

201006005B (1/2)

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20～22年度 総合研究報告書 - 1

研究代表者 山口 照 英

平成23(2011)年 5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20～22年度 総合研究報告書 - 1

研究代表者 山口 照 英

平成23(2011)年 5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・・・ 219
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・・・ 241
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・・・ 287
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・・・ 315
川端 健二
5. 細胞組織加工医薬品の造腫瘍性・異常増殖性評価技術の開発に関する研究・・・ 339
佐藤 陽治
6. 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・・・ 363
佐藤 陽治
7. 細胞組織加工医薬品の特性解析・品質管理に関する研究・・・ 399
石井 明子
8. 人工多能性幹細胞の品質・安全性に関する研究・・・ 425
山中 伸弥
9. 細胞特性・品質解析技術としての糖鎖解析技術の開発・・・ 431
早川 堯夫

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・ 459

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・ 475

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
部長（平成 20・21 年度）／客員研究員（平成 22 年度）

研究要旨

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)** ウイルス安全性評価技術の開発に関する研究として、B 型肝炎ウイルスの濃縮・高感度検出法の開発、パルボウイルス B19 の *in vitro* 持続感染系の確立、E 型肝炎ウイルスの核酸増幅検査用標準パネルの樹立を行った。また、マイコプラズマの迅速検査法として PCR 法 3 種類と酵素活性に基づく方法について品質管理試験としての有用性を評価した。**2)** ヒト骨髄間葉系幹細胞(MSC)における、クローナルな染色体異常の検出とその発生時期の解析を行い、細胞の造腫瘍性評価の上での染色体解析の重要性を示した。また、ナノ LC-MS を用いたハイスループットな高感度プロテオーム解析が可能となり、MSC に特徴づける表面 CD マーカーを網羅的に検出・定量できることを明らかにした。**3)** 細胞組織加工医薬品の同等性評価法の開発の一環として、培養条件が異なる MSC の糖鎖プロファイリングを行い、神経様ないし骨様分化前後で発現量に顕著な差がみられる糖鎖に関して主成分分析(PCA)が、分化の評価する方法として利用可能であることを見出した。**4)** 細胞組織加工医薬品の免疫原性評価系を確立するための基盤技術として、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開発を行うことを目的とし、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。**5)** 細胞組織加工医薬品の造腫瘍性・異常増殖性の評価技術の開発に関する研究として、ハイスループットに改良された軟寒天コロニー形成試験法のバリデーションを行った。**6)** 細胞特性評価指標の探索法開発として DNA マイクロアレイを応用し、通常培養時の発現量が 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。**7)** 細胞・組織加工医薬品の品質指標の探索の一環として、2 つのヒト血管内皮前駆細胞 (early EPC 及び late EPC) の特性指標の探索を行い、MMP-9 及び MMP-2 が early EPC の浸潤能に関連した機能的特性指標であることを明らかにすると共に、late EPC の管腔形成へのオクルディンの関与と機能指標としての有用性を明らかにした。**8)** 細胞組織加工医薬品の原材料としての人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の同一性・同等性評価法および特性解析法の開発を目的とし、様々な年齢の日本人の線維芽細胞から樹立した iPS 細胞を解析し、形態学的特徴、ES 細胞マーカー、

細胞表面抗原、分化能の点で、ほぼ同様であり、ES細胞の特性と類似していることを明らかにした。また、ヒトiPS細胞の細胞表面抗原に基づく細胞評価法や、DNAマイクロアレイによる特性解析法について、基礎的知見を得た。9) 細胞の糖タンパク質糖鎖解析技術を再生医療実用化のための細胞特性解析技術に応用することを検討した。具体的には、O-結合型糖鎖であるムチン型糖鎖とグリコサミノグリカン (GAG) 型糖鎖を一斉解析し、包括的にO-結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリングを行う技術を開発し、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
山中 伸弥	京都大学・物質・細胞統合システム拠点/再生医科学研究所・教授
中川 誠人	京都大学・再生医科学研究所・助教
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）

佐藤 功栄	埼玉県赤十字血液センター
岩田 明子	埼玉県赤十字血液センター
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・ティルハッティ	国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部
田邊 思帆里	国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部（安全情報部）・研究員
宮澤 明史	国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部・研究生（星薬科大学・修士課程）
小木 美恵子	金沢工業大学・情報フロンティア学部・教授
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	国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部・研究生（東邦大学大学院薬学研究科・修士課程）
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
鈴木 浩子	慶応義塾大学大学院薬学研究科／国立衛研生物薬品部
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、特定の有用細胞を複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い、以下の成果が得られた：

1) 細胞組織加工医薬品のウイルス安全性評価技術の開発

ウイルス安全性評価技術の開発に関する研究として、B型肝炎ウイルスの濃縮・高感度検出法の開発、パルボウイルス B19 の *in vitro* 持続感染系の確立、E型肝炎ウイルスの核酸増幅検査用標準パネルの樹立を行った。また、マイコプラズマの迅速検査法としてPCR法3種類と酵素活性に基づく方法について品質管理試験としての有用性を評価した。

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

ヒト骨髄間葉系幹細胞(MSC)における、クローナルな染色体異常の検出とその発生時

期の解析を行った。また、ナノ LC-MS を用いたハイスループットな高感度プロテオーム解析が可能となり、MSC に特徴的な表面 CD マーカーを網羅的に検出・定量できることを明らかにした。

3) 細胞組織加工医薬品の同等性評価技術の開発

細胞組織加工医薬品の同等性評価法の開発の一環として、培養条件が異なる MSC の糖鎖プロファイリングを行い、神経様ないし骨様分化前後で発現量に顕著な差がみられる糖鎖に関して主成分分析(PCA)を行うことにより 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) 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

細胞組織加工医薬品の免疫原性評価系を確立するための基盤技術として、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開発を行うことを目的とし、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。

5) 細胞組織加工医薬品の造腫瘍性・異常増殖性評価技術の開発に関する研究

細胞組織加工医薬品の造腫瘍性・異常増殖性の評価技術の開発に関する研究として、ハイスループットに改良された軟寒天コロニー形成試験法のバリデーションを行った。

6) 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

細胞特性評価指標の探索法開発として DNA マイクロアレイを応用し、通常培養時の発現量が 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。

7) 細胞組織加工医薬品の特性解析・品質管理に関する研究

細胞・組織加工医薬品の品質指標の探索の一環として、2 つのヒト血管内皮前駆細胞 (early EPC 及び late EPC) の特性指標の探索を行い、MMP-9 及び MMP-2 が early EPC の浸潤能に関連した機能的特性指標であること、及び、late EPC の管腔形成へのオクルディンの関与を明らかにした。

8) 人工多能性幹細胞の品質・安全性に関する研究

細胞組織加工医薬品の原材料としての人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の同一性・同等性評価法および特性解析法の開発を目的とし、様々な年齢の日本人の線維芽細胞から樹立した iPS 細胞を解析し、形態学的特徴、ES 細胞マーカー、細胞表面抗原、分化能の点で、ほぼ同様であり、ES 細胞の特性と類似していることを明らかにした。また、ヒト iPS 細胞の細胞表面抗原に基づく細胞評価法や、DNA マイクロアレイによる特性解析法について、基礎的知見を得た。

9) 細胞特性・品質解析技術としての糖鎖解析技術の開発

細胞の糖タンパク質糖鎖解析技術を再生医療実用化のための細胞特性解析技術に応用することを検討した。具体的には、O-結合型糖鎖であるムチン型糖鎖とグリコサミノグリカン (GAG) 型糖鎖を一斉解析し、包括的に O-結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリングを行う技術を開発し、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。

B. 研究方法

B-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

B-1-1 HBV の濃縮・高感度検出法の開発

ポリ-L-リジン(PLL)コート磁気ビーズはカルボキシル基を持つ磁気ビーズ(粒径 1 μm)に、PLL を水溶性カルボジイミド存在下でカップリングして作製した。HBV の濃縮は、検体に PLL 磁気ビーズを添加し、これに 1.1M 酢酸亜鉛溶液を混合後、ウイルスと磁性粒子表面の PLL との凝集体を形成させて磁気スタンド上に回収することで行った。

HBV-DNA はスマイテスト EX-R&D 試薬キットを用いて抽出し、定量的 PCR 法により測定した。なお標準曲線から求めた HBV の定量限界は 100 copies/ml 以上で、定性的な 95% 信頼限界は 60 copies/ml であった。HBs 抗原は、AxSYM HBsAg assay (Abbott Laboratories) を用いて測定した。

B-1-2 PVB19 感染系の確立

赤芽球系細胞株 Ku812 細胞を 100 ng/ml エリスロポエチン (EPO) 存在下に 96 ウエルプレートを用いて限界希釈して培養を行い、EPO 依存的に増幅する 2 クローン (Ku812-E2 及び Ku812-E4) を選別した。ヒト血漿由来 PVB19 を $10^2 \sim 10^5$ コピー/ml

になるように 2% ウシ胎児血清 (FCS) を含む RPMI1640 培地で希釈し、Ku812-E2 及び Ku812-E4 細胞と 1 時間培養した。その後、遠心により細胞を沈殿させ、未感染のウイルスを除去後、10% FCS RPMI1640 培地、ASF104 無血清培地、GIT 無血清培地に再び細胞を懸濁して培養を続けることで感染系を樹立した。

B-1-3 マイコプラズマの迅速検査法

マイコプラズマとして、*Mycoplasma fermentans* (MBRC No. 14854) を 267 培地を使用して 5% CO₂ 条件下で培養し、10 倍希釈列を作成して室温でおいたもの(室温保存品)と冷凍保存したもの(凍結保存品)を用いた(製品評価技術機構特許微生物寄託センター佐藤真則先生より供与)。マイコプラズマ DNA 標準品として、Genomic DNA from *Mycoplasma hyorhinis* (ATCC17981D; 0.2 $\mu\text{g/ml}$) 及び Genomic DNA from *Mycoplasma orale* (ATCC23714D; 0.2 $\mu\text{g/ml}$) を使用した。

マイコプラズマの検出は、酵素活性に基づく方法として、MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza) を用いた。Nested PCR 法による検出は、日本薬局方参考情報に収載されている方法に準じた。リアルタイム PCR による検出は、MicroSEQ mycoplasma detection assay (Applied Biosystems)、PCR-ELISA 法による検出は、Mycoplasma PCR-ELISA kit (Roche Applied Science) を用いた。

B-1-4 HEV 標準パネルの樹立

国内で見いだされる 4 種類のクラスターに属する swJR-P5(G3jp) 、

swJB-E10(G3sp) 、 swJB-M8(G3us) 、 swJB-H7(G4jp) の 4 種類 の 株 と、swJB-E10 を A549 細胞 に 感染 さ せ て 上 清 から 精 製 し た swJB-E10cul(G3sp)、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 なる HEV パ ネ ル 候 補 品 を 用 いた (ベ ネ シ ス 社 よ り 供 与)。HEV の 定 量 は、感 度 検 定 用 標 準 RNA と し て 次 の 2 種 類 を 使 用 し た (ベ ネ シ ス よ り 供 与)。①HEV PC RNA (10⁷ copies in 70% Ethanol/tube, G3jp, G3sp, G4sp 用) 、 ②HEV G3us PC RNA (10⁷ copies in 70% Ethanol/tube, G3us 用)

HEV の 核 酸 抽 出 は QIAamp viral RNA mini kit を 使 用 し、定 量 RT-PCR に は 以 下 の 機 器 及 び 試 薬 を 用 いた。

使 用 機 器 : Prism7000 sequence detection systems (Applied Biosystems)

使 用 キ ャ 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)

B-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

B-2-1 細胞の染色体安定性に関する検討

B-2-1-1 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) お よ び 前 骨 髄 性 白 血 病 細胞 HL60 細胞 株 を 使 用 し た。h MSC は 2 継 代 目 に て 入 手 後、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 ャ ッ ト (MSCGM SingleQuots 、 TAKARA) お よ び 10%FBS

を 添 加 し 培 養 を 行 い、50-70%コ ン フ ル エ ン ト の 状 態 で 継 代 を 続 け た。

ま た、異 常 が 認 め ら れ た ロ ッ ト 4 F1560 と 同 一 ロ ッ ト を、本 研 究 所 療 品 部 よ り ご 恵 与 いた だ き、培 養 を 行 った。hMSC は 4 継 代 目 に て 入 手 後、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 ャ 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。

B-2-1-2 細胞からの DNA の抽出

上 記 各 培 養 細胞 を 遠 心 分 離 に よ っ て 集 め、培 地 を 除 いた 後 proteinaseK 溶 液 に て 処 理 し た 後、通 常 の Phenol/chloroform 法 に て ゲ ノ ム DNA の 抽 出 を 行 った。得 ら れ た DNA の 沈 殿 を 70%Ethanol に て 洗 浄 し、TE-4 バ ッ フ ェ ー に 溶 解 さ せ た。ま た 一 部 DNA の 抽 出 に は 市 販 の QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) を 用 い、プ ロ ト コ ー ル に 従 っ て 行 った。

B-2-1-3 使用した SNP チップ

ヒ ト 約 5 万 SNP サ イ ト を 網 羅 し た GeneChip® Human Mapping 50K Array Xba に て 解 析 を 行 った。ア レ イ に は、フ ォ ト リ ソ グ ラ フ ィ ー 製 造 法 に よ り 同 時 合 成 さ れ た、配 列 の 明 ら か な 25 bp オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド プ ロ ー ブ が、1 種 類 あ た り 100 万 コ ピ ー 以 上 から 構 成 さ れ る。各 SNP に は、1 組 が 4 つ の プ ロ ー ブ から なる 5 組 の プ ロ ー ブ が 対 応 し、各 組 は、4 対 の パ ー フ ェ ク ト マ ッ チ プ ロ ー ブ と ミ ス マ ッ チ プ ロ ー ブ から 成 り、位 置 を ず ら し て SNP1 個 あ た り の 25 bp

オリゴヌクレオチド合計 40 種類により判定を行う。

B-2-1-4 ゲノム DNA の制限酵素による消化とラベル化

細胞より抽出したゲノム DNA 250ng を制限酵素 XbaI で消化し、XbaI シークエンスと続く PCR 増幅用のプライマー配列を持つアダプターをライゲーションした。その後、アダプター配列を認識する一種類のプライマーを用いて、アダプターを付加した DNA フラグメントを増幅した。この際、用いた PCR 条件は 250~1,000 bp のサイズのフラグメントを優先的に増幅するよう最適化した。次に、増幅した DNA を断片化し、ビオチン標識した後、GeneChip Mapping 50K Array にハイブリダイズさせた。

B-2-1-5 チップへのハイブリト、染色、洗浄およびシグナル検出

チップへのハイブリダイゼーションは、48 度にて一晩行い、ハイブリ溶液を除いた後、発現解析用チップと同様に Affymetrix 社の GeneChip 用フルイディックステーションにて洗浄および、ストレプトアビジン-フィコエリスリンによる蛍光ラベル化を行った後、GeneChip 専用スキャナーにてスキャンを行い、チップの蛍光イメージを取得した。

B-2-1-6 SNP の判定と LOH 解析

SNP の判定には、各 40 プローブずつのシグナル強度データを、専用の解析ソフトである GeneChip DNA Analysis Software (GDAS) ソフトウェアで解析した。SNP 判定を元に、GDAS により LOH 領域が判定

された。

B-2-1-7 ゲノムコピー数の解析

ゲノムコピー数の解析のため、フリーウェアとして利用可能であった、dCHIP (Lin et al., 2004) および CNAG (Nannya et al., 2005) というソフトウェアを使用した。

B-2-1-8 間期核の FISH 解析

これまでの検討で染色体異常が認められた hMSC のロット 4F1650 について、同一ロットを療品部より入手し、11 継代した後、間期核のスライド標本を作製し、以下に示した FISH プローブを用いて、染色体の数的異常の頻度に関する検討を行った。

- Vysis CEP8 Spectrum Green
- Vysis CEP17 Spectrum Orange

各セントロメア FISH プローブを、プロトコールに従ってハイブリ後、DAPI にて核を染色し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

B-2-1-9 染色体解析

療品部由来 hMSC、Lot 4 F1560 細胞を長期継代し、約 20 継代目の細胞の G バンド法および m-FISH 法による染色体解析を、(株)日本遺伝子研究所に委託した。

B-2-1-10 GeneChip データの解析

hMSC の培養過程における遺伝子発現変化を Affymetrix 社の GeneChip Human U133 アレイ用いて解析したデータをもとに、データ解析ソフトウェア GeneSpring (Agilent) を用いて、染色体異常の確認されたロット特異的な遺伝子発現に関して解析を行った。

B-2-1-11 染色体異常および小核試験

h MSC 細胞の染色体解析のため、細胞を分裂中期にて停止させるため Nocodazol (SIGMA) を DMSO に溶解し、各種濃度で培地中に添加し、1、3、6、24、48 時間作用させたときの効果を調べた。小核試験の観察用には、細胞をトリプシンにて剥離後、0.075M KCl 溶液にて 37°C 18 分低張処理をした後、カルノア溶液にて 5 分間固定後、遠心分離にて細胞を回収し、カルノア溶液にて 10 分間最固定した後、細胞を少量のカルノア溶液に懸濁させ、濡れたキムタオルの上においたガラススライド上に滴下し、エアードライ法にて標本作製した。

B-2-1-12 世代シーケンサーを用いたシーケンス解析

1.2 x 10⁶ 個の MSC より DNA Extractor WB キット (和光純薬工業) を用いて、核単離後、ゲノム DNA の抽出を行った。

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 ウェ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-2-2 細胞のプロテオーム解析

B-2-2-1 サンプルの前処理

(タンパク質の抽出)

1.5X10⁵ 個の細胞を 50 μ l の細胞溶解液にて溶解した後、450 μ l のアセトンを加えてタンパク質を沈殿させ、30 μ l の RapiGest 溶液に溶解した。

(還元アルキル化)

タンパク溶液 30 μ l に、30 μ l の 10mM DDT を加え、60°C 30 分間反応させて還元後、室温に戻した後、60 μ 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 μ l (0.25 μ g/ μ l) 加え、37°C で一晩消化した。

B-2-2-2 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 μ 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-2-2-3 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-2-2-4 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-2-2-5 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、ペプチドマスフィ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-2-2-6 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-3 細胞組織加工医薬品の同等性評価技術の開発

B-3-1 細胞及び試薬

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) 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 より購入した。Peptide-N-glycosidase F (PNGase F) は、Roche から購入した。

B-3-2 細胞培養

MSC は MSCGM (基礎培地 MSCBM に

Mesenchymal cell growth supplement、L-glutamine、GA-1000 を添加)で培養した (5%CO₂, 37°C)。セミコンフルエントまで培養し、EDTA 添加 PBS で洗浄を行い、Trypsin-EDTA (GIBCO) により細胞を剥離した後、約 2×10⁵ 個ずつの細胞を播種して継代培養を行った。培地交換は 2 から 4 日間に 1 回の頻度で行った。回収した細胞をプロテアーゼインヒビター (protease inhibitor mix DMSO solution, Sigma) 添加 PBS で 3 回洗浄した。

B-3-3 MSC の分化誘導

B-3-3-1 軟骨細胞

D-MEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12、1:1 Mixture、Invitrogen) に ITS Liquid Media Supplement (Sigma-Aldrich) 及び Penicillin-Streptomycin-Glutamine 及び StemXVivo Chondrogenic Supplement (R&D Systems) をそれぞれの終濃度が 1% になるように添加したものを軟骨分化誘導培地として用いた。セミコンフルエントまで培養した MSC を、軟骨分化誘導培地に懸濁させた後、15 ml のコニカルチューブに 2.5×10⁵ 個の細胞を播種した。200×g で 5 分間遠心した後、インキュベーター (5% CO₂, 37°C) で 21 日間分化誘導培養した。培地交換は 2~3 日間に 1 回の頻度で行った。

B-3-3-2 骨細胞

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 1%の StemXVivo Osteogenic Supplement (R&D Systems) を添加したものを使用した。

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。

B-3-3-3 脂肪細胞

脂肪分化誘導基礎培地として、10% FCS 及び 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine 添加し α -MEM 培地を用いた。脂肪分化誘導培地は脂肪誘導基礎培地に 1% の StemXVivo Adipogenic supplement (R&D Systems) を添加したものをを用いた。脂肪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、 2.1×10^4 cell/cm² の濃度で 24 ウェルマイクロプレート (IWAKI) に播種し、100% コンフルエントに達するまで培養した (5% CO₂, 37°C)。脂肪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-3-3-4 神経様細胞

神経誘導基礎培地及び神経誘導培地として、それぞれ HyClone AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cell Expansion Kit (Thermo Fisher Scientific) 及び 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。

MSC 及び分化細胞は、共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 (LSM 510 Carl Zeiss) により形態学的特徴を観察した。

B-3-3-5 細胞由来タンパク質の調製

培養終了後、細胞を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、日本製薬 (株)) 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、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 ×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-3-3-6 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 µg) を 50 µl 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 µl 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 µl 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-3-3-7 糖鎖の切り出し

回収した還元アルキル化タンパク質 (50 µg) を 200 µl 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 ×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 により乾燥させて、糖鎖を回収した。

B-3-3-8 ¹²C-及び ¹³C-フェニルヒドラジンによる糖鎖の標識

MSC 由来糖鎖は ¹²C-フェニルヒドラジン (PHN) で、神経様分化細胞由来糖鎖は ¹³C-PHN でそれぞれ 3 種類ずつ標識した。まず、乾燥糖鎖試料を 100 µl の H₂O で再溶解させた。次に、4 µmol の ¹²C-PHN 塩酸塩 (Aldrich) あるいは ¹³C-PHN 塩酸塩 (Cambridge Isotope Laboratories)、及び 10 µmol の 2-ピコリンボラン (純正化学) を加えて攪拌し、遮光下 55°C で 1 時間インキュベートした。2-ピコリンボランを完全に溶解するために、適宜、攪拌操作を繰り返した。反応終了後、100 µl のクロロホルムを加えて激しく攪拌した後、遠心分離 (1,000×g, 30 秒) を行った。クロロホルム層を除去した後、

再度 100 µl のクロロホルムを加えて同様の操作を 2 回繰り返して、過剰な試薬を除去した。最後に、H₂O 層を分取した後、タンパク質あたり等量となるように混合し、3 種類の分析試料溶液を調製した(表 19 及び図 29)。

B-3-3-9 還元化糖鎖の調製

乾燥糖鎖試料を 500 µl 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。

B-3-3-10 LC/MS

液体クロマトグラフィー (LC) 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 0.1%ギ酸溶液 (A 溶媒) 及び 90% アセトニトリルを含む 0.1%ギ酸溶液 (B 溶媒) を使用した。流速は 300 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) (装置名: LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific) を使用し、ポジティブイオンモードでデータを取得した。

PHN ラベル化糖鎖及び還元化糖鎖の分析で用いたカラム、グラジュエント条件、シングル MS 及び多段階 MS (MS/MS ~ MS/MS/MS/MS) 測定条件は、以下の通りであった。

B-3-3-10-1 PHN 標識糖鎖の分析

カラム : C30 (Develosil Packed Column, 0.075×150 mm, 粒子径 5µm, 野村化学)

トラップカラム : C18 (L-Column, 0.3×5.0 mm, 粒子径 5µm, (財) 化学物質評価研究機構)

グラジュエント条件 : 2-45%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 : 275°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%

B-3-3-10-2 還元化標識糖鎖の分析

カラム : グラファイトカーボンカラム (HyperCarb, 0.1×150 mm, 粒子径 5µm, 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 : 2.5ekV

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%

B-3-3-11 主成分分析 (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, Sweden) 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 N アセチルノイラミン酸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 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

B-4-1 Ad ベクターの作製

CXCL12 発現 Ad ベクター、VEGF 発現 Ad ベクター、HoxB4 発現 Ad ベクターの作製は improved in vitro ligation 法により行った。Cytomegarovirus (CMV) プロモーターおよびイントロン A を含むシャトルプラスミド pHMCMV10 にマウス CXCL12 cDNA またはマウス VEGF cDNA を挿入し pHMCMV10-CXCL12、pHMCMV10-VEGF を作製した。また、Chicken β -actin プロモーターと 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 にヒト HoxB4 cDNA を挿

入し pHMCA5-HoxB4 を作製した。これらの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、CXCL12 発現ベクタープラスミド pAd-CXCL12、VEGF 発現 Ad ベクタープラスミド pAd-VEGF、HoxB4 発現 Ad 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 CXCL12 発現 Ad ベクター Ad-CXCL12、VEGF 発現 Ad ベクター Ad-VEGF、HoxB4 発現 Ad ベクター Ad-HoxB4 を得た。コントロール Ad ベクターとして、ルシフェラーゼ発現 Ad ベクター Ad-Luc、 β -galactosidase (LacZ) 発現 Ad ベクター Ad-LacZ、ならびに外来遺伝子を発現しない Ad-Null を用いた。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 により測定した。

B-4-2 マウスへの Ad ベクター投与

5×10^{10} VP (vector particles) の Ad-CXCL12 あるいは Ad-Luc を、または 1×10^9 ifu (infectious unit) の Ad-VEGF あるいは Ad-Null を 8-10 週令 C57/BL6 ♀マウスの尾静脈内に投与した。投与 5 日後、末梢血、胸腺、脾臓、骨髓を回収し、以下の実験に用いた。血漿中 CXCL12 濃度お

よび VEGF 濃度は Quantikine ELISA キット (R&D Systems 社) を用いて測定した。

B-4-3 フローサイトメーター

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 Flt-1 抗体、抗 IgM 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 社) 陽性の死細胞を解析から除去して、FACSCalibur、もしくは LSRFortessa (BD Bioscience 社) にて解析した。

B-4-4 *In vitro* コロニーアッセイ

Ad ベクター投与 5 日後の細胞および ES、iPS 細胞由来血液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、末梢血単核細胞 (PBMC) ならびに脾臓細胞は 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。また、B 前駆細胞 (CFU-IL7) 数の測定は Methocult M3630 (Stem cell technologies 社) を用いた。

B-4-5 Hematoxyline-Eosin 染色

Ad ベクター投与 5 日後に脾臓を回収し、液体窒素中で凍結した。5 μm の凍結切片を作製後、4%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液中で 4°C、15 分間固定し、ヘマトキシリンにより核を、エオシンにより細胞質を染色した。その後、顕微鏡にて標本を観察した。

B-4-6 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_{0.1}) で 3 回洗浄した後、Alexa568 標識アビジン (Molecular Probe) を 37°C で 15 分反応させた。PBS-T_{0.1} で 3 回洗浄後、標本を封入し蛍光顕微鏡にて観察した。

B-4-7 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 (5×10^{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 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) あるいは NP-Ficoll (Biosearch technologies 社) (25 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、室温で 2 時間作用させた。PBS-T_{0.1} 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 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、室温で 1 時間作用させた。PBS-T_{0.1} で 3 回洗浄後、TMBZ を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加えて発色反応を行い、2 N H₂SO₄ を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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。

B-4-8 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 5×10^{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 1×10^7

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-4-9 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-4-10 マウス ES、iPS 細胞から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) 中にて血液細胞を誘導した。

B-5 細胞組織加工医薬品の造腫瘍性・異常増殖性評価技術の開発に関する研究

B-5-1 セルバンクの調製

HeLa 細胞 (JCRB9004, Lot:24222006, 継代数: 114) は (財) ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンクから入手した。HeLa 細胞増殖培地としては研究資源バンク推奨の Suppl-MEM (10%ウシ胎児血清 (FBS) (ICN, Cat: 2916754, Lot: 1604H)、2mM L-グルタミン (SIGMA, Cat: G7513) および 100U/mL ペニシリン G-100µg/mL ストレプトマイシン (GIBCO, Cat: 15140) を含む Eagle's minimum essential medium with non-essential amino acids (SIGMA, Cat: M5650)) を用いた。培養は CO₂ インキュベーター (SANYO MCO-175, 37°C, 二酸化炭素分圧 5%) で行い、培地量は 10mL/10cm ディッシュ、培地交換は 1 日おきに行った。継代は、細胞が培養容器中でおおよそ 80%コンフルエントになった際に行った。継代の操作としては、まず培養容器から培地を吸引除去し、1X リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (SIGMA, Cat: D8537, 10mL/10cm ディッシュ) を添加、細胞を 1 回洗浄した。次に 1X PBS を吸引除去し、0.25% トリプシン・EDTA (GIBCO, Cat: 25200, 2mL/10cm ディッシュ) を添加、細胞に行き渡らせた後にすぐさま吸引除去し、細胞が個別に分離するまで 2~3 分間室温で静置した。この際、細胞塊の発生を防ぐため、培養容器を振ったり叩いたりして細胞を強制的に剥がす操作は行わなかった。トリプシンの消化反応は Suppl-MEM (6mL/10cm ディッシュ) を細胞に添加することにより停止させ、緩やかなピペティング (3 mL/sec 以下) により細胞をよく分散した。分散した細胞は希釈倍率 1/2~1/6 で継代した。細胞のストックを調製するために、トリプシン消化により分散した細胞