

200706019A

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山口 照 英

平成 20 (2008) 年 4 月

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山 口 照 英

平成 20 (2008) 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・・・ 95
内田恵理子
2. 細胞組織利用医薬品の同一性や遺伝的安定性評価手法の開発に関する研究・・・ 109
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・・・ 125
川崎 ナナ
4. 新規免疫原性試験モデル動物の効率的作成に関する基盤技術開発・・・ 155
川端 健二
5. 細胞特性解析技術の開発に関する研究・・・ 165
石井 明子
6. 細胞組織利用医薬品の品質・安全性確保に関する研究・・・ 186
佐藤 陽治

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・ 203

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、以下の成果が得られた。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、独自に開発した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) によるウイルス濃縮法を、ドナーのスクリーニング法として応用するための検討を行った。その結果、PEI ビーズ濃縮法は HCV の 10 種類のジェノタイプや由来の異なる検体を全て濃縮可能であった。また、セロコンバージョンパネルを用いた検討より通常の PCR 法よりも数日早い段階の検体でウイルス検出が可能となり、HCV のウインドウ期の短縮が可能であることが示された。また、PEI ビーズ濃縮法が有効ではないウインドウ期の HBV については、新たな濃縮法として抗 HBV 抗体と $ZnCl_2$ を用い、抗体陰性のパネル血漿も効果的に濃縮可能な方法を開発した。②細胞組織利用医薬品の染色体レベルでの遺伝的安定性評価法として、一塩基多型を大規模に解析可能な GeneChip (SNP チップ) を用いた CGH (Comparative Genome Hybridization) 法の有用性を検討するために、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) の培養過程における染色体安定性を SNP チップによって解析した。その結果、長期培養においてクロソナルな増幅を示した検体について、染色体解析により転座を検出することができた。異常を持つ染色体のセントロメアプローブを使って培養過程での経時変化を追跡したところ、比較的早い段階から異常細胞の出現が確認でき、細胞培養過程における染色体変化と異常増殖性獲得細胞の検出に SNP チップが有用であることが示唆された。③糖鎖を指標とした細胞特性確認試験法の開発の一環として、フェニルヒドラジンの重水素置換体を標識試薬として用いる糖鎖の同位体標識法とナノフロー液体クロマトグラフィー/質量分析 (nano LC/MS) を組み合わせた簡便、迅速かつ高精度な糖鎖比較定量法を開発した。さらに同分析法により培養条件の異なるモデルヒト細胞由来糖鎖の定量解析を行い、細胞特性試験法や培養工程での細胞の同等性を評価する試験法としての応用可能性が高いことを確認した。④血球系ヒト化マウスを用いた細胞組織利用医薬品の免疫原性試験の開発を目的とし、改変マウスを効率的に作成するための基盤技術開発を行った。ヒト造血幹細胞に、骨髄 niche への接着に関与する分子もしくは造血幹細胞のアポトーシスを防ぐ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ことを目指し、アデノウイルス (Ad) ベクターを用いてヒト造血幹細胞を含む画分であるヒト骨髄 CD34 陽性細胞に抗アポトーシス遺伝子 (抗アポトーシス遺伝子である Bcl-xL の活性増強変異体 Bcl-FNK 遺伝子) を導入・発現させるとにより、細胞に抗アポトーシス活性を付与することに成功した。また、Bcl-FNK 遺伝子導入後も、培養 CD34 陽性細胞は一定期間、分化能および自己増殖能を保持していることを見出した。さらに、Bcl-FNK 遺伝子導入細胞を放射線照射した免疫不全マウスに移植し、移植細胞の骨髄での生着・分化を確認した。⑤細胞組織利用医薬品として血管再生療法での応用が期待される血管内皮前駆細胞 (early Endothelial Progenitor Cells: early EPC、および、Outgrowth Endothelial Cells: OEC) について、効率のよい誘導法の確立、ならびに品質管理に有用な特性指標を明らかにすることを目的に、血液由来細胞からの分化誘導法と誘導された細胞の特性に関する

る検討を行った。その結果、Thrombopoetin (TPO) が AC133 陽性細胞由来 CD31 強陽性 early EPC の誘導を促進することを見出すと共に、TPO は VEGF とは異なる作用機作により early EPC の誘導を行うことを見出した。また、TPO への反応性や TPO 受容体である Mpl の発現が early EPC の新たな特性指標となる可能性を示した。さらに、OEC 誘導系において、OEC コロニー出現数、増殖、管腔形成能への培地組成の影響を検討して OEC 培養条件の最適化を進めた結果、誘導効率と拡大効率を大幅に改善することができた。さらに、OEC の特性指標の候補となる遺伝子 3 つを見出した。⑥細胞組織利用医薬品の品質特性を網羅的に把握する手法の開発を目的とし、製品のばらつきの所在 (品質特性となりうる生理機能) をトランスクリプトーム解析によって同定する方法の検討を、hMSC を例に行った。GeneChip を用いて複数ロットの hMSC の遺伝子発現プロファイルを測定し、CV 値 (変動係数) の高い遺伝子についてオントロジー解析を行い、ロット間で発現のばらつきの大きいオントロジーを同定した。その結果、試料由来の CV 値が高い遺伝子には細胞分化・発生・免疫反応等のオントロジーと関連するものが多いこと、および試料由来の CV 値の評価には従来とは異なるアーチファクト評価法が必要であることが明らかとなった。また、CV 値の高い遺伝子群により構成される複数のオントロジークラスター間の相関を、多成分解析によって評価する方法を開発した。

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
 川端健二 (独) 医薬基盤研究所

協力研究者

押澤正 国立医薬品食品衛生研究所
 スレッシュ・ティルパッティ 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
 徳田敬代 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
 フラバドゥライザー 国立医薬品食品衛生研究所
 古田美玲 国立医薬品食品衛生研究所
 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所
 小木美恵子 金沢工業大学
 岩田明子 埼玉県赤十字血液センター
 佐藤功栄 埼玉県赤十字血液センター
 穂友絹美代 (独) 医薬基盤研究所
 良正博 (独) 医薬基盤研究所・大阪大学
 櫻井文教 (独) 医薬基盤研究所
 水口裕之 (独) 医薬基盤研究所

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・組織加工医薬品等（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、様々な形で細胞組織利用医薬品の開発が進められ、2007年10月には重症熱傷治療用培養皮膚製品が本邦初の細胞組織利用医薬品として承認されている。

さらには、世界に先駆けて本邦で開発され、再生医療の切り札として期待されているヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）をはじめ、近い将来にはさらに多くの細胞組織利用医薬品が実用化されると見込まれている。しかし、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。

本課題では細胞・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及び細胞のがん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) 免疫原性の新規評価技術の開発、5) 細胞特性指標の探索、6) 細胞組織利用医薬品の製造方法や規格設定の評価手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) ウイルス等感染性因子の高感度検出のための新規ウイルス濃縮法の開発研究として、ポリエチレンジアミンを結合した磁性粒子（PEI ビーズ）

を用いるウイルス濃縮法を開発し、種々のモデルウイルス及びヒト肝炎ウイルス標準品やパネル血漿に適用し、検出感度を定量的 PCR 法や nested PCR 法を用いて評価した。また、ウィンドウ期 B 型肝炎ウイルス（HBV）については抗 HBV 抗体と $ZnCl_2$ による濃縮法の有用性も検討した。

2) 細胞の培養過程における染色体安定性評価に関して、ヒト間葉系幹細胞を例に、大規模 SNP 解析用 GeneChip を用いた解析を行い、Spectro Karyotyping 法による染色体解析の結果と比較する事により、その有用性を検討した。

3) 製造工程由来不純物の一つである N グリコリルノイラミン酸（NeuGc）の高感度定量法を開発し、ウシ胎仔血清（FCS）、ヒト血清添加培地、もしくは無血清培地（ASF104 培地）で培養したモデル細胞に適用した。また、細胞特性を評価するための細胞表面糖鎖プロファイリング法を開発を目的として、nano LC/MS と安定同位体を用いた新規標識法を組み合わせた微量糖鎖の網羅的解析法を開発を行った。

4) 細胞組織利用医薬品の免疫原性試験における血球系ヒト化マウスの開発基盤技術として、改変マウスの効率的作成法の確立を目指した。具体的には、ヒト造血幹細胞に対し、骨髓 niche への接着に関与する分子もしくは造血幹細胞のアポトーシスを防ぐ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ことを試みた。このために、アデノウイルス（Ad）ベクターによる造血幹細胞への高効率遺伝子導入法を開発を行うとともに、それを用いた抗アポトーシス遺伝子の導入の効果を検討した。

5) 血管再生療法での応用が期待されている血管内皮前駆細胞（EPC）について、高効率な誘導法を開発を目的として、臍帯血単核球あるいは AC133 陽性細胞から EPC への分化誘導を促進する因子を探索し、誘導の高効率化を試みた。また、得られた血管内皮前駆細胞に発現しているタンパク質および mRNA のプロファイリングと細胞

機能解析により、特性指標の探索を行った。

6) 細胞組織利用医薬品の恒常的な品質・安全性・有効性を担保するための品質特性指標を、トランスクリプトーム解析によって同定する方法の開発を行った。

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

C型肝炎ウイルス (HCV) の標準品としては第1次国内標準品 (genotype HCV-1b, 力価: 100,000IU/ml) を用いた。HCV ジェノタイプパネルは BBI Diagnostics 社から入手した Worldwide HCV Performance Panel (WWHV 302) の中の 10 種類の検体を用いた。HCV のセロコンバージョンパネルは ZeptMetrix 社より入手した Anti-HCV Seroconversion Panel (HCV 6225, Donor No. 62999)を用いた。

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) 及び国内で樹立された HBV 標準パネル血漿の中の 15 種類の検体を用いた。

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 $0.8 \mu\text{m}$) 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 PEI ビーズによる濃縮は、ウイルス液 (パネル血漿) 1mL に PEI ビーズ溶液 $100 \mu\text{L}$ (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ウイルス液 (パネル血漿) 0.1ml 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 $0.22 \mu\text{m}$) を用いて除去した。ウイルス液として、HCV ジェノタイプパネルは、パネル血漿 0.1ml をヒト血漿 4ml で希釈したものを使用した。HCV セロコンバージョンパネルは、パネル血漿 0.9ml を PEI ビーズで濃縮し、未濃縮コントロールとしてパネル血漿 0.09ml を使用した。HBV のパネル血漿は、乳糜の影響を除くため、遠心ろ過フィルター (孔径 $0.22 \mu\text{m}$) に通したものと通していないものを用い、各 1ml から濃縮し、コントロールとして同じ処理を行ったもの 0.1ml を使用した。ゲノムコピー数定量用のスタンダードとして、HBV または HCV の国内標準品 0.1ml からスマイテスト EX-R&D でウイルスゲノムを抽出したものを用いた。

B-1-3 HBV の ZnCl_2 による濃縮

HBV パネル血漿 1ml に抗 HBV 抗体 (HBV PreS 抗原をウマに免疫して得た血清よりアフィニティー精製したもの) $4 \mu\text{l}$ を添加後、の 1.1M の ZnCl_2 を $20 \mu\text{l}$ 加えて $10,000\text{rpm}$ で 10 分間遠心した。得られた沈殿から、スマイテスト EX-R&D を用いてウイルスゲノムを抽出した。

B-1-4 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) $50 \mu\text{L}$ に溶解し、そのうちの $10 \mu\text{L}$ 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。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。ウイルスの検出に用いたプライマー、プローブの組み合わせを以下に示す。

HBV : F-Primer: 5'-GGA CCC CTG CTC GTG

TTA CA-3'

R-Primer: 5'-GAG AGA AGT CCA CCM CGA
GTC TAG A-3'

Probe: 5'-FAM-TGT TGA CAA RAA TCC TCA
CCA TAC CRC AGA-TAMRA-3';

HCV : F-Primer: 5'-TGC GGA ACC GGT GAG
TAC A-3'

R-Primer: 5'-CTT AAG GTT TAG GAT TCG
TGC TCA T-3'

Probe: 5'-FAM-CAC CCT ATC AGG CAG TAC
CAC AAG GCC-TAMRA-3'

B-2 細胞の同一性や遺伝的安定性評価手法の開発 及び細胞のがん化予測指標の探索に関する研究

B-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) およびヒト骨格筋筋芽細胞 (HSMM) を使用した。hMSC は2継代目にて入手後、間葉系幹細胞培養用基本培地培地 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。

HSMM 細胞は、2継代目にて入手後、骨格筋細胞基本培地 (SkBM®-2) に骨格筋細胞添加因子セット-2 (SkGM®-2 SingleQuots®, FBS 含有) を添加し、50-70%コンフルエントの状態にて継代を続けた。

B-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。また一部 DNA の抽出には市販の QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) を使い、プロトコールに従って行った。

B-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。

B-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。

B-2-5 チップへのハイブリと、染色、洗浄およびシグナル検出

チップへのハイブリダイゼーションは、55 度にて一晩行い、ハイブリ溶液を除いた後、発現解析用チップと同様に Affymetrix 社の GeneChip 用フルイディックステーションにて洗浄および、ストレプトアビジン・フィコエリスリンによる蛍光ラベル化を行った後、GeneChip 専用スキャナーにてスキャンを行い、チップの蛍光イメージを取得した。

B-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-2-7 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-2-8 間期核の FISH 解析

昨年度の検討で染色体異常が認められた hMSC のカルチャーについて、凍結保存していた各種継代数の凍結細胞を用いてスライド標本作製し、以下に示した各種 FISH プローブを用いて、染色体の数的異常の出現時期に関する検討を行った。

(Cambio)

- Star*FISH Human Specific-Centro Probes Cy3 Chromosome 7
- Star*FISH Human Specific-Centro Probes FITC Chromosome 8
- Star*FISH Human Specific-Centro Probes Cy3 Chromosome 17

(Vysis)

- CEP7 Spectrum Orange
- CEP8 Spectrum Green
- CEP17 Spectrum Orange

各セントロメア FISH プローブを、プロトコールに従ってハイブリ後、DAPI にて核を染色し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

B-2-9 Agilent カスタム CGH アレイを用いた 17

番染色体特異的 CGH 解析

本研究所、変異遺伝部にて作製された 17 番染色体特異的 CGH アレイ(Agilent)を使用し、異常の見られた hMSC 細胞由来の DNA を用いて、標準プロトコールに従って解析を行った。概要は、ゲノム DNA を RsaI にて消化後、ランダムプライマーを用いた PCR により Cy3 および Cy5-dUTP ラベルを行った。反応液を Microcon YM-30 カラムにて精製後、専用のハイブリチャンバー内にて 60°C、40 時間ハイブリを行った。そして、バッファーにて洗浄後乾燥させ、GenePix 4000B スキャナーにてシグナルを読み取り、CGH Analytics software (Agilent) にて解析を行った。なお、コントロールとして、市販のヒトリファレンス DNA (Promega) を用い、競合的にハイブリさせた。

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 細胞及び試薬

モデル細胞として Rapid Growth HL-60 細胞 (HL-60RG, ヒト前骨髄性白血病細胞)はセルバンク (JCRB, Osaka, Japan) より供与された。PHN 及び重水素標識 PHN (d5-PHN) は、Sigma (Mo, USA) 及び大塚製薬 (Tokyo, Japan) からそれぞれ購入した。ウシ胎仔血清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 (Sigma) 及び ASF104 培地は Sigma 及び味の素 (Tokyo, Japan)より購入した。標準ジシアリル 2 本鎖糖鎖 (A2F Glycan) 及び高マンノース型糖鎖 (MAN-9) は Ludger (Oxford, UK) より購入した。N-アセチルガラクトサミンは Sigma から購入した。

B-3-2 細胞培養

HL-60RG 細胞は 10%FCS、ペニシリン (100unit/ml)、ストレプトマイシン(100µg/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、その約 2×10⁵

個ずつの細胞をウシ血清及びヒト血清 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-3-3 膜画分の調製

洗浄済み細胞 (1×10^7 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 μ l, 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, 600 \times g, 10 分) により除去した後、細胞膜画分を超遠心分離 (4°C, 100,000 \times g, 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 μ l, pH 7.4) 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。得られた沈殿に残存する酢酸アンモニウムは Speed Vac により除去した。

B-3-4 膜タンパク質の還元アルキル化及び糖鎖の切り出し

1×10^7 個の HL-60RG 細胞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 μ l, 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, 600 \times g, 10 分) により除去した後、超遠心分離 (4°C, 100,000 \times g, 60 分) により細胞膜を含む画分を沈殿させた。沈殿物は 150 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (100 μ l, pH 7.4) 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。得られた沈殿に残存する酢酸アンモニウムは Speed Vac により除去した。乾燥させた沈殿物を 500 μ l の 8 M グアニジン-HCl / 0.5 M Tris-HCl (pH 8.6) に溶解させた。この溶液に 20 μ l の 1 M dithiothreitol (DTT, Sigma, 終末 40 mM) を加えて 65 °C で 30 分間、遮光下で加熱し、タンパク質を還元した。次いで、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 分間反応させて、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。pH が 7.0 付近であることを確認した後、10 unit の Peptide-N-glycosidase F (PNGase F, Roche, Germany) を加えて、37°C で 4 日間反応させて、N-結合型糖鎖を切り出した。反応溶液に、冷エタノール (終末 70%) を加えて、-20°C で 2 時間インキュベートした後、遠心分離 (4°C, 8,500 \times g, 15 分) によりタンパク質を沈殿させた。遊離した N-結合型糖鎖を含む上清を、Speed Vac により乾燥させた。残渣を H₂O に再溶解させた後、溶液中の糖鎖を ENVI Carb C カートリッジ (Supelco, PA, USA) を用いて精製した。

B-3-5 糖鎖の PHN 標識

1×10^7 個の HL-60RG 細胞由来 N-結合型糖鎖を、1.5 ml のガラスチューブに移し、Speed Vac. を用いて乾燥させた後、45 μ l の反応溶媒を加えて、糖鎖を完全に溶解した。反応溶媒として、有機塩基 (窒素複素環またはアルキルアミン)、酢酸及び H₂O の混合溶液を使用した。反応溶液に 5 μ l の PHN を加えて、室温または 80°C でインキュベートし、PHN 糖鎖を調製した。反応終了後、反応液を 0.1% ギ酸溶液を用いて 25 倍に希釈して、試料溶液とした (8×10^4 個細胞/ μ l)。

B-3-6 LC/MS

Nano LC は NanoFrontier nLC (HITACHI, Japan) を使用し、カラムはグラファイトカーボンカラム (Hypercarb, 0.075 \times 150mm, 5 μ) を用いた。溶離液として、2% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム溶液 (pH 9.6, A 溶媒) 及び 80% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム溶液 (pH 9.6, B 溶媒) を使用した。PHN 糖鎖は流速 200 nl、2-90%B 緩衝液 (60 分) のグラジエント条件で溶出した。MS 装置はナノエレ

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-FTICRMS) 装置 (LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific, CA, USA) を使用し、ポジティブイオンモードで測定した。キャピラリー温度は 275°C、スプレー電圧は 2.5kV、スキャン範囲は m/z 700-2,000 に設定した。MSⁿ の衝突エネルギー (コリジョンエネルギー) は 35% に設定した。一回に 5 μ l (4×10^5 個細胞) の試料溶液を LC/MS に注入した。

B-4 免疫原性の新規評価技術の開発

B-4-1 抗アポトーシス遺伝子発現 35 型 Ad ベクターの作製

35 型 Ad ベクターの作製は improved in vitro ligation 法により行った。Cytomegarovirus enhancer/chicken β -actin promoter (CA) プロモーターを含むシャトルプラスミド pHMCA5 のマルチクロニングサイトに抗アポトーシス遺伝子として Bcl-xL 遺伝子 (日本医科大学・太田成男先生より供与) を挿入した pHMCA-BclxL を I-CeuI, PI-SceI で消化し、同酵素で消化した 35 型 Ad ベクタープラスミド pAdMS18 と Ligation することにより、Bcl-xL 発現ベクタープラスミド pAdMS18-BclxL を得た。作製したプラスミドを SbfI で消化し、Superfect (キアゲン社) を用いて 35 型 E1B 発現 293 細胞にトランスフェクションすることで Bcl-xL 発現 35 型ベクター Ad35-BclxL を得た。Ad ベクターの増幅ならびに精製は定法に従い行った。精製した Ad ベクターの物理化学的力価ならびに生物学的力価は Maizel らの方法に従い測定した。その他、Bcl-xL の活性増強変異体である Bcl-FNK (日本医科大学・太田成男先生より供与) 発現 35 型 Ad ベクターについても上記と同様に作製した。

B-4-2 抗アポトーシス遺伝子の発現解析

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 陽性細胞に対し、各種 35 型 Ad ベクターを 6000 VP/cell で作用させ、48 時間培養した後、細胞を回収した。細胞を Lysis buffer で溶解した後、遠心し上清を回収、タンパク濃度を定量した。10 μ g/lane で 12.5% アクリルアミドゲルを用いて泳動し、抗 Bcl-xL 抗体 (500 倍希釈、Trevigen 社より入手) を用いて定法に従い検出した。

B-4-3 抗アポトーシス遺伝子導入細胞の増殖に関する検討

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に対し、上記と同様に 6000VP/cell で 35 型 Ad ベクターを 6 時間作用させた。遺伝子導入より 2、4、6、8 日後、細胞を回収し、細胞数を Nucleocounter (Chemometec 社より入手) を用いて測定した。また、細胞数計測時に等量の新鮮培地を加えた。

B-4-4 抗アポトーシス遺伝子導入細胞の抗アポトーシス能に関する検討

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に対し、上記と同様に 6000VP/cell で 35 型 Ad ベクターを 6 時間作用させた。6 日間培養後、細胞を回収し、各濃度の Camptotecin (Sigma 社より入手) を含む培地で培養した。培養 48 時間後、生存率を Trypan blue exclusion assay を用いて測定した。

B-4-5 抗アポトーシス遺伝子導入細胞の分化

能・増殖能に関する検討

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に対し、上記と同様に 6000 VP/cell で 35 型 Ad ベクターを 6 時間作用した。35 型 Ad ベクター作用 2 日および 8 日後、細胞を回収、洗浄した。細胞数を計測したのち、Methocult (H4344、Stemcell 社より入手) を用いて 2000 cells/dish で Colony assay を行った。細胞播種 14 日後、顕微鏡下コロニーを観察した。

B-4-6 免疫不全マウスへの移植実験

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に対し、Bcl-FNK 発現 35 型 Ad ベクターを 6000 VP/cell で 6 時間作用させたのち、計 48 時間培養した。細胞回収後、一回洗浄したのち、2.4Gy で放射線照射した NOG マウス (NOD/Shi-scid, IL-2RgKO, 実験動物中央研究所より入手) に 1×10^5 cells を尾静脈より移植した。移植より 20 週後、マウスを解剖し骨髄、脾臓、胸腺、末梢血より血液細胞を回収した。細胞を溶血処理したのち、各種抗体で染色し各種細胞表面マーカーの発現を FACS Canto (BD Biosciences 社より入手) を用いて解析した。使用した抗体は以下の通りである。PE-Cy7 標識 anti-mouse CD45 (30-F11), FITC 標識 anti-human CD45 (HI30), APC 標識 anti-human CD3 (UCHT1), PE 標識 anti-human CD56 (MEM-188), PE 標識 anti-human CD19 (HIB19), APC 標識 anti-human CD10 (HI10a), APC 標識 anti-human CD33 (WM53), PE 標識 anti-human CD4 (RPA-T4), PE-Cy7 標識 anti-human CD8 (RPA-T8), APC 標識 anti-human CD34 (581), PE 標識 anti-human CD38 (HIT2)。

B-5 細胞特性指標の探索

B-5-1 試薬

TPO は、キリン・アムジェン社より提供された。VEGF は、Strathmann Biotec 社より得た。AC133 細胞分離キット、抗 CD133/2 抗体・フィコ

エリスリン (PE) は Milteny Biotec から購入した。抗 CD110 (TPO レセプター) 抗体・アロフィコシアニン (APC)、抗 CD31 抗体・フルオレッセインイソチオシアネート (FITC) あるいは PE、抗 CD34 抗体・FITC、抗 CD45 抗体・FITC、抗 STAT3 抗体、抗リン酸化 Akt (Ser473) 抗体・APC は、BD Biosciences PharMingen より得た。抗 VEGF 受容体-2 (VEGFR-2/Flk-1/KDR) (Santa Cruz Biotechnologies 社) と抗ヒト内皮 NO 合成酵素 (eNOS) 抗体 (Cayman Chemical) を用いた。抗リン酸化 Akt (Ser473) 抗体、抗-Akt 抗体、抗リン酸化 STAT3 (チロシン 705) 抗体は、Cell Signaling Technology から求めた。フィブロネクチン (FN) -、IV 型コラーゲン・コートプレートは、イワキ社から購入した。抗 CD14 抗体・PE は、Dako Cytomation から得た。

B-5-2 単核球細胞の分離

インフォームドコンセントを得て採取された臍帯血は、東京赤十字血液センター、臍帯血バンクより提供された。末梢血バフィーコートは、埼玉赤十字血液センターより提供された。

血液サンプルは、2mM の EDTA を含むリン酸緩衝食塩水 (PBS) で希釈し、リンフォプレップチューブ (Axis-Shield PoC AS) (密度=1.077) に充填し、800g、18°C、20 分の遠心により、単核球細胞を集めた。細胞を磁気ビーズで標識する場合は、分画用溶液 {2mM の EDTA、0.5% のウシ血清アルブミン (BSA) ・PBS} で洗浄した。

B-5-3 AC133 陽性細胞の分離

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を用い抗 AC133 抗体・マイクロビーズと 4°C、30 min で反応させた。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 を含む EBM-2 培地に浮遊させ培養した。FN コートディッシュは蛍光免疫染色による接着細

胞の解析用に、IV型コラーゲンコートディッシュはフローサイトメーターの解析用に用いた。

B-5-4 フローサイトメーターによる解析

細胞を回収し、洗浄後、抗 CD31 抗体-FITC あるいは PE、抗 CD14 抗体-FITC、抗 CD45 抗体-FITC、抗 CD110 (TPO 受容体)抗体-APC、抗 CD133/2 抗体-PE、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。すべての細胞は 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、除去した。細胞内のリン酸化 Akt の解析は、細胞を固定・浸透化した後、免疫染色した。

B-5-5 臍帯血と末梢血の CD31 強陽性・陽性細胞における各種サイトカインの産生

培養 1 週間後の AC133 陽性細胞を抗 CD31 抗体-FITC で免疫染色後、FACS Aria (BD Biosciences) 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 の冷凍庫に保存した。サイトカインの測定は Bio-Plex サイトカインアッセイの方法に従った。

B-5-6 接着細胞の免疫染色

FN コートディッシュ上で AC133 陽性細胞を 2 週間培養後、細胞層を PBS で 3 回洗った。冷却したエタノール (-20°C) で固定後、細胞層を PBS で 3 回洗った。1% BSA を用いて細胞を 4°C 、1 時間、ブロッキングした。次に 4°C 、1 時間、それぞれの第 1 抗体でインキュベートした。PBS で洗浄後に、 4°C 、1 時間、抗マウス IgG 抗体-FITC または抗ウサギ IgG 抗体-Rhodamin でインキュベートした。PBS で洗浄後、Zeiss LSM 510 を用いて解析した。

B-5-7 細胞の可溶化サンプルの作成とイムノブロット

AC133 陽性細胞を、20%FBS-EBM2 培地に浮遊 3 日間培養し、細胞を集め、1% BSA-EBM2 培地中に 1-3 時間、培養し、血清の影響を除いた。細胞 (1×10^6) を、50ng/ml の TPO、50ng/ml の VEGF または両者で刺激した後、回収した。細胞は 1/100 (v/v) 蛋白質分解酵素阻害薬カクテルと 1/100 (v/v) ホスファターゼ抑制薬カクテル (Sigma Chemical) を含む可溶化バッファー(1% トリトン X-100、10mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、pH 7.5、1mM EDTA、5mM EGTA、10mM MgCl_2 、50mM β -グリセロリン酸)で溶解した。サンプルはウェスタンブロットにより解析した。

B-5-8 OEC の誘導

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, \pm hydrocortisone, \pm heparin) に懸濁し、FN コート 6well 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、 1×10^7 cells/well 程度とした。通常は、培養開始 1 日後に、培地を除いて PBS(-) で 1 回 wash し、新鮮培地を添加した。その後、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。顕微鏡による観察で OEC のコロニー数を計測し、光顕画像を撮影した。

B-5-9 マトリゲルを用いた管腔形成アッセイ

BD 社より購入したマトリゲルを氷上で一晩かけて融解し、冷却した 24 穴プレートに 300ul/well 分注した。 37°C のインキュベーター中に 30 分静置してゲル化させた。10cm ディッシュで培養していた OEC をトリプシンを用いて回収し、血清入り培地で洗浄した後、5%FCS を含む EBM-2 (増殖因子の添加なし) に懸濁した。マトリゲルをゲル化させた well に 1×10^5 個の細胞を播種し、 37°C の CO_2 インキュベーターで一晩培養した。形成された管腔の写真有位相差顕微鏡 Axiovert2000 で撮影した。一部の実験では、マト

リゲル中の増殖因子含量を低下させた Growth Factor Reduced (GFR) マトリゲルを用いた。各細胞の管腔形成能は、顕微鏡写真 1 視野 (2.35mm²)にある tube の長さ和本数を顕微鏡画像解析ソフト AxioVision を用いて測定することにより定量化した (n=4)。

B-5-10 OEC 特性指標の探索

特定の細胞あるいは情報伝達経路に関わる遺伝子 84 個の発現プロファイルを 1 枚の PCR プレートで測定することのできる Super Array 社の RT2 Profiler PCR Array を用い、血管内皮細胞の機能に関わると考えられている遺伝子の発現プロファイルを行った。Real-Time PCR の装置は ABI7000 を用いた。βアクチンを内部標準として、各遺伝子について βアクチンとの Ct 値の差を求め、 $2^{-\Delta Ct}$ を各遺伝子と βアクチンの発現量の比とした。HUVEC をコントロールとして、OEC における各遺伝子の発現量を比較した。各細胞について 3 枚のプレートを用いて解析した。プレート間での反応の一定性は、各プレートに 3well 設けられている Positive PCR Control (PPC) の Ct 値から判断したが、全てのプレートで threshold を一定にしたとき、PPC の Ct 値は全てのプレートを通じて一定していた (20.63 ± 0.19)。

B-6 細胞組織利用医薬品の製造方法や規格設定の評価手法の開発に関する研究

B-6-1 細胞の培養

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)はLonza社(旧Cambrex)より購入した。購入した細胞のロットは4F1127、4F0312、5F0138、4F1560、4F0591、4F0760の6種類であった。hMSCは製造者指定のプロトコールに従い、2% L-グルタミンおよび0.1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む専用増殖培地 (MSCGM, Lonza社) 中、炭酸ガス濃度5%、温度37°Cで培養した。細胞の継代も製造者指定のプロトコールに従った。

B-6-2 培養細胞からのtotal RNAの抽出

直径10cmの細胞培養用ディッシュに蒔いた継代数7または9のhMSCを、600mlのRLTバッファ (QIANEN) で溶解し、QIAshredder (QIAGEN) を用いてホモゲナイズしたのち、total RNAをRNeasy mini kit (QIAGEN)を用いて抽出した。total RNAはDEPC処理を施した蒸留水に溶解した。

B-6-3 トランスクリプトーム解析

Affymetrix社の2-cycle cRNA合成キットを用い、マニュアルに従って、抽出したtotal RNAサンプル(100 ngまたは1 μg)から逆転写反応によって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Human Genome U133 Plus 2.0 Array (54,613プローブセット/枚)を用いた。蛍光シグナルの値は、Affymetrix社の提供するMSKファイルにリスト化されているプローブセットの蛍光シグナルの平均値によって正規化した。Target Intensityは10,000とした。この際、Scaling Factorは2~3であった。

B-6-4 遺伝子オントロジー解析

GeneChipを用いた実験における測定アーチファクトを考慮に入れた上で、6ロットのhMSC(継代数7)において、発現シグナルの変動係数 (CV値, coefficient of variation=標準偏差/平均値) の大きさが全プローブセット中のトップ1,000位に含まれるプローブセットを抽出、継代数9の細胞についても同様に上位1,000個のプローブセットを抽出した。さらに、継代数非依存的に大きな

ばらつきを示すプローブセットを抽出する目的で、継代数7と9のそれぞれのCV値上位1,000個に共通して含まれるプローブセットを選択した。選択されたプローブセット集団について、GOTM (Gene Ontology Tree Machine; Vanderbilt University; <http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm>) を用いて、有意 ($P < 0.01$) に濃縮される遺伝子オントロジークラスターを探索した。

B-6-5 主成分分析および相関係数算出

GOTM を用いた遺伝子オントロジー解析において有意な濃縮が認められた各遺伝子オントロジークラスターにおいて、属するプローブセットの発現シグナルを標準化した。即ち、各ロットの発現シグナルと6ロットの平均値との差を6ロットの標準偏差で割った商 (z 値) を求めた。各遺伝子オントロジークラスターに属するすべてのプローブセットについて、標準化 (z 値化) された発現シグナルを用いて主成分分析を行った。主成分分析の計算には、SYSTAT J ver10.2 (SYSTAT Software Inc.) を用いた。主成分分析の結果に基づき、6ロットのそれぞれについて第一主成分得点を計算した。これにより、各遺伝子オントロジークラスターについて第一主成分得点からなる1行6列の行列を得た。次に、得られた1行6列の行列について、遺伝子オントロジークラスター間の相関係数 (スピアマン順位相関係数) およびその P 値を計算した。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、Microsoft Excel を用いて行った。有意水準は $P < 0.001$ とした。

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 HCV ジェノタイプパネルの濃縮

使用した HCV ジェノタイプパネルの詳細を Table 1 に示す。これらのジェノタイプと由来の異なる 10 種類のパネル血漿について、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、検体のウイルス量が異なるため、検出されるウイルス量も検体により異なるが、検討した全てのパネル血漿が濃縮可能であることが示された (Fig.1A)。濃縮倍率はパネル ID302-07 (ジェノタイプ 3a) の約 5 倍から、ID302-04 (ジェノタイプ 2a/2c) 及び ID302-10 (ジェノタイプ 4) の約 20 倍までと種類により差が認められたが、少なくとも 5 倍以上の濃縮が可能であった (Fig.1B)。

C-1-2 PEI ビーズによる HCV セロコンバージョンパネルの濃縮

次に、HCV のセロコンバージョンパネルについて、PEI ビーズによる濃縮を試みた。使用したセロコンバージョンパネル血漿の詳細を Table 2 に示す。Fig.2 に示すとおり、 $90 \mu\text{l}$ のパネル血漿からウイルスを直接抽出した場合にはパネル ID12 の 44 日目以降の検体が HCV 陽性と確認された。一方、 0.9ml のパネル血漿について、PEI ビーズを用いて HCV を濃縮すると、直接抽出よりも 6 日早いパネル ID11 の 38 日目の検体も HCV 陽性であることが確認できた。Table 2 に示

すとおろ、Roche 社の HCV monitor 法ではパネル ID11 以降が HCV 陽性と確認されているが、Chiron 社の bDNA 法や PCR RNA quantitative results ではパネル ID12 以降のみ陽性であった。

C-1-3 PEI ビーズによる HBV ジェノタイプパネルの濃縮

HBV の国内ジェノタイプパネルの濃縮に PEI ビーズ濃縮法が適用可能かどうかを検討した。使用した HBV 標準パネル血漿の詳細を Table 3 に示す。これらのパネル血漿について、0.1ml から直接ウイルス DNA を抽出したものとパネル血漿 1ml を PEI ビーズで濃縮したもので回収されたウイルス量を比較したところ、パネルの一部を除き、ほとんど濃縮効果が認められなかった (Fig.3A)。濃縮倍率をみると、ID003, 015, 068, 069 では 4 倍以上に濃縮されたが、その他の試料はほとんど濃縮されなかった (Fig.3B)。血漿中の乳糜の影響を除くため、フィルターろ過を行ってみたが、フィルターにより濃縮効率が改善されたのは ID007 と 015 の 2 種類のみで、フィルターろ過しても回収率は変わらないか、かえって回収率が低下した試料も多く認められた。4 倍以上の濃縮が認められた 4 検体は、いずれもジェノタイプ C の抗体陽性血漿あるいは低濃度キャリア血漿である (Table 3)。その他の検体は全てウインドウ期のものであった。また、抗 HBV 抗体の存在が濃縮の可否に関与している可能性が確認された。

C-1-4 ZnCl₂ と抗 HBV 抗体による HBV ジェノタイプパネルの濃縮

HBV は PEI ビーズ法で濃縮が難しいことから、他の濃縮法の開発を検討した。我々は、既に ZnCl₂ や MnCl₂ など 2 価イオンとスルホン酸磁気ビーズを組み合わせる方法が多くのウイルス濃縮に適用可能であることを報告している (Iwata et al, *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1065, 2003)。これらの方法を準用して、HBV 標準パネル血漿に抗 HBV 抗体を添加後、ZnCl₂ を加え、抗体と結合した HBV

を沈殿として回収することを試みた。その結果、抗体の有無にかかわらず、14 種類のパネル血漿の中で、12 種類の検体は ZnCl₂ と抗 HBV 抗体により効率よく回収された (Fig.4A)。濃縮倍率を求めると、ID007 と 017 以外は、5 倍から 20 倍に濃縮されることが確認された (Fig. 4 B)。

C-2 細胞の同一性や遺伝的安定性評価手法の開発及び細胞のがん化予測指標の探索に関する研究

C-2-1 異常を持つ hMSC 細胞の Agilent CGH アレイを用いた確認

昨年度 SNP チップ解析した hMSC の中に、Fig.5 に示すように 7 番および 17 番染色体に異常をもつロット (#F1460) を見出している。7 番染色体の異常については、マルチカラー-FISH 法による染色体解析の結果から、セントロメア近傍が新たな染色体として 2 本分増加していることがわかった。また、正常な 7 番染色体の片方は、17 番染色体と転座融合しており、転座した 17 番染色体においては、SNP チップによる CGH 解析で、複雑な変化の兆候を示したことから、複雑なリアレンジメントがおきている可能性が示唆された。この 17 番染色体コピー数の変化と、その詳細について検討する目的で、17 番染色体特異的にデザインされたオリゴ CGH アレイを用いて解析を行った。

その結果、Fig.6 に示すように 17 番染色体全体に渡って複数の増減を持つ領域が確認され、17 番染色体においてもコピー数の変化が存在することが明らかとなった。

C-2-2 異なる hMSC ロットおよび HSMM 細胞株における hMSC 細胞の遺伝子安定性に関する検討

培養に伴う染色体変化にどの程度の一般性があるかを調べる目的で、他の hMSC ロットおよびヒト骨格筋筋芽細胞に関しても同様に、培養に伴う染色体コピー数変化を GeneChip SNP 50K アレイを用いて解析した。

その結果として、HSMM での解析例を Fig.7

に示す。リファレンスに用いたデータとの性の不一致により性染色体は差が見られた（ポジコンとなる）が、それ以外の染色体に関してシグナルの変化は認められなかった。また、他の hMSC ロット（#4F1127, 4f0312, 5f0138）に関しても、培養の期間にかかわらず異常を示す細胞は認められなかった（Table 4）。また、SNP データより、ヘテロ接合性の消失（LOH）についても検討を行ったが、有意に LOH を示す例は認められなかった。

C-2-3 FISH 解析による染色体変化の経時追跡

異常が確認されたロット # 4F1560 においては、CGH およびマルチカラー FISH 解析より 7 番染色体のコピー数増加が認められたため、7 番染色体セントロメアプローブと、正常対照として 8 番染色体プローブを用いた 2 重 FISH 染色を長期培養後の 25 継代細胞を用いて解析した（Fig.8）。その結果、予想に反して、7 番染色体のセントロメアは正常の 2 個しか観察されず、異常が見られないことが示唆された。そこで、もうひとつ異常の見られた染色体として 17 番染色体プローブを用いて単独の FISH 解析を行ったところ、ほぼすべての細胞において 3 個以上のシグナルが認められ、異常が観察された。この結果より、詳細は不明であるが、17 番染色体のセントロメアをプローブとして異常細胞を検出できることがわかったため、8 番染色体と 17 番染色体セントロメアプローブによる 2 重 FISH を、凍結保存してあった同一ロットの 12 および 21 継代後の細胞を用いて行った。その結果、Figs.9&10 に示すようなシグナルが得られた。そこで、それぞれ 100 個ずつの間期核細胞を使って解析した結果、Table 5 に示すようなシグナル数が観察された。8 番染色体セントロメア 2 シグナル以下の細胞に関し、3 つ以上の 17 番セントロメアシグナルが得られた細胞および 8 番 3 および 4 シグナルに対し、5 以上の 17 番シグナルを持つ細胞を異常細胞として判定し、その出現頻度を調べた結果、12 継代で 17% および 21 継代で 53% と約半数を占めた。マルチカラ

ー FISH を行った 25 継代の細胞ではほぼすべてに異常が見られたことから、21 継代付近で急激に異常細胞の割合が増加したことが示唆された。これは、細胞の増殖曲線の記録にも反映されており、Fig.11 に示すとおり、異常のあった #4F1450 では、この付近において増殖曲線の傾きが急になっていた。このロットにおいては、比較的長期培養が可能であり、増殖性を獲得した細胞が不死化した可能性も残されている。

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 安定同位体標識法及び LC/MS による糖鎖の比較定量法

これまでに報告された PHN による糖鎖標識法では、 H_2O 、リン酸溶液、及び 10-20% の有機溶媒（メタノール又はアセトニトリル）含有水溶液が反応溶媒として使用されている。しかし、その標識効率は詳細に検討されていない。そこでまず、従来法による糖鎖の標識効率を検討したところ、いずれの溶媒を用いても加熱しなければ 90% 以上の標識効率が得られないことが明らかとなった。しかし、細胞又は組織由来糖鎖は、シアル酸が付加しているため、加熱処理を行うと多くのシアル酸が遊離してしまう危険性がある。従って、シアル酸を含む糖鎖構造を解析するためには、加熱処理はなるべく避けることが望ましい。次に、中性付近で加熱せずに標識可能な標識条件を検討した。その結果、有機塩基、酢酸及び H_2O の混合液を用いることによって中性条件下、室温で、90%以上の収率で PHN 糖鎖が得られることが明らかとなった。そこで本研究では、PHN と糖鎖の反応はすべて有機塩基/酢酸/ H_2O の混合液中で行なった。

Fig.12A は、標準ジシアリル 2 本鎖糖鎖（モノアイソトピック質量、2368.837 Da）を d_5 -PHN 及び d_0 -PHN で標識して、等量混合物の LC/MS により得られたトータルイオンクロマトグラム（TIC）である。Fig.12B には 41.65 分に検出された

ピーク (peak A) のマススペクトルを示した。同位体イオンの間隔が 0.5 マスユニットであることから、2 価イオンであることが確認できた。 d_0 -PHN 糖鎖 (モノアイソトピック質量, 2458.895 Da) のモノアイソトピック 2 価イオンが m/z 1230.51 であり、また d_5 -PHN 糖鎖 (モノアイソトピック質量, 2463.935 Da) のモノアイソトピック 2 価イオンは m/z 1233.01 に観測された。尚、 m/z 1230.5 と 1233.0 のシグナル強度が 1 : 1 ではないのは、 d_5 -PHN の純度 (57%) が原因である。Fig.12C 及び 12D は d_0 -PHN 糖鎖及び d_5 -PHN 糖鎖の分子イオン $[M + 2H]^2+$ (m/z 1230.5 及び m/z 1233.0) のマスクロマトグラムである。Fig.13 は d_0 -PHN 糖鎖の MS/MS スペクトルである。最も強く検出された m/z 657 は、シアル酸 (NeuAc)、ガラクトース (Gal) 及び N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) からなる B_3^+ イオンである。NeuAc-Gal-GlcNAc が解離した分子に相当する Y_4^+ イオン、及び Y_4^+ イオンから 1 分子の NeuAc が解離した B_6^+/Y_4^+ イオンは、それぞれ m/z 1804 及び m/z 1347 に検出された。一方、 Y_1^+ イオンに相当する m/z 458 が検出されたことから、還元末端 GlcNAc にフコース (Fuc) が付加していることが確認された。これらの結果から、 d_5 -PHN を用いる糖鎖の同位体標識法と LC/MS を組み合わせることで d_0 -PHN 及び d_5 -PHN 糖鎖のシグナル強度の比較による定量解析と、MS/MS による構造解析が可能であることが実証された。

以上のように、本分析法は PHN の重水素置換体を標識試薬として使用することで、還元操作をすることなく、簡便かつ迅速に糖鎖の比較定量が可能であることが実証された。

C-3-2 条件の異なる培地で培養した HL-60RG 細胞膜画分の比較定量解析

再生医療における課題の一つとして、培養に使用する血清の問題がある。そこで、我々はウシ胎仔血清 (FCS)、ヒト血清 (HS) 添加培地、及び無血清 (serum free) 培地で培養した細胞の膜画分か

ら N-結合型糖鎖を調製し比較定量解析を行った。FCS 添加培地及び無血清培地で培養した細胞由来糖鎖を d_0 -PHN で、HS 添加培地で培養した細胞由来糖鎖を d_5 -PHN でそれぞれ標識した (Fig.14)。

C-3-2-1 FCS 及び HS 添加培地で培養した細胞由来糖鎖の比較定量解析

Fig.15 は、FCS 添加培地で培養した細胞から調製した d_0 -PHN 糖鎖、及び HS 添加培地で培養した細胞から調製した d_5 -PHN 糖鎖の混合物の LC/MS により得られた TIC である。赤いラインはポジティブ、また青いラインはネガティブイオンモードで測定した結果である。糖鎖由来のイオンは、矢印で示した約 35~50 分の位置に溶出されていた。また、各糖鎖の構造は、MS/MS 及び MS/MS/MS スペクトルのフラグメントイオンの帰属により推定した。

Fig.16A は、ポジティブイオンモードで測定した高マンノース型糖鎖 ($Hex_{9,5}HexNAc_2$) のマスクロマトグラムである。約 35 分~42 分付近に Man-8, Man-9, Man-7, Man-6 及び Man-5 の順で溶出された。HS 添加培地で培養した細胞と比較して FCS 添加培地で培養した細胞では、増 Man-9, Man-7, Man-6, Man-5(1) 及び Man-5(2) 増加していることが明らかとなった。FCS 添加培地で培養した細胞の Man-5(1) は 1.97 倍に増加しており、最も増加した糖鎖であった。また Man-9, Man-7, Man-6 及び Man-5(2) も、1.62, 1.72, 1.38 及び 1.52 倍にそれぞれ増加していた。一方、FCS 添加培地で培養した細胞の Man-8 は、HS 添加培地で培養した細胞の 79% に減少していることが明らかとなった (Fig.16B)。

Fig.17A は、ポジティブイオンモードで測定した側鎖が不完全な糖鎖 (低分子量糖鎖) のマスクロマトグラムである。低分子量糖鎖は約 38 分~42 分に溶出された。約 38 分に溶出された糖鎖は、非還元末端にガラクトースが付加していない 2 本鎖糖鎖 (アガラクトシル糖鎖, $dHex_1Hex_3HexNAc_4$) であった。41~42 分に溶出

された糖鎖は、アガラクト糖鎖から1及び2分子のGlcNAcが欠損したパウチマンノース型糖鎖と呼ばれる糖鎖(dHex₁Hex₃HexNAc₃, dHex₁Hex₃HexNAc₂)、さらにトリマンノシルコアのマンノースが1分子欠損した糖鎖(dHex₁Hex₂HexNAc₂)であった。FCS添加培地で培養した細胞由来dHex₁Hex₂HexNAc₂は、HS添加培地で培養した細胞の1.04倍であり、変化はみられなかった。一方、FCS添加培地で培養した細胞のdHex₁Hex₃HexNAc₂, dHex₁Hex₃HexNAc₃及びdHex₁Hex₃HexNAc₄は、HS添加培地で培養した細胞の1.90, 2.01及び1.64倍に増加していた(Fig.17B)。

Fig.18Aは、ポジティブイオンモードで測定した2本鎖糖鎖のマスキロマトグラムである。約35分付近には、還元末端のGlcNAcにフコース(コアフコース)、非還元末端に2分子のシアル酸、1分子のGlcNAcが付加した糖鎖(dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₂)が溶出された。36分付近には、コアフコース、非還元末端に1または2分子のシアル酸が付加した糖鎖(dHex₁Hex₅HexNAc₄NeuAc_{1,2})が溶出された。37分付近の糖鎖は、コアフコース、非還元末端に1分子のシアル酸及びGlcNAcが付加した糖鎖(dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₁)であった。FCS添加培地で培養した細胞由来のdHex₁Hex₅HexNAc₄NeuAc₂及びdHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₂は、HS添加培地で培養した細胞と比較して1.09倍で変化はみられなかった(Fig.18B)。一方、dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₁及びdHex₁Hex₅HexNAc₄NeuAc₂はそれぞれ1.32及び1.59倍に増加しており、FCS添加培地で培養した細胞で増加していることが明らかとなった。

Fig.19Aは、ネガティブイオンモードで測定した3及び4本鎖糖鎖のマスキロマトグラムである。糖鎖は35~38分付近に溶出されていることが明らかとなった。全ての糖鎖に、コアフコースが付加していた。35分付近の糖鎖は、2または3分子のシアル酸が付加した3本鎖糖鎖

(dHex₁Hex₆HexNAc₅NeuAc₂, dHex₁Hex₆HexNAc₅NeuAc₃)、4分子のシアル酸が付加した糖鎖(dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuAc₄(1, 2))、さらにテトラシアロ4本鎖糖鎖の非還元末端に1分子のHexNAcが付加した糖鎖(dHex₁Hex₇HexNAc₇NeuAc₄)であった。36~37分付近に溶出された糖鎖は、3分子のシアル酸が付加した4本鎖糖鎖(dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuAc₃)、2~4分子のシアル酸及び1分子のラクトサミンが付加した4本鎖糖鎖(dHex₁Hex₈HexNAc₇NeuAc₄)、及び2~4分子のシアル酸、1分子のラクトサミン、1分子のHexNAcが付加した4本鎖糖鎖(dHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₄)であった。FCS添加培地で培養した細胞のdHex₁Hex₆HexNAc₅NeuAc₂は、HS添加培地で培養した細胞と比較して1.12倍に増加していたが、他の3及び4本鎖糖鎖は全て減少していた。特に最も高分岐化したと考えられるdHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₄は、HS添加培地で培養した細胞由来糖鎖の21%に減少していることが明らかとなった(Fig.19B)。また4本鎖糖鎖はdHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₂を除いて(FCS/HS=0.77)、いずれも50%以下に減少しており高分岐化した糖鎖は、FCS添加培地で培養すると減少する、即ちHS添加培地で高分岐糖鎖が増加することが明らかとなった。

FCS及びHS添加培地で培養した細胞膜糖鎖の比較定量解析の結果、FCS添加培地で培養することによって、高マンノース型糖鎖、低分子量糖鎖及び2本鎖糖鎖は増加することが示唆された。一方、3及び4本鎖糖鎖は減少することが示された(Fig.20)。

C-3-2-2 無血清培地で培養した細胞及びHS添加培地で培養した細胞の比較定量解析

Fig.21は、無血清培地で培養した細胞及びHS添加培地で培養した細胞からそれぞれ調製したd₀-PHN糖鎖及びd₅-PHN糖鎖の混合物のLC/MSにより得られたTICである。糖鎖由来のイオンは、矢印で示した約35~50分の位置に溶出されてい

た。また、各糖鎖の構造は、MS/MS 及び MS/MS/MS スペクトルのフラグメントイオンの帰属により推定した。

Fig.22A は高マンノース型糖鎖のマスキロマトグラムである。検出された糖鎖は、Man-9~Man-5 であり、いずれも d₀-及び d₅-PHN 糖鎖に共通して検出された。HS 添加培地で培養した細胞と比較して、無血清培地で培養した細胞で最も変化した高マンノース型糖鎖は Man-9 であり、2.43 倍に増加していた。また Man-7, Man-6 及び Man-5 (1,2) も、それぞれ 1.57, 1.76, 1.55 及び 1.54 倍に増加していた。一方、無血清培地で培養した細胞の Man-8 は、HS 添加培地で培養した細胞とほぼ等量であった (serum free / HS = 0.97) (Fig.22 B)。

Fig.23A は、低分子量糖鎖のマスキロマトグラムであり、アガラクト糖鎖 (dHex₁Hex₃HexNAc₄)、アガラクト糖鎖から 1 分子の GlcNAc が欠損した糖鎖 (dHex₁Hex₃HexNAc₃) 及び パウチマンノース型糖鎖 (dHex₁Hex₃HexNAc₂ 及び dHex₁Hex₂HexNAc₂) が検出された。最も変化した糖鎖は dHex₁Hex₃HexNAc₃ であり、無血清培地で培養した細胞で、HS 添加培地で培養した細胞の 3.06 倍に増加していた (Fig.23B)。また dHex₁Hex₂HexNAc₂、dHex₁Hex₃HexNAc₂ 及び dHex₁Hex₃HexNAc₄ も無血清培地で培養した細胞で、1.30, 2.14 及び 2.22 倍にそれぞれ増加しており、血清を除いた培地で HL60-RG 細胞を培養すると低分子量糖鎖が増加することが示唆された。

Fig.24A は、2 本鎖糖鎖のマスキロマトグラムである。無血清培地及び HS 添加培地で培養した細胞に共通して dHex₁Hex₅HexNAc₄NeuAc_{1,2}、dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₂ 及び dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₁ が検出された。Fig.24B に示したように、dHex₁Hex₅HexNAc₄NeuAc_{1,2} 及び dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₂ は、無血清培地で培養した細胞でそれぞれ 98%、90% 及び 80% にそれぞれ減少していた。一方、dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₁ は、HS 添加培地で培養した細胞由来糖鎖の 1.92 倍に増加していることが明らかとなった。そこで、

この糖鎖(糖鎖(a))の MS/MS スペクトルのフラグメントイオンの帰属により糖鎖構造を推定した。Fig.25 は、dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₁ の MS/MS スペクトルである。B₃⁺ イオン (NeuAcHexHexNAc⁺, m/z 657) 及び、B₂⁺ イオン (NeuAcHex⁺, m/z 454) が検出されたことから、シアル酸は Gal に結合していることが示唆された。また、B₄⁺ イオン (NeuAcHexHexNAcHex⁺, m/z 819)、及び B₄⁺ イオンに 1 分子の HexNAc が付加したフラグメントイオン (m/z 1022) から、この糖鎖はシアル酸が付加した側鎖にもう 1 分子 HexNAc が結合した糖鎖であり、バイセクテッド糖鎖(トリマンノシルコアの還元末端 Man に GlcNAc が付加した糖鎖)ではないことが明らかとなった。また dHexHexNAc-PHN⁺に相当する Y₁⁺ イオンが m/z 458 に検出されたことから、還元末端の GlcNAc に Fuc が付加していることが明らかとなった。これらの結果から、この糖鎖は、Fig.15 挿入図 に示したように、非還元末端にシアル酸及び HexNAc が結合した側鎖を持ち、コアフコースが付加した 2 本鎖糖鎖、あるいは Hex-HexNAc の繰り返し構造の非還元末端にシアル酸が結合した側鎖とコアフコースを持つ 2 本鎖糖鎖であることが示唆された。無血清培地で培養した細胞由来の 2 本鎖糖鎖は、dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₁ のみ増加していたが、他の糖鎖はいずれも減少しており、無血清培地で培養した細胞由来糖鎖のプロファイルは血清添加培地で培養した細胞とは異なることが明らかとなった。

Fig.26A は 3 及び 4 本鎖糖鎖のマスキロマトグラムである。無血清培地で培養した細胞由来の 3 及び 4 本鎖糖鎖は、dHex₁Hex₆HexNAc₅NeuAc₂, dHex₁Hex₆HexNAc₅NeuAc₃, dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuAc₃, dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuAc₄(1,2), dHex₁Hex₇HexNAc₇NeuAc₄, dHex₁Hex₈HexNAc₇NeuAc₂₋₄, dHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₂, dHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₃(1,2),