

幕張 (2010 年 8 月)

- 7) Hashii, N., Huang, X., Yamaguchi, T., Kawasaki, N.: Identification of cell therapeutic products from stem cells based on glycans. 第33回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会 神戸 (2010 年 12 月)
- 8) Hashii, N., Huang, X., Kawasaki, N., Yamaguchi, T.: Quantitative glycan analysis during neural differentiation of human mesenchymal stem cells by liquid chromatography/mass spectrometry. The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies Honolulu (2010 年 12 月)

H-1.

実用新案登録 なし

H-2.

その他 該当事項なし

表 1 糖鎖と PHN の組み合わせ

MSC	¹² C-PHN 標識糖鎖 1	¹² C-PHN 標識糖鎖 2	¹² C-PHN 標識糖鎖 3
神経様分化細胞	¹³ C-PHN 標識糖鎖 1	¹³ C-PHN 標識糖鎖 2	¹³ C-PHN 標識糖鎖 3
混合	↓	↓	↓
分析試料溶液	試料 1	試料 2	試料 3

表 2 糖鎖プロファイルの要約

価数	検出された m/z 値		糖組成 ^{a)}	推定糖鎖構造	MSC		N2d		平均存在比率 t-検定	N2dのMSCに対する平均増減割合 ^{b)}	RSD (%)
	MSC (¹² C)	N2d (¹³ C)			平均存在比率 (%) ^{b)}	RSD (%)	平均存在比率 (%) ^{b)}	RSD (%)			
[M+H] ⁺	999.36	1002.37	Hex9HexNAc2(M9)		1.7	89	0.9	92	0.50	+0.15	261
[M+H] ⁺	1813.69	1819.69	Hex8HexNAc2(M8)		0.3	52	0.2	78	0.41	+0.17	263
[M+H] ⁺	1651.68	1657.70	Hex7HexNAc2(M7)		0.2	63	0.2	63	0.98	+1.44	127
[M+H] ⁺	1489.61	1495.63	Hex6HexNAc2(M6)		1.2	68	1.0	53	0.70	+1.08	120
[M+H] ⁺	1327.54	1333.56	Hex5HexNAc2(M5)		0.8	24	0.9	6	0.78	+1.22	87
[M+H] ⁺	987.41	993.43	dHex1Hex2HexNAc2		2.0	28	1.6	25	0.48	+0.69	63
[M+H] ⁺	1149.49	1155.51	dHex1Hex3HexNAc2		24.0	36	26.8	34	0.72	+1.23	38
[M+2H] ²⁺	838.83	841.84	dHex1Hex5HexNAc3		0.7	27	0.5	32	0.19	+0.38	124
[M+H] ⁺	1514.66	1520.67	dHex1Hex4HexNAc3		2.7	53	1.4	8	0.19	+0.12	480
[M+2H] ²⁺	867.34	870.35	Hex5HexNAc4		0.4	71	0.2	80	0.41	+0.07	697
[M+2H] ²⁺	940.38	943.39	dHex1Hex5HexNAc4		4.0	51	3.7	27	0.84	+0.99	41
[M+2H] ²⁺	1012.87	1015.88	Hex5HexNAx4 NeuNAc1		0.7	39	0.7	32	0.90	+0.94	53
[M+2H] ²⁺	1158.42	1161.43	Hex5HexNAx4 NeuNAc2		5.3	45	4.4	50	0.65	+0.62	70
[M+2H] ²⁺	1085.94	1088.94	dHex1Hex5HexNAc4 NeuNAc1		7.1	58	8.3	61	0.76	+1.28	37
[M+2H] ²⁺	1231.49	1234.5	dHex1Hex5HexNAc4 NeuNAc2		14.2	11	15.7	16	0.44	+1.21	50

表 2 つづき(1)

[M+2H] ²⁺	1158.95	1161.96	dHex2Hex5HexNAc4 NeuNAc1		0.1	48	0.2	45	0.64	+1.40	28
[M+2H] ²⁺	1304.53	1307.55	dHex2Hex5HexNAc4 NeuNAc2		1.1	16	1.2	10	0.62	+1.09	17
[M+2H] ²⁺	1049.91	1052.92	Hex6HexNAc5		0.2	77	0.2	78	0.79	+0.66	49
[M+2H] ²⁺	1195.49	1198.5	Hex6HexNAc5 NeuNAc1		0.4	22	0.2	33	0.13	+0.32	176
[M+2H] ²⁺	1341.04	1344.1	Hex6HexNAc5 NeuNAc2		1.2 _{d)}	—	0.6	—	—	+0.02	—
[M+2H] ²⁺	1486.6	1489.6	Hex6HexNAc5 NeuNAc3		8.1	40	2.3	46	0.04	-0.81	9
[M+2H] ²⁺	1632.17	1635.2	Hex6HexNAc5 NeuNAc4		1.7	24	0.6	59	0.03	-0.55	60
[M+2H] ²⁺	1122.96	1126.0	dHex1Hex6HexNAc5 (Lac1)		12.1	6	12.5	10	0.68	+1.06	52
[M+2H] ²⁺	1268.52	1271.5	dHex1Hex6HexNAc5 NeuNAc1(Lac1)		3.8	79	5.8	87	0.59	+1.72	31
[M+2H] ²⁺	1414.08	1417.1	dHex1Hex6HexNAc5 NeuNAc2		1.8	59	2.2	52	0.67	+1.57	64
[M+2H] ²⁺	1559.63	1562.7	dHex1Hex6HexNAc5 NeuNAc3		0.5	41	0.6	49	0.41	+1.85	71
[M+2H] ²⁺	1305.55	1308.6	dHex1Hex7HexNAc6 (Lac)		2.5	28	5.2	36	0.09	+3.10	52
[M+2H] ²⁺	1451.11	1454.1	dHex1Hex7HexNAc6 NeuNAc1(Lac)		0.7	19	0.9	30	0.26	+1.72	68
[M+2H] ²⁺	1596.67	1599.7	dHex1Hex7HexNAc6 NeuNAc2(Lac)		0.5	49	1.0	42	0.17	+2.94	49
[M+3H] ²⁺	1161.79	1163.8	dHex1Hex7HexNAc6 NeuNAc3		0.9	21	2.0	50	0.14	+3.31	65
[M+3H] ²⁺	1258.83	1260.8	dHex1Hex7HexNAc6 NeuNAc4		0.9	38	1.9	64	0.25	+2.85	62

表 2 つづき(2)

[M+3H] ⁺	1186.45	1188.5	dHex1Hex8HexNAc7 NeuNAc2(Lac)		0.4	34	0.7	14	0.02	+3.29	65
[M+3H] ⁺	1283.5	1285.5	dHex1Hex8HexNAc7 NeuNAc3(Lac)		0.3	34	0.6	60	0.35	+2.16	70
[M+3H] ⁺	1380.56	1382.6	dHex1Hex8HexNAc7 NeuNAc4(Lac)		0.2	67	0.9	66	0.15	5.92	21

a) Hex, ヘキソース; HexNAc, *N*-アセチルヘキソサミン; dHex, デオキシヘキソース;
 NeuNAc, *N*-アセチルノイラミン酸; Lac, *N*-アセチルラクトサミン構造を有する糖鎖. b) 検
 出された全糖鎖のイオン強度の合計に対する各糖鎖のイオン強度の割合(%). c) 数値が+
 1.0 のとき, N2d 由来糖鎖の量は MSC 由来糖鎖量の 2.0 倍に増加していることを示す. d)
 糖鎖試料 1 からのみ検出された糖鎖のため, 統計処理は行わず.

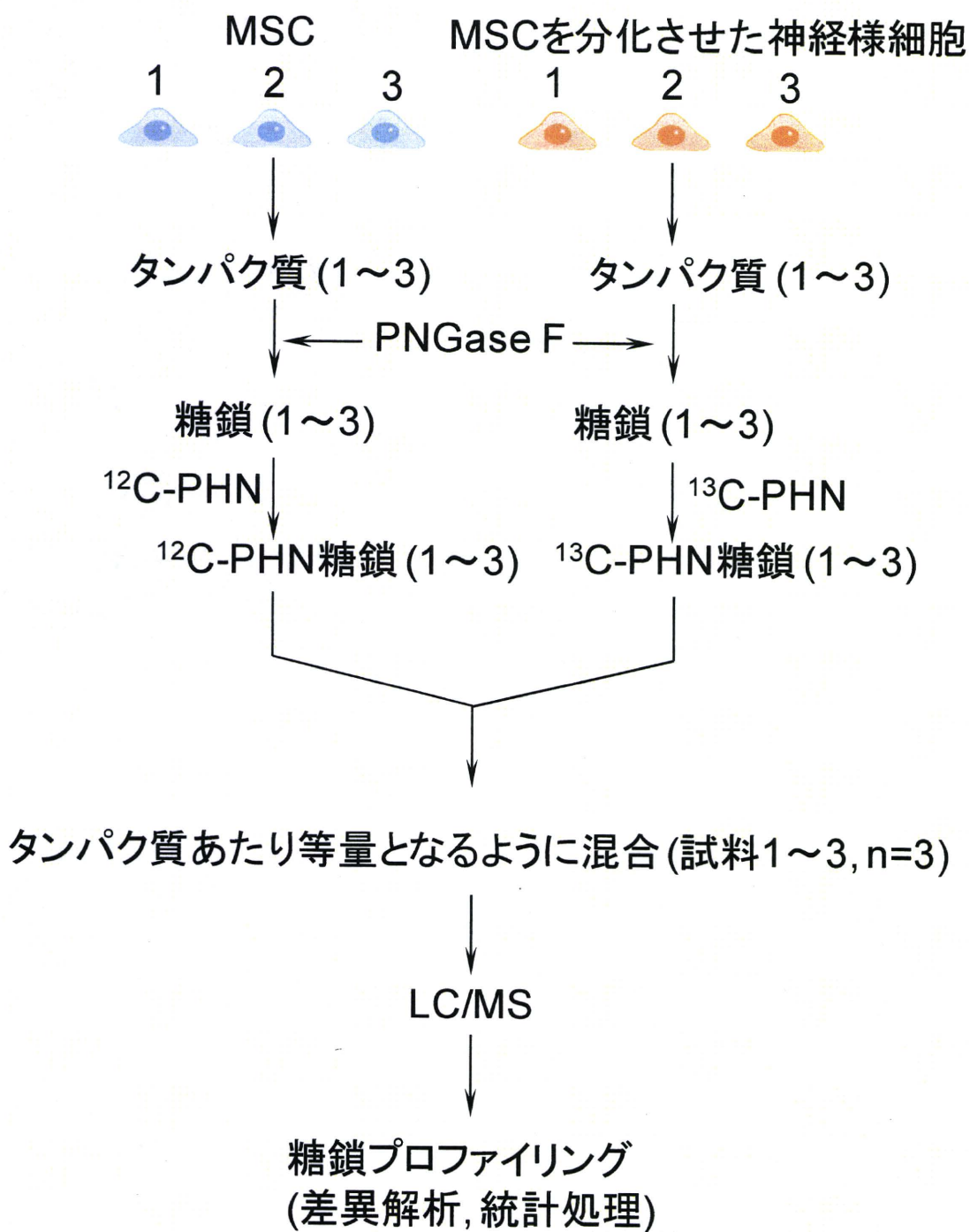


図1 MSC及びMSC由来神経様細胞の比較定量解析

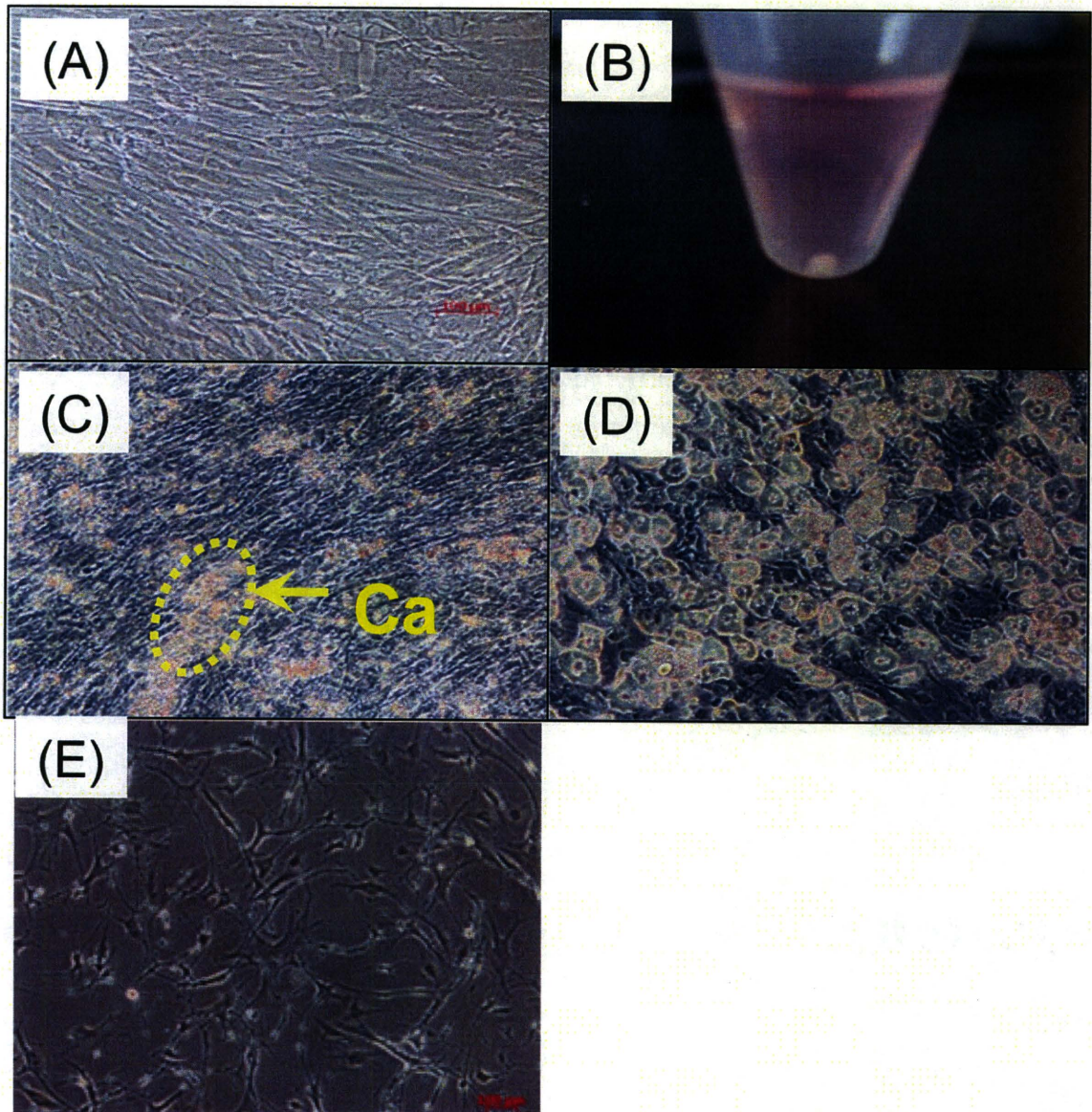


図2 MSCの骨、軟骨、脂肪及び神経様細胞への分化誘導. (A) 分化誘導前, (B)軟骨細胞への分化誘導により生じた球状細胞塊とグリコサミノグリカンの確認, (C) 骨細胞への分化誘導後のカルシウム蓄積の確認, (D) 脂肪細胞への分化誘導後の脂肪滴の確認, (E) 神経様分化細胞への分化誘導.

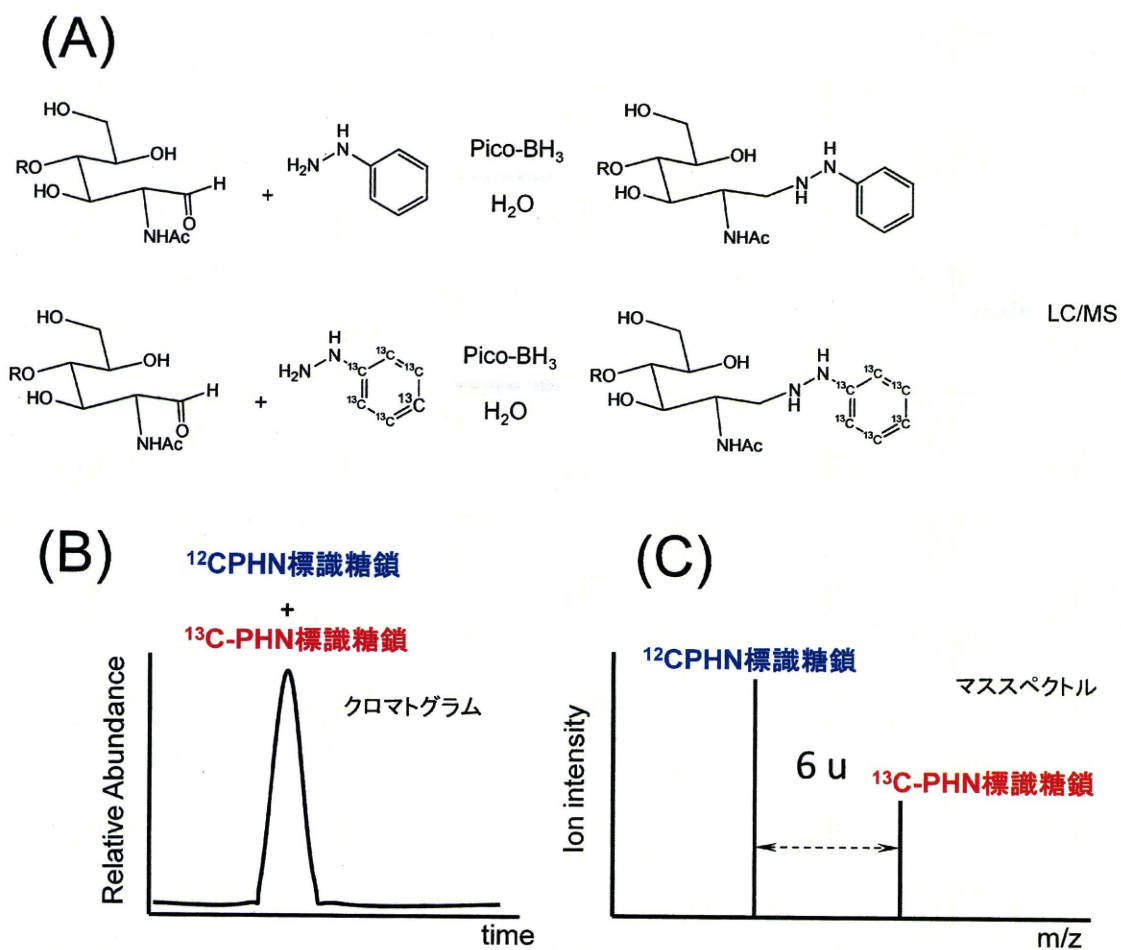


図3 ¹³C標識フェニルヒドラジン(PHN)を用いた定量的糖鎖プロファイリング法。
 (A), ¹²C-及び¹³C-PHNによる糖鎖標識; (B), ¹²C-及び¹³C-PHN標識糖鎖混合物のLC/MSを行ったときのクロマトグラム; (C), ¹²C-及び¹³C-PHN標識糖鎖混合物のマススペクトル。

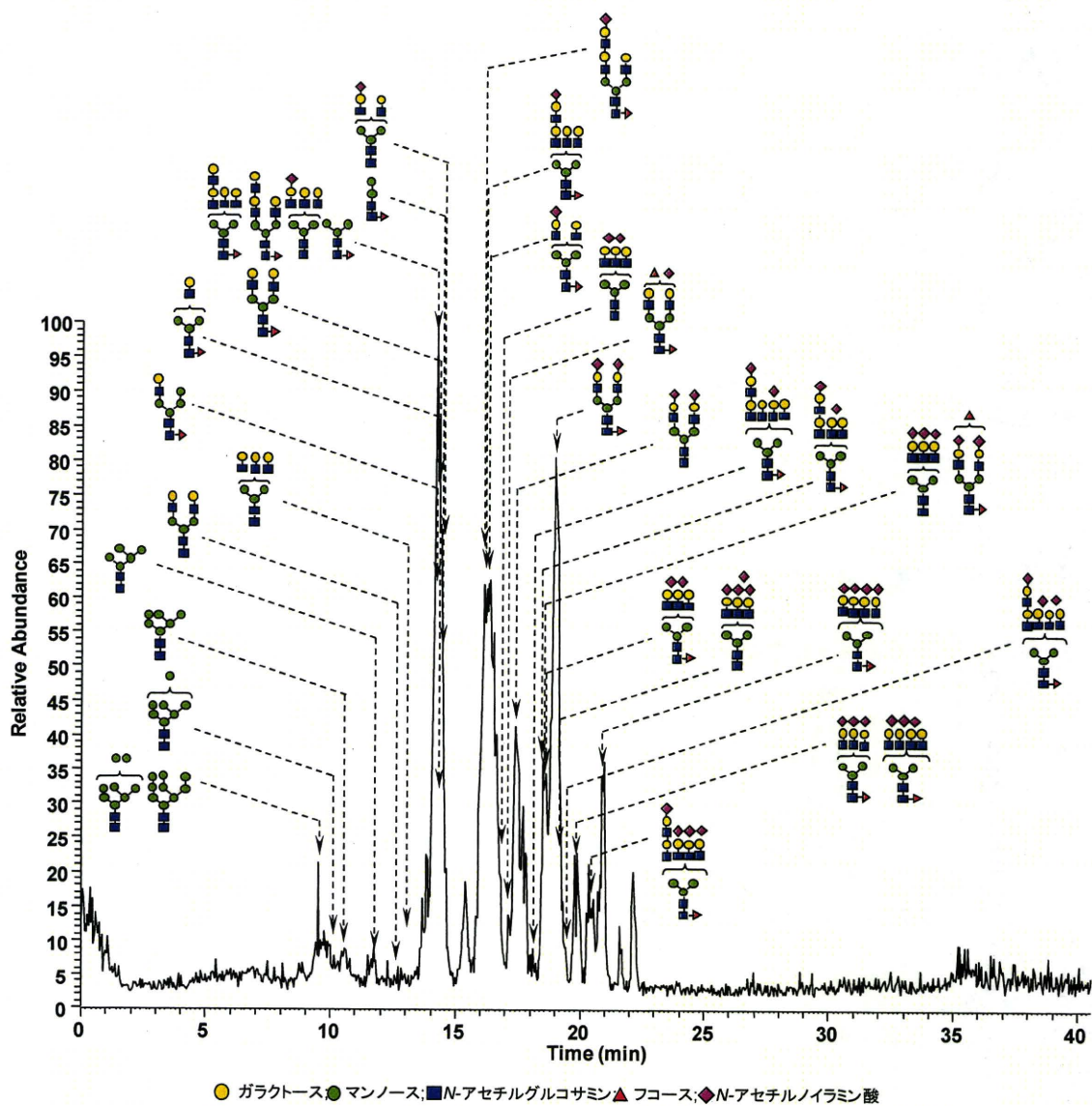


図4 MSC 及び神経様分化細胞由来 *N*-結合型糖鎖の LC/MS により得られた糖鎖プロフィール。図はベースピーククロマトグラム。帰属された糖鎖の溶出位置を矢印で示した。

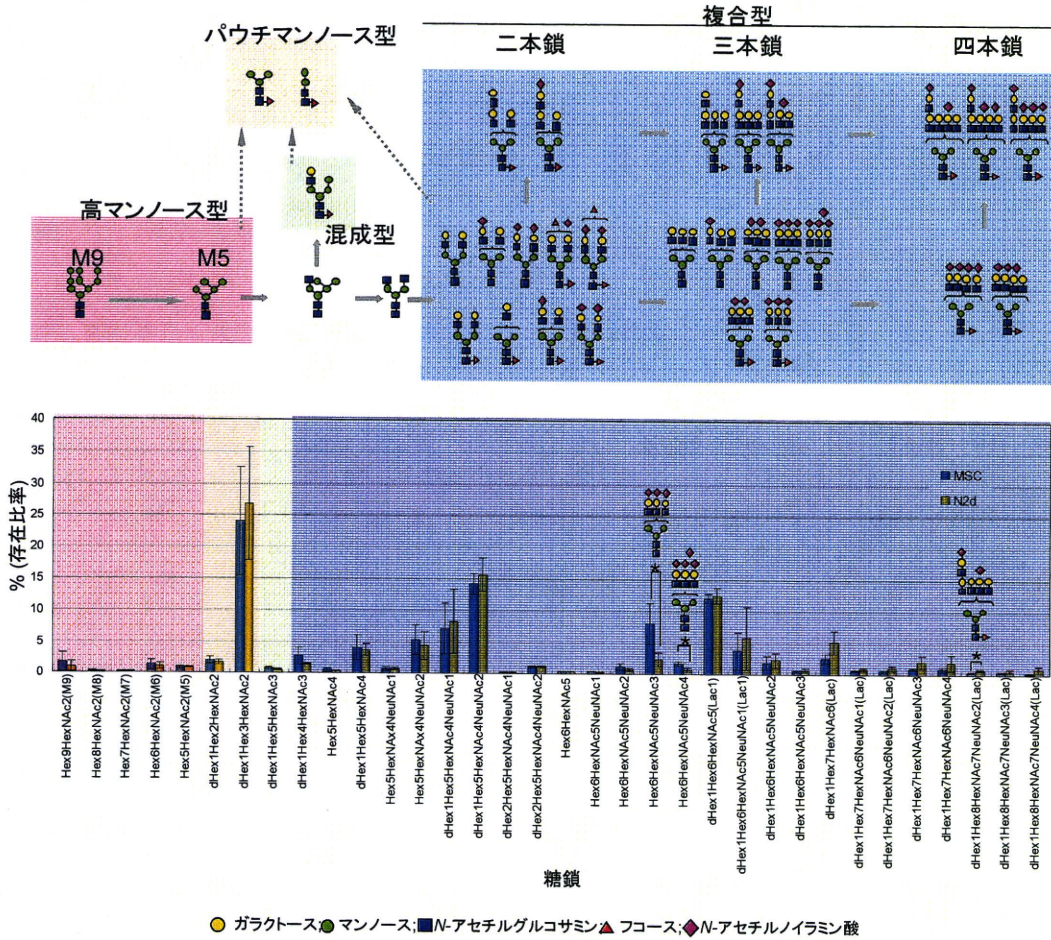


図5 MSC 及び神経様分化細胞由来 *N*-結合型糖鎖の分布. 数値は検出された全糖鎖のイオン強度の合計に対する各糖鎖のイオン強度の割合(%)として算出した. * $p < 0.05$

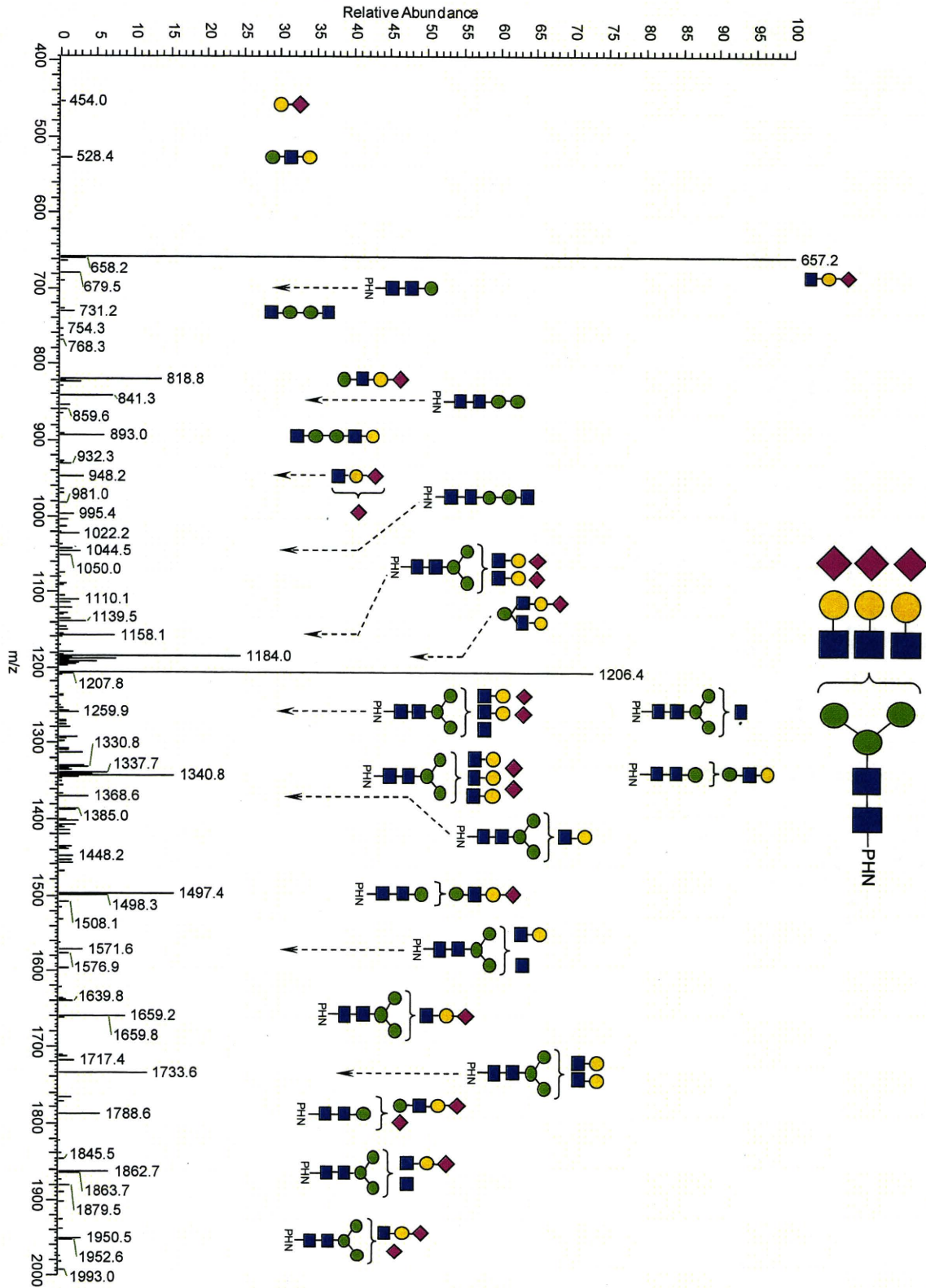


図 6 MSC を神経様細胞に分化すると減少することが明らかとなった糖鎖の LC/MS/MS. 側鎖は N アセチラクトサミンの繰り返し構造ではないことが推定された。

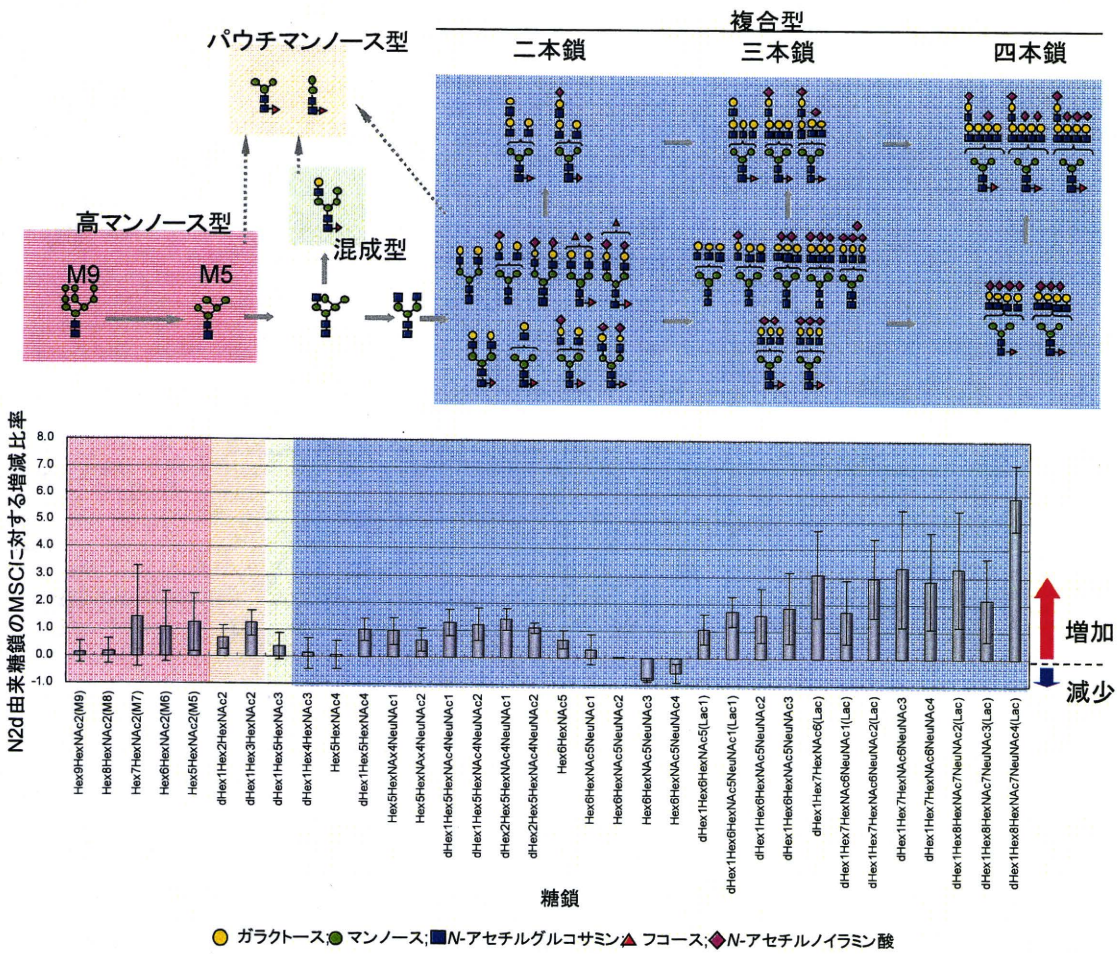


図7 神経様分化細胞 (N2d) 由来 N結合型糖鎖の MSC に対する増減比率。
増減比率 +1.0 は、N2d は MSC の 2 倍に増加していることを示す。

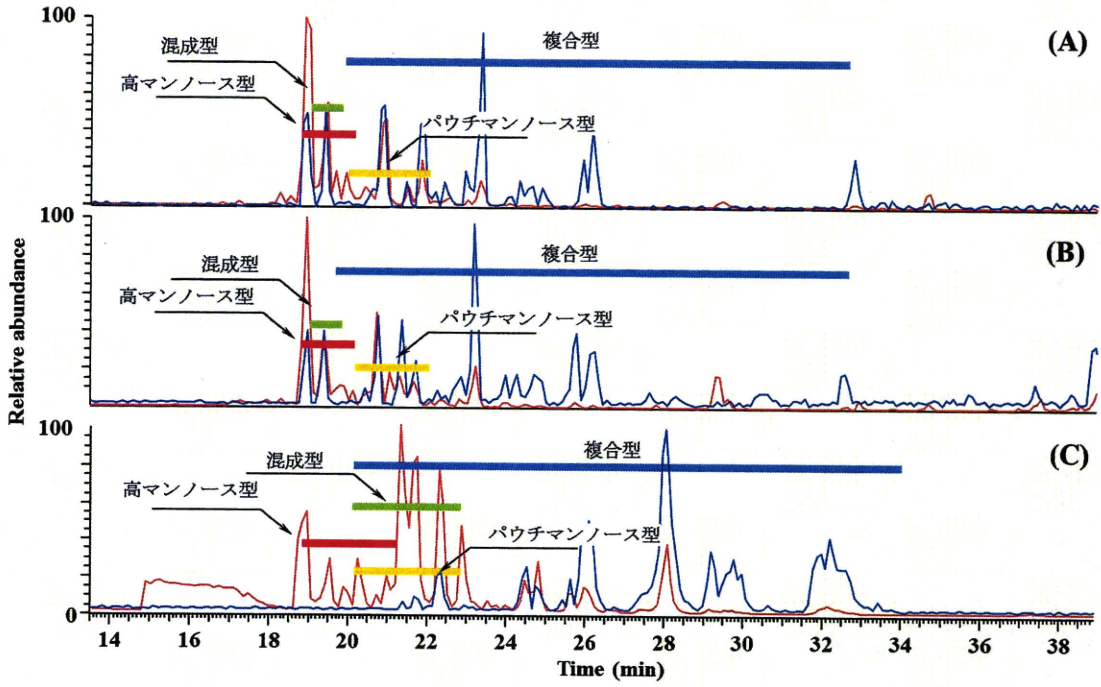


図 8 MSC (A), 神経様分化細胞 (B)及び骨分化細胞 (C) のベースピーククロマトグラム。赤線, ポジティブイオンモード; 青線, ネガティブイオンモード。

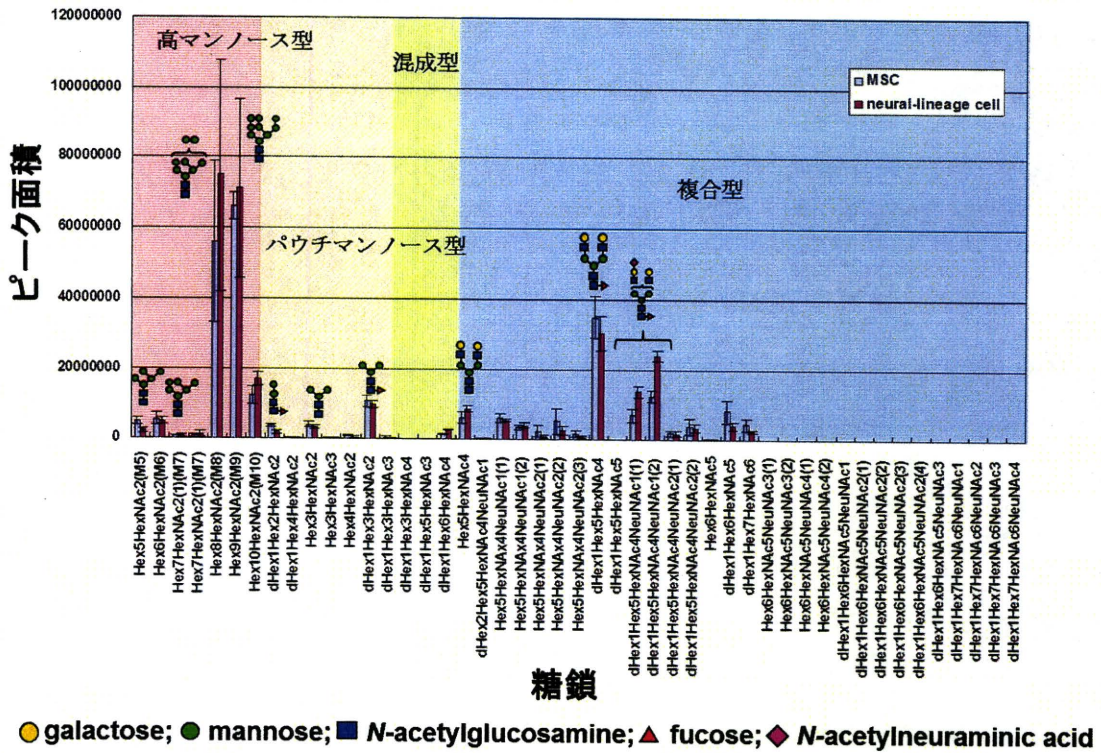
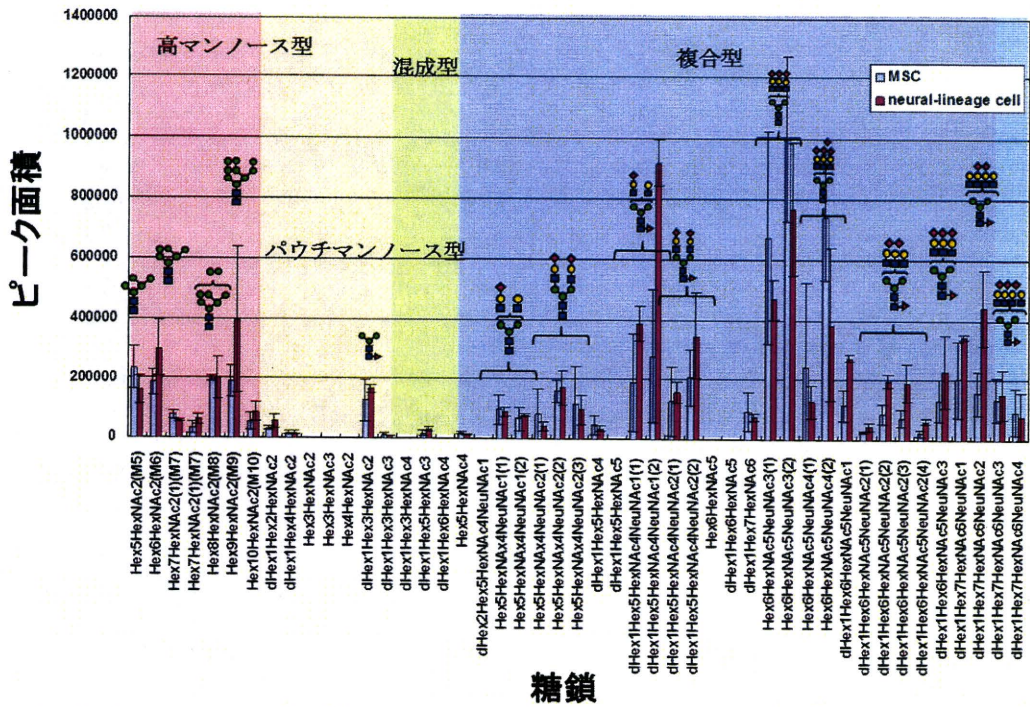
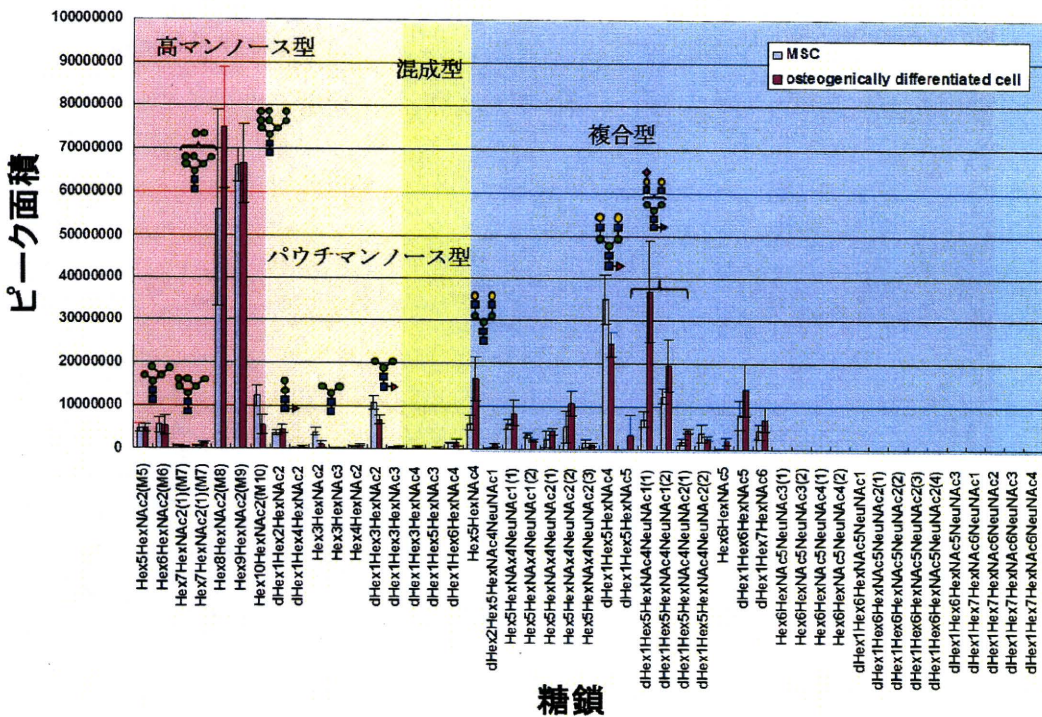


図 9 MSC 及び神経様分化細胞の糖鎖分布の比較。(ポジティブイオンモード)



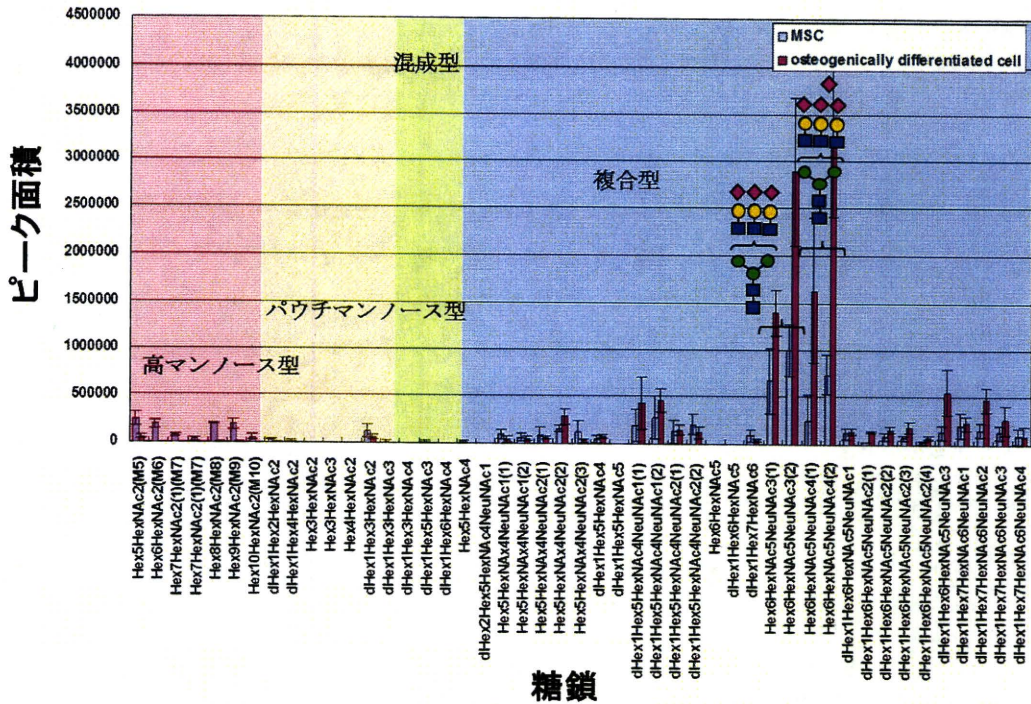
● galactose; ● mannose; ■ N-acetylglucosamine; ▲ fucose; ◆ N-acetylneuraminic acid

図 10 MSC 及び神経様分化細胞の糖鎖分布の比較。
(ネガティブイオンモード)



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

図 11 MSC 及び骨分化細胞の糖鎖分布の比較。
(ポジティブイオンモード)



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

図 12 MSC 及び骨分化細胞の糖鎖分布の比較。
(ネガティブイオンモード)

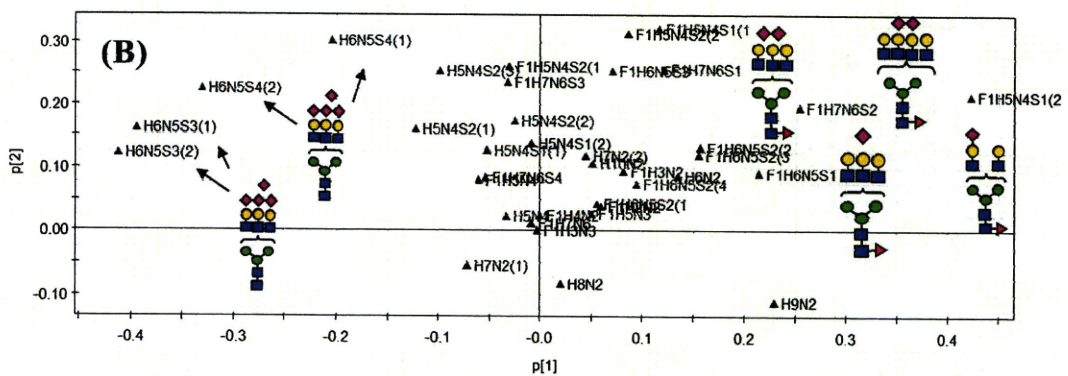
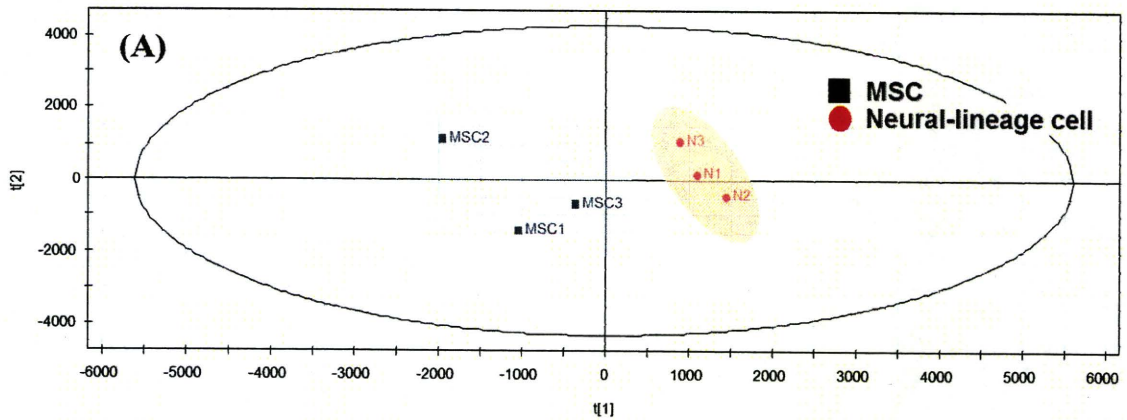


図 13 PCA による MSC 及び神経様分化細胞の区別。
(A), スコアプロット; (B), ローディングプロット

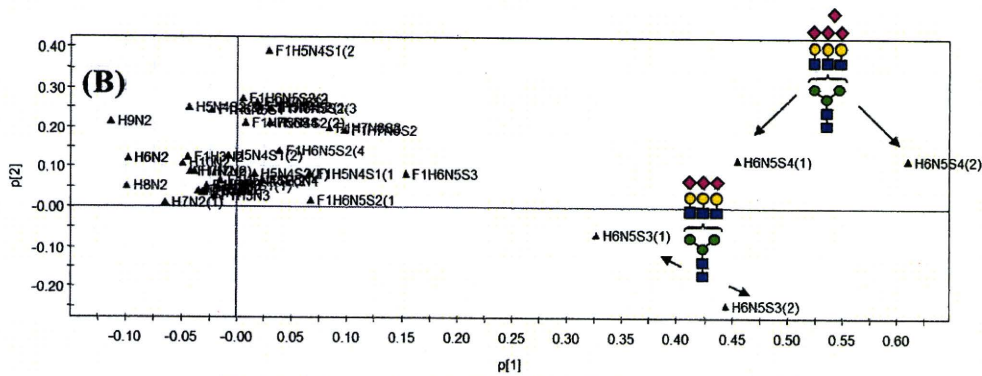
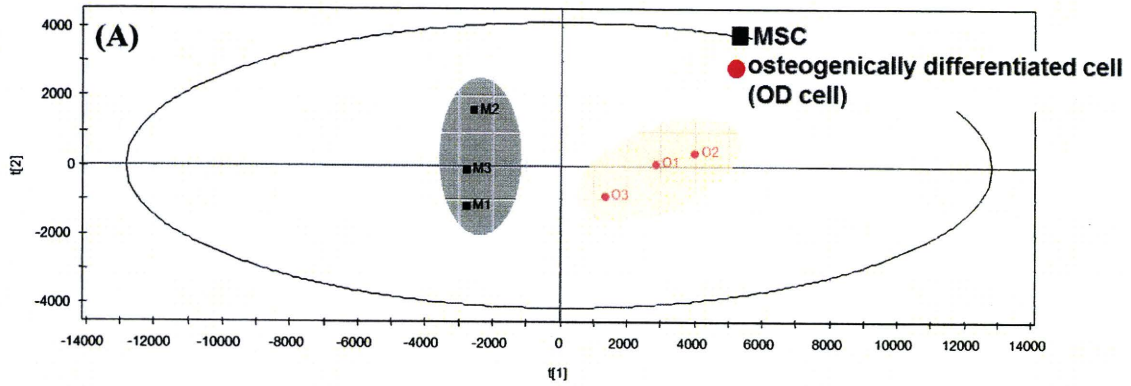


図 14 PCA による MSC 及び骨分化細胞の区別.
(A), スコアプロット; (B), ローディングプロット

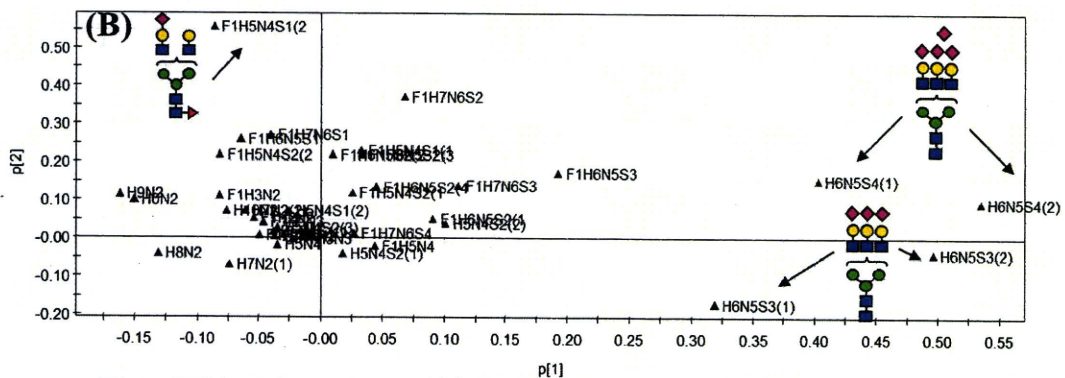
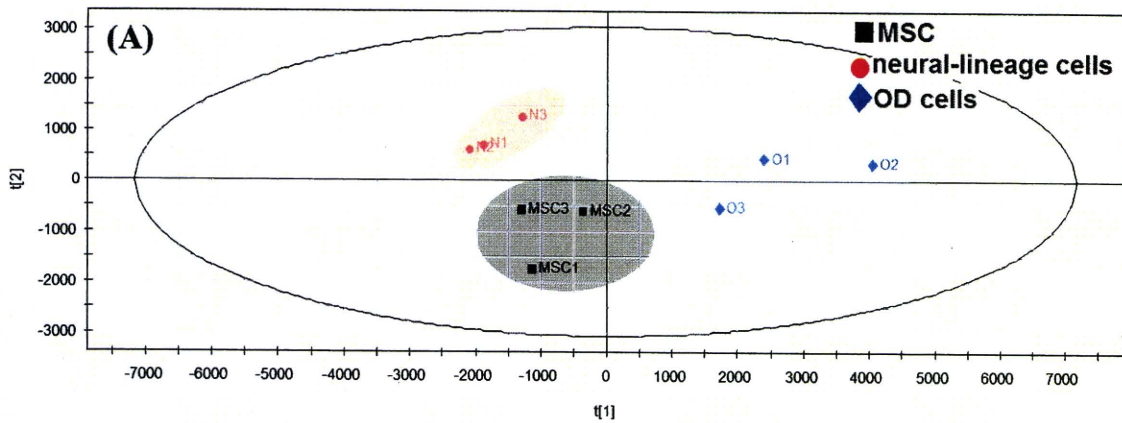


図 15 PCA による MSC, 神経様分化細胞及び骨分化細胞の区別.
(A), スコアプロット; (B), ローディングプロット

分担研究報告書

細胞組織加工医薬品の免疫学的安全性評価に関する基盤技術開発

分担研究者 川端 健二

独立行政法人 医薬基盤研究所

創薬基盤研究部 幹細胞制御プロジェクト プロジェクトリーダー

本研究は、細胞組織加工医薬品等の免疫原性を事前に試験する評価法の開発を目指して、ヒト血液系を有したマウスの作製、および当該マウスモデルによる免疫原性評価システムの基盤技術開発を行い、以下の結果を得た。

1. 外来造血幹細胞の移植効率を向上させる一つの手法として、サイトカインやケモカインを用いてレシピエントの骨髄環境を操作することが考えられるため、ケモカイン CXCL12 やサイトカイン VEGF を発現するアデノウイルス (Ad) ベクターをマウスに投与した際の血液細胞の動態について解析を行った。その結果、Ad ベクターを用いて CXCL12 や VEGF を投与することにより造血幹細胞を含む各種血液細胞が骨髄から遊離し、末梢血へ動員されることが明らかとなった。また、CXCL12 発現 Ad ベクターを投与した場合には造血幹細胞だけでなく、B 前駆細胞等のリンパ球も骨髄から遊離し、脾臓へ生着することが明らかとなった。さらに、CXCL12 発現 Ad ベクター投与マウス、あるいはコントロールベクター投与マウスへ外来骨髄細胞（ドナー細胞）を移植した結果、CXCL12 発現 Ad ベクター投与マウスにおいて、ドナー細胞の生着が確認された。
2. ES 細胞または iPS 細胞由来の血液細胞は細胞組織加工医薬品のモデルと考えられるため、ES 細胞または iPS 細胞から血液細胞への分化誘導法の開発を行った。その結果、Ad ベクターを用いて HoxB4 遺伝子を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示された。

本研究により、造血幹細胞移植の生着率向上法の開発、ならびに ES 細胞および iPS 細胞から血液細胞への高効率分化誘導法の開発に関する結果が得られた。今後のヒト血液系を有するキメラマウス作製に繋がる重要な知見であると思われる。

研究協力者

水口裕之 (独) 医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科

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

櫻井文教 大阪大学大学院薬学研究科

A. 研究目的

ヒトあるいは動物の細胞や組織を培養・加工した細胞組織加工医薬品は難治疾患に対する治療薬として有望視されているが、本格的な実用化には多くの問題点が存在する。その一つが医薬品自体の拒絶・中和反応であり、細胞治療薬の抗原性（免疫原性）を試験する評価系の確立が急務である。本研究では、ヒト血液系を有したマウスの作製、および当該マウスモデルによる免疫原性評価システムの基盤技術開発を行うことを目的とした。ヒト血液系を有するマウスを作製するためには、外来造血幹細胞を骨髄中の造血幹細胞がいるべき場所（ニッチ）に生着させる必要がある。したがって、内因性の造血幹細胞をニッチから遊離させることにより外来造血幹細胞の生着率は向上すると考えられる。Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) 等のある種のサイトカイン/ケモカインは、骨髄の造血幹細胞を末梢血中へ遊離（動員）する作用を有している。これらの蛋白質の投与により、造血幹細胞を骨髄から動員可能であると考えられるため、このような蛋白質の投与により効率良く造血幹細胞の空きニッチが形成できるものと考えた。なお、CXCL12は静止期造血幹細胞を骨髄に生着させるのに必須のケモカインである。また vascular endothelial growth factor (VEGF) は造血幹細胞の生存・増殖に必須な分子であることが知られているため、本研究では、ケモカイン CXCL12またはサイトカイン VEGF を発現するアデノウイルス (Ad) ベクター (Ad-CXCL12 または Ad-VEGF) をマウスに投与した後の内在性血液前駆細胞の動態

を詳細に解析することにより、外来造血幹細胞の移植効率向上法の基盤技術開発を試みた。

また、無限増殖能と多分化能を有する ES、iPS 細胞は細胞移植療法のソースとして期待されているが、その免疫原性については不明である。したがって、ES、iPS 細胞由来の血液細胞は細胞組織加工医薬品のモデルとなり得ることから、本研究ではマウス ES、iPS 細胞から血液細胞への分化誘導法の確立を目指した。

B. 研究方法

B-1. 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-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、骨髄を回収し、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-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. 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、骨髄細胞および 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-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 μ m 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-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-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 µg/mouse) あるいは NP-Ficoll (Biosearch technologies 社) (25 µg/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 20µg/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 条件下に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 µL/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 µL/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 µL/well 加えて発色反応を行い、2 N H₂SO₄ を 50 µL/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-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 ヶ月後に骨髄細胞を回収し、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-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-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