

なく細胞の中で増殖するものもあるとされ、このようなマイコプラズマの検出には向かないおそれがある。リアルタイム PCR 法を細胞基材の品質管理試験として用いるためには、使用者が細胞基材や培養液からの抽出効率も含めて、実際に厳密なバリデーションを実施して測定感度や測定法としての妥当性を明らかにすることが必要である。

E. 結論

培養細胞を汚染する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比較検討した結果、酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法は、PCR 法よりもさらに迅速かつ簡便で、生きたマイコプラズマを検出する利点があるが、検出限界は PCR 法よりもかなり劣り、ルーチンの検査でマイコプラズマに高度に汚染した細胞を見つけるには有用だが、細胞組織加工医薬品の品質管理試験としては妥当ではないことが明らかになった。一方、PCR 法のうち、Nested PCR 法とリアルタイム PCR 法は十分な感度を持つ可能性が示唆されたが、マイコプラズマ迅速試験法として品質管理に用いるには、複数のマイコプラズマ標準品を使用し、DNA の抽出効率も含めて十分なバリデーションにより妥当性を示す必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 内田恵理子: “第 8 章 細胞基材のマイコプラズマ試験”、先端バイオ医薬品の評価技術、山口照英監修、シーエムシー出版、東京(2010)、pp151-167
- 2) 内田恵理子: “20. バイオテクノロジー

応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験”、日本薬局方技術情報 2010 追補(JPTI2010)第 1 5 改正第一追補/第二追補対応、(財)日本公定書協会編、(株)じほう、東京(2010)、pp85-91

- 3) 内田恵理子、山口照英: 医薬品のウイルス安全性確保: 核酸増幅検査 (NAT) による C 型肝炎ウイルス検出の評価と NAT による高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発、*YAKUGAKU ZASSHI*, **130** (2), 163-169 (2010)
- 4) 宮田直樹、川崎ナナ、内田恵理子、蜂須賀暁子: 平成 19 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告: 日本薬局方の名称関連項目の科学的整備に関する研究、*医薬品研究*, **40**, 587-598 (2009)
- 5) 山口照英、内田恵理子: 核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保、*Pharmstage*, **9** (2), 1-5 (2009)

2. 学会発表

- 1) 眞田由親、新村卓也、井関寛、内田恵理子、山口照英、小木美恵子: HL60 細胞における Dimethyl Sulfoxide による分化誘導と c-myc の変化について、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月、横浜
- 2) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英: 造血支持能を持つフィーダー細胞膜タンパク質のプロテオーム解析による探索、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月、岡山

G. 知的財産権の出願・登録状況: なし

Table 1 日本薬局方収載マイコプラズマ否定試験法の比較

試験法	特徴	長所	短所
①培養法	人工培地（液体培地、寒天培地）に検体を接種してマイコプラズマを培養し、マイコプラズマ特有のコロニーを検出する 所要日数：4週間以上 検出感度：1～10cfu/ml	・マイコプラズマの直接培養法	・判定まで非常に時間がかかる ・培養細胞を汚染するマイコプラズマは人工培地では増殖しないものもある
②指標細胞を用いたDNA染色法	指標細胞(Vero細胞)に検体を接種し、細胞に依存して増殖したマイコプラズマをDNA特異的蛍光色素で染色して細胞核外の微小なDNA蛍光斑点として検出する間接検出法 所要日数：4～7日 検出感度：10～100cfu/ml	・培養細胞を汚染するマイコプラズマは細胞に依存して増殖しやすいため、培養法で検出されないマイコプラズマも検出できる	・DNAを蛍光染色する間接検出法であり、マイコプラズマDNAを特異的に検出するわけではない ・細胞由来DNAも染色されるため、判定に熟練を要する
③PCR法	検体からDNAを抽出し、マイコプラズマ特異的プライマーにより増幅して検出する方法 所要日数：1～2日 検出感度：1～10 copy / reaction	・迅速に判定できる ・検出感度、特異性に優れている	・マイコプラズマの不活性菌、DNA断片も検出され、感染性のあるマイコプラズマを検出するとは限らない ・プライマーに依存して検出されるマイコプラズマ種が規定される ・キャリーオーバーによる偽陽性が出やすい

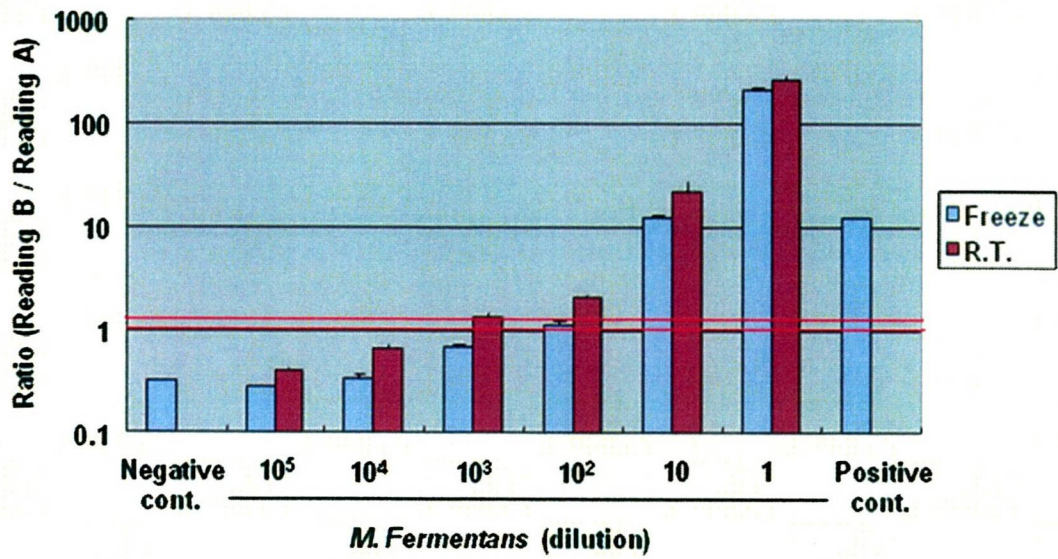


Fig.1 Mycoplasma detection by MycoAlert

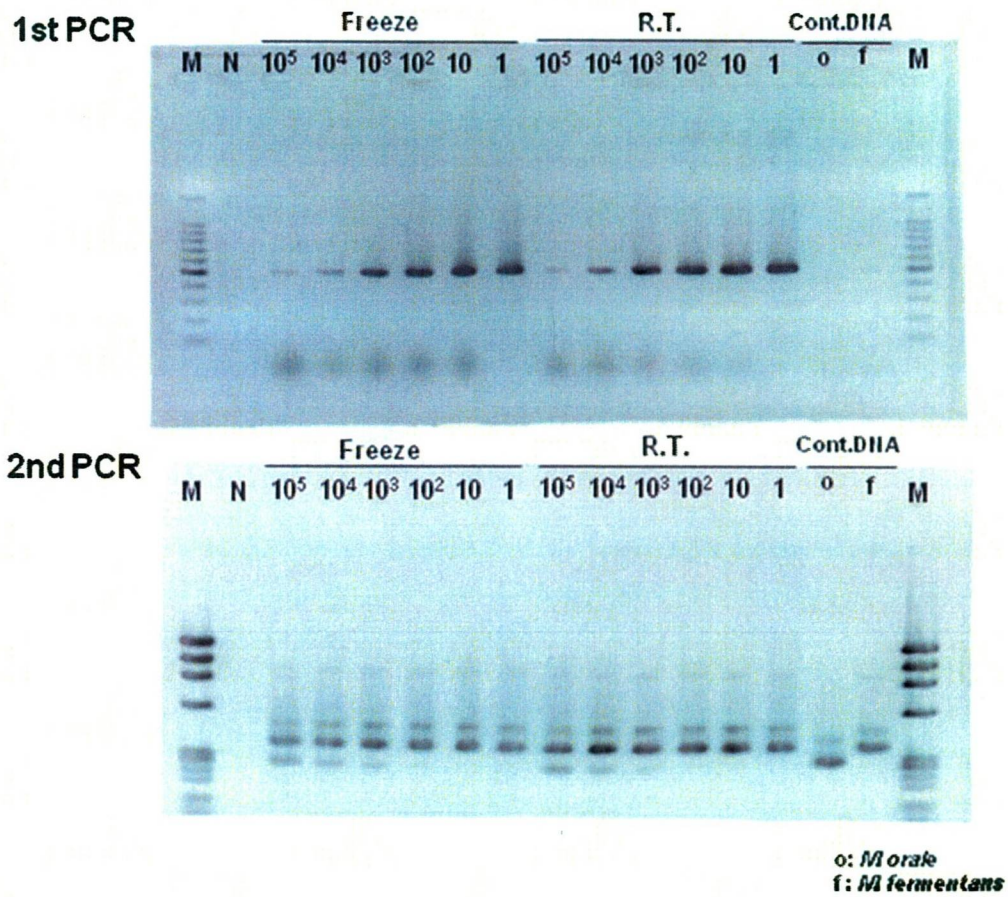


Fig.2 Mycoplasma detection by Nested PCR

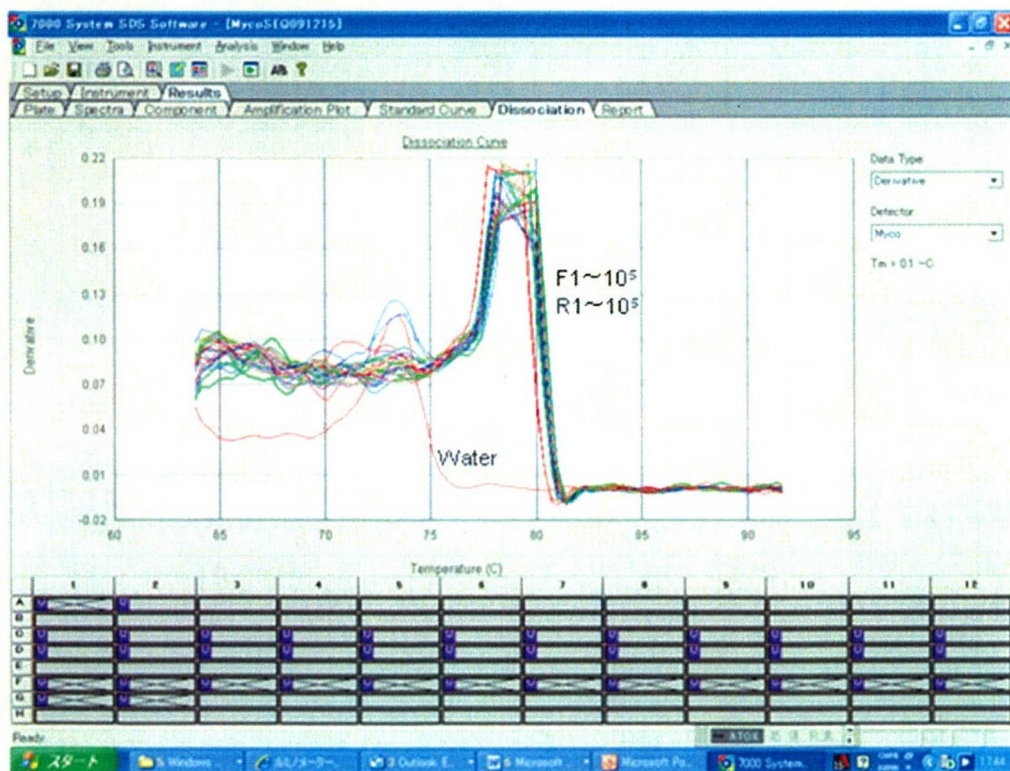
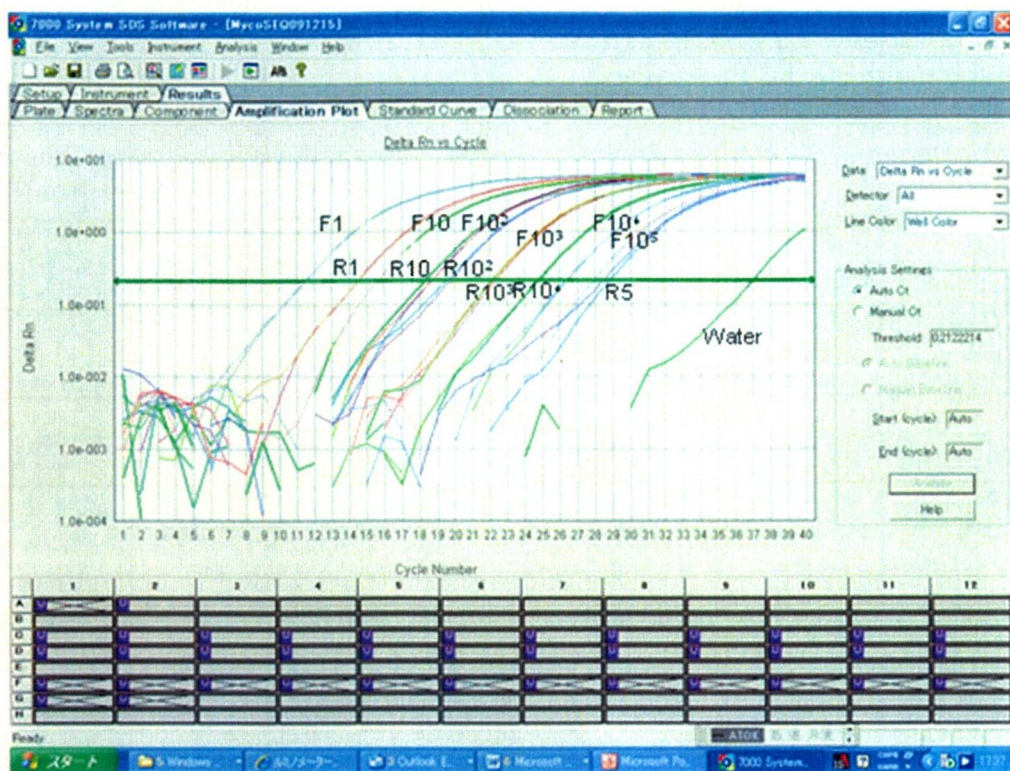


Fig.3 Mycoplasma detection by real-time PCR method

Table 2 Mycoplasma detection results by real-time PCR

<i>M.fermentans</i> Dilution	R.T.			Freeze		
	Ct	Tm	Detection	Ct	Tm	Detection
1	14.45	79.1	+	11.4	79.1	+
10	18.25	79.1	+	15.57	79.1	+
10 ²	19.49	79.1	+	18.63	79.1	+
10 ³	22.27	79.1	+	22.1	79.1	+
10 ⁴	24.77	79.1	+	26.37	79.1	+
10 ⁵	28.8	79.1	+	27.95	79.1	+
Positive cont.	29.44	79.7	+			
Negative cont	37	73.5	-			

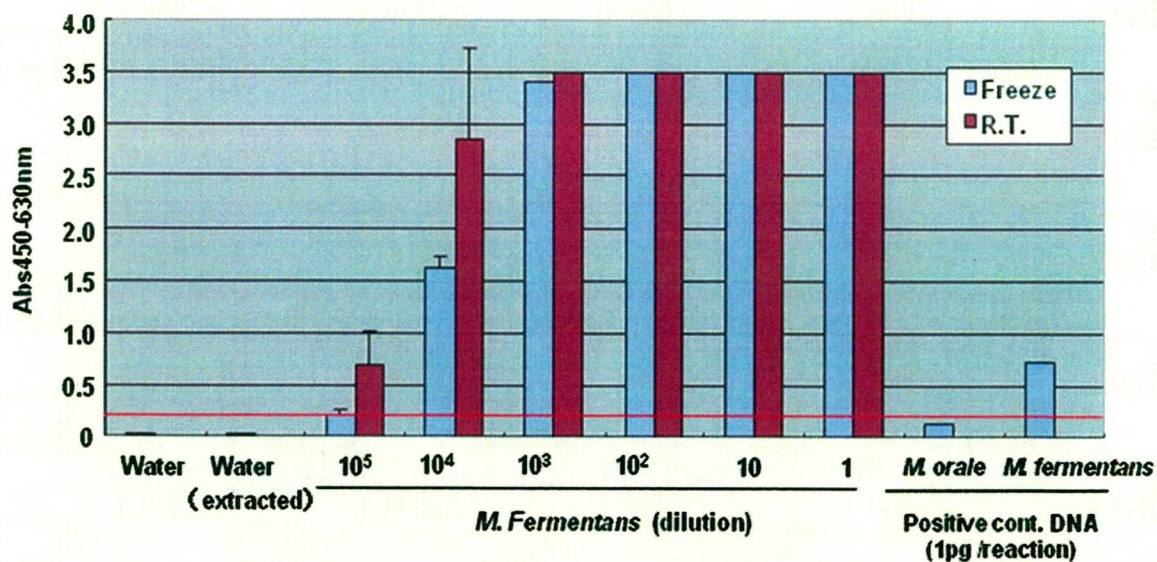


Fig. 4 Mycoplasma detection by PCR ELISA method

Table 3 Comparison of Mycoplasma detection methods

		<i>M. fermentans</i> dilution					
		1 (4.5 x 10 ⁶ CFU/ml)	10 (4.5 x 10 ⁵ CFU/ml)	100 (4.5 x 10 ⁴ CFU/ml)	1000 (4.5 x 10 ³ CFU/ml)	10000 (450 CFU/ml)	100000 (45 CFU/ml)
MycoAlert	Freeze	+	+	+/-	-	-	-
	R.T.	+	+	+	+	-	-
PCR (1st PCR)	Freeze	+	+	+	+	+	+
	R.T.	+	+	+	+	+	+
Nested PCR (2nd PCR)	Freeze	+	+	+	+	+	+
	R.T.	+	+	+	+	+	+
Real-time PCR	Freeze	+	+	+	+	+	+
	R.T.	+	+	+	+	+	+
PCR-ELISA	Freeze	+	+	+	+	+	+/-
	R.T.	+	+	+	+	+	+

Table 4 Comparison of detection of Mycoplasma DNA by PCR methods

Mycoplasma DNA / PCR reaction	Real-time PCR		PCR-ELISA	
	<i>M. hyorhinitis</i>	<i>M. orale</i>	<i>M. hyorhinitis</i>	<i>M. orale</i>
100pg	3/3	3/3	n.d.	5/5
10 pg	3/3	3/3	5/5	5/5
1 pg	3/3	3/3	5/5	0/5
100 fg	3/3	3/3	1/5	0/5
10 fg	1/3	1/3	0/5	0/5
1 fg	0/3	0/3	n.d.	n.d.
0.1fg	0/3	0/3	n.d.	n.d.

n.d.: not determined

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

分担研究者 鈴木 和博 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部部長

研究要旨

ヒト iPS 細胞の開発を受け、幹細胞を利用した細胞治療による再生医療の実現に向けた機運が高まりつつある。一方で、生体外で培養した細胞を、治療として生体へ戻す際の癌化をはじめとする危険性についても指摘されており、臨床応用へ向けて、細胞・組織加工医薬品の品質チェックと安全性確保は我々に課せられた重要な課題である。こうした要求に答えるべく、我々は主に細胞の培養過程における遺伝子の安定性の評価手法に関して研究を行ってきた。その中で、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞をモデルとし、培養過程における染色体レベルで遺伝的安定性を網羅的かつ詳細に調べる目的で、マイクロアレイを使った CGH (Comparative Genome Hybridization) 法を用いて検討した結果、1 ロットの細胞に培養過程における染色体変化を検出した。これまでの検討で、かなり早い時期からこの異常が存在したことが示唆されたため、同一ロットの細胞を別途入手し長期培養を行ったところ、同一の染色体異常が観察され、この異常は細胞の購入時（樹立時）より存在したことが証明できた。

また、細胞組織加工医薬品の品質、有効性を評価するためのバイオマーカーを検出する手法として、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系の確立を行い、間葉系幹細胞のプロテオーム解析を行ってきた。今年度はデータ解析の効率化のためのソフトウェア Progenesis を導入し、サンプル間のノンラベルによる定量比較を行うとともに、タンパク同定についても効率化を図り、同定数を向上させることができ、間葉系幹細胞の特異的 CD 抗原のうち昨年度に検出できなかった CD105 を検出できた。また、ソフトウェアにて検出されたペプチドピークの数は一萬を超え、合計で 1000 以上のタンパク質を同定でき、細胞のキャラクタリゼーションに有効であることがわかった。

協力研究者

- 鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
室長
- 押澤 正 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
主任研究員
- スレッジ
テイルパッティ 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
- 佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
室長
- 田邊思帆里 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
研究員
- 小木美恵子 金沢工業大学
情報フロンティア学部
教授

A. 研究目的

ヒト人工多能性幹細胞 (iPS) の開発は、体細胞を利用した再生医療、細胞治療法の開発に大きな可能性をもたらし、実用化に向けた急速な流れが各方面で加速されつつある。iPS は細胞治療の分野に大きな期待をもたらすとともに、その一方で、その安全性、主に腫瘍原性が問題となっており、これを如何に克服して、実用化へのハードルをクリアするかは、各種細胞の開発とともにわれわれに課せられた大きな課題である。我々は、ヒト iPS 細胞の開発以前より、細胞治療用医薬品の安全性に関して、特に

遺伝子および染色体の安定性という観点から検討を進めてきた。体内では比較的安定な細胞も、外に取り出して、人工的な培養環境の下、時として増殖因子や多種血清成分のなかでの分裂、増殖、分化を強いられるわけで、いくら培養環境を整えても、細胞の DNA や遺伝情報にエラーがおき、何らかの異常細胞が出現する可能性は高い。最悪のケースとして、ひとつでも癌化した形質を獲得した細胞が培養過程で生じた場合、この細胞を治療に用いることは、確実な癌原性物質を投与することに他ならず、その危険性は大きいといえる。しかし、一方で遺伝病や各種疾患に基づく生体の機能的欠損を、体外で培養した機能性の細胞集団を持って治療することは、従来治療法がなかった疾患に対し画期的な治療法となる可能性を秘めている。こうしたベネフィットをより有益に享受するためにも、考えられるリスクをきちんと評価して、それをコントロールするための安全面での検討は非常に重要である。各種生体由来の幹細胞などを培養、分化後に生体へ戻す場合など、培養過程における染色体変化や、がん遺伝子の活性化などの遺伝子変化が引き起こされる危険性があり、これらを十分にチェックする検査法を持つことが、細胞治療医薬品の安全を担保する上で重要な課題となる。細胞の染色体レベルでの変化を捉える手法として、CGH 法があるが、これまでに我々は、BAC(bacterial artificial chromosome) クローンやオリゴマーをスポットした CGH マイクロアレイおよび SNP を網羅的に検出する GeneChip による CGH 法を用いることにより、従来の手法では検出

できなかったゲノム異常を網羅的かつ高解像度に検出可能であることを示した。実際の細胞治療を想定したモデルケースとして、市販のヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の継代培養における染色体変化の可能性を検討し、長期培養により細胞集団全体が、特定の染色体異常を持った細胞に置き換わるという事例を発見するに至った。長期培養で染色体が不安定となることは一般的にも指摘されているところであり、例えばテロメアの縮小による染色体転座のメカニズムも考えられているが、この場合にはランダムな変化が高頻度に起こることが考えられ、CGHアレイで検出可能となるような共通した変化とはならない。培養の過程で一つの異常細胞 (これは常に低頻度ではランダムに生じていると考えられるが) が出現し、その細胞が比較的安定でかつ増殖性を獲得していたがゆえに、その後の継代を経て徐々にカルチャー中に拡大していったと考えられる。

さらに本研究では、細胞培養過程における、品質および有効性評価に有用なバイオマーカーの探索のため、細胞を用いた網羅的プロテオーム解析のための高感度分析手法の開発を、オンラインナノ LC・タンデム質量分析装置を用いて行った。

B. 研究方法

I. 細胞の染色体安定性に関する検討

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に継代を続けた。

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を作製し、以下に示した FISH プローブを用いて、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 プローブを、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。

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。

II. 細胞のプロテオーム解析

1. サンプルの前処理

(タンパク質の抽出)

1.5X10⁵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°C 30 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。

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。

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。

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。

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。

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。

C. 結果

I. 細胞の染色体安定性に関する検討

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(図1)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図 3 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、表 1 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 4F1560 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(Cytotherapy. 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。

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、図 2 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、図 4 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、図 5 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。

II. 細胞のプロテオーム解析

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（図6）。

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: 5F0138）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 で表示した例を図7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。(図8)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により、パフォーマンスが向上し、満足できるアライメントが可能となった。

図9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。図に示した例では、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、Swiss Prot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、実際の数はいずれも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表 2 と 3 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が含まれていたが、ポジティブなマーカとしては、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 マーカーを図 10 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、細胞のキャラクタリゼーション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リゼーションに有用なタンパクマーカの検索を行ない、細胞の品質評価へと応用したい。

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、必ずいくつもの危険性が伴う。特に、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。我々はヒト骨髄由来間葉系幹細胞 hMSC を用い、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、頻度は低かったが、解析した 1 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、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が、いつこ

の異常が起きたかをはっきりさせるため、同一ロットを他の研究者から入手し、長期培養により同一の異常が出現するかを確認した。その結果、予想されたとおり、全く同じと考えられる異常が、大部分の細胞に観察され、この異常が細胞購入時に既に存在したことが証明できた。これまでに報告されたこのロットの増殖曲線を良く見ると、培養途中で立ち上がりを見せており(矢印)、この時期に異常細胞のポピュレーションが拡大したことが推察される(図 11)。同様の変化は、新たに療品部より入手した同一ロットの細胞を再培養した際にも観察され、異常の出現は増殖曲線からも予測された。異常の出現時期を見ると今回再培養した際にはその時期が早くなっているが、これは今回通常と比べ、比較的コンフルエントに近い状態で継代したことが影響したと考えられる。

残念ながら、異常が観察された細胞の由来については性別、年齢、人種程度の情報しか得られないため、癌などの疾患や治療歴が無かったかを知ることはできなかったが、細胞の提供者の体内に既にこうした異常が存在した可能性もあり、それを取り出して培養したことにより、増殖性による選択圧がかかり、異常細胞の割合が増大していったと考えられる。これまでの検討で、この異常をもった細胞は不死化まではされていないことがわかっているが、がん化に向けたステップを踏み出しているとも考えられる。今後、細胞を利用した医薬品の製造においては、こうした異常を発生させる可能性を最大限除き、より良い品質の細胞を供給する必要がある。その意味で、低頻度から増殖性の異常をもった細胞を検出

できる手法の確立が望まれる。理想的には低頻度な異常細胞をオールマイティーに高感度検出できる試験法が望まれるが、現状では難しいと考えられるため、増殖性を生かして、一定期間継代をして異常を増幅した後検出することが現実的な対処法であると考えられる。自家細胞からの移植のように時間的な制限がある場合には難しいが、汎用性のあるバンキングした幹細胞を利用する場合などに対しては、こうした検査を課することは必要であると考ええる。

今回確認された染色体異常は、品質管理という観点とは別に、その成因や増殖性のメカニズムに関しても非常に興味もたれる。これまでの解析で、増幅部位に存在する遺伝子、および発現変化をする遺伝子群に関しての知見が得られているが、増殖性を説明できるには至っていない。また、CGH 解析の結果から、増加したマーカー染色体は 7 番染色体由来と考えられたが、今回のセントロメア FISH の結果から、セントロメアは 17 番染色体由来であることが確認された。ただし、m-FISH の結果からは他の部分に対しては 7 番染色体由来である可能性も考えられる。今後、クロモソームペインティング、切断点のシーケンス解析などで、詳細な染色体異常の解析を行なうことにより、異常成因に対して理解を深めたい。特に、17 番染色体は複雑なリアレンジメントを起こしていることが予想され、p53 遺伝子等の関与も含めて、シーケンスレベルでの異常の解析が期待される。

次に、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の検討を進め、Progenesis ソフトウェアの導入により、ノンラベル法によるサンプル間の

定量比較が可能となった。これにより、今後、細胞、組織加工医薬品の品質評価に有用なバイオマーカーの開発につながると期待される。使用した LTQ·Orbitrap 質量分析機は、高分解能、および高感度であり、ゆえに得られるデータの複雑性が高まることによりこれまでデータ解析の部分が研究を進める上で課題となっていたが、Progenesis ソフトウェアの導入により、この部分が効率化できた。ピークの認識等に関しまだ改良の余地があるものの、マニュアルでの検証を加えることにより、バイオマーカーの検索に関して、実用可能なレベルにあることが確認できた。本ソフトウェアは 2 次元電気泳動で培われた技術を元に画像ベースでのピークの検出およびアライメントを行なっている点の特徴であるが、我々が独自に開発してきたソフトウェア **mzMore** は、数値データを直接取り扱っているという違いがあり、今後は Progenesis での経験を生かし、数値データを扱う利点を強調できる形で独自の開発を進めたい。LTQ·Orbitrap と Progenesis を組み合わせることにより、間葉系幹細胞のホールプロテオーム解析で、1 万を超えるペプチドシグナルを検出可能であることがわかった。タンパク同定に関しても、複数のデータを Progenesis でまとめて MASCOT 検索を行なうことにより、同定数の向上が可能となり、千以上のタンパク質の同定を行なうことができた。今回はモデルケースとして、3 対 3 のデータ比較であったが、本ソフトウェア上では、さらに多くの LC·MS データの定量比較と統計解析が可能であり、今後はバイオマーカー検出に向けた検討を進める予定である。

さらに、今回同定されたペプチドシグナルは、検出されたペプチド数からすると半分以下であり、今後はマーカー候補に絞った MS/MS 測定を行なうことで、さらに同定効率を上げることが課題である。また、一方で細胞由来のペプチドを網羅的に同定しリファレンスデータベースを作成することも有用であると考えられることから、今後この両面からのアプローチを行なっていきたい。

今回、継代数の違いによる変化をモデルケースとして解析したが、ペプチドレベルでは 2 群間で明瞭な変化を示すペプチドが多く観察されたが、同定のついたタンパクレベルでの変化としては、はっきりとした変化は少なかった。その中で、発現変化のあったタンパク質として注目されるのは、細胞の増殖性に関与するタンパク質、および細胞骨格タンパクの変化である。前者は継代により発現が低下することにより、増殖性の低下、後者は培養による細胞の形態変化につながっている可能性があり、今後さらに解析例を増やすことにより検証を行ないたい。

またこの比較プロテオーム解析により、今後染色体異常の見られたロットに関して正常細胞との間で発現の変化するタンパク質を明らかにする計画である。遺伝子発現解析の結果とあわせて、増殖性獲得のメカニズムの解明を行なうとともに、異常細胞の検出に有効なバイオマーカーとしての利用も期待できる。全く新規のタンパク質がマーカーとして検出されれば、異常細胞を低頻度から高感度に測定できる可能性もあり、期待が持たれる。

E. 結論

以前の研究において頻度は低いものの、hMSC 細胞の安定した異常として観察された染色体変化は、同一起源の細胞を用いて同一の異常が観察されたことより、細胞購入時より存在したことを証明することができた。生体内、もしくはhMSCの分離、樹立時にこうした増殖性の異常が発生していたという事実は、今後治療に用いる細胞の由来、および樹立時にその品質に対してより注意が必要であることを示唆している。現状では、低頻度からすべての異常を検出することは難しいため、増殖優位性を指標として、一部の細胞を用いて少し継代を進めた後、共通性のある異常を示さないことを確認した後にそのロットを利用するといった品質評価が望ましいと考えられる。

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いたが、細胞間の定量比較のためには、膨大なマススペクトルデータの効率的な解析が課題となっていた。今回市販のソフトウェアであるProgenesis LC-MSの利用により、ノンラベルによる定量比較がある程度可能であることが示され、今後細胞の品質評価に有効なバイオマーカーの検索に活路が開かれた。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.

Yamaguchi T, Suzuki T, Arai H, Tanabe S, Atomi Y

Continuous mild heat stress induces differentiation of mammalian myoblasts, shifting fiber type from fast to slow.

Am. J. Physiol. Cell Physiol. 298 : C140-C148, 2010.

2. 学会発表

鈴木孝昌, Suresh Thiruppathi, 押澤正, Ramesh Doss, 田邊思帆里, 佐藤陽治, 鈴木和博 細胞・組織加工医薬品の品質評価および標準化に向けたプロテオーム解析技術の利用

日本ヒトプロテオーム機構第7回大会 (2009年7月)

T. Suzuki, A. Kohara, A. Ramadan, Y. Kikuchi, M. Honma, M. Hayashi Comparative study on in vivo genotoxicity of ochratoxin A and aristolochic acid as a causative for the Balkan Endemic Nephropathy

10th International Conference on Environmental Mutagens (2009年8月)

C. Furihata, T. Watanabe, A. Tadakuma, M. Kido, Y. Ishikawa, M. Natsume, M. Nakajima, T. Suzuki, S. Hamada, A. Koeda, K. Narumi, K. Oshida, A. Maeda, M. Hirayama, T. Sakuma, H. Sanada, I. Hanahara, M. Sakurai, W. Ohyama, E. Okada, H. Honda, S. Sutou Differential gene expression and gene networks induced with genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in mouse liver examined by quantitative real-time PCR

10th International Conference on Environmental Mutagens (2009年8月)

H. Takasawa, H. Suzuki, I. Ogawa, Y. Shimada, K. Kobayashi, Y. Terashima, H. Matsumoto, R. Ohta, K. Oshida, J. Tanaka, C. Aruga, N. Ikeda, T. Suzuki, T. Hagiwara, S. Hatakeyama, K. Nagaoka, J. Yoshida, T. Imamura, A. Miyazaki, Y. Saitou, S. Minowa, M. Kawabata, M. Hayashi Summary of collaborative studies of liver micronucleus assay in young rats - JEMS/MMS Collaborative Study Group

10th International Conference on Environmental Mutagens (2009年8月)

T. Suzuki, Y. Luan, A. Kohara, M. Kogi, S. Tanabe, M. Honma, T. Yamaguchi, K. Suzuki Patterns of c-myc amplification revealed by the CGH array

Workshop: Genomics in Cancer Risk

Assessment (2009年8月)

C. Furihata, T. Watanabe, K. Suenaga, H. Takasawa, A. Tadakuma, M. Kido, Y. Ishikawa, M. Natsume, M. Nakajima, T. Suzuki, S. Hamada, A. Koeda, K. Narumi, K. Oshida, A. Maeda, M. Hirayama, T. Sakuma, H. Sanada, I. Hanahara, M. Sakurai, W. Ohyama, E. Okada, H. Honda, S. Sutou Comparative analysis of gene expression and network between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in mouse and rat liver examined by quantitative real-time PCR
Workshop: Genomics in Cancer Risk Assessment (2009年8月)

T. Suzuki Genomic and Proteomic Approach in Toxicology
International Conference on Environment, Occupational & Lifestyle Concerns (2009年9月)

T. Suzuki Proteomics approach to find new biomarkers for toxicity
International Conference on Molecular Tools in Environmental Toxicology (2009年9月)

鈴木孝昌 個の医療の実現に向けて必要となる診断技術
第46回全国衛生化学技術協議会年会(2009年11月)

鈴木孝昌, 小原有弘, ラマダン アリ,

菊池裕, 本間正充, 林 真 バルカン腎症の原因物質としてのアリストロキア酸およびオクラトキシン A

日本環境変異原学会第38回大会(2009年11月)

スレッシュ テイルパッティ, ラメッシュ ドス, 押澤 正, 宮澤明史, 鈴木和博, 鈴木孝昌 ショットガンプロテオミクスによる変異原研究・遺伝子傷害性物質処理したマウス尿を使った検討

日本環境変異原学会第38回大会(2009年11月)

降旗千恵, 渡辺貴志, 末永和也, 高沢博修, 鈴木孝昌, 夏目匡克, 中嶋圓, 濱田修一, 多田隈英未, 小枝暁子, 成見香瑞範, 大信田系裕, 前田晃央, 平山満朝, 佐久間智宏, 真田尚和, 大山ワカ子, 岡田恵美子, 本田大士, 須藤鎮世 トキシコゲノミクスに関する JEMS/MMS 共同研究 (2009年): ラットとマウス肝臓におけ

る qPCR 法による遺伝子発現比較解析
日本環境変異原学会第38回大会(2009年11月)

鈴木孝昌, 小原有弘, 小木美恵子, 田邊思帆里, 本間正充 8番染色体特異的 CGH アレイ解析による各種がん細胞株での c-myc 遺伝子領域増幅形式の解析
第68回 日本癌学会学術総会 (2009年10月)

西川可穂子, 山下香織, 石井暁子, 伊藤友美, Thiruppathi Suresh, 鈴木孝昌, 藤原葉子 高脂肪食マウス肝臓におけるプロテオーム解析 -食餌性レスベラトロールの評価-

日本農芸化学会 2010年度大会(2010年3月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。