

した。抗 eNOS 抗体で染色する場合は更に冷却したエタノール (-20°C) で固定して細胞膜を透過させ、さらに PBS(-) で 3 回洗浄した。1% BSA-PBS を用いて細胞を 4°C、1 時間、ブロッキングした。次に 1 次抗体 (抗 CD45 抗体-FITC、抗 eNOS 抗体、抗 MMP-9 抗体、抗 MMP-2 抗体) で 4°C、1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、4°C、1 時間、抗マウス IgG 抗体-FITC、抗ウサギ IgG 抗体-Rhodamin、抗ウサギ IgG 抗体-FITC とインキュベーションした。抗 MMP-9 抗体あるいは抗 MMP-2 抗体による免疫染色後、抗 CD44 抗体-PE を用いて二重染色した。PBS で洗浄後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 LSM 510 (Carl Zeiss) を用いて解析した。

B-6-8 Early EPC の特性指標の探索

Early 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。

B-6-9 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はポアサイズが 8 μm のものを用いた。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 あるいはヒト冠状動脈血管内皮細胞 HCAEC を 1.6×10^5 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 の CO₂ インキュベーターに 3 時間静置した。浸潤した細胞は固定・染色し、顕微鏡下で計測した。

MMP-2/MMP-9 阻害剤 V (500 nM、Calbiochem) を用いる際には、インサート及び下室の両方に加えた。

B-6-10 MMP-2/MMP9 のウェスタンブロット及びザイモグラフィ

細胞培養上清は非還元下でサンプル調製を行い 10% アクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。転写は 10% Methanol を含む 10 mM CAPS バッファー (pH 11.0) を用いて 0.3 A で 2 時間行った。MMP-2 及び MMP-9 に対する抗体を用いて Western blot を行った。

Early EPC の分画には 0.25M Sucrose/10 mM Tris (pH 7.4) を用い、凍結融解により細胞を破壊し、2000 rpm、4°C、5 min 遠心して核分画である沈査を除去した。さらに 100,000g、4°C、40 min で遠心し、上清を細胞質分画、沈査を細胞膜分画とした。電気泳動用サンプルバッファーを加え、

ウエスタンブロットを行った。

ザイモグラフィーにはゼラチンザイモグラフィー用ゲルを用いた。非還元条件下で培養上清を電気泳動し、MMP-2/MMP9 酵素活性により分解された部分をクーマシー染色液で可視化し、Typhoon 9400 (Amersham)で画像化した。

B-6-11 統計解析

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

B-7-1 O-結合型糖鎖を含む糖ペプチド分画の調製

80%コンフルエント状態のヒト大腸癌細胞 (HCT116) 1.0×10^7 cells 相当に対して、1M EDTA を含む PBS を 50 μ L 加え氷上で 15 分間放置した後、2 M thiourea/5 M urea 溶液を 267 μ L、1 M DTT を 16.7 μ L、Benzonase を 25 units/5 μ L 加え室温で 30 分間放置した。10 分間遠心分離(15000 g、4 $^{\circ}$ C)により得られた上清約 300 μ L に対し、5%のトリエチルアミンおよび酢酸、水を含むアセトン溶液を 1.5 mL 加え、-20 $^{\circ}$ C で 1 時間放置した。10 分間遠心分離(15000 g、4 $^{\circ}$ C)後、沈殿物を回収し、75%エタノールにて 2 回沈殿物を洗浄し、糖タンパク質分画とした。得られた糖タンパク質分画は、1 mL の 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)にて懸濁した後、2 mg のプロナーゼを加えて 37 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートした。沸騰水浴上で 5 分間処理し酵素を失活させた後、10 分間遠心分離(15000 g、4 $^{\circ}$ C)して、上清を回収し、不溶性の沈殿を除いた。回収した可溶性分画に、2 M 水素化ホウ素ナトリウム水溶液を 500 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間イ

ンキュベートすることで、細胞中の遊離糖鎖を除去した。氷酢酸により水素化ホウ素ナトリウムを分解し、限外濾過フィルター (分子量 5000 Da cut off)を用いて脱塩した。得られた可溶性の糖ペプチド分画を AGC に導入し、O-結合型糖鎖を遊離させた。

B-7-2 高速糖鎖自動切断装置による O-結合型糖鎖の遊離

装置は当研究室で開発した O-結合型糖鎖自動切り離し装置 (AutoGlycoCutter-2 (AGC-2) : 島津製作所) を使用した。糖鎖切り離しのためのアルカリ溶液として 0.5 M 水酸化リチウム水溶液を用い、糖鎖遊離反応温度は 60 $^{\circ}$ C とし、反応時間は 3 分で行った。細胞から得られた糖ペプチド分画の水溶液 (50 μ L) を AGC-2 に導入し、得られた O-結合型糖鎖を回収し凍結乾燥した。

B-7-3 O-結合型糖鎖の 2-アミノ安息香酸 (2-AA) による蛍光標識

上記操作により遊離された O-結合型糖鎖の凍結乾燥物に 2-AA および NaBH₃CN をそれぞれ 3%の濃度で含む 2%ホウ酸/4%酢酸ナトリウム/メタノール溶液 (100 μ L) を加えて 80 $^{\circ}$ C で 1 時間加温した。反応後 SephadexLH-20 のゲルろ過クロマトグラフィーにより最初に溶出される蛍光性画分を回収し細胞由来の糖鎖とした。

B-7-4 セロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる O-結合型糖鎖の分画

ポンプには JASCO PU-980 型、検出器には JASCO FP-920 型蛍光検出器を使用し、流速 0.5 mL/ min で分析した。カラムは LA-Serotonin (Japan Oil Mills, 4.6 x 150 mm) を用い、カラム温度は 25 $^{\circ}$ C とした。検出は励起波長(Ex) 350 nm、蛍光波長(Em) 425 nm

により行った。移動相の溶液 A には水、溶液 B には 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液を用いた。グラジエント条件は、試料注入後 2 分間溶出液 B 5 %とし、溶出液 B が 20 分後に 40 %となるように直線グラジエント溶出を行い、O-結合型糖鎖のうちムチン型糖鎖を溶出した。さらに、溶離液を 1M NaCl とし、GAG 型糖鎖を溶出させた。

B-7-5 順相分配型 HPLC によるムチン型糖鎖の分析

カラムには Shodex NH2P-50 4E (4.6 mm x 250 mm、昭和電工)を用い、溶離液 A を 2% CH₃COOH/CH₃CN、溶離液 B に 5% CH₃COOH、3% Triethylamine/H₂O を用いた。溶出は 70%の溶離液 A によりカラムをあらかじめ平衡化した後、80 分で溶離液 B が 95%となるように直線グラジエント溶出を行った。また、検出は励起波長 350 nm、蛍光波長 425 nm で蛍光検出した。分離された糖鎖は Voyager DE-PRO (Applied Biosystems 製)を用い、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)を試料マトリックスとしてリニア/ネガティブイオンモードにより測定した。

B-7-6 キャピラリー電気泳動による GAG 不飽和 2 糖の分析

セロトニンアフィニティークロマトグラフィーにより得られた 1M NaCl 溶出分画を、透析(1000 Da cut off)により溶液中の NaCl を脱塩した。その後、酵素消化により GAGs を不飽和 2 糖に分解した。コンドロイチン硫酸 PGs は、試料を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0、100 μL)に溶解後、Chondroitinase ABC(0.5 unit、10 μL)を加え 37°C で 24 時間反応した。ヘパラン硫酸 PGs は、試料を 100 μL の 100 mM Sodium acetate/0.1 mM calcium

acetate(pH 7.0)に溶解後、Heparitinase 1 および Heparitinase 2(それぞれ 5 mU/10 μL)を加え、37°C で 24 時間反応した。反応後、沸騰水浴上で 5 分間処理した後、15000 xg で 5 分間遠心分離し、上清を 2AA により標識後、CE にて分析した。CE の条件は、Beckman MDQ Glycoprotein system を用い、キャピラリーはフューズドシリカキャピラリー(内径 50 μm、有効長 30 cm)を用いた。泳動用緩衝液は 100 mM Tris-phosphate buffer (pH 3.0)を用いた。印加電圧は 25 kV に設定し、陰極から陽極方向に電気泳動した。分析温度は 25 °C で、試料注入は加圧法で 1.0 psi で 10 秒間注入した。検出は、He-Cd レーザー励起蛍光検出を用いた(Ex 325 nm、Em 405 nm)。

<倫理面への配慮>

動物実験は、動物実験指針等を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施した。また、ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに採取された試料を使用するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で研究を実施した。

C. 結果

C-1 マイコプラズマ試験法

マイコプラズマは無細胞壁の原核生物で、細菌の 1/10 程度の大きさの自己増殖能を持つ最小の微生物である。これまでに 120 種類以上の菌種が報告されている。自然界では種特異性が強く固有のマイコプラズマが感染するが、培養細胞では血清やトリプシン、培養作業従事者等を介して種を超えて感染することが知られている。マイコプラズマが培養細胞に感染しても、多くの場合、細胞膜に付着して細胞と共存して増殖し、ウイルス感染のような細胞変性を伴わず、また一般の細菌感染で認められるような培養液の混濁も起こらないため、汚染には気づかないことが多い。マイコプラズマは細胞壁を持たないためペニシリン系薬剤は無効であり、可塑性を示すため 0.22 μm のろ過滅菌フィルターを通過する。カナマイシン、ゲンタマイシンなどには耐性を持つものもあるという。これらの特徴から、培養細胞のマイコプラズマ汚染は実験室レベルでは高頻度に認められている。しかし、マイコプラズマに感染した細胞は増殖性や形態の変化、サイトカインの産生など、細胞の本来の機能や性質が様々な影響を受けることが知られており、汚染細胞を用いて医薬品を製造したり、ヒトに投与する細胞が汚染されていると重大な事態を招く可能性がある。このため、細胞を医薬品として用いるヒト自己及び同種由来細胞組織加工医薬品では、医薬品の製造に細胞の培養工程が入ることから、最終製品について、適切なマイコプラズマ否定試験を実施することが指針により求められている。

日本薬局方（局方）の参考情報には、細

胞基材のマイコプラズマ否定試験法として現時点で適切と考えられる方法として、培養法、指標細胞を用いた DNA 染色法、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法が収載されている。各試験法の特徴を Table 1 に示す。局方では、各試験法には長所と短所があり、単独の試験ではマイコプラズマの存在を否定するには十分ではなく、判定には複数の試験を併用することが必要であるとされ、基本的には従来より実績のある培養法と DNA 染色法による実施を求めているが、DNA 染色法はマイコプラズマ以外の DNA も検出するため、DNA 染色法のみ陽性を示した場合には、PCR 法でマイコプラズマの存在を否定することができるとしている。しかし、培養法は試験に 4 週間以上、DNA 染色法でも 1 週間程度の時間がかかり、医薬品製造用の細胞基材のように、試験に十分な時間が取れるものであればこれらの試験を実施可能であるが、細胞の調製から投与まで十分な時間がないことが多い細胞組織加工医薬品では、より迅速、高感度で広範なマイコプラズマを検出可能な、試験法の開発が望まれている。

最近、マイコプラズマの迅速測定法として、酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法（MycoAlert）が簡易迅速検査法として研究用に市販され、培養細胞汚染の調査等に使用されている。また、研究用あるいは細胞基材の品質管理試験用として、PCR 法をベースとした種々のマイコプラズマ検出キットが市販されている。そこで、培養細胞を高頻度に汚染していることが知られる *M. fermentans* 培養液をモデルマイコプラズマとして使用し、酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法と 3 種類の PCR 法（局方

Nested PCR 法、リアルタイム PCR 法、PCR-ELISA 法)について、操作性、迅速性、検出限界等を比較検討した。また、リアルタイム PCR 法と PCR-ELISA 法については、2 種類のマイコプラズマ DNA 標準品、*M. hyorhinis* 及び *M. orale* の genomic DNA を用い他検討も実施した。

C-1-1 *M. fermentans* 培養液の測定

C-1-1-1 MycoAlert 法

MycoAlert はマイコプラズマに特有の酵素活性を利用したマイコプラズマ測定法である。マイコプラズマの膜を溶解して放出されるマイコプラズマ特有の酵素が特異的な基質と ADP から ATP を産生することを利用し、産生された ATP 量をルシフェリン・ルシフェラーゼ発光系により測定する。抽出した DNA を測定する PCR 法と異なり、酵素活性を測定する方法は生きたマイコプラズマを検出することが可能である。試料は細胞培養上清を用いる。細胞が試料に混入すると結果に影響を与えるため、遠心処理により細胞を除去する必要があるが、測定の前処理はこの遠心のみであり、測定の所要時間は 30 分程度である。

M. fermentans 培養液の 10 倍希釈列 (室温保存品及び冷凍保存品) 100 μ l を用いて、MycoAlert で測定した結果を Fig. 1 に示す。室温保存品では希釈倍率 10^3 倍まで陽性、凍結保存品では 10 倍希釈は陽性であったが、 10^2 倍希釈は偽陽性であった。*M. fermentans* 原液の力価は 4.5×10^6 CFU/ml であったことから、検出限界を力価に換算すると $4.5 \times 10^3 \sim 10^4$ CFU/ml と考えられた。

C-1-1-2 局方 Nested PCR 法

Nested PCR 法はマイコプラズマ DNA をマイコプラズマに特異的なアウタープライマーとその内側にあるインナープライマーを用いて 2 段階で PCR 増幅することにより検出する方法である。2 段階の増幅により検出の感度と特異性を増すことができる。局方では、比較的多くのマイコプラズマを検出する領域として rRNA オペロン内の 16S rRNA 遺伝子と 23S rRNA 遺伝子間のスペーサー領域から、広範囲のマイコプラズマ種に相同性のある領域を選択したプライマーが例示されている。このプライマーを用いた場合、マイコプラズマの菌種により 2nd PCR で得られる増幅断片のサイズが異なり、さらに制限酵素消化を行うことで細胞を汚染したマイコプラズマ菌種を推定することが可能である。局方では培養上清ではなく細胞懸濁液を試料として DNA を抽出することとされる。所要時間は 1st PCR までで 6 時間程度、Nested PCR を行って検出するにはさらに 4 時間程度必要となる。

M. fermentans 培養液の 10 倍希釈列から DNA を抽出後、1st PCR, 2nd PCR を実施した結果を Fig. 2 に示す。2 段階の PCR を実施したが、室温保存品及び冷凍保存品のどちらの場合も 1st PCR の段階で既に *M. fermentans* 培養液の最大希釈倍率である 10^5 倍 (力価換算すると 45 CFU/ml) まで PCR の増幅バンドが検出された。陽性対照 DNA として用いた *M. fermentans* DNA は 500 fg/PCR reaction に相当するが、1st PCR のバンドは希釈倍率 10^5 倍の培養液から抽出した DNA の増幅により得られたバンドはより明瞭であったことから、希釈倍率 10^5 倍の培養液から得られた DNA は 500

fg/reaction 以上と推測された。一方、陽性対照 DNA として用いた *M. orale* も *M. fermentans* と同量を PCR 反応に供したが、1st PCR ではバンドがほとんど検出されず、マイコプラズマの種によって検出感度が異なることが示唆された。

C-1-1-3 リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR 法によるマイコプラズマの検出は、MicroSEQ mycoplasma detection assay kit を使用した。欧州薬局方 (EP) では 2007 年にマイコプラズマ試験法が改正され、EP 収載のバリデーション試験に適合すれば、PCR 法などの核酸増幅検査 (NAT) を従来のマイコプラズマ否定試験の代替法とすることが可能になったが、本キットは細胞基材の品質管理試験用に開発され、EP のバリデーションに適合しているとされる。

リアルタイム PCR 検出用キットで使用しているプライマーは、マイコプラズマの 16S rRNA 領域に対する複数のプライマーを組み合わせたもので、90 種類以上のマイコプラズマ及び近縁種を特異的に検出可能という。マルチプレックス PCR となるため、SYBR Green で検出を行う。そのため、試料は培養細胞ではなく、細胞培養上清を使用し、宿主セル由来の核酸が混入しないように注意が必要である。リアルタイム PCR では増幅反応後、dissociation 反応を行い、増幅曲線と融解曲線から検出の有無を判定する。所要時間はカタログでは全工程 4 時間とあるが、DNA 抽出に 3 時間程度、リアルタイム PCR も 2~3 時間程度必要であった。

M. fermentans 培養液について、リアル

タイム PCR で測定した結果について、増幅曲線及び融解曲線を Fig.3 に、判定結果を Table 1 に示す。Negative control は陰性であったが、室温保存品及び冷凍保存品のどちらの場合も最大希釈倍率の 10^5 倍 (45 CFU/ml) まで検出は陽性であった。

C-1-1-4 PCR-ELISA 法

PCR-ELISA キットは、細胞培養上清を試料とし、マイコプラズマをアルカリで溶解後、中和したものをテンプレートとして用いる。PCR 増幅時に DIG 標識し、PCR 増幅産物をビオチン結合プローブとハイブリダイズさせて、ストレプトアビジンコートプレートにトラップする。これを抗 DIG-POD と TMB 基質による ELISA 反応により検出する方法である。今回の検討では、PCR 以降の反応のみ実施し、測定の所要時間は PCR 反応が 3 時間程度、ELISA 反応が 4 時間程度であった。全工程としては DNA 抽出にさらに 1 時間以上の時間が必要である。

M. fermentans DNA の PCR-ELISA 測定結果を Fig.3 に示す。凍結保存品のほうが室温保存よりも数値は低い、最大希釈倍率の 10^5 倍 (45 CFU/ml) までどちらも陽性と判定された。PCR-ELISA 法は定性試験であるが、陽性対照 DNA として用いた *M. fermentans* (1 pg/PCR reaction) と室温保存の 10^5 倍の吸光度は同程度であったことから、 10^5 倍で使用した DNA 溶液には 1 pg 程度の DNA が含まれていたと考えられる。なお、陽性対照 DNA として用いた *M. orale* も *M. fermentans* と同じく 1 pg/PCR reaction を使用したが、*M. fermentans* と比較して ELISA 反応は弱

く、陰性と判定された。マイコプラズマの種類によって PCR-ELISA の検出感度には差異があることが示唆された。

以上の4種類のマイコプラズマ試験法による *M. fermentans* 培養液の検出結果を Table 3 にまとめた。今回検討した PCR 法3種類はいずれも最大希釈である 10^5 倍(45 CFU/ml) まで検出可能であったが、MycoAlert は PCR 法より少なくとも 100 倍から 1000 倍以上検出感度が低いことが明らかになった。

C-1-2 *M. orale* 及び *M. hyorhinis* の genomic DNA の測定

市販の PCR 法であるリアルタイム PCR 法と PCR-ELISA 法について、局方の DNA 染色法で陽性対照として用いられる2種類のマイコプラズマ、*M. hyorhinis* 及び *M. orale* の genomic DNA を用いて検出限界を検討した。これらの測定法は、いずれも培養上清を試料とし、DNA の抽出工程からキット化されている。しかし、今回の検討では、精製 DNA の希釈列を使用し、PCR の1反応当たりの検出限界として2種類の方法を比較した (Table 4)。その結果、リアルタイム PCR 法は *M. hyorhinis* DNA 及び *M. orale* DNA とともに 100 fg/reaction まで検出可能であった。一方、PCR-ELISA 法では、*M. hyorhinis* DNA は 1 pg/reaction, *M. orale* DNA は 10 pg/reaction が検出に必要であった。

C-2-1 細胞の染色体安定性に関する検討

C-2-1-1 異常の見られた hMSC と同一ロット細胞における染色体異常出現に関する検

討

これまでの SNP チップ解析の結果、異常を示した hMSC 株ロット #4F1560 (Fig. 5) に関しては、昨年度の検討により、当研究室における培養の初期にも低頻度で異常が存在することがわかり、異常細胞は細胞の購入時にすでに存在したことが示唆された。この可能性を検証するため、たまたま当研究所の療品部において別途購入されていた同一ロットの hMSC 株 (#4F1560) をご恵与いただき、当研究室にて継代培養続けた。11 継代の後、間期核のスライド標本を作製し、昨年度と同様にセントロメア特異的 FISH プローブを用いた異常細胞出現の検討を行った。

異常が確認されたロット #4F1560 においては、17 番染色体特異的セントロメアプローブを用いた FISH 解析から、シグナル数の増加が認められていたため、正常対照として 8 番染色体特異的セントロメアプローブを用い、17 番染色体セントロメアプローブによる 2 重 FISH を行った。得られたシグナルの例を Fig. 7 に示す。昨年度の結果と同様に、17 番染色体シグナル数の増加を示す細胞が多数観察された。間期核におけるそれぞれのシグナル数を元に、異常細胞数の解析を行った。約 100 個の間期核細胞を使って解析した結果、Table 5 に示すようなシグナル数が観察された。8 番染色体セントロメア 2 シグナル以下の細胞に関し、3 つ以上の 17 番セントロメアシグナルが得られた細胞および 8 番 3 および 4 シグナルに対し、5 以上の 17 番シグナルを持つ細胞を異常細胞として判定し、その出現頻度を調べた結果、8 割以上の細胞が異常を示した。前回のデータと比較して、継代数に比し

て異常細胞の頻度は高めとなったが、これは今回の培養では 7-8 割のコンフルエントとやや継代間隔が長かったことが影響している可能性がある。

以上の結果より、ロット 4 F1560 において観察された染色体異常は、細胞購入時にすでに低頻度で存在したことが証明された。この異常細胞は、増殖優位性を持ち、継代数の増加に伴って、その割合が増加し、やがて培養系を置換することが再現できたわけである。本ロットに関しては、23 歳女性のアフリカ系黒人由来という程度の情報しか得られず、異常細胞がドナーの生体内に存在していたかどうかを調べることはできないが、その可能性は否定できない。また、ドナーからの間葉系幹細胞の樹立時に異常が生成した可能性もあり、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(Cytherapy. 7: 509-519, 2005)によってなされていることから、注意が必要であると考えられる。

C-2-1-2 染色体解析

セントロメア特異的 FISH 法にて確認された異常が、染色体レベルで前回と同一の異常であるかを確かめるため、約 20 継代目の細胞を用いて、マルチカラー FISH 法 (m-FISH) による染色体解析を行った。まず G バンド解析の結果から、Fig. 6 に示すように 3 本のマーカー染色体が観察され、前回の解析結果と異常は一致した。50 細胞観察を行ない、すべて同様の異常を示した。その由来は 7 番染色体および 17 番染色体であるが、Fig. 8 に示した m-FISH 解析の結果は、前回の SKY 解析の結果と比較すると、

Marker1 は両者の転座、Marker2 は 7 番染色体由来ということで一致したが、Marker3 に関しては、前回の 7 番という結果と異なり、Fig. 9 に示したセントロメア FISH の結果から 17 番由来と判定された (標識の色が異なっている点に注意)。

我々のセントロメア FISH の結果とも一致し、増加したシグナルは 17 番セントロメア由来であることは確実であるが、Marker3 の他の部分に関しては、m-FISH のシグナル自体判別が難しく、以前に行なった CGH の結果も加味すると、7 番染色体由来の可能性も高いと考えられる。今後、クロモソームペインティングの手法を用いて、この点は明らかにしたい。さらに、前回マイナーな異常として一部の細胞に観察された、21 番と 22 番染色体の転座による dicentric 染色体は、今回は観察されなかった。

また、G バンドのパターンから、Marker 染色体のバンドパターンは、由来する正常な 7 番および 17 番染色体のバンドパターンとは異なり、複雑なリアレンジメントがおきていることが示唆された。

C-2-2 細胞のプロテオーム解析

C-2-2-1 Progenesis ソフトウェアを用いたノンラベル法による定量解析の基礎検討

昨年度の検討により、本研究所において利用可能なタンデム型質量分析装置である、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) を用いた検討を行い、後者が分解能だけでなく感度においても優れて

いることがわかったため、本年度の検討には LTQ-Orbitrap を使用した(Fig. 10)。

質量分析による定量比較のためには、ICAT (Isotope Coded Affinity Tag) 法などの安定同位体を用いた方法による、同一ランでの比較法が有効であるが、試薬が高価であり作業が煩雑なる点、および多検体での比較を可能とするために、ラベルを用いずに定量比較を可能とすることが望まれている。この場合、異なるサンプルを異なる LC のランで解析を行うため、イオン化効率の差による定量性の変化およびリテンションタイムのずれが主に問題となる。また、細胞由来のプロテオーム解析に関しては、より複雑な解析を迫られるため、データ解析の効率化のためには、ソフトウェアの利用が必須となり、これまで独自のソフトウェアの開発を行ってきた。

一方で、この目的に合致したソフトウェアが二次元電気泳動用のソフトウェアをベースとして開発され、市販が開始されたため、本研究にもいち早くこのソフトウェアの導入をはかり、そのパフォーマンスを評価した。

定量比較のためのサンプルデータとして、凍結保存してあった hMSC 細胞 (ロット C: 5 F0138) の 4 継代および 16 継代の細胞より、総タンパク質を抽出し、トリプシン消化してペプチドとした後、LC-MS 解析を行った。

LTQ-Orbitrap 質量分析装置から得られるデータを、付属のソフトウェア Xcalibur で表示した例を Fig. 11 に示した。測定は、一段階目の MS 測定 (親イオン) を高分解能の Orbitrap (電場型 FT) で測定し、同時に MS/MS 測定をリニアイオントラップ検出器

(LTQ) で測定した。本装置においては、MS 測定と MS/MS 測定を並行して同時に行なえるため、他の装置に見られるような MS/MS 測定による MS 測定の休止に由来する感度低下は起こらないという利点がある。通常 LC-MS によるデータの全体像は TIC (Total Ion Chromatography) として把握され、質量分析データの詳細は、あるタイムポイントを切り取ったマススペクトルとして表示される。実際の解析データの全体像は、この 2 次元マススペクトルの時間軸における積み重ねからなる 3 次元データであり、その意味では、昨年度に報告したとおり、3 次元データとしてデータの全体像を把握することが重要である。

この目的のため、本年度は別予算にて導入した定量解析能を有するソフトウェアである Progenesis が利用可能となったため、本研究にもこれを利用した。LTQ-Orbitrap より得られる RAW 形式のデータファイルを Progenesis により直接読み込むことができ、3 次元 (2 次元デンシティプロット) 画像化して表示される。(Fig. 12) 異なる LC-MS 解析データの定量比較を可能とするためには、サンプル間のリテンションタイムのずれの補正をする必要があり、Progenesis ではこの 3 次元プロットを元に、それを行なった。このアラインメント過程は、ソフトウェアにより自動に行なうことが可能であるが、今回のような複雑性の高いデータの場合にはうまくアラインメントが取れない場合もあり、手動で 20-30 個程度のシグナルをランドマークとして重ね合わせることにより、パフォーマンスが向上し、満足できるアラインメントが可能となった。

Fig. 13 に Progenesis にて検出されたペプ

チドピークのサンプル間の比較例を示した。本ソフトウェアにおいては、一連のアイソトープピークが一つのペプチドピークとして認識され、その価数も自動的に判断され、例えば2価であれば赤色というように、色分けされて表示される。実際のデータでは、隣接する複数のペプチド由来のアイソトープピークが複雑に重なり合い、肉眼でも判断が難しい状況にあるが、ソフトウェアの利用により、正しくピーク認識が行なわれ、対応するペプチドピーク間の比較が可能となった。Fig. 13 に示した例では、中央の2価ピーク領域は一部その下の3価ピークのシリーズの領域と重なっているが、実際の定量には、さらに各アイソトープピーク部分のみが選択されて行なわれるため、重なりが生じなかった。こうしたピークの分離という意味では、Orbitrapによる高分解能は非常に威力を発揮し、本ソフトウェアとの組み合わせにより、かなり複雑なサンプルにおいても、定量比較が現実として可能であることが明らかとなった。

こうして自動認識された2価以上のペプチドの総数は約22000であったが、内容を吟味すると、同一のピークが、リテンションタイム方向に複数のピークに分断されて認識されている事例が多く見られた。ノイズピークの誤認識等を考慮すると実際のペプチドピークの数は一減ると考えられるが、少なくとも半数は正しいピークと考えられるため、検出できたペプチドの総数は1万を越えたと解釈した。

これら1万を超えると考えられるペプチドのうち、約半分はMS/MS解析が行なわれており、生データであるRAWファイルにはその情報も含まれている。親イオンの強度

の高いピークに関しては、サンプル間およびサンプル内においても繰り返しMS/MS測定が行なわれていたが、これら複数のMS/MSデータを統合し、より良いデータを選んで一括検索を行なう機能をProgenesisは有しており、これによりタンパク同定のステップを効率化することができた。

統合、整理したMS/MSデータを、タンパク同定用のソフトウェアであるMASCOT解析用のデータファイルに変換し、インハウスのMASCOTサーバーを利用して、SwissProtデータベースに対して検索同定をした結果をProgenesisに読み込んだところ、一般的なMASCOTスコアをクリアしたタンパク同定数として、5657という値を得た。この数字は前述したように、分断された同一ピークの重複した同定結果を含むため、実際の数はこれより少ないと考えられる。Progenesisでは、この同定結果をタンパクレベルで統合し、同一タンパク由来のペプチドをグループ化して取り扱うことができ、これによって、タンパクレベルでの定量比較が可能となった。その結果、合計1017個のタンパク質が同定された。それぞれのタンパク質に対して、4継代と16継代間での定量比較を行い、帰属するペプチドの発現比の平均値から、タンパクとしての発現比を得ることができた。4継代に比べ16継代の細胞で発現が3倍以上上昇もしくは低下したタンパク質のリストをTable 6と7に示した。

どちらも、トップにランクされたのはミトコンドリアのタンパク質であった。Eukaryotic transcription initiation factor 3は両方のリストに含まれたが、サブユニットCが増加、Eが減少と逆の動きを示した。その

他、発現上昇したタンパクとしては、転写に関係するタンパク (HXA10, UBF1)、膜タンパク (FADS3, RAB36, TM87A) が含まれた。一方、発現低下をするタンパクとしては、細胞骨格タンパク (TBB2A, TBB3)、HLA 関連遺伝子、細胞増殖関連遺伝子 (PSME3, PCNA)、DNA 損傷でリン酸化を受けるタンパク質 (HNRPF, EIF3E, HSP74) などが含まれた。

hMSC 細胞を用いて同定されたタンパク質に関しては、昨年度の報告書において、細胞膜上の表面抗原である各種 CD 抗原が同定されたことを報告した。この中で、CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD166 などの間葉系幹細胞での表面マーカーが含まれていたが、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。今回、Progenesis を用いた検索により、前回検出されなかった CD105 も検出、同定された。今回検出された CD マーカーを Fig. 14 に示した 2 次元マップ上に記載した。

これら CD 抗原については、プロテオーム解析により抗体を使わなくてもそれらを網羅的に解析可能であり、細胞のキャラクター化に有用であることが示唆された。今後は、CD 抗原以外にも間葉系幹細胞のキャラクター化に有用なタンパクマーカーの検索を行ない、細胞の品質評価へと応用したい。

C-3-1 MSC 及び MSC 由来神経様細胞 (N2d) の糖鎖差異解析

C-3-1-1 MSC の神経様分化誘導

近年、MSC を神経様細胞に分化誘導するための様々な誘導培地が開発されている。そこで、以前に報告された誘導法 (誘導法

A)、及び市販の MSC 神経様分化誘導培地を使用する誘導法 (誘導法 B) を用いて MSC の神経様分化誘導を行い、得られた分化細胞の形態学的な特徴の違いを調べた。誘導法 A を用いたとき、神経様分化誘導培地播種後 1 日目で、MSC の細胞質部分が繊維状から球状に変化するとともに、神経細胞様の突起が観察されたが (Fig. 17A, B)、誘導後 2 日間目には死細胞の増加が認められたことから、効率良く神経様細胞に誘導することは困難であると判断された (Fig. 17C)。誘導法 B により MSC を分化誘導したとき、播種後 1 日目に細胞質部分の球状化及び突起が認められた (Fig. 17D)。誘導法 A と比較して、2~3 倍の長さの突起が多数みられ、培養 2 日間目でもほとんど死細胞は観察されなかった (Fig. 17E)。これらの結果より、誘導法 B の方が MSC の神経様分化誘導に適していると判断されたことから、本研究では、誘導法 B で 2 日間培養した細胞を MSC 由来の神経様細胞 (N2d) として使用することとした。

C-3-1-2 LC/MS 及び LCMSⁿ による MSC 及び N2d 由来糖鎖の定量的糖鎖プロファイリング

昨年度までに我々は、重水素置換フェニルヒドラジン (PHN) を用いた定量的糖鎖プロファイリング法を開発している。この方法は、糖鎖試料と対象糖鎖をそれぞれ重水素置換 PHN と未置換 PHN で標識した後、それらを混合物して LC/MS 及び LCMSⁿ を行うもので、重水素置換 PHN 糖鎖と未置換 PHN 糖鎖のピーク強度比から、各糖鎖の量的比較を行うものである。この方法は、糖鎖の質的量的変化を解析する方法として優れているが、重水素置換 PHN 糖鎖と未置換

PHN 糖鎖の溶出時間が完全に一致しないことや、試薬の純度が低いことなどの問題があったため、本年度は、¹³C 置換 PHN を用いる方法を検討した。この改良法は、¹²C-PHN 及び ¹³C-PHN で標識した糖鎖の混合物を LC/MS により分析するもので、¹²C-PHN 糖鎖と ¹³C-PHN 糖鎖は同じ時間に溶出され(Fig. 18A, B), マススペクトル上は質量が異 6 u なる分子として検出される(Fig. 18C)。本研究では、MSC 及び N2d 由来糖鎖をそれぞれ ¹²C-PHN 及び ¹³C-PHN で標識した後、タンパク質あたり等量となるように混合し、LC/MS を用いて比較定量した(Fig. 16, Fig. 18)。3 種類の糖鎖試料溶液について分析した後、統計処理した。

C-3-1-2-1 糖鎖構造解析

Fig. 19 は、糖鎖試料 1(Table 8 参照)の LC/MS により得られたベースピーククロマトグラムである。各糖鎖の精密質量、及び LC/MS^d で取得されたプロダクトイオンスペクトルを解析し、大凡、高マンノース型糖鎖、パウチマンノース型糖鎖及び混成型糖鎖、並びに複合型糖鎖の順に溶出されることが確認された。複合型糖鎖は、2 本鎖、3 本鎖及び 4 本鎖の順に溶出され、シアロ糖鎖よりもアシアロ糖鎖の方が早く溶出される傾向がみられた。5 種類の高マンノース型糖鎖(M9~M5)、2 種類のパウチマンノース型糖鎖、1 種類の混成型糖鎖、及び 26 種類の複合型糖鎖が帰属された(Table 9)。興味深い糖鎖として、フコースを 2 分子有する複合型 2 本鎖糖鎖、*N*-アセチルラクトサミン構造(Lac)を有する糖鎖、さらには複合型 3 本鎖糖鎖に 4 個の *N*-アセチルノイラミン酸 (NeuNAc) が付加した糖鎖が認められた。

C-3-1-2-2 MSC 及び N2d 由来糖鎖の分布

つぎに、MSC 及び N2d の糖鎖の分布を比べるため、試料 1~3 で確認された糖鎖の全ピーク強度に対する各糖鎖のピーク強度比率(存在比率(%))を求めた (Fig. 20 及び Table 9)。最も多く存在する糖鎖は、MSC 及び N2d 共にトリマンノースコア構造にフコース付加したパウチマンノース型 (dHex1Hex3HexNAc2 (MSC, 24%; N2d, 27%))であった。その他、存在比率が高い糖鎖は、NeuNAc, Fuc 及び Lac が付加した複合型 2 本鎖糖鎖であった (dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1(MSC, 7%; N2d, 8%); dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc2 (MSC, 14%; N2d, 16%); dHex1Hex6HexNAc5 (Lac) (MSC, 12%; N2d, 13%))。

MSC と N2d の分布を比較したとき、存在比率に顕著な差がみられた糖鎖は、NeuNAc を 3 及び 4 分子もつ複合型 3 本鎖糖鎖 (Hex6HexNAc5NeuNAc3 (MSC, 8%; N2d, 2%); Hex6HexNAc5NeuNAc4 (MSC, 2%; N2d, 0.6%)) であり、N2d における存在比率は MSC の 1/3 であった。これらの糖鎖は、MS/MS スペクトルの解析により、Lac をもつ 2 本鎖糖鎖ではなく、Lac をもたない 3 本鎖糖鎖であることを確認している(Fig. 21, Hex6HexNAc5NeuNAc4 についてはデータを示さず)。一方、Lac をもつ複合型 3 及び 4 本鎖糖鎖の存在比率は、分化誘導すると増加する傾向がみられ、特に N2d における dHex1Hex8HexNAc7NeuNAc2 (Lac) (MSC, 0.4%; N2d, 0.7%)の存在比率は、MSC の 1.5 倍であった。MSC あるいは N2d にのみ発現している糖鎖は見つからなかった。

C-3-1-2-3 糖鎖差異解析

糖鎖試料 1~3 で帰属された全ての糖鎖について、 ^{12}C -PHN 標識糖鎖のピーク強度に対する ^{13}C -PHN 標識糖鎖のピーク強度の比率($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)を算出した(Fig. 22 及び Table 9). その結果, MSC を神経様細胞に分化誘導すると, 帰属されたほとんどの複合型糖鎖について増加する傾向がみられた. 一方, NeuNAc を 3 及び 4 分子もつ複合型 3 本鎖糖鎖 (Hex6HexNAc5NeuNAc3, Hex6HexNAc5NeuNAc4) は分化誘導すると発現量が 1/2 に減少することが明らかとなった.

C-3-2 MSC 及び N2d のタンパク質発現差異解析

C-3-2-1 MSC 及び N2d における神経細胞マーカーの免疫蛍光染色

神経幹細胞のマーカーとして使用されているネスチン, また, ニューロン及びアストロサイト等成熟した神経細胞のマーカーとして使用されている β III-チューブリン及び GFAP 等が, MSC 及び N2d に発現しているかどうかを免疫蛍光染色法により確認した. Fig. 23A 及び 23B は, ネスチン抗体を用いて免疫蛍光染色した結果であり, N2d だけでなく MSC も染色されることが明らかとなった. β III チューブリン及び GFAP についても同様に検討した結果, MSC と N2d に共通して発現していることが確認された(Fig. 23C-23F). 従来から使用されてきた神経マーカーの多くは MSC にも発現しており, これらのマーカーで, MSC と神経様分化細胞を区別することは難しいことが示唆された.

C-3-2-2 MSC 及び N2d 由来表層タンパク質

の発現差異解析

分化指標として利用するタンパク質は, セルソーター等の細胞分画に利用可能な細胞表層タンパク質であることが望ましい. そこで, まず細胞表層のタンパク質をビオチンで標識し, 細胞を溶解した後でタンパク質を抽出し, 二次元電気泳動を行った. つぎに, 蛍光標識ストレプトアビジンでビオチン標識タンパク質を検出し, 得られたスポットの蛍光強度に基づく差異解析を行った. 最後に, 差のみられたスポットにつき, ゲル内消化, LC/MS/MS 及びデータベース検索によるタンパク質同定を行った(Fig. 24).

C-3-2-2-1 MSC 及び N2d 由来細胞表層タンパク質のビオチン標識

まず, イミノビオチンを用いて細胞を標識した後, FITC-標識ストレプトアビジンを用いて細胞染色を行った. 神経様分化誘導後の細胞を染色した結果, 細胞の輪郭が染色され, 細胞表層タンパク質のみがビオチン標識されていることが確認された(Fig. 25). つぎに, ビオチン標識 MSC 及び N2d から調製したタンパク質について SDS-PAGE を行い, ビオチン標識タンパク質の分子量を確認した(Fig. 26). FITC-ストレプトアビジンで染色されたバンドの多くは, 150 kDa を超える高分子量タンパク質であった. 興味深いことに, 500 kDa 付近のバンド(バンド A) は N2d のみから検出された. このバンドについてタンパク質同定を行った結果, 約 600 kDa のタンパク質 A が含まれていることが明らかとなった.

C-3-2-2-2 アガロースゲル二次元電気泳動

によるタンパク質発現差異解析

バンド A には複数のタンパク質が混在していたことから、発現量の差が他のタンパク質に起因している可能性があったので、アガロースゲル二次元電気泳動によりタンパク質を展開した後、発現差異解析を行った。Fig. 27 は、pH3.0 から 10.0 の範囲の等電点アガロースゲルを用いたときの二次元電気泳動の結果である。アガロースゲルを使用しているため境界は不明瞭であるが 500 kDa 付近に、N2d で増加しているスポットが検出された。このスポットについてタンパク質同定を行ったところ、タンパク質 A が同定されたことから、MSC の神経様分化に伴いタンパク質 A は増加することが確認された。

スポット A 以外にもピーク面積に変化のみられるスポットがいくつか確認されたので、等電点の範囲を pH3.0 から 8.0 に狭めて二次元電気泳動を行った。その結果、検出された 48 個のスポットのうち、神経様分化後に 24 スポットが 1.5 倍以上増加し、7 スポットが 1.5 倍以下に減少していることが明らかとなった(Fig. 28 及び Table 10)。そこで、変動の見られたスポットについてタンパク質同定を行った結果、13 個の増加したスポット、及び 2 個の減少したスポットのタンパク質を同定することができた。

Type IV コラーゲンやラミニンには増加する傾向がみられたが、Type I, III コラーゲン及びフィブロネクチンには減少傾向が認められた。このことは、神経分化に伴い、細胞外マトリクス (ECM) を構成する成分の発現量が変化することを示唆していると思われる。また、スポット 28~31 及び 44 から同定されたタンパク質は同一タンパク質

であったことから、複数の isoform が含まれることが明らかとなった。

C-3-2-2-3 MSC の神経様分化指標候補 (タンパク質 A) の発現解析

タンパク質 A の発現量に変化が認められたことから、ウエスタンブロットにより、分化誘導後の経時的変化を調べた。Fig. 29 は、MSC、並びに神経様細胞へ分化誘導した後、3 時間、6 時間及び 1 日培養した細胞から得られた全タンパク質を試料としたウエスタンブロットの結果である。誘導後 3 時間でタンパク質 A のバンドが確認され、誘導時間が長くなるにつれて発現量も増加することが明らかとなった。また、250kDa 付近にもタンパク質 A と同じ挙動を示すバンドが観察され、isoform が存在する可能性が示唆された。一方、MSC にはタンパク質 A の発現は認められなかった。本実験の結果は、二次元電気泳動の結果を支持するとともに、タンパク質 A の発現量は、細胞表面だけでなく、細胞全体において増加していることを示唆していると思われる。

C-3-2-2-4 タンパク質 A の RNAi

タンパク質 A の神経様分化への関与を検討するために、タンパク質 A をノックダウンしたときの MSC の神経様分化について観察した。まず、3 種類のプライマーについて、ウエスタンブロットを用いてノックダウン効率を検討した結果、プライマー C による効率が最も良いことが示唆された(Fig. 30A)。そこで、プライマー C を用いてタンパク質 A をノックダウンしたときの形態学的変化を確認したところ、タンパク質 A をノックダウンしても、神経様細胞に分化することわ

かった(Fig. 30B). タンパク質 A は MSC の神経様分化の制御に直接関与しているのではなく、分化した結果として発現されるタンパク質であると推察された。

以上のように、MSC 及び MSC 由来神経様分化細胞の表層タンパク質について差異解析を行った結果、タンパク質 A を含む複数のタンパク質の発現量に変化が生じることが示唆された。これらのタンパク質は MSC の神経様分化における分化指標として利用できる可能性があると思われる。

C-4 免疫原性の事前評価法の開発に関する基盤研究

昨年度、Ad ベクターにより CXCL12 をマウス生体へ高発現させることにより、血液細胞の動態がどのように変化するか解析を行った結果、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。また、CXCL12 は B 細胞分化に必須であることが知られていたため、B 細胞の動態についても解析したところ、脾臓においてプレ B 細胞やプロ B 細胞といった B 前駆細胞が増加していることをフローサイトメトリーにより明らかにした。そこで本年度は、Ad-CXCL12 を投与することにより B 前駆細胞が実際に脾臓に生着しているかどうかを免疫抗体染色により解析した。Ad-CXCL12 をマウスに投与し 5 日後に脾臓の細胞を解析したところ、IgM⁺IgD⁺B220⁺ の B 前駆細胞が確認された (Fig. 31)。一方、コントロールベクターであるルシフェラーゼ発現 Ad ベクター Ad-Luc 投与マウスの脾臓ではそのような現象はみとめられなかつ

た。以上の結果から、Ad-CXCL12 投与により血漿 CXCL12 濃度を上昇させることで、脾臓に本来存在しないはずの B 前駆細胞が生着していることが示された。

B 細胞は抗原の刺激に応答して抗体を産生する細胞である。Ad-CXCL12 をマウス生体へ投与することにより B 細胞の動態が変化しているため、液性免疫に影響をおよぼしているかどうか検討した。Ad-CXCL12 投与 3 日後に T 細胞依存性 (TD) 抗原である chicken γ -globulin (CGG)、または T 細胞非依存性 (TI) 抗原である Ficoll を腹腔内投与し、その 2 週間後に抗体産生量を解析した。その結果、Ad-CXCL12 投与群は、Ad-Luc 投与群と比較し、CGG に対する IgM、IgG1 の抗体産生量が低下することが明らかとなった。一方で、Ficoll に対する抗体産生量はわずかではあるものの増加していた (Fig. 32)。以上の結果から、Ad-CXCL12 投与により、B 前駆細胞の動態を変化させるだけでなく、B 細胞の抗体産生についても影響をおよぼすことが明らかとなった。

CXCL12 以外にも、VEGF や Ang-1 などのサイトカインも骨髄の造血幹/前駆細胞を骨髄ニッチから遊離させる作用を有している。そこで、VEGF 発現 Ad ベクター (Ad-VEGF) を作製し、 5×10^{10} VP/mouse の濃度でマウス静脈内投与したところ、約 100ng/mL の VEGF が血漿中に認められた (Fig. 33)。今後、この Ad-VEGF や Ang-1 発現 Ad ベクター (Ad-Ang-1) を用いて血液細胞の動態について解析する予定である。

C-5-1. 低酸素・グルコース欠乏処理による

細胞の生存

低酸素・グルコース欠乏条件下での、6 ロットの hMSC の生存の時間経過を Fig. 34 に示す。コントロール群の生存率は比較的一定であったが、Repeated Measures One-way ANOVA を行ったところ、低酸素・グルコース欠乏処理群 (HGD, Hypoxia and Glucose Deprivation) とコントロール群と比較した場合、細胞生存率に優位 ($P < 0.05$) な差異が認められた。同時点における 2 群間の比較をした場合には、低酸素・グルコース欠乏処理開始後 48 時間で優位な差が認められた。これらの結果より、サイトカインの測定用の培養上清は低酸素・グルコース欠乏処理開始後 24 時間の時点で回収することとした。

C-5-2. サイトカイン抗体アレイによるサイトカイン放出プロファイルの検討

RayBiotech 社のサイトカイン抗体アレイを用いて、24 時間の低酸素・グルコース欠乏処理 (HGD) を行った場合の細胞上清とコントロールの細胞上清とで、含有されるサイトカインのプロファイルを比較した。化学発光量を定量したところ、HGD 群においてコントロール群と比べて有意な上昇 ($P < 0.05$ [Paired t-test]) が認められたのは、PIGF、osteoprotegerin、osteopontin、TGF- β 2、および FGF-4 であった (Fig. 35)。細胞が低酸素環境に暴露されると産生および分泌が増加するサイトカインとしてよく知られている VEGF に関しては、HGD 群とコントロール群とで差が認められなかった。

C-5-3. ELISA による検討

サイトカイン抗体アレイの結果を再確認する目的で、従来の ELISA 法を用いた PIGF、VEGF 等の定量を行った (Fig. 36)。その結果、HGD 群およびコントロール群のコンディションド・メディウム中の PIGF 濃度は非常に低く、サイトカインアレイの結果とは異なり、低酸素・グルコース欠乏 (HGD) 処理による濃度上昇は認められなかった。一方、コンディションド・メディウム中の VEGF 濃度を測定したところ、サイトカイン抗体アレイを用いた測定結果とは異なり、HGD 群ではコントロール群の 2-3 倍の濃度上昇が認められた。VEGF ならびに PIGF の活性に影響を与えるとされている可溶性 Flt1 の濃度は ELISA による測定系の検出限界未満 (31.2pg/mL 未満) であった。

後述の RT-PCR の結果をもとに、その他のサイトカインとして leptin、angiogenin、TGF- β 1 および HGF の濃度を測定したが、いずれも HGD 処理による分泌上昇は認められなかった。

C-5-4. RT-PCR による検討

サイトカイン抗体アレイの結果と ELISA の結果との間に乖離認められたことから、別のアプローチとして、リアルタイム RT-PCR により遺伝子発現を評価した。その結果、HGD 群ではコントロール群と比較して、細胞ロットに共通して VEGF、PIGF、TGF- β 1、Angiogenin、leptin などの遺伝子発現上昇が認められた (Fig. 37)。

C-6-1 AC133 陽性細胞由来 early EPC、単核球由来 early EPC の特性解析

まず、起源細胞画分の違いによる early EPC の特性の差異について検討した。Fig.

38にAC133陽性細胞由来 early EPCおよび単核球(MNC)由来 early EPCの分化誘導法を示した。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。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. 39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陽性細胞由来 early EPCと単核球由来 early EPCを抗CD31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CD31陽性であった(Fig. 40)。また、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. 40右上)。

抗CD45抗体および抗eNOS抗体で蛍光免疫染色後、共焦点顕微鏡で観察した結果、AC133陽性細胞由来 early EPCと単核球由来 early EPCのいずれにおいても、すべての細胞がCD45陽性、eNOS陽性であった(Fig. 41)。

これらの結果から、CD31、CD45およびeNOS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は類似していると考えられた。一方、 10^8 個の血液単核球から調製可能な細胞数に関して、AC133陽性細胞由来 early EPCが 10^6 個程度であるのに対して単核球由来 early EPC血液単核球では 10^7 個程度である。再生医療への応用において細胞数の確保は重要な要素であると考え、以下の検討は単核

球由来 early EPCを用いて実施した。

C-6-2 Early EPCの特性指標の探索

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を解析した。Fig. 42に、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結果を示す。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。興味深いことに血管新生に重要と考えられるマトロ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。そこで、early EPCの浸潤能および浸潤におけるMMP-2/MMP-9の関与についてlate EPCやHUVECと比較検討した。

C-6-3 種々の細胞におけるMMP-2/MMP-9の発現

Early EPCにおけるMMP-9タンパク質の発現を種々の細胞の培養上清を用いてウエスタンブロット法とザイモグラフィーで検討した(Fig. 43)。その結果、early EPCの培養上清にのみMMP-9のバンドが検出され、Late EPC、HUVEC、HCAECの培養上清にはMMP-2のバンドが検出された。また、ザイモグラフィーでは、ウエスタンブ

ロットでバンドが検出された試料について、ウェスタンブロットと同じ分子量を示す泳動位置にゼラチン分解により生じるバンドが検出された。MMP-2 および MMP-9 の発現パターンは、は Fig. 42 の遺伝子発現プロフィールと一致するものであった。

MMP-2 や MMP-9 を産生する細胞は、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と考えられる。また、高い浸潤活性には MMP-2 や MMP-9 が細胞表面に存在することが必要であるという報告もある (Brooks et al. Cell 85 683 1996, Yu et al. Gene Dev. 2000 14 163)。そこで、フローサイトメトリーにより MMP-2/MMP-9 の細胞表面局在を検討した。その結果、early EPC の細胞表面には MMP-9 のみならず、培養上清には観察されなかった MMP-2 も検出された。一方、late EPC、HUVEC、HCAEC の細胞表面には、遺伝子発現解析結果に一致して MMP-9 は検出されず、培養上清に検出された MMP-2 も細胞表面には検出されなかった (Fig. 44)。細胞膜タンパク質である CD44 と結合して MMP-9 が細胞表面に存在しているという報告 (Yu et al. Gene Dev. 2000 14 163, Bansal Plos ONE 4 e4911 2009) を参考に、early EPC を免疫染色し、フローサイトメーターと共焦点顕微鏡 (Fig. 45) で解析した。その結果、MMP-9、MMP-2、CD44 は、いずれも early EPC の表面に存在することが示された。MMP-9 あるいは MMP-2 と CD44 の 2 重染色 (フローサイトメーター 3 段目) では、MMP-9 陽性あるいは MMP-2 陽性の細胞で CD44 陰性の細胞は殆ど観察されなかった。次に early EPC を細胞質と細胞膜に分画後、ウェスタンブロットで解析した結果 (Fig. 46)、共焦点

顕微鏡 (Fig. 45) で解析した結果と同様に、細胞膜画分に MMP-9、MMP-2、および CD44 が検出された。

C-6-4 Early EPC の浸潤活性

マトリゲルに対する early EPC の浸潤活性を、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 は late EPC、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. 47)。さらに、VEGF と共に MMP-2/MMP-9 阻害剤を加えると early EPC の VEGF 刺激に応答した浸潤は完全に阻害された (Fig. 48)。これらの結果から、early EPC の浸潤には MMP-2/MMP-9 が関与していることが示され、early 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が示された。

C-6-5 AC133 由来 early EPC における MMP-9 の発現

これまでの解析から、単核球由来 early EPC は MMP-9 を発現していることが明らかになった。そこで、AC133 由来 early EPC における MMP-9 の発現を共焦点顕微鏡で検討した。Fig. 49 に示すように AC133 由来 early EPC も MMP-9 を発現し、この点でも単核球由来 early EPC と共通していると考えられた。

C-7 O 結合型糖鎖解析技術の開発

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。しかしながら同じ O 結合型糖鎖でも、GalNAc を介しコアタンパク質に結合するムチン型糖鎖と Xyl を介しコアタンパク質に結合する GAG 型糖鎖は、糖鎖の物理化学的な特性の違いから、分離分析については異なる手法を用いて行われてきた。平成 20 年度の本研究で、我々はムチン型糖タンパク質から O 結合型糖鎖を切り離し分析する方法を報告した。我々はその研究過程で、幸運にもムチン型糖タンパク質の糖鎖切り話し過程で、プロテオグリカン中のグリコサミノグリカン鎖も効率よく切り離されることを発見した。そこで、本年度は平成 20 年度に報告した高速糖鎖自動切断装置 “AutoGlycoCutter (AGC)” とセロトニンアフィニティークロマトグラフィーを組合わせたムチン型糖鎖の比較糖鎖プロファイリング技術を PG 型糖鎖解析へ応用を図った。

最初にウシフェツイン由来ムチン型糖鎖とヒアルロン酸オリゴ糖混合物をモデル試料として、ムチン型糖鎖と GAG 型糖鎖のセロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる分離について検討した。結果を Fig.50 に示す。ウシフェツイン由来ムチン型糖鎖のうち、シアル酸を 1 残基持つシアリル T (NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc) が 8 分、シアリル T の GalNAc6 位に更にシアル酸 1 残基が付加したシアル酸を 2 残基持つジシアリル T (NeuAc α 2-3Gal β 1-3[NeuAc α 2-6]GalNAc) が 15 分に観察された。一方、ヒアルロン酸オリゴ糖は 15 分~30 分の間に 4 糖から順に重合度の小さなものから観察された。セロト

ニンアフィニティークロマトグラフィーは弱イオン相互作用により糖タンパク質糖鎖をシアル酸残基数の違いにより分離できる手法であるが、GAG 型糖鎖のようなカルボキシル基や硫酸基を持つ糖鎖とも相互作用し、分離分析に応用できることがわかった。

次にヒト大腸癌細胞 HCT116 の O 結合型糖鎖混合物についてセロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる分画を試みた。結果を Fig.52 に示す。その結果、3 分~16 分の間にシアル酸残基数の異なるムチン型糖鎖と考えられる 6 つのピークが観察された。一方、1M NaCl の溶出により 22 分~26 分に GAG 型糖鎖と考えられるピークが観察された。観察された各ピークを分画し、順相 HPLC とキャピラリー電気泳動により分析した。

順相 HPLC では、M1~M6 の全ての分画においてムチン型糖鎖が観察された (Fig. 52, Table 1)。M1 分画ではムチン型 Core2 構造を持つ 4 糖 (Gal β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]GalNAc) を主とし、さらにラクトサミンユニット (Gal β 1-4GlcNAc) が 1~2 ユニット付加したオリゴ糖が観察された。M2 分画では Core2 骨格を持つ 4 糖のいずれかの Galactose 残基に N-アセチルノイラミン酸が付加したモノシアロオリゴ糖を主とし、これらのオリゴ糖にさらにラクトサミンユニットが 1~2 ユニット付加したオリゴ糖が観察された (Fig.52, Table 12)。M3 分画では約 20 分にシアリル T 抗原糖鎖 (NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc) が観察され、シアリル T 抗原糖鎖に N-acetylglucosamine が付加したオリゴ糖の含量が最も高かった。10 分以降に溶出された M4~M6 のうち、M4 分画は、N-アセチルノイラミン酸と Galactose から構成されるオリゴ糖であり、

AGC においてピーリング反応により生じた分解物であった (Fig. 52, Table 12)。一方、M5 と M6 分画のオリゴ糖はいずれも N-アセチルノイラミン酸を 2 残基持つジシアロオリゴ糖であり、M5 は Core2 骨格を持つ 4 糖およびさらにラクトサミンユニット 2 ユニットが付加した 6 糖の非還元末端に N-アセチルノイラミン酸を 2 残基持つオリゴ糖であった (Fig. 52, Table 12)。一方、M6 はジシアリル T 抗原糖鎖 (NeuAc α 2-3Gal β 1-3[NeuAc α 2-6]GalNAc) が主要なオリゴ糖であった。一方、1MNaCl によって溶出される 20 分以降の分画にはムチン型糖鎖は全く観察されなかった。

1MNaCl によって溶出される 20 分以降の分画は、脱塩濃縮後、3 種類の GAG 型糖鎖加水分解酵素を組合わせて不飽和二糖とし蛍光標識化して、キャピラリー電気泳動法による 2 糖組成分析を実施した。Fig. 53a に HCT116 細胞由来の 1M NaCl 溶出分画を Chondroitinase ABC により消化し、蛍光標識後 CE により分析した結果を示す。フェログラム上で観察される各不飽和二糖の構造を Fig. 54 に示す。不飽和二糖標準品の分析結果との比較、および標準品の添加実験により各ピークを同定した結果、12 分付近のピークは硫酸基を持たない Δ di-HA および Δ diCS-0S、7 分付近のピークは硫酸基を 1 残基有する Δ diCS-4S および Δ diCS-6S、そして 5 分付近のピークは硫酸基を 2 残基有する Δ diCS-SE であった。また、Heparitinase 1 および Heparitinase 2 の同時消化で得られた HS 由来の不飽和二糖を CE により分析した結果 (Fig. 53b)、15 分に硫酸基を持たない Δ diHS-0S が、7 分に硫酸基を 1 残基有する Δ diHS-NS、 Δ diHS-6S、 Δ diHS-2S が、4.5 分に硫酸基を 2 残基有する Δ diHS-S1、 Δ diHS-S2、 Δ diHS-S3 が、そして 3.7 分に Δ diHS-TriS が

観察された。以上の結果、HCT116 では硫酸基を持たない Δ diCS-0S や Δ diHS-0S により構成される GAG 鎖を多く含むと考えられた。培養癌細胞をはじめとする生体試料から抽出したサンプルを解析する際、試料由来と考えられる不純物のピークなどが観察され、ピークの同定や定量が困難となることが多い。しかし、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーにより分画された GAG 糖鎖分画では培養癌細胞由来の GAGs 不飽和二糖を高精度に解析できた。なお、ムチン型糖鎖分画 (M1~M6) を酵素消化し 2 糖組成分析した結果、GAGs 由来不飽和二糖のピークは観察されなかったことから、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーを用いることで、培養癌細胞由来の O-結合型糖鎖群からムチン型糖鎖と GAGs を簡便に分画できることがわかった。また得られた各分画について NP-HPLC、MALDI-TOF MS、CE および各種酵素消化を組み合わせることで培養癌細胞中のムチン型糖鎖と GAG の両方を含む O-結合型糖鎖混合物を一挙に定量的かつ網羅的に解析できた。