

200706019B (1/2)

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 17 ～ 19 年度 総合研究報告書

1 / 2

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 17－19 年度 総合研究報告書

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 . . . . .	213
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 . . . . .	243
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 . . . . .	279
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 . . . . .	339
川端 健二	
5. 細胞特性解析技術の開発に関する研究 . . . . .	363
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 . . . . .	395
佐藤 陽治	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	441
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ウイルス等感染性因子の高感度検出の確立を目指し、ポリエチレンイミンを結合した磁性粒子（PEI ビーズ）を用いる新規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、定量的 PCR 法や nested PCR 法による測定を用いてその有用性を評価した。その結果、培養液中の各種モデルウイルスの濃縮の最適化条件が明らかとなり、種々のウイルスの濃縮・高感度検出に適用可能であることが示された。また、本法のドナーのウイルススクリーニングへの応用を検討し、細胞組織利用医薬品のウイルス安全性確保上問題となる血液中の A 型肝炎ウイルス（HAV）、C 型肝炎ウイルス（HCV）の高感度検出に適用可能であることを示した。一方、HBV の低濃度キャリアの検出には本法が有用であるが、HBV ウィンドウ期の高感度検出には抗 HBV 抗体と ZnCl<sub>2</sub> によるウイルス濃縮法が有用であることを明らかにした。②細胞の培養過程における遺伝的安定性を染色体レベルで網羅的かつ詳細に調べる目的で、ヒト間葉系幹細胞を例に、大規模一塩基多型（SNP ; single nucleotide polymorphism）解析用 GeneChip を用いた CGH（Comparative Genome Hybridization）法を行い、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。その結果、シグナル強度の比較によりコピー数変化が検出できることが確認でき、微細な染色体欠失や組み換え型の LOH など、従来の染色体解析法では検出できなかった異常の検出に有用であることが明らかとなった。③細胞組織利用医薬品の製造工程由来不純物として懸念されている N グリコシルノイラミン酸（NeuGc）を nano LC/MS を用いて定量する方法を開発し、モデルヒト細胞中に含まれている微量の NeuGc を高感度に定量できることを確認した。また、独自に開発した nano LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法を改良して、微量糖鎖プロファイリング法を開発した。さらに、マウス腎臓細胞をモデル細胞として用いて、微量糖鎖プロファイリング法が、細胞糖タンパク質糖鎖の網羅的解析及び糖鎖抗原特異的解析法として利用可能であることを確認した。また、本分析法を用いて、培養条件の変更により細胞の糖鎖プロファイルが大きく変化することを見出し、細胞糖鎖プロファイルが、細胞の品質特性評価法として利用できることを確認した。さらに、細胞品質評価法として利用することを目的として、重水素置換フェニルヒドラジンを用いた糖鎖の定量的プロファイリング法を開発し、培養条件の異なる細胞を用いて、細胞品質評価法としての有用性を明らかにした。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することを目的とし、ヒト造血幹細胞に対して骨髓 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や抗アポトーシス遺伝子の効果について検討した。種々のプロモーターの効果と比較した結果、CD34 陽性細胞には CA プロモーターを有する 35 型 Ad ベクターが最適であることが明らかとなった。このベクターを用いて Bcl-FNK 遺伝子を導入した CD34 陽性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、低効率ながらも正常に生着していることが示された。したがって、35 型 Ad ベクターは造血幹

細胞の移植効率向上に有用なツールとなることが明らかとなった。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、高効率な誘導法の開発を目的として、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、誘導した EPC 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。その結果、AC133 陽性細胞から誘導される CD31 強陽性細胞が高活性な early EPC であることを明らかにした。early EPC の誘導がトロンボポエチン（TPO）で促進されることを見出し、VEGF と組み合わせることにより高効率に early EPC の誘導を行う方法を確立した。early EPC の特性指標として、IL-8、MCP-1 等の細胞遊走に関わるサイトカイン類や、TPO 受容体 Mpl が有用であることを示した。また、細胞表面抗原、コロニー出現数、増殖、管腔形成能を指標として培地組成の影響を含めて単核球からの OEC（Outgrowth Endothelial Cell）培養条件の最適化を行い、CD45 陰性画分を用いること、培養開始時に hydrocortisone 不含とすること、拡大培養時の血清濃度を 10%に変更すること等により OEC 誘導/拡大の高効率化が可能であることを見出した。遺伝子発現プロファイルの解析により、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生物活性評価技術および品質評価技術を開発するために、遺伝子発現解析用 GeneChip を用いた未分化細胞の分化能予測マーカーの探索および細胞ロット間の品質特性の探索を行い、トランスクリプトーム解析による特性指標探索法の技術要件について検討した。その結果、目的細胞誘導能を評価するための細胞特性指標探索法として、多能性細胞のクローニングにより複数のサブラインを作成した後に、分化誘導前の遺伝子発現プロファイルと分化誘導後の目的細胞への分化効率との間の相関関係を各ライン間で比較する方法が有用であることを明らかにした。また、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を例にして、製品のばらつきの所在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行い、トランスクリプトーム解析が細胞組織利用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を明らかにした。

#### 分担研究者

川西徹	国立医薬品食品衛生研究所・部長	佐藤陽治	国立医薬品食品衛生研究所・室長
石井明子	国立医薬品食品衛生研究所・室長	鈴木孝昌	国立医薬品食品衛生研究所・室長
内田恵理子	国立医薬品食品衛生研究所・室長	川端健二	(独) 医薬基盤研究所・主任研究員
川崎ナナ	国立医薬品食品衛生研究所・室長	水口裕之	(独) 医薬基盤研究所・プロジェクトリーダー

#### 研究協力者

中西真人	(独) 産業技術総合研究所	押澤正	国立医薬品食品衛生研究所
穂友絹美代	(独) 医薬基盤研究所	米須杏子	国立医薬品食品衛生研究所
櫻井文教	(独) 医薬基盤研究所	スツェルハルト	国立医薬品食品衛生研究所
良正博	(独) 医薬基盤研究所・大阪大学	田邊思帆里	国立医薬品食品衛生研究所
村上さやか	京都薬科大学大学院	徳田敬代	国立医薬品食品衛生研究所
佐藤光利	東邦大学	豊田淑江	国立医薬品食品衛生研究所
小木美恵子	金沢工業大学	橋井則貴	国立医薬品食品衛生研究所
岩田明子	埼玉県赤十字血液センター	長谷川哲也	国立医薬品食品衛生研究所・東邦大学

## 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、様々な形での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、3年間を通じて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法の確立を目指して、ポリエチレンイ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、ウインドウ期B型肝炎ウイルス（HBV）については抗HBV抗体とZnCl<sub>2</sub>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)の高感度定量法の開発し、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、フェニルヒドラジン(PHN)の重水素置換体を糖鎖の同位体標識試薬として用いる迅速、高精度な定量的糖鎖プロファイリング法(Fig.35参照)の開発を行った。

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の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、高効率な誘導法の開発を目的として、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生物活性評価および品質評価におけるトランスクリプトーム解析の有用性を検討するために、遺伝子発現解析用 GeneChip を用いた未分化細胞の分化能予測マーカーの探索法および細胞ロット間の品質特性の探索法の開発を行った。

## 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

モデルウイルスとして単純ヘルペス I 型 (HSV-1)、SV-40、アデノウイルス 5 型、ブタパルボウイルス (PPV)、ポリオウイルス sabin 1 型を用いた。

A 型肝炎ウイルス (HAV) は、ATCC (strain HM175/18f) より入手後、FRhK-4 細胞を用いて *in vitro* 培養系で 9-11 日間増幅した培養上清を試料として用いた。

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) 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) の標準品としては、HBV DNA 第 1 次国内標準品 (genotype C, 力価:  $4.4 \times 10^6$  IU/ml) を用いた。また市販の HBV ジェノタイプパネル(BBI Diagnostics; Hepatitis B Virus DNA Genotype Performance Panel PHD201(M))の 1 種類を HBV 陽性血漿として用いた。さらに HBV ジェノタイプパネルとして、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

ポリエチレンイミン (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。

ウイルスの濃縮は、通常、無血清培地 (DMEM) あるいは血清添加培地 (DMEM + 5%FCS) で希釈したウイルス液 1mL もしくは 10mL に PEI 溶液  $100 \mu\text{L}$  (5mg の PEI 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 ビーズ画分または PEI ビーズを添加する前のオリジナルのウイルス液  $100 \mu\text{L}$  の各液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。

#### B-1-3 ウイルスゲノムの定量

抽出したウイルス核酸は TE  $50 \mu\text{L}$  あるいは  $100 \mu\text{L}$  に溶解し、 $10 \mu\text{L}$  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。HAV, 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 の高感度検出を検討する際には 2 段階 PCR を行った。各ウイルスの検出に用いたプライマー、各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 Table 1 に示す。

#### B-1-4 磁気ビーズに固相化する PEI の分子量の検討

3 種類の分子量の異なる PEI (分子量 70,000、10,000、1,800) を磁気ビーズに固相化して用いた。各磁気ビーズを用いて常法によりモデルウイルスを濃縮し、濃縮効率を比較した。

#### B-1-5 ウイルス濃縮時の pH の影響

無血清培地 (DMEM) あるいは血清添加培地 (DMEM + 2%FCS) に pH の異なる Good's buffer を添加し、最終濃度 20mM に調整した。作製した pH4~8 の 5 種類の pH の異なる培地でウイルスを希釈後、常法に従って PEI ビーズによる濃縮を行った。

#### B-1-6 PEI ビーズにウイルスとともに濃縮される血清中のタンパク質の解析

血清添加培地で希釈したウイルス液と PEI ビーズを反応後、PEI ビーズ結合画分を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分画した。PEI ビーズにより濃縮された各バンドを切り出してトリプシンを用いて in gel 加水分解を行った後、抽出したペプチドを MS/MS により解析、同定した。

#### B-1-7 PEI 結合カラムの作成とカラムへのタンパク質の吸着

ブロムシアン活性化セファロース 6MB に PEI を結合させて PEI-セファロース 6MB(PEI-S-6MB)カラムを作成した。IgG 抗体及び IgM 抗体について、1~1.5mg/ml の濃度の溶液を調製し、PEI-S-6MB カラムおよび対照カラ

ムとして PEI を結合していない Glycine-6MB カラムにアプライし、各カラムより得た溶出フラクションの吸光度によりカラムへの吸着の有無を判定した。

#### B-1-8 抗マウス IgG ウサギ IgM 抗体の調製

マウス IgG 抗体をウサギに免疫後、IgM タイターが高くなった 11 日目に採血し、抗マウス IgG-ウサギ抗血清を作成した。抗マウス IgG-ウサギ抗血清はマウス IgG 抗体結合アフィニティーカラムで精製後、PEI-S-6MB カラムにアプライした。PBS(-)を用いて素通り画分を溶出後、1.4M NaCl/50mM HEPES (pH 7.6)を用いてカラム結合画分を溶出し、濃縮した。濃縮した溶液を抗マウス IgG-ウサギ IgM 抗体として用いた。

#### B-1-9 PEI ビーズと IgM 抗体、補体を用いたウイルス濃縮

ポリオウイルスのウイルス液にポリオウイルス Type I に対するマウスモノクローナル抗体 (IgG) を加え、さらに抗マウス IgG-ウサギ IgM 抗体あるいは補体第 1 成分 (C1) と補体第 4 成分 (C4) を添加後、PEI ビーズ溶液 100  $\mu$ L を加え、定法に従い濃縮操作を行った。

#### B-1-10 抗 HBV-IgM 抗体の作成

adr サブタイプ及び adw サブタイプの 2 種類の組換え HBV 表面抗原 (HBVsAg; Advanced ImmunoChemical より入手) を混合してウサギに免疫した。IgM タイターが上昇した免疫 10 日目に採血し、抗 HBVsAg-ウサギ抗血清を得た。抗血清は等量の PBS で希釈後、PEI セファロース 6MB カラムにアプライし、20ml の PBS で素通り画分を溶出後、1.4M NaCl/100mM HEPES (pH 7.0) でカラム結合画分を溶出した。結合画分を回収し、PD-10 カラムで脱塩後、ImmunoPure IgM purification kit (Pierce 社)を用いて IgM を濃縮し、抗 HBV-IgM 抗体として使用した。



### B-1-11 ヒト血液試料からのウイルス濃縮

ヒト正常血漿またはヒト正常血清でウイルスを希釈し、常法に従って PEI ビーズでの濃縮を行った。ヒト正常血漿及びヒト正常血清は Sigma 社で購入したもの、もしくは健康なボランティアから採取したものをを用いた。ヒト正常血清をフィルターろ過する場合は 0.22  $\mu\text{m}$  の PVDF 膜でろ過して使用した。

### B-1-12 HBV の $\text{ZnCl}_2$ による濃縮

HBV パネル血漿 1ml に抗 HBV 抗体 (HBV PreS 抗原をウマに免役し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  $\text{ZnCl}_2$  を 20  $\mu\text{l}$  加えて 10,000rpm 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-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

(株化細胞)

国立医薬品食品衛生研究所、細胞バンク (当時) より入手したヒト前骨髄球系白血病細胞株 HL60 細胞およびその増殖性変異株である HL60-RG 株を使用した。この細胞は既に染色体解析および CGH 法にて解析が行われ、myc 遺伝子の増幅を Double Minute (DM) 染色体および Homologous Staining Region (HSR) として持つことが知られている。なお、分担研究者自身の血液より抽出した DNA を、正常コントロールサンプルとして用いた

(組織幹細胞)

#### ① 骨髄由来間葉系幹細胞

Cambrex 社より入手した正常ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 (hMSC) を使用した。2 継代目にて入手後、間葉系幹細胞培養用基本培地培地 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

エントの状態に継代を続けた。

#### ② 骨格筋筋芽細胞

HSMC 細胞は、2 継代目にて Cambrex 社より入手後、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。

### B-2-3 使用した CGH アレイ

(BAC array)

Macrogen 社にて開発された MAC Array™4K スライドを使用した。これは、Macrogen 社の所有する約 4000 個のヒト BAC DNA クローンをスライドガラス上に duplicate にてスポットティングしたもので、すべての染色体領域を平均 1Mb 以下の間隔でカバーする。

(NANDEMO Array)

HL60 細胞における c-myc 増幅領域の詳細検討のため、アレイ一枚あたり 39 万個のオリゴヌクレオチド (50mer) プローブをカスタムデザイン可能である Nimblegen 社 NANDEMO アレイを用いた。用いたアレイ上のプローブデザインを Table 6 に示す。これまでの BacCGH および SNP アレイを使った解析から、増幅が予想される 8 番染色体 8q24 領域に対して、連続的に 50mer のプローブを配置し、その外側の領域には一定間隔において、プローブを配置した。また、これまでに HL60 細胞とその増殖性の subline である HL60-RG 株との間に変化の見られた染色体領域に関しても、一定間隔で残りのプローブを配置した。このデザインに基づいて、Nimblegen 社にお

いてオリゴマーがアレイ上にデジタルミラーを用いたマスクレス法により固層合成され、カスタムメイドマイクロアレイを得た

(SNP Chip)

ヒト約1万および5万 SNP サイトを網羅した GeneChip® Human Mapping 10K および 50K Array XbaI 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 mismatch 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。

(Agilent oligo CGH アレイ)

また、17 番染色体の詳細解析には、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-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ダイゼーションと染色・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 染色体解析

hMSC23 継代目の凍結保存細胞を再培養し、24 継代目の細胞を用いて Spectral Karyotyping 法による染色体解析および G-banding による染色体解析を、SRL 社に委託解析した。また、コントロールとして 4 継代目の細胞についても、同様に

再培養し、5継代目の細胞を G-banding による染色体解析に供した。

### B-2-9 間期核の FISH 解析

染色体異常が認められた hMSC のカルチャーについて、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を作製し、以下に示した各種 FISH プロブを用いて、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-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 試薬

Le<sup>x</sup> 及び ルイス a (Le<sup>a</sup>) 結合ピリジリアミノ化 (PA) 糖鎖, 及び Le<sup>x</sup> 結合複合型 3 本鎖 PA 糖鎖はタカラより購入した。Rapid Growth HL-60 (HL-60-RG) 細胞 (ヒト前骨髄性白血病細胞) はセルバンクより供与された。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。ウシ胎仔血清 (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。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。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 (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% CO<sub>2</sub>, 37 °C)。セミコンフルエントまで培養した後, その 2 × 10<sup>5</sup> 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。

### B-3-3 マウス腎臓糖鎖の調製

マウス (MRL/MpJ-+/+) 腎臓は日本エスエルシー株式会社より購入した。腎臓から難溶性結合組織を Cell strainer (70mm, BD Biosciences) を用いて除去した後, 組織細胞中に混在する赤血球を NH<sub>4</sub>Cl-Tris 溶液処理により除去した。細胞を 7 M ウレア, 2 M チオウレア, 2% CHAPS, 30 mM Tris-HCl を含む緩衝液に溶解させてタンパク質を可溶化した後, 7 倍量の冷アセトンを加えてタンパク質を沈殿させた。還元カルボキシメチル化したタンパク質 (200 µg) を 200 mM リン酸緩衝液 (500 µl, pH 7.2) に溶解し, PNGase F 処理 (10 unit, 37 °C, 48 時間) により N 結合型糖鎖を切り出した。反応液に冷エタノール (1.2 ml, 終末 70%) を加えてタンパク質を沈殿除去した後, 得られた上清を濃縮, 凍結乾燥により糖鎖を回収し

た。

#### B-3-4 膜画分の調製

洗浄済み細胞 ( $1 \times 10^7$  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  $\mu$ 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  $\mu$ 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-3-5 膜タンパク質の還元アルキル化及び糖鎖の切り出し

$1 \times 10^7$  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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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、システイ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 H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O 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-3-6 糖鎖の還元

精製した糖鎖を 1ml の 0.5 M NaBH<sub>4</sub> 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。

#### B-3-7 マウス腎臓由来糖鎖の 2-アミノピリジン (2-AP) 標識

10  $\mu$ l のカップリング試薬 (12.8 M 2-AP-酢酸溶液) を糖鎖に加えて 90°C で 60 分間反応させた。反応液に 10  $\mu$ l の還元試薬 (3.3 M ボランジメチルアミン複合体-酢酸溶液) を加えて 80°C で 60 分加熱して還元した。反応液にトリエチルアミン-メタノール (20  $\mu$ l) 及びトルエン (40  $\mu$ l) を加えた後、窒素気流下減圧乾固した (60°C, 10 分間, 1 回)。過剰の未反応試薬は残渣にメタノール (20  $\mu$ l) 及びトルエン (40  $\mu$ l) を加えた後、窒素気流下減圧除去し (60°C, 10 分間, 2 回)、さらに 50  $\mu$ l のトルエンを残渣に加えた後、窒素気流下減圧乾固した (50°C, 10 分間, 1 回)。得られたピリジルアミノ化 (PA) 糖鎖は Envi-Carb C カートリッジ (Supelco) を用いて脱塩した後、凍結乾燥させた。

#### B-3-8 糖鎖の PHN 標識

$1 \times 10^7$  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  $\mu$ 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 H<sub>2</sub>O の混合溶液を使用した. 反応溶液に 5 µl 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<sup>4</sup> 個細胞/µl).

### B-3-9 NeuAc 及び NeuGc の切り出し及び DMB 標識

膜面分に 250 µl の H<sub>2</sub>O 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/H<sub>2</sub>O (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 H<sub>2</sub>O (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.

### B-3-10 Le<sup>a</sup> 及び Le<sup>x</sup> 結合 PA 化糖鎖の MS<sup>n</sup>

PA 化糖鎖を 1 pmol/µl になるように 10 µM NaCl を含む 50% アセトニトリル/5 mM 酢酸アンモニウム溶液 (pH 9.6) に溶解し, LC/MS に注入した. MS 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, Thermo Fisher Scientific, CA, USA) を使用した. ポジティブイオンモードで流速を 2.0 µl/min に設

定してシリンジによる直接導入法により測定した. スプレー電圧は 2.0 ekV, キャピラリー温度は 200°C, MS<sup>n</sup> の衝突エネルギーは 20-30% に設定した.

### B-3-11 マウス腎臓から調製した PA 化糖鎖の LC/MS<sup>n</sup>

LC は Magic 2002 system (Michrom BioResource, CA, USA) を使用した. カラムはグラファイトカーボンカラム (Hypercarb, 0.2×150 mm, 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 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6) (A 溶媒), 及び 80% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6) (B 溶媒) を使用した. PA 化糖鎖は流速 2 µl/min で 10-70% (60 分) のグラジエント条件で溶出した. また糖鎖分子由来のイオンをナトリウムアダクトにするためにポストカラム (10 µM NaCl 溶液, 流速 2 µl/min) を使用した. MS 装置は nanoESI を接続した LTQ-FT を使用した. キャピラリー温度は 200°C, スプレー電圧は 2.0 ekV, MS<sup>n</sup> の衝突エネルギーは 25%, スキャン範囲は *m/z* 750-2,000 に設定した.

MS<sup>n</sup> の測定は, 以下の方法により行なった.

- ① MS<sup>1</sup> : Full scan (positive ion mode)
- ② MS<sup>2</sup> : Data-dependent scan (positive ion mode)
- ③ MS<sup>3,4</sup> : Target ion scan (positive ion mode)  
MS<sup>3</sup> : *m/z* 534  
MS<sup>4</sup> : *m/z* 388

### B-3-12 nanoLC/ESI-FTMS

#### B-3-12-1 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) 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  $\mu$ l で 10-90 % B 緩衝液 (20 分) のグラジエント条件で溶出した。DMB-NeuAc 及び DMB-NeuGc の分析は、nanoESI (AMR) を接続した ITMS-FTMS 装置 (LTQ-FT) 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  $^{\circ}$ C, スプレー電圧は 1.8 ekV, スキャン範囲は  $m/z$  400-450 に設定した。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 セッティングの値は  $5E+04 \sim 5E+06$  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。

#### B-3-12-2 HL60-RG から調製した還元化糖鎖のプロファイリング

ナノ液体クロマトグラフィー (nanoLC) は Paradigm MS4 (Michrom BioResource) を使用した。MS 装置は nanoESI (AMR) を接続した ITMS-FTMS 装置 (LTQ-FT) を使用した。カラムはグラファイトカーボンカラム (HyperCarb, 0.1 x 150 mm, 5  $\mu$ ) を用いた。溶離液として、2% アセトニトリルを含む 5mM AcONH<sub>4</sub> 溶液 (pH 9.6, A 溶媒) 及び 80 % アセトニトリルを含む 5mM AcONH<sub>4</sub> 溶液 (pH 9.6, B 溶媒) を使用した。還元化糖鎖は流速 0.4  $\mu$ l, 10-40 % B 緩衝液 (60 分) のグラジエント条件で溶出した。測定はポジティブ及びネガティブイオンモードで行った。キャピラリー温度は 275  $^{\circ}$ C, スプレー電圧は 1.8 ekV, スキャン範囲は  $m/z$  800-2000 に設定した。MS<sup>n</sup> の コリジョンエネルギーは 35% に設定した。

#### B-3-12-3 HL60-RG から調製した PHN 標識糖鎖のプロファイリング

nanoLC 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 x 150mm, 5 $\mu$ ) 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 nanoESI (AMR) を接続した ITMS-FTMS 装置 (LTQ-FT) 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 $^{\circ}$ C, スプレー電圧は 2.5ekV, スキャン範囲は  $m/z$  700-2,000 に設定した。MS<sup>n</sup> 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  $\mu$ l ( $4 \times 10^5$  個細胞) の試料溶液を LC/MS に注入した。

#### B-3-13 シアル酸分析法のバリデーション

分析法の直線性は NeuAc 及び NeuGc 標準品を用いて 0.0078-500 pmol の範囲で検討した。分析法の検出限界(DL)及び定量限界(QL)は  $DL=3.3 \cdot \sigma / \text{slope}$  ( $\sigma$ =マスクロマトグラムの平均ノイズ) 及び  $QL=10 \cdot \sigma / \text{slope}$  を用いて算出した。分析法の真度及び精度は、無血清培地で培養した細胞の膜面分に 10 及び 100 fmol の NeuGc を添加した試料を 3 回測定して求めた。真度は回帰直線を用いて計算した NeuGc 量と既知量の比較により示した。精度は NeuGc 添加試料の測定により得られた実測値の相対標準偏差により求めた。

#### B-4 免疫原性の新規評価技術の開発

##### B-4-1 Ad ベクターの作製

5 型ならびに 35 型 Ad ベクターの作製は improved *in vitro* ligation 法により行った。シヤトルプラスミド pHMCMV5 のマルチクローニングサイトに Enhanced Green Fluorescence Protein (GFP) 遺伝子を挿入した pHMCMV-GFP を I-CeuI, PI-SceI で消化し、同酵素で消化した 5 型ならびに 35 型 Ad ベクタープラスミド pAdHM4 および pAdMS4 と Ligation することにより、GFP 発現ベ

クタープラスミド pAdHM4-CMVGFP および pAdMS4-CMVGFP を得た。作製したプラスミドを PacI もしくは SbfI で消化し、Superfect (キアゲン社) を用いて 293 細胞もしくは 35 型 E1B 発現 293 細胞にトランスフェクションすることで GFP 発現 5 型ベクター Ad5GFP ならびに 35 型 Ad ベクター Ad35GFP 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、および鐘ヶ江らの方法に従い測定した。また、各種プロモーターの比較検討においては、pHCMV5 のかわりに各種プロモーターを搭載したシャトルプラスミドを用いた。

ペントンベース・RGD 配列を RGE に置換した 35 型 Ad ベクタープラスミドである pAdMS19、及び RGD 配列を欠損させた 35 型 Ad ベクタープラスミド pAdMS20 は以下のように作製した。シャトルプラスミド pHM5.4 を AscI/EcoRI で処理したフラグメントと、同じく AscI/EcoRI で処理した 35 型 Ad ゲノム (bp7930-21944) のフラグメントをライゲーションすることにより pHM5.4-Ad35-2 を得た。次に、PmeI/AscI/NheI/Bst1107I/Csp45I/PacI/NotI のマルチクローニングサイトを有するシャトルプラスミド pFS4 と pHM5.4-Ad35-2 をそれぞれ SphI/Csp45I で処理したフラグメントをライゲーションし、pFS4-Ad35-1 を得た。さらに、pFS4-Ad35-1 を Bst1107I と Csp45I で切断したフラグメント (35 型 Ad ゲノムの 14409 bp -15544 bp を含む) と、pFS4 を Bst1107I と Csp45I で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-2 を作製した。そして、pFS4-Ad35-2 を PvuII/PstI 処理したフラグメントと、ペントンベース・RGD 配列付近をコードした合成オリゴ DNA

(5' -CTGCTGCAGAAGCTAAGGCAAACATAGTTGCCAGCGAC

TCTACAAGGGTTGCTAACGCTGGAGAGGTCAGAGGAGAGAATT TTGCGCCAACACCTGTTCCGACTGCA-3' ,  
5' -GTCGGAACAGGTGTTGGCGCAAATTCTCTCTCTGACC TCTCCAGCGTTAGCAACCCTGTAGAGTCGCTGGCAACTATGT TTGCCTTAGCTTCTGCAGCAG-3'、アンダーラインは RGE 配列に変更した部分) をライゲーションすることにより pFS4-Ad35-5 を作製した。次に、pFS4-Ad35-5 と pFS4-Ad35-1 を SphI と PvuII で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-6 を得た。pFS4-Ad35-7 は、pFS4-Ad35-6 と pHM5.4-Ad35-2 をそれぞれ I-CeuI/B1pI 処理した後ライゲーションすることによって作製した。さらに、pFS4-Ad35-7 を SgrAI と PacI で切断したフラグメントと、pHM5.4-Ad35-2 を SgrAI と PacI で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-9 を得た。そして最後に、pFS4-Ad35-9 を AscI/PacI で切断したものと Bst1107I で消化した pAdMS18 を混和させ、大腸菌 BJ5183 株にエレクトロポレーションし、大腸菌中での相同組み換えによりプラスミド pAdMS19 を得た。pAdMS20 も pAdMS19 と同様の手順で作製した。尚、pAdMS20 作成の際に使用した合成オリゴ DNA の配列は以下の通りである。

5' -CTGCTGCAGAAGCTAAGGCAAACATAGTTGCCAGCGACT CTACAAGGGTTGCTAACGCTGGAGAGGTCAATTTTGGCGCCAAC ACCTGTTCCGACTGCA-3'

5' -GTCGGAACAGGTGTTGGCGCAAATTGACCTCTCCAG CGTTAGCAACCCTTGTAGAGTCGCTGGCAACTATGTTGCCTT AGCTTCTGCAGCAG-3'

Green fluorescence protein (GFP) 発現 35 型 Ad ベクターは以下のように作成した。pHCMAGFP を I-CeuI および PI-SceI 処理したフラグメントと、pAdMS18 を I-CeuI および PI-SceI 処理したフラグメントをライゲーションし、pAdMS18-GFP を

得た。そして、pAdMS18-GFP を Ad ゲノムの両末端に存在する制限酵素 SbfI で消化することにより線状にし、SuperFect Transfection Reagent (キアゲン社より入手) を用いて 60 mm 培養ディッシュに播種した 293E1B 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後約 10 日間培養し、GFP 発現 35 型 Ad ベクター-Ad35GFP を得た。ペントンベース・RGD 配列を RGE (Arg-Gly-Gln) に改変した 35 型 Ad ベクター-Ad35RGEGFP および RGD 配列を欠損させた 35 型 Ad ベクター-Ad35・RGDGFP は、ベクタープラスミド pAdMS19 および pAdMS20 を用いて Ad35GFP を同様に作製した。

Cytomegalovirus enhancer/chicken  $\gamma$ -actin promoter (CA) プロモーターを含むシャトルプラスミド pHMCA5 のマルチクロー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 35 型 E1B 発現 293 細胞の作製

35 型 Ad の E1B-55K 遺伝子を含む 1911-3413 塩基からなるフラグメントは、35 型 Ad ゲノムの

1-7930 塩基からなるフラグメントを有するプラスミド pFS2-Ad35-1 を鋳型としてプライマー 1 (5' -GAT AAA TGG ATC CCG CAG AC-3') とプライマー 2 (5' -CCC AAT ACT CAC CTT AGT CAG-3') を用いて PCR を行い作製した。このフラグメントを pEF/myc/nuc (Invitrogen 社) のマルチクローニングサイトに挿入することで、pEF-Ad35E1B を作製した。このプラスミドを 293 細胞に Superfect を用いてトランスフェクションし、G418 (500  $\mu$ g/ml, Invitrogen 社) 存在下で培養することにより、35 型 Ad の E1B-55K タンパク安定発現 293 細胞を得た。

#### B-4-3 CD34 陽性細胞における Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) ならびに CD46 の発現解析

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞 (Cambrex 社) を抗ヒト CAR 抗体 (RmcB, Upstate Biotechnology 社) を含む staining buffer (1% BSA 含有 PBS) に懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄後、phycoerythrin (PE) 標識された抗マウス IgG 抗体 (Pharmingen 社) を含む staining buffer に懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を洗浄後、フローサイトメーター (FACScalibur flow cytometer; Beckton Dickinson) を用いて解析した。CD46 発現解析においては、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識された抗 CD46 抗体 (E4.3, Pharmingen 社) を用いて同様に解析した。

#### B-4-4 Ad ベクターによる CD34 陽性細胞への遺伝子導入実験

CD34 陽性細胞は、解凍後サイトカイン入り培地 (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, Stem



Cell 社)に懸濁、16-18時間培養した後、 $1 \times 10^4$  cells/wellとなるよう96穴プレートに播種した。その後、同じくサイトカイン入り培地で調製した GFP 発現 5 型ならびに 35 型 Ad ベクターを作用させた。合計 48 時間培養後、GFP の発現をフローサイトメーターにて解析した。

#### B-4-5 ヒストン脱アセチル化阻害剤による遺伝子発現効率の上昇

上記と同様に CD34 陽性細胞を調製、播種した。その後、同じくサイトカイン入り培地で調製した CA プロモーターを搭載した GFP 発現 35 型 Ad ベクターを 6000VP/cell で 6 時間作用させた。同時にヒストン脱アセチル化阻害剤 (HDAC 阻害剤) として FR901228 (アステラス製薬より供与)、および CAY10398 (Cayman 社) を各濃度で 6 時間作用させた。その後、細胞を回収・遠心して 35 型 Ad ベクターおよび HDAC 阻害剤を取り除いた後、再び細胞を培地に懸濁し培養した。合計 48 時間培養後、GFP の発現をフローサイトメーターにて解析した。

#### B-4-6 ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞におけるインテグリンの発現解析

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 陽性細胞を 1% BSA-PBS (staining buffer) に懸濁し各種抗インテグリン抗体を添加後、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を staining buffer で 2 回洗浄後、phycoerythrin (PE) 標識した 2 次抗体 (anti-mouse immunoglobulin specific polyclonal antibody (Pharmingen 社より入手) および anti-rat IgG

(H+L) antibody (Jackson ImmunoResearch 社より入手)) を添加し、氷上で 1 時間インキュベートした後、細胞を staining buffer で 2 回洗浄した。これらの細胞をフローサイトメーターを用いて解析した。抗・v・3 (LM609)、抗・v・5 (P1F6)、抗・5 (P1D6)、抗・1 (P4C10)、抗・2 インテグリン抗体 (P4H9-A11) は Chemicon International 社より、抗・4 インテグリン抗体 (HP2/1) は Immunotech 社、抗・6 インテグリン抗体 (GoH3) は R&D Systems 社より入手した。

#### B-4-7 RGD ペプチド存在下での 35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、4・C、30 分間インキュベートした。次に、RGD または RGE ペプチドを各濃度になるように添加し、4・C、1 時間インキュベートした。その後、Ad35GFP を 3000 VP/cell で作用させ、37・C、3 時間培養後、新鮮培地に置換し 48 時間後の GFP 発現量をフローサイトメーターを用いて検討した。

#### B-4-8 35 型 Ad ベクターのヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への取り込み

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を  $3 \times 10^4$  cells/well で 48 穴プレートに播種し、Ad35GFP、Ad35RGEGFP および Ad35・RGDGFP を 6000 VP/cell で感染させ、37・C、3 時間培養後に細胞を回収した。細胞を冷 PBS で 5 回洗浄した後、35 型 Ad ベクターのゲノム DNA を含む total DNA を DNeasy Tissue Kit (キアゲン社より入手) を用いて回収した。DNA 量を picogreen (Invitrogen 社より入手) で測定した後、total DNA に含まれる Ad ゲノム DNA 量を ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems 社) を用いて測定し

た。測定条件は、25 ng サンプルDNA、0.5 · M プライマーセット、0.16 · M TaqMan probe、25 · L Real-time PCR Master Mix (TOYOBO 社より入手)を含む最終容量 50 · L の混合液を反応させ、95 · C 15 秒、60 · C 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクルの条件で定量した。また、プライマーおよび蛍光標識プローブは 35 型 Ad ベクターの pIX 領域に設定した。配列を以下に示す。

Ad35 pIX-forward ; 5' -TGG ATG GAA GAC CCG TTC AA-3'

Ad35 pIX-reverse ; 5' -CGT CCA AAG GTG AAG AAC TTA AAG T-3'

蛍光標識プローブ ; 5' -FAM-CGC CAA TTC TTC AAC GCT GAC CTA TGC-TAMRA-3'

35 型 Ad ベクターのスタンダードとしては 35 型 Ad ベクターのプラスミド pAdMS4 を用いた。

#### B-4-9 抗インテグリン抗体存在下での 35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、4 · C、30 分間インキュベートした。次に、抗インテグリン抗体を 50 · g/mL で添加し、4 · C、1 時間インキュベートした。その後 Ad35GFP を 3000 VP/cell で作用させ、37 · C、3 時間培養した。新鮮培地に交換の後再度培養し、遺伝子導入 48 時間後にフローサイトメーターを用いて GFP 発現量を測定した。

#### B-4-10 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 · 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-4-11 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-4-12 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-4-13 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-4-14 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  $1 \times 10^5$  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 単核球細胞の分離

細胞を用いた血管再生療法で血管形成が促進される機構としては、投与された細胞集団に含まれる血管内皮前駆細胞の起源となる細胞が局所で分化し、血管形成を促進する因子を放出することや、血管内皮細胞に分化して血管を形成すること等が考えられる。一方、*in vitro* では、血液から単核球あるいは特定の表面マーカーを持つ細胞を分離し、VEGF 等の存在下で培養すると、培養開始 1 週間程度で early EPC、2~3 週間目から late EPC (Outgrowth Endothelial Cells: OEC)

と呼ばれる 2 種類の血管内皮前駆細胞が誘導されることが知られている (Fig.87)。それぞれの細胞の特性に関して詳細は明らかになっていないが、early EPC は血管形成を促進するサイトカイン類を分泌する性質をもち、OEC はそれ自身が管腔形成能を持つ細胞であるとされていることから、*in vivo* においても、early EPC や OEC が血管再生に寄与していると考えられている。

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-5-2 臍帯血あるいは末梢血 AC133 陽性細胞から CD31 強陽性細胞の調製

単核球を 0.5% BSA、2mM EDTA を含む PBS(-) (分離バッファー) で洗浄し、500 $\mu$ l の分離バッファーに再浮遊させた。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 (Milteny Biotec) を用い抗 AC133 抗体・マイクロビーズと 4°C、30 min で抗原抗体反応させた。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、50 ng/ml SCF を含む EBM-2 培地に浮遊させ、タイプ IV コラーゲンでコートした 24 穴のマルチウェルに分注し、1 週間培養した。細胞を回収し、洗浄後、抗 CD31 抗体-FITC (BD Biosciences PharMingen)、抗 CD110 (TPO 受容体) 抗体-APC (BD Biosciences PharMingen)、抗 CD133/2 抗体-PE (Milteny Biotec)、抗 VE-Cadherin (CD144) 抗体-PE (Beckman

Coulter) 等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。なお、すべての検体は 7-amino actinomycin D (7-AAD) で染色し、陽性の細胞は死細胞として、解析の際に除去した。

### B-5-3 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-5-4 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。培養上清中のサイトカインは Bio-Plex サイトカインアッセイのプロトコールに従って測定した。

### B-5-5 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 ( $1 \times 10^6$ ) を、50ng/ml の TPO、50ng/ml の VEGF または両方で刺激した後、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  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ 、pH

7.5、1mM EDTA、5mM EGTA、10mM  $MgCl_2$ 、50mM  $\beta$ -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-5-6 単核球画分からの血小板除去

5 容量の Optiprep (AXIS SHILD 社製) と 22 容量の希釈液 (0.85% NaCl, 20mM HEPES-NaOH pH 7.4, 1mM EDTA) を混合して  $\rho=1.063g/ml$  に調整した Optiprep 溶液に、培地に懸濁した単核球を上層した。20°C、350g (1300rpm) で 15 分遠心し、沈澱画分として単核球を回収した。

### B-5-7 血小板の調製

全血を室温、140g (1000rpm) で 10 分間遠心し、Platelet Rich Plasma (PRP) を得た。PRP を 2mM EDTA を含む PBS(-) で 2 倍に希釈して、室温、1500g (3000rpm) で 10 分遠心し、血小板を沈澱として回収。2mM EDTA を含む PBS(-) に懸濁後、再度、室温、1500g (3000rpm) で 10 分間遠心した後、培地に懸濁した。血小板数は自動血球計数装置 SYSMEX F820 を用いて測定した。

### B-5-8 血小板の隔離培養

セルカルチャーインサート (ベクトン・ディッキンソン社製) を用い、血小板を単核球と接触しない条件で添加した場合の影響を検討した。用いたセルカルチャーインサートは、ポアサイズ 0.4  $\mu m$ /ポア密度  $1.6 \times 10^6/cm^2$  のもの、ポアサイズ 0.4  $\mu m$ /ポア密度  $1.0 \times 10^8/cm^2$  のもの、ポアサイズ 0.4  $\mu m$ /ポア密度  $1.6 \times 10^6/cm^2$  で FN コートされたものの、の 3 種類である。

### B-5-9 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