

Fig. 20 虚血後における hMSC のレプチン遺伝子発現変化

通常条件または擬似的虚血条件培養24時間後に回収した細胞より抽出したTotal RNAを用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸はコントロール群のレプチン遺伝子発現量に対する虚血群の比率を示しており、横軸はロットを示している。

虚血後における hMSC では、レプチン遺伝子の発現に有意な上昇が認められた。 [各ロット1例ずつ、計6ロットの平均値] * $p < 0.01$ vs. Control

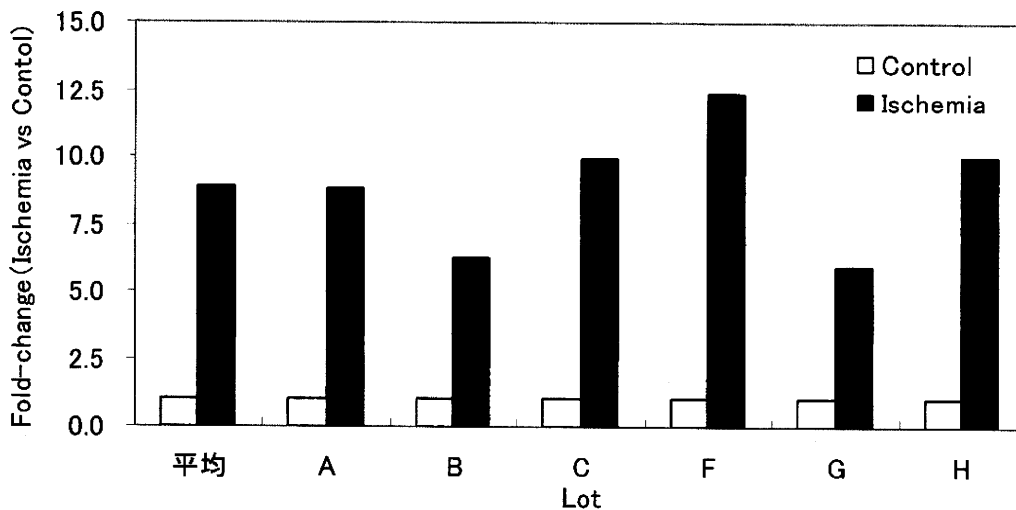


Fig. 21 虚血後における hMSC の VEGF 遺伝子発現変化

通常条件または擬似的虚血条件培養24時間後に回収した細胞より抽出したTotal RNAを用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸はコントロール群の VEGF 遺伝子発現量に対する虚血群の比率を示しており、横軸はロットを示している。

虚血後における hMSC では、VEGF 遺伝子の発現に有意な上昇が認められた。 [各ロット1例ずつ、計6ロットの平均値] * $p < 0.01$ vs. Control

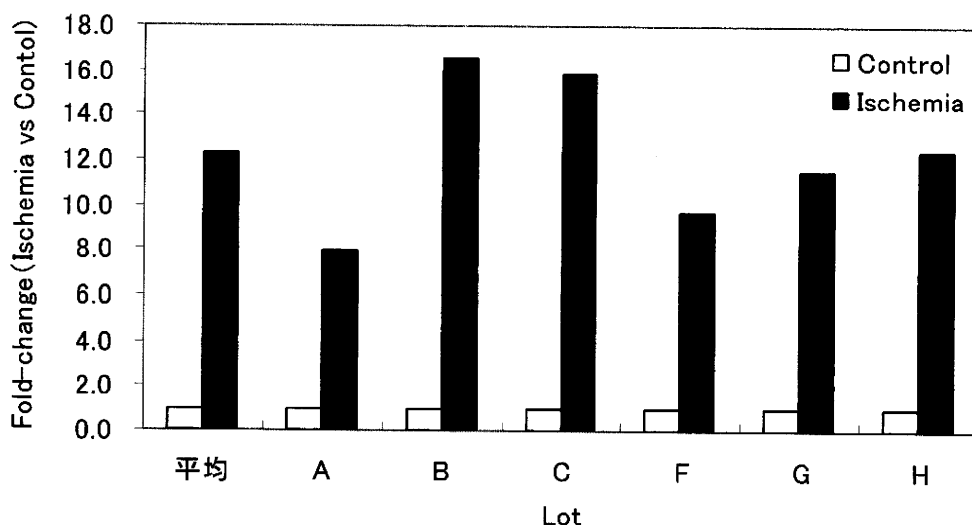


Fig. 22 虚血後における hMSC の PIGF 遺伝子発現変化

通常条件または擬似的虚血条件培養24時間後に回収した細胞より抽出したTotal RNAを用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸はコントロール群の PIGF 遺伝子発現量に対する虚血群の比率を示しており、横軸はロットを示している。

虚血後における hMSC では、PIGF 遺伝子の発現に有意な上昇が認められた。

[各ロット1例ずつ、計6ロットの平均値] * $p < 0.01$ vs. Control

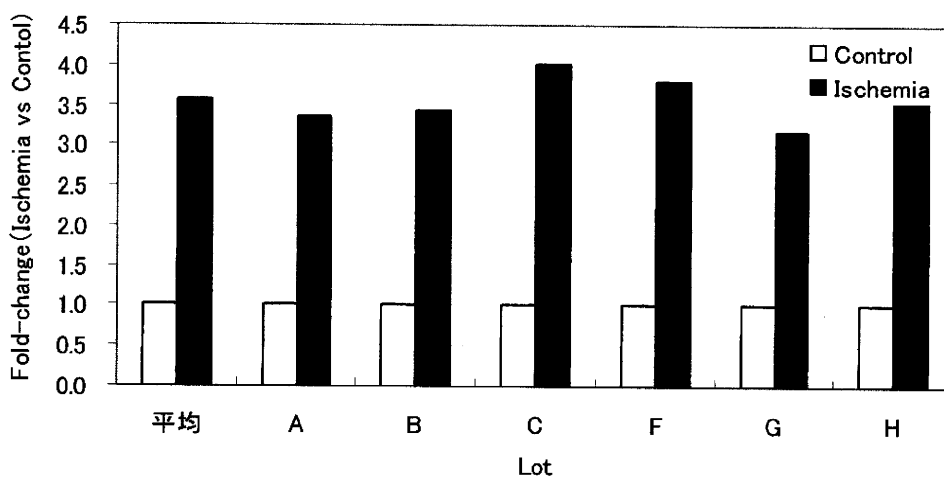


Fig. 23 虚血後における hMSC のアンジオゲニン遺伝子発現変化

通常条件または擬似的虚血条件培養24時間後に回収した細胞より抽出したTotal RNAを用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸はコントロール群のアンジオゲニン遺伝子発現量に対する虚血群の比率を示しており、横軸はロットを示している。

虚血後における hMSC では、アンジオゲニン遺伝子の発現に有意な上昇が認められた。[各ロット1例ずつ、計6ロットの平均値] * $p < 0.01$ vs. Control

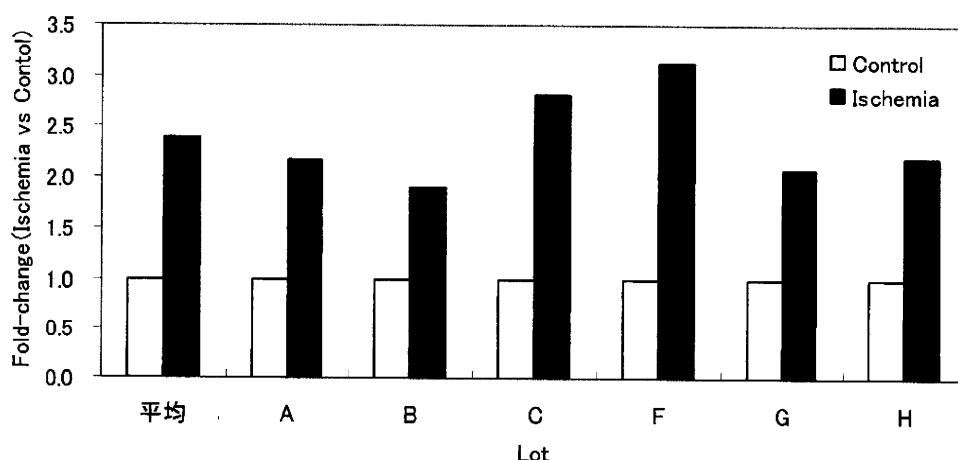


Fig. 24 虚血後における hMSC の TGF-β1 遺伝子発現変化

通常条件または擬似的虚血条件培養24時間後に回収した細胞より抽出したTotal RNAを用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸はコントロール群の TGF-β1 遺伝子発現量に対する虚血群の比率を示しており、横軸はロットを示している。

虚血後における hMSC では、TGF-β1 遺伝子の発現に有意な上昇が認められた。

[各ロット1例ずつ、計6ロットの平均値] * $p < 0.01$ vs. Control

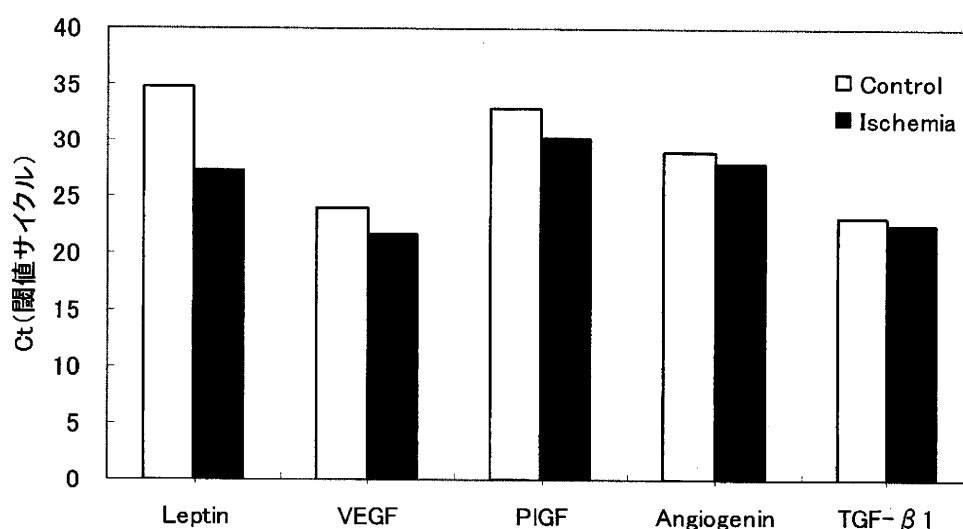


Fig. 25 虚血後の hMSC において有意な上昇が認められたサイトカイン遺伝子の Ct 値

通常条件または擬似的虚血条件培養24時間後に回収した細胞より抽出したTotal RNAを用いて遺伝子発現量を検討した。

縦軸はシグナルの閾値に到達するサイクル数 (Ct) を示しており、横軸は各サイトカインを示している。

[各ロット1例ずつ、計6ロットの平均値]

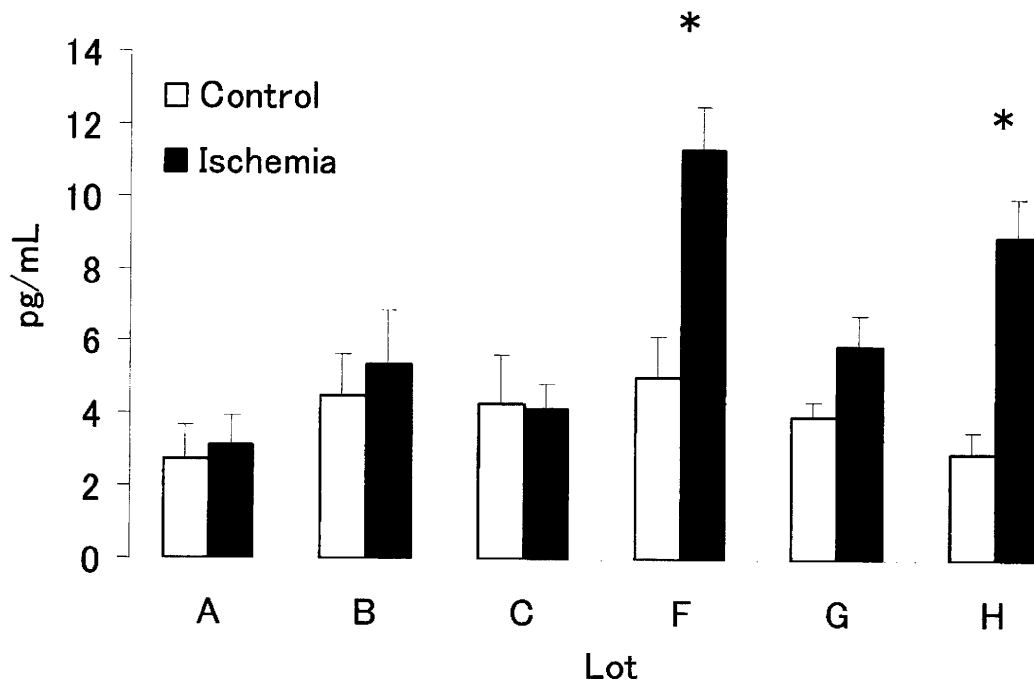


Fig. 26 虚血後におけるhMSCのレプチン分泌量変化

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後における培養上清を用いてレプチン分泌を検討した。縦軸はレプチン濃度を示しており、横軸はロットを示している。

Two-way ANOVA によれば、レプチン分泌量は、hMSC のロット間で有意な差が認められた ($p(\text{Lot}) < 0.05$)。

また、虚血による有意なレプチン分泌増加が認められた ($p(\text{Ischemia}) < 0.05$)。

虚血とロットとの相互作用についても有意な差が認められ ($p(\text{Lot} \times \text{Ischemia}) < 0.05$)、虚血後のレプチン分泌量にはロット間の差がみられたと同時に、ロットFおよびHにおいて虚血によるレプチン分泌量の有意な増加が認められた ($p < 0.05$, Student-Newman-Keul test)。

[平均値 ± S.E.M. (n=5)] * $p < 0.05$ vs. Control group of each lot

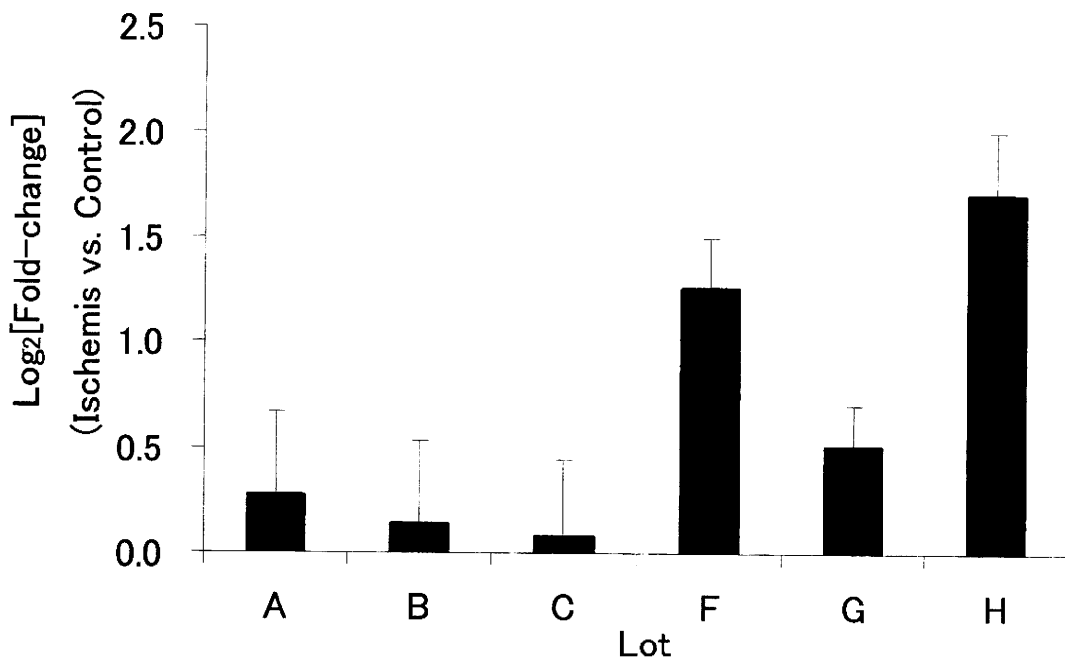


Fig. 27 虚血後におけるhMSCのレプチン分泌変化率

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後における培養上清を用いてレプチン分泌を検討した。縦軸はコントロール群のレプチン濃度に対する虚血群の比率の対数を示しており、横軸はロットを示している。

One-way ANOVA によれば、虚血時のレプチン分泌変化率には有意なロット差が見られた($p < 0.05$)。

[平均値±S.E.M.(自由度=8)]

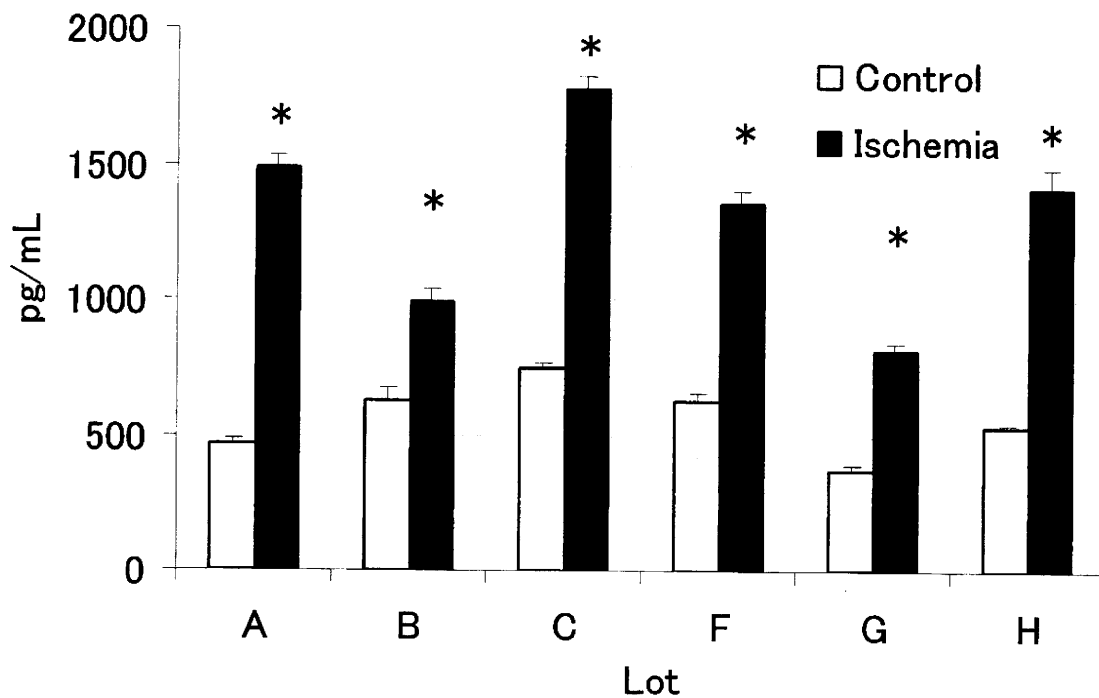


Fig. 28 虚血後におけるhMSCのVEGF分泌量変化

通常条件または擬似的虚血条件培養24時間後における培養上清を用いてVEGF分泌を検討した。縦軸はVEGF濃度を示しており、横軸はロットを示している。

Two-way ANOVAによれば、VEGF分泌量は、hMSCのロット間で有意な差が認められた($p_{Lot} < 0.05$)。

また、虚血による有意なVEGF分泌増加が認められた($p_{Ischemia} < 0.05$)。

虚血とロットとの相互作用についても有意な差が認められ($p_{Lot \times Ischemia} < 0.05$)、虚血後のVEGF分泌量にはロット間の差がみられたと同時に、6ロット各々において虚血によるVEGF分泌量の有意な増加が認められた($p < 0.05$, Student-Newman-Keul test)。

[平均値±S.E.M.(n=5)] * $p < 0.05$ vs. Control group of each lot

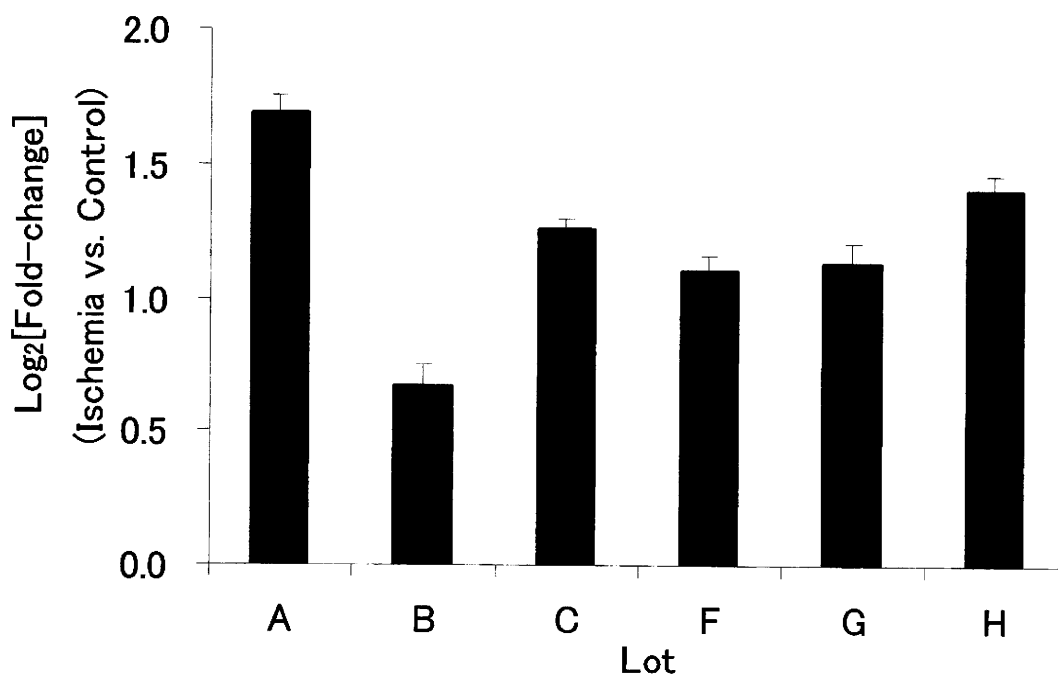


Fig. 29 虚血後における hMSC の VEGF 分泌変化率

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後における培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。縦軸はコントロール群の VEGF 濃度に対する虚血群の比率の対数を示しており、横軸はロットを示している。

One-way ANOVA によれば、虚血時の VEGF 分泌変化率には有意なロット差が見られた ($p < 0.05$)。

[平均値 ± S.E.M. (自由度=8)]

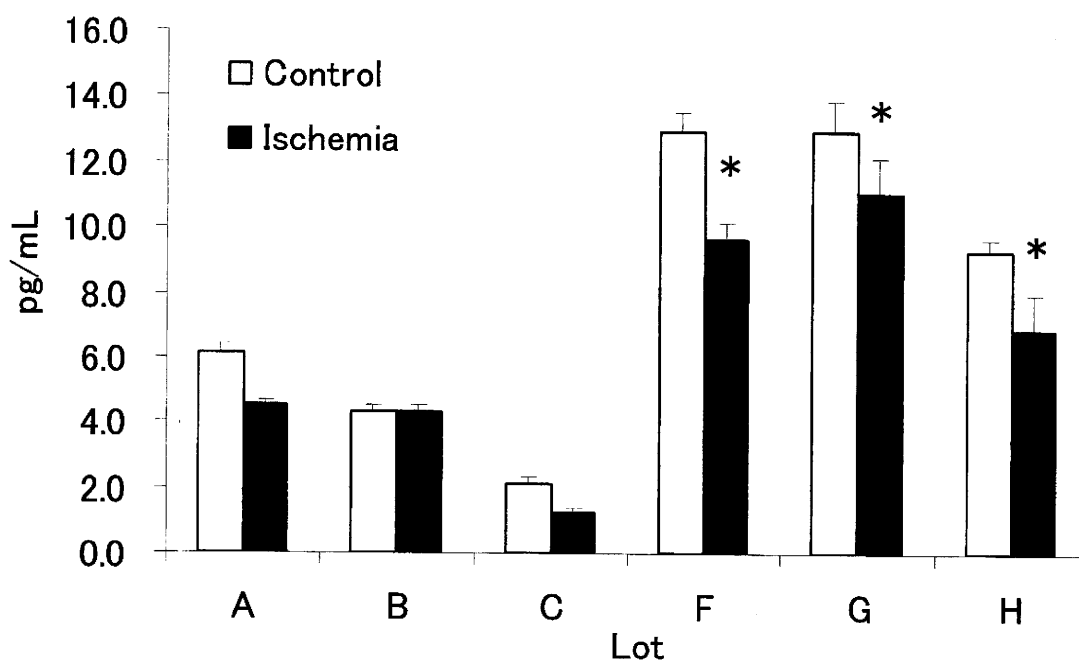


Fig. 30 虚血後におけるhMSCのPIGF分泌量変化

通常条件または擬似的虚血条件培養24時間後における培養上清を用いてPIGF分泌を検討した。縦軸はPIGF濃度を示しており、横軸はロットを示している。

Two-way ANOVAによれば、PIGF分泌量は、hMSCのロット間で有意な差が認められた($p(\text{Lot}) < 0.05$)。

また、ロットF、ロットGおよびロットHについては虚血による有意なPIGF分泌減少が認められた($p(\text{Ischemia}) < 0.05$)。

ただし、虚血とロットとの相互作用については有意な差は認められなかった($p(\text{Lot} \times \text{Ischemia}) = 0.117$)。

[平均値±S.E.M.(n=5)] * $p < 0.05$ vs. Control group of each lot

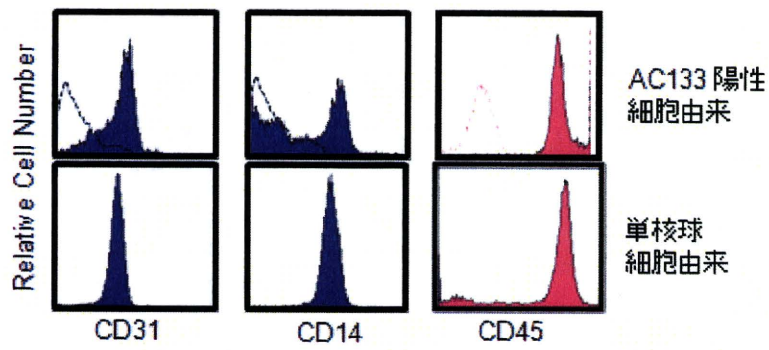


Fig. 31 AC133 陽性細胞及び単核球由来 early EPC の 細胞表面マーカー分子発現の確認

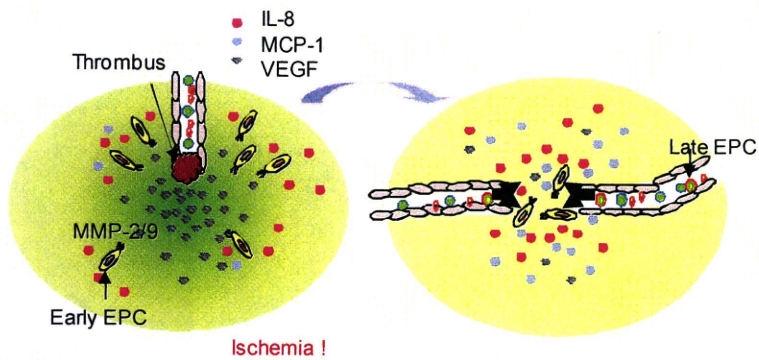


Fig. 32 Early EPC が最も早く虚血部位に浸潤する と考える作業仮説

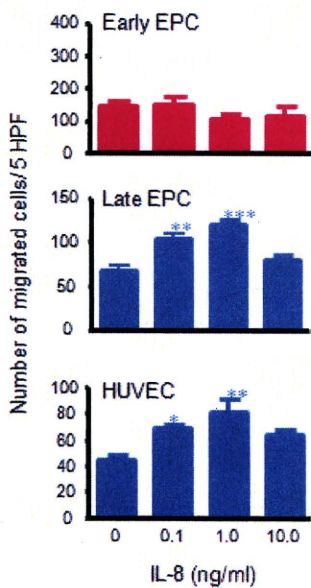


Fig. 33 IL-8 に応答した EPC の遊走

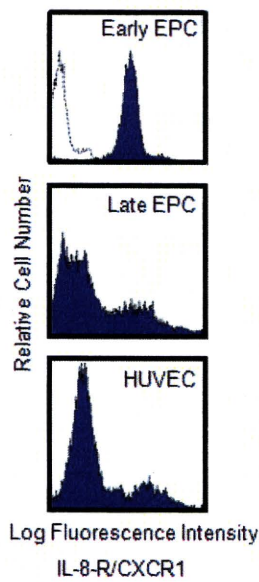


Fig. 34 EPC における IL-8 受容体の発現

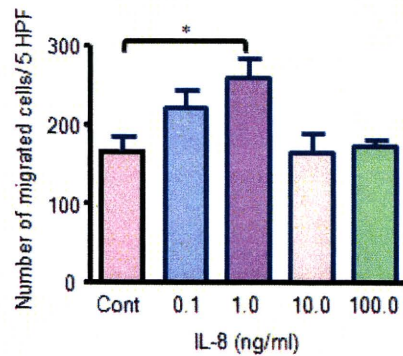


Fig. 35 IL-8 に応答した CD14 陽性細胞の遊走

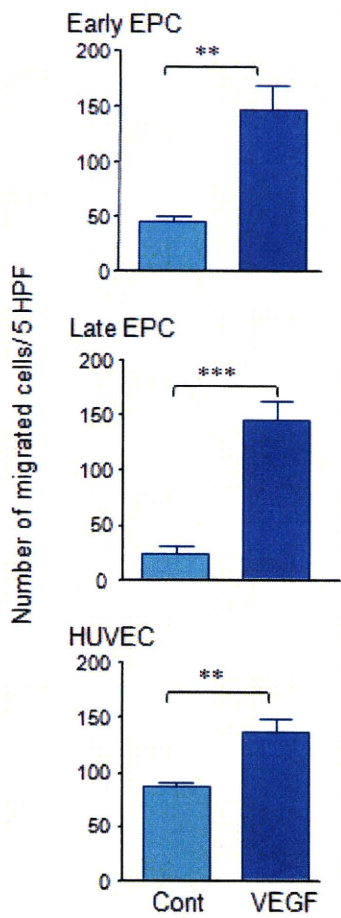


Fig. 36 VEGF に応答した EPC の遊走

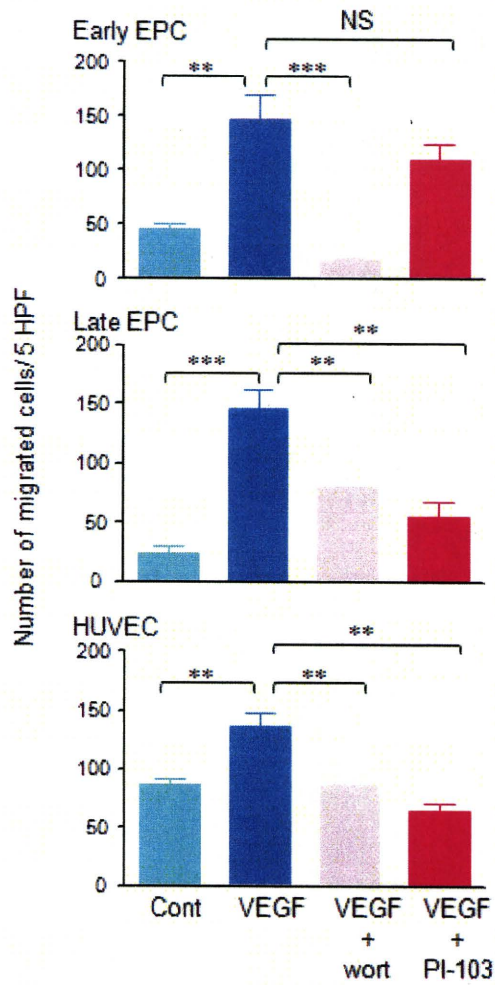


Fig. 37 VEGF により惹起される遊走に対する PI3K 阻害剤の効果

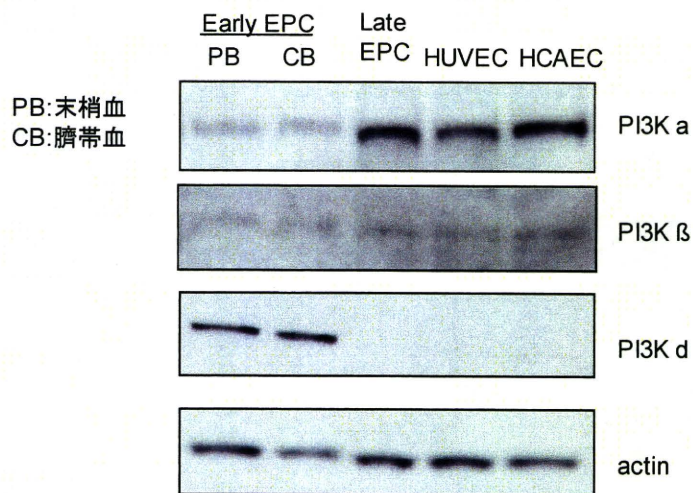


Fig. 38 種々の細胞における PI3K アイソフォームの発現

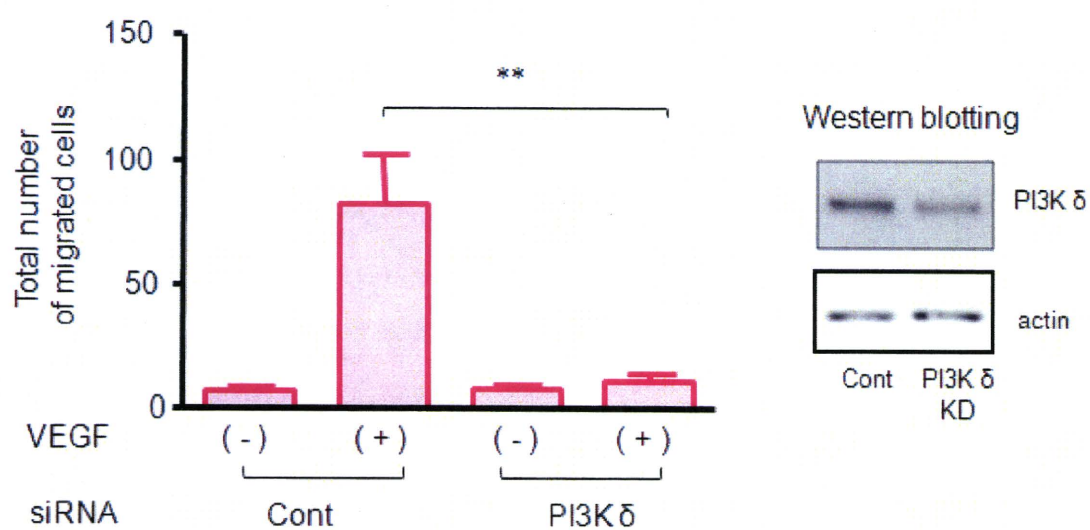


Fig. 39 VEGF に誘導される Early EPC の遊走に対する p110 PI3K δ siRNA の効果

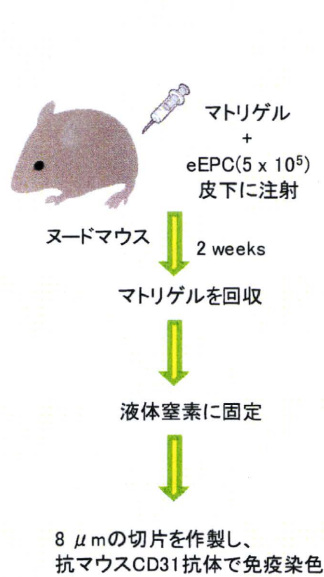


Fig. 40 マトリゲルとともにヌードマウスに移植した eEPC の *in vivo* における血管形成促進効果

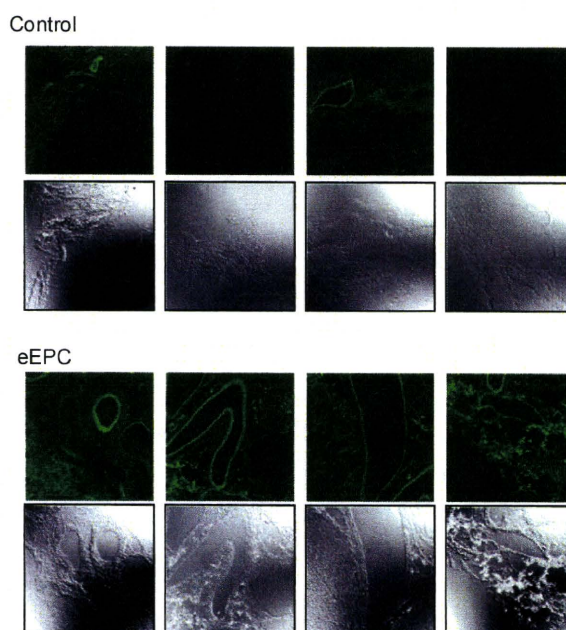


Fig. 41 Early EPC とともに移植したマトリゲル内に観察される宿主マウス由来 CD31 陽性血管内皮細胞

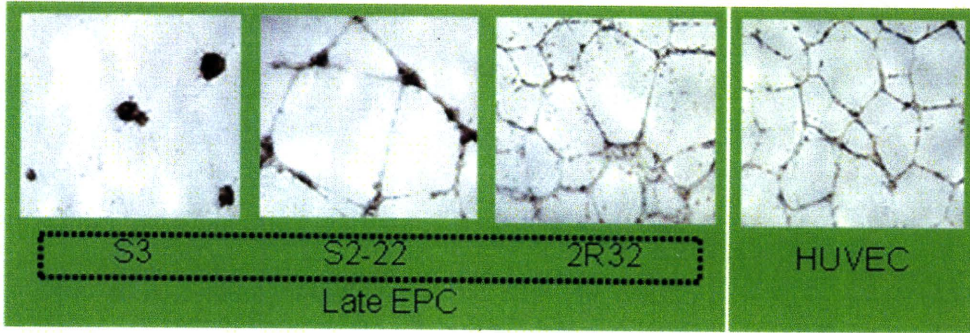


Fig. 42 種々の late EPC の *in vitro* 管腔形成能

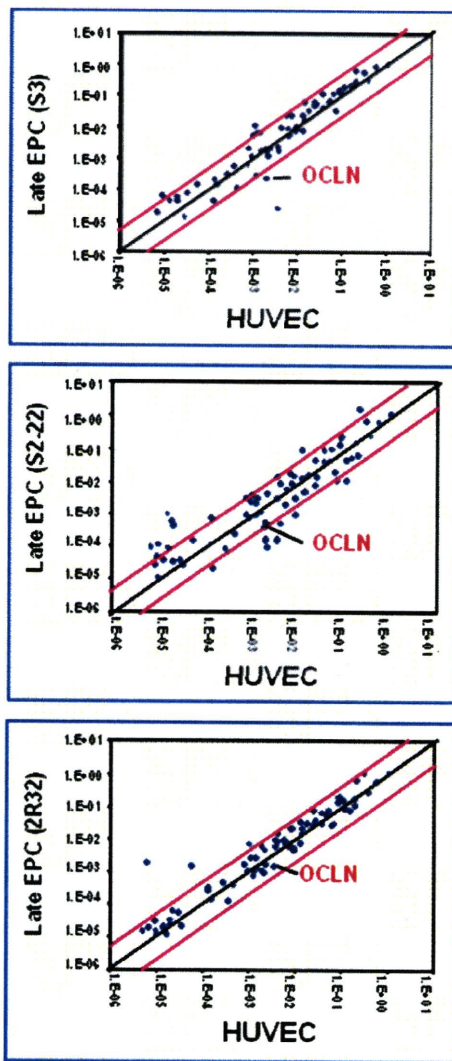


Fig. 43 LateEPC と HUVEC の 遺伝子発現プロファイル比較

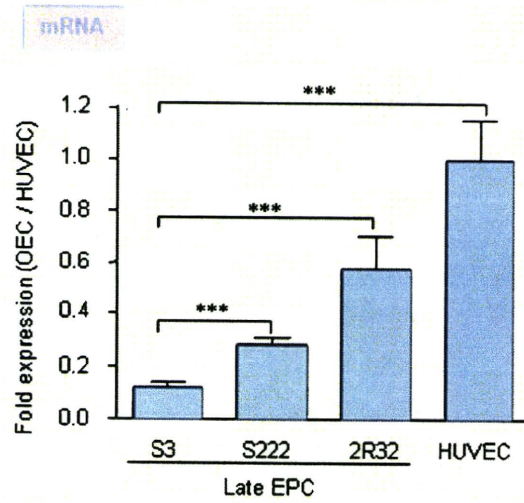


Fig. 44 Late EPC におけるオクルディンの mRNA 及びタンパク質発現

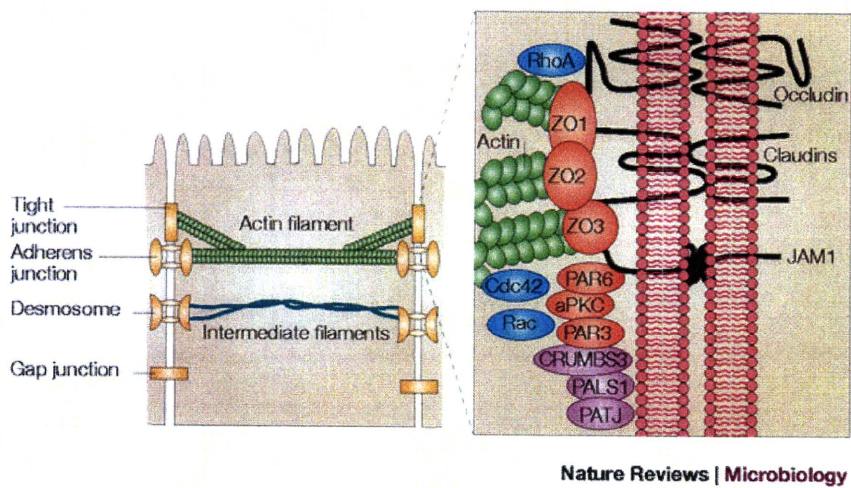


Fig. 45 Tight Junction タンパクとして働くオクルディン

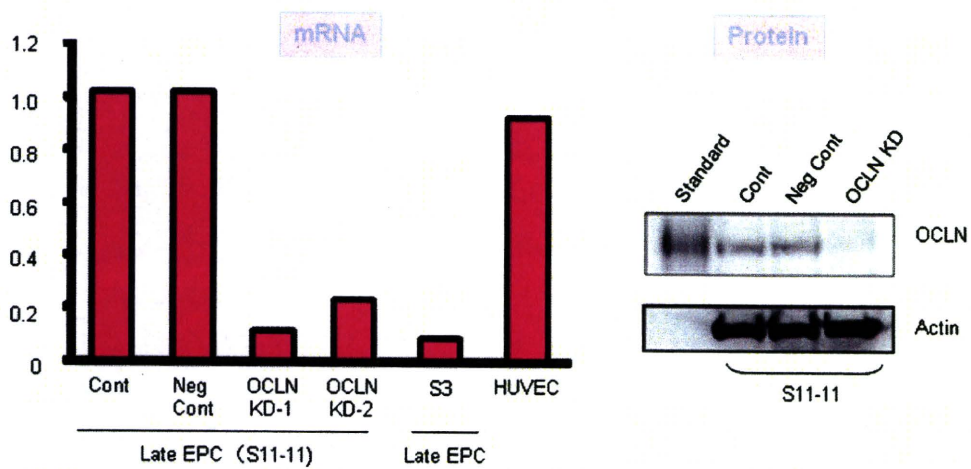


Fig. 46 siRNA 導入によるオクルディンの mRNA 及びタンパク発現の変化

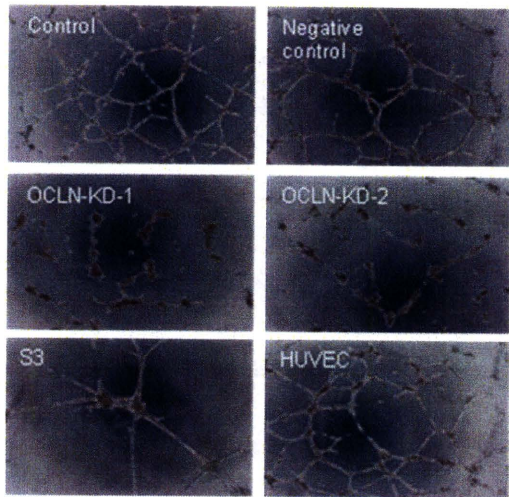


Fig. 47 オクルディン siRNA による管腔形成の抑制

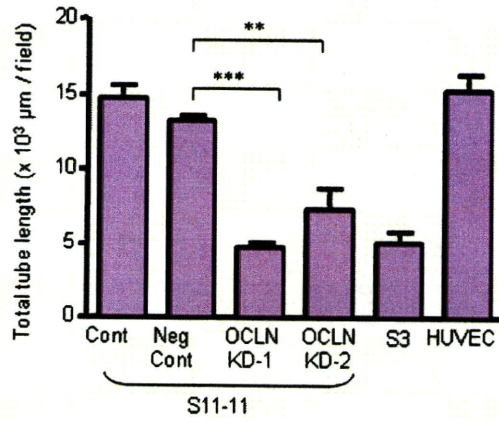


Fig. 48 オクルディン siRNA による管腔形成抑制の定量評価

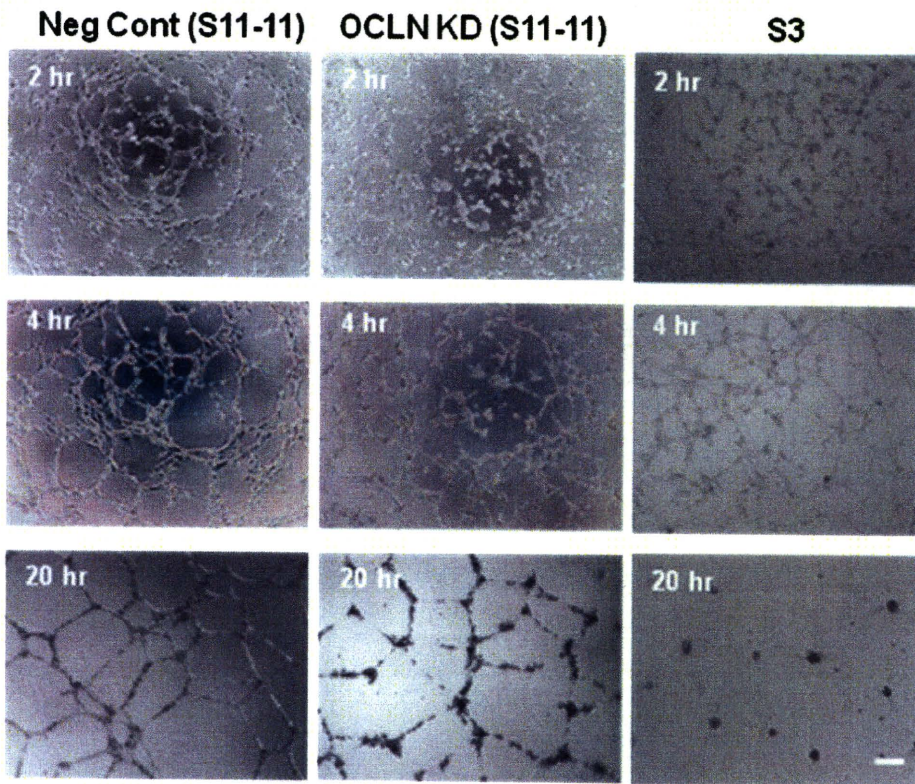


Fig. 49 オクルディン siRNA の管腔形成への影響の経時的観察

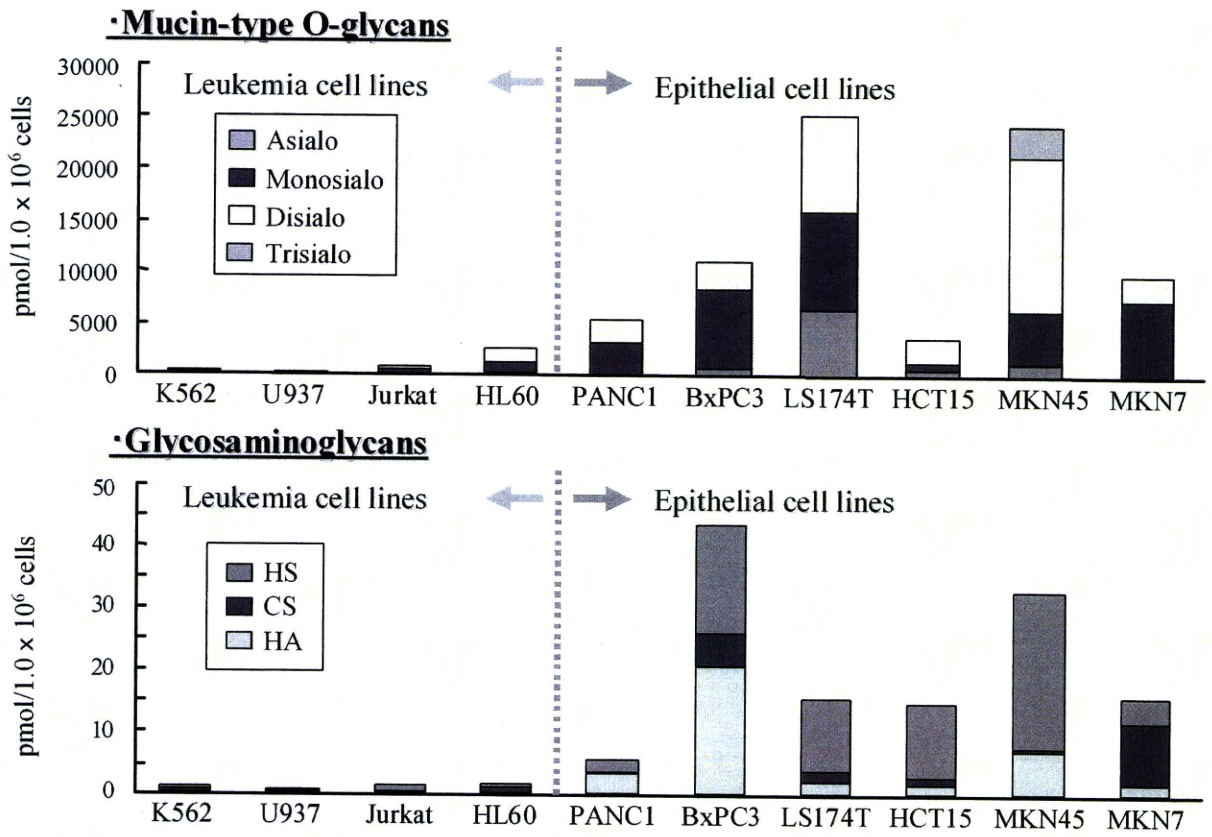
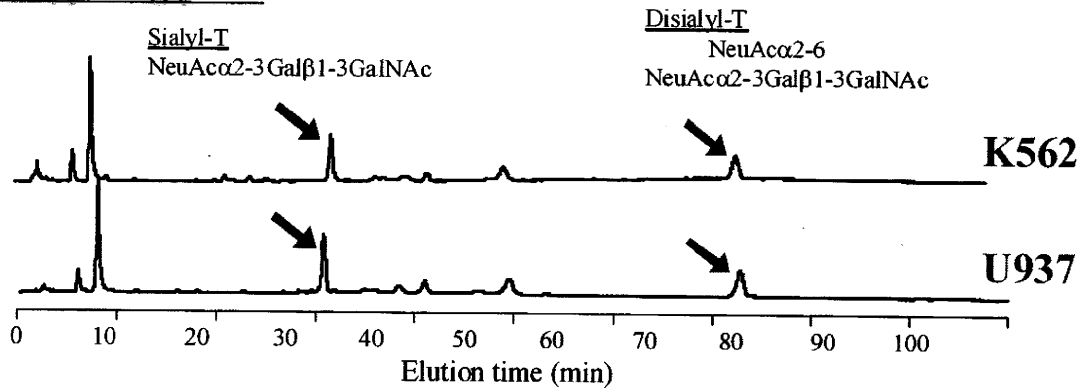


Fig. 50 Comparison of the amounts of O-glycans expressed on cancer cells.

•Mucin-type O-glycans



•Glycosaminoglycans (CS)

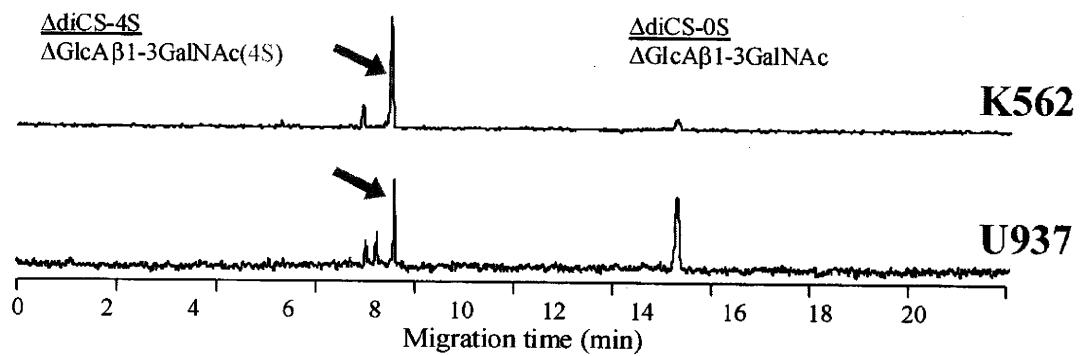
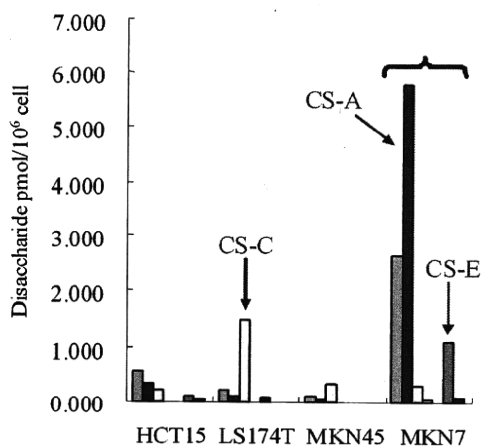


Fig. 51 CE analysis of unsaturated disaccharides from K562 and U937 cell. Analytical conditions; Capillary, fused silica (40 cm x 50 μ m.i.d). Buffer, 100 mM Tris-phosphate buffer (pH 3.0). Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure method (1.0 psi, 10 sec). Temperature, 25 $^{\circ}$ C. Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).

CS/DS Disaccharides



HP/HS Disaccharides

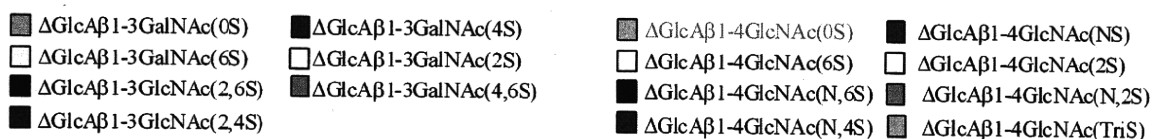
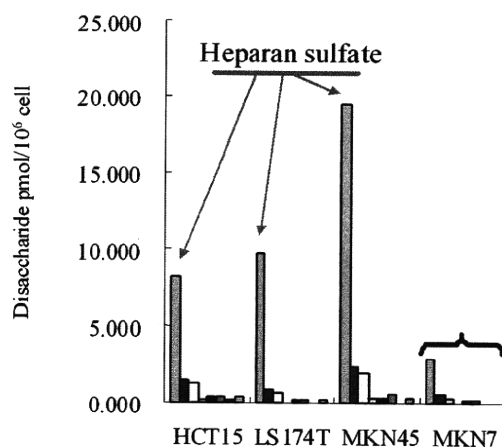


Fig. 52 Comparison of the GAGs expressed on cancer cells

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

細胞組織加工医薬品のウイルス安全性評価技術の開発

研究分担者 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第1室長

再生医療実用化に向けた細胞組織加工医薬品の安全性・品質用の確保に関する基盤技術開発研究の一環として、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を行った。今年度は、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、各パネルのコピー数は、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PCR定量を実施して設定した。今回樹立されたHEV-NAT評価用標準パネルは、今後の公開により幅広い活用が期待される。

研究協力者

山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所
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

の重要な課題のひとつである。細胞組織加工医薬品には原料である細胞、組織に由来するウイルス等の感染性因子や製造工程で用いる血清や添加剤等から迷入する感染性因子による汚染のリスクが存在する。しかし、細胞組織加工医薬品はその性質上、ウイルス等の感染性因子を不活化・除去するための滅菌や高度な精製といった処理を行うことが困難であるため、ウイルス等の感染性因子が混入していると患者や患者の家族等に感染が広がる危険性がある。従って細胞組織加工医薬品ではドナースクリーニング等の検査を行うことによる原材料の安全性確保、及び製造工程中での生物由来原料に由来する汚染リスクの低減が求められる。

A. 研究目的

細胞組織加工医薬品の品質、安全性の確保は細胞組織加工医薬品の本格的実用化へ

本分担研究では、細胞組織加工医薬品の

ウイルスやマイコプラズマなどの感染因子の安全性評価技術の開発に関する研究として、感染性因子の高感度検出技術の開発及び安全性評価技術の開発に関する研究を行うことを目的とする。再生医療製品を含むヒト由来成分を原料とする医薬品のウイルス安全性確保には、核酸増幅検査 (NAT) によるウイルスの高感度検出が採用されているが、NATの実施にはウイルスの標準品や参照パネルを用いた検出法の評価が不可欠である。B型及びC型肝炎ウイルスやヒト免疫不全ウイルスについては既に標準品や参照パネルが国内外で樹立されている。しかし、加熱の不十分なブタ等の内臓肉の摂取により感染して肝炎を起こすE型肝炎ウイルス (HEV) は、最近、輸血によっても感染するケースがあることが明らかにされた人獣共通感染症であるが、HEV(genotype 3)の標準品の策定がWHOで予定されているものの、参照パネルは作成されていない。そこで、今年度は、HEVのNATによる検出の評価に用いる標準パネルの樹立について検討を行った。

B. 研究方法

(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)) を実験感染ブタの糞便より抽出・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。

(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 (ベネシスより供与)。

- 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°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、1mL 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。

(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 μ 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 μ L を使用し、N=3 で実施した。

(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 μ L
20 μ M primer HE86	1 μ L (400nM)
20 μ M primer HE87	1 μ L (400nM)
10 μ M probe	0.5 μ L (100nM)
QuantiTect RT Mix	0.5 μ L
RNase Free Water	12 μ L
RNA	10 μ L
Total	50 μ L

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

(2) 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。

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 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 種類はブタの糞便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、