

Rodent Micronucleus Tests - Past, Present,
and Future -

International Workshop on "Micronucleus
Assays with Buccal Cells for Human and
Environmental Monitoring " (2011.2)
(Tiruchirappalli, India)

押澤正, 豊田淑江, 内田恵理子, 鈴木孝昌, 山
口照英, 鈴木和博

カルシウム結合タンパク質 S100A8 は HL-60 細
胞の好中球様分化において増殖・分化に重要な
働きをする (その3)

第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生
化学会大会 合同大会 (2010.12) (神戸)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1 検出された間葉系幹細胞特異的 CD 抗原の 2 次元マップ上の位置

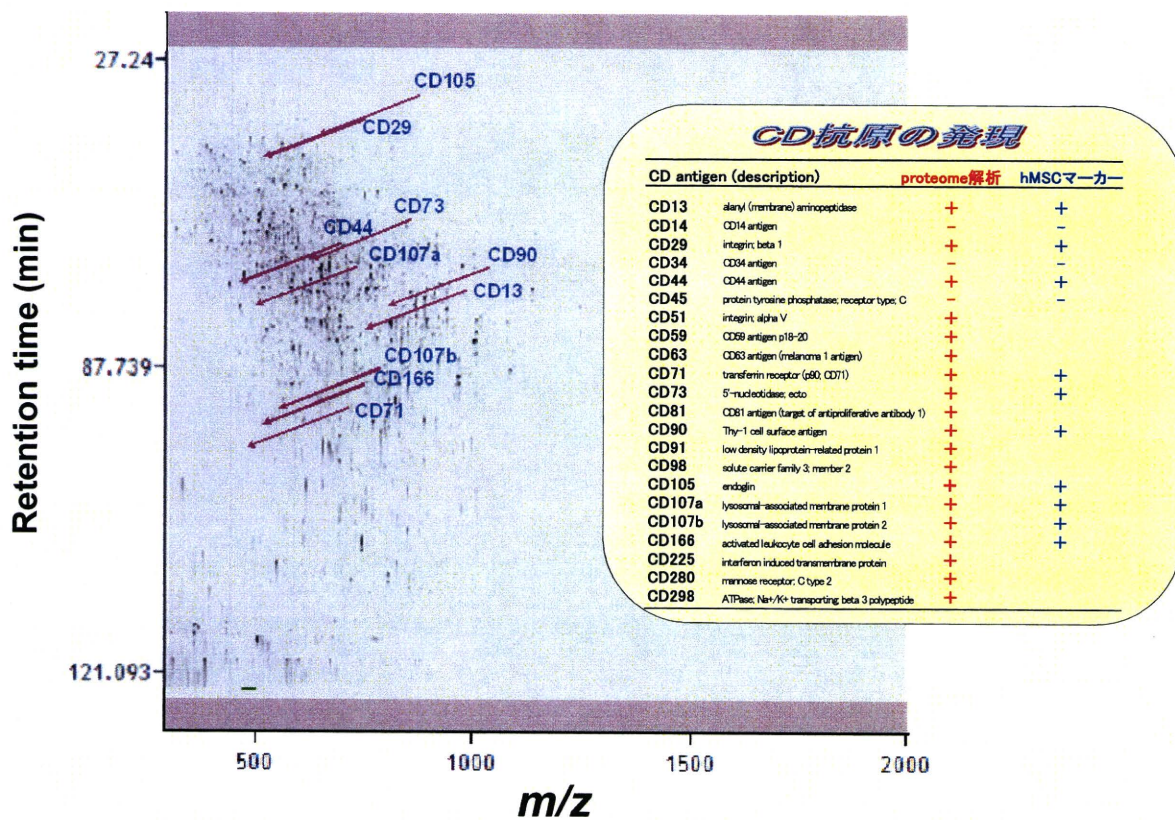


図2 安定同位体ラベルペプチドのピークプロファイル

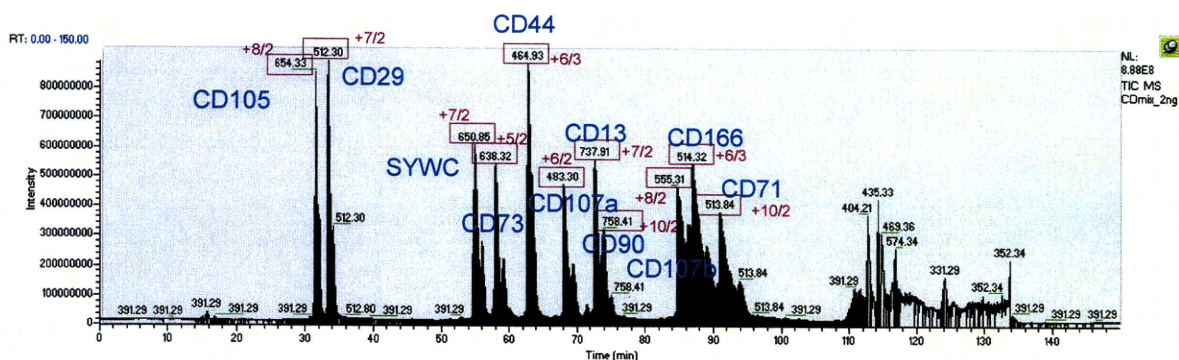


図3 hMSC 由来ペプチドにラベル CDmix を添加した際の LC-MS ピークプロファイル

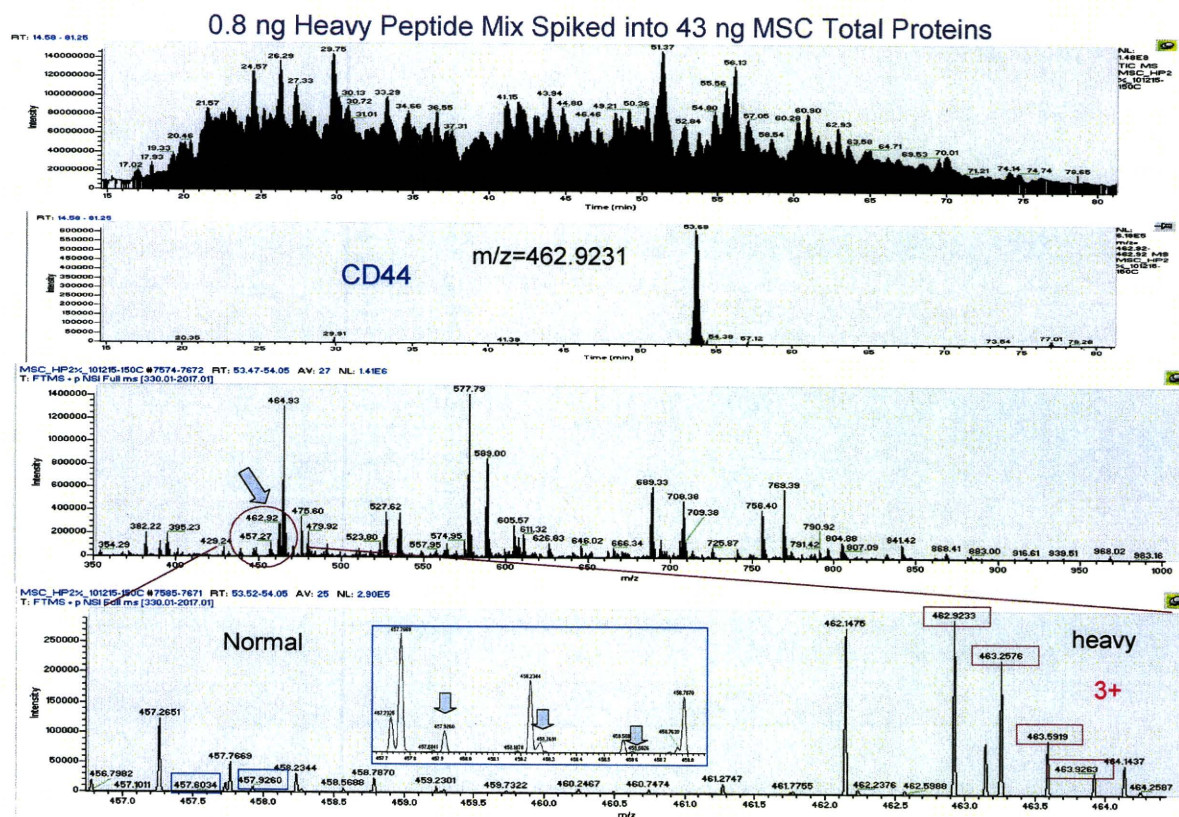


表 1 同定した CD 分子種と安定同位体導入合成ペプチドの質量

CD分子種	タンパク名	アミノ酸配列(ラベル)	Original m/z	Heavy m/z
SYWC	継代で発現が上昇するタンパク質	PNSSIF(L)TDTAK	647.33 (+2)	650.85
CD13	alanyl (membrane) aminopeptidase	YLSYT(L)NPD LIR	734.40 (+2)	737.91
CD29	integrin; beta 1	SAVTTVVNP(K)	508.29 (+2)	512.30
CD44	CD44 antigen	YGFIEGH(V)VIPR	462.92 (+3)	464.93
CD71	transferrin receptor (p90; CD71)	ILNI(F)GVIK	508.83 (+2)	513.84
CD73	5'-nucleotidase; ecto	Y(P)FIVTSDDGR	635.83 (+2)	638.32
CD90	Thy-1 cell surface antigen	VTSLTACLVDQSL(R)	753.39 (+2)	758.41
CD105	endoglin	GEVTTYTSQVS(K)	650.33 (+2)	654.33
CD107a	lysosomal-associated membrane protein 1	(P)SLVIAFGR	480.29 (+2)	483.30
CD107b	lysosomal-associated membrane protein 2	YLDVFVAV(K)	551.30 (+2)	555.31
CD166	activated leukocyte cell adhesion molecule	VLH(P)LEGAVVIFK	512.32 (+3)	514.32

¹³Cおよび¹⁵Nで標識

表 2 hMSC (Lot # E-9)の CD 抗原定量結果

antigen	Normal (m/z)	abundance	Heavy (m/z)	abundance	Ratio	Amount (pg/ng protein)
CD13	734.40	55500	737.90	287000	0.193	0.327
CD29	508.29	457000	512.30	5570000	0.082	0.139
CD44	462.92	253000	464.93	1190000	0.213	0.360
CD71	503.83	6450 *	513.84	260000 *	0.025	0.042
CD73	635.83	67100	638.32	1990000	0.034	0.057
CD90	753.39	966 *	758.41	47200 *	0.020	0.035
CD105	650.33	129000	654.33	3860000	0.033	0.057
CD107a	480.29	33400	483.29	125000	0.267	0.452
CD107b	551.30	9630	555.31	212000	0.045	0.077
CD166	512.32	27500	514.32	26900	1.022	1.729

* measured by the peak height in raw data

細胞組織加工医薬品の同等性評価技術の開発

分担研究者 川崎ナナ（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長）

協力研究者 橋井則貴（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第一室長）

研究要旨 幹細胞を用いた再生医療の実用化には、分化細胞を評価する技術の開発が不可欠である。我々はこれまで、LC/MSにより得られた糖鎖プロファイルを幹細胞分化の評価に利用することを検討してきた。本年度は、糖鎖プロファイリングに主成分解析（PCA）を組み合わせることで、間葉系幹細胞（MSC）、神経様分化細胞及び骨分化細胞が分離してプロットされることを見出した。糖鎖プロファイリングとPCAを組み合わせた方法は、MSCの分化程度を評価する方法として期待される。

A. 研究目的

幹細胞を培養・加工して様々な疾患の治療に用いる細胞組織加工医薬品の開発が活発化している。一方で、本格的な実用化のためには、幹細胞を分化させた細胞（加工細胞）が目的とする方向に分化していることを確認するための指標を確立し、未分化幹細胞と加工細胞を識別する技術を開発することが求められている。

糖鎖は、細胞の分化や増殖等の様々な生命現象に伴い変化することが報告されており、加工細胞の指標として利用できる可能性が高い。昨年度は、液体クロマトグラフィー／質量分析（LC/MS）及び同位体ラベル化法を組み合わせた定量的糖鎖プロファイリングにより、多能性幹細胞の一つであるヒト骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）とMSCの神経様分化細胞において、一部のN結合型糖鎖の結合量に差がみられることを明らかにした。そこで本年度は、

LC/MSによる糖鎖プロファイリングとPCAを組み合わせた方法について、分化程度の評価法としての有用性を検討した。

略号：Fuc, フコース; dHex, デオキシヘキソース; Hex, ヘキソース; HexNAc, N-アセチルヘキソサミン; NeuNAc, N-アセチルノイラミン酸; Lac, N-アセチルラクトサミン。

B. 研究方法

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。

2. 細胞培養及び分化誘導

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%CO₂, 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 2×10^5 の細胞を播種して継代培養を行った。

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、 2×10^5 個の MSC を 24 時間培養 (5%CO₂, 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。

2-3) 骨細胞への分化誘導

骨分化誘導基礎培地は α -MEM 培地 (α -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、 4.2×10^3 cell/cm² 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%CO₂, 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。

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。

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 μ g) を 50 μ 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 μ 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 μ 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。

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 μ g) を 200 μ 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。

5. 還元化糖鎖の調製

乾燥糖鎖試料を 500 μ l の 0.5 M NaBH₄ 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 H₂O 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 H₂O 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。

6. 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 μ 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 \times 5.0 mm, 粒子径 7 μ m, 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：2.5ekV

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%

7. 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。

C. 結果

1. 細胞分化の確認

研究方法 2-2) に示した方法に従い、MSC (図 1A) 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。図 1B 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(図 1C)。

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

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 ～MS/MS/MS/MS により分析した。図 2A 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～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、19～21 分、20～21 分、及び 21～23 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、0～2 分子の NeuNAc と 0～1 分子の Fuc が付加した 2 本鎖糖鎖、0～4 分子のシアル酸と 0～1 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、20～32 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(図 2B, 2C)。

2-2. 糖鎖分布の比較

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(図 3)。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)、1~3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1~3分子のシアル酸及び1~2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(図 4)。

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(図 5)。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(図 6)。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。

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 (図 4) 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 (図 7A) 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 (図 7B)。

つぎに、MSC 及び骨分化細胞の糖鎖分布の比較 (図 6) 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 (図 8A, 8B)。

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 (図 9)。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 (図 9A)。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 (図 9B)。

D. 考 察

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 を神経様細胞に分化させると、dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1 及び dHex1Hex6HexNAc5NeuNAc1-3 の結合量が増加すること、及び Hex6HexNAc5NeuNAc3-4 が減少することを明らかにした。この結果は、昨年度に実施した定量的糖鎖プロファイリングの結果とよく一致していた。一方、神経細胞に特徴的に発現している糖鎖として、HNK-1 糖鎖やポリシアル酸付加糖鎖が知られているが (Morita, I., *et al. J. Biochem.*, 2008; Yanagishita, M., *et al. Glycobiology* 2007)、それらの糖鎖は検出されなかった。HNK-1 糖鎖やポリシアル酸付加糖鎖は、神経回路形成や神経細胞接に関係することが示唆されていることから、本研究で調製した神経様分化細胞は、機能的には未成熟な段階の細胞である可能性が示唆された。

MSC 及び骨分化細胞の糖鎖構造及び分布の変化については、(Heiskanen, A., *et al. Glycoconj. J.*, 2009) らが、MSC を骨分化させると、高マンノース型糖鎖の結合量が減少し、dHex0-1Hex5HexNAc4、dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1 及び dHex0-1Hex6HexNAc5 の結合量が増加することを明らかにしている。本研究では、dHex0-1Hex5HexNAc4、dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1 及び

Hex6HexNAc5 については同じ傾向を示したが、高マンノース型糖鎖及び dHex1Hex6HexNAc5 の変化はみられなかった。さらに、本研究で最も変化のみられた Hex6HexNAc5NeuNAc3-4 は Heiskanen らの報告では検出されていなかった。この原因としては、MSC の細胞株や分化誘導法等の違いが考えられた。

2. PCA による細胞の識別

本研究では、糖鎖分布の比較に使用した糖鎖のピーク面積情報を用いて PCA を行い、分化前後の細胞の識別を試みた。スコアプロットにおいて、神経様分化細胞及び骨分化細胞は MSC とは異なる位置にプロットされることが確認され、LC/MS による糖鎖解析法と PCA を組み合わせた手法は、幹細胞と加工細胞の識別方法として有用であることが確認された。

E. 結論

LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングにより、MSC、神経様分化細胞及び骨分化細胞では糖鎖プロファイルが異なることを確認した。さらに糖鎖プロファイルについて PCA を行うことにより、MSC、神経様分化細胞及び骨分化細胞は異なる位置にプロットされることを確認した。N 結合型糖鎖の分布は、MSC 由来加工細胞の分化指標として有用であり、LC/MS による糖鎖プロファイリングと PCA を組み合わせた方法は、MSC の分化を評価する方法として利用できることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Hashii, N., Huang, X., Kawasaki, N., Yamaguchi, T.: Differential glycan analysis during neural differentiation of human mesenchymal stem cells by quantitative glycan profiling using liquid chromatography/mass spectrometry. The 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010) 幕張 (2010. 8, 1-6)
- 2) Hashii, N., Huang, X., Yamaguchi, T., Kawasaki, N.: Identification of cell therapeutic products from stem cells based on glycans. 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会合同大会 神戸 (2010. 12, 7-10)
- 3) Hashii, N., Huang, X., Kawasaki, N., Yamaguchi, T.: Quantitative glycan analysis during neural differentiation of human mesenchymal stem cells by liquid chromatography/mass spectrometry. The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies Honolulu (2010. 12. 15-20)

H-1.

実用新案登録 なし

H-2.

その他 該当事項なし

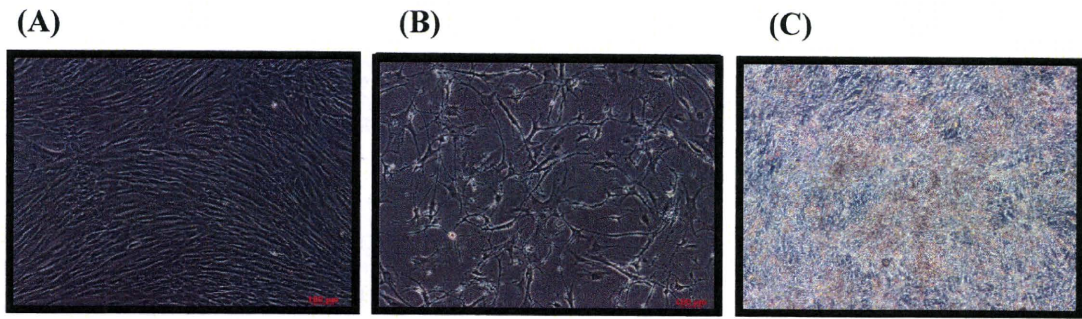


図 1 MSC (A), 神経様分化細胞 (B)及び骨分化細胞 (C) の顕微鏡写真

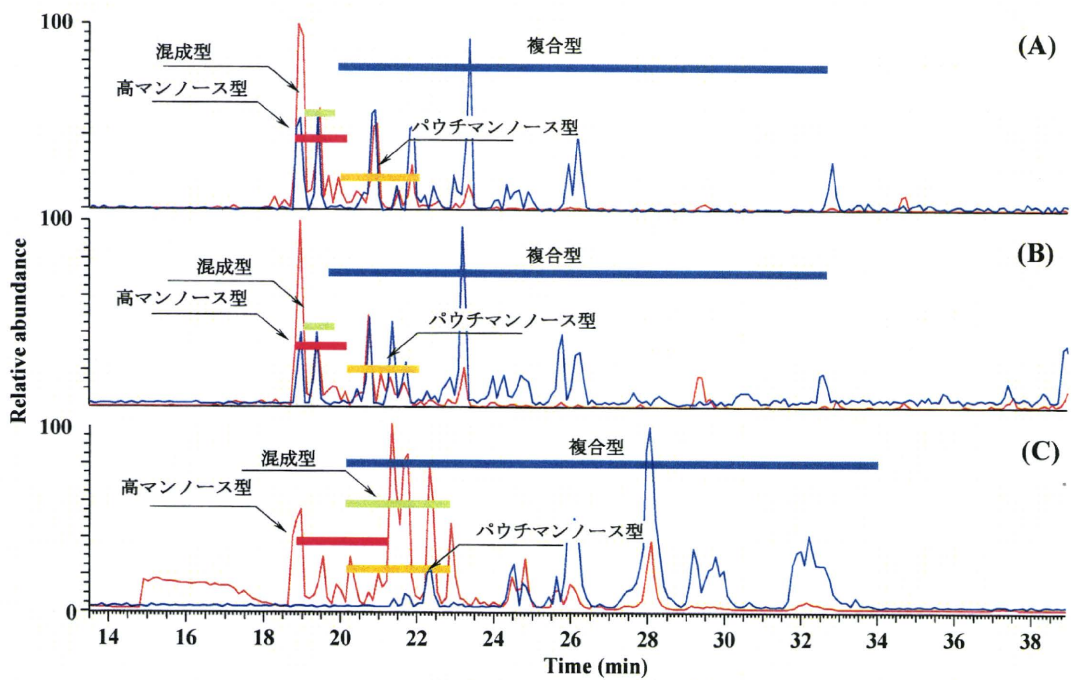
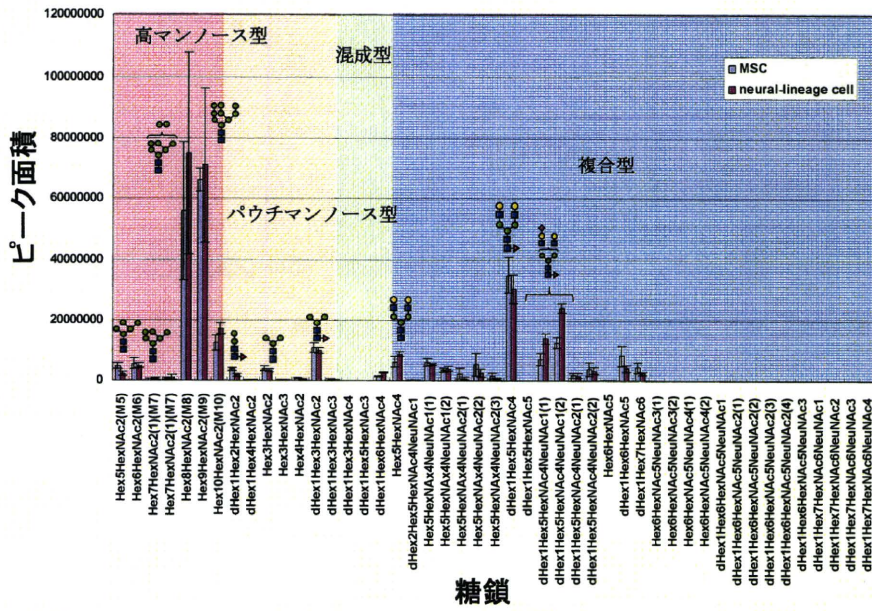
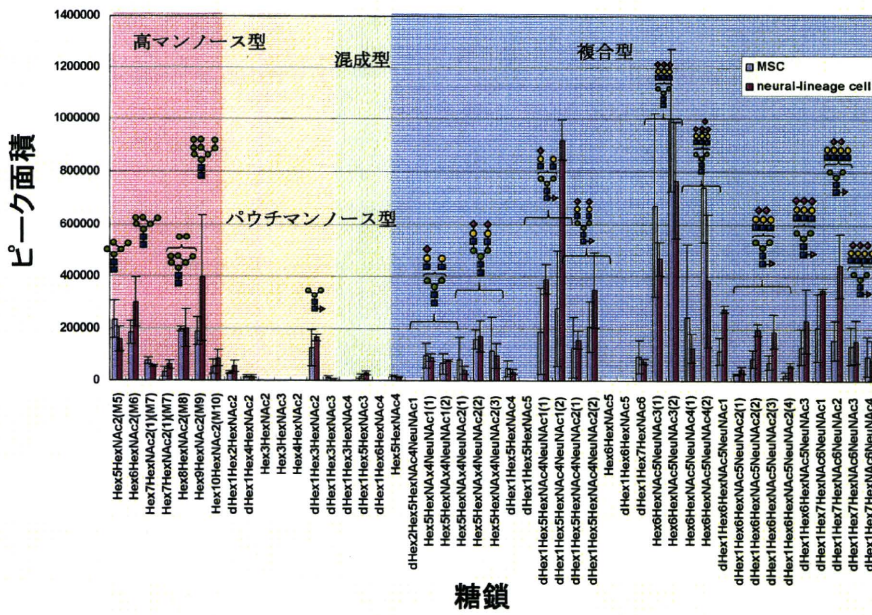


図 2 MSC (A), 神経様分化細胞 (B)及び骨分化細胞 (C) のベースピーククロマトグラム。
赤線, ポジティブイオンモード; 青線, ネガティブイオンモード。



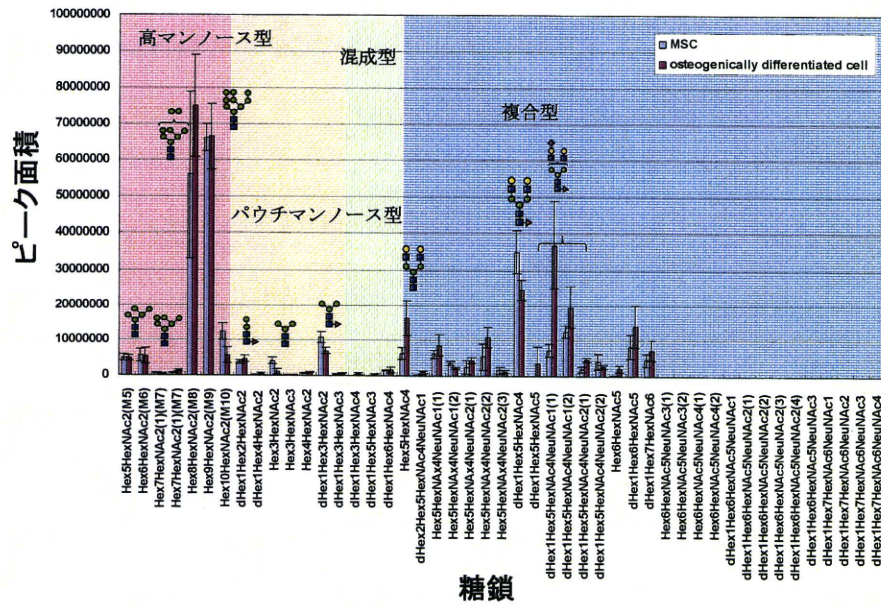
● galactose; ● mannose; ■ N-acetylglucosamine; ▲ fucose; ◆ N-acetylneuraminic aci

図3 MSC および神経様分化細胞の糖鎖分布の比較
(ポジティブイオンモード)



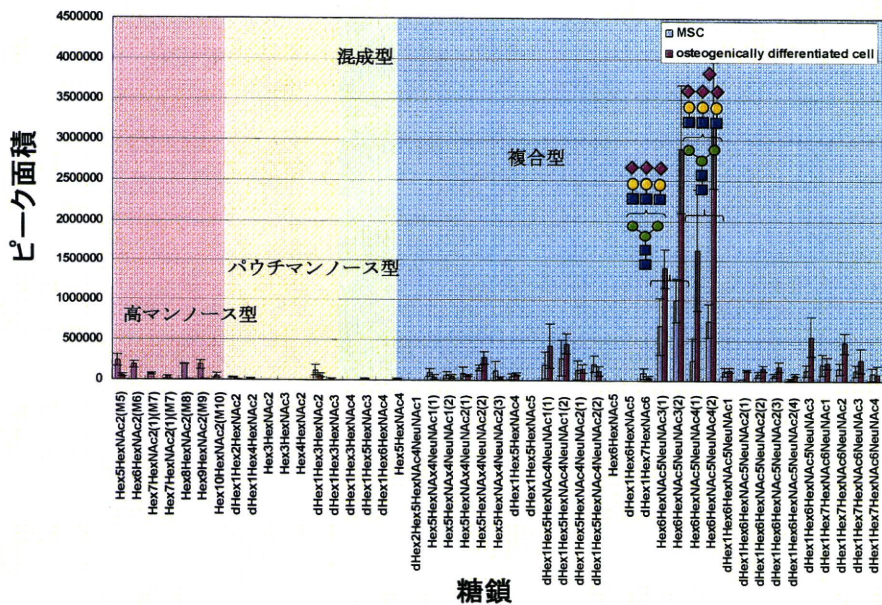
● galactose; ● mannose; ■ N-acetylglucosamine; ▲ fucose; ◆ N-acetylneuraminic aci

図4 MSC 及び神経様分化細胞の糖鎖分布の比較
(ネガティブイオンモード)



● galactose; ● mannose; ■ N-acetylglucosamine; ▲ fucose; ◆ N-acetylneuraminic acid

図 5 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)



● galactose; ● mannose; ■ N-acetylglucosamine; ▲ fucose; ◆ N-acetylneuraminic acid

図 6 MSC 及び骨分化細胞の糖鎖分布の比較
(ネガティブイオンモード)

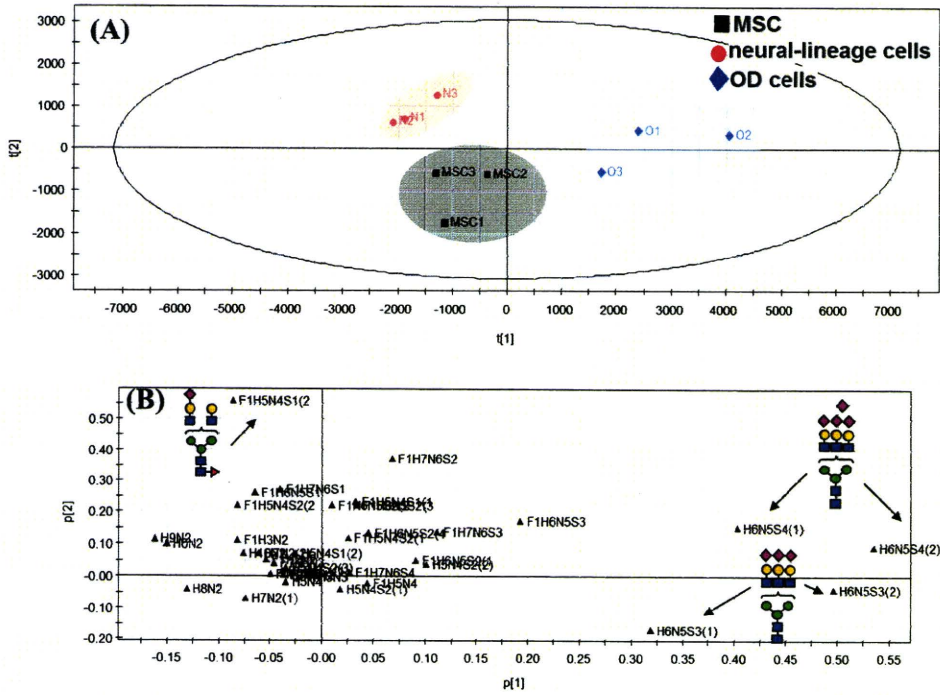


図9 PCAによるMSC, 神経様分化細胞及び骨分化細胞の識別
 (A), スコアプロット; (B), ローディングプロット

分担研究報告書

細胞組織加工医薬品の免疫学的安全性評価に関する基盤技術開発

分担研究者 川端 健二

独立行政法人 医薬基盤研究所

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

本研究は、細胞組織加工医薬品等の免疫原性を事前に試験する評価法の開発を目指して、ヒト血液系を有したマウスの作製、および当該マウスモデルによる免疫原性評価システムの基盤技術開発を行う。外来造血幹細胞の移植効率を向上する目的でケモカイン CXCL12 を発現するアデノウイルス (Ad) ベクター (Ad-CXCL12) をマウスに投与してレシピエントの骨髄環境を操作後に骨髄細胞を移植した際の移植効率について解析を行った。また、VEGF 発現 Ad ベクター投与後の造血幹細胞、血液前駆細胞の動態についても解析を進めた。さらに多能性幹細胞由来血液細胞を細胞加工医薬品のモデルとして使用するため、ES 細胞や iPS 細胞から血液細胞への高効率分化誘導法の確立を試みた。

A. 研究目的

ヒトまたは動物の細胞や組織を利用して製造される細胞組織加工医薬品は、有効な治療手段の少ない疾患の有望な治療薬になると考えられている。しかしながら、細胞組織加工医薬品は多くの未知な要素が含まれており、実用化に至るために検討すべき課題は多い。なかでも、細胞治療薬の抗原性（免疫原性）を試験する評価系の確立が望まれているため、本研究では、ヒト血液系を有したマウスの作製、および当該マウスモデルによる免疫原性評価システムの基盤技術開発を行う。ヒト血液系を有するマウスを作製するためには、外来造血幹細胞を骨髄中の造血幹細胞がいるべき場所（ニッチ）に生着させる必要がある。したがって、内因性の造血幹細胞をニッチから遊離

研究協力者

水口裕之 (独) 医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科

櫻井文教 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

させることにより外来造血幹細胞の生着率は向上すると考えられる。

昨年度までに、ヒト血液系を有したマウスを効率良く作製することを目指し、CXCL12 発現アデノウイルス (Ad) ベクターの作製および Ad ベクター投与後の内在性血液細胞の動態について解析した。その結果、血漿 CXCL12 濃度を上昇させることにより、骨髓中の造血幹細胞、血液前駆細胞が末梢へ遊離することが明らかとなるだけでなく、B 前駆細胞も骨髓から遊離していることが明らかとなった。また、vascular endothelial growth factor (VEGF) 発現 Ad ベクターを作製してマウスへ投与したところ、血中 VEGF 濃度を 100 ng/mL まで上昇させることが可能であることを示した。そこで本年度は、Ad-CXCL12 投与後に外来骨髓細胞を移植した際の移植効率について解析を行った。また、VEGF 発現 Ad ベクターをマウスへ投与することにより、骨髓中の血液細胞の動員が認められるか否か検討した。また、ES 細胞や iPS 細胞等の多能性幹細胞由来の血液細胞は細胞組織加工医薬品のモデルとなり得ることから、本年度では、マウス ES、iPS 細胞から血液細胞への分化誘導法の確立を目指した。

B. 研究方法

B-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 5×10^{10} VP (vector particles) の Ad-CXCL12、または 1×10^9 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-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-3. 骨髓細胞の移植

C57BL/6 ♀マウス (8 週) の尾静脈内に、1 匹あたり 5×10^{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髓細胞を回収し、1 匹あたり 1×10^7 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 ヶ月後に骨髓細胞を回収し、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. 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 1×10^6 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 4×10^4 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-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 β -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-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-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 50ng/mL, Flt-3L 50ng/mL, TPO 10ng/mL, IL-3 5ng/mL, IL-6 5ng/mL、全て Peprotech 社から購入) 中にて血液細胞を誘導した。

C. 研究結果

C-1. Ad-CXCL12 投与マウスへの骨髓細胞の移植

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髓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髓細胞を移植した