

F1560#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。

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、染色体異常試験は、個々の細胞レベルでの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、染色体解析に必要な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ので、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 μ 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、1.2~1.5 $\times 10^6$ 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 μ 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。

II. 細胞のプロテオーム解析

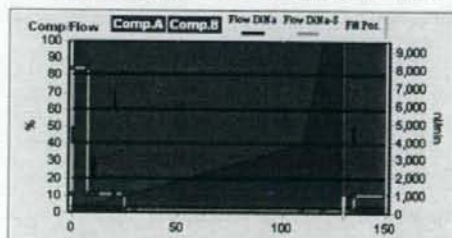
1. 質量分析装置の性能に関する検討

本研究において利用可能なタンデム型質量分析装置として、Q・TOF（四重極-飛行時間）型の Qstar-XL（Applied Biosystems）および Linear Iontrap-FT(Orbitrap)型の LTQ-Orbitrap（Thermo Fisher）を共同利用型機器として保有している。これまで我々は前者を使ってプロテオーム解析を行ってきたが、最新型の LTQ-Orbitrap は、感度の面においては未知数であったが、FTによる高分解能が期待でき、細胞のホールプロテオーム解析といった複雑性の高い網羅的な解析において有効性が高いと考えた。そこで、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、それぞれ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、 1.5×10^5 個の細胞を 50 μ 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 $^{\circ}$ C で一晚消化し、分析用サンプルとした。

一回の LC-MS 分析には 500ng 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 μ m ID x 50mm）を用い、毎分 300nl 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 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。

なお、いずれのマシンの場合も横軸に平行に持続的に観察されるノイズのピークが存在するが、このシグナルは溶媒やサンプルの組成に関係なく常に観察されるものであり、測定室の環境由来のコンタミネントであると考えられる。文献調査の結果 (Schlosser and Volkmer-Engert J. Mass Spectrom. 38: 523-525, 2003)、これらのピークは環状シロキサンであると推定された。環状シロキサンはシリコンオイル等に含まれており、質量分析装置が置かれている測定室においては、質量分析装置に付随する真空ポンプ等にシリコンオイルが一般的に用いられており、測定中は常にポンプが稼働しており、これらのポンプから生じる揮発性の環状ポリシロキサンが環境中に存在していると考えられる。ポンプ自体は質量分析装置から分離が難しいため、このノイズは除去不可能であることがわかった。

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 4 F1560 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 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、マー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 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 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、陰性なマーカーである 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。

D. 考察

各種体性幹細胞を含む細胞治療用の細胞を、*in vitro* において培養する場合には、必ずいくつかの危険性が伴う。特に、最近報告されたヒト人工多能性幹細胞 (iPS) の場合には、c-myc 遺伝子の導入や、レトロウイルスベクターの使用による染色体の不安定性が懸念されており、がん化につながる初期変化として、その検出は重要な課題となることが予想される。より安全な方法による iPS 細胞の樹立に関する研究が進められつつあるが、一般に体外に取り出した細胞を、人工的な環境下で培養することは、細胞にとってはリスクをはらんでおり、培養環境の安全性を含めて細胞の遺伝的安定性に与える影響を正しく評価することは、今後こうした革新的技術を臨床応用して行

く上で重要な課題となる。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、解析した最初の例において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変遷を検討した結果、比較的初期に起きた異常が細胞集団の中へ広がっていくことが確認された。

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。このことより、たまたま初めの解析にて検出された異常は、このロットに特異的に起きたことがわかった。しかし、頻度は低いものの異常が観察されたという事実は、遺伝的安定性の評価に関する重要性を物語っており、さらにかなり培養初期に異常細胞が存在した事実は注意を喚起するものである。骨髄からの間葉系幹細胞樹立時の染色体異常の発生に関しては、同様の報告が Johns Hopkins 大学の Wang ら (Cytotherapy, 7: 509-519, 2005) によってなされており、この場合には驚くべきことに、異常を持った細胞は形質転換をして NOD/SCID マウスに対して腫瘍形成能を持つことが確かめられている。

今回 FISH 解析では、当初予想された7番染色体セントロメアプローブでは数的異常は検出されず、代わりに17番染色体セン

トロメアプローブにて異常が検出できた訳であるが、間期核での検討であるため詳細な理由は不明である。染色体解析において増えていた7番染色体が17番染色体のセントロメアを持つことになり、非常に不思議である。17番染色体自体にもコピー数変化が検出されているので、その可能性はあり、異常発生のメカニズムに興味を持たれる。

遺伝子発現変化の観点から、そのメカニズムに検討を加えるため、すでに結果を得ていた GeneChip による網羅的発現データから、特徴的な遺伝子を抽出することを試みた。GeneChip の場合も、細胞集団の平均としての遺伝子発現を検出するという原理から、異常ロットにおける発現変化は、異常をもつ細胞集団が十分に拡大した時期、即ち培養後期になって初めて検出可能であるという考えにもとづき、28継代の細胞の遺伝子発現に関して、異常ロットのみで発現が変化した遺伝子群 (5倍以上の変化) を GeneSpring を使って選択した。発現の弱い遺伝子は除き 49 遺伝子が選択されたが、これら遺伝子の発現を異常ロットの他の 20 継代以降のチップデータにて検証したところ、すべての遺伝子に関して同様の変化が認められた。これらの遺伝子は、その変化の方向性および、異常ロット内での継代数による差の観点から、5つのグループに分けられた。同じグループに属する遺伝子は機能的に関連した作用を持つことが予想され、異常ロットにおける増殖性の獲得との関連性に興味を持たれる。観察された染色体異常は、主に7番染色体と17番染色体を含むものであり、これら染色体上の遺伝子の発現変化が予想されたが、選択さ

れた遺伝子群が特にこの染色体領域に集まることはなかったため、染色体異常との直接の因果関係はつかめなかった。今後、選択された遺伝子群の機能と染色体異常との関連性についても検討を進めたい。

CGH アレイにおいて観察される異常は、細胞集団のマジョリティーである必要があり、それが検出されるためには、起きた染色体異常が安定であり、かつ増殖の優位性を獲得する必要がある。培養過程における染色体異常は比較的高頻度にランダムに起きていることが予想できるが、大部分は不安定かつ増殖に不利な変化となって淘汰されていくと考えられる。しかし、いったん増殖性を獲得するような安定な変化がもたらされた場合には、培養を通じて異常な細胞が濃縮されていく結果となる。今回観察された異常ロットについては、幸い不死化までには至っておらず、発癌性は低いと考えられるが、さらに別の異常が加わることによって、形質転換を起こす可能性は高いと考えられ、注意が必要である。実際の治療の場面では、たとえ少数の集団であってもこうした安定な染色体変化を示す細胞が体内に戻されることによる危険性は高いと考えられるため、早期から高感度に異常細胞を検出する試験系の開発が望まれる。

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いか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。

E. 結論

SNP チップを用いた解析により、LOH 解析とともに染色体コピー数の変化の検出に有効であることが示され、細胞治療に用いる培養細胞の遺伝的安定性の検証法として、その利用が期待できる。また、ヒト間葉系幹細胞を使った長期培養実験から、染色体変化が観察され、その発生時期や一般性に関して検討を加えた結果、頻度は高くないものの、変化が比較的培養初期からおきていたことが判明した。他の報告からも、組織幹細胞の樹立に当たって、染色体の安定性に注意を払う必要性が喚起された。CGH 解析は検出感度という点ではやや劣るが、網羅性、解像性に優れており、長期培養による評価が許される場合においては、増殖性の変異が検出可能となり、今後細胞の品質評価の上でも有用な手法であることが判明した。一方、一細胞レベルでの染色体異常を観察しうる簡便な手法としての小核試験の適応に関する基礎的な検討を行い、間葉系幹細胞の自然小核誘発頻度に関するデータを得るとともに、この手法が培養環境の安全性の評価に向けて有効である可能性が示唆された。

一方、LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析によるバイオマーカー開発のアプローチについては、質量分析装置の選択を含め試験系の確立を行い、満足の行くパフォーマンスが得られるようになった。間葉系幹細胞のホールプロテオーム解析により、数多くのペプチドシグナルの検出とタンパク質の同定が可能となっており、細胞膜表面

の特異抗原の解析にも有効であることがわかった。今後、独自のデータ解析ソフトウェアの開発を進め、自動化を行うことにより、各種比較プロテオーム解析を行い、培養細胞の品質、有効性、安全性の評価に有用なバイオマーカーの開発を進めたい。

G. 健康危険情報

特になし

H. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe T, Tanaka G, Hamada S, Namiki C, Suzuki T, Nakajima M, Furihata C. Dose-dependent alterations in gene expression in mouse liver induced by diethylnitrosamine and ethylnitrosourea and determined by quantitative real-time PCR. *Mutat Res.* 673: 9-20, 2009.

Tanabe S, Sato Y, Suzuki T, Suzuki K, Nagao T, Yamaguchi T. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for identification of novel markers in early- and late-stage cell culture. *J Biochem.* 144: 399-408, 2008.

2. 学会発表

T. Suzuki, T. Suresh, T. Oshizawa, K.

Ramesh, K. Suzuki Proteomics approach to find new biomarkers for genotoxicity in mouse urine.

欧州環境変異原学会 2008 (2008年9月)

T. Suzuki, M. Kogi, M. Honma, S. Tanabe, T. Yamaguchi SNP and CGH array analysis on amplification profile of the c-myc gene

第67回日本癌学会学術総会(2008年10月)

押澤正, 豊田淑江, 内田恵理子, 鈴木孝昌, 鈴木和博, 山口照英 カルシウム結合タンパク質 S100A8 は HL-60 細胞の好中球様分化において増殖・分化に重要な働きをする(その2)

BMB2008 (2008年12月)

田邊思帆里, 佐藤陽治, 鈴木孝昌, 鈴木和博, 山口照英 ヒト間葉系幹細胞における培養分化マーカー同定に関する遺伝子発現プロファイリング

BMB2008 (2008年12月)

多田隈英未, 櫻井幹也, 渡辺貴志, 鈴木孝昌, 成見香瑞範, 浜田修一, 平山満朝, 真田尚和, 小枝暁子, 中嶋圓, 大信田系裕, 佐久間智宏, 降旗千恵 遺伝子傷害性肝発がん物質および非遺伝子傷害性肝発がん物質投与とマウス肝臓における遺伝子発現の比較解析

BMB2008 (2008年12月)

櫻井幹也, 多田隈英未, 花原泉, 渡辺貴志, 鈴木孝昌, 降旗千恵 マウス肝臓における遺伝子傷害性肝発がん物質 Chrysene 投与後短時間での遺伝子発現解析

BMB2008 (2008年12月)

新井祐子, 多田隈英未, 渡辺貴志, 浜田修一, 鈴木孝昌, 中嶋圓, 降旗千恵 ジェチルニトロソアミン投与マウス肝臓における、遺伝子発現の経時変化および用量依存性変化の解析

BMB2008 (2008年12月)

スレッシュ テイルパッティ, ラメッシュ ドス, 押澤 正, 鈴木和博, 鈴木孝昌 プロテオミクス手法を用いた遺伝子傷害性の新しいバイオマーカー探索

日本環境変異原学会第37回大会(2008年12月)

鈴木孝昌, 降旗千恵 Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS

日本環境変異原学会第37回大会(2008年12月)

鈴木孝昌, 小泉朋子, 本間正充, 中嶋圓, 濱田修一, 渡辺貴志, 降旗千恵 トキシコゲノミクスに関する JEMS/MMS 共同研究 II: 遺伝子障害性発癌物質の迅速スクリーニング系としての TaqMan Low Density Array の評価

日本環境変異原学会第37回大会(2008年12月)

降旗千恵, 渡辺貴志, 夏目匡克, 中嶋圓, 濱田修一, 多田隈英未, 櫻井幹也, 花原泉, 小枝暁子, 佐久間智宏, 大信田系裕, 前田晃央, 成見香瑞範, 真田尚和, 平山満朝, 大山ワカ子, 岡田恵美子, 本田大士, 須藤鎮世, 鈴木孝昌 トキシコゲノミクスに関する

る JEMS/MMS 共同研究 (2008 年) : 遺伝子傷害性および非遺伝子傷害性肝がん原物質についての精選した 27 遺伝子に関する qPCR 法による遺伝子発現解析

日本環境変異原学会第 37 回大会 (2008 年 12 月)

浅野哲秀, 西川貴史, 笠松俊夫, 青儀巧, 岡宏明, 小島肇, 伊東悟, 鈴木孝昌, 原巧, D. Gibson, 林 真 皮膚細胞を用いる小核試験—開発と検証—

日本環境変異原学会第 37 回大会 (2008 年 12 月)

鈴木孝昌, 田邊思帆里, 小木美恵子, 押澤 正, 佐藤陽治, 山口照英, 鈴木和博 ヒト間葉系幹細胞継代培養時の染色体安定性の解析

第 8 回日本再生医療学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1 異常を持つhMSC株での核型解析とCGH解析結果

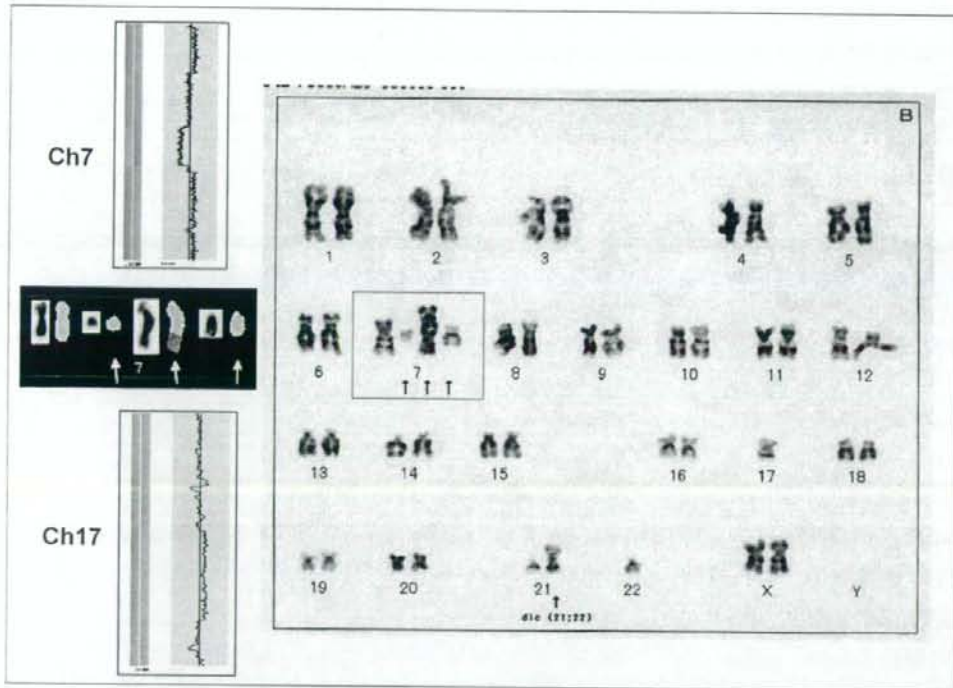


図2 8番および17番染色体セントロメアプローブによる2重染色FISHによる異常検出例

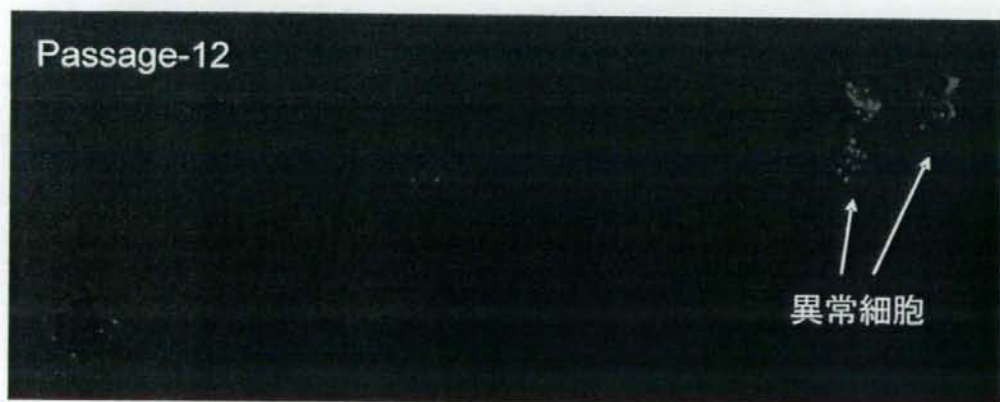


図3 hMSC細胞株の増殖曲線と異常ロット4F1560のFISH解析による異常頻度変化

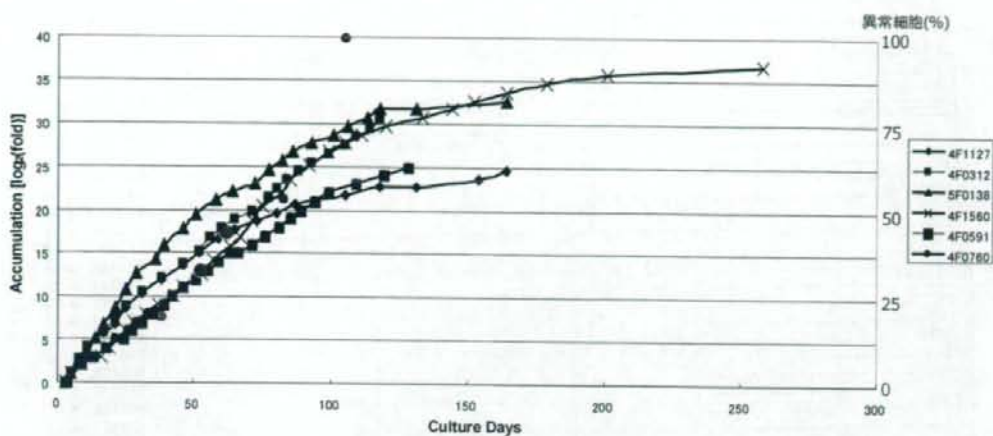


図4 異常ロットの長期培養時の増殖曲線

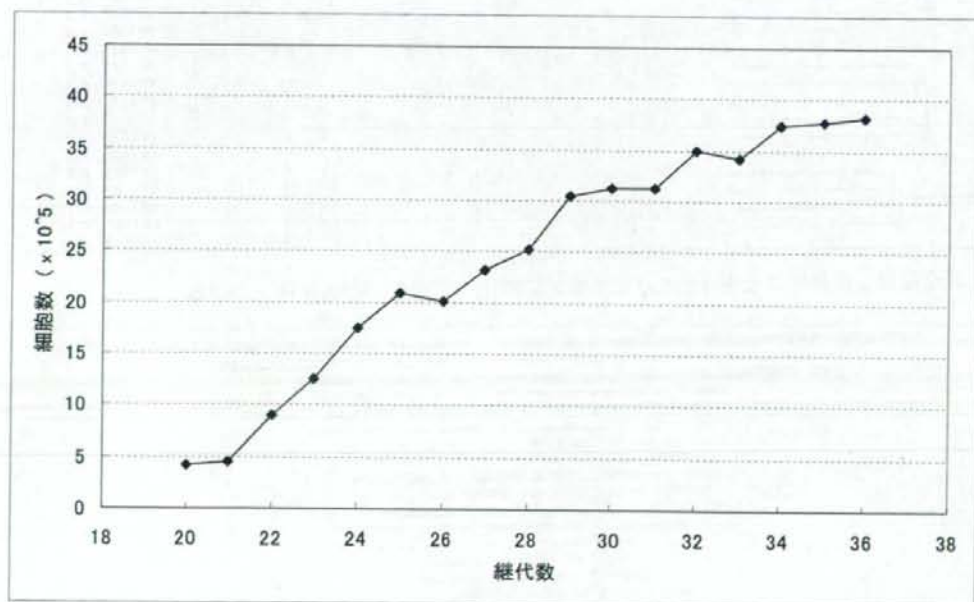


図5 h MSC の培養過程における遺伝子発現変化のクラスター解析

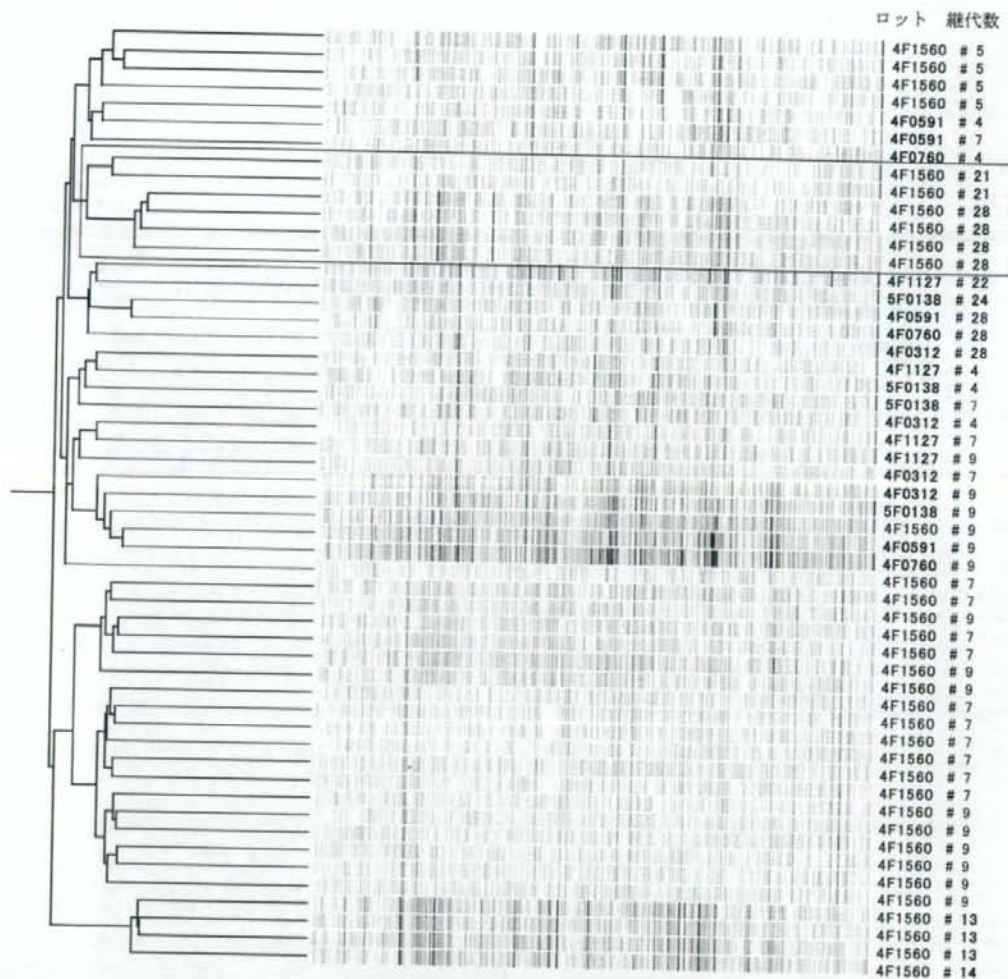
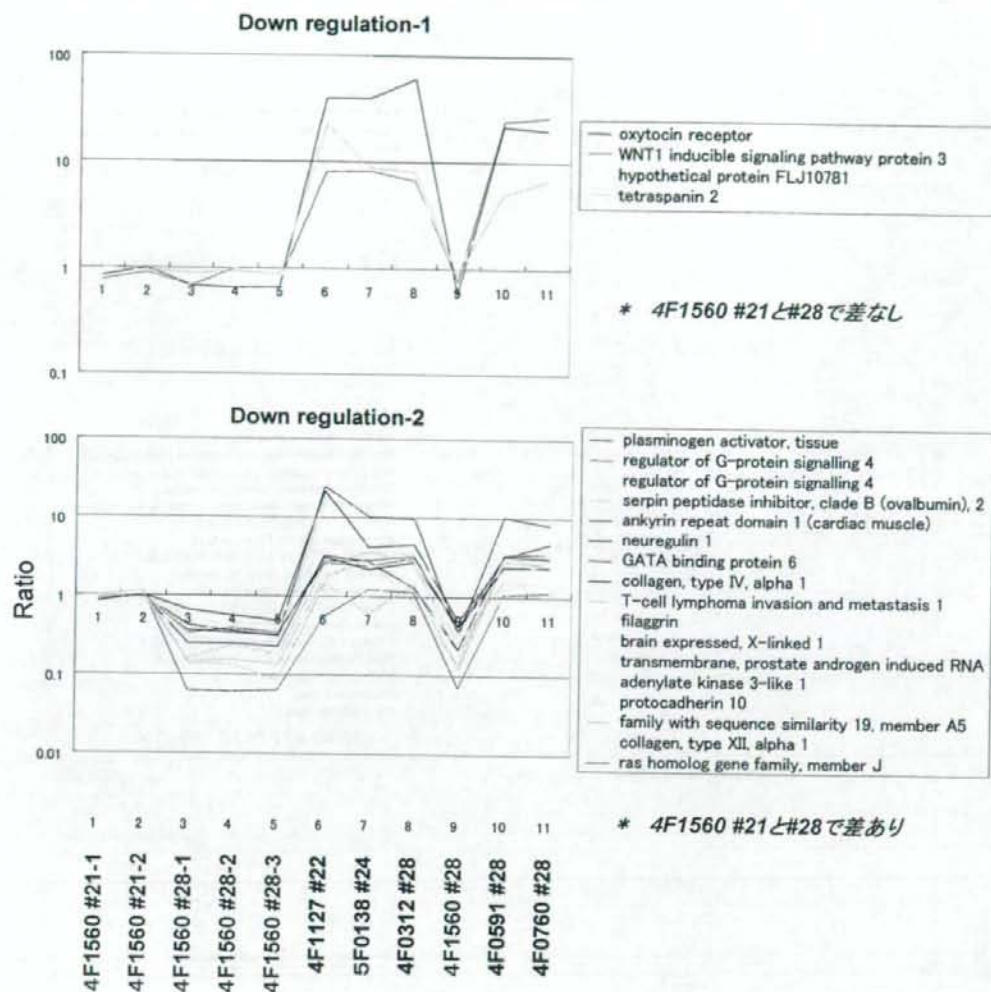


図6 長期培養した異常ロット4F1560に特徴的に変化した遺伝子の染色体上の位置



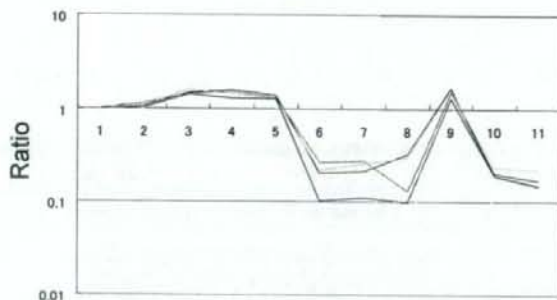
図7 長期培養した異常ロット4 F1560 に特徴的に変化した遺伝子群とそのパターン分類

(異常ロットにおいて発現が低い遺伝子群)



(異常ロットにおいて発現が高い遺伝子群)

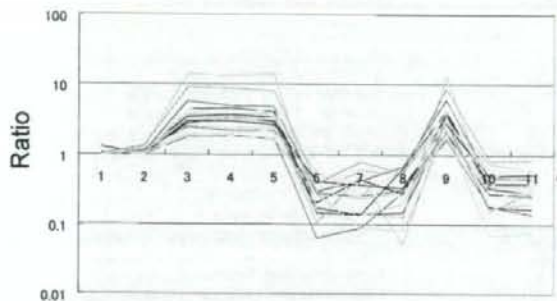
Up regulation-1



— adenosine deaminase
— platelet-derived growth factor receptor-like potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J2
— adenosine deaminase
— Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J2

* 4F1560 #21と#28で差なし

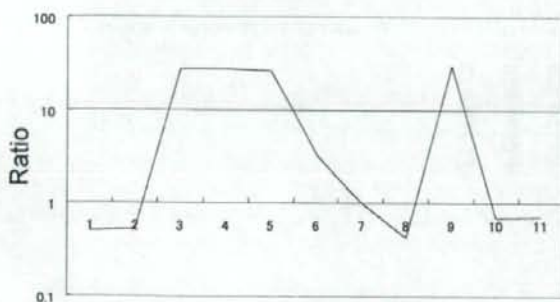
Up regulation-2



— hypothetical gene supported by NM_182582
— fibulin 1
— apolipoprotein E
— CD302 antigen
— fibulin 2
— nephroblastoma overexpressed gene
— G protein-coupled receptor associated sorting protein 1
— loss of heterozygosity, 11, chromosomal region 2 A
— 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B
— potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily 2
— sushi, von Willebrand factor type A odd-skipped related 2 (Drosophila)
— CDNA FLJ42670 fis, clone BRAMY2022383
— mannosidase, alpha, class 1C, member 1
— lipopolysaccharide binding protein
— Clones 24632 and 24634 mRNA sequence
— platelet derived growth factor D
— transcription elongation factor A (SID)-like 7
— N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2
— SAM domain containing 1
— Transcribed locus
— protocadherin beta 7

* 4F1560 #21と#28で差あり

Up regulation-3



— secretogranin II (chromogranin C)

* 他と少し違うパターン

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
4F1560 #21-1
4F1560 #21-2
4F1560 #28-1
4F1560 #28-2
4F1560 #28-3
4F1127 #22
5F0138 #24
4F0312 #28
4F1560 #28
4F0591 #28
4F0760 #28

図8 HL60細胞のプロテオーム解析における装置間のパフォーマンス比較

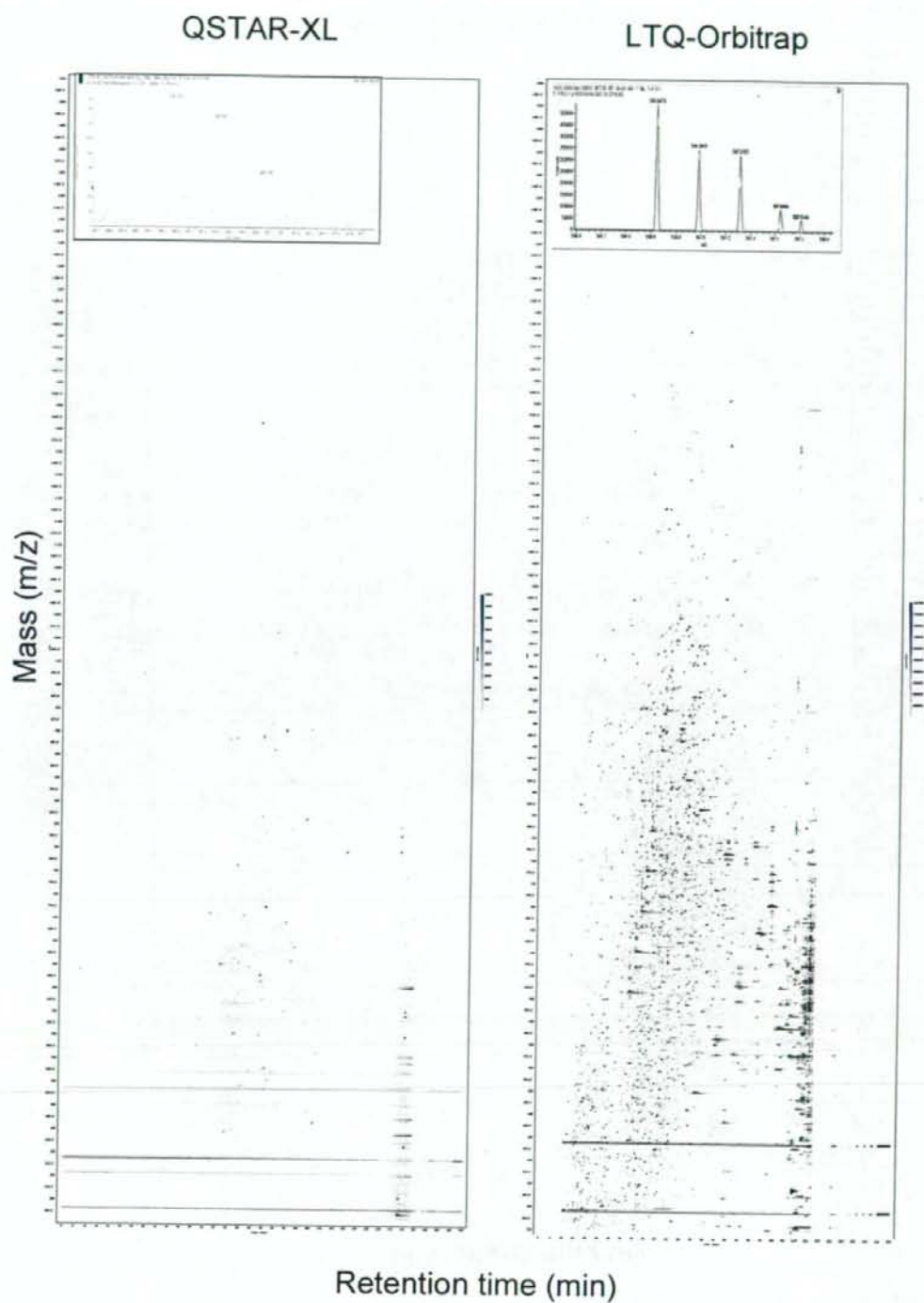


図9 hMSC細胞のプロテオーム解析

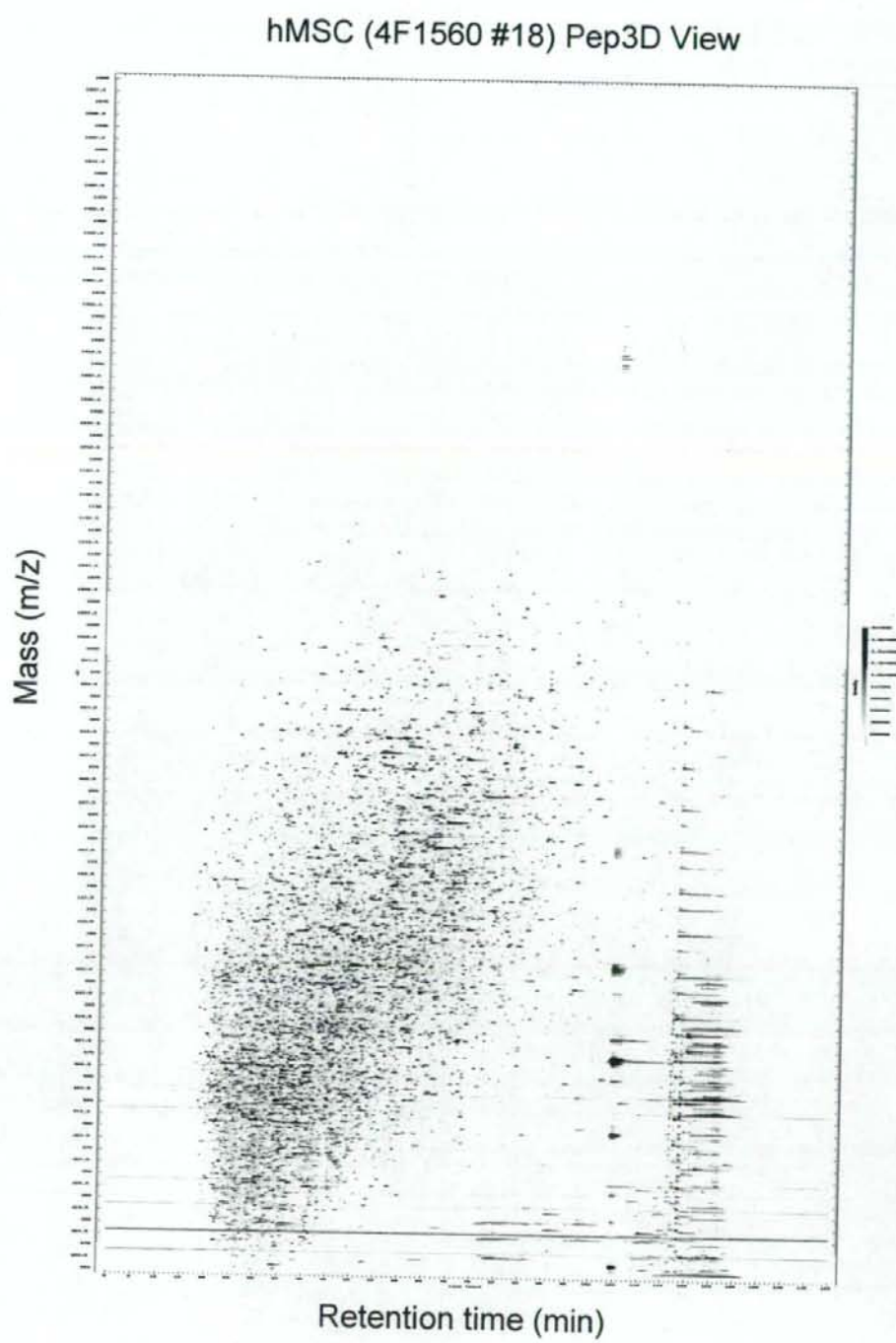


表 1 hMSC 細胞の培養過程における染色体変化の普遍性

Cell	hMSC										HSMM
	Lot#	4F1127			4F0312		5F0138		4F1560		
Passage#	11	11	23	5	23	7	23	25	22	7	
LOH	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
Copy Number Change	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	

表 2 ロット 4F1560 株の継代過程における FISH シグナル数変化と異常頻度

シグナル個数		判定	細胞数				
Ch8	Ch17		#12	#15	#17	#21	#24
1	2	正常	2	1	3	0	1
	3	異常	1	0	1	1	0
	6	異常	0	0	1	0	0
2	1	正常	1	3	2	0	0
	2	正常	75	60	48	41	0
	3	異常	11	28	34	33	73
	4	異常	5	5	9	13	15
	5	異常	0	0	0	4	5
	6	異常	0	0	0	1	2
3	2	正常	3	0	0	1	0
	3	正常	1	0	2	2	0
	4	正常	0	1	0	3	2
4	4	正常	1	1	0	0	0
	6	異常	0	1	0	0	1
	7	異常	0	0	0	1	0
合計	正常	83	66	55	47	3	
	異常	17	34	45	53	97	

表3 ロット4F1560株の継代過程におけるFISHシグナル数変化と異常頻度

Conc.		Time (h)					
μM	$\mu\text{g/ml}$	1	3	6	24	48	
5	1.51	変化なし	細胞周辺が変化	細胞の端が剥がれる	細胞が剥れる(一部残る)	細胞が剥れる(一部残る)	
1	0.30	変化なし	細胞周辺が変化	細胞の端が剥がれる	細胞が剥れる(一部残る)	細胞が剥れる(一部残る)	
0.5	0.15	変化なし	変化なし	細胞周辺が変化	細胞が剥がれ始める	一部剥がれる	
0.1	0.03	変化なし	変化なし	変化なし	細胞周辺が変化	一部剥がれる	
0.75	0.02	変化なし	変化なし	変化なし	細胞周辺が変化	細胞周辺が変化	

表4 hMSCの自然発生小核頻度に関する予備検討

	~1/3	1/3~1/2	Multi-MN	MN	total MN	分裂期細胞	多核細胞	変形核細胞	正常細胞	カウント	細胞数
hMSC F #6	8	0	3	11	11	1	3	0	489	500	
	6	2	2	8	10	2	4	0	492	500	
hMSC F #26	5	0	0	5	5	1	5	0	495	500	
	7	0	1	8	8	3	2	0	492	500	

自然小核

	~1/3	Multi-MN	total MN	カウント	細胞数
hMSC F #6	14	5	19	1000	
hMSC F #26	12	1	13	1000	

