

設平均値をパネルのコピー数として設定した (Table 7)。

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 8 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 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

### C-2-1 細胞の染色体安定性に関する検討

#### C-2-1-1 異なる hMSC ロットにおける hMSC 細胞の遺伝子安定性に関する検討

これまでの SNP チップ解析の結果、異常を示した hMSC 株ロット #4F1560 (図 12) 以外の 3 ロットおよびヒト骨格筋筋芽細胞 (HSMM) に関しては、ゲノムコピー数の異常は検出されていなかった。さらに新たな 2 ロットについても同様に検討したところ、異常は検出されず、染色体変化は上記ロット #4F1560 に特徴的に起きた変化であり、少なくともその頻度はあまり高くないことがわかった (表 9)。

### C-2-1-2 セントロメア特異的 FISH プローブを用いた異常獲得ロットにおける染色体異常蓄積の経時変化に関する検討

異常が確認されたロット #4F1560 においては、CGH およびマルチカラー FISH 解析より 7 番染色体のコピー数増加が認められたが、7 番染色体セントロメアプローブを用いた FISH 解析により、セントロメア数は正常であることがわかった。一方、同じくコピー数異常の認められた 17 番染色体特異的セントロメアプローブを用いた FISH 解析から、シグナル数の増加が認められ、異常が観察された。この結果より、2 本増加していた 7 番染色体には、17 番染色体由来のセントロメアが存在する可能性が示唆されるとともに、17 番染色体のセントロメアをプローブとして異常細胞を検出できることがわかった。そこで、正常対照として 8 番染色体特異的セントロメアプローブを用い、17 番染色体セントロメアプローブによる 2 重 FISH を、凍結保存してあった同一ロットの各種継代数の細胞について行った。間期核におけるそれぞれのシグナル数を元に、異常細胞数の解析を行った。得られた異常細胞の例を図 13 に示す。それぞれ 100 個ずつの間期核細胞を使って解析した結果、表 2 に示すようなシグナル数が観察された。8 番染色体セントロメア 2 シグナル以下の細胞に関し、3 つ以上の 17 番セントロメアシグナルが得られた細胞および 8 番 3 および 4 シグナルに対し、5 以上の 17 番シグナルを持つ細胞を異常細胞として判定し、その出現頻度を調べた結果、12 継代で 17% であった異常頻度が、15、17、および 21 継代と培養が進むにつれて、それぞれ 34%、45%、53% と増加し、24 継代では 97% とほぼすべ

てに異常が見られた。このことから、比較的培養初期から異常細胞が存在し、21 継代付近で急激に異常細胞の割合が増加したことが示唆された。これは、細胞の増殖曲線の記録にも反映されており、図 14 に示すとおり、異常のあった#4F1560 では、この付近において増殖曲線の傾きが急になっていた。このロットにおいては、比較的長期培養が可能であり、増殖性を獲得した細胞が不死化した可能性も考えられた。そこで、さらに培養を続けたところ、30 継代以上増殖を続けたが、34 継代を超えたところでは増殖をしなくなり、不死化は起こっていないことがわかった。

### C-2-1-3 異常の見られた hMSC と同一ロット細胞における染色体異常出現に関する検討

これまでの SNP チップ解析の結果、異常を示した hMSC 株ロット #4F1560 に関しては、当研究室における培養の初期にも低頻度で異常が存在することがわかり、異常細胞は細胞の購入時にすでに存在したことが示唆された。この可能性を検証するため、たまたま当研究所の療品部において別途購入されていた同一ロットの hMSC 株 (#4F1560) をご恵与いただき、当研究室にて継代培養続けた。11 継代の後、間期核のスライド標本作製し、昨年度と同様にセントロメア特異的 FISH プロブを用いた異常細胞出現の検討を行った。

異常が確認されたロット #4F1560 においては、17 番染色体特異的セントロメアプロブを用いた FISH 解析から、シグナル数の増加が認められていたため、正常対照として 8 番染色体特異的セントロメアプロ

ブを用い、17 番染色体セントロメアプロブによる 2 重 FISH を行った。得られたシグナルの例を図 15 に示す。初年度の結果と同様に、17 番染色体シグナル数の増加を示す細胞が多数観察された。間期核におけるそれぞれのシグナル数を元に、異常細胞数の解析を行った。約 100 個の間期核細胞を使って解析した結果、表 2 に示すようなシグナル数が観察された。8 番染色体セントロメア 2 シグナル以下の細胞に関し、3 つ以上の 17 番セントロメアシグナルが得られた細胞および 8 番 3 および 4 シグナルに対し、5 以上の 17 番シグナルを持つ細胞を異常細胞として判定し、その出現頻度を調べた結果、8 割以上の細胞が異常を示した。

前回のデータと比較して、継代数に比して異常細胞の頻度は高めとなったが、これは今回の培養では培養者が異なり、7・8 割のコンフルエントとやや継代間隔が長かったことが影響している可能性がある。

以上の結果より、ロット 4 F1560 において観察された染色体異常は、細胞購入時にすでに低頻度で存在したことが証明された。この異常細胞は、増殖優位性を持ち、継代数の増加に伴って、その割合が増加し、やがて培養系を置換することが再現できたわけである。本ロットに関しては、23 歳女性のアフリカ系黒人由来という程度の情報しか得られず、異常細胞がドナーの生体内に存在していたかどうかを調べることはできないが、その可能性は否定できない。また、ドナーからの間葉系幹細胞の樹立時に異常が生成した可能性もあり、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(Cytherapy. 7: 509-519, 2005)に

よってなされていることから、注意が必要であると考えられる。

#### C-2-1-4 染色体解析

セントロメア特異的 FISH 法にて確認された異常が、染色体レベルで前回と同一の異常であるかを確かめるため、約 20 継代目の細胞を用いて、マルチカラー FISH 法 (m-FISH) による染色体解析を行った。まず G バンド解析の結果から、図 12 に示すように 3 本のマーカー染色体が観察され、前回の解析結果と異常は一致した。50 細胞観察を行ない、すべて同様の異常を示した。その由来は 7 番染色体および 17 番染色体であるが、図 16 に示した m-FISH 解析の結果は、前回の SKY 解析の結果と比較すると、Marker1 は両者の転座、Marker2 は 7 番染色体由来ということで一致したが、Marker3 に関しては、前回の 7 番という結果と異なり、図 17 に示したセントロメア FISH の結果から 17 番由来と判定された (標識の色が異なっている点に注意)。

我々のセントロメア FISH の結果とも一致し、増加したシグナルは 17 番セントロメア由来であることは確実であるが、Marker3 の他の部分に関しては、m-FISH のシグナル自体判別が難しく、以前に行なった CGH の結果も加味すると、7 番染色体由来の可能性も高いと考えられる。今後、クロモソームペインティングの手法を用いて、この点は明らかにしたい。さらに、前回マイナーな異常として一部の細胞に観察された、21 番と 22 番染色体の転座による dicentric 染色体は、今回は観察されなかった。

また、G バンドのパターンから、Marker

染色体のバンドパターンは、由来する正常な 7 番および 17 番染色体のバンドパターンとは異なり、複雑なリアレンジメントがおきていることが示唆された。

#### C-2-1-5 染色体解析用サンプル調整法の検討および小核試験

CGH 解析では、ゲノムワイドに異常を検出可能であるという利点がある反面、全体ポピュレーションの平均として解析を行うという特徴から、個々の細胞およびマイナーなポピュレーションにおける異常は検出できないという短所がある。増殖形質を獲得した細胞は、たとえ最初は 1 細胞でも、すでに観察された異常ロットのように培養系に拡大し、癌化の危険性をはらむ事となる。こうした異常細胞を早期に見つけるためには、1 細胞レベルで異常を観察できる試験が必要とされる。古典的ではあるが、染色体異常試験は、個々の細胞レベルでの異常を検出可能であり、培地等の培養環境の安全性を含めた細胞の品質評価が可能となる。一般に、間葉系幹細胞等の正常細胞は分裂速度が遅いため、染色体解析に必要な分裂中期像を十分な数確保することが難しい。そこで、染色体解析に向け、分裂中期細胞の集積法に関する基礎的検討を行った。まず、一般的には Colcemid を用いて分裂期の標本作製する (処理時間 2 ~ 6 時間) が、hMSC はダブリングタイムが長いため、処理時間も長くしなければいけない。そこで、G<sub>2</sub>、M 期で細胞周期を止め、長時間処理できる Nocodazol を用いて予備実験を行った。Nocodazol の処理時間および処理濃度を振って、細胞への影響を検討とした結果を表 3 にまとめた。この結果

より、長時間処理しても細胞が死なない濃度として、0.1 $\mu$ M で処理する事にした。

hMSC ロット 4F 1560、継代数#6 および #26 の細胞を用い、1.2~1.5 $\times 10^5$  cells / 5ml in 6cm シャーレにて 24 時間前培養し、細胞が接着しているのを確認して、Nocodazol 終濃度 0.1 $\mu$ M を処理した。そして、48 時間後に細胞を回収して染色体標本作製、ギムザ染色して観察した。

その結果、以下の細胞数の分裂中期像が得られた。

#6 全体を観察したときに 20 個程度のメタフェーズが観察された

#26 全体を観察したときに 18 個程度のメタフェーズが観察された

株化細胞等に比べると分裂中期像の頻度は低かったが、解析可能な数を確保できた。FISH 法などに用いる場合には、この数でも十分であると考えられる。

しかし、染色体異常の観察のためには、さらに分裂中期像の集積が必要となるため、間期核にて染色体異常が検出可能な、簡便な試験法としての小核試験に注目し、hMSC 細胞を用いた予備検討を行った。

サイトカラシン B を用いない方法にて、小核試験観察用スライド標本作成し、アクリジンオレンジ染色をした後、蛍光顕微鏡にて、小核の自然発生頻度を調べた。結果を表 4 に結果をまとめた。スライドあたり 500 細胞、合計 1000 細胞を観察した時の小核を持つ細胞の頻度は、継代数 6 の細胞で 19 個、継代数 26 の細胞で 13 個であった。このロットは染色体異常が認められたものであるが、継代数の増加に伴う小核発生頻度の増加は認められなかった。

## C-2-1-6 染色体異常が観察された hMSC ロットにおける遺伝子発現変化の解析

CGH アレイによって異常が観察された hMSC のロット #4F1560 に関しては、初期に起きた異常により増殖優位性を獲得した細胞が、継代とともにそのポピュレーションを拡大し、培養系全体に広がっていったことがわかった。即ち、染色体変化が細胞に増殖性を獲得させたわけであるが、その増殖性の原因となった変化は何であったのだろうか？染色体変化からその謎に迫るアプローチも考えられるが、すでに我々の研究グループでは、本異常ロットを含めた複数の hMSC ロットに関して、培養に伴う遺伝子発現変化を GeneChip を用いて解析したデータがあり、これを使って、遺伝子発現変化という視点から、増殖性獲得のメカニズムに迫ることを考えた。

遺伝子発現データの詳細に関しては、すでに公共データベースに登録されており、以下のサイトにて情報を得ることができる。これまでの研究では、主に培養に伴う遺伝子発現変化という観点から解析が行われたが、今回は、異常が認められたロットに着目し、そこで特徴的に起こっている遺伝子発現変化を他の正常ロットと比較することにより検討した。データ解析には、必要に応じてソフトウェアとして GeneSpring (Agilent Technologies) を使用した。

まず、異常ロットを含む hMSC6 ロットに対し、異なる継代数の細胞に関する計 53 チップデータを、単純にすべての遺伝子を用いてクラスタリング解析した結果を図 18 に示す。ロットを問わず、20 継代を超える長期培養後の細胞における発現パターンは、一群のクラスターを形成し、培養に伴う共

通した変化が示唆された。その中で、異常のあったロット#4F1560 のデータに関しては、他のロットと分離したクラスターを形成し、染色体変化を反映した、特徴的な遺伝子発現変化が存在する可能性が示唆された。

そこで、この特徴的な変化をもたらす遺伝子群を調べるため、このロットにおいて他のロットと異なる発現変化を示す遺伝子の抽出を GeneSpring を用いて行った。検索条件としては、28 継代の 4 F1560 の 1 ロットにおいて、他のロットにおける 20 継代以上の遺伝子発現と比較して 5 倍以上の変化を示す遺伝子をフィルタリングし、このうち、データの信頼性を考慮し、半数以上で遺伝子発現量が 100 以下の遺伝子は除いたところ、合計 49 遺伝子が選択された。その染色体上の位置を図 19 に示す。これら遺伝子の発現パターンを、他の 20 継代以上の長期培養 4 F1560 ロットのデータで確認したところ、図 20 に示したようにいずれの遺伝子も選択に使ったサンプル（4 F1560#28）と同様に特徴的な変化を示した。正常ロットと比べて異常ロットで発現が高めの遺伝子が 21、低めの遺伝子が 28、そして、これらのパターンは、4 F1560 ロットにおける 28 日と 21 日のデータに差があるかどうかで、二つのパターンに分けられ、発現が上がった群では、他と少し異なるパターンをとるものが 1 遺伝子あった。それぞれの群の中では、各遺伝子の発現の変化は非常に一致していた。これら遺伝子群が、どのように細胞の増殖性および染色体異常とかかわっているのかは、今後の検討課題である。

## C-2-2 細胞のプロテオーム解析

### C-2-2-1 質量分析装置の性能に関する検討

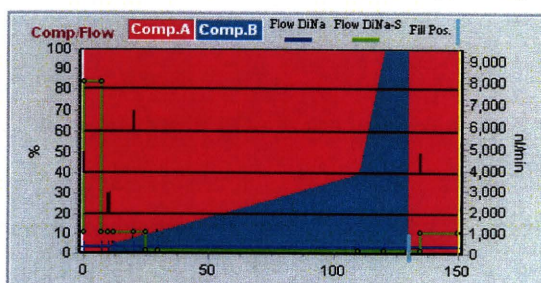
本研究所において利用可能なタンデム型質量分析装置として、Q-TOF（四重極飛行時間）型の Qstar-XL（Applied Biosystems）および Linear Iontrap-FT(Orbitrap)型の LTQ-Orbitrap（Thermo Fisher）を共同利用型機器として保有している。これまで我々は前者を使ってプロテオーム解析を行ってきたが、最新型の LTQ-Orbitrap は、感度の面においては未知数であったが、FT による高分解能が期待でき、細胞のホールプロテオーム解析といった複雑性の高い網羅的な解析において有効性が高いと考えた。そこで、LC-MS を用いたプロテオーム解析系の確立において重要な要素を担う質量分析装置の性能に関して評価を行うため、細胞より抽出した総タンパクを用いて、ショットガンプロテオーム解析を行い、それぞれの機器の特性を比較した。

まず HL60 細胞をモデルに用い、サンプルの前処理、LC 分離の条件などを検討した。Qstar-XL を用いた検討より、比較的高感度な測定が可能であることがわかり、初期のサンプル量として必要な細胞数は、 $10^5$  個程度であることがわかった。そこで、 $1.5 \times 10^5$  個の細胞を 50 $\mu$ l の細胞溶解液にて溶解した後、アセトンを加えてタンパク質を沈殿させ、トリプシン消化のため RapiGest 溶液に溶解した。このステップにおいて、質量分析においてペプチドのイオン化の妨害となるイオン性の低分子化合物を除去できる。次に、たんぱく質の還元アルキル化を行うため、DTT を加え還元後、ヨードアセトアミド溶液を加えアルキル化し、S-S 結合を遊離させ、遮光して室温にて 30 分間反応させ



た。トリプシン溶液を加え、37℃で一晩消化し、分析用サンプルとした。

一回の LC-MS 分析には 500ng 相当量のペプチドをインジェクションした (数マイクロリットルの最終溶液)。ナノ LC の分離条件としては、C18 逆送カラム (150 $\mu$ mID x50mm) を用い、毎分 300nl の流速にて、150 分間のグラジエント (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)) プログラムにて行った。



質量分析装置にて検出されるペプチドの全体像をつかむためには既存の測定ソフトウェアでは不十分であったため、可視化ツールとして利用可能なフリーソフトウェアである Pep3D (TPP ソフトウェアに搭載される) を用いて、2次元電気泳動に用いられるような 2D-density プロットを行った。この際、Pep3D による処理には、質量分析装置から得られる生データを直接利用することができないため、同じく TPP ソフトに含まれる変換機能を用いて、Qstar の場合には Wiff 形式ファイルを、LTQ の場合には RAW 形式のファイルを共通フォーマットである m/z XML 形式に変換した。同じ、HL60 細胞由来総タンパクのトリプシン消化サンプルを用い、同じ LC 分離条件にて 2 つのマシンで測定を行った結果を可視化した 3D プロットを図 21 に示す。

グラフにおいて横軸は LC のリテンションタイムを、縦軸は質量数 (m/z) の値を

350-1600 の範囲にて表示した。スポットの濃さが質量分析計にて検出されたシグナル強度を表し、Qstar では 5000、LTQ では 100 万を最高レンジとした。質量 (m/z) 差 0.5 以下のアイソトープピークを伴うペプチド由来のピーク (大半がそうである) が無数に観察された。C18 逆送カラムによるリテンションタイムが遅いほど質量数の大きなペプチドが溶出される様子がよくわかるが、Qstar に比べて LTQ の方が m/z が 1000 を超える比較的大きなペプチドも検出されていることがわかる。シグナル強度のレンジからもわかるように、LTQ の方がペプチドシグナル検出の感度は高く、(1 スキャンあたりの積算時間も後者のほうが短いのでその差はさらに大きい) より多くのペプチドシグナルが検出可能であることがわかった。また、実際のスペクトルを比較しても、その強度とともに解像度も LTQ の方が高く、ピーク幅の小さいシャープなイオンピークとして観察された。以上の結果から、複雑な細胞由来の総タンパクのプロテオーム解析には、高感度かつ高解像度である LTQ-Orbitrap の利用が望ましいことが明らかとなった。

なお、いずれのマシンの場合も横軸に平行に持続的に観察されるノイズのピークが存在するが、このシグナルは溶媒やサンプルの組成に関係なく常に観察されるものであり、測定室の環境由来のコンタミネーションであると考えられる。文献調査の結果 (Schlosser and Volkmer-Engert J. Mass Spectrom. 38: 523-525, 2003)、これらのピークは環状シロキサンであると推定された。環状シロキサンはシリコンオイル等に含まれており、質量分析装置が置かれている測

定室においては、質量分析装置に付随する真空ポンプ等にシリコンオイルが一般的に用いられており、測定中は常にポンプが稼働しており、これらのポンプから生じる揮発性の環状ポリシロキサンが環境中に存在していると考えられる。ポンプ自体は質量分析装置から分離が難しいため、このノイズは除去不可能であることがわかった。

次に、実際の hMSC 細胞のプロテオーム解析を行うため、18 継代の 4 F1560 ロットの凍結保存細胞より、プロテオーム解析用試料を調整し、LTQ-Orbitrap を用いて測定を行った。Pep3D によるプロテオーム像を図 22 に示すが、HL60 同様に良好な分離ができ、数千におよぶペプチドシグナルが得られた。この際、LTQ-Orbitrap では、MS 測定と平行して、データ依存的な MS/MS 測定が可能であるため、FT による親マススキャンより得られた上位 3 ペプチドを自動的にリニアアイオントラップにて MS/MS 測定を行い、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試みた。装置より得られ RAW データを、データベース検索ソフトウェアである MASCOT を用いて SwissProt データベースにて検索したところ、MASCOT における標準的な信頼値  $p < 0.05$  にて同定されたタンパク質の総数は 764 にのぼった。これは一次元分離による LC-MS/MS 測定においては、最高レベルの同定数であると推察される。もちろんこの中には擬陽性のデータも含まれると考えられるが、FT-MS 測定により Pep3D グラフ上にて観察可能な大部分のペプチドが MS/MS 測定されていないことから、この同定数は LC の分離条件 (2 次元分離を含め) や測定条件を検討することによ

りさらに増加できるはずである。また、マーカー検索においては、MS/MS 測定がされなくても、親マスの強度すなわち Pep3D グラフのスポット強度の比較から発現変化の見られるペプチドを選択可能である。現状では、目視によりその比較を行わなければいけないが、我々はこのステップの自動化のため、後述のオリジナルソフトウェアの開発を行っている。

表 13 に同定された hMSC 由来のタンパク質のリストを示した。リストは信頼性の高い順に並んでいるので、一般的には上位にあるタンパクほど発現量の高いタンパクであると考えられる。上位には actin や tubulin など細胞骨格や heat shock protein などのハウスキーピングタンパクが見られるが、膜タンパクや、核内タンパクおよびシグナル伝達にかかわるような分子も散見する。特に注目されるのは、細胞膜上の表面抗原である各種 CD 抗原が多種同定されている点である。表 6 に検出、同定された CD 抗原の種類および間葉系幹細胞での表面マーカーとして利用されている CD 抗原をリストアップした。プロテオーム解析により同定された CD 抗原の総数は 18 にのぼり、すでに間葉系幹細胞の表面マーカーとして用いられている CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD166 が含まれていた。ポジティブなマーカーとしては、CD105 のみが当初同定されていなかったが、その後の検討により同定された。検出された CD マーカーを図 23 に示した 2 次元マップ上に記載した。一方で、陰性なマーカーである CD14, CD34, CD45 はいずれも同定されなかった。CD 抗原については、特異交代を用いたフローサイトメーターによる解析が一般的であ

るが、プロテオーム解析により抗体を使わなくてもそれらを網羅的に解析可能であり、細胞のキャラクタリゼーションに有用であることが示唆された。プロテオーム解析では特異抗体が入手不可能な抗原に対してもその存在を確認できるという利点があり、今後の応用が期待できる。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。

### C-2-2-2 hMSC 特異的 CD 分子種の同定と安定同位体を用いた定量法の確立

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、最終的にペプチド数として 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 (図 22)。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

ノ酸配列を表 7 に示す。

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  $^{13}\text{C}$  および  $^{15}\text{N}$  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。

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、図 24 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-2-2-3 hMSC サンプルを用いた CD 分子種の定量

次に実サンプルを用いて、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、図 25 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(表 8、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、Xcalibur 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-2-2-4 Progenesis ソフトウェアを用いたノンラベル法による定量解析の基礎検討

質量分析による定量比較のためには、ICAT (Isotope Coded Affinity Tag) 法などの安定同位体を用いた方法による、同一ランでの比較法が有効であるが、試薬が高価であり作業が煩雑なる点、および多検体での比較を可能とするために、ラベルを用いずに定量比較を可能とすることが望まれている。この場合、異なるサンプルを異なる LC のランで解析を行うため、イオン化効率の差による定量性の変化およびリテンションタイムのずれが主に問題となる。また、細胞由来のプロテオーム解析に関しては、より複雑な解析を迫られるため、データ解析の効率化のためには、ソフトウェアの利用が必須となり、これまで独自のソフトウェアの開発を行ってきた。

一方で、この目的に合致したソフトウェアが二次元電気泳動用のソフトウェアをベースとして開発され、市販が開始されたため、本研究にもいち早くこのソフトウェアの導入をはかり、そのパフォーマンスを評価した。

定量比較のためのサンプルデータとして、凍結保存してあった hMSC 細胞 (ロット C: 5 F0138) の 4 継代および 16 継代の細胞より、総タンパク質を抽出し、トリプシン消化してペプチドとした後、LC-MS 解析を行った。

LTQ-Orbitrap 質量分析装置から得られるデータを、付属のソフトウェア Xcalibur で表示した例を図 26 に示した。測定は、一段階目の MS 測定 (親イオン) を高分解能の Orbitrap (電場型 FT) で測定し、同時に

MS/MS 測定をリニアイオントラップ検出器 (LTQ) で測定した。本装置においては、MS 測定と MS/MS 測定を並行して同時に行なえるため、他の装置に見られるような MS/MS 測定による MS 測定の休止に由来する感度低下は起こらないという利点がある。通常 LC-MS によるデータの全体像は TIC (Total Ion Chromatography) として把握され、質量分析データの詳細は、あるタイムポイントを切り取ったマススペクトルとして表示される。実際の解析データの全体像は、この 2 次元マススペクトルの時間軸における積み重ねからなる 3 次元データであり、その意味では、昨年度に報告したとおり、3 次元データとしてデータの全体像を把握することが重要である。

この目的のため、別予算にて導入した定量解析能を有するソフトウェアである Progenesis を利用した。LTQ-Orbitrap より得られる RAW 形式のデータファイルを Progenesis により直接読み込むことができ、3 次元 (2 次元デンシティープロット) 画像化して表示される。(図 27) 異なる LC-MS 解析データの定量比較を可能とするためには、サンプル間のリテンションタイムのずれの補正をする必要があり、Progenesis ではこの 3 次元プロットを元に、それを行なった。このアラインメント過程は、ソフトウェアにより自動に行なうことが可能であるが、今回のような複雑性の高いデータの場合にはうまくアラインメントが取れない場合もあり、手動で 20-30 個程度のシグナルをランドマークとして重ね合わせることで、パフォーマンスが向上し、満足できるアラインメントが可能となった。

図 28 に Progenesis にて検出されたペプチ

ドピークのサンプル間の比較例を示した。本ソフトウェアにおいては、一連のアイソトープピークが一つのペプチドピークとして認識され、その価数も自動的に判断され、例えば 2 価であれば赤色というように、色分けされて表示される。実際のデータでは、隣接する複数のペプチド由来のアイソトープピークが複雑に重なり合い、肉眼でも判断が難しい状況にあるが、ソフトウェアの利用により、正しくピーク認識が行なわれ、対応するペプチドピーク間の比較が可能となった。図に示した例では、中央の 2 価ピーク領域は一部その下の 3 価ピークのシリーズの領域と重なっているが、実際の定量には、さらに各アイソトープピーク部分のみが選択されて行なわれるため、重なりが生じなかった。こうしたピークの分離という意味では、Orbitrap による高分解能は非常に威力を発揮し、本ソフトウェアとの組み合わせにより、かなり複雑なサンプルにおいても、定量比較が現実として可能であることが明らかとなった。

こうして自動認識された 2 価以上のペプチドの総数は約 22000 であったが、内容を吟味すると、同一のピークが、リテンションタイム方向に複数のピークに分断されて認識されている事例が多く見られた。ノイズピークの誤認識等を考慮すると実際のペプチドピークの数は一減ると考えられるが、少なくとも半数は正しいピークと考えられるため、検出できたペプチドの総数は 1 万を越えたと解釈した。

これら 1 万を超えると考えられるペプチドのうち、約半分は MS/MS 解析が行なわれており、生データである RAW ファイルにはその情報も含まれている。親イオンの強度

の高いピークに関しては、サンプル間およびサンプル内においても繰り返しMS/MS測定が行なわれていたが、これら複数のMS/MSデータを統合し、より良いデータを選んで一括検索を行なう機能を Progenesis は有しており、これによりタンパク同定のステップを効率化することができた。

統合、整理した MS/MS データを、タンパク同定用のソフトウェアである MASCOT 解析用のデータファイルに変換し、インハウスの MASCOT サーバーを利用して、Swiss Prot データベースに対して検索同定をした結果を Progenesis に読み込んだところ、一般的な MASCOT スコアをクリアしたタンパク同定数として、5657 という値を得た。この数字は前述したように、分断された同一ピークの重複した同定結果を含むため、実際の数はこれより少ないと考えられる。Progenesis では、この同定結果をタンパクレベルで統合し、同一タンパク由来のペプチドをグループ化して取り扱うことができ、これによって、タンパクレベルでの定量比較が可能となった。その結果、合計 1017 個のタンパク質が同定された。それぞれのタンパク質に対して、4 継代と 16 継代間での定量比較を行い、帰属するペプチドの発現比の平均値から、タンパクとしての発現比を得ることができた。4 継代に比べ 16 継代の細胞で発現が 3 倍以上上昇もしくは低下したタンパク質のリストを表 9 と 10 に示した。

どちらも、トップにランクされたのはミトコンドリアのタンパク質であった。Eukaryotic transcription initiation factor 3 は両方のリストに含まれたが、サブユニット C が増加、E が減少と逆の動きを示した。その

他、発現上昇したタンパクとしては、転写に関係するタンパク (HXA10, UBF1)、膜タンパク (FADS3, RAB36, TM87A) が含まれた。一方、発現低下をするタンパクとしては、細胞骨格タンパク (TBB2A, TBB3)、HLA 関連遺伝子、細胞増殖関連遺伝子 (PSME3, PCNA)、DNA 損傷でリン酸化を受けるタンパク質 (HNRPF, EIF3E, HSP74) などが含まれた。

### C-3 細胞組織加工医薬品の同等性評価技術の開発

#### C-3-1 MSC の多分化能確認

MSC の多分化能を確認では、MSC を軟骨、骨、脂肪及び神経様細胞に分化誘導後、顕微鏡により形態学的な変化を観察した。図 30 は、MSC、軟骨細胞誘導後に形成された不溶性凝集塊軟骨、骨、脂肪、及び神経様細胞の顕微鏡写真である。MSC (図 30A) を軟骨細胞へ分化誘導すると、2 日目から細胞は丸みを帯び始め、分化誘導後 20 日前後になると球状の凝集塊 (軟骨) が形成された (図 30B)。骨細胞への分化誘導では、14 日目からミネラルの沈着が観察され、21 日目には、細胞の約 70% にカルシウムの沈着がみられた (図 30C)。脂肪細胞への分化では、誘導開始 7 日目から脂肪滴が観察され始め、21 日目には多くの細胞で脂肪滴の蓄積が観察された (図 30D)。図 30E 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。本研究で用いた細胞株が多分化能を有することが確認された。

### C-3-2 定量的糖鎖プロファイリングによる MSC 及び神経様分化細胞の糖鎖差異解析

これまでに我々は、<sup>13</sup>C 標識フェニルヒドラジン (PHN) を用いた定量的糖鎖プロファイリング法を開発してきた。この方法は、一方の糖鎖試料を <sup>13</sup>C 標識 PHN で、もう一方の試料を未標識 (<sup>12</sup>C) PHN でラベルしてその等量混合物を LC/MS で分析し、検出された各糖鎖のピーク強度比に基づき、サンプル間の比較定量を行うものである(図 31)。そこで定量的糖鎖プロファイリングにより、MSC 及び MSC 由来加工細胞の糖鎖差異解析を行い、糖鎖プロファイルの変化を検討した。モデル加工細胞として神経様分化細胞を用いた。MSC 及び神経様分化細胞をそれぞれ <sup>12</sup>C-PHN 及び <sup>13</sup>C-PHN で標識した後、タンパク質あたり等量となるように混合した糖鎖試料溶液につき定量的糖鎖プロファイリングを行った(図 31)。3 種類の糖鎖試料溶液について分析した後、統計処理した。

#### C-3-2-1 糖鎖構造解析

図 32 は、糖鎖試料 1(表 19 参照)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。各糖鎖の精密質量、及び MS/MS ~MS/MS/MS/MS で取得されたプロダクトイオンスペクトルを解析した結果、高マンノース型糖鎖、パウチマンノース型糖鎖及び混成型糖鎖、並びに複合型糖鎖の順に溶出されることが確認された。複合型糖鎖は、2 本鎖、3 本鎖及び 4 本鎖の順に溶出され、シアロ糖鎖よりもアシアロ糖鎖の方が早く溶出される傾向がみられた。5 種類の高マンノース型糖鎖(M9~M5)、2 種類のパウチマンノース型糖鎖、1 種類の混成型糖鎖、及び 26 種類の複合型糖鎖が帰属された(表 20)。

興味深い糖鎖として、フコースを 2 分子有する複合型 2 本鎖糖鎖、Lac を有する糖鎖、さらには複合型 3 本鎖糖鎖に 4 個の NeuNAc が付加した糖鎖が認められた。

#### C-3-2-2 糖鎖分布

次に、MSC 及び神経様分化細胞の糖鎖分布を比べるため、試料 1~3 で確認された糖鎖の全ピーク強度に対する各糖鎖のピーク強度比率(存在比率(%))を求めた(図 33 及び表 20)。最も多く存在する糖鎖は、MSC 及び神経様分化細胞共にトリマンノースコア構造にフコース付加したパウチマンノース型(dHex1Hex3HexNAc2 (MSC, 24%; 神経様分化細胞, 27%))であった。その他、存在比率が高い糖鎖は、NeuNAc、Fuc 及び Lac が付加した複合型 2 本鎖糖鎖であった(dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1(MSC, 7%; 神経様分化細胞, 8%); dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc2 (MSC, 14%; 神経様分化細胞, 16%); dHex1Hex6HexNAc5 (Lac) (MSC, 12%; 神経様分化細胞, 13%))。

MSC と神経様分化細胞の分布を比較したとき、存在比率に顕著な差がみられた糖鎖は、NeuNAc を 3 及び 4 分子もつ複合型 3 本鎖糖鎖 (Hex6HexNAc5NeuNAc3 (MSC, 8%; 神経様分化細胞, 2%); Hex6HexNAc5NeuNAc4(MSC, 2%; 神経様分化細胞, 0.6%)) であり、神経様分化細胞における存在比率は MSC の 1/3 であった。これらの糖鎖は、MS/MS スペクトルの解析により、Lac をもつ 2 本鎖糖鎖ではなく、Lac をもたない 3 本鎖糖鎖であることを確認した(図 34, Hex6HexNAc5NeuNAc4 についてはデータを示さず)。一方、Lac をもつ複合型 3 及び 4 本鎖糖鎖の存在比率は、分化誘導す

ると増加する傾向がみられ、特に神経様分化細胞における dHex1Hex8HexNAc7NeuNAc2 (Lac) (MSC, 0.4%; 神経様分化細胞, 0.7%)の存在比率は、MSC の 1.5 倍であった。MSC あるいは神経様分化細胞にのみ発現している糖鎖は見つからなかった。

### C-3-2-3 糖鎖差異解析

糖鎖試料 1~3 で帰属された全ての糖鎖について、<sup>12</sup>C-PHN 標識糖鎖のピーク強度に対する <sup>13</sup>C-PHN 標識糖鎖のピーク強度の比率 (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C)を算出した(図 35 及び表 20)。その結果、MSC を神経様細胞に分化誘導すると、帰属されたほとんどの複合型糖鎖について増加する傾向がみられた。一方、NeuNAc を 3 及び 4 分子もつ複合型 3 本鎖糖鎖 (Hex6HexNAc5NeuNAc3-4) は分化誘導すると発現量が 1/2 に減少することが明らかとなった。

### C-3-3 糖鎖プロファイリング及びPCAによる MSC 分化評価法の開発

定量的糖鎖プロファイリングにより、MSC と加工細胞で糖鎖プロファイルが変化することが確認された。糖鎖プロファイルは分化前後の細胞を区別するための指標として利用できる可能性がある。そこで次ぎに、LC/MS による糖鎖プロファイリングと PCA を組み合わせた手法の MSC 分化評価法としての有用性を検討した。

#### C-3-3-1 LC/MS による MSC 及び加工細胞の糖鎖プロファイリング

##### C-3-3-1-1 糖鎖構造解析

加工細胞のモデルとして、神経様分化細

胞及び骨分化細胞を用いた。MSC 及びモデル加工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 5µg 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 36A 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、複合型糖鎖の結合量が異なる可能性が示唆された (図 36B, 36C)。

##### C-3-3-1-2 糖鎖分布の比較

### (1) MSC 及び神経様分化細胞の比較

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 37)。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 38)。

### (2) MSC 及び骨分化細胞の比較

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 39)。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 40)。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-3-3-2 PCA による細胞の区別

まず、MSC 及び神経様分化細胞の糖鎖分布の比較 (図 41) 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 41A) 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区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 41B)。

つぎに、MSC 及び骨分化細胞の糖鎖分布の比較 (図 42) 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 42A,42B)。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 43)。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 43A)。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 43B)。

#### C-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

##### C-4-1 Ad-CXCL12 投与マウスにおける血液細胞の動態解析

健全成体において造血幹細胞は骨髄ニッチに存在し、G0 期を維持している。一方、癌化学療法時や放射線照射時等負荷時には、種々のサイトカインやケモカインが産生され、幹細胞は G1 期に入ると同時に末梢に遊離されてくることが知られており、この現象は骨髄動員とよばれる。骨髄動員には G-CSF や CXCL12 等の種々のサイトカインが関与しており、これらのサイトカインの骨髄中濃度により造血幹細胞が骨髄に留まるのか、あるいは末梢に遊離するのかが決まると考えられる。

本研究では、CXCL12 を Ad ベクターを用いてマウス生体に高発現させることによって、血液細胞の分化・動態に対しどのよ

うな影響がみとめられるのかについて検討した。用いた Ad ベクターは、従来の CMV プロモーターに比べ数倍から十数倍の活性を有し、CAG プロモーターと同等以上の活性を有するイントロン A を付与した CMV プロモーターを用い、その下流に CXCL12 遺伝子を挿入した。CXCL12 発現 Ad ベクター(Ad-CXCL12)を C57BL/6 マウスに  $5 \times 10^{10}$  VP/mouse の濃度で静脈内投与したところ、5 日後において約 17 ng/ml の CXCL12 が血漿中にみとめられた。各組織の細胞数を測定したところ、コントロールとくらべて CXCL12 発現ベクターを投与したマウスでは、骨髄の細胞数は有意に減少するとともに、末梢血および脾臓の細胞数は有意に増加していた(図 44)。また、胸腺の細胞数には著差がなかった。次に、骨髄・脾臓・末梢血における各系列の細胞数をフローサイトメーターを用いて測定した(図 45)。その結果、骨髄では骨髄球系細胞数および B 細胞数の著明な減少がみとめられ、代わりに末梢血においてこれらの細胞数は増加していた。したがって、Ad-CXCL12 の投与により末梢血中の CXCL12 濃度が増加し、骨髄中の種々の血液細胞が末梢に遊離してくるものと推察された。

次に、各組織における血液前駆細胞数をコロニーアッセイにより測定した。骨髄、末梢血、脾臓の各組織を用いてコロニーアッセイを行った結果、骨髄の前駆細胞は CFU-GEMM を含む調べた全ての lineage に

ついて減少していた。また、末梢血および脾臓の前駆細胞は有意に増加していた。したがって、前述した骨髄での細胞数の減少、および末梢血・脾臓での細胞数の増加は前駆細胞数の変化によるものであることが明らかとなり、骨髄を遊離した前駆細胞が末梢血を經由して脾臓に生着している可能性が示唆された (Fig. 46)。骨髄での血液前駆細胞数の減少が認められたため、次に、マウスの造血幹細胞を含む画分とされている  $c\text{-kit}^+\text{Sca-1}^+\text{lin}^-$  (KSL) 細胞の数を測定することにより、造血幹細胞数の変化を検討した。その結果、Ad-CXCL12 を投与したマウス骨髄の KSL 細胞数はコントロールと比較し約 1/4 にまで減少していた (Fig. 47)。したがって、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となった。

CXCL12 は生理的に B 細胞分化に必須であることが遺伝子欠損マウスの解析により明らかとなっている。そこで、次に B 細胞系列の動態について解析を行った。Ad-CXCL12 投与後 5 日目の骨髄および脾臓における B 細胞数を調べた結果、骨髄では  $\text{IgM}^+\text{B220}^+$  成熟 B 細胞が有意に減少していた (Fig. 48A)。一方、脾臓においては本来骨髄にしか存在しないはずの  $\text{IgMB220}^+$  B 前駆細胞が増加しており、CXCL12 により、プロ B、プレ B といった B 前駆細胞も骨髄から遊離し、脾臓に生着している可能性が示唆された (Fig. 48A)。また、Ad-CXCL12 の投与により脾臓におい

て B 前駆細胞が増加していることは、IL-7 を用いたコロニーアッセイにおいても確認され (Fig. 48B)、CXCL12 により骨髄から遊離した B 前駆細胞が脾臓に生着していることが示唆された。そこで、B 前駆細胞が実際に脾臓に生着しているかどうかを免疫抗体染色により解析した。その結果、Ad-CXCL12 を投与して 5 日後に脾臓において  $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{B220}^+$  の B 前駆細胞が確認された (Fig. 48C)。一方、Ad-Luc 投与マウスの脾臓では B 前駆細胞は検出されなかった。以上の結果から、Ad-CXCL12 投与により血漿 CXCL12 濃度を上昇させることで、脾臓に本来存在しないはずの B 前駆細胞が生着していることが示された。Ad-CXCL12 の投与により、脾細胞数が増大し、かつ脾臓に B 前駆細胞を含む血液前駆細胞が増加していたため、次に脾臓の構造を組織学的に観察した (Fig. 48D)。ベクター投与後の脾臓を HE 染色にて観察した結果、コントロールとくらべて構造上は大きな差が認められず、正常であることを確認した。

B 細胞は抗原の刺激に応答して抗体を産生する細胞である。Ad-CXCL12 をマウス生体へ投与することにより B 細胞の動態が変化しているため、液性免疫に影響をおよぼしているかどうか検討した。Ad-CXCL12 投与 3 日後に T 細胞依存性 (TD) 抗原である chicken  $\gamma$ -globin (CGG)、または T 細胞非依存性 (TI) 抗原である Ficoll を腹腔内投与し、その 2 週間後に抗体産生量を解析した。その結果、Ad-CXCL12 投与群は、Ad-Luc 投与

群と比較し、CGG に対する IgM、IgG1 の抗体産生量が低下することが明らかとなった。一方で、Ficoll に対する抗体産生量はわずかではあるものの増加していた (Fig. 49)。以上の結果から、Ad-CXCL12 投与により、B 前駆細胞の動態を変化させるだけでなく、B 細胞の抗体産生に関しても影響をおよぼすことが明らかとなった。

#### C-4-2 Ad-CXCL12 投与マウスにおける血液細胞の動態解析

これまでの結果から、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となった。そこで次に、CXCL12 発現 Ad ベクター投与後に GFP トランスジェニックマウス由来の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造血幹細胞の空きニッチを維持するために、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 (Fig. 50)。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。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下ことが推察される。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 21)。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-4-3 VEGF による骨髄動員作用

CXCL12 以外にも、VEGF や Angiopoietin (Ang)-1 などのサイトカインも骨髄の造血幹/前駆細胞を骨髄ニッチから遊離させる作用を有している。そこで、VEGF 発現 Ad ベクター (Ad-VEGF) を作製し、 $5 \times 10^{10}$  VP/mouse の濃度でマウス静脈内投与したところ、約 100ng/mL の VEGF が血漿中に認められた (Fig. 51)。そこで次に、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 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. 52)。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 KSL 細胞数が減少することを明らかにした。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. 53A, 53B)。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. 53C)。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、興味深いことに、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. 54)。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-4-4 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。そこで本研究ではマウス 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。そのため、本研究では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. 55A)。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. 55B)。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. 55C)。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 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

##### C-5-1 コロニー形成

細胞の軟寒天培地中でのコロニー形成能について、顕微鏡下の観察をしたところ、HeLa 細胞は、培養期間とともにコロニーを形成し、コロニーサイズも大きくなっていくのに対し、軟寒天培地中の hMSC (lot C) は、明らかなコロニーは認められなかった。Fig. 62 に CBA-130 用軟寒天培地中での細胞のコロニー形成の様子を示す。CBA-140 用軟寒天培地中での細胞のコロニー形成についても、同様の結果であった (データ省略)。

##### C-5-2 用量作用関係

1 ウェルあたりに播種した細胞数と、10

日、20日もしくは30日後に測定した蛍光シグナルまたは化学発光シグナルとの間の用量作用関係を Fig. 63 に示す。CBA-130 (生細胞回収なし、蛍光検出)、CBA-140 (生細胞回収あり、蛍光検出)、CBA-140+CellTiter Glo (生細胞回収あり、化学発光検出)の3種のアッセイ系のいずれにおいても、HeLa 細胞における検出シグナルは、hMSC (lot C)における検出シグナルと比較し、低用量で発現し、かつ培養期間に依存する増加が顕著であることが認められた。

### C-5-3 検出限界

3種のアッセイ系の検出限界を Fig. 64 に示す。3種のアッセイ系に共通して、HeLa 細胞の検出限界が hMSC (lot C)の検出限界よりも10倍以上低く、また HeLa 細胞の検出限界は培養期間依存的な低下が認められた。また、蛍光検出系に比べ、化学発光検出系の方が検出限界が顕著に低いことが明らかとなった。

### C-5-4 感度

3種のアッセイ系の感度を Fig. 65 に示す。3種のアッセイ系に共通して、HeLa 細胞の検出限界が hMSC (lot C)の検出限界よりも10倍以上高く、また HeLa 細胞の感度は培養期間依存的な上昇が認められた。また、蛍光検出系に比べて化学発光検出系の方が、検出限界が顕著に高いことが明らかとなった。

### C-5-5 選択性

hMSC (lot C)と比較した場合の、3種のアッセイ系の HeLa 細胞への選択性を Fig.

66(top)に示す。3種のアッセイ系に共通して、HeLa 細胞への選択性は培養期間依存的に上昇することが認められた。また、蛍光検出系に比べ、化学発光検出系の方が HeLa 細胞への選択性が低い傾向にあった。10日間の培養では蛍光検出系を用いた場合は100倍以上の選択性は得られず、化学発光検出系を用いた場合は20日間以下の培養では100倍以上の選択性が得られなかった。

### C-5-6 精度

3種のアッセイ系について、HeLa 細胞と hMSC (lot C)とを峻別する精度 (併行精度) を検討した結果、培養期間に係らず、CBA-130 (生細胞回収なし、蛍光検出)のアッセイ系が他の2種のアッセイ系と比較して低いP値 (=高い精度) を示した。(Fig. 66(bottom))

### C-5-7 hMSC の製造ロット (ドナー) による差異

HeLa 細胞は樹立された細胞株であるが、hMSC はロットを構成し、各ロットは単一ドナー由来である。したがって、上で観察されたアッセイ形の特徴は、製造ロット (またはドナー) に特異的である可能性が考えられる。そこで、アッセイ系の特徴が、hMSC の製造ロットもしくはドナーに依存しているかを検討する目的で、上で検討したロット(C)に加えて2つのロット (B, H) を用いた場合のアッセイ系の特徴を評価した。hMSC (lot C)と比較した場合の、3種のアッセイ系の HeLa 細胞への選択性は、培養期間依存的に上昇することが認められたため、培養期間はロット C を用いて検討した中で最長期間である30日間を選択した。その

結果、Fig. 67 に示すとおり、ロットBおよびHにおいても、検出限界および感度については 3 種のアッセイ系のうち CBA-140+CellTiter Glo (生細胞回収あり、化学発光検出) が優れており、一方、選択性および精度は CBA-130 (生細胞回収なし、蛍光検出) が優れていることが明らかとなった。

## **C-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**

### **C-6-1. 低酸素・グルコース欠乏処理による細胞の生存**

虚血 (低酸素・グルコース欠乏) 条件下での、6 ロットの hMSC の生存の時間経過を図 68 に示す。コントロール群の生存率は比較的一定であったが、Repeated Measures One-way ANOVA を行ったところ、虚血群とコントロール群と比較した場合、細胞生存率に優位 ( $P < 0.05$ ) な差異が認められた。同時点における 2 群間の比較をした場合には、低酸素・グルコース欠乏処理開始後 48 時間で優位な差が認められた。これらの結果より、サイトカインの測定用の培養上清は低酸素・グルコース欠乏処理開始後 24 時間の時点で回収することとした。

### **C-6-2 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、RT<sup>2</sup> 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。

RT<sup>2</sup> 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 (PIGF : Placental Growth Factor)、アンジオゲニン (Angiogenin)、 $\beta 1$  型形質転換成長因子 (TGF- $\beta 1$  : Transforming Growth Factor-beta1) の遺伝子発現に有意な上昇が認められた (図 69 ~ 74)。

### **C-6-3 サイトカイン抗体アレイによるサイトカイン放出プロファイルの検討**

RayBiotech 社のサイトカイン抗体アレイを用いて、24 時間の低酸素・グルコース欠乏処理 (HGD) を行った場合の細胞上清とコントロールの細胞上清とで、含有されるサイトカインのプロファイルを比較した。化学発光量を定量したところ、HGD 群においてコントロール群と比べて有意な上昇 ( $P < 0.05$  [Paired t-test]) が認められたのは、PIGF、osteoprotegerin、osteopontin、TGF- $\beta 2$ 、および FGF-4 であった (図 75)。細胞が低酸素環境に暴露されると産生および分泌が増加するサイトカインとしてよく知られている VEGF に関しては、HGD 群とコントロール群とで差が認められなかった。

### **C-6-4 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、