

法について検討したい。

残念ながら、倫理的制限で細胞提供者のゲノム情報は得られなかったため、MSC の樹立過程における変異の可能性に関しては検討できなかったが、今後提供者のゲノム情報が得られるようなサンプルがあれば、検討を行いたい。

今回解析した細胞では、染色体転座や増幅、欠失を含む染色体異常が起きていることが確認されていたが、シーケンス解析の結果からは、それを反映する情報は得られなかった。その理由として、まずエクソン領域のみを解析しているため、転座の **breakpoint** が検出できなかった可能性が考えられる。全ゲノム解析を行えば、**breakpoint** を含むシーケンス断片を検出することは可能であるが、現在の解析方法ではおそらくマッピングの段階で、マップできない情報として削除されてしまうと考えられるので、それを拾い上げるための別の解析手法が必要である。さらに、ゲノムコピー数の増減についても、同様のアプローチが必要であると考えられる。

今回得られた PAWR 遺伝子は、癌抑制遺伝子の WT-1 に作用して、その転写活性を抑制することが知られており、前立腺細胞のアポトーシスの過程で発言が特異的に上昇していることが知られている。また、最近の知見では、それ自身が細胞外から Fas が関与したパスウェイに働いて、NF- κ B の転写活性を抑制することによりアポトーシスを誘発することが報告されている (Cell 138 220-222, 2009)。よって、今回観察された PAWR 遺伝子の変異により、このアポトーシス誘導活性が影響を受け、染色体異常を持ちながらもアポトーシスを回避するために、増殖性を獲得した可能性が示唆された。この変異が、PAWR 遺伝子の機能的変化をもたらすかどうかについて、検討が必要である。

D-4 再生医療製品のウイルス安全性評価

ウイルスの産生量は、細胞内に発現する Gag, Gag-Pro-Pol タンパク質量に依存する。まずウイルスタンパク質は一連のポリペプチドとして合成されたのち Gag-Pro-Pol 内の Pro によるプロセッシングによって切断されるが、その切断が細胞内で起きてしまうと小胞形成に必要とされる ESCRT I, II, III と呼ばれる 100 種類以上のタンパク質をリクルートできずに、ウイルス粒子形成はごく効率の悪いものになると考えられる。つまり細胞内で合成された Gag, Gag-Pro-Pol のプロセッシングが、一時的にでも抑制される仕組みがあると考えられてきたが、その実体は不明なままである。p15 はミリスチル化されているので、細胞膜にアンカーされているが、p12, p30, p10 は、そうではないため、ウイルス粒子の成熟に必要な分子が、ウイルス粒子内に取り込まれないからである。また ESCRT 分子群をリクルートすることもできなくなるため、ウイルス粒子産生能は極端に低下するものと考えられる。通常はウイルス粒子が細胞の外にリリースされてもすぐは感染性をもたず、1-2 時間すると感染性を獲得するようになるがこれは細胞内ではプロセッシングが抑制されており、アッセンブリーと出芽が起きたあとで、プロセッシングが開始され、切断されたカプシドタンパク質である p30 によってコア形成がおきるからである。しかし、実際には細胞内でもプロセッシングがある程度起きており、必ずしも効率的な粒子形成は実際に行われず、その制御は、leaky なものであろうと考えられている。その状況下でも p80 のアミノ酸残基 340~499 までに細胞内でのプロセッシングを抑制する領域があることがわかった。

本実験の目的は、モニター配列を複数ウイルス粒子内にもつウイルス様粒子の作製である。こうしたウイルス様粒子の作製のために必要な条件とは、(1) ウイルス粒子内に、ウイルスゲノム RNA が取り込まれないこと、(2) ウイルス粒子内でカプシドを形成する p30 が Gag ポリペプチドから細胞内で切り出されず、細胞外にリリースされてから適切にプロセッシ

ングされること、(3) ウイルス粒子形成時に、ウイルス粒子数をモニターするための 2 本鎖 DNA を効率よく取り込ませること、である。

まず(1)については *gag* 遺伝子上流にあるパッケージングシグナルを除くことによってウイルスゲノムを含まないウイルス様粒子を作製することができる。Gag とプロテアーゼを含む Pro-Pol は同じ翻訳フレーム上にタンデムに並んでいるが、Gag と Pro-Pol の間には UAG (終止コドン) があり、翻訳は通常この UAG で停止するが、そのポリペプチドの 5-10% はこの終止コドンで停止せず、伸長を続け、Gag-Pro-Pol となる。そして Gag-Pro-Pol に含まれているプロテアーゼによってウイルスのカプシド形成が起きる。ところがこのプロセッシングがウイルス粒子の出芽以前に感染細胞内で起きてしまうと、ウイルス粒子形成の効率を大きく低下させる原因となる。実際にはこのプロテアーゼによるプロセッシング過程を制御するしくみがあると考えられているがその詳細は不明である。そこでこの点について検討を行い、Pol 領域に細胞内でのプロセッシングを抑制する領域があることがわかった。(3)に関しては、モニター用の DNA を結合する為に特異的な DNA 結合能をもつ複数のタンパク質について検討を行い、UASG (Upstream Activatin Sequences for galactose) と呼ばれる 2 本鎖 DNA を認識して結合することができる転写調節遺伝子 GAL4 を用いることにした。GAL4 の DNA 結合ドメインを Gag との融合タンパク質とすることによって、ウイルス粒子内にモニター用の DNA を >2000 コピー取り込ませ、ウイルスモニターの感度を上げることが可能になる。以上を考慮し、実用に耐えるウイルス様粒子を作製することができるものと考えられた。

E. 結論

E-1 ヒト間葉系幹細胞における虚血応答性サイトカインの分泌に関与する因子に関する検討

医療の進歩が著しい現代においても、ライ

フスタイルの変化、高齢化などにより、依然として高血圧や冠動脈疾患の罹患率は高い。心血管疾患では、末期に心不全に陥る確率が高く、また予後が不良である。現在では、薬により、心室のリモデリングや心機能の低下を起こすことなく症状の改善を図ることが可能になり、治療は飛躍的に向上している。しかし、一部の患者は不可逆的な重症心不全へと移行する。幹細胞は様々な成熟細胞の起源細胞であり、自己複製能や多分化能を持つ。その幹細胞を心臓に移植し、心筋修復を図る再生医療が注目され、重症心不全の新たな治療法として確立されることが期待されている。

幹細胞の一つである MSC もまた多分化能を有し、組織修復、再生医療における重要な候補と考えられている。MSC は、虚血状態においても数日間生存可能であることが知られ、さらに虚血性心疾患に対してパラクリン効果により血管新生を行い、修復作用を示すことが報告されている。

これまでの研究により、MSC における心筋修復効果に VEGF が大きな役割を果たしていることが示唆され、また VEGF 分泌と正の相関を示し、MSC の VEGF 分泌能予測マーカーとなる遺伝子 (VSR6, 7 遺伝子) が特定された。

本研究では、VSR 遺伝子の VEGF 分泌への関与は虚血条件のうち低酸素という条件に関与するのか、飢餓 (グルコース無添加) という条件に関与するのかを明らかにする目的で、RNAi を用いて VSR6, 7 遺伝子を各々発現抑制後、酸素濃度 1%, グルコースありの低酸素条件下で hMSC を培養し、放出された VEGF 量を通常条件下と比較することで、低酸素条件下における VSR6, 7 遺伝子の VEGF 分泌への影響を検討した。VEGF 分泌量は ELISA を用いて測定した。その結果、低酸素時の VEGF 分泌量は、VSR6 遺伝子を発現抑制することで有

意に増加し、VSR7 遺伝子を発現抑制することで有意に減少することが明らかとなった。VSR7 遺伝子は、虚血応答性 VEGF 分泌だけでなく、低酸素応答性 VEGF 分泌にも影響を与えることが示唆された。

さらに、VSR6, 7 遺伝子を発現抑制した細胞を用い、虚血（低酸素）時に誘導される HIF1 α に感受性を示す遺伝子の発現量を測定することで、VEGF 分泌に対する VSR6, 7 遺伝子の制御機構を検討した。今回、遺伝子発現量が虚血（低酸素）により上昇した HIF1 α 感受性遺伝子は VEGF, SERPINE, PEGF β の 3 つである。これらの遺伝子発現量は、VSR6 遺伝子を発現抑制することで増加し、VSR7 遺伝子を発現抑制することで減少する結果となった。以上より VSR6 遺伝子は、虚血時において、VEGF の合成、あるいはその後の VEGF 放出までの過程を誘導する働きと、HIF 抑制作用があり、低酸素時には、HIF 抑制作用のみであることが示唆された。そして VSR7 遺伝子は、HIF の作用または発現を促進することが示唆された。

本研究により、hMSC の虚血応答性 VEGF 分泌における VSR6, 7 遺伝子の制御機構の一部が解明された。しかしまだ確証には至らず、今後さらに検討する必要がある。また今回 VSR7 遺伝子については、虚血応答性に加え、低酸素応答性 VEGF 分泌も誘導する働きを持つことが明らかとなった。しかし、VSR6 遺伝子については低酸素条件下での VEGF 分泌は、虚血条件下での VEGF 分泌と逆の挙動を示した。低酸素条件と虚血条件の違いは、グルコースの有無であり、グルコースが VSR6 遺伝子の VEGF 分泌制御に何かしら関与している可能性が考えられる。高グルコースは、VEGF 産生や増加に影響を与えないとの報告があるが³⁴⁾、今後低グルコースと VSR6 遺伝子の関係についても検討する必要がある。

現在、VEGF や幹細胞を用いた臨床試験が、急性および慢性心不全を始め多くの心臓病で活発に行われている。また、MSC による臨床試験も進んでおり、将来心臓移植に代わる治療法となることが期待されている。しかし MSC による治療効果が、VEGF を単独投与するときに比べ、少量で現れるとの報告があり、同時に分泌される生理活性物質との相乗効果によることが示唆されているが、具体的な解明には至っておらず、今後検討が必要である。さらに、VEGF 分泌能の低い hMSC に対して分泌能を高める方法の確立、MSC の最適な投与方法、治療効果を得るために必要な細胞数の確保など課題は多い。これらの課題が一日も早く解決され、新たな治療法として確立されることが望まれる。

E-2 幹細胞の *in vitro* 培養工程における遺伝子発現の動態解析による品質評価技術の開発

幹細胞のがん化の陽性対照となり得る可能性をもつ Ewing 肉腫細胞を 4 種類（Hs822.T, Hs863.T, RD-ES, SK-ES-1）用いて遺伝子発現の網羅的解析を行い、骨髓由来間葉系幹細胞（hMSC）との比較を行った。その結果、肉腫細胞の遺伝子の発現パターンについて、Hs822.T と Hs863.T, RD-ES と SK-ES-1 のそれぞれが類似した発現パターンを示し、さらに Hs822.T と Hs863.T については、他の 2 種の肉腫細胞よりも hMSC の発現パターンにより類似している事がわかった。全ての Ewing 肉腫細胞において hMSC よりも 10 倍以上発現が変化した遺伝子を探索したところ、CCND2, IGF2BP1 など 9 遺伝子であった。そして、RT-PCR により両遺伝子とも hMSC と比較して肉腫細胞 4 種類の方が、その mRNA 発現レベルはるかに高い事を確認した。

E-3 細胞組織加工医薬品の遺伝的安定性の評価方法に関する研究

次世代シーケンサーによるシーケンス解析は、細胞の遺伝子異常の検出のための有力なツールであり、解析対象をエクソンに絞ること、作業の効率化を図ることができる。

E-4 再生医療製品のウイルス安全性評価

ウイルス動態を調べるための有用なウイルス様粒子の作製のためのいくつかの基礎的な検討を終えることができた。とくに安定なウイルス様粒子作製のためには、Pol 領域の p80 に細胞内での Pro によるプロセッシングを抑制する領域があり、それを導入する必要があることがわかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. 鈴木和博 再生医療と細胞特性 国立医薬品食品衛生研究所報告 2011;129:27-36.
2. 佐藤陽治, 黒田拓也 ヒト多能性幹細胞を使った再生医療・細胞治療における造腫瘍性試験の現状 医学のあゆみ 2011; 239:1460-5.
3. Nishioka K, Nishida M, Ariyoshi M, Jian Z, Saiki S, Hirano M, Nakaya M, Sato Y, Kita S, Iwamoto T, Hirano K, Inoue R, Kurose H. Cilostazol Suppresses Angiotensin II-induced Vasoconstriction via Protein Kinase A-mediated phosphorylation of TRPC6 channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31:2278-86.
4. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する指針整備と主なポイント 再生医療 2011; 10:206-10.
5. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト (自己) 体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針 (案) —総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について— 再生医療 2011; 10:211-8.
6. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト (同種) 体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針 (案) —総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について— 再生医療 2011; 10:219-26.
7. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト (自己) iPS (様) 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針 (案) —総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について— 再生医療 2011; 10:227-37.
8. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト (同種) iPS (様) 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針 (案) —総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について— 再生医療 2011; 10:238-48.
9. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針 (案) —総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について— 再生医療 2011; 10:249-60.
10. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針 (案) —ヒト体性幹細胞, iPS (様) 細胞又は ES 細胞を加工して製造される医薬品等 (ヒト幹細胞加工医薬品等) の最終製品の品質管理— 再生医療 2011; 10:261-6.
11. 早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥: ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針 (案) —ヒト体性幹細胞, iPS (様) 細胞又は ES 細胞

- を加工して製造される医薬品等(ヒト幹細胞加工医薬品等)の非臨床試験及び臨床試験について— 再生医療 2011; 10:267-72.
12. Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Watanabe K, Ono K, Shimizu S, Hayakawa T, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y. AW551984: a novel regulator of cardiomyogenesis from pluripotent embryonic cells. *Biochem J*. 2011;437:345-55.
 13. Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, Sato Y, Kiyonaka S, Hoshijima M, Ikeda Y, Nakaya M, Ide T, Mori Y, Kurose H, Nishida M. TRPC3-mediated Ca^{2+} influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;409:108-13.
 14. Yuan, Y., Maeda, Y., Terasawa, H., Monde, K., Harada, S., Yusa, K. A Combination of Polymorphic Mutations in V3 Loop of HIV-1 gp120 Can Confer Noncompetitive Resistance to Maraviroc. *Virology*, 413:293-299, 2011.
 15. Maeda, Y., Yoshimura, K., Miyamoto, F., Kodama, E., Harada, S., Yuan, Y., Harada, S., Yusa, K. *In vitro* and *In vivo* Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry Inhibitors. *J. AIDS Clin. Res.* S2-004, 2011.
 16. 遊佐敬介, 山口照英, 川崎ナナ. ヒトに感染が疑われているレトロウイルスとウイルス安全性, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 42: 444-447, 2011.
 17. 遊佐敬介, 新見伸吾, 橋井則貴. バイオ医薬品の外来性感染物質について *Pharm. Tech. Jpn.* 28: 941-946, 2012.
 18. Luan Y, Kogi M, Rajaguru P, Ren J, Yamaguchi T, Suzuki K, Suzuki T. Microarray analysis of responsible genes in increased growth rate in the subline of HL60 (HL60RG) cells. *Mutation Res.* 731: 20-29 (2012)
 19. Ramadan A, Suzuki T. Detection of Genotoxicity of Phenolic Antioxidants, Butylated hydroxyanisole and tert-Butylhydroquinone in Multiple Mouse Organs by the Alkaline Comet Assay. *J. American Science* 8: 722-727 (2012)
 20. 鈴木孝昌: 個別化医療のためのバイオマーカーの探索・バリデーションと活用手法 「個別化医療の世界的動向を踏まえた開発・事業戦略」, 技術情報協会, 77-89頁, (2011)
 21. Uchida M, Ishii I, Hirata K, Yamamoto F, Tashiro K, Suzuki T, Nakayama Y, Ariyoshi N, Kitada M. Degradation of filamin induces contraction of vascular smooth muscle cells in type-I collagen matrix honeycombs. *Cell Physiol Biochem.* 27: 669-80 (2011)
- ### G-2 学会発表
1. Kuramochi T, Satoh M, Atsuki H, Yasuda S, Hayakawa T, Suzuki K, Sato Y. Modes of action of genes facilitating ischemia-induced VEGF secretion in human mesenchymal stem cells. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都 (2012 年 3 月 14-16 日)
 2. 佐藤陽治 細胞治療・再生医療の規制の国際比較 第 12 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム, 東京 (2012 年 2 月 4 日)
 3. Sato Y. Update on the Regulation and Development of Cell/Tissue-Based Products in Japan. 2011 International Convention of the Pharmaceutical Society of Korea, 仁川, 韓国 (2011 年 11 月 8 日)
 4. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human stem cells. World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany (2011 年 11 月 2-4 日)
 5. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human somatic stem cells. World Stem Cell Summit 2011, Pasadena, USA (2011 年 11 月 3-5 日)
 6. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S,

- Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human pluripotent stem cells. World Stem Cell Summit 2011, Pasadena, USA (2011 年 11 月 3-5 日)
7. 佐藤陽治 ヒト iPS (様) 細胞を加工して製造される分化細胞の品質 第1回レギュラトリーサイエンス学会学術大会, 東京 (2011 年 9 月 3 日)
 8. Sato Y, Atsuki H, Satoh M, Tanabe S, Yamaguchi T, Hayakawa T, Suzuki K. Identification of genes that regulate cardiomyogenesis in mouse embryonic cells. The 10th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011 年 6 月 15-18 日)
 9. Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y. Genes associated with ischemia-induced VEGF secretion of human bone marrow mesenchymal stem cells. The 10th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011 年 6 月 15-18 日)
 10. 澤田留美, 松岡厚子「チタンディスク上で培養したヒト間葉系幹細胞の遺伝子発現に関する網羅的解析」 第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11)
 11. R. Sawada, Y. Haishima, K. Isama, A. Matsuoka; Effect of surface-modified titanium by chemical treatment on the gene expression profile in osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, SOT's 51st Annual Meeting (2012.3)
 12. Yusa, K., Yuan, Y., Maeda, Y., Hiromi, T., Monde, K., Harada, S. A Combination of Polymorphic Mutations in V3 Loop of HIV-1 gp120 Can Confer Noncompetitive Resistance to Maraviroc. *International Union of Microbiological Societies, XV, International Congress of Virology*, Sapporo, September 2011.
 13. 原田恵嘉, 濱治有希, 遊佐敬介, 松下修三, 吉村和久. 抗HIV剤がEnv多様性に与える影響. 第25回日本エイズ学会学術総会 東京 11.30.2011.
 14. 中野雄介, 前田洋助, 遊佐敬介, 原田信志. コレセプター阻害剤によるCCR5のoligomerization 増強に關与するCCR5領域の解析. 第25回日本エイズ学会学術総会 東京 11.30.2011.
 15. 鈴木孝昌:植物由来発癌物質“アリストロキア酸”の強力な変異原性とオミックスアプローチによるバイオマーカー探索 第70回日本癌学会学術総会 (2011.10) (名古屋)
 16. 鈴木孝昌, 押澤正, 宮澤明史, 佐藤陽治, 降旗千恵, 鈴木和博:次世代シーケンサーを用いた間葉系幹細胞における突然変異検出とゲノム安定性の検討 日本環境変異原学会 第40回大会 (2011.11) (東京)
 17. 鈴木孝昌: Genetic instability of human mesenchymal stem cells インド環境変異原学会 (変異原と環境ストレスに対するヒトの健康の分子基盤に関する国際シンポジウム) (2012.1) (ブヴァネーシュヴァル/インド)
 18. 鈴木 孝昌, ラマダン・アリ, 小原 有弘, 本間 正充, 林 真, 菊池 裕: バルカン腎症の原因物質と考えられるオクラトキシンAおよびアリストロキア酸のマウスに対する遺伝子傷害性の比較 日本マイコトキシン学会 第70回 学術講演会
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- H-1. 特許取得 なし
- H-2. 実用新案登録 なし
- H-3. その他 特記事項なし
- I. 参考文献**
1. D. Rubio, J. Garcia-Castro, M.C. Martin, R. Fuente, J.C. Cigudosa, A.C. Lloyd, and A. Bernad, *Cancer Res.*, **65**, 3035-3039 (2005)
 2. R. Fuente, A. Bernad, J. Garcia-Castro, M.C.

- Martin, and J.C. Cigudosa, *Cancer Res.*, **70**, 6682 (2010)
3. N. Riggi, M.L. Suvà, D. Suvà, L. Cironi, P. Provero, S. Tercier, J.M. Joseph, J.C. Stehle, K. Baumer, V. Kindler, I. Stamenkovic, *Cancer Res* **68**, 2176-2185 (2008)
 4. I. Ben-Porath, M.W. Thomson, V.J. Carey, R. Ge, G.W. Bell, A. Regev, and R.A. Weinberg, *Nature genetics*, **40**, 499-507 (2008)
 5. R. Mitra, J. Lee, J. Jo, M. Milani, J.N. McClintick, H.J. Edenberg, K.A. Kesler, K.M. Rieger, S. Badve, O.W. Cummings, A. Mohiuddin, D.G. Thomas, X. Luo, B.E. Juliar, L. Li, C. Mesaros, I.A. Blair, A. Srirangam, R.A. Kratzke, C.J. McDonald, J. Kim, D.A. Potter, *Clin. Cancer Res.*, **17**, 2934-2946 (2011)
 6. M. Kheirollahi, M. Mehr-Azin, N. Kamalian, P. Mehdipour, *Med. Oncol.*, **28**, 7-14 (2011)
 7. T. Kato, S. Hayama, T. Yamabuki, N. Ishikawa, M. Miyamoto, T. Ito, E. Tsuchiya, S. Kondo, Y. Nakamura, Y. Daigo, *Clin. Cancer Res.*, **13**, 434-442 (2007)
 8. L. Gu, K. Shigemasa, K. Ohama, *Int .J. Oncol.*, **24**, 671-678 (2004)

Table 1 本研究に用いられた hMSC のロット情報

ロット番号		年齢	性別	人種
in house	製造元			
A	4F1127	23	男	アフリカ系
C	5F0138	19	男	アフリカ系
H	4F0760	25	女	コーカサス系

Table 2 Stelth RNAi の配列

Gene	Name	Context	Strand
VSR6	HSS127432	GGGACCAACUCAUUACACAGCUGAA	Sense
		UUCAGCUGUGUAAUGAGUUGGUCCC	Antisense
VSR7	NM_182705_stelth_96	CCGAGCUCGUGGACGCGAAGAAGAA	Sense
		UUCUUCUUCGCGUCCACGAGCUCGG	Antisense

Table 3 TaqMan Gene Expression Assay の Assay ID

Gene	Product	Sequence or Assay ID
VSR6	TaqMan Gene Expression Assay	Hs01073633_m1
VSR7	TaqMan Gene Expression Assay	Hs00823804_m1
EEF1A1	TaqMan Gene Expression Assay	Hs00265885_g1

Table 4 VSR 遺伝子および EEF1A1 の RT-PCR 溶液調整方法

順序	試薬	最終濃度	1 反応あたりの試薬の用量
1	DEPC 処理済蒸留水		7.2 μ L
2	20 $\times$ TaqMan Gene Expression Assay	1 $\times$	1.5 μ L
3	2 $\times$ QuantiTect RT-PCR Master Mix	1 $\times$	15 μ L
4	2 $\times$ QuantiTect RT Mix	1 $\times$	0.30 μ L
Total (Mix Solution)			24 μ L/tube

Table 5 サーマルサイクラーの条件

	反応温度	反応時間	サイクル数
ステージ 1	50 $^{\circ}$ C	30min	1Cycle
ステージ 2	95 $^{\circ}$ C	15min	1Cycle
ステージ 3	94 $^{\circ}$ C	15sec	40Cycle
	60 $^{\circ}$ C	1min	

Table 6 HIF1 α 感受性遺伝子および TaqMan Gene Expression Assay の Assay ID

Gene	Product	Sequence or Assay ID
VEGF	TaqMan Gene Expression Assay	Hs00900055_m1
SERPINE	TaqMan Gene Expression Assay	Hs01126604_m1
PDGF β	TaqMan Gene Expression Assay	Hs00966522_m1
EDN1	TaqMan Gene Expression Assay	Hs00174961_m1
EPO	TaqMan Gene Expression Assay	Hs01071097_m1
TF	TaqMan Gene Expression Assay	Hs00169070_m1

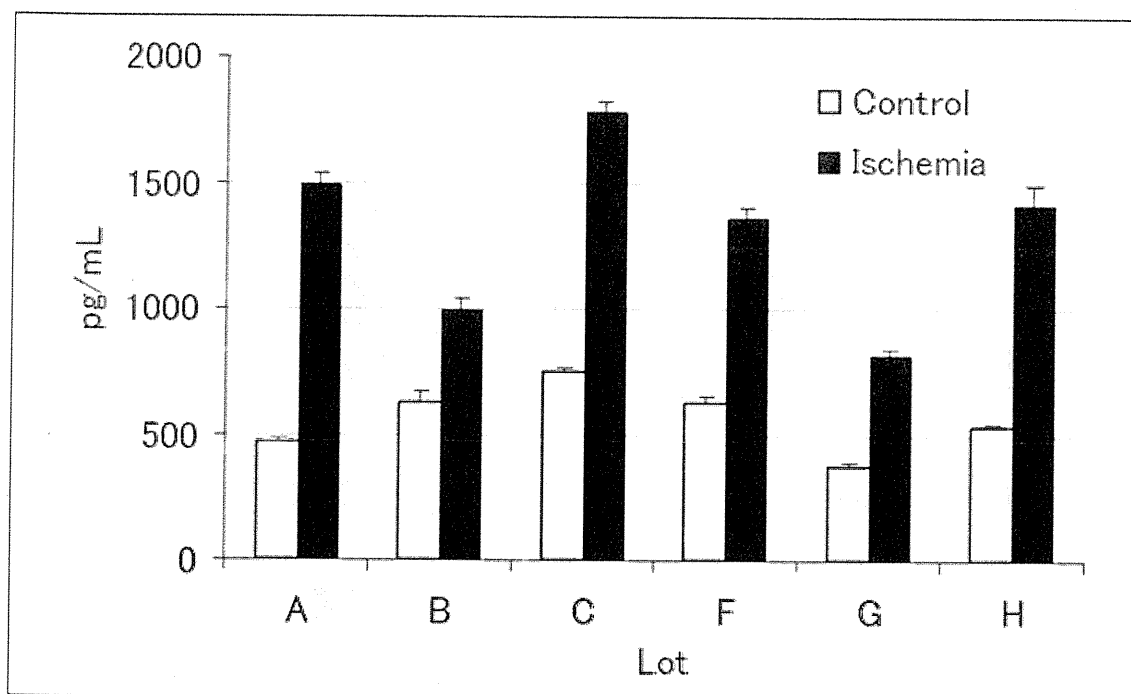


Fig.1 虚血後における hMSC の VEGF 分泌量変化

通常条件または擬似的虚血条件にて 24 時間培養し、回収した培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。縦軸は VEGF 濃度を示しており、横軸はロットを示している。two-way ANOVA によれば、VEGF 分泌量は、hMSC のロット間で有意な差が認められた ($p(\text{Lot}) < 0.05$)。また、虚血による有意な VEGF 分泌増加が認められた ($p(\text{Ischemia}) < 0.05$)。虚血とロットとの相互作用についても有意な差が認められ ($p(\text{Lot} \times \text{Ischemia}) < 0.05$)、虚血後の VEGF 分泌量にはロット間の差がみられたと同時に、6 ロット各々において虚血による VEGF 分泌量の有意な増加が認められた ($p < 0.05$, Student-Newman-Keul test)。[平均値 $\pm$ S.E.M. (n=5)] * $p < 0.05$ vs. Control group of each lot

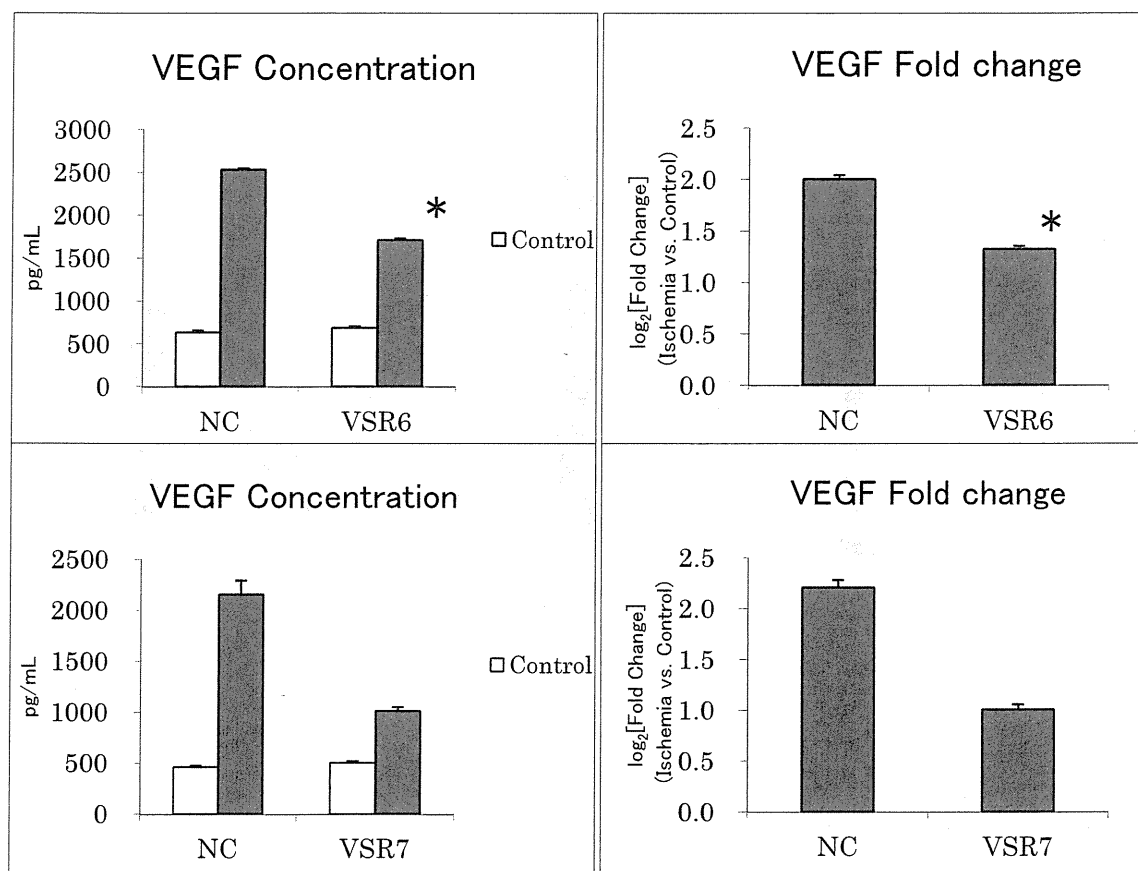


Fig.2 ロット A における VSR 遺伝子阻害後の VEGF 分泌変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または擬似的虚血条件にてさらに 24 時間培養し、回収した培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。縦軸は VEGF 濃度（左図）またはネガティブコントロール（NC）群の VEGF 濃度に対する RNAi 群の比率の対数（右図）を示しており、横軸は遺伝子を示している。VSR6 および VSR7 発現抑制後において、虚血後における VEGF 分泌量および分泌変化率の双方に有意な減少が認められた。〔平均値±SEM (n=5)〕 * $p < 0.05$ vs. NC-Ischemia (left panels) or NC (right panels)

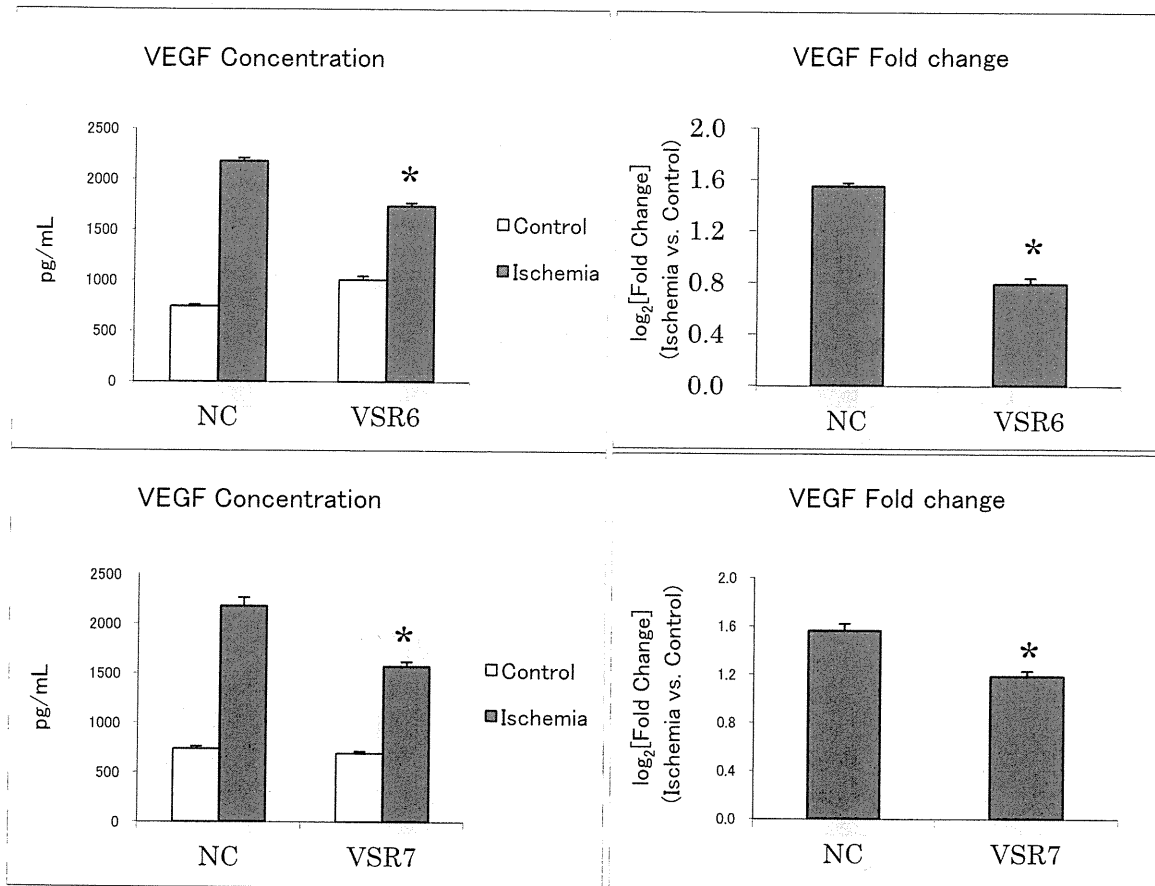


Fig.3 ロット C における VSR 遺伝子阻害後の VEGF 分泌変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または擬似的虚血条件にてさらに 24 時間培養し、回収した培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。

縦軸は VEGF 濃度 (左図) またはネガティブコントロール (NC) 群の VEGF 濃度に対する RNAi 群の比率の対数 (右図) を示しており、横軸は遺伝子を示している。VSR6 および VSR7 発現抑制後において、虚血後における VEGF 分泌量および分泌変化率の双方に有意な減少が認められた。[平均値±SEM (n=5)] * $p < 0.05$ vs. NC-Ischemia (left panels) or NC (right panels)

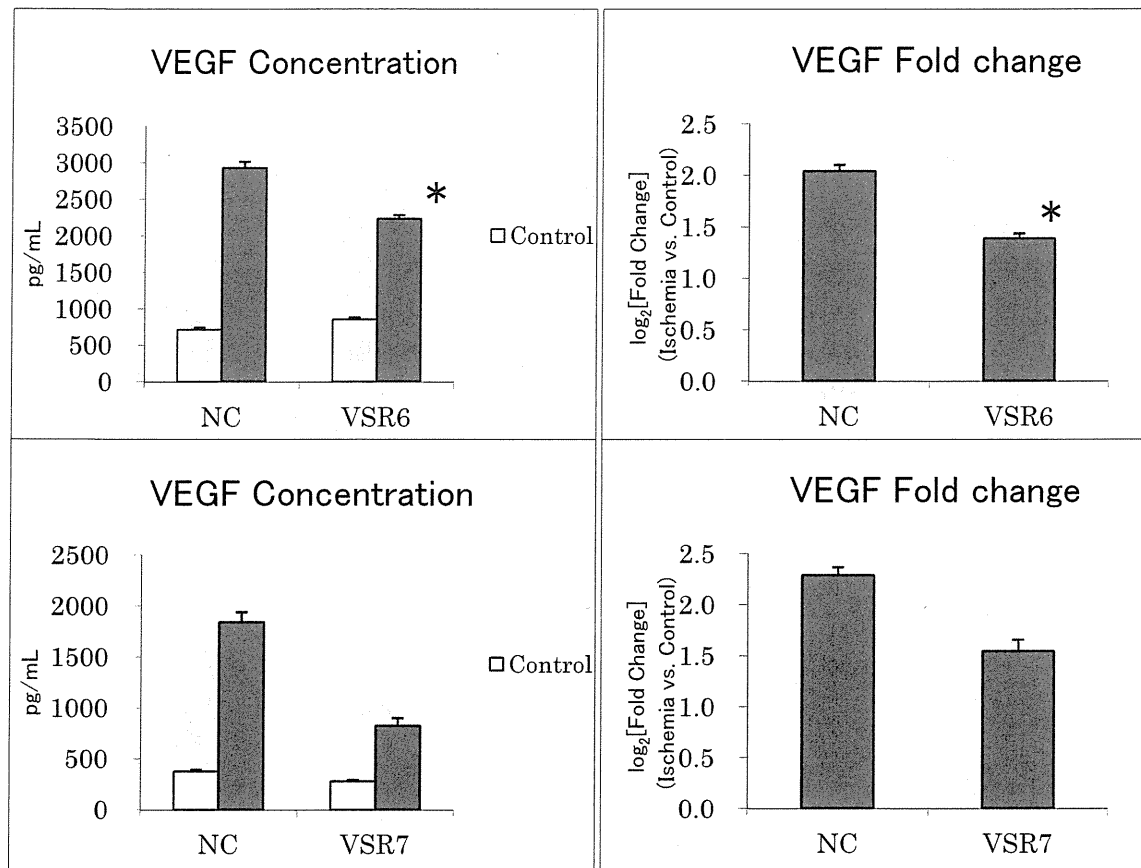


Fig.4 ロット H における VSR 遺伝子阻害後の VEGF 分泌変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または擬似的虚血条件にてさらに 24 時間培養し、回収した培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。

縦軸は VEGF 濃度 (左図) またはネガティブコントロール (NC) 群の VEGF 濃度に対する RNAi 群の比率の対数 (右図) を示しており、横軸は遺伝子を示している。

VSR6 および VSR7 発現抑制後において、虚血後における VEGF 分泌量および分泌変化率の双方に有意な減少が認められた。[平均値±SEM (n=5)]

* $p < 0.05$ vs. NC-Ischemia (left panels) or NC (right panels)

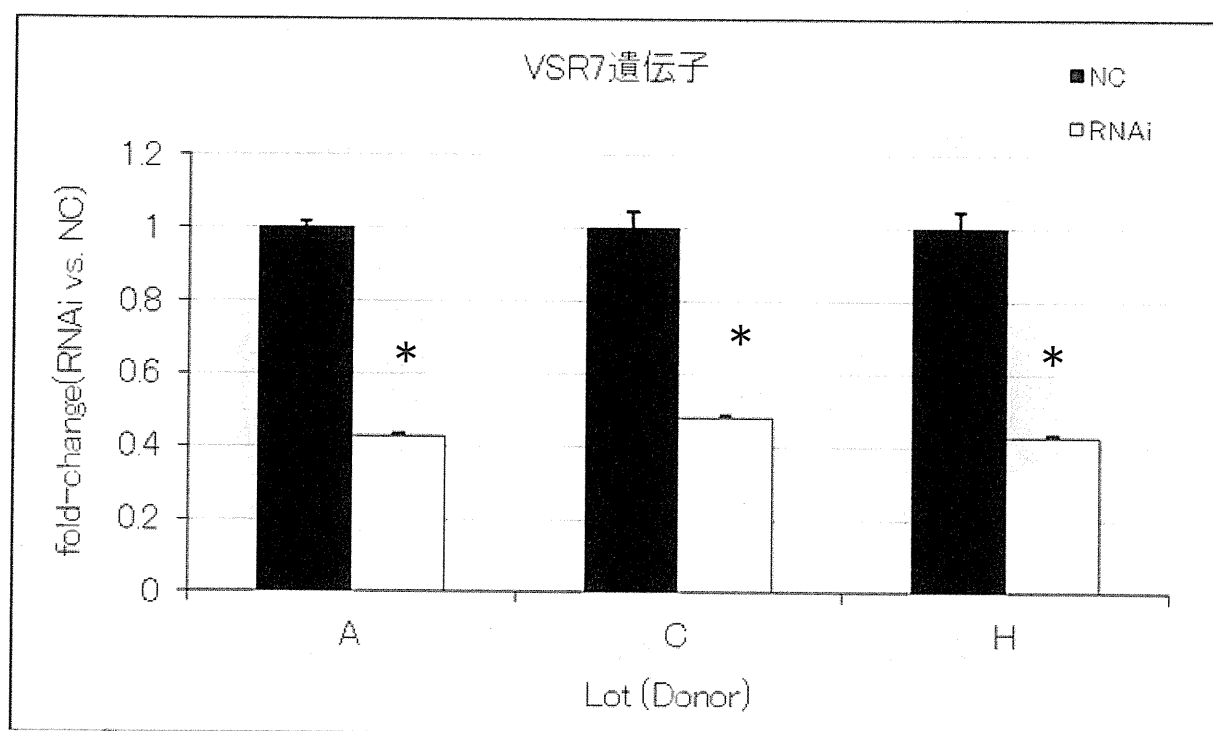
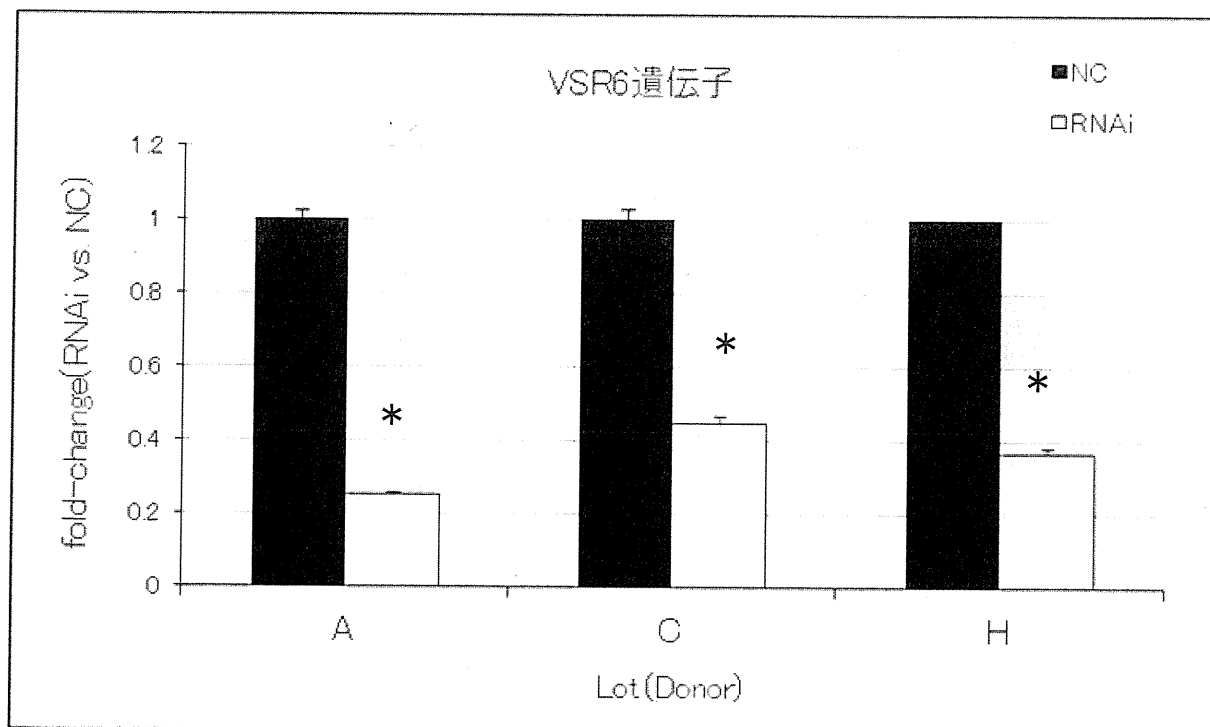


Fig.5 各ロットにおける VSR6、7 遺伝子のノックダウン効率

RNAi 24 時間後に回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸は各ロットのネガティブコントロール (NC) 群の遺伝子発現量に対する RNAi 群の比率を示しており、横軸はロットを示している。3 ロット全てで有意な発現の抑制が見られた。[平均値±SEM (n=3)] * $p < 0.05$ vs. NC

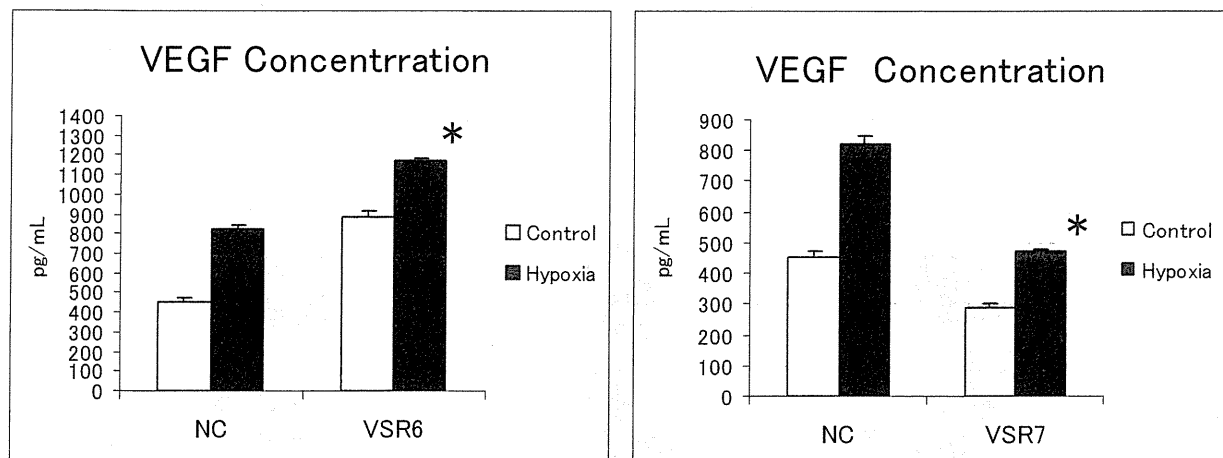


Fig.6 ロット A における VSR 遺伝子阻害後の VEGF 分泌量の変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または低酸素条件にてさらに 24 時間培養し、回収した培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。

縦軸は VEGF 濃度を示しており、横軸は遺伝子を示している。

VSR6 遺伝子発現抑制によって低酸素下での VEGF 分泌量は有意な増加が見られ、VSR7 遺伝子発現抑制によって低酸素下での VEGF 分泌量は有意な減少が見られた。〔平均値±SEM (n=5)〕

* $p < 0.05$ vs. NC-Hypoxia

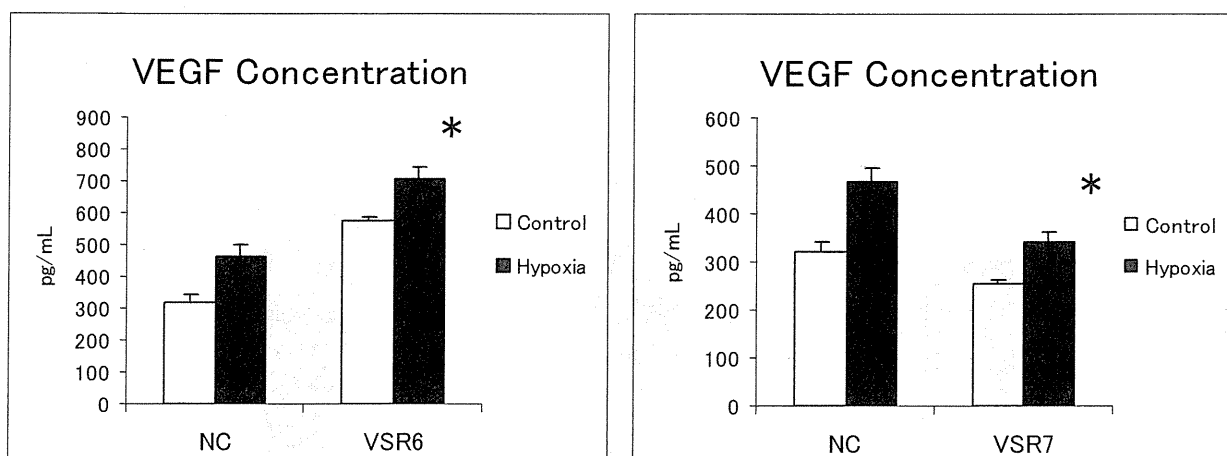


Fig.7 ロット C における VSR 遺伝子阻害後の VEGF 分泌量の変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または低酸素条件にてさらに 24 時間培養し、回収した培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。

縦軸は VEGF 濃度を示しており、横軸は遺伝子を示している。

VSR6 遺伝子発現抑制によって低酸素下での VEGF 分泌量は有意な増加が見られ、VSR7 遺伝子発現抑制によって低酸素下での VEGF 分泌量は有意な減少が見られた。〔平均値±SEM (n=5)〕

* $p < 0.05$ vs. NC-Hypoxia

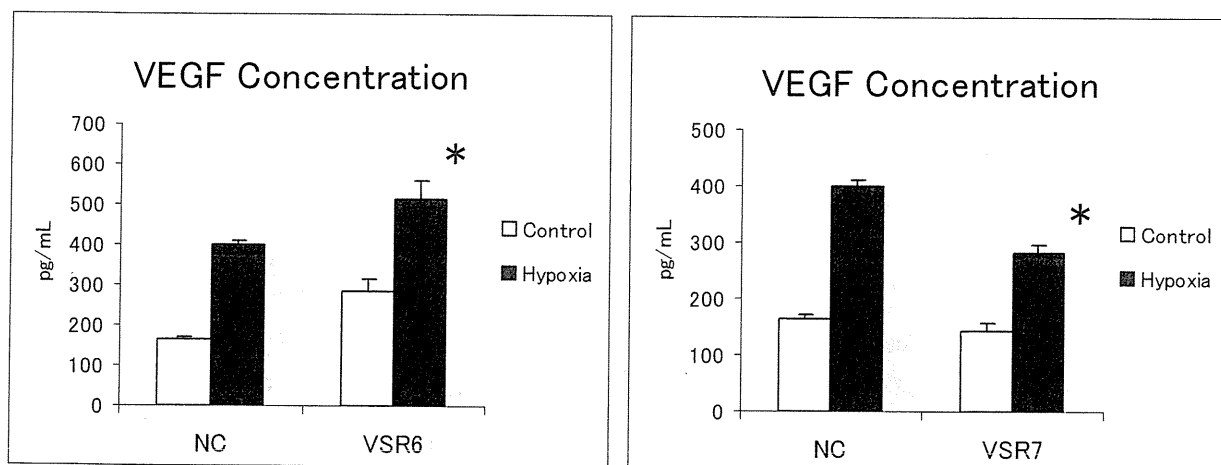


Fig.8 ロット H における VSR 遺伝子阻害後の VEGF 分泌量の変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または低酸素条件にてさらに 24 時間培養し、回収した培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。縦軸は VEGF 濃度を示しており、横軸は遺伝子を示している。VSR6 遺伝子発現抑制によって低酸素下での VEGF 分泌量は有意な増加が見られ、VSR7 遺伝子発現抑制によって低酸素下での VEGF 分泌量は有意な減少が見られた。[平均値±SEM (n=5)] * $p < 0.05$ vs. NC-Hypoxia

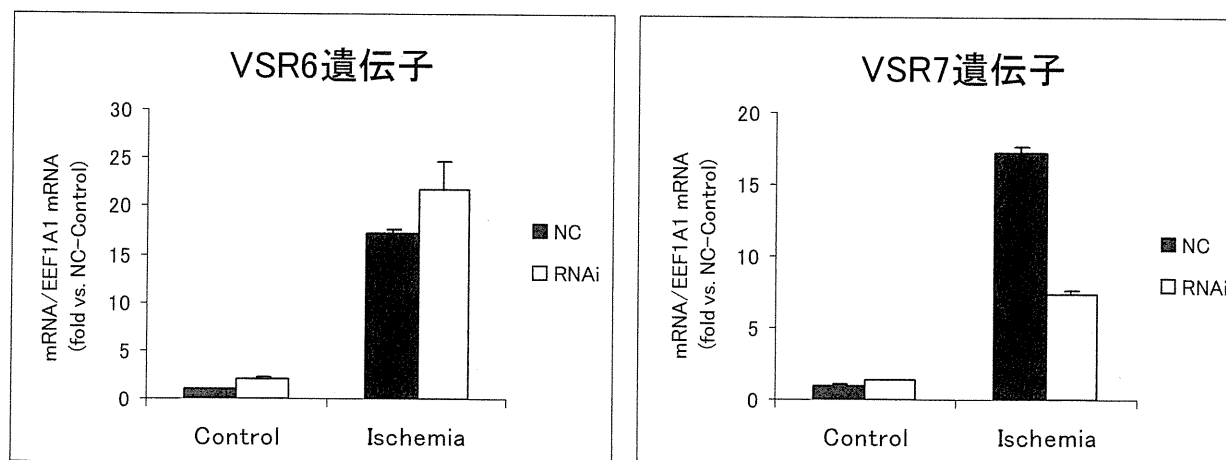


Fig.9 ロット A における VSR 遺伝子阻害後の VEGF 遺伝子発現量の変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または擬似的虚血条件にてさらに 24 時間培養し、回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸は通常条件 (Control) におけるネガティブコントロール (NC) 群の遺伝子発現量に対する比率を示しており、横軸は培養条件を示している。なお左図は VSR6 遺伝子、右図は VSR7 遺伝子発現抑制後の遺伝子変化を示している。擬似的虚血条件 (Ischemia) での VEGF 遺伝子発現量は、VSR6 遺伝子発現抑制によって上昇し、VSR7 遺伝子発現抑制によって減少した。[平均値±SEM (n=3)]

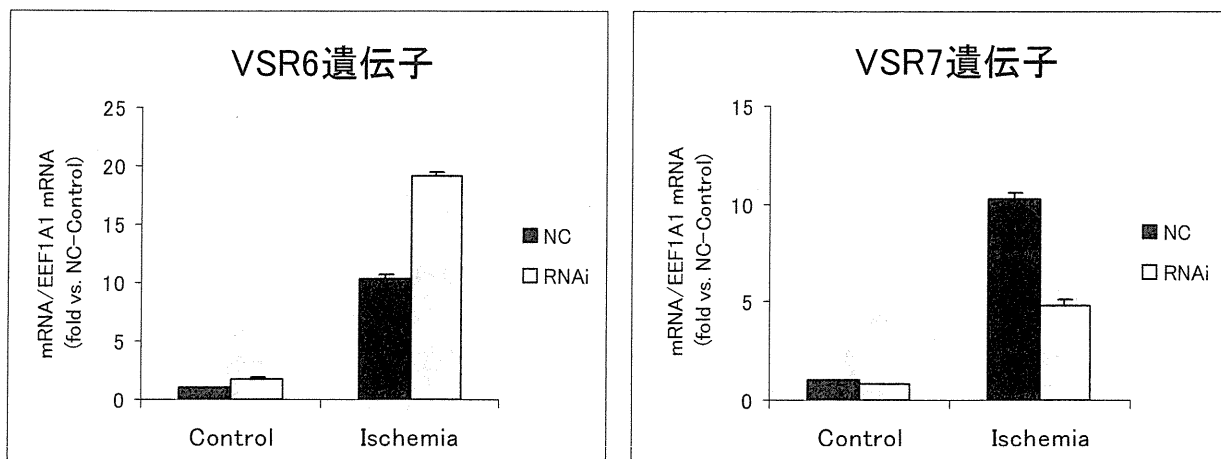


Fig.10 ロット H における VSR 遺伝子阻害後の VEGF 遺伝子発現量の変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または擬似的虚血条件にてさらに 24 時間培養し、回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸は通常条件 (Control) におけるネガティブコントロール (NC) 群の遺伝子発現量に対する比率を示しており、横軸は培養条件を示している。なお左図は VSR6 遺伝子、右図は VSR7 遺伝子発現抑制後の遺伝子変化を示している。擬似的虚血条件 (Ischemia) での VEGF 遺伝子発現量は、VSR6 遺伝子発現抑制によって上昇し、VSR7 遺伝子発現抑制によって減少した。〔平均値±SEM (n=3)〕

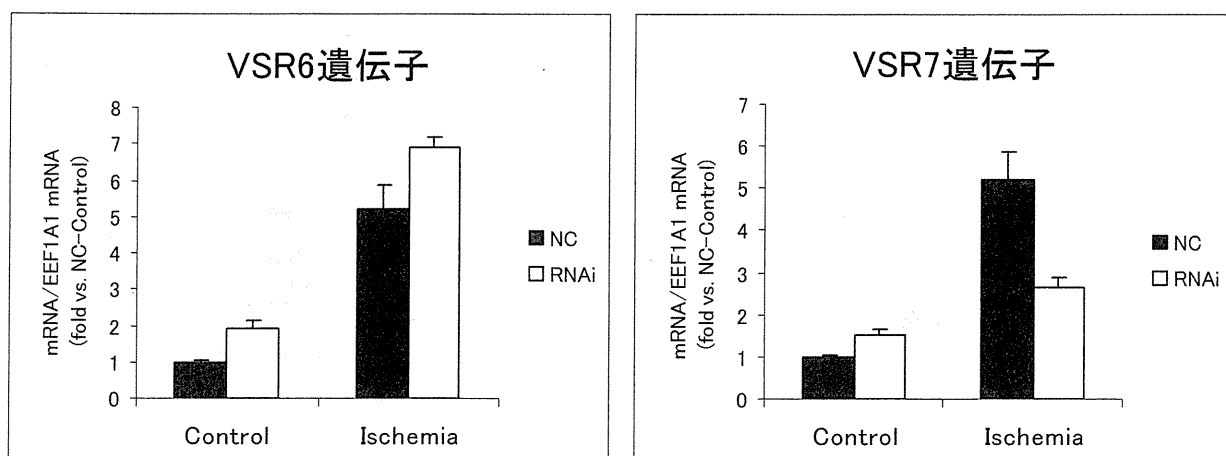


Fig.11 ロット A における VSR 遺伝子阻害後の SERPINE 遺伝子発現量の変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または擬似的虚血条件にてさらに 24 時間培養し、回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸は通常条件 (Control) におけるネガティブコントロール (NC) 群の遺伝子発現量に対する比率を示しており、横軸は培養条件を示している。なお左図は VSR6 遺伝子、右図は VSR7 遺伝子発現抑制後の遺伝子変化を示している。擬似的虚血条件 (Ischemia) での VEGF 遺伝子発現量は、VSR6 遺伝子発現抑制によって上昇し、VSR7 遺伝子発現抑制によって減少した。〔平均値±SEM (n=3)〕

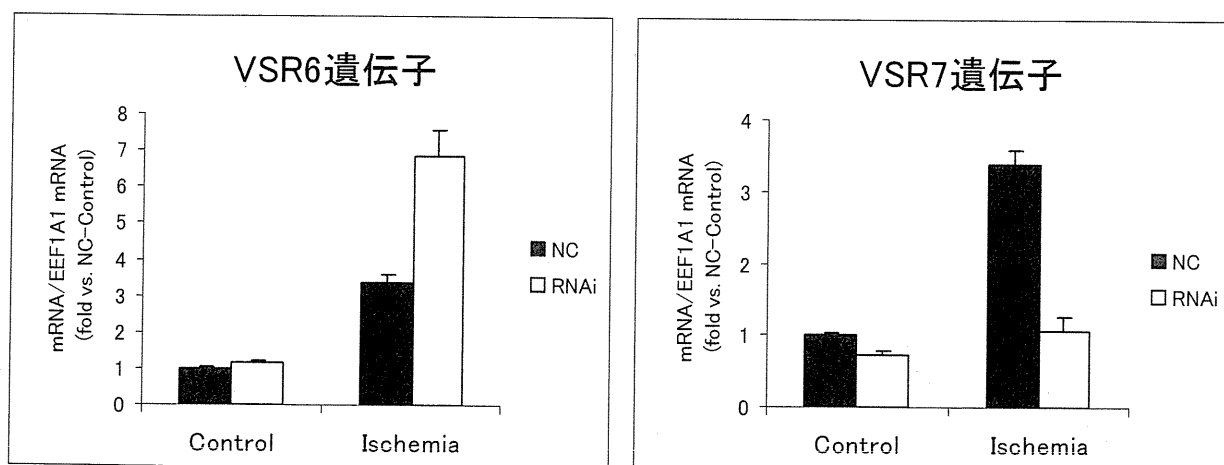


Fig.12 ロット H における VSR 遺伝子阻害後の SERPINE 遺伝子発現量の変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または擬似的虚血条件にてさらに 24 時間培養し、回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸は通常条件 (Control) におけるネガティブコントロール (NC) 群の遺伝子発現量に対する比率を示しており、横軸は培養条件を示している。なお左図は VSR6 遺伝子、右図は VSR7 遺伝子発現抑制後の遺伝子変化を示している。擬似的虚血条件 (Ischemia) での VEGF 遺伝子発現量は、VSR6 遺伝子発現抑制によって上昇し、VSR7 遺伝子発現抑制によって減少した。

[平均値±SEM (n=3)]

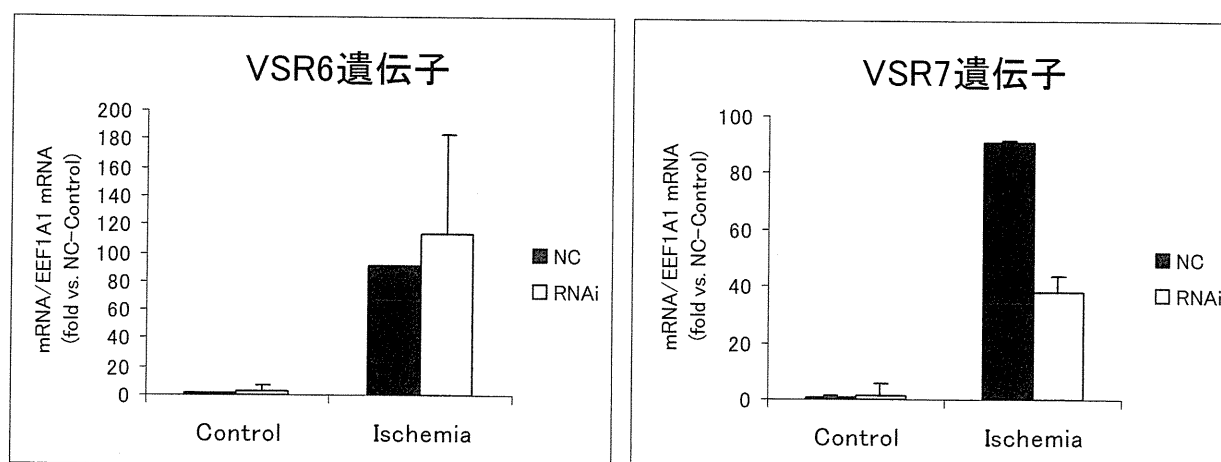


Fig.13 ロット A における VSR 遺伝子阻害後の PDGF β 遺伝子発現量の変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または擬似的虚血条件にてさらに 24 時間培養し、回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸は通常条件 (Control) におけるネガティブコントロール (NC) 群の遺伝子発現量に対する比率を示しており、横軸は培養条件を示している。なお左図は VSR6 遺伝子、右図は VSR7 遺伝子発現抑制後の遺伝子変化を示している。擬似的虚血条件 (Ischemia) での VEGF 遺伝子発現量は、VSR6 遺伝子発現抑制によって上昇し、VSR7 遺伝子発現抑制によって減少した。[平均値±SEM (n=3)]

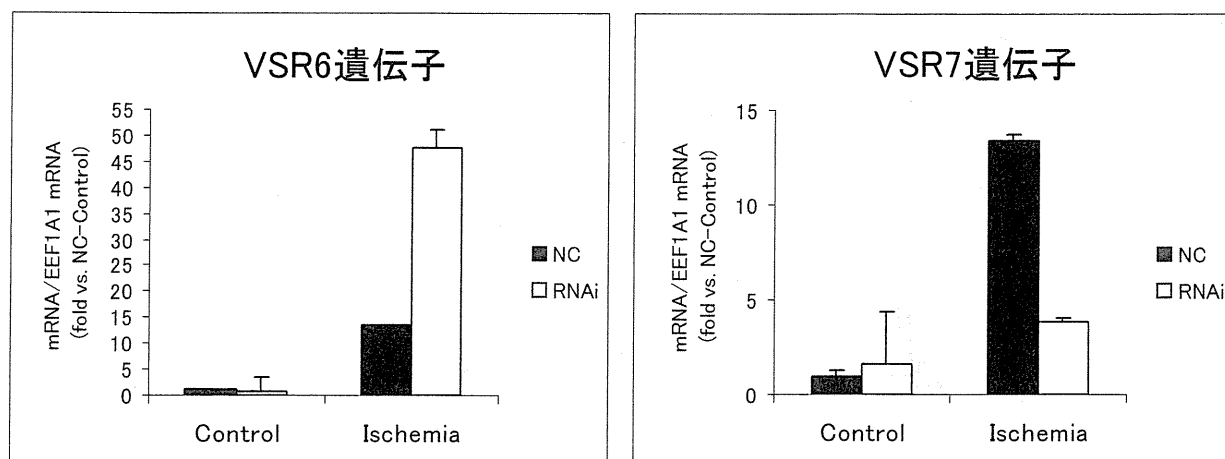


Fig.14 ロット H における VSR 遺伝子阻害後の PDGF β 遺伝子発現量の変化

RNAi 24 時間後に継代した細胞を、通常条件または擬似的虚血条件にてさらに 24 時間培養し、回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸は通常条件 (Control) におけるネガティブコントロール (NC) 群の遺伝子発現量に対する比率を示しており、横軸は培養条件を示している。なお左図は VSR6 遺伝子、右図は VSR7 遺伝子発現抑制後の遺伝子変化を示している。擬似的虚血条件 (Ischemia) での VEGF 遺伝子発現量は、VSR6 遺伝子発現抑制によって上昇し、VSR7 遺伝子発現抑制によって減少した。〔平均値 $\pm$ SEM (n=3)〕

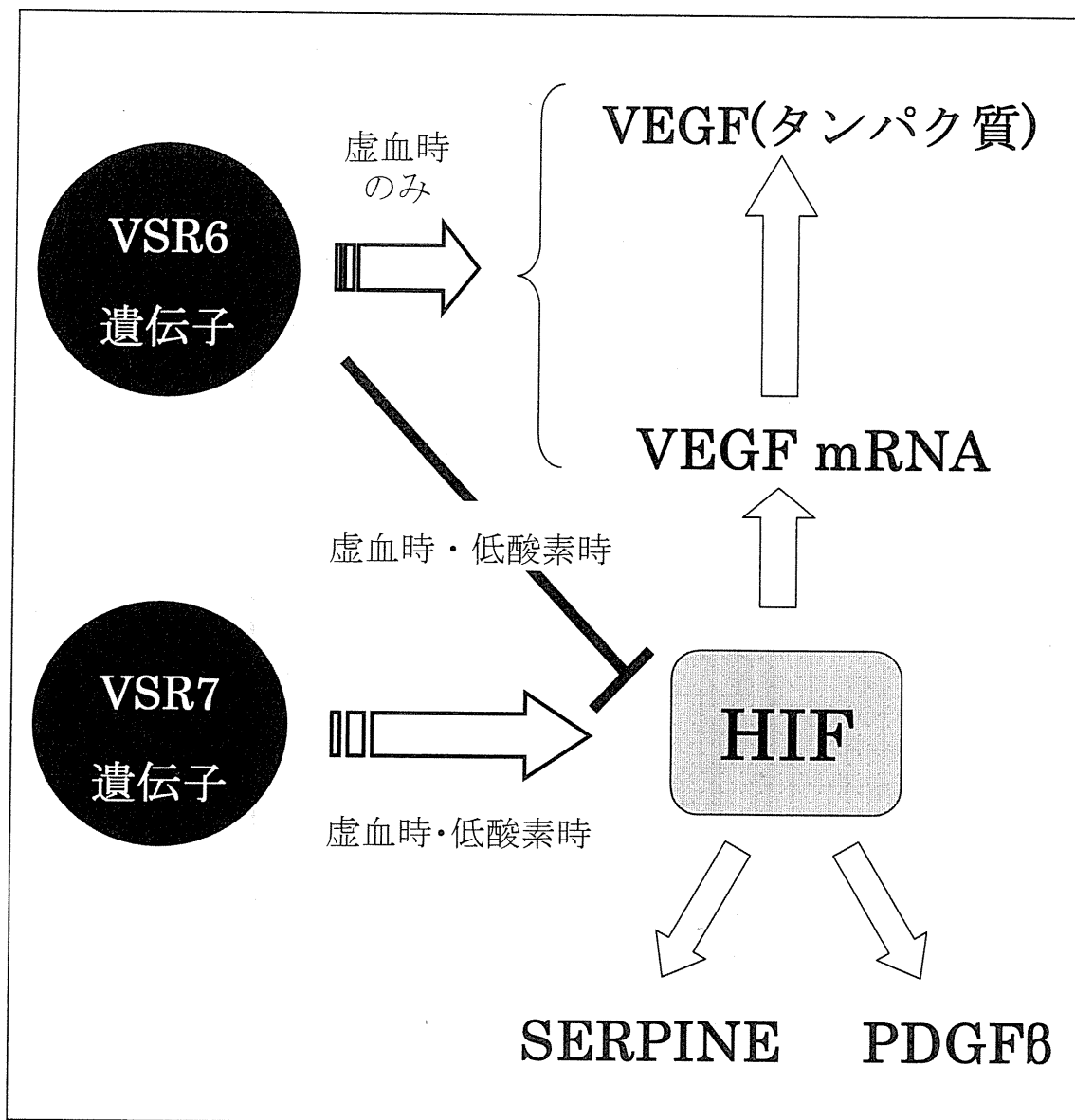


Fig.15 VSR6 および VSR7 の虚血応答性 VEGF 分泌における推定作用点

VSR7 遺伝子は、HIF の作用（または発現）を調節していることが示唆される。VSR7 遺伝子発現抑制後の虚血応答性 VEGF 分泌の減少も、HIF の作用調節を介したものである可能性が高い。VSR6 遺伝子発現抑制後、虚血条件下において VEGF（タンパク質）は減少するが、VEGF 遺伝子の発現は上昇した。従って、虚血応答性 VEGF（タンパク質）分泌において VSR6 遺伝子は、mRNA の転写後を調節している可能性が高い。