

B-6-2) 単核球の分離

インフォームドコンセントを得て採取された臍帯血は、東京赤十字血液センター、臍帯血バンクより提供された。献血用に採取された血液（液量不足等による規格外品）は、埼玉赤十字血液センターより提供された。

血液サンプルは、2mM の EDTA を含むリン酸緩衝食塩水 (PBS) で希釈してリンフォプレップチューブ (Axis-Shield PoC AS) (密度= 1.077) に添加した。800g、18°C、20 分の遠心により、単核球を集めた。細胞を磁気ビーズで標識する場合は、分画用溶液 {2mM の EDTA、0.5% のウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS} で洗浄した。

B-6-3) AC133 陽性あるいは CD14 陽性細胞の分離

臍帯血あるいは末梢血 AC133 陽性細胞は、Indirect CD133 マイクロビーズ分離キット、CD14 マイクロビーズ分離キットを用い Auto MACS (Milteny Biotec) で分離した。

AC133 陽性細胞は 20% FCS、50 ng/ml VEGF、50 ng/ml TPO、を含む EBM-2 培地に浮遊させ 5 日間、IV型コラーゲンコートディッシュ上で培養した。細胞を全て回収し、EGM-2 培地に懸濁し、FN コートディッシュ上で 24 時間培養し接着した細胞を AC133 陽性細胞由来 early EPC として解析した。CD14 陽性細胞は IL-8 に対する遊走実験に用いた。

B-6-4) 単核球由来 early EPC の誘導

リンフォプレップチューブにより分離

した単核球を EGM-2 培地に懸濁し、FN コート 6 穴プレートにおよそ $1\sim 2 \times 10^7$ cells/well 播種した。約 1 週間培養後、プレート上に接着した細胞を単核球由来 early EPC とした。

B-6-5) 単核球由来 late EPC の誘導

臍帯血から調製した単核球を培地 EGM-2 に懸濁し、FN コート 6 穴プレートに播種した。播種細胞数は、 1×10^7 cells/well 程度とし、1 週間に 2 回、培地交換し、2~3 週間後に出現する敷石上でコロニーを形成する増殖能の高い細胞を late EPC とした。

B-6-6) フローサイトメーターによる解析

Early EPC は培養プレートから非酵素的に剥離・回収した。洗浄後、抗 CD31 抗体-FITC、抗 CD14 抗体-FITC、抗 CD14 抗体-FITC、抗 IL-8 抗体で免疫染色した。なお、全ての細胞は対照用抗体で染色し、非特異的な反応でないことを確認した。染色した細胞の蛍光強度は FACS Calibur (Becton Dickinson) で解析した。

B-6-7) Late EPC の特性指標の探索

Late EPC および HUVEC の RNA を、RNeasy (QIAGEN) を用いて回収した。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-6-8) 各種細胞の遊走

IL-8 や VEGF に対する各種細胞の遊走は改良型ボイデンチャンバー法を用いて解析した。メンブランフィルターはポアサイズが $8 \mu\text{m}$ のものを用いた。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 2×10^4 cells/50 μl /well になるように上室に播種した。下室には種々の濃度の IL-8, 10 ng/ml VEGF を含む 2% FBS-EBM-2 を 30 μl /well 加え、37°C の CO₂ インキュベーターに 3 時間静置した。遊走した細胞は固定・染色し、顕微鏡下で計測した。

PI3K 阻害剤 wortmannin (100 nM)、p110 PI3K α 阻害剤、PI-103 (250 nM) を用いる際には、15 分細胞に前処理し、さらに阻害剤をチャンバーの上室及び下室の両方に加えた。

B-6-9) PI3K アイソフォームとオクルディンのウェスタンブロットティング

種々の細胞は回収後 lysis buffer に溶解した。電気泳動用サンプルバッファーを加え、電気泳動後ウェスタンブロットを行った。抗 PI3K アイソフォーム抗体及び抗オクルディン抗体ブロット後、抗アクチン抗体を細胞内スタンダードとして用いた。

B-6-10) マトリゲルを用いた *in vitro*, *in vivo* 管腔形成アッセイ

In vitro; マトリゲルを氷上で融解し、48 穴プレートに 200 μl /well 添加した。37°C、CO₂ インキュベーター中に 30 分静置しゲル化させた。種々の late EPC はトリプシンを用いて回収し、2% FBS-EBM-2 に懸濁し、 5×10^4 cells/0.5 ml/well になるようゲル化したマトリゲル上に播種した。37°C、CO₂ インキュベーターで一晩培養した。形成された管腔の写真有位相差顕微鏡 Axiovert2000 で撮影し、顕微鏡画像解析ソフト AxioVision を用いて管腔の長さを定量化した。

In vivo; 6 週令のヌードマウスに early EPC を 5×10^5 cells/0.5 ml になるようにマトリゲルに懸濁し、マウスの皮下に移植した。皮下、マウスの体温でゲル化したマトリゲルを 2 週間後に採り出し、凍結超薄切片を作製し、抗マウス CD31 抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡で解析した。

B-6-11) PI3K δ 及びオクルディンの siRNA

PI3K δ の siRNA はセンダイウイルスベクター(Ishihara Sangyo 社)を用い、early EPC に導入した。以下 3 種類の配列を混合して用いた; UCU UAA AGA UGA UGC CCA CGC UGC C, UCA UGA UGU UGU CGC UGU GCC GAU C, UUC AGC AGC UCG CCC UUC UCA UCU G。オクルディンの siRNA は LipofectamineTM RNAiMAX (Invitrogen)を用いて late EPC に導入した。2 種類の以下の配列をそれぞれ別個に用いた; GGUUCUGGUGUGAACUAAAtt (#1)、CCUUUAGGAGGUAGUGUAAtt (#2)。

B-6-12) 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 回繰り返して、代表的なデータを示した。

B-7-1 細胞総糖タンパク質分画の調製

ヒト培養癌細胞を 1 M EDTA を含む PBS (50 μ L) 中に懸濁し、2 M Thiourea および 5 M Urea 水溶液 (267 μ L)、1 M DTT (16.7 μ L) および Benzonase 溶液 (125 units) を加え室温で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、12000 g、15 分間遠心分離後の上清を回収した。回収した上清に 5% 酢酸、5% 水、5% トリエチルアミンを含むアセトン溶液を加え、-20°C で 30 分間タンパク質を沈殿させたのち、12000 g、15 分間遠心分離した。得られた沈殿に 75% エタノールを加え、12000 g、15 分間遠心分離後の沈殿を細胞総タンパク質として糖鎖分析に用いた。

B-7-2 O-結合型糖鎖を含む糖ペプチド分画の調製

細胞総タンパク質の凍結乾燥物を 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0、0.2 ml) に懸濁し、プロナーゼ (50 μ g) を加え 37 °C で 24 時間反応した。反応後、反応液を沸騰水浴中で 10 分間煮沸し、遠心分離後の上清に 2M NaBH₄ (500 μ L) を加え、室温で 30 分間インキュベートした。反応液に氷酢酸を注意深く滴下し限外ろ過フィルター (MWCO 5000) を用いて脱塩し、フィルター上部を O-結合型糖ペプチド分画として回収した。

B-7-3 高速糖鎖自動切断装置による O-結合型糖鎖の遊離と蛍光標識

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 45°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。上記操作により遊離されたムチン型糖鎖の凍結乾燥物に 2AA 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°C で 1 時間加温した。反応後 Sephadex LH-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 °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させ、その後 10 分間、溶出液 B を 1M NaCl としグリコサミノグリカン型糖鎖を溶出させた。ムチン型糖鎖の各分画は減圧濃縮乾固した。一方、グリコサミノグリカン型糖鎖は透析

(1000 Da cut)を用いて脱塩し、減圧濃縮乾燥した。

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 グリコサミノグリカン鎖不飽和二糖の調製と蛍光標識

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グリコサミノグリカン分画は酵素消化により不飽和二糖に分解した。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。ヘパリン/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。両酵素反応物は、沸騰水浴上で 5 分間煮沸した後、15000 xg で 5 分間遠心分離し、上清を減圧濃縮乾燥した。上記操作により遊離されたグリコサミノグリカン鎖不飽和二糖の凍

結乾燥物に 2AA 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 μl) を加えて 80°C で 1 時間加温した。反応後 Sephadex LH-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た。

B-7-7 キャピラリー電気泳動によるグリコサミノグリカン鎖不飽和二糖の分析

装置には 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 とし電気泳動を行った。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

動物実験を行う際には、動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施した。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試料を採取するとともに、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-1-1 HEV パネルの希釈系列における HEV 均一性試験

5種類のパネルのうち4種類はHEV感染SPFブタから抽出したものでありウイルス凝集の可能性が考えられた。そこで、標準パネルの定量を行う前に、低濃度下でもウイルスの分散が均一であるかどうかを確認するため、希釈系列における均一性試験を実施した。HEVパネルのうち、swJB-H7についてヒトACD血漿を用いて10倍、100倍、1000倍、10000倍の希釈液を調製した。HEV原液及び希釈列からの溶出液について定量RT-PCRで測定した。また、原液から抽出した1本よりTEを用いてRNAの10倍希釈列を作成し、これを同時に定量RT-PCRで測定して比較した。その結果、定量PCRでの検量線となるHEV希釈列とCtをプロットすると検量線がほぼ直線にのることが確認された(Fig. 1)。予備的検討でもswJR-P5、swJB-E10、swJB-E10cul、swJB-M8について均一性試験を実施し、ウイルスはほぼ分散していることを確認した。これらの結果より、ウイルスパネルの均一性が確認され、ウイルス希釈列を用いても定量性に問題はないものと考えられた。

C-1-2 HEV標準パネルのコピー数設定

HEVパネル候補品について、共同検定に参加した6施設において定量を行い、各パネルのコピー数を算出した。HEVはheterogeneityが高く、参加施設数も少ないため、共同検定では可能な限り統一したプロトコールに従って行うこととした。ウイルス核酸の抽出は、ブタ糞便由来でRNase等のRT-PCRを阻害する不純物が多く含まれると想定されるため、カラム法が適していることから、カラム法の同一キ

ットを採用することとした。また、RT-PCRのキット、検出に用いるプライマー、プローブもすべての機関で統一した。RT-PCRに用いた機器は施設により異なり、ABI 7500が2施設、ABI 7500fast、ABI 7900、ABI 7000、Roche LightCyclerが各1施設であった。使用機器及び施設により、RT-PCRの反応系の容量やプライマー、テンプレートの量などは適宜変更した。

各共同検定参加施設では、パネル3セットについて日を変えて核酸抽出とリアルタイムRT-PCRを行うことにより定量を実施した(Log copies/mlをN=3で算出)結果をTable 3にまとめた。全6施設の平均値を求めたところ、どのパネルメンバーにおいてもSDが0.5以上と非常にばらつきが大きくなった(Table 4)。特に、6施設のうち1施設のデータが値のばらつきが大きく、また他施設よりも定量値がかなり低い傾向が認められたことから、測定系になんらかの問題があることが考えられた。そこでこの1施設を除いた5施設の平均値を求めたところ、参考値に近い値となりSDも0.5以内となった。そこで、この5施設平均値をパネルのコピー数として設定した(Table 4)。

C-1-3 HEV標準パネルの検出限界

HEV標準パネルの定量に用いた検出法による標準パネルの検出限界について検討を行った。各パネルについてヒト陰性血漿を用いて1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000の4段階に希釈後、ウイルス核酸を抽出し、リアルタイム定量PCRにより測定した。各パネルの希釈による計算値と実測値を

Table 5 に示す。NAT ガイドラインによると、「95%の確率で検出される検体一定量当たりのウイルス遺伝子の際定量である陽性カットオフ値を検出感度として設定する。」とあり、十分な回数の試験を繰り返して求める必要がある。N=3 で実施した今回のデータからは厳密な検出限界を算出することはできないが、2/3 以上が検出される条件を考慮すると、10~20 copies/reaction 程度まで検出可能と考えられた。

C-2-I 細胞のプロテオーム解析

C-2-I-1 hMSC 特異的 CD 分子種の検出と同定

昨年度までの検討により、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 Linear Iontrap-FT(Orbitrap)型の LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher)を用いたプロテオーム解析の検討を行い、本装置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り、ナノ LC とノ組み合わせによる高感度ショットガンプロテオーム解析の手法を確立した。

これを用いて、hMSC にて発現するタンパク質を網羅的に検索した結果、ペプチド数として2万以上のピークを検出でき、MS/MS 測定結果を用いた MASCOT データベース検索により、5000 個を超えるペプチドが同定でき、1000 個以上のタンパク質を検出することができた。これらの中には、hMSC 特異的膜抗原とされる10個のCD分子種 (CD13, CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD107a, CD107b, CD166) 由来のペプチドが含まれていた

(Fig. 3)。複数のペプチドが同定された場合には、シグナル強度の強いものを選択し、定量分析を行うための指標とした。これらペプチドのアミノ酸配列を Table 6 に示す。

C-2-I-2 安定同位体ラベルペプチドの合成

得られた CD 分子種の指標となるペプチドを質量分析装置で同時定量するために、得られたペプチドの配列情報を元に、内部標準として添加するための安定同位体導入ペプチドを合成した。安定同位体は、ペプチドシーケンス中の1箇所のアミノ酸を ^{13}C および ^{15}N で標識し、元のペプチドと比較して5-10質量数の重いペプチド (Heavy peptide) を作成した。

C-2-I-3 安定同位体ラベルペプチド混合物の LC-MS による分析

こうして合成したペプチドを一定量混合し、ラベル CDmix を作成した。この一部を取り、通常に分析を行う条件で LC-MS 分析を行った結果、Fig. 4 に示す Elution profile が得られた。これは、オリジナルなペプチドの溶出位置とほぼ一致するとともに、マスにて測定された質量数も、安定同位体を含む理論値と一致した。

これらペプチドは、価数+2 価または+3 価のピークとして観察され、オリジナルのペプチドよりも m/z 値として2.5-4高質量側にシフトした位置に観察された。各ペプチドは当モル数混合したが、それぞれのピーク強度は必ずしも同じとはならなかった。

C-2-I-4 hMSC サンプルを用いた CD 分子種の定量

次にモデルサンプルを用いて、CD 分子種を低了するための条件検討を行った。hMSC より調製したタンパクのトリプシン消化物に対して、作成した同位体ラベル CDmix を量を変えながら添加し、ピーク強度の比較を行い、43ng の細胞由来ペプチドに 0.8ng のラベル CDmix を添加した際に、Fig. 5 に示すような良好な結果が得られた。

ここでは、CD44 の例を示したが、いずれの CD 種に対しても、安定同位体ラベルペプチドと同じリテンションタイムに、対応する非ラベルペプチドのピークが観察されたことから、Mascot 検索にて同定したペプチドが確かに目的とする CD 分子種由来であることが証明された。

次に、観察された多価ピークのうち最も強度の強いものを選び(2 価または 3 価)、Progenesis ソフトウェアによるピーク解析により、ペプチドピークのピーク面積を算出した(Table 7、abundance)。

そして、サンプル中の非ラベルペプチドのピーク強度と、ラベル CDmix における対応するピークの強度との比の値から、サンプル中に含まれる各 CD 分子種の量を算出した。なお、ピークが小さく Progenesis にて自動認識できなかった CD71 と 90 に関しては、Xcalbar ソフトウェアにより算出される raw data でのピークの高さを指標とした。

こうして、hMSC サンプルに含まれる 10 種の CD 分子種の質量分析を用いた一斉定量が可能となった。この手法は、骨髄由来間葉系幹細胞のキャラクタリゼーシ

ョンに有効であるとともに、同様の手法は ES 細胞や iPS 細胞など、他の幹細胞のキャラクタリゼーションにも有効であると考えられる。

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ーの検索を行ない、細胞の品質評価へと応用したい。

さらに、より定量性の高い手法として期待される MRM (Multiple Reaction Monitoring)の手法を用いた、タンデム型質量分析装置による 定量分析法の確立をはかり、細胞の品質評価手法として普及を図りたい。

C-2-II 細胞の遺伝的安定性に関する検討

我々は昨年までに検討において、hMSC の 1 ロット (4F1560) にゲノムコピー数異常を伴う染色体異常が起きていることを見出し、この異常が細胞購入時より微量に存在したことを証明した。この結果は、幹細胞の樹立時、もしくはドナーの体内にて異常細胞が生じたことを意味しており、注目される。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)によっても報告されている。

同様の報告が、iPS 細胞に関しても最近 Nature 誌に報告され、細胞樹立時のゲノム不安定性に関して警鐘がなされた。そこで、我々の hMSC でのデータの比較という意味でも、これらの公表論文データの調査研究を行った。

C-2-II-1 iPS 細胞のゲノム不安定性に関する報告

(ゲノムコピー数変化)

Hussein SM, et al.,

Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency.

Nature. 471: 58-62. (2011)

体細胞のリプログラミングにより iPS 細胞を作成する際、ゲノムの性状がどの程度安定であり、元の細胞と同一であるかは重要な問題である。本論文ではコピー数多型 (CNV) という観点から、SNP アレイを用いたゲノムワイドな解析を行い、iPS 細胞の樹立および培養過程での変化を、ES 細胞や体細胞と比較している。その結果、培養初期の iPS 細胞では、培養中期の iPS 細胞や ES 細胞、繊維芽細胞などに比べて、多くの CNV を持つことがわかった。iPS 細胞においてはその樹立や初期培養の過程において新規の CNV が発生しやすく、多くの CNV がモザイクで存在する状態にあり、これらの多くは細胞の増殖に不利に働くため、さらに培養を続ける過程で消失していくが、その中で増殖に有利に働く変異が選択されてくると考えられる。

我々が hMSC で観察したゲノム異常も、最初は de novo に起きた変異であり、その存在量はわずかであったが、おそらく増殖に有利な変化であったため、培養環境下での選択圧により増加したという点で、まったく同じ経緯をたどったと考えられる。すなわち、幹細胞の樹立や、その後の培養過程自体が、増殖性を持つ細胞を選択する圧力として働き、ゲノム変化をもった細胞集団を拡大させる危険性を持つということ

を意味する。現状では、CNV の検出はゲノムワイドには個別の細胞で検出が難しいため、培養による選択圧を与えた後にチェックをする必要があると考えられる。

(DNA シークエンス変化)

Gore A, et al.,

Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells.

Nature. 471: 63-7. (2011)

iPS 細胞は、シークエンスレベルでどの程度の突然変異を蓄積しており、それが癌化等の異常として、治療用の細胞の性状に影響を与えるかは重要な課題である。近年の DNA シークエンサーの飛躍的な進歩に伴い、いわゆる次世代シークエンサーを使ってゲノムワイドに塩基配列を解析することが可能となってきた。そこで、本論文では、5つの異なる方法により樹立された 22 のヒト iPS 細胞株を用いて、コーディング領域の網羅的シークエンス解析を行い、起源の細胞との比較を行った結果、全エクソンあたり平均 6 個の突然変異を検出した。これらは主にコードするタンパクの機能変化を伴うもので、注目すべきことに、それらに癌関連遺伝子が多く見られた。そして、これら遺伝子変異のうち少なくとも半数が、リプログラミング前の細胞にも存在することがわかり、前述の CNV のケースと同様、リプログラミングやその後の培養の過程が、わずかに存在した増殖性のこうした変異細胞を拡大させる作用を持ったと考えられる。こうした事実は、iPS 細胞由来の細胞を治療に用いた場合の癌化の危険性について挿入変異のみならずゲノム安定性の観点からも注意が必要で

あることを示唆している。臨床応用において安全性を確保するためには、全ゲノム(エクソン)シーケンスを含めた詳細なゲノム解析が標準となるべきと主張している。

我々の観察した hMSC の場合には、癌関連遺伝子に異常があるかどうかまでは検討されていなかったが、本報告を受け、全エクソンのシーケンス解析を行うことにした。CNV での結果を考えると、比較的安定とされる体性幹細胞の場合においても、シーケンス解析等によるゲノム安定性に関する詳細な解析が要求されるべきであると考えられる。

(エピジェネティック変化)

Lister R, et al.,

Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells.

Nature. 471: 68-73. (2011)

DNA メチル化の変化もゲノムの構造変化の一部として捉えられ、遺伝子発現に影響を与えるエピジェネティックな変化として、最近注目を浴びている、体細胞のリプログラミング自体もエピジェネティックな変化であり、ES 細胞と iPS 細胞では共通した DNA メチル化パターンを持つことが知られている。本論文では、この類似性に関して、ゲノムワイドに詳細な解析を行い、ES 細胞とは異なった iPS 細胞特有の DNA メチル化の変化について報告している。

iPS 細胞に共通する ES 細胞とは異なるメチル化領域は、一般に低メチル化状態であり、リプログラミングが不完全とも考えら

れる。

また iPS のメチル化異常の特徴として、CpG 配列以外でのメチル化の変化がセントロメアまたはテロメア近傍のまとまった領域に起きており、これらの部位では、ヒストンメチル化の変化も伴っている。こうした変化は、iPS 細胞を分化させた後の細胞においても記憶されている。

以上の結果より、iPS 細胞特異的なメチル化の異常が示され、メチル化状態の解析が、細胞の品質評価に有用であると考えられる。

我々の hMSC の例ではメチル化の変化については検討を行っていなかったが、ごく最近の論文*で、同じ骨髄由来間葉系幹細胞を用いて、たった二つの癌抑制遺伝子 (HIC1、RassF1A) のプロモーターのメチル化が、細胞を形質転換したという驚くべき事実が報告された。今後、エピジェネティクスな変もゲノムの安定性を考える上で重要な要素となると考えられる。

** Teng IW, et al.,*

Targeted methylation of two tumor suppressor genes is sufficient to transform mesenchymal stem cells into cancer stem/initiating cells.

Cancer Res. 2011 Apr 25. [Epub ahead of print]

C-2-II-2 次世代シーケンサーを用いた変異解析

異常が認められた hMSC 株において、シーケンスレベルでどの程度の変異がおきていたか、また、何が増殖性獲得の原因となったかを調べるため、培養初期と、培養後期の細胞での全エクソンの塩基配

列を、次世代シーケンサーを用いて解析した。

使用した次世代シーケンサーは Illumina 社の Genome Analyzer IIx であり、1 ラン(1 レーン)あたり約 1.5Gbp のデータを取得できる。全エクソンをカバーするために、エクソン部分のみを Agilent 社の SureSelect™ Human All Exon Kit V. 2 にてキャプチャーし、シーケンス反応に用いた。このキットを用いることにより、エクソン由来の約 50Mbp を解析対象として絞り込むことができ、1 レーンで平均 30 の重複度でシーケンス解析が可能となる。よって、2 サンプルを混ぜて測定した場合の、サンプルあたりの重複度は 15 となり、変異によるヘテロコールを識別可能な数であると考えられる。

シーケンス結果について、残念ながら本報告書作成に間に合わなかったため、今後の継続する研究報告のなかで紹介させていただくこととする。

C-2-II-3 ゲノム DNA 抽出法に関する検討

次世代シーケンサー解析のためのゲノム DNA の調製のため、TRIZOL 法および DNA Extractor WB キットを用いて、サンプル調製を行った。TRIZOL 法では、DNA だけでなく、RNA、タンパクの抽出も同時に行えるため、まずこの方法を試した。2x10⁶個の hMSC (8 継代および 18 継代) 細胞を用い、RNA を抽出後、残った溶液から DNA とタンパク質を抽出した。得られた DNA 溶液の濃度をナノドロップ吸収光度計にて測定した結果、収量はそれぞれ、24.9μg および 10.6μg であった。

OD 260/280 も約 1.8 と良好な値を示したが、電気泳動にて確認したところ、十分な量のバンドが確認できず、Qubit 蛍光度計による測定においても、解析において最小限必要とされる 3μg に満たなかった。

DNA 量に差が見られた原因については不明であるが、DNA の分解、RNA の混入が考えられたため、より純粋に DNA のみを抽出する方法として DNA Extractor WB キットを用いた。9 継代および 20 継代の細胞 1-2x10⁶個より、それぞれ吸収光度測定により 25.3μg および 22.6μg の DNA が得られた。その結果、Qubit 蛍光度計によっても、6.9μg および 6.1 μg と必要量が確保できたので、この DNA サンプルを次世代シーケンサーによる解析に供した。

DNA を使った解析には、より純度の高い方法として、核を単離して DNA のみを抽出する方法が適しているが、TRIZOL 法は、RNA とタンパク質も同時に抽出できるという点で優れている。細胞のより詳細な品質評価を目指して、CGH、メチル化、シーケンス解析等のゲノミクス解析、RNA を用いたトランスクリプトーム解析、タンパクを用いたプロテオーム解析を組み合わせた統合オミックス解析を行う上で、TRIZOL 法は魅力的であり、今後さらに検討を加えていきたい。

C-3-1 細胞分化の確認

研究方法 2-2) に示した方法に従い、MSC (Fig. 6A) の神経様分化誘導を行った後、形態学的な特徴から分化程度を評価した。Fig. 6B は MSC を神経様細胞に分化誘導後 2 日目の細胞である。細胞質部分の

繊維状から球状への変化、及び突起の伸長が観察され、神経細胞の形態学的な特徴を有していることが確認された。また、実験方法 2-3) に従い、骨分化させた細胞についても同様に検討した結果、分化誘導後 14 日目からカルシウムの沈着が観察され、21 日目には、細胞の約 60% にカルシウムの沈着がみられたことから、骨細胞様に分化していることが確認された(Fig. 6C)。

C-3-2 LC/MS による MSC、神経様分化細胞及び骨分化細胞由来 N 結合型糖鎖の解析

C-3-2-1 糖鎖構造解析

MSC、神経様分化細胞及び骨分化細胞から調製した糖鎖を還元した後、タンパク質量に換算して 5 μ g 相当の還元化糖鎖を LC/MS 及び MS/MS \sim MS/MS/MS/MS により分析した。Fig. 7A は、MSC 由来還元化糖鎖の 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。FT-MS を用いたシングル MS スキャンにより測定された精密質量と MS/MS \sim MS/MS/MS/MS で検出されたフラグメントイオンの帰属により糖鎖構造を推定した結果、19 \sim 21 分、20 \sim 21 分、及び 21 \sim 23 分にそれぞれ 7 種類の高マンノース型糖鎖、3 種類の混成型糖鎖、及び 7 種類のパウチマンノース型糖鎖が溶出されていることが明らかとなった。また、複合型糖鎖については、0 \sim 2 分子の NeuNAc と 0 \sim 1 分子の Fuc が付加した 2 本鎖糖鎖、0 \sim 4 分子のシアル酸と 0 \sim 1 分子のフコースが付加した 3 及び 4 本鎖糖鎖 (又は Lac 付加 2 及び 3 本鎖糖鎖) を含む 29 種類 (異性体を含む) の糖鎖が、20 \sim 32 分にかけて溶出されていることが

確認された。その他、興味深い複合型糖鎖としては、フコースを 2 分子有する複合型 2 本鎖糖鎖、及び 3 本鎖 (又は Lac 付加 2 本鎖) 糖鎖に 4 分子の NeuNAc が付加した糖鎖が検出された。

同様に、神経様分化細胞及び骨分化細胞から調製した還元化糖鎖について解析した結果、MSC と比較して検出された糖鎖の種類に違いは認められなかった。しかし、複合型糖鎖が溶出される位置のベースピーククロマトグラムの形状に違いがみられたことから、複合型糖鎖の糖鎖分布が異なる可能性が示唆された(Fig. 7B, 2C)。

C-3-2-2. 糖鎖分布の比較

C-3-2-2-1) MSC 及び神経様分化細胞の糖鎖分布の比較

MSC 及び神経様分化細胞の糖鎖分布を比較するために、還元化糖鎖のピーク面積を求め、糖鎖分布を比較した。まず、ポジティブイオンモード測定により取得されたデータを用いて主に高マンノース型、混成型及びパウチマンノース型糖鎖のピーク面積を比較した結果、両者に顕著な差は認められなかった(Fig. 8)。次に、ネガティブイオンモード測定により取得されたデータを用いて、主に複合型糖鎖のピーク面積を比較した結果、神経様分化細胞において 1 分子のシアル酸及びフコースが付加した複合型 2 本鎖糖鎖 (dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1)、1 \sim 3 分子のシアル酸及び 1 分子のフコースが付加した複合型 3 本鎖 (又は Lac 付加 2 本鎖) 糖鎖 (dHex1Hex6HexNAc5NeuNAc1-3) 及び 1 \sim 3 分子のシアル酸及び 1 \sim 2 分子のフコースが付加した複合型 4 本鎖 (又は

Lac 付加 3 本鎖) 糖鎖 (dHex1Hex7HexNAc6NeuNAc1-2)の結合量が増加していた。一方、シアル酸が 3 及び 4 分子のシアル酸が付加した複合型 3 本鎖 (又は Lac 付加 2 本鎖) 糖鎖 (Hex6HexNAc5NeuNAc3-4) の結合量は、神経様分化細胞で減少していた(Fig. 9)。

C-3-2-2-2) MSC 及び骨分化細胞の糖鎖分布の比較

ポジティブイオンモード測定により取得されたデータを用いて高マンノース型、混成型及びパウチマンノース型糖鎖のピーク面積を比較した結果、高マンノース型糖鎖 (M10) 及び一部のパウチマンノース型糖鎖 (Hex3HexNAc2 及び dHex1Hex3HexNAc2) の結合量が僅かに変化していたが、他に顕著な差は認められなかった(Fig. 10)。一方、ネガティブイオンモード測定により得られた複合型糖鎖のピーク面積を比較した結果、神経様分化細胞において 3~4 分子のシアル酸が付加した複合型 3 本鎖 (又は Lac 付加 2 本鎖) 糖鎖 (Hex6HexNAc5NeuNAc3-4) の結合量が著しく増加していた(Fig. 11)。また、2~3 分子のシアル酸及び 1 分子のフコースが付加した複合型糖鎖 (dHex1Hex6HexNAc5NeuNAc2-4, dHex1Hex7HexNAc6NeuNAc2-4) の結合量についても骨分化細胞で増加する傾向がみられた。

C-3-3 主成分解析 (PCA) による MSC、神経様分化細胞及び骨分化細胞の識別

まず、MSC 及び神経様分化細胞の糖鎖分布の比較 (Fig. 9) に使用した各糖鎖の

ピーク面積の情報を用いて PCA を行った。スコアプロット (Fig. 12A) に示したように、両細胞は分離してプロットされ、N 結合型糖鎖の分布を指標として MSC と神経様分化細胞を識別することができた。また、ローディングプロットの結果から、MSC では Hex6HexNAc5NeuNAc3-4、神経様分化細胞では dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1、dHex1Hex6HexNAc5NeuNAc1 及び dHex1Hex7HexNAc6NeuNAc2 の結合量が多く、これらの糖鎖が両細胞の分離に関与していることが確認された (Fig. 12B)。

つぎに、MSC 及び骨分化細胞の糖鎖分布の比較 (Fig. 11) に使用した糖鎖ピーク面積情報を用いて PCA を行った。その結果、スコアプロットにおける両細胞の分離度は良好であった。また、ローディングプロットの結果から、骨分化細胞では Hex6HexNAc5NeuNAc3-4 の結合量が多く、これらの糖鎖が両細胞の分離に関与していることが明らかとなった (Fig. 13A, 13B)。

さらに、MSC、神経様分化細胞、及び骨分化細胞の糖鎖ピーク面積情報を用いて PCA を行った(Fig. 14)。スコアプロットでは、3 種類の細胞は分離してプロットされること、また骨分化細胞は神経様分化細胞よりも MSC から離れた位置にプロットされることが確認された(Fig. 14A)。また、ローディングプロットにより、MSC では dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1、骨分化細胞では Hex6HexNAc5NeuNAc3-4 の結合量が多く、これらの糖鎖が 3 種類の細胞の分離に関与していることが明らかとなった (Fig. 14B)。

C-4-1 Ad-CXCL12 投与マウスへの骨髄細胞の移植

昨年度までに、Ad ベクターを用いて CXCL12 をマウス生体へ高発現させることにより、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にした。そこで本年度は、CXCL12 発現 Ad ベクター投与後に外来骨髄細胞を移植した際の移植率について解析を行った。なお、今回の検討では、レシピエント骨髄の空きニッチを保持するために、X 線照射は行わずに移植を行った。移植 20 週間後に骨髄細胞を回収して移植効率を解析した結果、Ad-CXCL12 投与マウスでは、Ad-Luc 投与群と比較し、レシピエント骨髄に GFP 陽性のドナー細胞が生着していることが明らかとなった。一方、コントロール群では GFP 陽性細胞は検出できなかった (Fig. 15)。したがって、Ad-CXCL12 投与により形成された造血幹細胞ニッチに外来ドナー細胞が生着したことが推察される。しかし、その移植効率は極めて低く、GFP 陽性細胞の割合は骨髄細胞中の 0.06%であった (Table 8)。したがって、CXCL12 を発現させただけでは移植率の向上は困難であることが示唆された。

C-4-2 VEGF による骨髄動員作用

骨髄動員作用を有する因子として、CXCL12 の以外に、VEGF や Stem Cell Factor (SCF)、Angiopoietin-1 (Ang-1) 等が知られている。昨年度、Ad-VEGF をマ

ウスへ投与することにより、血漿 VEGF 濃度が著名に増加することを示した。そこで本年度では、Ad-VEGF 投与マウスにおける血液細胞の動態について検討した。Ad-VEGF 投与 5 日後に骨髄細胞および末梢血単核細胞 (PBMC) 数を測定したところ、Ad-VEGF 投与マウスはコントロールである Ad-null 投与マウスと比較し、骨髄細胞数が有意に減少するとともに PBMC 数が有意に増加することが明らかとなった (Fig. 16)。これまでに Ad-CXCL12 投与マウスの骨髄では、造血幹細胞を含む画分である c-kt+Sca-1+Lineage- (KSL) 細胞数が減少することを明らかにしている。そこで VEGF も同様の作用を有しているか否か検討した。その結果、VEGF 投与マウスにおいても KSL 細胞は有意に減少することが明らかとなった (Fig. 17A, 17B)。さらにコロニーアッセイにより骨髄細胞および PBMC における血液前駆細胞数を解析した結果、造血幹細胞や血液前駆細胞が形成する CFU-GEMM/CFU-Mix が骨髄細胞中において減少する一方で、PBMC においては有意に増加していた (Fig. 17C)。以上の結果から、マウス生体内において血中 VEGF 濃度が上昇することにより、骨髄から造血幹細胞を含む血液前駆細胞が遊離し、末梢血へ動員されることが示された。また、Ad-VEGF 投与マウスの末梢血中には Flt-1 (VEGFR1) 陽性細胞が増加していた (Fig. 18)。Ad-CXCL12 投与マウスにおいては Flt-1 陽性細胞の増加はみとめ

られないことから（データ略）、VEGF と CXCL12 では動員する細胞の種類が異なっていることが示唆された。

C-4-3 マウス ES 細胞、iPS 細胞から血液細胞への誘導

多能性幹細胞である ES、iPS 細胞から誘導した血液細胞は、細胞組織加工医薬品のモデル細胞として利用可能であると考えられる。また、生体から樹立可能な iPS 細胞由来の血液細胞は移植におけるドナー細胞となり得るため、iPS 細胞から誘導した血液細胞を用いることにより、多様な *in vivo* 免疫原性評価系の構築に繋がると考えられる。そこで本年度はマウス ES、iPS 細胞から血液細胞を誘導することを試みた。なお、これまでは HoxB4 遺伝子を ES 細胞へ恒常的に発現させることにより造血幹細胞を含む血液前駆細胞の誘導が行われてきたが、この遺伝子導入法では外来遺伝子が染色体に挿入されるために医療応用には適していない。そこで本研究ではまず、一過性の遺伝子発現を示す Ad ベクターを用いて HoxB4 遺伝子を導入し、血液前駆細胞への分化誘導が可能かどうか検討した。まず、誘導した血液細胞数を計測したところ、HoxB4 遺伝子の導入によりその細胞数が有意に増加していることが明らかとなった (Fig. 19A)。また、HoxB4 遺伝子導入細胞では、CD45 や c-kit、Sca-1 を発現する細胞も効率良く誘導できていることが示された (Fig. 19B)。さらに、

得られた細胞中の血液前駆細胞数をコロニーアッセイにより解析した結果、HoxB4 遺伝子導入群では、CFU-GEMM 数が有意に増加していることが明らかとなった (Fig. 19C)。したがって、Ad ベクターを用いて ES、iPS 細胞へ HoxB4 遺伝子を導入することにより、効率良く造血幹細胞・血液前駆細胞を誘導可能であることが示された。

C-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

通常条件または擬似的虚血条件培養後に回収した hMSC より Total RNA を抽出し、RT² Profiler PCR Array によって血管新生関連遺伝子の発現量を測定することで、コントロール群および虚血群における発現量を比較し、虚血後において有意に上昇するサイトカイン遺伝子を検討した。

RT² Profiler PCR Array Angiogenic Growth Factors & Angiogenesis Inhibitors により 84 種の血管新生関連遺伝子の発現量を検討したところ、虚血後における hMSC では、レプチン (Leptin)、血管内皮細胞成長因子 A (VEGF-A : Vascular Endothelial Growth Factor-A、以降 VEGF と省略する)、胎盤成長因子 (PlGF : Placental Growth Factor)、アンジオゲニン (Angiogenin)、 β 1 型形質転換成長因子 (TGF- β 1 : Transforming Growth Factor-beta1) の遺伝子発現に有意な上昇が認められた (Fig. 20-25)。

C-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

虚血後の hMSC において遺伝子発現に有意な上昇が認められたレプチン、VEGF、PlGF、アンジオゲニン、TGF- β 1 の 5 種類のサイトカインについて、通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後に回収した培養上清中の濃度を測定することで、hMSC から実際に分泌されるサイトカイン濃度を検討した。

レプチンは、虚血群においてロット F およびロット H で分泌量および分泌変化率に有意な増加が認められた。それぞれのレプチン濃度は 11.3 pg/mL (ロット F)、8.9 pg/mL (ロット H) であった。他の 4 ロットにおいては有意な差は認められなかった (Fig. 26, 27)。

VEGF は、虚血群において全ロットで分泌量および分泌変化率に有意な増加が認められた。それぞれの VEGF 濃度は、1489 pg/mL (ロット A)、994 pg/mL (ロット B)、1780 pg/mL (ロット C)、1355 pg/mL (ロット F)、817 pg/mL (ロット G)、1410 pg/mL (ロット H) であった。また、各ロットにおける VEGF 分泌量および分泌変化率には有意なロット差が見られた (Fig. 28, 29)。

PlGF は、コントロール群および虚血群における有意な差がないか、あるいはコントロール群での増加が見られる結果となった (Fig. 30)。

アンジオゲニンおよび TGF- β 1 については検出限界未満であった。それぞれの検出限界濃度は、6.0 pg/mL (アンジオゲニン)、4.6 pg/mL (TGF- β 1) であった。

C-5-3 虚血後における hMSC の VEGF 分

泌能と相関する遺伝子の探索

虚血後の VEGF 分泌について有意なロット差が見られたことから、①PS#9 における遺伝子発現量と虚血時の VEGF 分泌量、②PS#9 における遺伝子発現量と虚血による VEGF 分泌変化率、③PS#7 における遺伝子発現量と PS#9 における虚血時の VEGF 分泌量、④PS#7 における遺伝子発現量と PS#9 における虚血による VEGF 分泌変化率、これら 4 つの組み合わせについてスピアマンの順位相関係数とその有意確率を算出し、hMSC における VEGF 分泌能と相関する遺伝子を探索した。

その結果、全ての組み合わせにおいて有意な相関が認められた Probe Set が 22 個検出された。このうち、VSR6、VSR8、VSR15 は 2 つの Probe Set、VSR9 は 3 つの Probe Set が重複してコードする遺伝子であり、検出された遺伝子は全部で 17 個であった (Table 14, 15)。

一方、VSR12、VSR16、VSR17 を除く 14 遺伝子は、虚血下における生存率 (= 虚血抵抗性) に対しては、有意な負の相関を示した (Table 16)。

C-6-1 Early EPC の特性指標

C-6-1-1 単核球由来 early EPC の細胞表面マーカー分子発現の確認

まず、本研究で用いる単核球由来 early EPC について、より未分化な幹細胞を起源に持つ AC133 陽性細胞由来 early EPC を陽性対照として、細胞表面マーカー分子の発現を確認した。評価対象としたマーカーは、血管内皮細胞マーカー CD31、単核球マーカー CD14、及び、白血球マーカー

CD45 である。単核球由来 early EPC は、AC133 陽性細胞由来 early EPC と同様、試験した 3 種類のマーカー分子を発現していることが確認できた (Fig. 31)。Early EPC は CD45 陽性であることから、血球系の細胞であると考えられる。

昨年我々は、early EPC の細胞表面に活性型 MMP-9/MMP-2 が存在すること、及び、early EPC が高い浸潤活性を持つことを見出した。生体内で虚血が起きた場合、Fig. 32 に示すように early EPC が浸潤・遊走して最初に虚血部位に到着し、その場でサイトカインを放出し、既存の血管や late EPC をリクルートすることにより血管再生を促す可能性が考えられる。この仮説に基づく、遊走能は、細胞組織加工医薬品としての early EPC の有効性に関わる重要な特性であると考えられる。そこで、early EPC の効力の裏づけとなる機構の解明のため、遊走を促進する因子と、その作用機構について解析した。

C-6-1-2 Early EPC の IL-8 応答性の解析

我々は既に、early EPC が IL-8 を多く産生することを見出している。そこで、IL-8 のオートクライン作用を考え、IL-8 を刺激剤として early EPC の遊走能を評価した。同時に、early EPC 由来 IL-8 のパラクライン作用も想定して、late EPC 及び HUVEC についても、IL-8 の遊走促進作用を検討した。その結果、IL-8 は late EPC や HUVEC を濃度依存的に促進したが、early EPC では IL-8 に応答した遊走は認められなかった (Fig. 33)。

IL-8 受容体の発現をフローサイトメー

ターで解析すると (Fig. 34)、late EPC や HUVEC に比べ early EPC で強く発現していた。また、単核球由来 early EPC は殆どが CD14 陽性細胞である (Fig. 31) ことから、新鮮な CD14 陽性細胞を用いて IL-8 に対する遊走能を検討すると、IL-8 の濃度に依存して遊走が促進された (Fig. 35)。以上のことから、early EPC は分化の過程でオートクリン的に産生する IL-8 により脱感作され、IL-8 に対する遊走能を失うと考えられた。

C-6-1-3 Early EPC の VEGF 応答性の解析

次に、遊走促進因子を VEGF に変えて early EPC の遊走能を調べた。その結果、Fig. 36 に示すように、late EPC や HUVEC と同様に、early EPC は VEGF に応答して遊走することが分かった。

細胞遊走を調節するシグナル伝達分子として PI3K が関与していることが報告されている。また、early EPC は血球系由来であると考えられるため、early EPC の遊走には血球に特異的に発現する p110 PI3K δ が重要と考えられた。そこで、VEGF により惹起される遊走に対する PI3K 阻害剤の効果を調べたところ、early EPC の遊走は、PI3K アイソフォーム非選択的阻害剤である Wortmannin により阻害されたが、p110 PI3K α 選択的阻害剤である PI-103 では阻害されなかった (Fig. 37)。Late EPC 及び HUVEC の遊走は、PI-103 により抑制された。

次に、p110 PI3K のアイソフォーム発現をウエスタンブロット法で解析したところ、Late EPC、HUVEC、及び、ヒト

冠状動脈内皮細胞(HCAEC)は p110 PI3K α を発現しているのに対し、early EPC は p110 PI3K δ を発現していた (Fig. 38)。Early EPC における p110 PI3K δ の発現を siRNA により抑制すると p110 PI3K δ タンパク量は低下し、VEGF に対する遊走も有意に抑制された (Fig. 39)。以上の結果から、early EPC には PI3K のうち δ アイソフォームが発現しており、遊走には p110 PI3K δ が関与していると考えられた。

C-6-1-4 Early EPC の *in vivo* 活性評価系

Early EPC の血管形成への寄与を *in vivo* でも確認するため、マウスへの細胞移植による血管形成促進能の評価系を確立した。本評価系では、氷上で溶解したマトリゲルに early EPC を浮遊させ、ヌードマウスの背部に皮下投与する。マウスの体温でゲル化したマトリゲルを 2 週間後に取り出して超薄切片を作成し、マウスの血管内皮細胞を抗マウス CD31 抗体により検出した (Fig. 40)。Fig. 41 に示すように、early EPC とともに移植したマトリゲル内には多くのマウス由来 CD31 陽性細胞から成る血管が観察され、移植した early EPC が血管形成促進作用を持つことが確認された。

C-6-2. Late EPC の特性指標

C-6-2-1 Late EPC の管腔形成能とオクルディン発現量の関連

Late EPC は、血液単核球細胞を血管内皮細胞増殖条件下で 2~3 週間培養して得られる細胞で、マトリゲル上での管腔形

成する能力を保有している。しかし、管腔形成能は、株ごとに異なっており、細胞組織加工医薬品として用いるためには、管腔形成能の評価が必要である。また、管腔形成に関わる特性指標を明らかにすることが、品質評価において有用であると考えられる。Late EPC の管腔形成に関する代表的な例を Fig. 42 に示す。Late EPC 株である S3、S2-22、2R32 のうち、2R32 は組織由来血管内皮細胞である HUVEC と同程度の管腔形成能を示す株であり、S2-22 及び S3 は HUVEC より管腔形成能が低い株である。特に、S3 と名付けたセルラインでは殆ど管腔が形成されない。S3 株も CD31 や KDR 等の血管内皮細胞マーカーは発現している (data not shown)。

これらの 3 種類の late EPC 株について、HUVEC を対照として遺伝子の発現プロファイルと比較したところ、管腔形成能の程度によらず、HUVEC と類似したプロファイルを示すことが明らかになった (Fig. 43)。しかし、管腔形成能に相関する遺伝子として、オクルディン (OCLN) が見出され、管腔形成能の低い S3 では、これらの遺伝子の発現が低いことが見出された (Fig. 44 上)。

遺伝子発現プロファイル比較に用いた late EPC とは異なる株で、管腔形成能を持つ S11-11 と S11-12、及び、管腔形成能の極めて低い S3 について、オクルディンのタンパク質レベルでの発現をウエスタンブロットにより確認したところ、S11-11 株、S11-12 株、及び、陽性対照として用いた HUVEC ではオクルディンの発現が検出されたが、S3 株ではオクルデ

インの発現が検出されなかった (Fig. 44 下)。

オクルディンは Fig. 45 で示すように tight junction を形成する 4 つの膜貫通ドメインをもつタンパクであるが、血管内皮前駆細胞の管腔形成能との関連はこれまで報告されていない。

C-6-2-2 Late EPC の管腔形成におけるオクルディンの機能的役割に関する検討

LateEPC の管腔形成におけるオクルディンの機能的役割を明らかにするため、siRNA を用いたオクルディンのノックダウン実験を行った。管腔形成能の高い Late EPC 株である S11-11 に、オクルディン特異的な siRNA (OCLN-KD-1 あるいは OCLN-KD-2) を導入したところ、オクルディンの mRNA (Fig. 46 左) が確認された。また、タンパク質レベルでのオクルディンの減少も確認された (Fig. 46 右)。また、これらの siRNA の導入により、管腔形成が抑制された (Fig. 47、48)。

マトリゲル上に播種した細胞の変化を経時的に観察したところ、オクルディンをノックダウンした細胞も S3 細胞も、コントロールの細胞と同様、細胞が網目状になり、4 時間後では管腔様構造が認められることが分かった (Fig. 49)。しかし、20 時間後には、オクルディンをノックダウンした細胞及び S3 細胞では、管腔構造が消失しており、お互いにコンタクトできない様子が観察された。以上のことから、オクルディンは late EPC の管腔形成の後期過程あるいは維持に必要な機能的な指標であると考えられた。

C-7 培養細胞の O-結合型糖鎖の比較解析

10 種類の培養癌細胞より O-結合型糖鎖を調製し、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーで分画後、ムチン型糖鎖とグリコサミノグリカン鎖のそれぞれについて定量的な解析を行った。ムチン型糖鎖は、アジアロ、モノシアロ、ジシアロ、トリシアロ糖鎖分画ごとに、グリコサミノグリカン鎖はコンドロイチン硫酸類 (CS)、ヘパリン/ヘパラン硫酸類 (HS)、ヒアルロン酸 (HA) ごとに定量解析した結果を Fig. 50 に示す。定量解析の結果、Jurkat、U937、K562、HL60 などの血球系細胞は上皮系細胞に比べムチン型糖鎖とグリコサミノグリカン鎖のいずれも発現量が少ないことがわかる。一方、上皮系細胞 6 種類については、ムチン型糖鎖とグリコサミノグリカン鎖の総発現量は高く、各糖鎖の発現量も細胞種ごとに大きく異なることがわかった。例えば、ムチン型糖鎖では大腸癌 LS174T は発現量が高いが、同じ大腸癌であっても HCT-15 では低かった。同様に胃癌細胞である MKN45 と MKN7 では 2 倍以上も糖鎖量が異なり、MKN45 ではジシアロおよびトリシアロ糖鎖の含量が全ムチン型糖鎖の 70%以上を占めるなど、細胞種によって大きく異なることがわかった。

グリコサミノグリカン鎖については、膵臓癌細胞 BxPC3 は CS 鎖、HS 鎖、HA 鎖のいずれも同じ膵臓癌細胞である PANC1 に比べ発現量が高かった。一方、ムチン型糖鎖で発現量に著しい差が観察された大腸癌 LS174T と HCT-15 はグリコサミノグリカン鎖の発現量に大きな差は観察されなかった。

次に、ムチン型糖鎖とグリコサミノグリ

カン鎖の発現量のみでは識別が困難であった細胞種について発現糖鎖の比較解析を行った。Fig. 51 に K562 と U937 のムチン型糖鎖とコンドロイチン硫酸鎖を解析した結果を示す。ムチン型糖鎖については両細胞ともに、シアリル T 抗原とジシアリル T 抗原糖鎖が主たる糖鎖として観察され、その発現量にも大きな違いはなかった。一方、コンドロイチン硫酸については、両細胞に Δ diCS-4S のピークが観察されたが、U937 では Δ diCS-0S のピークも観察され、U937 は K562 に比べ硫酸化度の低いコンドロイチン硫酸鎖を持つことがわかる。

10 種類の細胞のうち、大腸癌細胞 (LS174T, HCT16) と胃癌細胞 (MKN45, MKN7) に着目しグリコサミノグリカン鎖の発現量を比較した結果を Fig. 52 に示す。4 種類のうち MKN7 はコンドロイチン硫酸 A の発現量が高く、また構成 2 糖単位に硫酸基を 2 つ持つコンドロイチン硫酸 E も観察された。一方、LS174T, HCT16, MKN45 はコンドロイチン硫酸鎖の発現量は MKN7 に比べ低い、ヘパラン硫酸鎖の発現量は MKN7 に比べ高いことがわかった。このように細胞中のグリコサミノグリカン鎖はムチン型糖鎖と同様に細胞の個性解析において有用な指標となることがわかった。また、K562 と U937 の場合のように、ムチン型糖鎖だけでは識別が困難な細胞種でもグリコサミノグリカン鎖の情報を利用すれば識別可能となることがわかった。

D. 考察

D-1 感染性危険因子評価技術開発

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。国内の 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 パネル候補品は、国内 4 クラスターに属し、実験感染 SPF ブタから得た 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、0.5ml ずつ分注したものであり、均一性試験を実施して確認後、参加 6 施設でリアルタイム PCR 定量を実施することにより各パネルの単位を設定した。今回は HEV 標準品が利用できなかったため、合成 RNA を用いてコピー数を設定したが、WHO の HEV 標準品が樹立されれば、今後、WHO の標準品を基に単位を換算できるようにすることが望ましい。今回樹立した HEV-NAT 評価用標準パネルは今後広く公開する予定であり、幅広い活用が期待される。

D-2 安定性評価技術開発

これまで検討を行ってきたプロテオーム解析に関しては、最新型タンデム質量分析装置の利用とデータ解析ソフト Progenesis の導入により、十分な量のペプチドシグナルの検出が可能となるとともに、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。

今年度は、hMSC の品質評価の手法として、その表面マーカーとされる CD 分子種に注目し、これらを質量分析装置を用いて一斉に定量する方法を確立した。質量分析装置では、測定ごとのコンディションの差により、正確な定量が難しいとされるが、

安定同位体ラベルした合成ペプチドを内部標準として添加することにより、それが可能となった。今後は、より正確な定量へ向け、希釈サンプルを用いた直線性の確認を行うとともに、四重極型タンデム質量分析装置を用いたターゲット特異的選択イオンモニタリング (SRM) を組み合わせた MRM 法による定量法への応用を行いたい。MRM 法は、抗体を用いることなく、大量のタンパク質の同時定量を可能とする手法として注目されており、CD 分子種だけでなく、品質評価に有用なバイオマーカーとなるタンパク質を組み込むことにより、より信頼性の高い評価を行える試験系の確立が可能となる。

昨年度に得られた、継代により変化するバイオマーカー候補タンパク質群に関しては、さらなる検討を加えることができなかったが、得られた配列情報と MS/MS スペクトルデータから、SRM 法に必要となる特異的質量ピークの組み合わせを作成することが可能であり、今後 MRM 法により検討を加えて行きたい。

最近の iPS 細胞に関するゲノム不安定性の報告や、我々の hMSC での検討結果から、幹細胞株の樹立 (含リプログラミング) やその後の *in vitro* での細胞培養の過程が、わずかに存在する増殖性のゲノム変異を伴った細胞の選択圧として働く危険性が示唆された。また、iPS 細胞において観察された遺伝子変異が、癌関連遺伝子に多く認められた点、および癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化が直接細胞を形質転換させるといった最近の報告を受け、癌化につながる変化としてのゲノム不安定性の評価の重要性が再認識さ

れた。理想的には、個々の細胞におけるゲノム安定性が評価できれば良いが、既存の手法ではそこまでの感度はなく、ポピュレーション全体の平均として評価をせざるを得ない。そこで、増殖性の変化に着目し、一定期間培養を続けた後の細胞を使って評価するアプローチによりこの問題がある程度解決できるのではないかと考える。

さらに、ゲノムの安定性の評価指標としては、次世代シーケンサーの活用によるホールゲノム (前段階としてはエクソン) シーケンシングの活用が有効であると考え、遅ればせながら検討を開始した。今後に活用できる基礎的データとなることを期待したい。DNA シーケンサーをめぐる近年の進展は目を見張るものがあり、次々世代シーケンサーでは、一分子による測定も可能となることから、細胞一個レベルでの解析にも期待がかかる。また、コストダウンも進んで、既に次世代シーケンサーもパーソナルユースな機器となっており、全ゲノム解析が 1000 ドルでできる日も近づいている。そうになると、治療用の細胞の品質評価として、全ゲノムシーケンシングを標準的な試験として課することも現実的であると考えられる。

D-3 同等性・特性解析指標の探索手法の開発

D-3-1 LC/MS による糖鎖構造解析及び糖鎖分布の比較

本年度は、まず、細胞から切り出した糖鎖を還元化した後、LC/MS 及び MS/MS ~ MS/MS/MS/MS により構造解析を行い、各糖鎖のピーク面積に基づき糖鎖分布を比較した。その結果、MSC を神経様細胞に