

Fig.1 d_5 重水素置換フェニルヒドラゾン糖鎖を内部標準とした定量的糖鎖プロファイリング法

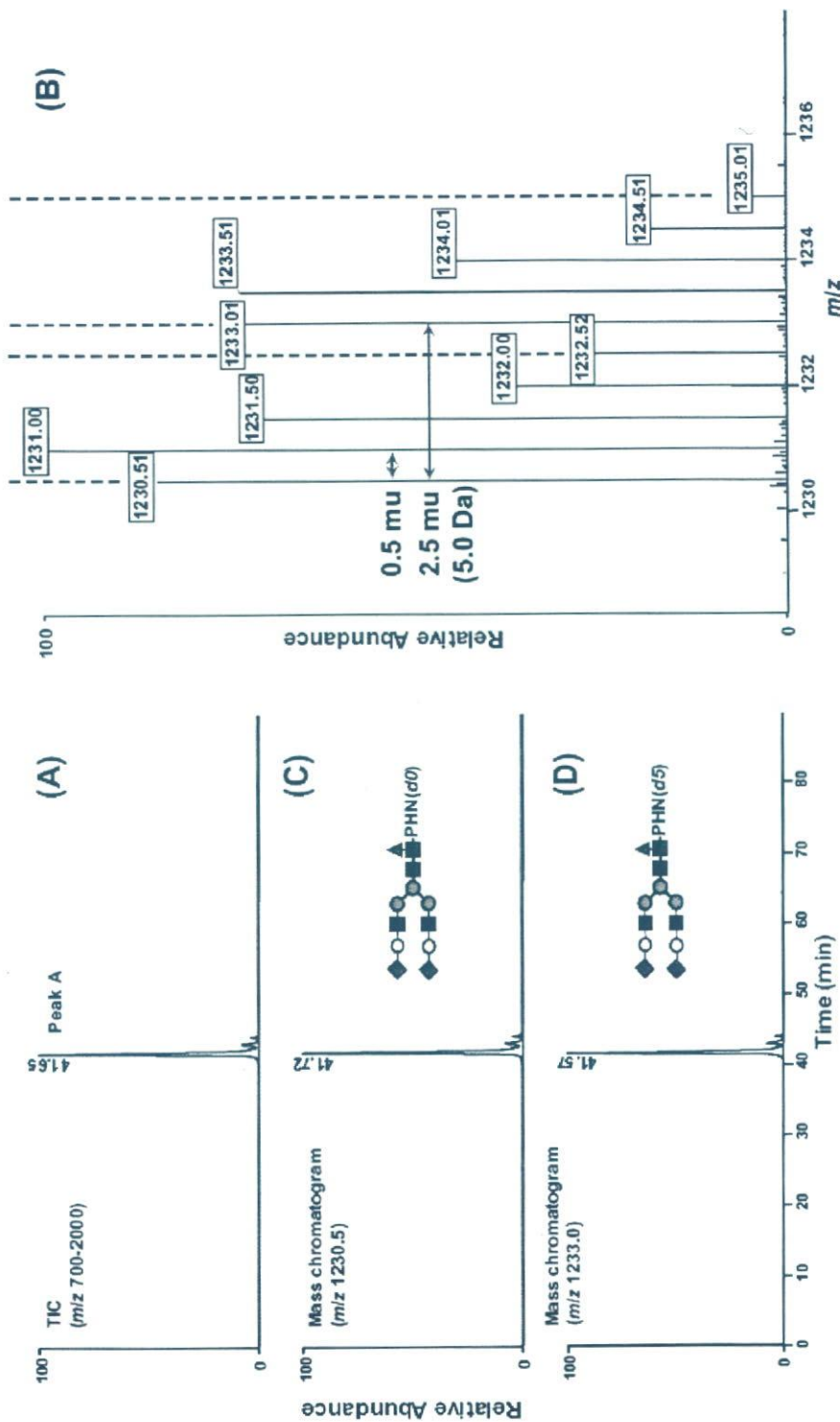


Fig. 2 d_0 -及び d_5 -PHN糖鎖のLC/FTMS. (A), d_0 -及び d_5 -PHN糖鎖の標準ジシアリル2本鎖糖鎖混合物のLC/MSにより得られたTIC; (B), peak A のマススペクトル; (C), d_0 -PHN糖鎖のマスクロマトグラム; (D), d_5 -PHN糖鎖のマスクロマトグラム.

LC: Instrument, NanoFrontier nLC (Hitachi); Column, Hypercarb (0.075 x 150 mm); Trap cartridge, Graphitized carbon cartridge (0.3 x 5 mm), (Flow rate, 200 nL/min; A buffer, 2 % $\text{CH}_3\text{CN}/5$ mM ammonium acetate (pH 9.6); B buffer, 80 % $\text{CH}_3\text{CN}/5$ mM ammonium acetate (pH 9.6); Gradient, 2 – 90 % of B in 60 min; MS: Instrument, LTQ-FT (ThermoFisher Scientific); Ion mode, positive ion.

◆, *N*-アセチルノイラミン酸; ○, ガラクトース; ■, *N*-アセチルグルコサミン; ●, マンノース; ▲, フコース; PHN, フェニルヒドラジン.

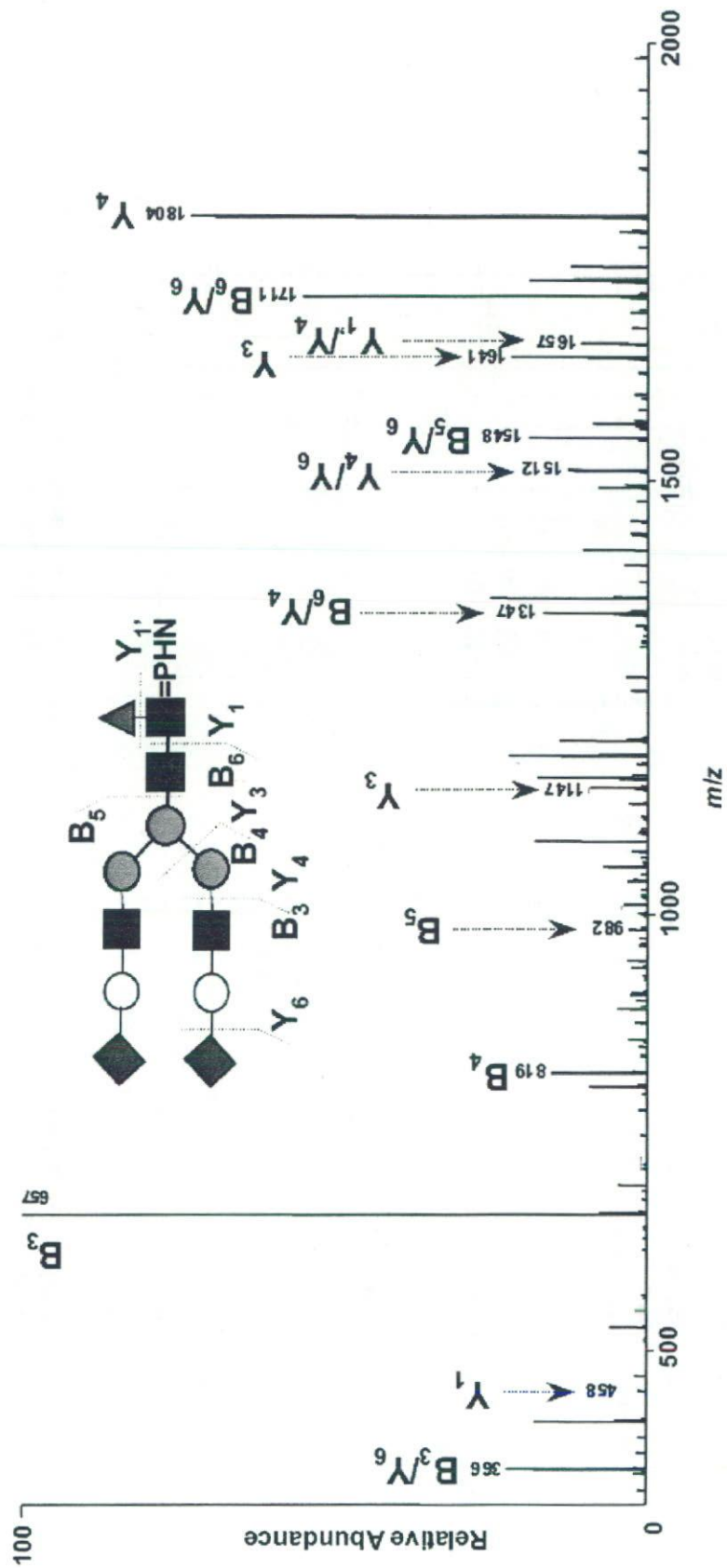


Fig.3 d₀-PHN糖鎖-のMS/MSスペクトル

◆, N-アセチルノイラムミン酸; ○, ガラクトース; ■, N-アセチルグルコサミン; ●, マンノース; ▲, フコース; PHZ, フェニルヒドラジン.

モデル細胞: rapid growth HL-60 細胞

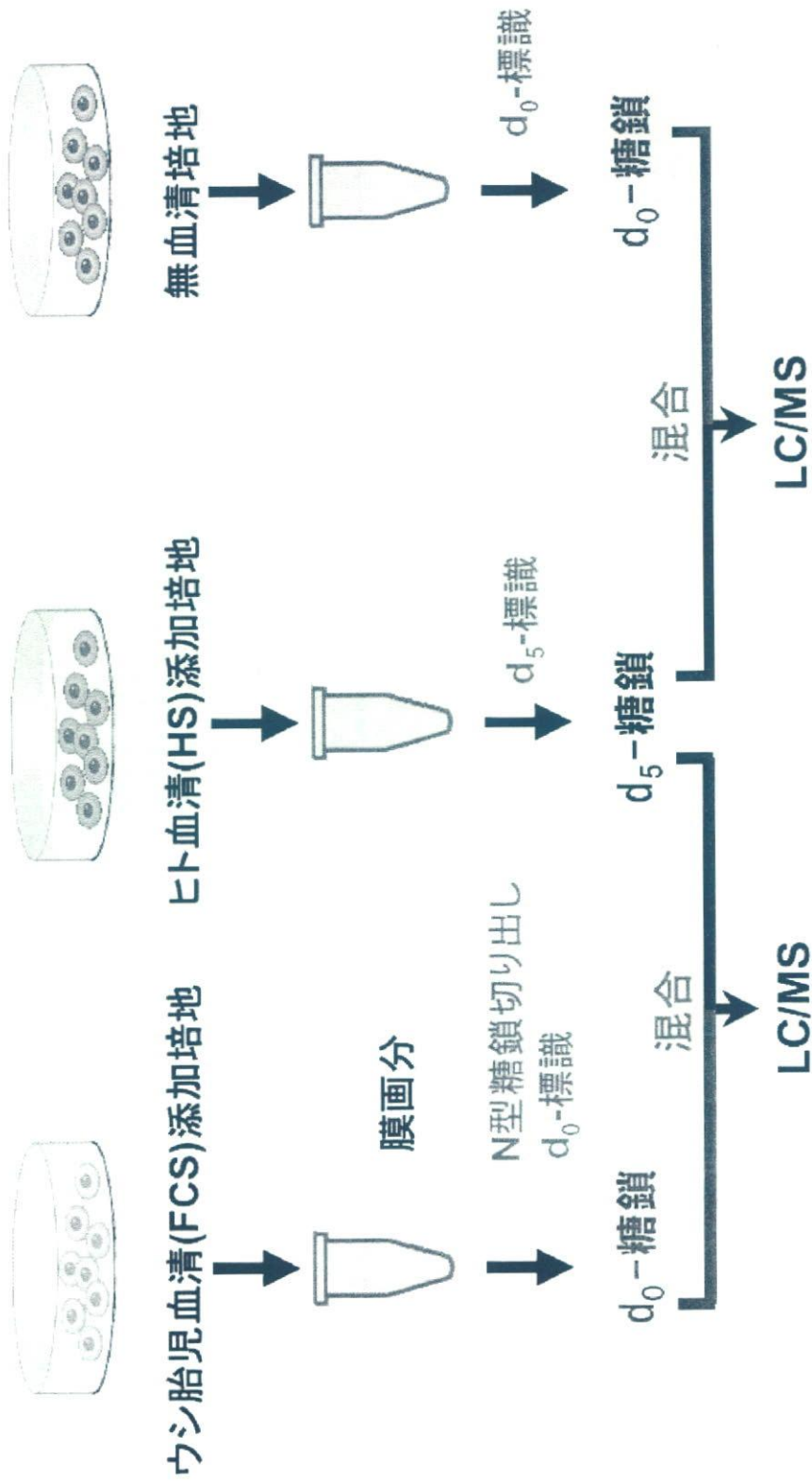


Fig.4 異なる培養条件で培養した細胞の膜画分由来糖鎖の差異解析

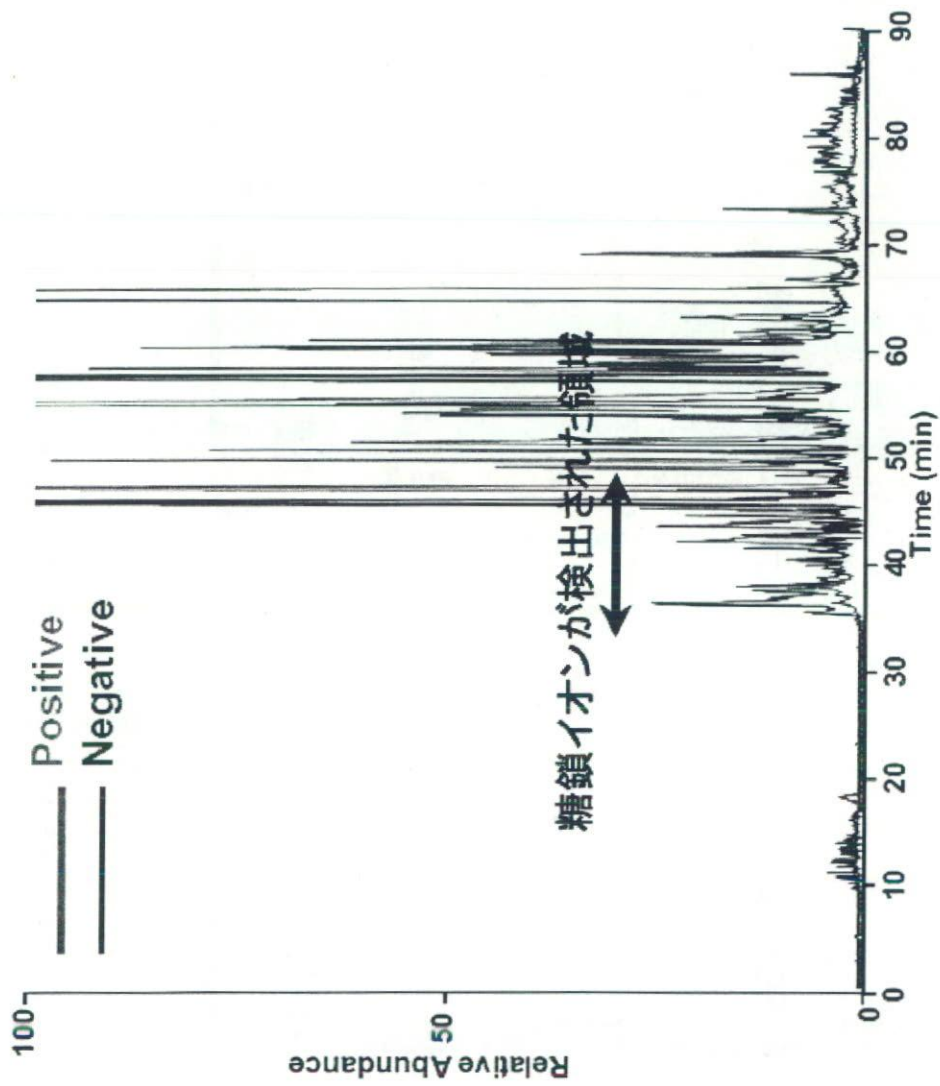


Fig. 5 FCS及びHS添加培地で培養した細胞から調製した d_0 -PHN糖鎖及び d_5 -PHN-HS糖鎖混合試料のLC/MSにより得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC)

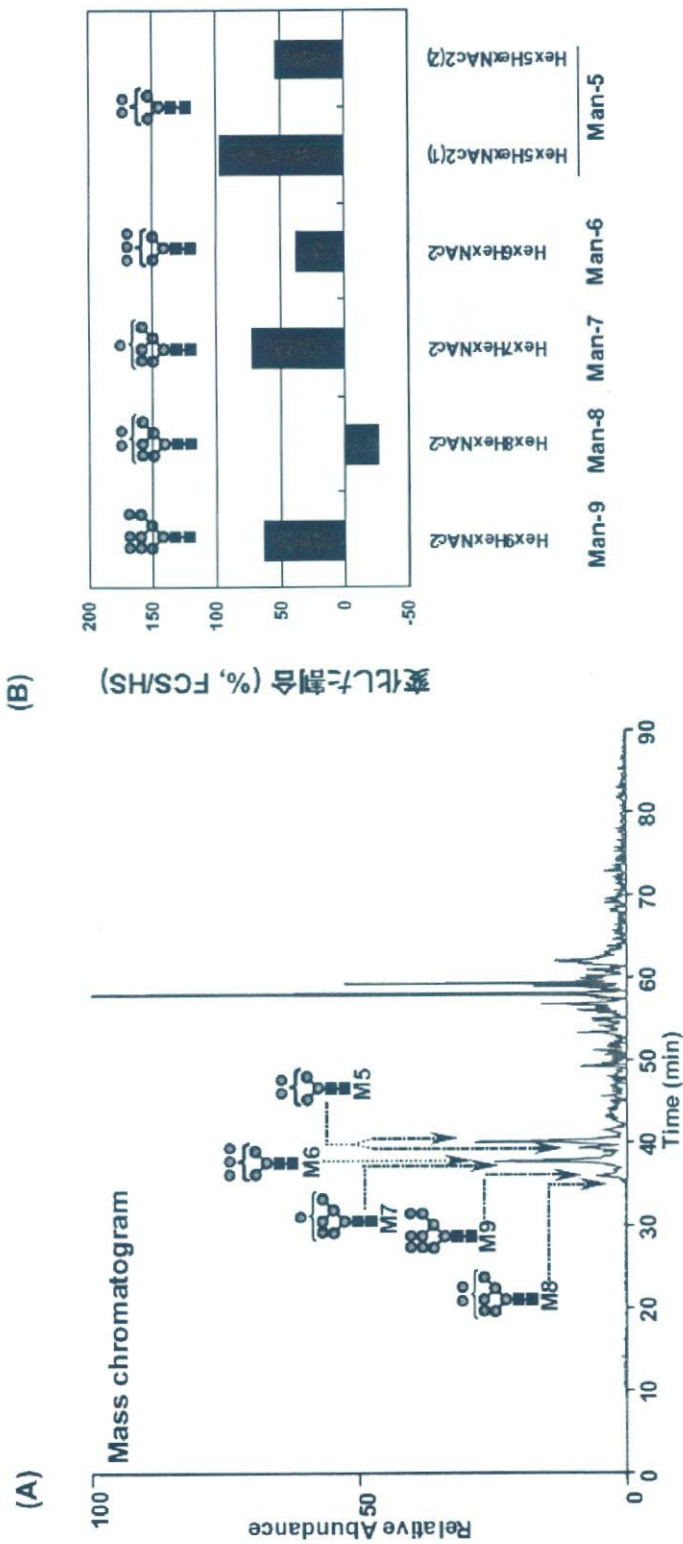
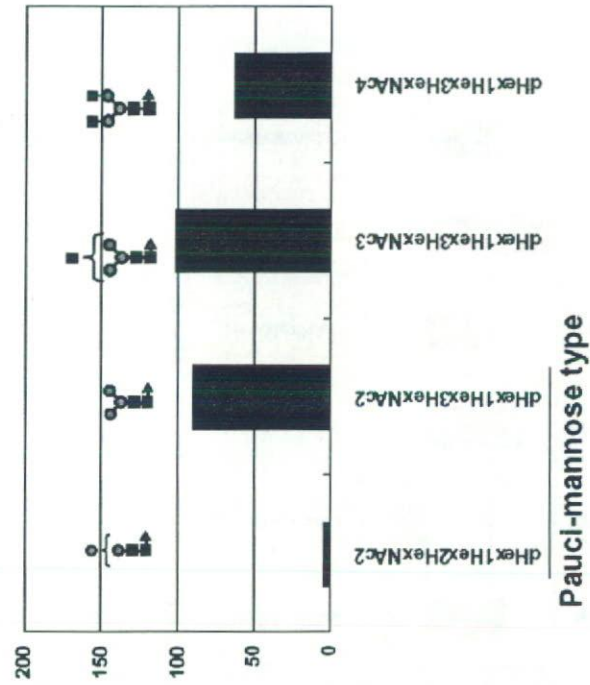


Fig. 6 高マンノース型糖鎖の比較定量解析 (FCS vs HS)

(B)



(A)

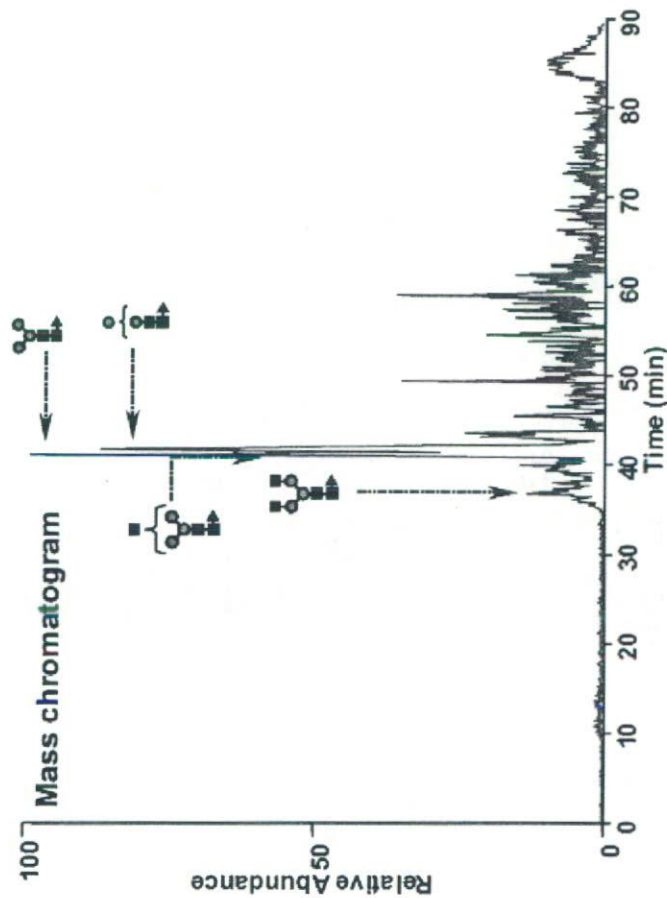


Fig. 7 低分子量糖鎖の比較定量解析 (FCS vs HS)

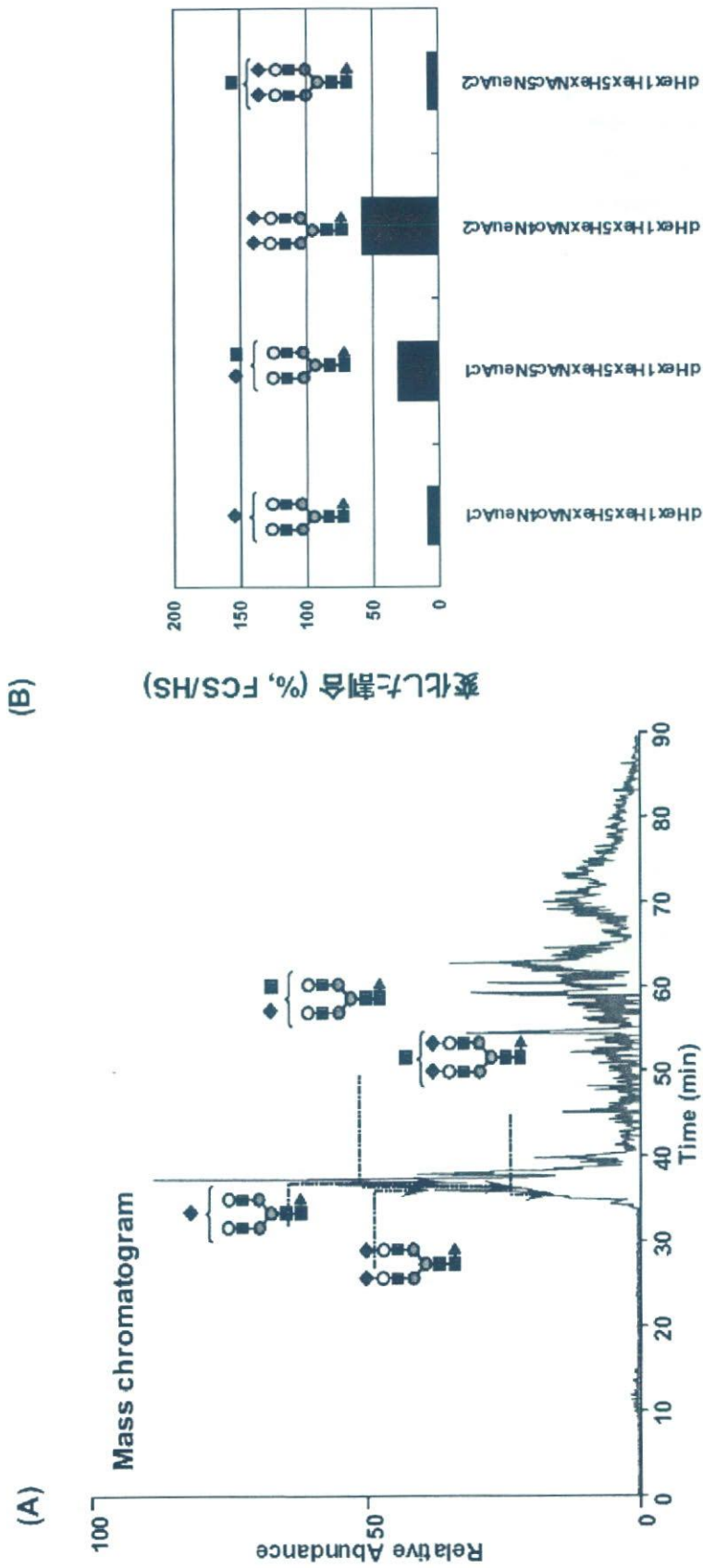


Fig. 8 2本鎖糖鎖の比較定量解析 (FCS vs HS)

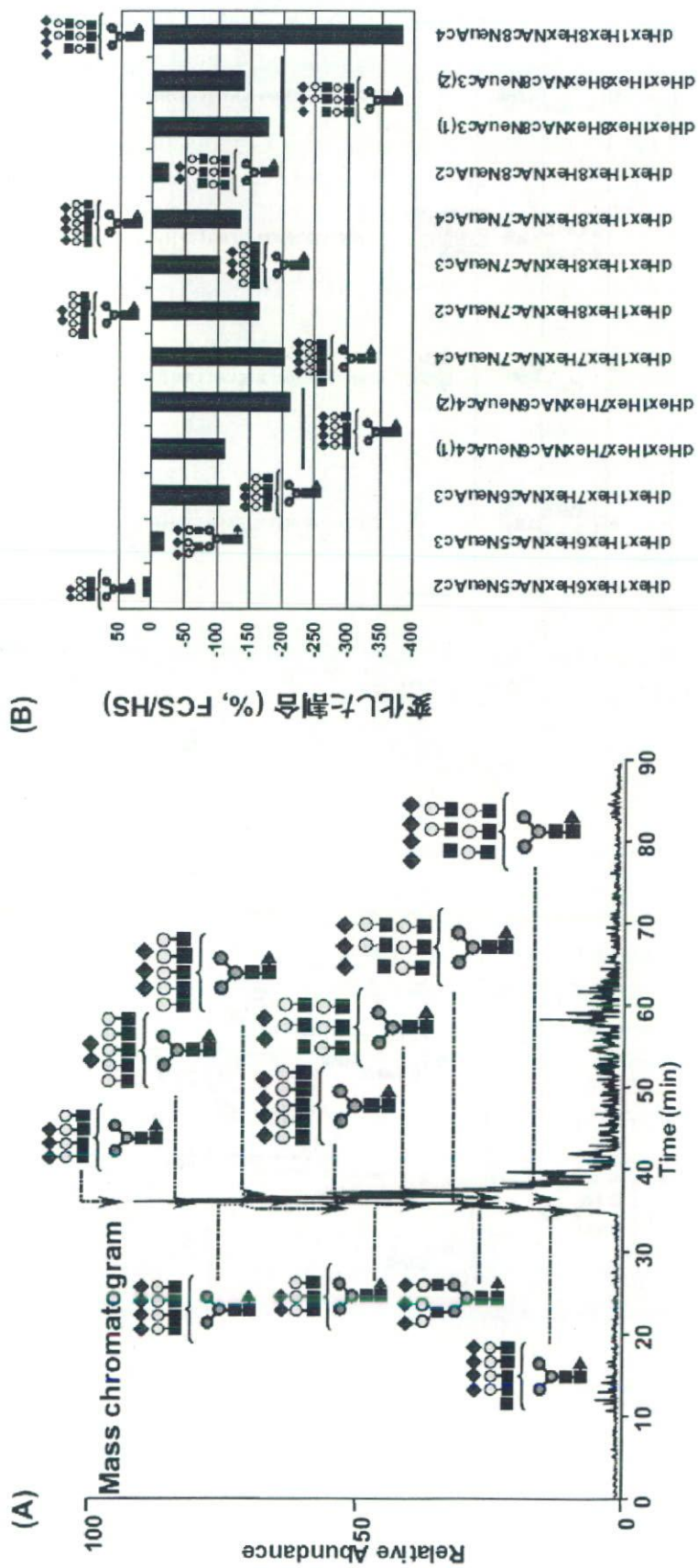


Fig. 9 3及び4本鎖糖鎖の比較定量解析 (FCS vs HS)

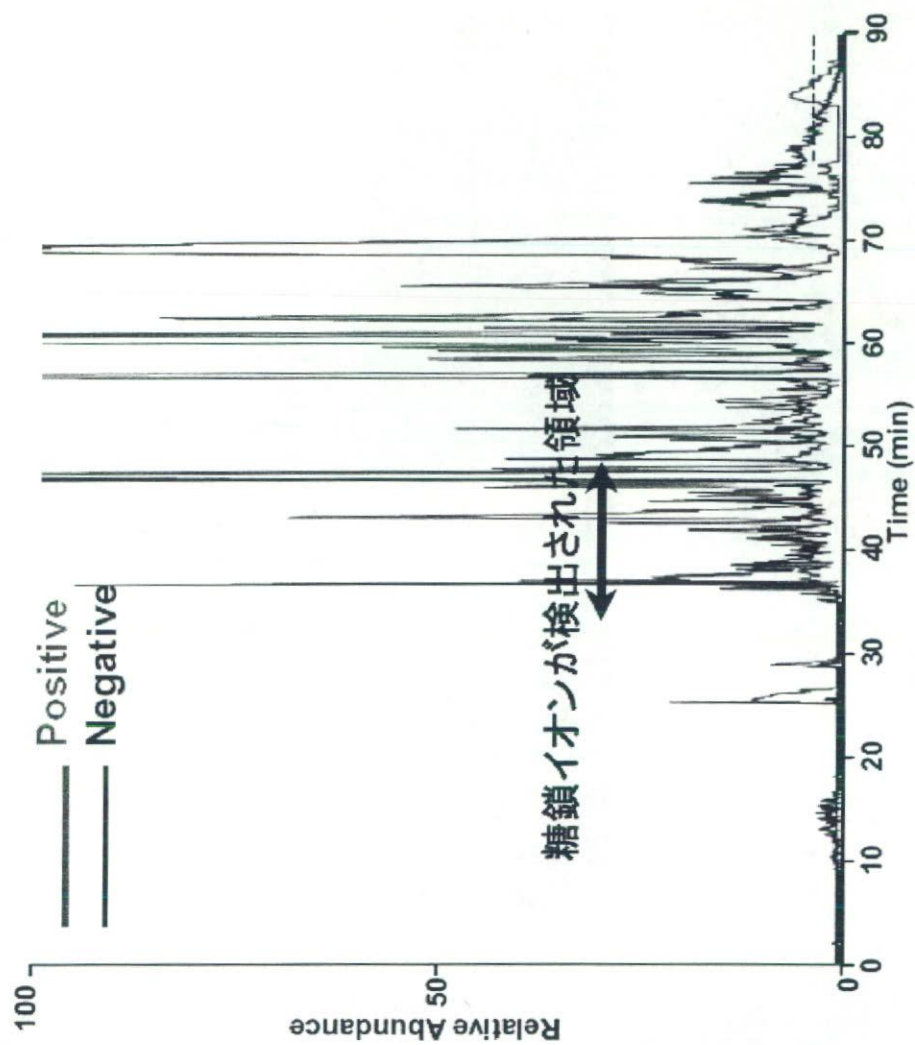


Fig. 11 無血清培地及びHS添加培地で培養した細胞から調製した d_0 -PHN糖鎖及び d_5 -PHN-HS糖鎖混合試料のLC/MSにより得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC)

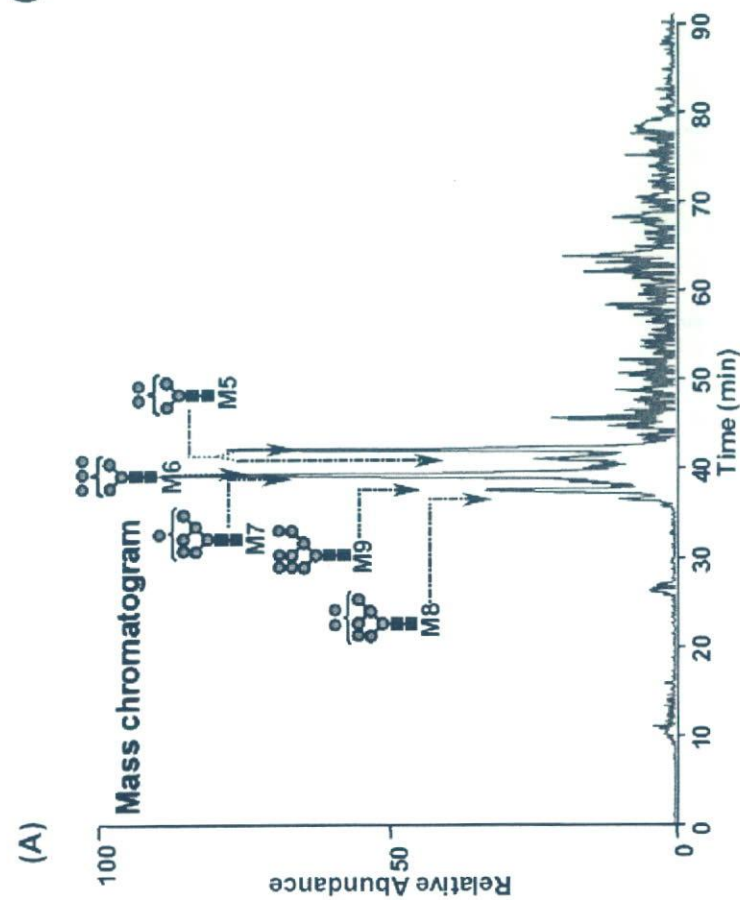


Fig. 12 高マンノース型糖鎖の比較定量解析 (serum free vs HS)

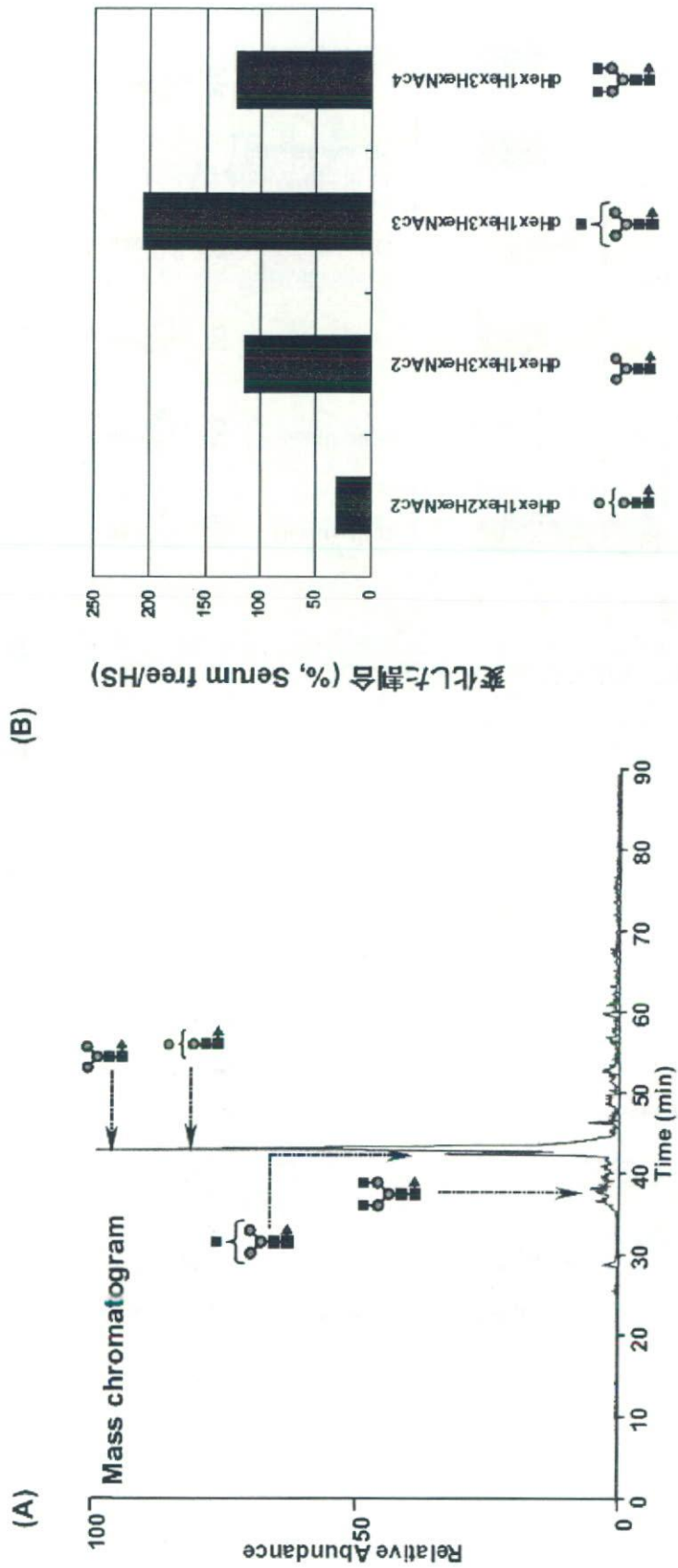


Fig. 13 低分子量糖鎖の比較定量解析 (serum free vs HS)

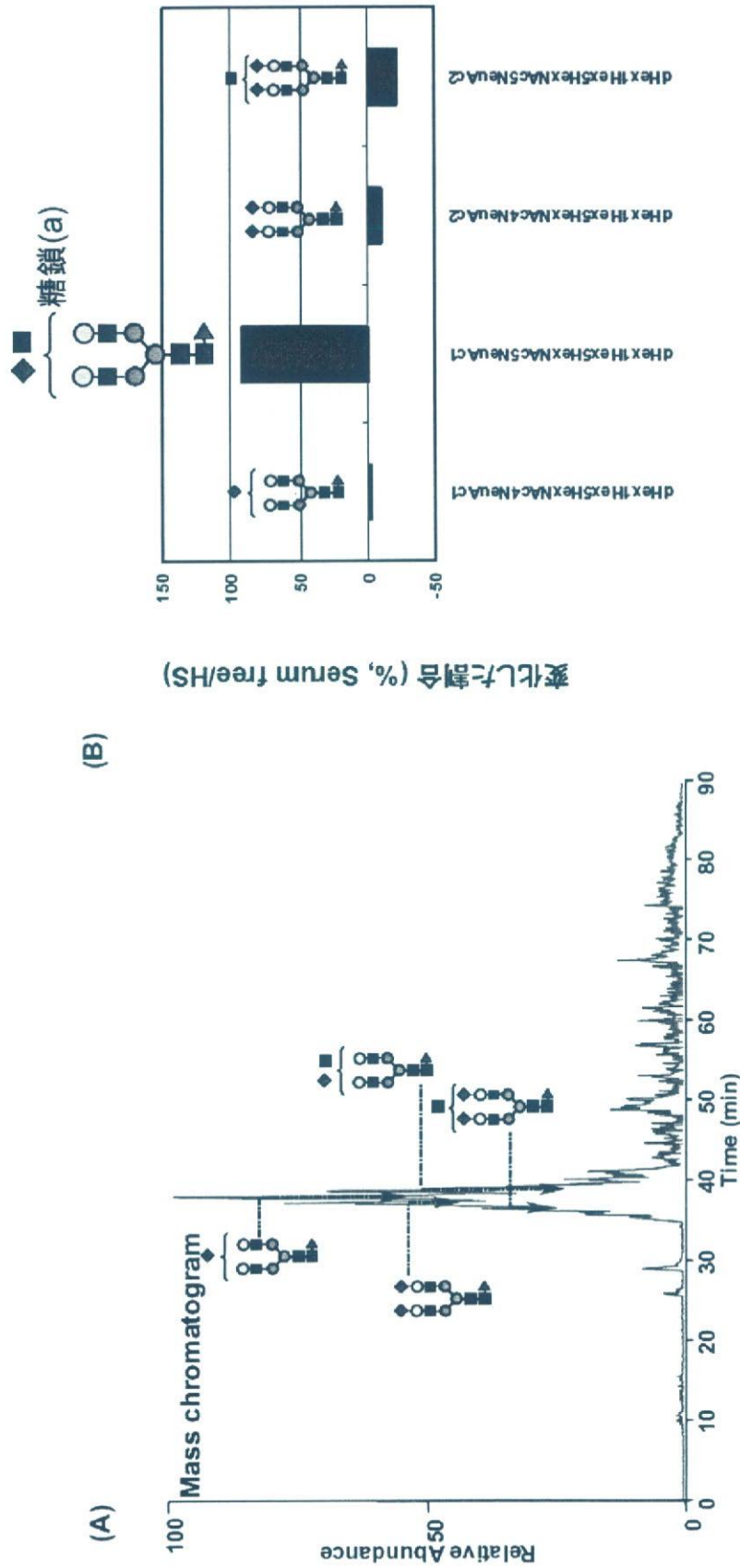


Fig. 14 2本鎖糖鎖の比較定量解析 (serum free vs HS)

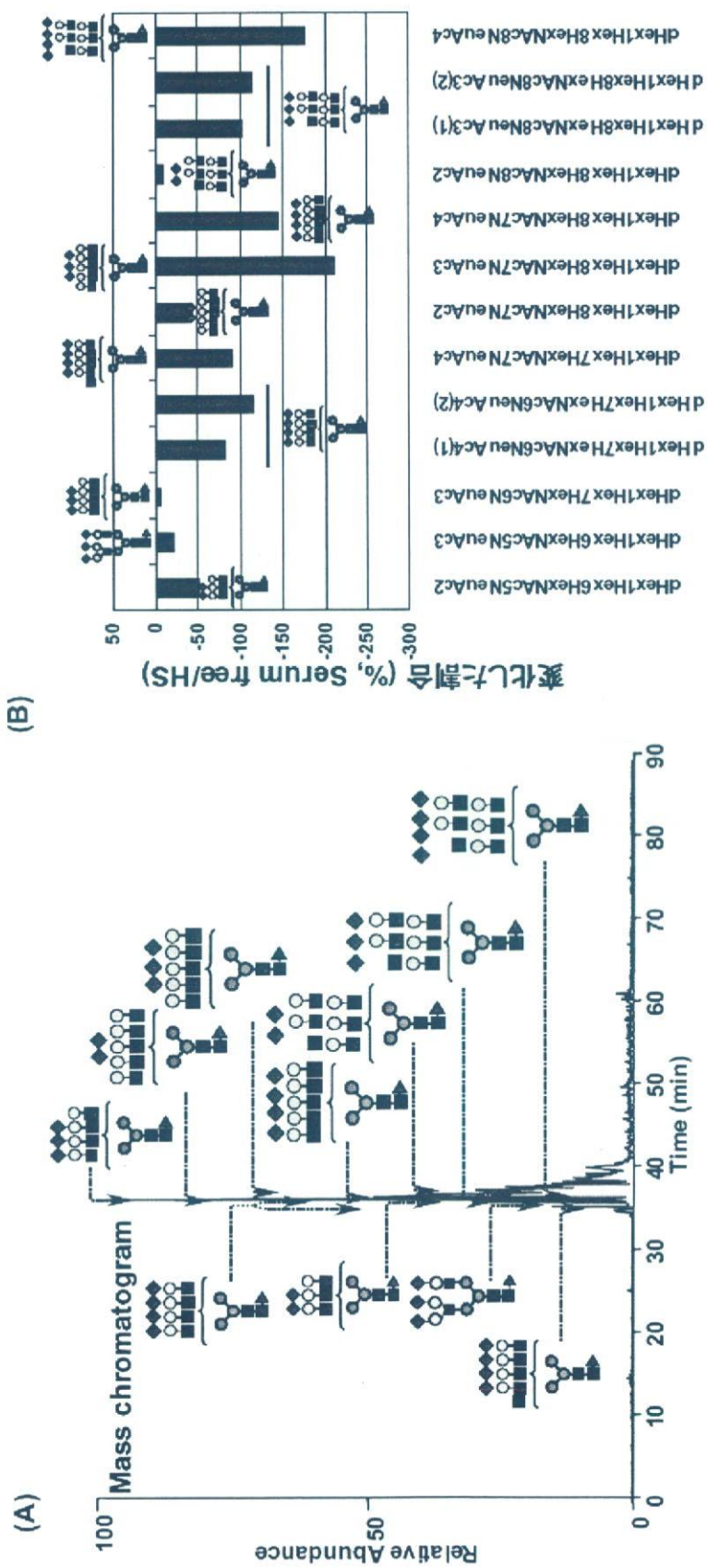


Fig. 16 3及び4本鎖糖鎖の比較定量解析 (serum free vs HS)

分担・研究報告書

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

分担研究者 川端 健二

独立行政法人 医薬基盤研究所

基盤的研究部 遺伝子導入制御プロジェクト 主任研究員

本研究は、ヒト造血幹細胞に対し、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的とする。本年度は、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を導入することにより、以下の結果を得た。

1. ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に対し、抗アポトーシス遺伝子である Bcl-xL の活性増強変異体である Bcl-FNK 遺伝子を導入・発現させることにより、CD34 陽性細胞に抗アポトーシス活性を付与することに成功した。
2. Bcl-FNK を遺伝子導入することにより、CD34 陽性細胞が一定期間培養後も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。
3. 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たところ、移植細胞が骨髄に正着し分化していることを確認した。

分担研究者

川端健二 (独) 医薬基盤研究所
主任研究員

協力研究者

水口裕之 (独) 医薬基盤研究所
プロジェクトリーダー

櫻井文教 (独) 医薬基盤研究所
研究員

穂友絹美代 (独) 医薬基盤研究所
技術補助員

良 正博 (独) 医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科

A. 研究目的

造血幹細胞は、自己複製能ならびに多分化能を有していることから遺伝子治療の重要な標的細胞であるとともに、再生医療・細胞治療の細胞ソースとしても大いに期待されている。造血幹細胞を用いた治療では、造血幹細胞を一旦体外に取り出して遺伝子導入、もしくは培養・増殖させた後、患者に細胞を移植するといった治療法が用いられている。これまで X 連鎖重症複合免疫不全症や白血病などの難治性疾患に対し造血幹細胞を用いた治療の有効性が報告されているが、一方で造血幹細胞の移植効率が低

いために十分な治療効果が得られていないことが明らかになってきた。造血幹細胞移植においては、造血幹細胞の液体培養時を始め、移植し骨髄に生着するまでの過程で様々なストレスを受けるとともに、移植後、骨髄まで十分な細胞数が到達・生着していないことが予想される。そこで本研究では、造血幹細胞への遺伝子導入に優れた 35 型アデノウイルス (Ad) ベクターを用いてヒト造血幹細胞に移植効率を向上させる分子 (骨髄 niche への生着を向上させるような分子など)、もしくはアポトーシスを防ぐ分子 (抗アポトーシス遺伝子) を強制発現させることによって、移植効率の向上が可能か否かを検討することを最終目的とする。本年度は、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 をヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に導入・発現させ、その機能について評価した。

B. 研究方法

B-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 らの方法に従って測定した。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-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) を用いて定法に従って検出した。

B-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. 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-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-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)。

C. 研究結果

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.1)。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.2)。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。