

200906007A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

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

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口照英

平成22(2010)年 5月

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

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

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口照英

平成22(2010)年 5月

目 次

I. 総括研究報告書

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

山口 照英

II. 分担研究報告書

1. 細胞組織加工医薬品のウイルス安全性評価技術の開発 110
内田恵理子
2. 細胞組織利用医薬品の同一性や遺伝的安定性評価手法の開発に関する研究 . . . 124
鈴木 和博
3. 細胞組織加工医薬品の同等性評価技術の開発 147
川崎 ナナ
4. 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 176
川端 健二
5. 細胞・組織加工医薬品等の品質評価技術の開発に関する研究 185
佐藤 陽治
6. 細胞組織加工医薬品の特性解析・品質管理に関する研究 199
石井 明子
7. 細胞特性・品質解析技術としての O 結合型糖鎖解析技術の開発 212
早川 堯夫

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 223

IV. 研究成果の刊行物・別刷 229

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

総括研究報告書

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

研究代表者 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・部長

研究要旨 再生医療実用化に向けた細胞・組織加工医薬品の安全性・品質等の確保に関する基盤技術開発を目的とする研究により、以下の成果を得た。1) マイコプラズマの迅速検査法として PCR 法 3 種類と酵素活性に基づく方法について簡便性および検出限界の面から比較し、品質管理試験としての有用性を評価した。2) 骨髄間葉系幹細胞(MSC)における、クローナルな染色体異常の検出とその発生時期の解析を行い、細胞の造腫瘍性評価の上での染色体解析の重要性を示した。また、高感度ナノ LC-MS 測定によるショットガンプロテオミクスを用いた網羅的発現解析法の、細胞特性評価指標の探索における有用性を示した。3) MSC の神経様分化前後の N-結合型糖鎖の差異解析を行い、発現量に顕著な差がみられる糖鎖を明らかにした。また、プロテオミクスの手法により、MSC の神経様分化前後の細胞表面タンパク質の発現差異解析を行い、複数のタンパク質の発現量が変化することを見出した。4) 免疫原性評価のための基盤技術として、ヒト血液系保持マウスモデルの作製効率化におけるアデノウイルスベクター(Ad-CXCL12)の有用性を検討し、Ad-CXCL12 は造血幹細胞や血液前駆細胞のみならず B 細胞の動態にも影響をおよぼすことを示唆する結果を得た。5) 細胞特性評価指標の探索法開発として、MSC の虚血（低酸素低グルコース）ストレス下でのサイトカイン分泌プロファイルの解析における抗体アレイの有用性を評価した。6) 2 種類存在することが知られているヒト血管内皮前駆細胞(early EPC 及び late EPC) の特性指標の探索を行い、MMP-9 及び MMP-2 が early EPC の浸潤能に関連した機能的特性指標であることを明らかにした。7) 細胞特性解析技術である細胞のムチン型糖タンパク質糖鎖解析技術の応用拡大を目指し、O-結合型糖鎖であるムチン型糖鎖とグリコサミノグリカン (GAG) 型糖鎖を一斉解析し、包括的に O-結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリングを行う技術を開発した。

研究分担者

内田 恵理子
 鈴木 和博
 川崎 ナナ
 川端 健二
 佐藤 陽治
 石井 明子
 早川 堯夫
 中内 啓光
 中川 誠人

(順不同)

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第1室 室長
 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 部長
 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第1室 室長
 (独) 医薬基盤研究所 サブプロジェクトリーダー
 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第2室 室長
 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第2室 室長
 近畿大学薬学総合研究所 所長
 東京大学医科学研究所 教授
 京都大学 物質-細胞統合システム拠点/再生医科学研究所 講師

研究協力者

鈴木 孝昌
 押澤 正
 スレッシュ テイルパッティ
 田邊 思帆里
 小木 美恵子
 橋井 則貴
 黄 笑宇
 水口 裕之
 櫻井 文教
 田代 克久
 安田 智
 吾月 遥
 佐藤 光利
 豊田 淑江
 北川 博子
 木下 充弘
 掛樋 一晃

(順不同)

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 室長
 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 主任研究官
 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 流動研究員
 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 研究員
 金沢工業大学 情報フロンティア学部 教授
 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官
 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
 (独) 医薬基盤研究所/大阪大学大学院薬学研究科
 (独) 医薬基盤研究所
 (独) 医薬基盤研究所
 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 主任研究官
 東邦大学大学院薬学研究科 薬物安全性学教室
 東邦大学大学院薬学研究科 薬物安全性学教室 准教授
 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
 近畿大学薬学部
 近畿大学薬学部/近畿大学薬学総合研究所

A. 研究目的

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

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

細胞・組織加工医薬品は、非常に複雑な構造と「生きている」というこれまでの医薬品にない動的性質を持っており、新たな特性解析技術や品質管理法の開発、あるいは安全性確保のための適切な評価技術の開発が望まれている。本研究では細胞・組織加工医薬品の品質・安全性の確保するために、①感染因子に関する安全性評価技術の開発、②細胞の遺伝的安定性の評価技術手法に関する研究、③同一性・同等性評価法の開発、④免疫原性の事前評価法の開発、⑤細胞・組織加工医薬品の特性解析法の開発および製造方法・規格設定の評価手法の開発に関する研究を行うことを目的とし、本年度は以下の研究を行った。

- 1) マイコプラズマの迅速検査法としてPCR法3種類と酵素活性に基づく方法について簡便性および検出限界の面から比較し、品質管理試験としての有用性を評価した。
- 2) ヒト骨髄間葉系幹細胞(MSC)における、クローナルな染色体異常の検出とその発生時期の解析を行い、マイクロアレイを使ったCGH (Comparative Genome Hybridization) 法の有用性を評価した。また、高感度ナノ LC-MS 測定によるショットガンプロテオミクスを用いた網羅的発現解析法の、細胞特性評価指標の探索における有用性を評価した。

- 3) N-結合型糖鎖の差異解析およびプロテオミクスの、細胞同等性評価における有用性を評価する目的で、MSCの神経様分化前後におけるN-結合型糖鎖のプロファイリングを行うと同時に、細胞表層タンパク質の発現差異解析を行った。
- 4) 免疫原性評価のための基盤技術として、ヒト血液系保持マウスモデルの作製効率化におけるアデノウイルスベクター(Ad-CXCL12)の有用性を評価する目的で、Ad-CXCL12の造血幹細胞や血液前駆細胞およびB細胞の動態に対する影響を検討した。
- 5) 細胞特性評価指標の探索法開発として、MSCの虚血(低酸素低グルコース)ストレス下でのサイトカイン分泌プロファイルの解析における抗体アレイの有用性を評価した。
- 6) 2種類存在することが知られているヒト血管内皮前駆細胞(early EPC及びlate EPC)の特性指標の探索を行い、MMP-9及びMMP-2がearly EPCの浸潤能に関連した機能的特性指標である可能性を検討した。
- 7) 細胞特性解析技術である細胞のムチン型糖タンパク質糖鎖解析技術の応用拡大を目指し、O-結合型糖鎖であるムチン型糖鎖とグリコサミノグリカン(GAG)型糖鎖を一斉解析し、包括的にO-結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリングを行う技術を開発した。

B. 研究方法

B-1-1 マイコプラズマ

マイコプラズマ標品は製品評価技術機構特許微生物寄託センターの佐藤真則先生より供与された。特許微生物寄託センターにおいて、*Mycoplasma fermentans* (MBRC No. 14854) を 267 培地を使用して 5% CO₂ 条件下で培養し、10 倍希釈列を作成して室温でおいたもの（室温保存品）と冷凍保存したもの（凍結保存品）を用いた。希釈列作成時の原液の力価は 4.50 x 10⁶ CFU/ml であった。また、マイコプラズマ DNA 標準品として、0.2 µg/ml の Genomic DNA from *Mycoplasma hyorhinis* (ATCC17981D; 0.2 µg/ml) 及び Genomic DNA from *Mycoplasma orale* (ATCC23714D; 0.2 µg/ml) を使用した。

B-1-2 MycoAlert 法

酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法として、MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza) を用いた。測定はキット添付のマニュアルに従い、次のように行った。まず、マイコプラズマ希釈列又は陰性対照として滅菌水、陽性対照として MycoAlert assay control のいずれか 100 µl を 96 well opaque plate に duplicate で入れ、MycoAlert Reagent 100 µl を添加して 5 分間静置後、Wallac ARV0sx1420 マルチラベルカウンター (Perkin Elmer) を用いて 1 秒間の発光量を測定した (Reading A)。次に、MycoAlert Substrate を 100 µl 添加して 10 分間静置後、再度 1 秒間の発光量を測定した (Reading B)。Reading B / Reading A の値を算出し、1 未満をマイコプラズマ陰性、1 から 1.3

を偽陽性、1.3 以上をマイコプラズマ陽性と判定した。

B-1-3 Nested PCR 法

マイコプラズマの Nested PCR 法による検出は日本薬局方参考情報に記載されている方法に準じて行った。マイコプラズマ希釈列又は陰性対照として滅菌水 600 µl より DNA をクロロホルム抽出し、エタノール沈殿により回収した。得られた DNA は 40 µl の蒸留水に溶解し、5 µl を 1st PCR に使用した。PCR 反応の陽性対照 DNA として、*M. orale* 及び *M. fermentans* (100 fg/ µl) を 5 µl 使用した。1st PCR 終了後、1st PCR の反応生成物 2 µl を使用し、2nd PCR を実施した。PCR 反応は 1st PCR、2nd PCR とともに局方では 100 µl のところ 50 µl に変更し、次のプライマーを使用した。1st PCR: F1: 5'-ACA CCA TGG GAG YTG GTA AT-3'; R1: 5'-CTT CWT CGA CTT YCA GAC CCA AGG CAT-3'; 2nd PCR: F2: 5'-GTG SGG NTG GAT CAC CTC CT-3'、R2: 5'-GCA TCC ACC AWA WAC YCT T-3'

1st PCR, 2nd PCR の反応条件はいずれも 95°C で 11min 加熱した後、94°C 30sec の変性、55°C で 2min のアニーリング、72°C で 2min の伸長反応を 30 サイクル行い、72°C で 5min 処理を行った。

1st PCR 及び 2nd PCR の反応産物各 10 µl について、2%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、バンドの検出の有無で判定した。

B-1-4 リアルタイム PCR 法

マイコプラズマのリアルタイム PCR による検出は、MicroSEQ mycoplasma

detection assay (Applied Biosystems)を用いて行った。MicroSEQ mycoplasma detection assay は PrepSEQ mycoplasma nucleic acid extraction kit と MicroSEQ Mycoplasma Real-time PCR detection kit から構成されている。DNA の抽出は PrepSEQ mycoplasma nucleic acid extraction kit を使用し、無細胞系からのマイコプラズマ DNA の抽出法に従って以下の通り行った。まず、マイコプラズマ希釈液又は陰性対象の滅菌水 100 μ l を取り、10% SDS 1 μ l, 0.5M EDTA 1 μ l, RNase 5 μ l を加えて 56°C, 15min インキュベート後、さらに 2 μ l の Proteinase K を添加して 56°C, 5min インキュベートした。これに Lysis buffer 200 μ l を混合し、室温で 5分 インキュベートしてライセートを調製した。ライセートに 30 μ l の磁気ビーズ溶液と 200 μ l の Binding solution を添加混合した。15,000 x g で 15sec 遠心後、マグネティックスタンドで磁気ビーズを磁石に捕集し、上清を除去した。磁気ビーズに 300 μ l の 95%エタノールと lysis buffer の 3:2 混合物を添加し、転倒混和後、同様の操作でマグネティックスタンドに磁気ビーズを回収、上清を除去した。さらに 300 μ l の wash solution を添加して 2回洗浄した後、磁気ビーズを風乾した。100 μ l の elution buffer を添加して 70°Cで 7分間 incubate 後、磁気ビーズをマグネティックスタンドに捕集し、マイコプラズマ DNA 溶液を回収した。

リアルタイム PCR は MicroSEQ Mycoplasma Real-time PCR detection kit を使用し、抽出した DNA 溶液 10 μ l を Power SYBR Green PCR Master Mix 15 μ l, Mycoplasma Real-Time PCR Primer

Mix 3 μ l と混合し、定量 PCR 反応を行った。測定機器は PRISM7000 リアルタイム PCR システム(Applied Biosystems)を使用した。反応条件は、95°C, 10 min で酵素活性化後、95°C, 15 sec と 60°C, 1 min の条件で 40 cycle 行った後、95°C, 15 sec, 60°C, 20 sec, 95°C, 15 sec の条件で dissociation を行った。結果の判定は Ct 値 (Threshold Cycle) が 36 未満、dissociation curve の Tm 値が 75~85°Cであればマイコプラズマ陽性、それ以外は陰性と判定した。

B-1-5 PCR-ELISA 法

PCR-ELISA法によるマイコプラズマの検出は、Mycoplasma PCR-ELISA kit (Roche Applied Science)を用いてマニュアルに従って行った。但し、DNAの抽出操作についてはマニュアルどおりではなく、Nested PCR法用にマイコプラズマ希釈液から調製したDNAを使用して、PCR反応以降を実施した。PCR反応はマイコプラズマDNA 10 μ l を PCR ready-to-go mix 25 μ l と蒸留水 15 μ l と混合し、50 μ l の反応系で実施した。反応条件は 5 min, 95°Cで熱処理後、94°C, 30 sec; 62°C, 30sec; 72°C, 1minのサイクル反応を 39回繰り返し、72°C で 10 min 処理した。PCR反応後、反応産物 10 μ l を 40 μ l の Denaturation reagent と混合して 10分間反応させた。これに Hybridization reagent 450 μ l を加え、200 μ l を ストレプトアビジンコートマイクロプレートの各wellに移して 300 rpm で振とうしながら 37°C で 3時間反応させた。プレートを洗浄緩衝液で洗浄後、anti-DIG-POD working dilution を 200 μ l/well 添加し、室温で 30分間 反応させた。さらに洗浄後、TMB 基質溶液 100 μ l を 添加

して20分間反応させた。停止液を100 μ l加え、マイクロプレートリーダー (BioRad 680) を用いて450 nmと630 nmの吸光度差を測定し、0.2以上の場合をマイコプラズマ陽性と判定した。

B-2-1 細胞の染色体安定性に関する検討

B-2-1-1 使用した細胞株

Cambrex 社より入手した正常ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 (hMSC) のうち、異常が認められたロット4 F1560 と同一ロットを、本研究所療品部よりご恵与いただき、培養を行った。hMSCは4継代目にて入手後、間葉系幹細胞培養用基本培地培地 Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM) に間葉系幹細胞添加因子セット (MSCGM SingleQuots、TAKARA) および10%FBSを添加し培養を行い、70-80%コンフルエントの状態を継代を続けた。

B-2-1-2 間期核の FISH 解析

これまでの検討で染色体異常が認められた hMSC のロット4F1650 について、同一ロットを療品部より入手し、11継代した後、間期核のスライド標本作製し、以下に示した FISH プロブを用いて、染色体の数的異常の頻度に関する検討を行った。

- Vysis CEP8 Spectrum Green
- Vysis CEP17 Spectrum Orange

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

B-2-1-3 染色体解析

療品部由来 hMSC、Lot 4 F1560 細胞を

長期継代し、約20継代目の細胞のGバンド法およびm-FISH法による染色体解析を、(株)日本遺伝子研究所に委託した。

B-2-2 細胞のプロテオーム解析

B-2-2-1 サンプルの前処理

(タンパク質の抽出)

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、450 μ lのアセトンを加えてタンパク質を沈殿させ、30 μ lのRapiGest溶液に溶解した。

(還元アルキル化)

タンパク溶液30 μ lに、30 μ lの10mM DDTを加え、60°C30分間反応させて還元後、室温に戻した後、60 μ lの30mM ヨードアセトアミド溶液を加え、遮光して室温にて30分間反応させた。

(トリプシン消化)

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

B-2-2-2 ナノ LC

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

B-2-2-3 質量分析装置

本研究に使用した質量分析装置は、昨年度の検討よりより高感度、高精度の測定が可能であった ESI-ion trap/FT 型 LTQ-Orbitrap(Thermo Fisher)であり、前述のナノ LC とオンライン接続し、LC-MS としての測定を行った。通常の測定は、ポジティブモードを使用した。ESI ナノスプレー用チップとして、KYA 社製および New Objective 社製スプレーチップを使用した。逆相カラムにてペプチドを分離後、ナノスプレーインターフェースにて質量分析装置へと導入した。この際、スプレー電圧は 1600V から 2400V の間でスプレーチップの劣化に応じて変更し、安定したスプレーを得ることを確認した。

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

(LTQ-Orbitrap)

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

その他のパラメーターは、測定を行いながら最適化した。

B-2-2-4 TOF マス測定とデータ処理

LTQ-Orbitrap による質量分析データは、基本的に付属のソフトウェアである Xcalibur を用いて解析し、LTQ-Orbitrap の場合には、FT-MS 測定と MS/MS 測定が同時に行われるため、基本的にデータ依存的 MS/MS 測定 (上位 3 親イオンを測定) を同時に行い、スキャンスピードはノーマルに

設定した。

Raw データの解析のため、Analyst にて作成される Wiff 形式ファイルおよび Xcalibur にて生成される Raw 形式のファイルの加工のため、共通フォーマットである mzXML への変換ツールとして、Systems Biology Institute より提供されている Trans-Proteomic Pipeline (TPP) というソフトウェアを利用した。このソフトウェアにより、mzXML 形式ファイルを、さらに LC-MS データとしての 3D グラフによる可視化を行った。また、同時に独自の定量解析ソフトとして”mzMore”と名付けたソフトウェアの開発を進めた。

B-2-2-5 データベースサーチによるタンパク質の同定

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

B-2-2-6 Progenesis LC-MS ソフトウェアによる定量解析

ノンラベルによるサンプル間の各ペプチ

ドピークの定量比較を行う目的で、Nonlinear Dynamics 社製、Progenesis LC-MS ソフトウェアを使用した。本ソフトウェアは、二次元電気泳動のゲルスポットの定量比較のために開発されたソフトウェアを基本とし、LC-MS 用に開発されたものである。LTQ-Orbitrap からの生データである Raw 形式のファイルを直接読み込むことができ、TPP と同様に 3D グラフ化が可能である。この画像化されたデータを元に、異なるサンプル間のリテンションタイムの補正を行うことにより、ペプチドスポットのマッチングを行い、複数のサンプル間の定量比較および、統計解析を行うことが可能である。また、MS/MS データを含む複数の Raw データを統合して MASCOT 検索を行う機能もあり、同定結果を取り込んで、タンパクレベルでの解析を行うこともできる。

B-3-1 細胞及び試薬

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC, MSC-R36) は理化学研究所バイオリソースセンター (RIKEN BRC CELL BANK) より供与された。Mesenchymal stem cell growth medium (MSCGM) は Lonza (Basel, Switzerland) より購入した。Peptide-N-glycosidase F (PNGase F) は、Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) から購入した。

B-3-2 細胞培養

MSC は L-glutamine を添加した MSCGM 培地 (10 ml/10 cm ディッシュ) で培養 (5%CO₂, 37°C) した。セミコンフルエントまで培養し、0.02% EDTA を添加した PBS

で洗浄を行い、0.25% Trypsin-EDTA (GIBCO, MD, USA) により細胞を剥離した後、10cm ディッシュに約 2×10⁵ の細胞を播種して継代培養を行った。

B-3-3 神経様細胞への分化誘導

以下の 2 種類の 방법으로 MSC の神経様分化誘導を行った。

B-3-3-1 誘導法 A

細胞分化には、神経誘導基礎培地、神経プレ誘導培地及び神経誘導培地の 3 種類の培地を用いた。神経誘導基礎培地として、15% FCS , 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine 及び 1% Sodium pyruvate を添加した Prime DMEM Low-glucose 培地 (Invitrogen, CA, USA) を用いた。神経プレ誘導培地として、20% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine 及び 10 ng/ml の bFGF を添加した Prime DMEM Low-glucose 培地を用いた。神経誘導培地には、Prime DMEM Low-glucose 培地に 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine , 20ng/ml bFGF, 25 mM KCl, 100 mM Putrescine, 30 nM Sodium selenite, 2% Dimethyl sulfoxide, 100 mM Butylated hydroxyanisole , 20 nM Progesterone, 5 mg/ml Insulin, 及び 100 mg/ml Transferrin を添加したものをを用いた。

神経誘導基礎培地 (10 ml/10 cm ディッシュ) を用いて、2×10⁵ 個の MSC を 24 時間培養 (5%CO₂, 37°C) した後、神経プレ誘導培地を用いて 2 回洗浄し、神経プレ誘導培地 (10 ml) を添加して 24 時間培養した (10 cm ディッシュ, 5%CO₂, 37°C) 。プレ神経誘導が終了後、神経誘導培地を用いて細胞を 2 回洗浄し、神経誘導培地 (10 ml/10

cm ディッシュ) で 2 日間神経誘導した。24 時間培養した後に培地を一回交換した。

B-3-3-2 誘導法 B

神経誘導基礎培地には, HyClone AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cell Expansion Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いた。神経誘導培地には HyClone AdvanceSTEM Neural Differentiation Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。神経誘導基礎培地 (10 ml/10 cm ディッシュ) を用いて, 2×10^5 個の MSC を 24 時間培養 (5%CO₂, 37°C) した後, 神経誘導培地を用いて細胞を 2 回洗浄後, 神経誘導培地 (10 ml/10 cm ディッシュ) で 2 日間神経誘導した。24 時間培養した後に, 培地を一回交換した。

B-3-4 細胞由来タンパク質の調製

培養終了後, 細胞をプロテアーゼインヒビター (protease inhibitor mix DMSO solution, Sigma, MO, USA) を添加した PBS (pH 7.2, 日水製薬(株), 東京) を用いて 3 回洗浄した, Cell Lifter (Corning, NY, USA) を用いて回収した。洗浄済み細胞 ($2 \sim 4 \times 10^5$ 個) を, プロテアーゼインヒビターを添加した LIPA バッファー (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.25% Sodium Deoxycholate, 1% NP-40, 1% protease Inhibitor) で溶解し, 不溶性物質を遠心分離 (4°C, 8,000 ×g, 5 分) により除去した後, 上清を分取して, タンパク質試料溶液とした。Non-Interfering Protein Assay Kit (CALBIOCHEM, CA, USA) を用いてタンパク質濃度を定量した後, タンパク質試料溶液を -20°C で保存した。

B-3-5 還元アルキル化タンパク質の調製

ProteinExtract Protein Precipitation Kit (CALBIOCHEM) を用いて脱塩した乾燥タンパク質 (100 μg) を 50 μl の 8 M グアニジン-HCl / 0.5 M Tris-HCl (pH 8.6) に溶解させた。まず, この溶液に 2 μl の 1 M dithiothreitol (DTT, 終末 40 mM) を加えて 65°C で 30 分間, 遮光下で加熱し, タンパク質を還元した。次いで, 4.8 μl の 1 M モノヨード酢酸ナトリウム (終末 96 mM) を加えて室温, 暗所で 40 分間反応させて, シス테인残基のチオール基をカルボキシメチル化した。反応終了後, ProteinExtract Protein Precipitation Kit を用いて脱塩し, 還元アルキル化タンパク質とした。

B-3-6 糖鎖の切り出し

回収した還元アルキル化タンパク質を 200 μl の 100 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁させた後, 5 unit の PNGase F を加えて, 37°C で 2 日間反応させて N-結合型糖鎖を切り出した。反応溶液に, 冷エタノール (終末 60%) を加えて, -20°C で 2 時間インキュベートした後, 遠心分離 (4°C, 8,000 ×g, 5 分間) によりタンパク質を除去した。遊離した N-結合型糖鎖を含む上清を Speed Vac により乾燥させた。乾燥糖鎖試料は, MSC 及び神経様分化細胞共に 3 種類ずつ調製した。

B-3-7 ¹²C-及び¹³C-フェニルヒドラジンによる糖鎖の標識

MSC 由来乾燥糖鎖, 及び神経様分化細胞由来乾燥糖鎖に H₂O を 100 μl ずつ加えて溶解し, それぞれに 4 μmol の ¹²C-PHN 塩酸塩 (Aldrich, MO, USA) 及び ¹³C-PHN 塩酸塩

(Cambridge Isotope Laboratories, MA, USA)を加えた。それぞれの溶液に 10 μmol の 2-ピコリンボラン (純正化学, 東京) を加えて攪拌し, 遮光下 55°C で 1 時間インキュベートした。2-ピコリンボランを完全に溶解するために, 適宜, 攪拌操作を繰り返した。反応終了後, 100 μl のクロロホルムを加えて激しく攪拌した後, 遠心分離 (1,000 \times g, 30 秒) を行った。クロロホルム層を除去した後, 再度 100 μl のクロロホルムを加えて同様の操作を 2 回繰り返す, 過剰な試薬を除去した。最後に, H₂O 層を分取した後, タンパク質あたり等量となるように混合し, 3 種類の分析試料溶液を調製した (Table 8 及び Fig. 16)。

B-3-8 細胞表層タンパク質のイミノビオチン標識

細胞表層タンパク質のイミノビオチン標識には, Iminobiotin Protein Labeling Kit (PerkinElmer, MA, USA) を用いた。細胞を培養後, 修飾ビオチン (0.9 mg/10 cm²ディッシュ) により細胞表層のタンパク質を室温で 1 時間標識した後, 0.1M グリシンを含む PBS (2 ml) によりイミノビオチン修飾反応を停止させた。細胞の回収は, 3) に従って行った。

B-3-9 SDS-PAGE

サンプルと等量のサンプルバッファー (7 M Urea 及び 2M Thioureaを含む) を加えて, 95°C で 5 分間前処理した。ゲルには 5~20% のグラジュエントゲル (e-PAGEL, アトー(株), 東京) 用い, 電気泳動装置にはパジェェルラン (アトー(株)) を使用した。定電流を 40mA に設定して, 90 分間電気泳動を行った。

B-3-10 アガロースゲル二次元電気泳動

B-3-10-1 一次元目等電点電気泳動

一次元目のアガロースゲルには, agar GEL A-M310 pH 3-8 及び pH 3-10 (アトー(株)) を用いた。電気泳動装置には, AE-6541 ディスクラン (アトー(株)) を使用した。定電圧を 300 V に設定し, 210 分間泳動した。電気泳動終了後, ゲルを固定液 (2.5% トリクロロ酢酸) にて 3 分間固定し, MilliQ で 1 分間の洗浄を 3 回, さらに 2 時間の洗浄を 1 回行った。

B-3-10-2 二次元目電気泳動

二次元目の SDS-PAGE ゲルには, e-PAGEL (7.5%) を用いた。電気泳動装置には, AE-6531P パジェェルラン (アトー(株)) を使用した。洗浄済み一次元目アガロースゲルを SDS 平衡化液 (50mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 0.001% BPB) 中で 10 分間平衡化後, SDS-PAGE ゲルの上端にアプライし, 定電流 40mA で 90 分間電気泳動を行った。

泳動終了後, ゲルを 50% のイソプロパノール溶液に移し, 室温で 15 分間固定した後, Rodamin 標識ストレプトアビジンを用いて, 室温で一晩染色した。イミノビオチン修飾したタンパク質の画像は, Typhoon 9400 (GE Healthcare Lifesciences, MA, USA) を用いて, レザー及び蛍光フィルターを 532nm 及び 580 nm BP 30nm に設定して取り込んだ。スポットのマッチング及びスポットの定量等の画像解析には, DeCyder 2D Differential Analysis Software Version 6.0 (GE Healthcare Lifesciences) を用いた。

B-3-11 ゲル内消化

画像解析終了後、スポットを切り出し、ゲルを 1.5 ml チューブに移した。チューブ内でゲル内消化を行った。まず、100 μ l の 50%メタノールを含む 50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液で 30 分間振とうし、ゲル片を脱色した。さらに 100 μ l の 100% アセトニトリルで 30 分間インキュベートした後、Speed Vac で完全に乾燥させた。乾燥させたゲル片に 5 μ l のトリプシン溶液 (20 μ g/ml, 0.1% オクチルグルコシドを含む 20 mM 重炭酸アンモニウム) を加え、37°C で一晩反応させた。50 μ l の 1% トリフルオロ酢酸水溶液/50% アセトニトリルを加え、4°C で 5 分間超音波処理し、ペプチド抽出液を回収した。次いで 70 μ l の 0.2% トリフルオロ酢酸水溶液/50% アセトニトリルを加え、再度抽出処理を行った。さらに 100% アセトニトリルを加えて、室温で 15 分間インキュベート下の後に抽出液をすべて回収し、Speed Vac を用いて濃縮した。

B-3-12 LC/MS

nanoLC には Paradigm MS4 (Michrom BioResources, CA, USA) を使用した。溶離液には 2% アセトニトリルを含む 0.1%ギ酸溶液 (A 溶媒) 及び 90% アセトニトリルを含む 0.1%ギ酸溶液 (B 溶媒) を使用した。流速は 300 nl に設定した。質量分析 (MS) 装置にはナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源 (AMR, 東京) を接続した Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR-MS, LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific) を使用し、ポジティブイオンモードでデータを取得した。

PHN 標識糖鎖の分析及びタンパク質同定で用いたカラム、グラジュエント条件、シ

ングル MS 及び多段階 MS (MS^n , $n=2\sim 4$) 測定条件は、以下の通りであった。

B-3-12-1 PHN 標識糖鎖の分析

カラム : C30 (Develosil Packed Column, 0.075 \times 150 mm, 粒子径 5 μ m, 野村化学, 東京)

トラップカラム : C18 (L-Culumn, 0.3 \times 5.0 mm, 粒子径 5 μ m, (財) 化学物質評価研究機構, 東京)

グラジュエント条件 : 2–45%B 溶媒 (リニアグラジュエント, 60 分間)

シングル MS スキャンモード : FT-MS

MS^n スキャンモード : IT-MS

スキャン範囲 : m/z 700-2,000

キャピラリー温度 : 275°C

スプレー電圧 : 2.5ekV

MS^n の衝突エネルギー (コリジョンエネルギー) : 25%

B-3-12-2 タンパク質同定

カラム : C18 (L-Culumn, 0.075 \times 150 mm, 粒子径 3 μ m, (財) 化学物質評価研究機構)

トラップカラム : C18 (L-Culumn, 0.3 \times 5.0 mm, 粒子径 5 μ m, (財) 化学物質評価研究機構)

グラジュエント条件 : 2–65%B 溶媒 (リニアグラジュエント, 50 分間)

シングル MS 及び MS/MS スキャンモード : IT-MS

スキャン範囲 : m/z 400-2,000

キャピラリー温度 : 200°C

スプレー電圧 : 2.0ekV

MS^n の衝突エネルギー (コリジョンエネルギー) : 35%

データベース検索エンジン :

TurboSEQUENT (Thermo Fisher Scientific)
データベース : NCBIInr (02 / '09)

B-3-13 ウェスタンブロット

SDS-PAGE を行った後、タンク式ブロッテイング装置 KS-8451 (System Instruments, 東京) を用いて、タンパク質を PVDF 膜 (Bio-Rad, CA, USA) へ転写した(定電流 400 mA, 240 分間). 転写バッファーは CAPS バッファー (100 mM CAPS, 10% メタノール, pH 11.0) を使用した. 転写終了後, Cy5 monofunctional reactive dye label antibody or other protein (GE Healthcare) により全タンパク質を染色した後, Membrane blocking agent (GE Healthcare) を用いて 4°C で一晩ブロッキングした. タンパク質 A の一次抗体及び二次抗体を, それぞれ Can Get Signal 1 及び 2 (東洋紡, 東京) を用いて希釈した後, 順次 4°C で 1 時間反応させた. 反応前後の PVDF 膜は, 0.1% Tween 20 を含む PBS を用いて 10 分間洗浄した(合計 3 回). 検出には Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) を用いた. スキャナーは Typhoon 9400 を使用した. アプライしたタンパク質量が等量であることは Cy5 イメージで確認した.

B-3-14 免疫蛍光染色

Rabbit anti-human Nestin IgG (N1602), Goat anti-human GFAP IgG (N18) 及び mouse anti-Human β III-Tubulin IgG (AB14545) は, それぞれ(株)免疫生物研究所 (群馬), Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) 及び Abcam (Cambridge, UK) から購入した. TRITC 標識 Goat anti-rabbit IgG, FITC 標識 Rabbit anti-goat IgG, 及び FITC 標識 Rat anti-Mouse

IgG2a は, それぞれ Beckman Coulter (CA, USA), Sigma, 及び BD Biosciences (CA, USA) から購入した.

細胞を PBS で 3 回洗浄し, 4% の PFA を含む PBS を用いて, 室温で 15 分間固定した. PBS で 2 回洗浄後, 0.2% TritonX により室温 10 分間の処理により, 細胞膜に穴を開けた. PBS で 2 回洗浄した後, 3% BSA を含む PBS を用いて, 室温で 15 分間ブロッキングした後, PBS を用いて希釈した一次抗体と 37°C で 2 時間反応させた. 0.05% TritonX で 3 回洗浄した後, PBS を用いて希釈した二次抗体と 37°C で 30 分間反応させた. 0.05% TritonX で 3 回洗浄した後, Drop ProLong GOLD Antifade Reagent を用いてスライドガラスに封入し, 共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510, Carl Zeiss, Jena, Germany) により観察した.

B-3-15 RNAi

タンパク質 A に対する 3 種類のプライマー 及び Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用い, ノックダウントランスフェクションを行った. まず 0.12, 0.36 及び 0.6 pmol/ μ l の RNAi duplex を含む Opti-MEMR I Reduced Serum Medium (GIBCO) (250 μ l) と 5, 15, 及び 25 μ l の Lipofectamine RNAiMAX を含む Opti-MEMR I Reduced Serum Medium (250 μ l) を, それぞれ穏やかに混合し, 室温で 10 分間インキュベーションした後, 2.5 ml の抗生物質を含まない神経誘導基礎培地と混合して, 10nM, 30nM, 50nM の RNAi duplex を調製した. つぎに RNAi duplex を神経誘導基礎培地で 24 時間培養した細胞に添加後, 24 時間 (5%CO₂, 37°C) のインキュベートによりノッ

クダウンした。反応終了後、神経誘導培地で3回洗浄した後、神経誘導を行い、細胞形状の変化を観察した。トランスフェクション効率は、BLOCK-iT Alexa Fluor Red Fluorescent Oligo (invitrogen) を用いて確認した。ノックダウンの細胞毒性を検討するため、プライマーの代わりに同濃度の Negative Control 及び Fluorescent Oligo を添加し、対照実験を同時に行った。また、ノックダウンした細胞から調製したタンパク質を用いて、タンパク質 A のウエスタンブロットを行い、ノックダウン効率を確認した。

B-4-1 VEGF 発現 Ad ベクター、Ang-1 発現 Ad ベクターの作製

VEGF 発現 Ad ベクター、Ang-1 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 pHMCMV10 のマルチクローニングサイトにマウス VEGF cDNA を挿入し pHMCMV10-VEGF を作製した。また、C57BL/6 マウスの骨髄細胞由来の cDNA から PCR 法によりマウス Ang-1 cDNA を増幅し、pHMCMV10 に挿入することで pHMCMV10-Ang-1 を作製した。なお、得られた cDNA 断片の配列はシーケンサーにより確認した。作製したシャトルプラスミドを 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、VEGF 発現ベクタープラスミド pAd-VEGF および Ang-1 発現ベクター

プラスミド pAd-Ang-1 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 VEGF 発現 Ad ベクター Ad-VEGF および Ang-1 発現 Ad ベクター Ad-Ang-1 を得た。Ad ベクターの増幅ならびに精製は定法に従って行った。精製した Ad ベクターの物理化学的力価は Maizel らの方法に従って測定した。

B-4-2 マウスへの Ad ベクター投与

5×10^{10} VP (vector particles) /mL の各種 Ad ベクター (Ad-CXCL12, Ad-VEGF, Ad-Luc) を 8-10 週令 C57/BL6 ♀マウスの尾静脈内に $200 \mu\text{l}$ 投与した。血漿中 CXCL12 および VEGF 濃度は Quantikine ELISA キット (R&D Systems 社) を用いて測定した。

B-4-3 免疫蛍光抗体染色

Ad-CXCL12 または Ad-Luc をマウスへ静脈内投与し、5 日後に脾臓を回収した。4% パラホルムアルデヒドを用いて固定した脾臓の凍結切片を 2% BSA 溶液にてブロッキング後、FITC 標識抗 IgM 抗体 (eBiosciences)、FITC 標識抗 IgD 抗体 (eBiosciences)、Biotin 標識抗 B220 抗体 (eBiosciences) を 4°C で一晚反応させた。0.1% Tween 20 を含む PBS (PBS- $T_{0.1}$) で 3 回洗浄した後、Alexa568 標識 Avidin (Molecular Probe) を 37°C で 15 分反応させた。PBS- $T_{0.1}$ で 3 回洗浄後、標本を封入し蛍光顕微鏡にて観察した。

B-4-4 抗体産生量の解析

Ad-CXCL12、Ad-Luc を C57/BL6 ♀マウスの尾静脈内に投与し (5×10^{10} VP/mouse)、その3日後に Inject Alum (Pierce 社) と混合した NP-chicken gamma globulin (NP-CGG; Biosearch technologies 社) ($50 \mu\text{g}/\text{mouse}$) あるいは NP-Ficoll (Biosearch technologies 社) ($25 \mu\text{g}/\text{mouse}$) を腹腔内投与した。2週間後に末梢血を回収し、遠心分離により血漿を得た。抗体産生量は下記の ELISA 法で解析した。Carbonate Biocarbonate Buffer (Sigma 社) で $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した NP-BSA (Biosearch technologies 社) をイムノプレートに添加し、 4°C 条件下に一晩静置して固層化した。PBS で3回洗浄後、イムノブロック (DS ファーマバイオメディカル社) にて室温で2時間ブロッキングした。その後、 $1 \text{ mg}/\text{mL}$ BSA/PBS 溶液で希釈した血漿を $50 \mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、室温で2時間作用させた。PBS- $T_{0.1}$ で3回洗浄後に10%イムノブロックにて希釈した HRP 標識抗マウス IgM 抗体 (BD Bioscience 社)、または HRP 標識抗マウス IgG1 抗体 (BD Bioscience 社) を $50 \mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、室温で1時間作用させた。PBS- $T_{0.1}$ で3回洗浄後、TMBZ を $100 \mu\text{L}/\text{well}$ 加えて発色反応を行い、 $2 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ を $50 \mu\text{L}/\text{well}$ 添加することで発色反応を停止させた。吸光度 (測定吸光度 450 nm 、リファレンス吸光度 655 nm) はマイクロプレートリーダーで測定した。

B-5-1 細胞の培養

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) は Lonza 社 (旧 Cambrex) より購入した。購入した細胞のロットは 4F1127、4F0312、5F0138、4F1560、4F0591、4F0760 の6種類であった。各ロットのドナーに関する情報は Table 11 の通り。hMSC は製造者指定のプロトコールに従い、2% L-グルタミンおよび 0.1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む専用増殖培地 (MSCGM, Lonza 社) 中、炭酸ガス濃度 5%、温度 37°C で培養した。細胞の継代も製造者指定のプロトコールに従った。継代数 7 の細胞をセルバンカー I (十慈フィールド社) 中に懸濁し -80°C にて凍結後、ワーキングセルバンクとして -150°C で保存した。

継代数 7 の細胞を融解して培養 (継代数 8) したのち、継代数 9 の細胞を用いて実験を行った。

B-5-2 低酸素・グルコース欠乏処理

継代数 8 の hMSC を 96 穴プレートに $10,000 \text{ cells}/100\mu\text{L}/\text{well}$ で播種し、正常増殖培地 MSCGM 中で 37°C 、5% CO_2 の条件下で培養した (継代数 9)。24 時間後、培地を 0.1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含むグルコース欠乏 DMEM (Invitrogen, Gibco, Cat#11966) に置換し、細胞を 1% O_2 、5% CO_2 の条件で培養した (低酸素・グルコース欠乏処理)。コントロールとしては、通常の細胞培養環境下 (20% O_2 、5% CO_2) において 0.1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含むグルコース含有 DMEM (Invitrogen, Gibco, Cat#11965) 中で培養した細胞およびそのコンディションド・メディアウムを用いた。

B-5-3 細胞の生存試験

低酸素・グルコース欠乏処理開始を時間 0 として、細胞の生存の時間経過を評価した。細胞の生存評価は CyQuant 細胞増殖アッセイキット (Invitrogen) を用いた。核酸に結合した CyQuant 色素の蛍光はマルチラベルカウンター ARVOsx (PerkinElmer) を用いて測定した。

B-5-4 サイトカイン抗体アレイによる評価

低酸素・グルコース欠乏処理をした hMSC の培地を回収し、サイトカイン抗体アレイないし ELISA による hMSC 由来サイトカインの測定時まで -80℃にて凍結保存した。細胞は別途 -80℃で凍結保存し、CyQuant 色素により細胞生存率評価に用いた。

サイトカイン抗体アレイは RayBiotech 社の Human Cytokine Antibody Array AAH-CYT-5 を用いた。サンプルは低酸素・グルコース欠乏処理をした hMSC の培地 1mL を用いた。サイトカイン抗体アレイの測定に関しては製造元のマニュアルに従った。アレイ上に結合したサイトカインの由来の化学発光シグナルの測定は、ルミノ・イメージアナライザー LAS-3000 (FUJIFILM 社) を用いて行った。

B-5-5 ELISA による評価

低酸素・グルコース欠乏処理をした hMSC の培地に存在する VEGF (血管内皮細胞増殖因子, vascular endothelial growth factor)、PLGF (胎盤増殖因子, placental growth factor) および可溶性 Flt1 (VEGF 受容体-1, FMS-related tyrosine kinase 1) の濃度を ELISA により定量した。細胞は LotC

ならびに H を用いた。ELISA の試薬としては、R&D Systems 社製の Quantikine Colorimetric Sandwich ELISA を用い、測定に関しては製造元のマニュアルに従った。

B-5-6 RT-PCR による検討

低酸素・グルコース欠乏処理をした hMSC を RLT Buffer (QIAGEN) に溶解し、QIA Shredder により DNA を裁断したのち、M48 Biorobot (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。Total RNA 中に存在する血管新生関連遺伝子について、Human Angiogenic Growth Factors & Angiogenesis Inhibitors PCR Array (SA Biosciences) および ABI Prism 7000 または 7300 (Applied Biosystems) を用いて評価した。Total RNA の逆転写反応、PCR 反応、ならびにデータ解析に関しては製造元のマニュアルに従った。

B-6-1 試薬

トロンボポエチン (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、IL-8 は Strathmann Biotec 社より、AC133 細胞分離キットは Miltenyi Biotec 社より購入した。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 CD45 抗体-FITC は BD Biosciences PharMingen 社より購入した。抗ヒト内皮 NO 合成酵素 (eNOS) 抗体 (Cayman Chemical) を用い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 社から購入した。抗 MMP-9 抗

体は第一ファインケミカル社より購入した。抗 MMP-2 抗体は Cell Signalling Tech 社より求めた。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%牛胎児血清(FCS)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)で希釈してリンフォプレップチューブ(Axis-Shield PoC AS)(密度=1.077)に添加した。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。

B-6-3 AC133 陽性細胞の分離

臍帯血あるいは末梢血 AC133 陽性細胞は、Indirect CD133 マイクロビーズ分離キットを用い Auto MACS (Milteny Biotec)で分離した。得られた AC133 陽性細胞は 20% FCS、50 ng/ml VEGF、50 ng/ml TPO、を含む EBM-2 培地に浮遊させ 5 日間、IV型コラーゲンコートディッシュ上で培養した。細胞を全て回収し、EGM-2 培地に懸濁し、FN

コートディッシュ上で 24 時間培養し接着した細胞を AC133 陽性細胞由来 early EPC として解析した(図 1)。

B-6-4 単核球由来 early EPC の誘導

リンフォプ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単核球由来 early EPC とした(図 1)。

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 EGM-2 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、 1×10^7 cells/well 程度とし、1 週間に 2 回、培地交換し、2~3 週間後に出現する敷石上でコロニーを形成する増殖能の高い細胞を late EPC とした。

B-6-6 フローサイトメーターによる解析

Early EPC は培養プレートから非酵素的に剥離・回収した。洗浄後、抗 CD31 抗体-FITC あるいは-PE、抗 CD14 抗体-FITC で免疫染色した。抗 MMP-9 抗体、抗 MMP-2 抗体は 1 次抗体でインキュベート後、抗マウス IgG 抗体-FITC あるいは抗ウサギ IgG 抗体-FITC で免疫染色した。その後、抗 CD44 抗体-PE を用いて二重染色した。なお、全ての細胞は対照用血清で染色し、非特異的な反応でないことを確認した。

B-6-7 接着細胞の免疫染色

単核球あるいは AC133 陽性細胞を 1 週間培養後、実験に用いた。細胞を PBS で 3 回洗浄し、1% ホルムアルデヒド-PBS で固定