

脂肪量を Adipogenesis Assay Kit を用いて測定した。Fig. IV-10A に示すように細胞量と蓄積脂肪量の高に高い相関性 ($R^2=0.9911$) が確認され、本定量法を用いて脂肪細胞分化能を評価できることが確認された。また播種した細胞の増加に伴い脂肪量の増加が認められた(Fig. IV-10B)。

以上のように、GAG、カルシウム及び脂肪を定量することにより、それぞれ MSC の軟骨、骨及び脂肪細胞への分化能を定量的に評価できることが確認できたことから、これらの方法の応用として、5~7 継代した MSC を用いて、継代回数増加に伴う軟骨、骨及び脂肪細胞分化能の変化を解析した。

C-4-2-1-4 継代数の異なる MSC の軟骨、骨及び脂肪細胞分化能の測定

はじめに、5~7 継代培養した R36 株 MSC (R36P5(+), R36P6(+)) 及び R36P7(+)) を用いて、軟骨分化能を比較した。Fig. IV-11A に示すように、分化誘導後 21 日目の R36P5(+), R36P6(+)) 及び R36P7(+)) の GAG 生成量は、それぞれ $1.20 \pm 0.11 \mu\text{g}$ 、 $0.95 \pm 0.23 \mu\text{g}$ 、及び $1.13 \pm 0.20 \mu\text{g}$ であり、各継代数の MSC の軟骨分化能に差異は認められなかった。

次に、同じ細胞株の骨細胞分化誘導後 21 日目のカルシウム生成量を測定したところ、それぞれ $61.00 \pm 2.86 \mu\text{g}$ 、 $43.93 \pm 5.73 \mu\text{g}$ 、 $15.55 \pm 1.28 \mu\text{g}$ であり、減少していることが分かった(Fig. IV-11B)。この結果は、継代培養回数の増加により MSC の骨分化能が低下することを示唆していると思われる。

さらに、同細胞株の脂肪細胞分化能を比較するために、分化誘導後 21 日目の脂肪生

成量を求めた。その結果、oil red 染色による吸光度 (O.D. 500 nm) はそれぞれ 2.19 ± 0.08 、 2.49 ± 0.07 、 3.01 ± 0.09 であり、継代培養回数の増加により MSC の脂肪分化能は僅かに増加する傾向があることが分かった(Fig. IV-11C)。

以上のように、来年度の分化能予測指標探索に向けて、MSC の軟骨、骨、及び脂肪細胞分化を定量的に評価する系を確立することができた。

C-4-2-2 神経細胞への分化誘導法の評価

MSC の神経分化については、様々な分化誘導方法が報告されているが、未だ多くの問題が残されており、分化誘導法は確立されていないと言ってよい。J.A. Jeong らは、ジメチルスルホキシド(DMSO)及びブチルヒドロキシアニソールを用いることより、MSC が速やかに神経細胞に誘導され、 β III-Tubulin、TrkA、GFAP 及び CNPase 等のニューロン及びグリア細胞特異的のマーカを発現することを報告している (2004, *Regeneration and Transplantation*)。本研究では、その神経分化誘導法が、分化能予測指標の探索に利用できるかどうかを評価した。

Fig. IV-12 は、J.A. Jeong らの方法により分化誘導させた細胞の形態変化を示したものである。神経分化誘導基礎培地で培養した細胞と(Fig. IV-12A)、プレ培地播種後 1 日目の細胞には差が認められなかったが(Fig. IV-12B)、神経分化誘導培地播種後 2 日目には、球状の細胞質、長い樹状突起、及び突起の先に見られる扇状末端等の神経細胞に特徴的な形態を示す細胞が現れ始め、誘導後 4 日目には約 50% の細胞が神経細胞

に分化していることが示唆された (Fig. IV-18D・18F)。同時に、細胞が分化するタイミングには不均一性があることや、分化誘導開始 5 日目以降死細胞が増加し、10 日後には殆どの細胞が死滅することが明らかとなった。以上のことから、Jeong らの方法では、分化誘導後 3・4 日目が最も神経細胞の観察に適していることが示唆された。

次に、免疫蛍光染色法により神経細胞のマーカートンパク質の発現を確認した。Fig. IV-13 は、Nestin 及び β III-Tublin の抗体を用いて二重染色した細胞の顕微鏡写真である。神経幹細胞のマーカであり、神経分化初期の細胞質と細胞核に発現することが知られている Nestin は、神経分化初期に高発現し、分化が進むにつれて減少することが確認された。一方、ニューロン突起中の微小管構成タンパク質で、成熟神経細胞のマーカとして知られている β III-Tublin には、誘導日数が経つにつれて樹状突起の部分が明瞭に染色される傾向が見られた。これらのことから、誘導後 4 日目前後で成熟した神経細胞に分化していることが示唆された。さらに成熟神経細胞の別のマーカとして知られるチロシンキナーゼレセプター A (TrkA) についてに検討した結果、誘導後 4 日目には TrkA が細胞表層に高発現していることが明らかとなった (Fig. IV-14)。以上ののように、本分化誘導法により得られた神経細胞は、形態学的特徴、及び特異的マーカを用いた免疫蛍光染色法により神経分化を評価できることから、神経分化能予測指標の探索に適していることが示唆された。

C-5 免疫学的安全性評価に関する基盤技術開発

健全成体において造血幹細胞は骨髄ニッチに存在し、G0 期を維持している。一方、癌化学療法時や放射線照射時等負荷時には、種々のサイトカインやケモカインが産生され、幹細胞は G1 期に入ると同時に末梢に遊離されてくることが知られており、この現象は骨髄動員とよばれる。骨髄動員には G-CSF や CXCL12 等の種々のサイトカインが関与しており、これらのサイトカインの骨髄中濃度により造血幹細胞が骨髄に留まるのか、あるいは末梢に遊離するのかが決まると考えられる。

本研究では、CXCL12 を Ad ベクターを用いてマウス生体に高発現させることによって、血液細胞の分化・動態に対しどのような影響がみとめられるのかについて検討した。用いた Ad ベクターは、従来の CMV プロモーターに比べ数倍から十数倍の活性を有し、CAG プロモーターと同等以上の活性を有するイントロン A を付与した CMV プロモーターを用い、その下流に CXCL12 遺伝子を挿入した。CXCL12 発現 Ad ベクター (Ad-CXCL12) を C57BL/6 マウスに 5×10^{10} VP/mouse の濃度で静脈内投与したところ、5 日後において約 17 ng/ml の CXCL12 が血漿中にみとめられた。各組織の細胞数を測定したところ、コントロールとくらべて CXCL12 発現ベクターを投与したマウスでは、骨髄の細胞数は有意に減少するとともに、末梢血および脾臓の細胞

数は有意に増加していた (Fig. V-1)。また、胸腺の細胞数には著差がなかった。次に、骨髄・脾臓・末梢血における各系列の細胞数をフローサイトメーターを用いて測定した (Fig. V-2)。その結果、骨髄では骨髄球系細胞数および B 細胞数の著明な減少がみとめられ、代わりに末梢血においてこれらの細胞数は増加していた。したがって、Ad-CXCL12 の投与により末梢血中の CXCL12 濃度が増加し、骨髄中の種々の血液細胞が末梢に遊離してくるものと推察された。

次に、各組織における血液前駆細胞数をコロニーアッセイにより測定した。骨髄、末梢血、脾臓の各組織を用いてコロニーアッセイを行った結果、骨髄の前駆細胞は CFU-GEMM を含む調べた全ての lineage について減少していた。また、末梢血および脾臓の前駆細胞は有意に増加していた。したがって、前述した骨髄での細胞数の減少、および末梢血・脾臓での細胞数の増加は前駆細胞数の変化によるものであることが明らかとなり、骨髄を遊離した前駆細胞が末梢血を経由して脾臓に生着している可能性が示唆された (Fig. V-3)。骨髄での血液前駆細胞数の減少が認められましたので、次に、マウスの造血幹細胞を含む画分とされている Sca-1⁺c-kit⁺lin⁻ 細胞の数を測定することで、造血幹細胞数の変化を検討した。その結果、Ad-CXCL12 を投与したマウス骨髄の Sca-1⁺c-kit⁺lin⁻ 細胞数はコントロールと比較し約 1/4 にまで減少していた。したがっ

て、造血幹細胞を含む種々の血液前駆細胞が骨髄から遊離していることが明らかとなった (Fig. V-4)。

CXCL12 は生理的に B 細胞分化に必須であることが遺伝子欠損マウスの解析により明らかとなっている。そこで、次に B 細胞系列の動態について解析を行った (Fig. V-5)。Ad-CXCL12 投与後 5 日目の骨髄および脾臓における B 細胞数を調べた結果、骨髄では IgM⁺B220⁺ 成熟 B 細胞が有意に減少していた (Fig. V-5A)。一方、脾臓においては本来骨髄にしか存在しないはずの IgMB220⁺ B 前駆細胞が増加しており、CXCL12 により、プロ B、プレ B といった B 前駆細胞も骨髄から遊離し、脾臓に生着している可能性が示唆された (Fig. V-5A)。脾臓で B 前駆細胞が増加していることを、さらに確認するために、脾臓における B 前駆細胞数を、IL-7 を用いたコロニーアッセイにより測定した (Fig. V-5B)。その結果、Ad-CXCL12 を投与したマウスの脾臓では B 前駆細胞コロニーが顕著に増加しており、CXCL12 により骨髄から遊離した B 前駆細胞が脾臓に生着している可能性が示唆された。Ad-CXCL12 の投与により、脾細胞数が増大し、かつ脾臓に B 前駆細胞を含む血液前駆細胞が増加していたので、次に脾臓の構造を組織学的に観察した (Fig. V-5C)。ベクター投与後の脾臓を HE 染色にて観察した結果、コントロールとくらべて構造上は大きな差が認められず、正常であることを確認した。

今後、この現象の液生免疫におよぼす影響を検討することで、CXCL12の生理的役割をさらに解明するとともに、Adベクターを用いて他のサイトカインを発現させたときの血液細胞の動態も解析していく予定である。

C-6 特性解析・品質管理に関する研究

C-6-1 AC133陽性細胞由来 early EPC、単核球由来 early EPC、および late EPCの形態とFACSによる特性解析

Fig. VI-1にAC133陽性細胞由来 early EPC、単核球由来 early EPC、および late EPCの分化・誘導法を模式的に示した。単核球由来 early EPCはAC133陽性細胞由来 early EPCを含むヘテロな集団と考えられる。 10^8 個の単核球の中には約1%、すなわち 10^6 個程度のAC133陽性細胞が存在し、その数パーセントがAC133陽性細胞由来 early EPCとなる。AC133陽性細胞由来 early EPCはTPO刺激で増加させることができ、 10^6 個のAC133陽性細胞から約 10^5 個程度のAC133陽性細胞由来 early EPCを得ることができる。一方、 10^8 個の単核球からは、約 10^6 個の単核球由来 early EPCが得られる。

AC133陽性細胞を1週間培養した後、CD31強陽性細胞をFACSで分画し、FNコートディッシュ上で培養するとFig. VI-2a左に示すように紡錘状のearly EPCが出現した。また、単核球由来 early EPCも同様に紡錘状の形態を示した。

1週間培養後のAC133陽性細胞を抗CD45抗体-FITCで染色してフローサイトメーターで解析すると、殆どすべての細胞

が白血球共通抗原であるCD45陽性であった(Fig. VI-2b左上)。また、単核球由来 early EPCもCD45陽性であり(Fig. VI-2b左下)、両細胞はともに血球系細胞の特徴を持つと考えられた。Fig. VI-2bの中段はタイプIVコラーゲンコートプレート上で一週間培養したAC133陽性細胞を一晩FNコートプレート上に培養し、接着した細胞を解析した結果である。接着細胞は殆どCD31強陽性分画に由来する(Kanayasu-Toyoda et al., J Cell Physiol. 2003)ため、これらの細胞はAC133陽性細胞由来 early EPCである。その結果、接着細胞はCD31陽性であり、単核球由来 early EPCもCD31陽性であった。CD14の発現に関しては、単核球由来 early EPCは殆どが陽性であるのに対し、AC133陽性細胞由来 early EPCは陽性と陰性を含むヘテロな集団であった(Fig. 2b右)。血液から分離されるAC133陽性細胞は単核球画分に含まれるため、単核球由来 early EPCにはAC133陽性細胞由来 early EPCが含まれていると想定される。AC133陽性細胞由来でCD14陰性の細胞が単核球由来 early EPCで検出されていないのは、単核球由来 early EPCに含まれるCD14陰性細胞の割合が低いためであると考えられる。

これらの結果から、CD31およびCD45の発現と形態の点ではAC133陽性細胞由来 early EPCと単核球由来 early EPCはきわめて類似して特長を持つと考えられた。特性指標の探索や特性解析法の検討においても、再生医療への応用においても、細胞数の確保は重要な要素であると考え、以下の実験は単核球由来 early EPCを用いて実施した。

Fig. VI-3a に early EPC、late EPC 及びヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の位相差顕微鏡画像を示す。HUVEC は、組織由来の成熟血管内皮細胞の例として用いた。Early EPC は紡錘状を示しているが、late EPC、HUVEC では血管内皮細胞に典型的な敷石状の形態が観察された。細胞表面マーカーを FACS で解析すると、これらの細胞はいずれも CD31 陽性であった (Fig. VI-3b)。一方、CD45、CD14 の発現は early EPC では陽性であるのに対し、late EPC 及び HUVEC は陰性であった。代表的な血管内皮細胞のマーカーである KDR/VEGFR2 の発現は early EPC では弱陽性、late EPC 及び HUVEC では陰性と陽性の 2 集団が観察された。Vascular endothelial cadherin (VEcad) の発現は early EPC では弱陽性、late EPC 及び HUVEC では陽性であった。これらのことから、late EPC の細胞表面マーカー発現は組織由来血管内皮細胞である HUVEC と類似していること、early EPC の細胞表面マーカー発現は late EPC や HUVEC と異なり、血球系のマーカーを発現している細胞であることが明らかとなった。

これら 3 種の細胞を免疫染色した結果を Fig. VI-4 に示す。Fig. VI-3 で示した CD45 および CD14 発現に関する解析結果は、免疫染色でも確認された。また、early EPC、late EPC 及び HUVEC はいずれも、endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 発現陽性であった (Fig. VI-4、2 段目)。

以上の結果から、early EPC と late EPC は、血管内皮細胞マーカーである CD31、eNOS を共通して発現していること、early EPC は CD45 および CD14 陽性の血球系の

細胞であり、late EPC や HUVEC とは異なる系統の細胞であることが示された。

C-6-2 Early EPC の培養上清による冠状動脈内皮細胞 (HCAEC) 管腔形成・遊走促進

Early EPC は虚血性心疾患の細胞治療にも応用されようとしている。そこで、冠状動脈内皮細胞 (HCAEC) の管腔形成や遊走に対する early EPC 培養上清 (CM) の促進効果を検討した。Fig. VI-5a に示すように、early EPC の CM は 10 倍希釈、5 倍希釈と濃度に依存して HCAEC の管腔形成を有意に促進した。また、HCAEC の遊走も同様に CM 添加により促進された (Fig. VI-5b)。

C-6-3 Early EPC の特性指標の探索

Fig. VI-5 に示したように early EPC の培養上清には血管新生に関わる細胞応答を促進する作用があることから、early EPC の特性指標候補分子を探索するため、血管新生に関わる遺伝子 84 種類について、HUVEC あるいは late EPC を対照として、多検体同時比較 Real Time PCR により発現プロファイル解析を行った。

Fig. VI-6 は、early EPC および HUVEC について、各細胞における被験遺伝子の発現量と β アクチン遺伝子発現量の比をプロットしたものである。グラフ上に遺伝子名が示してある点は、early EPC と HUVEC で発現量に有意差の認められた遺伝子である。Early EPC は HUVEC と比較して、CXCL9、CXCL10、CXCL3、IL-8、CCL2、IL1B、TNF、VEGFA など多くのサイトカイン・ケモカイン類の遺伝子を高発現していた。その中で IL-8、CCL2 は VEGFA と同様に直接血管内皮細胞の遊走や増殖を促

進するという報告がある。従って、early EPC 自身は管腔形成をしないが、近隣の血管内皮細胞の血管新生を直接的あるいは間接的に促進する可能性が考えられる。一方、HUVECでは、LAMA5 (Laminin, alpha 5)、PECAM1 (CD31)、COL18A1 (Collagen, type XVIII, alpha 1)、ITGAV (Integrin, alpha V)、ITGB3 (Integrin, beta 3) などの細胞接着関連タンパク質の遺伝子発現が高いことが観察された。興味深いことに血管新生に重要と考えられるマトリックスメタルプロテアーゼである MMP-9 は early EPC で、MMP-2 は HUVEC で、より多く発現されていた。

一方、late EPC と HUVEC では、遺伝子発現プロファイルにほとんど差が認められなかった (Fig. VI-7)。Late EPC と比較して HUVEC では LAMA5 (Laminin, alpha 5) や ITGB3 (Integrin, beta 3) など細胞接着に関連する遺伝子の発現が高かった。また Late EPC と比較して HUVEC で発現量が高かった THBS2 (Thrombospondin 2) は、血管新生抑制因子として知られている。Fig. VI-8 に示すように、early EPC と late EPC の遺伝子発現を比較した場合、early EPC と HUVEC の比較と同様の結果が得られた。

これらの結果から、early EPC と late EPC では、遺伝子発現プロファイルが大きく異なること、late EPC は成熟した血管内皮細胞である HUVEC と類似した遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかとなった。

C-6-4 Late EPC の特性指標に関する解析

C-6-4-1 PCR array を用いた特性指標候補分子の探索

Late EPC が成熟血管内皮細胞である HUVEC と類似した遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかになったことから、late EPC を特徴づける分子を探索するため、上記の検討とは異なる血管内皮細胞機能関連の遺伝子 84 種類を対象として、late EPC 株と HUVEC における発現プロファイル比較を行った (Fig. VI-9)。Fig. VI-7 で示した血管新生関連遺伝子に関する解析結果と同様、血管内皮細胞機能関連遺伝子についても、late EPC は HUVEC と類似した遺伝子発現プロファイルを示した。しかし、一部の遺伝子の発現には差異があり、HUVEC と比較して late EPC で特に発現の高い遺伝子として matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) が見出された (Fig. VI-10)。MMP-1 の mRNA 発現量は HUVEC と比較して S3 株では 93 倍、S2-22 株では 1105 倍、2R32 株では 634 倍と late EPC で顕著に高く、MMP-1 は late EPC に特徴的に発現している分子であると考えられた。その他に、MMP-1 と比べると差は小さいが、late EPC と HUVEC で発現量に 2 倍以上差のある遺伝子として、Chemokine ligand5、Phospholipase A2 group IV C、Thrombomodulin、Fibronectin 1、Fas が見出された (Fig. VI-10)。

さらに各細胞の管腔形成能と遺伝子発現量の比較をしたところ、occludin および caspase-1 の発現量が管腔形成能と関連していることが明らかとなり、occludin および caspase-1 が管腔形成に関与する分子で

ある可能性が示唆された (Fig. VI-11)。血管内皮細胞機能関連遺伝子の他に、幹細胞関連遺伝子 84 種類についても late EPC と HUVEC で発現量を比較したが、両者で大きな差異は認められなかった。

C-6-4-2 Western blot による MMP-1 タンパク質の検出

遺伝子発現解析から、MMP-1 は late EPC の特徴的産生物質であると考えられた。このことをさらに検証するため、late EPC 調製の原材料である臍帯血単核球 (MNCs)、early EPC、組織由来成熟血管内皮細胞である HUVEC、ヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC)、及びヒト冠状動脈血管内皮細胞 (HCAEC) の培養上清中の MMP-1 を Western blot により検出した (Fig. VI-12)。その結果、late EPC の培養上清にのみ MMP-1 のバンドが検出された。他の細胞では MMP-1 が検出されず、late EPC に関連する細胞株の中で、MMP-1 の発現は late EPC に特徴的であることが明らかになった。MMP-1 は 450 アミノ酸残基からなる分子量約 52,000 の潜在型として細胞から分泌され、プロペプチドが切断されて 360 アミノ酸残基からなる分子量約 43,000 の活性型になることが知られている。Late EPC 培養上清中に検出された MMP-1 のバンドの泳動度から、late EPC 上清中に存在する MMP-1 は潜在型であると考えられた。

C-6-4-3 培養上清中 MMP-1 の活性測定

Late EPC 培養上清中では MMP-1 タンパク質が潜在型として存在していると考えられたため、上清中の MMP-1 を APMA 処理により活性型に変換し、MMP-1 の活性を確

認した。潜在型 MMP の N 末端プロペプチド部分にはシステインスイッチと呼ばれるアミノ酸配列 (PRCGVP) が存在し、この部位のシステイン残基のチオール基が酵素活性部位の Zn と配位結合することにより潜在型としての構造が保たれている。APMA を添加することにより、システイン残基と Zn の結合が解離し、自己消化によりプロペプチドが除去されて活性型 MMP-1 となる。Fig. VI-13 に示すように、late EPC 上清では、APMA 処理に依存して MMP-1 活性の上昇が検出された。これに対して、late EPC 以外の細胞では APMA 処理後も活性の上昇は認められなかった。Late EPC の上清では APMA 処理していない試料中にも基質切断活性が検出されたが、本実験に用いた基質ペプチドは、MMP-1 の他に MMP-2, 3, 8, 12, 13 の基質ともなり得ることから、late EPC は MMP-1 以外のプロテアーゼも分泌している可能性があると考えられた。

C-6-4-4 MMP 類の定量

MMP-1 と同じく MMP ファミリーに属するタンパク質の中では、MMP-2 や MMP-9 が血管新生との関連が深いとされており、分泌された MMP 類の不活性化作用を持つ調節タンパク質である TIMP 類の存在も知られている。また、Fig. VI-8 で示した遺伝子発現解析結果では、early EPC と比較して late EPC では MMP-2 の発現量が高いことが示された。そこで、late EPC および関連の細胞について、MMP 類に対する抗体が固定化されたガラススライドアレイを用い、培養上清中の MMP 類の定量解析を行った (Fig. VI-14)。その結果、late EPC 上清中

の MMP-1 の濃度は 75ng/mL (約 1.4nM) であると定量された。その他に MMP-10 が 1.8ng/mL 検出されたが、MMP-3, 8, 9 は検出限界以下であった。TIMP-1 は 27.4ng/mL (約 1nM) であった。MMP-2 に関しては、検量線が不良であり測定ができなかった。

これらの検討結果から、late EPC が分泌する MMP 類の中では、MMP-1 が主要なタンパク質であることが明らかとなった。TIMP-1 は、MMP-1 と非可逆的に結合することにより MMP-1 を不活性することが知られている。Late EPC の分泌する TIMP-1 の量は、他の成熟血管内皮細胞 (HUVEC、HMVEC、HCAEC) とほぼ同じであり、TIMP-1 の分泌量は late EPC と成熟血管内皮細胞で差がないことが明らかとなった。

以上の結果から、MMP-1 が late EPC の特徴的産生物質であることが支持された。

C-6-5 Early EPC と late EPC の浸潤活性

遺伝子発現解析の結果、early EPC において MMP-9 の遺伝子発現が高かったことから、early EPC は細胞外マトリックスの分解により周囲に浸潤する活性が高いことが考えられた。そこで、early EPC のマトリゲルに対する細胞浸潤活性を、late EPC、HUVEC、HCAEC と比較した。浸潤刺激因子としては VEGF を用いた。マトリゲルは、細胞外マトリックスタンパク質を豊富に含む Engelbreth-Holm-Swarm マウス肉腫から抽出した可溶性基底膜から成り、主成分は、ラミニン、コラーゲン IV、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、およびエンタクチン/ニドジェン 1,2 である。解析の結果、early EPC と late EPC は HUVEC、HCAEC に比べ高い浸潤活性を持つことが明らかにな

った (Fig. VI-15)。このことは early EPC と late EPC が投与局所において新生血管形成のために高効率に浸潤できる可能性を示しており、両細胞が細胞治療に適した細胞であることを示唆していると考えられる。

C-7 細胞特性・品質解析技術の開発

コアタンパク質の Ser/Thr 残基に結合する O 結合型糖鎖の解析は、アルカリ還元法により O 結合型糖鎖を遊離し、HPLC や MS により解析する方法が一般的である。しかしながらアルカリ還元法では、糖鎖の遊離に数十時間を要し、得られる糖鎖は糖アルコールとなるため高感度検出のための誘導体化が不可能であり、N 型糖鎖の解析に比べ研究は著しく遅れている。我々は O 結合型糖鎖の解析における問題点を解決するため、誘導体化が可能なヘミアセタール構造を有する O 結合型糖鎖を数分以内に得ることができる高速糖鎖自動切断装置 “AutoGlycoCutter (AGC)” を開発した。本研究では、AGC により得られた細胞中のムチン型糖鎖を蛍光標識後、セロトニンアフィニティークロマトグラフィー及び順相分配型 HPLC を用いてムチン型糖鎖のプロファイリングを行った。

最初に 4 種類の血球系癌細胞および臓器癌細胞 2 種 (PANC1、BxPC3)、大腸癌細胞 2 種 (LS174T、HCT15)、胃癌細胞 2 種 (MKN45、MKN7) について、 1×10^6 細胞当りで発現するムチン型糖鎖量を比較した。結果を Fig. VII-1 に示す。今回実験に使用した 4 種類の血球系癌細胞のムチン型糖鎖の含量は $3000 \text{ pmol}/1 \times 10^6 \text{ cell}$ であり、上皮系細胞に比べムチン型糖鎖の含量は低かった。一方、上皮系細胞 6 種のうち、LS174T、MKN45 は血球系癌細胞の 10 倍以上のムチン型糖鎖が発現し、細胞の種類によって発

現するムチン型糖鎖の含量は大きく異なることがわかった。

次に各細胞に発現するムチン型糖鎖を比較した結果を Fig. VII-2 に示す。4 種類の血球系癌細胞では、30 分前後に観察される Sialyl-T (NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc, K-1, U-1, J-1, H-4) と 72 分前後に観察される Disialyl-T (NeuAc α 2-3Gal β 1-3[NeuAc α 2-6]GalNAc, K-3, U-3, J-5, H-14) が主要なムチン型糖鎖であることがわかった (Table VII-1)。また、前骨髄性白血病細胞 (HL60) については、Sialyl-T と Disialyl-T 以外に 22 分~30 分付近および 40 分~50 分の間にムチン型糖鎖の還元末端 GalNAc の 6 位に N-acetylglucosamine が付加した Core2 構造を基本骨格とする糖鎖が観察された (Table VII-1)。

上皮系癌細胞に含まれるムチン型糖鎖のプロファイルについて比較を行った結果を Fig. VII-3 に示す。6 種類のうち膵臓癌細胞 PANC1 と BxPC3、胃癌細胞 MKN7 では血球系癌細胞に似たプロファイルを示し、Sialyl-T と Disialyl-T が主要なムチン型糖鎖であった。一方、他の癌細胞については、複雑な糖鎖プロファイルを示し、多種多様なムチン型糖鎖の存在が伺えた。次に、各癌細胞に含まれるムチン型糖鎖を詳細に解析するため、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーによりムチン型糖鎖を非還元末端のシアル酸残基数の違いに基づき分画し、各分画について MALDI-TOF MS を用いて解析した (Fig. VII-4)。膵臓癌細胞 PANC1 では、モノシアロ分画 (P-2) には Sialyl-T、ジシアロ分画 (P-4) には Disialyl-T のみが観察された (Fig. VII-5)。一方、BxPC3 ではモノシアロ糖鎖の含量が最も高く、PANC1 と同様に主要なムチン型糖鎖は Sialyl-T と Disialyl-T であったが、アシアロ

分画 (B-1)、モノシアロ分画 (B-2)、ジシアロ分画 (B-3 and -4) のいずれにも R-Gal β 1-3(R-Gal β 1-GlcNAc β 1-6)GalNAc のムチン Core2 構造を基本骨格として持つ糖鎖も観察された (Table VII-2)。

大腸癌細胞 LS174T は 6 種類の細胞の中で最も多くの種類のムチン型糖鎖を含み、全分画で計 37 種類のムチン型糖鎖を確認できた (Fig. VII-6 and Table VII-3)。LS174T 中のムチン型糖鎖は R-Gal β 1-3(R-Gal β 1-GlcNAc β 1-6)GalNAc のムチン Core2 構造を骨格とし、Gal β 1-GlcNAc β 1-6 側鎖上に LacNAc (Gal β -GlcNAc) が伸張した糖鎖が多く、さらにフコースあるいは硫酸基によって修飾を受けた糖鎖も観察された (Table VII-3)。一方、HCT15 は 6 種類の中で最もムチン型糖鎖含量が低かったが、Sialyl-T と Disialyl-T の他、Core2 構造を骨格にもつムチン型糖鎖とそれらに硫酸基が付加した糖鎖も観察された (Table VII-3)。

胃癌細胞のうち MKN45 はジシアロ糖鎖 (M-4) が全体の 60% 以上を占め、さらに他の細胞では観察されなかったトリシアロ糖鎖 (M-5) も多く観察された (Table VII-4)。MKN7 には Core2 構造を骨格にもつムチン型糖鎖も含量は低いが見られた (Fig. VII-7 and Table VII-4)。HCT15 は 6 種類の中で最もムチン型糖鎖含量が低かったが、Sialyl-T と Disialyl-T の他、Core2 構造を骨格にもつムチン型糖鎖とそれらに硫酸基が付加した糖鎖も観察された (Table VII-4)。MKN45 のジシアロ分画 (M-4) およびトリシアロ分画 (M-5) に含まれるムチン型糖鎖は LS174T と同様に LacNAc (Gal β -GlcNAc) を数残基持つポリラクタミン型糖鎖であると考えられる高分子量の糖鎖が多く観察されたが、LS174T とは異なりフコースや硫酸基で修飾された糖鎖は全く観察されな

った (Table VII-4)。また、MKN45 にはアルカリを用いた糖鎖の遊離時に生じる R-Gal 側鎖の分解物として、LacNAc を 1~6 単位含む分解物糖鎖が観察されたことから、R-Gal β 1-3(NeuAc α 1-6)GalNAc の Gal β 1-3 側鎖に 2 本の LacNAc 鎖が伸張したこれまで殆ど見出されたことのない糖鎖であると考えられた。

一方、MKN7 はモノシアロ糖鎖が全体の約 75% を占め、主要なムチン型糖鎖は Sialyl-T と Sialyl-Tn (NeuAc α 2-6GalNAc) であったが LacNAc を 1 残基もつ Core2 タイプの糖鎖も観察された (Table VII-4)。

C-8 iPS 細胞の同一性・同等性評価/特性解析法の開発

C-8-1 細胞の同一性・同等性評価法の開発

これまで分担者が報告したヒト iPS 細胞は白人由来のものであり、本邦にて iPS 細胞に立脚した将来の細胞組織加工医薬品に発展させるには、日本人由来 iPS 細胞に関する知見が必要である。そこで、6 歳から 81 歳の男女に由来する線維芽細胞を入手し、レトロウイルスベクターにより Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc を導入し、iPS 細胞を樹立した。これらの iPS 細胞のコロニーは典型的なヒト ES 細胞様の形態を示した。RT-PCR で解析した ES 細胞マーカーの発現は、ヒト ES 細胞や、私達の既報の白人由来 iPS 細胞と同様であった。本研究項目の解析対象である細胞表面抗原について、全ての日本人 iPS 細胞について、SSEA-1、SSEA-3、および TRA-1-81 などに対する抗体で染色を行ったところ、ES 細胞と同様であることが明らかとなった。継代を行っても、これらの特徴が同様に保持されるのか詳細に調査する。また、いくつかの年齢の異なる iPS 細胞について胚葉体形成

法による *in vitro* 分化能や、SCID マウス移植によるテラトーマ形成法で *in vivo* 分化能を調べたが、多能性の観点で年齢差は認められなかった。

C-8-2 特性解析法の開発

上述の日本人 iPS 細胞を用いて品質特性の評価法開発の一環として、まず DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。Cyanine 3 で標識したトータル RNA を調製し、全ヒトゲノムマイクロアレイにハイブリダイズさせ、解析データ解析をヒートマップなどにまとめた。その結果、線維芽細胞と iPS 細胞は非常に遺伝子発現が異なることが明らかとなった。一方、iPS 細胞間および iPS 細胞と ES 細胞間の違いは極めて小さかった。今後、iPS 細胞を分化誘導させて得られる様々な系譜の細胞について同様の解析を行っていき、細胞機能との相関を調べ、DNA マイクロアレイの細胞評価における有効性を検証していく予定である。

D. 考察

D-1 感染性因子の安全性評価技術開発

D-1-1 HBV の濃縮・高感度検出法の開発

HBV の濃縮・高感度検出法として、PLL 結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法を開発し、PLL 磁気ビーズを用いることにより、ごく微量の HBV を含む血漿から 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り、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。これまで数多くのウイルスをポリエチレンイミン (PEI) 磁気ビーズで濃縮後、NAT により検出することによる高感度検出法を検討し、その有用性を明らかにしてきたが、ウインドウ期の HBV ウイルスでは定量的な濃縮ができないという欠点があった。昨年、このようなウインドウ期の検体の HBV 検出の高感度を行うために、Zn イオンの添加により濃縮を行う方法を開発した。また、抗体を添加することにより、より濃縮効率を上げることが可能であることも示した。しかし、Zn イオンによる濃縮は遠心操作が必要であり、迅速性、簡便性の観点から改良が必要であった。そこで、本年は、Zn イオン存在下に PLL 磁気ビーズを用いて濃縮する方法を開発した。PLL 磁気ビーズを用いることにより、遠心操作を行わなくても磁気分離により簡便にウイルスを濃縮できることが示された。本年度は、主として低濃度 HBV キャリアへの適用を解析し、これまでの手法では HBV-DNA 陰性とされていた検体で、本法を適用することにより、効率的に濃縮可能であることを示した。次年度は、本法を用いてウインドウ期検体への適用を確認する予定である。

D-1-2 パルボウイルス B19 の感染系の確立

EPO 依存性網状赤血球細胞 Ku812-E2 細胞を樹立し、この Ku812-E2 細胞を用いてパルボウイルス B19 の *in vitro* 感染系を確立した。確立した感染系ではパルボウイルス B19 による CPE は起こらず、持続感染をした。また、細胞外へ放出されるウイルスのみならず、細胞内のウイルスも感染性を持っていることが示された。パルボウイルス B19 の感染・増幅に最適な培地は血清を含む培地であり、血清成分が増幅に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。パルボウイルス B19 はヒト同種由来細胞組織加工医薬品のガイドラインによりドナースクリーニングを行うように求められているが、従来よりパルボウイルス B19 抗体を持っているレシピエントあるいは、ドナーが抗体を持っているときに感染性にどのような影響を与えるのか論議されてきている。本研究の結果から、抗体存在下では持続感染が強く抑制されたことより、抗体によりウイルス感染価が中和された可能性が考えられた。今回の検討では高い抗体量を用いたが、今後この *in vitro* 感染系を用いてパルボウイルス B19 の抗体の影響、特にどの程度の抗体価で感染が阻害されるのかを明らかにし、パルボウイルス B19 の安全性評価の一助としたい。

D-2 *in vitro* 造腫瘍性評価技術開発

細胞組織加工医薬品等は製品内に細胞あるいは組織という極めて複雑な構造かつ「生きている」という動的特性を含むという点で、従来の医薬品等に適用されてきた品質管理の必要事項が必ずしも適用できる

とは限らない。つまり、細胞組織製品の安全性に関しては特別な配慮が必要となってくる。特に造腫瘍性試験のような生きて細胞の特性を評価する試験においては、最終製品中の細胞の状態（細胞種・生存率・保存条件等）や試験条件（培養条件・分散酵素処理条件等）のばらつきによって施設ごとに、あるいは実験者ごとに試験の特性および結果が大幅に異なる可能性が高い。したがって、絶対値として定められた規格がすべての細胞組織製品の試験法に一律に課されるのは合理的ではなく、各施設（各実験者）においてまず、試験系の特性に関するバリデーションを行い、得られた特性値に基づいて品目ごとに適切な品質管理用規格を設定する必要がある。そこでは試験法のバリデーション法の開発および標準化という新たな課題が生まれる。

細胞組織加工医薬品等の造腫瘍試験では、正常細胞中に微量に存在する造腫瘍性細胞を高感度かつ正確に検出する手法が必要となる。そこで、本研究では細胞組織加工医薬品等の造腫瘍性評価を目的とした場合の、軟寒天コロニー形成試験のバリデーションのケーススタディとして、三種の軟寒天コロニー試験法の悪性細胞と正常細胞に対する性能試験を行った。

悪性細胞の例としては、世界各国で汎用され、品質管理された株が入手可能かつ表現型・遺伝型の詳細な解析がなされているHela細胞を採用した。正常細胞の例としては、現在再生医療および細胞治療の領域で研究開発および実用化が進むhMSCを用いた。軟寒天コロニー試験法としてはCell Biolabs社のCBA-130 CytoSelect 96-well Cell Transformation Assay および

CBA-140 CytoSelect 96-well Cell Transformation Assay (Cell Recovery Compatible)を採用した。これらのアッセイ系を選択した理由は、従来の軟寒天コロニー試験法と比較しこれらの方法が①ハイスルーブットかつ定量的であり、②主観的計数のプロセスを含まず、また③短期間（6～8日）で済む、とされる点で優れていると判断したからである。CBA-130とCBA-140のいずれも、オリジナルのプロトコールでは、軟寒天層を可溶化したのち、コロニー中の細胞数を蛍光色素のCyQuant GRを用いて評価することに変更はない。CBA-130とCBA-140の大きな違いは、軟寒天を可溶化した際に前者では細胞が死滅するのに対し、後者で細胞が死滅せず、生きてそのまま回収できる点にある。CyQuant GRは溶解した細胞の総核酸量に比例して蛍光を発する試薬で、細胞の核酸と結合すると蛍光が増し、他の細胞成分からの干渉はおこらないことが知られており（最大励起/蛍光=480/520 nm）、簡便で迅速かつ高感度な方法で、培養物中の細胞密度を測定することができる。

化学発光検出法は概して蛍光検出法よりもバックグラウンド値が低いため、検出限界が低くかつ測定感度が高い傾向にある。そこで本研究では、CBA-130もしくはCBA-140の生細胞数評価法としてオリジナルプロトコールにあるCyQuant GRの蛍光検出法を用いるのではなく、化学発光検出法を用いることができれば、より性能のよいアッセイ法となる可能性があるとの仮説を立てた。

CellTiter-Gloは、細胞の内在性のATPを定量することで、生存する細胞数を測定す

る試薬で、“添加→攪拌→測定”だけの簡便なホモジニアスアッセイのキットであり、試薬の添加後、短時間で結果が得られる高感度なアッセイ系であるとされている。

CellTiter-Glo を軟寒天コロニー形成試験に適用するには軟寒天層中の細胞を生きたまま取り出す必要があるため、CBA-130 と CBA-140 のうち、後者とカップルさせるのが適当であった。そのため、本研究では 2 種の異なる軟寒天層溶解法と 2 種の異なる検出方法の組み合わせで 3 種のアッセイ法を検討することとした。

3 種のアッセイ法を比較した結果、CellTiter-Glo を用いたアッセイ法が最も検出限界が低くかつ、測定感度が格段に高いことが明らかとなった。ただし、細胞組織加工医薬品等の造腫瘍性を評価するための *in vitro* 試験としては、悪性細胞を正常細胞よりも選択的かつ高精度で検出する能力が要求される。選択性および精度の面から見れば、3 種のアッセイ法の中では CBA-130 が最も優れていると考えられる。CBA-140 (CellTiter-Glo 検出) の試験系の選択性および精度が、CBA-130 および CBA-140 (CyQuant 検出) よりも劣っていたことの原因としては、細胞 1 個あたりの ATP 含有量が Hela 細胞と hMSC とで異なる、個々の細胞の ATP 含有量のばらつきが大きい、あるいは軟寒天層の可溶化時の細胞生存率のばらつきが大きい、などの可能性が考えられる。

今後は、選択性および精度の優れた CBA-130 の系を用いて、①悪性細胞と正常細胞を混合培養した際の、悪性細胞の検出能の評価、②CBA-130 の試験系における細胞培養条件の最適化 (培地、酵素濃度、side

population の利用など)、③より適切なネガティブもしくはポジティブコントロールとなりうる細胞株の探索とその妥当性評価、などが課題となる。

D-3 染色体安定性等の評価技術開発

各種体性幹細胞を含む細胞治療用の細胞を、*in vitro* での培養により染色体異常や染色体異常を伴うがん化のリスクが存在する。我々はすでにヒト骨髄由来間葉系幹細胞 hMSC を題材として用い、長期培養による遺伝的安定性を SNP チップをはじめとするアレイ CGH の手法を用いて検討を行った。その結果、解析した hMSC の 1 検体でゲノムのコピー数の変化が認められ、マルチカラー-FISH 法による染色体解析において、7 番および 17 番染色体の転座および増幅を伴う異常を検出した。染色体特異的セントロメア FISH 法を用いて、培養過程におけるその異常頻度を検討した結果、比較的初期に起きた異常あるいはドナーの中で既に起きていた異常が細胞集団の中へ広がっていった可能性が考えられた。

一方で、こうした異常の普遍性という観点に関して、他のロットの間葉系幹細胞についても検討を加えた結果、CGH アレイにて観察可能なコピー数異常を示す細胞は観察されなかった。従って、このロットに特異的に起きたことがわかった。

p53 遺伝子の異常など比較的広範囲の癌に検出される事例はあるものの、一般に癌化につながる遺伝子変化は多種多様であり、すべての変化を捉えることは難しい。増殖性に基づいた軟寒天コロニー形成法なども高感度に異常細胞を検出する手段であるが、我々は遺伝的安定性という観点から、一細胞レベルで異常を観察するための、染色体

異常試験およびその簡便法としての小核試験の適応に関して基礎的検討を行った。Nocodazole の処理によりある程度の分裂中期像を得ることができ、FISH 解析などには応用可能であったが、染色体観察自体がヒト細胞では難しいこともあり、より迅速簡便な試験法として、小核試験の導入を試みた。小核は、染色体異常に伴う染色体断片が主核とは別の小さな核を形成するものであり、染色体に関する知識がなくても観察が可能である。小核自体は安定ではなく、異常を持った細胞が癌化する可能性は低い、その発生頻度から細胞集団としての遺伝的安定性および培養環境のリスクを評価でき、特に培地や培地に添加される薬剤の安全性評価につながる。今回の予備的検討においては、小核を持つ細胞の頻度が1%を超え、樹立された癌細胞株と類似の頻度が得られた。この検討では、異常が確認されたロットを使ったという影響も考えられるが、継代数の少ない細胞もむしろ高い頻度を示すことから考えると、一般的な現象であるとも考えられる。今後、より広範な検討を進め、間葉系幹細胞の安定性に関して知見を深めるとともに、この試験の培養系の安全性に関する評価法としての有用性についても検討を加える予定である。

次に、もうひとつのアプローチとして、プロテオーム解析を用いた細胞の品質および有効性に関する評価のために有用なバイオマーカーの検索を行った。近年の質量分析機の進歩は著しく、高感度かつ網羅的に細胞等に含まれるタンパク質の発現状態を比較するプロテオーム解析が可能となった。我々はこれまでに、LC・MSを用いたショットガンプロテオミクスの手法の開発を行っ

てきており、これまでに蓄積したノウハウを応用して、バイオマーカー検出のための試験系の樹立を行った。バイオマーカー発見の成否を握る鍵は、以下に低発現量のタンパク質まで検出できるかにかかっており、その意味でサンプルの前処理法を含めた試験系の高感度化による網羅性の向上が課題となる。試験系の開発にあたり、我々は利用可能な二つのタイプの質量分析計の性能を比較したが、感度、および解像度の面から LTQ-Orbitrap が有効であることを確認した。このマシンを使った間葉系幹細胞のホールプロテオーム解析により、数千におよぶペプチドシグナルを検出可能であることがわかるとともに、そのうち 700 以上のタンパク質に関して、MS/MS データに基づくペプチドマスフィンガープリンティング法による同定に成功した。同定されたタンパク質には、細胞のキャラクタリゼーションに有用だと考えられる細胞膜抗原なども多く含まれており、実際に CD 抗原の発現パターンは、すでに確認されている間葉系幹細胞のパターンと CD105 を除き一致した。CD105 が同定されなかった原因としては、発現量が低く、親イオンが MS/MS 測定されなかったためと考えられるが、ペプチドシグナルとしては、3D マップ上に存在している可能性が考えられ、今後の検討が必要である。プロテオーム解析により、抗体を用いずに一度に多数のマーカーを検出可能であり、これ自体でも細胞のキャラクタリゼーションに有用であると期待できる。また、今後この手法を用いて、培養過程や分化に伴うタンパク発現変化や、細胞のロット差、薬物処理による影響などを検討することにより、細胞の品質、有効性や培養環

境の安全性を評価するバイオマーカーの検出を行っていく予定である。

バイオマーカー検出のためには、質量分析装置自体は満足のゆく性能が得られており、現状では手作業に頼らざるを得ないデータ解析の部分を中心に自動化して効率的に進めるかが、次の課題となる。この課題の克服に向けて、我々は以前より独自の解析ソフトウェア (mzMore) の開発を進めてきた。このソフトウェアに必要な機能としては、ペプチドピークの自動認識、定量、リテンションタイムのずれの補正、ノーマライゼーションなどの機能があげられる。Qstar より得られるデータに関してはこれまでの検討によりプロトタイプの完成まで開発は進んでいたが、LTQ-Orbitrap から得られる生データに関しては、その量、質の差から直接応用することに問題が生じた。現在、LTQ からの質量分析データにも対応するため、mzMore の改良を行っている。来年度中には、このソフトウェアを使った解析により、ノンラベルによる定量比較を可能とする予定である。

一方、質量分析による、より定量性の高い手法としての安定同位体ラベル法にも注目し、特に LTQ-Orbitrap の特性である、高分解能と早いスキャンスピードおよび Orbitrap 測定が同時進行可能であるという利点を生かすためには、iTRAQ 法 (MS/MS 測定による比較定量) の適応が有用だと考えられる。現在 8 サンプルまで同時可能な試薬が開発されており、同時に多検体を比較可能なため、より分離に時間をかけることも現実的となり、2次元 LC によりペプチドの分離を良くしてより多くのペプチドに対して MS/MS 測定をし、カバー率を上げる

というアプローチが有効であると考えられる。

D-4 同等性評価方法の開発

D-4-1 MSC の同等性評価指標の探索

LC/MS による細胞糖鎖のプロファイリングを用いて、細胞同等性評価指標の探索を行った結果、第 1 に、無血清培地で培養した MSC では、シアル酸付加混成型糖鎖の比率が高まることが明らかになった。混成型糖鎖は、高マンノース型糖鎖の側鎖マンノースが α -マンノシダーゼにより完全にトリミングされなかった時に生合成される糖鎖である (Fig. IV-6 下)。また、混成型糖鎖生合成後であっても、マンノースがトリミングされると、複合型糖鎖に変換される。従って、無血清培地培養細胞にシアル酸付加混成型糖鎖が増加していたことは、 α -マンノシダーゼの発現あるいは活性が低下するような変化が生じている可能性、並びに、この糖鎖が同等性評価指標として利用できる可能性を示唆している。

第 2 に、無血清培地で培養すると、モノシアル 2 本鎖糖鎖及びトリシアル 3 本鎖糖鎖糖鎖が、減少することが明らかとなった。これまでに我々は、無血清培地を用いて HL60-RG を培養すると、ヒト血清添加培地を用いた場合と比べて、成熟した複合型鎖糖鎖が減少することを報告している。本年度は、FCS 添加培地と無血清培地の比較であるが、MSC においても、無血清培地で培養すると一部の複合型糖鎖が減少することが明らかとなったことから、シアル酸が結合したある種の複合型糖鎖も、細胞の同等性指標として利用可能であることが示唆された。

D-4-2 MSC 分化能保持予測のためのマーカー糖鎖探索に関する基礎的研究

本研究では、MSC 神経分化能保持予測のためのマーカー糖鎖探索に関する基礎的研究として、MSC の軟骨、骨及び脂肪細胞への分化程度は、形態学的観察と、それぞれ GAG、カルシウム及び脂肪を定量的に解析することにより評価できることを確認した。また、これらの定量法の応用として、継代数の異なる MSC の軟骨、骨及び脂肪細胞分化能を測定し、継代数の増加は、軟骨細胞への分化能には影響しないが、骨細胞分化能を低下させ、脂肪細胞分化能を増加させることを見出した。今後、これらの細胞に結合している糖鎖の特徴を明らかにすることによって、分化能保持予測指標を見出したいと考えている。

神経分化については、J. A. Jeong らの DMSO 及びブチルヒドロキシアニソールを用いる方法により、樹状突起等の神経細胞に特徴的な形態と、神経分化マーカーを複数発現する神経細胞が得られることが確認できた。しかし、播種した細胞を一斉に分化させることは難しく、誘導開始 5 日目前後から神経細胞と死細胞が混在し始め、50%以上の誘導効率を得ることは困難である等の問題も明らかになり、来年度以降引き続き、適切な神経分化誘導法を検討する必要性も示唆された。

D-5 免疫学的安全性評価に関する基盤技術開発

ヒト血液系を有するマウスを作製し、そのマウスを用いて医薬品（特に細胞組織加

工医薬品）の免疫原性を評価する系を構築するには、ヒト造血幹細胞をマウスに効率良く生着させる技術の開発が重要である。本研究では、造血幹細胞の生存・増殖・生着に重要であることが知られているサイトカイン CXCL12 を Ad ベクターを用いてマウス体内で過剰発現させることにより、マウス自身の造血幹細胞を本来の生着場所 (niche) から遊離させ、ヒト造血幹細胞などの外来血液細胞を効率良く生着させることを目的としている。

Ad-CXCL12 をマウスに投与したところ、骨髄の細胞数が著明に減少し、末梢血・脾臓の細胞数が増加した。Ad ベクターは静脈内投与後、主に肝臓で目的遺伝子を発現する。したがって、Ad-CXCL12 投与後、肝臓で発現された CXCL12 が循環血中に分泌され、血中 CXCL12 濃度が骨髄中 CXCL12 濃度を上回ったため、骨髄に生着していた血液細胞が遊離してきたものと考えられた。遊離してきた血液細胞種を詳細に解析した結果、骨髄球系細胞だけでなく、B 細胞などのリンパ球も含まれていることが明らかとなった。さらに、わずかではあるが造血幹細胞を含む未分化な血液前駆細胞も同時に遊離してくることが示された。

以上より、Ad-CXCL12 を投与することにより造血幹細胞を含む多種の血液細胞が骨髄より遊離してくることが明らかとなり、ヒト造血幹細胞などの外来造血幹細胞を骨髄 niche に効率良く生着させることができる可能性が示された。しかしながら、前述

のように、抗体産生細胞である B 細胞も同時に末梢に遊離してくるため、このモデルを用いて医薬品の抗原性を評価するには、遊離してきた内在性 B 細胞の影響も考慮する必要があるものと考えられる。今後、B 前駆細胞が脾臓に生着することによる抗体産生への影響を明らかにするとともに、外来性造血幹細胞の生着率が実際に向上するかを検討していきたい。

D-6 特性解析・品質管理に関する研究

成体における血管形成は従来、既存の血管内皮細胞遊走・増殖により新たな血管が形成される血管新生 (angiogenesis) の機序により生じるものと考えられていたが、骨髄に由来する血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) が成体の循環血液中に存在することが報告され (Asahara T. et al, Science 275, 964, 1997)、胎生期にのみに認められるとされていた血管発生 (vasculogenesis) の機序を介して血管内皮前駆細胞が成体での血管形成に関わるという概念が提唱された。それ以来、EPC を用いた血管再生療法の開発が試みられ、EPC あるいは EPC の起源細胞を含む細胞画分を用いた臨床研究等が展開されている。

EPC には少なくとも 2 つのタイプがあることが知られている。1 つは増殖能が低く、自身は管腔形成能をもたないが、血管形成に関与するサイトカイン等を放出する紡錘状の形をした early EPC である。Early EPC は不均一ではあるが培養 1-2 週間で出現する。もう 1 つは、高い増殖能と管腔形成能をもち、敷石状を呈した late EPC である。

Late EPC は多くの均一な細胞数が得られるので扱いやすいが、出現時期が 2-3 週間と遅く、出現頻度も低い。

Early EPC と late EPC の定義は現在に至っても明確でなく、EPC に関する論文においても、early EPC と late EPC のどちらに関する研究であるのかが表題や要旨からは明らかでなく、method の内容から読者が判断しなければならぬ状況にある。したがって、EPC の分化誘導に関わる基礎的研究の観点はもとより、再生医療における実用化に向けた品質管理法の観点からも、early EPC と late EPC の差異を明確にし、それぞれの特性を明らかにすることが重要である。

既に我々は EPC の発見当初から EPC に関する研究に着手し、幹細胞である AC133 陽性細胞を起源とする EPC に関する研究を進めてきた (Kanayasu-Toyoda et al., J Cell Physiol. 195, 119, 2003, J Biol Chem 282, 33507, 2007)。2000 年以降、EPC には 2 種類の細胞 (early EPC と late EPC) が存在することや (Lin Y. et al. J. Clin. Invest. 105, 71, 2000)、単核球を起源として early EPC の調製が可能であることなどが明らかになり、EPC の起源細胞や調製法に関する知見は変遷してきた。また、単核球を投与する臨床研究や先進医療も多く行われるようになってきた。AC133 陽性細胞が単核球画分に含まれる細胞であること、また本年度の研究から明らかになったように AC133 陽性細胞を起源とする early EPC と単核球を起源とする early EPC は類似した性質を持つこと、単核球由来 early EPC の方が細胞数の確保が容易であること等を考慮し、early EPC については、単核

球から分化誘導される細胞を用いて解析を進めることとした。

Fig. VI-8 に示したように、early EPC と late EPC では遺伝子発現プロファイルが大きく異なることが明らかになった。Early EPC では、MMP-9、CXCL10、CXCL9、TNF、IL-1 β 、TYMP、IFN γ 、IL-8、CCL2 などの発現が高く、これらが特性指標として有用である可能性が考えられる。これらの中でも特に、IL-8 や CCL2 は血管内皮細胞の遊走や増殖を促進することが知られており、early EPC の血管新生促進作用に寄与している可能性が高い。他に興味深い知見として、early EPC が MMP-9 を高発現していたことがあげられる。MMP-9 は、基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンを分解することがよく知られているが、その他に、c-kit リガンドを切断して可溶性リガンドとして放出させることにより、骨髄由来血管内皮前駆細胞の動員に関わることが報告されている。MMP-9 の early EPC や late EPC に対する効果は未検討であるが、early EPC 由来の MMP-9 が直接あるいは間接的に EPC の機能に影響を与えるのであれば、MMP-9 が early EPC と late EPC が協調作用の一翼を担っている可能性も考えられる。

一方、late EPC は、形態および遺伝子発現プロファイルが成熟血管内皮細胞である HUVEC と非常に類似していた。しかし、血管内皮細胞機能関連遺伝子の発現比較においては、少なくとも 3 種類の特性指標候補分子を見出すことができた。一つは、HUVEC と比較して late EPC で発現量が顕著に高い MMP-1 である。その他に、発現は late EPC に特異的ではないが、血管内皮細胞の管腔形成能と発現量が相関する分子と

して見出された occludin と caspase-1 である。

MMP-1 は、細胞外マトリックスを分解する亜鉛要求性のコラーゲナーゼで、創傷治癒、血管新生など重要な生体機能に関与することが知られている。本研究の結果、MMP-1 の発現は、late EPC の起源細胞を含む単核球、early EPC、あるいは成熟血管内皮細胞 (HUVEC、HCAEC、HMVEC) と比べて、late EPC で特徴的に高いことが明らかになった。MMP-1 はタイプ I コラーゲンなどの細胞外基質を分解することが知られていることから、late EPC から分泌され、さらに活性型に変換された MMP-1 が、late EPC 周辺の細胞外基質を分解することにより late EPC の浸潤を促進する可能性が考えられる。これは、細胞・組織加工医薬品として虚血部位に投与された late EPC が血管を形成していく上で有用な特性であると考えられる。

また、MMP-1 には、細胞外基質のみならず、Protease-activated receptor-1 (PAR-1) の細胞外部分を切断し、PAR-1 を活性化する作用があることが報告されている。一方、late EPC には PAR-1 が発現しており、PAR-1 アゴニストペプチドを用いた実験で、PAR-1 を介したシグナルが late EPC の増殖や遊走促進に関わることが報告されていることから、活性型に変換された MMP-1 が PAR-1 を介して late EPC 自身に作用することにより、late EPC の増殖や遊走を促進する可能性も考えられる。

本実験で評価した限りにおいては、late EPC の上清中に検出される MMP-1 はプロペプチドを持つ潜在型が主であった。潜在型 MMP-1 は MMP-3 やプラスミンによって

活性化されることが知られている。In vivo において、late EPC が何らかの刺激に应答して MMP-1 を活性化するタンパク質を産生するようになるのか、あるいは、他の細胞から分泌された酵素の働きで late EPC 由来の MMP-1 が活性化されるのかについては今後の課題である。

Occludin は、tight junction 構成タンパク質であり、血管内皮細胞においては血管透過性の維持に関与しているとされている。新たに血管が形成される際にも occludin が細胞同士の接着に関与することにより、管腔形成に必須の役割を果たしている可能性が考えられる。また、occludin は血管内皮細胞の分化マーカーとして有用である可能性も考えられる。このことは、上皮細胞における occludin の発現と間葉系細胞への分化に伴う発現変動に関する知見から考察することができる。すなわち、上皮細胞が TGF β 等の刺激を受けて間葉系細胞に分化する (Epithelial mesenchymal Transition: EMT) 際に occludin の発現が低下することが知られていること、血管内皮細胞も TGF β 等の刺激を受けて間葉系細胞に分化すること (Endothelial Mesenchymal Transition: EndMT) から、血管内皮細胞が間葉系細胞に分化する際に occludin 発現が低下することが想定される。Occludin の発現量が高いほど血管内皮細胞として成熟した状態であることが検証されれば、有用な分化マーカーになるであろう。

Caspase-1 はアポトーシス誘導に関与することがよく知られているシステインプロテアーゼファミリーの一つであるが、他のカスパーゼと異なり、IL-1 β や IL-18 の活性化に寄与すること等により、炎症反応に関与

するとされている。最近の報告では、caspase-1 が細胞保護や組織再生に関連するタンパク質のプロセッシングにも関与するとされていることから、管腔形成に必要なタンパク質のプロセッシングに関与する結果、caspase-1 の発現量と管腔形成能が相関している可能性が考えられる。

Late EPC は血管内皮前駆細胞に分類される細胞であるため、未分化な細胞に含まれる分子が発現していることを予測した。しかし、幹細胞関連遺伝子について、発現量を成熟血管内皮細胞である HUVEC と比較したところ、顕著な差は認められなかった。Late EPC における幹細胞関連遺伝子の発現の有無を明らかにするには、評価対象とした 84 種類以外の幹細胞関連遺伝子についても検討する必要があると考えられる。

細胞・組織加工医薬品の品質管理においては、確認試験として、目的とする細胞・組織の形態学的特徴、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質、その他の適切な遺伝型あるいは表現型の指標を選択して、目的とする細胞・組織であることを確認することが求められている (薬食発第 0208003 号 ヒト (自己) 由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について)。本研究で明らかになった特性指標候補分子は、それぞれの細胞の機能との関連をさらに検証する必要があるが、early EPC あるいは late EPC の確認試験や力価試験において有用である可能性が考えられる。すなわち、early EPC で高発現している MMP-9 やケモカイン類、Late EPC で高発現している MMP-1 は特徴的産生物質として、late EPC の管腔形成能と発現量が相関していた occludin および

caspase-1 は生化学的指標として用いることができる可能性がある。

我が国では iPS 細胞の発見やガイドラインの整備などが推進力となっていることもあり、再生医療の臨床研究が盛んに行われている。その成果を医薬品としての実用化に発展させるためには、治療効果の期待される細胞を、薬事法の規制下に細胞・組織加工医薬品として開発することにより、その品質・有効性・安全性を確保していくことが求められる。スーパー特区の選定など、実用化推進に向けた枠組みも作られ、研究成果の医薬品開発への反映が期待されることである。先端的な医療では特に、安全性の点では未知・未経験の要素が多いことから、治療の実施に際して、少なくとも一定の有効性を担保し、リスク・ベネフィットを明らかにする必要がある。有効成分となる細胞の特性が明らかでない血管再生医療ではこの点の課題解決が特に求められていることから、EPC の品質試験法に有用な特性指標の探索と機能解析を継続していきたいと考えている。

D-7 細胞特性・品質解析技術の開発

本研究では細胞の糖タンパク質糖鎖解析を再生医療実用化のための細胞特性解析技術として応用するため、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、10 種類のヒト培養細胞をモデルにムチン型糖鎖の解析へと応用した。血球系培養細胞に含まれるムチン型糖鎖については、上皮系培養細胞に比べ糖鎖含量が低く、何れの細胞でも主要なムチン型糖鎖は Sialyl-T と Disialyl-T であったが、HL60 ではシアル酸やフコースにより修飾を受けたムチン Core2 構造を持つ糖鎖も観察された。一方、

今回使用した 6 種類の上皮系培養細胞については、LS174T と MKN45 では LacNAc (Gal β -GlcNAc) を数残基持つポリラクタサミン型糖鎖が豊富に含まれ、培養細胞のムチン型糖鎖は細胞の種類、分化度によって大きく異なることがわかった。また、MKN45 ではムチンコア GalNAc の Gal β 1-3 側鎖と Gal β 1-GlcNAc β 1-6 側鎖の両方に LacNAc が伸張したポリラクタサミン型糖鎖と考えられる糖鎖を発見した。このような 2 分岐型の高分子量ムチン型糖鎖についてはこれまでに報告例がなく、今後タンデム MSMS 解析技術などを応用してより詳細な解析が必要である。

D-8 iPS 細胞の同一性・同等性評価／特性解析法の開発

iPS 細胞は、個人の年齢や性別にかかわらず樹立が可能であった。樹立された日本人 iPS 細胞は、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、同様の特性及び機能を持っていることが見いだされ、ES 細胞の特性と高い類似性を有していることが明らかにできた。今回は、樹立直後の細胞の解析であったが、継代を重ねていった場合、核型も含めて細胞表面抗原や網羅的遺伝子発現状況などに変動がないか研究を行っていく。