは産生されないために、ヒトに対して抗原性を示すことが知られている。有効性や安全性に対する NeuGc の影響を正しく評価するために、現在、細胞治療薬に含まれる NeuGc の定量法が開発が求められている。

細胞の特性確認試験は、製造工程における培養条件の一定性、並びに最終製品の表現型、遺伝型、機能特性及び細胞活性の安定性確認を目的として設定するものである。現在、表現型としては各種 CD 抗原の発現をはじめとして、様々な分化マーカーなどがその指標として用いられているが、製造工程の変動等により細胞の特性が変化することを想定した場合、細胞の変化をより鋭敏に検

出する方法を開発する必要がある。培養条件によって変化する分子の一つとして糖鎖がよく知られている。従って、細胞が発現する糖タンパク質の糖鎖のプロファイルが製造工程や最終製品における細胞の品質特性指標としてエピジェネティックな表現型の変化も含めて利用できる可能性は高い。

これまで分担研究者らは、本研究などを通して、液体クロマトグラフ/質量分析装置 (LC/MS) を用いた独自の糖鎖解析法を開発し、単糖分析や糖鎖プロファイリングに応用してきた。本年度は第一に、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 NeuGc の微量定量法の開発を検討し、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。第二に、先に分担研究者らが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。

B. 研究方法

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会株式会社 (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。

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。

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。

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。

5) N 結合型糖鎖の切り出し

1×10^7 個の HL-60RG 細胞を 500 μ l 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 μ l 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 μ l 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、シスチ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 μ g/ml, 5 μ l) 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 μ g) 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。

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 μ l 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 kV, 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 セットアップの値は 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