

### B-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 で一晩反応させた。0.1% Tween 20 を含む PBS (PBS-T<sub>0.1</sub>) 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<sub>0.1</sub> 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. 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 ( $5 \times 10^{10}$  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  $\mu$ g/mouse) あるいは NP-Ficoll (Biosearch technologies 社) (25  $\mu$ g/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  $\mu$ g/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 mg/mL BSA/PBS 溶液で希釈した血漿を 50  $\mu$ L/well で添加し、室温で 2 時間作用させた。PBS-T<sub>0.1</sub> 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  $\mu$ L/well で添加し、室温で 1 時間作用させた。PBS-T<sub>0.1</sub> で 3 回洗浄後、TMBZ を 100  $\mu$ L/well 加えて発色反応を行い、2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 50  $\mu$ L/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。

### C. 研究結果

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<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> の B 前駆細胞が確認された (Fig. 1)。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った。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应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  $\gamma$ -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. 2)。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、 $5 \times 10^{10}$  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. 3)。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。

#### D. 考察

ヒト血液系を有するキメラマウスを作製して細胞組織加工医薬品の免疫原性を評価するには、まず、外来造血幹細胞をマウスの骨髄ニッチに高効率に生着させる技術の

確立が必須である。本研究では Ad ベクターを用いて造血幹細胞の生存・増殖・生着に重要である CXCL12 や VEGF、Ang-1 などのサイトカインをマウスの生体内で発現させることにより、マウスの造血幹細胞を骨髄から遊離させ、外来造血幹細胞の生着率を向上させることを目的としている。

昨年度までに Ad-CXCL12 をマウスに投与することにより、造血幹細胞などの未熟な細胞を含む血液細胞が骨髄から遊離することを示した。また、CXCL12 は B 細胞分化に必須であることから B 細胞の動態についても解析したところ、骨髄においては成熟 B 細胞が減少していたのに対し、脾臓においては B 前駆細胞が増加するという現象を見出した。そこで本年度は、Ad-CXCL12 投与により、B 細胞の動態の変化が液性免疫に影響をおよぼしているかどうか検討した。

まず Ad-CXCL12 投与後のマウスの脾臓の組織切片を作製し、免疫抗体染色により B 前駆細胞が生着しているかどうか検討したところ、通常は成熟 B 細胞が存在する B 細胞領域に IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>B220<sup>+</sup> の B 前駆細胞が存在することが明らかとなった。近年、B 前駆細胞は CXCL12 の受容体である CXCR4 を発現していること、そして骨髄中 CXCL12 高発現細胞がプレプロ B 細胞のニッチとして機能していることが報告されている。したがって、Ad-CXCL12 投与により血漿中 CXCL12 濃度が骨髄中の CXCL12 を上回ったため、B 前駆細胞が骨髄から動員されてきたものと考えられる。しかし、B 細胞が脾臓などのリンパ組織へ移入するには CXCL13 と CXCR5 のシグナルが重要であり、B 前駆細胞は CXCR5 の発現レベルが

低いことが報告されている。したがって、CXCL13-CXCR5 のシグナル以外の経路が存在し、それに応答して B 前駆細胞は脾臓内に移入していると考えられるが、その詳細は不明である。

Ad-CXCL12 投与により B 細胞の動態が変化していたことから、TD 抗原または TI 抗原に対する液性免疫に影響を与えているかどうか検討した。その結果、コントロールベクター群と比較し、TD 抗原および TI 抗原に対する抗体産生量に変化していることが示された。脾臓のマージナルゾーン B 細胞や腹腔内の B-1 細胞は TI 抗原に対して効率良く抗体産生を行うことが知られている。したがって、マウス生体への Ad-CXCL12 の投与により、これらの細胞が増加していることが考えられ、今後の検討課題である。なお、TD 抗原に対する抗体産生量が著明に低下している理由も不明である。今後、Ad-CXCL12 投与後の骨髄や脾臓、末梢血中でのプラズマ細胞（抗体産生細胞）の動態について解析を進める予定である。

Ad-CXCL12 の投与により造血幹/前駆細胞を骨髄から遊離させることが可能であることから、外来造血幹細胞の骨髄ニッチへの生着が可能とあると考えられるものの、上述のように B 細胞の動態にも影響をおよぼしていることが示された。したがって、Ad-CXCL12 を用いる系では内在性 B 細胞の影響を考慮する必要がある。CXCL12 以外にも VEGF や Ang-1、Stem Cell Factor (SCF) などのサイトカインも骨髄から造血幹/前駆細胞を遊離させる作用を有している。Ad-VEGF をマウスへ投与することに

より、血漿 VEGF 濃度を約 100ng/mL にまで上昇させることが可能であるため、今後は Ad-VEGF 単独投与、あるいは Ad-CXCL12 や Ad-Ang-1 との共投与により血液細胞の動態を解析するとともに外来骨髄細胞、外来造血幹細胞を移植による生着率を検討する予定である。また、近年、インターフェロン (IFN)  $\alpha$  が G0 期の造血幹細胞を G1 期へ移行させる作用があることが明らかにされた。IFN  $\alpha$  と Ad-CXCL12 や Ad-VEGF を併用することで、これまでよりも効率良く造血幹細胞を骨髄から遊離させることが可能であることが考えられるため、今後検討していきたい。

## E. 結論

CXCL12 発現 Ad ベクターをマウスに投与することにより、造血幹細胞を含む多種の血液細胞が骨髄 niche から遊離してることが示された。なお、B 細胞の動態に影響をおよぼしていることを考慮する必要はあるものの、これらの結果は、今後のヒト血液細胞を有するマウスの作製に有用な知見であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tashiro K., Inamura M., Kawabata K., Sakurai F., Yamanishi K., Mizuguchi H. Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction. *Stem Cells*, 27, 1802-1811 (2009)

2. Tashiro K, Kondo A, Kawabata K, Sakurai H, Sakurai F, Yamanishi K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Efficient osteoblast differentiation from mouse bone marrow stromal cells with polylysine-modified adenovirus vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379**, 127-132 (2009)

## 2. 学会発表

1. Kenji Kawabata, Katsuhisa Tashiro, Mitsuru Inamura, Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Adenovirus vector-mediated differentiation into adipocytic and osteoblastic lineages from mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. 12th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, San Diego, USA, 2009年5-6月 (ポスター発表)

2. 稲村 充、川端 健二、櫻井 文教、形山 和史、林田 みどり、松村 紘子、古江一楠田美保、水口裕之、未分化ヒト ES 細胞から中内胚葉へのラミニンによる分化促進効果、日本組織培養学会第 82 回大会、栃木、2009年5月18-19日 (口頭・ポスター発表)

3. 稲村 充、川端 健二、形山 和史、梅澤明弘、阿久津英憲、林田 みどり、松村 紘子、古江一楠田美保、水口裕之、ヒト ES 細胞や iPS 細胞からの内胚葉系細胞および肝細胞への分化誘導法の開発、第 16 回肝細胞研究会、山形、2009年6月26-27日 (ポスター発表)

4. 田代 克久、稲村 充、川端 健二、櫻井 文教、水口 裕之、アデノウイルスベクターによるマウス iPS 細胞への高効率遺伝子導入法の確立と分化誘導への応用、第 25 回日本 DDS 学会学術集会、東京、2009年7月3-4日 (ポスター発表)

5. Katsuhisa Tashiro, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by efficient adenoviral transduction, 7th Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research, Barcelona, Spain, 2009年7月 (ポスター発表)

6. Mitsuru Inamura, Katsuhisa Kawabata, Fuminori Sakurai, Kazufumi Katayama, Midori Hayashida, Hiroko Matsumura, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi, Laminin promotes human embryonic stem cell differentiation into mesodendoderm, 7th Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research, Barcelona, Spain, 2009年7月 (ポスター発表)

7. 川端 健二、田代 克久、水口 裕之、アデノウイルスベクターを用いた iPS 細胞への遺伝子導入の最適化と分化誘導、第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009年10月21-24日 (シンポジウム、口頭発表)

8. 稲村 充、川端 健二、櫻井 文教、形山 和史、林田 みどり、松村 紘子、古江一楠田美保、水口裕之、未分化ヒト ES

細胞から中内胚葉へのラミニンによる分化促進効果、ファーマ・バイオフィオーラム 2009 第 8 回、名古屋、2009 年 11 月 14-15 日ポスター発表)

該当事項なし

9. Katsuhisa Tashiro, Mitsuru Inamura, Norihisa Furukawa, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi, Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human induced pluripotent stem cells, 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009 年 12 月 9-12 日 (ポスター発表)

10. 田代 克久、稲村 充、形山 和史、櫻井 文教、古江一楠田美保、川端 健二、水口 裕之、アデノウイルスベクターを用いた未分化ヒト ES/iPS 細胞への高効率遺伝子導入、日本薬学会第 130 年会、岡山、2010 年 3 月 28-30 日 (ポスター発表)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

名称：幹細胞から肝細胞への分化誘導方法

出願番号：特願 2009-247342

出願日：2009/10/28

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明者：水口裕之、川端健二、稲村充、古江美保

##### 2. 実用新案登録

該当事項なし

##### 3. その他

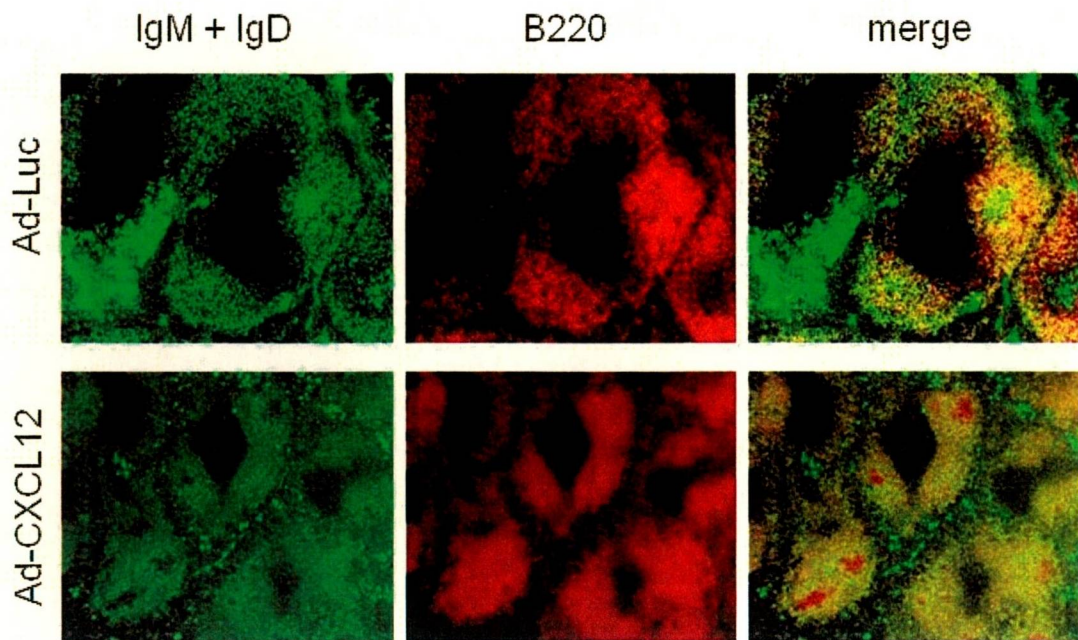


Fig. 1 Localization of B cell precursors in Ad-CXCL12-injected mice

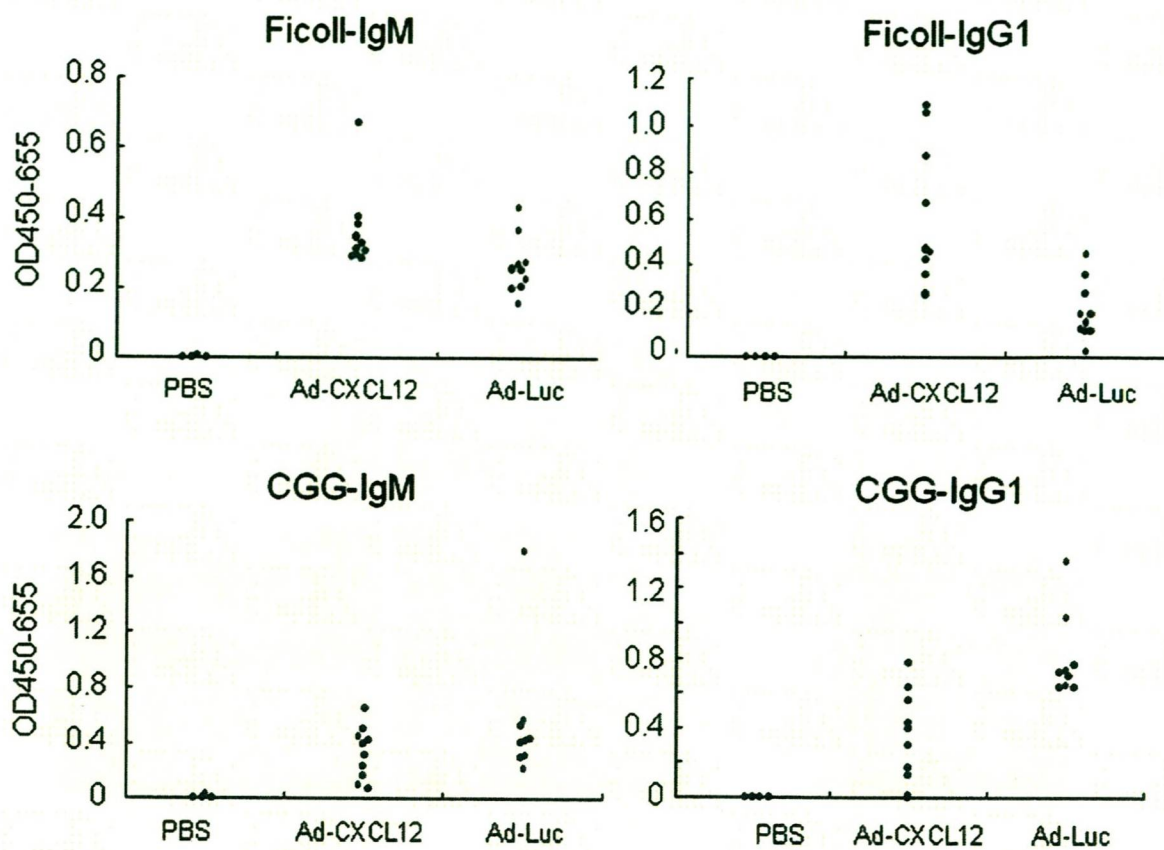


Fig. 2 The effect of Ad-CXCL12 on the antibody production.

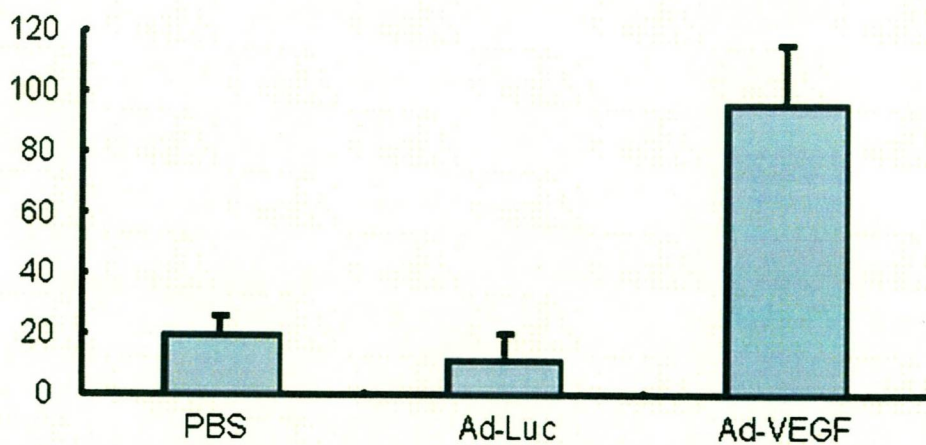


Fig. 3 Serum levels of VEGF.

## 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

研究分担者 佐藤 陽治 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

### 研究要旨

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（hMSC）は虚血性疾患治療を目的とした細胞・組織加工医薬品として期待されている。従って、生体内虚血環境における hMSC の生理的挙動の理解、特に hMSC の有効性に関する主要な機序とされるサイトカイン類の分泌プロファイルを理解することは、hMSC の細胞特性指標の同定ならびに品質規格の設定の上で重要と考えられる。そこで、*in vitro* 虚血環境下（低酸素・グルコース欠乏条件）での hMSC のサイトカイン分泌プロファイルの解析における市販の抗体アレイの有用性を評価した。その結果、胎盤由来増殖因子 PlGF の選択的誘導を示唆する結果等が得られたものの、通常低酸素環境・虚血環境下で惹起されるとされる血管内皮増殖因子 VEGF 分泌促進は検出されなかった。従って、抗体アレイは網羅的手法ではあるものの特性解析指標の探索における信頼性確保にはアレイ上の個々の抗体の特性評価等が必要であると考えられた。

### 研究協力者

安田 智

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

吾月 遥

東邦大学大学院薬学研究科

薬物安全性学教室 修士1年

佐藤 光利

東邦大学大学院薬学研究科

薬物安全性学教室 准教授

hMSC) という 2 種の体性幹細胞が存在する。前者は骨髄中で自己複製しながら研究前駆細胞を産生する。骨髄中の造血幹細胞の維持には骨髄ストローマ細胞が必要である。骨髄ストローマ細胞は複雑な三次元網目構造を形成しており、造血幹細胞はその構造の中で未分化状態を維持したり分化したりしている。骨髄ストローマ細胞の一部の細胞集団は、培養条件によって骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞などの間葉系細胞へと分化することから、間葉系幹細胞と呼ばれている。間葉系幹細胞については、その造血支持能に注目し、hMSC 併用移植による移植後造血系再構築促進効果が検討されている。また、骨再生・軟骨再生を目的とした再生医療に用いる細胞の供給源としても

### A. 研究目的

ヒト骨髄中には造血幹細胞と間葉系幹細胞（human mesenchymal stem cell:



期待され、さらに、hMSC の免疫抑制能と炎症・組織障害部位への集積性に着目した移植片対宿主病（graft-versus-host disease: GVHD）や虚血性心疾患・末梢動脈疾患の治療に関する研究が活発化しており、有効性を示唆する報告も多い。

しかしながら、こうした hMSC の有効性に関する報告に関しては、その機序が必ずしも明らかではなく、従ってリスク評価に限界がある点が問題である。すなわち、hMSC を細胞・組織加工製品ないしその原材料として利用する場合には、可能な限り作用機序の解明を行い、有効性/安全性評価ないし品質評価のための細胞特性指標を同定することが必要である。たとえば、虚血性疾患の治療を目的とし、虚血部位に hMSC を投与し細胞保護作用・血管新生作用等の治療効果が認められる報告は数多いが、その機序については不明なことが多い。そこで本研究では、虚血性疾患治療を目的とした細胞・組織加工医薬品としての hMSC の作用機序を理解するために *in vitro* で虚血環境を再現し、hMSC から分泌される生理活性物質を評価することにより、虚血環境における hMSC の生理的挙動を理解すると同時に hMSC の有効性と関連する特性解析指標を、サイトカイン抗体アレイを用いて同定することを試みた。

## B. 研究方法

### B-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

情報は表 1 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-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 cells/100 $\mu$ L/well/で播種し、正常増殖培地 MSCGM 中で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>) 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-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 ARV0sx (PerkinElmer)を用いて測定した。

#### **B-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 $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。細胞は別途 $-80^{\circ}\text{C}$ 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. 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)等の濃度を 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-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。

#### **(倫理面への配慮)**

Lonza 社の hMSC はヒト由来細胞であるが、提供者の同意を取り適切に細胞を採取していることが確認されている。このため国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規程に倫理審査該当品目とはならなかった。

### **C. 研究結果**

#### **C-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図 1 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-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- $\beta$ 2、および FGF-4 であった (図 2)。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-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 (図 3)。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・メディア中の 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・メディア中の 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- $\beta$ 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-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- $\beta$ 1、angiogenin、leptinなどの遺伝子発現上昇が認められた (図4)。

## **D. 考察**

培養細胞が培地中に分泌するサイトカイン類等の生理活性物質の検出・測定は従来 ELISA を用いて行われることが多かったが、種類の多いサイトカイン類を網羅的に解析しようとする場合にスループットの点で問題があった。その点、多種類の抗サイトカイン抗体をプラットフォーム上に集積させたサイトカイン抗体アレイはハイスループットにサイトカイン含量・濃度のプロファイリングが可能であり、細胞の特性解析を行う上で有用なツールとなる可能性がある。

RayBiotech 社のサイトカイン抗体アレイは ELISA よりも、1) ハイスループット

(1 サンプルで同時に多数のサイトカインの検出が可能)、2) 高感度 (例えば MCP-1 の場合、サイトカイン抗体アレイでは 4pg/mL までが測定可能なのに対し、通常の ELISA では 40pg/mL 程度の濃度がなければ明瞭なシグナルは得られない、3) 検出域が広い (例えば IL-2 の場合、25k~250,000 pg/mL の検出域を持つのに対し、通常の ELISA の場合、100~1000 倍の検出域である)、4) ばらつきが少ない、5) 短時間で簡単、といった点で優れていると言われている。そこで、本研究では、hMSC の虚血環境下での生理的挙動を評価する場合における、このサイトカイン抗体アレイの有用性を検討した。虚血環境は低酸素・グルコース欠乏 (HGD, Hypoxia and Glucose Deprivation) 処理によって *in vitro* で再現した。

サイトカイン抗体アレイによる測定では、HGD 処理群はコントロール群と比較して、PlGF のサイトカインの分泌上昇が認められた。RT-PCR の結果から、この分泌上昇は PlGF の遺伝子発現上昇を伴っていることが明らかとなった。しかし、ELISA による測定では HGD による PlGF 分泌亢進は認められなかった。また、特性指標候補として PlGF を捉えた場合、今回 ELISA で確認された程度の極めて低濃度の PlGF がはたして生理的意義があるかという点が問題となる。さらに大きな問題としては、HGD 処理群とコントロール群との間での培地中 VEGF 濃度の差異に関しても、サイトカイン抗体アレイによる検出と ELISA による検出とで結果に乖離があったことが挙げられる。VEGF は低酸素刺激により細胞での発現および分泌が増加する因子として良く

知られており、低酸素・グルコース欠乏処理において言わば陽性コントロール的なものととらえることができる。ELISA の結果ならびに RT-PCR の結果は、虚血刺激による分泌・遺伝子発現上昇を示しており、従来の数多くの報告と矛盾しない。一方、サイトカイン抗体アレイでは、HGD 処理群における VEGF 分泌の増加は全く認められなかった。

これらの結果の乖離の原因の可能性の一つとしては、抗体の特異性の差異が挙げられる。すなわち、サイトカイン抗体アレイ中の抗 VEGF 抗体が VEGF に対して十分な特異性を持たず、非特異的なシグナルが検出されているのかもしれない。VEGF は狭義の VEGF である VEGF-A (VEGF-1) の他、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、PlGF-1、PlGF-2 の 7 つのアイソフォームがあり、これらの中には VEGF ファオルタナティブスプライシング (Alternative splicing) によりいくつかのバリエーションを持つものも存在する。本研究で用いた ELISA アッセイの中に含まれる抗 VEGF 抗体は VEGF<sub>165</sub>/PlGF、VEGF-B<sub>167</sub>、VEGF-C ならびに VEGF-D とは交叉反応しないことが知られているが、サイトカイン抗体アレイ中の抗 VEGF 抗体の各アイソフォーム/バリエーションに対する選択性は明らかではない。従って、サイトカイン抗体アレイと ELISA との間の結果の乖離の原因の別の可能性としては、VEGF 抗体の VEGF アイソフォームまたはそのバリエーションへの選択性の差によることも考えられる。

## E. 結論

hMSC の薬効・効力には、生体内で hMSC

自身が分泌するサイトカイン類等の生理活性物質が大きく寄与していると言われている。従って、hMSC を生体に投与した場合、投与部位ないしホーミングしていく部位における hMSC の生理的挙動を評価することは、細胞・組織加工医薬品としての hMSC の有効性・安全性および品質を評価する際に重要と考えられる。たとえば hMSC は虚血性疾患の治療を目的に虚血部位に投与されることがあるが、そのような場合には、虚血部位に存在する hMSC がら分泌されるサイトカイン類等の生理活性物質の分泌プロファイルを評価することが、hMSC の特性解析指標の同定並びに品質管理のための規格設定のためには重要となってくる。そこで、本研究では、hMSC の虚血環境下での生理的挙動を評価する場合における、このサイトカイン抗体アレイの有用性を検討した。その結果、ELISA では検出できなかった虚血環境下での PIGF の分泌亢進が観察されるなど一定の有用性が示唆されたものの、従来から知られている虚血による VEGF の分泌亢進は観察されず、データの信頼性を確保するには、サイトカイン抗体アレイ上にある抗体の特異性を詳細に検討するなどの対策が必要であると考えられた。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

1. Nishida M, Suda R, Nagamatsu Y, Tanabe S, Onohara N, Nakaya M, Kanaho Y, Shibata T, Uchida K, Sumimoto H, Sato Y, Kurose H. Pertussis toxin upregulates angiotensin type 1 receptors through Toll-like receptor 4-mediated Rac activation. *J Biol Chem* 2010 (in press)
2. Sakamoto K, Hiraiwa M, Saito M, Nakahara T, Sato Y, Nagao T, Ishii K. Protective effect of all-trans retinoic acid on NMDA-induced neuronal cell death in rat retina. *Eur J Pharmacol.* 2010 (in press)
3. Nishida M, Watanabe K, Sato Y, Nakaya M, Kitajima N, Ide T, Inoue R, Kurose H. Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. *J Biol Chem* 2010 (in press)
4. 早川堯夫, 梅澤明弘, 山中伸弥, 小澤敬也, 大和雅之, 澤芳樹, 山口照英, 松山晃文, 佐藤陽治, 中内啓光: 組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する研究(その1) ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案(中間報告) *再生医療* 2010;9:116-27.
5. 早川堯夫, 梅澤明弘, 山中伸弥, 小澤敬也, 大和雅之, 澤芳樹, 山口照英, 松山晃文, 佐藤陽治, 中内啓光: 組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する研究(その2) ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案(中間報告) *再生医療* 2010;9:128-38.
6. 早川堯夫, 梅澤明弘, 山中伸弥, 小澤敬也, 大和雅之, 澤芳樹, 山口照英, 松山晃文, 佐藤陽治, 中内啓光: 組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する研究(その3) ヒト(自己) iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案(中間報告) *再生医療* 2010;9:139-51.
7. 早川堯夫, 梅澤明弘, 山中伸弥, 小澤敬也, 大和雅之, 澤芳樹, 山口照英, 松山晃文, 佐藤陽治, 中内啓光: 組織

- 加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する研究(その4) ヒト(同種) iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案(中間報告) *再生医療* 2010;9:152-65.
8. 早川堯夫, 梅澤明弘, 山中伸弥, 小澤敬也, 大和雅之, 澤芳樹, 山口照英, 松山晃文, 佐藤陽治, 中内啓光: 組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する研究(その5) ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案(中間報告) *再生医療* 2010;9:166-80.
  9. 佐藤陽治 ヒト幹細胞からの肝細胞分化誘導とその創薬非臨床試験への応用 *実験医学(増刊)* 2010;28:334-338.
  10. 西田基宏, 佐藤陽治, 仲矢道雄, 黒瀬等 G タンパク質共役型受容体-TRPCチャネルタンパク複合体形成による心肥大シグナル制御 *日本薬理学雑誌* 2009;134:131-6.
  11. Tanabe S, Sato Y, Suzuki K. Characteristics of stem cells based on expression profile of molecular markers. *Res. Adv. in Biochemistry*. 2009;1-8.
  12. Fujishita K, Ozawa T, Shibata K, Tanabe S, Sato Y, Okuda T, Maeda S, Koizumi S. Grape seed extract (GSE) acting on astrocytes reveals neuronal protection against oxidative stress via interleukin-6-mediated mechanisms. *Cell Mol Neurobiol*. 2009;29:1121-9
  13. 佐藤陽治 ヒト細胞・組織加工医薬品などの安全性確保 *医学のあゆみ* 2009;229:893-896.
- G-2 学会発表**
1. 千蔵 さつき, 仲矢 道雄, 佐藤 陽治, 小柳 悟, 大戸 茂弘, 西田 基宏, 黒瀬 等 Metoprolol の長期投与が心臓に及ぼす影響 日本薬学会 第 130 年会(平成 22 年 3 月、岡山)
  2. 西田 基宏, 佐藤 陽治, 上村 綾, 仲矢道雄, 黒瀬 等 圧負荷による P2Y6 受容体-G12/13 蛋白質経路を介した心臓の線維化 第 82 回日本生化学会大会(平成 21 年 10 月 21-24 日、神戸) *生化学* 2009; 81:366
  3. 佐藤 陽治 血管の『しなやかさ』と甲状腺ホルモン 日本薬学会薬理系薬学部会 生体機能と創薬シンポジウム 2009(平成 21 年 8 月 26-27 日、東京)
  4. Nishida M, Sato Y, Nakaya M, Inoue K, Inoue R, Mori Y, Kurose H. Formation of P2Y2 receptor-TRPC5-eNOS signal complex defines ATP-stimulated anti-hypertrophic responses in rat neonatal cardiomyocytes. *Fukuoka Purine 2009* (Joint with JSPS Core-to-Core Program A Satellite Symposium for IUPS2009) (July, Fukuoka, 2009)
  5. Nishida M, Sato Y, Uemura A, Tozaki-Saitoh H, Nakaya M, Inoue K, Kurose H. P2Y6 receptor-G12/13 signaling triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis. *Fukuoka Purine 2009* (Joint with JSPS Core-to-Core Program A Satellite Symposium for IUPS2009) (July, Fukuoka)
  6. Kurose H, Nishida M, Sato Y, Uemura A, Narita Y, Tozaki-Saitoh H, Nakaya M, Ide T, Suzuki K, Inoue K, Nagao T. Cardiac fibrosis triggered by P2Y6-G12/13 signaling in cardiomyocytes. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009, July, Kyoto).
  7. 鈴木 孝昌, Suresh Thirupathi, 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(JHUPO)第 7 回大会(平成 21 年 7 月 27-28 日、東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-3.その他 特記事項なし

H-1. 特許取得 なし

H-2. 実用新案登録 なし

表 1 hMSC 各ロットのドナー情報

| Lot (in house) | Lot (Manufacturer) | Age | Race      | Sex    |
|----------------|--------------------|-----|-----------|--------|
| A              | 4F1127             | 23  | Black     | Male   |
| B              | 4F0312             | 27  | Black     | Female |
| C              | 5F0138             | 19  | Black     | Male   |
| F              | 4F1560             | 23  | Black     | Female |
| G              | 4F0591             | 32  | Caucasian | Male   |
| H              | 4F0760             | 25  | Caucasian | Female |

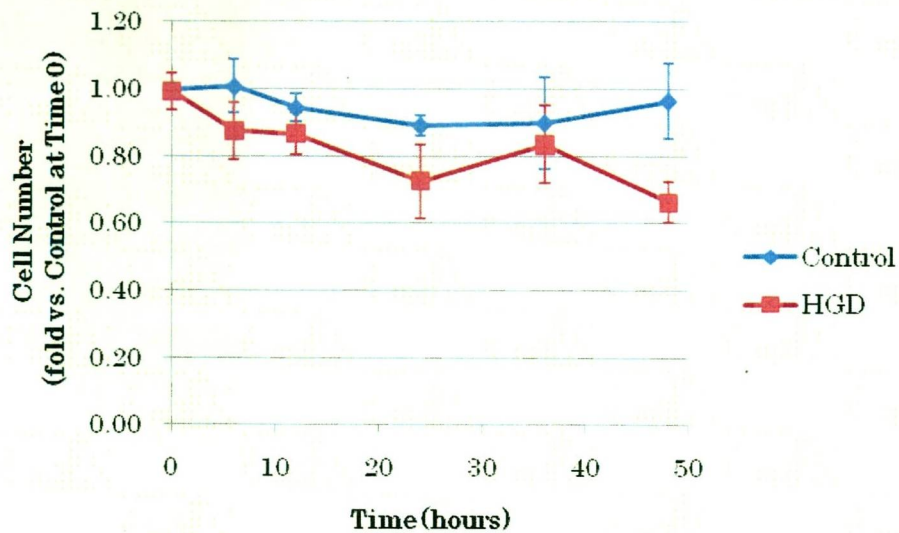


図 1 hMSC の生存に対する低酸素・グルコース欠乏環境の影響

無血清培地の下で通常酸素分圧でグルコース存在する環境にある hMSC に比べ、低酸素・グルコース欠乏の条件 (HGD, Hypoxia-Glucose Deprivation) に暴露した hMSC の生存率は低かった ( $P < 0.05$ , Repeated Measures One-way ANOVA)。低酸素・グルコース欠乏による培養開始後が 48 時間になると生存率の差が明確となった。値は 6 ロットの平均値と標準誤差で示した。



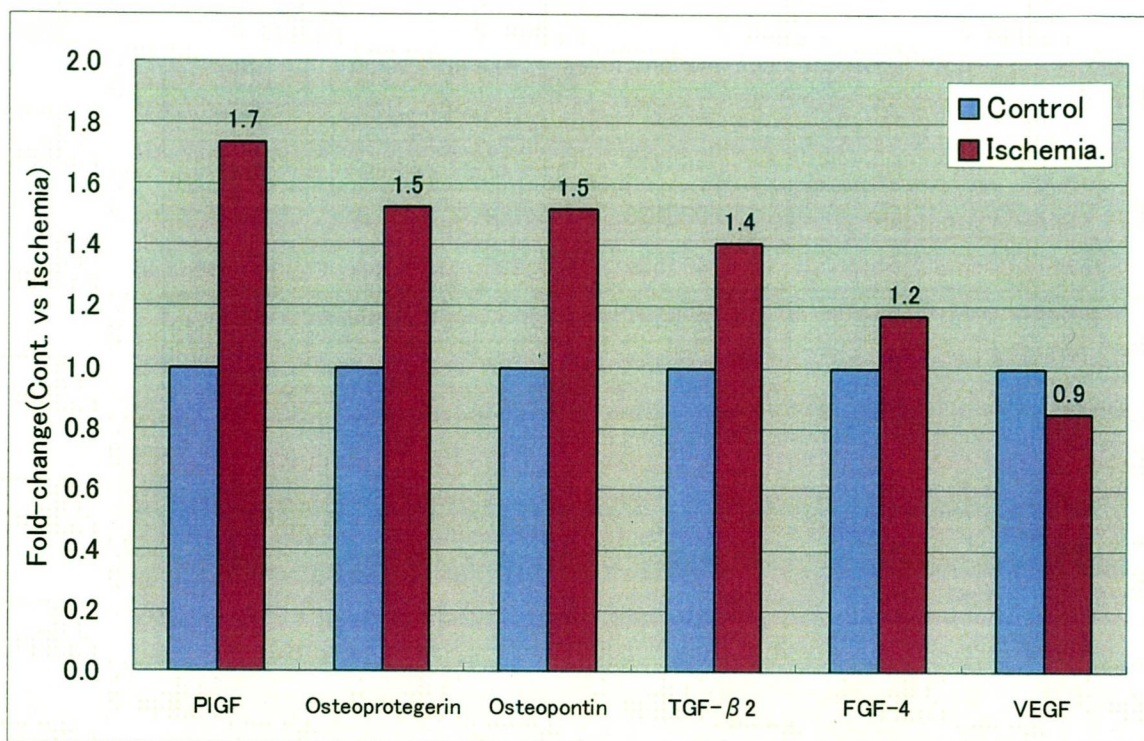
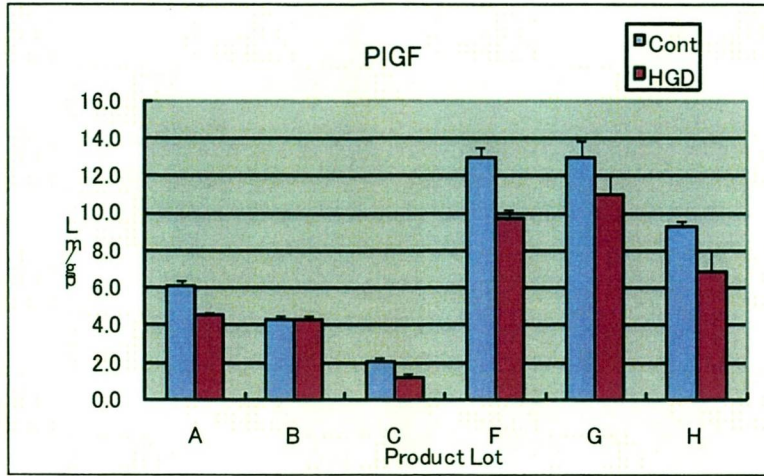


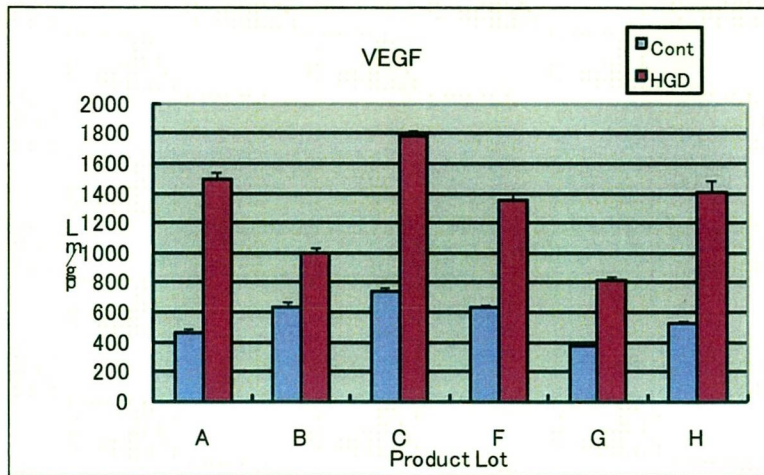
図2 サイトカイン抗体アレイを用いたhMSC由来サイトカイン類の分泌測定

無血清培地の中で通常酸素分圧でグルコース存在する環境にある hMSC のコンディションドメディウムと、低酸素・グルコース欠乏の条件 (Ischemia=HGD, Hypoxia-Glucose Deprivation) に暴露した hMSC のコンディションドメディウムとの間で、含有される各種サイトカイン濃度を、サイトカイン抗体アレイを用いて比較した。6 ロットの hMSC に関して Paired t-test を行い、有意差 (P<0.05) の認められたものは以上の 6 分子であった。値は平均値を表す。

A



B



C

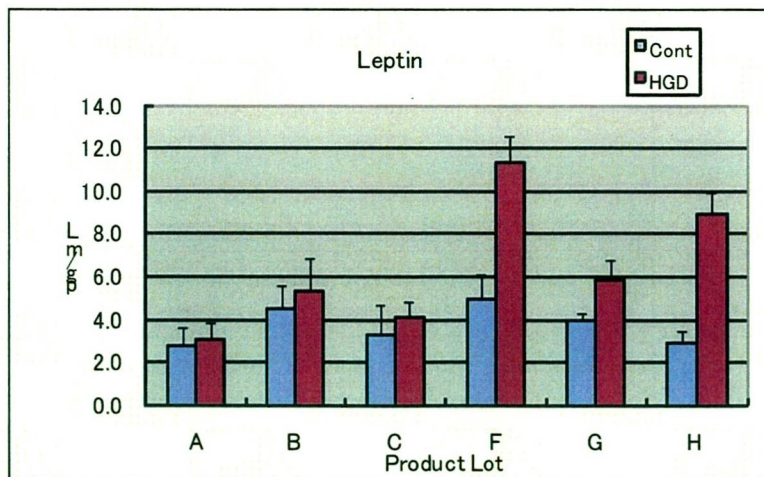
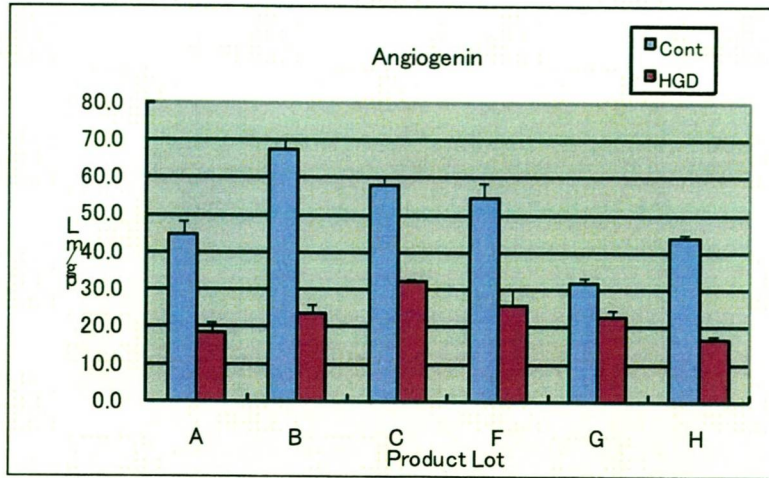
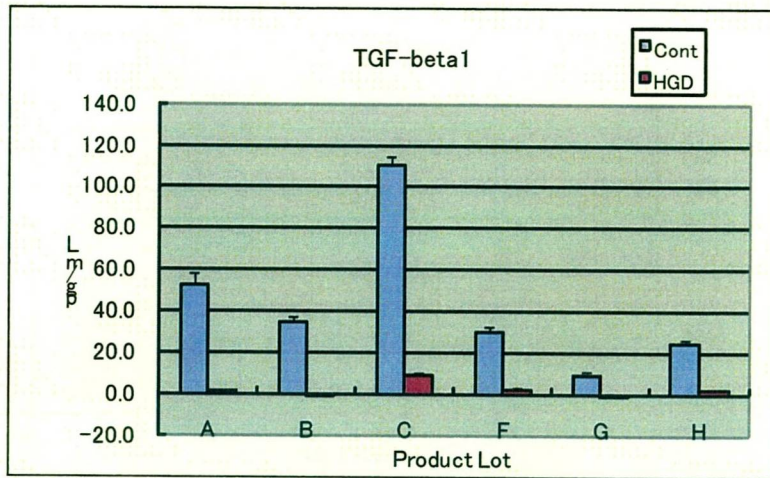


図3 ELISAを用いたhMSC由来サイトカイン類の分泌測定  
 コントロールと HGD 処理群のコンディションドメディウムの間で、含有される各種サイトカイン濃度を、ELISA を用いて測定・比較した。値は平均値±S.E.M.

D



E



F

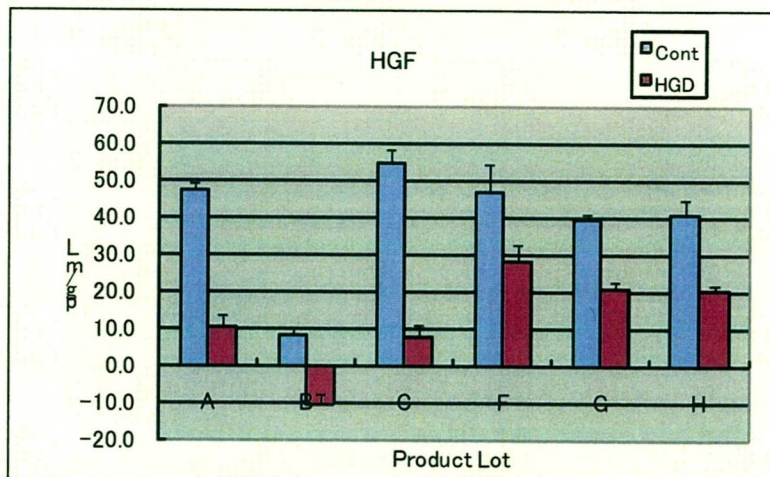
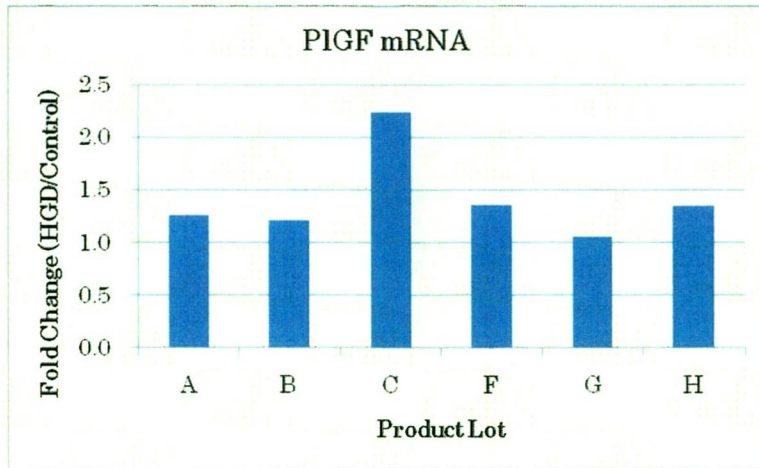
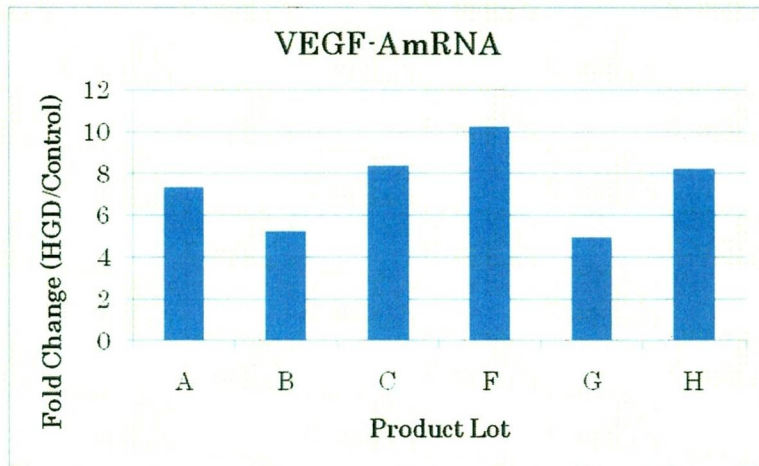


図3 (続き)

A



B



C

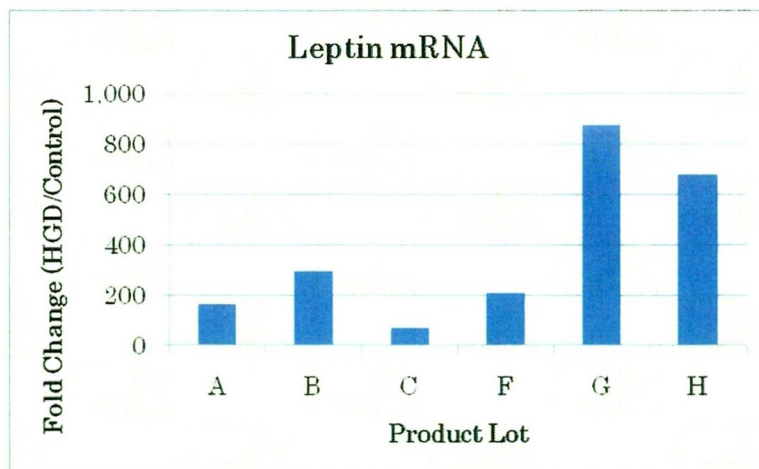


図4 PCR Arrayを用いたhMSCサイトカイン類のmRNA発現量の測定

コントロールとHGD処理群のhMSCの間で、各種サイトカイン遺伝子発現量を、RT-PCRを用いて測定・比較した。