

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-5-10 OEC の免疫染色

OEC の同定を行うため、コロニーをトリプシン・EDTA ではがし、FN コートの 48 マルチウェルに播種した。2 日後、細胞層を洗い、1% パラホルムアルデヒドで固定した。細胞の固定・透過性のため -20°C のエタノールを加えた。1% BSA-PBS(-) でブロッキング後、それぞれの抗体を含む 1% BSA-PBS(-) を添加し、 4°C で抗原抗体反応させた。抗体は抗 lectin-like oxidized-LDL receptor (Lox-1) 抗体、抗 endothelial NO 合成酵素 (eNOS, Cayman Chemical)、抗 kinase insert domain protein receptor (KDR) 抗体 (Santa Cruz 社)、抗 CD11b 抗体 (BD PharMingen)、抗 CD14 抗体 (BD PharMingen)、VE-cadherin 抗体 (BD PharMingen) を用いた。接着した細胞を PBS(-) で洗浄し、抗 IgG 抗体-FITC あるいは抗 IgG 抗体-ローダミンを 4°C 、1 時間反応させた。細胞は共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 で観察した。

B-5-11 OEC 及び HUVEC の IL-8 受容体発現の解析

OEC あるいは HUVEC を非酵素的にはがし、洗浄後、浮遊細胞と抗 IL-8 受容体抗体を 4°C 、30 分で抗原抗体反応させた。細胞を 1% BSA-PBS(-) で洗浄し抗 IgG 抗体-FITC を 4°C 、30 分反応させ洗浄後、フローサイトメーターで解析した。

B-5-12 細胞遊走

細胞遊走はボイデンチャンバー法を用いた。48

穴のマイクロウェルの下室に種々の濃度の IL-8 を含んだ $27 \mu\text{l}$ の 2% EBM-2 培地を加えた。上室には $50 \mu\text{l}$ の OEC の細胞浮遊液を 1 ウェルあたり 2×10^4 /well 個播種した。上室と下室の間に $0.8 \mu\text{m}$ のポアがあるフィルターを用いた。 37°C 、4 時間 CO_2 インキュベーター内で遊走させた後、フィルター上部についた細胞をはがし、遊走してきた下側の細胞を固定・染色し、細胞数を数えた。

B-5-13 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 $300 \mu\text{l}/\text{well}$ 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 (2.35mm^2) にある tube の長さとお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-5-14 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、 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 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 未分化細胞の分化能予測マーカーの探索

B-6-1-1 使用細胞

マウス由来の胚性癌細胞 P19 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) より、P19 細胞由来の細胞株である CL6 細胞は RIKEN Cell Bank より入手した。さらに、この CL6 細胞由来の細胞株である CL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52 は、筆者らによって Fig.116 のようにして作製された。すなわち、マウス α ミオシン重鎖 (α MHC) プロモーターおよびヒト成長ホルモンポリアデニレーションシグナルを組み込んだ pBluescript SK (+) ベクターは Jeffery Robbins 博士 (Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, U.S.A) から供与を受けた。 α MHC プロモーター配列の下流かつヒト成長ホルモンのポリアデニレーションシグナルの上流にある Sall サイトと HindIII サイトの間に pEGFP ベクター (Clontech) 由来の green fluorescent protein (GFP) コード配列を導入したベクターを定法により作製した。このベクター 21.6mg と Neomycin 耐性遺伝子をもつベクターである pcDNA3.1 (+) 2.4 mg を血清および抗生物質を含まない Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification (α MEM, Sigma) 1.5ml に穏やかに希釈した。一方、Lipofectamine2000 (Invitrogen) 60ml を血清および抗生物質を含まない α MEM1.5ml に穏やかに希釈した。Lipofectamine2000 の希釈液を5分間室温で放置

した後、DNA ベクターの希釈液と穏やかに混和し、20分間室温で放置することにより DNA と Lipofectamine2000 との複合体を形成させた。次段落で詳説する基本培地 10ml を用いて CL6 細胞を直径 100mm のディッシュ上で 40~50% のコンフルエンスとなるように培養し、これに DNA と Lipofectamine2000 との複合体希釈液 (計 3ml) を添加することにより DNA をトランスフェクションした。トランスフェクション後 2日経過した時点より Geneticine (G418, Sigma) (濃度 1mg/ml) 存在下で培養し、単一コロニーを単離することにより、Neomycin 耐性遺伝子を含む CL6 細胞サブラインをクローニングした。分化誘導後の GFP の発現を ARVO sx MULTILABEL COUNTER を用いて GFP の蛍光を測定することにより評価したところ、本研究で用いた CL6 のサブラインのうち、心筋細胞分化誘導後に GFP の発現が認められたのは CL6G52 のみであった。

B-6-1-2 細胞の培養法および分化誘導法

未分化な状態での細胞の培養には基本培地を用い、直径 100mm の細胞培養ディッシュ (Falcon または Corning) 上、5%CO₂ 存在下 37°C で、コンフルエントにならないように注意しながら行った。基本培地の組成は、 α MEM に非働化したウシ胎仔血清 (FCS, Lot No. 29080306, Cell Culture Technologies) を 10%、L-glutamine (Sigma) を 2mM、Penicillin-Streptomycin (Gibco) を 100unit/ml の濃度になるようにそれぞれ添加したものである。心筋細胞への分化誘導は、ディッシュ面積に対して 50~70% 程度まで増殖させた未分化な細胞を用いて行った。まず、基本培地を除去し、Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS, Sigma) 5ml で 2回洗浄した。次に、trypsin-EDTA (Gibco) 1ml で細胞全体を軽く濡らして、直ちに除去、5%CO₂ 存在下 37°C で 3分間、その後、室温で 5分弱インキュベートし、分化培地 5ml に懸濁した。この細胞懸濁液を細胞培養容器に分注した後、5%CO₂ 存在下 37°C

で培養し、これを用いて各実験を行った。分化培地は基本培地に dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma) を 1%の濃度になるように添加したものである。

B-6-1-3 培養細胞からの total RNA の抽出

培養細胞からの total RNA の抽出は、SV Total RNA Isolation System (Promega)、RNesay Midi (QIAGEN)、RNesay Mini (QIAGEN)、BioRobot M48 Workstation (QIAGEN) のいずれかを用い、各社のマニュアルに従って行った。RNA サンプルの濃度は 260nm の吸光度を測定することで評価し、260nm の吸光度と 280nm の吸光度の比を指標に純度を確認した。抽出したサンプルは-80°Cで冷凍保存した。

B-6-1-4 心筋組織からの total RNA の抽出

心筋組織からの total RNA の抽出は以下のように行った。まず、9 週齢の雄の C3H/He マウス 4 匹より心室筋を取り出し 1ml Sepazol (Nacalai Tesque) / Heart を加えて Polytron ホモジナイザーを用いてホモジナイズし (氷冷下, 最高速度で 10 秒回転×3 回)、4 匹分を合わせてから 1ml ずつ分注した。次に、クロロホルム 200 μ l/tube を添加し、緩く攪拌した後、室温で 2~3 分放置し、12,000 \times g、4°Cで 15 分間遠心分離した。上層 500 μ l / tube を 500 μ l / tube のイソプロパノールと混ぜて攪拌し、室温で 10 分以上放置し、12,000 \times g、4°Cで 10 分間遠心分離した。上清を除去し、沈殿に 75%エタノールを 500 μ l / tube 加えて攪拌し、7,500 \times g、4°Cで 5 分遠心分離した後、沈殿を風乾 (5 分未満) した。続いて沈殿を DNaseI (H₂O+10 \times buffer + DNaseI [Promega]) 溶液 30 μ l/tube で溶解させ、37°Cで 30 分インキュベーションした。この後、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混合液 (Gibco) を 30 μ l/tube 添加し、緩く攪拌した後、室温で 2~3 分放置し、12,000 \times g、4°Cで 15 分遠心分離した。上層 27 μ l/tube をイソプロパノール 27 μ l/tube と

混ぜて攪拌した後、室温で 10 分以上放置し、12,000 \times g、4°Cで 10 分遠心分離した。沈殿に 75%エタノールを 54 μ l tube 加えて攪拌し、7,500 \times g、4°Cで 5 分遠心分離し、沈殿を風乾した後に、40U/ μ l RNase Inhibitor 入り H₂O (30 μ l/tube) で沈殿を溶解した。濃度が均一になるように 4 本を混ぜて、10 μ l ずつ分注、これらの吸光度 (260nm) を測定することで濃度を測定した。抽出したサンプルは-80°Cで冷凍保存した。

B-6-1-5 分化誘導後の心筋細胞特異的マーカー遺伝子発現の測定

P19 細胞、CL6 細胞、および CL6 細胞サブラインの CL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52 の 6 種類の細胞を分化誘導処理し、6 穴細胞培養用マルチウェルプレート (Falcon) に各細胞株 6 枚ずつ 1 \times 10⁵ cells /well の密度で蒔いた。これを、5%CO₂ 存在下、37°Cで 20 日間培養し、培地は 2 日毎に交換した。分化誘導後、8 日目、12 日目、16 日目、20 日目に SV Total RNA Isolation System (Promega) を用いて、total RNA を抽出した。測定した心筋細胞特異的マーカー遺伝子は、Nkx 2.5、GATA4、MEF2C、 α MHC、 β MHC、MLC2a、MLC2v の 7 種類。これらに加え、各遺伝子の発現量を補正するために、内部標準として 18S rRNA の発現量を測定した。精製した各細胞の total RNA は、測定するマーカーごとに検量線が成り立つ範囲に入るような濃度で希釈した。また、検量線用サンプルとして、B-1-4 項で精製したマウス心筋由来の total RNA を用いた。遺伝子発現の定量のために、TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems) および ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて RT-PCR を行い、PCR の時間経過をリアルタイムで取得した。3~15 サイクルの間に検出されたシグナルからベースラインを設定し、これをもとに増幅が指数関数的に起こる領域でシグナルの閾値を設定した。シグナルの閾値に到達するサイクル数

(Threshold Cycle: Ct 値) を縦軸に、初期の RNA 量の対数を横軸にプロットし、検量線を作成した。目的の遺伝子のサンプルについても、Ct 値を求めることにより検量線からサンプル中の目的の RNA 量を算出した。心筋細胞特異的マーカー遺伝子の RNA 発現量はサンプルの平均値と標準偏差により標準化した後、統計ソフトウェア SYSTAT (SYSTAT Software) により主成分分析し、心筋細胞分化の指標となる主成分を得た。なお、ここで用いたプライマーおよびプローブの配列は Table 14 に示す通りである。

B-6-1-6 分化誘導前における各細胞株の遺伝子プロファイルの取得

P19 細胞、CL6 細胞、および Neomycin 耐性遺伝子を含む CL6 細胞サブラインの CL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52 の 6 種類を分化誘導処理せず、6 穴細胞培養用マルチウェルプレート (Falcon) に 8 枚ずつ 1×10^5 cells/well の密度になるように蒔いた。これを 5%CO₂ 存在下 37°C で培養し、コンフルエントになる前に RNeasy Midi (QIAGEN) で細胞を回収し、その細胞の 6 ウェル分を 1 つにまとめた後、RNA を抽出した。これを RNeasy Mini (QIAGEN) で 2 回精製した後、260nm の吸光度を測定することで濃度を測定し、260nm/280nm の比から純度を確認した。GeneChip (Affymetrix) により遺伝子発現を網羅的に解析するために、まず各細胞株について濃度が高く、かつ純度の高いサンプル 5 個ずつを選択した。Affymetrix 社のマニュアルに従い、各 RNA サンプルから 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 MOE430A (Probe Set 数 22,626) と MOE430B (Probe Set 数 22,511) を用いた。検出された遺伝子からシグナルの高い方から 2% および低い方から 2% を除いた時の、残りの Probe Set の平均値が 500 になるようにスケールした。これに次に示すようなフィルターをかけて、各細胞株の心筋細胞分化能と相関のある遺伝子を検出した。ここで検出された遺伝子を、Cardiomyogenesis Predictor Candidate (CMP) と名づけた。

フィルター①：GCOS で解析された各 Probe Set のシグナルは Absolute Analysis (発現の有無を判定する解析) の結果「発現があるもの:P (Present)」、「発現があるかわからないもの:M (Marginal)」、あるいは「発現がないもの:A (Absent)」として判定がなされる。細胞株各群の 5 例の半数以上 (つまり 3 例以上) で P と判定された Probe Set については、当該細胞株においてその Probe Set がコードする遺伝子が発現していると判断した。逆に各群の 5 例のうち P 判定されたものが 2 例以下の場合は当該細胞株においてその Probe Set をコードする遺伝子の発現はないと判断した。細胞株のうち少なくとも 1 株以上において発現が見られる Probe Set は次のフィルターをかけ、全ての細胞株で発現が見られない Probe Set は棄却した。

フィルター②：一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) で細胞株間の遺伝子発現の平均値の比較を行い、有意水準 5% の条件で帰無仮説が棄却できたもの、すなわち 6 細胞株の中で発現が飛びぬけて多いもしくは少ないものが少なくとも 1 つは存在する結果が出た Probe Set は次のフィルターをかけ、いずれの細胞株間でも有意差が認められなかった Probe Set は棄却した。

フィルター③：細胞株間の遺伝子発現の差の平均値が 50% 以上のあるもの、すなわち 6 細胞株の最

低の平均値と最高の平均値の差が 2.5 倍以上ある Probe Set は次のフィルターをかけ、差が 2.5 より小さいものは棄却した。

フィルター④: GeneChip で得られた各 Probe Set の発現シグナルと自律拍動する小結節出現までの日数、自律拍動する小結節数、定量性リアルタイム RT-PCR によって得られた分化後の心筋遺伝子発現データの第 1 主成分もしくは第 2 主成分との間でスピアマンの順位相関係数を算出、有意水準 5% の条件で有意性を検討し、有意な相関がある Probe Set を抽出した。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、マイクロソフトエクセルを用いて行った。

B-6-1-7 RNAi による CMP 遺伝子の機能阻害

Neomycin 耐性遺伝子を含む CL6 細胞サブラインのうち、最も効率よく心筋細胞に分化する株である CL6G52 を分化誘導処理せず、24 穴細胞培養用マルチウェルプレート (Falcon) に 1×10^4 cells / well となるように蒔いた。これを 37°C、5%CO₂ で一晩培養後、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて各 CMP 遺伝子特異的な Stealth RNAi (Invitrogen) (CMP11 については QIAGEN 社製 siRNA) を導入し、B-6 項において心筋細胞分化能と相関の得られた遺伝子をノックダウンした。まず、各細胞を抗生物質不含の基本培地 500 μ l で 2 回洗浄し、各ウェルに同培地 400 μ l を加えた。次に、1 ウェル当たりの siRNA が 40pmol となるように、蛍光オリゴとして BLOCK-iT (Invitrogen) (最終濃度 10 pmol/well) を含む、OPTI-MEM α Reduced Serum Medium (Gibco) で希釈した。また、ネガティブコントロ

ールとして、Stealth RNAi Negative Control Duplexes (Invitrogen) を同様に希釈した。その後、Lipofectamine 2000 を 1.5 μ l/well となるように、OPTI-MEM α Reduced Serum Medium で希釈し、室温で 5 分インキュベートした。このようにして希釈した siRNA 溶液またはネガティブコントロール溶液 50 μ l と Lipofectamine 2000 溶液 50 μ l を緩やかに混和し、複合体を形成させるために室温で 20 分間インキュベートした。この複合体を 100 μ l ずつ各ウェルに加えて緩やかに振盪しながら混ぜ、5%CO₂ 条件下 37°C で 48 時間インキュベートした。

B-6-1-8 CMP 遺伝子のノックダウン効率の測定

RNAi を行った各遺伝子が、実際にノックダウンされているかどうかについて、定量性リアルタイム RT-PCR を用いて測定した。B-1-7 項に示すように、RNAi を行った後、細胞から RNesay Mini (QIAGEN) または BioRobot M48 Workstation (QIAGEN) を用いて、total RNA を抽出した。これを、検量線が成り立つ範囲に入るように、2ng/ μ l に希釈し、未知サンプルとした。スタンダードサンプルとして、未分化な CL6G52 を直径 100mm の細胞培養ディッシュ (Falcon) でコンフルエントにならないように培養し、これから BioRobot M48 Workstation (QIAGEN) を用いて、total RNA を抽出した。この RNA サンプルについて TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems) および ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて B-1-5 項と同様に RT-PCR を行った。CMP19 については、RNAi 群で遺伝子の検出ができなかったため、予備的な検討において TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems) よりも検出感度が優れていた QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて再度測定した。得られた結果は、18S rRNA の発現値を用いて補正し、各サンプルの補正值をネガティブコントロ

ールの補正值と比較することで、各遺伝子の発現量の変動を解析した。

B-6-1-9 CMP 遺伝子の機能阻害後における心筋細胞分化効率の測定

RNAiを用いて機能阻害を行ったCL6G52を用いて、CMP 遺伝子が心筋細胞への分化効率にどのように影響するかを評価するために、自律拍動する小結節数の計測および心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現を測定した。まず、B-7 項に述べたようにRNAiを行った後、CL6G52細胞を分化誘導処理した。これを5%CO₂条件下37°Cで培養し、2日毎に培地交換および自律拍動する小結節数を計測した。計測された小結節数は、統計ソフトウェアSigmaStat (SYSTAT Software)を用いて、反復測定二元配置分散分析 (Two-Way Repeated Measures ANOVA) で解析した。また、分化誘導後14日目に、RNesay Mini (QIAGEN) またはBioRobot M48 Workstation (QIAGEN)を用いて、細胞からtotal RNAを抽出し、心筋細胞特異的マーカー遺伝子である α MHC、 β MHC、MLC2a、MLC2vの発現を定量した。発現の定量は抽出したtotal RNAを鋳型として、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)を用いてリアルタイム RT-PCR をすることにより行った。

得られた結果は、18S rRNAの発現値を用いて補正し、各サンプルの補正值をネガティブコントロールの補正值と比較することで、各遺伝子の発現量の変動を解析した。ここで用いた、プライマーおよびプローブの配列についてはTable 14に示した。

B-6-2 細胞組織利用医薬品の品質特性の探索

B-6-2-1 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-6-2-2 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-6-2-3 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100g)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-6-2-4 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を探索した。

B-6-2-5 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)

ヒト由来の生体試料に関しては、試料提供者に一切不利益および危険性が伴わない、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに採取された試料を用いた。また、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国立医薬品食品衛生研究所・研究倫理委員会による審査・承認を得た上で研究を実施した。

C. 結果及び考察

C-1 感染性因子の安全性評価技術開発

C-1-1 PEIビーズによるウイルス濃縮の最適化

細胞組織利用医薬品のウイルス安全性確保には、ウイルス等の感染性因子の高感度検出技術の開発が非常に重要である。我々はこれまでPEIビーズを用いたウイルス濃縮法を開発し、広範なウイルスを濃縮可能であること、濃縮したウイルスゲノムを核酸増幅法(NAT)で検出することにより、ウイルスゲノムの高感度検出が可能であることを明らかにしてきた。しかし、PEIビーズを用いたウイルス濃縮法は一部の非エンベロップウイルスには有効でないこと、また濃縮効率が低いウイルスも見られることから、PEIビーズによるウイルス濃縮法の最適化による濃縮効率の向上と濃縮できないウイルスを濃縮できる方法の開発について検討した。

最初に、磁性粒子に結合しているPEIの分子量の違いがウイルスの濃縮効果に及ぼす影響について検討した。分子量70,000、10,000、1,800の3種類のPEIを結合させた磁気ビーズをそれぞれ作製し、モデルウイルスとしてHSV-1の濃縮を試みたところ、分子量70,000のPEIビーズでは非常に高い濃縮効率が得られるが、分子量1,800,

10,000 の PEI ビーズでは濃縮がほとんど見られないことが明らかとなった (Fig.1)。データは示さないが、他のモデルウイルスでも同じ結果が得られた。また、濃縮時の pH がウイルスの濃縮効率に与える影響を検討した。その結果、どのモデルウイルスの場合でも、pH6 付近において最も高い濃縮効率を得られることが明らかとなった (Fig.2 ; 図は SV40 のみ示した)。

次に、PEI ビーズを用いて血清を含む培養液中に存在するウイルスを濃縮する場合に、ウイルスと共に濃縮される分子について検討した。PEI ビーズ結合画分と濃縮前のタンパク質について、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で比較検討した結果、複数のタンパク質が PEI ビーズ上に濃縮されることが見いだされた。そこで、PEI ビーズ上に濃縮された分子を同定するために、濃縮画分を SDS-PAGE により分離後、得られた各バンドを切り出し、トリプシンを用いて加水分解した後、各分解物を抽出精製した。質量分析により各バンドの同定を行ったところ、血清中の補体第 3 成分や補体第 4 成分、セルプラスミン、IgM 等がウイルスと共に濃縮されることが明らかとなった (Fig.3)。この結果より、PEI ビーズによるウイルスの濃縮時に免疫複合体を形成させることにより、濃縮できないウイルスを濃縮できる可能性や濃縮効率を向上させられる可能性が示された。

そこで PEI ビーズ単独では濃縮できないポリオウイルスについて、補体や IgM 抗体と免疫複合体を形成させることにより濃縮できるかどうか検討した。この際、ポリオウイルスに対する IgM 抗体は入手が困難であるため、抗ポリオウイルス-マウスモノクローナル抗体 (IgG) と抗マウス IgG-ウサギ IgM 抗体を利用することにした。そこで、マウス IgG 抗体をウサギに免疫して抗血清を作成し、マウス IgG 抗体結合アフィニティーカラムと PEI-セファロース 6MB (PEI-S-6MB) カラムを用いて 2 段階精製を行った。IgM 抗体は PEI-S-6MB カラムに吸着するが、IgG 抗体は吸

着がみられないことを確認している (Fig.4)。マウス IgG 抗体結合アフィニティーカラム結合画分を PEI-S-6MB カラムにアプライし、結合画分を回収して抗マウス IgG-ウサギ IgM 抗体として使用した (Fig.5)。この抗マウス IgG-ウサギ IgM 抗体と抗ポリオウイルスモノクローナル抗体 (IgG) をウイルス液に添加した後、PEI ビーズによるポリオウイルスの濃縮を行った。その結果、抗ポリオウイルスモノクローナル抗体単独の添加でもウイルスの濃縮が認められたが、抗マウス IgG-ウサギ IgM 抗体を添加することにより、濃縮効率がさらに向上した (Fig.6)。また、抗ポリオウイルスモノクローナル抗体と補体第 1 成分 (C1) 及び補体第 4 成分 (C4) をウイルス液に添加し、室温あるいは 37°C でインキュベート後に PEI ビーズによりポリオウイルスの濃縮を行った結果、室温の反応ではポリオウイルスの濃縮効率は抗ポリオウイルスモノクローナル抗体単独とほとんど変わらなかったが、補体系が働く 37°C で反応した場合にはウイルス濃縮効率の向上が認められた (Fig.6)。

C-1-2 PEI ビーズによる HAV の濃縮

PEI ビーズによるウイルス濃縮の最適化条件のヒト肝炎ウイルスへの適用について検討した。まず、*in vitro* 培養系で増幅した A 型肝炎ウイルス (HAV) を対象に、PEI ビーズ濃縮に及ぼす pH と FCS の影響を検討した結果、pH の影響、FCS の影響は特に認められず、いずれの条件でも 1ml (10 倍量) のウイルス液からの濃縮で control の 100 μ l からの抽出と比較して約 10 倍のコピー数が回収されほぼ完全に濃縮された (Fig.7A)。次に、10ml(100 倍量)の大容量からのウイルス液からの濃縮を検討した結果、PEI ビーズ画分に 74 倍と非常に高率で HAV が回収され、上清画分に残存した量は 20%以下であった (Fig. 7B)。PEI ビーズによるウイルス濃縮をヒト血液試料に適用可能かどうか検討する目的で、ヒト正常血漿またはヒト正常血清で HAV を希釈した場合の PEI

ビーズによる濃縮を検討した (Fig. 7C)。その結果、ヒト正常血漿で希釈した HAV はほぼ完全に回収されたが、ヒト正常血清で希釈した場合には回収率は 50%程度とやや劣っていた。

C-1-3 PEI ビーズによる HBV の濃縮

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。まず、PEI ビーズ濃縮の pH と FCS の影響を検討した結果、無血清条件では濃縮率は 5 倍以上であったが HAV ほど高効率ではなく、さらに血清含有条件では濃縮率が最大で 3 倍程度と低いものであった (Fig. 8A)。また、HBV ではウイルス濃縮時の pH の影響が大きく、pH5 前後の弱酸性条件において濃縮率が 6 倍程度と最も効率のよい濃縮が得られた。これまでの検討から、IgM 抗体を用いて免疫複合性を形成させることにより PEI 磁気ビーズの濃縮効率を向上させることができることが判明している。そこで、ウサギを用いて抗 HBV-IgM 抗体を作成し、PEI ビーズによる HBV の濃縮時に抗 HBV-IgM 抗体を添加したところ、添加量に依存して濃縮効率の向上が認められた (Fig. 8B)。そこで、この条件を用いて大容量からの濃縮を検討したが、10ml(100 倍量)からの濃縮では、抗 HBV-IgM 抗体の有無にかかわらず 1ml (10 倍量) からの濃縮よりもさらに低い量のウイルスしか PEI ビーズには回収されなかった (Fig. 8C)。

HBV のウイルススクリーニングへの適用を考え、ヒト血液試料中の HBV の濃縮を検討した。すなわち、HBV 国内標準品をヒト正常血漿及びヒト正常血清で希釈して PEI ビーズによる濃縮を検討した (Fig. 9A)。その結果、ヒト正常血漿、ヒト正常血清のいずれで希釈した場合も PEI ビーズへの HBV の吸着は全く認められなかった。抗 HBV-IgM 抗体を添加しても回収率の向上には至らなかった。ウイルス濃縮効率はヒト正常血漿のロットにより差があり、ヒト正常血漿に乳糜が認められると濃縮効率が劣ること、乳糜の影響は

0.22 μ m のフィルターろ過で除くことができることが予備実験で確認されている。しかし、フィルターろ過したヒト正常血漿を用いても、濃縮効率は改善されなかった。同様の検討を HBV ジェノタイプパネルの中の 1 種類の HBV 陽性血漿を用いて同様の検討を行った (Fig. 9B)。その結果、ヒト正常血漿で希釈すると、HAV と同様に効率よく濃縮され、抗 HBV-IgM 抗体の添加によりさらに濃縮率の向上が認められた。一方、ヒト正常血清で希釈したものはあまり濃縮が認められなかった。

C-1-4 PEI ビーズによる HCV の濃縮

C 型肝炎ウイルス (HCV) の PEI ビーズ濃縮について HCV 国内標準品を用いて検討した。その結果、HCV は 2%FCS 存在下でも PEI ビーズにより非常に効率よく濃縮可能であること、濃縮効率は弱酸性でより高い傾向が認められた (Fig. 10A)。しかし、HCV の 10ml(100 倍量)からの濃縮を検討したところ、30 倍程度の濃縮に留まり、1ml (10 倍量) からの濃縮と比較してかなり効率が劣ることが判明した (Fig. 10B)。また、ヒト血液試料中の HCV の濃縮について、ヒト正常血漿及びヒト正常血清で希釈して検討したところ、HAV と同様、ヒト正常血漿では高効率で濃縮可能であるが、ヒト血清で希釈したものは濃縮効率が劣るという結果が得られた (Fig. 10C)。

次に、PEI ビーズ濃縮による HCV の検出感度を検討した。HCV をヒト正常血漿で希釈して 1, 10, 100 IU/ml となるように調製し、コントロールの 0.1ml 各 10 本のチューブからの直接抽出と、1ml 各 10 本のチューブからの PEI ビーズ濃縮を行った後、2 段階 PCR によりウイルスを検出したところ、コントロールでは 1 IU/ml で 2/10 の低い確率でしか検出されず、10 IU/ml でも 8/10 の確率に留まるのに対して、PEI ビーズ濃縮では 1 IU/ml で 8/10 の確率で検出され、10 IU/ml では完全に検出が可能という結果が得られた (Fig. 11A)。コントロールと 1ml からの PEI ビーズ抽出の試料各 2 本ずつについて、定量

RT-PCR でコピー数を測定した結果、PEI ビーズ濃縮により 1 IU/ml の HCV が検出可能であり、濃縮により検出感度が 5~7 倍向上することが確認された (Fig.11B)。

C-1-5 PEI ビーズによる HCV ジェノタイプパネルの濃縮

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、HCV ジェノタイプパネルを用いて検討した。使用した HCV ジェノタイプパネルの詳細を Table 2 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.12A)。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.12B)。

C-1-6 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は Table 3 に示す。Fig.13 に示すとおり、90 μ 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 4 4 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 3 8 日目の検体も HCV 陽性であることが確認され、ウインドウ期の短縮化が可能であることが示唆された。Table 3 に示すとおり、Roche 社の HCV monitor 法では PEI ビーズ濃縮した場合と同様、パネル ID11

が HCV 陽性であることが確認されているが、Chiron 社の bDNA 法や PCR DNA quantitative results ではパネル ID12 以降のみ陽性と判定されている。今回、PEI ビーズ濃縮法は Roche 社の HCV monitor 法と同等の高感度検出が可能であることが示された。

C-1-7 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 (標準パネル血漿) 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 4 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.14A)。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、その他の検体はほとんど濃縮されなかった (Fig.14B)。これらの 4 検体はいずれも抗体陽性血漿あるいは低濃度キャリアである。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検体も多かった。4 倍以上の濃縮が認められた ID003, 015, 068, 069 は、いずれもジェノタイプ C で、HBsAb または HBcAb が陽性の検体であった (Table 4)。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。

C-1-8 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方法を試みた。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 種類の検体が ZnCl₂と抗 HBV 抗体により効率よく回収された (Fig.15A)。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、十分に効果があることが確認された (Fig.15B)。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 10²未満と極めて微量であること、また、017 もウイルス量は 10²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かもしれない。

これまでの検討により PEI ビーズで濃縮可能なウイルスを Table 5 にまとめた。PEI ビーズ濃縮法では小型の非エンベロップウイルスやヒト感染性ウイルスを含めて、極めて広範なウイルスを効率よく濃縮可能であることが明らかとなった。

C-1-9 感染性因子の安全性評価技術開発研究についての考察

17 年度はウイルスの高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発を目的として、PEI ビーズを用いたウイルス濃縮法の最適化の検討を行った。PEI ビーズを用いたウイルス濃縮法の最適化については、分子量 70,000 の PEI を結合したビーズを用いて、pH6 付近で濃縮を行った場合が最も高

いウイルス濃縮効率を得られることが判明した。PEI ビーズはカチオン性ポリマーで正に荷電し、細胞やウイルスは負に荷電しているために、液体中のウイルスは静電的な力により PEI ビーズに吸着されると考えられるが、分子量 70,000 の PEI が最も優れていたのは、分子量が大きいほど側鎖が増え、より静電的な力が大きいためと思われる。分子量 70,000 より大きい分子量の PEI を用いてビーズを作製することでさらに濃縮効率が向上する可能性も考えられる。

PEI ビーズにウイルスと同時に濃縮される蛋白質としては、血清中の補体成分の C3、C4、IgM、セルロプラスミン等が同定された。このことから、PEI ビーズによるウイルスの濃縮時に IgM 抗体や補体を加えて免疫複合体を形成させることにより、濃縮できないウイルスを濃縮できる可能性が考えられた。また、濃縮効率の低いウイルスの濃縮効率を改善できる可能性も示唆された。そこで、PEI ビーズ単独では濃縮できないポリオウイルスの濃縮時に抗ポリオウイルスモノクローナル抗体 (IgG) と抗マウス IgG・ウサギ IgM 抗体の添加、あるいは抗ポリオウイルスモノクローナル抗体と補体 C1、C4 の添加を試みた。その結果、IgM 存在下や補体の酵素反応が起こる条件で濃縮を行うことによりポリオウイルスの回収率が顕著に向上することが明らかになったことから、同様の手法でウイルス免疫複合体を形成させることにより、PEI ビーズを用いて全てのウイルスが濃縮できる可能性が示唆された。

18 年度は、17 年度に最適化を行った PEI ビーズを用いたウイルス濃縮法のヒト肝炎ウイルスへの適用について検討を行った。

HAV の濃縮は pH や FCS に依存せず、10ml の大容量のウイルス液からでも高効率で濃縮可能であった。また、ヒト血液試料中のウイルス濃縮を検討したところ、ヒト正常血漿で HAV を希釈しても高い濃縮効率を得られるが、ヒト正常血清では濃縮効率が劣ることが明らかになった。

HBV の濃縮は FCS で阻害され HAV よりも濃

縮効率が劣るが、抗HBV-IgM抗体の添加で濃縮効率は改善された。これは17年度に報告したように、PEIビーズがIgM抗体を吸着する性質を持つため、IgM抗体を介した免疫複合体形成によりウイルス濃縮効率が向上したものと考えられる。HBVをヒト正常血漿で希釈した場合、標準品とHBV陽性血漿ではPEIビーズによる濃縮に差が認められ、標準品は濃縮できなかったが、HBV陽性血漿は濃縮された。両者の違いのひとつに採血時期があり、標準品はウインドウ期から得たHBVで抗HBV抗体陰性であるが、HBV陽性血漿は抗HBV抗体陽性であったことから、試料中の抗HBV抗体が濃縮に影響する可能性が示唆された。

HCVはPEIビーズにより高効率の濃縮が認められ、大容量からもある程度の濃縮が可能であった。ヒト血液試料中のウイルス濃縮についてはHAVと同様、ヒト血漿中のウイルスは高効率での濃縮が可能であった。従って、HAV及びHCVは、ヒト血漿試料を用いることによりPEIビーズ濃縮で高感度に検出可能であることが示された。さらに、HCVの検出感度を検討したところ、PEIビーズで濃縮することにより、血漿中のHCV IU/mlを確実に検出可能であった。

19年度は、PEIビーズ濃縮法のドナースクリーニングへの応用を検討するため、HCVとHBVのパネル血漿に適用可能か検討した。HCVのジェノタイプパネルについて検討したところ、濃縮効率に差があるものの、ジェノタイプと由来の異なる10種類のHCVパネル血漿がいずれもPEIビーズにより1ml(10倍量)からの濃縮で5倍以上に濃縮可能であることを確認した。理論値の10倍以上のウイルス濃縮効果が得られる場合は、ウイルス濃縮中にRNaseのような阻害物質が試料から除去されるためではないかと推測される。

さらに、HCVのセロコンバージョンパネルについて検討したところ、濃縮を行わない場合に比べ、6日早い検体でHCV陽性が確認され、ウインドウ期の短縮化が可能であることが示唆され

た。この結果は、Roche社のHCV monitor法と同等の高感度検出が可能であることを示すものであり、また、Chiron社のbDNA法やPCR DNA quantitative resultsよりも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、これと同等の感度が得られていることから、より多量の非検液を濃縮することにより、さらに感度を上げられる可能性がある。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により、HCV monitor法より優れた検出が行える可能性も考えられる。

一方、HBVのジェノタイプパネルにPEIビーズ濃縮法を用いたところ、HBV抗体陽性のパネル血漿は濃縮されるが、抗体陰性のウインドウ期パネル血漿はほとんど濃縮されないことが明らかになった。抗体陽性の試料は感染後の時間が経過しているものであり、ウインドウ期の試料は抗体陰性であることから、ウインドウ期のHBVを高感度検出するためには、さらに濃縮条件の検討が必要であることが示された。

そこで、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 of ウイルス濃縮に適用可能であることを準用して、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方法を試みた。この方法をHBVジェノタイプパネルに適用したところ、14種類のパネル血漿の中で12種類の検体で5倍以上の濃縮が認められ、本法が血液検体中のHBVの濃縮・高感度検出に有用な方法であることが示唆された。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。

以上の結果より、PEIビーズによるウイルス濃縮法は広範なウイルスを濃縮可能であり、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ヒト血漿試料中のHAV、HCVの濃縮・高感度検

出にも有用な方法であること、一方、ヒト血漿試料中の HBV は抗 HBV 抗体と ZnCl₂ を用いた濃縮法により濃縮・高感度検出が可能であることが示された。

C-1-10 感染性因子の安全性評価技術開発研究についてのまとめ

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、ウイルスの高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発を検討した。ポリエチレンイミン (PEI) を結合した磁性粒子 (PEI ビーズ) を用いたウイルス濃縮法の開発・最適化の検討を行い、分子量 70,000 の PEI ビーズを用いて弱酸性条件で濃縮を行うと最もウイルス濃縮効率が高いこと、ウイルス濃縮時に IgM 抗体や補体を添加することにより PEI ビーズ単独では濃縮されないウイルスも濃縮可能であることを明らかにした。本法は、A 型肝炎ウイルス (HAV)、C 型肝炎ウイルス (HCV) も高効率で濃縮可能であり、血漿中の 1 IU/ml の HCV を確実に検出可能であった。HCV ジェノタイプパネルの 10 種類の異なる検体を全て濃縮可能であり、HCV セロコンバージョンパネルに適用すると、通常の PCR 法よりもウインドウ期の短縮が可能であった。一方、本法では B 型肝炎ウイルス (HBV) は抗体陽性血漿以外は濃縮されなかった。そこで、新たな濃縮法として抗 HBV 抗体と ZnCl₂ による濃縮法を開発し、抗体陰性の HBV パネル血漿も効果的に濃縮可能であることを明らかにした。以上の結果より、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 HAV、HCV の高感度検出や HBV の低濃度キャリアの検出には PEI ビーズによるウイルス濃縮法が有用であること、HBV ウインドウ期の高感度検出には抗 HBV 抗体と ZnCl₂ によるウイルス濃縮法が有用であることが示された。

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 HL60 細胞の染色体解析

C-2-1-1 GeneChip を用いた HL60 および HL60-RG 株の SNP 解析

HuSNP10K 2.0 array (Affymetrix) を用いて、HL60 および HL60-RG 株の SNP 解析を行った。GeneChip SNP call に基づく LOH 解析の結果、全く予想できなかった 1 番染色体全体の LOH が新たに見いだされた。HL60-RG 細胞においては、Fig.16 に示した m-FISH の結果からも、11 番染色体短腕の欠失などを含む染色体異常が検出されていたが、1 番染色体に関しては全く正常だと考えられた。しかし、Fig.17 に示したように、RG 株における SNP 解析結果は、染色全領域においてヘテロ接合性 (AB の call) が消失していた。一方、親株では全域に渡ってヘテロの call が存在するため、RG 株が形成された過程において、ヘテロ接合性が消失したと考えられる。CGH 解析の結果からも染色体の量的変化は起こっていないため、父もしくは母由来の染色体の片側が消失し、片親由来の染色体に置き換わった uniparental disomy が起きていると結論できる。これは、おそらく、いったん片側に染色体が一本増えた trisomy 状態から、反対側のアレルの染色体が脱落して 2 本に戻るにより生成したと予想される。

一方、染色体解析において欠失の見られた 11 番染色体短腕領域は、同様にしてヘテロ接合性の消失が見られるが (AA 若しくは BB call)、CGH の結果からもこの部位では染色体コピー数が半減していることより、それぞれ A0 または B0 という欠失型の LOH であると結論できる。SNP 解析用の GDAS ソフトウェアは染色体コピー数まで考慮していないため、A0 および B0 という判定はできず、AA または BB という call になったと推察できる。また、付属の LOH 解析機能は、SNP call を元にその予測が可能であったが、染色体の増減を伴う欠失型か、伴わない組み換え型の

LOH を判定することはできない。そこで、染色体コピー数の増減に関する検討を加えるため、SNP チップの各プローブのシグナル強度を元に Affymetrix 社より提供される CNAT および Web 上のフリーソフトとして利用可能な d-CHIP ソフトウェアを使って検討を行った。

CNAT では、正常ヒト由来のコントロールサンプルにおいても、コピー数比がコンスタントに 1 にならないなど、解析結果に信頼性が持てなかったが、d-CHIP を使った解析においては、Fig18 に示すように BAC CGH とほぼ同様の結果が得られた。即ち、5 番染色体においては NG,RG 株とも同じ領域において染色体の欠失が検出でき、10 番染色体短腕部における欠失に関しては、RG 株の方がやや長い欠失領域を持つという CGH の結果が SNP チップでも再現された。以上の結果より、SNP チップは染色体の増減解析において CGH 解析と同様に使用することができ、その際に、d Chip という解析ソフトウェアが有効であることが示された。さらに、c-myc の増幅領域に関する解析については、CGH アレイにて 8 番染色体 c-myc 遺伝子近傍にひとまとまりの増幅領域として観察されていたものが、SNP アレイによる解析により、3 つの独立したピークとして検出された (Fig.19)。

C-2-1-2 HL60 細胞の遺伝子増幅の解析

コントロールの正常ゲノム DNA をリファレンスに、HL60 細胞より抽出したゲノム DNA と、Table 6 に従って作成した NANDEMO アレイ上に競合的にハイブリさせた結果得られた CGH データのうち、8q24 領域の c-myc 遺伝子近傍の部分のシグナルを Fig.20 に示す。図より、この領域において 6 つの独立した増幅領域が確認された。さらに詳しく見ると、5 番目の増幅領域に関しては、他と比べてコピー数の多い部分があり、この部分を独立した領域と考え、全 7 領域に関して、1-7 の番号をつけその両端をセントロメア側から a,b とした (Fig.20)。次に各増幅における末端部

を決定するために、両端に外向きに PCR 増幅用のプライマーを設計した。プライマーの設計にあたっては、Fig.20 の 1a-7b 領域に置ける各プローブのシグナル強度の変化より、切断点と予想される領域から少し内側に百-数百塩基対入った場所に、ゲノムの配列情報を基に約 19-20bp のプライマーを設定した。プライマーの設計にあたっては、primer3 ソフトウェアを用いて、Tm 値や 2 次構造や相互の相補性の回避などを考慮して設計した。設計したプライマーのゲノムシーケンス上の位置 (UCSC ゲノムブラウザー) を Fig.20 に記した。赤矢印が設計したプライマーの位置であり、図中黒矢印は、シーケンス解析のためにより外側に設計したプライマーの位置である。なお、白矢印は、最終的に決定された切断点の位置である。

文献と示した赤矢印は、過去の報告により用いられたプライマーの位置である。この報告では、HL60 細胞に対して、c-myc を含む領域と myc co-amplified region (MCR) の二つの領域の増幅が確認されており、今回の増幅領域においては、それぞれ 4a-b、および 5a-b に相当する。

こうして設計したプライマーを用いて、どの増幅領域とどの増幅領域がつながっているかを調べるために、1a-7b の 14 種類のプライマーを用いた総当たりの PCR を行った。その結果、電気泳動の Fig.21 に示したようにいくつかの組み合わせについて増幅が認められた。非特異的増幅によるバンドも含まれていると考えられたため、確認のため増幅が見られたバンドを切り出し、PCR 産物をゲルより精製した後、シーケンス解析を行った。その結果、ゲノム配列より予想される配列が得られたペアについて下図に示した。最終的に、2b,5a に関しては、目的のシーケンスが当初得られなかったが、ランダムプライマーを使ったウォーキング法により、この両者がつながっていることが確認できた。

以上の結果より、それぞれの増幅領域における配列の順序が Figs.22&23 のように決定でき、全

ての領域が繋がったことから、増幅領域は環状の構造をしていることが明らかとなった。HL60細胞での遺伝子増幅領域は DM 染色体として存在するため、この結果より、DM 染色体が環状構造をしていることが証明できた。

各増幅単位の連結部分のシーケンス解析結果を Fig.24 に示すが、7b と 1a のジャンクション部分の配列解析の結果、7 と 1 の配列の間に約 200bp のどちらにも属さない新たな配列が確認できた。この由来を調べるために、ヒトゲノムシーケンスに対して相同配列検索 (BLAST サーチ) を行ったところ、同じ 8 番染色体の 7b より約 6Mbp 下流 (テロメア側) の配列と一致した。この結果より、増幅単位は全てで 8 つあることが判明した。また、ジャンクション部分の特徴として、短い相同配列、およびが見られた。これは非相同的組み換えがおきる引き金となっていると予想される。また、もう一つの特徴として、ジャンクションの近傍に回文構造や、相補的配列が認められ、これらが離れた増幅単位を立体的に近傍に導く要因となったと考えられる。

C-2-2 ヒト間葉系幹細胞の培養過程における染色体変化の解析

C-2-2-1 SNP アレイによる異常の検出

Cambrex 社より購入したヒト間葉系幹細胞 (Lot#4F1560) を、推奨 MSCGM 培地にて継代培養を続け、23 継代目にあたる細胞を 5 継代目の細胞とともに DNA の抽出を行い、50K Human Mapping Array による SNP 解析およびそのシグナル強度を利用した CGH 解析を行った。

各プローブのシグナル強度を CGH 解析を行うための CNAG および dCHIP ソフトウェアを利用して、解析を行った。Fig.25 に 5 継代目をリファレンスとして 23 継代目のシグナル値の増減を表した結果を示す。両ソフトウェアから得られた結果は一致し、7 番および 17 番染色体上にシグナル値の異常が観察された。7 番染色体は大きく 4 つのセグメントに分かれてシグナル値の変化

があり、シグナルの増加している部分、正常部分、および減少している部分が認められた。長腕側の 2 箇所は小さな領域としてシグナルが 1 段階変わっており、また短腕テロメア部分も増加していたシグナル値が一段階戻っていた。17 番染色体の方は、さらに複雑な様式でシグナルの増減を示す領域が複数箇所認められた。

dCHIP を使った LOH (Loss of Heterozygosity) 解析の結果、有意な LOH 領域として、3 番染色体および 8 番染色体の一部にヘテロの SNP Call の消失が認められた (Fig.26)。この LOH は、23 継代とともに 5 継代目でも同様に発見されており、培養過程で起こった LOH ではなく、この細胞が元から持っていた LOH であると考えられる。この LOH 領域に存在する遺伝子を Table 8 に示した。

以上の結果より、23 継代目の細胞には 7 番と 17 番染色体を含む何らかの染色体異常が起きている可能性が示唆されたため、これを確認するため Spectro Karyotyping (SKY) 法及び G-banding による染色体解析を行った。24 継代目の凍結保存細胞を培養し、26 継代となった時点で染色体標本作製し SKY 解析を行った結果を Fig.27 に示す。予想された通り、7 番染色体に異常が認められ、一部 17 番染色体との転座を含んでセントロメア付近の部分のコピー数が増えていた事がわかった。また、これに対して、同一 hMSC の 6 継代目の細胞を用いた結果は、異常核型を持った細胞は検出出来ておらず、この世代間での培養の途中において、染色体変化を持った細胞が増えたことになる。異常を持つ細胞の割合については、G-banding 法を用いてより多くの細胞について、核型を解析した結果を Table 7 に示した。10 細胞ずつを解析した結果、6 継代目については全て正常核型であったのに対し、26 継代目の細胞では、全てに 7 番および 17 番染色体を含む異常が観察されたほか、1 例について 21 番と 22 番染色体の転座による 2 動原体染色体が認められた。さらに各 50 メタフェーズに対して染色体数を計測した

結果、6世代目が全て正常の46本であったのに対し、26継代目は47本を中心に40本まで染色体数が広く分布していた。現在、この間の経時変化について、7番および17番染色体セントロメア特異的FISHプローブを用いた追跡を行っている。

上記、染色体解析の結果得られた異常像を、CGH解析の結果と比較したのがFig.28である。染色体解析の結果より、17番染色体はセントロメア付近の領域のみをもつ短い染色体が2本少し異なるサイズにて余分に存在する。また、17番染色体との転座融合染色体が1本存在する。これをCGHの結果と比較すると、ちょうどセントロメア付近でシグナルが最大になっている領域が染色体4本分、すなわち一番短い染色体の占める領域に相当し、2番目に短い染色体に余分に存在する領域が、染色体3本分に相とすると考えられる。それ以外の部分は正常の2本分に相当するため、CGHで一見ロスがあるように見えた領域が、本来の正常2コピーに相当する領域であることがわかった。

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

SNPチップ解析により異常が検出されたhMSC株ロット#F1460に関して、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.29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-2-2-3 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.30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 9)。また、SNPデータより、ヘテロ接合性の消失(LOH)に関し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。以上の結果より、幹細胞培養過程において最初に発見された染色体の変化の出現頻度は高くなく、こうした幹細胞は、一般には正常な核型を維持できることがわかった。

C-2-2-4 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。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(Fig.31)。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.32&33に示すようなシグナルが得られた。それぞれ100個ずつの間期核細胞を使って解析した結果、およびTable 10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.34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。

C-2-3 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についての考察

細胞治療に用いる細胞の遺伝的安定性を調べることは、その品質や同一性を保証する上で重要なファクターとなる。特に、種々の幹細胞を増殖、分化させた後生体に戻すという治療においては、*in vitro*での培養過程が必須であり、この間に起きる染色体異常等の遺伝的変化は時にがん原性といった重篤な悪影響を与えかねない。そこで、遺伝的な安定性を治療前に確認して置くことでできれば非常に有用と考えられる。我々は既に、細胞の同一性の検証のためには複数のSTRマーカーを用いた解析が有効であることを示したが、同一起源の細胞においても、染色体転座や欠失、増幅、LOHといった異常を持つ可能性があり、特に細胞のがん化形質の獲得へとつながる可能性もあることから注意が必要である。染色体の欠失は、がん抑制遺伝子の不活性化を、増幅は *myc*

等のがん遺伝子の活性化を引き起こし、がん化へとつながる引き金になると考えられる。染色体の増減に関する情報を得る上で、簡便でより詳細な方法として、BACクローンを使ったCGHアレイやSNP検出用のGeneChipが有用であることを我々は既に示した。今回さらに詳細な検討が可能となるカスタムメイドのoligoCGHアレイを用いて、遺伝子増幅のメカニズムに迫るとともに、さらに高密度のSNP検出用のGeneChipを使用した骨髄間葉系幹細胞の培養過程での染色体安定性の検討を行った。

HL60細胞の*c-myc*遺伝子の増幅領域の解析においては、これまでの解析で完全に解明できなかった部分の全貌を明らかにすることができた。各増幅領域のジャンクションについては、CGHアレイからの詳細なデータを元に設計したPCRプライマーにより、シーケンスレベルでの解明に成功した(Fig.26)。oligoCGHを使った詳細な増幅単位の解析は、染色体異常発症のメカニズムを解析する上で有用であるが、細胞全体としての評価をする場合には、ゲノム全体を網羅的に解析可能なCGHアレイが必要となる。今回、そのツールとして、5万箇所SNPを同時に検出可能なGeneChipを使って、ヒト間葉系幹細胞の培養過程における染色体変化を検討した。まず、遺伝的変化が起きうるかを調べるために、長期培養したロットに関して、その最初と最後でのゲノム変化を解析してみた。すると、二つの染色体において明らかなCGHシグナルの変化(異常)が検出され、その後のマルチカラーFISHによる染色体解析により、染色体異常が確認された。CGHアレイで検出されるためにはその異常がある程度の範囲の細胞に及んでいる必要があり、実際にG-bandingによる核型解析からも、26継代目の細胞ではほぼ全ての細胞が染色体異常を持つことが確認された。6継代目の細胞には50細胞の観察からは異常が確認されておらず、この間の20世代の間に一部に起きた異常が全体へと広がったと考えられた。そのため、この異常細胞が増殖

優位性を持つと考えられるとともに、全体のポピュレーションを占めるまでにはある程度の時間がかかるため、比較的早い段階で（最初からの可能性を含め）異常が発生したと予想した。この経時変化を追うために、凍結保存してあった継代途中の細胞を用いて FISH 解析による検討を行った結果、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（# 4 F1560）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が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ることが報告されている。これは、細胞購入時にすでに異常細胞が存在した可能性を強く示唆している。

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。

また、増殖優位性に関して考察するため、増加が起きていた染色体領域に含まれる遺伝子が注目されるが、一つの候補として既に乳癌等で増幅が知られている EGFR が 7 番染色体セントロメア付近の 7q12 ローカスに存在し、その関与が示唆される。

以上、本研究においては、SNP および CGH マイクロアレイや FISH 法などの染色体解析技術を

用いて細胞の遺伝的安定性を評価したわけであるが、それぞれの手法は、それぞれの長所短所を持っており、それらをまとめたのが Table 11 である。染色体の増減に関する情報を得る上で、従来メタフェーズ染色体を用いた CGH 法が使われていたが、これに変わる簡便でより詳細な方法として、BAC クローンを使った CGH アレイが有用であることを我々は既に示した。今回さらに SNP をゲノムワイドに解析することにより LOH を含めた異常に関して検討が可能であると考え、Affymetrix 社より提供される SNP 検出用の GeneChip を使用した検討を行った。このアレイは SNP を検出するためにデザインされているが、アレイへのハイブリグナルを解析することにより、染色体のコピー数の解析、即ち CGH 的な使い方ができることが期待された。しかし、Affymetrix 社より提供されるコピー数解析ツールでは満足した結果を得ることができなかった。これは、解析に用いるコントロール DNA の由来が不明なことにも起因すると考えられる。幸い、他の研究者によりコピー数を解析するためにデザインされた dChip というソフトが無償で利用可能であったことからこれを用いて解析を行ったところ、BAC CGH データとも一致するデータを得ることができた。この事より、SNP チップが CGH にも利用可能であることが示された。今回用いた 10K アレイの SNP 数は約 1 万であり、4000 クローンの BAC CGH アレイと比べてやや詳細な解析が期待されたが、17 番染色体などはプローブの設計上、むしろ BAC データの方が切断点に関して有効な情報が得られた。しかし、SNP チップに関しては 100K さらには最近では 500K とより高密度なチップが利用可能となっており、さらに詳細な検討が期待できる。一方で、CGH アレイに関しても、最近では BAC クローンを用いたものに加えて、オリゴ DNA を用いたマイクロアレイが、agilent 社などから市販されており、これらは BAC アレイに比べてさらにプローブ数が増加しているため、より詳細に検討が可能であ

った。特にカスタムデザイン可能な NANDEMO アレイは、連続的にプローブを設計することが可能であり、HL60 細胞の増幅領域の詳細な決定に威力を発揮した。

一方、SNP チップは本来多型を検出するためにデザインされたものであることから、コピー数に関しては、CGH アレイに比べると信頼性は低いと思われる。実際のデータをもとに、ベースラインの安定性や、再現性と言った観点では CGH アレイの方が優れていることから、コピー数の増減に着目した解析には CGH アレイが向いていると言える。さらに、コピー数の増減に関しては、定量的リアルタイム PCR を用いた検証が有効である。

一方、SNP チップは染色体の増減を伴わない LOH を検出でき、より広範囲な異常を一つのアレイで検出できるという点で優れている。細胞治療の現場では、G-バンディング等の標準的染色体検査を用いて核型が正常であることを保証する場合も見受けられるが、一見正常に見える染色体も実は LOH 型の異常を持つ危険性が示唆される。より確実な検証のためには、今後 SNP チップの利用が有効であると考えられる。

さらに、SNP チップでは検出できない異常として、染色体転座があげられる。白血病の発生においては特定の染色体転座がその成因のメカニズムとなっており、これらを有効に検出するためには、m-FISH 等の方法を用いる必要がある。

最終年度においては、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ると検出できず、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ていく手法に加え、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

C-2-4 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についてのまとめ

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、ヒト間葉系幹細胞を使った長期培養実験から、染色体変化を検出する手法としての有用性が示された。

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。

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 Le^x 糖鎖の MSⁿ

はじめに、Le^x 糖鎖特異的検出法の開発を検討した。Le^x 抗原は、GlcNAc に Fuc と Gal がそれ

ぞれ α 1-3 結合及び β 1-4 結合した糖鎖である。その位置異性体として、GlcNAc に Gal と Fuc が β 1-3 及び α 1-4 結合した Le^a が存在する。また、 Le^x 及び Le^a の Gal に Fuc が α 1-2 結合した糖鎖は、それぞれ Le^y 及び Le^b と呼ばれる (Fig.36)。 Le^x と Le^a 、及び Le^y と Le^b は分子量と糖組成が同一であるため、MS による分子量測定や MS^2 による糖鎖配列解析では識別することができない。そこで、 Le^x 結合糖鎖のみを特異的に検出する方法として、 MS^n によって Le^a からは生じない GlcNAc のピラノース環開裂イオンを検出することを試みた。

ここではモデルとして Fig.37 に示す市販の Le^x 及び Le^a 構造を含む PA 糖鎖を用いた。糖鎖 I 及び II はそれぞれ Le^x 及び Le^a を含む糖鎖であり、糖鎖 III は、より複雑な構造を持つ Le^x 結合糖鎖である。一般に、環開裂イオンを含む様々なプロダクトイオンを得るためには、糖鎖をナトリウム付加体として解析するとよいことが知られている。そこで、モデル糖鎖は、10 μ M の塩化ナトリウムを含む溶媒に溶解して、 MS^n に付した。

Fig.38 はモデル糖鎖 I の MS^{14} スペクトルである。Fig.38A はフル MS^1 スキャンによって得られたマススペクトルで、ナトリウム付加体が m/z 954 に検出されている。これを前駆イオンとして MS^2 を行った結果、Fig.38B に示すように Le^x の 3 糖構造のナトリウム付加体が m/z 534 に検出された。さらに、この m/z 534 を前駆イオンとして MS^3 を行ったところ、Fuc が開裂した GalGlcNAc が m/z 388 に検出された (Fig.38C)。さらにこのイオンを前駆イオンとして MS^4 を行ったところ、GlcNAc のピラノース環の C-3 及び C-4 間が開裂した $^{35}A_2$ イオンが m/z 259 に検出された。この環開裂イオンは Gal が GlcNAc の 3 位ではなく 4 位に結合していることを示すイオンであり、 Le^a からは生じないプロダクトイオンである。このように、 MS^n によって、 Le^x 糖鎖に特徴的なイオンを検出できることが確認された。

つぎに、 Le^a モデルの糖鎖 II の MS^{14} スペクト

ルを測定した (Fig.39)。 MS^1 では Le^x と同様に m/z 954 にナトリウム付加体が検出された。また、 MS^2 でも、Gal(Fuc)GlcNAc からなる m/z 534 のイオンが検出され、さらに MS^3 でも m/z 388 のイオンが検出された。しかし、 MS^4 では、 Le^x で検出された m/z 259 は検出されなかった。このことは、 MS^2 によって生じた Gal(Fuc)GlcNAc⁺ を選択して MS^3 を行い、さらに MS^3 で生じた GalGlcNAc⁺ を選択して MS^4 を行って、環開裂イオン (m/z 259) の有無を確認することによって、 Le^a と Le^x を識別できることを示唆している (Fig.40)。

そこで、より複雑な構造を有する Le^x 糖鎖のモデル (糖鎖 III) を用いて、 MS^2 において生じた Gal(Fuc)GlcNAc、さらに MS^3 において生じた GalGlcNAc を前駆イオンとして MS^4 を行った場合、 Le^x に特徴的なイオンが生成されるかどうかを検証した。Fig.41 は糖鎖 III の MS^{24} スペクトルである。 MS^2 で m/z 534、 MS^3 で m/z 388、さらに MS^4 で m/z 259 が検出されることを確認した。このことから、この 3 つのプロダクトイオン (m/z 534, 388, 259) を、 Le^x 構造の診断イオンとして利用することによって、 Le^x のみを選択的に検出できることが実証された。本法は、シアリル Le^x にも適用可能であり、細胞の特性解析指標やガン細胞の高感度検出にも適用出来る可能性が高い。

G-3-2 LC/ MS^n による糖鎖のプロファイリングと Le^x 結合糖鎖特異的検出

つぎに、LC/ MS^n を用いて、細胞組織由来糖鎖の網羅的解析を検討した。マウス腎臓由来のタンパク質に PNGase F を作用させて N 結合型糖鎖を切り出した。イオン化効率を高めるため糖鎖を PA 化した後、その糖鎖を LC/ MS^n 装置を用いて分析した。ここでは、フル MS^1 スキャンに続いて (Fig.42A)、データ依存的 MS^2 (Fig.42B) スキャンを行った。フル MS^1 スキャンで得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) にピーク a-j が