

201006005A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照 英

平成23(2011)年 3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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 口 照 英

平成 23 (2011) 年 3 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・・・・・・・・ 94

内田恵理子

2. 細胞組織利用医薬品の同一性・安定性評価手法の開発に関する研究・・・・・・・・ 104

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・・・・・・・・ 121

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・・・・・・・・ 134

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・・・・・・・・ 147

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・・・・・・・・ 176

石井 明子

7. 細胞特性・品質解析技術としての糖鎖解析技術の開発・・・・・・・・ 189

早川 堯夫

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・ 198

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・ 202

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

平成 22 年度 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 客員研究員

要旨

細胞組織加工医薬品の特性解析法や製造工程の評価のための基盤技術として次の成果が得られた：1) 細胞組織加工医薬品のウイルス安全性確保の一環として、E 型肝炎ウイルス（HEV）の核酸増幅検査（NAT）による測定の評価に用いる標準パネルを樹立し、検出感度を含めた NAT の評価に有用なことを示した。2) ナノ LC-MS を用いた高感度分析により、ハイスループットなプロテオーム解析が可能となり、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）に特徴的な表面 CD マーカーを網羅的に検出できることを明らかにした。そして、安定同位体ラベルをした合成ペプチドを内部標準として用いることにより、10 種のヒト MSC 特異的 CD 分子種を、質量分析装置により同時に定量可能な試験系を確立できた。3) 細胞組織加工医薬品の品質評価技術の開発の一環として、LC/MS により得られたヒト MSC 及び MSC を分化誘導した細胞（加工細胞）の糖鎖プロファイルの主成分分析（PCA）を行い、本手法が MSC の分化を評価する方法として利用可能であることを見出した。4) CXCL12 発現アデノウイルス（Ad）または VEGF Ad ベクター投与が、ヒト造血幹細胞移植効率を向上させる技術として有用である可能性を示した。また、ES、iPS 細胞へ Ad ベクターを用いて HoxB4 遺伝子を導入することにより効率良く血液細胞を誘導可能であることを見出し、ES や iPS 細胞から細胞を細胞加工医薬品の評価に用いることが可能と考えられた。5) 細胞特性評価指標の探索法として DNA マイクロアレイを応用し、通常培養時の発現量がヒト MSC の虚血（低酸素低グルコース）ストレス化下でのサイトカイン（VEGF）分泌と相関する遺伝子、すなわち虚血応答性 VEGF 分泌の指標となり得る因子を同定した。6) 2 種類のヒト血管内皮前駆細胞（early EPC 及び late EPC）の血管形成促進機構に関する検討を行い、early EPC の遊走に p110 $\delta$  PI3K が関与していること、及び、late EPC の管腔形成にオクルディンが関与していることを見出した。7) O-結合型糖鎖とグリコサミノグリカン型糖鎖の比較糖鎖プロファイリング技術を開発し、両 O-結合型糖鎖の比較解析が、細胞の特性解析、同定・確認、細胞間の差異、品質管理、細胞の機能と細胞を構成する糖タンパク質の関係、さらには各種疾患における原因糖鎖や疾患マーカーの探索など、きわめて広範囲に応用できる可能性を明らかにした。

### 研究分担者（順不同）

内田 恵理子	国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部・室長
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
川崎 ナナ	国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・部長
川端 健二	（独）医薬基盤研究所・創薬基盤研究部 幹細胞制御プロジェクト・プロジェクトリーダー
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
石井 明子	国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・室長
青井 貴之	京都大学・物質-細胞統合システム拠点/iPS 細胞研究センター・教授
中内 啓光	東京大学医科学研究所・教授
早川 堯夫	近畿大学薬学総合研究所・所長／特任教授

### 研究協力者（順不同）

岡田 義昭	国立感染症研究所
水澤 左衛子	国立感染症研究所
柚木 幹弘	㈱ベネシス
辻川 宗男	㈱ベネシス
皆木 隆男	㈱ベネシス
稲田 耕一	日本製薬㈱
小西 久郎	日本製薬㈱
五十嵐 正志	日本赤十字社
鈴木 光	日本赤十字社
嘉悦 洋	（財）化学及血清療法研究所
下瀬 克郎	（財）化学及血清療法研究所
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・主任研究官
スレッジ・ティルパッティ	元 国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部
橋井則貴	国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・室長
黄 笑宇	国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部
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	大阪大学大学院薬学研究科
田代克久	（独）医薬基盤研究所
野中昭希	大阪大学大学院薬学研究科
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2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
豊田淑江	国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部
北川博子	国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部
掛樋一晃	近畿大学薬学部／近畿大学薬学総合研究所・学部長／教授
木下充弘	近畿大学薬学部・講師

## 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、特定の有用細胞を作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他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）も現時点では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、製品によっては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) 感染性危険因子評価技術開発：細胞・組織加工医薬品のウイルス等の感染因子に関する安全性評価技術の開発の一環として、HEVのNATによる測定の評価に用いる標準パネルの樹立に関する検討を行った。国内で見出されるHEVの遺伝子型は3型又は4型で、4種類のクラスター（G3jp, G3us, G3sp, G4jp）に分類される。HEVパネル候補品として、国内4クラスターに属し、実験感染ブタ糞便から得た4株と培養細胞で増幅した1株の計5株をヒト血清で約 $10^5$  copies/mlに希釈したものをを用いた。パネル候補品は2施設で均一性試験を実施し、分注の均一性を確認した。また、共同検定に参加した6施設において、可能な限り統一した方法でのウイルスゲノム抽出とリアルタイム

ム PCR 定量を実施して各パネルのコピー数を設定することにより、HEV-NAT 試験用標準パネルを樹立した。

- (2) 安定性評価技術開発：ヒト MSC の総タンパク質をトリプシン消化物を、ナノ LC (DiNa)・LTQ・Orbitrap により解析する手法と同位体導入ペプチドを解析する手法を組み合わせ、hMSC にて発現している CD 抗原を同時に定量する方法を確立した。
- (3) 同等性・特性解析指標の探索手法の開発：MSC の分化を評価する方法を開発することを目的として、分化指標としての糖鎖プロファイル解析が MSC の分化細胞を簡便に評価する方法として有用なことを明らかにした。
- (4) 免疫原性評価のための基盤技術開発：Ad-CXCL12 投与マウスへのドナー細胞の移植実験から、レシピエント骨髄環境の制御が生着率向上に有用であることが示された。また VEGF も CXCL12 と同等の作用を有していることを初めて明らかにした。今後、移植条件を最適化することにより、生着率向上が可能になると思われる。
- (5) 細胞特性・品質解析技術の開発(1)：虚血性疾患治療を目的とした細胞治療薬としての MSC の品質特性指標の同定を目的に、生体内の虚血環境を模した条件下における培養 MSC からの生理活性物質の放出プロファイルを解析し、VEGF の誘導が確認された。次に細胞特性評価指標の探索法として DNA マイクロアレイを応用し、通常培養時の発現量がヒト MSC の虚血（低酸素低グルコース）ストレス化下での VEGF 分泌と 관련된遺伝子、すなわち虚血応答性サイトカイン分泌の指標となり得る因子を同定し、細胞特性評価指標の探索法としての本法の有用性を示した。
- (6) 細胞特性・品質解析技術の開発(2)：血管内皮前駆細胞の一種である

early EPC の遊走に関わるシグナル伝達分子に関する検討を行い、p110 $\delta$  PI3K が関与していることを明らかにした。また、ヌードマウスへの移植による *in vivo* 評価系を構築し、early EPC がホスト由来の血管内皮細胞から構成される血管の形成を促進することを示した。さらに、自身が管腔形成能を持つ血管内皮前駆細胞である late EPC について、siRNA を用いた発現抑制実験により、遺伝子発現プロファイルから特性指標候補分子として見出したオクルディンが管腔形成に関わる機能的特性指標であることを示した。

- (7) 細胞特性・品質解析技術の開発(3)：細胞の糖タンパク質糖鎖解析を細胞特性解析技術として応用するため、O-結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイルリング技術を開発し、複数種のヒト培養癌細胞をモデルにムチン型糖鎖の解析へと応用した。その結果、各種細胞間で O-結合型糖鎖の糖鎖プロファイル解析が、細胞の特性解析、同定・確認、細胞間の差異、品質管理、細胞の機能と細胞を構成する糖タンパク質の関係、さらには各種疾患における原因糖鎖や疾患マーカーの探索など、きわめて広範囲に応用できる可能性を明らかにした。

## B. 研究方法

### B-1-(1) HEV パネル

国内で見いだされる HEV の遺伝子型は 3 型又は 4 型で、4 種類のクラスター (G3jp, G3us, G3sp, G4jp) に分類される。HEV の国内標準パネル候補品は、国内 4 種類のクラスターに属する 4 種類の株 (swJR-P5(G3jp)、swJB-E10(G3sp)、swJB-M8(G3us)、swJB-H7(G4jp)) を実験感染 SPF ブタより抽出・精製したものと、swJB-E10 を A549 細胞に感染させて上清から精製した swJB-E10cul(G3sp) の計 5 種類について、希釈用ヒト血清を用

いて約  $10^5$  copies/ml に希釈したもの、およびコントロールのヒト陰性血漿の計 6 本のバイアル (各 0.5ml/tube) からなり、ベネシス社より供与された。HEV の国内標準パネル候補品 1 セットの内容を Table 1 に示す。また、HEV パネルの系統樹を Fig. 1 に示す。

#### B-1-(2) 感度検定用標準 RNA

HEV の定量は、感度検定用標準 RNA として、次の 2 種類のものを使用した。

- ① HEV PC RNA ( $10^7$  copies in 70% Ethanol/tube, G3jp, G3sp, G4sp 用)
- ② HEV G3us PC RNA ( $10^7$  copies in 70% Ethanol/tube, G3us 用)

①は G4jpswJB-H7 株、②は G3us 株より RNA を抽出し、RT-PCR で調整した増幅領域を含む cDNA 断片を基に、in vitro 転写法で作製した RNA 断片である。 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し、1 回のアッセイにつき 1 本を使用した。標準 RNA を使用する際は、14000rpm、10 分の遠心により沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄、風乾後、1 mL の滅菌水を加えて溶解して  $10^5$  copies/ $10\mu\text{L}$  液とした。これをさらに滅菌水で希釈して  $10^4$  copies/ $10\mu\text{L}$  液、 $10^3$  copies/ $10\mu\text{L}$  液、 $10^2$  copies/ $10\mu\text{L}$  液を調製して標準 RNA 液として使用し、コピー数を算出した。定量には 4 つの各濃度につき  $N=3$  で検量線を作成した。

#### B-1-(3) HEV RNA の抽出

HEV の核酸抽出は QIAamp viral RNA mini kit を使用した。マニュアルに準じて試料  $140\mu\text{L}$  を用いて抽出を行い、Buffer AVE  $50\mu\text{L}$  を用いて溶出した。定量

RT-PCR の 1 回の反応には RNA 溶出液  $10\mu\text{L}$  を使用し、 $N=3$  で実施した。

#### B-1-(4) 定量 RT-PCR

機器 : Prism7000 sequence detection systems (Applied Biosystems)

定量 RT-PCR キット : QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)

Primer : HE86 及び HE87

Probe : FHE88 (swJB-M8 以外) 又は FHE100 (swJB-M8 用)

使用したプライマー、プローブの配列は Table 2 に示す。

#### 【反応条件】

2xQuantiTect RT-PCR Master Mix	$25\mu\text{L}$
20 $\mu\text{M}$ primer HE86	$1\mu\text{L}$ (400nM)
20 $\mu\text{M}$ primer HE87	$1\mu\text{L}$ (400nM)
10 $\mu\text{M}$ probe	$0.5\mu\text{L}$ (100nM)
QuantiTect RT Mix	$0.5\mu\text{L}$
RNase Free Water	$12\mu\text{L}$
<u>RNA</u>	<u><math>10\mu\text{L}</math></u>
Total	$50\mu\text{L}$

上記の混液について、 $50^{\circ}\text{C}$ 、30 分の逆転写反応と  $95^{\circ}\text{C}$ 、15min の保温後、 $94^{\circ}\text{C}$  15sec と  $60^{\circ}\text{C}$ 、35 sec のサイクル反応を 45 回行い核酸の増幅を行った。

#### B-1-(5) HEV の定量法

パネル候補品は衛研とベネシスの 2 施設で均一性試験を実施し、分注の均一性を確認した。また、各パネルのコピー数は、共同検定に参加した 6 施設 (衛研、ベネシス、感染研、化血研、日本製薬、日本赤



十字社)において、パネル原液から可能な限り統一した方法での抽出、定量を行った。

## B-2-1 細胞のプロテオーム解析

### B-2-1-1 サンプルの前処理

(タンパク質の抽出)

1.5X10<sup>5</sup>個の細胞を50 $\mu$ lの細胞溶解液にて溶解した後、450 $\mu$ lのアセトンを加えてタンパク質を沈殿させ、30 $\mu$ lのRapiGest溶液に溶解した。

(還元アルキル化)

タンパク質溶液30 $\mu$ lに、30 $\mu$ lの10mM DDTを加え、60 $^{\circ}$ C30分間反応させて還元後、室温に戻した後、60 $\mu$ 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 $\mu$ l

(0.25 $\mu$ g/ $\mu$ l)加え、37 $^{\circ}$ Cで一晩消化した。

### B-2-1-2 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 $\mu$ 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-2-1-3 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-2-1-4 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-I-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、ペプチドマスマイ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-I-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-2-II-1 細胞の遺伝的安定性に関する検討

##### B-2-II-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、以前の検討において、異常が認められたロット 4F1560 と同一ロットを使用した。hMSC は、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  
で継代を続けた。細胞継代時に凍結保存して  
おいた細胞、およびそれを1-2世代再培養  
した細胞を使用した。

## B-2-II-2 ゲノム DNA の抽出

次世代シーケンサー解析用のサンプ  
ル調整を行うため、以下の2種類の  
方法を用いてゲノム DNA の抽出を行  
った。

### a. TRIZOL 法

TRIZOL 溶液 (Invitrogen) は主に  
RNA の抽出に用いられるが、タンパク  
およびゲノム DNA も同時に分離抽出  
できる。これらを用いて同一細胞から、  
遺伝子発現 (RNA)、ゲノム情報 (DNA)  
およびプロテオーム (タンパク) に関  
して、統合的なオミックス解析を行  
うことが可能となる。以下の操作手  
順に従って、各細胞成分の抽出を行  
った。

#### (細胞の溶解)

凍結保存細胞  $1-2 \times 10^6$  個を融解し、  
TRIZOL 試薬 1ml を加え混和した。

#### (RNA の抽出)

室温にて5分間放置し、クロロホルム  
0.2ml を加えた。チューブに蓋をして、  
15秒間激しく混合し、室温にて3分  
間放置した。その後、5°Cにて15分  
間、12,000gにて遠心分離した。こ  
の際、暗赤色のフェノール/クロロホル  
ム層、中間層、および無色の上部水層  
に分離した。RNA を含む水層を新し  
いチューブに移し、イソプロピルアル  
コール 0.5ml を加えて RNA を沈殿  
させた。サンプルを室温にて10分間  
放置した後、5°Cにて10分間、12,000g  
にて遠心分離した。

上清を除去し、RNA ペレットを 75%エ

タノール 1ml にて1回洗浄し、5°Cにて  
15分間、7500gにて遠心分離した。RNA  
ペレットを風乾後、RNase free 水に溶解  
した。

#### (DNA の抽出)

上記の中間層の上に残っている水槽を  
完全に除去し、中間層およびフェノール/  
クロロホルム層に 100%エタノール 0.3ml  
を加え転倒混和し、室温で3分間放置  
した。室温にて3分間放置し、DNA を沈  
殿させ、5°Cにて5分間 2,000gにて遠  
心分離した。

タンパクを含むフェノール、エタノール  
含有の上層を新しいチューブに取り分け、  
10%エタノールに 0.1M クエン酸ナトリ  
ウムを加えた溶液 1ml で室温 30分間  
インキュベートし、DNA ペレットを2回  
洗浄した。5°Cにて5分間、2,000g  
にて遠心分離し、沈殿を回収後、75%  
エタノール溶液 1.5ml に懸濁、室温 15  
分放置、5°Cにて5分間、2,000g  
にて遠心分離した。上清を除いて風乾  
した後、8 mM NaOH 50  $\mu$ l に溶解  
した。

#### (タンパクの抽出)

上のフェノール、エタノール含有層に  
1.5 室温で10分間放置し、ml のイソ  
プロピルアルコールを加え、5°Cにて10  
分間、12,000gにて遠心分離し、タン  
パクを沈殿させた。上清を除去し、0.3M  
塩酸グアニジンを含む 95%エタノール  
溶液 2ml を加え。室温にて20分間  
インキュベート、で5°Cにて10分間、  
12,000gにて遠心分離の操作によりペ  
レットを3回洗浄した。その後、ペレ  
ットにエタノール 2ml を加え、ボル  
テックスした後、室温で20分間放置  
し、5°Cにて5分間、7,500gにて遠  
心分離

した。ペレットを遠心濃縮機にて、10分間真空乾燥し、1%SDS溶液を加え、ピペティングにて溶解させた。

#### b. DNA Extractor WB キット

DNA Extractor WB キット(和光純薬工業)は、フェノールやクロロホルムといった有毒な有機溶媒を用いず、ヨウ化ナトリウムとイソプロパノールにて、細胞よりDNAのみを抽出する簡便な方法である。また、核分離を行った後DNAの抽出を行うため、比較的純度の高いDNAを得ることができる。以下の操作にしたがって、細胞よりゲノムDNAを抽出した。

(細胞の溶解と核分離)

- 1) 凍結保存細胞  $1\cdot 2 \times 10^6$  個に溶解液を0.5ml 加えて、チューブを数回転倒混合した。
- 2) 遠心分離 (10K×g, 4°C, 20 秒間) した後、上清を除いた。
- 3) 再び溶解液を1ml 加えて、30 秒間激しく攪拌し、遠心分離 (10K×g, 4°C, 20 秒間) した後、上清を除いた。
- 4) ステップ3)をもう一度繰り返した。  
(核膜の破壊とタンパク変性)
- 5) 酵素反応液 200  $\mu$ l とタンパク質分解酵素 10  $\mu$ l (使用前に酵素 10mg を0.6ml の滅菌蒸留水に溶解) を加えて混合した。
- 6) 37°Cで1時間反応させた。(途中2~3回軽く振り混ぜた)
- 7) よう化ナトリウム溶液を 300  $\mu$ l 加えて混合した。

(DNAの精製)

- 8) イソプロパノールを0.5ml 加えて、白い綿状のDNAが完全に見えるまで混合した。

9) 遠心分離 (10K×g, 室温, 10 分間) した後、上清をゆっくり除き、容器をろ紙の上に逆さに置き、器壁に残った溶液を十分に除いた。

10) 洗浄液Aを1ml 加えて混合し、遠心分離 (10K×g, 室温, 5 分間) した後、上清を除いた。

11) 洗浄液Bを1ml 加えて混合し、遠心分離 (10K×g, 室温, 5 分間) した後、上清を除いた。

12) DNA沈殿を風乾し、TEバッファーに溶解させた。

#### B-2-II-3 次世代シーケンサーを用いたシーケンス解析

解析すべきゲノム配列をある程度絞り込むために、ゲノムDNAをアコースティックソルビライザー(コバリス社)を用いて断片化した後、Agilent社のSureSelect™ Human All Exon Kit V.2を用いて、エクソン部分のDNA配列を濃縮した。イルミナ社の次世代シーケンサー(Illumina Genome Analyzer IIx)を用いて、ペアーエンド法により、断片化したDNAの両端のシーケンスを解析した。2種類の細胞から得られたゲノムDNAにそれぞれ異なる配列のシーケスタグを付加した後、1ウエルに混合して解析することにより、シングルランで細胞あたり約150bpを1.5億リード読んだ。得られたシーケンスデータを専用のソフトウェアにてヒトゲノム上にマッピングし、2つの細胞間における変異配列の検出を行った。

なお、シーケンス解析に関しては、北海道システムサイエンス社に委託した。

### 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) より購入した。Peptide-N-glycosidase F (PNGase F) は, Roche Diagnostics (Mannheim) から購入した。

### B-3-2 細胞培養及び分化誘導

#### B-3-2-1) MSC の培養

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%CO<sub>2</sub>, 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) により細胞を剥離した後、10 cm ディッシュに約  $2 \times 10^5$  の細胞を播種して継代培養を行った。

#### B-3-2-2) 神経様細胞への分化誘導

神経誘導基礎培地は、HyClone AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cell Expansion Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。神経誘導培地は 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、 $2 \times 10^5$  個の MSC を 24 時間培養 (5%CO<sub>2</sub>, 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。培地は 24 時間培養後に一回交換した。

#### B-3-2-3) 骨細胞への分化誘導

骨分化誘導基礎培地は  $\alpha$ -MEM 培地 ( $\alpha$ -Minimum Essential Medium, Invitrogen) に 10% FCS 及び 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine を添加したものをを用いた。骨分化誘導培地は骨分化誘導基礎培地に 5%の StemXVivo Osteogenic Supplement (R&D Systems) を添加したものをを使用した。骨分化誘導基礎培地を用いて MSC をセミコンフルエントまで培養した後、 $4.2 \times 10^3$  cell/cm<sup>2</sup> の濃度で 24 ウェルマイクロプレート (IWAKI) に播種し、50~70% コンフルエントに達するまで培養した (5%CO<sub>2</sub>, 37°C)。骨分化誘導培地に置換した後、21 日間分化誘導培養した。培地交換は 3~4 日間に 1 回の頻度で行った。

### B-3-3 細胞由来タンパク質の調製

培養終了後、細胞を 1% のプロテアーゼインヒビター (protease inhibitor mix DMSO solution, Sigma) を添加した PBS (pH 7.2, 日水製薬) を用いて 3 回洗浄した後、Cell Lifter (Corning) を用いて回収した。洗浄済み細胞 ( $2 \sim 4 \times 10^5$  個) を、1%のプロテアーゼインヒビターを添加した RIPA 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  $\times$ 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) 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-3-4 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  $\mu$ g) を 50  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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、システイン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-3-5 糖鎖の切り出し

回収した還元アルキル化タンパク質 (50  $\mu$ g) を 200  $\mu$ l 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  $\times$ 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、細胞ごとに 3 種類ずつ調製した。

### B-3-6 還元化糖鎖の調製

乾燥糖鎖試料を 500  $\mu$ l の 0.5 M NaBH<sub>4</sub> 溶液を加えて、糖鎖を溶解させた後、室温で 16 時間還元した。反応溶液を中和した後、還元化糖鎖の回収は、グラファイトカ

ーボン樹脂を固定相とした ENVI Carb C カートリッジ (Supelco) を用いて行った。カートリッジは 1 ml の 100% アセトニトリル、50% アセトニトリル及び H<sub>2</sub>O で、それぞれ 2 回ずつ洗浄した。試料溶液を注入して、糖鎖を樹脂に吸着させた。1 ml の H<sub>2</sub>O で樹脂を洗浄した後、1.5 ml の 45% アセトニトリル溶液で糖鎖を溶出させた。得られた溶液の Speed Vac 及び凍結乾燥により還元化糖鎖試料を調製した。

### B-3-7 LC/MS

nanoLC は Paradigm MS4 (Michrom BioResources) を使用した。溶離液は 2% アセトニトリルを含む 5mM 重炭酸アンモニウム溶液 (A 溶媒) 及び 80% アセトニトリルを含む 5mM 重炭酸アンモニウム溶液 (B 溶媒) を使用した。流速は 750 nl に設定した。質量分析 (MS) 装置は ナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源 (AMR) 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及びネガティブイオンモードでデータを取得した。尚、分析に使用したカラム、グラジュエント条件、シングル MS 及び多段階 MS (MS $\sim$ MS/MS/MS/MS) 測定条件は、以下の通りであった。

カラム：グラファイトカーボンカラム (HyperCarb, 0.1 $\times$ 150 mm, 粒子径 5 $\mu$ m, Thermo Fisher Scientific)

トラップカラム：グラファイトカーボ

ンカラム (HyperCarb, 0.3×5.0 mm, 粒子径 7 μm, Thermo Fisher Scientific)

グラジュエント条件：5–60%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/MS~MS/MS/MS/MS 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：200°C

スプレー電圧：2.5kV

MS/MS~MS/MS/MS/MS の衝突エネルギー (コリジョンエネルギー)：25%

### B-3-8 主成分解析 (PCA)

LC/MS 解析により得られ各糖鎖のピーク面積データを用いて、多変量解析ソフト Simca-P+ (Umetrics) により、第 2 主成分まで計算して PCA を行った。尚、ポジティブイオンモードで測定した LC/MS では NeuNAc が付加した高分岐複合型糖鎖の検出が困難であったことから、ネガティブイオンモードで測定したデータを用いた。

### B-4-1 マウスへの Ad ベクター投与ならびに血漿サイトカイン濃度測定

C57BL/6 ♀マウスの尾静脈内に、1 匹あたり  $5 \times 10^{10}$  VP (vector particles) の Ad-CXCL12、または  $1 \times 10^9$  ifu (infectious unit) の Ad-VEGF を投与した。血漿中のサイトカイン濃度は Quantikine ELISA キット (R&D Systems 社) を用いて測定した。

### B-4-2 表面抗原の解析

各組織の生細胞数は NucleoCounter

(ChemoMetec 社) を用いて測定した。

その後、fluorescein isothiocyanate (FITC)、phycoerythrin (PE)、allophycocyanin (APC)、PE-Cy7、Biotin で標識した各抗体と反応させた。用いた抗体は、抗 B220 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 Gr-1 抗体、抗 CD3 抗体、抗 Ter119 抗体、抗 Sca-1 抗体、抗 c-kit 抗体、抗 CXCR4 抗体、抗 CD34 抗体、抗 Flt-1 抗体 であり、eBiosciences 社、BD Bioscience 社、R&D Systems 社より入手した。また、2 次抗体として PerCP-Cy5.5 標識ストレプトアビジン (eBioscience 社) を使用した。染色した細胞のうち、7-amino actinomycin D (eBioscience) 陽性の死細胞を解析から除去して、LSRFortessa (BD Bioscience 社) にて解析した。

### B-4-3 骨髄細胞の移植

C57BL/6 ♀マウス (8 週) の尾静脈内に、1 匹あたり  $5 \times 10^{10}$  VP の Ad-CXCL12、または Ad-Luc を投与した。5 日後に GFP (green fluorescent protein) トランスジェニックマウスの骨髄細胞を回収し、1 匹あたり  $1 \times 10^7$  個の細胞を Ad-CXCL12 または Ad-Luc 投与マウスの尾静脈から投与した。移植の 5 ヶ月後に骨髄細胞を回収し、GFP 発現細胞をフローサイトメーターにて解析することにより移植効率を評価した。

### B-4-4 *In vitro* コロニーアッセイ

各種細胞をコロニーアッセイ用培地 Methocult (M3434, Stem cell technologies

社)に播種した。なお、末梢血  $1 \times 10^6$  cells/mL、骨髓細胞および ES 細胞由来もしくは iPS 細胞由来血液細胞は  $4 \times 10^4$  cells/mL の濃度で播種した。細胞播種 14 日後、顕微鏡下でコロニーを計測した。

#### **B-4-5 Ad ベクターの作製**

HoxB4 発現 Ad ベクターの作製は improved in vitro ligation 法により行った。Chicken  $\beta$ -actin プロモーターと Cytomegarovirus (CMV) エンハンサーのハイブリッドプロモーターである CA プロモーターを含むシャトルプラスミド pHMCA5 のマルチクローニングサイトに ヒト HoxB4 cDNA を挿入し pHMCA-HoxB4 を作製した。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、HoxB4 発現ベクタープラスミド pAd-HoxB4 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 HoxB4 発現 Ad ベクター、Ad-HoxB4 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、生物学的力価は AdenoX Rapid Titer Kit (Clontech 社)を用いて測定した。

#### **B-4-6 マウス ES 細胞およびマウス iPS**

#### **細胞の培養**

E14 マウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞は leukemia inhibitory factor (LIF) 含有培地 (Millipore 社)にてマイトマイシン C 処理をした mouse embryonic fibroblast (MEF; Millipore 社)上で培養した。なお、マウス iPS 細胞 38C2 は京都大学山中伸弥教授から供与していただいた。

#### **B-4-7 血液細胞への分化誘導**

Lipidure コート 96well プレート (ヌンク社)でマウス ES 細胞またはマウス iPS 細胞を培養することにより、胚様体 (Embryoid body; EB) を形成させた。トリプシンで単細胞に解離した後に、Ad-HoxB4 または LacZ 発現 Ad ベクター、Ad-LacZ を  $3,000$  VP/cell の濃度で作用させた。Ad ベクターの作用後に OP9 細胞に播種し、サイトカイン含有培地 (SCF  $50$ ng/mL, Flt-3L  $50$ ng/mL, TPO  $10$ ng/mL, IL-3  $5$ ng/mL, IL-6  $5$ ng/mL、全て Peprotech 社から購入) 中にて血液細胞を誘導した。

#### **B-5-1 虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞の遺伝子発現変化**

##### **B-5-1-1 使用細胞および細胞培養**

骨髓由来 hMSC は、Lonza 社より入手した。各ロットの年齢・性別・人種に関する情報は Table 9 の通り。

虚血条件下における hMSC の血管新生関連遺伝子発現変化を検討する目的で、hMSC (継代数 9 (PS#9)) を  $1 \times 10^4$  cells/well となるよう 96 穴細胞培養プレート上に撒き、MSCBM [Lonza] に



MSCGM SingleQuots [Lonza] を加えて調整した基本培地中で 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 80%コンフルエントになるまで培養した。その後、培養した上記の 96 穴細胞培養プレートを、コントロール群および虚血群に分け、Table 10 に示す通常条件または擬似的虚血条件においてさらに 24 時間培養し、Total RNA を抽出した。6 つのロット (A, B, C, F, G, H) について、同様の実験を行った。

#### **B-5-1-2 培養細胞からの Total RNA の抽出**

培養細胞からの Total RNA の抽出は、MagAttract RNA Cell Mini M48 Kit [ QIAGEN ]、BioRobot M48 Workstation [ QIAGEN ] を使用し、QIAGEN 社のマニュアルに従って行った。RNA サンプル濃度は 260nm の吸光度を測定することで評価し、260nm の吸光度と 280nm の吸光度の比が 1.6 以上であることを指標に純度を確認した。吸光度測定は NanoDrop ND-1000 [Thermo] を用いて行った。抽出した RNA サンプルは -80°C にて冷凍保存した。

#### **B-5-1-3 虚血後における血管新生関連遺伝子発現量の測定**

血管新生関連遺伝子発現量を網羅的に解析するために、RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Angiogenic Growth Factors & Angiogenesis Inhibitors [SA Biosciences, cat# PAHS-072] を用いた。測定した遺伝子は Table 11 の通りである。

各ロットについて RNeasy Mini Kit [QIAGEN] を用いてサンプルを濃縮し、

Total RNA が 1µg/10µL となるよう調整した後、SA Biosciences 社のマニュアルに従い、各 RNA サンプルから cDNA を合成した。

次いで、合成した cDNA を用いて同マニュアルに従い溶液を調整後、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System [ Applied Biosystems ] にて RT-PCR を行い、各サイクルについてリアルタイムでモニターした。サーマルサイクラーの条件設定は Table 12 の通りである。

クオリティーコントロールとして、上記のサイクリングプログラム後すぐに融解曲線プログラムを実行し、プレート上の各ウェルの PCR 産物に対して融解曲線を作成した。融解曲線の温度微分曲線において、80°C 以上に出現するピークが 1 つだけであることを指標に PCR 産物の特異性を確認した。

検出された PCR シグナルからベースラインを設定し、これをもとに PCR 産物の増幅が指数関数的に起こる領域でシグナルの閾値を設定した。シグナルの閾値に到達するサイクル数 (Ct : Threshold Cycle) を算出し、Ct 値 > 35 の遺伝子については発現がないものとみなした。各遺伝子の mRNA 発現量を補正するための内部標準としては  $\beta$ -actin,  $\beta$ 2-microglobulin、Hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1, Ribosomal protein L13a の発現量を測定した。データの正規化には、RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis [SA Biosciences, <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>] を使用した。

#### **B-5-1-4 統計解析**

統計ソフトウェア Sigma Stat [SYSTAT Software] または Microsoft Excel [Microsoft] を用いて、コントロール群および虚血群に対する Paired t-test により検定を行い、有意水準を危険率 1%未満 ( $p < 0.01$ ) として評価した。RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array は多変量解析 (multivariate index assay) の一種と考えられ、84 種の因子についての検定を同時に行う。そこで、期待擬陽性数を下げる目的で、有意水準は一般的な「危険率 5% 未満 ( $p < 0.05$ )」よりも厳密にした。

#### **B-5-2 虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞の血管新生関連サイトカイン分泌変化**

##### **B-5-2-1 使用細胞および細胞培養**

虚血条件下における hMSC の血管新生関連サイトカイン分泌変化を検討する目的で、B-1-1 と同様に hMSC (PS#9) を 96 穴細胞培養プレート上で培養後、さらに通常条件または擬似的虚血条件下で 24 時間培養し、培養上清を回収した。回収した上清サンプルは  $-80^{\circ}\text{C}$  にて冷凍保存した。

##### **B-5-2-2 虚血後における血管新生関連サイトカイン分泌量の測定**

虚血後において遺伝子発現に有意な上昇が見られた 5 種類のサイトカインについて、実際の分泌量およびその変化率を検討するために、Quantikine ELISA Kit [R&D] を用いて B-1-1 で回収した培養上清中の VEGF 濃度を測定した。測定は、R&D 社のマニュアルに従って行った。使

用した ELISA Kit は Table 13 の通りである。

##### **B-5-2-3 統計解析**

群間の差に対する統計学的検定は、統計ソフトウェア Sigma Stat [SYSTAT Software] または Microsoft Excel [Microsoft] により行った。

血管新生関連サイトカインの濃度データについては Two-way ANOVA を行い、有意差が認められた場合には、多群比較の post-hoc test として Student-Newman-Keul test を行った。

血管新生関連サイトカインの濃度変化率は、虚血群の濃度とコントロール群の濃度という 2 つの独立変数の比である。すなわち、各濃度の対数を新たな独立変数とすれば、濃度変化率の対数はこれら 2 つの新しい独立変数の差で表わされる。一般に、2 つの独立変数の差の平均値は各独立変数の平均値の差として求められる。また、2 つの独立変数の差の標準偏差は、各独立変数の標準偏差の平方和の平方根として求められ、2 つの独立変数の差の自由度は各独立変数の自由度 (標本数 - 1) の和となる。これらをもとに、One-way ANOVA を行うことにより、血管新生関連因子の濃度変化率のロット間の差を評価した。有意水準は危険率 5% 未満 ( $p < 0.05$ ) とした。

##### **B-5-3 虚血後における hMSC の VEGF 分泌能と関連する遺伝子の探索**

##### **B-5-3-1 虚血前遺伝子発現量と虚血後 VEGF 分泌の相関関係の評価**

虚血後において有意なロット差が認められた VEGF 分泌に対して、VEGF 分泌

能を予測する因子となり得る遺伝子を探  
索するために、6 ロットの hMSC にお  
ける虚血前の遺伝子発現量と虚血後の  
VEGF 分泌について相関関係を検討した。

虚血前の遺伝子発現量は、本研究で用  
いた 6 ロットの hMSC (PS#7 および PS#9)  
と GeneChip HG-U133Plus2.0  
[Affymetrix (54,613 Probe Sets, 41,080  
Reference Sequence Transcripts)] を用  
いて筆者の所属する研究室で過去に測定  
されたデータを利用した。このデータは  
hMSC の Total RNA から Affymetrix 社の  
Two-cycle プロトコルならびにハイブ  
リダイゼーションの定法に従って遺伝子  
発現シグナルを取得し、これを GCOS ソ  
フトウェア [Affymetrix] を用いて解析し  
たものである。現在、データは米国  
National Center for Biotechnology  
Information (NCBI) のデータベースであ  
る Gene Expression Omnibus (GEO,  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) に登  
録されている (Series# GSE7637,  
Sample# GSM184654-GSM184665)。な  
お、データの正規化には内部標準 Probe  
Set リストである MSK ファイル  
[Affymetrix] を用い、目標強度 (target  
intensity) は 10,000 としてある。この  
GeneChip データに次に示すフィルター  
をかけ、虚血後の VEGF 分泌量または変  
化率と相関のある遺伝子を抽出した。こ  
こで抽出された遺伝子を、便宜上 VEGF 分  
泌能予測候補遺伝子 (VSR 遺伝子: VEGF  
Secretion Related Candidate Gene) と名  
づけた。

・フィルター①

GeneChip HG-U133Plus2.0 における

各 Probe Set のシグナルは Absolute  
Analysis (発現の有無を判定する解析) の  
結果、「発現があるもの: P (Present)」、  
「発現があるかわからないもの: M  
(Marginal)」あるいは「発現がないもの:  
A (Absent)」として判定がなされる。6 ロ  
ットのうち半数以上 (つまり 3 ロット以  
上) で P と判定された Probe Set につ  
いては、hMSC においてその Probe Set が  
コードする遺伝子が発現していると判断  
した。逆に 6 ロットのうち P 判定された  
ものが 2 ロット以下の場合は、hMSC に  
おいてその Probe Set がコードする遺伝  
子の発現はないと判断した。

発現が見られる Probe Set については  
次のフィルターをかけ、発現が見られない  
Probe Set は棄却した。

・フィルター②

細胞特性指標の大切な要件の一つにシ  
グナル/ノイズ比が大きいことが挙げら  
れる。逆に細胞特性指標候補のロット間  
のばらつきが小さいことは、シグナル/ノ  
イズ比が低くなることを意味することか  
ら避けるべきと考えられる。そこで、発  
現量データのロット間のばらつきが十分  
に大きい遺伝子を抽出する目的で、各  
ロットにおける発現量 (シグナル) の平  
均値の最低値と最高値の比が 3.0 倍  
以上ある Probe Set については次の  
フィルターをかけ、差が 3.0 倍より小  
さいものは棄却した。

・フィルター③

PS#7 または PS#9 における各 Probe  
Set の発現量と、治療効果をより直  
接的に反映すると考えられる PS#9 の  
hMSC に

における虚血後の VEGF 分泌量または変化率との間でスピアマンの順位相関係数を算出した。有意水準は危険率 1%未満 ( $p < 0.01$ ) で評価し、以下 4 つの組み合わせ全てにおいて有意な正の相関がある Probe Set を抽出した。

- ① PS#9 における遺伝子発現量 vs. PS#9 での虚血時の VEGF 分泌量
- ② PS#9 における遺伝子発現量 vs. PS#9 での虚血による VEGF 分泌変化率
- ③ PS#7 における遺伝子発現量 vs. PS#9 での虚血時の VEGF 分泌量
- ④ PS#7 における遺伝子発現量 vs. PS#9 での虚血による VEGF 分泌変化率

スピアマンの順位相関係数および有意確率 ( $p$  値) の算出は、群馬大学社会情報学部・青木繁伸「統計学自習ノート」の「スピアマンの順位相関係数」の項 <http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/lecture/Soukan/spearman.html> に基づき、Microsoft Excel [Microsoft] を用いて行った。

また、虚血後の VEGF 分泌におけるロット差が、単なる細胞数の増加によるものではないことを確認するために、CyQUNANT Cell Proliferation Assay Kit [Invitrogen] を用いて、虚血 24 時間後の hMSC の生存率 (= 虚血群の細胞数/コントロール群の細胞数 = 虚血抵抗性) を測定し、同様に各 Probe Set の発現量との間のスピアマンの順位相関係数を算出し、 $p < 0.01$  で評価した。

### **B-5-3-2 統計解析**

群間の差に対する統計学的検定は、統計ソフトウェア Sigma Stat [SYSTAT Software] または Microsoft Excel [Microsoft] により行った。

### **B-6-1) 試薬**

VEGF は Strathmann Biotec 社より、IL-8 は Strathmann Biotec 社より、AC133 細胞、CD14 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、抗マウス CD31 抗体-FITC は BD Biosciences PharMingen 社より購入した。抗 CD14 抗体-FITC は、Dako Cytomation 社から購入した。抗 VEGFR-2 (Flk-1/KDR) 抗体、抗 p110 PI3K $\beta$  抗体、抗 p110 PI3K $\delta$  抗体は Santa Cruz Biotechnology, Inc. より購入した。抗 p110 PI3K $\alpha$  抗体は Cell Signaling Technology より購入した。抗 IL-8 受容体抗体は R&G System 社より得た。抗オクルディン抗体は Sigma 社より購入した。p110 PI3K $\alpha$  の阻害剤である PI-103 は Calbiochem 社より購入した。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。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)、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。