

Table 7 HEV 標準パネル

	パネル名	クラスター	由来	容量	コピー数 (log copies/ml)
1	HEV swJR-P5	G3jp	実験感染ブタ糞便	0.5ml/tube	5.07 ± 0.35
2	HEV swJB-E10	G3sp	実験感染ブタ糞便	0.5ml/tube	4.80 ± 0.33
3	HEV swJB-E10cul	G3sp	A549細胞培養上清	0.5ml/tube	4.43 ± 0.31
4	HEV swJB-M8	G3us	実験感染ブタ糞便	0.5ml/tube	4.91 ± 0.42
5	HEV swJB-H7	G4jp	実験感染ブタ糞便	0.5ml/tube	5.27 ± 0.39
6	Negative control	?	希釈用ヒト血清	0.5ml/tube	?

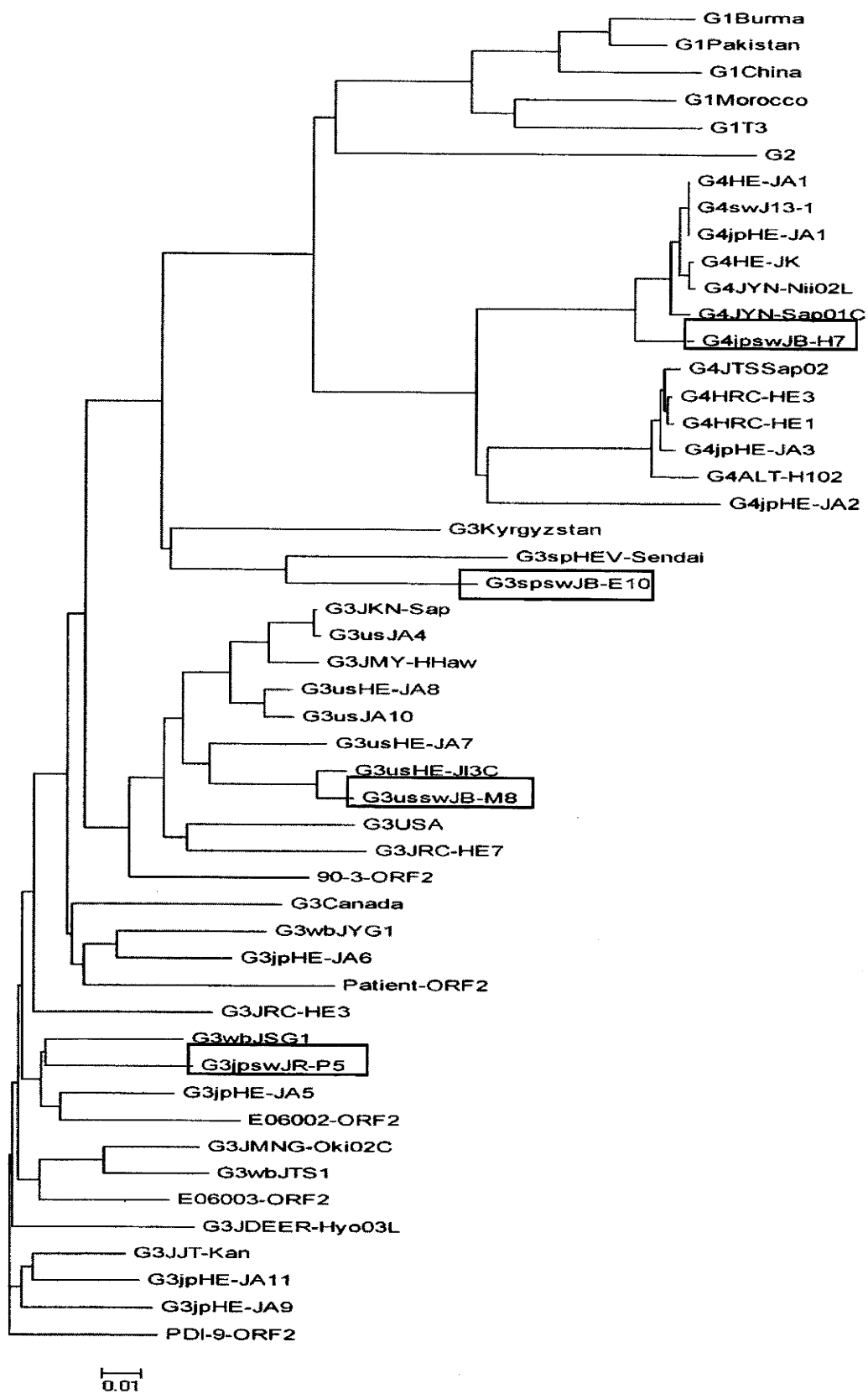


Fig.10 HEV パネルの系統樹

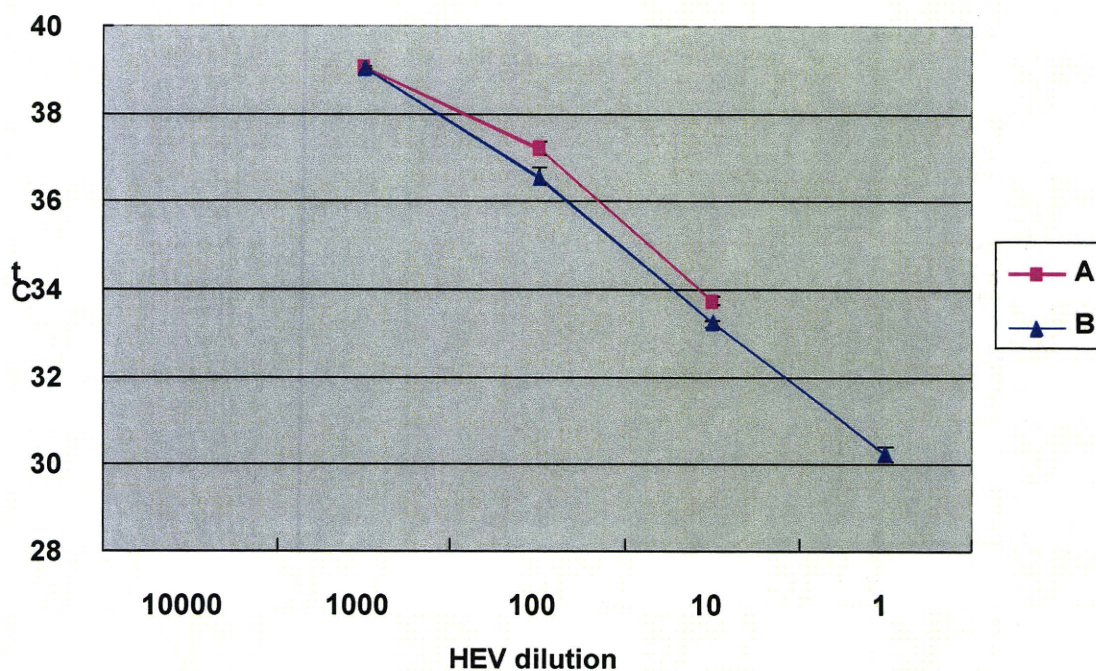


Fig.11 HEV パネル候補品 (swJB-H7) の均一性試験

A : HEV 原液より RNA を抽出後に 10 倍希釈列を調製し、qRT-PCR を実施

B : HEV の 10 倍希釈列から HEV RNA を抽出し、qRT-PCR を実施

Table. 8 HEV 標準パネルの希釈列の定量

(単位: copies/reaction)

	HEV panel	1/10 dilution	1/100 dilution	1/1000 dilution	1/10000 dilution	
HEV swJR-P5	計算値	235.0	23.5	2.3	0.2	
	実測値	284.9	1.8	6.3	?	
HEV swJB-E10	計算値	126.2	12.6	1.3	0.1	
	実測値	75.8	11.8	?	1.1	検出頻度 : 3/3
HEV swJB-E10cul	計算値	53.8	5.4	0.5	0.1	
	実測値	31.4	?	1.8	?	検出頻度 : 2/3
HEV swJB-H7	計算値	162.6	16.3	1.6	0.2	
	実測値	223.4	26.7	?	?	
HEV swJB-M8	計算値	170.2	17.0	1.7	0.2	
	実測値	92.5	3.7	1.5	0.6	

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

分担研究者 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

研究要旨

ヒト iPS 細胞の開発を受け、幹細胞を利用した細胞治療による再生医療の実現に向けた機運が高まりつつある。一方で、生体外で培養した細胞を、治療として生体へ戻す際の癌化をはじめとする危険性が指摘されており、臨床応用へ向けて、細胞・組織加工医薬品の品質チェックと安全性確保は我々に課せられた重要な課題である。こうした要求に答えるべく、我々は細胞の培養過程における遺伝子の安定性の評価手法に関して研究を行った。その中で、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)をモデルとし、培養過程における染色体レベルで遺伝的安定性を網羅的かつ詳細に調べる目的で、マイクロアレイを使った CGH (Comparative Genome Hybridization) 法を用いて検討した結果、1 ロットの細胞に培養過程における染色体変化を検出した。そして、同一ロットの細胞を別途入手し長期培養を行ったところ、同一の染色体異常が観察され、この異常は細胞の購入時（樹立時）より存在したことを証明した。最近ヒト iPS 細胞においても、細胞株樹立初期においてゲノムが変化しやすいことが相次いで報告されており、今後、次世代シーケンサーを含めた詳細なゲノム解析による細胞の品質評価の重要性は高まると予想される

また、細胞組織加工医薬品の品質、有効性を評価するためのバイオマーカーを検出する手法として、高感度ナノ LC-MS 測定によるショットガンプロテオミクスを用いた網羅的発現解析系の確立を行い、hMSC のプロテオーム解析を行ってきた。データ解析の効率化のためのソフトウェア Progenesis を導入し、サンプル間のノンラベルによる定量比較を行うとともに、タンパク同定に関しても効率化を図り、同定数を向上させることができ、その結果、2 万を超えるペプチドピークを検出し、千を超えるタンパク質が同定できた。このうち hMSC の細胞表面特異的マーカーとされる 10 種類の CD 抗原由来のペプチドに注目し、安定同位体導入ペプチドを利用してこれらを同時に定量する方法を確立した。

協力研究者

- 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
主任研究員
- スレッジ
ティルパッティ 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
流動研究員
- 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
- 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
実習生 (星薬科大学)
- 小木美恵子 金沢工業大学
情報フロンティア学部
教授

A. 研究目的

ヒト人工多能性幹細胞 (iPS) の開発は、体細胞を利用した再生医療、細胞治療法の開発に大きな可能性をもたらし、実用化に向けた急速な流れが各方面で加速されつつある。iPS は細胞治療の分野に大きな期待をもたらすとともに、その一方で、その安全性、主に腫瘍原性が問題となっており、

これを如何に克服して、実用化へのハードルをクリアするかは、各種細胞の開発とともに課せられた大きな課題である。我々は、ヒト iPS 細胞の開発以前より、細胞治療用医薬品の安全性に関して、特に遺伝子および染色体の安定性という観点から検討を進めてきた。体内では比較的安定な細胞も、外に取り出して、人工的な培養環境の下、時として増殖因子や多種血清成分のなかでの分裂、増殖、分化を強いられるわけで、いくら培養環境を整えても、細胞の DNA や遺伝情報にエラーがおき、何らかの異常細胞が出現する可能性は高い。最悪のケースとして、一つでも癌化した形質を獲得した細胞が培養過程で生じた場合、この細胞を治療に用いることは、確実な癌原性物質を投与することに他ならず、その危険性は大きいといえる。しかし、一方で遺伝病や各種疾患に基づく生体の機能的欠損を、体外で培養した機能性の細胞集団を持って治療することは、従来治療法がなかった疾患に対し画期的な治療法となる可能性を秘めている。こうしたベネフィットをより有益に享受するためにも、考えられるリスクをきちんと評価し、それをコントロールするための安全面での検討は非常に重要である。各種生体由来の幹細胞などを培養、分化後に生体へ戻す場合など、培養過程における染色体変化や、がん遺伝子の活性化などの遺伝子変化が引き起こされる危険性があり、これらを十分にチェックする検査法を持つことが、細胞治療医薬品の安全を担保する上で重要な課題となる。細胞の染色体レベルでの変化を捉える手法として、CGH 法があるが、これまでに我々は、BAC(bacterial

artificial chromosome)クローンやオリゴマーをスポットした CGH マイクロアレイおよび SNP を網羅的に検出する GeneChip による CGH 法を用いることにより、従来の手法では検出できなかったゲノム異常を網羅的かつ高解像度に検出可能であることを示した。実際の細胞治療を想定したモデルケースとして、市販のヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の継代培養における染色体変化の可能性を検討し、長期培養により細胞集団全体が、特定の染色体異常を持った細胞に置き換わるという事例を発見するに至った。培養の過程で一つの異常細胞 (これは常に低頻度ではランダムに生じていると考えられるが) が出現し、その細胞が比較的安定でかつ増殖性を獲得していたがゆえに、その後の継代を経て徐々にカルチャー中に拡大していったと考えられる。同様の事例が最近 iPS 細胞において報告されており、幹細胞の樹立およびその後の培養過程における、増殖性変異細胞選択の危険性に注意が必要である。

さらに本研究では、細胞培養過程における、品質および有効性評価に有用なバイオマーカーの探索のため、細胞を用いた網羅的プロテオーム解析のための高感度分析手法の開発を、オンラインナノ LC・タンデム質量分析装置を用いて行った。

一方、近年の質量分析装置における技術革新により、タンパク発現のプロファイルを網羅的に解析するプロテオーム解析がより現実的のものとなってきた。そして、比較プロテオーム解析により、疾患や薬物治療のバイオマーカー探索が可能となってきた。我々も、当所において共同利用型機器として使用可能な最新型タンデム質

量分析装置を有効活用し、ナノ LC との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系を確立してきた。この技術を利用して、細胞の培養過程におけるタンパク質発現の変化を網羅的に解析し、細胞の品質や安全性評価のためのバイオマーカーの検索を行うことが本研究の目的である。

また、質量分析装置はすでに知られているタンパク質バイオマーカーの検出において、ELISA 法やフローサイトメーターを用いる既存の方法に変わりうる可能性を秘めており、特に検出に抗体を必要としない点、多重項目を同時に検出可能である点において期待がもたれている。こうした質量分析の応用へ向け、我々は、プロテオーム解析により検出した hMSC 特異的細胞膜抗原である複数の CD 分子種を、質量分析装置を用いて同時定量を行う試験系の確立を行った。

B. 研究方法

I. 細胞の染色体安定性に関する検討

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。hMSC 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に継代を続けた。

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を継代を続けた。

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 バッファーに溶解させた。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。

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 XbaI にて解析を行った。アレイには、フォトソグラフィ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 mismatches 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。

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。

5. チップへのハイブリと、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。

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、専用の解析ソフトウェアである 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。

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。

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。

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。

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 アレイを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。

11. 染色体異常および小核試験

hMSC 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を作製した。

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、ペアーエンド法により、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ンスタグを付加した後、1 ウエ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

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。

II. 細胞のプロテオーム解析

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°C30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。

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。

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。

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。

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。

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。

C. 結果

I. 細胞の染色体安定性に関する検討

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 1) 以外の 3 ロットおよびヒト骨格筋芽細胞 (HSMC) 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 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 2 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 3 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ほぼ増殖をしなくなり、不死化は起こっていないことがわかった。

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を作製し、昨年度と同様にセントロメア特異的 FISH プロー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ーブを用いた 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 を行った。得られたシグナルの例を図 4 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 4F1560 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 (Cytotherapy. 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。

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 1 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 5 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によって一致したが、Marker3 に関しては、前回の 7 番という結果と異なり、図 6 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。

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を作製する（処理時間 2 ～ 6 時間）が、hMSC はダブリングタイムが長いので、処理時間も長くしなければいけない。そこで、G2、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、 $0.1\mu\text{M}$ 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、 $1.2\sim 1.5\times 10^5$ 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 $0.1\mu\text{M}$ 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を作製、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 個程度のマフェーズが観察された

#26 全体を観察したときに 18 個程度のマ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を作成し、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。

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7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4F1560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8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4F1560ロットのデータで確認したところ、図9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(4F1560#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、4F1560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。

II. 細胞のプロテオーム解析

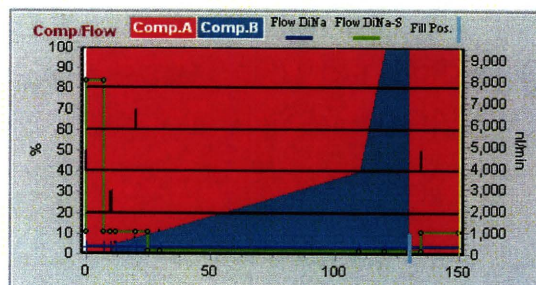
1. 質量分析装置の性能に関する検討

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、 1.5×10^5 個の細胞を 50 μ 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 $^{\circ}$ C 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 μ m ID x 50mm）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用い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 10 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ナント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動しており、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 11 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

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5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 tublin 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 12 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。

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11)。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}C および ^{15}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13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。

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14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 ソウトウエ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、Xcalbar ソフトウエ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。

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エ

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: 5F0138)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15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16)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17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