

200806010A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

再生医療実用化に向けた細胞組織加工医薬品の
安全性・品質等の確保に関する基盤技術開発研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照 英

平成21 (2009) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

再生医療実用化に向けた細胞組織加工医薬品の
安全性・品質等の確保に関する基盤技術開発研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 口 照 英

平成 21 (2009) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書

- 再生医療実用化に向けた細胞組織加工医薬品の安全性・品質等の確保に関する
基盤技術開発研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
山口 照英

II. 分担研究報告書

1. 細胞組織加工医薬品のウイルス安全性評価技術の開発・・・・・・・・・・・・ 133
内田恵理子
2. 細胞組織加工医薬品の造腫瘍性・異常増殖性評価技術の開発に関する研究・・・・ 147
佐藤 陽治
3. 細胞組織加工医薬品の遺伝的安定性・品質特性指標の評価技術の開発・・・・・・・・ 170
鈴木 和博
4. 細胞組織加工医薬品の同等性評価法の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 200
川崎 ナナ
5. 細胞組織加工医薬品の免疫学的安全性評価に関する基盤技術開発・・・・・・・・ 224
川端 健二
6. 細胞組織加工医薬品の特性解析・品質管理に関する研究・・・・・・・・・・・・ 234
石井 明子
7. 細胞特性・品質解析技術としてのムチン型糖鎖解析技術の開発・・・・・・・・・・・・ 259
早川 堯夫
8. 人工多能性幹細胞の品質・安全性に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 278
山中 伸弥

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 282

IV. 研究成果の刊行物・別刷

再生医療実用化に向けた細胞組織加工医薬品の安全性・品質等の確保
に関する基盤技術開発研究

研究代表者 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・部長

研究要旨 再生医療実用化に向けた細胞組織加工医薬品の安全性・品質等の確保に関する基盤技術開発を目的とする研究により、以下の成果を得た。①細胞組織加工医薬品のウイルス安全性評価技術の開発に関する研究としては、B型肝炎ウイルス（HBV）の濃縮・高感度検出法として、ポリ-Lリジン結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法を開発し、低濃度キャリアの高感度ウイルススクリーニング法としての有用性を確認した。また、パルボウイルス B19 の *in vitro* 持続感染系を確立し、感染リスクの評価に有用なことを明らかにした。②細胞組織加工医薬品の造腫瘍性・異常増殖性の評価技術の開発に関する研究として、ハイスループットに改良された軟寒天コロニー形成試験法の検出限界、感度、悪性細胞に対する選択性、および精度の評価を行うとともに、試験法の最適化を検討した。③さらに、染色体異常の検出法の最適化を目的として、分裂中期細胞の集積するための最適条件を検討した。また、細胞組織加工医薬品の品質、有効性を評価するためのバイオマーカーを探索する手法として、高感度ナノ LC-MS 測定によるショットガンプロテオミクスを用いた網羅的発現解析系の有用性を確認した。④細胞組織加工医薬品の同等性評価法の開発の一環として、培養条件が異なるヒト間葉系幹細胞（hMSC）の糖鎖プロファイリングを行い、同等性評価指標候補となる糖鎖構造を明らかにした。また、hMSC の神経分化誘導能予測法のための糖鎖マーカーの探索を行った。⑤細胞組織加工医薬品の抗原性（免疫原性）評価系を確立するための基盤技術として、ヒト血液系を有したマウスの作製、および当該マウスモデルによる免疫原性評価システムの開発を行うことを目的とし、ケモカイン CXCL12 を発現するアデノウイルスベクター（Ad-CXCL12）投与によるヒト造血幹細胞の移植効率向上のための検討を行った。CXCL12 導入マウスにおける内在性血液前駆細胞の動態を詳細に解析した結果、造血幹細胞を含む多種の血液細胞が骨髄 niche から遊離してくることが示された。⑥細胞・組織加工医薬品としての血管内皮前駆細胞の実用化における品質指標の探索の一環として、細胞の起源と特性に関する解析を行い、AC133 由来 early EPC と単核球由来 early EPC の比較、および、early EPC と late EPC の特性の差異に関して検討を行い、early EPC および late EPC の特性指標候補となる分子を見出した。⑦細胞の糖タンパク質糖鎖解析技術を再生医療実用化のための細胞特性解析技術に応用することを検討した。具体的には、ムチン型糖鎖の比較糖鎖プロファイリング技術を開発し、これを 10 種類のヒト培養細胞に適用し、細胞特性解析技術としての有用性について検証し

た。⑧細胞組織加工医薬品に供する細胞資源としての人工多能性幹細胞（iPS細胞）の同一性・同等性評価法の開発、特性解析法の開発を目的とし、様々な年齢の日本人の線維芽細胞から樹立したiPS細胞を解析したところ、形態学的特徴、ES細胞マーカー、細胞表面抗原、*in vitro* および *in vivo* の分化能の点で、ほぼ同様であり、ES細胞の特性と類似していることが明らかとなった。また、ヒトiPS細胞の細胞表面抗原に基づく細胞評価法や、DNAマイクロアレイによる特性解析法について、基礎的知見を得た。

研究分担者

(順不同)

鈴木 和博	国立医薬品食品衛生研究所	遺伝子細胞医薬部	部長
川崎 ナナ	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部	第1室 室長
石井 明子	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部	第2室 室長
内田 恵理子	国立医薬品食品衛生研究所	遺伝子細胞医薬部	第1室 室長
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
川端 健二	医薬基盤研究所	サブプロジェクトリーダー	
早川 堯夫	近畿大学薬学総合研究所	所長	
中内 啓光	東京大学医科学研究所	教授	
山中 伸弥	京都大学 物質-細胞統合システム拠点/再生医科学研究所	教授	

研究協力者

(順不同)

櫻井 文教	医薬基盤研究所		
田代 克久	医薬基盤研究所/大阪大学大学院薬学研究科		
水口 裕之	医薬基盤研究所/大阪大学大学院薬学研究科		
小木 美恵子	金沢工業大学 情報フロンティア学部	教授	
鈴木 浩子	慶応義塾大学大学院薬学研究科/国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部	
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
鈴木 孝昌	国立医薬品食品衛生研究所	遺伝子細胞医薬部	室長
押澤 正	国立医薬品食品衛生研究所	遺伝子細胞医薬部	主任研究官
スレッシュ ティムパ ッティ	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
北川 博子	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部	
豊田 淑江	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部	
橋井 則貴	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部	研究員
篠原 聡	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部	非常勤職員
黄 笑宇	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部	流動研究員
岩田 明子	埼玉県赤十字血液センター研究部		
佐藤 功栄	埼玉県赤十字血液センター研究部		
木下 充弘	近畿大学薬学部		
掛樋 一晃	近畿大学薬学部/近畿大学薬学総合研究所		

A. 研究目的

ヒトまたは動物の細胞や組織を培養・加工して製造される細胞組織加工医薬品は、有効な治療手段の少ないがん、心筋梗塞、神経疾患、脊髄損傷、熱傷、パージャージャー病等の疾患・損傷、あるいは再生不良性貧血等の先天性疾患等に対する画期的な治療薬となる可能性が高い。更に、細胞組織加工医薬品は慢性的なドナー不足が問題となっている臓器移植と異なり、目的とする細胞・組織等を増幅し、特定の有用細胞を作製できる可能性を持つ製品である。細胞組織加工医薬品の開発は先進国のみならずグローバルな開発・実用化が進められている。わが国においても、様々な細胞組織加工医薬品の開発が進められており、平成19年10月には重症熱傷治療用培養皮膚製品が初の細胞組織加工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加工医薬品が実用化されると見込まれている。しかし、細胞組織加工医薬品は未知・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。また今後、細胞系列を超えた分化能に期待する新たな細胞組織加工医薬品や遺伝子治療等他の先端技術と組み合わせた多くの製品(複合製品)が開発されてくる可能性も高い。例えば、マトリックスや支持膜との複合化や遺伝子改変細胞を利用した製品などが数多く開発中である。世界に先駆けて本邦で開発された人工多能性幹細胞(iPS細胞)も特定の遺伝子を細胞に導入されていることから遺伝子治療薬との複合製品と考えられ、遺伝子治療薬としての安全性評価法の開発も望まれている。従って、細胞組織加工医薬品については将来の動向を見

据え、先導的に品質・安全性評価に関する新たな技術開発を行い、より高品質で安全性および有効性の高い細胞組織加工医薬品の開発や実用化を適正に推進することが緊急の課題となっている。

細胞組織加工医薬品は、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動的性質を持っており、新たな特性解析技術や品質管理法の開発、あるいは安全性確保のための適切な評価技術の開発が望まれている。本研究では細胞組織加工医薬品の品質・安全性の確保するために、①ウイルス安全性確保を目的とした、核酸増幅法(NAT)によるウインドウ期や低濃度キャリアーの高感度ウイルススクリーニング法の開発およびNATのパリテーション手法の標準化に関する研究、②細胞のがん化や異常増殖性獲得細胞を高感度で検出する試験法の開発、③遺伝的安定性・同一性・同等性評価法の開発、④免疫原性の事前評価法の開発、⑤細胞組織加工医薬品の特性解析法の開発および製造方法・規格設定の評価手法の開発に関する研究を行うことを目的とし、本年度は以下の研究を行った。

- 1) 細胞組織加工医薬品のウイルス安全性評価技術の開発に関する研究として、ウイルス等の感染性因子の高感度検出技術の開発及び安全性評価技術の開発を目的として、B型肝炎ウイルス(HBV)の濃縮・高感度検出法の開発とパルボウイルスB19の感染系の確立について検討した。
- 2) 細胞組織加工医薬品の造腫瘍性・異常増殖性の評価技術の開発に関する研究として、ハイスルーブットに改良された軟寒天コロニー形成試験法の検出限界、感

度、悪性細胞に対する選択性、および精度のバリデーションを行うと同時に、同試験法における細胞検出系の最適化を検討した。

- 3) 細胞組織加工医薬品に利用されるヒト間葉系幹細胞における染色体異常の検出手法の改良を行った。また、細胞培養過程における品質および安全性評価に有用なバイオマーカーの探索のための、細胞を用いた網羅的プロテオーム解析に使用することを目的として、オンラインナノLC・タンデム質量分析装置を用いた高感度分析手法の開発を行った。
- 4) ヒト間葉系幹細胞の同等性評価、並びに分化能保持予測法の開発を目的として、独自に開発した細胞糖タンパク質糖鎖プロファイリング技術を用いて、培養条件が異なるMSCの糖鎖プロファイリングを行い、細胞同等性評価指標となる糖鎖マーカーの探索を行った。また、ヒト間葉系幹細胞の神経分化誘導能の予測用糖鎖マーカーの探索を行った。
- 5) 細胞組織加工医薬品の抗原性(免疫原性)を試験する評価系を確立するための基盤技術として、ヒト血液系を有したマウスの作製、および当該マウスモデルによる免疫原性評価システムの開発を行うことを目的とし、外来造血幹細胞の移植効率を向上させることを目指し、ケモカイン CXCL12 を発現するアデノウイルスベクター (Ad-CXCL12) をマウスに投与した後の内在性血液前駆細胞の動態を詳細に解析した。
- 6) 細胞組織加工医薬品としての血管内皮前駆細胞の品質評価法確立を目的として、細胞の起源と特性に関する解析を行い、AC133由来early EPCと単核球由来early EPCの比較、および、early EPCとlate EPCの特性の差異に関して検討を行った。
- 7) 細胞の糖タンパク質糖鎖を定量的に解析するための技術を開発し、それらの技術を10種類の各種ヒト培養細胞のムチン型糖鎖の比較糖鎖プロファイリングへ適用し、細胞特性解析技術等としての有用性について検証した。
- 8) iPS細胞をベースにした細胞組織加工医薬品の品質・安全性の確保を目的として、樹立したiPS細胞の細胞表現型プロファイリングによるES細胞との比較を行った。

B. 研究方法

B-1 感染性因子の安全性評価技術開発

B-1-1 HBV の濃縮・高感度検出法の開発

1) HBV と HBs 抗原の濃縮

ポリ-L-リジン(PLL)コート磁気ビーズはカルボキシル基を持つ磁気ビーズ(粒径 1 μm)に、PLL を水溶性カルボジイミド存在下でカップリングして作製した。HBV の濃縮は以下のように行った。まず検体 2ml に PLL 磁気ビーズ 2mg (最終濃度 1mg/ml) を添加し、これに 1.1M 酢酸亜鉛溶液を 30 μl 混合して 5 分間静置し、ウイルスと磁性粒子表面のポリ-L-リジンとの凝集体を形成させた。これを磁気スタンド上に 5 分間静置し、血漿成分を除去した後に PBS で 2 回洗浄後、DNA 測定用には 100 μl 、HBsAg 測定用には 0.25ml の 0.4M EDTA 溶液で溶出して濃縮液とした。

2) HBV-DNA の測定

HBV-DNA はスマイテスト EX-R&D 試薬キット((株)医学生物学研究所, 長野)を用いて、添付の操作手順書に従って抽出した。HBV-DNA は ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いた定量的 PCR 法により行い、NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) の標準品を基に調整した自家標準品を用いて作製した標準曲線を用いて定量した。なお標準曲線から求めた HBV の定量限界は 100 copies/ml 以上で、定性的な 95% 検出限界は 60 copies/ml であった。

3) HBs 抗原の測定

HBs 抗原は、AxSYM HBsAg assay

(Abbott Laboratories ; AbbottPark, IL)

を用いて、添付の操作手順に従って測定した。

4) HBs 抗体の影響

ウマを用いて作成した抗 HBs 抗体(タイター: 51200IU/ml)を HBV 陽性試料に添加して検討した。(20ul: 1024mIU/ml, 35ul: 1792mIU/ml)

5) 他のウイルスの影響

HBV 濃縮に及ぼす他のウイルスの影響は、パルボ B19 (非エンベロープ DNA ウイルス)、HCV (エンベロープ RNA ウイルス)を添加して検討した。

B-1-2 パルボウイルス B19 感染系の確立

1) パルボウイルス B19 感受性細胞の樹立

赤芽球系細胞株 Ku812 細胞を 100 ng/ml エリスロポエチン (EPO) 存在下に 96 ウェルプレートを用いて限界希釈して培養を行い、クローナルに EPO 依存的に増幅する細胞を選別した。EPO 依存的に増幅する 2 つの細胞株が得られ、それぞれ Ku812-E2 及び Ku812-E4 とした。

2) パルボウイルス B19 の感染

$10^2 \sim 10^5$ コピー/ml になるようにヒト血漿由来パルボウイルス B19 を 2% ウシ胎児血清 (FCS) 含有 RPMI1640 培地で希釈し、Ku812-E2 及び Ku812-E4 細胞と 1 時間培養した。その後、遠心により細胞を沈殿させ、未感染のウイルスを除去した後、10% FCS RPMI1640 培地、ASF104 無血清培地、GIT 無血清培地に再び細胞を懸濁して培養を続けた。

3) パルボウイルス B19 感染時の抗パルボウイルス B19 抗体の影響

2) で示した感染条件下に、さらに抗パルボウイルス B19 抗体を添加した条件下と比較した。それ以外の条件は同一であった。

B-2 *in vitro* 造腫瘍性評価技術開発

B-2-1 セルバンクの調製

Hela 細胞 (JCRB9004, Lot: 24222006, 継代数: 114) は (財) ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンクから入手した。Hela 細胞増殖培地としては研究資源バンク推奨の Suppl-MEM (10% ウシ胎児血清 (FBS) (ICN, Cat: 2916754, Lot: 1604H)、2mM L-グルタミン (SIGMA, Cat: G7513) および 100U/mL ペニシリン G・100 μ g/mL ストレプトマイシン (GIBCO, Cat: 15140) を含む Eagle's minimum essential medium with non-essential amino acids (SIGMA, Cat: M5650)) を用いた。培養は CO₂ インキュベーター (SANYO MCO-175, 37°C, 二酸化炭素分圧 5%) で行い、培地量は 10mL/10cm ディッシュ、培地交換は 1 日おきに行った。継代は、細胞が培養容器中でおおよそ 80% コンフルエントになった際に行った。継代の操作としては、まず培養容器から培地を吸引除去し、1X リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (SIGMA, Cat: D8537, 10mL/10cm ディッシュ) を添加、細胞を 1 回洗浄した。次に 1X PBS を吸引除去し、0.25% トリプシン-EDTA (GIBCO, Cat: 25200, 2mL/10cm ディッシュ) を添加、細胞に行き渡らせた後にすぐさま吸引除去し、細胞が個別に分離するまで 2~3 分間室温で静置した。この際、細胞塊の発生を防ぐた

め、培養容器を振ったり叩いたりして細胞を強制的に剥がす操作は行わなかった。トリプシンの消化反応は Suppl-MEM (6mL/10cm ディッシュ) を細胞に添加することにより停止させ、緩やかなピペティング (3 mL/sec 以下) により細胞をよく分散した。分散した細胞は希釈倍率 1/2~1/6 で継代した。細胞のストックを調製するために、トリプシン消化により分散した細胞を遠心分離 (Sakuma RSL-05A, 800rpm, 5min, 室温) により回収し、10% ジメチルスルホキシド (DMSO, SIGMA, Cat: D2650) を含む Suppl-MEM (1 mL/10cm ディッシュ) で再懸濁した後、一晚掛けて Cryo1°C Freezing Container (NALGENE, Cat: 5100-0001) 中で -80 °C までゆっくりと凍結し、そのあと -150 °C の冷凍庫中に保存した。継代数 118~119 を試験細胞として用いた。

骨髄由来 hMSC は Lonza 社から入手した (Cat: PT-2501, 継代数: 2)。使用した hMSC の各ロットのドナーの詳細については Table II-1 に示した。hMSC 増殖培地としては、MSCGM (Mesenchymal Stem Cell Growth Medium BulletKit, Lonza, Cat: PT-3001) を用いた。培養は CO₂ インキュベーター (SANYO MCO-175, 37°C, 二酸化炭素分圧 5%) 内で行い、培地量は 15mL/10cm ディッシュ、培地交換は 1 日おきに行った。継代は、細胞が培養容器中でおおよそ 90% コンフルエントになった際に行った。継代の操作としては、まず培養容器から培地を吸引除去し、1X PBS (SIGMA, Cat: D8537, 10mL/10cm ディッシュ) を添加、細胞を 1 回洗浄した。次に 1X PBS を吸引除去し、0.25% トリプシン-EDTA

(GIBCO, Cat: 25200, 2mL/10cm ディッシュ)を添加、細胞に行き渡らせた後にすぐさま吸引除去し、細胞が個別に分離するまで1~2分間室温で静置した。この際、培養容器側面を時々叩いて細胞を揺らして剥がす。トリプシンの消化反応は MSCGM (6mL/10cm ディッシュ)を細胞に添加することにより停止させ、緩やかなピペッティング (3 mL/sec 以下) により細胞をよく分散した。分散した細胞を孔径 40 μ m のセルストレーナーに通して細胞塊を除去した。新たな MSCGM を空になった培養容器に加えて洗浄し、洗浄液も同じセルストレーナーに通して培養容器に残った細胞を回収した。回収した細胞の懸濁液を 300,000~500,000 細胞/10cm ディッシュとなるように MSCGM で希釈して継代した。また、細胞のストックを調製する場合には、回収した細胞懸濁液を遠心分離 (Sakuma RSL-05A, 800rpm, 5min, 室温) することにより細胞を集め、上清を除去した後、500,000~5,000,000 細胞に対して細胞保存液セルバンカー1 (十慈フィールド) を 1mL 添加し、細胞を懸濁した後、1mL/tube でクライオチューブに分注し、-80 $^{\circ}$ C で凍結、翌日に-150 $^{\circ}$ C の冷凍庫中に保存した。継代数 5 をワーキングセルバンクとし、それよりも若い細胞をマスターセルバンクとして保存した。

B-2-2 軟寒天コロニー形成試験

B-2-2-1 アッセイ用 Hela 細胞の調製

凍結されている継代数 118~119 の Hela 細胞を-150 $^{\circ}$ C のフリーザーから液体窒素中に移し、37 $^{\circ}$ C のウォーターバスの脇まで移動、クライオチューブ中に凍結保存され

た細胞を 37 $^{\circ}$ C のウォーターバス中で素早く解凍した。クライオチューブの周囲を、70% エタノールを染み込ませたキムワイブでぬぐい消毒、内容物を 1mL ピペットで数回攪拌後、注意深く吸出し、あらかじめ用意した 9mL Suppl-MEM (室温) 入り 15mL コニカルチューブに加えた。次に、細胞懸濁液を遠心分離 (Sakuma RSL-05A, 800rpm, 5min, 室温) することにより細胞を集め、DMSO を含んだ上清を除去した。細胞を 6mL の Suppl-MEM (室温) 中で懸濁した後、あらかじめ 7mL の Suppl-MEM (室温) が分注されている 10cm ディッシュに 3mL ずつ分注し、ディッシュを前後左右に揺らすことにより細胞を均等に分散させた。細胞は、CO₂ インキュベーター (SANYO MCO-175, 37 $^{\circ}$ C, 二酸化炭素分圧 5%) 中で 1 晩培養し、翌日培地交換 (10mL/10cm ディッシュ) を行い、翌々日に軟寒天コロニー形成試験に使用した。軟寒天コロニー形成試験の開始時には、以下のように細胞を分離した。すなわち、直径 100mm の細胞培養ディッシュ上で Hela 細胞が 80~90% コンフルエントであることを確認した後、培地を吸引除去し、1X リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (SIGMA, Cat: D8537, 10mL/10cm ディッシュ) を添加、細胞を 1 回洗浄した。次に 1X PBS を吸引除去し、0.25% トリプシン-EDTA (GIBCO, Cat: 25200, 1.5mL/100mm ディッシュ) を添加、細胞に行き渡らせた後にすぐさま吸引除去し、細胞が個別に分離するまで 2~3 分間室温で静置した。この際、細胞塊の発生を防ぐため、培養容器を振ったり叩いたりして細胞を強制的に剥がす操作は行わなかった。トリプシンの消化反応は、MSCGM

(6mL/10cm ディッシュ)を細胞に添加することにより停止させ、緩やかなピペティング (3 mL/sec 以下)により細胞をよく分散した。分散した細胞の懸濁液 90 μ L に 10 μ L の 0.5%トリパンプルー溶液を添加、トリパンプルーで染まらない生細胞をビルケルチュルク血球計算盤で計数し、細胞の濃度に基づいて MSCGM で適宜希釈した。

B-2-2-2 アッセイ用 hMSC の調製

凍結されている継代数 5 の hMSC を -150°C のフリーザーから液体窒素中に移し、37°C のウォーターバスの脇まで移動、クライオチューブ中に凍結保存された細胞を 37°C のウォーターバス中で素早く解凍した。クライオチューブの周囲を、70%エタノールを染み込ませたキムワイプでぬぐい消毒、内容物を 1mL ピペットで数回攪拌後、注意深く吸出し、あらかじめ用意した 9mL MSCGM (室温)入り 15mL コニカルチューブに加えた。次に、細胞懸濁液を遠心分離 (Sakuma RSL-05A, 800rpm, 5min, 室温)することにより細胞を集め、細胞保存液である上清を除去した。細胞を 10mL の MSCGM (室温)中で懸濁した後、あらかじめ 10mL の MSCGM (室温)が分注されている 10cm ディッシュに 5mL ずつ分注し、ディッシュを前後左右に揺ることにより細胞を均等に分散させた。細胞は、CO₂ インキュベーター (SANYO MCO-175, 37°C, 二酸化炭素分圧 5%) 中で 1 晩培養し、翌日培地交換 (15mL/10cm ディッシュ)を行い、翌々日に軟寒天コロニー形成試に使用した。軟寒天コロニー形成試験の開始時には、以下のように細胞を分離した。すなわち、2 枚の直径 100mm 細胞培養ディッシュ上で

MSC が 40~50%コンフルエントであることを確認した後、培地を吸引除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (SIGMA, Cat: D8537, 10mL/10cm ディッシュ)を添加、細胞を 1 回洗浄した。次に PBS を吸引除去し、0.25%トリプシン-EDTA (GIBCO, Cat: 25200, 2mL/100mm ディッシュ)を添加、細胞に行き渡らせた後にすぐさま吸引除去し、細胞が個別に分離するまで 1~2 分間室温で静置した。この際、細胞を効率的に剥がす目的で、培養容器を適宜振ったり叩いたりした。トリプシンの消化反応は、MSCGM (5mL/10cm ディッシュ)を細胞に添加することにより停止させ、緩やかなピペティング (3 mL/sec 以下)により細胞をよく分散した。2 枚分の細胞懸濁液を合わせて、1 本のポリプロピレン製遠心管に移し、遠心分離 (Sakuma RSL-05A, 800rpm, 5min, 室温)することにより細胞を集めた。培地を除去し、新たに 1mL の MSCGM を細胞に添加、懸濁した後、孔径 40 μ m のセルストレーナーを通した。得られた細胞懸濁液 90 μ L に 10 μ L の 0.5%トリパンプルー溶液を添加、トリパンプルーで染まらない生細胞をビルケルチュルク血球計算盤で計数し、細胞の濃度に基づいて MSCGM で適宜希釈した。

B-2-2-3 CytoSelect CBA-130 (生細胞回収なし、蛍光検出)によるアッセイ

Cell Biolabs 社のプロトコールに従い、底部寒天層および細胞含有寒天層を調製した (Fig. II-1)。細胞の播種密度は 96 穴細胞培養プレートに HeLa 細胞および MSC をそれぞれウェルあたり 0.75~75 個および 25~2,500 個とした。細胞は 10 日、20 日もしく

は 30 日間培養し、細胞数の評価を、CyQuant(Invitrogen)の蛍光を測定することより行った。蛍光の測定は、ARVO-SX (Perkin-Elmer) 及び Wallac1420 Workstation を用いて行った。測定条件は以下の通り：① Measurement: Shake (duration: 3sec, speed: normal, diameter 0.1mm, shaking type: orbital, repeat operation, yes); Fluorescence (0.1sec), ② Plate: Generic 8x12 size plate (Measure each plate: 6 times, Hight: standard (approx. 8mm)), ③ File output: Excel5.0。

B-2-2-4 CytoSelect CBA-140 (生細胞回収あり、蛍光検出および化学発光検出)によるアッセイ

Cell Biolabs 社のプロトコールに従い、底部寒天層および細胞含有寒天層を調製した (Fig. II-2)。細胞の播種密度は 96 穴細胞培養プレートに Hela 細胞および MSC をそれぞれウェルあたり 0.75~75 個および 25~2,500 個とした。細胞は 10 日、20 日もしくは 30 日間培養したのち、Matrix Solubilization Buffer により寒天成分を溶解して細胞懸濁液を得た。得られた懸濁液中の細胞数を CyQuant(Invitrogen)の蛍光もしくは CellTiter Glo (Promega)の化学発光により評価した。CellTiter Glo の操作は Promega 社のプロトコールに従った。蛍光および化学発光の測定は、ARVO-SX (Perkin-Elmer) 及び Wallac1420 Workstation を用いて行った。蛍光の測定条件は以下の通り：① Measurement: Shake (duration: 3sec, speed: normal, diameter 0.1mm, shaking type: orbital, repeat operation, yes); Fluorescence (0.1sec), ②

Plate: Generic 8x12 size plate (Measure each plate: 6 times, Hight: standard (approx. 8mm)), ③ File output: Excel5.0 (Microsoft)。また、化学発光の測定条件は以下の通り：① Measurement: Shake (duration: 1sec, speed: fast, diameter 0.1mm, shaking type: linear, repeat operation, yes); CPS (1sec), ② Plate: Generic 8x12 size plate (Measure each plate: 6 times, Hight: standard (approx. 8mm)), ③ File output: Excel5.0 (Microsoft)。

B-2-3 データ解析

B-2-3-1 検出限界の検討

ICH Q2(R1)ガイドラインによる「分析法の検出限界 (Detection Limit (DL))」の定義は、「試料中に存在する分析対象物の検出可能な最低の量のことである。ただし、このとき必ずしも定量できる必要はない。」となっている。検出限界を求めるためにはいくつかの手法を利用でき、分析法が機器分析であるか否かによって異なる。本研究では、ICH Q2(R1) Part II 6.3.1 「レスポンスの標準偏差と検量線の傾きに基づく方法」により、検出限界を次式により決定した。

$$DL = 3.3\sigma / S$$

ここで、 σ は測定シグナルの標準偏差を、 S は検量線の傾きを表す。また、傾き S は、細胞数 vs. 蛍光 (化学発光) 関係の検量線から推定した。標準偏差 σ については、種々の推定方法があるが、ICH Q2(R1)ガイドライン中に例示されている「ブランクの標準偏差に基づく方法」を採用した。すなわち、

適当な数（本研究では 6 例）のブランク試料を分析し、その測定シグナルの標準偏差を計算することによって、分析法のバックグラウンドの標準偏差の大きさを見積った。（Fig. II-3）

B-2-3-2 感度の検討

分析的には「感度 (Sensitivity)」は、分析対象物 1 ユニット分の差でどの程度の測定シグナルの差が得られるか、すなわち検量線の傾斜を指し、検量線が線形性を示す限りいかなる点においても測定可能な係数である。しばしば「検出限界」と「感度」とが混同される場合が見受けられるが、その理由は「検出限界が低い」という意味に相当する言葉が英語にも日本語にもなく、“sensitive”という言葉が一般に使われてしまうためである。本研究では、複数のアッセイ系の感度を比較する必要があるため、バックグラウンド値の平均値に対する検量線の傾斜 S の比を「感度」の指標とした。（Fig. II-4）

B-2-3-3 特異性（選択性）の検討

ICH Q2(R1)ガイドラインによれば、「特異性 (Specificity)」とは「共存が予想される不純物、分解物、配合成分等の存在下で、分析対象物を正確に測定できる能力」のことである。本研究では悪性細胞 (Hela 細胞) と正常細胞 (hMSC) の 2 種の細胞間での「感度」の比を指標として検討した。ただしこの比が、分析法のがん細胞に対する「特異性 (Specificity)」を示すほどの普遍性を持つとは考えにくいので、本研究ではこれを「選択性 (Selectivity)」と呼ぶ。（Fig. II-5）

B-2-3-4 精度の検討

ICH Q2(R1)ガイドラインの分析法の「精度 (Precision)」の定義は、「均質な検体から多数回採取して得られた複数の試料について、記載された条件に従って測定して得られた一連の測定値間の一致の程度（又はばらつきの程度）」となっている。精度には、併行精度、室内再現精度及び室間再現精度の 3 つのレベルがある。併行精度 (Repeatability) とは、短時間の間に同一条件下で測定する場合の精度のことである。Intra-assay precision ともいう。室内再現精度 (Intermediate precision) とは、同一施設内において、試験日、試験実施者、器具、機器等を変えて測定する場合の精度のことである。また、室間再現精度 (Reproducibility) とは、異なった施設間で測定する場合の精度のことである（通常、分析法を標準化する際の共同研究において評価が必要とされる）。本研究では、精度の 1 指標として併行精度の検討を行うこととし、悪性細胞 (Hela 細胞) と正常細胞 (hMSC) の 2 種の細胞間での分析法の「感度」の差に対する有意確率 (P 値) を指標とした。「感度」(検量線の傾き) の差に対する有意確率 (P 値) は、Glantz SA の方法*に従った。（Fig. II-6）

*Glantz SA “Primer of Biostatistics 5th Ed” (McGraw-Hill, 2002)

B-2-3-5 アッセイ系の最低要件

細胞組織加工製品の *in vitro* 造腫瘍性評価系として応用する際の実用性を鑑み、暫定的に 2 つの条件を設定した。すなわち、①Hela 細胞 (悪性細胞) に対するアッセイ形の選択性が、hMSC (正常細胞) と比較し

て 100 倍以上であることと、②Hela 細胞と hMSC とを区別する精度（併行精度）の指標としての有意確率が可能な限り低いこと、の 2 条件を最低要件とした。

B-3 染色体安定性等の評価技術開発

B-3-1 細胞の染色体安定性に関する検討

B-3-1-1 使用した細胞株

Cambrex 社より入手した正常ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 (hMSC) および前骨髄性白血病細胞 HL60 細胞株を使用した。hMSC は 2 継代目にて入手後、間葉系幹細胞培養用基本培地培地 Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM) に間葉系幹細胞添加因子セット (MSCGM SingleQuots、TAKARA) および 10%FBS を添加し培養を行い、50-70%コンフルエントの状態にて継代を続けた。

HL60 細胞は、10%牛胎児血清添加 RPMI1640 培地にて培養をした。

B-3-1-2 細胞からの DNA の抽出

上記各培養細胞を遠心分離によって集め、培地を除いた後 proteinaseK 溶液にて処理した後、通常の Phenol/chloroform 法にてゲノム DNA の抽出を行った。得られた DNA の沈殿を 70%Ethanol にて洗浄し、TE-4 バッファーに溶解させた。また一部 DNA の抽出には市販の QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) を用い、プロトコールに従って行った。

B-3-1-3 使用した SNP チップ

ヒト約 5 万 SNP サイトを網羅した GeneChip® Human Mapping 50K Array Xba にて解析を行った。アレイには、フォ

トリソグラフィ製造法により同時合成された、配列の明らかな 25 bp オリゴヌクレオチドプローブが、1 種類あたり 100 万コピー以上から構成される。各 SNP には、1 組が 4 つのプローブからなる 5 組のプローブが対応し、各組は、4 対のパーフェクトマッチプローブとミスマッチプローブから成り、位置をずらして SNP1 個あたりの 25 bp オリゴヌクレオチド合計 40 種類により判定を行う。

B-3-1-4 ゲノム DNA の制限酵素による消化とラベル化

細胞より抽出したゲノム DNA 250ng を制限酵素 XbaI で消化し、XbaI シークエンスと続く PCR 増幅用のプライマー配列を持つアダプターをライゲーションした。その後、アダプター配列を認識する一種類のプライマーを用いて、アダプターを付加した DNA フラグメントを増幅した。この際、用いた PCR 条件は 250~1,000 bp のサイズのフラグメントを優先的に増幅するよう最適化した。次に、増幅した DNA を断片化し、ビオチン標識した後、GeneChip Mapping 50K Array にハイブリダイズさせた。

B-3-1-5 チップへのハイブリと、染色、洗浄およびシグナル検出

チップへのハイブリダイゼーションは、48 度にて一晩行い、ハイブリ溶液を除いた後、発現解析用チップと同様に Affymetrix 社の GeneChip 用フルイディックステーションにて洗浄および、ストレプトアビジン・フィコエリスリンによる蛍光ラベル化を行った後、GeneChip 専用スキャナーにてスキャンを行い、チップの蛍光イメージを取得

した。

B-3-1-6 SNP の判定と LOH 解析

SNP の判定には、各 40 プローブずつのシグナル強度データを、専用の解析ソフトである GeneChip DNA Analysis Software (GDAS) ソフトウェアで解析した。SNP 判定を元に、GDAS により LOH 領域が判定された。

B-3-1-7 ゲノムコピー数の解析

ゲノムコピー数の解析のため、フリーウェアとして利用可能であった、dCHIP (Lin et al., 2004) および CNAG (Nannya et al., 2005) というソフトウェアを使用した。

B-3-1-8 間期核の FISH 解析

これまでの検討で染色体異常が認められた hMSC のロット 5F1650 について、保存していた各種継代数の凍結細胞を用いてスライド標本作製し、以下に示した FISH プローブを用いて、染色体の数的異常の出現時期に関する検討を行った。

- Vysis CEP8 Spectrum Green
- Vysis CEP17 Spectrum Orange

各セントロメア FISH プローブを、プロトコールに従ってハイブリ後、DAPI にて核を染色し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

B-3-1-9 GeneChip データの解析

h MSC の培養過程における遺伝子発現変化を Affymetrix 社の GeneChip Human U133 アレイを用いて解析したデータをもとに、データ解析ソフトウェア GeneSpring (Agilent)を用いて、染色体異常の確認され

たロット特異的な遺伝子発現に関して解析を行った。

B-3-1-10 染色体異常および小核試験

h MSC 細胞の染色体解析のため、細胞を分裂中期にて停止させるため Nocodazol (SIGMA)を DMSO に溶解し、各種濃度で培地中に添加し、1、3、6、24、48 時間作用させたときの効果を調べた。小核試験の観察用には、細胞をトリプシンにて剥離後、0.075M KCl 溶液にて 37°C 18 分低張処理をした後、カルノア溶液にて 5 分間固定後、遠心分離にて細胞を回収し、カルノア溶液にて 10 分間最固定した後、細胞を少量のカルノア溶液に懸濁させ、濡れたキムタオルの上においたガラススライド上に滴下し、エアードライ法にて標本作製した。

B-3-2 細胞のプロテオーム解析

B-3-2-1 サンプルの前処理

(タンパク質の抽出)

1.5X10⁵ 個の細胞を 50 μ l の細胞溶解液にて溶解した後、450 μ l のアセトンを加えてタンパク質を沈殿させ、30 μ l の RapiGest 溶液に溶解した。

(還元アルキル化)

タンパク溶液 30 μ l に、30 μ l の 10mM DDT を加え、60°C 30 分間反応させて還元後、室温に戻した後、60 μ l の 30mM ヨードアセトアミド溶液を加え、遮光して室温にて 30 分間反応させた。

(トリプシン消化)

還元アルキル化したサンプル溶液にそのままトリプシン溶液を 4.6 μ l (0.25 μ g/ μ l) 加え、37°C で一晩消化した。

B-3-2-2 ナノ LC

本研究にはナノ LC として、Qstar 接続用に Splitless Nano HPLC System DiNa (KYA テクノロジーズ)を、LTQ 接続用に Ultimate(Dionex)を使用した。配管には内径 50 μ m のヒューズドキャピラリーチューブを用い、C-18 逆相カラム (KYA, W-3) およびトラップカラムを使用した。移動相は A (2% アセトニトリル, 0.1% ギ酸), B(80% アセトニトリル, 0.1% ギ酸)の 2 種類の組成の溶媒を用い、A100%から B100%へのグラジエントをかけてペプチドを順次カラムより溶出させた。

B-3-2-3 質量分析装置

本研究に使用した質量分析装置は、ESI-Q/TOF 型 QSTAR-XL-PF (Applied Biosystems) および ESI-ion trap/FT 型 LTQ-Orbitrap(Thermo Fisher)であり、前述のナノ LC とオンライン接続し、LC-MS としての測定を行った。通常の測定は、ポジティブモードを使用した。ESI ナノスプレー用チップとして、KYA 社製スプレーチップを使用した。逆相カラムにてペプチドを分離後、ナノスプレーインターフェースにて質量分析装置へと導入した。この際、スプレー電圧は 1400V から 2000V の間でスプレーチップの劣化に応じて変更し、安定したスプレーを得ることを確認した。

質量分析装置の設定に関しては、基本的に以下の TOF-MS 測定条件をデフォルト値として使用した。

(Qstar)

- TOF マス質量範囲 ; 350-1400m/z
- Total Analysis Time ; 150 min
- Accumulation time ; 4 sec.

- Spray Voltage ; 1600V

(LTQ)

- TOF マス質量範囲 ; 350-2000m/z
- Total Analysis Time ; 150 min
- Accumulation time ; Normal (0.1-0.3 sec.)
- Spray Voltage ; 1700V

その他のパラメーターは、測定を行いながら最適化した。

B-3-2-4 TOF マス測定とデータ処理

QSTAR-XL による質量分析データは、基本的に付属のソフトウェアである

AnalystQS を用いて解析された。同様に LTQ-Orbitrap データは、Xcalibur を用いて解析された。QSTAR-XL にて TOF マス依存解析を行う場合には、積算時間は 4 秒と長めに設定した。LTQ-Orbitrap の場合には、FT-MS 測定と MS/MS 測定が同時に行われるため、基本的にデータ依存的 MS/MS 測定 (上位 3 親イオンを測定) を同時に行い、スキャンスピードはノーマルに設定した。この場合、シングルスキャンのフルレンジ FT-MS 測定に要する時間は約 0.02 と QSTAR に比べてかなり早い。

Raw データの解析のため、Analyst にて作成される Wiff 形式ファイルおよび Xcalibur にて生成される Raw 形式のファイルの加工のため、共通フォーマットである mzXML への変換ツールとして、Systems Biology Institute より提供されている Trans-Proteomic Pipeline (TPP) というソフトウェアを利用した。このソフトウェアにより、mzXML 形式ファイルを、さら

に LC-MS データとしての 3D グラフによる可視化を行った。また、同時に独自の定量解析ソフトとして「mzMore」と名付けたソフトウェアの開発を進めた。

B-3-2-5 データベースサーチによるタンパク質の同定

MS/MS 測定から得られたフラグメントイオンパターンより、ペプチドマスフィンガープリンティング法によるタンパク質の同定を行うための解析ソフトである MASCOT(Matrix Science)を用いて、SwissProt プロテインデータベースを検索した。MASCOT の検索パラメーターとしては LTQ 用のデフォルト値を用い、可変修飾として、メチオニンの酸化、およびシステインのカルバジドメチル化を設定した。同定の信頼性には、MASCOT のデフォルト値である、 $p < 0.05$ を用い、切断ミス許容数 1 にて検索を行った。

B-3-2-6 データ解析ソフト「mzMore」の開発

質量分析機に付随する解析用のソフトウェアはマスマスペクトルの測定という点に関しては十分な性能と機能を持っているが、測定後のデータ解析については、既存のソフトウェアでは十分でなく、データ解析用のツールが必要とされている。このような目的に開発された市販のソフトウェアはいくつか存在するが、いずれも高価である点とカスタマイズが難しいという問題から、我々は前述のフリーソフトウェアの利用とともに、独自の解析用ソフトウェアの開発を試みている。「mzMore」と名づけたこのソフトウェアシステムの開発は、協力研究

者である Suresh Thiruppathi 博士を中心に、インド RUSHMORE 社のシステムエンジニアである Ramesh Kanagapathy 氏の協力の下、進められた。

B-4 同源性評価方法の開発

B-4-1 細胞及び試薬

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) は理化学研究所バイオリソースセンター (RIKEN BRC CELL BANK) より供与された。Mesenchymal stem cell growth medium (MSCGM) は Lonza、MF-medium は東洋紡績株式会社より購入した。Peptide-N-glycosidase F (PNGase F) は、Roche から購入した。

B-4-2 細胞培養

MSC は MSCGM (基礎培地 MSCBM に Mesenchymal cell growth supplement、L-glutamine、GA-1000 を添加) で培養した ($5\% \text{CO}_2$, 37°C)。セミコンフルエントまで培養し、EDTA 添加 PBS で洗浄を行い、Trypsin-EDTA (GIBCO) により細胞を剥離した後、約 2×10^5 個ずつの細胞を播種して継代培養を行った。また、無血清培地については MF-medium (ウシ胎仔血清 (FCS)、Growth factor supplement 添加) で 24 時間培養した後、FCS を除いた MF-medium に置換して培養した。培地交換は 2 から 4 日間に 1 回の頻度で行った。回収した細胞をプロテアーゼインヒビター (protease inhibitor mix DMSO solution、Sigma) 添加 PBS で 3 回洗浄した。

B-4-3 膜画分の調製

洗浄済み MSC (1×10^7 個) をプロテアーゼインヒビター添加 0.25 M ショ糖/10 mM Tris-HCl 緩衝液 (100 μ l, pH 7.4) に懸濁させ、4°C で 30 秒間の超音波処理 (40W, 2 回) を行った。核を遠心分離 (4°C, 900 \times g, 10 分) により除去した後、細胞膜画分を超速心分離 (4°C, 100,000 \times g, 60 分) により沈殿させた。膜画分は 150 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (100 μ l, pH 7.4) に懸濁させて、超音波処理及び超速心分離を行いショ糖を除去した。得られた沈殿に残存する酢酸アンモニウムは Speed Vac. により除去した。

B-4-4 還元アルキル化タンパク質の調製

乾燥させた沈殿物を 500 μ l の 8 M グアニジン-HCl / 0.5 M Tris-HCl (pH 8.6) に溶解させた。この溶液に 20 μ l の 1 M dithiothreitol (DTT, 終末 40 mM) を加えて 65°C で 30 分間、遮光下で加熱し、タンパク質を還元した。次いで、48 μ l の 1 M モノヨード酢酸ナトリウム (終末 96 mM) を加えて室温、暗所で 40 分間反応させて、システイン残基のチオール基をカルボキシメチル化した。反応終了後、溶液を透析 (セルロースチューブ 20/32; 透過分子量, 14,000 Da; 三光純薬) により脱塩した。還元アルキル化タンパク質は凍結乾燥により回収した。

B-4-5 糖鎖の切り出し及び還元糖鎖の調製

得られた還元アルキル化タンパク質を 500 μ l の 100 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解させた後、10 unit の PNGase F を加えて、37°C で 2

日間反応させて、N-結合型糖鎖を切り出した。反応溶液に、冷エタノール (終末 70%) を加えて、-20°C で 2 時間インキュベートした後、遠心分離 (4°C, 8,000 \times g, 15 分) によりタンパク質を除去した。遊離した N-結合型糖鎖を含む上清を Speed Vac により乾燥させた後、沈殿物を 500 μ l の H₂O で再溶解させた。試料溶液中の糖鎖の回収は、グラファイトカーボン樹脂を固定相とした ENVI Carb C カートリッジ (Supelco, PA, USA) を用いて行なった。カートリッジは 1 ml の 100% アセトニトリル、50% アセトニトリル及び H₂O で、それぞれ 2 回ずつ洗浄した。試料溶液を注入して、糖鎖を樹脂に吸着させた。1 ml の H₂O で樹脂を洗浄した後、1.5 ml の 45% アセトニトリル溶液で糖鎖を溶出させた。得られた溶液の Speed Vac 及び凍結乾燥により糖鎖を回収した後、500 μ l の 0.5 M NaBH₄ 溶液を加えて、糖鎖を溶解させた後、室温で 16 時間還元した。還元糖鎖は、ENVI Carb C カートリッジを用いて再度精製した。

B-4-6 LC/MS

nanoLC は NanoFrontier nLC (日立ハイテクノロジーズ) を使用し、カラムはグラファイトカーボンカラム (0.075 \times 150mm, 5 μ) を用いた。溶離液として、2% アセトニトリルを含む 5 mM 炭酸水素アンモニウム溶液 (A 溶媒) 及び 80% アセトニトリルを含む 5 mM 炭酸水素アンモニウム溶液 (B 溶媒) を使用した。糖鎖は流速 200 nl、2:90%B 緩衝液 (60 分) のグラジエント条件で溶出した。MS 装置はナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン

源(AMR)を接続した Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR-MS, LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific) を使用し、ポジティブイオンモード及びネガティブイオンモードを測定中に切り換えながらデータを取得した。シングル MS スキャンは、FT-MS モードで、MSⁿ スキャンは IT-MS モードで行なった。キャピラリー温度は 275°C、スプレー電圧は 2.5kV、スキャン範囲は m/z 600-2,000 に設定した。MSⁿ の衝突エネルギー (コリジョンエネルギー) は 35% に設定した。一回に 5 μ l (2 $\times 10^6$ 個細胞) の試料溶液を LC/MS に注入した。

B-4-7 軟骨分化とグリコサミノグリカン (GAG) 定量

B-4-7-1 軟骨への分化誘導

D-MEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, 1:1 Mixture, Invitrogen) に ITS Liquid Media Supplement (Sigma-Aldrich) 及び Penicillin-Streptomycin-Glutamine 及び StemXVivo Chondrogenic Supplement (R&D Systems) をそれぞれの終濃度が 1% になるように添加したものを軟骨分化誘導培地として用いた。セミコンフルエントまで培養した MSC を、軟骨分化誘導培地に懸濁させた後、15 ml のコニカルチューブに 2.5×10^5 個の細胞を播種した。200 \times g で 5 分間遠心した後、インキュベーター (5% CO₂, 37°C) で 21 日間分化誘導培養した。培地交換は 2~3 日間に 1 回の頻度で行った。

B-4-7-2 軟骨細胞由来 GAG の定量

軟骨細胞により生成された GAG は、Sulfated Glycosaminoglycan Quantitation Kit (生化学工業) を用いて定量した。分化誘導後に生成された不溶性物質 (軟骨) をプロテアーゼで消化 (55°C、2 時間) した後、10 分間の煮沸処理により酵素反応停止させた。GAG を 1,9-Dimethylmethylene Blue と反応 (遮光、常温、5 分間) させた後、Microplate Spectrophotometer (SpectraMax Plus 384 Molecular Devices) を用いて、530 nm における吸光度を測定した。別に作成した硫酸化 GAG 標準原液 (サメ軟骨由来、1,000 μ g/ml) の検量線を用いて、軟骨細胞中の GAG 濃度を算出した。

B-4-8 骨分化とカルシウム定量

B-4-8-1 骨への分化誘導

骨分化誘導基礎培地は α -MEM 培地 (α -Minimum Essential Medium, Invitrogen) に 10% FCS 及び 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine を添加したものをを用いた。骨分化誘導培地は骨分化誘導基礎培地に 1% の StemXVivo Osteogenic Supplement (R&D Systems) を添加したものをを使用した。

骨分化誘導基礎培地を用いて MSC をセミコンフルエントまで培養した後、 4.2×10^3 cell/cm² の濃度で 24 ウェルマイクロプレート (IWAKI) に播種し、50~70% コンフルエントに達するまで培養した (5% CO₂, 37°C)。骨分化誘導培地に置換した後、21 日間分化誘導培養した。培地交換は 3~4 日間に 1 回の頻度で行った。

B-4-8-2 骨細胞由来カルシウムの定量

骨細胞により生成されたカルシウムは、Stanbio Total Calcium Liquicolor Kit (Stanbio Laboratory) を用いて定量した。まず、分化誘導した骨細胞を 0.5 M HCl を用いて 24 ウェルマイクロプレートから 1.5 ml チューブに移した後、4°C で 20 時間の攪拌により細胞溶解液を調製した。次に、細胞溶解液を 500×g で 2 分間遠心分離し、得られた上清中に含まれるカルシウムを Total Calcium Color Reagent 及び Total Calcium Base Reagent を用いて、室温、1 分間発色させた後、Microplate Spectrophotometer を用いて、550 nm における吸光度を測定した。骨細胞中のカルシウム濃度は、別に作成したカルシウム標準液の検量線を用いて算出した。

B-4-9 脂肪細胞分化と脂肪定量

B-4-9-1 脂肪細胞への分化誘導

脂肪分化誘導基礎培地として、10% FCS 及び 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine 添加し α -MEM 培地を用いた。脂肪分化誘導培地は脂肪誘導基礎培地に 1% の StemXVivo Adipogenic supplement (R&D Systems) を添加したものをを用いた。脂肪誘導基礎培地を用いて MSC をセミコンフルエントまで培養した後、 2.1×10^4 cell/cm² の濃度で 24 ウェルマイクロプレート (IWAKI) に播種し、100% コンフルエントに達するまで培養した (5% CO₂, 37°C)。脂肪分化誘導培地に置換した後、21 日間分化誘導培養した。培地交換は 3 ~ 4 日間に 1 回の頻度で行った。

B-4-9-2 脂肪細胞由来脂肪の定量

脂肪細胞により生成された脂肪は、Adipogenesis Assay Kit (Cayman Chemical) を用いて定量した。まず、分化誘導した脂肪細胞に固定液を添加した後、15 分間インキュベートした。反応終了後、細胞を洗浄した後、Oil Red で 20 分間染色した後、Microplate Spectrophotometer を用いて、500 nm における吸光度を測定した。

B-4-10 神経細胞分化

B-4-10-1 神経細胞への分化誘導

神経細胞分化誘導基礎培地は、15% FCS、1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine 及び 1% Sodium pyruvate を添加した Prime DMEM Low-glucose (Prime D-Minimum Essential Medium, Invitrogen) 培地を使用した。神経細胞分化誘導プレ培地は 20% FCS、1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine 及び 10 ng/ml FGF 添加 Prime DMEM Low-glucose 培地を使用した。神経細胞分化誘導培地は Prime DMEM Low-glucose 培地に 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine、20ng/ml bFGF、25 mM KCl、100 mM Putrescine、30 nM Sodium selenite、2% Dimethyl sulfoxide、100 mM Butylated hydroxyanisole、20 nM Progesterone、5 mg/ml Insulin、100 mg/ml Transferrin を添加したものをを用いた。神経細胞分化誘導基礎培地を用いて MSC をセミコンフルエントまで培養した後、 5.0×10^3 cell/cm² の濃度で 12 ウェルマイクロプレート (IWAKI) に播種した。70~80% コンフルエントに達するまで培養 (5%CO₂, 37°C) した後、神経細胞分化誘導プレ培地で 1 日