

メーキング 第14回 日本バイオイメージング学会 2005年10月

- 17) 小林哲、河合洋、鈴木琢雄、石井明子、早川堯夫、川西 徹：MALDI-TOF MSにおけるタンパク質シグナルの増強 Part 2 質量分析総合討論会 2005年5月

H. 知的財産権の出願・登録状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |


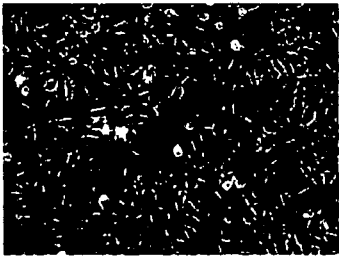
	EPC	OEC
形態	 Spindle shape (or round shape ?)	 Cobblestone
特徴	細胞のheterogeneity高い 増殖性低い	均質な細胞 増殖性高い
機能	血管形成を促進する サイトカイン等を放出	新生血管に取り込まれる
臨床応用例	あり	なし
有用性確保の ための課題	増幅法の確立 特性解析	誘導効率の改善 (現状: 1コロニー/10 <sup>7</sup> MNCs程度) 特性解析

Fig. 1 Early EPCとOECの特徴

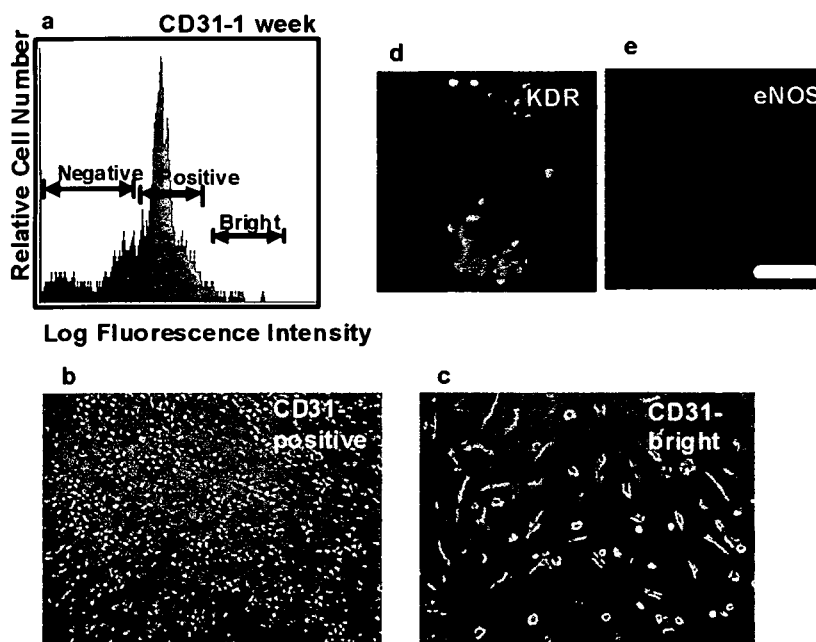


Fig. 2 AC133陽性細胞から誘導したCD31強陽性early EPC

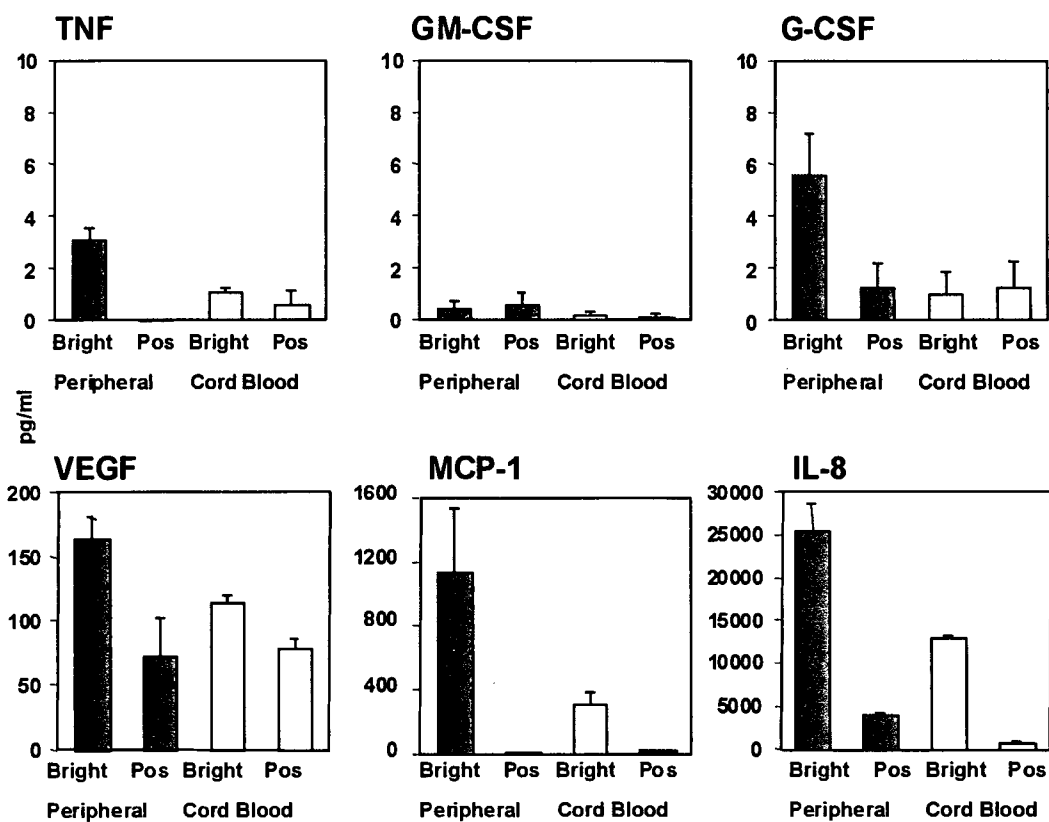


Fig. 3 AC133陽性細胞由来CD31陽性・強陽性細胞が放出するサイトカインの解析

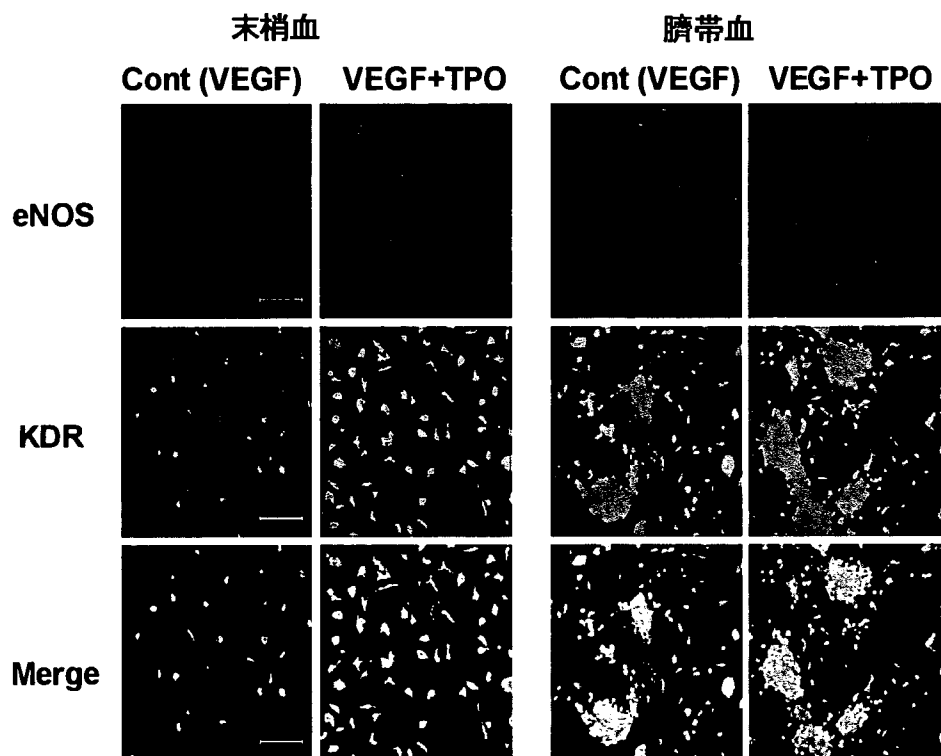


Fig. 4 TPOのEPC増幅作用

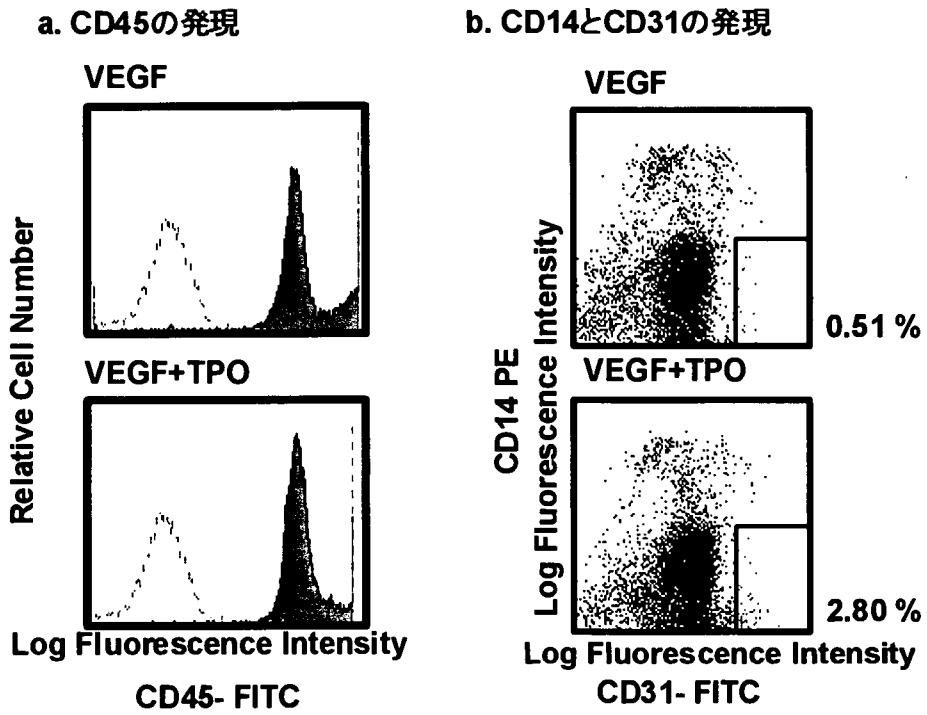


Fig. 5 培養AC133陽性細胞におけるCD45とCD14の発現

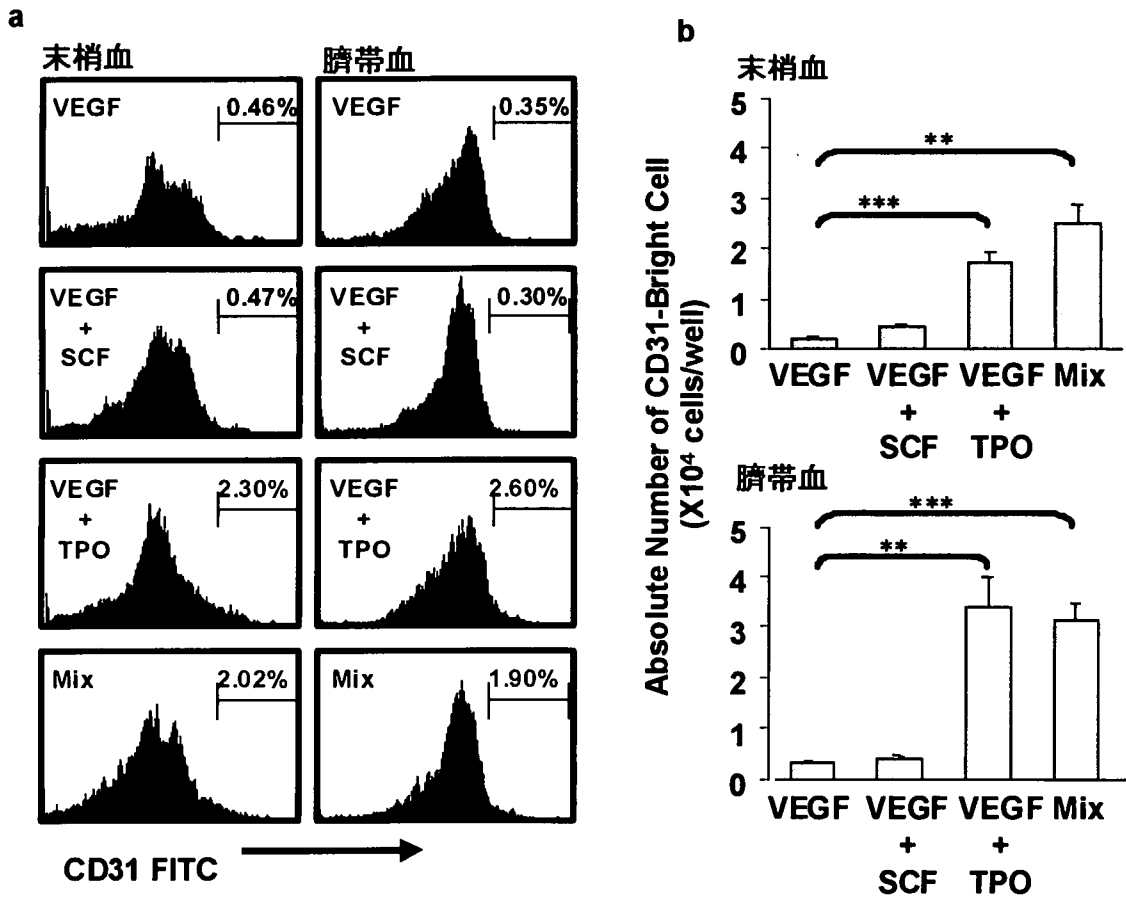


Fig. 6 CD31強陽性細胞出現に対するTPOの効果

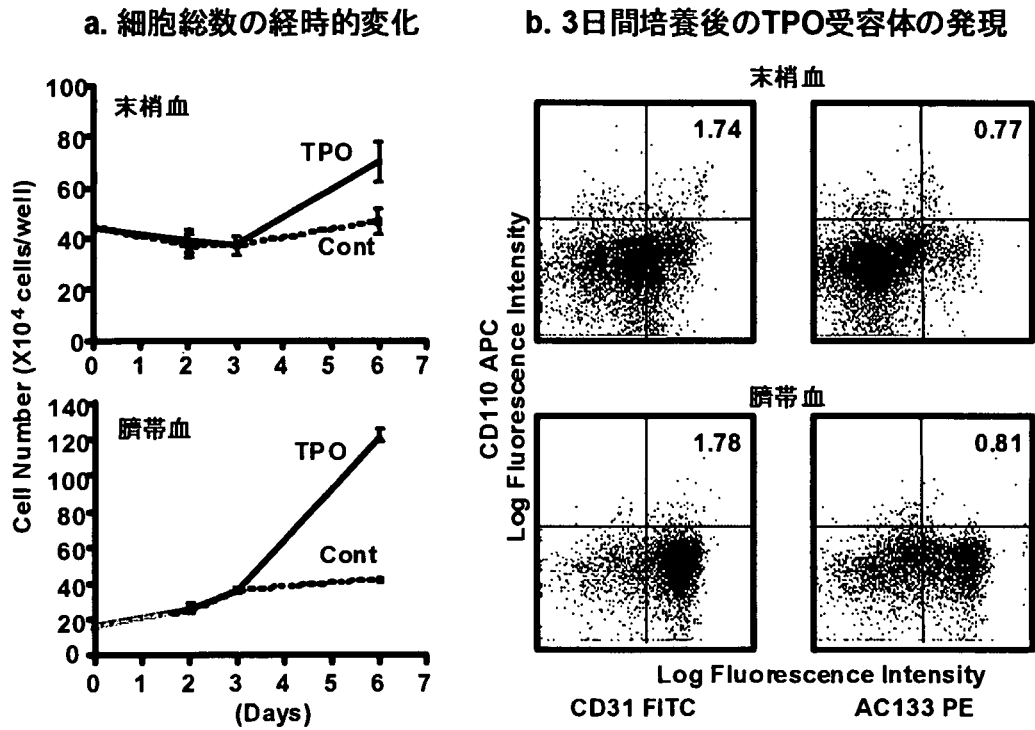


Fig. 7 AC133<sup>+</sup>細胞におけるTPO添加によるEPC増幅作用の経時変化

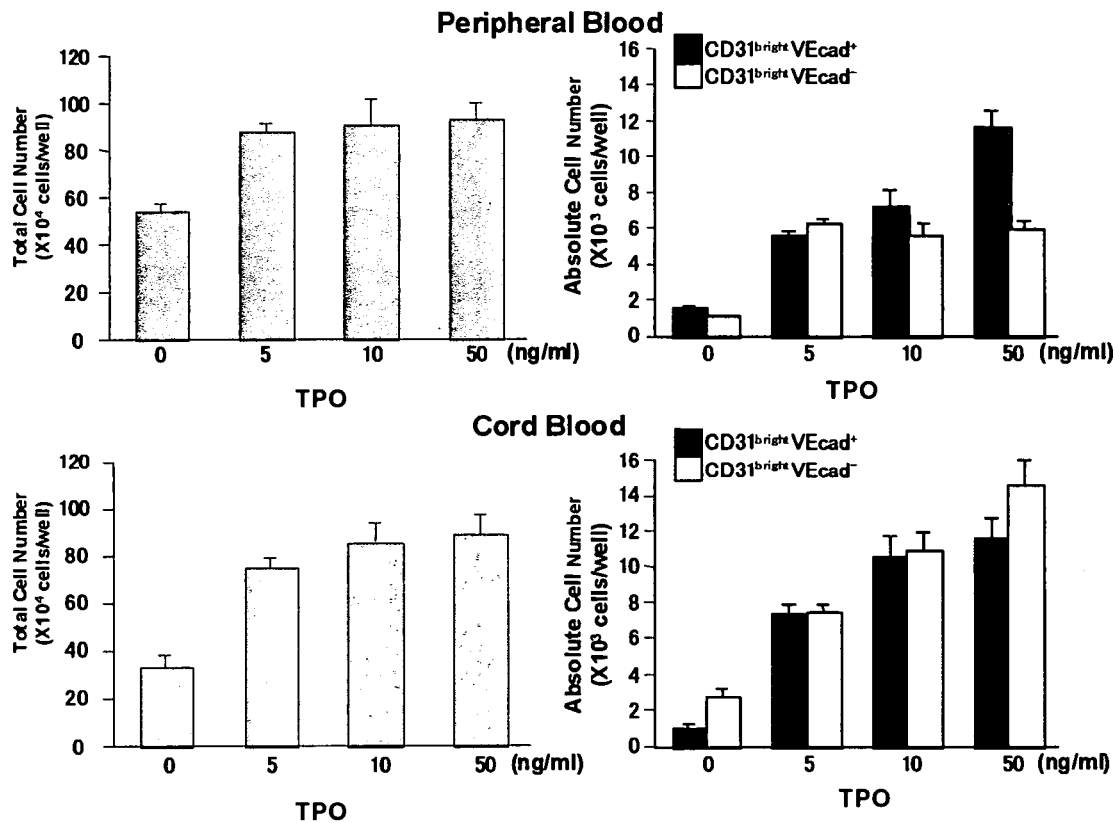


Fig. 8 CD31強陽性細胞出現に対するTPOの効果

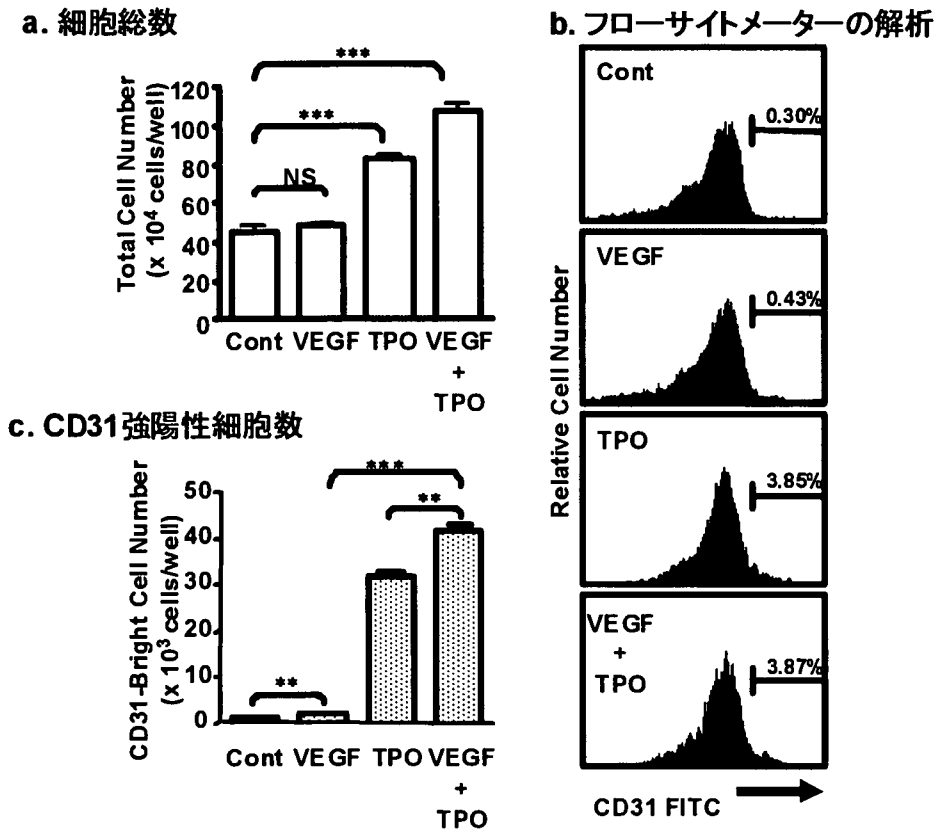


Fig. 9 EPC増幅作用におけるTPOとVEGFの比較

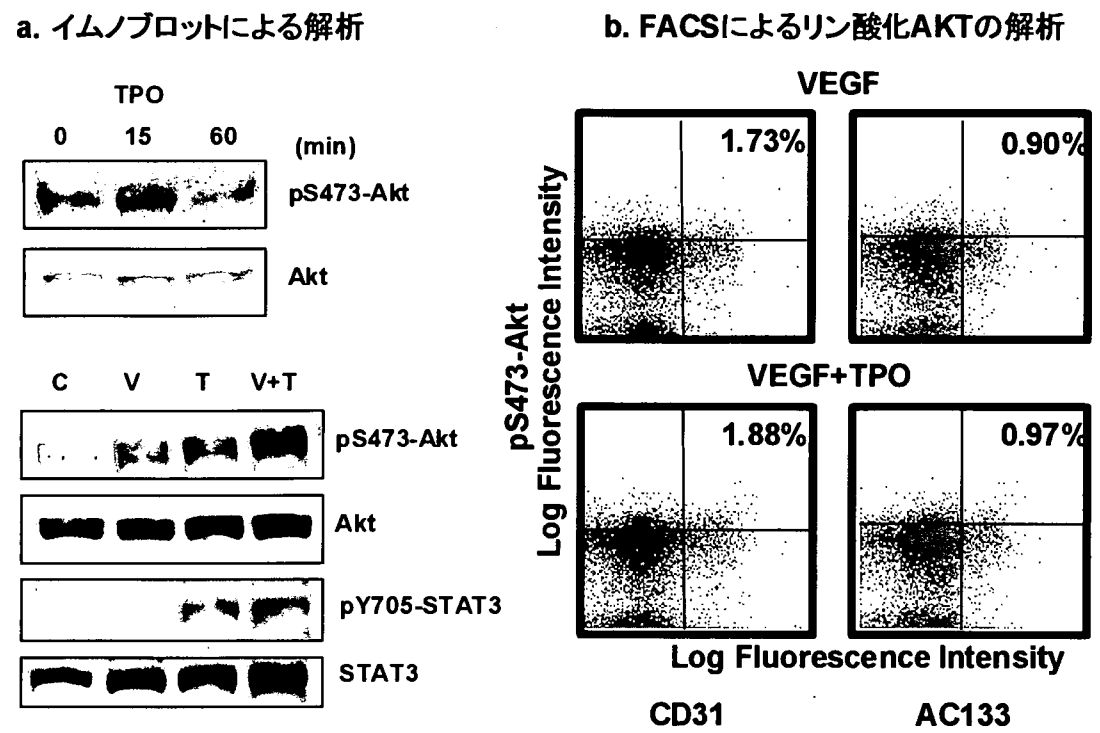


Fig. 10 AC133<sup>+</sup>細胞におけるTPO添加によるAKT及びSTAT3のリン酸化

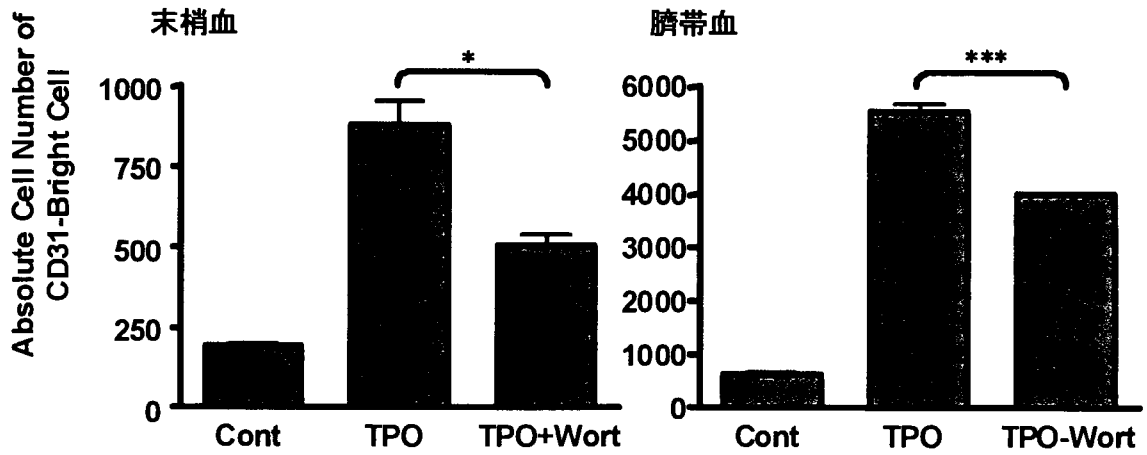


Fig. 11 TPOのEPCの分化・増殖作用におけるワートマニンの効果

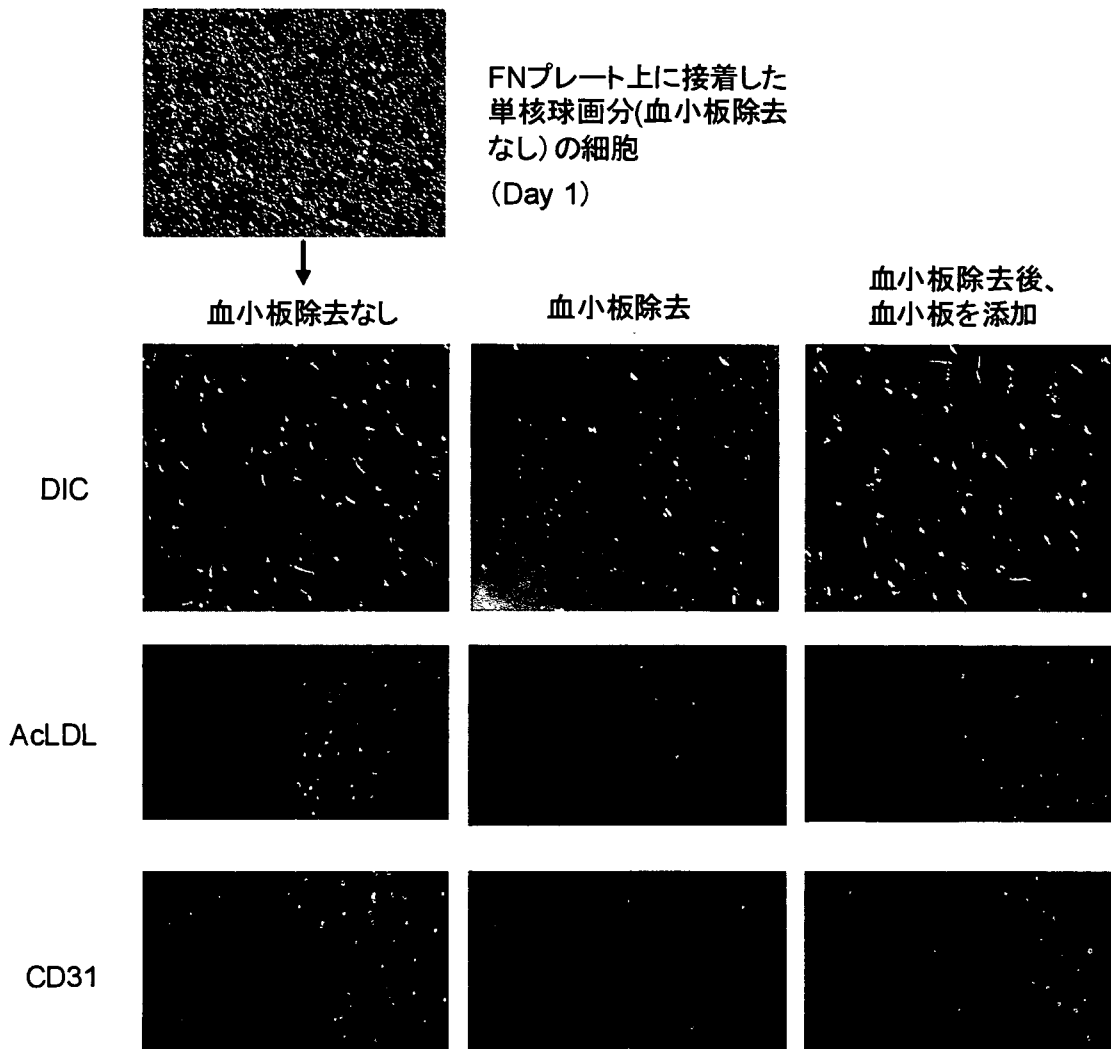


Fig.12 単核球からのEarly EPC誘導に対する血小板の影響(Day6)

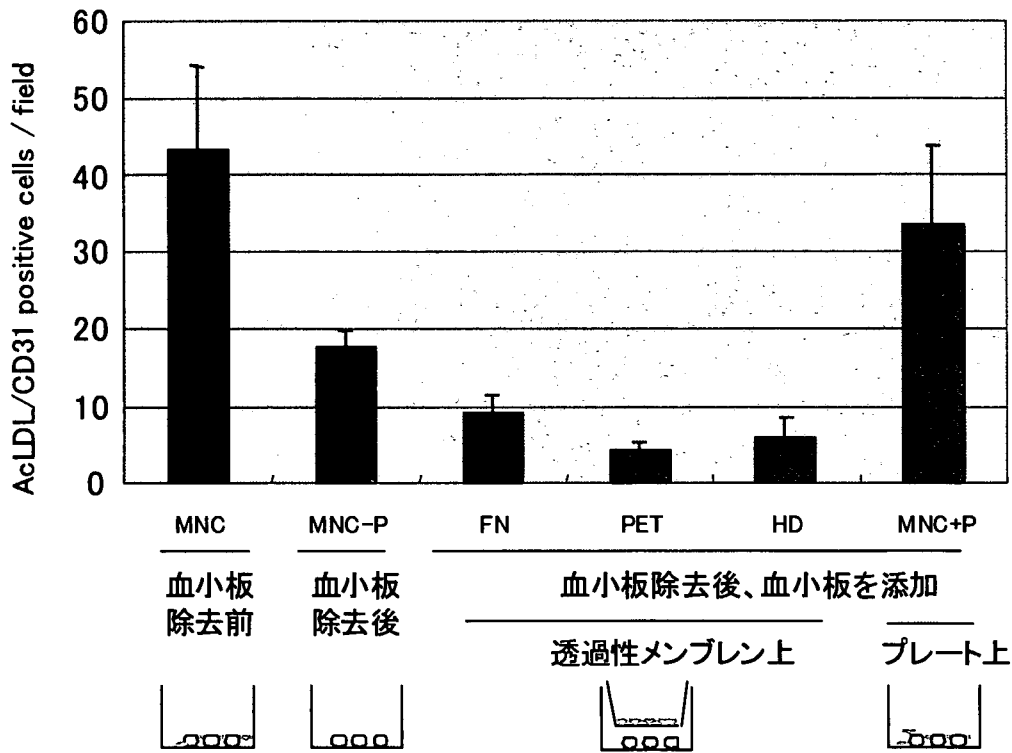


Fig. 13 EPC誘導に対する血小板の影響

透過性メンブレン(ポアサイズ0.4 μm)

FN: Fibronectinコート  
 PET: 通常のメンブレン  
 HD: ポア高密度

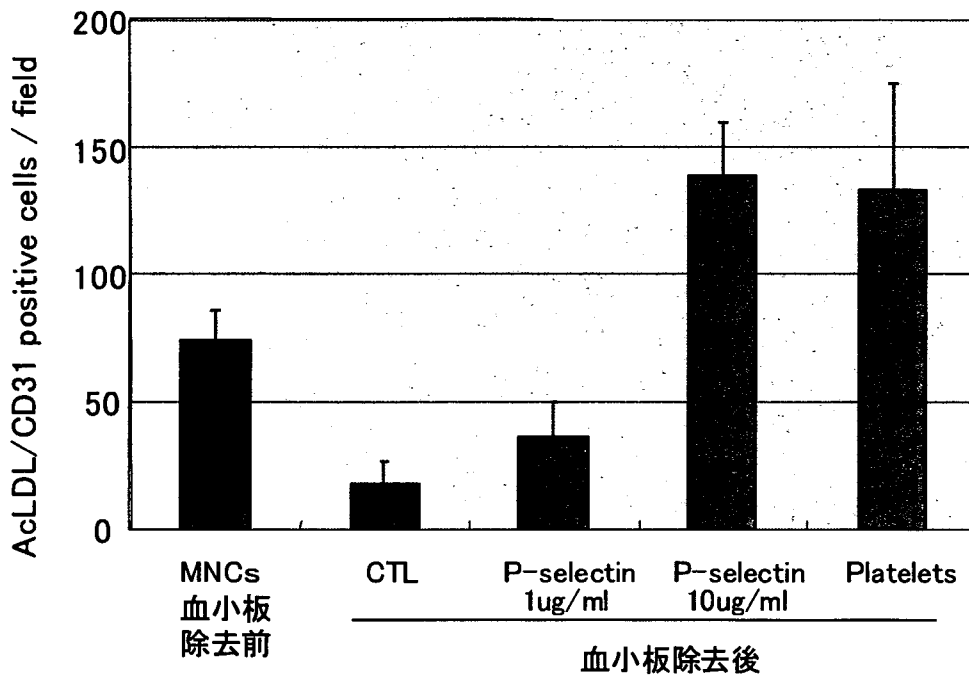


Fig.14 EPC誘導に対する組換えP-selectin(可溶型)の効果



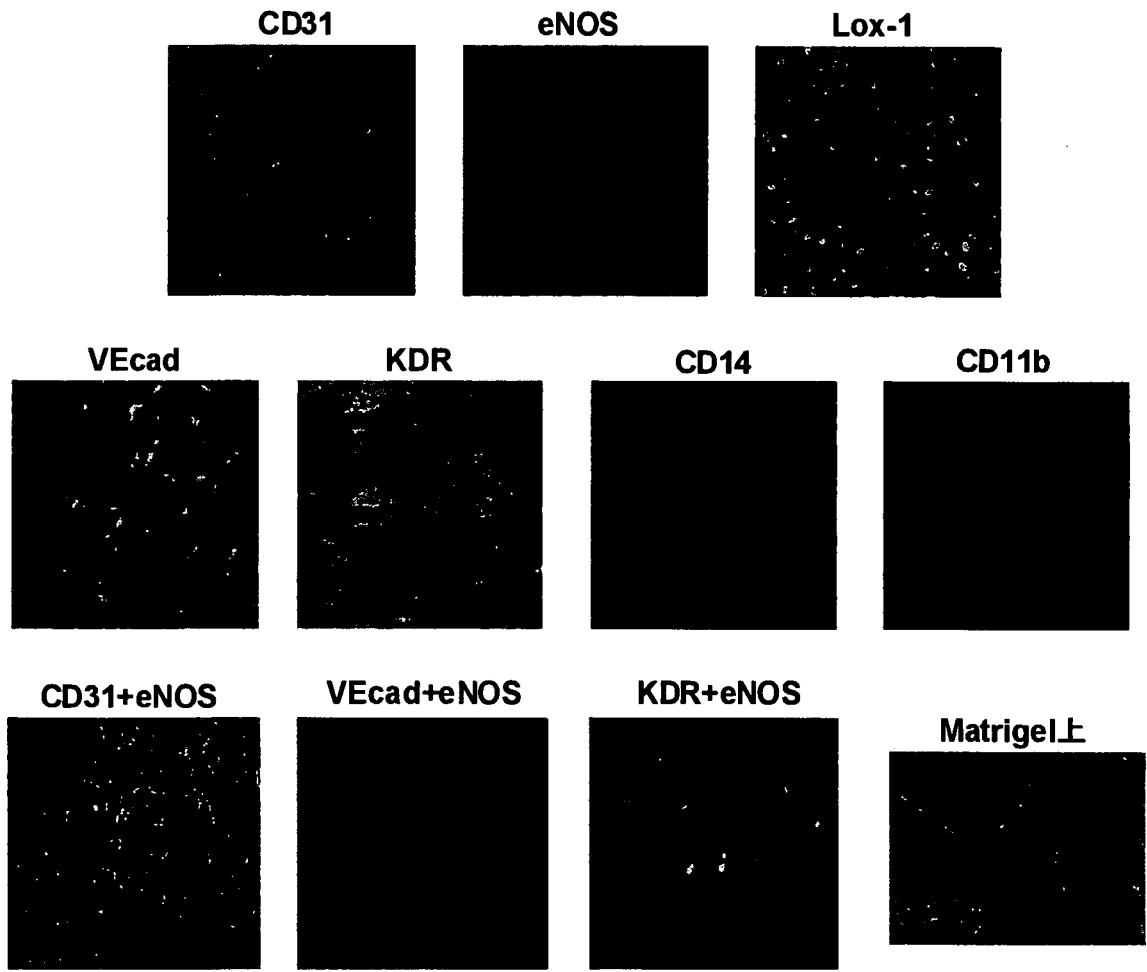


Fig. 15 臍帯血OECが血管内皮細胞である同定

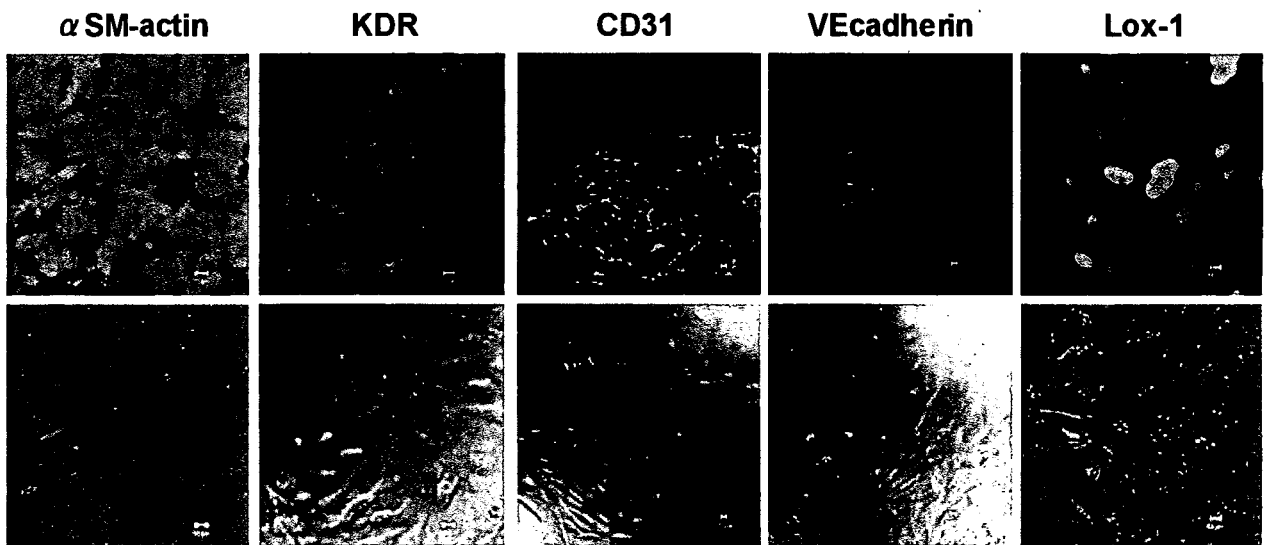
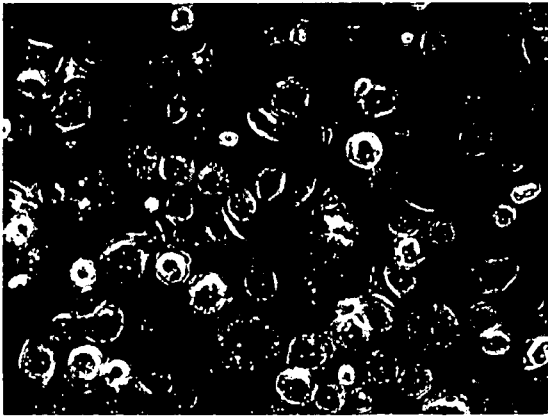


Fig. 16 臍帯血単核球由来OEC誘導条件下での培養時に出現した血管平滑筋細胞の同定



Oil Red O染色  
(Adipocytes)



酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性染色  
(Osteoclasts)

OECパッチ4  
血小板を多量に添加したwell

Fig. 17 臍帯血単核球由来OEC誘導条件下での培養時に出現した  
脂肪細胞および破骨細胞

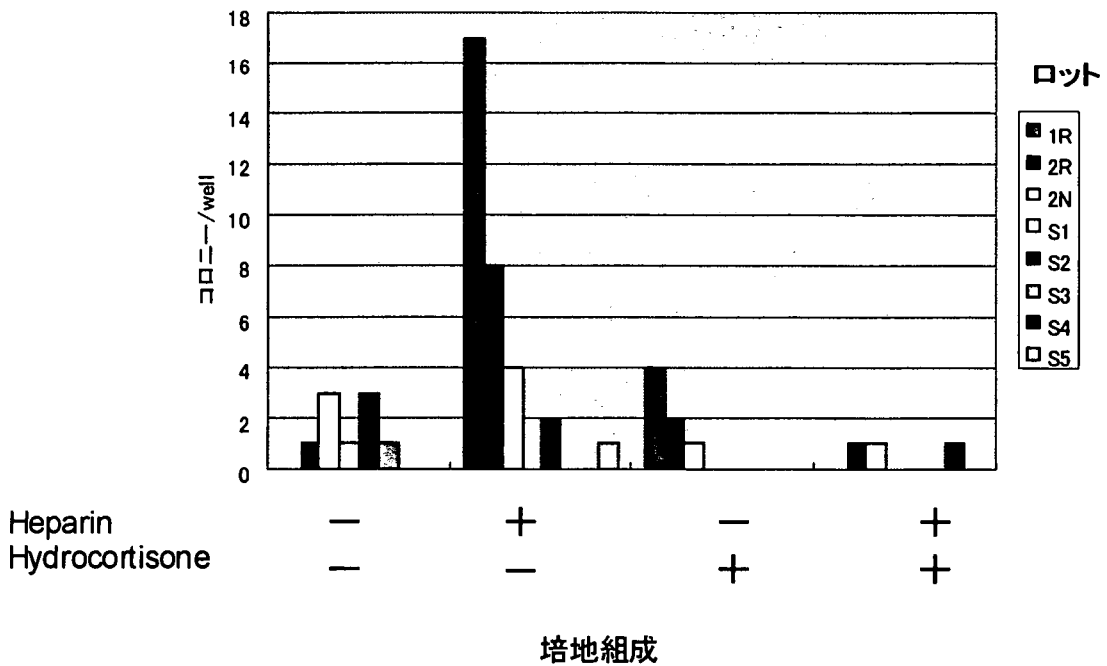


Fig. 18 OECコロニー出現に対するhydrocortisoneおよびheparinの影響

Table 1 分画した単核球から誘導されたOECコロニー数

		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7
実験条件	Cord Blood	Frozen	Frozen	Frozen	Fresh	Frozen	Fresh	Frozen
	CD45-回収率	56%	34%	30%		28%	46.40%	30%
	HC添加 (day 7~)	-	-	-	-	+	+	+
OECコロニー数	MNC	1 12.5x10 <sup>7</sup>	1 9.1x10 <sup>7</sup>	0 6x10 <sup>7</sup>	0 10x10 <sup>7</sup>	63 6x10 <sup>7</sup>	63 8x10 <sup>7</sup>	2 6x10 <sup>7</sup>
	CD45+	0 30x10 <sup>7</sup>	0 23.9x10 <sup>7</sup>	0 45x10 <sup>7</sup>		0 30.6x10 <sup>7</sup>	10 10x10 <sup>7</sup>	0 24x10 <sup>7</sup>
	CD45-		0 3.3x10 <sup>7</sup>	0 2x10 <sup>7</sup>		34 6x10 <sup>7</sup>	127 13x10 <sup>7</sup>	21 4x10 <sup>7</sup>
	CD45-/CD34+		0 0.7x10 <sup>7</sup>	0 0.55x10 <sup>7</sup>		9 0.8x10 <sup>7</sup>		5 3.25x10 <sup>7</sup>
	CD45-/CD34-	0 6x10 <sup>7</sup>	0 0.7x10 <sup>7</sup>	5 1.4x10 <sup>7</sup>		1 1.6x10 <sup>7</sup>		3 0.84x10 <sup>7</sup>

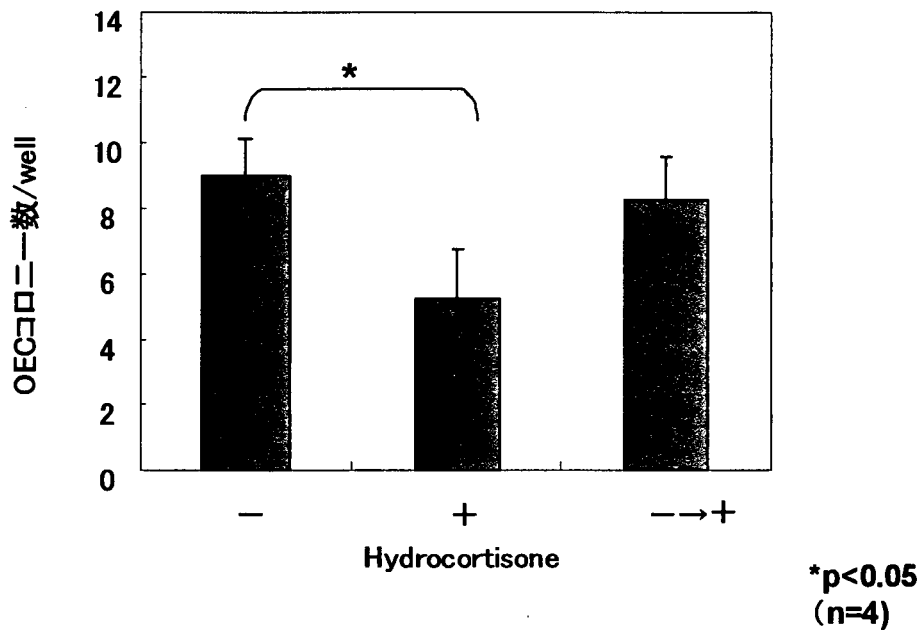


Fig. 19 Hydrocortisoneの添加とOECコロニー数の関連(単一ロットでの解析)

a)

2% FCS	拡大した ライン数	6cm dish まで拡大	10cm dishまで まで拡大	10cm dish で継代	60日ぐらいまで さらに継代
		×	△	○	◎
バッチ1	3	2	1	0	0
バッチ2R	7	2	0	3	2
バッチ2N	5	0	3	2	0
バッチ3	5	4	0	0	1
バッチ4	3	2	1	0	0
バッチ5	2	1	1	0	0
計	25	11	6	5	3
割合	100.0	44.0	24.0	20.0	12.0

FCS濃度を10%に変更

b)

10% FCS	拡大した ライン数	6cm dish まで拡大	10cm dishまで まで拡大	10cm dish で継代	60日ぐらいまで さらに継代
		×	△	○	◎
S1~S5	6	1	0	0	5
割合	100.0	16.7	0.0	0.0	83.3

Fig. 20 OEC拡大の成功率

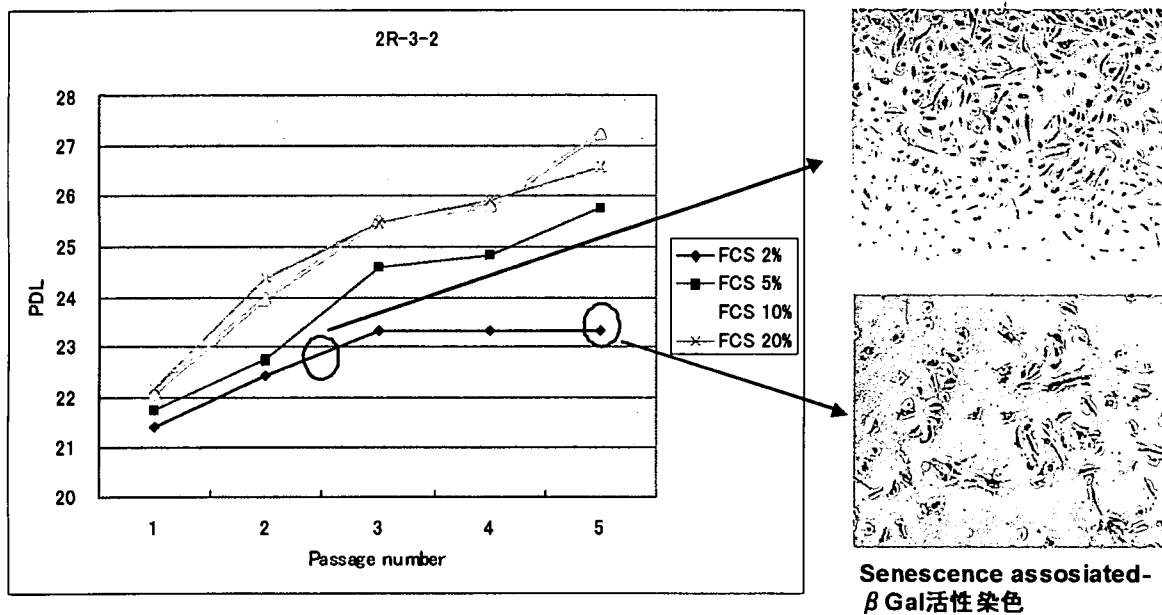


Fig. 21 OEC増殖に対する血清濃度の影響

x

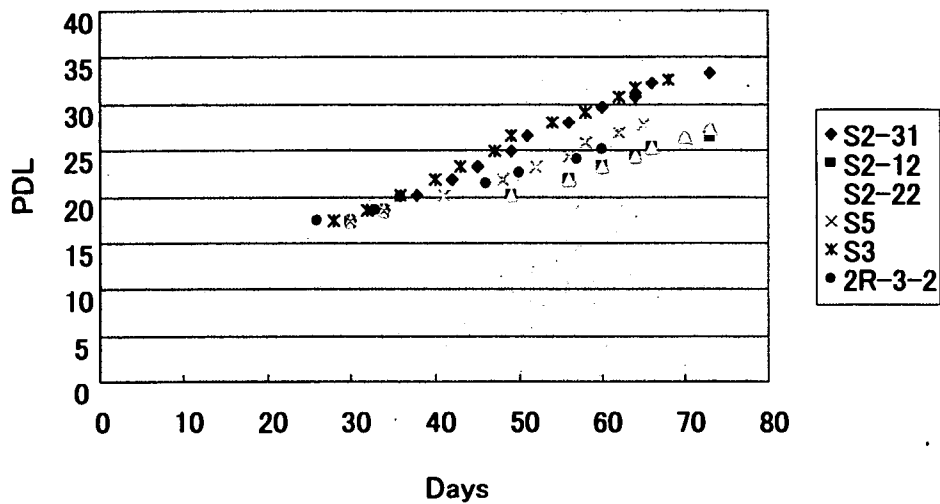


Fig.24 樹立したOEC株の増殖特性

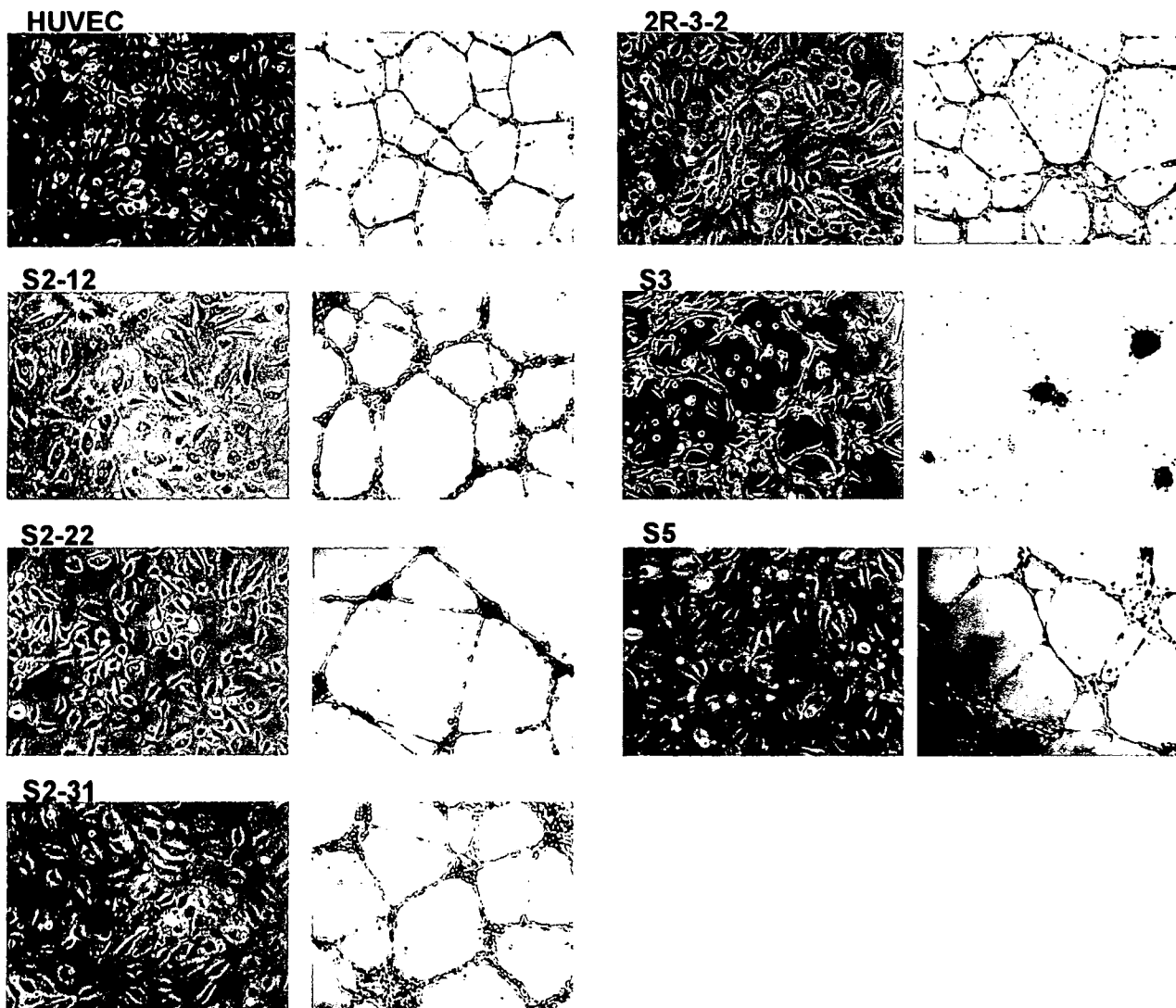


Fig.25 樹立したOEC株の形態とMatrigel上での管腔形成能

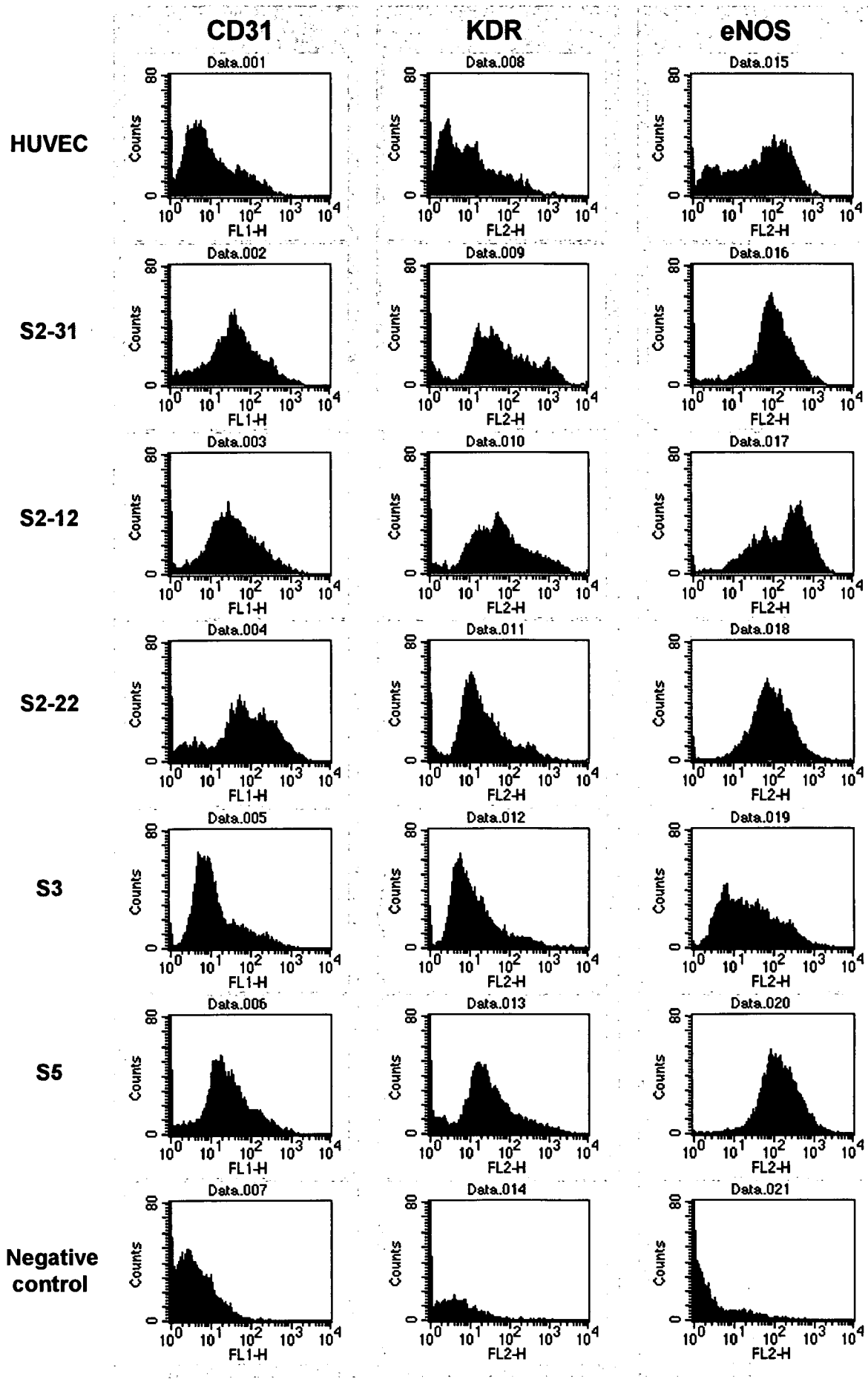


Fig. 26 樹立したOEC株における特性指標候補分子の発現

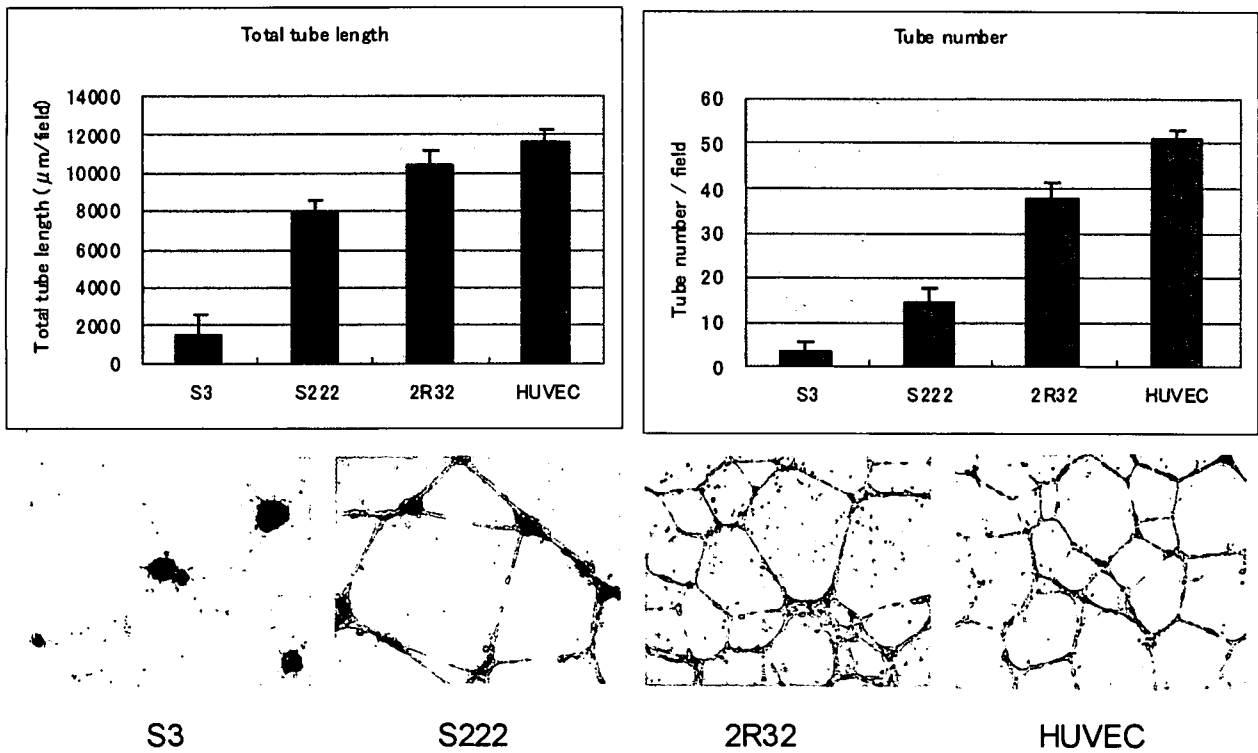


Fig. 27 特性指標の探索に用いたOEC3株およびHUVECの管腔形成能の定量評価

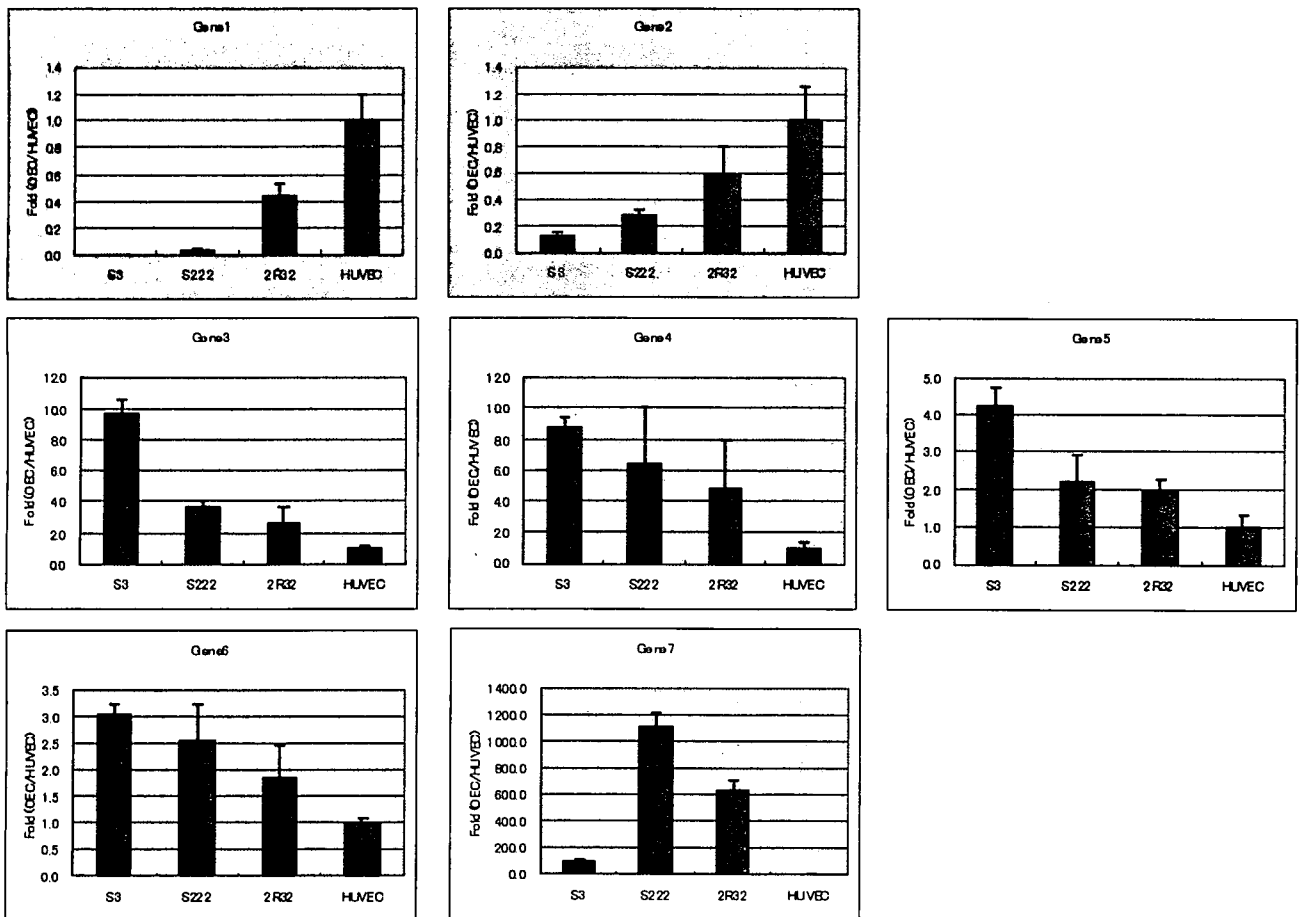
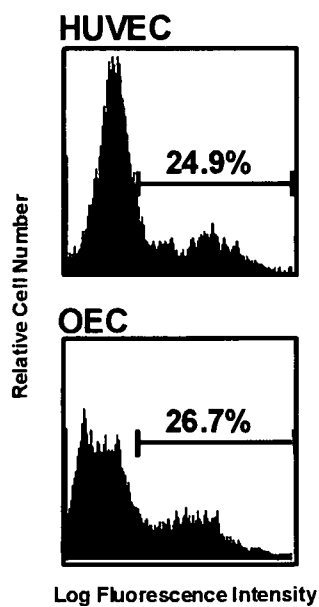


Fig. 28 特性指標候補と考えられる遺伝子の発現量の比較



a. IL-8受容体発現



b. IL-8による遊走促進

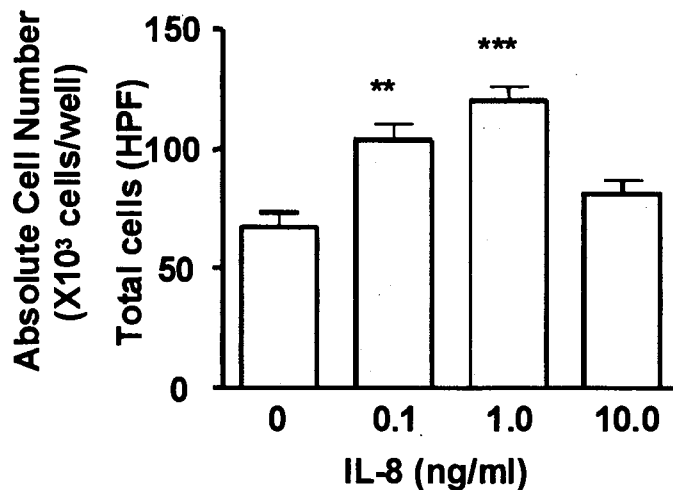


Fig. 29 臍帯血由来OECにおけるIL-8受容体発現とIL-8の遊走促進効果

細胞の特性解析・特性指標解析技術の開発

分担研究者 佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部・第2室・室長

**研究要旨** 細胞組織利用医薬品の特性解析および特性指標解析技術を開発するために、遺伝子発現解析用GeneChipを用いた a)未分化細胞の分化能予測マーカーの探索および b)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。a) 細胞組織利用医薬品の品質・安全性を確保するために、未分化細胞の分化能評価手法の確立は重要である。そこで、未分化細胞中に存在し、かつ特定の細胞種への分化に寄与する遺伝子の同定法の開発を、心筋細胞分化を例にして行った。マウス胚性癌細胞株であるP19細胞由来の数種の細胞株を用い、同一条件下で分化誘導した各細胞株の心筋細胞分化能の比較を行うと同時に、分化誘導前の遺伝子発現プロファイルを得て、分化誘導前の発現量と心筋細胞分化能が相関する遺伝子に着目し、未分化細胞中に発現する心筋細胞への分化に寄与する因子を探索した。その結果、分化誘導前の発現量と心筋細胞分化能との有意な相関性を示す24個の遺伝子が見出された。さらに、RNAiを用いて各遺伝子の発現を阻害した結果、発現が阻害されることにより心筋細胞分化が抑制される13遺伝子と、発現が阻害されることにより心筋細胞分化が促進される6遺伝子が同定された。未分化細胞におけるこれらの遺伝子あるいはその遺伝子産物をマーカーとすることにより、細胞の心筋分化活性の検出が可能になると考えられた。b) 細胞組織利用医薬品の品質特性を網羅的に把握する手法の開発を目的とし、製品のばらつきの所在（品質特性となりうる生理機能）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、ヒト骨髄間葉系幹細胞を例に行った。GeneChipを用いて複数ロットの細胞の遺伝子発現プロファイルを測定し、CV値（変動係数）の高い遺伝子についてオントロジー解析を行い、ロット間で発現のばらつきの大きいオントロジーを同定した。その結果、試料由来のCV値が高い遺伝子には細胞分化・発生・免疫反応等のオントロジーと関連するものが多いこと、および試料由来のCV値の評価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が明らかとなった。また、CV値の高い遺伝子群により構成される複数のオントロジークラスター間の相関を、多成分解析によって評価する方法を開発した。本分担研究により、トランスクリプトーム解析は細胞組織加工医薬品の生物活性および品質の評価を行うためのツールとして有用であること、およびバイオマーカー探索と品質特性探索とではトランスクリプトーム測定系の誤差の評価方法が異なることが示された。

協力研究者

長谷川哲也	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部・研究生	佐藤光利	東邦大学薬学部 准教授
細野哲司	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部・流動研究員	田邊思帆里	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部・研究員

## A. 研究目的

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の開発は世界各国で急速に進んでいる。このように細胞・組織そのものを治療薬として用いることができれば、がん・筋ジストロフィー・再生不良性貧血・心筋梗塞など致死的な疾患、あるいは骨粗しょう症・重篤な肝疾患等に対してきわめて有効な治療法になる可能性が高いと期待されている。わが国においても、様々な細胞組織利用医薬品の開発が進められており、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、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、細胞組織利用医薬品は未知・未経験な要素が多く本格的な実用化に至るために検討すべき課題はまだ数多い。細胞組織利用医薬品は、非常に複雑な構造と「生きている」というこれまでの医薬品にない性質を持っており、新たな特性解析技術の開発による、安全性・品質の適切な評価法の開発が望まれている。そこで、本研究ではGeneChipを用いたトランスクリプトーム解析をバイオマーカー探索と品質特性探索に応用することを試み、その有用性および技術的要件を検討した。

細胞組織利用医薬品に用いられる細胞に関する大きな問題点の一つとして、細胞形質のコントロールが挙げられる。また、形質のコントロールが可能だとしても、適切な形質の細胞の十分な数の確保も問題である。そこで本研究ではまず、細胞の形質・特性を的確に評価する方法の開発を行った。具体的には、分化に至るために重要な役割を果たすマーカー遺伝子やタンパク質、目的の方向に分化する細胞を識別するバイオマーカーとなる遺伝子およびタンパク質を探索した。標的細胞の特性を代表するバイオマーカーを同定し、マーカーの発現解析により構築される細胞特性の評価システムの妥当性を検討した。本研究では特に、未分化細胞からの心

筋細胞分化系を細胞特性解析システム構築のモデルケースとした。

医薬品の安全性・品質確保のためには、医薬品のもつリスクを的確に評価することも必要である。具体的な作業としては、①意図する使用目的（薬効・主作用）および安全に関わる特質の明確化、②既知あるいは予見可能なハザード（毒性・副作用）の特定、および、③各ハザードに関するリスクの推定を行わなければならない。また、④これらの結果から導き出される安全上の要求事項を「漏れなく」「曖昧でなく」かつ「相反することなく」導き出す必要がある。一般に医薬品の品質確保において、その物理的性能（化合物の安定性など）に関しては、現代の科学技術をすれば比較的容易に設計・コントロールが可能である。医薬品の同等性・不純物混入などに関しては物理的性能よりは設計・コントロールが難しい。一方、薬物動態・薬効・毒性などの性質に関しては、現代の科学技術をして設計・コントロールすることは非常に困難である（“Drug Discovery”と言われる所以である）。医薬品の品目別に言えば、一般的に、化学合成品、天然化合物、生薬、生物薬品の順に品質の設計・コントロールが困難となっていく。細胞組織加工医薬品の品質の設計・コントロールは、生物薬品よりも更に困難である。つまり、細胞組織加工医薬品に関しては、意図した機能・薬効以外の品質特性（品質を評価する項目）を「漏れなく」把握する事が非常に困難となる。その理由は、上述のように、細胞組織加工医薬品が非常に複雑な構造と「生きている」というこれまでの医薬品にない性質をもつことによる。つまり細胞組織加工医薬品は、製品（細胞・組織）の「ばらつき」の所在が極めて不明確であり、潜在する「ばらつき」による思わぬハザードが出現する危険性がある。この問題を解決する方法として、近年開発されたハイスループットのアッセイ系（所謂“Omics”）を利用して細胞組織加工医薬品の品質特性を網羅的に探索する方法が考えられる。ヒト骨髄由来間

葉系幹細胞(hMSC)は、多分化能を有し、再生医療における細胞組織加工製品の原料として期待されているだけでなく、hMSC自身が持つ免疫抑制効果を応用し、造血系幹細胞移植医療における移植片対宿主病 (GVHD, graft-versus-host disease) を抑制するための医薬品としての開発も進行している。本分担研究では、hMSCを例にして、製品の「ばらつき」の所在 (品質特性となりうる生理機能) をトランスクリプトーム解析によって網羅的に同定する方法の検討を行い、その技術的問題点と解決法を評価した。

## B. 研究方法

### B-1 未分化細胞の分化能予測マーカーの探索

#### B-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.1のようにして作製された。すなわち、マウス $\alpha$ ミオシン重鎖( $\alpha$ 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。 $\alpha$ 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SalI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 ( $\alpha$ 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 $\alpha$ 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-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%CO<sub>2</sub>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、 $\alpha$ 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%CO<sub>2</sub>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