

dHex<sub>1</sub>Hex<sub>8</sub>HexNAc<sub>8</sub>NeuAc<sub>4</sub>)であり、糖鎖の種類に HS 添加培地で培養した細胞由来糖鎖と違いはみられなかった。Fig.26B に示したように、無血清培地で培養した細胞由来 dHex<sub>1</sub>Hex<sub>8</sub>HexNAc<sub>7</sub>NeuAc<sub>3</sub> 及び dHex<sub>1</sub>Hex<sub>8</sub>HexNAc<sub>8</sub>NeuAc<sub>4</sub>は、HS 添加培地で培養した細胞由来糖鎖の僅か 32%及び 36%であり、顕著に減少していることが明らかとなった。また Hex<sub>1</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuAc<sub>2</sub>, dHex<sub>1</sub>Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>6</sub>NeuAc<sub>4</sub>(1,2), dHex<sub>1</sub>Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>7</sub>NeuAc<sub>4</sub>, dHex<sub>1</sub>Hex<sub>8</sub>HexNAc<sub>7</sub>NeuAc<sub>4</sub> 及び dHex<sub>1</sub>Hex<sub>8</sub>HexNAc<sub>8</sub>NeuAc<sub>3</sub>(1,2)も 50%~60% に減少しており、無血清培地で培養した細胞の 3 及び 4 本鎖糖鎖は、HS 添加培地で培養した細胞と比較していずれも減少していることが明らかとなった。このことから、無血清培地で細胞を培養すると高分岐糖鎖が減少することが示唆された。

以上のように無血清培地及び 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、高マンノース型糖鎖、低分子量糖鎖は、無血清添加培地で培養することによって増加することが明らかとなった (Fig.27)。一方複合型鎖糖鎖は dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuAc<sub>1</sub>を除き、無血清培地で培養すると減少し、HS 添加培地で培養すると増加することが明らかとなった。

#### C-4 免疫原性の新規評価技術の開発

まず初めに、ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に抗アポトーシス遺伝子である Bcl-xL およびその活性増強変異体である Bcl-FNK 発現 35 型 Ad ベクター (Ad35-BclxL、Ad35-BclFNK) を作用させ、その発現を Western Blot にて検討したところ、Ad35-BclxL および Ad35-BclFNK を作用させた細胞ではその発現が認められた (Fig.28)。一方、何もベクターを作用させていない細胞および GFP 発現 35 型 Ad ベクター (Ad35-GFP) を作用させ

た細胞では Bcl-xL の発現は見られなかった。

次に、Bcl-xL および Bcl-FNK の発現が CD34 陽性細胞の増殖に与える影響について検討した。遺伝子導入後、経時的に細胞数を計測したところ、どの群においても著差なく細胞が増殖することが示された (Fig.29)。しかしながら、Ad35-BclxL および Ad35-BclFNK を作用させた群においては、mock ならびに Ad35-GFP 作用群と比較すると若干増殖速度が遅かった。

さらに Bcl-xL および Bcl-FNK の発現により細胞が抗アポトーシス能を獲得するかどうか検討するため、トポソメラーゼ I 阻害剤である Camptotecin 存在下において培養した。その結果、Camptotecin 10 $\mu$ M 存在下において Mock ならびに Ad35-GFP 作用群においてはそれぞれ 57%、75% の生存率であったのに対し、Ad35-BclFNK 作用群では 88%の生存率を示した (Fig.30)。従って CD34 陽性細胞に対し Bcl-FNK を発現させることにより、抗アポトーシス能を獲得することが示された。

次に Bcl-xL および Bcl-FNK の発現が細胞の分化・増殖に与える影響について明らかにするため、コロニーアッセイを用いて遺伝子導入細胞のコロニー形成能について検討した。その結果、遺伝子導入 2 日後の細胞ではどの群においても同程度のコロニー形成が観察されたが、遺伝子導入 8 日後の細胞をコロニーアッセイにかけたところ、Ad35-BclFNK 作用群においては他群と比較し、有意に高いコロニー形成能を示した (Fig.31)。一方で、Ad35-BclxL 作用群においては有意な差は認められなかった。以上の結果より、Bcl-xL の活性増強体である Bcl-FNK を強制発現させることにより、CD34 陽性細胞の分化能・増殖能が一定期間液体培養後も維持されることが示唆された。

そこで、Bcl-FNK 発現 35 型 Ad ベクターを作用させた CD34 陽性細胞を、放射線照射した NOG

マウスに移植し正着するかどうか検討した。移植20週後に末梢血、骨髄、胸腺、脾臓に含まれるヒト由来の血液細胞を解析したところ、末梢血、胸腺、脾臓においてはヒト由来の細胞は検出されなかったものの、骨髄では少ないながらも(1%以下)ヒト CD45 陽性細胞が検出され、CD34 陽性細胞が正着していることが示唆された (Fig.32)。さらに各種抗体を用いて解析したところ、CD19/CD10 陽性細胞および CD33 陽性細胞が検出されたことから、B 細胞および Myeloid 細胞に分化していることが示唆された。なお、T 細胞 (CD3 陽性細胞) および造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) は検出されなかった。

## C-5 細胞特性指標の探索

血管内皮前駆細胞 (EPC) の起源となる細胞には多くの種類があり、CD34、AC133、CD14 等の表面マーカーをもつ細胞と考えられている。EPC には少なくとも2つのタイプがあり、1つは増殖能が低く、自身は管腔形成能をもたないが、インターロイキン-8 (IL-8)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、血管内皮成長因子 (VEGF) を放出する紡錘状の形をした early EPC である。もう1つは、高い増殖能と管腔形成能をもち、敷石状を呈した OEC である。OEC は多くの均一な細胞数が得られるので扱いやすいが、出現時期が2-3週間と遅く、また、出現頻度も低い。Early EPC は不均一ではあるが培養1-2週間で出現する。

血管新生治療のために十分な数の EPC を得ることは、細胞治療で非常に重要である。EPC は多くの物質、例えば G-CSF、GM-CSF、VEGF、EPO、スタチン等によって、骨髄から動員される。しかし、患者に過度に負担をかけることなく、できるだけ多くの EPC を得るためには、生体外すなわち *in vitro* で EPC を分化・増殖を促進する方法を確立することが望ましい。新たな EPC 増幅方法をあきらかにできた場合、増幅した EPC が従来の EPC と同等の性質を持っているのかの

検証も必要となる。その検証が得られた場合には、解析によって得られた様々な細胞特性が、新たな EPC の品質特性となることが考えられ、細胞の品質管理の点からも有用である。

## C-5-1 Thrombopoietin による early EPC の分化誘導と特性解析

トロンボポエチン (TPO) は従来血小板産生を促進する因子として知られ、また造血幹細胞の自己複製を促進する因子としても知られている。我々は以前の研究で、AC133 陽性細胞から early EPC への分化過程を詳細に検討した結果、CD31 強陽性細胞が early EPC であることを報告した。本年度の研究で、我々は AC133 陽性細胞から early EPC への分化・増殖の過程における TPO の効果を解析し、TPO は VEGF よりも強く early EPC の分化・増殖を促進する重要な役割を果たすことを明らかにした。

### C-5-1-1 AC133 陽性細胞由来 early EPC の特性

AC133 陽性細胞を VEGF 存在下に fibronectin または typeIV コラーゲン上で培養すると、CD31 の発現分布は Fig.33 のようになり、CD31 強陽性細胞が early EPC である。Early EPC は様々なサイトカインを産生すると考えられることから、CD31 陽性細胞と CD31 強陽性細胞を分画し、産生するサイトカインを比較した (Fig.34)。その結果、末梢血と臍帯血のいずれを原材料とした場合にも、CD31 強陽性細胞が CD31 陽性細胞よりも多量のサイトカインを産生しており、特に IL-8 や MCP-1 の産生量が多いことが明らかになった。このことから CD31 強陽性細胞が early EPC としての性質を示すことがわかる。

### C-5-1-2 TPO による CD31 強陽性 early EPC の分化誘導

AC133 陽性細胞に VEGF のみを添加、あるいは、VEGF と TPO の両者を添加して fibronectin プレート上で2週間培養したところ、VEGF 単独

群に比して、VEGF+TPO 添加群で KDR 陽性、eNOS 陽性の接着した細胞が増加した (Fig.35)。末梢血由来細胞と臍帯血由来細胞のいずれを原材料とした場合も同様の結果が得られた。フローサイトメトリーによる解析では、TPO の添加により CD31 強陽性細胞が 0.51% から 2.80% に増加していた (Fig.40b 参照)。したがって、TPO は AC133 陽性細胞から early EPC への分化・増殖を促進することが明らかとなった。

上記の検討は対照群に VEGF を添加し、VEGF に TPO を加えて比較検討したが、次に AC133 陽性細胞から early EPC に分化・増殖する作用が TPO 単独で行われるのかどうか、また、VEGF との比較についても検討した。その結果、AC133 陽性細胞に VEGF を加えて一週間培養しても細胞総数 (Fig.36a) は対照群と比べて増加しなかったが、フローサイトメーター (Fig.36b) で CD31 強陽性細胞の割合を解析すると約 1.5 倍とわずかなではあるが上昇しており、CD31 強陽性細胞数 (Fig.36c) は対照群に比べて有意に増加していた。一方、TPO を加えて培養すると、細胞総数は約 2 倍増加 (Fig.36a) し、CD31 強陽性細胞の割合は約 13 倍近く上昇しており (Fig.36b)、CD31 強陽性細胞数 (Fig.36c) は 20 倍以上の増加が観察された。また、VEGF と TPO を同時に添加すると細胞総数がさらに増加し、両者の作用により CD31 強陽性細胞数は相乗的に増加していた (Fig.36c)。

TPO と VEGF を添加した AC133 陽性細胞において、細胞総数を経時的に観察すると、3 日以降に急激に上昇した (Fig.37a)。AC133 陽性細胞を単核球から分離した直後は、CD110 (TPO 受容体) は全く発現していなかった (データは示さず)。しかし、培養 3 日後、CD31 陽性、CD110 陽性細胞が末梢血では 1.74%、臍帯血では 1.78% であり (Fig.37b)、AC133 陽性、CD110 陽性細胞の割合は増加することから、EPC は AC133 陽性細胞から CD110 陽性細胞を経て分化していく可能性が考えられた。

### C-5-1-3 TPO の情報伝達経路

次に AC133 陽性細胞が TPO の刺激を受けた際の情報伝達経路について検討した。Fig. 5 に示すように、AC133 陽性細胞は培養 3 日以降に急激に上昇し、なおかつ培養 3 日目には TPO 受容体を発現しているため、培養 3 日後の細胞を用いた。Fig.38a に示すように、PI3K/Akt 経路の活性化として重要な Akt の 473 番目のセリンの強いリン酸化が 15 分で観察された。また、TPO は JAK/STAT 経路を活性化することも報告されている。STAT3 の 705 番目のチロシンのリン酸化もやはり Akt と同様に 15 分で観察 (Yamaguchi, et al. 1999、Kanayasu-Toyoda, et al. 1999) されることから、PI3K/Akt 経路と JAK/STAT 経路の両経路を TPO と VEGF で刺激して 15 分後に比較検討した。その結果、Akt の 473 番目のセリンのリン酸化は VEGF より TPO のほうが強く、両者で細胞を同時に刺激するとさらに強いリン酸化が起こった (Fig.38c)。これは EPC の分化・増殖促進作用に一致している。また、フローサイトメーターによる解析では、Akt のリン酸化は CD31 陽性細胞でも AC133 陽性細胞でも、ともに観察された (Fig.38b)。一方、STAT3 の 705 番目のチロシンのリン酸化は TPO で刺激した時のみ観察された。PI3K をその阻害剤であるワートマニンで抑制すると、末梢血・臍帯血ともに CD31 強陽性細胞の産生は有意に減少した (Fig.39)。しかし、その阻害が完全でなく部分的であったことを考えると、EPC 産生促進には PI3K/Akt 経路と JAK/STAT 経路の両経路の活性化が重要と考えられた。また、TPO が VEGF より強い EPC 産生促進作用をもつのは TPO 単独で両経路の活性化ができることが一因であると考えられた。

### C-5-1-4 TPO を用いて分化させた early EPC の特性

AC133 陽性細胞に VEGF 単独あるいは VEGF+TPO を添加して 1 週間培養後、抗 CD45

抗体-FITCで染色してフローサイトメーターで解析したところ、対照群 (VEGFのみ、Fig.40a 上段) も TPO 処理群 (VEGF+TPO、Fig.40a 下段) も殆どすべての細胞が白血球共通抗原である CD45 陽性であった。したがって、VEGF 処理した場合も TPO 処理した場合も AC133 陽性細胞から分化する細胞は全て血球系のマーカーを発現しており、我々が以前から報告してきた CD31 強陽性細胞は血球系に由来する細胞であることが示された。これに対して、成熟した血管内皮細胞は CD45 陰性であることが知られており、OEC も CD45 陰性細胞がほとんどである (Mukai N. et al. Exp. Cell Res. 314, 430, 2007)。血球系細胞と血管内皮細胞は共通の母細胞 (Hemangioblast) から発生するが、血管内皮前駆細胞と言われる細胞の中でも、early EPC と OEC は分化系統が異なる細胞であることが示唆された。

Early EPC には、血球系に属する単核/マクロファージ系細胞の表面マーカーである CD14 を発現する細胞に由来するものがあると報告されている。そのため、AC133 陽性細胞由来 early EPC の CD14 発現を検討した。しかし、Fig.40b に示すように、いわゆる transdifferentiation (分化転換) により単核/マクロファージ系から分化する early EPC とは異なり、AC133 陽性細胞由来 early EPC は CD14 陰性であった。このことから、血球系に属する EPC である early EPC には、CD14 陽性と陰性の複数の分化系統に属するものがあると考えられた。

## C-5-2 OEC 誘導に関する解析

### C-5-2-1 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、 $1 \times 10^7$  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、誘導効率の上昇が必須である。また、長期培養による染色体の変化も懸念されるため、最初に多くの OEC コロニーを得て、少ない継代数で十分な細胞数を得ることが望ましい。

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た。昨年度の検討により、hydrocortisone が OEC 誘導に抑制的に働くことが示唆されたが、試験したロットが 3 ロットと十分でなかったため、本年度はさらに 5 ロットで同様の検討をすることにより、hydrocortisone の効果を確かめた。

Fibronectin でコーティングした 6well 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。5 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.41のような結果となり、得られたコロニー数が全体として少なかったものの、hydrocortisone を含まない培地が OEC 誘導に適しているという昨年度の結果を支持する結果が得られた。Hydrocortisone は抗炎症作用を持ち、血管内皮に対しては接着分子の発現を抑制する作用を持つと考えられることから、hydrocortisone 不含培地を用いることで、fibronectin への細胞の接着が強められることにより接着細胞が増えることが誘導効率改善の要因であると考えられる。

#### C-5-2-2 CD45 陰性画分を用いた OEC 誘導

OEC の起源となる細胞についてはこれまでのところ明確に同定されていないが、CD45 陰性の画分に OEC の起源となる細胞が存在することが報告された (Timmermans F. et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1572, 2007)。CD45 は白血球共通抗原とも言われ、リンパ球と単球には強く発現していることから、単核球画分に含まれるほとんどの細胞は CD45 陽性である。そのため、CD45 陰性画分を用いることにより、より純度の高い OEC の誘導が可能になると考えられた。

一方、これまで、培養開始 1 週間の間は頻りに培地交換をする方がよいという報告を元に、培養上清中に OEC 誘導を抑制する因子が存在することも考え、最初の 7 日間、毎日全量の培地交換を実施していた。しかし、OEC コロニーは培養 well の端に出現することが多いことから、血管内皮の形質を獲得するまでの間は接着が弱く、接着し続けられた細胞が分化・増殖して OEC のコロニーを形成すると考えると、OEC の起源となる細胞が接着細胞の形質を獲得するまでの間、できるだけ静置した状態で培養を続けることが望ましいとも考えられた。そこで、CD45 陰性画分を用いた実験では、弱く接着した細胞が培地交換の際に洗浄されないよう、細胞接着を維持した状態 (培地を全量交換せず、2ml 中 1.5ml を交換) での培養を試みることにした。

その結果、ロットによる差が大きいものの、1 ロットの臍帯血由来の細胞から 100 個以上の OEC コロニーが得られるというこれまでに例のない高い効率で OEC を誘導することができた (Table 6)。

その後の検討で、最適と思われる条件で実験を行っても、誘導される OEC コロニー数に関してロットによる差が非常に大きいことから、現在、OEC を効率よく誘導するための主要因は何であるか、検討を続けているところである。Table1 の実験では、hydrocortisone を day7 以降に添加することとコロニーの高頻度の出現が関連していたため、hydrocortisone の添加のタイミングが重要である可能性が考えられた。しかし、同一ロットを用いて、hydrocortisone 非添加、添加、day7 以降のみ添加、の 3 群について比較を行ったところ (各 4well)、hydrocortisone 非添加と day7 以降の添加では差がなく、hydrocortisone の day7 以降の添加は OEC 誘導の主要因ではないと考えられた (Fig.42)。また、CD45 陰性画分を分離する操作を行っているが、回収率が実際の CD45 陰性画分よりかなり高いことから、用いた細胞の CD45 陰性細胞としての純度は高くないと考え、細胞分画と OEC 誘導効率の関連についても検証中である。

#### C-5-2-3 OEC 誘導後の培養条件の最適化

昨年度までの検討において、単核球から出現した OEC コロニーを拡大していく際に、早期に増殖が停止するコロニーが高頻度に見られた (Fig.43a)。培養ディッシュのコーティングタンパク質や継代方法を変更しても改善はみられなかったが、培地に添加する血清を組織由来血管内皮細胞である HUVEC 用に最適化された培地 (EGM-2) に含まれる 2%から 10%に変更することで、拡大の成功率が 12%から 83.3%に改善された (Fig.43b)。その後の検討でも、10%血清入り培地ではほぼすべての OEC 株が問題なく拡大できている。

血清濃度の変更が細胞の特性に与える影響を調べるため、2%血清を含む条件下で継代培養していた OEC 株について、血清濃度を 2%、5%、10%、20%にして培養したところ、2%血清で培養している細胞では、細胞老化の特徴である増殖停止と細胞の肥大化が最も早く見られ、増殖が停止した細胞では老化マーカーである senescence associated- $\beta$ -galactosidase の活性染色陽性となった (Fig.44)。血清濃度 2%で培養している細胞の増殖が停止した時点でも、血清濃度 5%以上では増殖能が維持された (Fig.44)。また、膜透過性の亢進した死細胞を検出する 7-AAD による染色で細胞の viability に対する血清濃度の影響を調べたところ、細胞の生存率も血清濃度が高い方がよいという結果となった (Fig.45)。

細胞の増殖能と機能はしばしば逆相関すると言われていることから、OEC の機能の指標としてマトリゲル上での管腔形成アッセイにより、OEC の機能に対する血清濃度の影響を調べた。2%、5%、10%、20%の血清濃度で培養した OEC のマトリゲル上での管腔形成能を比較したところ、管腔形成能に顕著な差はなく、培養中の血清濃度は OEC の管腔形成能に影響しないと考えられた (Fig.46)。

これらの結果に基づき、OEC の拡大培養においては血清濃度を 10%とすることとした。OEC 誘導時の血清濃度については、血清濃度が低い方がよいという報告 (Gulati R. et al. Circ. Res. 93, 1023, 2003) に基づき、これまでのとおり 2%としている。

#### C-5-2-4 OEC の特性指標の探索

臍帯血単核球の培養により取得した OEC 株 6 種類について、長期培養における増殖特性とマトリゲル上での管腔形成能を評価した (Figs.47&48)。Fig. 16 に示すように、組織由来血管内皮細胞であるヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 HUVEC と同程度の管腔形成能を示す株が 1 つ (2R-3-2)、中程度の管腔形成能を示す株が 4

つ (S5, S2-12, S2-22, S2-31)、管腔形成能がほとんどない株が 1 つ (S3) であった。

FACS により血管内皮細胞の代表的なマーカーである CD31、KDR、eNOS の発現を調べたところ、全ての細胞株でその発現が陽性であった (Fig.49)。管腔形成能を持たない S3 株においても、低いながら CD31、KDR、eNOS の発現は認められた。

これらの OEC 株の中から、管腔形成能が高い 2R-3-2、管腔形成能が中程度の S2-22、管腔形成能が低い S3 を選び、OEC 3 株と HUVEC について、特性指標候補遺伝子の発現比較を行った。用いた 4 種類の細胞のマトリゲル上の管腔形成能について、形成された tube の長さおよび本数を顕微鏡画像解析ソフト AxioVision を用いて顕微鏡の視野(2.35mm<sup>2</sup>)ごとに定量した結果を Fig.50 に示す。

血管内皮細胞に発現している 84 個の遺伝子について、4 種類の細胞における発現量を Real Time PCR により定量比較した。各細胞における  $\beta$ アクチンの発現量と各遺伝子の発現量の比を、HUVEC をコントロールとして比較したところ、細胞の管腔形成能と相関すると考えられる遺伝子が 2 つ (Gene1, 2)、管腔形成能と逆相関すると考えられる遺伝子が 4 つ (Gene3~6)、管腔形成能との相関はないものの HUVEC と比較して OEC で顕著に発現の高い遺伝子が 1 つ (Gene7)、見出された (Fig.51)。また、Gene7 ほど発現量の差が顕著でないものの、HUVEC に対して OEC3 株で共通して発現が高い遺伝子が他に 7 つ見出された。Gene1, 2, 7 の 3 つは、OEC の特性指標として有用である可能性が高いと考え、OEC の機能との関連を検討中である。

#### C-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

##### C-6-1 GeneChip解析のアーチファクトの評価

GeneChipを用いた実験における測定アーチファクトには3種類ある。すなわち、「GeneChipに

対する非特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナル」、「測定機器の検出限界未満のノイズ」、および「測定機器由来のシグナルのばらつき」である。

#### C-6-1-1 非特異的なハイブリダイゼーション

「GeneChipに対する非特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナル」を評価する方法として、GeneChipおよびGCOSプログラムによる“Absolute Analysis”の結果を採用した。“Absolute Analysis”はGeneChipの各プローブセットに対応する転写産物が実際に発現しているか否かを、プローブセット内のパーフェクトマッチプローブ由来蛍光シグナルとミスマッチプローブ由来蛍光シグナルとを比較することにより、定性的に判定する解析である。判定は“Present”、“Marginal”または“Absent”として出力される。本研究では、検討した6ロットで“Present”の判定が認められないプローブセットの蛍光シグナルを、非特異的なハイブリダイゼーションによるものと判断した。

#### C-6-1-2 検出限界

いかなる測定系にも検出限界が存在する。普段あまり省みられることはないが、GeneChipとスキャナーを用いた測定系も例外ではない。ISOおよびIUPACの定義に基づくICHの定義によれば、検出限界は、

$$L_c = 3.3x_{sm}/a \quad (> \text{検出不可能}) \quad \dots \textcircled{1}$$

とされる。 $L_c$ は「濃度推定値の検出限界」、 $s_m$ は測定値の標準偏差、 $a$ は検出限界付近の検量線の傾きである。「測定値の検出限界」を $L_m (=axL_c)$ とすると、

$$L_m = 3.3xs_m$$

となるので、測定値のCV値を $CV_m$ とすれば①式

は以下の②式のように書き換えることができる。

$$CV_m = s_m/L_m = 0.3 \quad (< \text{検出不可能}) \quad \dots \textcircled{2}$$

つまり、「測定値の検出限界」とは、測定値のCV値( $CV_m$ )が0.3となる点を指すことになる。使用した6ロットのhMSC(継代数7)の中の1つから合成された単一のcRNAサンプルを用いて、繰り返し測定を行った結果をFig.1に示す。同一サンプルの繰り返し測定における測定値の標準偏差は、平均値が増加するに従って増加する傾向が認められた(Fig.52a)。これとは対照的に、CV値は平均値が増加するに従って減少する傾向が認められた(Fig.52b)。Fig.52cはFig.52bのグラフの横軸を線形目盛りとし、平均値の低い部分を拡大したものである。これから判断すると、 $CV_m$ の移動平均値(100データ)が0.3を通過するのは測定シグナルが60のときであることが明らかとなった。同一ロットの継代数9のサンプルを繰り返し測定した場合も同様の結果が得られた(データ省略)。

#### C-6-1-3 測定機器由来のばらつき

いかなる測定機器から得られた観測値にも必ず測定誤差が含まれるのは不可避である。複数のサンプルを測定する場合の観測値の標準偏差を $SD_m$ 、このうちサンプル由来の標準偏差を $SD_s$ 、測定機器由来の標準偏差を $SD_a$ とした場合、以下の③式が成り立つ。

$$SD_m^2 = SD_s^2 + SD_a^2 \quad \dots \textcircled{3}$$

単一サンプルを繰り返し測定した場合には、サンプル由来の標準偏差がないと仮定できるので、観測値の標準偏差はそのまま測定機器由来の標準偏差と考えてよい。Fig.53aはFig.52aのグラフの縦軸と横軸を両対数目盛りでプロットしなおしたものである。Fig.53aより、検出限界以上の平均値に関しては、「測定機器由来の標準偏差の対

数」が「平均値の対数」と比例関係にある傾向が明らかとなった。この比例関係をさらに見やすくするために、「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数の比」を「平均値の対数」についてプロットしたのがFig.53bである。Fig.53bより、「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」は平均値に依らず一定である傾向がより明らかとなった。しかし、「平均値の対数」に対する「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」の分布が平均値を挟んで対称な分布を示している保証はまだない。そこで、「平均値の順位」に対する「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」をプロットすると、長方形の分布が得られた (Fig.53c)。この結果から、検出限界以上では「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」は平均値に依らず一定であることが明らかとなった。つまり、単一サンプルを繰り返し測定した場合の測定機器由来の標準偏差 (SD<sub>d</sub>) と平均値 (Mean) との間には、

$$\log[SD_d] / \log[Mean] = C \text{ (constant)}$$

の関係が成立する。すなわち、

$$SD_d = \text{Mean}^C \quad \dots \text{④}$$

となり、SD<sub>d</sub>はシグナルの平均値の関数として近似できる。従って、サンプル由来の標準偏差は、③式に④式を導入することにより、

$$SD_s = (SD_m^2 + \text{Mean}^{2c})^{1/2} \quad \dots \text{⑤}$$

によって観測値から算出できる。なお、同一ロットの継代数9のサンプルを繰り返し測定した場合も同様の結果が得られた (データ省略)。

#### C-6-1-4 アーチファクト除去の効果

複数ロット間の遺伝子発現のばらつきについ

でのGeneChip解析を行う際に、以上の結果に基づいて、アーチファクトの除去を行った。すなわち、「GeneChipに対する非特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナル」を除去するために、「Absolute Analysis」の結果、検討したどのロットからも「Present」の判定が得られなかったプローブセットをその後のオントロジー解析から除外した。「測定機器の検出限界未満のノイズ」を除去するためには、測定した複数ロットのシグナルの平均値が60 (CV<sub>m</sub>=0.3) 未満のプローブセットをオントロジー解析から除外した。今回の6ロットのhMSCの遺伝子発現解析では、上記2条件のいずれかのために棄却されたプローブセットは全54,675個の60%で、解析に適すると判断されたプローブセットは全体の40%であった。また、「測定機器由来のシグナルのばらつき」を除去するために、CV値を算出する際には観測値の標準偏差 (SD<sub>m</sub>) ではなく、⑤式によるサンプル由来の標準偏差 (SD<sub>s</sub>) を採用した。

複数ロット間の遺伝子発現のばらつきを評価する上で、3種のアーチファクトが及ぼす影響を評価するために、各アーチファクトを考慮した場合と考慮しない場合とで、CV値の順位を比較した。CV値のプローブセット上位1000に含まれるプローブセットの共通性を見ると、「GeneChipに対する非特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナル」および「測定機器の検出限界未満のノイズ」のCV値に与える影響が大きいことが明らかとなった (Fig.54)。

#### C-6-2 ばらつきの大きな生理機能

培養された複数ロットのhMSCにおいて発現のばらつきが大きい遺伝子が、どのような生理機能と関連しているかを検討するために、GOTMを用いた遺伝子オントロジー解析を行った。3種のアーチファクトを考慮したうえで、まず6ロット (継代数7) のCV値上位1,000位までのプローブセットを抽出した。同様に継代数9の細胞についても上位1,000位までのプローブセットを抽出し



た。継代数7と9のCV値上位1,000位のリストに共通して含まれるプローブセット、即ち継代数によらずに大きなばらつきを示すプローブセットは428セットであった。この428プローブセットについて、GOTMを用いてGene Ontology Treeを描出し、GeneChip全体のオントロジー解析結果と比較して有意 ( $P < 0.01$ ) に濃縮の見られる生理機能を探索した (Fig.55)。その結果、"Biological Process" に関して は、"development"、"pregnancy"、"circulation"、"defence response"等のオントロジークラスターが検出された (Fig.55a)。また、"Molecular Function" に関しては、"carbohydrate binding"、"carbocyclic acid binding"、"phospholipid binding"、"growth factor binding"、"structural molecule activity"等のオントロジークラスターが検出された (Fig.55b)。  
"Cellular Component"については、"soluble fraction"、"RNA polymerase complex"、"extracellular matrix"等のオントロジークラスターが検出された (Fig.55c)。

次に、有意 ( $P < 0.01$ ) に濃縮の見られる"Biological Process"中のオントロジークラスターについて、Fig.56のようにして、クラスター間の相関を検討した。その結果、スピアマンの相関係数の有意水準 (P値) を0.1%として評価した場合、Table 7のような結果となり、様々なクラスターと有意な相関を示すクラスターだけでなく、"blood pressure regulation"のように他のクラスターとの相関が認められない、すなわち独自のばらつきを示すクラスターが存在することが明らかとなった。

## D. 考察

### D-1 感染性因子の安全性評価技術開発

#### D-1-1 PEI ビーズによる HCV ジェノタイプパネルの濃縮

C型肝炎ウイルス (HCV) の PEI ビーズ濃縮

について、昨年度は HCV 国内標準品を用いて検討し、C型肝炎ウイルス (HCV) はヒト正常血漿中のウイルスを PEI ビーズにより高効率で濃縮可能であった。また、PEI ビーズ濃縮により、血漿中に含まれる 1 IU/ml の HCV を確実に検出可能であることを明らかにした。今年度は、HCV のパネル血漿に適用可能かどうかを検討した。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。その結果、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、濃縮倍率は少なくとも 5 倍以上と考えられた。

#### D-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

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ところ、PEI ビーズ濃縮法は HCV monitor 法と同等の高感度検出が可能であり、bDNA 法や PCR RNA quantitative results と比べて、ウインドウ期の短縮効果が認められた。Roche 社法は、0.4~0.8ml の非検液から HBV ゲノムを抽出して試験を行っており、これと同様の感度が得られていることから、今後、より多量の血漿に本法を適用することにより、さらに感度を向上させることも可能と考えられる。また、本研究で用いた HCV 検出用の PCR プライマー、プローブや検出条件は最適化されたものではないことから、条件の最適化を行うことも必要と考えられる。

#### D-1-3 PEI ビーズによる HBV ジェノタイプパネルの濃縮

昨年度は 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。その結果、培養液中の HBV の PEI ビーズによる濃縮は FCS で阻害され、HAV や HCV と比べて濃縮効率が劣るが、PEI ビーズ濃縮の際、抗 HBV-IgM 抗体を添加することにより濃縮効率が改善された。また、ヒト正常血漿で希釈した場合、

抗 HBV 抗体陽性の試料は効率よく濃縮されたが、HBV 標準品の濃縮は困難であった。HBV 標準品は抗 HBV 抗体陰性のウインドウ期の血漿であることから、抗 HBV 抗体の存在が濃縮の可否に関与していることが示唆された。今年度、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結果、ほとんど濃縮効果がないことが示唆された。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った。その他の検体は全てウインドウ期のものであり、ジェノタイプの差よりもウインドウ期であることの方が濃縮に影響している可能性が考えられた。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。ウインドウ期の検体に適用することを考慮すると、PEI ビーズ濃縮法は HBV の濃縮にはあまり適していないと考えられる。

#### D-1-4 ZnCl<sub>2</sub>と抗 HBV 抗体による HBV ジェノタイプパネルの濃縮

ZnCl<sub>2</sub>やMnCl<sub>2</sub>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を用いて、HBV 標準パネル血漿に抗 HBV 抗体を添加後、ZnCl<sub>2</sub>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 ZnCl<sub>2</sub>と抗 HBV 抗体により効率よく回収され、十分に効果があることが確認された。ID007と017が沈殿として回収されなかった原因は明らかではないが、007はウイルス量 10<sup>2</sup>未満と極めて微量であること、また、ID 017もウイルス量は 10<sup>2</sup>オーダーと低く、ウイルスサブタイプが 007 は *adr mutant*、017 は *adw mutant* であることから、使用した抗 HBV 抗体の反応性が低かったことなどがその要因のひとつであるかもしれない。今後、本法を HBV のセロコンバージョンパネルに適用し、ウインドウ期の短縮が可能かどうか検討する予定である。

#### D-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

各種体性幹細胞を含む細胞治療用の細胞を、*in vitro*において培養する場合には、必ずいくつかの危険性が伴う。まず、起こりにくい深刻な問題となる細胞の取り違い、これは既に細胞バンク等で指摘されているように、複数の細胞を同一機関で培養する際の危険性として指摘されている。この問題については、STR解析やSNP解析により高精度で細胞の同一性を保証できることを既に示した。次に、染色体異常に代表される遺伝的安定性を調べるのが重要となる。特に、最近報告されたヒト万能性幹細胞 iPS の場合には、*c-myc* 遺伝子の導入や、レトロウイルスベクターの使用による染色体の不安定性が懸念されており、がん化につながる初期変化として、その検出は重要な課題となることが予想される。我々はすでにヒト骨髄由来間葉系幹細胞 hMSC を題材として用い、長期培養による遺伝的安定性を SNP チップをはじめとするアレイ CGH の手法を用いて検討を行った。その結果、hMSC の1つのロットでゲノムのコピー数の変化が認められ、マルチカラー-FISH 法による染色体解析において、7番および17番染色体の転座および増幅を伴う異常を検出した。CGH アレイにて検出された事からも推察されたように、長期培養により細胞集団は全てこの異常を持った細胞集団へと変化していた。今年度は、この現象がどの程度の頻度でおこるか、また起きた変化は培養のどの時期から起きていたかに関して検討を加えることにした。

まず、普遍性という課題に関しては、調べた他のロットおよび骨格筋芽細胞において CGH 解析および LOH 解析による異常は見いだされなかった。よって、染色体変化はそれほど頻度が高い現象ではなく、最初の異常が特殊なケースであったことがわかった。ただし、ここで注意しなければならないのは、CGH 法にてゲノムの変化として検出できるのは、異常が少なくとも全体の細胞集

団の半数を占めた場合、即ち、異常細胞が増殖性を獲得して細胞集団に広がった場合にのみ検出可能と言える。

次に、培養の過程において異常が発現した時期に関する検討に関しては、昨年度の報告書にて、算術的に細胞集団へ異常が広がるためにはかなり長い培養期間を要するという考察から、比較的早い時期に最初の異常が起きていたことを予測していたが、今年度のFISHを用いた解析により、予想通り比較的早い時期から異常が出現していることが明らかとなった。12継代目に2割弱異常細胞が存在するという事は、培養開始初期から微量に異常細胞が存在したことを示唆するものである。この予測を裏付ける事実として、最近開かれた第7回日本再生医療学会総会において、他の研究室において培養されたCambrex社hMSCの同一ロット(#4F1560)が、継代の過程において我々の場合と同様に途中で増殖曲線の傾きに変化し増殖速度が少し速くなるというデータが発表されていた。

今回FISH解析では、当初予想された7番染色体セントロメアプローブでは数的異常は検出されず、代わりに17番染色体セントロメアプローブにて異常が検出できた訳であるが、間期核での検討であるため詳細はな理由は不明である。可能性としては染色体解析において増えていた7番染色体が17番染色体のセントロメアを持つことになり、非常に不思議である。17番染色体自体にもコピー数変化が検出されているので、その可能性はあるが、メカニズムを含めてその真偽に興味を持たれる。今後、分裂中期像を使ってFISH解析を行うことによりその詳細を検討したい。

今回異常示したhMSCロットが不死化およびがん原性を持つかという疑問に関しては十分に検討できなかったが、前者に関しては、増殖速度は落ちるものの、他のロットより長期培養可能であり、現在39継代まで培養を続けている。がん原性を持つかどうかに関しては、今後免疫不全マウスへの移植実験などにより確認したい。

さらに、今回の異常細胞がどうして増殖性を持ったかという疑問に関しても十分には検討ができなかったが、7番染色体セントロメア近傍にある癌関連遺伝子として、乳癌細胞において増幅が認められているEGFR(Epidermal Growth Factor Receptor)遺伝子があり、この遺伝子数の増加が増殖性獲得に寄与している可能性が考えられる。今後、EGFR遺伝子プローブによるコピー数変化の確認を行うとともに、その発現量に関しても検討を加えたい。

以上、今年度はSNPチップによるCGH、LOH解析と、FISHによる特定染色体コピー数変化を解析してきたが、両者はそれぞれ一長一短を持ち、相補的に働く。即ち、前者は網羅的であり、微細な変化も検出できるが、全体の平均を取るため異常細胞の割合が多くないと検出できず、感度という面では劣る。逆に、セントロメアプローブを用いたFISH法では一細胞ずつを対象とできるため、異常が低頻度であっても数をこなすことにより検出できるが、特定の染色体にのみ限られるため、それ以外の染色体の異常は検出できないという網羅性に欠ける。その点、マルチカラーFISHは網羅性は高いがスループットという点では今のところ十分ではない。両者の欠点、長所をうまく補いながら使っていくことが重要かと思われる。

実際の細胞治療の場において、こうした染色体解析技術を細胞の品質評価に使おうとする場合、どうしても異常細胞を低頻度の状態から検出できる方法が望まれる。残念ながら現在の技術水準ではそれを達成しうる手法は存在しないが、上記のような既存の技術をうまく組み合わせる手法に加え、新しい原理に基づいた革新的な試験法を開発するアプローチが今後必要であると考えられる。

### D-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

昨年度は、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の細胞特性解析試験法とし

での有用性を評価する目的で、糖鎖プロファイリング法により、HS 添加培地、及び無血清培地で培養した細胞から調製した還元化糖鎖の差異解析を行った。その結果、無血清培地で培養すると Man-9 糖鎖が増加すること、及び複合型糖鎖のプロファイルが変化することを明らかできることを示した。しかし還元した糖鎖を分析する方法では、サンプルを別々に分析することから、正確な量的比較をすることができなかつた。以前に分担研究者らは、糖鎖の比較定量法として 2-AP の重水素置換体を用いた糖鎖の同位体標識法と LC/MS を組み合わせた分析法を開発している。この定量法では酢酸中加熱して糖鎖を標識するために、シアル酸が解離してしまう恐れがあったので本年度は、中性溶液中での標識が可能な PHN の重水素置換体を糖鎖標識試薬として使用する比較定量法の開発を検討した。有機塩基、酢酸及び H<sub>2</sub>O からなる反応溶媒を使用することにより、中性条件下、室温でシアル酸を解離させることなく糖鎖を標識することが可能であった。この標識法と LC/MS を組み合わせることで簡便かつ高精度な糖鎖の比較定量が可能となった。

さらに FCS、HS 添加培地及び無血清培地で培養した細胞から切り出した糖鎖の比較定量解析に応用することで同定量法の細胞特性解析試験法としての有用性を検討した。その結果、高マンノース型糖鎖、パウチマンノース型糖鎖、アガラクトシル糖鎖及び 2 本鎖糖鎖は、FCS 添加培地で培養した細胞に多いこと、一方 3 及び 4 本鎖糖鎖は HS 添加培地で培養した細胞に多いことが明らかになった。また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由来糖鎖の比較定量解析の結果、無血清培地で培養した細胞は FCS 添加培地で培養した細胞と同様に、高マンノース型糖鎖、パウチマンノース型糖鎖及びアガラクト糖鎖が増加していることを明らかにした。これらの結果は、HS 添加培地で細胞を培養すると、FCS 添加培地及び無血清培地で培養した細胞と比較して、糖鎖の高分岐化が進むことを示すものと考え

えられる。

以上のことから、培養条件により生じた細胞変化は、糖鎖の変化として捉えることが可能であることが明らかとなった。さらに PHN の重水素置換体を使用する糖鎖標識法と LC/MS を組み合わせた比較定量法は細胞特性解析試験法として応用することができることが示唆された。

#### D-4 免疫原性の新規評価技術の開発

造血幹細胞は患者より採取しやすく、また表面マーカーが既に同定されていること、また高い分化能・自己増殖能を有することから、最も早い段階から注目され臨床応用されてきた幹細胞である。すでに白血病などの難治性疾患において造血幹細胞移植は優れた治療効果を収めている。しかしながら造血幹細胞は液体培養中に急速にその分化能を失うことが報告されているとともに、移植後、骨髄の niche にたどりつくことが出来ず細胞死にいたる恐れがある。従って、造血幹細胞の移植効率向上は治療効果を左右する極めて重要な要素であるとともに、移植効率向上に向けて有効な解決法の開発が期待される。そこで本研究では、造血幹細胞を含む画分であるヒト骨髄 CD34 陽性細胞への遺伝子導入に優れた 35 型 Ad ベクターを用いて、CD34 陽性細胞に Bcl-xL およびその活性増強変異体 Bcl-FNK を導入し、その細胞特性について検討した。

Bcl-FNK は Bcl-xL の 3 アミノ酸 (Y22F、G26N、R165K) を置換することにより分子内の水素結合を 3 箇所消失させている。これにより Bcl-xL のターゲットであるミトコンドリア外膜に存在する VDAC (Voltage-dependent anion channel) への親和性が増強し、高い抗アポトーシス活性を示すと考えられる。本研究においても、Ad35-BclFNK 作用群は Ad35-BclxL 作用群よりも高い抗アポトーシス能を示すと同時に、一定期間培養後も高いコロ

ニー形成能を示した。Bcl-FNK 発現による CD34 陽性細胞の分化能維持について、その詳細なメカニズムについては不明であるが、過去の研究より未熟な造血前駆細胞では Bcl-xL が発現していること、マウス骨髄細胞にレトロウイルスベクターを用いて Bcl-xL を発現させることにより移植効率が向上したことが報告されている。本研究においてもより強い活性を持つ Bcl-FNK を発現させることにより、培養中に発現低下していく Bcl-xL を補っているものと考えられる。

今回、Ad35-BclxL および Ad35-BclFNK 作用群では Ad35-GFP 作用群および mock 群と比較すると若干増殖速度の低下が観察された。これに関しては Bcl-xL が細胞周期に入るのを遅らせる役割を持つことが報告されたことから、細胞周期に入るのが遅れたためと思われる。しかしながら、Ad ベクターの場合、細胞分裂によりゲノムが希釈されて遺伝子発現効率が低下していくことから、増殖速度が低下することにより遺伝子発現の延長が期待される。また、最終的には遺伝子発現が減少することにより増殖速度は回復すると予想されることから、大きな問題にはならないと思われる。

Bcl-FNK 発現 35 型 Ad ベクターを作用させた CD34 陽性細胞を放射線照射した NOG マウスに移植したところ、骨髄においてヒト CD45 陽性細胞および B 細胞、Myeloid 細胞が検出されたことから、移植細胞が生着し、さらに分化したものである。今回は予備的検討であるため、Bcl-FNK 遺伝子導入により移植効率が向上したかどうかは不明であるが、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入細胞が生着能・分化能を有することが示された。今後さらに例数を重ねることにより、移植効率について検討していく予定である。

造血幹細胞への遺伝子導入にはこれまでレト

ロウイルスベクター（もしくはレンチウイルスベクター）が汎用されてきた。しかしながらレトロウイルスベクターは遺伝子が宿主細胞の染色体に挿入されることにより細胞が癌化する恐れがあること、抗アポトーシス遺伝子は癌細胞で高発現していることから、本研究に関してはレトロウイルスベクターの使用は極めて危険であると思われる。さらに血液細胞は分化するに従い、Lineage によっては Bcl-xL の発現が減少することから、恒常的な Bcl-xL の発現は血液細胞の分化に影響を与える恐れがある。そこで本研究においては、一時的な遺伝子発現が可能な 35 型 Ad ベクターを用いた。我々は 35 型 Ad ベクターは CD34 陽性細胞に対し高い遺伝子導入活性を有すること、遺伝子導入細胞が分化能・増殖能を保持することを明らかにしており、35 型 Ad ベクターは造血幹細胞への抗アポトーシス遺伝子導入に最も優れたベクターであるといえる。

#### D-5 細胞特性指標の探索

Ex vivo で調製した血管内皮前駆細胞を細胞・組織加工医薬品として用いるための製法・品質関連の課題には、以下のようなものがあると考えられる。

##### Early EPC 関連

- ・増幅法の確立
- ・CD31 強陽性細胞の分取法の確立
- ・管腔形成促進能の評価系の確立（OEC との共培養によるアッセイ等）
- ・管腔形成促進能と関連する特性指標の同定
- ・少数の細胞で実施可能な品質試験の開発

##### OEC 関連

- ・誘導効率の改善
- ・管腔形成能と関連する特性指標の同定
- ・培養期間と細胞特性の関連

本研究ではこれらの課題解決に向けて有用な

知見を得ることができた。Early EPC では得られる細胞数が限られていることから、実用化に向けては増幅法が最重要課題である。巨核球の分化増殖因子として知られている TPO が early EPC の増幅に有効であったという知見は、血液細胞の分化に関する生物学の分野でも重要な発見である。これまでの検討では、TPO により増幅した early EPC と VEGF 単独で増幅した early EPC の特性に違いは認められておらず、early EPC としての性質を保持した細胞を TPO により増幅することが可能であると考えている。本研究により明らかになった TPO 受容体の発現や TPO への応答性は、early EPC の新たな特性指標としても有用であろう。

CD31 強陽性細胞は高活性な early EPC であり血管再生療法に有用であると考えられるが、CD31 発現を指標とした場合は分取に FACS が必要であるため、臨床応用を考えるとより簡便な方法で分取できることが望ましい。そのため、CD31 強陽性細胞に特異的なマーカーを探索し、同定されたマーカーを利用してマグネティックソーティングにより分取する方法を現在検討中である。

Early EPC では CD31、MCP-1、IL-8、TPO 受容体の発現が特徴的であり、これらが特性指標として有用である可能性を示した。この中でも特に、MCP-1 や IL-8 は細胞遊走促進作用を持つため、early EPC の機能すなわち有効性と関連した特性指標として有用であると考えられる。

Early EPC は現在のところ継代培養ができないため、得られる細胞は貴重である。品質管理試験に用いることのできる細胞が限られるため、特性解析した結果をもとに、少数の細胞で評価が可能な品質試験法を確立することも重要である。

OEC の分化誘導においては、培地交換法と血清濃度という極めて基本的な点での改良ながら、誘導効率と拡大効率を改善することができた。CD45 陰性画分の利用の有用性に関しては、分画された細胞の純度を測定するなど、検討を続けて

いるところである。

最近、OEC の培養中には高頻度に染色体変異が起こることが報告された (Corselli M. et al. *Exp. Hematol.* 36, 340, 2008)。我々の系でも同様のことが起こっているかどうかは確認していないが、培養期間は短い方が染色体変異の懸念は少ない。短い培養期間で臨床上必要とされる細胞数を得るためには、最初に多くのコロニーを得ることが必須である。1つの細胞から  $1 \times 10^6$  個の細胞が得られる時点では、population doubling level (PDL) は 20 に達している。最初に 100 個のコロニーを得ることができれば、細胞総数が  $1 \times 10^6$  個になる時点での PDL は 14 である。OEC をヒトに投与した報告はないため、実際に必要とされる細胞数は明らかでないが、マウスの実験では  $2 \sim 5 \times 10^5$  個程度の細胞が投与されている。品質評価の観点からは、継代数に依存した細胞特性の変化を明らかにし、品質面から許容される PDL の範囲を明らかにしていく必要があると考えている。

OEC は均質な細胞であるとされているが、これまで樹立した株を見ていると、出現するコロニーごとに形態が多少異なり、増殖特性や管腔形成能にもばらつきがあるようである。そのため、特性指標としては機能と関連のあるものを選択することが望ましいと考え、管腔形成能の異なる OEC 株の遺伝子発現プロファイルを比較した。管腔形成能との相関がある Gene1,2 および OEC で高発現している Gene 7 は特性指標として有用であると考え、OEC の機能との関連を検討中である。管腔形成能とは相関がないものの、OEC で顕著に発現量が高い Gene7 は、管腔形成能以外の点で、組織由来血管内皮細胞である HUVEC との特性の違いを反映したものである可能性もある。

2007 年度は、我が国で初めての細胞・組織加工医薬品である培養皮膚製品の承認、ヒト iPS 細胞の作製成功、ヒト (自己) 由来細胞・組織加工

医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)の公表など、再生医療関係のトピックが相次いだ。我が国では再生医療の臨床研究が盛んに行われているが、その成果を広く一般に提供していくためには、治療効果の期待される細胞を、薬事法の規制下に細胞・組織加工医薬品として開発することにより、その品質・有効性・安全性を確保することが望ましい。先端的な医療では特に、安全性の点では未知・未経験の要素が多いことから、治療の実施に際して、少なくとも一定の有効性を担保し、リスク・ベネフィットを明らかにする必要がある。有効性のメカニズムが明らかでない血管再生医療ではこの点の課題解決が特に求められていることから、今後、有効性と関連する特性指標の探索を継続していきたいと考えている。

#### D-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

細胞組織加工医薬品の品質管理上の大きな問題として、意図した薬効以外の品質特性の把握が困難であることが挙げられる。トランスクリプトームをはじめとする、いわゆる“Omics”は、細胞の表現型や遺伝子型を網羅的俯瞰することが可能なツールとして、創薬ターゲット探索、バイオマーカー探索や遺伝子多型解析等、先端医薬品開発の各方面で利用されている。しかし、細胞組織加工医薬品の品質管理を目的として直接“Omics”を利用する試みも、あるいは、原料・製造工程もしくは製品の品質管理に必要な品質特性を探索する手段として間接的に“Omics”を利用する試みもあまり見られていない。これは“Omics”が依然として高価なアプローチであるという費用的な問題点、および様々なプラットフォーム間のデータの標準化方法が確立されていない点によるところが大きい。しかし、トランスクリプトームをはじめとして、“Omics”のコストパフォーマンスは改善され続けており、またマイクロアレイデータの標準化の試みも米国を中心に進行中である。こ

ういった現状および将来の動向を見据えた上で、品質評価および品質特性探索における“Omics”の有用性が一旦確立されれば、その応用は急速に広がっていく可能性がある。米国FDAは既に2006年より、Critical Path Initiativeの活動の一環として、生物製剤を製造するために用いられる細胞(cell substrate)の品質評価のためのマイクロアレイ利用法について、研究を開始している。その流れは近い将来細胞組織加工医薬品の品質管理にも波及する可能性が高い。

創薬ターゲット探索やバイオマーカー探索を目的とした、いわば「標的遺伝子探索」のためのトランスクリプトーム解析と、品質特性探索を目的とした、いわば「製品間のばらつき探索」のためのトランスクリプトーム解析との間の大きな違いは擬陽性シグナルの取り扱い方にある。トランスクリプトーム解析を用いた「標的遺伝子探索」における擬陽性シグナルは、定量性RT-PCRなどの他の方法によってその真偽を再確認することが可能であるため、ある程度許容できる。一方、「製品間のばらつき探索」のためにトランスクリプトーム解析を行なう場合には、擬陽性シグナルは可能な限り回避しなければならない。その理由は、シグナルの平均値が低い遺伝子については、CV値(=標準偏差/平均値)が自ずと大きくなる傾向があるからである。つまり、アーチファクト評価をより慎重に行う必要がある。そこで今回、本分担研究において、GeneChipを用いた実験における3種の測定アーチファクトについて検討を行った結果、測定機器の検出限界および測定機器由来誤差は単一サンプルの繰り返し測定により算出可能であることが明らかとなった。また、CV値の評価には「非特異的ハイブリダイゼーションによるシグナル」と「検出限界以下のノイズ」を除去することが重要であること、また同時に、3種の測定アーチファクトのなかでも「測定機器由来のシグナルのばらつき」は比較的影響が少ないことも明らかとなった。

遺伝子オントロジー解析を行った結果、6ロッ

トのCV値の高いプローブセットについて、有意に関連性高いオントロジーが検出された。”development”や”defence response”およびその下位の階層のオントロジーがばらつきの大きい生理機能として検出されたことは、hMSCの再生医療および移植医療における用途を考慮した場合に重要である。次に、検出されたオントロジークラスター間の相関を、主成分分析による第一主成分の算出、および各ロットにおける第一主成分得点間のスピアマン順位相関係数の算出によって評価した。相関係数として順位相関を選択した理由は、クラスター間の相関は必ずしも線形を示すとは限らないためであり、また、いくつかの飛離れた値が存在する場合には、例え相関が線形であったとしても、ピアソンの積率相関係数などの間隔尺度・比尺度間の相関係数の場合はそれらの値に引きずられて不当に高い相関係数が得られてしまうからである。

オントロジークラスター間の相関関係の評価は、意図した薬効が予期せぬハザードと相関している可能性を吟味する上で重要と考えられる。たとえば、今回の結果では、hMSCにおいてばらつきの大きい生理機能と考えられる”immune response”が別のばらつきの大きい生理機能”coagulation”と有意に相関していることが示唆された。したがって、hMSCの免疫調節機能を応用した医薬品においては血液凝固関連への影響も吟味する必要がある可能性がある。また、オントロジー”blood pressure regulation”も関連遺伝子の発現のばらつきの大きい生理機能として検出されたが、このオントロジークラスターは他のどのクラスターとも相関しない、いわば孤立したクラスターであった。すなわち、このオントロジーに関する細胞表現型のばらつきについては、ほかの生理機能のばらつきから類推することが困難であり、特別に試験系を構築して評価する必要がある可能性があると考えられる。

## E. 結論

### E-1 感染性因子の安全性評価技術開発

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、本年度は、これまで培養系の細胞に適用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。このためにまず、HCV、HBV のパネル血漿に適用した。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 HCV のセロコンバージョンパネルに適用すると、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、ウインドウ期の短縮が可能であることが示された。一方、HBV のジェノタイプパネルに PEI ビーズ濃縮法を適用したが、HBV 抗体陽性のパネル血漿以外は濃縮できなかった。そこで、新たな濃縮法として抗 HBV 抗体と  $ZnCl_2$  による濃縮法を検討したところ、抗体陰性のパネル血漿も効果的に濃縮された。以上の結果より、PEI ビーズ濃縮法及び抗 HBV 抗体と  $ZnCl_2$  によるウイルス濃縮法は、それぞれ HCV、HBV 陽性検体の濃縮・高感度検出に有用であることが示唆された。

### E-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

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、がん遺伝子増幅のメカニズム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染色体変化異常が観察された検体の解析にも適用可能であった。FISH 法は比較的低頻度な状態から、特定の染色体変化を検出する手法として有用であった。



一方、CGH 解析は確かに検出感度という点ではやや劣るが、網羅性、解像力に優れており、長期培養による評価が許される場合においては、増殖性の変異を検出可能となるという利点も兼ね備えることになり、現実的な手法として、今後実際に細胞の品質評価の上でも有用な手法であることが判明した。以上の結果より、今後細胞治療用培養細胞の遺伝的安定性の評価のためには、追加培養を加えた CGH 解析が有用であるかもしれない。なお、自己細胞製品などで短期間の培養の場合には、マルチカラー-FISH 法などの染色体解析法が有用だと考える。

### E-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

フェニルヒドラジンの重水素置換体を用いる同位体標識法と LC/MS を組み合わせた糖鎖の比較定量法を開発した。また本分析法を用いて培養条件の違いにより生じた細胞の変化は、糖鎖プロファイルの変化として表れることを確認することができた。以上のことからフェニルヒドラジンをを用いる糖鎖の同位体標識法と LC/MS を組み合わせた分析法が簡便かつ高精度な糖鎖比較定量法として有用であること、また細胞特性確認試験法として利用可能であることが示唆された。

### E-4 免疫原性の新規評価技術の開発

ヒト造血幹細胞を含む画分であるヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞に対し、高効率な遺伝子導入可能な 35 型 Ad ベクターを用いて抗アポトーシス遺伝子である Bcl-FNK を発現させることにより、CD34 陽性細胞に抗アポトーシス能を付与することに成功した。さらに遺伝子導入後、CD34 陽性細胞が一定期間培養後も分化能・増殖能を維持していることを見出した。

### E-5 細胞特性指標の探索

細胞・組織加工医薬品の品質管理において有用

な特性指標の探索および品質試験法の開発に関連する研究として、血管内皮前駆細胞をモデルとした研究を行い、以下の結果を得た。

- 1) TPO が *in vitro* でより効率良く AC133 陽性細胞から early EPC への分化・増殖を促進することを明らかにした。TPO の EPC 分化・増殖促進作用は VEGF よりも強く、TPO と VEGF を AC133 陽性細胞に同時に添加すると EPC は相乗的に増加した。
- 2) AC133 陽性細胞由来 early EPC は TPO 受容体である Mpl を発現していた。TPO と VEGF の細胞内伝達を比較すると VEGF は AKT のリン酸化のみを促進するのに対し、TPO は AKT のリン酸化のみならず、STAT3 のリン酸化も促進した。さらに TPO と VEGF の同時に添加するとそれぞれ単独で添加した場合に比べ、より強い AKT のリン酸化が観察された。
- 3) TPO への反応性やその受容体である Mpl の発現は、early EPC の新たな特性指標として有用であると考えられた。
- 4) OEC の誘導方法を改良し、昨年度までと比較して高い効率で OEC を誘導することができた。ロット間の差を越えて、安定して OEC を得る方法を引き続き検討中である。
- 5) 10% 血清入り培地を利用することで誘導された OEC コロニー拡大の成功率を高めることができ、得られた OEC コロニーを確実に拡大することが可能になった。
- 6) OEC の管腔形成能を反映した特性指標の候補となる遺伝子を 2 つ、管腔形成能との相関はないが、HUVEC と比較して OEC で顕著に発現量の高い特性指標候補遺伝子 1 つを見出した。

### E-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

本研究により、トランスクリプトーム解析は細

胞組織加工医薬品の品質のばらつきの所在、即ち品質特性の候補を同定するツールとして有用であること、およびその際にはサンプル以外に由来する誤差を慎重に吟味することが重要であることが示唆された。本分担研究のようなトランスクリプトーム解析によって同定された品質特性候補が真の品質特性であるか否かの評価には、遺伝子オントロジー解析で検出された生理機能において実際にばらつきが存在することを生理学的実験によって示し、そのばらつきが製品の有効性および安全性と関連するか否かに関してさらなる検討を加えていく必要がある。

## E-7 おわりに

本研究では当初計画に見合った成果が得られた部分は数多い。しかし、がん細胞由来細胞株や動物細胞株など、モデル系での評価にとどまっている研究もある。そのような研究に関しては、製品として臨床応用されるヒト細胞を用いた評価を行う必要がある。また、免疫原性評価のための動物モデル開発に関してはまだ基盤技術が完成した段階(基礎的な技術検討段階)であり、更なる進展が望まれる。細胞組織利用医薬品の開発は急速に進んでいるが、その恒常的な品質・安全性・有効性を担保するための製造方法の妥当性の確認や、特性解析データ等に基づいた規格試験法の設定については依然として未知・未経験な要素が多い。細胞組織利用医薬品の安全性・品質確保のためには、さらなる高感度ウイルススクリーニング法の開発や高感度腫瘍原性検出法の開発等を通じ、製造方法の評価法および規格試験法に盛り込むべき純度・細胞特性・生物活性等について、より深い検討が必要と考えられる。

## F. 健康危険情報

遺伝子組み換え実験については、研究開発等に係る遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令並

びに国立医薬品食品衛生研究所「遺伝子組換え安全管理規則」に則って実施した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Ng MK, Wu J, Chang E, Wang BY, Katzenberg-Clark R, Ishii-Watabe A, Cooke JP. A central role for nicotinic cholinergic regulation of growth factor-induced endothelial cell migration.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(1):106-12.

山口照英

ヒト細胞治療薬の品質と安全性確保について.

*Bio Clinica.* 2007;27:67-74.

Ishii-Watabe A, Kanayasu-Toyoda T, Suzuki T, Kobayashi T, Yamaguchi T, Kawanishi T.

Influences of the recombinant artificial cell adhesive proteins on the behavior of human umbilical vein endothelial cells in serum-free culture.

*Biologicals.* 2007;35(4):247-57.

Yamaguchi T, Uchida E.

Regulatory aspects of oncolytic virus products.

*Curr Cancer Drug Targets.* 2007;7(2):203-8.

Sakurai F, Kawabata K, Mizuguchi H.

Adenovirus vectors composed of subgroup B adenoviruses.

*Curr Gene Ther.* 2007;7(4):229-38.

川端健二・櫻井文教・水口裕之

改良型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子デリバリー

*Drug Delivery System* 2007;22(2):148-54.

山口照英、内田恵理子

日米EU医薬品規制調和国際会議遺伝子治療専門家会議の活動と遺伝子治療薬の規制における国際動向。

*Drug Delivery System* 2007;22-6:651-9.

Sakurai F, Akitomo K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H.

Downregulation of human CD46 by adenovirus serotype 35 vectors.

*Gene Ther.* 2007;14(11):912-9.

Murakami S, Sakurai F, Kawabata K, Okada N, Fujita T, Yamamoto A, Hayakawa T, Mizuguchi H.

Interaction of penton base Arg-Gly-Asp motifs with integrins is crucial for adenovirus serotype 35 vector transduction in human hematopoietic cells.

*Gene Ther.* 2007;14(21):1525-33.

Watanabe T, Tobe K, Nakachi Y, Kondoh Y, Nakajima M, Hamada S, Namiki C, Suzuki T, Maeda S, Tadakuma A, Sakurai M, Arai Y, Hyogo A, Hoshino M, Tashiro T, Ito H, Inazumi H, Sakaki Y, Tashiro H, Furihata C.

Differential Gene Expression Induced by Two Genotoxic N-nitroso Carcinogens, Phenobarbital and Ethanol in Mouse Liver Examined with Oligonucleotide Microarray and Quantitative Real-time PCR.

*Genes and Environment.* 2007;29:115-27.

Mizuguchi H, Funakoshi N, Hosono T, Sakurai F, Kawabata K, Yamaguchi T, Hayakawa T.

Rapid construction of small interfering RNA-expressing adenoviral vectors on the basis of direct cloning of short hairpin

RNA-coding DNAs.

*Hum Gene Ther.* 2007;18(1):74-80.

Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Oshizawa T, Yamaguchi T.

A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133-positive cells.

*J Biol Chem.* 2007;282(46):33507-14.

Nishida M, Onohara N, Sato Y, Suda R, Ogushi M, Tanabe S, Inoue R, Mori Y, Kurose H.

Galpha12/13-mediated up-regulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through nuclear factor of activated T cells activation.

*J Biol Chem.* 2007;282(32):23117-28.

Kanayasu-Toyoda T, Suzuki T, Oshizawa T, Uchida E, Hayakawa T, Yamaguchi T.

Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase C $\alpha$  in neutrophilic differentiation cells.

*J Cell Physiol.* 2007;211(1):189-96.

Hashii N, Kawasaki N, Nakajima Y, Toyoda M, Katagiri Y, Itoh S, Harazono A, Umezawa A, Yamaguchi T.

Study on the quality control of cell therapy products. Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry.

*J Chromatogr A.* 2007;1160(1-2):263-9.

Koizumi N, Yamaguchi T, Kawabata K, Sakurai F, Sasaki T, Watanabe Y, Hayakawa T,

- Mizuguchi H.  
Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced IL-6 production.  
*J Immunol.* 2007;178(3):1767-73.
- Niimi S, Harashima M, Hyuga M, Yamguchi T.  
Study of hepatocytes using RNA interference.  
*J Organ Dysfunction.* 2007;3:164-82.
- Kawai H, Suzuki T, Kobayashi T, Ishii-Watabe A, Sakurai H, Ohata H, Honda K, Momose K, Hayakawa T, Kawanishi T.  
Caspase cascade proceeds rapidly after cytochrome c release from mitochondria in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death.  
*J Pharmacol Sci.* 2007;103(2):159-67.
- Uchida E, Kogi M, Oshizawa T, Furuta B, Satoh K, Iwata A, Murata M, Hikata M, Yamaguchi T.  
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.  
*J Virol Methods.* 2007;143(1):95-103.
- Sanda T, Okamoto T, Uchida Y, Nakagawa H, Iida S, Kayukawa S, Suzuki T, Oshizawa T, Suzuki T, Miyata N, Ueda R.  
Proteome analyses of the growth inhibitory effects of NCH-51, a novel histone deacetylase inhibitor, on lymphoid malignant cells.  
*Leukemia.* 2007;21(11):2344-53.
- Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M.  
Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells.  
*Mutat Res.* 2007;619(1-2):113-23.
- Shinozaki Y, Sato Y, Koizumi S, Ohno Y, Nagao T, Inoue K.  
Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of c-jun-N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase.  
*Neuroscience.* 2007;147(1):153-63.
- 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 山口照英  
細胞治療薬の品質・安全性評価における糖鎖解析の重要性と LC/MS の応用可能性.  
*News Letter 糖鎖フラッシュ号, Functional Glycomics.* 2007;9:35-41.
- 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹  
薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第7回  
*Pharm Tech Japan.* 2007;23(2):81-87.
- 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹  
薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第9回  
*Pharm Tech Japan.* 2007;23(4):101-9.
- 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹  
薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第12回  
*Pharm Tech Japan.* 2007; 23(8): 85-93.
- 内田恵理子, 川崎ナナ, 宮田直樹  
薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第15回  
*Pharm Tech Japan.* 2007;23(11):93-100.
- 内田恵理子  
遺伝子治療薬開発の現状と品質・安全性確保における国際的動向.  
*Pharmstage.* 2007;7(9):1-5.