

検出された。これらは、分子量及びMS²スペクトルから、高マンノース型糖鎖及び複合型フコシル糖鎖と推定された。フコースが複数結合した糖鎖が検出されたことから、Le^x糖鎖の存在が示唆された。

そこで、上記したLe^x糖鎖の特異的検出法を用いて、マウス腎臓由来糖鎖の中から、Le^x結合糖鎖だけを選択的に検出することを検討した。データ依存的MS²スキャンで生じたm/z 534イオンを前駆イオンとしてMS³(Fig.42C)、さらにMS³で生じたm/z 388イオンを前駆イオンとしてMS⁴を行い、生じたm/z 259イオンを検出した(Fig.42D)。その結果、ピークa-jのうち、ピークa, b, e, f及びhのMS^{2,4}からLe^x診断イオンが検出され、この5つの糖鎖にLe^xが結合していることが示唆された。

Le^x構造の存在が示唆された糖鎖の詳細構造は、データ依存的MS^{2,4}スペクトルから解析した。代表的なMS^{2,4}スペクトルとして、Fig.43にピークfのMS^{2,4}スペクトルを示す。まず、フラグメントパターン及び分子量から、この糖鎖にはFucが3分子結合していることが示唆された。また、データ依存的MS²でm/z 534のイオンが検出され(Fig.43A)、m/z 534イオンを前駆イオンとしたMS³でm/z 388のイオンが観察され(Fig.43B)、さらにm/z 388イオンを前駆イオンとしたMS⁴でm/z 259イオンが観察されることから(Fig.43C)、Le^xが結合していることが確認された。さらに、m/z 1035にバイセクティング糖鎖に特徴的なY_{3α/3β}イオンが比較的強く検出されたことから、この糖鎖は、Le^x構造を2分子有するバイセクテッド糖鎖と予想された。同様に、Le^xの存在が示唆された主な糖鎖について、MS^{2,4}スペクトルを基に糖鎖構造を推定した結果をTable 12にまとめる。マウス腎臓にはLe^x糖鎖が存在することが明らかになった。

このように、LC/MSⁿによって、細胞や組織に発現している糖タンパク質の糖鎖の分布と構造を解析できること、さらに、任意の糖鎖抗原に特

徴的なイオンを診断イオンとして利用することによって、その糖鎖抗原のみを特異的に検出し、分布や詳細な構造を明らかにできることが示された。

C-3-3 製造工程由来不純物試験：NeuGc 定量法

C-3-3-1 nanoLC/ITMS-FTMSによるDMB-NeuAc及びDMB-NeuGcの測定

シアル酸の定量法として、DMB誘導体化とLC/蛍光検出法やMSを組み合わせた方法が用いられている。MSには、分子量やフラグメントからシアル酸分子種を同定できるという利点がある反面、DMBシアル酸の分子イオンは脱水しやすいために十分な検出感度が得られないという問題がある。そこで、脱水イオンの生成を抑えるためにイオンの取り込み量(AGC値)及び脱水イオンの生成量の関係について調べたところ、FTMSのイオン取り込み量を5E+04に設定することによって、脱水イオンの生成をほぼ抑えられることが明らかとなった(Fig.44)。本研究ではこのAGC値を用いてDMB-NeuAc及びDMB-NeuGcの分析を行った。

まず、nanoLC/FTMS装置を用いて、DMBで標識したNeuGc標準品(MW 442.14)及びNeuAc標準品(MW 426.15)(各2 pmol)をポジティブイオンモードのSelected ion monitoring(SIM, m/z 400-450)により測定した。m/z 442.12-442.16及びm/z 426.13-426.17のエクストラクトイオンクロマトグラム(EIC)を描いたところ、Fig.45に示すように、14及び15分周辺にpeak a及びbが出現した。14分に溶出された分子は、分子イオン([M+H]⁺)のm/z値(m/z 442.145)から、DMB-NeuGcであることが示唆された(Fig.46A)。さらに、m/z 442.145のイオンをプリカーサーイオンとして得られたプロダクトイオンスペクトル(Fig.46B)上に、2分子及び3分子のH₂Oが解離したイオン(m/z 406及びm/z 388)、H₂O3分子及びグリコリル基が解離して生じたイオン(m/z 313)、並びに環開裂フラグメントイオン

(m/z 229 及び m/z 283) が観測されたことから、この分子は DMB-NeuGc であることが確認された。同様に、peak b の分子は、 $[M + H]^+$ (m/z 426.150) 及びそれをプリカーサーイオンしたプロダクトイオン (m/z 390, 372, 313, 283 及び 229) から、DMB-NeuAc であることが確認された (Fig.46C 及び D)。

nanoLC/ESI-FTMS による DMB-シアル酸測定法の直線性について、500 pmol から 7.8 fmol の範囲で検討した。その結果、0.0078-50 pmol の範囲で直線性が確認された。DMB-NeuGc 及び NeuAc の回帰直線式はそれぞれ $Y=1.31 \times 10^6 X - 9028.5$ ($r=0.9998$) 及び $Y=2.03 \times 10^6 X - 21548.0$ ($r=0.9995$) であった (Fig.47)。また NeuGc の検出限界 (DL) 及び定量限界 (QL) は 8.6 fmol 及び 26.3 fmol、並びに NeuAc の DL 及び QL は 5.6 fmol 及び 16.9 fmol であった。NeuGc 分析の精度は 7.3%、また、真度は 92.4% であった。以上の結果から、nanoLC/FTMS により DMB-NeuGc 及び DMB-NeuAc の定量が可能であることが確認された。

C-3-3-2 HL-60 細胞膜画分由来 NeuGc 及び NeuAc の定量

モデル細胞として HL-60 細胞を用いて、細胞膜に存在する NeuGc 及び NeuAc の定量法としての本分析法の実行可能性を評価した。

FCS 添加培地で培養した細胞 (1×10^6 個) の膜画分を超遠心分離により調製し、酸処理 (2 M 酢酸, 80°C, 3 時間) によりシアル酸を遊離させた。DMB でシアル酸を標識した後、細胞 2.5×10^3 個分のシアル酸を用いて、nanoLC/FTMS 及び nanoLC/MS/MS を行った。Fig.48A に示すように、EIC (m/z 442.12-442.16) の 14 分にピークが出現した (peak c)。この位置に溶出された分子は、分子イオン (m/z 442.145) (Fig.48B)、及び $[M + H]^+$ (m/z 442.145) をプリカーサーイオンとして得られたプロダクトイオン (m/z 406, 388, 313, 283 及び 229) から (Fig.48C)、DMB-NeuGc と同定され

た。同様に、EIC (m/z 426.13-426.17) 上に出現した 15 分付近のピーク (peak d) (Fig.49A) の分子は、分子イオン (m/z 426.150) 及びその分子イオンの MS/MS により得られたプロダクトイオン (m/z 390, 372, 313, 283 及び 229) から、DMB-NeuAc と同定された (Fig.49B 及び C)。

10% FCS 添加培地中で培養された HL-60 細胞 (2.5×10^3 個) 膜画分に存在する NeuGc 及び NeuAc 量は、Peak c 及び d のピーク面積から、それぞれ 55.4 ± 4.6 fmol 及び 13.5 ± 0.6 pmol と算出された (Fig.50)。

つぎに、ヒト血清添加培地中で HL-60 細胞を 10 日間培養 (培地交換 4 回) した後、本分析法を用いて、細胞膜画分に存在する NeuGc 及び NeuAc を定量した。ヒト血清を使用したにも関わらず、EIC (m/z 442.12-442.16) 上の DMB-NeuGc が溶出される 14 分付近にピーク (peak e) が確認された (Fig.51A)。Peak e の位置に溶出された分子は、分子イオン (m/z 442.145) 及びその MS/MS から、DMB-NeuGc と同定された (Fig.51B 及び C)。細胞 (2.5×10^3 個) 膜画分に存在する NeuGc 及び NeuAc の含量は、それぞれ 29.2 ± 2.4 fmol 及び 21 ± 1.4 pmol であった (Fig.50)。これらの結果から、ヒト血清添加培地で培養しても、HL-60 細胞膜画分に NeuGc が存在することが明らかとなった。以上のように、nanoLC/FTMS を用いたシアル酸分析法によって、細胞膜に存在する微量の NeuGc を定量できることが実証された。

さらに、HL-60 細胞を無血清培地で培養し、膜画分に含まれるシアル酸分子の同定と定量を行った。その結果、EIC (m/z 442.12-442.16) 上に NeuGc に相当するピークは観察されなかった。尚、NeuAc 量は 20.5 ± 1.6 pmol であった (Fig.50)。以上のことから、NeuGc を含まない無血清培地で培養したヒト細胞には NeuGc は混入しないことが確認された。

C-3-4 細胞特性確認試験：還元化 N 結合型糖鎖のプロファイリング

はじめに、10% FCS を含む培地で培養した HL-60 細胞から N 結合型糖鎖を酵素的に切り出し、 NaBH_4 で還元した後、細胞 1×10^6 個相当の糖鎖を用いて、ポジティブイオン FTMS、データ依存的 LC/MS²~MS⁴、並びにネガティブイオン FTMS、データ依存的 LC/MS²~MS⁴ を行った。データ依存的 MS²~MS⁴ は各スキャンで最も強度の高いイオンをプリカーサーイオンとして行った。Fig.52 の青で示す部分は、ポジティブイオン FTMS によって得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) で、主に中性糖鎖とシアル酸結合数の小さい糖鎖のプロファイルを示している。赤で示す部分は、ネガティブイオン FTMS によって得られた TIC で、主にシアル酸結合数の大きい糖鎖のプロファイルを表している。主なピークの糖鎖構造は、プロダクトイオンスペクトルから、Fig.52 中に示すように推定された。以上のように、nanoLC/MS を利用することによって、 10^6 個程度の細胞より得られた試料を用いて糖鎖プロファイリングが可能になることを確認した。

つぎに、ヒト血清を含む培地、及び無血清培地で培養した HL-60 細胞の糖鎖プロファイリングを行った。Fig.53A 及び B はそれぞれ、ヒト血清及び無血清培地で培養した HL-60 細胞由来高マンノース型糖鎖のプロファイルである。無血清培地で培養すると、Man-9 糖鎖が増加することがわかる。Fig.53C 及び D は、ポジティブイオンモードで得られたヒト血清及び無血清培地で培養した細胞由来複合型糖鎖のプロファイルである。また、Fig.53E 及び F はネガティブイオンモードで得られた同糖鎖のプロファイルである。ヒト血清添加培地と無血清培地で培養した細胞の糖鎖プロファイルは全く異なること、特に、無血清培地ではバイセクテッド 2 本鎖糖鎖が著しく増加することが明らかとなった。以上の結果から、糖鎖プロファイリングは細胞の変化を検出する方法として利用可能であることが示唆された。

C-3-5 安定同位体標識法及び LC/MS による糖鎖の比較定量法

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

Fig.54A は、標準ジシアリル 2 本鎖糖鎖 (モノアイソトピック質量, 2368.837 Da) を d_5 -PHN 及び d_0 -PHN で標識して、等量混合物の LC/MS により得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) である。Fig.54B には 41.65 分に検出されたピーク (peak A) のマススペクトルを示した。同位体イオンの間隔が 0.5 マスユニットであることから、2 価イオンであることが確認できた。 d_0 -PHN 糖鎖 (モノアイソトピック質量, 2458.895 Da) のモノアイソトピック 2 価イオンが m/z 1230.51 であり、また d_5 -PHN 糖鎖 (モノアイソトピック質量, 2463.935 Da) のモノアイソトピック 2 価イオンは m/z 1233.01 に観測された。尚、 m/z 1230.5 と 1233.0 のシグナル強度が 1 : 1 ではないのは、 d_5 -PHN の純度 (57%) が原因である。Fig.54C 及び D は d_0 -PHN 糖鎖及び d_5 -PHN 糖鎖の分子イオン $[\text{M} + 2\text{H}^+]^{2+}$ (m/z 1230.5 及び m/z 1233.0) のマスキロマトグラムである。Fig.55 は d_0 -PHN 糖鎖の MS/MS スペクトルである。最も強く検出された m/z 657

は、シアル酸 (NeuAc), ガラクトース (Gal) 及び N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) からなる B_3^+ イオンである. NeuAc-Gal-GlcNAc が解離した分子に相当する Y_4^+ イオン, 及び Y_4^+ イオンから 1 分子の NeuAc が解離した B_6^+/Y_4^+ イオンは, それぞれ m/z 1804 及び m/z 1347 に検出された. 一方, Y_1^+ イオンに相当する m/z 458 が検出されたことから, 還元末端 GlcNAc にフコース (Fuc) が付加していることが確認された. これらの結果から, d_5 -PHN を用いる糖鎖の同位体標識法と LC/MS を組み合わせることで d_0 -PHN 及び d_5 -PHN 糖鎖のシグナル強度の比較による定量解析と, MS/MS による構造解析が可能であることが実証された.

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

C-3-6 条件の異なる培地で培養した HL-60RG 細胞膜画分の比較定量解析

再生医療における課題の一つとして, 培養に使用する血清の問題がある. そこで, 我々はウシ胎仔血清 (FCS), ヒト血清 (HS) 添加培地, 及び無血清 (serum free) 培地で培養した細胞の膜画分から N-結合型糖鎖を調製し比較定量解析を行った. FCS 添加培地及び無血清培地で培養した細胞由来糖鎖を d_0 -PHN で, HS 添加培地で培養した細胞由来糖鎖を d_5 -PHN でそれぞれ標識した (Fig.56).

C-3-6-1 FCS 及び HS 添加培地で培養した細胞由来糖鎖の比較定量解析

Fig.57 は, FCS 添加培地で培養した細胞から調製した d_0 -PHN 糖鎖, 及び HS 添加培地で培養した細胞から調製した d_5 -PHN 糖鎖の混合物の LC/MS により得られた TIC である. 赤いラインはポジティブ, また青いラインはネガティブイオンモードで測定した結果である. 糖鎖由来のイオンは, 矢印で示した約 35~50 分の位置に溶出され

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

Fig.58A は, ポジティブイオンモードで測定した高マンノース型糖鎖 ($Hex_{9,5}HexNAc_2$) のマスクロマトグラムである. 約 35 分~42 分付近に Man-8, Man-9, Man-7, Man-6 及び Man-5 の順で溶出された. HS 添加培地で培養した細胞と比較して FCS 添加培地で培養した細胞では, 増 Man-9, Man-7, Man-6, Man-5(1) 及び Man-5(2) 増加していることが明らかとなった. FCS 添加培地で培養した細胞の Man-5(1) は 1.97 倍に増加しており, 最も増加した糖鎖であった. また Man-9, Man-7, Man-6 及び Man-5(2) も, 1.62, 1.72, 1.38 及び 1.52 倍にそれぞれ増加していた. 一方, FCS 添加培地で培養した細胞の Man-8 は, HS 添加培地で培養した細胞の 79% に減少していることが明らかとなった (Fig.58B).

Fig.59A は, ポジティブイオンモードで測定した側鎖が不完全な糖鎖 (低分子量糖鎖) のマスクロマトグラムである. 低分子量糖鎖は約 38 分~42 分に溶出された. 約 38 分に溶出された糖鎖は, 非還元末端にガラクトースが付加していない 2 本鎖糖鎖 (アガラクトシル糖鎖, $dHex_1Hex_3HexNAc_4$) であった. 41~42 分に溶出された糖鎖は, アガラクト糖鎖から 1 及び 2 分子の GlcNAc が欠損したパウチマンノース型糖鎖と呼ばれる糖鎖 ($dHex_1Hex_3HexNAc_3$, $dHex_1Hex_3HexNAc_2$), さらにトリマンノシルコアのマンノースが 1 分子欠損した糖鎖 ($dHex_1Hex_2HexNAc_2$) であった. FCS 添加培地で培養した細胞由来 $dHex_1Hex_2HexNAc_2$ は, HS 添加培地で培養した細胞の 1.04 倍であり, 変化はみられなかった. 一方, FCS 添加培地で培養した細胞の $dHex_1Hex_3HexNAc_2$, $dHex_1Hex_3HexNAc_3$ 及び $dHex_1Hex_3HexNAc_4$ は, HS 添加培地で培養した細胞の 1.90, 2.01 及び 1.64 倍に増加していた (Fig.59B).

Fig.60A は, ポジティブイオンモードで測定し

た2本鎖糖鎖のマスクロマトグラムである。約35分付近には、還元末端のGlcNAcにフコース(コアフコース)、非還元末端に2分子のシアル酸、1分子のGlcNAcが付加した糖鎖(dHex₁Hex₃HexNAc₅NeuAc₂)が溶出された。36分付近には、コアフコース、非還元末端に1または2分子のシアル酸が付加した糖鎖(dHex₁Hex₃HexNAc₄NeuAc₁₋₂)が溶出された。37分付近の糖鎖は、コアフコース、非還元末端に1分子のシアル酸及びGlcNAcが付加した糖鎖(dHex₁Hex₃HexNAc₅NeuAc₁)であった。FCS添加培地で培養した細胞由来のdHex₁Hex₅HexNAc₄NeuAc₂及びdHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₂は、HS添加培地で培養した細胞と比較して1.09倍で変化はみられなかった(Fig.60B)。一方、dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₁及びdHex₁Hex₅HexNAc₄NeuAc₂はそれぞれ1.32及び1.59倍に増加しており、FCS添加培地で培養した細胞で増加していることが明らかとなった。

Fig.61Aは、ネガティブイオンモードで測定した3及び4本鎖糖鎖のマスクロマトグラムである。糖鎖は35~38分付近に溶出されていることが明らかとなった。全ての糖鎖に、コアフコースが付加していた。35分付近の糖鎖は、2または3分子のシアル酸が付加した3本鎖糖鎖(dHex₁Hex₆HexNAc₅NeuAc₂, dHex₁Hex₆HexNAc₅NeuAc₃), 4分子のシアル酸が付加した糖鎖(dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuAc₄(1,2)), さらにテトラシアロ4本鎖糖鎖の非還元末端に1分子のHexNAcが付加した糖鎖(dHex₁Hex₇HexNAc₇NeuAc₄)であった。36~37分付近に溶出された糖鎖は、3分子のシアル酸が付加した4本鎖糖鎖(dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuAc₃), 2~4分子のシアル酸及び1分子のラクトサミンが付加した4本鎖糖鎖(dHex₁Hex₈HexNAc₇NeuAc₄), 及び2~4分子のシアル酸、1分子のラクトサミン、1分子のHexNAcが付加した4本鎖糖鎖(dHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₄)であった。FCS添加培地で培養した細胞のdHex₁Hex₆HexNAc₅NeuAc₂は、

HS添加培地で培養した細胞と比較して1.12倍に増加していたが、他の3及び4本鎖糖鎖は全て減少していた。特に最も高分岐化したと考えられるdHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₄は、HS添加培地で培養した細胞由来糖鎖の21%に減少していることが明らかとなった(Fig.61B)。また4本鎖糖鎖はdHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₂を除いて(FCS/HS=0.77), いずれも50%以下に減少しており高分岐化した糖鎖は、FCS添加培地で培養すると減少する、即ちHS添加培地で高分岐糖鎖が増加することが明らかとなった。

FCS及びHS添加培地で培養した細胞膜糖鎖の比較定量解析の結果、FCS添加培地で培養することによって、高マンノース型糖鎖、低分子量糖鎖及び2本鎖糖鎖は増加することが示唆された。一方、3及び4本鎖糖鎖は減少することが示された(Fig.62)。

C-3-6-2 無血清培地で培養した細胞及びHS添加培地で培養した細胞の比較定量解析

Fig.63は、無血清培地で培養した細胞及びHS添加培地で培養した細胞からそれぞれ調製したd₀-PHN糖鎖及びd₅-PHN糖鎖の混合物のLC/MSにより得られたTICである。糖鎖由来のイオンは、矢印で示した約35~50分の位置に溶出されていた。また、各糖鎖の構造は、MS/MS及びMS/MS/MSスペクトルのフラグメントイオンの帰属により推定した。

Fig.64Aは高マンノース型糖鎖のマスクロマトグラムである。検出された糖鎖は、Man-9~Man-5であり、いずれもd₀-及びd₅-PHN糖鎖に共通して検出された。HS添加培地で培養した細胞と比較して、無血清培地で培養した細胞で最も変化した高マンノース型糖鎖はMan-9であり、2.43倍に増加していた。またMan-7, Man-6及びMan-5(1,2)も、それぞれ1.57, 1.76, 1.55及び1.54倍に増加していた。一方、無血清培地で培養した細胞のMan-8は、HS添加培地で培養した細胞とほぼ等量であった(serum free / HS = 0.97) (Fig.64B)。

Fig.65A は、低分子量糖鎖のマスキロマトグラムであり、アガラクト糖鎖 (dHex₁Hex₃HexNAc₄)、アガラクト糖鎖から 1 分子の GlcNAc が欠損した糖鎖(dHex₁Hex₃HexNAc₃) 及び パウチマンノース型糖鎖 (dHex₁Hex₃HexNAc₂ 及び dHex₁Hex₂HexNAc₂) が検出された。最も変化した糖鎖は dHex₁Hex₃HexNAc₃ であり、無血清培地で培養した細胞で、HS 添加培地で培養した細胞の 3.06 倍に増加していた (Fig.65B)。また dHex₁Hex₂HexNAc₂, dHex₁Hex₃HexNAc₂ 及び dHex₁Hex₃HexNAc₄ も無血清培地で培養した細胞で、1.30, 2.14 及び 2.22 倍にそれぞれ増加しており、血清を除いた培地で HL60-RG 細胞を培養すると低分子量糖鎖が増加することが示唆された。

Fig.66A は、2 本鎖糖鎖のマスキロマトグラムである。無血清培地及び HS 添加培地で培養した細胞に共通して dHex₁Hex₅HexNAc₄NeuAc_{1,2}, dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₂ 及び dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₁ が検出された。Fig.66B に示したように、dHex₁Hex₅HexNAc₄NeuAc_{1,2} 及び dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₂ は、無血清培地で培養した細胞でそれぞれ 98%, 90% 及び 80% にそれぞれ減少していた。一方、dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₁ は、HS 添加培地で培養した細胞由来糖鎖の 1.92 倍に増加していることが明らかとなった。そこで、この糖鎖(糖鎖(a))の MS/MS スペクトルのフラグメントイオンの帰属により糖鎖構造を推定した。Fig.67 は、dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₁ の MS/MS スペクトルである。B₃⁺ イオン(NeuAcHexHexNAc⁺, *m/z* 657) 及び、B₂⁺ イオン(NeuAcHex⁺, *m/z* 454) が検出されたことから、シアル酸は Gal に結合していることが示唆された。また、B₄⁺ イオン(NeuAcHexHexNAcHex⁺, *m/z* 819), 及び B₄⁺ イオンに 1 分子の HexNAc が付加したフラグメントイオン (*m/z* 1022) から、この糖鎖はシアル酸が付加した側鎖にもう 1 分子 HexNAc が結合した糖鎖であり、バイセクテッド糖鎖(トリマンノシルコアの還元末端 Man に GlcNAc が付加した糖鎖)ではない

ことが明らかとなった。また dHexHexNAc-PHN⁺ に相当する Y₁⁺ イオンが *m/z* 458 に検出されたことから、還元末端の GlcNAc に Fuc が付加していることが明らかとなった。これらの結果から、この糖鎖は、Fig.67 挿入図 に示したように、非還元末端にシアル酸及び HexNAc が結合した側鎖を持ち、コアフコースが付加した 2 本鎖糖鎖、あるいは Hex-HexNAc の繰り返し構造にシアル酸が結合した側鎖とコアフコースを持つ 2 本鎖糖鎖であることが示唆された。無血清培地で培養した細胞由来の 2 本鎖糖鎖は、dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₁ のみ増加していたが、他の糖鎖はいずれも減少しており、無血清培地で培養した細胞由来糖鎖のプロファイルは血清添加培地で培養した細胞とは異なることが明らかとなった。

Fig.68A は 3 及び 4 本鎖糖鎖のマスキロマトグラムである。無血清培地で培養した細胞由来の複合型 3 及び 4 本鎖糖鎖は、dHex₁Hex₆HexNAc₅NeuAc₂, dHex₁Hex₆HexNAc₅NeuAc₃, dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuAc₃, dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuAc₄(1,2), dHex₁Hex₇HexNAc₇NeuAc₄, dHex₁Hex₈HexNAc₇NeuAc_{2,4}, dHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₂, dHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₃(1,2), dHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₄) 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.68B に示したように、無血清培地で培養した細胞由来 dHex₁Hex₈HexNAc₇NeuAc₃ 及び dHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₄ 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 Hex₁Hex₆HexNAc₅NeuAc₂, dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuAc₄(1,2), dHex₁Hex₇HexNAc₇NeuAc₄, dHex₁Hex₈HexNAc₇NeuAc₄ 及び dHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₃(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HL-60RG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.69)。一方複合型鎖糖鎖はdHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₁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-3-7 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研究についての考察

我々は、平成12年度から参加した厚生労働省の再生医療の品質・安全性評価に関わる研究班において、LC/MSを用いた独自の糖鎖プロファイリング法を確立し、細胞発現生理活性物質の構造特性解析や、分化・がん化指標の探索に応用してきた。平成17~19年度は糖鎖プロファイリングを用いた細胞表面糖鎖及び単糖の定性的定量的解析技術の開発に取り組んだ。

平成17年度は、MSⁿによって生じたLe^x糖鎖に特徴的なプロダクトイオンを診断イオンとして用いることによって、組織全糖鎖中のLe^x糖鎖の特異的検出と構造解析に成功した。この糖鎖は脳など特定の組織に多く存在し、ヒトでは胎児期に多く見られることが知られている。さらに、シアル酸が結合したシアリルLe^xは癌関連糖鎖抗原として臨床診断に用いられている。このような分化・癌化に関連した糖鎖、または特定の組織に存在する糖鎖は、再生医療に用いられる細胞の品質特性の評価やがん化した細胞の検出手法として有用な指標となっていく可能性がある。

平成18年度は、まず、高分解能質量分析が可

能なFTMSを用いてSIMにより質量範囲を制限して測定することにより、微量シアル酸の分析が可能になることを見出した。さらに、この分析法を用いて、FCS及びヒト血清添加培地を用いて培養したHL-60細胞の細胞膜画分のNeuGc及びNeuAcを定量し、僅か2.5 x10³個の細胞を使って、NeuGcの含量を測定できることを確認した。本分析法は感度及び特異性が高いことから、細胞治療薬のNeuGcの定量に応用可能であることが示唆された。

次に、細胞特性確認試験法としての糖鎖プロファイリング法の応用可能性を評価する目的で、HL-60細胞を用いて、培養条件の変化によって生じた細胞の変化を糖鎖プロファイリングによって捉えることができるかどうかを調べた。その結果、培養条件によって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、さらに、LC/MSを用いた糖鎖プロファイリングは、それを鋭敏に検出できることが確認された。今回の結果は、LC/MSを用いた糖鎖プロファイリングが細胞特性確認試験法として応用可能であることを示唆していると思われる。

平成19年度は、迅速、簡便、高精度な定性的定量的糖鎖プロファイリングの開発を目指して、PHNの重水素置換体を糖鎖標識試薬として用いる比較定量法の開発を検討した。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H₂O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 HL60-RG 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。

以上のように, 本研究で開発した細胞及び組織由来糖鎖の定性的定量的解析技術は, 細胞治療薬の特性解析, 及び品質評価技術として利用可能であると考えられる。

C-3-8 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研究についてのまとめ

(1) マウス腎臓をモデル細胞組織として用いて, LC/MS を用いる糖鎖プロファイリングが, 細胞組織発現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実証した。(2) LC/MS を用いて, 細胞治療薬の製造工程由来不純物として懸念されている NeuGc の微量定量法を開発し, モデルヒト細胞中に含まれ

ている微量の NeuGc を定量できることを確認した。(3) PHN を用いた定性的定量的糖鎖プロファイリング法を開発し, 同分析法が糖鎖を指標とした細胞特性確認試験法として利用できることを確認した。

C-4 免疫原性の新規評価技術の開発

造血幹細胞への高効率な遺伝子導入は, 遺伝子治療のみならず細胞治療・再生医療の発展において非常に有用な技術として期待されている。これまで, 造血幹細胞への遺伝子導入では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用いられてきた。しかしながら, これらのベクターでは長期的な遺伝子発現が期待できる一方, ウイルスゲノムが細胞の染色体に組み込まれる挿入変異のリスクがあり, 細胞が癌化にもつながる恐れがあること, 遺伝子機能解析などの一過性の発現が望ましい場合には適さないことなどが問題となっている。そこで我々は遺伝子が染色体に組み込まれることなく遺伝子発現を示す Ad ベクターによるヒト造血幹細胞への高効率な遺伝子導入法を開発を試みた。

Ad ベクターとしては, 従来汎用されている 5 型 Ad ベクター, ならびに血液細胞に対し親和性を有する 35 型 Ad を基本骨格とした 35 型 Ad ベクターを用いた。5 型 Ad ベクターは受容体として coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) を, 35 型 Ad ベクターは CD46 を認識することが報告されている (Fig. 70)。そこでまずヒト造血幹細胞を含む画分である骨髓由来 CD34 陽性細胞における CAR ならびに CD46 の発現を Flowcytometry にて検討した (Fig. 71)。その結果, 5 型 Ad ベクターの受容体である CAR の発現はほとんど認められなかったものの, 35 型 Ad ベクターの受容体である CD46 はほぼ全ての細胞が発現していた。

次に CD34 陽性細胞に対し, CMV プロモーターを

搭載した GFP 発現 5 型ならびに 35 型 Ad ベクターを加え、48 時間共培養した。その結果、35 型 Ad ベクターは 5 型 Ad ベクターと比較し、有意に高い遺伝子発現効率を示した (Fig. 72)。各 Ad ベクターを MOI (multiplicity of infection) 300 で作用させた場合では、5 型 Ad ベクターでは約 4.5% の細胞しか遺伝子発現を示さなかったのに対し、35 型 Ad ベクターでは約 59% もの細胞が遺伝子発現を示した。また平均蛍光強度においても、35 型 Ad ベクターは 5 型 Ad ベクターの約 10~60 倍高い値を示した。従って、35 型 Ad ベクターは 5 型 Ad ベクターよりもヒト造血幹細胞への優れた遺伝子導入用ベクターとなりうることを示された。

次に、CD34 陽性細胞においてどのプロモーターが最も優れているか検討するため、各種プロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターを作製して遺伝子発現効率を比較検討した。用いたプロモーターとしては、以下の 6 種類である：the human elongation factor 1 promoter (EF1 promoter), the CMV immediate-early 1 gene enhancer/β-actin promoter with β-actin intron (CA promoter), the CMV promoter/enhancer with the largest intron of CMV (intron A) (CMVi promoter), the mouse phosphoglycerate kinase 1 promoter (PGK promoter), the murine stem cell virus (MSCV) long terminal repeat (LTR) promoter (MSCV promoter)。これら各種プロモーターを搭載した 35 型 Ad ベクターをヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞に 6000VP/Cell で 6 時間のみ作用させたところ、EF1 プロモーター、CMVi プロモーター、CA プロモーターが他のプロモーターと比較し、高い遺伝子発現効率を示した (Fig. 73)。特に CA プロモーターでは約 54% の細胞が GFP 陽性であり、最も高い遺伝子発現効率を示した。以上の結果より、CD34

陽性細胞における遺伝子発現効率はプロモーターによって大きく異なり、今回調べたプロモーターの中では、CA プロモーターが最も活性が高いことが示された。

CA プロモーターを用いることで遺伝子発現効率の改善が認められたが、CD34 陽性細胞はほぼ全ての細胞が受容体である CD46 を発現しているにもかかわらず、遺伝子発現細胞の割合は 100% に到達していない。そこで遺伝子発現効率の更なる向上を目指して、ヒストン脱アセチル化 (HDAC) 阻害剤存在下での遺伝子発現効率を測定した。HDAC 阻害剤は、内在性および外来遺伝子の発現を転写レベルで増強することが知られている。ヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞に対し、HDAC 阻害剤 (FR901228、CAY10398) および GFP 発現 35 型 Ad ベクターを 6000VP/cell で 6 時間作用させたところ、HDAC 阻害剤非存在下においては、約 59% の細胞が遺伝子発現を示したのに対し、FR901228 濃度の増加とともに遺伝子発現効率の増大が観察され、FR901228 濃度 0.1ng/ml においては 71% の細胞が遺伝子発現を示した (Fig. 74B-E)。また、平均蛍光強度に関してはさらに顕著な改善が見られ、FR901228 濃度 0.1ng/ml では非存在下と比較し 3.5 倍の上昇が観察された。一方、もう一つの HDAC 阻害剤である CAY10398 では FR901228 の場合と比較し顕著な改善は認められなかった (Fig. 74F-H)。両薬物ともに 0.01-0.1ng/ml の範囲では、明らかな細胞毒性は観察されなかった。以上の結果より、HDAC 阻害剤を用いることによりヒト CD34 陽性細胞へ高効率な遺伝子導入が可能となった。

次にヒト骨髓由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入実験に用いた Ad ベクターを Fig. 75 に示す。ヒト CD34 陽性細胞におけるインテグリンの発現をフローサイトメトリーにより検討したところ、

$\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ および $\beta 2$ インテグリンがほぼ 100%の細胞で発現していた (Fig. 76)。また、発現レベルはやや低いものの 13%の細胞で $\alpha v \beta 3$ インテグリンが、2%の細胞で $\alpha v \beta 5$ インテグリンが発現していた。尚、CD34 陽性細胞におけるインテグリンの発現について 2 人のドナー由来の細胞を解析したが、どちらの細胞においても同程度の発現が得られた (data not shown)。

次に、35 型 Ad ペントンベース・RGD 配列の感染への関与について検討するために、RGD ペプチドによる 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入阻害実験を行った。その結果、インテグリンに結合しない RGE ペプチド作用群と比較して、RGD ペプチド存在下では濃度依存的に有意な遺伝子導入阻害が見られた (Fig. 77)。RGD ペプチド 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 存在下で 43%まで遺伝子導入効率が低下した。以上の結果より、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入にはペントンベース・RGD 配列が関与していることが示唆された。また本結果より、インテグリンの中でも RGD 配列を認識するインテグリンが関与していることが示唆された。

さらにペントンベースの RGD 配列の関与について検討するため、35 型 Ad ベクターのペントンベースに存在する RGD モチーフを RGE に置換 (Ad35RGE GFP)、または欠損 (Ad35・RGD GFP) させた 35 型 Ad ベクターを作製し、通常の 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率と比較した。その結果、通常の 35 型 Ad ベクターと比較して、Ad35RGE GFP および Ad35・RGD GFP のいずれのベクターを作用させた場合においても遺伝子導入効率の有意な低下が観察され、それぞれ Ad35GFP の 20%または 17%まで遺伝子発現量が低下した (Fig. 78)。従って、前節の RGD ペプチドを用いた 35 型 Ad ベクター遺伝子導入阻害実験および本実験の結果より、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入にペントンベ

ース・RGD 配列とインテグリンの結合が関与していることが明らかとなった。

次に、ペントンベース・RGD 配列改変 35 型 Ad ベクターの細胞内取り込み量を Real-time PCR を用いて測定した。RGD 配列改変 35 型 Ad ベクターの細胞内ベクターコピー数は従来の 35 型 Ad ベクターと比較して、Ad35RGE GFP および Ad35・RGD GFP とともに有意な差は認められなかった (Fig. 79)。さらに CD34 陽性細胞の細胞表面への結合量に関しても差は見られなかった (Fig. 80)。以上の結果から、ペントンベース・RGD 配列改変による遺伝子発現量の低下は、35 型 Ad ベクターの細胞表面接着や細胞内取り込み過程ではなく、それ以降の細胞内輸送が妨げられたことに起因していることが示唆された。

さらに 35 型 Ad ベクターによる CD34 陽性細胞への遺伝子導入に関与しているインテグリン分子を同定するために、種々の抗インテグリン阻害抗体を用いて 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入阻害実験を行った。その結果、抗 $\alpha v \beta 3$ インテグリン抗体存在下でコントロール IgG 作用群と比較して 59%まで遺伝子導入効率が低下した (Fig. 81)。しかし、その他の抗体を作用させた場合には有意な差は認められなかった。従って、35 型 Ad ベクターによるヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入に $\alpha v \beta 3$ インテグリンが関与していることが示された。

次に、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. 82)。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. 83)。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 μ 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. 84)。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. 85)。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・増殖能が一定期間培養した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 マウスに移植し生着するかどうか検討した。移植 20 週後に末梢血、骨髓、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、骨髓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 陽性細胞が生着していることが示唆された (Fig. 86)。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 (Fig. 86)、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 週間で出現するとされている。(Fig.87)

移植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、骨髓から動員される。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 AC133 陽性細胞由来 CD31 強陽性 early EPC の特性および TPO による誘導

C-5-1-1 AC133 陽性細胞由来 CD31 強陽性 early EPC の特性

我々はこれまで、ヒト末梢血あるいは臍帯血から分画した細胞から EPC を分化・誘導する系を確立し、AC133 陽性細胞に由来する CD31 強陽性細胞が VE cadherin 陰性の early EPC であることを報告してきた (Kanayasu-Toyoda et al. J. Cell Physiology. 195, 119, 2003)。タイプ IV コラーゲン上で 1 週間培養した AC133 陽性細胞を CD31 発現量を指標に FACS で分画し (Fig.88a)、ファイブロネクチン上でさらに 1 週間培養すると、CD31 強陽性画分の細胞は CD31 陽性画分の細胞と比較して接着性が高く紡錘形の形態を示す

(Fig.88 b, c)。また、CD31 強陽性画分の細胞は KDR 陽性、eNOS 陽性である (Fig.88 d, e)。

Early EPC は様々なサイトカインを産生することによって血管形成促進作用を示すと考えられることから、CD31 陽性細胞と CD31 強陽性細胞について、サスペンションアレイによるサイトカイン濃度の多項目同時定量法を用いて各細胞が産生するサイトカインを比較した (Fig.89)。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 などのケモカインの産生量が多いことが明らかになった。

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

Early EPC の臨床応用に向けた課題は、移植される患者の負担やリスクを軽減するため *in vitro*

での増幅法を確立することである。そこで、EPC 増幅作用を持つ物質を種々探索した結果、巨核球の分化増殖や造血幹細胞の自己複製に関与することが知られている TPO が、AC133 陽性細胞から CD31 強陽性細胞への分化誘導を促進することを見出した。

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.90)。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.91b 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。

C-5-1-3 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.91a 上段) も TPO 処理群 (VEGF+TPO、Fig.91a 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とされている (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

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.91b 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存在すると考えられた。

C-5-1-4 TPO による early EPC 誘導系の特性

Fig.92 は AC133 陽性細胞を 1 週間培養後、抗 CD31 抗体-FITC で免疫染色し、フローサイトメーターで解析した結果である。この検討では、全ての群に VEGF を添加して実験を行った。CD31 強陽性細胞は末梢血では 0.46%、臍帯血では 0.35% の部分に相当する。SCF 添加では末梢血では 0.47%、臍帯血では 0.30% とあまり増加しないのに対し、TPO を加えると末梢血では 2.30%、臍帯血では 2.60% と増加する (Fig.92a)。細胞総数と FACS により示される割合から CD31 強陽性細胞の絶対数を計算すると、Fig.92b のようになり、TPO を添加することで CD31 強陽性細胞が 10 倍以上増加することが明らかとなった。

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.93a)。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.93b)、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。

次に、添加する TPO の濃度を検討した。その結果、5ng/ml の TPO により細胞総数が約 2 倍の上昇を示した (Fig.94 左)。TPO の濃度を 10ng/ml から 50ng/ml に上昇させても細胞総数の顕著な増加は観察されなかったが (Fig. 94 左)、CD31 強陽性細胞の絶対数を計算すると末梢血では CD31^{bright}VEcad⁺細胞 (Fig.94 右上) が、臍帯血では CD31^{bright}VEcad⁺細胞と CD31⁺brightVEcad⁻細胞 (Fig.94 右下) が、TPO の濃度に依存して増加した。VE カドヘリン (VEcad) は EPC の分化段階のマーカーであり、EPC としての分化が進むと VEcad 発現が増加すると考えられることから、末梢血では、TPO によって分化の進んだ細胞の割合が高い EPC を調製できると考えられた。

C-5-1-5 VEGF 非存在下での TPO の効果

先の検討は対照群に 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.95a) 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.95b) で CD31 強陽性細胞の割合を解析すると約 1.5 倍とわずかではあるが上昇しており、CD31 強陽性細胞数 (Fig.95c) 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.95a) し、CD31 強陽性細胞の割合は約 13 倍近く上昇しており (Fig.95b)、CD31 強陽性細胞数 (Fig.95c) 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.95c)。

C-5-1-6 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.93 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.96a 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。これは EPC の分化・増殖促進作用 (Fig.95c) 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.96b)。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.97)。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-5-2 単核球由来 EPC の誘導に対する血小板の影響

単核球から AC133 陽性細胞を分離し、EPC を誘導する我々独自の系と並行して、最も一般的な単核球画分全体からの EPC 誘導系に関する検討も行った。臍帯血より Lymphoprep tube を用いて単核球を分離し、FN コートしたプレートに播種すると、単核球の一部の画分と共に血小板もプ

レートに接着し、培養開始 1 週間後ぐらいまではプレート上に存在する (Fig.98)。血小板は血管新生に促進的あるいは抑制的に働く多くの生理活性物質を含有していることから、FN への単核球の接着あるいは EPC への分化に血小板が影響している可能性が考えられた。そこで、Lymphoprep ($\rho=1.077\text{g/ml}$) による分離で得られた単核球画分を、 $\rho=1.063\text{g/ml}$ に調整した細胞分離用高分子担体 Optiprep に上層して遠心することにより、単核球画分から血小板を除去したサンプルを用いて、血小板が EPC 分化に与える影響を解析した。血小板除去前、除去後、および、血小板除去後に血小板を添加したサンプルの 3 種類について、EPC 誘導条件下で培養を行い、1 週間後に AcLDL 取り込み陽性、抗 CD31 抗体染色陽性の細胞を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、Fig.98 に示すように、血小板を除去することにより、EPC が大幅に減少することが明らかになった。一方で、血小板除去後に血小板を添加することにより、EPC 数が回復したことから、血小板が EPC の誘導に促進的に働いていると考えられた。

EPC 誘導系における血小板の作用が血小板由来の液性因子を介したものである可能性を検討するため、単核球と血小板が接触しないよう、単核球を FN コートプレート上に、血小板を多孔性のセルカルチャーインサート中に播種して、培養を行った。セルカルチャーインサートとしては、血小板 (直径約 $2\mu\text{m}$) が通過しないように、 $0.4\mu\text{m}$ のポアサイズのものを用い、ポア密度が通常のものより高いもの、および、ポア密度が通常で FN コートしてあるもの、の 3 種類を用いた。その結果、血小板をインサート内に隔離して培養した場合は、いずれの種類のインサートにおいても EPC 出現に対する血小板の促進効果が見られず、血小板が EPC の誘導を促進するには、血小板と単核球が接触できる環境にあることが必要であると考えられた (Fig.99)。実験に用いた培養系では、流れ刺激などは与えていないが、FN コート

プレート上の細胞を顕微鏡で観察すると、血小板が細かく動き、単核球に接触を繰り返す様子が観察された。血小板の動きはパラホルムアルデヒドで固定した場合も観察されたため、能動的なものではないと考えられるが、静置培養系においても単核球と血小板の接触が認められたことから、血小板との接触によって単核球内でのシグナル伝達経路が直接活性化される可能性、あるいは、血小板と単核球の接触後に、どちらか、あるいは両方から、EPC誘導に関わる因子が放出され、EPCの誘導に関与している可能性などが考えられる。

血小板と単核球の接触によりEPCの誘導が促進されていることが明らかとなったため、血小板に存在する接着タンパク質P-selectinが、単核球由来EPCの分化誘導促進作用を持つ可能性について検討した。P-selectinは、789アミノ酸からなる膜貫通タンパク質で、細胞外部分にはレクチンドメインがあり、シアリルルイスX構造を持つ糖鎖をリガンドとしている。P-selectinの細胞外ドメイン730アミノ酸のみをCHO細胞で発現させた組換えP-selectinを用い、そのEPC誘導効果について検討した。

Optiprepを用いて血小板を除去した単核球をFNコートしたプレートに播種し、P-selectinを10ng/ml、100ng/ml、1 μ g/ml、10 μ g/mlの濃度で添加して培養した。培養開始1週間後に、DiI-Ac-LDLの取り込み、および、抗CD31抗体染色陽性の細胞数を計測した結果をFig.100に示す。その結果、P-selectin濃度が1 μ g/ml、10 μ g/mlの場合に、P-selectinを添加しない場合と比較してEPC数が多く、P-selectinがEPC誘導促進効果を持つことが明らかになった。

C-5-3 OEC誘導法と特性に関する解析

C-5-3-1 臍帯血単核球由来OECの特性指標解析

OECコロニーは、臍帯血由来単核球をFNコート上で培養すると14日目ぐらいから観察される。このコロニーの形状は円形で、各々の細胞は

敷石状を呈しており、増殖能が高い。培養15日目にコロニーをトリプシン・EDTAを用いて回収し、48穴のマルチウェルに再播種して、蛍光免疫染色により血管内皮細胞マーカー分子の発現を解析した。その結果、このOECはCD31陽性、eNOS陽性、VE cadherin陽性、KDR陽性、CD11b陰性、CD14陰性であり、血管内皮細胞としての特徴を備えていた(Fig.101)。また、eNOSとCD31、VE cadherin、KDRを2重染色すると、すべての細胞が2重に染色されることから均一な集団と考えられた。さらに、この細胞の内皮細胞としての機能を検討するため、マトリゲル上の3次元培養を試みた。その結果、このOECはマトリゲル上で、管腔を形成したことから、機能的にも血管内皮細胞と同等の性質を持つことが確認できた(Fig.101)。

OECを誘導するために、単核球をFNコートプレート上で血管内皮細胞用の培地で長期培養している際、OEC以外の細胞が出現することがある。その頻度や量は、細胞のロット(ドナー)や細胞播種密度により異なるが、Fig.102に示すように、非常に大きいスピンドルな形をした α -SMアクチン陽性の血管平滑筋細胞が観察される場合があった。また、脂肪細胞様の細胞が認められることがしばしばあった。OEC培養中に認められたこの細胞を脂肪染色に用いられるOil Red Oで染色したところ、Fig.103に示すように赤く染色され、脂肪細胞であると考えられた。単核球培養開始時の血小板含量が高いと、出現する細胞のheterogeneityが高くなる傾向があり、酒石酸耐性アルカリホスファターゼ活性染色陽性で多核の破骨細胞様の細胞が認められることもあった(Fig.103)。

純度の高いOECを得るためには、これらの細胞の混入がない状態で細胞を調製することが重要であり、細胞の純度が品質評価の重要な項目となる。適正な播種数を設定することでheterogeneityは抑えられると思われるが、脂肪細胞様の細胞は比較的出現頻度が高いため、注意

が必要であると思われた。ただし、出現した脂肪細胞の増殖はほとんど認められない。平滑筋細胞は増殖能が高く OEC を覆い尽くしてしまうほどであるが、形態からの判別は比較的容易である。確認試験や純度試験における細胞形態の観察も重要であると考えられる。

C-5-3-2 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、 1×10^7 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、誘導効率を上昇させる必要がある。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うる生理活性物質で

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、誘導効率に与える影響を評価した。

FN 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。単核球のロット（ドナー）により差があるが、OEC コロニーは培養開始 10 日～2 週間後ぐらいから出現し始める。8 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.104 のような結果となり、heparin を含み、hydrocortisone を含まない培地が OEC 誘導に適している可能性が考えられた。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-5-3-3 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、夾雑細胞の少ない状態で OEC を誘導すること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 13)。

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。Table 13 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.105)。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-5-3-4 OEC 誘導後の培養条件の最適化

本研究開始当初の検討において、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.106a)。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 用に至適化された培地 (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.106b)。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- β -galactosidase の活性染色陽性となった (Fig.107)。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.107)。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.108)。

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.109)。

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-5-3-5 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.110&111)。Fig.111 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.112)。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(2.35mm²)ごとに定量した結果を Fig.113 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 β 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.114)。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。

我々は先の検討で、CD31 強陽性 EPC が大量 (ng/ml レベル) の IL-8 を分泌することを見出し (Fig.89)、EPC の特性指標としての IL-8 の同定に成功している。一方、生体において、EPC と OEC は協調的に働きながら血管形成を促進していると考えられるが、その機構は明らかでない。そこで、ケモカインである IL-8 が OEC の遊走を促進する可能性を考え、OEC における IL-8 受容体発現、および、OEC 遊走に対する IL-8 の効果を検討した。

臍帯血単核球由来 OEC を非酵素的にプレートから剥離して細胞浮遊液とし、IL-8 受容体の発現をその抗体を用いて解析した (Fig.115a)。その結果、OEC は IL-8 受容体を発現していることが明らかとなった。IL-8 受容体は OEC のみならず、代表的な組織由来血管内皮細胞である HUVEC (臍帯静脈血管内皮細胞) でも発現しており、OEC と HUVEC で発現量に差は認められなかった。IL-8 による OEC の遊走促進効果を検討したところ、Fig.115b に示すように、0.1 ng/ml という低濃度の IL-8 で OEC の遊走が有意に促進され、1.0 ng/ml で最大効果を示した。10.0ng/ml では遊走が促進されておらず、OEC 遊走における IL-8 の濃度依存性は遊走促進因子として典型的なベル・シェイプとなった。

これらの結果から、AC133 由来 CD31 強陽性 EPC の特性指標として IL-8 を同定すると共に、IL-8 が OEC の遊走促進効果を持つことを明らかにすることができた。血液由来細胞から分化誘導した early EPC と OEC を同時に投与することで、血管再生の効率を上げることができると考えられる。フローサイトメトリーによる解析で OEC が IL-8 受容体を発現していることが明らか

となったが、OECの細胞集団の中でIL-8受容体を発現している細胞の割合は26.7%であったことから、IL-8受容体陽性OECのみを分離して用いることで、血管再生の効率を上昇させられる可能性も考えられる。

C-5-4 細胞特性指標の探索研究についての考察

血管再生療法をより安全に有効性の高いものとして一般に提供していくためには、血管内皮前駆細胞を *in vitro* で増幅し、品質・有効性・安全性の確保された細胞・組織加工医薬品として開発していくことが望まれる。血管内皮前駆細胞を細胞組織・加工医薬品として用いることを考えると、ドナーは患者自身であると想定されるため、製造工程関連の要素としては細胞誘導の方法が特に重要であり、また、最終製品の安全性、力価、純度に影響する試薬、添加剤なども重要な要素になると考えられる。一方で、確認試験や力価などの製品の品質特性を示す規格および試験方法を設定するには、細胞誘導の方法が確立され、目的とする細胞の特性指標が明らかになっていなければならないことから、現状では、血管内皮前駆細胞の誘導方法の確立と細胞特性指標の探索が最も重要な課題であると考えられる。

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、あるいは造血幹細胞の自己複製を促進する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。また、Early EPC では CD31、MCP-1、IL-8 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。短い培養期間で临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。また、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と比較した。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。

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、細胞・組織加工医薬品の品質・安全性確保のための評価系確立のモデルとして、有効性と関連する特性指標の探索や安全性評価法の開発を継続していきたいと考えている。

C-5-5 細胞特性指標の探索研究についてのまとめ

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) AC133 陽性細胞から分化誘導される CD31 強陽性細胞が高活性な early EPC であることを見出した。また、CD31 強陽性細胞の誘

導がトロンボポエチン (TPO) で促進されることを見出し、CD31 強陽性細胞の誘導率向上に TPO が有用であることを示した。

- 2) TPO の early EPC 分化・増殖促進作用は VEGF よりも強く、VEGF 非存在下でも有効であった。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。TPO と VEGF の細胞内伝達を比較すると VEGF が Akt のリン酸化のみを促進するのに対して、TPO は Akt のリン酸化のみならず、STAT3 のリン酸化も促進したことから、TPO が PI3K/Akt と JAK/STAT 経路を介して EPC の分化・増殖を促進していると考えられた。
- 3) CD31 強陽性細胞のタンパク質発現プロファイル解析により、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 が有用である可能性を示した。また、IL-8 が OEC の遊走促進作用を持つことを明らかにし、early EPC と OEC の併用により血管再生の効率が向上する可能性を示唆した。
- 4) 単核球由来 early EPC の分化誘導には、単核球画分に含まれる血小板が促進的に作用することを明らかにした。
- 5) 単核球からの OEC 誘導系において、OEC コロニー出現数、増殖、管腔形成能への培地組成の影響を検討して OEC 培養条件の最適化を行った。CD45 陰性画分の利用、細胞播種時に hydrocortisone 非添加により OEC 誘導効率が改善された。また、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 の遺伝子発現プロファイルの解析により、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