

懸濁した。この細胞懸濁液を細胞培養容器に注した後、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-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-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200µl/tubeを添加し、緩く攪拌した後、室温で2~3分放置し、12,000×g、4°Cで15分間遠心分離した。上層500µl / tubeを500µl / 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×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500µl / tube加えて攪拌し、7,500×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×buffer + DNaseI [Promega]) 溶液30µl/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30µl/tube添加し、緩く攪拌した後、室温で2~3分放置し、12,000×g、4°Cで15分遠心分離した。上層27µl/tubeをイソプロパノール27µl/tubeと混

ぜて攪拌した後、室温で10分以上放置し、12,000×g、4°Cで10分遠心分離した。沈殿に75%エタノールを54µl tube加えて攪拌し、7,500×g、4°Cで5分遠心分離し、沈殿を風乾した後に、40U/µl RNase Inhibitor入りH₂O (30µl/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、10µl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-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1×10⁵ 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、αMHC、βMHC、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 1に示す通りである。

B-1-6 分化誘導前における各細胞株の遺伝子プロフィールの取得

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リングした。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例以下の場合に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-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-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-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 1に示した。

B-2 細胞組織利用医薬品の品質特性の探索

B-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-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、600 μ l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-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10 μ g)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-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

ープセットを抽出した。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ーを探索した。

B-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ーにおいて、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ー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ー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ー間の相関係数 (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. 研究結果

C-1 未分化細胞の分化能予測マーカーの探索

C-1-1 P19系列細胞の心筋細胞分化

P19系列細胞の心筋細胞分化を観察した結果、分化誘導処理後、約4日でコンフルエントとなり、約10日で自律拍動する小結節が認められるようになった。この自律拍動する小結節は、時間とともにその数が増え、約16日でその数の増加がプラトーになった。CL6G52は、自律拍動する小結節の出現とともに、GFPの発現が認められた (Fig.2A-C)。小結節の数が、 0.016 個/cm²以上 (6穴細胞培養用マルチウェルプレート1枚につき1つ以上) ある時を「少ない」、 0.098 個/cm²以上 (6穴細胞培養用マルチウェルプレートのウェル1つにつき1つ以上) ある時を「中程度」、 157 個/cm²以上 (顕微鏡視野 (×200) を1面につき1つ以上) ある時を「多い」と定性的に定義し、それぞれを1、2、3とした場合、分化誘導後の自律拍動する小結節数の時間変化は細胞株により異なっていた (Fig.2D)。

C-1-2 分化誘導後の心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現

各細胞株の心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量を比較するために、分化誘導したP19細胞と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種類の細胞からtotal RNAを抽出し、定量性リアルタイムRT-PCRを用いて心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量を測定

した。このことにより、細胞株の違いによって心筋細胞特異的マーカー発現の時間経過や発現量に相違があることが確認された (Fig.3)。

心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現を心筋細胞分化と関連付けて解釈する際、個々の心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量にどの程度の重み付けをした上で解釈してよいかは明らかではない。そこで、得られた多くのデータをよりわかりやすくするために主成分分析し、これによって産出された主成分から細胞株による分化の違いについて比較検討した。心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量を主成分分析したところ、寄与率63%の第1主成分と寄与率17%を説明する第2主成分が算出された (Fig.4)。寄与率と変量プロットを見ると、資料の本質の約63%を説明する第1主成分は全ての変量の係数が正であり、資料の本質の約17%を説明する第2主成分は心筋細胞分化の比較的初期に発現が見られる心筋細胞特異的マーカー遺伝子の係数が負に、比較的後期に見られる心筋細胞特異的マーカー遺伝子の係数が正に出ている (Fig.4 AおよびB)。個々のサンプルにおける各心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現を統合して主成分得点として表すと細胞株による心筋細胞への分化能の違いがより明確に見られるようになった (Fig.4Cおよび4D)。

C-1-3 心筋細胞分化能と相関関係の認められた遺伝子の検出

P19細胞とCL6細胞、Neomycin耐性遺伝子を含むCL6細胞サブラインのCL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52の6種類について、①分化誘導後の心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現の第1主成分の最大値、②第2主成分の最大値、③自律拍動する小結節出現までの日数および④出現した自律拍動する小結節の数、の4項目について、GeneChipの遺伝子発現シグナルとの間のスピアマンの順位相関とその有意確率を算出し、心筋細胞分化と相関する遺伝子を探索した。その結果、第1主成分、自律拍動する小結節出現ま

での日数、出現した収縮小結節の数の3項目が発現シグナル値と相関するプローブセットが24個検出された (Table 2)。これには、第2主成分と有意に相関するものも含まれていた。

C-1-4 CMP遺伝子発現阻害と心筋細胞分化効率

RNAiを行うことで、各CMP遺伝子をノックダウンし、心筋細胞分化効率への影響を検討した。実際に各遺伝子がRNAiによりノックダウンされていることを確認するために、定量性リアルタイムRT-PCRでノックダウン効率を測定した。その結果、ネガティブコントロールと比較して、CMP1で45%、CMP2で13%、CMP3で43%、CMP4で45%、CMP5で27%、CMP6で19%、CMP7で30%、CMP8で25%、CMP9で15%、CMP10で12%、CMP11で86%、CMP12で51%、CMP13で51%、CMP14で60%、CMP15で37%、CMP16で53%、CMP17で19%、CMP18で35%、CMP19で28%、CMP20で46%、CMP21で55%、CMP22で86%、CMP23で29%、CMP24で34%まで発現を抑制することができた。t検定の結果、11、19、22を除く19個のCMP遺伝子で有意な発現の抑制が認められた (Fig.5)。

CMP遺伝子のノックダウンにより心筋細胞分化にどのような影響が出るかを、自律拍動する小結節数および心筋細胞特異的マーカー遺伝子4種類を測定することによって検討した。まず、自律拍動する小結節数を測定した結果をFig.6に示す。Two-Way Repeated Measures ANOVAで検定した結果、CMP1、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP6、CMP9、CMP10、CMP13、CMP18、CMP24のノックダウンにより、ネガティブコントロールと比較して有意な小結節数の減少が認められた。逆に、CMP7、CMP12、CMP16、CMP17、CMP21、CMP23では有意な増加が認められた。また、CMP8、CMP14、CMP15、CMP20では有意な変化が認められなかった。次に、分化誘導後14日目における、心筋細胞特異的マーカー遺伝子を測定した結果をFig.7-10に示す。t検定の結果、 α MHC

では、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP10、CMP13、CMP18で有意な減少が、CMP12、CMP23で有意な増加が認められた。βMHCでは、CMP2、CMP13で有意な減少が、CMP16、CMP17、CMP23で有意な増加が認められた。MLC2aでは、CMP2、CMP4、CMP8、CMP10、CMP20、CMP23で有意な減少が、CMP16で有意な増加が認められた。MLC2vでは、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP6、CMP10、CMP13で有意な減少が、CMP7、CMP12、CMP16、CMP23で有意な増加が認められた。これらの結果をまとめたものを、Table 3に示す。

C-2 細胞組織利用医薬品の品質特性の探索

C-2-1 GeneChip解析のアーチファクトの評価

GeneChipを用いた実験における測定アーチファクトには3種類ある。すなわち、「GeneChipに対する非特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナル」、「測定機器の検出限界未満のノイズ」、および「測定機器由来のシグナルのばらつき」である。

C-2-1-1 非特異的なハイブリダイゼーション

「GeneChipに対する非特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナル」を評価する方法として、GeneChipおよびGCOSプログラムによる“Absolute Analysis”の結果を採用した。“Absolute Analysis”はGeneChipの各プローブセットに対応する転写産物が実際に発現しているか否かを、プローブセット内のパーフェクトマッチプローブ由来蛍光シグナルと mismatch プローブ由来蛍光シグナルとを比較することにより、定性的に判定する解析である。判定は“Present”、“Marginal”または“Absent”として出力される。本研究では、検討した6ロットで“Present”の判定が認められないプローブセットの蛍光シグナルを、非特異的なハイブリダイゼーションによるものと判断した。

C-2-1-2 検出限界

いかなる測定系にも検出限界が存在する。普段あまり省みられることはないが、GeneChipとスキャナーを用いた測定系も例外ではない。ISOおよびIUPACの定義に基づくICHの定義によれば、検出限界は、

$$L_c = 3.3 \times s_m / a \quad (> \text{検出不可能}) \quad \dots \textcircled{1}$$

とされる。 L_c は「濃度推定値の検出限界」、 s_m は測定値の標準偏差、 a は検出限界付近の検量線の傾きである。「測定値の検出限界」を $L_m (=a \times L_c)$ とすると、

$$L_m = 3.3 \times s_m$$

となるので、測定値のCV値を CV_m とすれば①式は以下の②式のように書き換えることができる。

$$CV_m = s_m / L_m = 0.3 \quad (< \text{検出不可能}) \quad \dots \textcircled{2}$$

つまり、「測定値の検出限界」とは、測定値のCV値(CV_m)が0.3となる点を指すことになる。

使用した6ロットのhMSC(継代数7)の中の1つから合成された単一のcRNAサンプルを用いて、繰り返し測定を行った結果をFig.11に示す。同一サンプルの繰り返し測定における測定値の標準偏差は、平均値が増加するに従って増加する傾向が認められた(Fig.11a)。これとは対照的に、CV値は平均値が増加するに従って減少する傾向が認められた(Fig.11b)。Fig.11cはFig.11bのグラフの横軸を線形目盛りとし、平均値の低い部分を拡大したものである。これから判断すると、 CV_m の移動平均値(100データ)が0.3を通過するのは測定シグナルが60のときであることが明らかとなった。同一ロットの継代数9のサンプルを繰り返し測定した場合も同様の結果が得られた(データ省略)。

C-2-1-3 測定機器由来のばらつき

いかなる測定機器から得られた観測値にも必ず測定誤差が含まれるのは不可避である。複数のサンプルを測定する場合の観測値の標準偏差を SD_m 、このうちサンプル由来の標準偏差を SD_s 、測定機器由来の標準偏差を SD_a とした場合、以下の③式が成り立つ。

$$SD_m^2 = SD_s^2 + SD_a^2 \quad \dots ③$$

単一サンプルを繰返し測定した場合には、サンプル由来の標準偏差がないと仮定できるので、観測値の標準偏差はそのまま測定機器由来の標準偏差と考えてよい。Fig.12aはFig.11aのグラフの縦軸と横軸を両対数目盛りでプロットしなおしたものである。Fig.12aより、検出限界以上の平均値に関しては、「測定機器由来の標準偏差の対数」が「平均値の対数」と比例関係にある傾向が明らかとなった。この比例関係をさらに見やすくするために、「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数の比」を「平均値の対数」についてプロットしたのがFig.12bである。Fig.12bより、「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」は平均値に依らず一定である傾向がより明らかとなった。しかし、「平均値の対数」に対する「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」の分布が平均値を挟んで対称な分布を示している保証はまだない。そこで、「平均値の順位」に対する「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」をプロットすると、長方形の分布が得られた (Fig.12c)。即ち、「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」の分布は平均値を挟んで対称であることが明らかとなった。この結果から、検出限界以上では「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」は平均値に依らず一定であると判断できる。つまり、単一サンプルを繰返し測定した場合の測定機器由来の標準偏差 (SD_a) と平均値 (Mean) との間には、

$$\log[SD_a] / \log[Mean] = C \text{ (constant)}$$

の関係が成立する。すなわち、

$$SD_a = \text{Mean}^C \quad \dots ④$$

となり、 SD_a はシグナルの平均値の関数として近似できる。従って、サンプル由来の標準偏差は、③式に④式を導入することにより、

$$SD_s = (SD_m^2 + \text{Mean}^{2C})^{1/2} \quad \dots ⑤$$

によって観測値から算出できる。なお、同一ロットの継代数9のサンプルを繰返し測定した場合も同様の結果が得られた (データ省略)。

C-2-1-4 アーチファクト除去の効果

複数ロット間の遺伝子発現のばらつきについてのGeneChip解析を行う際に、以上の結果に基づいて、アーチファクトの除去を行った。すなわち、「GeneChipに対する非特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナル」を除去するために、“Absolute Analysis”の結果、検討したどのロットからも“Present”の判定が得られなかったプローブセットをその後のオントロジー解析から除外した。「測定機器の検出限界未満のノイズ」を除去するためには、測定した複数ロットのシグナルの平均値が60 ($CV_m=0.3$) 未満のプローブセットをオントロジー解析から除外した。今回の6ロットのhMSCの遺伝子発現解析では、上記2条件のいずれかのために棄却されたプローブセットは全54,675個の60%で、解析に適すると判断されたプローブセットは全体の40%であった。また、「測定機器由来のシグナルのばらつき」を除去するために、CV値を算出する際には観測値の標準偏差 (SD_m) ではなく、⑤式によるサンプル由来の標準偏差 (SD_s) を採用した。

複数ロット間の遺伝子発現のばらつきを評価

する上で、3種のアーチファクトが及ぼす影響を評価するために、各アーチファクトを考慮した場合と考慮しない場合とで、CV値の順位を比較した。CV値のプロブセット上位1000に含まれるプロブセットの共通性を見ると、「GeneChipに対する非特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナル」および「測定機器の検出限界未満のノイズ」のCV値に与える影響が大きいことが明らかとなった (Fig.13)。

C-2-2 ばらつきの大きな生理機能

培養された複数ロットのhMSCにおいて発現のばらつきが大きい遺伝子が、どのような生理機能と関連しているかを検討するために、GOTMを用いた遺伝子オントロジー解析を行った。3種のアーチファクトを考慮したうえで、まず6ロット（継代数7）のCV値上位1,000位までのプロブセットを抽出した。同様にして継代数9の細胞についても上位1,000位までのプロブセットを抽出した。継代数7と9のCV値上位1,000位のリストに共通して含まれるプロブセット、即ち継代数によらずに大きなばらつきを示すプロブセットは428セットであった。この428プロブセットについて、GOTMを用いてGene Ontology Treeを描出し、GeneChip全体のオントロジー解析結果と比較して有意 ($P < 0.01$) に濃縮の見られる生理機能を探索した (Fig.14)。その結果、“Biological Process”に関しては、“development”、“pregnancy”、“circulation”、“defence response”等のオントロジークラスターが検出された (Fig.14a)。また、“Molecular Function”に関しては、“carbohydrate binding”、“carbocyclic acid binding”、“phospholipid binding”、“growth factor binding”、“structural molecule activity”等のオントロジークラスターが検出された (Fig.14b)。“Cellular Component”については、“soluble fraction”、“RNA polymerase complex”、“extracellular matrix”等のオントロジークラスターが検出された (Fig.14c)。

次に、有意 ($P < 0.01$) に濃縮の見られる“Biological Process”中のオントロジークラスターについて、Fig.15のようにして、クラスター間の相関を検討した。その結果、スピアマンの相関係数の有意水準 (P値) を0.1%として評価した場合、Table.4のような結果となり、様々なクラスターと有意な相関を示すクラスターだけでなく、“blood pressure regulation”のように他のクラスターとの相関が認められない、すなわち独自のばらつきを示すクラスターが存在することが明らかとなった。

D. 考察

D-1 未分化細胞の分化能予測マーカーの探索

D-1-1 心筋細胞分化能と関連する遺伝子

P19細胞と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種類の細胞の心筋細胞分化能を検討するために、定量性リアルタイムRT-PCRを用いて心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量を測定した。ここで測定したマーカーは心筋線維遺伝子としてミオシン軽鎖2a(MLC2a)、ミオシン軽鎖2v(MLC2v)、 α ミオシン重鎖(α MHC)、 β ミオシン重鎖(β MHC)の4種、心筋細胞分化関連転写因子としてNkx2.5、GATA4、MEF2Cの3種である。しかし、これら7種のマーカーから得られたデータをそのまま用いて分析するには資料の数が多く複雑すぎる上、個々のマーカー遺伝子の発現にどの程度の重み付けをした上で解釈してよいかは明らかではない。そこで、これらのデータから本質的な情報を引き出すためにこれらを主成分分析した。算出された主成分が資料の情報をどれくらい説明しているかの目安を与える、すなわち主成分の妥当性を表す寄与率を見ると、第1主成分は7個ある資料のうち約4.4個の情報すなわち資料の本質の約63%を説明しており、第2主成分は約1.2個の情報すなわち資料の本質の約17%を説明していることが認められ、この2つの主成分で資料

の本質の80%以上が説明されることがわかる。算出された第1および第2主成分の式を視覚化した図である変量プロットを見ると、第1主成分は各変量の係数全てが正に出ていることから心筋細胞の分化の指標となることが考えられる。GATA4、MEF2CおよびNkx2.5は心筋細胞分化の比較的初期に発現が見られるマーカーであり、心筋線維遺伝子のMLC2a、MLC2v、 α MHC、 β MHCは心筋細胞分化の比較的後期に発現が見られることが知られている。なかでも β MHCはマウスでは胎生期の心筋に発現し、出生後は α MHCに置換される。第2主成分ではGATA4、MEF2CおよびNkx2.5の係数は負の値であり、心筋線維遺伝子の係数はすべて正の値である上、 β MHCが α MHCよりも低い係数を割り当てられていることから、第2主成分は心筋細胞の成熟の指標となることが考えられる。本研究では分化誘導後における自律拍動する小結節出現までの日数および出現した小結節の数に加え、この第1主成分の得点を心筋細胞分化能の指標とした。次に分化前の遺伝子発現を評価するために、マイクロアレイによる解析を行った。得られたデータにフィルターをかけて心筋細胞分化能との相関のあるものを検出した。まず、遺伝子の発現が見られるProbe Setを選ぶためにフィルター①をかけた。次に、細胞株による遺伝子発現の差を比較するためには細胞株間で差があるものを選ぶ必要があるためフィルター②をかけた。その次に、細胞株間での差が小さいと相関がないものまで相関があるとして検出されてしまう危険性があるので細胞株間での差が平均で50%ずつあれば大きな差が出ると仮定、すなわち最大の平均値と最小の平均値に2.5倍の差があればよいと仮定しフィルター③をかけた。最後に、フィルター④をとして定量性リアルタイムRT-PCRで得られた第1主成分の最大値、第2主成分の最大値、さらに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に対してスピアマンの順位相関係数を算出し、有意な相関があるものを選び出した。ここで、相関係数として

順位相関を選択した理由は、分化前における特定の遺伝子発現が心筋細胞分化に影響する場合、分化前の遺伝子発現量と分化効率はずしも線形の相関を示すとは限らないためであり、また、いくつかの飛離れた値が存在する場合には、例えば相関が線形であったとしても、ピアソンの積率相関係数などの間隔尺度・比尺度間の相関係数の場合はそれらの値に引きずられて不当に高い相関係数が得られてしまうからである。この結果、Table 2に示すような24遺伝子が検出された。このうち、CMP2とCMP13は2種類のプローブセットで検出されており、心筋細胞分化との相関関係については信頼度が特に高いと考えられた。

D-1-2 CMP遺伝子と心筋細胞分化との因果関係の評価

CMP遺伝子は未分化細胞の心筋細胞分化能と相関関係が認められるが、これらが実際に心筋細胞分化に関与しているという因果関係を説明するには、相関関係のみでは不十分であるといえる。そこで、RNAiを用いて、各CMP遺伝子の機能を阻害し、心筋細胞への分化に影響を与えているかどうかを評価することを試みた。RNAiを用いて、各CMP遺伝子をノックダウンした結果、CMP11、CMP19、CMP22を除く全ての遺伝子で、有意な発現の抑制が認められた。Table 3より、CMP1、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP6、CMP8、CMP9、CMP10、CMP13、CMP18、CMP20、CMP24は、その機能を阻害することにより心筋細胞分化が抑制され、逆に、CMP7、CMP12、CMP16、CMP17、CMP21、CMP23は、その機能を阻害することにより、心筋細胞分化が促進されることが明らかとなった。これらの結果より、上記遺伝子は心筋細胞分化過程において有意な生理的役割を担っていることが示唆される。ここで、心筋細胞分化能の指標となる第1主成分との相関性を考えてみると、正の相関が得られた遺伝子、すなわち、心筋細胞に分化しやすいものほど発現が多

いものは、分化を促進する方向に働き、その発現を抑制することで、分化が抑制されると考えられる。逆に、負の相関が得られたものは、心筋細胞に分化しにくいものほど発現が多く、分化を抑制する方向に働き、発現の抑制により分化が促進されると考えられる。これを基に、Table 2とTable 3を比較してみると、CMP6、CMP7、CMP8、CMP9、CMP12、CMP16、CMP21、CMP24においては、相関関係とRNAiを用いて機能を阻害した結果は矛盾しているように見える。しかし、心筋細胞分化に寄与することが既に知られている遺伝子の中にはWntやBMPのように心筋細胞分化過程の特定のタイミングで一過性に機能が調節されることが必要な遺伝子も存在する。従って、RNAiを用いて遺伝子の機能を比較的長期に抑制した場合と、特異的なブロッカー等を用いて一過性に抑制した場合とでは、分化への影響が異なる可能性があり、今後、詳細な検討が必要である。

CMP23は、その機能の阻害により、自律拍動する小結節数、および、心筋細胞特異的マーカー遺伝子の α MHC、 β MHC、MLC2vは有意な増加が認められた。それにも関わらず、MLC2aは有意な減少が認められた。心房筋を特徴付けるMLC2aが減少し、心室筋を特徴付けるMLC2vが増加したことは、心室筋の特異的な誘導に重要な因子であることが示唆され、心不全の治療に有用な情報と考えられる。

D-2 細胞組織利用医薬品の品質特性の探索

細胞組織加工医薬品の品質管理上の大きな問題として、意図した薬効以外の品質特性の把握が困難であることが挙げられる。トランスクリプトームをはじめとする、いわゆる”Omics”は、細胞の表現型や遺伝子型を網羅的俯瞰することが可能なツールとして、創薬ターゲット探索、バイオマーカー探索や遺伝子多型解析等、先端医薬品開発の各方面で利用されており、本研究中の心筋細胞分化活性バイオマーカーの探索においても、その有用性が明らかとなった。しか

し、細胞組織加工医薬品の品質管理を目的として直接”Omics”を利用する試みも、あるいは、原料・製造工程もしくは製品の品質管理に必要な品質特性を探索する手段として間接的に”Omics”を利用する試みもあまり見られていない。これは”Omics”が依然として高価なアプローチであるという費用的な問題点、および様々なプラットフォーム間のデータの標準化方法が確立されていない点によるところが大きい。しかし、トランスクリプトームをはじめとして、”Omics”のコストパフォーマンスは改善され続けており、またマイクロアレイデータの標準化の試みも米国を中心に進行中である。こういった現状および将来の動向を見据えた上で、品質評価および品質特性探索における”Omics”の有用性が一旦確立されれば、その応用は急速に広がっていく可能性がある。米国FDAは既に2006年より、Critical Path Initiativeの活動の一環として、生物製剤を製造するために用いられる細胞(cell substrate)の品質評価のためのマイクロアレイ利用法について、研究を開始している。その流れは近い将来細胞組織加工医薬品の品質管理にも波及する可能性が高い。

創薬ターゲット探索やバイオマーカー探索を目的とした、いわば「標的遺伝子探索」のためのトランスクリプトーム解析と、品質特性探索を目的とした、いわば「製品間のばらつき探索」のためのトランスクリプトーム解析との間の大きな違いは擬陽性シグナルの取り扱い方にある。トランスクリプトーム解析を用いた「標的遺伝子探索」における擬陽性シグナルは、定量性RT-PCR、RNAiなどの他の様々な方法によってその真偽を再確認することが可能であるため、ある程度許容できる。一方、「製品間のばらつき探索」のためにトランスクリプトーム解析を行う場合には、擬陽性シグナルは可能な限り回避しなければならない。その理由は、シグナルの平均値が低い遺伝子については、CV値(=標準偏差/平均値)が自ずと大きくなる傾向があるからである。つまり、アーチファクト

評価をより慎重に行う必要がある。そこで今回、本分担研究において、GeneChipを用いた実験における3種の測定アーチファクトについて検討を行った結果、測定機器の検出限界および測定機器由来誤差は単一サンプルの繰り返し測定により算出可能であることが明らかとなった。また、CV値の評価には「非特異的ハイブリダイゼーションによるシグナル」と「検出限界以下のノイズ」を除去することが重要であること、また同時に、3種の測定アーチファクトのなかでも「測定機器由来のシグナルのばらつき」は比較的影響が少ないことも明らかとなった。

遺伝子オントロジー解析を行った結果、6ロットのCV値の高いプローブセットについて、有意に関連性高いオントロジーが検出された。“development”や“defence response”およびその下位の階層のオントロジーがばらつきの大きい生理機能として検出されたことは、hMSCの再生医療および移植医療における用途を考慮した場合に重要である。次に、検出されたオントロジークラスター間の相関を、主成分分析による第一主成分の算出、および各ロットの第一主成分のスピアマン順位相関係数の算出によって評価した。相関係数として順位相関を選択した理由は、クラスター間の相関は必ずしも線形を示すとは限らないためであり、また、いくつかの飛離れた値が存在する場合には、例え相関が線形であったとしても、ピアソンの積率相関係数などの間隔尺度・比尺度間の相関係数の場合はそれらの値に引きずられて不当に高い相関係数が得られてしまうからである。

オントロジークラスター間の相関関係の評価は、意図した薬効が予期せぬハザードと関連している可能性を吟味する上で重要と考えられる。たとえば、今回の結果では、hMSCにおいてばらつきの大きい生理機能と考えられる“immune response”が別のばらつきの大きい生理機能“coagulation”と有意に関連していることが示唆された。したがって、hMSCの免疫調節機能を応用した医薬品においては血液凝固関連への影響

も吟味する必要がある可能性がある。また、オントロジー“blood pressure regulation”も関連遺伝子の発現のばらつきの大きい生理機能として検出されたが、このオントロジークラスターは他のどのクラスターとも相関しない、いわば孤立したクラスターであった。すなわち、このオントロジーに関する細胞表現型のばらつきについては、ほかの生理機能のばらつきから類推することが困難であり、特別に試験系を構築して評価する必要がある可能性があると考えられる。

E. 結論

細胞の心筋分化活性の指標となるマーカーの探索はこれまでも国内外で盛んに行われている。心筋分化活性の指標となるマーカーは、高い心筋分化能を有する未分化細胞を分離する技術、さらには特異的かつ効率的な心筋細胞分化誘導技術への応用につながる。しかしながら、未分化段階も含めた分化過程において用いる、細胞の心筋分化活性の指標となるマーカーは依然として存在していない。従来の研究では、未分化細胞に対して心筋分化誘導刺激を施した後、分化過程の初期に発現が変動する遺伝子を探索する手法が取られていた。このため、得られたマーカーは「既に開始してしまった心筋細胞分化の初期過程」のマーカーではあっても、分化誘導前の「未分化細胞が有する心筋細胞への分化活性」についてのマーカーではない。心疾患の適切な治療のためには、未分化細胞の品質評価および心筋分化能の高い未分化細胞の分離が必要とされる。したがって、未分化段階も含めた分化過程において、細胞の心筋分化活性の検出に用いることが可能なマーカーが依然として求められている。本研究において筆者らは、未分化段階を含む分化過程において、細胞における複数の特定遺伝子（CMP遺伝子群）の発現量が、細胞の心筋分化活性と有意な相関を示すという知見を得た。これと同時に、本研究で検出された複数のCMP遺伝子の中には、未分化細胞の心

筋細胞への分化において有意な生理的役割を果たしているものが存在することが示唆された。これらのことから、CMP遺伝子およびその遺伝子産物をマーカーとして用いることにより、細胞の心筋分化活性を的確に検出することができる可能性があると考えられた。しかし、CMP遺伝子がP19系列以外の未分化細胞・幹細胞あるいは他の動物種でも同様の機能を果たすか、また、各CMP遺伝子の心筋細胞分化に対する詳細な機能については、多くが不明でありさらなる検討が必要である。先端医薬品である細胞治療薬の品質と再生医療の有効性・安全性を確保するのはフロンティア領域であるがゆえに未知の要素が多く単純ではない。重症心不全に対するより良い治療法の確立のために本研究の進展を含め、今後さらなる多角的な研究が必要とされる。

また、「細胞組織利用医薬品の品質特性の探索」に関しては、本研究により、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、およびその際にはサンプル以外に由来する誤差を慎重に吟味することが重要であることが示唆された。本研究のようなトランスクリプトーム解析によって同定された品質特性候補が真の品質特性であるか否かの評価には、遺伝子オントロジー解析で検出された生理機能において実際にばらつきが存在することを生理学的実験によって示し、そのばらつきが製品の有効性および安全性と関連するか否かに関してさらなる検討を加えていく必要がある。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

1. 論文発表

Tamehiro N, Sato Y, Suzuki T, Hashimoto T, Asakawa Y, Yokoyama S, Kawanishi T, Ohno Y, Inoue K, Nagao T, Nishimaki-Mogami T, Riccardin C: a natural product that functions as a liver X receptor (LXR) alpha agonist and an LXRbeta antagonist. *FEBS Lett.* 2005; 579: 5299-304.

Sato Y, Nakamura R, Satoh M, Fujishita K, Mori S, Ishida S, Yamaguchi T, Inoue K, Nagao T, Ohno Y. Thyroid hormone targets matrix Gla protein gene associated with vascular smooth muscle calcification. *Circ Res.* 2005; 97: 550-7.

Kanayasu-Toyoda T, Fujino T, Oshizawa T, Suzuki T, Nishimaki-Mogami T, Sato Y, Sawada J, Inoue K, Shudo K, Ohno Y, Yamaguchi T. HX531, a retinoid X receptor antagonist, inhibited the 9-cis retinoic acid-induced binding with steroid receptor coactivator-1 as detected by surface plasmon resonance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005; 94: 303-9.

Nishida M, Tanabe S, Maruyama Y, Mangmool S, Urayama K, Nagamatsu Y, Takagahara S, Turner JH, Kozasa T, Kobayashi H, Sato Y, Kawanishi T, Inoue R, Nagao T, Kurose H. G alpha 12/13- and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase by angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2005; 280: 18434-41.

Minamisawa S, Uemura N, Sato Y, Yokoyama U, Yamaguchi T, Inoue K, Nakagome M, Bai Y,

- Hori H, Shimizu M, Mochizuki S, Ishikawa Y. Post-transcriptional down-regulation of sarcolipin mRNA by triiodothyronine in the atrial myocardium. *FEBS Lett.* 2006;580:2247-52.
- Onohara N, Nishida M, Inoue R, Kobayashi H, Sumimoto H, Sato Y, Mori Y, Nagao T, Kurose H. TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J.* 2006;25:5305-16.
- Nagamatsu Y, Nishida M, Onohara N, Fukutomi M, Maruyama Y, Kobayashi H, Sato Y, Kurose H. Heterotrimeric G protein G α 13-induced induction of cytokine mRNAs through two distinct pathways in cardiac fibroblasts. *J Pharmacol Sci.* 2006;101:144-50.
- Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, Tominaga M, Shimizu S, Sato Y, Mori Y. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature Chem Biol.* 2006;2:596-607.
- Suzuki T, Nishimaki-Mogami T, Kawai H, Kobayashi T, Shinozaki Y, Sato Y, Hashimoto T, Asakawa Y, Inoue K, Ohno Y, Hayakawa T, Kawanishi T. Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using green fluorescent protein derivatives. *Phytomedicine.* 2006;13:401-11.
- Tozaki-Saitoh H, Koizumi S, Sato Y, Tsuda M, Nagao T, Inoue K. Retinoic acids increase P2X2 receptor expression through the 5'-flanking region of P2rx2 gene in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Mol Pharmacol* 2006;70:319-28.
- Haghighi K, Chen G, Sato Y, Fan GC, He S, Kolokathis F, PaterL, Paraskevaidis L, Jones WK, Dorn GW, Kremastinos DT, Kranias EG. A human phospholamban promoter polymorphism in dilated cardiomyopathy alters transcriptional regulation by glucocorticoids. *Hum Mutat.* (in press)
- Yokoyama U*, Sato Y* (* equal contribution), Akaike T, Ishida S, Sawada J, Nagao T, Quan H, Jin M, Iwamoto M, Yokota S, Ishikawa Y, Minamisawa S. Maternal vitamin A altered gene profiles and structural maturation of the rat ductus arteriosus. *Physiol. Genomics.* 2007; 31: 139-57.
- Nishida M, Onohara N, Sato Y, Suda R, Ogushi M, Tanabe S, Inoue R, Mori Y, Kurose H. Galpha 12/13-mediated upregulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through NFAT activation. *J Biol Chem.* 2007; 282: 23117-28.
- Shinozaki Y, Sato Y (correspondence), Koizumi S, Ohno Y, Nagao T, Inoue K. Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience.* 2007; 147: 153-63.

2. 学会発表

Sato Y, Nagao T. Matrix Gla Protein Gene Identified as a Direct Target of Thyroid Hormone in Vascular Smooth Muscle Cells. 第70回記念日本循環器学会総会・学術集会 (2006年3月)

吉田 ひろみ, 為広 紀正, 最上 知子, 井上 和秀, 大野 泰雄, 長尾 拓, 佐藤 陽治 Capsaicin による PPAR γ と PPAR α 活性制御 日本薬学会第 126 年会 (2006 年 3 月)

Hiraiwa M, Saito M, Nakahara T, Sato Y, Nagao T, Sakamoto K, Ishii K. All-trans retinoic acid reduces neuronal cell death induced by intravitreal injection of NMDA in the rat retina 第 79 回 日本薬理学会年会 (2006 年 3 月)

Yoshida H, Tamehiro N, Nishimaki-Mogami T, Inoue K, Ohno Y, Nagao T, Sato Y. PPAR γ partial agonist activity and PPAR α inverse agonist activity of capsaicin 第 79 回 日本薬理学会年会 (2006 年 3 月)

Yamazaki Y, Kawano Y, Yoshida H, Sato Y, Uebayashi M. Natural and synthetic phenolic amides and esters with adiponectin production enhancing activity in cultured human preadipocytes and diabetic mice. The 10th Adiposcience Symposium (2005 年 8 月)

佐藤 光利, 中村 亮, 藤下 加代子, 森 聡子, 石田 誠一, 山口 照英, 井上 和秀, 長尾 拓, 大野 泰雄, 佐藤 陽治 ラット血管平滑筋における甲状腺ホルモンによる石灰化抑制作用 第 7 回応用薬理学シンポジウム (2005 年 8 月)

南沢 享, 横山 詩子, 佐藤 陽治, 岩本 眞理, 横田 俊平, 石川 義弘. ビタミン A がラット動脈管遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響 第 4 回小児心臓血管発生研究会 (2005 年 7 月)

吉田 ひろみ, 為広 紀正, 橋本 敏弘, 最上知子, 山口 照英, 大野 泰雄, 長尾 拓, 浅川 義範, 井上 和秀, 佐藤 陽治 イチョウ成分ギンコール酸とその類似体の PPAR α ならびに PPAR γ 活性化

に対する作用 第 112 回日本薬理学会関東部会 (2005 年 6 月)

佐藤 陽治 血管石灰化と甲状腺ホルモン 第 112 回日本薬理学会関東部会シンポジウム (2005 年 6 月)

山崎幸苗, 河野泰広, 吉田ひろみ, 佐藤陽治, 上林正巳 フェルラ酸アミド誘導体と不飽和脂肪酸によるアディポネクチンの産生増強日本農芸化学会 2006 年度大会 (2006 年 3 月)

長谷川哲也, 細野哲司, 佐藤光利, 山口照英, 佐藤陽治: DNA マイクロアレイを用いた心筋細胞分化予測指標の探索. 日本薬学会第 127 年会, 富山 (2007 年 3 月)

田邊思帆里, 佐藤陽治, 鈴木孝昌, 長尾拓, 山口照英: ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の品質管理に関するゲノムプロファイリング. 日本薬学会第 127 年会, 富山 (2007 年 3 月)

Nishida M, Onohara N, Inoue R, Sumimoto H, Sato Y, Mori Y, Nagao T, Kurose H. TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. 第 80 回日本薬理学会年会, 名古屋 (2007 年 3 月)

Suda R, Onohara N, Sato Y, Nishida M, Kurose H. Inhibition of angiotensin II signaling by ATP-induced NFAT activation in cardiac fibroblasts. 第 80 回日本薬理学会年会, 名古屋 (2007 年 3 月)

Narita Y, Onohara N, Nishida M, Sato Y, Nagao T, Kurose H. Role of Galpha12/13 in angiotensin II-induced cardiac fibrosis in mice. 第 80 回日本薬理学会年会, 名古屋 (2007 年 3 月)

Sato Y, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Yamaguchi T. Search for cardiomyogenesis marker genes in multipotent cells. 第80回日本薬理学会年会, 名古屋 (2007年3月)

Tanabe S, Sato Y, Nagao T, Yamaguchi T. Analysis for quality control markers in gene expression profiles of human bone marrow mesenchymal stem cells. 第80回日本薬理学会年会, 名古屋 (2007年3月)

鈴木孝昌, 欒洋, 田邊思帆里, 佐藤陽治, 小木美恵子, 山口照英: ヒト間葉系幹細胞培養時の染色体安定性の解析. 第6回日本再生医療学会総会, 横浜 (2007年3月)

田邊思帆里, 佐藤陽治, 山口照英: ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の培養状態に関わる品質特性指標の探索. 第6回日本再生医療学会総会, 横浜 (2007年3月)

佐藤陽治, 田邊思帆里, 山口照英: トランスクリプトーム解析によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の品質特性の探索. 第6回日本再生医療学会総会, 横浜 (2007年3月)

長谷川哲也, 細野哲司, 佐藤光利, 山口照英, 佐藤陽治: 未分化細胞における心筋分化予測マーカー遺伝子の探索. 第6回日本再生医療学会総会, 横浜 (2007年3月)

Tanabe S, Yamaguchi T, Nagao T, Sato Y: Passage-dependent alterations in gene expression profiles of human bone marrow mesenchymal stem cells. 日本分子生物学会2006フォーラム, 名古屋 (2006年12月)

Kurose H, Suda R, Tanabe S, Onohara N, Mangmool S, Nagamatsu Y, Sato Y, Nagao T, Nishida M. Rac up-regulates angiotensin II

type I receptors through ROS and NF-kappaB-dependent interleukin-1beta production in rat cardiac fibroblasts. The American Heart Association Scientific Sessions 2006, Chicago, USA (2006年11月)

Satoh M, Nakamura R, Fujishita K, Mori S, Ishida S, Yamaguchi T, Inoue K, Ohno Y, Nagao T, Sato Y. Thyroid Hormone Suppresses Calcification of Blood Vessel through Matrix Gla Protein. The 5th Joint Seminar, Kunming, China (2006年10月)

Tozaki-Saito H, Tsuda M, Inoue K, Koizumi S, Shinozaki Y, Sato Y. Upregulation of microglial P2X4 receptors by retinoic acid. Neuroscience 2006, the 36th annual meeting of Society for Neuroscience, Atlanta, USA (2006年10月)

Satoh M, Nakamura R, Fujishita K, Mori S, Ishida S, Yamaguchi T, Inoue K, Ohno Y, Nagao T, Sato Y. Prevention of vascular smooth muscle calcification by thyroid hormone. The XVth International Congress of Pharmacology, Beijing, China (2006年7月)

Minamisawa S, Satoh Y, Cho MC. Regulation of Activity of Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase in the Failing Heart. 第72回日本循環器学会総会・学術集会, 福岡 (2008年3月28日) *Circulation J.* 2008 72 (Suppl. I): 21.

田邊 思帆里, 佐藤 陽治, 鈴木 孝昌, 鈴木 和博, 山口 照英 新規ヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養時系列マーカーに関する遺伝子発現プロファイリング 日本薬学会第128年会 (平成20年3月26-28日、横浜)

重本-最上 由香里, 奥平 桂一郎, 佐藤 陽治, 為
広 紀正, 篠崎 陽一, 鈴木 和博, 長尾 拓, 影
近 弘之, 澤田 純一, 最上-西巻 知子 RXR アゴ
ニスト PA024 はコレステロール低下・抗炎症作
用を示し、動脈硬化病変の形性を抑制する 日本
薬学会第 128 年会 (平成 20 年 3 月 26-28 日、横
浜)

柳野 紗智子、佐藤 光利、鈴木 和博、佐藤 陽
治 甲状腺ホルモンによる血管平滑筋石灰化関連
遺伝子の制御 日本薬学会第 128 年会 (平成 20
年 3 月 26-28 日、横浜)

Nishida M, Suda R, Sato Y, Onohara N,
Tanabe S, Nakaya M, Kurose H. A small
GTPase rac mediates pertussis toxin-induced
up-regulation of angiotensin receptors. 第 81
回日本薬理学会年会 (平成 20 年 3 月 17-19 日、
横浜) *J Pharmacol Sci.* 2008 106 (Suppl. I):
217P.

Yanagino S, Satoh M, Suzuki K, Sato Y.
Thyroid hormone regulates genes associated
with vascular smooth muscle calcification. 第
81 回日本薬理学会年会 (平成 20 年 3 月 17-19
日、横浜) *J Pharmacol Sci.* 2008 106 (Suppl.
I): 169P.

田邊 思帆里, 佐藤 陽治, 鈴木 孝昌, 鈴木 和
博, 山口 照英 遺伝子発現プロファイリングに
よる新規ヒト骨髄由来間葉系幹細胞継代培養時
系列マーカー遺伝子の探索. BMB2007 (第 30
回日本分子生物学会年会/第 80 回日本生化学会
大会合同大会), 横浜 (2007 年 12 月 11-15 日)

佐藤 陽治 細胞組織製品の実用化に向けての臨
床試験と規制. 第 29 回日本バイオマテリアル学
会大会, 大阪 (2007 年 11 月 26 日)

Haghighi K, Sato Y, Fan G-C, He S, Kolokathis
F, Paraskevaidis I, Jones K, Dorn GW II,
Kremastinos DT, Kranias EG. A Novel Human
Phospholamban Promoter Polymorphism in
Dilated Cardiomyopathy Alters Glucocorticoid
Nuclear Receptor Mediated Transcription
Regulation. The American Heart Association
Scientific Sessions 2007, Orlando, USA (2007
年 11 月) *Circulation.* 2007;116 (Suppl. II): 605.

柳野 紗智子, 佐藤 光利, 鈴木 和博, 佐藤 陽
治 動脈血管平滑筋細胞における甲状腺ホルモ
ンの生理的ターゲットとしての TGFβ遺伝子. 第
117 回日本薬理学会関東部会, 東京 (2007 年 10
月 6 日)

Sato Y. Transcriptomic approach to identify
quality characteristics of cell-based medical
products. The 6th World Congress on
Alternatives & Animal Use in the Life
Sciences: Review progress made toward the
3Rs, Tokyo, Japan (2007 年 8 月 21-25 日)

田邊 思帆里, 鈴木 孝昌, 山口 照英, 鈴木 和
博, 佐藤 陽治 細胞治療薬応用を目的とした骨
髄由来間葉系幹細胞のゲノムプロファイリング.
日本ケミカルバイオロジー研究会第 2 回年会,
京都(2007 年 5 月)

Suzuki T, Luan Y, Prabha D, Kogi M, Honma
M, Koizumi T, Tanabe S, Sato Y, Suzuki K,
Yamaguchi Y. CGH and SNP Arrays as New
Tools for Detailed Analysis of Chromosome.
The 8th International Symposium on
Chromosomal Aberrations, Kobe, Japan (2007
年 10 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2006-109854 「細胞の心筋細胞分化活性検出用マーカー」出願日：平成 18 年 4 月 12 日、
発明者：佐藤陽治、長谷川哲也、山口照英、細野哲司、佐藤光利

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

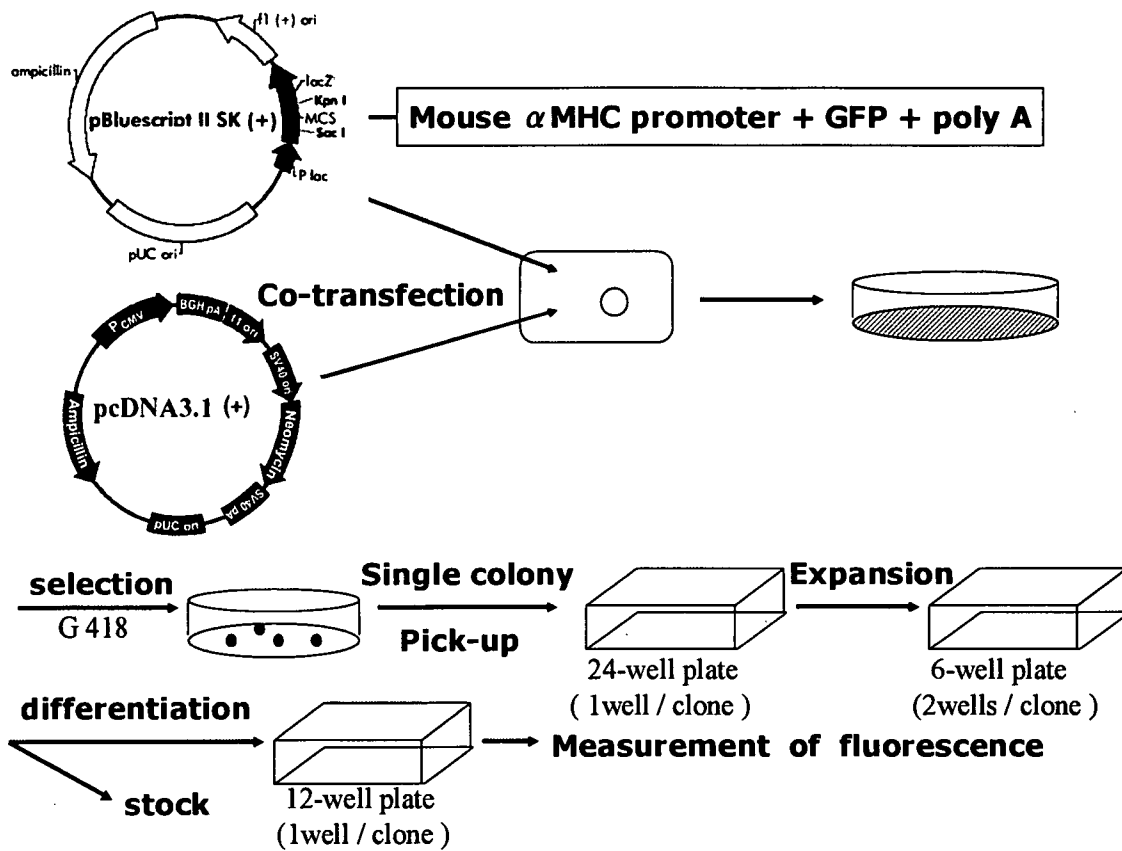


Fig.1 CL6 由来細胞株の作製

本研究で用いたCL6由来細胞株であるCL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52は、以上のようにして作製されたものである。 α MHC: alpha myosin heavy chain; GFP: green fluorescent protein; poly A: human growth hormone poly A signal; G418: Geneticine

Table 1 心筋細胞特異的マーカー遺伝子測定用のプライマーおよびプローブの配列

Gene	Name	Sequence
Nkx2.5	TaqMan probe mNkx2.5_T	TGCTGAAGCTCACGTCCACGCAG
	Forward primer mNkx2.5_F	CTTCAAGCAACAGCGGTACCT
	Reverse primer mNkx2.5_R	CGCTGTGCTTGCACCTTGTA
GATA4	TaqMan probe mGATA4_T	TGCATCTCCTGTCACTCAGACATCGCA
	Forward primer mGATA4_F	TGCTCTAAGCTGTCCCCACAA
	Reverse primer mGATA4_R	GTGATTATGTCCCCATGACTGTCA
MEF2C	TaqMan probe mMEF2C_T	CCAGTTACCATCCCAGTGTCCAGCCATAAC
	Forward primer mMEF2C_F	TCCACCTCCCAGCTTTGAGAT
	Reverse primer mMEF2C_R	TGACAGGATTGCTGTACACCAAAC
MLC2a	TaqMan probe mMLC2a_T	AAGGCCTTCAGCTGCATTGACCAGAAC
	Forward primer mMLC2a_F	AAGCCCAGATTCAGGATTCAAG
	Reverse primer mMLC2b_R	AGCTCTTCCTCCGGAACACTT
MLC2v	TaqMan probe mMLC2v_T	CATGGACCAGAACAGAGACGGCTTCA
	Forward primer mMLC2v_F	GGAGTTCAAGGAAGCCTTCACA
	Reverse primer mMLC2v_R	TGTGTCCCTTAGGTCATTCTTGTC
α MHC	TaqMan probe m α MHC_T	TCTGCTGATACCGGTGACAGTGGTAAAGG
	Forward primer m α MHC_F	CATGGCTACACTCTTCTCTACCTATGC
	Reverse primer m α MHC_R	GGTGGAGAGCAGACACTGTTTG
β MHC	TaqMan probe m β MHC_T	ACCCCTACGATTATGCGTTCATCTCCCAA
	Forward primer m β MHC_F	TTTCTACCAAATCCTGTCTAATAAAAAGC
	Reverse primer m β MHC_R	GTCATCAATGGAGGCCACAGT