

表2 糖鎖プロファイルの要約

| 価数 | 検出された m/z 値 | | 糖組成 ^{a)} | 推定糖鎖構造 | MSC | | N2d | | 平均存在比率 t-検定 | N2dのMSCに対する平均増減割合 ^{b)} | RSD (%) |
|----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|--------|--------------------------|---------|--------------------------|---------|-------------|---------------------------------|---------|
| | MSC (¹² C) | N2d (¹³ C) | | | 平均存在比率 (%) ^{b)} | RSD (%) | 平均存在比率 (%) ^{b)} | RSD (%) | | | |
| [M+H] ⁺ | 999.36 | 1002.37 | Hex9HexNAc2(M9) | | 1.7 | 89 | 0.9 | 92 | 0.50 | +0.15 | 261 |
| [M+H] ⁺ | 1813.69 | 1819.69 | Hex8HexNAc2(M8) | | 0.3 | 52 | 0.2 | 78 | 0.41 | +0.17 | 263 |
| [M+H] ⁺ | 1651.68 | 1657.70 | Hex7HexNAc2(M7) | | 0.2 | 63 | 0.2 | 63 | 0.98 | +1.44 | 127 |
| [M+H] ⁺ | 1489.61 | 1495.63 | Hex6HexNAc2(M6) | | 1.2 | 68 | 1.0 | 53 | 0.70 | +1.08 | 120 |
| [M+H] ⁺ | 1327.54 | 1333.56 | Hex5HexNAc2(M5) | | 0.8 | 24 | 0.9 | 6 | 0.78 | +1.22 | 87 |
| [M+H] ⁺ | 987.41 | 993.43 | dHex1Hex2HexNAc2 | | 2.0 | 28 | 1.6 | 25 | 0.48 | +0.69 | 63 |
| [M+H] ⁺ | 1149.49 | 1155.51 | dHex1Hex3HexNAc2 | | 24.0 | 36 | 26.8 | 34 | 0.72 | +1.23 | 38 |
| [M+2H] ²⁺ | 838.83 | 841.84 | dHex1Hex5HexNAc3 | | 0.7 | 27 | 0.5 | 32 | 0.19 | +0.38 | 124 |
| [M+H] ⁺ | 1514.66 | 1520.67 | dHex1Hex4HexNAc3 | | 2.7 | 53 | 1.4 | 8 | 0.19 | +0.12 | 480 |
| [M+2H] ²⁺ | 867.34 | 870.35 | Hex5HexNAc4 | | 0.4 | 71 | 0.2 | 80 | 0.41 | +0.07 | 697 |
| [M+2H] ²⁺ | 940.38 | 943.39 | dHex1Hex5HexNAc4 | | 4.0 | 51 | 3.7 | 27 | 0.84 | +0.99 | 41 |
| [M+2H] ²⁺ | 1012.87 | 1015.88 | Hex5HexNAx4 NeuNAc1 | | 0.7 | 39 | 0.7 | 32 | 0.90 | +0.94 | 53 |
| [M+2H] ²⁺ | 1158.42 | 1161.43 | Hex5HexNAx4 NeuNAc2 | | 5.3 | 45 | 4.4 | 50 | 0.65 | +0.62 | 70 |
| [M+2H] ²⁺ | 1085.94 | 1088.94 | dHex1Hex5HexNAc4 NeuNAc1 | | 7.1 | 58 | 8.3 | 61 | 0.76 | +1.28 | 37 |
| [M+2H] ²⁺ | 1231.49 | 1234.5 | dHex1Hex5HexNAc4 NeuNAc2 | | 14.2 | 11 | 15.7 | 16 | 0.44 | +1.21 | 50 |

表 2 つづき(1)

| | | | | | | | | | | | |
|----------------------|---------|---------|-----------------------------------|--|-------------------|----|------|----|------|-------|-----|
| [M+2H] ²⁺ | 1158.95 | 1161.96 | dHex2Hex5HexNAc4 NeuNAc1 | | 0.1 | 48 | 0.2 | 45 | 0.64 | +1.40 | 28 |
| [M+2H] ²⁺ | 1304.53 | 1307.55 | dHex2Hex5HexNAc4 NeuNAc2 | | 1.1 | 16 | 1.2 | 10 | 0.62 | +1.09 | 17 |
| [M+2H] ²⁺ | 1049.91 | 1052.92 | Hex6HexNAc5 | | 0.2 | 77 | 0.2 | 78 | 0.79 | +0.66 | 49 |
| [M+2H] ²⁺ | 1195.49 | 1198.5 | Hex6HexNAc5 NeuNAc1 | | 0.4 | 22 | 0.2 | 33 | 0.13 | +0.32 | 176 |
| [M+2H] ²⁺ | 1341.04 | 1344.1 | Hex6HexNAc5 NeuNAc2 | | 1.2 _{b)} | — | 0.6 | — | — | +0.02 | — |
| [M+2H] ²⁺ | 1486.6 | 1489.6 | Hex6HexNAc5 NeuNAc3 | | 8.1 | 40 | 2.3 | 46 | 0.04 | -0.81 | 9 |
| [M+2H] ²⁺ | 1632.17 | 1635.2 | Hex6HexNAc5 NeuNAc4 | | 1.7 | 24 | 0.6 | 59 | 0.03 | -0.55 | 60 |
| [M+2H] ²⁺ | 1122.96 | 1126.0 | dHex1Hex6HexNAc5 (Lac1) | | 12.1 | 6 | 12.5 | 10 | 0.68 | +1.06 | 52 |
| [M+2H] ²⁺ | 1268.52 | 1271.5 | dHex1Hex6HexNAc5 NeuNAc1(Lac1) | | 3.8 | 79 | 5.8 | 87 | 0.59 | +1.72 | 31 |
| [M+2H] ²⁺ | 1414.08 | 1417.1 | dHex1Hex6HexNAc5 NeuNAc2 | | 1.8 | 59 | 2.2 | 52 | 0.67 | +1.57 | 64 |
| [M+2H] ²⁺ | 1559.63 | 1562.7 | dHex1Hex6HexNAc5 NeuNAc3 | | 0.5 | 41 | 0.6 | 49 | 0.41 | +1.85 | 71 |
| [M+2H] ²⁺ | 1305.55 | 1308.6 | dHex1Hex7HexNAc6 (Lac) | | 2.5 | 28 | 5.2 | 36 | 0.09 | +3.10 | 52 |
| [M+2H] ²⁺ | 1451.11 | 1454.1 | dHex1Hex7HexNAc6 NeuNAc1(Lac) | | 0.7 | 19 | 0.9 | 30 | 0.26 | +1.72 | 68 |
| [M+2H] ²⁺ | 1596.67 | 1599.7 | dHex1Hex7HexNAc6 NeuNAc2(Lac) | | 0.5 | 49 | 1.0 | 42 | 0.17 | +2.94 | 49 |
| [M+3H] ²⁺ | 1161.79 | 1163.8 | dHex1Hex7HexNAc6 NeuNAc3 | | 0.9 | 21 | 2.0 | 50 | 0.14 | +3.31 | 65 |
| [M+3H] ²⁺ | 1258.83 | 1260.8 | dHex1Hex7HexNAc6 NeuNAc4 | | 0.9 | 38 | 1.9 | 64 | 0.25 | +2.85 | 62 |

表 2 つづき(2)

| | | | | | | | | | | | |
|----------------------|---------|--------|----------------------------------|--|-----|----|-----|----|------|-------|----|
| [M+3H] ³⁺ | 1186.45 | 1188.5 | dHex1Hex8HexNAc7 NeuNAc2(Lac) | | 0.4 | 34 | 0.7 | 14 | 0.02 | +3.29 | 65 |
| [M+3H] ³⁺ | 1283.5 | 1285.5 | dHex1Hex8HexNAc7 NeuNAc3(Lac) | | 0.3 | 34 | 0.6 | 60 | 0.35 | +2.16 | 70 |
| [M+3H] ³⁺ | 1380.56 | 1382.6 | dHex1Hex8HexNAc7 NeuNAc4(Lac) | | 0.2 | 67 | 0.9 | 66 | 0.15 | 5.92 | 21 |

a) Hex, ヘキソース; HexNAc, *N*-アセチルヘキソサミン; dHex, デオキシヘキソース; NeuNAc, *N*-アセチルノイラミン酸; Lac, *N*-アセチルラクトサミン構造を有する糖鎖. b) 検出された全糖鎖のイオン強度の合計に対する各糖鎖のイオン強度の割合(%). c) 数値が+1.0 のとき, N2d 由来糖鎖の量は MSC 由来糖鎖量の 2.0 倍に増加していることを示す. d) 糖鎖試料 1 からのみ検出された糖鎖のため, 統計処理は行わず.

表3 アガロースゲル (pH 3.0-8.0) を用いた二次元電気泳動による MSC 及び神経様分化細胞由来膜タンパク質の発現差異解析

| スポット 番号 | ピーク面積比 (N2d/MSC) | 同定されたタンパク質 | GI 番号 | 分子量 (Da) | 帰属されたペプチドの数 | |
|------------|---------------------|--|----------|----------|-------------|------|
| | | | | | MSC | N2d |
| 1 | 1.65 | — ^{a)} | | | | |
| 2 | 1.60 | — | | | | |
| 3 | 0.56 | — | | | | |
| 4 | 2.10 | — | | | | |
| 5 | 1.02 | alpha 1 type V collagen preproprotein | 89276751 | 183,558 | 12 | N.D. |
| 6 | 2.19 | — | | | | |
| 7 | 1.27 | — | | | | |
| 8 | 0.64 | prepro-alpha1(I) collagen | 1418928 | 138,911 | 3 | 21 |
| 9 | 1.37 | Laminin subunit gamma-1 | 126369 | 177,606 | 15 | N.D. |
| 10 | 0.96 | — | | | | |
| 11 | 2.38 | タンパク質 11 | | 162,464 | 12 | 24 |
| 12 | 4.39 | — | | | | |
| 13 | 3.21 | — | | | | |
| 14 | 1.09 | hypoxia up-regulated 1 precursor | 5453832 | 111,335 | 10 | 11 |
| 15 | 2.14 | collagen (VI) alpha-1 chain | 1915902 | 47,807 | 1 | 5 |
| | | collagen, type VI, alpha 1 precursor | 87196339 | 108,529 | 1 | 2 |
| 16 | 2.82 | タンパク質 16 | | 94,299 | N.D. | 10 |
| 17 | 1.84 | タンパク質 17 | | 89,321 | 10 | 17 |
| 18 | 1.90 | — | | | | |
| 19 | 2.05 | — | | | | |
| 20 | 2.08 | — | | | | |
| 21 | 1.64 | — | | | | |
| 22 | 1.80 | — | | | | |
| 23 | 1.22 | Caldesmon | 2498204 | 93,249 | 12 | 16 |
| 24 | 1.84 | タンパク質 24 | | 72,332 | 10 | 16 |
| 25 | 1.85 | タンパク質 25 | | 93,249 | 14 | 6 |
| 26 | 1.42 | Caldesmon | 2498204 | 93,249 | 16 | 12 |
| 27 | 1.41 | lamin A/C isoform 1 precursor | 27436946 | 74,139 | 12 | 24 |
| 28 | 1.85 | タンパク質 28(1) | 13676857 | 70,021 | N.D. | 1 |
| | | タンパク質 28(2) | 2498204 | 93,249 | 10 | N.D. |

表 3 のつづき

| | | | | | | |
|----|-------------------|---|-----------|---------|------|--------------------|
| 29 | 2.47 | タンパク質 29(1) | | 53,517 | 4 | 1 |
| | | タンパク質 29(2) | | 70,020 | 3 | 1 |
| 30 | 1.53 | タンパク質 30(1) | | 53,517 | 4 | 3 |
| | | タンパク質 30(2) | | 70,021 | 3 | 2 |
| 31 | 1.44 | heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 | 24234686 | 53,517 | 2 | 3 |
| | | heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 | 5729877 | 70,898 | 3 | 2 |
| | | heat shock 70kDa protein 2 | 13676857 | 70,021 | 3 | 2 |
| 32 | 1.10 | — | | | | |
| 33 | 1.49 | タンパク質 33(1) | | 66,193 | 4 | 4 |
| 34 | 0.77 | — | | | | |
| 35 | 0.97 | — | | | | |
| 36 | 0.74 | — | | | | |
| 37 | 0.64 | — | | | | |
| 38 | 0.60 | — | | | | |
| 39 | 0.69 | filamin A, alpha isoform 2 | 160420317 | 280,757 | 10 | 25 |
| | | Fibronectin | 2506872 | 262,439 | 11 | 6 |
| 40 | 0.85 | — | | | | |
| 41 | 1.17 | prepro-alpha1(I) collagen | 1418928 | 138,911 | 12 | N.D. |
| 42 | 3.19 | タンパク質 42(1) (タンパク質 A) | 61743954 | 628,705 | N.D. | 2(8 ^b) |
| 43 | 1.21 ^c | prepro-alpha2(I) collagen | 179596 | 129287 | 9 | N.D. |
| 44 | 2.15 | タンパク質 44(1) | | 53,517 | 9 | 3 |
| 45 | 2.02 | タンパク質 45(1) | | 331,773 | 12 | N.D. |
| | | タンパク質 45(2) | | 92,468 | N.D. | 9 |
| 46 | 1.80 | タンパク質 46(1) | | 116,722 | N.D. | 45 |
| | | タンパク質 46(2) | | 113,715 | 7 | N.D. |
| 47 | 0.51 | — | | | | |
| 48 | 0.59 | prepro-alpha1(I) collagen | 1418928 | 138,911 | 9 | 2 |
| | | collagen type III alpha 1 preproprotein | 4502951 | 138,555 | N.D. | 5 |

スポット番号, 図 14 参照; GI 番号; GenInfo Identifier number; a) 同定されず. b) pH 3.0–10.0 のアガロースゲルを用いたときの本数(図 4B, スポット A). c) pH 3.0–10.0 のアガロースゲルを用いたときの値. タンパク質同定に使用した Protein filter; peptide provability < 0.001.

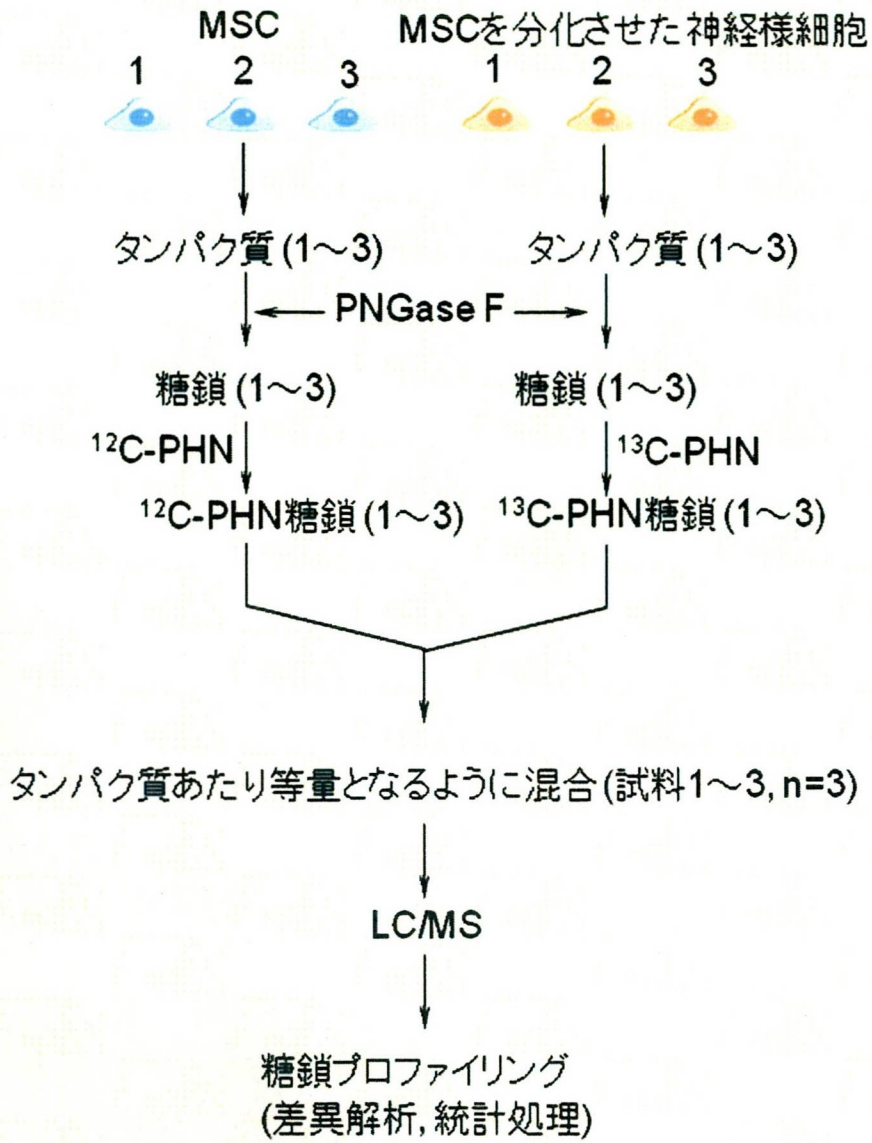


図1 MSC 及び MSC 由来神経様細胞の比較定量解析

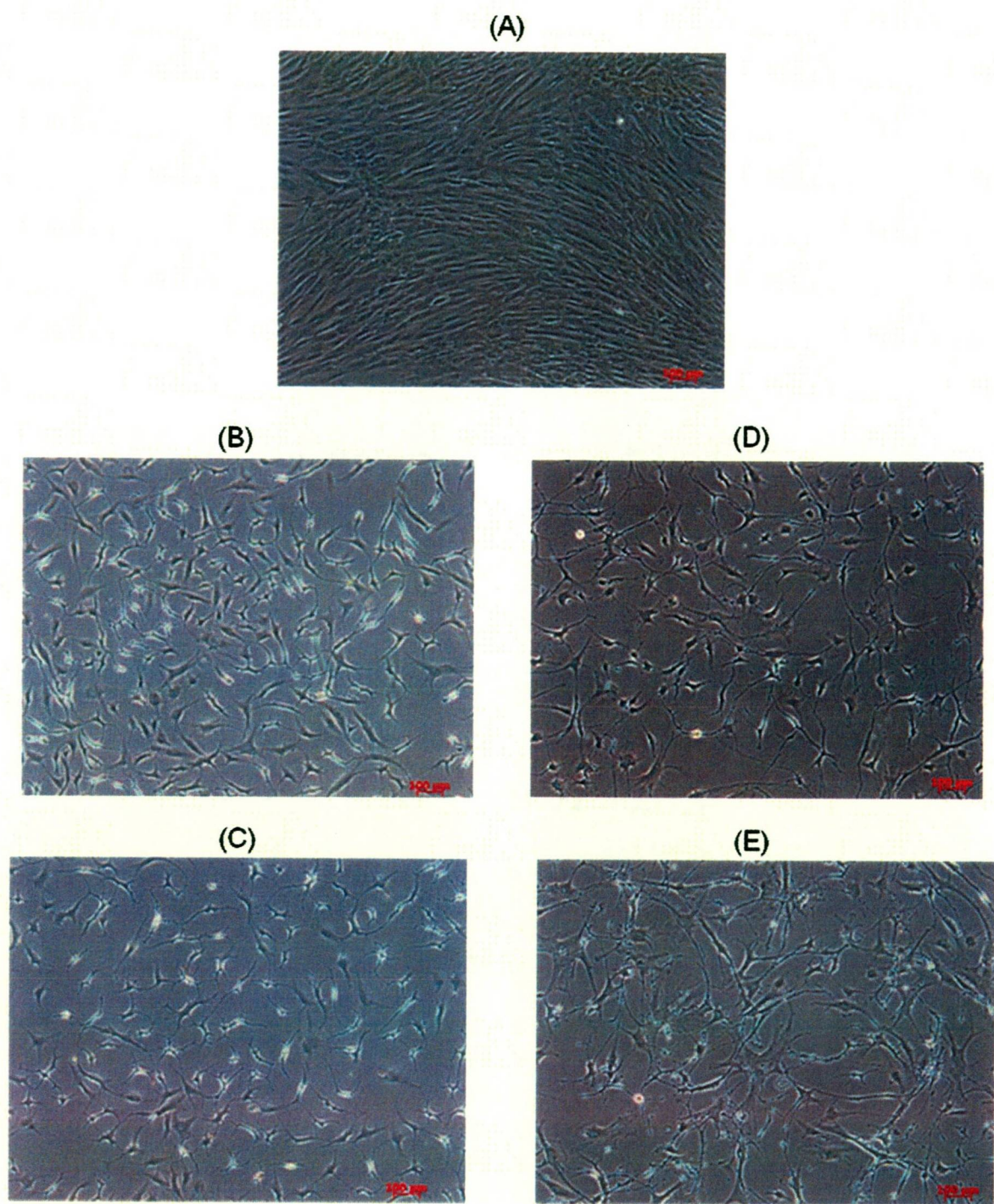


図2 MSCの神経様分化誘導法の検討. (A), MSC; (B), 誘導法Aによる分化誘導1日目; (C), 誘導法Aによる分化誘導2日目; (D), 誘導法Bによる分化誘導1日目; (E), 誘導法Bによる分化誘導2日目.

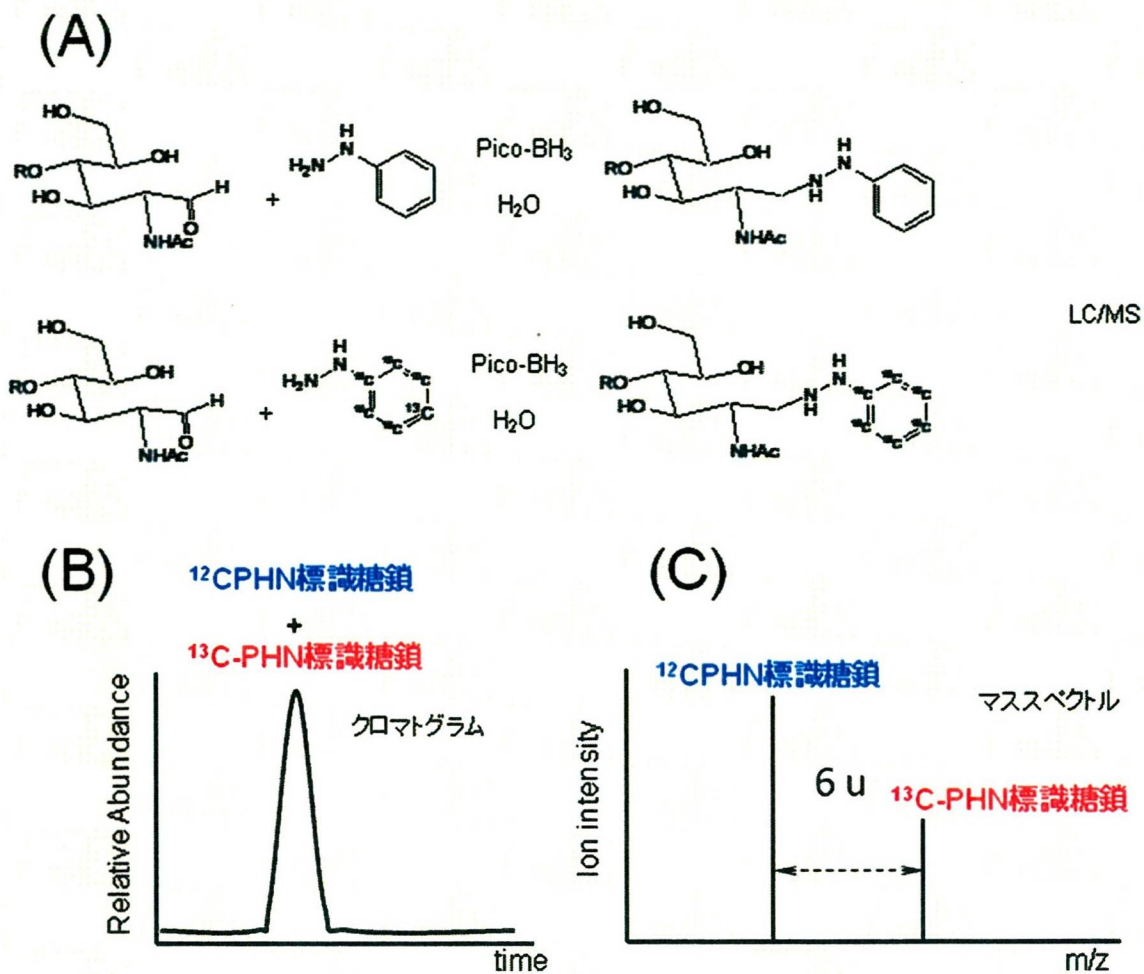


図3 ^{13}C 標識フェニルヒドラジン(PHN) を用いた定量的糖鎖プロファイリング法。
 (A), ^{12}C -及び ^{13}C -PHN による糖鎖標識; (B), ^{12}C -及び ^{13}C -PHN 標識糖鎖混合物の LC/MS を行ったときのクロマトグラム; (C), ^{12}C -及び ^{13}C -PHN 標識糖鎖混合物のマススペクトル。

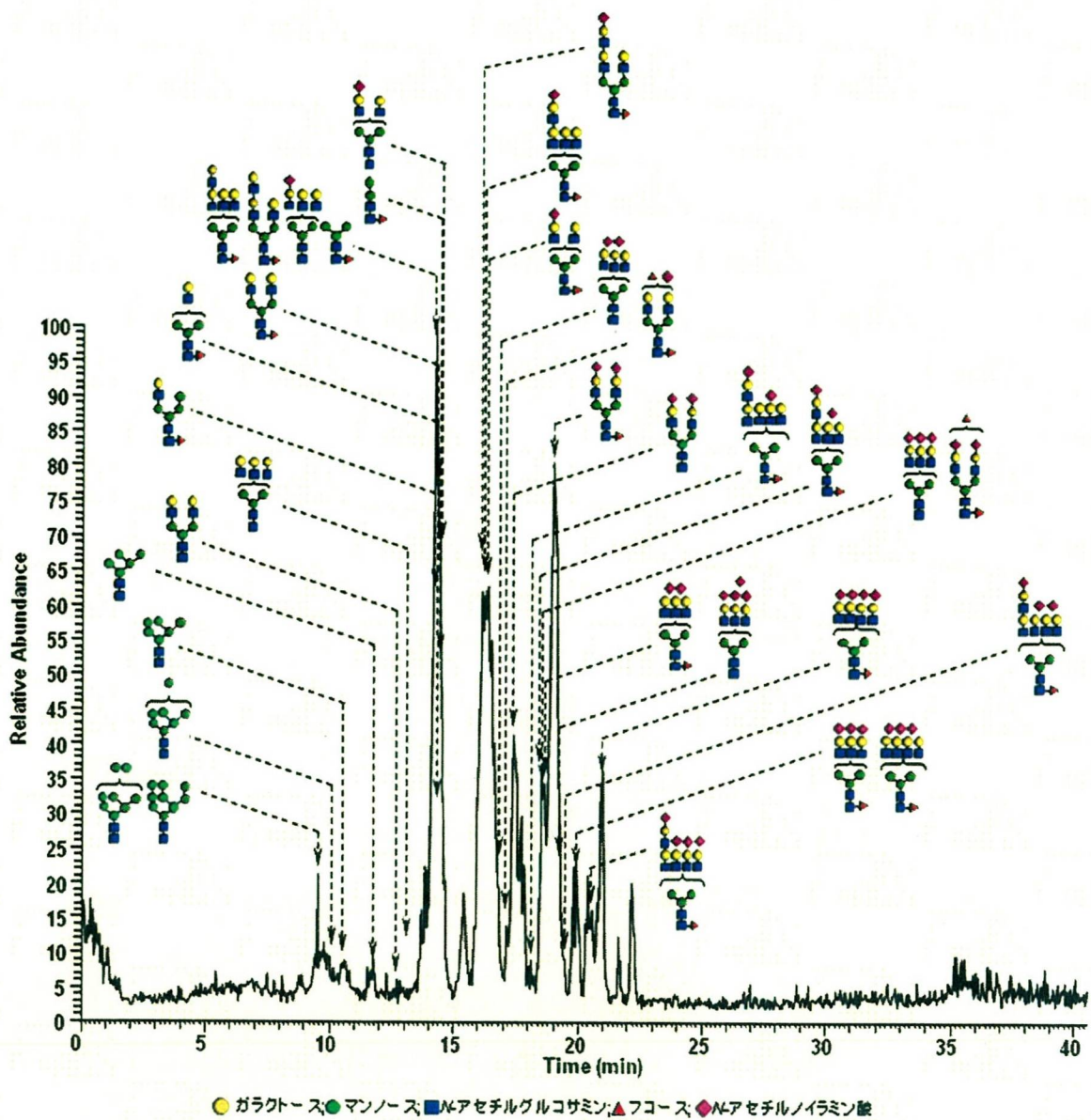


図4 MSC 及び神経様分化細胞由来 *N*-結合型糖鎖の LC/MS により得られた糖鎖プロファイル。図はベースピーククロマトグラム。帰属された糖鎖の溶出位置を矢印で示した。

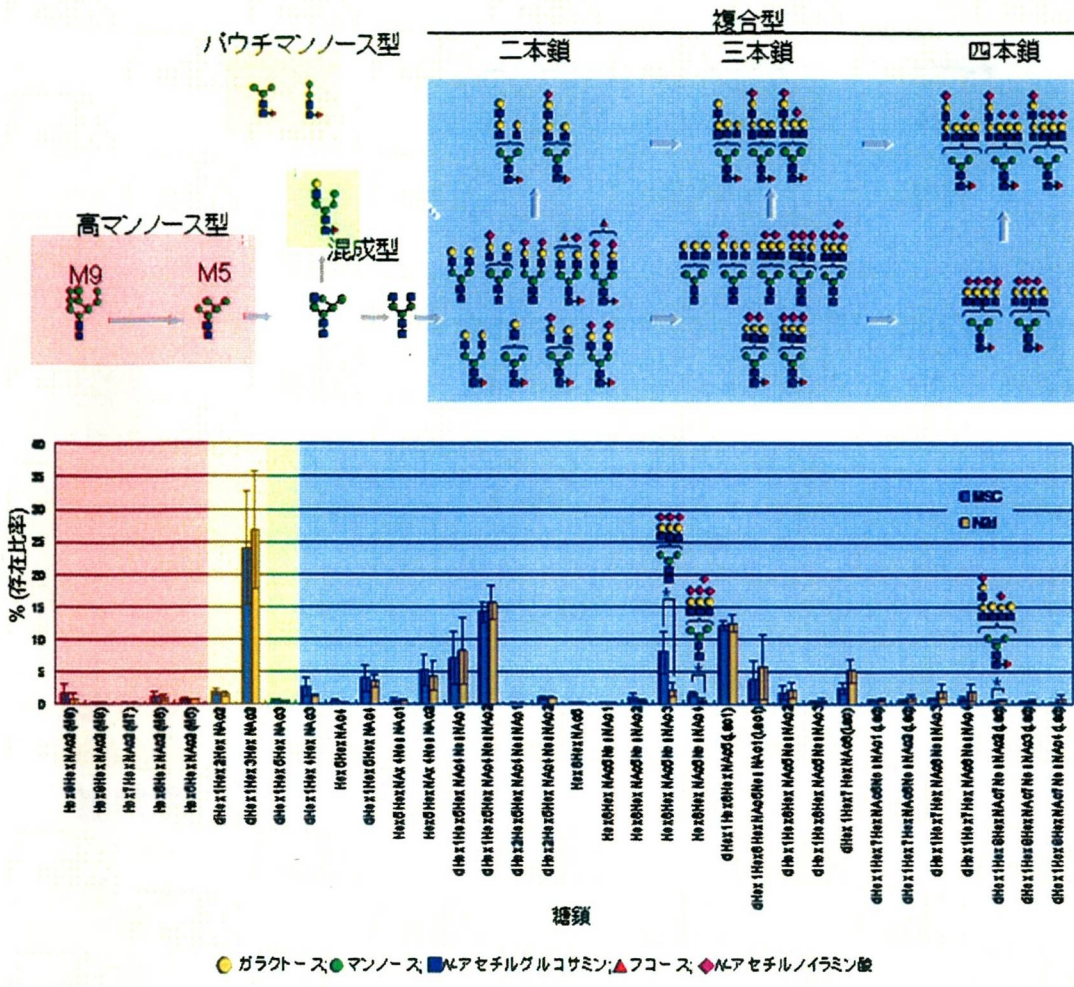


図 5 MSC 及び神経様分化細胞由来 N-結合型糖鎖の分布. 数値は検出された全糖鎖のイオン強度の合計に対する各糖鎖のイオン強度の割合(%)として算出した. * $p < 0.05$

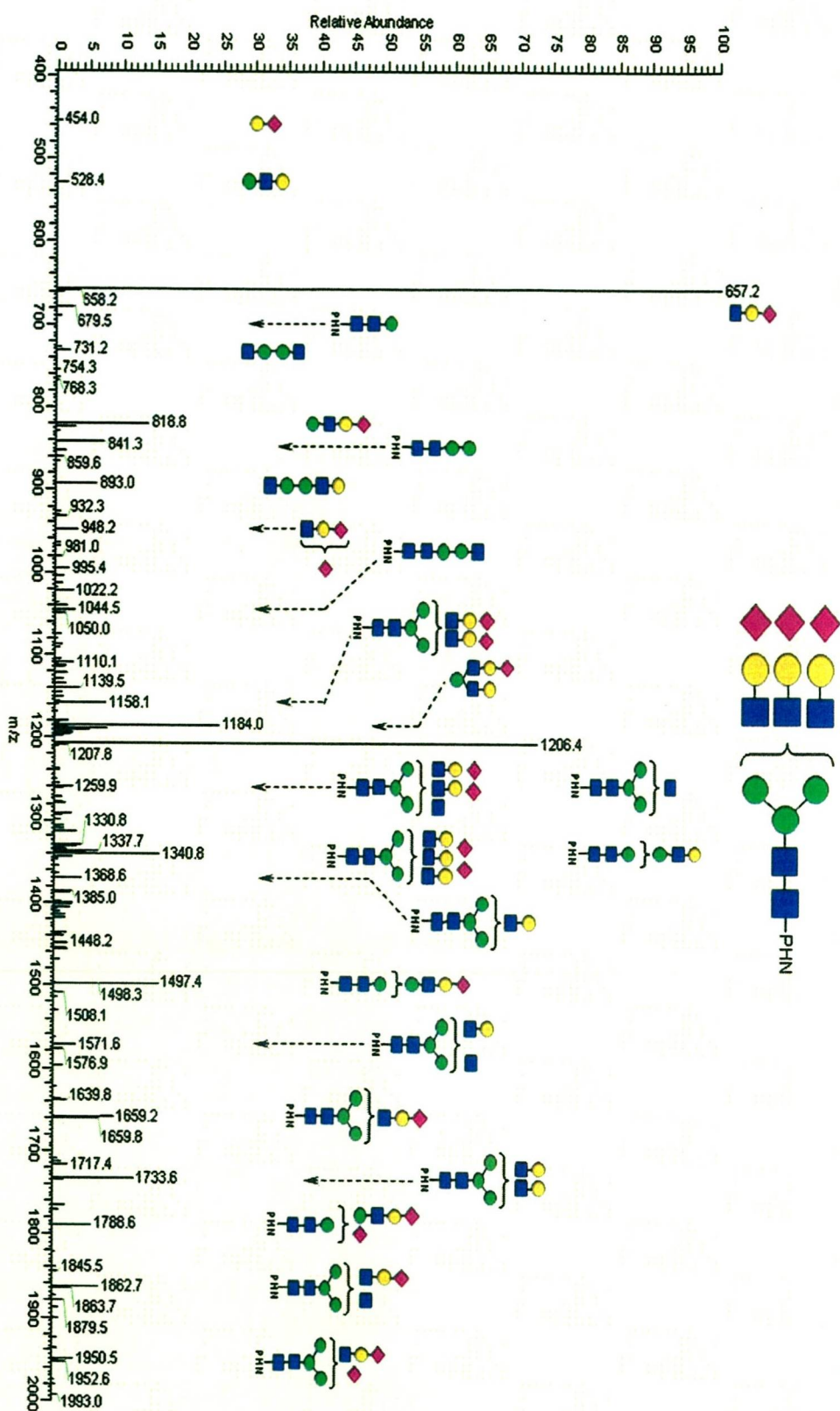


図6 MSCを神経様細胞に分化すると減少することが明らかとなった糖鎖のLCMSMS. 側鎖はNアセチルラクトサミンの繰り返し構造ではないことが推定された。

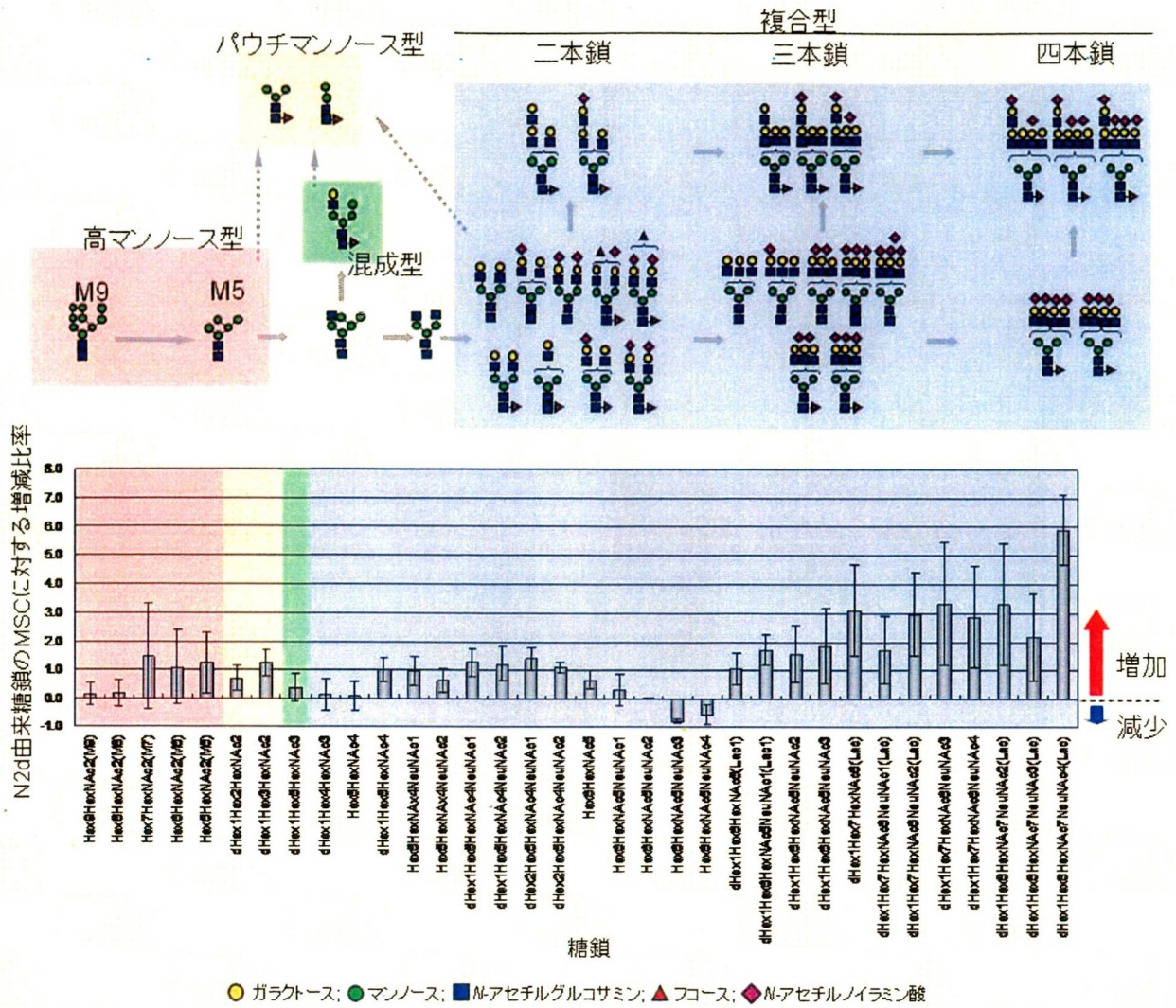


図7 神経様分化細胞 (N2d) 由来 N-結合型糖鎖の MSC に対する増減比率。
 増減比率 +1.0 は、N2d は MSC の 2 倍に増加していることを示す。

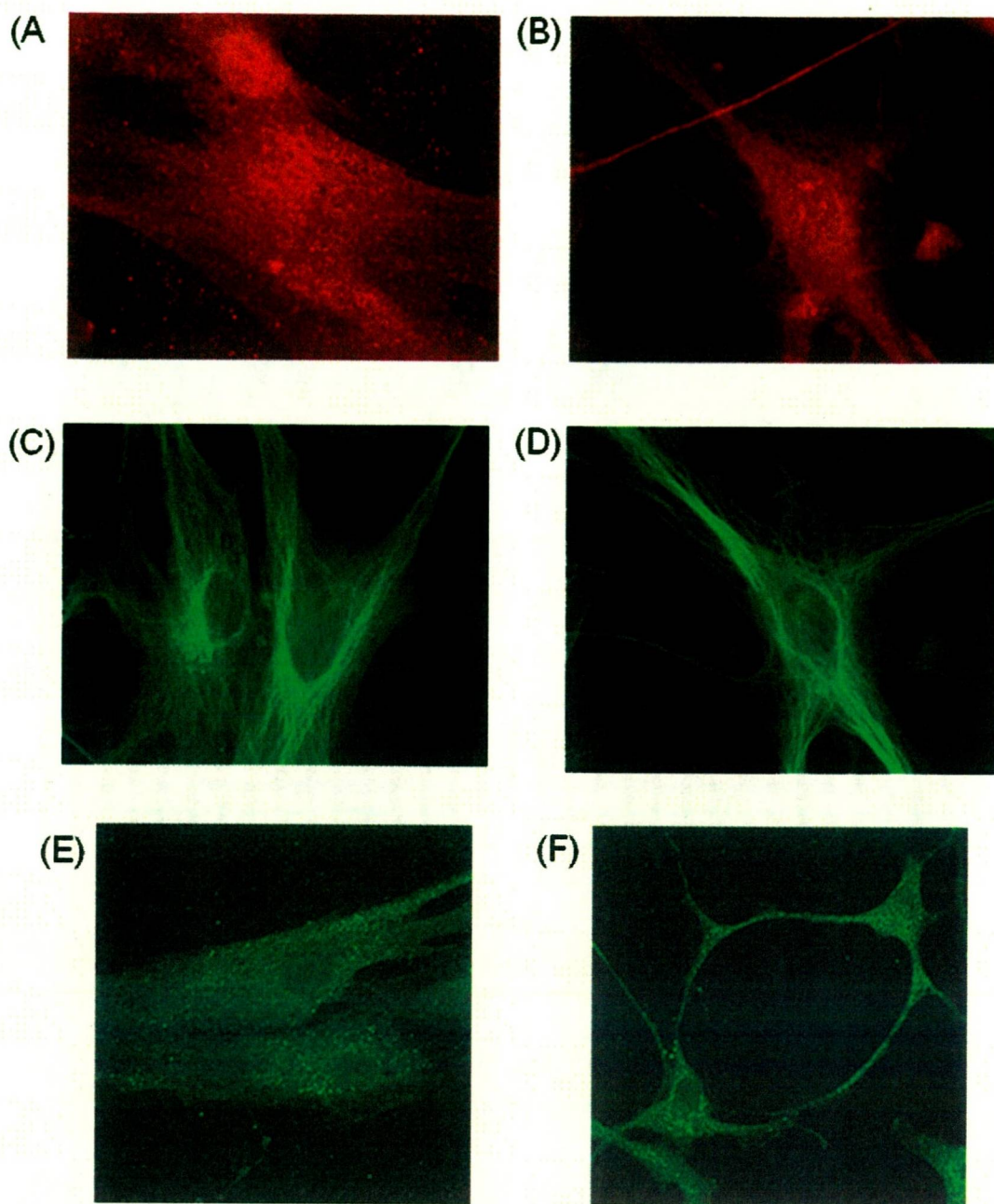


図8 MSC 及び MSC 由来神経様細胞(N2d)における神経細胞マーカーの免疫染色. (A) MSC,ネスチン;
 (B) N2d, ネスチン; (c) MSC, β III チュブリン; (d) N2d, β III チュブリン; (e) MSC, GFAP; (f) N2d, GFAP.

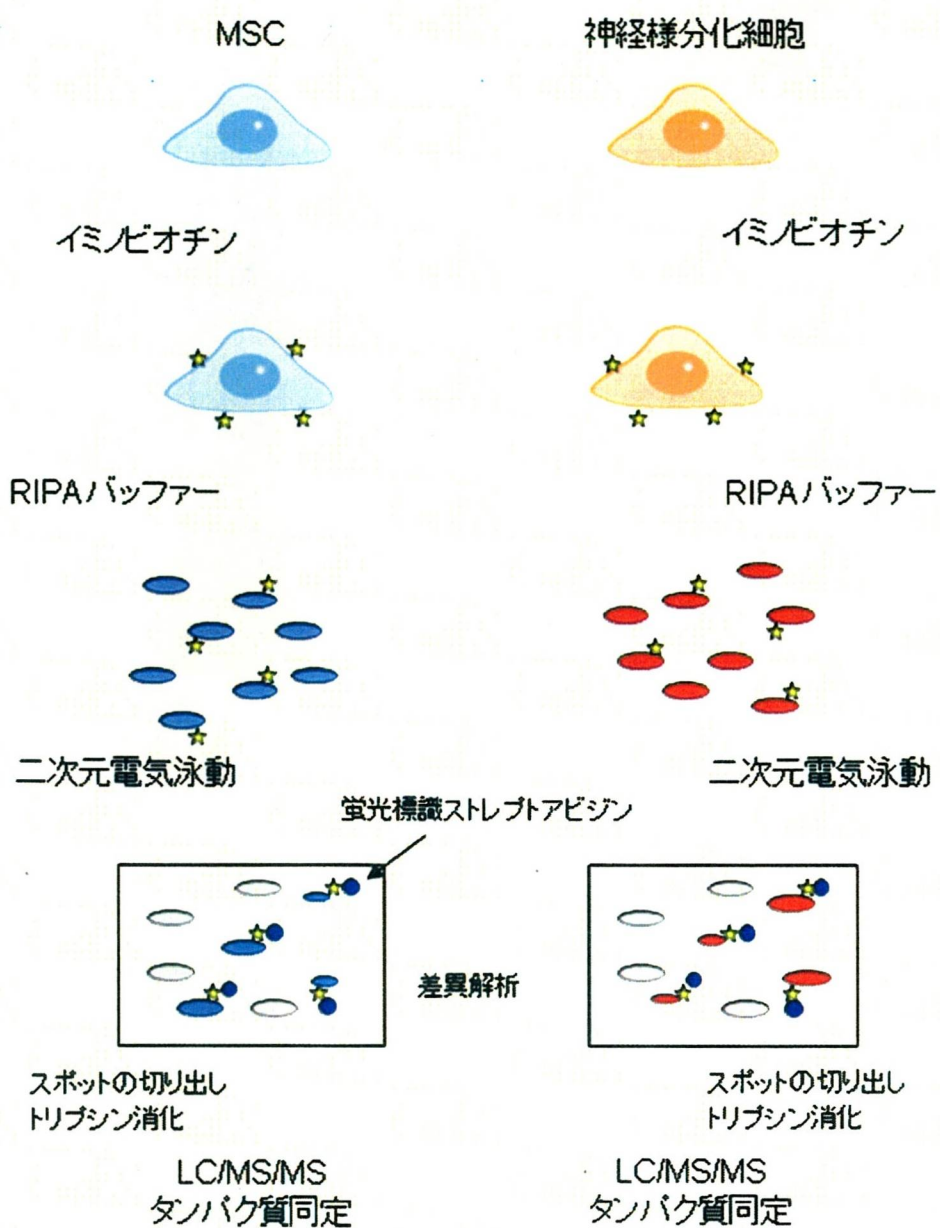


図9 MSC 及び神経様分化細胞の膜タンパク質発現差異解析.

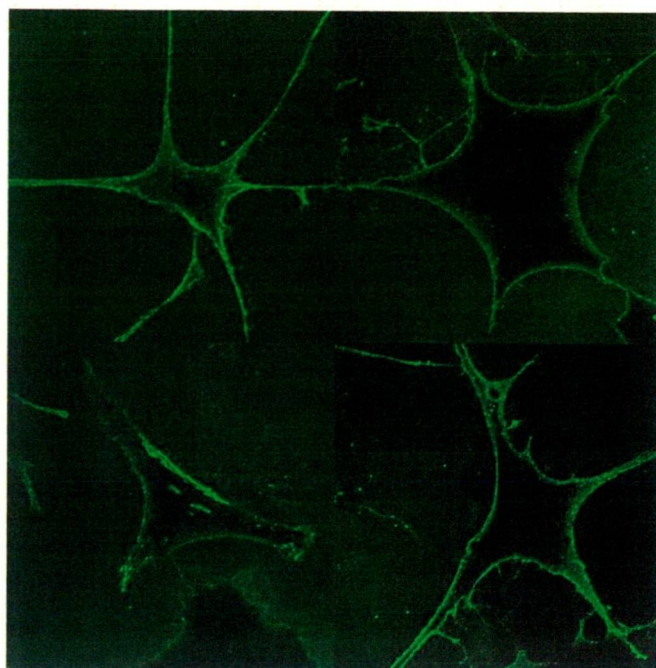


図10 ビオチン標識 Nd2 の染色.
検出, FITC ストレプトアビジン

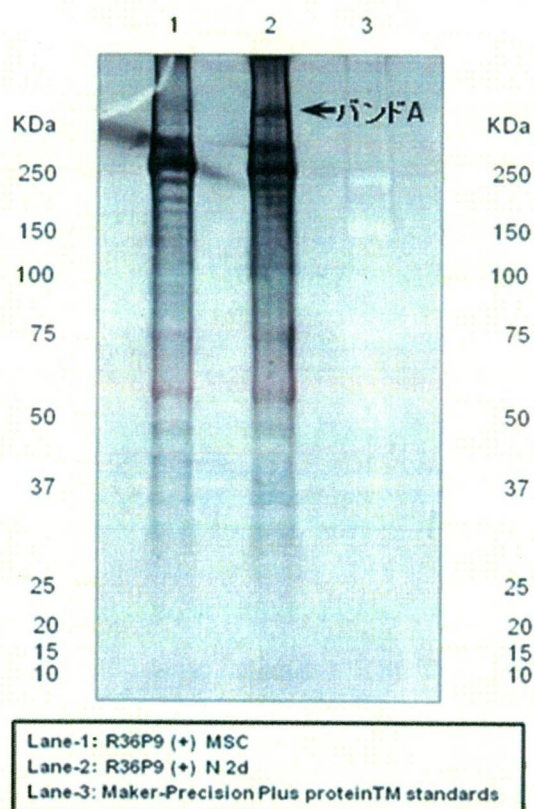


図11 MSC 及び神経様分化細胞 (N2d) 由来タンパク質の SDS-PAGE. バンド A, N2d で増加したバンド(約 500 kDa)

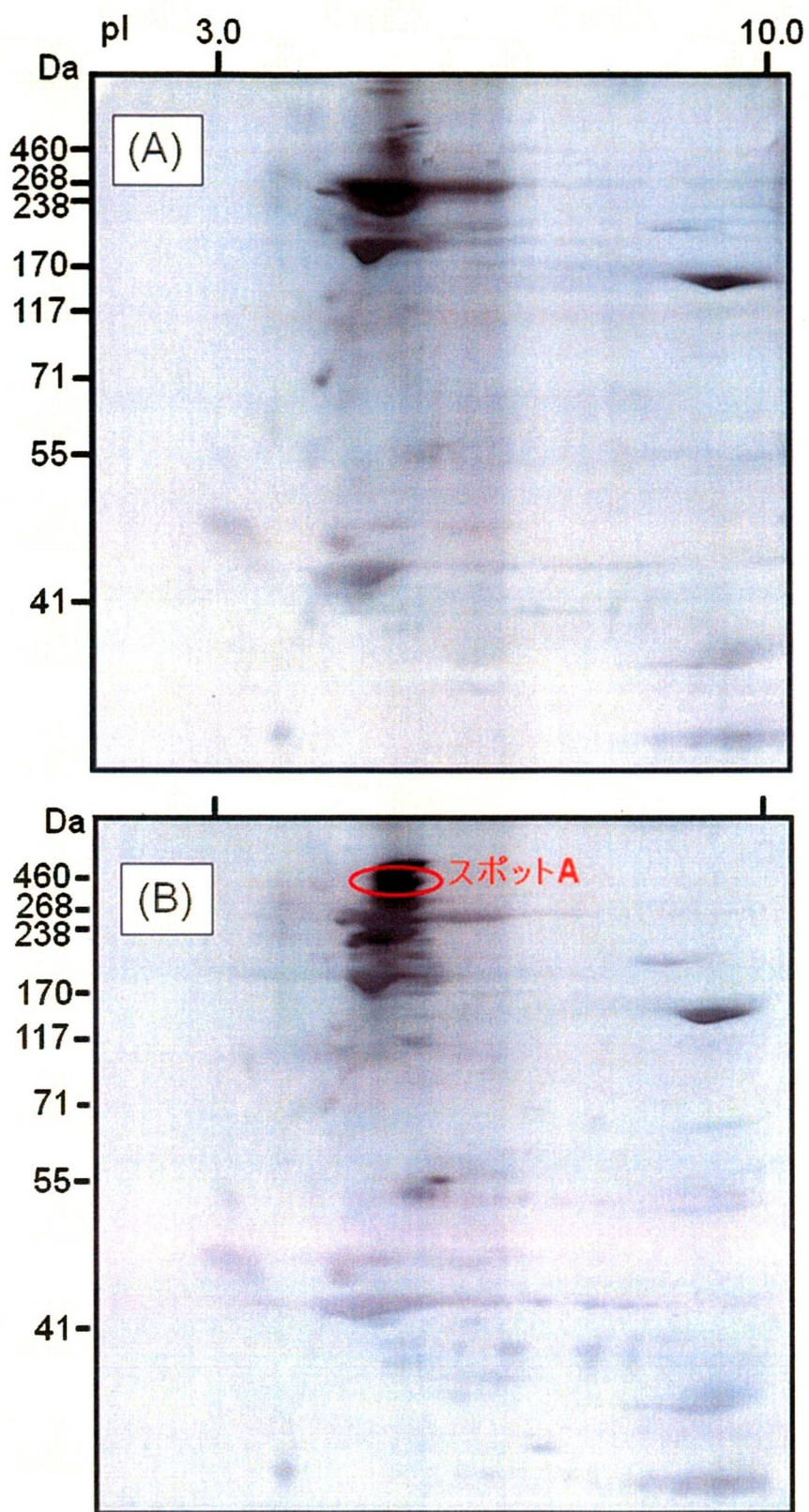


図 12 MSC 及び 神経様分化細胞 (N2d) 由来膜タンパク質のアガロースゲル二次元電気泳動. (A), MSC; (B), N2d. スポット A は図 2 のバンド A に相当する.

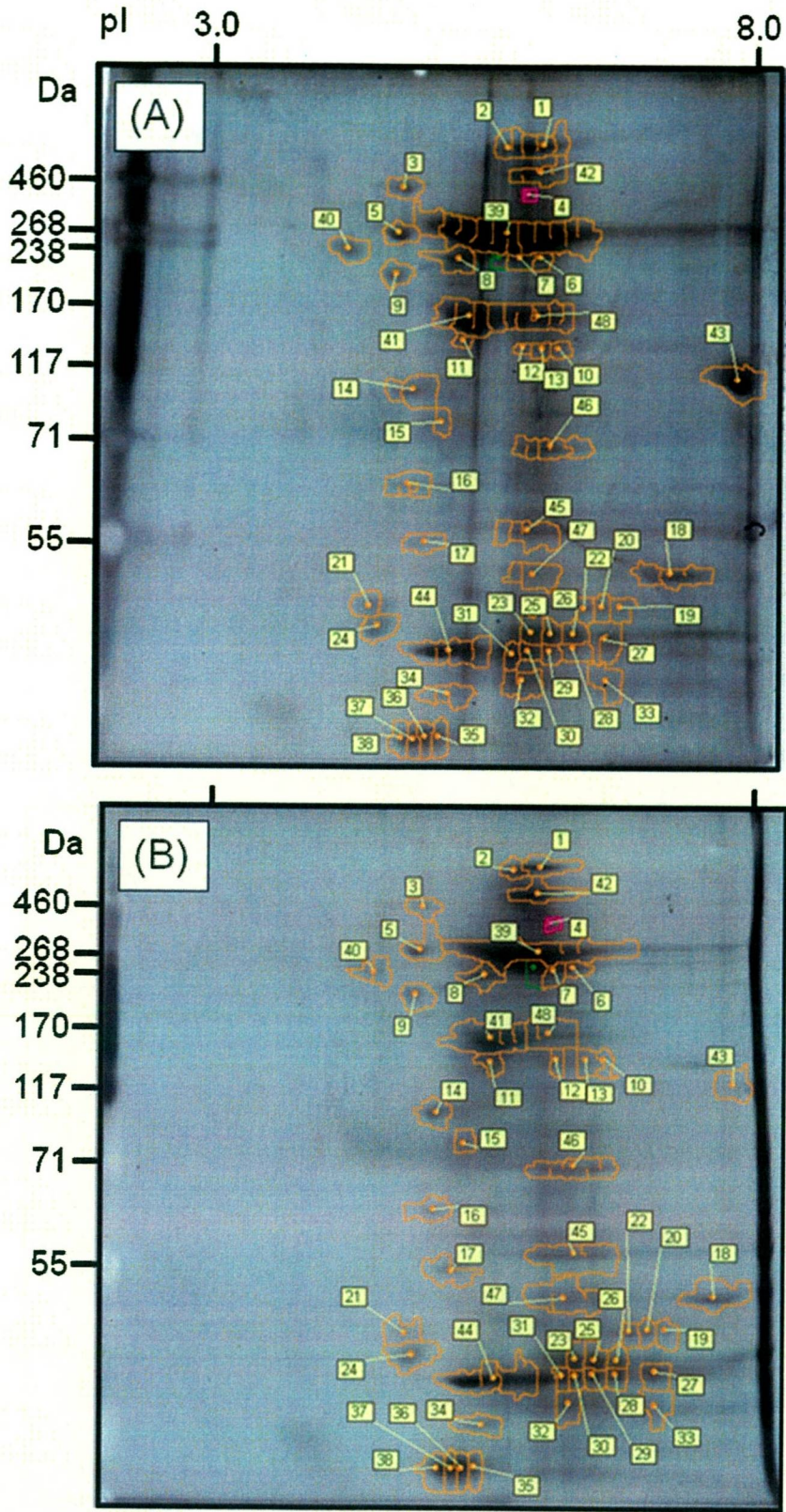


図 13 MSC 及び 神経様分化細胞 (N2d) 由来膜タンパク質のアガロースゲル二次元電気泳動.
 (A), MSC; (B), N2d. 切り出したスポットの位置をオレンジ色で示した.

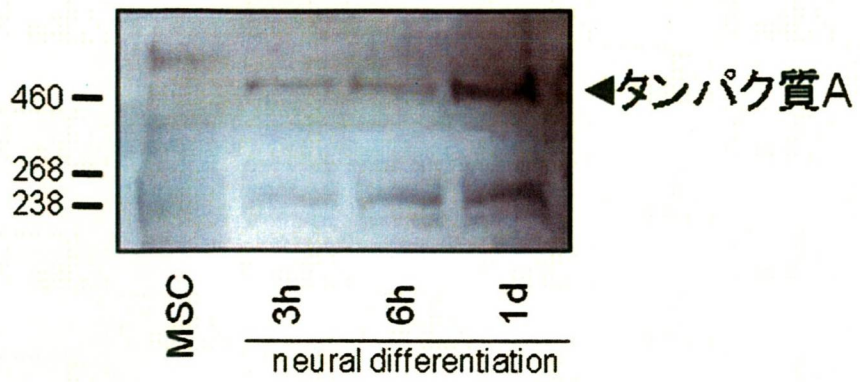


図 14 蛋白質Aのウェスタンブロット

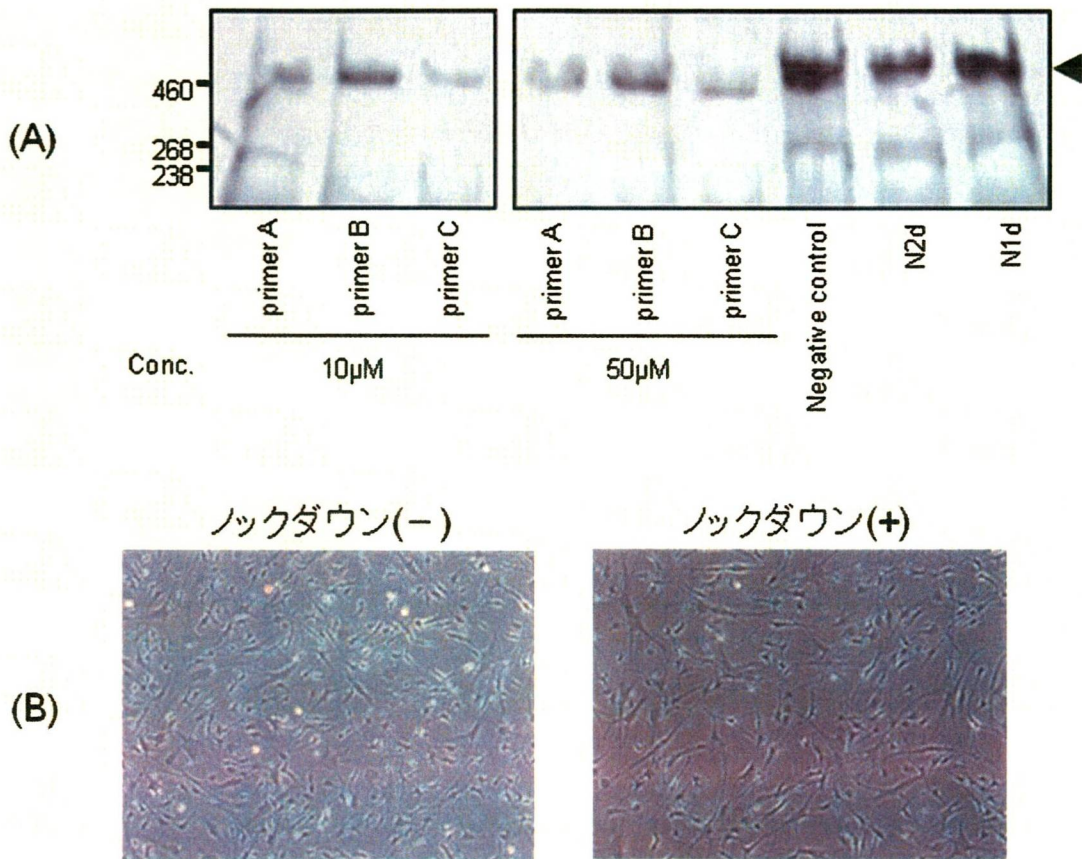


図 15 タンパク質Aの機能解析 (A) タンパク質Aのノックダウン後におけるタンパク質Aのウェスタンブロット. N2d, 誘導後二日目(基礎培地誘導1日間); N1d, 誘導後一日目(プレ誘導2日間); (B), タンパク質Aのノックダウンが神経様分化誘導に与える影響の検討.

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。外来造血幹細胞の移植効率を向上する目的でケモカイン 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ところ、造血幹/前駆細胞だけでなく B 細胞も骨髄から遊離していたことから、本年度は、Ad-CXCL12 投与後の B 細胞の機能について解析した。その結果、Ad-CXCL12 投与により、B 前駆細胞が本来存在していないはずの脾臓の B 細胞領域に生着していることが明らかとなった。また、Ad-CXCL12 投与により液性免疫にも影響をおよぼしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒトまたは動物の細胞や組織を利用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疾患の有望な治療薬になると考えられている。しかしながら、細胞組織加工医薬品は多くの未知な要素が含まれており、実用化に至るために検討すべき課題は多い。なかでも、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望まれているため、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。ヒト血液系を有するマウスを作製するためには、外来造血幹細胞を骨髄中の造血幹細胞がいるべき場所（ニッチ）に生着させる必要がある。したがって、内因性の造血幹細胞をニッチから遊離させるこ

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

とにより外来造血幹細胞の生着率は向上すると考えられる。

昨年度、ヒト血液系を有したマウスを効率良く作製することを目指し、CXCL12 発現アデノウイルス (Ad) ベクターの作製および Ad ベクター投与後の内在性血液細胞の動態について解析した。その結果、血漿 CXCL12 濃度を上昇させることにより、骨髄中の造血幹/前駆細胞が末梢へ遊離することが明らかとなった。なお、興味深いことに、Ad-CXCL12 投与により、造血幹細胞や骨髄球系の細胞だけでなく、B 前駆細胞 (プロ B 細胞、プレ B 細胞) が骨髄から遊離し、脾臓へ生着していた。そこで本年度は、Ad-CXCL12 投与後に B 前駆細胞が遊離することで液性免疫に影響を与えているかどうかについて解析した。また、CXCL12 だけでなく、Vascular endothelial growth factor (VEGF) や Angiopoietin-1 (Ang-1) も骨髄から造血幹/前駆細胞を遊離させるサイトカインとして知られている。しかし、CXCL12 との比較や協調作用などを検討した少ない。そこで、これらのサイトカインを発現するアデノウイルスベクターをマウスへ単独、または同時に投与して血中濃度を上昇させることにより、骨髄中の造血幹細胞を末梢へ効率良く遊離させることを目的として、ベクターの作製を行った。

B. 研究方法

B-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い行った。精製した Ad ベクターの物理化学的力価は Maizel らの方法に従い測定した。

B-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 μ 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。