

PIGF、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 (図 76, 77)。

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 (図 78, 79)。

PIGF 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 (図 80)。

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-6-5 虚血後における hMSC の VEGF 分泌能と関連する遺伝子の探索

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、② PS#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 分泌能と関連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 (表 28, 29)。

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 (表 30)。

C-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

C-7-1 AC133 陽性細胞由来 early EPC、単核球由来 early EPC、および late EPC の形態と FACS による特性解析

図 81 に AC133 陽性細胞由来 early EPC、単核球由来 early EPC、および late EPC の分化・誘導法を示した。単核球由来 early EPC は AC133 陽性細胞由来 early EPC を含むヘテロな集団と考えられる。 10^8 個の単核球の中には約 1%、すなわち 10^6 個程度の AC133 陽性細胞が存在し、その数パーセントが AC133 陽性細胞由来 early EPC となる。AC133 陽性細胞由来 early EPC は TPO 刺

激で増加させることができ、 10^6 個の AC133 陽性細胞から約 10^5 個程度の AC133 陽性細胞由来 early EPC を得ることができる。一方、 10^8 個の単核球からは、約 10^6 個の単核球由来 early EPC が得られる。

AC133 陽性細胞を 1 週間培養した後、CD31 強陽性細胞を FACS で分画し、FN コートディッシュ上で培養すると図 82 上に示すように紡錘状の early EPC が出現した。また、単核球由来 early EPC も同様に紡錘状の形態を示した。

1 週間培養後の AC133 陽性細胞を抗 CD45 抗体-FITC で染色してフローサイトメーターで解析すると、殆どすべての細胞が白血球共通抗原である CD45 陽性であった(図 83 左上)。また、単核球由来 early EPC も CD45 陽性であり(図 83、左下)、これらの細胞はともに血球系であると考えられた。

図 83 の中段はタイプ IV コラーゲンコートプレート上で一週間培養した AC133 陽性細胞を一晩 FN コートプレート上に培養し、接着した細胞を解析した結果である。接着細胞は殆ど CD31 強陽性分画に由来する(Kanayasu-Toyoda et al., J Cell Physiol. 2003)ため、これらの細胞は AC133 陽性細胞由来 early EPC である。AC133 陽性細胞由来細胞及び単核球由来細胞はいずれも CD31 陽性であった。

CD14 の発現に関しては、単核球由来 early EPC は殆どが陽性であるのに対し、AC133 陽性細胞由来 early EPC は陽性と陰性を含むヘテロな集団であった(図 83 右)。血液から分離される AC133 陽性細胞は単核球画分に含まれるため、単核球由来 early EPC には AC133 陽性細胞由来 early EPC

が含まれていると想定される。AC133 陽性細胞由来で CD14 陰性の細胞が単核球由来 early EPC で検出されていないのは、単核球由来 early EPC に含まれる CD14 陰性細胞の割合が低いためであると考えられる。

これらの結果から、CD31 および CD45 の発現と形態の点では AC133 陽性細胞 early EPC と単核球由来 early EPC は類似していると考えられた。特性指標の探索や特性解析法の検討においても、再生医療への応用においても、細胞数の確保は重要な要素であると考え、以下の実験は単核球由来 early EPC を用いて実施した。

図 84 に early EPC、late EPC 及びヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)の位相差顕微鏡画像を示す。HUVEC は、組織由来の成熟血管内皮細胞の例として用いた。Early EPC は紡錘状を示しているが、late EPC、HUVEC では血管内皮細胞に典型的な敷石状の形態が観察された。細胞表面マーカーを FACS で解析すると、これらの細胞はいずれも CD31 陽性であった(図 85)。一方、CD45、CD14 の発現は early EPC では陽性であるのに対し、late EPC 及び HUVEC は陰性であった。代表的な血管内皮細胞のマーカーである KDR/VEGFR2 の発現は early EPC では弱陽性、late EPC 及び HUVEC では陰性と陽性の 2 集団が観察された。Vascular endothelial cadherin (VEcad) の発現は early EPC では弱陽性、late EPC 及び HUVEC では陽性であった。これらのことから、late EPC の細胞表面マーカー発現は組織由来血管内皮細胞である HUVEC と類似していること、early EPC の細胞表面マーカー発現は late EPC や

HUVEC と異なり、血球系のマーカーを発現している細胞であることが明らかとなった。

これら 3 種の細胞を免疫染色した結果を図 86 に示す。図 85 で示した CD45 および CD14 発現に関する解析結果は、免疫染色でも確認された。また、early EPC、late EPC 及び HUVEC はいずれも、endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 発現陽性であった(図 86、2 段目)。

以上の結果から、early EPC と late EPC は、血管内皮細胞マーカーである CD31、eNOS を共通して発現していること、early EPC は CD45 および CD14 陽性の血球系の細胞であり、late EPC や HUVEC とは異なる系統の細胞であることが示された。

C-7-2 Early EPC の培養上清による冠状動脈内皮細胞 (HCAEC) 管腔形成・遊走促進

Early EPC は虚血性心疾患の細胞治療にも応用されようとしている。そこで、冠状動脈内皮細胞 (HCAEC) の管腔形成や遊走に対する early EPC 培養上清 (CM) の促進効果を検討した。図 87a に示すように、early EPC の CM は 10 倍希釈、5 倍希釈と濃度に依存して HCAEC の管腔形成を有意に促進した。また、HCAEC の遊走も同様に CM 添加により促進された(図 87b)。

C-7-3 Early EPC の *in vivo* 活性評価系

血管再生療法に用いられる細胞の *in vivo* 活性評価系を確立した。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注射した(図 88)。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、超薄切片を作成した。図 89 に示すように、

early EPC とともに移植したマトリゲル内にはマウス由来の CD31 陽性細胞から成る多くの血管が観察された。我々が培養した early EPC は顕著な血管形成促進作用があることが示された。

C-7-4 Early EPC の特性指標の探索

図 87 に示したように early EPC の培養上清には血管新生に関わる細胞応答を促進する作用があることから、early EPC の特性指標候補分子を探索するため、血管新生に関わる遺伝子 84 種類について、HUVEC あるいは late EPC を対照として、多検体同時比較 Real Time PCR により発現プロファイル解析を行った。

図 90 は early EPC および HUVEC について、各細胞における被験遺伝子の発現量と β アクチン遺伝子発現量の比をプロットしたものである。グラフ上に遺伝子名が示してある点は、early EPC と HUVEC で発現量に有意差の認められた遺伝子である。Early EPC は HUVEC と比較して、CXCL9、CXCL10、CXCL3、IL-8、CCL2、IL1B、TNF、VEGFA などのサイトカイン・ケモカイン類の遺伝子を高発現していた。その中で IL-8、CCL2 は VEGFA と同様に直接血管内皮細胞の遊走や増殖を促進するという報告がある。従って、early EPC 自身は管腔形成をしないが、近隣の血管内皮細胞の血管新生を直接的あるいは間接的に促進する可能性が考えられる。一方、HUVEC では、LAMA5 (Laminin, alpha 5)、PECAM1 (CD31)、COL18A1 (Collagen, type XVIII, alpha 1)、ITGAV (Integrin, alpha V)、ITGB3 (Integrin, beta 3) などの細胞接着関連タンパク質の遺伝子発現が高いことが

観察された。興味深いことに血管新生に重要と考えられるマトロプロテアーゼである MMP-9 は early EPC で、MMP-2 は HUVEC で、より多く発現されていた。

Late EPC と HUVEC では、遺伝子発現プロファイルにほとんど差が認められず、late EPC は組織由来の血管内皮細胞と類似した性質を持つことが示唆された (図 91)。差はわずかではあるが、Late EPC と比較して HUVEC では LAMA5 (Laminin, alpha 5) や ITGB3 (Integrin, beta 3) など細胞接着に関連する遺伝子の発現が高かった。また Late EPC と比較して HUVEC で発現量が高かった THBS2 (Thrombospondin 2) は、血管新生抑制因子として知られている。図 92 に示すように、early EPC と late EPC の遺伝子発現を比較した場合、early EPC と HUVEC の比較と同様の結果が得られた。

これらの結果から、early EPC と late EPC では、遺伝子発現プロファイルが大きく異なること、late EPC は成熟した血管内皮細胞である HUVEC と類似した遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかとなった。

C-7-5 種々の細胞における MMP-2/MMP-9 の発現

Early EPC における MMP-9 タンパク質の発現を種々の細胞の培養上清を用いてウエスタンブロット法とザイモグラフィで検討した(図 93)。その結果、early EPC の培養上清にのみ MMP-9 のバンドが検出され、late EPC、HUVEC、HCAEC の培養上清には MMP-2 のバンドが検出された。また、ザイモグラフィでは、ウエスタンブロットでバンドが検出された試料について、ウ

エスタンブロットと同じ分子量を示す泳動位置にゼラチン分解により生じるバンドが検出された。MMP-2 および MMP-9 の発現パターンは、は図 90 や図 92 の遺伝子発現プロファイルと一致するものであった。

MMP-2 や MMP-9 を産生する細胞は、細胞外マトリックスの分解により周囲に浸潤する活性が高いと考えられる。また、高い浸潤活性には MMP-2 や MMP-9 が細胞表面に存在することが必要であるという報告もある (Brooks et al. Cell 85 683 1996, Yu et al. Gene Dev. 2000 14 163)。そこで、フローサイトメトリーにより MMP-2/MMP-9 の細胞表面局在を検討した。その結果、early EPC の細胞表面には MMP-9 のみならず、培養上清には観察されなかった MMP-2 も検出された(図 94)。一方、late EPC、HUVEC、HCAEC の細胞表面には、遺伝子発現解析結果に一致して MMP-9 は検出されず、培養上清に検出された MMP-2 も細胞表面には検出されなかった(図 94)。

細胞膜タンパク質である CD44 と結合して MMP-9 が細胞表面に存在しているという報告 (Yu et al. Gene Dev. 2000 14 163, Bansal Plos ONE 4 e4911 2009) を参考に、early EPC を免疫染色し、フローサイトメーターと共焦点顕微鏡(図 95)で解析した。その結果、MMP-9、MMP-2、CD44 は、いずれも early EPC の表面に存在することが示された。MMP-9 あるいは MMP-2 と CD44 の 2 重染色 (フローサイトメーター 3 段目) では、MMP-9 陽性あるいは MMP-2 陽性の細胞で CD44 陰性の細胞は殆ど観察されなかった。

次に early EPC を細胞質と細胞膜に分画後、MMP-9、MMP-2、および CD44 の発

現をウエスタンブロットで解析した結果、共焦点顕微鏡(図 95)による解析と同様に、細胞膜画分に MMP-9、MMP-2、および CD44 が検出された(図 96)。また、還元条件下で電気泳動後、ウエスタンブロットにより MMP-9 及び MMP-2 の分子量を細胞内と培養液中で比較したところ、細胞内の方がともに小さいことが明らかとなった(図 97)。したがって、膜に局在する MMP-9 及び MMP-2 は活性型と考えられた。

C-7-6 Early EPC の浸潤活性

マトリゲルに対する early EPC の浸潤活性を、late EPC、HUVEC、HCAEC と比較した。浸潤刺激因子としては VEGF を用いた。マトリゲルは、細胞外マトリックスタンパク質を豊富に含む Engelbreth-Holm-Swarm マウス肉腫から抽出した可溶性基底膜から成り、主成分は、ラミニン、コラーゲン IV、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、およびエンタクチン/ニドジェン 1,2 である。解析の結果、early EPC では late EPC、HUVEC、HCAEC に比べ 3 時間でも高い浸潤活性が観察され、23 時間でも持続することが明らかになった(図 98)。VEGF と共に MMP-2/MMP-9 阻害剤を加えると early EPC の VEGF 刺激に応答した浸潤は完全に阻害された(図 99)。これらの結果から、early EPC の浸潤には MMP-2/MMP-9 が関与していることが示され、early EPC が投与局所において新生血管形成のために高効率に浸潤できる可能性が考えられた。

C-7-7 AC133 由来 early EPC における MMP-9 の発現

これまでの解析から、単核球由来 early EPC は MMP-2/MMP-9 を発現していることが明らかになった。そこで、AC133 由来 early EPC における MMP-2/MMP-9 の発現を共焦点顕微鏡で検討した。図 100 に示すように AC133 由来 early EPC も MMP-2/MMP-9 を発現し、この点でも単核球由来 early EPC と共通していると考えられた。

C-7-8 Early EPC の IL-8 に対する遊走の解析

Early EPC による血管形成促進の機構として、early EPC が虚血部位に浸潤・遊走し、多くのサイトカインを放出して、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という仮説が考えられた(図 101)。そこで、この過程において重要な、early EPC の遊走に関わるシグナル伝達機構を解析した。

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 は IL-8 に対し遊走しなかった(図 102)。

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(図 103)、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(図 83)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(図 104)。以上のことから、early EPC は分化の過程で IL-8 に対する遊走能を失う可能性が示された。

C-7-9 Early EPC の VEGF に対する遊走の解析

次に、遊走促進因子を VEGF に変えて earlyEPC の遊走能を調べた。その結果、図 105 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タンパクとして 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(図 106)。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(図 107)。また、AC133 由来 early EPC も免疫染色の結果、p110 PI3K δ を発現していることが確認された(図 108)。Early EPC における p110 PI3K δ の発現を siRNA により抑制すると図 109

右に示すように p110 PI3K δ タンパク発現は抑制され、VEGF に対する遊走も有意に抑制された(図 109 左)。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-7-10 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図 110 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(図 111)。

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(図 112)。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(図 114左)。

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 株ではオクルディンの発現が検出されなかった(図 114右)。

オクルディンは図 113 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-7-11 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 及び OCLN-KD-2) を導入したところ、オクルディンの mRNA (図 115 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(図 115 右)。また、これらの siRNA の導入により、管腔形成が抑制された(図 116、117)。

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、細胞が網目状にならび、4 時間まで管腔様構造が認められた。しかし、

20 時間では、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(図 118)。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-8 人工多能性幹細胞の品質・安全性に関する研究

C-8-1 細胞の同一性・同等性評価法の開発

これまで分担者が報告したヒト iPS 細胞は白人由来のものであり、本邦にて iPS 細胞に立脚した将来の細胞組織加工医薬品に発展させるには、日本人由来 iPS 細胞に関する知見が必要である。そこで、6 歳から 81 歳の男女に由来する線維芽細胞を入手し、レトロウイルスベクターにより Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc を導入し、iPS 細胞を樹立した。これらの iPS 細胞のコロニーは典型的なヒト ES 細胞様の形態を示した。RT-PCR により、ES 細胞マーカーの発現は、ヒト ES 細胞や、我々が報告した白人由来 iPS 細胞と同様であった。本研究項目の解析対象である細胞表面抗原について、全日本人 iPS 細胞について、SSEA-1、SSEA-3、および TRA-1-81 などに対する抗体で染色を行ったところ、それらの結果は、ES 細胞と同様であることが明らかとなった。継代を行っていても、これらの特徴が同様に保持されるのか詳細に調査する。また、いくつかの年齢の異なる iPS 細胞について胚葉体形成法による *in vitro* 分化能や、SCID マウス移植によるテラトーマ形成法で *in vivo* 分化能を調べたが、多能性の観点で年齢差は認められなかった。

C-8-2 特性解析法の開発

上述の日本人 iPS 細胞を用いて品質特性の評価法開発の一環として、まず DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。Cyanine 3 で標識したトータル RNA を調製し、全ヒトゲノムマイクロアレイにハイブリダイズさせ、解析データ解析をヒートマップなどにまとめた。その結果、線維芽細胞と iPS 細胞は非常に遺伝子発現が異なることが明らかとなった。一方、iPS 細胞間および iPS 細胞と ES 細胞間の違いは極めて小さかった。今後、iPS 細胞を分化誘導させて得られる様々な系譜の細胞について同様の解析を行っていき、細胞機能との相関を調べ、DNA マイクロアレイの細胞評価における有効性を検証していく予定である。

C-9 細胞特性・品質解析技術としての糖鎖解析技術の開発

C-9-1 細胞ムチン型糖鎖解析技術の開発 (平成 20 年度)

コアタンパク質の Ser/Thr 残基に結合する O-結合型糖鎖の解析は、アルカリ還元法により O-結合型糖鎖を遊離し、HPLC や MS により解析する方法が一般的である。しかしながらアルカリ還元法では、糖鎖の遊離に数十時間を要し、得られる糖鎖は糖アルコールとなるため高感度検出のための誘導体化反応が行えず、N 型糖鎖の解析に比べ遅れている。我々は O-結合型糖鎖の構造解析における問題点を解決するため、誘導体化反応が可能なヘミアセタール構造を有する O-結合型糖鎖を数分以内に得ることができる高速糖鎖自動切断装置“AutoGlycoCutter (AGC)”を開発している。そこで、AGC

により得られた細胞中のムチン型糖鎖を蛍光標識後、セロトニンアフィニティークロマトグラフィー及び順相分配型 HPLC を用いてムチン型糖鎖のプロファイリング法について検討した。

最初に 4 種類の血球系癌細胞および膵臓癌細胞 2 種 (PANC1、BxPC3)、大腸癌細胞 2 種 (LS174T、HCT15)、胃癌細胞 2 種 (MKN45、MKN7) について、 1×10^6 細胞当りのムチン型糖鎖量の比較を行った (Fig.119)。4 種類の血球系癌細胞のムチン型糖鎖の含量は上皮系細胞に比べ低かった。一方、上皮系細胞 6 種のうち、LS174T、MKN45 は血球系癌細胞の 10 倍以上のムチン型糖鎖が発現しており、細胞種によってムチン型糖鎖の含量は大きく異なることがわかった。また、各細胞に含まれるムチン型糖鎖のプロファイルについて比較を行うと血球系癌細胞のいずれも Sialyl-T と 7Disialyl-T が主要なムチン型糖鎖であった (Fig.120、Table 31)。また、HL60 については、Sialyl-T と Disialyl-T 以外に Core2 構造を基本骨格とする糖鎖も観察された (Table 31)。

上皮系癌細胞に含まれるムチン型糖鎖のプロファイルについては、膵臓癌細胞 PANC1 と BxPC3、胃癌細胞 MKN7 では血球系癌細胞に似たプロファイルを示し、Sialyl-T と Disialyl-T が主要なムチン型糖鎖であった (Fig.121)。一方、他の癌細胞については、多種多様なムチン型糖鎖が観察された。次に、各癌細胞に含まれるムチン型糖鎖をセロトニンアフィニティークロマトグラフィーにより分画し、各分画について MALDI-TOF MS を用いて解析した (Fig.122)。膵臓癌細胞 PANC1 では、モノシアロ分画 (P-2) には Sialyl-T、ジシアロ分画 (P-4) には Disialyl-T のみが、BxPC3 ではモノシア

ロ糖鎖の含量が最も高く Sialyl-T と Disialyl-T の他、ムチン Core2 構造を基本骨格として持つ糖鎖も観察された (Table 32)。

大腸癌細胞 LS174T は多くの種類のムチン型糖鎖を含み、37 種類のムチン型糖鎖を確認できた (Table 33)。LS174T 中のムチン型糖鎖は Core2 構造を骨格とし、Gal β 1-GlcNAc β 1-6 側鎖上に LacNAc (Gal β -GlcNAc) が伸張した糖鎖が多く、さらにフコースあるいは硫酸基によって修飾を受けた糖鎖が観察された (Table 33)。一方、HCT15 はムチン型糖鎖含量が低い、Sialyl-T と Disialyl-T の他、Core2 構造を骨格とするムチン型糖鎖と硫酸基が付加した糖鎖が観察された (Table 33)。

胃癌細胞のうち MKN45 はジシアロ糖鎖 (M-4) が全体の 60%以上を占め、さらにトリシアロ糖鎖 (M-5) も多く観察された (Table 34)。MKN45 のジシアロ分画 (M-4) およびトリシアロ分画 (M-5) に含まれるムチン型糖鎖は LS174T と同様に LacNAc (Gal β -GlcNAc) を数残基持つポリラクタサミン型糖鎖が多く観察されたが、LS174T とは異なりフコースや硫酸基で修飾された糖鎖は全く観察されなかった (Table 34)。一方、MKN7 はモノシアロ糖鎖が全体の約 75%を占め、主要なムチン型糖鎖は Sialyl-T と Sialyl-Tn であったが LacNAc を 1 残基もつ Core2 タイプの糖鎖も観察された (Table 34)。

以上、平成 20 年度は細胞のムチン型糖鎖プロファイリング法について検討し、O-結合型糖鎖の解析を 3 日以内に完了する技術を開発できた。

C-9-2 細胞 O-結合型糖鎖の分画技術の開発 (平成 21 年度)

O-結合型糖鎖の解析は、アルカリ還元法

により O-結合型糖鎖を遊離し、HPLC や MS により解析する方法が一般的である。しかしながら同じ O 結合型糖鎖でも、GalNAc を介しコアタンパク質に結合するムチン型糖鎖と Xyl を介しコアタンパク質に結合する GAG 型糖鎖は、糖鎖の物理化学的な特性の違いから、分離分析については異なる手法を用いて行われてきた。平成 21 年度は前年度開発したムチン型糖鎖プロファイリング法を、GAG 型糖鎖解析へ応用を図った。

最初にウシフェツイン由来ムチン型糖鎖とヒアルロン酸オリゴ糖混合物をモデル試料として、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる両糖鎖の分離について検討した。結果を Fig.123 に示す通り、シアリル T、ジシアリル T、ヒアルロン酸オリゴ糖を一回の分析で分離できる条件を設定することができた。

次にヒト大腸癌細胞 HCT116 の O 結合型糖鎖混合物についてセロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる分画を試みた。結果を Fig.124 に示す。その結果、3 分～16 分の間にシアル酸残基数の異なるムチン型糖鎖と考えられる 6 つのピークが観察された。一方、1M NaCl の溶出により 22 分～26 分に GAG 型糖鎖と考えられるピークが観察された。観察された各ピークを分画し、順相 HPLC とキャピラリー電気泳動により分析した。

順相 HPLC では、M1～M6 の全ての分画においてムチン型糖鎖が観察された (Fig.125, Table 35)。M1 分画ではムチン型 Core2 構造を持つ 4 糖を主とし、さらにラクタサミンユニット (Gal β 1-4GlcNAc) が 1~2 ユニット付加したオリゴ糖が観察された。M2 分画では Core2 骨格を持つ 4 糖のいずれかの Galactose 残基に N-アセチルノイラミン酸が付加したモノシアロオリゴ糖を主とし、

これらのオリゴ糖にさらにラクトサミンユニットが 1~2 ユニット付加したオリゴ糖が観察された (Fig.125, Table 35)。M3 分画では約 20 分にシアリル T 抗原糖鎖が観察され、シアリル T 抗原糖鎖に N-acetylglucosamine が付加したオリゴ糖の含量が最も高かった。10 分以降に溶出された M4~M6 のうち、M4 分画は、N-アセチルノイラミン酸と Galactose から構成されるオリゴ糖であり、AGC においてピーリング反応により生じた分解物であった (Fig.125, Table 35)。一方、M5 と M6 分画のオリゴ糖はいずれも N-アセチルノイラミン酸を 2 残基持つジシアロオリゴ糖であり、M5 は Core2 骨格を持つ 4 糖およびさらにラクトサミンユニット 2 ユニットが付加した 6 糖の非還元末端に N-アセチルノイラミン酸を 2 残基持つオリゴ糖であった (Fig.125, Table 35)。一方、M6 はジシアリル T 抗原糖鎖が主要なオリゴ糖であった。一方、1MNaCl によって溶出される 20 分以降の分画にはムチン型糖鎖は全く観察されなかった。

1MNaCl によって溶出される 20 分以降の分画は、不飽和二糖とし蛍光標識化し 2 糖組成分析を実施した。Fig.126 に HCT116 細胞由来の 1M NaCl 溶出分画を分析した結果を示す。フェログラム上で観察される各不飽和二糖の構造を Fig.127 に示す。不飽和二糖標準品の分析結果との比較、および標準品の添加実験により各ピークを同定した。結果、コンドロイチン硫酸類として、HCT-116 は硫酸基を持たない Δ di-HA、 Δ diCS-0S、 Δ diCS-4S および Δ diCS-6S、 Δ diCS-SE の 2 糖単位より構成されるコンドロイチン硫酸鎖を持つことがわかった。一方、ヘパリン/ヘパラン硫酸鎖については Δ diHS-0S、 Δ diHS-NS、 Δ diHS-6S、 Δ diHS-2S、 Δ diHS-S1、 Δ diHS-S2、 Δ diHS-S3、 Δ diHS-TriS

が観察された。以上の結果、HCT116 では硫酸基を持たない Δ diCS-0S や Δ diHS-0S により構成される GAG 鎖を多く含むと考えられた。

以上、平成 21 年度はセロトニンアフィニティークロマトグラフィーを用いて細胞の O-結合型糖鎖群からムチン型糖鎖と GAGs を簡便に分画しかつ、両糖鎖を定量的に分析する方法を開発した。

C-9-3 細胞 O-結合型糖鎖の比較解析 (平成 22 年度)

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、アシアロ、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.128 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、腓

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.129 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.130 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。

以上、平成 22 年度は前年度までの 2 年間で開発した細胞の O-結合型糖鎖解析技術を利用し、10 種類の培養癌細胞の比較解析を実施した。その結果、ムチン型糖鎖とグリコサミノグリカン鎖の定量的な発現情報を活用すれば、遺伝子やタンパク質マーカーに匹敵する精度で細胞の個性解析が可能となることがわかった。

D. 考察

D-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

D-1-1 HBV の濃縮・高感度検出法の開発

HBV の濃縮・高感度検出法として、PLL 結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法を開発し、PLL 磁気ビーズを用いることにより、ごく微量の HBV を含む血漿から HBV を濃縮して HBV DNA 及び HBsAg を高感度に検出することが可能であり、低濃度キャリアの高感度ウイルススクリーニング法としての有用性を確認した。これまで HBV をポリエチレンイミン磁気ビーズで濃縮後、NAT により検出することによる高感度検出法を検討してきたが、ウインドウ期の検体では定量的な濃縮ができないという欠点があった。このようなウインドウ期の検体の HBV の高感度検出を行うために、Zn イオンの添加により濃縮を行う方法も開発したが、Zn イオンによる濃縮は遠心操作が必要であり、迅速性、簡便性の観点から改良が必要であった。今回、Zn イオン存在下に PLL 磁気ビーズを用いて濃縮する方法を開発し、遠心操作を行わなくても磁気分離により簡便にウイルスを濃縮できることが示された。

D-1-2 PVB19 の感染系の確立

EPO 依存性網状赤血球細胞 Ku812-E2 細胞を樹立し、Ku812-E2 細胞を用いた PVB19 感染系を確立した。本感染系では細胞変性作用は認められず、持続感染系であることが明らかとなった。また、細胞の増殖に伴い PVB19 も増幅することから、一部が細胞上清に放出されるものと考えられた。この系では、細胞外へ放出されるウイルスのみならず、細胞内のウイルスも感染性を持っていることが示された。PVB19 の感染・増幅に最適な培地は血清を含む培地であり、血清成分が増幅に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。PVB19 はヒト同種由来細胞組織加工医薬品のガイドラインによりドナースクリーニングを行うように求められているが、PVB19 抗体を持っているレシピエント、あるいはドナーが抗体を持っているときに感染性にどのような影響を与えるのか論議されてきているが、本研究の結果からは、抗体存在下で持続感染が強く抑制されたことより、抗体によりウイルス感染価が中和されることが示唆された。

D-1-3 マイコプラズマの迅速検査法の比較

マイコプラズマの迅速検査法として、酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法と 3 種類の PCR 法について、*M. fermentans* をモデルに使用して比較検討した。MycoAlert 法は、PCR 法よりもさらに簡便で迅速な検査法である。しかし、 $10^3 \sim 10^4$ CFU/ml 以上のマイコプラズマが必要であり、PCR 法と比較して 100~1000 倍以上検出感度が低いことが明らかになった。EP のマイコプラズマ試験法によると、NAT を培養法の代替

法として用いるには、10 CFU/ml、DNA 染色法の代替法とするには、100 CFU/ml を検出できることを示す必要がある。MycoAlert 法は 100 CFU/ml の *M. fermentans* を検出できなかったことから、細胞の品質管理試験に用いるには妥当ではないと考えられた。

一方、局方 Nested PCR 法、リアルタイム PCR 法、PCR-ELISA 法の 3 種類の PCR 法はいずれも 45 CFU/ml の *M. fermentans* を検出可能であった。Nested PCR 法は 1st PCR の段階で 45 CFU/ml の *M. fermentans* を検出できており、2nd PCR により少なくとも 10 倍以上は感度が上昇すると考えられることから、EP の基準でも培養法の代替法として使用できる可能性がある。また、精製マイコプラズマ DNA を用いた検討により、リアルタイム PCR 法は *M. hyorhinis*、*M. orale* とも 100 fg/reaction まで検出可能であったが、PCR-ELISA 法は、*M. hyorhinis* DNA が 1 pg/reaction、*M. orale* DNA は 10 pg/reaction 必要であり、リアルタイム PCR 法が 10 倍から 100 倍感度が高いことが明らかになった。リアルタイム PCR 法は、PCR 増幅産物をオープンにすることなく測定可能で nested PCR 法のようにキャリーオーバーによる偽陽性の恐れが少なく、電気泳動の手間もなく測定可能で優れた方法と思われる。しかし、今回用いたリアルタイム PCR 法は SYBR Green で検出するため、試料は細胞由来 DNA の混入のない培養上清しか使えない。多くのマイコプラズマは細胞表面で増殖するが、マイコプラズマの種類によっては細胞表面ではなく細胞の中で増殖するものもあるとされ、このようなマイコプラズマの検出には向かないおそれがある。リアルタ

イムPCR法を細胞基材の品質管理試験として用いるには、細胞基材や培養液からの抽出効率も含めて、使用者が厳密なバリデーションを実施して測定感度や測定法としての妥当性を明らかにすることが必要と考えられる。

D-1-4 HEV 標準パネルの樹立

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、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 試験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 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

各種体性幹細胞を含む細胞治療用の細胞を、*in vitro* において培養する場合には、必ずいくつかの危険性が伴う。特に、染色体の不安定性が懸念されており、がん化につながる初期変化として、その検出は重要な課題となる。我々はヒト骨髄由来間葉系幹

細胞 hMSC を用い、長期培養による遺伝的安定性を SNP チップをはじめとするアレイ CGH の手法を用いて検討を行った。その結果、頻度は低かったが、解析した 1 例においてゲノムのコピー数の変化が認められ、マルチカラー-FISH 法による染色体解析において、7 番および 17 番染色体の転座および増幅を伴う異常を検出した。染色体特異的セントロメア FISH 法を用いて、比較的初期に起きた異常が細胞集団の中へ広がっていくことが確認されたが、いつこの異常が起きたかをはっきりさせるため、同一ロットを他の研究者から入手し、長期培養により同一の異常が出現するかを確認した。その結果、予想されたとおり、全く同じと考えられる異常が、大部分の細胞に観察され、この異常が細胞購入時に既に存在したことが証明できた。これまでに報告されたこのロットの増殖曲線を良く見ると、培養途中で立ち上がりを見せており(図 14 矢印)、この時期に異常細胞のポピュレーションが拡大したことが推察される。同様の変化は、新たに療品部より入手した同一ロットの細胞を再培養した際にも観察され、異常の出現は増殖曲線からも予測された。異常の出現時期を見ると今回再培養した際にはその時期が早くなっているが、これは今回通常と比べ、比較的コンフルエントに近い状態で継代したことが影響したと考えられる。

残念ながら、異常が観察された細胞の由来については性別、年齢、人種程度の情報しか得られないため、癌などの疾患や治療歴が無かったかを知ることはできなかったが、細胞の提供者の体内に既にこうした異常が存在した可能性もあり、それを取り出して培養したことにより、増殖性による選

選択圧がかかり、異常細胞の割合が増大していったと考えられる。これまでの検討で、この異常をもった細胞は不死化まではされていないことがわかっているが、がん化に向けたステップを踏み出しているとも考えられる。今後、細胞を利用した医薬品の製造においては、こうした異常を発生させる可能性を最大限除き、より良い品質の細胞を供給する必要がある。その意味で、低頻度から増殖性の異常をもった細胞を検出できる手法の確立が望まれる。理想的には低頻度な異常細胞を高感度検出できる試験法が望まれるが、現状では難しいと考えられるため、増殖性を生かして、一定期間継代をして異常を増幅した後検出することが現実的な対処法であると考えられる。自家細胞からの移植のように時間的な制限がある場合には難しいが、汎用性のあるバンク化した幹細胞を利用する場合などに対しては、こうした検査を課することが必要である。

我々の hMSC での結果と同様の報告が、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。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。

今回確認された hMSC における染色体異常は、品質管理という観点とは別に、その成因や増殖性のメカニズムに関しても非常に興味をもたれる。これまでの解析で、増幅部位に存在する遺伝子、および発現変化をする遺伝子群についての知見が得られているが、増殖性を説明できるには至っていない。また、CGH 解析の結果から、増加したマーカー染色体は 7 番染色体由来と考えられたが、今回のセントロメア FISH の結果から、セントロメアは 17 番染色体由来であることが確認された。ただし、m-FISH の結果からは他の部分に対しては 7 番染色体由来である可能性も考えられる。今後、クロモソームペインティング、切断点のシーケンス解析などで、詳細な染色体異常の解析を行なうことにより、異常成因に対して理解を深めたい。特に、17 番染色体は複雑なリアレンジメントを起こしていることが予想され、p53 遺伝子等の関与も含めて、次世代シーケンサーによる変異解析結果が注目される。

一方、プロテオーム解析を用いた細胞の品質および有効性に関する評価のための検討を LC-MS を用いて進め、Progenesis ソフトウェアの導入により、ノンラベル法によるサンプル間の定量比較を可能とした。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

につながることを期待される。使用した LTQ-Orbitrap 質量分析機は、高分解能、および高感度であり、ゆえに得られるデータの複雑性が高まることによりこれまでデータ解析の部分が研究を進める上で課題となっていたが、Progenesis ソフトウェアの導入により、この部分が効率化できた。ピークの認識等に関しまだ改良の余地があるものの、マニュアルでの検証を加えることにより、バイオマーカーの検索に関して、実用可能なレベルにあることが確認できた。本ソフトウェアは 2 次元電気泳動で培われた技術を元に画像ベースでのピークの検出およびアラインメントを行なっている点の特徴であるが、我々が独自に開発してきたソフトウェア mzMore は、数値データを直接取り扱っているという違いがあり、今後は Progenesis での経験を生かし、数値データを扱う利点を強調できる形で独自の開発を進めたい。

LTQ-Orbitrap と Progenesis を組み合わせることにより、間葉系幹細胞のホールプロテオーム解析で、1 万を超えるペプチドシグナルを検出可能であることがわかった。タンパク同定に関しても、複数のデータを Progenesis でまとめて MASCOT 検索を行なうことにより、同定数の向上が可能となり、千以上のタンパク質の同定を行なうことができた。今回はモデルケースとして、3 対 3 のデータ比較であったが、本ソフトウェア上では、さらに多くの LC-MS データの定量比較と統計解析が可能であり、今後はバイオマーカー検出に向けた検討を進める予定である。

さらに、今回同定されたペプチドシグナルは、検出されたペプチド数からすると半

分以下であり、今後はマーカー候補に絞った MS/MS 測定を行なうことで、さらに同定効率を上げることが課題である。また、一方で細胞由来のペプチドを網羅的に同定しリファレンスデータベースを作成することも有用であると考えられることから、今後この両面からのアプローチを行なっていきたい。

今回、継代数の違いによる変化をモデルケースとして解析し、ペプチドレベルでは 2 群間で明瞭な変化を示すペプチドが多く観察されたが、同定のついたタンパクレベルでの変化としては、はっきりとした変化は少なかった。その中で、発現変化のあったタンパク質として注目されるのは、細胞の増殖性に関与するタンパク質、および細胞骨格タンパクの変化である。前者は継代により発現が低下することにより、増殖性の低下、後者は培養による細胞の形態変化につながっている可能性があり、今後さらに解析例を増やすことにより検証を行ないたい。

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。

さらに、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期待できる。

D-3 細胞組織加工医薬品の同等性評価技術の開発

D-3-1 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

定量的糖鎖プロファイリング法を用いて、MSC 及び神経様分化細胞の糖鎖差異解析を行った結果、MSC が神経細胞様に分化すると、3 及び 4 個のシアル酸が付加した 3 本鎖糖鎖の発現量が有意に減少すること、逆に Lac をもった 3 及び 4 本鎖糖鎖が増加することが明らかとなった。一般に、複合型 3 及び 4 本鎖糖鎖は、それぞれ β 1-4-*N*-アセチルグルサミン転移酵素 (GnT-IV) 及び β 1-6-*N*-アセチルグルサミン転移酵素 V (GnT-V) による GlcNAc の付加により、分岐鎖が伸長される。一方、Lac は β 1-3 *N*-アセチルグルサミン転移酵素 (β 3GnT) による GlcNAc の付加により、側鎖が伸長する。これらの結果から、MSC を神経様細胞に分化させたとき

に、これらの糖転移酵素に何らかの変化が生じている可能性が示唆された。

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。

D-3-2 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

D-3-2-1 LC/MS による MSC 及び加工細胞の糖鎖プロファイリング

MSC 及び分化誘導した細胞から還元化糖鎖を調製して、LC/MS により糖鎖プロファイリングを行った結果、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、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。

MSC を骨細胞に分化させたときの糖鎖分布の変化については、Heiskanen, A. ら (*Glycoconj. J.*, 2009) 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報告している。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つ
た。さらに、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。

D-3-3 PCA による細胞の区別

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 による糖鎖プ
ロファイリングと 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。

D-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

ヒト血液系を有したマウスを作製し、そ
のマウスを用いて医薬品（特に細胞組織加
工医薬品）の免疫原性を評価する系を構築
するには、ヒト造血幹細胞をマウスに効率
良く生着させる技術の開発が重要である。
本研究では、造血幹細胞の生存・増殖・生
着に重要であることが知られているケモカ
イン CXCL12 やサイトカイン VEGF を Ad
ベクターを用いてマウス体内で過剰発現さ
せることにより、マウス自身の造血幹細胞
を本来の生着場所（ニッチ）から遊離させ、

ヒト造血幹細胞などの外来血液細胞を効率
良く生着させることを目的として研究を行
った。

Ad-CXCL12 をマウスに投与したところ、
骨髄の細胞数が著明に減少し、末梢血・脾
臓の細胞数が増加した (Fig. 44)。Ad ベク
ターは静脈内投与後、主に肝臓で目的遺伝
子を発現する。したがって、Ad-CXCL12 投
与後、肝臓で発現された CXCL12 が循環血
中に分泌され、血中 CXCL12 濃度が骨髄中
CXCL12 濃度を上回ったため、骨髄に生着
していた血液細胞が遊離してきたものと考
えられた。遊離してきた血液細胞種を詳細
に解析した結果、骨髄球系細胞だけでなく、
B 細胞などのリンパ球も含まれていること
が明らかとなった (Fig. 45)。さらに、わず
かではあるが造血幹細胞を含む未分化な血
液前駆細胞も同時に遊離してくることが示
された。

そこで Ad-CXCL12 投与後に外来骨髄細
胞を移植した場合の移植率について検討を
行った。その結果、Ad-Luc 投与後に骨髄細
胞を移植した群においては、外来造血幹細
胞が生着しなかったのに対し、Ad-CXCL12
投与後に移植した群においてはドナー細胞
の生着がみとめられた (Table 21)。したが
って、Ad-CXCL12 投与したマウスの骨髄で
は造血幹細胞の空きニッチが形成され、そ
の結果、外来造血幹細胞が生着したものと
考えられる。しかしながら、Ad-CXCL12 投
与マウスにおける移植率（キメリズム）は
0.06%と極めて低いものであったため、

Ad-CXCL12の単独投与では生着率向上は困難であることが推察される。今回は骨髄微小環境を維持するためにX線照射を行っていないことから、レシピエントマウスの血液細胞が残っており、そのために移植率が低くなったものと考えられる。したがって、Ad-CXCL12投与した後に、さらに抗がん剤を投与することにより、骨髄から遊離したレシピエントの血液細胞を死滅させ、その後外来造血幹細胞を移植することで、生着率の向上に繋がることを期待される。

本研究ではさらに、VEGF発現Adベクターをマウス生体へ投与した際の血液細胞の動態についても解析を進めた。その結果、CXCL12と同様に、骨髄から造血幹細胞を含む血液細胞が遊離し、末梢血へ動員されることが明らかとなった (Fig. 53)。したがって、CXCL12と同様に、VEGFは骨髄の造血幹細胞ニッチを形成させるのに有用であることと考えられる。また、Ad-VEGF投与時には、Ad-CXCL12投与時とは異なり、Flt-1陽性細胞が末梢血において増加することが示された (Fig. 54)。Flt-1陽性細胞中には骨髄再構築能を有する造血幹細胞も含まれていることが過去に報告されている (Hattori K. et al., 2002 Nat. Med.)。したがって、Ad-VEGF投与により末梢血へ動員されるFlk-1陽性細胞中にも造血幹細胞が含まれている可能性もあるため、今後、移植実験を行い、確認する必要がある。また、上述のようにAd-CXCL12の単独投与では移植率を向上させることが困難であるため、Ad-CXCL12と

Ad-VEGFの共投与時の血液細胞の動態を解析するとともに、Ad-CXCL12とAd-VEGFを共投与したマウスに外来造血幹細胞を移植することにより、生着率が向上するか否か検討する必要がある。

ケモカインやサイトカイン発現Adベクターを投与することにより造血幹細胞を含む多種の血液細胞が骨髄より遊離してくることが明らかとなり、ヒト造血幹細胞などの外来造血幹細胞を骨髄ニッチに効率良く生着させることができる可能性が示された。しかしながら、前述のように、Ad-CXCL12を投与した場合、抗体産生細胞であるB細胞も同時に末梢に遊離し、抗原刺激に対する抗体産生にも影響を及ぼしていることが示唆された (Fig. 48, 49)。したがって、このモデルを用いて医薬品の抗原性を評価するには、遊離してきた内在性B細胞の影響も考慮する必要があるものと考えられる。

本研究では、ES、iPS細胞由来血液細胞を細胞組織加工医薬品のモデルとして使用するため、ES、iPS細胞から血液細胞への分化誘導法の開発も試みた。その結果、造血系サイトカインを作用させる従来の誘導法と比較し、Adベクターを用いてHoxB4遺伝子を一過性に導入することにより、効率良く血液細胞を誘導可能であることが明らかとなった (Fig. 55)。今後、実際に医薬品のモデルとなるか否か、移植することにより明らかになると思われる。

D-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等は製品内に細胞あるいは組織という極めて複雑な構造かつ「生きている」という動的特性を含むという点で、従来の医薬品等に適用されてきた品質管理の必要事項が必ずしも適用できるとは限らない。つまり、細胞組織製品の安全性に関しては特別な配慮が必要となってくる。特に造腫瘍性試験のような生きた細胞の特性を評価する試験においては、最終製品中の細胞の状態（細胞種・生存率・保存条件等）や試験条件（培養条件・分散酵素処理条件等）のばらつきによって施設ごとに、あるいは実験者ごとに試験の特性および結果が大幅に異なる可能性が高い。したがって、絶対値として定められた規格がすべての細胞組織製品の試験法に一律に課されるのは合理的ではなく、各施設（各実験者）においてまず、試験系の特性に関するバリデーションを行い、得られた特性値に基づいて品目ごとに適切な品質管理用規格を設定する必要がある。そこでは試験法のバリデーション法の開発および標準化という新たな課題が生まれる。

細胞組織加工医薬品等の造腫瘍試験では、正常細胞中に微量に存在する造腫瘍性細胞を高感度かつ正確に検出する手法が必要となる。そこで、本研究では細胞組織加工医薬品等の造腫瘍性評価を目的とした場合の、軟寒天コロニー形成試験のバリデーションのケーススタディとして、三種の軟寒天コロニー試験法の悪性細胞と正常細胞に対する性能試験を行った。

悪性細胞の例としては、世界各国で汎用され、品質管理された株が入手可能かつ表現型・遺伝型の詳細な解析がなされているHeLa細胞を採用した。正常細胞の例として

は、現在再生医療および細胞治療の領域で研究開発および実用化が進むhMSCを用いた。軟寒天コロニー試験法としてはCell Biolabs社のCBA-130 CytoSelect 96-well Cell Transformation Assay およびCBA-140 CytoSelect 96-well Cell Transformation Assay (Cell Recovery Compatible)を採用した。これらのアッセイ系を選択した理由は、従来の軟寒天コロニー試験法と比較しこれらの方法が①ハイスループットかつ定量的であり、②主観的計数のプロセスを含まず、また③短期間（6～8日）で済む、とされる点で優れていると判断したからである。CBA-130とCBA-140のいずれも、オリジナルのプロトコールでは、軟寒天層を可溶化したのち、コロニー中の細胞数を蛍光色素のCyQuant GRを用いて評価することに変わりはない。CBA-130とCBA-140の大きな違いは、軟寒天を可溶化した際に前者では細胞が死滅するのに対し、後者で細胞が死滅せず、生きたまま回収できる点にある。CyQuant GRは溶解した細胞の総核酸量に比例して蛍光を発する試薬で、細胞の核酸と結合すると蛍光が増し、他の細胞成分からの干渉はおこらないことが知られており(最大励起/蛍光=480/520 nm)、簡便で迅速かつ高感度な方法で、培養物中の細胞密度を測定することができる。

化学発光検出法は概して蛍光検出法よりもバックグラウンド値が低いため、検出限界が低くかつ測定感度が高い傾向にある。そこで本研究では、CBA-130もしくはCBA-140の生細胞数評価法としてオリジナルプロトコールにあるCyQuant GRの蛍光検出法を用いるのではなく、化学発光検出

法を用いることができれば、より性能のよいアッセイ法となる可能性があるとの仮説を立てた。

CellTiter-Glo は、細胞の内在性の ATP を定量することで、生存する細胞数を測定する試薬で、“添加→攪拌→測定”だけの簡便なホモジニアスアッセイのキットであり、試薬の添加後、短時間で結果が得られる高感度なアッセイ系であるとされている。CellTiter-Glo を軟寒天コロニー形成試験に適用するには軟寒天層中の細胞を生きたまま取り出す必要があるため、CBA-130 と CBA-140 のうち、後者とカップルさせるのが適当であった。そのため、本研究では 2 種の異なる軟寒天層溶解法と 2 種の異なる検出方法の組み合わせで 3 種のアッセイ法を検討することとした。

3 種のアッセイ法を比較した結果、CellTiter-Glo を用いたアッセイ法が最も検出限界が低くかつ、測定感度が格段に高いことが明らかとなった。ただし、細胞組織加工医薬品等の造腫瘍性を評価するための *in vitro* 試験としては、悪性細胞を正常細胞よりも選択的かつ高精度で検出する能力が要求される。選択性および精度の面から見れば、3 種のアッセイ法の中では CBA-130 が最も優れていると考えられる。CBA-140 (CellTiter-Glo 検出) の試験系の選択性および精度が、CBA-130 および CBA-140 (CyQuant 検出) よりも劣っていたことの原因としては、細胞 1 個あたりの ATP 含有量が HeLa 細胞と hMSC とで異なる、個々の細胞の ATP 含有量のばらつきが大きい、あるいは軟寒天層の可溶化時の細胞生存率のばらつきが大きい、などの可能性が考えられる。

今後は、選択性および精度の優れた CBA-130 の系を用いて、①悪性細胞と正常細胞を混合培養した際の、悪性細胞の検出能の評価、②CBA-130 の試験系における細胞培養条件の最適化 (培地、酵素濃度、side population の利用など)、③より適切なネガティブもしくはポジティブコントロールとなりうる細胞株の探索とその妥当性評価、などが課題となる。

D-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

D-6-1 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

培養細胞が培地中に分泌するサイトカイン類等の生理活性物質の検出・測定は従来 ELISA を用いて行われることが多かったが、種類の多いサイトカイン類を網羅的に解析しようとする場合にスループットの点で問題があった。その点、多種類の抗サイトカイン抗体をプラットフォーム上に集積させたサイトカイン抗体アレイはハイスループットにサイトカイン含量・濃度のプロファイリングが可能であり、細胞の特性解析を行う上で有用なツールとなる可能性がある。

RayBiotech 社のサイトカイン抗体アレイは ELISA よりも、1) ハイスループット (1 サンプルで同時に多数のサイトカインの検出が可能)、2) 高感度 (例えば MCP-1 の場合、サイトカイン抗体アレイでは 4pg/mL までが測定可能なのに対し、通常の ELISA では 40pg/mL 程度の濃度がなければ明瞭なシグナルは得られない)、3) 検出域が広い (例えば IL-2 の場合、25k~250,000 pg/mL の検出域を持つのに対し、通常の ELISA の場合、100~1000 倍の検出域である)、4) ばらつきが少ない、5) 短時間で簡単、といった点で