

間ブレ培養した後、神経細胞分化誘導培地で分化誘導を行った。

#### B-4-10-2 神経細胞の免疫蛍光染色

免疫蛍光染色は、神経細胞の分化マーカーとして知られている Nestin、 $\beta$ III-Tublin、MAP2 及び TrkA に対して行なった。

Nestin の検出には、一次及び二次抗体として、それぞれ Anti-Human Nestin (N1602) Rabbit IgG Affinity Purify (免疫生物研究所) 及び Goat F (ab') Fragment Anti-Rabbit IgG (H+L)-TRITC (Beckman Coulter, Inc.) を使用した。MAP2 の検出には、一次抗体として Mouse Anti-MAP2 Monoclonal Antibody (Chemicon) を、二次抗体として FITC-Monoclonal Rat Anti-Mouse IgG1 (Invitrogen) 及び Alexa Fluor 555 Goat anti-Mouse IgG1 (Molecular Probes) を用いた。 $\beta$ III-Tublin の検出には、一次抗体として Neuron specific beta III Tubulin antibody (TUJ-1) (Abcam) を、二次抗体として FITC-Rat anti-Mouse IgG2a (BD Biosciences) 及び Alexa Fluor 555 Goat anti-Mouse IgG2a (Molecular Probes) を使用した。TrkA の検出には、一次及び二次抗体として Goat IgG Anti-human TrkA Antibody (R&D Systems) 及び Rabbit anti-Goat IgG (whole molecule)-FITC を用いた。

12 ウェルマイクロプレートで分化誘導した細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定 (37°C、15min) した後、0.2% TritonX で処理した。5% BSA 溶液を用いて室温下、15 分間ブロッキングした。5% BSA 溶液で希釈した一次抗体で 37°C、2 時間インキュベートした後、5% BSA 溶液で希釈した二次

抗体で 37°C、1 時間インキュベートした。Prolong Gold Antifade Reagent with DAPI Special (Invitrogen) で封入した後、共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡 (LSM 510 Carl Zeiss) により観察した。

#### B-5 免疫学的安全性評価に関する基盤技術開発

##### B-5-1 CXCL12 発現 Ad ベクターの作製

CXCL12 発現 Ad ベクターの作製は improved in vitro ligation 法により行なった。Cytomegalovirus (CMV) プロモーターおよびイントロン A を含むシャトルプラスミドのマルチクローニングサイトにマウス CXCL12 cDNA (Invivogen 社) を挿入し pHMCMV-CXCL12 を作製した。これを I-CeuI および PI-SceI で消化し、同酵素で消化した Ad ベクタープラスミドとライゲーションすることにより、CXCL12 発現ベクタープラスミド pAd-CXCL12 を得た。作製したプラスミドを PacI で消化し、SuperFect (Qiagen 社) を用いて 293 細胞にトランスフェクションすることで CXCL12 発現 Ad ベクター Ad-CXCL12 を得た。コントロール Ad ベクターとして、ルシフェラーゼ発現 Ad ベクター Ad-Luc を用いた。Ad ベクターの増幅ならびに精製は定法に従い行なった。精製した Ad ベクターの物理化学的力価ならびに生物学的力価は Maizel らの方法に従い測定した。

##### B-5-2 マウスへの Ad ベクター投与

$5 \times 10^{11}$  VP (vector particles)/mL の

Ad-CXCL12 あるいは Ad-Luc を 8-10 週令 C57/BL6 雌マウスの尾静脈内に 100 $\mu$ l 投与した。投与 5 日後、末梢血、胸腺、脾臓、骨髄を回収し、以下の実験に用いた。血漿中 CXCL12 濃度は Quantikine ELISA キット (R&D Systems 社) を用いて測定した。

### B-5-3 フローサイトメーター

各組織の生細胞数は NucleoCounter (ChemoMetec 社) を用いて測定した。1 $\times$ 10<sup>5</sup> 個の細胞を fluorescein isothiocyanate (FITC) あるいは phycoerythrin (PE) で蛍光標識した抗体と反応させ、FACSCanto (BD Bioscience 社) にて解析した。用いた抗体は抗 IgM 抗体 (II/41)、抗 B220 抗体 (RA3-6B2)、抗 Mac-1 抗体 (M1/70)、抗 Gr-1 抗体 (RB6-8C5)、抗 CD3 抗体 (17A2)、Sca-1 抗体 (D7)、抗 c-kit 抗体 (2B8) であり、全て eBiosciences 社より入手した。

### B-5-4 *In vitro* コロニーアッセイ

Ad ベクター投与 5 日後の末梢血、脾臓、骨髄を回収し、Methocult (M3434, Stem cell technologies 社) を用いてコロニーアッセイを行った。なお、末梢血、脾臓は 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mL、骨髄は 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mL の濃度で播種した。細胞播種 14 日後、顕微鏡下でコロニーを計測した。また、B 前駆細胞 (CFU-IL7) 数の測定は Methocult M3630 を用いた。

### B-5-5 Hematoxyline-Eosin 染色

Ad ベクター投与 5 日後に脾臓を回収し、液体窒素中で凍結した。5  $\mu$ m の凍結切片を作製後、4%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液中で 4°C、15 分間固定し、ヘマトキシリンにより核を、エオシンにより細胞質を染色した。その後、顕微鏡にて標本を観察した。

### B-6 特性解析・品質管理に関する研究

#### B-6-1 試薬

TPO は、キリン・アムジェン社より提供された。VEGF は、Strathmann Biotec 社より購入した。AC133 細胞分離キットは Miltenyi Biotec から購入した。抗 CD31 抗体・フルオレッセインイソチオシアネート (FITC) あるいはフィコエリスリン (PE)、抗 CD34 抗体-FITC、抗 CD45 抗体-FITC、抗 VE cadherin(CD144) 抗体は、BD Biosciences PharMingen より購入した。抗 VEGF 受容体-2 (VEGFR-2/Flk-1/KDR) 抗体はサンタクルーズバイオテクノロジー社より、抗ヒト内皮 NO 合成酵素 (eNOS) 抗体は Cayman Chemical より購入した。フィブロネクチン (FN) あるいはIV型コラーゲンでコーティングされたプレートは、イワキ社から購入した。抗 CD14 抗体-FITC は、Dako Cytomation から購入した。RT2 Profiler PCR Array は Supper Array 社から購入した。培地は内皮細胞用基礎培地 (EBM-2)、血管内皮細胞用増殖培地 (EGM-2、2% FCS、VEGF、bFGF、EGF、R3-IGF、アスコルビン酸、ヒドロコチゾン、ヘパリン) (三光純薬) を用いた。マトリゲルは BD Biosciences 社より購入した。

### B-6-2 単核球の分離

インフォームドコンセントを得て採取された臍帯血は、東京赤十字血液センター、臍帯血バンクより提供された。献血用に採取された血液（液量不足等による規格外品）は、埼玉赤十字血液センターより提供された。

血液サンプルは、2mM の EDTA を含むリン酸緩衝食塩水（PBS）で希釈し、リンフォブレップチューブ（Axis-Shield PoC AS）（密度=1.077）に充填し、800g、18℃、20 分の遠心により、単核球を集めた。細胞を磁気ビーズで標識する場合は、分画用溶液 {2mM の EDTA、0.5% のウシ血清アルブミン（BSA）を含む PBS} で洗浄した。

### B-6-3 AC133 陽性細胞の分離

AC133 陽性細胞を分離するため、AC133 マイクロビーズ分離キットを用い抗 AC133 抗体・マイクロビーズと 4℃、30 min で反応させた。陽性細胞の分離は、Auto MACS (Milteny Biotec) を用いて行った。臍帯血と末梢血 AC133 陽性細胞は 20% 牛胎児血清 (FBS)、50 ng/ml VEGF、50 ng/ml TPO、を含む EBM-2 培地に浮遊させ培養した。FN コートディッシュは接着細胞として解析する際に、IV型コラーゲンコートディッシュはフローサイトメーターによる解析を行う際に用いた。

### B-6-4 単核球由来 early EPC の誘導

リンフォブレップチューブにより分離した単核球を EGM-2 培地に懸濁し、FN コート 6 穴プレートにおよそ  $1\sim 2 \times 10^7$  cells/well 播種した。約 1 週間培養後、プレート上に接着した細胞を early EPC とした。

Early EPC の培養上清 (Conditioned Medium : CM) を採る場合は、early EPC を非酵素的に回収し、EGM-2 培地に懸濁した後、FN コート、48 穴プレートに  $5 \times 10^4$ /well の密度で播種した。24 時間後、培地を捨て、5% FBS を含む EBM-2 を 0.3 ml/well 加え、24 時間培養した上清を回収し、0.22  $\mu$ m のフィルターでろ過し、-20℃ で保存し、以下の実験に CM として用いた。

### B-6-5 単核球由来 late EPC の誘導

臍帯血から調製した単核球を培地 (Endothelial Basal Medium-2, 2% FCS, VEGF, bFGF, EGF, R3-IGF1, ascorbic acid, heparin) に懸濁し、FN コート 6 穴プレートに播種した。播種細胞数は、 $1 \times 10^7$  cells/well 程度とした。通常は、培養開始 1 日後に、培地を除いて PBS(-) で 1 回 wash し、新鮮培地を添加した。その後、培養開始 7 日目までは毎日培地交換を行い、以降は 1 週間に 2 回、培地を交換した。

### B-6-6 フローサイトメーターによる解析

Early EPC は分画用溶液 (2 mM EDTA、0.5% BSA を含む PBS) で非酵素的に、late EPC はトリプシンを用いて細胞を剥離・回収し、洗浄後、抗 CD31 抗体-FITC あるいは PE、抗 CD14 抗体-FITC、抗 CD45 抗体-FITC で免疫染色した。抗 VE cadherin (CD144) 抗体、抗 VEGF 受容体-2 抗体の場合、二次抗体として抗マウス IgG-FITC 抗体を用いた。なお、すべての細胞は 7-amino actinomycin D (7-AAD) で染色し、陽性の細胞は死細胞として、解析の際に排除した。

### B-6-7 接着細胞の免疫染色

Early EPC は 1 週間培養後、late EPC および HUVEC はコンフルエントになったところで実験に用いた。細胞を PBS で 3 回洗浄、1% ホルムアルデヒド・PBS で固定後、更に冷却したエタノール (-20°C) で固定して細胞膜を透過させ、さらに PBS で 3 回洗浄した。1% BSA-PBS を用いて細胞を 4°C、1 時間、ブロッキングした。次に 4°C、1 時間、それぞれの第 1 抗体でインキュベートした。PBS で洗った後に、4°C、1 時間、抗ウサギ IgG 抗体・Rhodamin でインキュベートした。PBS で洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 (Zeiss) を用いて解析した。

### B-6-8 マトリゲルを用いた管腔形成アッセイ

マトリゲルを氷上で融解し、24 穴プレートに 300  $\mu$ l/well 添加した。37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーター中に 30 分静置しゲル化させた。ヒト冠状動脈内皮細胞 (HCAEC) をトリプシンを用いて回収した。方法(4)で回収した CM を 5 倍、10 倍に希釈した 5% FBS-EBM-2 に懸濁し、 $1 \times 10^5$  cells/0.5 ml/well になるようゲル化したマトリゲル上に播種した。37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーターで一晩培養した。形成された管腔の写真有位相差顕微鏡 Axiovert2000 で撮影し、顕微鏡画像解析ソフト AxioVision を用いて管腔の長さを定量化した。

### B-6-9 HCAEC の遊走における early EPC-CM の影響

48 穴の改良型ボイデンチャンバーを用い

て遊走実験を行った。下室には 5 倍、10 倍に希釈した CM を含む 5% FBS-EBM-2 を 30  $\mu$ l 加えた。上室には、5% FBS-EBM-2 に懸濁した HCAEC を  $2 \times 10^4$  cells/well/50  $\mu$ l 加えた。上室と下室を挟むメンブランフィルターはポアサイズが 8  $\mu$ m のポリカーボネートフィルターを用いた。改良型ボイデンチャンバーを 37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーターに 3 時間静置した。メンブランフィルターをはずし、上室側に付いた細胞は拭き取り、遊走してきた下室側の細胞を固定・染色し、顕微鏡で数えた。

### B-6-10 Early EPC および late EPC の特性指標の探索

臍帯血より分離した単核球を EGM-2 培地を用いて FN 上で培養し、early EPC および late EPC を分化誘導した。Early EPC、late EPC および HUVEC の RNA を、RNeasy (QIAGEN) を用いて回収した。Early EPC の RNA サンプルは、TURBO DNase (Ambion) で処理後、再度 RNeasy で精製した。調製した RNA の品質を Agilent RNA 6000 Nano Assay を用いたキャピラリー電気泳動により確認した。RT<sup>2</sup> First strand kit を用いて、逆転写反応により 1 本鎖 cDNA を調製し、血管新生に関連する遺伝子 84 種類について、定量的 PCR (RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays; Super Array) により発現プロファイルを解析した。Real-Time PCR の装置は ABI7000 を用いた。β アクチンを内部標準として、各遺伝子について β アクチンとの Ct 値の差を求め、 $2^{-\Delta Ct}$  を各遺伝子と β アクチンの発現量の比とした。

### B-6-11 細胞の浸潤活性

マトリゲルに対する各種細胞の浸潤を BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber を使い、BD Biosciences 社の示すプロトコールに従って行った。メンブランフィルターのパアサイズは 8  $\mu\text{m}$  を用いた。マトリゲルをコートしたインサートに 2% FBS-EBM-2 に懸濁した early EPC、late EPC、HUVEC および HCAEC を  $2.5 \times 10^4$  cells/0.5 ml/インサートになるように播種した。下室には 10 ng/ml VEGF を含む 2% FBS-EBM-2 を 0.75 ml/well 加え、37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーターにチャンバーを 23 時間静置した。浸潤した細胞は固定・染色し、光顕下で計数した。

### B-6-12 統計解析

統計解析ソフト Prism 4 を用いて検定を行った。p<0.05 の場合に、有意差があると判断した。各々の実験は 3 回繰り返し、代表的なデータを示した。

### B-6-13 MMP-1 の Western blot 解析

培養上清 10  $\mu\text{L}$  に 6 $\times$ sample buffer を 2  $\mu\text{L}$  を加え、100°C で 5 分間インキュベートした後、氷上に置いた。各サンプルを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離後、PVDF 膜に転写した。SDS-PAGE における泳動は 30 mA で行い、転写は 10% Methanol を含む 10 mM CAPS バッファー (pH11.0) を用いて 0.3 A で 2 時間行った。ブロッキングは 1% BSA を含む TBST (0.1% Tween 20 含有 Tris-buffered saline) 中で、室温で 1~2 時間行った。1 次抗体 (Anti-hMMP-1, purified IgG: F74、第一ファインケミカル) 反応は、

抗体を 5000 倍に希釈して 4 °C で overnight、さらに室温で 1 時間行った。2 次抗体 (ECL™ Anti-mouse IgG : GE Healthcare) 反応は、抗体を 10,000 倍希釈し室温で 1~2 時間行った。化学発光検出試薬は ECL™ Plus Western Blotting Detection System(GE) を使い、イメージアナライザー LAS-3000 (FUJI FILM) で測定した。

### B-6-14 MMP-1 活性測定用培養上清の回収

細胞をコラーゲンでコーティングされた 6 穴プレート (early EPC のみ FN コーティング) に  $1 \times 10^5$  cells/well の密度で播種して培養した。1 日後、PBS(-) で洗浄してから 0.1% FCS を含む EBM-2 に培地交換し、24 時間後に上清を回収して 10,000 rpm で 15 分間、4°C で遠心した。遠心後の上清を conditioned medium として回収した。浮遊細胞である単核球は、0.1% FCS を含む EBM-2 に懸濁して、fibronectin でコーティングされた 6 well プレートに播種した。播種 24 時間後に上清を回収し、遠心した上清を conditioned medium として回収した。Conditioned medium は数日中に実験に使う場合は -20°C で、それ以外の場合は -80°C で保存した。

### B-6-15 MMP-1 の活性測定

各細胞の培養上清中に含まれる MMP-1 の活性を Sensolyte™ 490 MMP-1 assay kit (ANA Spec) を用いて測定した。本法では、MMP による切断配列の前後に FRET (Fluorescence resonance energy transfer) を起こす蛍光色素が結合したペプチドを基質として用い、MMP によるペプチド切断後

に FRET が解消されて生じる蛍光強度を測定する。まず、細胞の培養上清を 1 mM の 4-aminophenylmercuric acetate (APMA) 共存下で 37°C、3 時間インキュベートして MMP-1 を活性化した。次に、assay buffer を添加し、遮光下で室温、1 時間インキュベートした。Stop solution を入れて反応を止め、蛍光プレートリーダー-FLEX station (Molecular Devices) で蛍光強度を測定した。

#### B-6-16 MMP 類タンパク質量の定量

Late EPC および関連する細胞の培養上清中に含まれる MMP 類や TIMP 類の量を調べるため、Ray Quantibody™ Human MMP Array 1 (Ray Biotech) を用いた定量解析を行った。本 array は、ガラススライド上に固定した抗体で試料中の被験タンパク質を捕捉し、更にビオチン標識した二次抗体とストレプトアビジン標識 Alexa Fluor 555 を用いて、被験タンパク質を定量的に蛍光検出するものである。実験に用いた試料は 100  $\mu$ L/well である。蛍光用スキャナーは Gene® Pix (Filgen) を用いた。

#### B-7 細胞特性・品質解析技術の開発

##### B-7-1 ムチン型糖鎖を含む糖ペプチド分画の調製

コンフルエント状態の細胞 (1~5 x 10<sup>7</sup> cells) を回収し、2%プロテアーゼインヒビターを含む 5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0、0.5 ml) 中氷冷下で懸濁し 20 分放置した。次に 2%TritonX-100 を含む同緩衝液 (0.5 ml) を加えて懸濁し、ガラスホモジナイザーで約 7 分間ホモジナイズし、8000rpm で遠心分離後の上清を回収し減圧乾固し、細胞由来可溶性分画とした。可溶性分画に 80 %エタ

ノールを加え 15000 rpm で遠心分離した。上清を除き沈殿に 80 %エタノール (1 ml) を加えて 2 回洗浄し沈殿を回収した。得られた沈殿にアセトンを加え 15000 rpm で遠心分離し、沈殿を凍結乾燥し細胞由来タンパク質とした。凍結乾燥物を 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0、0.2 ml) に懸濁し、プロナーゼ (50  $\mu$ g) を加え 37 °C で 24 時間反応した。反応後、反応液を沸騰水浴中で 10 分間煮沸し、遠心分離後の上清に 2M NaBH<sub>4</sub> (500  $\mu$ L) を加え、室温で 30 分間インキュベートした。反応液に氷酢酸を注意深く滴下し限外ろ過フィルター (MWCO 5000) を用いて脱塩し、フィルター上部をムチン型糖ペプチド分画として回収した。

##### B-7-2 高速糖鎖自動切断装置によるムチン型糖鎖の遊離

装置は当研究室で開発した O-結合型糖鎖自動切り離し装置 (AutoGlycoCutter-2 (AGC-2): 島津製作所) を使用した。糖鎖切り離しのためのアルカリ溶液として 0.5 M 水酸化リチウム水溶液を用い、糖鎖遊離反応温度は 45°C とし、反応時間は 3 分で行った。細胞から得られた糖ペプチド分画の水溶液 (50  $\mu$ l) を AGC-2 に導入し、得られたムチン型糖鎖を回収し凍結乾燥した。

##### B-7-3 ムチン型糖鎖の 2-アミノ安息香酸 (2AA) による蛍光標識

上記操作により遊離されたムチン型糖鎖の凍結乾燥物に 2AA および NaBH<sub>3</sub>CN をそれぞれ 3%の濃度で含む 2%ホウ酸/4%酢酸ナトリウム/メタノール溶液 (100  $\mu$ l) を加えて 80°C で 1 時間加温した。反応後 SephadexLH-20 のゲルろ過クロマトグラフィーにより最初に溶出される蛍光性画分を回収し細胞由来の糖鎖とした。

#### B-7-4 セロトニンアフィニティークロマトグラフィーによるムチン型糖鎖の分画

ポンプには JASCO PU-980 型、検出器には JASCO FP-920 型蛍光検出器を使用し、流速 0.5 mL/min で分析した。カラムは LA-Serotonin (Japan Oil Mills, 4.6 x 150 mm) を用い、カラム温度は 25 °C とした。検出は励起波長(Ex) 350 nm、蛍光波長(Em) 425 nm により行った。移動相の溶液 A には水、溶液 B には 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液を用いた。グラジエント条件は、試料注入後 2 分間溶出液 B 5% とし、溶出液 B が 37 分後に 75% となるように直線グラジエント溶出を行い、その後 10 分間で溶出液 B が 100% となるようにした。

#### B-7-5 順相分配型 HPLC によるムチン型糖鎖の分析

カラムには Shodex NH2P-50 4E (4.6 mm x 250 mm, 昭和電工) を用い、溶離液 A を 2% CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>CN、溶離液 B に 5% CH<sub>3</sub>COOH, 3% Triethylamine/H<sub>2</sub>O を用いた。溶出は 70% の溶離液 A によりあらかじめ平衡化した後、80 分で溶離液 B が 95% となるように直線グラジエント溶出を行った。また、検出は励起波長 350 nm、蛍光波長 425 nm で蛍光検出した。分離された糖鎖は Voyager DE-PRO (Applied Biosystems 製) を用い、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) を試料マトリックスとしてリニア/ネガティブイオンモードにより測定した。

#### B-8 iPS 細胞の同一性・同等性評価/特性解析法の開発

##### B-8-1 細胞の同一性・同等性評価法の開発

細胞の培養、増幅、加工過程を通じての細胞の恒常性や、目的とする細胞への分化誘導による特性の付与を、細胞表面糖鎖の

恒常性・変化から適切に捉えるために、網羅的な全細胞糖鎖の解析法を開発する。同時に、開発した糖鎖プロファイリング技術を用いて細胞特性解析、がん化予測法開発、製造工程由来不純物検出法開発等への応用に関する研究を行う。

##### B-8-2 特性解析法の開発

細胞治療薬は有効性・安全性に関わる品質特性の評価法開発の一環として、ヒト血管内皮前駆細胞やヒト間葉系幹細胞、さらには iPS 細胞由来機能性細胞を用いて、その品質を評価するための特性指標を探索する。DNA マイクロアレイ、プロテインアレイ等を利用した細胞特性指標探索法としての有用性を評価する。開発した小型マイクロアレイを含め特性指標探索法の標準化に必要な要素を明らかにし、指針等への反映を目指す。

#### <倫理面への配慮>

動物実験は、動物実験指針等を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施した。また、ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、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使用するとともに、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適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で研究を実施した。

## C. 結果

### C-1 感染性因子の安全性評価技術開発

#### C-1-1 HBV の濃縮・高感度検出法の開発

現在、HBV 感染症のスクリーニング検査には HBV 表面抗原 (HBsAg) 検査、HBc 抗体検査を実施し適合を確認した上で、より高感度な核酸増幅検査 (以下 NAT) によるスクリーニング検査が実施されている。しかし、近年、HBs 抗原陰性にもかかわらず血中や組織中に HBV-DNA が認められる、いわゆるオカルト HBV (低濃度 HBV キャリアー) 感染の存在が大きな問題となってきた。従来、HBs 抗原が陰性で、HBs 抗体、HBc 抗体の両者あるいはいずれか一方が陽性である場合は、HBV の一過性感染経過後または HBV キャリアーからの離脱後 (HBV 感染の既往) の状態と考えられていた。しかし近年、このような状態にある人の肝臓の中には、ごく微量の HBV が持続感染し、血液中にもごく微量の HBV が存在し続けており、移植により感染する可能性があることが明らかになってきた。今回、このようなごく微量の HBV を検出するための方法として、2 価金属イオン存在下でウイルスと凝集体を形成するポリ・L-リジン (PLL) を表面にコートした磁気ビーズ (PLL 磁気ビーズ) によりウイルスを濃縮後に検出する方法を検討した。

まず、種々の濃度の HBV を種々の濃度で含む溶液を調製し、PLL 磁気ビーズによる HBV DNA の濃縮効率を検討した。(Table I-1)。HBV の濃度が  $10^3$  copies/ml から  $10^6$  copies/ml において、HBV は PLL 磁気ビーズで濃縮されるが、HBV のコピー数が増加するにつれて、濃縮効率は 0.76 から 0.49 に低下した。

PLL 磁気ビーズによる HBsAg の濃縮を Fig.I-1 に示す。高タイターの試料 (s/n 比 266.03) では 1000 倍希釈すると検出限界以下 (s/n 比 1.16) となったが、この希釈液を PLL 磁気ビーズにより 8 倍濃縮すると HBsAg の検出が陽性 (s/n 比 3.24) となった。低濃度の試料 (s/n 比 11.91) でも同様に、10 希釈により検出限界以下 (s/n 比 1.69) となった試料を PLL 磁気ビーズにより 8 倍濃縮すると検出陽性 (s/n 比 4.36) となった。さらに、陰性の試料 (s/n 比 1.66) について PLL 磁気ビーズにより 8 倍濃縮したところ、検出可能 (s/n 比 3.49) となった。濃縮の効率は高濃度試料で約 0.64、低濃度試料で約 0.59 であった。

次に、HBV の PLL 磁気ビーズ濃縮に及ぼす HBs 抗体の影響を検討した (Table I-2)。PLL 磁気ビーズによる HBV DNA の 10 倍濃縮の際、抗体を添加しないと濃縮効率が 0.72 であるのに対し、抗 HBs 抗体を添加することにより濃縮効率が 1 倍以上に改善された。しかし、抗 HBs 抗体を添加すると、HBsAg の検出は阻害された (data not shown)。

HBV の PLL 磁気ビーズ濃縮時に他のウイルスが共存する場合の影響を検討した (Table I-3)。HBV を正常血漿、HCV 陽性血漿 ( $10^6$  copies/ml)、またはパルボウイルス B19 陽性血漿 (RHA (receptor-mediated haemagglutination assay) 法で  $2^{11}$ ) で希釈後、PLL 磁気ビーズで濃縮を行ったところ、濃縮効率に差は認められなかった。なお、パルボ B19 はエンベローブがないため PLL 磁気ビーズでは濃縮されないが、HCV RNA は PLL 磁気ビーズにより定量的に濃縮することが可能である。



以上の結果から、ごく微量の HBV を含む血漿から PLL 磁気ビーズを用いることにより HBV を濃縮して HBV DNA 及び HBsAg を高感度に検出することが可能であること、濃縮の際、HBV 表面抗原に対する抗体を共存させるとより濃縮効率が向上すること、HCV やパルボウイルス B19 が共存しても HBV の濃縮が可能であることが示された。

なお本濃縮法のドナースクリーニング法としての有用性を明らかにするために、HBcAb 陽性、HBsAg 陰性の血液を用いて検証した。その結果、これまでの NAT 検査で HBV DNA が陰性であった 61 検体中 25 検体で、PLL 磁気ビーズ濃縮により HBV-DNA が新たに検出されること、また、HBsAg 陰性の 78 検体中 29 検体で PLL 磁気ビーズ濃縮により HBsAg が新たに検出されることを確認した。以上の結果より、PLL 磁気ビーズ濃縮がごく低濃度の HBV の濃縮・高感度検出に有用であり、オカルト HBV 感染血液でも検出可能であることが実証された。

#### C-1-2 パルボウイルス B19 の感染系の確立

パルボウイルス B19 は網状赤血球細胞でのみ増幅すると言われている。そこで、エリスロポエチン (EPO) 存在下に赤芽球系細胞株 Ku812 細胞を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。その結果、EPO 依存的に増幅する 2 つの細胞株 Ku812-E2 及び Ku812-E4 が得られた。これらの細胞は、クローニングに 1 ヶ月を要し、さらに 2 ヶ月間の培養を行っても EPO 依存的な増幅能は維持されていた。また、網状赤血球細胞様の特性は培養後沈殿させた細胞がヘモグロ

ピンを含んでいることから確認された (Fig.I-2, I-3)。

パルボウイルス B19 を Ku812-E2 細胞及び Ku812-E4 細胞に感染させたところ、両細胞とも細胞変性は起こらなかった。そこで、持続感染している可能性が考えられたために、経時的に細胞を含む培養液から DNA を抽出し、パルボウイルス B19 のコピー数の変化を測定した。その結果、両細胞とも培養の時間経過と共にパルボウイルス B19 のコピー数が増加することが明らかになった。また、Ku812-E4 細胞よりも Ku812-E2 細胞の方がより高いコピー数の増加が認められたことから、以後の検討では Ku812-E2 細胞を用いた (Fig.I-4)。また、培養上清と細胞から DNA を抽出し、コピー数の比較を行ったところ、培養初期では細胞上清に含まれるウイルス量は細胞とそれほど大きな差はなかった (細胞を除去することによりコピー数は 1/3 ほどに減少した)。細胞あたりの感染ウイルス量が多いほど上清中のウイルス量は増加するものの、細胞との比率はむしろ減少していき、上清に見出されたのは細胞に含まれるウイルス量の約 1/5 量程度であった (Fig.I-4, Day2 と Day2 sup)。

以上の結果から、Ku812-E2 細胞を用いたパルボウイルス B19 感染系を確立することができたが、本感染系では細胞変性作用 (CPE) は認められず、持続感染系であることが明らかとなった。また、細胞の増幅と共にパルボウイルス B19 も増幅し、一部が細胞上清に放出されるものと考えられた。また、細胞内に含まれるパルボウイルス B19 の感染性が維持されているか確認するために、パルボウイルス B19 を感染させた

細胞を沈殿させ、低張処理により細胞を破碎し、その上清を再び Ku812-E2 細胞に感染させた。その結果、それほど高い感染性ではないが、再び持続感染させることが可能であった。

次に、Ku812-E2 細胞でのパルボウイルス B19 の増幅に最も適した条件を検討した。Fig.I-5 に示すように、無血清培地と FCS 含有培地ではウイルスの増幅に大きく差が認められた。ASF104 無血清培地では細胞そのものの増幅が高くないが、GIT 無血清培地では細胞の増幅は血清存在下と同等であったことより、血清培地でのパルボウイルス B19 の高い増幅作用は別の要因が考えられた。以降の検討は 10%FCS 含有培地を用いて行った。

次に、パルボウイルス B19 感染における抗パルボウイルス B19 抗体の影響について検討した。Fig.I-6 に示すように、抗体存在下に感染させた場合には、パルボウイルス B19 の持続感染は殆ど認められなかった。このことは、十分な抗パルボウイルス抗体が存在するのであればパルボウイルス B19 の感染性はそれほど高くないと考えられる。

## C-2 *in vitro* 造腫瘍性評価技術開発

### C-2-1 コロニー形成

細胞の軟寒天培地中でのコロニー形成能について、顕微鏡下の観察をしたところ、Hela 細胞は、培養期間とともにコロニーを形成し、コロニーサイズも大きくなっていくのに対し、軟寒天培地中の hMSC (lot C) は、明らかなコロニーは認められなかった。Fig. II-7 に CBA-130 用軟寒天培地中での細胞のコロニー形成の様子を示す。CBA-140 用軟寒天培地中での細胞のコロニー形成に

についても、同様の結果であった（データ省略）。

### C-2-2 用量作用関係

1 ウェルあたりに播種した細胞数と、10 日、20 日もしくは 30 日後に測定した蛍光シグナルまたは化学発光シグナルとの間の用量作用関係を Fig. II-8 に示す。CBA-130 (生細胞回収なし、蛍光検出)、CBA-140 (生細胞回収あり、蛍光検出)、CBA-140+CellTiter Glo (生細胞回収あり、化学発光検出)の 3 種のアッセイ系のいずれにおいても、Hela 細胞における検出シグナルは、hMSC (lot C)における検出シグナルと比較し、低用量で発現し、かつ培養期間に依存する増加が顕著であることが認められた。

### C-2-3 検出限界

3 種のアッセイ系の検出限界を Fig. II-9 に示す。3 つのアッセイ系に共通して、Hela 細胞の検出限界が hMSC (lot C)の検出限界よりも 10 倍以上低く、また Hela 細胞の検出限界は培養期間依存的な低下が認められた。また、蛍光検出系に比べ、化学発光検出系の方が検出限界が顕著に低いことが明らかとなった。

### C-2-4 感度

3 種のアッセイ系の感度を Fig. II-10 に示す。3 つのアッセイ系に共通して、Hela 細胞の検出限界が hMSC (lot C)の検出限界よりも 10 倍以上高く、また Hela 細胞の感度は培養期間依存的な上昇が認められた。また、蛍光検出系に比べて化学発光検出系の方が、検出限界が顕著に高いことが明らか

となった。

### C-2-5 選択性

hMSC (lot C)と比較した場合の、3種のアッセイ系のHela細胞への選択性をFig. II-11(top)に示す。3つのアッセイ系に共通して、Hela細胞への選択性は培養期間依存的に上昇することが認められた。また、蛍光検出系に比べ、化学発光検出系の方がHela細胞への選択性が低い傾向にあった。10日間の培養では蛍光検出系を用いた場合は100倍以上の選択性は得られず、化学発光検出系を用いた場合は20日間以下の培養では100倍以上の選択性が得られなかった。

### C-2-6 精度

3種のアッセイ系について、Hela細胞とhMSC (lot C)とを峻別する精度(併行精度)を検討した結果、培養期間に係らず、CBA-130(生細胞回収なし、蛍光検出)のアッセイ系が他の2種のアッセイ系と比較して低いP値(=高い精度)を示した。(Fig. II-11(bottom))

### C-2-7 hMSCの製造ロット(ドナー)による差異

Hela細胞は樹立された細胞株であるが、hMSCはロットを構成し、各ロットは単一ドナー由来である。したがって、上で観察されたアッセイ形の特性は、製造ロット(またはドナー)に特異的である可能性が考えられる。そこで、アッセイ系の特性が、hMSCの製造ロットもしくはドナーに依存しているかを検討する目的で、上で検討したロット(C)に加えて2つのロット(B, H)を用いた場合のアッセイ系の特性を評価した。

hMSC (lot C)と比較した場合の、3種のアッセイ系のHela細胞への選択性は、培養期間依存的に上昇することが認められたため、培養期間はロットCを用いて検討した中で、の最長期間である30日間を選択した。その結果、Fig. II-12に示すとおり、ロットBおよびHにおいても、検出限界および感度については3種のアッセイ系のうちCBA-140+CellTiter Glo(生細胞回収あり、化学発光検出)が優れており、一方、選択性および精度はCBA-130(生細胞回収なし、蛍光検出)が優れていることが明らかとなった。

## C-3 染色体安定性等の評価技術開発

### C-3-1 細胞の染色体安定性に関する検討

#### C-3-1-1 異なるhMSCロットにおけるhMSC細胞の遺伝子安定性に関する検討

これまでのSNPチップ解析の結果、異常を示したhMSC株ロット#4F1560(図III-1)以外の3ロットおよびヒト骨格筋芽細胞(HSMM)に関しては、ゲノムコピー数の異常は検出されていなかった。今回さらに新たな2ロットについても同様に検討したところ、異常は検出されず、染色体変化は上記ロット#4F1560にのみ認められた。(表III-1)

#### C-3-1-2 セントロメア特異的FISHプローブを用いた異常獲得ロットにおける染色体異常蓄積の経時変化に関する検討

異常が確認されたロット#4F1560においては、CGHおよびマルチカラーFISH解析より7番染色体のコピー数増加が認められたが、7番染色体セントロメアプローブを用いたFISH解析により、セントロメア数

は正常であることがわかった。一方、同じくコピー数異常の認められた17番染色体特異的セントロメアプローブを用いたFISH解析から、シグナル数の増加が認められ、異常が観察された。この結果より、2本増加していた7番染色体には、17番染色体由来のセントロメアが存在する可能性が示唆されるとともに、17番染色体のセントロメアをプローブとして異常細胞を検出できることがわかった。そこで、正常対照として8番染色体特異的セントロメアプローブを用い、17番染色体セントロメアプローブによる2重FISHを、凍結保存してあった同一ロットの各種継代数の細胞について行った。間期核におけるそれぞれのシグナル数を元に、異常細胞数の解析を行った。得られた異常細胞の例を図III-2に示す。それぞれ100個ずつの間期核細胞を使って解析した結果、表III-2に示すようなシグナル数が観察された。8番染色体セントロメア2シグナル以下の細胞に関し、3つ以上の17番セントロメアシグナルが得られた細胞および8番3および4シグナルに対し、5以上の17番シグナルを持つ細胞を異常細胞として判定し、その出現頻度を調べた結果、12継代で17%であった異常頻度が、15、17、および21継代と培養が進むにつれて、それぞれ34%、45%、53%と増加し、24継代では97%とほぼすべてに異常が見られた。このことから、比較的培養初期から異常細胞が存在し、21継代付近で急激に異常細胞の割合が増加したことが示唆された。これは、細胞の増殖曲線の記録にも反映されており、図III-3に示すとおり、異常のあった#4F1560では、この付近において増殖曲線の傾きが急になっていた。このロットにおいては、

比較的長期培養が可能であり、増殖性を獲得した細胞が不死化した可能性も考えられた。そこで、さらに培養を続けたところ、30継代以上増殖を続けたが、34継代を超えたところではほぼ増殖をしなくなり、不死化は起こっていないことがわかった。(図III-4)

### C-3-1-3 染色体異常が観察されたhMSCロットにおける遺伝子発現変化の解析

CGHアレイによって異常が観察されたhMSCのロット#4F1560に関しては、増殖優位性のある細胞が、継代とともそのポピュレーションを拡大し、培養系全体に広がっていったことがわかった。即ち、染色体変化が細胞に増殖性を獲得させたわけであるが、その増殖性の原因となった変化は何であったのだろうか？染色体変化からその謎に迫るアプローチも考えられるが、すでに我々の研究グループでは、本異常ロットを含めた複数のhMSCロットに関して、培養に伴う遺伝子発現変化をGeneChipを用いて解析したデータがあり、これを使って、遺伝子発現変化という視点から、増殖性獲得のメカニズムに迫ることを考えた。

遺伝子発現データの詳細に関しては、すでに公共データベースに登録されており、以下のサイトにて情報を得ることができる。これまでの研究では、主に培養に伴う遺伝子発現変化という観点から解析が行われたが、今回は、異常が認められたロットに着目し、そこで特徴的に起こっている遺伝子発現変化を他の正常ロットと比較することにより検討した。データ解析には、必要に応じてソフトウェアとしてGeneSpring (Agilent Technologies) を使用した。

まず、異常ロットを含むhMSC6ロット

に対し、異なる継代数の細胞に関する計 53 チップデータを、単純にすべての遺伝子を用いてクラスタリング解析した結果を図 III-5 に示す。ロットを問わず、20 継代を超える長期培養後の細胞における発現パターンは、一群のクラスターを形成し、培養に伴う共通した変化が示唆された。その中で、異常のあったロット#4F1560 のデータに関しては、他のロットと分離したクラスターを形成し、染色体変化を反映した、特徴的な遺伝子発現変化が存在する可能性が示唆された。(図 III-6)

そこで、この特徴的な変化をもたらす遺伝子群を調べるため、このロットにおいて他のロットと異なる発現変化を示す遺伝子の抽出を GeneSpring を用いて行った。検索条件としては、28 継代の 4F1560 の 1 ロットにおいて、他のロットにおける 20 継代以上の遺伝子発現と比較して 5 倍以上の変化を示す遺伝子をフィルタリングし、このうち、データの信頼性を考慮し、半数以上で遺伝子発現量が 100 以下の遺伝子は除いたところ、合計 49 遺伝子が選択された。これら遺伝子の発現パターンを、他の 20 継代以上の長期培養 4F1560 ロットのデータで確認したところ、図 III-7 に示したようにいずれの遺伝子も選択に使ったサンプル(4F1560#28)と同様に特徴的な変化を示した。正常ロットと比べて異常ロットで発現が高めの遺伝子が 21、低めの遺伝子が 28、そして、これらのパターンは、4F1560 ロットにおける 28 日と 21 日のデータに差があるかどうかで、二つのパターンに分けられ、発現が上がった群では、他と少し異なるパターンをとるものが 1 遺伝子あった。それぞれの群の中では、各遺伝子の発現の変化

は非常に一致していた。これら遺伝子群が、どのように細胞の増殖性および染色体異常とかかわっているのかは、今後の検討課題である。

#### C-3-1-4 染色体解析

CGH 解析では、ゲノムワイドに異常を検出可能であるという利点がある反面、全体ポピュレーションの平均として解析を行うという特徴から、個々の細胞およびマイナーなポピュレーションにおける異常は検出できないという短所がある。増殖形質を獲得した細胞は、たとえ最初は 1 細胞でも、すでに観察された異常ロットのように培養系に拡大し、癌化の危険性をはらむ事となる。こうした異常細胞を早期に見つけるためには、1 細胞レベルで異常を観察できる試験が必要とされる。古典的ではあるが、染色体解析試験は、個々の細胞レベルでの染色体異常を検出可能であり、培地等の培養環境の安全性を含めた細胞の品質評価が可能となる。一般に、間葉系幹細胞等の正常細胞は分裂速度が遅いため、染色体解析に必要となる分裂中期像を十分な数確保することが難しい。そこで、染色体解析に向け、分裂中期細胞の集積法に関する基礎的検討を行った。まず、一般的には Colcemid を用いて分裂期の標本を作製する(処理時間 2~6 時間)が、hMSC はダブリングタイムが長いと、処理時間も長くしなければいけない。

そこで、G2、M 期で細胞周期を止め、長時間処理できる Nocodazol を用いて予備実験を行った。Nocodazol の処理時間および処理濃度を振って、細胞への影響を検討とした結果を表 III-3 にまとめた。この結果より、

長時間処理しても細胞が死なない濃度として、 $0.1\mu\text{M}$  で処理する事にした。

hMSC ロット 4F 1560、継代数#6 および #26 の細胞を用い、 $1.2\sim 1.5\times 10^5$  cells / 5ml in 6cm シャーレにて 24 時間前培養し、細胞が接着しているのを確認して、Nocodazol 終濃度  $0.1\mu\text{M}$  を処理した。そして、48 時間後に細胞を回収して染色体標本を作製、ギムザ染色して観察した。

その結果、以下の細胞数の分裂中期像が得られた。

#6 全体を観察したときに 20 個程度のマフェーズが観察された

#26 全体を観察したときに 18 個程度のマフェーズが観察された

株化細胞等に比べると分裂中期像の頻度は低かったが、解析可能な数を確保できた。FISH 法などに用いる場合には、この数でも十分であると考えられる。

しかし、染色体異常の観察のためには、さらに分裂中期像の集積が必要となるため、間期核にて染色体異常が検出可能な、簡便な試験法としての小核試験に注目し、hMSC 細胞を用いた予備検討を行った。

サイトカラシン B を用いない方法にて、小核試験観察用スライド標本を作成し、アクリジンオレンジ染色をした後、蛍光顕微鏡にて、小核の自然発生頻度を調べた。結果を表 III-4 に結果をまとめた。スライドあたり 500 細胞、合計 1000 細胞を観察した時の小核を持つ細胞の頻度は、継代数 6 の細胞で 19 個、継代数 26 の細胞で 13 個であった。このロットは染色体異常が認められたものであるが、継代数の増加に伴う小核発生頻度の増加は認められなかった。

## C-3-2 細胞のプロテオーム解析

### C-3-2-1 質量分析装置の性能に関する検討

LC-MS を用いたプロテオーム解析系の確立において重要な要素を担う質量分析装置の性能に関して評価を行うため、細胞より抽出した総タンパクを用いて、ショットガンプロテオーム解析を行い、複数の機器の特性を比較した。

まず HL60 細胞をモデルに用い、サンプルの前処理、LC 分離の条件などを検討した。Qstar-XL を用いた検討より、比較的高感度な測定が可能であることがわかり、初期のサンプル量として必要な細胞数は、 $10^5$  個程度であることがわかった。そこで、 $1.5\times 10^5$  個の細胞を  $50\mu\text{l}$  の細胞溶解液にて溶解した後、アセトンを加えてタンパク質を沈殿させ、トリプシン消化のため RapiGest 溶液に溶解した。このステップにおいて、質量分析においてペプチドのイオン化の妨害となるイオン性の低分子化合物を除去できる。次に、たんぱく質の還元アルキル化を行うため、DTT を加え還元後、ヨードアセトアミド溶液を加えアルキル化し、S-S 結合を遊離させ、遮光して室温にて 30 分間反応させた。トリプシン溶液を加え、 $37^\circ\text{C}$  で一晩消化し、分析用サンプルとした。

一回の LC-MS 分析には  $500\text{ng}$  相当量のペプチドをインジェクションした（数マイクロリットルの最終溶液）。ナノ LC の分離条件としては、C18 逆送カラム ( $150\mu\text{mID}\times 50\text{mm}$ ) を用い、毎分  $300\text{nl}$  の流速にて、150 分間のグラジエント (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)) プログラムにて行った。

質量分析装置にて検出されるペプチドの全体像をつかむためには既存の測定ソフト

ウェアでは不十分であったため、可視化ツールとして利用可能なフリーソフトウェアである Pep3D (TPP ソフトウェアに搭載される) を用いて、2次元電気泳動に用いられるような 2D-density プロットを行った。この際、Pep3D による処理には、質量分析装置から得られる生データを直接用いることができないため、同じく TPP ソフトに含まれる変換機能を用いて、Qstar の場合には Wiff 形式ファイルを、LTQ の場合には RAW 形式のファイルを共通フォーマットである m/z XML 形式に変換した。同じ、HL60 細胞由来総タンパクのトリプシン消化サンプルを用い、同じ LC 分離条件にて 2つのマシンで測定を行った結果を可視化した 3D プロットを図 III-8 に示す。

グラフにおいて横軸は LC のリテンションタイムを、縦軸は質量数 ( $m/z$ ) の値を 350-1600 の範囲にて表示した。スポットの濃さが質量分析計にて検出されたシグナル強度を表し、Qstar では 5000、LTQ では 100 万を最高レンジとした。質量 ( $m/z$ ) 差 0.5 以下のアイソトープピークを伴うペプチド由来のピーク (大半がそうである) が無数に観察された。C18 逆送カラムによるリテンションタイムが遅いほど質量数の大きなペプチドが溶出される様子がよくわかるが、Qstar に比べて LTQ の方が  $m/z$  が 1000 を超える比較的大きなペプチドも検出されていることがわかる。シグナル強度のレンジからもわかるように、LTQ の方がペプチドシグナル検出の感度は高く、(1 スキャンあたりの積算時間も後者のほうが短いのでその差はさらに大きい) より多くのペプチドシグナルが検出可能であることがわかった。また、実際のスペクトルを比較し

ても、その強度とともに解像度も LTQ の方が高く、ピーク幅の小さいシャープなイオンピークとして観察された。以上の結果から、複雑な細胞由来の総タンパクのプロテオーム解析には、高感度かつ高解像度である LTQ-Orbitrap の利用が望ましいことが明らかとなった。

次に、実際の hMSC 細胞のプロテオーム解析を行うため、18 継代の 4F1560 ロットの凍結保存細胞より、プロテオーム解析用試料を調整し、LTQ-Orbitrap を用いて測定を行った。Pep3D によるプロテオーム像を図 III-9 に示すが、HL60 同様に良好な分離ができ、数千におよぶペプチドシグナルが得られた。この際、LTQ-Orbitrap では、MS 測定と平行して、データ依存的な MS/MS 測定が可能であるため、FT による親マススキャンより得られた上位 3 ペプチドを自動的にリニアイオントラップにて MS/MS 測定を行い、ペプチドマスマ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試みた。装置より得られ RAW データを、データベース検索ソフトウェアである MASCOT を用いて SwissProt データベースにて検索したところ、MASCOT における標準的な信頼値  $p < 0.05$  にて同定されたタンパク質の総数は 764 にのぼった。これは一次元分離による LC-MS/MS 測定においては、最高レベルの同定数であると推察される。もちろんこの中には擬陽性のデータも含まれると考えられるが、FT-MS 測定により Pep3D グラフ上にて観察可能な大部分のペプチドが MS/MS 測定されていないことから、この同定数は LC の分離条件 (2次元分離を含め) や測定条件を検討することによりさらに増加できるはずである。また、マ

一カー検索においては、MS/MS 測定がされなくても、親マスの強度すなわち Pep3D グラフのスポット強度の比較から発現変化の見られるペプチドを選択可能である。現状では、目視によりその比較を行わなければいけないが、我々はこのステップの自動化のため、後述のオリジナルソフトウェアの開発を行っている。

表 III-5 に同定された hMSC 由来のタンパク質のリストを示した。リストは信頼性の高い順に並んでいるので、一般的には上位にあるタンパクほど発現量の高いタンパクであると考えられる。上位には actin や tubulin など細胞骨格や heat shock protein などのハウスキーピングタンパクが見られるが、膜タンパクや、核内タンパクおよびシグナル伝達にかかわるような分子も散見する。特に注目されるのは、細胞膜上の表面抗原である各種 CD 抗原が多種同定されている点である。表 III-6 に検出、同定された CD 抗原の種類および間葉系幹細胞での表面マーカーとして利用されている CD 抗原をリストアップした。プロテオーム解析により同定された CD 抗原の総数は 18 にのぼり、すでに間葉系幹細胞の表面マーカーとして用いられている CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD166 が含まれていた。ポジティブなマーカーとしては、CD105 のみが同定されていなかった。一方で、陰性マーカーである CD14, CD34, CD45 はいずれも同定されなかった。CD 抗原については、特異交代を用いたフローサイトメーターによる解析が一般的であるが、プロテオーム解析により抗体を使わなくてもそれらを網羅的に解析可能であり、細胞のキャラクターリゼーションに有用であることが示唆され

た。プロテオーム解析では特異抗体が入手不可能な抗原に対してもその存在を確認できるという利点があり、今後の応用が期待できる。

#### C-4 同等性評価方法の開発

##### C-4-1 MSC 細胞の同等性評価指標の探索—培養条件が異なる MSC の糖鎖プロファイリング

これまでに我々は、FCS 添加培地と無血清培地を用いて培養したヒト前骨髄性白血病細胞 (HL60-RG) では、糖鎖プロファイルが異なり、一方に特異的な糖鎖が存在することを見出している。そこで、MSC の同等性評価指標となる糖鎖を探索する目的で、10% FCS 添加培地及び無血清培地で培養した MSC の糖鎖プロファイリングを実施した。

##### C-4-1-1 10% FCS 添加培地で培養した MSC 由来 N-結合型糖鎖のプロファイリング

はじめに、10% FCS 添加培地で培養した MSC から N-結合型糖鎖を遊離させ、LC/MS による糖鎖プロファイリングを行った。Fig. IV-1A は、ポジティブイオンモードのシングル MS スキャン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. IV-1B-1E に、それぞれ高マンノース、パウチマンノース、混成型、及び複合型 2 本鎖糖鎖の分布、並びにプロトン化分子の精密質量及び MS/MS ~ MS/MS/MS/MS によって得られたフラグメントイオンから推定された糖鎖構造を示す。

約 25~29 分付近 (ピーク 1~7) に検出された糖鎖は、高マンノース型糖鎖 M9、M8、M7(1, 2)、M6、M9+Hex 及び M5



(Hex<sub>9-5</sub>HexNAc<sub>2</sub>(M5-9) 及び M9 + Hexose (Hex))と帰属された(Fig. IV-1B)。高マンノース型糖鎖の中で、結合の比率の高い糖鎖は M8 (ピーク 2) 及び M9 (ピーク 3) であった。また、M7 には 24.9 分 (ピーク 1) 及び 26.1 分 (ピーク 4) に溶出される 2 種類の異性体が存在することが分かった。

側鎖を持たない低分子量糖鎖はパウチマンノース型糖鎖と呼ばれている。パウチマンノース型糖鎖として、3 分子の Hex と 2 分子の N-acetylhexsamine (GlcNAc) からなるトリマンノシルコアと思われる糖鎖 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>, ピーク 8)、deoxyhexose (dHex) が付加し、1 分子の Hex を欠いたトリマンノシルコア (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>2</sub>, ピーク 9)、及び 1 分子の dHex が付加したトリマンノシルコア (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>, ピーク 10)の 3 種類の糖鎖が確認された(Fig. IV-1C)。

NeuAc が結合した混成型糖鎖としては、4 ~6 分子の Hex、3 分子の HexNAc からなる Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>3</sub>NeuNAc<sub>1</sub> (ピーク 11)、Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>3</sub>NeuNAc<sub>1</sub> (ピーク 13) 及び Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>3</sub>NeuNAc<sub>1</sub> (ピーク 14) が確認された。一方、NeuNAc が付加していない混成型糖鎖として、(Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>3</sub>(1) (ピーク 12)、Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>3</sub> (ピーク 15) 及び Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>3</sub>(2) (ピーク 16) が帰属された(Fig. IV-1D)。

複合型 2 本鎖糖鎖では、非還元末端に 1 ~2 分子の NeuNAc が付加した糖鎖 (Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>NeuAc<sub>1</sub> 及び Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>NeuAc<sub>2</sub>(1), (2)) (ピーク 17~19)が確認された(Fig. IV-1E)。また、還元末端の HexNAc に dHex が付加したシアリル糖鎖 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>NeuAc<sub>1</sub>(1),

(2) 及び dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>NeuAc<sub>2</sub>(1), (2)) (ピーク 20, 22-24) も帰属された。一方で NeuAc 及び dHex のどちらも付加していない糖鎖 (Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>, ピーク 21) の存在も確認された。

複合型 3 及び 4 本鎖糖鎖の構造は、ネガティブイオンモードで測定したスペクトルから推定した。Fig. IV-2A, 2B 及び 2C は、それぞれネガティブイオンモードで得られた TIC、3 本鎖糖鎖及び 4 本鎖糖鎖の分布である。非還元末端に 1~3 分子の NeuNAc が付加した 3 本鎖糖鎖として、Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuAc<sub>1</sub>(1-2)、Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuAc<sub>2</sub>(1-2) 及び Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuAc<sub>3</sub>が確認された。また、NeuNAc が付加していない 3 本鎖糖鎖として、Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>、さらに、還元末端の HexNAc に dHex が付加した糖鎖として (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuNAc<sub>1</sub>(1-2)、dHex<sub>1</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuNAc<sub>2</sub>(1-2)及び dHex<sub>1</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuNAc<sub>3</sub>) (ピーク 30-34)が帰属された。

確認された 4 本鎖糖鎖 (ピーク 35-40) は、いずれも還元末端 HexNAc に dHex が付加していることが示唆された。また非還元末端には、0~4 分子の NeuNAc が付加していることも明らかとなった (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>6</sub>NeuAc<sub>0-4</sub>)。

我々は先に、FCS を添加した培地で HL-60RG を培養すると、NeuAc の約 0.1% が NeuGc に置換されることを報告している。そこで、FCS 添加培地で培養した MSC に NeuGc 付加糖鎖が存在するかどうかを明らかにするため、NeuGc 付加糖鎖を探したところ、25.6 分及び 24.7 分 (ピーク 41 及び 42) に 1 分子の NeuGc が付加した 2 本鎖糖

鎖 (Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>NeuGc<sub>1</sub>) 及び 1 分子ずつの NeuAc 及び NeuGc が付加した 2 本鎖糖鎖 (Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>NeuAc<sub>1</sub>NeuGc<sub>1</sub>) (Fig. IV-3A)、及び 1 分子の NeuGc が付加した 3 本鎖糖鎖 (Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuNAc<sub>2</sub>NeuNGc<sub>1</sub>) が存在することが明らかとなった (Fig. IV-3B)。以上のように、MSC を FCS 添加培地で培養すると NeuAc の一部が NeuGc に置換されることが示唆された。

#### C-4-1-2 無血清培地で培養した MSC 由来 N-結合型糖鎖のプロファイリング

次に、無血清培地で培養した MSC の糖鎖プロファイリングを行なった。Fig. IV-4A はポジティブイオンモードにより得られた TIC で、糖鎖全体の分布を示している。Fig. IV-4B は、高マンノース型糖鎖及び M9 + Hex の分布を示している (ピーク 1'・7')。FCS 添加培地で培養した MSC の糖鎖プロファイル (Fig. IV-1B) と比べて、大きな違いはみられなかった。

Fig. IV-4C はパウチマンノース型糖鎖の分布を示している。27.3、28.0 及び 30.2 分 (ピーク 8'・10') の糖鎖は、それぞれ Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>、dHex<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>2</sub> 及び dHex<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub> と帰属された。FCS 添加培地で培養した MSC の糖鎖プロファイル (Fig. IV-1C) と比較すると、dHex<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub> (ピーク 10') の割合が僅かに高いことが明らかになった。

混成型糖鎖としては、ピーク 11'・15' に Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>3</sub>(1)、Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>3</sub>NeuNAc<sub>1</sub>、Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>3</sub>NeuNAc<sub>1</sub>、Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>3</sub>NeuNAc<sub>1</sub> 及び Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>3</sub> が検出された (Fig. IV-4D)

FCS 添加培地で培養した MSC では、2 種類の Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>3</sub> が検出されたが、無血清培地で培養した MSC からは、一方の Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>3</sub>(ピーク 12') の存在しか確認できなかった。

Fig. IV-4E は、複合型 2 本鎖糖鎖の分布を示している。検出された糖鎖は、Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>NeuAc<sub>2</sub>(1・2)(ピーク 17', 22')、Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>NeuAc<sub>1</sub> (ピーク 18')、dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>NeuAc<sub>1</sub>(1, 2)(ピーク 20', 23')、Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub> (ピーク 21') 及び dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>NeuAc<sub>2</sub> (ピーク 24') であった。FCS 添加培地で培養した MSC の糖鎖プロファイル (Fig. IV-1E) と比較すると、モノシリアル 2 本鎖糖鎖 (Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>NeuNAc<sub>1</sub>(ピーク 18')) の比率が相対的に低下していることが分かった。

Fig. IV-5A はネガティブイオンモードで得られた TIC である。3 本鎖糖鎖及び 4 本鎖糖鎖の分布をそれぞれ Fig. IV-5B 及び Fig. IV-5C に示す。3 本鎖糖鎖と帰属された糖鎖は、Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuNAc<sub>1</sub>(1, 2)(ピーク 25', 29')、Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuNAc<sub>2</sub>(ピーク 26')、Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuNAc<sub>3</sub>(ピーク 27')、Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>(ピーク 28')、dHex<sub>1</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuNAc<sub>2</sub>(1, 2, 3)(ピーク 30', 33', 34')、dHex<sub>1</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuNAc<sub>3</sub>(ピーク 31') 及び dHex<sub>1</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuNAc<sub>1</sub>(2)(ピーク 32') であった。FCS 添加培地で培養した場合と比べて、トリシリアル 3 本鎖糖鎖 (Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuAc<sub>3</sub>) が著しく減少することが明らかとなった (Fig. IV-2B 及び Fig. IV-5B)。これに対して、主な 4 本鎖糖鎖は、dHex<sub>1</sub>Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>6</sub>NeuNAc<sub>1</sub>(1, 2)(ピーク 35', 40')、

dHex<sub>1</sub>Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>6</sub>NeuNAc<sub>3</sub>(ピーク 36')、dHex<sub>1</sub>Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>6</sub>NeuNAc<sub>2</sub>(ピーク 37)、dHex<sub>1</sub>Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>6</sub>NeuNAc<sub>4</sub>(ピーク 38')及び dHex<sub>1</sub>Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>6</sub>(ピーク 40')と、FCS 添加培地で培養した MSC と同じであり、結合比率にも顕著な差はみられなかった (Fig. IV-2C 及び IV-5C)。

以上のように、無血清培地及び FCS 添加培地のどちらで培養しても、MSC の主要な糖鎖の構造に差は見られなかった。しかし、一部の糖鎖の比率が変化することが明らかになったので、次に、すべての糖鎖に占める各糖鎖の割合(%)をピーク面積から算出し、両者を比較した (Fig. IV-6)。

その結果、FCS 添加培地及び無血清培地のどちらを用いた場合でも、M8 及び M9 が全体の約 3 割を占めており、両糖鎖は培地変更にかかわらず MSC の主要糖鎖であることがわかった。その他の高マンノース型糖鎖は、無血清培地を使用すると、M9 + Hex (Hex<sub>10</sub>HexNAc<sub>2</sub>) の割合が約 8 倍に増加することが示唆された。

パウチマンノース型糖鎖を比べると、無血清培地で培養した MSC では、dHex が付加した糖鎖 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>2</sub> 及び dHex<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>) が 1.5~2.0 倍に増加していることが明らかになった。

混成型糖鎖においては、FCS 添加培地で培養した細胞では複数の糖鎖が認められるのに対して、無血清培地で培養することによって、多様性がなくなり、ほぼ NeuAc 付加糖鎖 (Hex<sub>5-6</sub>HexNAc<sub>3</sub>NeuNAc<sub>1</sub>) になることが明らかとなった。

さらに大きな差が、複合型糖鎖に認められた。FCS 添加培地で培養した MSC の糖

鎖の、13% はモノシアリル 2 本鎖糖鎖 (Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>NeuAc<sub>1</sub> (ピーク 18)) であったが、無血清培地で培養すると 2% にまで低下した。同様に、10% を占めていたトリシアリル 3 本鎖糖鎖 (Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuAc<sub>3</sub>, ピーク 27) も、無血清培地の使用によって、1%と大幅に減少することが明らかになった。その他の複合型糖鎖においても、FCS 添加培地で培養した MSC に結合していたジシアリル 2 本及び 3 本鎖糖鎖 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>NeuAc<sub>1</sub>(1,2) (ピーク 20, 20', 23 及び 23') 及び dHex<sub>1</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuAc<sub>2</sub> (ピーク 30, 30') が約 20% 程度にまで低下していることが確認された。

このように、FCS 添加培地で培養した MSC と無血清培地で培養した MSC の糖鎖分布には大きな差があり、特に、ある種のシアリル 2 本鎖及び 3 本鎖糖鎖が、同等性を評価する指標となり得ることが示唆された。

#### C-4-2 MSC の分化能保持予測指標の探索のための基礎的研究

MSC の分化能 (軟骨、骨、脂肪及び神経細胞) 予測指標を探索するにあたって、はじめに、MSC の分化を定性的・定量的に評価する方法を確立しておく必要がある。そこで初年度は、軟骨、骨、及び脂肪細胞への分化を形態学的に評価する方法及び特異的マーカーを用いて定量的に評価する方法について検討した。また、確立された分化誘導方法がない神経細胞については、形態学観察及び分子マーカーを用いた解析を行う

ことにより、文献で報告されている分化誘導方法が、本研究目的に合致しているかどうかの評価を行った。

#### C-4-2-1 軟骨、骨、及び脂肪細胞への分化を形態学的に評価する方法及び特異的マーカーを用いた定量的評価法の検討

Fig. IV-7A-7D は、それぞれ分化誘導前の MSC、軟骨細胞誘導後に形成された不溶性凝集塊軟骨、骨に分化誘導後、及び脂肪細胞に分化誘導後の顕微鏡写真である。MSC を軟骨細胞へ分化誘導すると、2 日目から細胞は丸みを帯び始め、分化誘導後 20 日後になると球状の凝集塊（軟骨）が形成された (Fig. IV-7B)。骨細胞への分化誘導では、14 日目からミネラルの沈着が観察され、21 日目には、細胞の約 70% にミネラルの沈着がみられた (Fig. IV-7C)。脂肪細胞への分化では、誘導開始 7 日目から脂肪滴が観察され始め、21 日目にはほぼ全ての細胞で脂肪滴の蓄積が観察された (Fig. IV-7D)。次に、これら軟骨、骨及び脂肪細胞への分化を定量的に評価する方法について検討した。

#### C-4-2-1-1 グリコサミノグリカン定量による軟骨細胞分化能評価法の検討

軟骨細胞は、コンドロイチン硫酸等のグリコサミノグリカン(GAG)を多量に生合成するので、GAG を定量することによって、軟骨細胞への分化を定量的に評価法できると考えた。しかし、MSC を軟骨細胞に誘導すると不溶性の軟骨が形成され、均一な試料溶液を調製することが困難であった。そこでプロテアーゼにより軟骨を消化した後、GAG を定量する方法を検討した。

$1.40 \times 10^3$ 、 $2.80 \times 10^3$ 、 $5.60 \times 10^3$ 、 $1.12$

$\times 10^4$  及び  $2.24 \times 10^4$  個の MSC を 21 日間分化誘導後、プロテアーゼで処理し、市販の Sulfated Glycosaminoglycan Quantification キットを用いて GAG 量を測定した。細胞数と GAG 生成量をプロットした結果、両者間に良好な相関性 ( $R^2=0.9781$ ) が確認できたことから (Fig. IV-8)、GAG 定量法を軟骨細胞分化能評価法として利用できることが確認された。

#### C-4-2-1-2 カルシウムの定量による骨細胞分化能評価法の検討

骨細胞分化能をカルシウム生成量により評価する方法を検討した。 $1.85 \times 10^3$ 、 $3.70 \times 10^3$ 、 $1.11 \times 10^4$ 、及び  $1.48 \times 10^4$  個の MSC を 24 ウェルマイクロプレートにそれぞれ播種し、分化誘導後 21 日目の生成カルシウム量を Stanobio Total Calcium LiquiColor kit を用いて測定した。その結果、細胞量と生成カルシウム量に良好な相関性 ( $R^2=0.9153$ ) がみられたことから、カルシウムの定量は、骨細胞分化能評価法として利用可能であることが明らかとなった (Fig. IV-9A)。Fig. IV-9B は誘導培養後の細胞の顕微鏡写真である。播種した細胞の増加に伴いミネラル沈着量の増加が観察され、定量結果と一致することが示された。

#### C-4-2-1-3 脂肪の定量による脂肪細胞分化能評価法の検討

脂肪定量による脂肪細胞分化能評価法を検証するために  $9.30 \times 10^3$ 、 $1.48 \times 10^4$ 、 $4.00 \times 10^4$ 、 $5.55 \times 10^4$  及び  $7.40 \times 10^4$  個の MSC を 24 ウェルマイクロプレートにそれぞれ播種した後、誘導培養後 21 日目の脂