

◆ NeuAc, ◇ NeuGc, Gal, ● Glc, ■ GlcNAc, ● Man, ▲ Fuc

Fig. 6 MSC 由来 N-結合型糖鎖の差異解析の結果, 及び N-結合型糖鎖の生合成経路  
縦軸は, 検出された全糖鎖のピーク面積に対する各糖鎖のピーク面積の割合を示す.

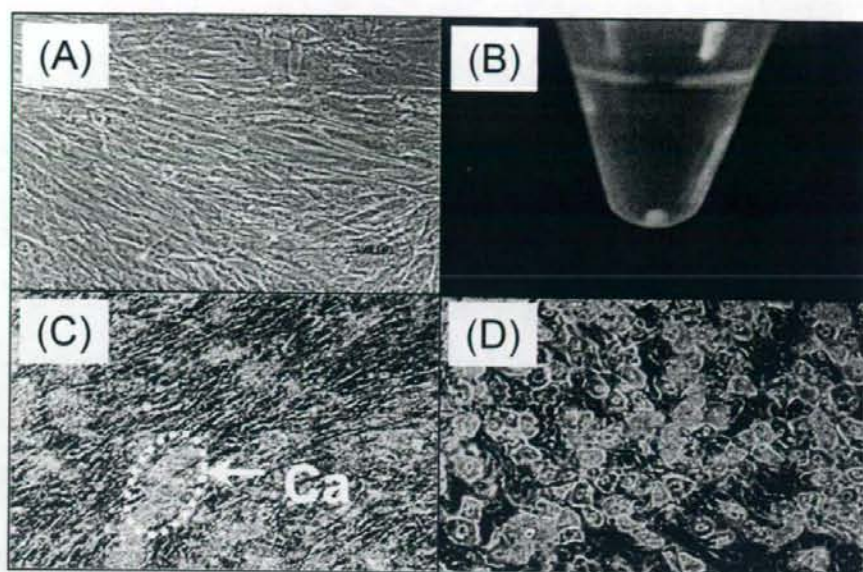


Fig. 7 MSC の骨、軟骨及び脂肪細胞への分化誘導. (A) 分化誘導前, (B)軟骨細胞への分化誘導により生じた球状細胞塊とグリコサミノグリカンの確認, (C) 骨細胞への分化誘導後のカルシウム蓄積の確認, (D) 脂肪細胞への分化誘導後の脂肪滴の確認

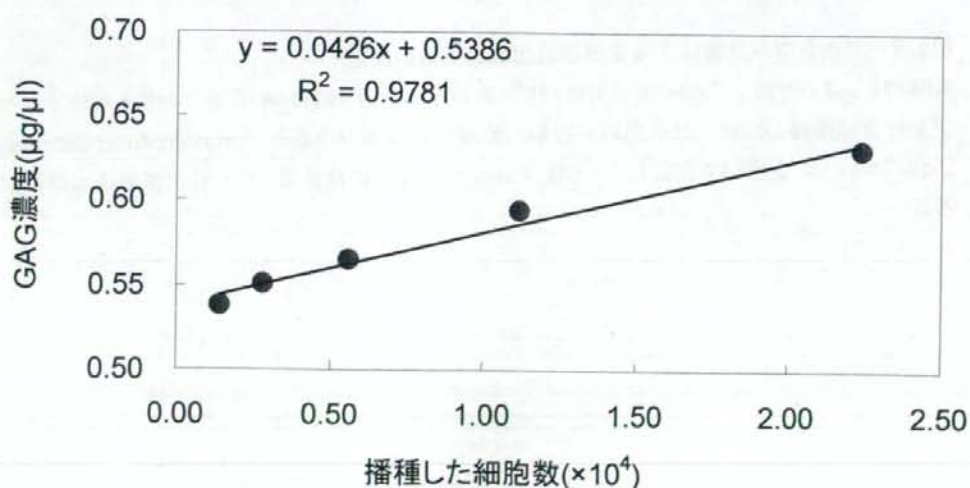
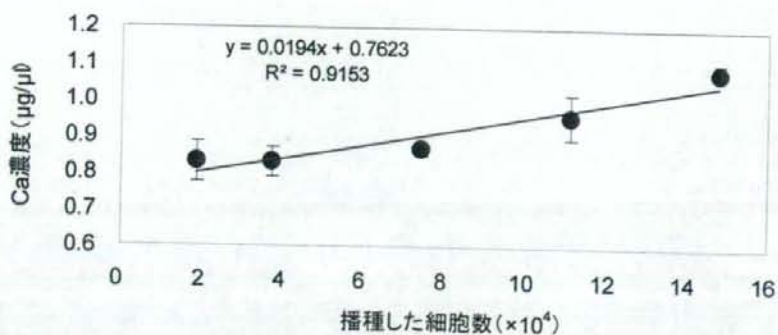


Fig. 8 GAG 定量による軟骨細胞分化能評価法の検討  
 $1.40 \times 10^3$ ,  $2.80 \times 10^3$ ,  $5.60 \times 10^3$ ,  $1.12 \times 10^4$ , 及び  $2.24 \times 10^4$  個の MSC の分化誘導を行い, 生成した GAG を Sulfated Glycosaminoglycan Quantification Kit を用いて定量した. グラフには GAG 定量の検量線を示す.

(A)



(B)

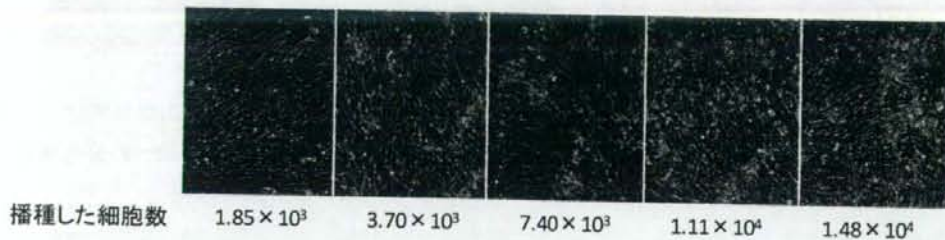
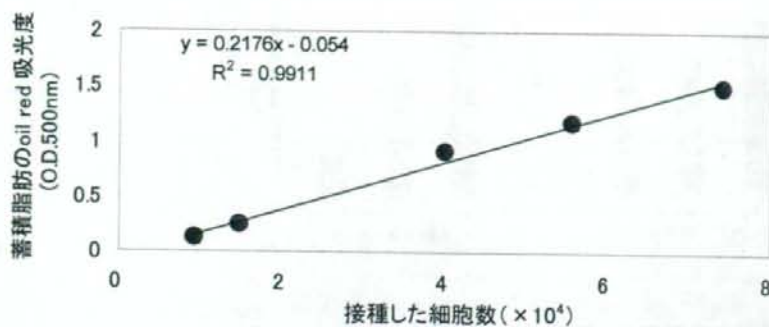


Fig. 9 カルシウム定量による骨細胞分化能評価法の検討

$1.85 \times 10^3$ ,  $3.70 \times 10^3$ ,  $7.40 \times 10^3$ ,  $1.11 \times 10^4$ , 及び  $1.48 \times 10^4$  個の MSC を 24 ウェルマイクロプレートに播種した後, 分化誘導を行い, 生成したカルシウムを Stanobio Total Calcium LiquiColor kit を用いて定量した. (A) カルシウム定量の検量線. (B) 分化誘導後の顕微鏡写真

(A)



(B)

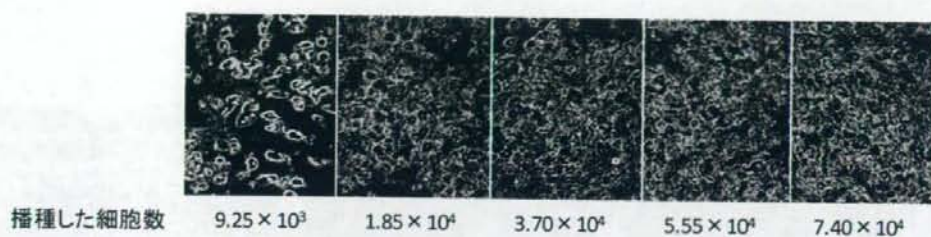


Fig. 10 脂肪定量による脂肪細胞分化能評価法の検討

$9.25 \times 10^3$ ,  $1.85 \times 10^3$ ,  $3.70 \times 10^3$ ,  $5.55 \times 10^4$ , 及び  $7.40 \times 10^4$  個の MSC を 24 ウェルマイクロプレートに播種した後、分化誘導を行い、生成した脂肪を Adipogenesis Assay Kit を用いて定量した。(A) 脂肪定量の検量線。脂肪を oil red 染色した後、O.D. 500 nm における吸光度として示した。(B) 分化誘導後の顕微鏡写真。



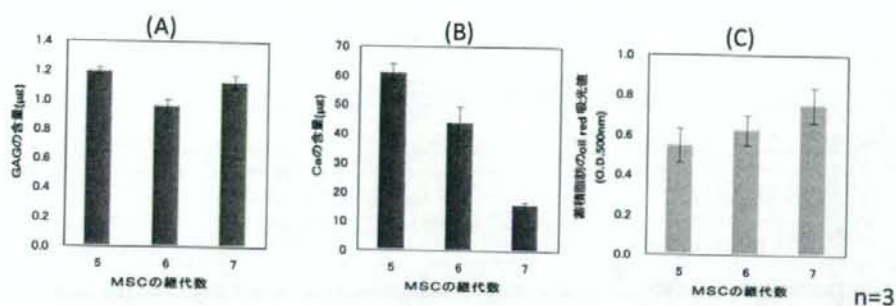


Fig. 11 継代数の異なる MSC (R36P5(+), R36P6(+)) 及び R36P7(+)) の分化能の測定(分化誘導期間, 21 日), (A) 軟骨細胞分化誘導後の GAG 定量, (B) 骨細胞分化誘導後のカルシウム定量, 及び (C) 脂肪細胞分化誘導後の脂肪定量

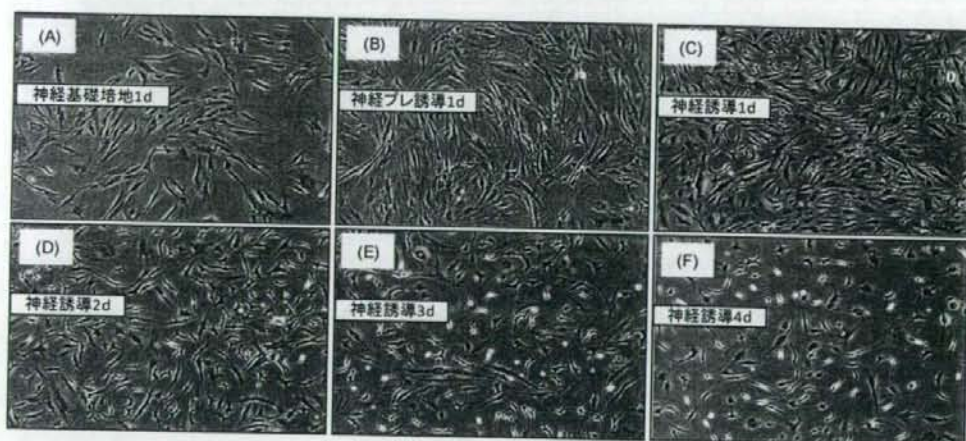


Fig.12 MSC の神経細胞への分化誘導及び細胞形態の変化の様子, (A) 神経分化基礎培地に播種後 1 日目, (B) 神経分化誘導プレ培地に播種後 1 日目, (C) 神経分化誘導培地播種後 1 日目, (D) 2 日目, (E) 3 日目及び(F) 4 日目

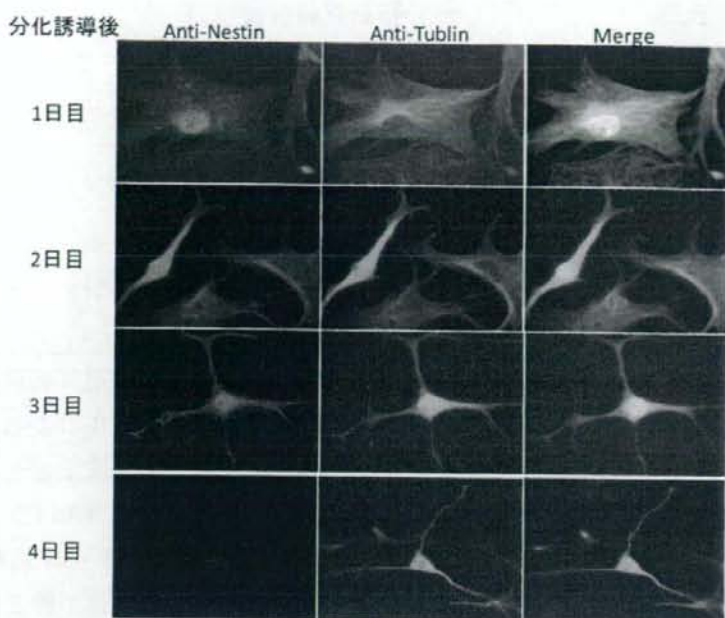


Fig. 13 神経分化誘導培地に播種後の細胞の免疫蛍光顕微鏡写真 Nestin,  $\beta$ III-Tublin に対する抗体を用いて細胞を染色した。

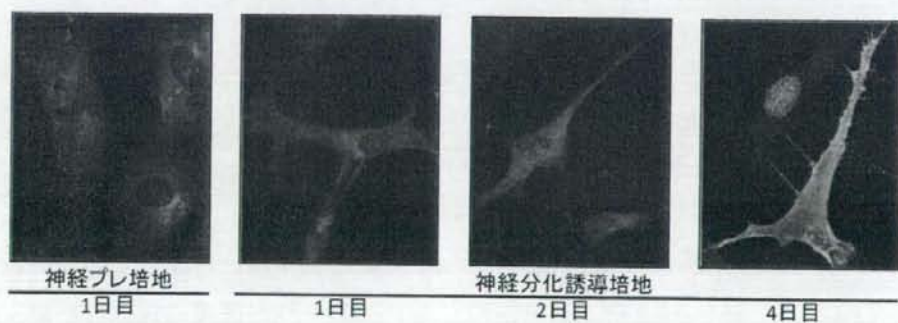


Fig. 14 TrkA 抗体を用いて免疫蛍光染色した神経分化細胞の顕微鏡写真

分担研究報告書

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

分担研究者 川端 健二

独立行政法人 医薬基盤研究所

基盤的研究部 遺伝子導入制御プロジェクト サブプロジェクトリーダー

本研究は、細胞組織加工医薬品等の免疫原性を事前に試験する評価法の開発を目指して、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。本年度は、外来造血幹細胞の移植効率を向上させることを目的として、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、以下の知見を得た。

1. Ad-CXCL12 をマウスに投与することにより、末梢血単核球数が約 2 倍に上昇することを見出した。またそれと並行して、骨髄細胞数は著減していた。
2. Ad-CXCL12 をマウスに投与することにより、CFU-GM 等種々の血液前駆細胞が骨髄から遊離し、末梢血あるいは脾臓に生着することを見出した。
3. 骨髄から遊離した細胞の中には造血幹細胞や骨髄球系細胞だけでなく、B 前駆細胞等のリンパ球も含まれていた。

研究協力者

水口裕之	(独) 医薬基盤研究所 大阪大学大学院薬学研究科
櫻井文教	(独) 医薬基盤研究所
田代克久	(独) 医薬基盤研究所 大阪大学大学院薬学研究科

A. 研究目的

ヒトあるいは動物の細胞や組織を培養・加工した細胞組織加工医薬品は難治疾患に対する治療薬として有望視されているが、本格的な実用化には多くの問題点が存在する。その一つが医薬品自体の拒絶・中和反応であり、細胞治療薬の抗原性(免疫原性)を試験する評価系の確立が急務である。本研究では、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。そのため、本年度は特に、外来造血幹細胞の移植効率を向上させることを目的として、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。CXCL12 は静止期造血幹細胞を骨髄に生着させるのに必須のケモカインである。そこで、Ad-CXCL12 をマウスに全身投与し血中 CXCL12 濃度を上昇させることで、骨髄中の造血幹細胞が末梢に遊離し、本来造血幹細胞がいるべき場 (niche) が空くことになり、外来造血幹細胞がより生着し易くなるのではないかと考え研究を行った。

## B. 研究方法

### B-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 法により行った。Cytomegarovirus (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 pHCMV-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-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 ♀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-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 $\times 10^5$  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-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 $\times 10^6$  cells/mL、骨髄は 1 $\times 10^5$  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. 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  $\mu\text{m}$  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。

## C. 研究結果

健常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  $5 \times 10^{10}$  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. 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. 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. 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<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> 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. 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. 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<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> 成熟 B 細胞が有意に減少していた (Fig. 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 IgM<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> 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. 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. 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. 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。

#### D. 考察

ヒト血液系を有したマウスを作製し、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。

#### E. 結論

CXCL12 発現 Ad ベクターをマウスに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 niche から遊離してくることが示された。これらの結果は、今後のヒト血液細胞を有するマウスの作製にとり非常に有用な知見であると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1. 論文発表

1. Sakurai F, Nakamura SI, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction following direct administration into organs of nonhuman primates. *Gene Ther.* in press.

2. Sakurai F, Nakamura S, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Transduction properties of adenovirus serotype 35 vectors after intravenous administration into nonhuman primates. *Mol. Ther.*, **16**; 726-733 (2008).

##### 2. 学会発表

1. Katsuhisa Tashiro, Kenji Kawabata, Asami Ino, Haruna Sakurai, Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi: Efficient Differentiation into Osteoblastic Lineage from Both Mouse Embryoid Bodies and Bone Marrow Stromal Cells by Adenovirus Vectors, 11th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Boston, USA, 2008 年 5-6 月

2. 田代克久、井野麻美、川端健二、桜井晴奈、桜井文教、水口裕之: 改良型アデノウイルスベクターを用いた骨芽細胞への高效率分化誘導法の開発. 第 31 回日本分子生物学学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸 (2008 年 12 月)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当事項なし

##### 2. 実用新案登録

該当事項なし

##### 3. その他

該当事項なし



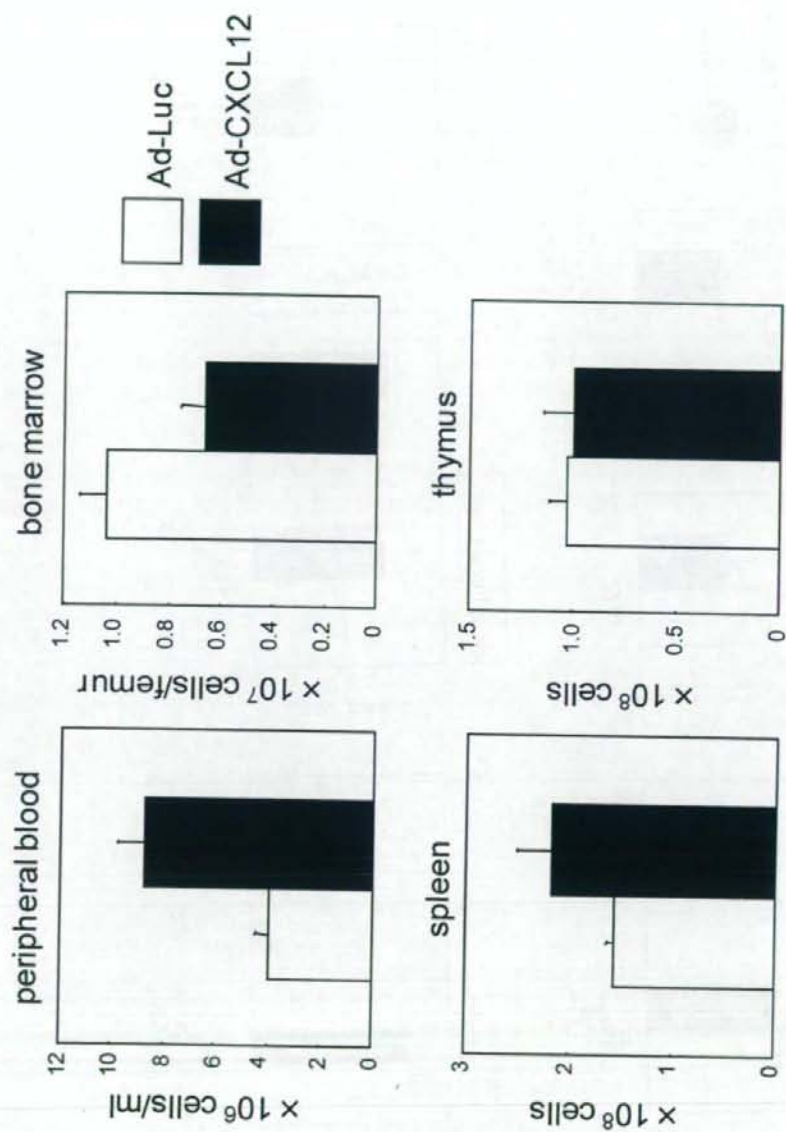


Fig.1 Cell number of each tissue 5 days after intravenous injection of Ad-CXCL12.

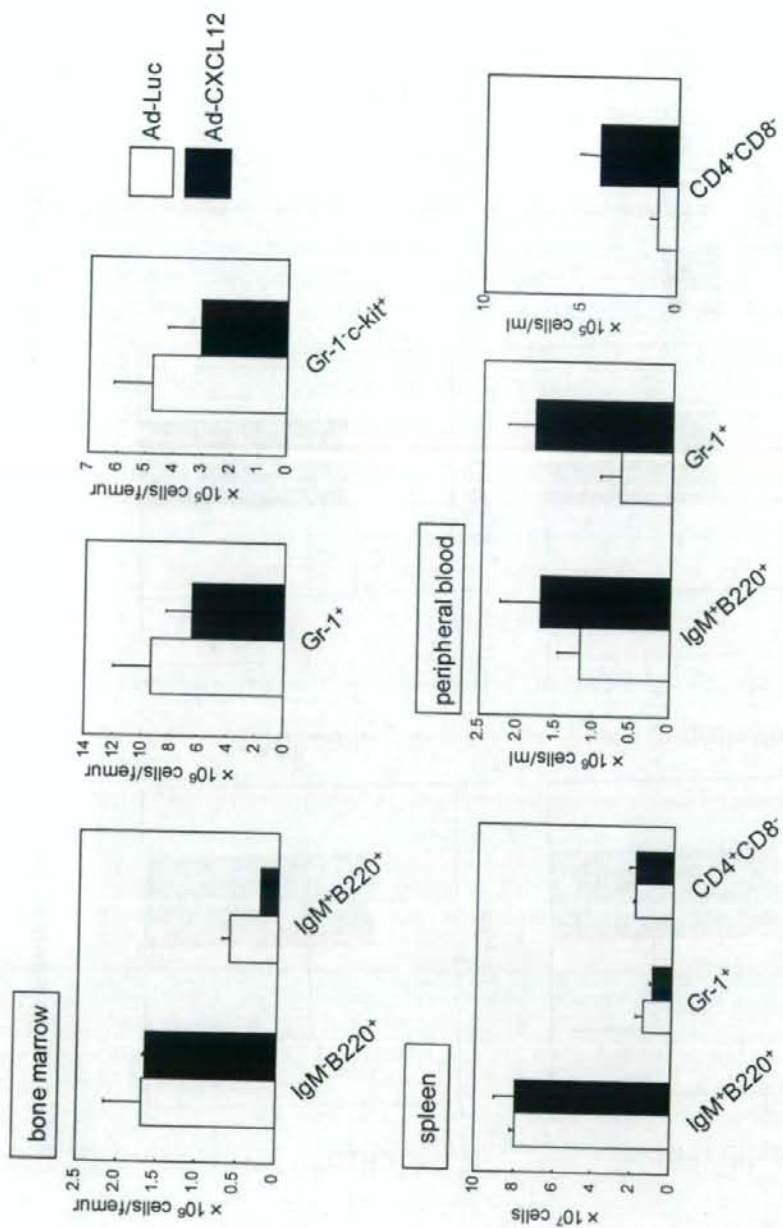


Fig. 2 Cell number of each lineage in tissues 5 days after intravenous injection of Ad-CXCL12.

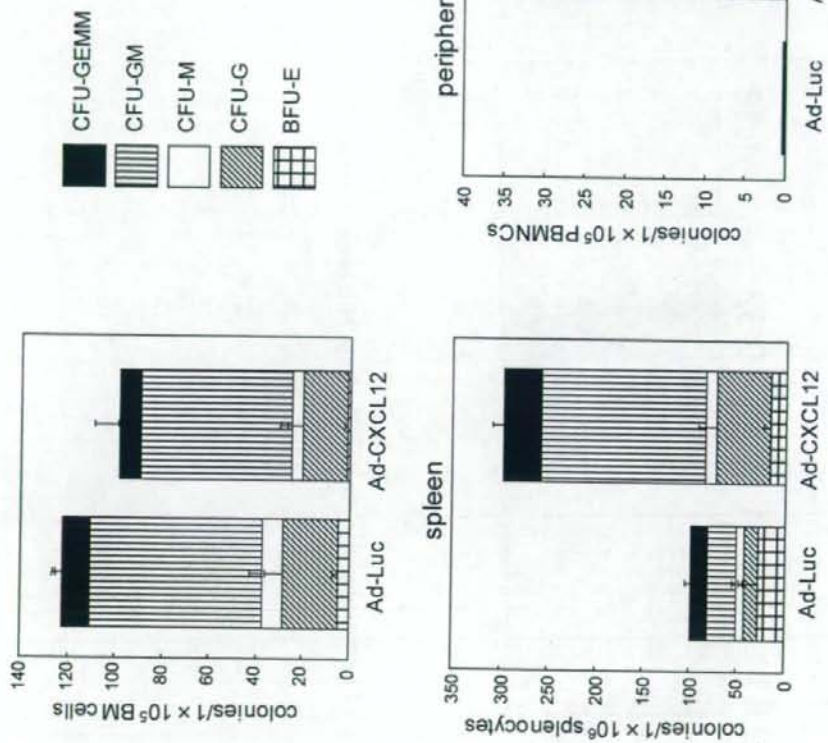


Fig. 3 Mobilization of hematopoietic progenitor cells from the bone marrow to peripheral tissues 5 days after injection of Ad-CXCL12.



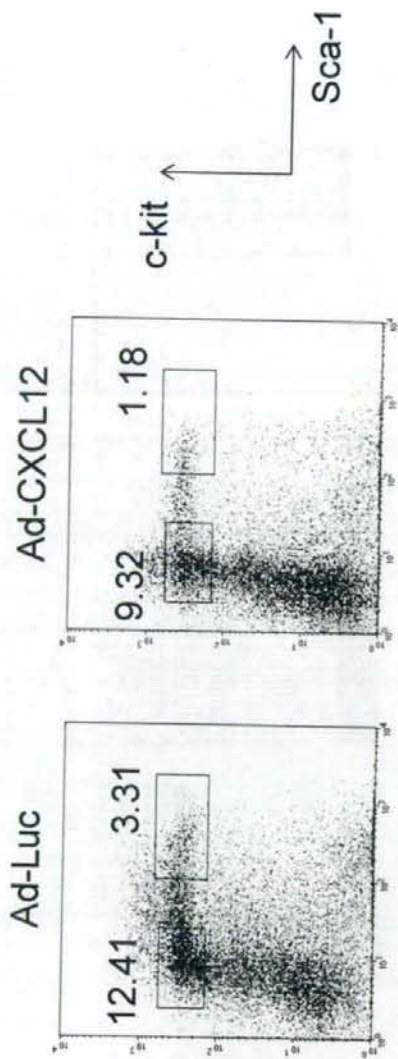


Fig. 4 Mobilization of hematopoietic stem cells from the bone marrow 5 days after injection of Ad-CXCL12.

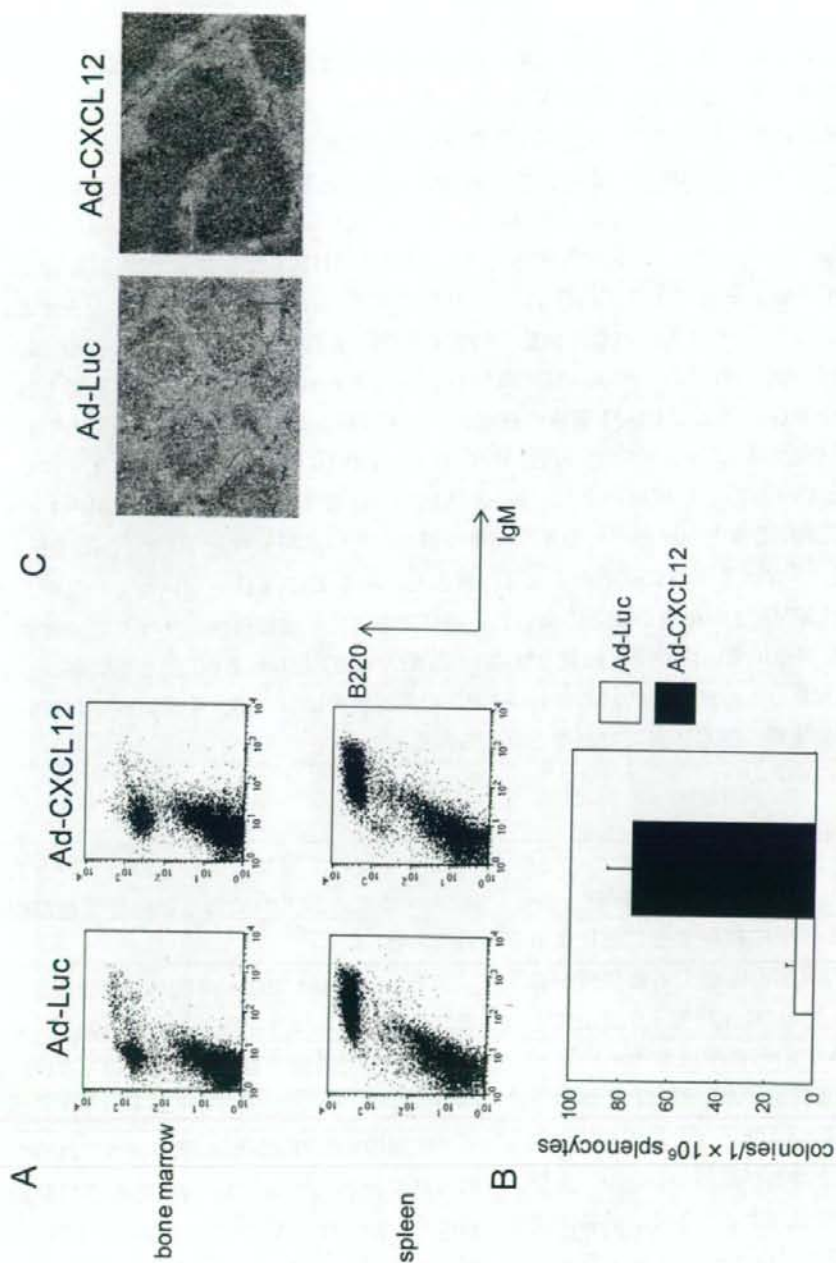


Fig. 5 Mobilization of B cell progenitors from the bone marrow 5 days after injection of Ad-CXCL12.

## 細胞組織加工医薬品の特性解析・品質管理に関する研究

研究分担者	石井明子	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部第二室長
研究協力者	豊田淑江	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部
研究協力者	北川博子	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部
研究協力者	鈴木浩子	慶応義塾大学大学院薬学研究科/国立衛研生物薬品部	

細胞・組織加工医薬品として血管再生療法での応用が期待される血管内皮前駆細胞 (Endothelial Progenitor Cells: EPC) には、early EPC と late EPC の 2 種類が存在することが知られており、それぞれの起源細胞や特性の解明、品質評価法の確立等が実用化に向けた課題となっている。本年度は、AC133 陽性細胞由来 early EPC について、形態と細胞表面マーカー CD45 および CD31 発現の観点から、単核球由来 early EPC と類似した性質を示すことを明らかにした。また、early EPC と late EPC の遺伝子発現プロファイルが大きく異なっていることを明らかにし、early EPC の血管形成促進作用に MMP-9 や CXCL9、CXCL10、IL-8 といったケモカイン類等が寄与している可能性を示した。Late EPC の遺伝子発現プロファイルは組織由来の血管内皮細胞である HUVEC と類似していたが、late EPC では MMP-1 の発現が顕著に高いことが見出された。細胞外マトリックスに対する浸潤活性は、組織由来の血管内皮細胞と比較して early EPC と late EPC でともに高かった。これらの知見は、early EPC および late EPC の品質管理において、確認試験や力価試験における評価指標の選定に有用であると考えられる。

## A. 研究目的

G-CSF で動員した末梢血 CD34 陽性細胞、あるいは骨髄単核球を局所に投与することにより虚血部位での血管の再生を促進する血管再生療法は、我が国でも精力的に臨床研究や先進医療としての治療が行われている再生医療の一つである。これらの治療で血管形成が促進される機構としては、投与された細胞集団に含まれる血管内皮前駆細胞の起源となる細胞が局所で分化し、血管形成を促進する因子を放出することや、血管内皮細胞に分化して血管を形成すること等が考えられる。しかし、骨髄採取等の患者への負担や、幹細胞の異所性分化の懸念があることに加えて、投与された細胞集団のうち、どのような細胞が、ど

のように働いて奏功しているのかという有効性のメカニズムが不明であるという問題が指摘されている。

一方、*in vitro* では、血液から単核球あるいは特定の表面マーカーを持つ細胞を分離し、VEGF 等の存在下で培養すると、培養開始 1 週間程度で early EPC、2~3 週間目から late EPC と呼ばれる 2 種類の血管内皮前駆細胞が誘導されることが知られている。それぞれの細胞の特性に関して詳細は明らかになっていないが、early EPC は血管形成を促進するサイトカイン類を分泌する性質を持ち、late EPC はそれ自身が新生血管に取り込まれる性質を持つ細胞であるとされており、*in vivo* においてもこれらの細胞が血管再生に寄与



していると考えられる。

したがって、患者から採取した血液細胞を原材料として early EPC や late EPC を調製し、品質・有効性・安全性の確保された細胞・組織加工医薬品として供給することができれば、現在の血管再生療法よりも低侵襲で有効性・安全性の高い方法として、血管再生療法を広く一般に提供することが可能になると考えられる。本研究では、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向けた課題解決を目的として、細胞の起源と特性に関する解析を行っている。本年度は、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。

## B. 研究方法

### 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。

### 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°C、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。

### 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°C、30 min で反応させた。陽性細胞の分離は、Auto MACS (Miltenyi 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。

### 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  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存し、以下の実験に CM として用いた。

#### 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。

#### 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-aminocoumarinyl 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。

#### 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 ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) 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  $4^{\circ}\text{C}$ 、1 時間、ブロッキングした。次に  $4^{\circ}\text{C}$ 、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、 $4^{\circ}\text{C}$ 、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、共焦点レーザー蛍光顕微鏡

LSM 510 (Zeiss) を用いて解析した。

#### 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  $300 \mu\text{l/well}$  添加した。 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  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。 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  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を位相差顕微鏡 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。

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

48 穴の改良型ポ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  $30 \mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $8 \mu\text{m}$  のポリカーボネートフィルターを用いた。改良型ポイデンチャンバーを  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  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、光顕下で数えた。

#### 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。RT2 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 (RT2 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。

#### 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 を用い、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ポアサイズは 8 μm 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、顕微鏡下で計数した。

#### 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。

#### 13) MMP-1 の Western blot 解析

培養上清 10 μL に 6×sample buffer を 2 μL 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) を用い、イメージアナライザー LAS-3000 (FUJI FILM) で測定した。

#### 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。

#### 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