

図 13. 反応溶液中 NaCl の ANS-タンパク質結合に与える影響

図 13 の結果、L-FABP と ANS の結合では 1500 mM NaCl の高塩濃度条件下でも顕著なシグナルの変化は確認されなかった。しかし、BSA と ANS の結合では 150~1500 mM NaCl の塩濃度依存的に飽和曲線の傾きが変化した。非特異的な相互作用や、アッセイプレートへのタンパク質の吸着を防ぐ目的にも 150 mM NaCl 条件でアッセイを行うこととした。

各種評価脂肪酸は DMSO に溶解するため、反応溶液中への DMSO の混入が ANS 結合シグナルに影響を及ぼすかを検討する。

96 well プレートに 20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl 緩衝液条件で 1 μM L-FABP、BSA をそれぞれ添加し、

DMSO 濃度を 0%~25% となるように添加し、プレートシェイカーで混和した。その後 ANS を 70 μM で添加し室温で 3 分間反応させた。本アッセイプレートを Ex=375 nm, Em=490 nm の蛍光を測定した。

解析結果は DMSO 0% 条件下の結合シグナルを 100% として相対蛍光値として図 14 に示した。

図 14 の結果、L-FABP-ANS 結合シグナルは 10% DMSO 添加まで 80% シグナルを維持しており、BSA-ANS 結合シグナルは 5% DMSO 添加まで 80% シグナルを維持していた。よって、反応溶液中に添加する DMSO 濃度限界は 5% と決定した。

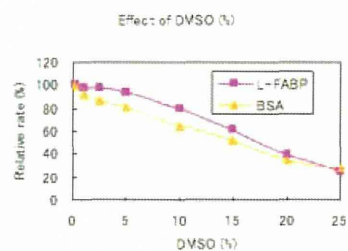


図 14. DMSO の濃度による ANS-タンパク質結合に与える影響

#### アッセイスケールの検討

上記条件で各種脂肪酸の親和性解析を行うにあたり、スループットを高めることと、材料使用量の効率化を図るために、96well プレートから 384well プレートへの系の圧縮を検討した。

各種材料のモル濃度を統一し、96well プレートのアッセイボリュームを 200 μL、384well プレートのアッセイボリュームを 50 μL として同様の条件で蛍光測定を行った。得られた各プレ

ートにおける結合飽和曲線を図 15 に示す。結果、どちらのプレートにおいても結合飽和曲線は得られ、384well プレートにすることでシグナルの増強が見られた。以上の結果よりアッセイボリュームの観点からも材料使用量は 1/4 に効率化でき、スループットも 1 プレート処理量が 4 倍に上昇した。

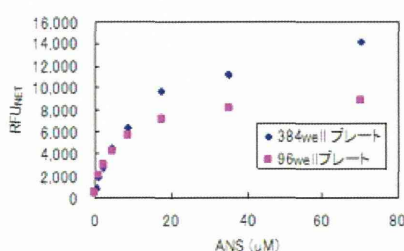


図 15. アッセイプレートの変更による結合飽和曲線への影響。

#### 反応時間の検討

ANS-タンパク質結合が十分に定常状態に移行する反応時間を検討する。384 well プレートに 20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl 緩衝液条件で  $0.5 \mu\text{M}$  L-FABP を添加し、 $70 \mu\text{M}$  ANS を添加して 1 分間プレートシェイカーにて攪拌を行った。本アッセイプレートについて  $E_x=375 \text{ nm}$ ,  $E_m=490 \text{ nm}$  の蛍光を経時的に 5, 15, 30, 45, 60 分間反応後、測定を続けた。図 16 に L-FABP-ANS 結合反応の経時変化を示す。その結果 15 分で蛍光シグナルは最大値を示し、その後徐々に減弱されていく。なお 180 時間経過後も蛍光シグナルは微減弱を続けていた (データ非掲載)。よって、反応時間は 20 分とした。

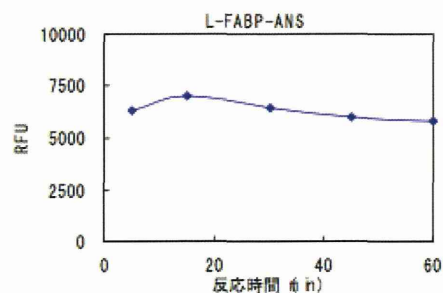


図 16. L-FABP-ANS 結合反応の経時変化。

#### ANS の濃度設定

本脂肪酸親和性解析における ANS 濃度の決定は ANS-タンパク質の結合飽和曲線から  $K_m$  値を概算し、その濃度で各種脂肪酸との親和性解析を行うこととした。

#### L-FABP

384 well プレートに 20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl 緩衝液条件で  $1 \mu\text{M}$  L-FABP を添加し、続いて ANS を  $0 \sim 1000 \mu\text{M}$  まで濃度を変えて添加して 1 分間プレートシェイカーにて攪拌を行った。その後、室温にて 20 分間静置させ、 $E_x=375 \text{ nm}$ ,  $E_m=490 \text{ nm}$  の蛍光を測定した。図 17A に結合飽和曲線と図 17B にそのスキッチャード解析結果を示す。その結果、 $K_m$  値は  $20 \mu\text{M}$  となったことから、L-FABP:  $1.0 \mu\text{M}$ , ANS:  $20 \mu\text{M}$  の条件で脂肪酸親和性の評価をすることとした。

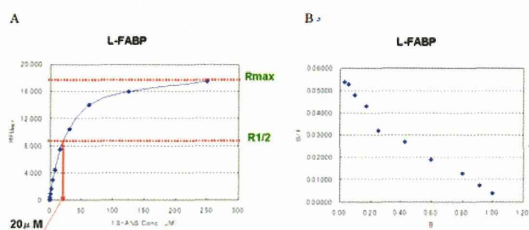


図 17. L-FABP-ANS の結合飽和曲線とそのスキャッチャード解析。

## A-FABP

384 well プレートに 20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl 緩衝液条件で  $3.5 \mu\text{M}$  A-FABP を添加し、続いて ANS を  $0 \sim 1000 \mu\text{M}$  まで濃度を変えて添加して 1 分間プレートシェイカーにて攪拌を行った。その後、室温にて 20 分間静置させ、 $\text{Ex}=375 \text{ nm}$ ,  $\text{Em}=490 \text{ nm}$  の蛍光を測定した。図 18A に結合飽和曲線と図 18B にそのスキャッチャード解析結果を示す。その結果、 $K_m$  値は  $70 \mu\text{M}$  となったことから、A-FABP:  $3.5 \mu\text{M}$ , ANS:  $70 \mu\text{M}$  の条件で脂肪酸親和性の評価をすることとした。

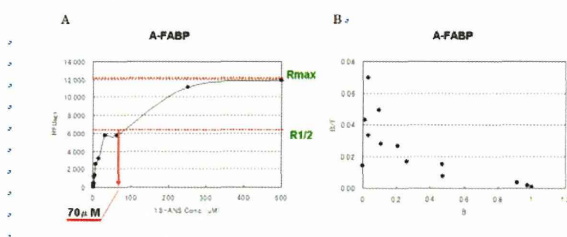


図 18. A-FABP-ANS の結合飽和曲線とそのスキャッチャード解析。

## C-FABP

384 well プレートに 20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl 緩衝液条件で  $2.5 \mu\text{M}$  C-FABP を添加し、続いて ANS を  $0 \sim 1000 \mu\text{M}$  まで濃度を変えて添加して 1 分間プレートシェイカーにて攪拌を行った。その後、室温にて 20 分間静置させ、 $\text{Ex}=375 \text{ nm}$ ,  $\text{Em}=490 \text{ nm}$  の蛍光を測定した。図

19A に結合飽和曲線と図 19B にそのスキャッチャード解析結果を示す。その結果、 $K_m$  値は  $30 \mu\text{M}$  となったことから、C-FABP は  $2.5 \mu\text{M}$ , ANS は  $30 \mu\text{M}$  の条件で脂肪酸親和性の評価をすることとした。

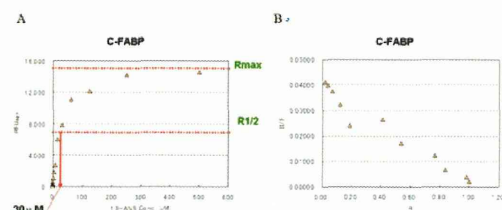


図 19. C-FABP-ANS の結合飽和曲線とそのスキャッチャード解析。

## BSA

384 well プレートに 20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl 緩衝液条件で  $0.25 \mu\text{M}$  BSA を添加し、続いて ANS を  $0 \sim 1000 \mu\text{M}$  まで濃度を変えて添加して 1 分間プレートシェイカーにて攪拌を行った。その後、室温にて 20 分間静置させ、 $\text{Ex}=375 \text{ nm}$ ,  $\text{Em}=490 \text{ nm}$  の蛍光を測定した。図 20A に結合飽和曲線と図 20B にそのスキャッチャード解析結果を示す。その結果、 $K_m$  値は  $2 \mu\text{M}$  となったことから、BSA は  $0.25 \mu\text{M}$ , ANS は  $2 \mu\text{M}$  の条件で脂肪酸親和性の評価をすることとした。

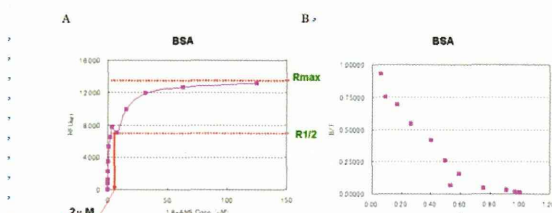


図 20. BSA-ANS の結合飽和曲線とそのスキャッチャード解析。

## 1-4. 脂肪酸親和性解析

上記検討で決定した条件においてステアリン酸 (S4751) を濃度依存的



に添加して親和性を評価した。

384 well プレートに 20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl 緩衝液条件で各種タンパク質を添加し、評価脂肪酸を添加後、プレートシェイカーで 1 分間攪拌させ、室温にて 30 分間静置させた。その後、各種濃度の ANS を添加しプレートシェイカーで 1 分間攪拌させ、室温にて 20 分間静置させた。反応後  $E_x=375$  nm,  $E_m=490$  nm の蛍光を測定した。

得られた蛍光値 R は反応緩衝液に ANS と評価脂肪酸のみを添加したシグナル  $R_0$  を差し引いた値で解析した。

ステアリン酸による阻害曲線をタンパク質ごとに比較したデータを図 21 に示す。

その結果、ステアリン酸は BSA にはほとんど阻害効果を示さないものの、それ以外のタンパク質に対しては一定の阻害効果を示した。

以上の結果から、C-, A-, L-FABP の精製品を取得し、その脂肪酸結合能が確認された。

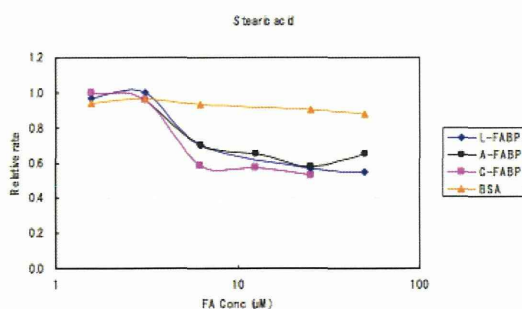


図 21. ステアリン酸による ANS 阻害曲線。

## 2. ヒト脂肪由来幹細胞に関連する脂肪酸結合タンパク (FABP) に対する

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの取得

### 2-1. マウスへの C-FABP 免疫

上記検討 1 で得られた C-FABP を 3 匹の MRL/MpJ マウスに免疫を行った。免疫スケジュールを以下に示す。

図 22 免疫スケジュール。



### 2-2. 抗体価確認

2 回目免疫の 10 日後採取した免疫マウス血清に対して、ELISA アッセイとドットブロット及びウエスタンブロットを用いて、C-FABP に対する抗体価を確認した。

#### a. ELISA アッセイ

タンパク質固相化用プレートに C-FABP 及び L-FABP を固相化したプレートを作製した。一方、得られた 3 匹のマウスからそれぞれ血清を採取し (A, B, C)、3 倍から 100 倍希釈の系列を作製し、本固相化プレートに添加して反応性を確認した。

図 23 に血清の抗体価確認の結果を示す。グラフはマウス A, B, C をそれぞれ青, 緑, 赤のラインで示し、コントロールとして Normal Mouse Serum (NMS) を評価した。

その結果、C-FABP に対しては 3 匹ともほぼ同等の抗体価上昇が確認された。L-FABP に対しては、マウス A のみ抗体価が低く、他の 2 匹は同様の抗体価が確認された。

## b. ドットブロット

精製した C-, L-FABP と市販の I-, H-, B-FABP を親水化した PVDF 膜上に任意の濃度で液滴を作る (メンブレン上の FABP 配置図は図 24 の上に示す)。膜上の液滴が乾燥したことを確認した後、5% スキムミルクを含んだ TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20) で 30 分間ブロッキングを行った。ブロッキング後メンブレンを TBS-T で 3 回洗浄し、Can Get Signal (Wako) Solution 1 で 1000 倍に希釈したマウス抗血清 A, B, C をそれぞれ反応させ、室温で 1 時間静置した。反応後、メンブレンを TBS-T で 3 回洗浄を行い、Can Get Signal Solution 2 で 2000 倍に希釈した Anti mouse IgG, HRP linked Antibody を反応させ、室温で 1 時間静置した。反応後、メンブレンを TBS-T で 3 回洗浄を行い、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents を用いて発光させバンドを検出した (図 24 の最下段)。なお、メンブレンへの FABP の固定の確認のため弊社保持の C-FABP pAb を用いて検出を行った (図 24 の中段)。その結果、マウス A, B, C どの抗血清においても C-FABP に対するドットが確認された。一方 L-FABP に対してはどの血清も反応性を示していたが、強度としてはマウス B, C > A となっており、これは ELISA の結果と一致した傾向となった。また、I-, H-, B- に対しても共通して反応性が確認さ

れており強度としては B>C>A であった。

図 23. マウス抗血清の ELISA 検定

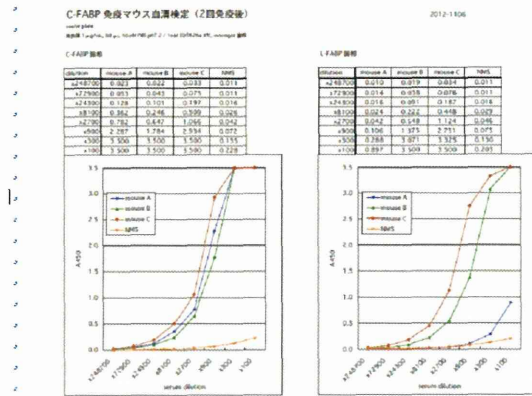


図 24. マウス抗血清のドットブロット検定 (続き)

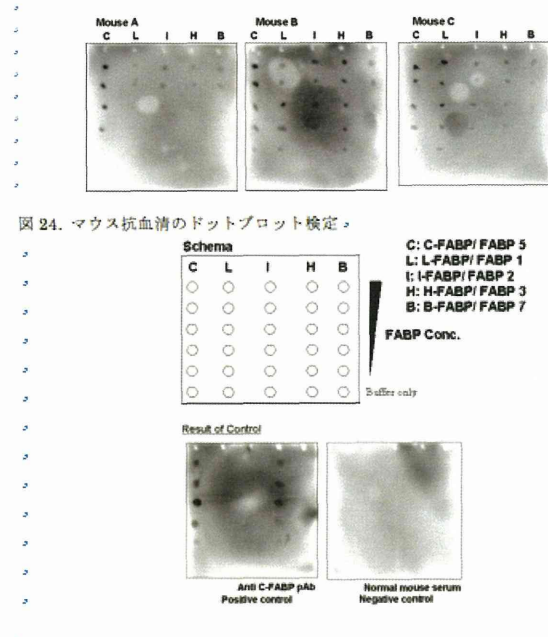
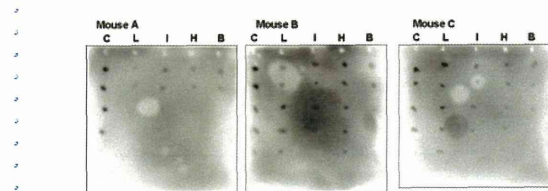


図 24. マウス抗血清のドットブロット検定 (続き)



## c. ウェスタンブロット

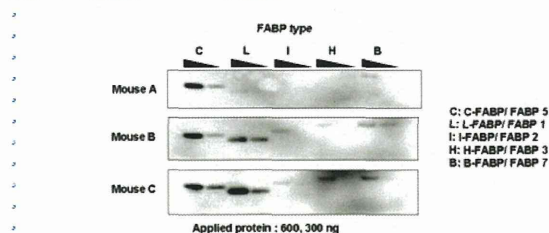
上記ドットブロットと同様に各種 FABP を任意の濃度で NuPAGE 4-12%ビス-トリスゲルにアプライし、NuPAGE MES SDS ランニングバッ

ファーにて 200 V, 35 分間電気泳動を行った。泳動後、ゲルを PVDF 膜に転写した。以下の作業は上記ドットブロットと同様のプロトコルにて検出を行った (図 25)。

結果、どのマウス抗血清においても C-FABP に対する反応性が確認された。一方 L-FABP に対してはどの血清も反応性を示していたが、強度としてはマウス B, C > A となっており、これは ELISA, ドットブロットの結果と一致した傾向となった。また、マウス B, C においては I-, H-, B- に対しても共通して反応性が確認されており、マウス A は僅かに B-FABP への反応性が確認された。

以上より C-FABP に比較的強く反応するマウス A と、他の FABP タイプにも広く反応するマウス B を次の工程に進めることとした。

図 25. マウス抗血清のウエスタンブロット検定



### 2-3. 細胞融合

マウス A, B から脾臓を採材し、B 細胞を取得した。本細胞を標準的な PEG 法を用いてミエローマ細胞と細胞融合させ、抗体産生細胞を作製した。得られた細胞について ELISA 及び、ドットブロットを用いて抗体のスクリーニングを行った。

上記と同様の方法で ELISA, ドット

ブロットを実施したまとめを図 26 に示す。

その結果 C-FABP に特異的に反応する抗体産生細胞を 9 クローン、様々な FABP タイプに広く反応する抗体産生細胞を 10 クローン取得した。

以下の工程はこの中からいくつかピックアップして進めることとした。本書における C-FABP モノクローナル抗体作製はここまでの内容を報告し、以下の工程についても追って検討を行うこととした。

以下、取得した抗体の一部についてウエスタンブロットと免疫染色に使用した例を示す。

図 26. C-FABP 抗体産生融合細胞スクリーニングまとめ

Clone No.	ELISA screening (OD value)			Dot Blot							
	C-FABP	L-FABP	Empty	L-	A-	C-	I-	H-	B-		
TA-A	3.500	0.018	0.014	-	-	+	-	-	-		
TA-B	0.204	1.627	0.014	++	-	++	++	-	-		
TA-C	0.303	3.114	0.012	++	++	++	-	-	-		
TA-D	0.023	2.696	0.014	+++	++	++	-	-	-		
TA-E	0.090	2.696	0.013	++	++	-	-	-	-		
TA-F	0.187	3.114	0.014	++	++	++	-	-	-		
TA-G	0.016	0.026	0.015	-	-	-	-	-	-		
TA-H	3.072	0.018	0.013	-	++	+++	-	++	-		
TA-I	0.018	2.578	0.014	++	-	-	-	-	-		
TA-J	0.064	3.309	0.015	++	+++	++	-	-	-		
TA-K	3.500	0.035	0.015	-	-	+++	-	-	-		
TA-L	0.040	0.027	0.013	-	-	-	-	-	-		
TA-M	0.039	0.021	0.013	-	-	++	-	-	++		
TA-O	0.253	3.446	0.013	++	++	++	++	-	-		
TA-P	3.370	0.039	0.013	-	-	+++	-	-	-		
TA-Q	0.034	0.039	0.012	-	-	-	-	-	-		
TA-R	3.500	0.026	0.013	-	-	+++	-	++	++		
TA-S	2.739	0.025	0.013	-	-	++	-	-	-		
TA-T	3.15	0.028	0.012	-	-	+++	-	-	-		
TA-U	0.052	0.307	0.013	-	-	-	-	-	-		
TA-V	3.444	0.026	0.017	-	-	+++	-	-	-		
TA-W	3.500	0.023	0.014	-	-	+++	-	-	-		
TA-X	3.110	0.028	0.013	-	-	++	-	-	-		
TA-Y	0.466	0.026	0.014	-	-	-	-	-	-		
TA-Z	0.036	0.025	0.014	-	-	-	-	-	-		
TA-AA	3.500	0.026	0.013	-	-	+++	-	-	-		
TA-AB	0.032	0.018	0.013	-	-	-	-	-	-		

### 2-4. 作製抗体の評価

#### a. ウエスタンブロット

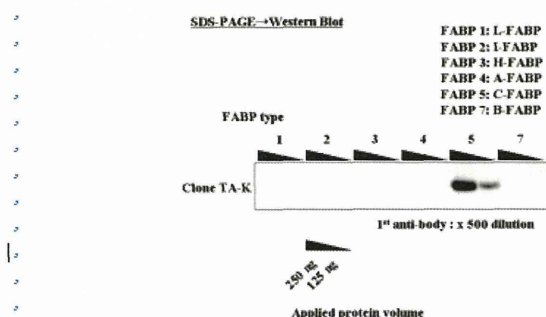
上記と同様の方法によって L-, I-, H-, A-, C-, B-FABP に対する反応性を検討した (図 27)。

その結果、本抗体は C-FABP に特異的にバンドが検出されたことから、



C-FABP 特異的な抗体であると考えられる。

図 27. ウエスタンブロット評価



### b. 組織染色

ホルマリン固定されたヒトの腎臓について標準的な方法に従いパラフィン包埋を行い、約  $3\mu\text{m}$  の厚さに 10 枚薄切りした後 HE 染色、Anti L-FABP Ab clone1、Anti L-FABP Ab clone2 及び Anti C-FABP の免疫染色を実施した (図 28)。

結果、本症例においては近位尿細管に L-FABP (Clone1 及び Clone2) は高度に染色され、特徴的には核が強陽性となった。また、C-FABP は尿細管には陰性であった。強拡大すると、C-FABP は間質領域に浸潤するマクロファージに強陽性であった。

部分切除虚血時腎生検標本において近位尿細管細胞が L-FABP により強く染色されることは、生体腎移植標本における結果 (T. Yamamoto, JASN, 2007) と良好な一致を示した。一方 C-FABP に関しては、糖尿病性腎症を併発していた本症例において、顕著な間質浸潤マクロファージ陽性像が得られた。今回取得した C-FABP 特異的モノクローナル抗体が、全ての単球・マクロファージを認識するのか、虚血

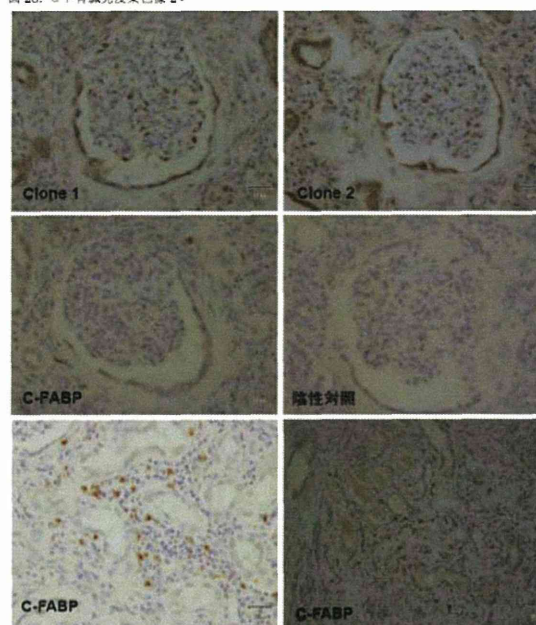
ストレスと関連する浸潤マクロファージのみを認識するのかは、さらなる検討が必要であると考えた。

以上の結果より、今回取得した C-FABP モノクローナル抗体は FABP ファミリーに対して C-FABP 特異的に反応し、免疫染色にも耐えうる性能であり、今後サンドイッチ ELISA 等への活用が期待される。

図 28. ヒト腎臓免疫染色像 1



図 28. ヒト腎臓免疫染色像 2



### 3. ヒト脂肪由来幹細胞に関連するヒト完全長脂肪酸結合タンパク (FABP)

を用いた発現解析

### 3-1. 細胞培養

#### Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs)

ADSCs (T25 フラスコ) の上清培地を除去し、HUNK' S BALANCED SALT SOLUTION (SIGMA) で一度洗浄した。その後トリプシン-EDTA (invitrogen) を添加して、37°Cのインキュベータで3分ほど静置し、細胞を剥がした。剥がれた細胞は培地で十分に懸濁し、細胞数をカウントした。細胞懸濁液は1200 rpm, 5分間遠心分離を行い、上清を除去した後 MESEN PRO (invitrogen) によって再度懸濁し任意の濃度でセラチンコート 10cm<sup>2</sup> ディッシュに撒き、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件で培養を行った。

#### Renal epithelial cell line (233A cells)

233A 細胞の-80°Cストック品に K-1 培地 (DMEM/Ham' s F-12, ITS mix, ニコチンアミド) を添加し十分に懸濁した後、細胞数をカウントした。細胞懸濁液は1200 rpm, 5分間遠心分離を行い、上清を除去した後 K-1 培地によって再度懸濁し任意の濃度でセラチンコート 10cm<sup>2</sup> ディッシュに撒き、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件で培養を行った。

### 3-2. 各種 FABP の添加実験

各種細胞株を 5 x 10<sup>5</sup> cells/dish でセラチンコート 10cm<sup>2</sup> dish に撒き3日間培養を行った。培養後、各種 FABP (L, A, C 型) をそれぞれ 1 uM となるように添加して1日培養を行った。な

お FABP の溶媒である生理食塩水のみを添加したものをコントロールとした。培養後、細胞をセルスクレーパーで回収し1200 rpm, 3分間遠心分離し、培養上清を除去後 HUNK' S BALANCED SALT SOLUTION で1回洗浄を行い得られた細胞ペレットを-80°Cにて凍結保存した。

### 3-3. RNA 抽出と RNA 確認

#### 濃度測定

測定機器: Nanodrop ND1000 version 3.5.2 (Thermo Fisher Scientific)

#### 状態測定

測定機器: Agilent 2100 Bioanalyzer G2939A (Agilent Technologies)

試薬 Kit: Agilent RNA6000 Nano kit 5067-1511 (Agilent Technologies)

解析ソフト: 2100 expert software version B.02.07 (Agilent Technologies)

サンプルの濃度及び状態測定方法 (概略)

濃度測定機器にて濃度を測定する。判定基準→13.5ng/ul 以上 (100bg 以上)

状態測定機器にて波形を確認する。判定基準→RIN7 以上

RIN = RNA integrity number の略。Agilent Technologies が推奨する RNA の Quality check 数値である。10.0 を満点とし、0 に近いほど RNA の分解を受けているものと判断する。

ヒト由来 RNA 8 サンプルの濃度と状



態を測定した。測定の結果、すべての RNA サンプルは量及び状態に問題は見られなかったので以降の作業を行った。

### 3-4. Probe 作製と確認

Probe 作製試薬

試薬 Kit : Low Input Quick Amp labeling kit, one-color 5190-2305 (Agilent Technologies)

Agilent RNA Spike-In kit 5188-5282 (Agilent Technologies)

精製 kit : RNeasy mini kit 74106 (Qiagen)

Probe 作製概要

推奨プロトコルに従う。

a. RNA100ng に T7 promoter が付いた poly dT primer と逆転写酵素を用いて cDNA を作製した (37°C, 2 時間)。

b. 作製した cDNA と T7 RNA polymerase から RNA を合成した。この時 Cy dye (Cy3) を添加することで Cy dye で標識された RNA が合成された (37°C, 2 時間)。

c. RNeasy mini kit で標識されなかった Cy dye を取り除き probe として精製した。

Probe 確認使用試薬・機器

濃度測定

測定機器 Nanodrop ND1000 version 3.5.2 (Thermo Fisher Scientific)

状態測定

測定機器 : Agilent t2100 Bioanalyzer G2939A (Agilent Technologies)

試薬 kit : Agilent RNA6000 Nano kit 5067-1511 (Agilent Technologies)

解析ソフト : 2100 expert software version B.02.07 (Agilent Technologies)

作製 probe の濃度及び状態測定概略推奨プロトコルに従う。

a. 濃度測定機器にて濃度を測定した。判定基準→825ng 以上、Cy dye 取込効率 6 以上

b. 状態測定機器にて波形を確認した。判定基準→200-2000nt における特有のピークの存在

作製した 8 サンプルに対して Cy3 ラベリングを行い、probe を作製した。本 probe について濃度と状態を測定した。作製した probe すべてにおいて、作製量、Cy dye 取込効率、波形など問題が見られなかったことから、本 probe を用いてアレイ解析を行った。

### 3-5. Hybridization と Wash

Hybridization 使用試薬・機器

解析チップ : SurePrint G3 Human GE Microarray 8x60K Ver2.0 G4851B (Agilent Technologies)

データベースは「hg19:GRCh37 (Feb2009)」を使用した。

8x15K, 8x60K アレイフォーマット用消耗品 (ガスケットスライド) G2534-60014 (Agilent Technologies)

試薬 kit : Gene Expression Hybridization kit 5188-5242 (Agilent Technologies)

使用機器 : ハイブリゼーションオープン一式 G2545A, G2530-60029 (Agilent Technologies)

## Wash 使用試薬・機器

試薬 kit : Gene Expression Wash Pack 5188-5242 (Agilent Technologies)

## Hybridization 方法概略

推奨プロトコルに従う。

- 精製した probe 600ng 分をフラグメンテーション反応した (60°C, 30 分)。
- ハイブリダイゼーション試薬を混ぜ、probe 480ng 分を解析チップとハイブリダイズを行った (65°C, 17 時間, 10rpm)。

## Wash 方法概略

推奨プロトコルに従う。

- Wash から Scanning 終了までオゾンブース内で作業と行った。

Wash Buffer1=RT, 1min, Wash Buffer2=37°C, 1min

- Wash 後、チップを乾燥させた (残った水滴などは窒素ガスで排除)。

## 3-6. Scanning と数値化

### Scanning 使用機器

使用機器 : Scanner G2539A (Agilent Technologies)

解析ソフト : Scan Control version A.8.5.1 (Agilent Technologies)

### 数値化使用ソフト

数値化ソフト : Feature Extraction version 10.10.1.1 (Agilent Technologies)

### Scanning 方法概略

推奨プロトコルに従う。

下記に示す条件を設定して Scanning を行った (AgilentG3\_GX\_color)。

項目	Dye channel	Scan region	TIFF file dynamic range
設定条件	Green	AgilentHD (61x21.6mm)	20bit
項目	R/G PMT gain	Scan Resolution	XDR ratio
設定条件	100%	3 um	No XDR

### 数値化方法概略

推奨プロトコルに従う。

下記に示す条件を設定して数値化を行った。

項目	Grid template	FE protocol	QC Metric
設定条件	03B394_D_F_20120411	GE1_1010_Sep10	GE1_QCMT_Sep10

精製した probe について、1probe 当たり 480ng 相当を Agilent Technologies の DNA マイクロアレイチップにハイブリダイズを行った (65°C, 17 時間)。ハイブリダイズ後チップを wash 及び乾燥させ Scanning により画像データを読み取った。その結果から専用の数値化ソフト「Future Extraction」によりデータを数値化した。

作製した probe について、1probe 当たり 480ng 相当を Agilent Technologies の DNA マイクロアレイチップにハイブリダイズを行った (65°C, 17 時間)。ハイブリダイズ後チップを wash 及び乾燥させ Scanning により画像データを読み取った。その結果から専用の数値化ソフト「Future Extraction」によりデータを数値化した。

## 3-7. データ解析

解析ソフト : GeneSpring GX version 12.5.0 (Agilent Technologies)

### データ解析方法

設定条件は以降の「データ解析条件設定」を参照。

データ解析条件設定

GeneSpring GX を使用して以下のような条件設定で解析を行った。

1: Data import	解析に使用するデータを import
2: Flag import	検出条件に「Detected, Compromised, Not Detected」を設定
3: Normalization	percentile Shift=75
4: Baseline options	Do not perform baseline transformation
5: Grouping & interpretation	「Grouping」=各 import データに対して「群名」を設定、「Interpretation」=比較する組み合わせ… <ADSC-LF>vs<ADSC-CNT>、 <ADSC-CF>vs<ADSC-CNT>、 <ADSC-AF>vs<ADSC-CNT>、 <233A-LF>vs<233A-CNT>、 <233A-CF>vs<233A-CNT>、 <233A-AF>vs<233A-CNT>を設定
6: Data Filtering-1 (Control spot) & Fold Change	Data Filtering-1 = 「controlSpot」=「0」 8 サンプル中 8 サンプル、「Fold Change」=各比較で ADSC-CNT, or 233A-CNT, を基準に「カットオフ値 1.0」設定
7: Expression Filtering	Expression Filtering = 「Upper cutoff:100, Lower cutoff:20」 選択、2 サンプル中少なくとも 1 サンプル設定
8: Flag Filtering & Fold Change	Flag Filtering = 「Detected, Not Detected」 選択、2 サンプル中少なくとも 1 サンプル設定 Fold Change = 各比較で ADSC-CNT, or 233A-CNT, を基準に「カットオフ値 1.0」設定
9: Data Filtering-2 (WellaboveBG) & Fold Change	Data Filtering-2 = 「glsWellAboveBG」=「1」 2 サンプル中少なくとも 1 サンプル設定 Fold Change = 各比較で ADSC-CNT, or 233A-CNT, を基準に「カットオフ値 1.0 or 2.0」

上記設定条件は以下の条件にあてはまる遺伝子を削除する条件。

- ・解析に使用しない spot…「6: Data Filtering-1(Control spot)」
- ・比較する 2 サンプルとも再現性が低いとされる遺伝子発現量が下位 20% に含まれる遺伝子…「7: Expression Filtering」
- ・比較する 2 サンプルとも Flag が「Compromised」であった遺伝子…「8: Flag Filtering」
- ・比較する 2 サンプルともバックグラウンドと差がないことを示す「glsWellAboveBG=0」であった遺伝子…「9: Data Filtering-2 (WellaboveBG)」

上記設定条件の「7: Expression Filtering」後に「Fold Change」を行っていないのは、今回の解析では「7: Expression Filtering」処理した後、「8: Flag Filtering」をおこなった結果、「7: Expression Filtering」処理後の結果と「8: Flag Filtering」処理後の結果

において同じ結果（変化しなかった）だったので、「7: Expression Filtering」で「Fold Change」を行っていない。

### a. 変動遺伝子抽出 <ADSC-LF>vs<ADSC-CNT>

得られた数値化データ (raw data) を用いて、  
<ADSC-LF>vs<ADSC-CNT> …  
「ADSC-CNT」を基準にして  
「ADSC-LF」で変動している遺伝子抽出を行った。全部で 5 つの遺伝子リストを作成した。

- ・「1\_<ADSC-LF>vs<ADSC-CNT>=「6: Data Filtering-1 (Control spot)」まで行った遺伝子リスト
- ・「2\_<ADSC-LF>vs<ADSC-CNT>=「7: Expression Filtering」「8: Flag filtering」まで行った遺伝子リスト
- ・「3\_<ADSC-LF>vs<ADSC-CNT>=「9: Data Filtering-2 (WellaboveBG)」まで行った遺伝子リスト
- ・「4-1\_<ADSC-LF>vs<ADSC-CNT>2UP」=「9: Data Filtering-2 (WellaboveBG)」まで行った遺伝子リストのうち「ADSC-CNT」を基準にして「ADSC-LF」で 2 倍以上発現が上昇していたリスト
- ・「4-1\_<ADSC-LF>vs<ADSC-CNT>2DN」=「9: Data Filtering-2 (WellaboveBG)」まで行った遺伝子リストのうち「ADSC-CNT」を基準にして「ADSC-LF」で 2 倍以上発現が減少していたリスト



各比較での遺伝子数は以下の通りであった。

シート名	遺伝子数
1_<ADSC-LF>vs<ADSC-CNT>	50683
2_<ADSC-LF>vs<ADSC-CNT>	42809
3_<ADSC-LF>vs<ADSC-CNT>	24247
4-1_<ADSC-LF>vs<ADSC-CNT>2UP	714
4-1_<ADSC-LF>vs<ADSC-CNT>2DN	486

#### b. 変動遺伝子抽出 <ADSC-CF>vs<ADSC-CNT>

得られた数値化データ (raw data) を用いて、  
<ADSC-CF>vs<ADSC-CNT> ...

「ADSC-CNT」を基準にして「ADSC-CF」で変動している遺伝子抽出を行った。全部で5つの遺伝子リストを作成した。

- ・「1\_<ADSC-CF>vs<ADSC-CNT>=「6: Data Filtering-1 (Control spot)」まで行った遺伝子リスト
- ・「2\_<ADSC-CF>vs<ADSC-CNT>=「7: Expression Filtering」「8: Flag filtering」まで行った遺伝子リスト
- ・「3\_<ADSC-CF>vs<ADSC-CNT>=「9: Data Filtering-2 (WellaboveBG)」まで行った遺伝子リスト
- ・「4-1\_<ADSC-CF>vs<ADSC-CNT>2UP」=「9: Data Filtering-2 (WellaboveBG)」まで行った遺伝子リストのうち「ADSC-CNT」を基準にして「ADSC-CF」で2倍以上発現が上昇していたリスト
- ・「4-1\_<ADSC-CF>vs<ADSC-CNT>2DN」=「9: Data Filtering-2 (WellaboveBG)」まで行った遺伝子リ

ストのうち「ADSC-CNT」を基準にして「ADSC-CF」で2倍以上発現が減少していたリスト

各比較での遺伝子数は以下の通りであった。

シート名	遺伝子数
1_<ADSC-CF>vs<ADSC-CNT>	50683
2_<ADSC-CF>vs<ADSC-CNT>	42356
3_<ADSC-CF>vs<ADSC-CNT>	23726
4-1_<ADSC-CF>vs<ADSC-CNT>2UP	584
4-1_<ADSC-CF>vs<ADSC-CNT>2DN	513

「ADSC-CNT」を基準にして「ADSC-CF」で2倍以上減少している遺伝子の1位は、どちらかのサンプルでFlagが「Compromised」であり、かなり発現量が高く検出されたものだった。

#### c. 変動遺伝子抽出 <ADSC-AF>vs<ADSC-CNT>

得られた数値化データ (raw data) を用いて、  
<ADSC-AF>vs<ADSC-CNT> ...

「ADSC-CNT」を基準にして「ADSC-AF」で変動している遺伝子抽出を行った。全部で5つの遺伝子リストを作成した。

- ・「1\_<ADSC-AF>vs<ADSC-CNT>=「6: Data Filtering-1 (Control spot)」まで行った遺伝子リスト
- ・「2\_<ADSC-AF>vs<ADSC-CNT>=「7: Expression Filtering」「8: Flag filtering」まで行った遺伝子リスト
- ・「3\_<ADSC-AF>vs<ADSC-CNT>=「9: Data Filtering-2 (WellaboveBG)」まで行った遺伝子リスト
- ・

「4-1\_<ADSC-AF>vs<ADSC-CNT>2UP」 = 「9: Data Filtering-2 (WellaboveBG)」まで行った遺伝子リストのうち「ADSC-CNT」を基準にして「ADSC-AF」で2倍以上発現が上昇していたリスト

「4-1\_<ADSC-AF>vs<ADSC-CNT>2DN」 = 「9: Data Filtering-2 (WellaboveBG)」まで行った遺伝子リストのうち「ADSC-CNT」を基準にして「ADSC-AF」で2倍以上発現が減少していたリスト

各比較での遺伝子数は以下の通りであった。

シート名	遺伝子数
1_<ADSC-AF>vs<ADSC-CNT>	50683
2_<ADSC-AF>vs<ADSC-CNT>	43960
3_<ADSC-AF>vs<ADSC-CNT>	26382
4-1_<ADSC-AF>vs<ADSC-CNT>2UP	1735
4-1_<ADSC-AF>vs<ADSC-CNT>2DN	791

「ADSC-CNT」を基準にして「ADSC-AF」で2倍以上減少している遺伝子の1位は、どちらかのサンプルでFlagが「Compromised」であり、かなり発現量が高く検出されたものだった。

#### d. 変動遺伝子抽出<233A-LF>vs<233A-CNT>

得られた数値化データ (raw data) を用いて、<233A-LF>vs<233A-CNT>…「233A-CNT」を基準にして「233A-LF」で変動している遺伝子抽出を行った。全部で5つの遺伝子リストを作成した。

・「1\_<233A-LF>vs<233A-CNT>=「6: Data Filtering-1 (Control spot)」まで

行った遺伝子リスト

・「2\_<233A-LF>vs<233A-CNT>=「7: Expression Filtering」「8: Flag filtering」まで行った遺伝子リスト

・「3\_<233A-LF>vs<233A-CNT>=「9: Data Filtering-2 (WellaboveBG)」まで行った遺伝子リスト

「4-1\_<233A-LF>vs<233A-CNT>2UP」 = 「9: Data Filtering-2 (WellaboveBG)」まで行った遺伝子リストのうち「233A-CNT」を基準にして「233A-LF」で2倍以上発現が上昇していたリスト

「4-1\_<233A-LF>vs<233A-CNT>2DN」 = 「9: Data Filtering-2 (WellaboveBG)」まで行った遺伝子リストのうち「233A-CNT」を基準にして「233A-LF」で2倍以上発現が減少していたリスト

各比較での遺伝子数は以下の通りであった。

シート名	遺伝子数
1_<233A-LF>vs<233A-CNT>	50683
2_<233A-LF>vs<233A-CNT>	42774
3_<233A-LF>vs<233A-CNT>	27048
4-1_<233A-LF>vs<233A-CNT>2UP	890
4-1_<233A-LF>vs<233A-CNT>2DN	970

「233A-CNT」を基準にして「233A-CF」で2倍以上上昇している遺伝子の1、2位は、どちらかのサンプルでFlagが「Compromised」であり、かなり発現量が高く検出されたものだった。

#### f. 変動遺伝子抽出<233A-AF>vs<233A-CNT>

得られた数値化データ (raw data) を用いて、<233A-AF>vs<233A-CNT> … 「233A-CNT」を基準にして「233A-AF」で変動している遺伝子抽出を行った。全部で5つの遺伝子リストを作成した。

- ・「1\_<233A-AF>vs<233A-CNT>=「6: DatAFiltering-1 (Control spot)」まで行った遺伝子リスト

- ・「2\_<233A-AF>vs<233A-CNT>=「7: Expression Filtering」「8: Flag filtering」まで行った遺伝子リスト

- ・「3\_<233A-AF>vs<233A-CNT>=「9: DatAFiltering-2 (WellaboveBG)」まで行った遺伝子リスト

- ・「4-1\_<233A-AF>vs<233A-CNT>2UP」=「9: DatAFiltering-2 (WellaboveBG)」まで行った遺伝子リストのうち「233A-CNT」を基準にして「233A-AF」で2倍以上発現が上昇していたリスト

- ・「4-1\_<233A-AF>vs<233A-CNT>2DN」=「9: DatAFiltering-2 (WellaboveBG)」まで行った遺伝子リストのうち「233A-CNT」を基準にして「233A-AF」で2倍以上発現が減少していたリスト

各比較での遺伝子数は以下の通りであった。

シート名	遺伝子数
1_<233A-AF>vs<233A-CNT>	50683
2_<233A-AF>vs<233A-CNT>	43123
3_<233A-AF>vs<233A-CNT>	26444
4-1_<233A-AF>vs<233A-CNT>2UP	825
4-1_<233A-AF>vs<233A-CNT>2DN	1037

#### 4. ヒト脂肪由来幹細胞の分化誘導と

#### 特異性解析

##### 4-1. 転写因子結合サイト探索解析

本解析の目的は発現変化のあった遺伝子群の転写開始点上流に有意に多く存在する転写因子結合サイトをTRANSFAC Database を用いて探索することである。

探索解析の入力データは複数条件でマイクロアレイ解析を行ったデータを Fold change などで比較して、Yes-set として変化のあった遺伝子群、No-set として変化がない遺伝子群を抽出した。なおこの時 No-set の遺伝子数は Yes-set の遺伝子数より十分に多くなければならない (5~10 倍)。

Yes-set に含まれる転写因子結合サイトと、No-set に含まれる転写因子結合サイトを比較し、大きく存在頻度が異なる結合サイトを探索した。

なお、各種探索条件は以下に示す。

<ADSC-AF>vs<ADSC-CNT>

F-Match; Profile vertebrate\_h0.01 /

Use high-specific matrices with cut-offs: from

minFN/ Promoter window: from

-1000 to 100 / If gene has multiple promoters use

All promoters / Optimize cut-off: ON,

Optimize window position OFF with

p-value

threshold 0.01

<ADSC-CF>vs<ADSC-CNT>

F-Match; Profile vertebrates / Use

high-specific matrices with cut-offs:

from



minSUM/ Promoter window: from  
-1000 to 100 / If gene has multiple  
promoters  
use All promoters / Optimize cut-off:  
ON, Optimize window position OFF  
with pvalue  
threshold 0.01

<ADSC-LF> vs <ADSC-CNT>  
F-Match; Profile vertebrates / Use  
high-specific matrices with cut-offs:  
from  
minSUM/ Promoter window: from  
-1000 to 100 / If gene has multiple  
promoters  
use All promoters / Optimize cut-off:  
ON, Optimize window position OFF  
with pvalue  
threshold 0.01

<233A-AF> vs <233A-CNT>  
F-Match; Profile vertebrates / Use  
high-specific matrices with cut-offs:  
from  
minSUM/ Promoter window: from  
-1000 to 100 / If gene has multiple  
promoters  
use All promoters / Optimize cut-off:  
ON, Optimize window position OFF  
with pvalue  
threshold 0.01

<233A-CF> vs <233A-CNT>  
F-Match; Profile vertebrates / Use  
high-specific matrices with cut-offs:  
from

minSUM/ Promoter window: from  
-1000 to 100 / If gene has multiple  
promoters  
use All promoters / Optimize cut-off:  
ON, Optimize window position OFF  
with pvalue  
threshold 0.01

<233A-LF> vs <233A-CNT>  
F-Match; Profile vertebrate\_h0.01 /  
Use high-specific matrices with  
cut-offs: from  
minSUM/ Promoter window: from  
-1000 to 100 / If gene has multiple  
promoters  
use All promoters / Optimize cut-off:  
ON, Optimize window position OFF  
with pvalue  
threshold 0.01

FABP 無処理細胞 <ADSC,  
233A-CNT>に比して FABP 処理細胞  
<ADSC, 233A-A, C, LF>で発現に変  
動が確認された mRNA の上流転写因  
子結合サイトと、それに結合する因子  
を解析した。なおそれぞれの探索解析  
において使用した入力データ (Yes-set,  
No-set) の数を以下に示す。

Yes-set

No-set

< ADSC-AF > vs < ADSC-CNT >  
128 (FC 絶対値 > 15)  
683 (FC 絶対値 < 1.02)  
< ADSC-CF > vs < ADSC-CNT >  
124 (FC 絶対値 > 10)

662 (FC 絶対値<1.007)	Yes / Follow curated
< ADSC-LF > vs < ADSC-CNT >	chains: Yes
123 (FC 絶対値>11)	
709 (FC 絶対値<1.007)	<ADSC-LF>vs<ADSC-CNT>
< 233A-AF > vs < 233A-CNT >	Direction Upstream / Max radius: 6 /
132 (FC 絶対値>19)	Compute FDR: Yes and apply
656 (FC 絶対値<1.009)	threshold
< 233A-CF > vs < 233A-CNT >	0.05 / Including
131 (FC 絶対値>18)	expression/transregulation reaction:
731 (FC 絶対値<1.009)	Yes / Follow curated
<233A-LF>vs<233A-CNT>	chains: Yes
140 (FC 絶対値>19)	
743 (FC 絶対値<1.009)	<233A-AF>vs<233A-CNT>
	Direction Upstream / Max radius: 6 /
	Compute FDR: Yes and apply
	threshold
	0.05 / Including
	expression/transregulation reaction:
	Yes / Follow curated
	chains: Yes
	<233A-CF>vs<233A-CNT>
	Direction Upstream / Max radius: 6 /
	Compute FDR: Yes and apply
	threshold
	0.05 / Including
	expression/transregulation reaction:
	Yes / Follow curated
	chains: Yes
	<233A-LF>vs<233A-CNT>
	Direction Upstream / Max radius: 6 /
	Compute FDR: Yes and apply
	threshold
	0.05 / Including
	expression/transregulation reaction:

#### 4-2. キーノード解析

本解析は転写因子結合サイト解析で判明した転写因子から、上流側に探索を行い、キーノードタンパク質（遺伝子発現変化の原因と思われるタンパク質）を推測した。

なお、各種解析条件は以下に示す。

<ADSC-AF>vs<ADSC-CNT>  
 Direction Upstream / Max radius: 6 /  
 Compute FDR: Yes and apply  
 threshold  
 0.05 / Including  
 expression/transregulation reaction:  
 Yes / Follow curated  
 chains: Yes

<ADSC-CF>vs<ADSC-CNT>  
 Direction Upstream / Max radius: 6 /  
 Compute FDR: Yes and apply  
 threshold  
 0.05 / Including  
 expression/transregulation reaction:

Yes / Follow curated  
 chains: Yes  
 <ADSC-LF>vs<ADSC-CNT>  
 Direction Upstream / Max radius: 6 /  
 Compute FDR: Yes and apply  
 threshold  
 0.05 / Including  
 expression/transregulation reaction:  
 Yes / Follow curated  
 chains: Yes  
 <233A-AF>vs<233A-CNT>  
 Direction Upstream / Max radius: 6 /  
 Compute FDR: Yes and apply  
 threshold  
 0.05 / Including  
 expression/transregulation reaction:  
 Yes / Follow curated  
 chains: Yes  
 <233A-CF>vs<233A-CNT>  
 Direction Upstream / Max radius: 6 /  
 Compute FDR: Yes and apply  
 threshold  
 0.05 / Including  
 expression/transregulation reaction:  
 Yes / Follow curated  
 chains: Yes  
 <233A-LF>vs<233A-CNT>  
 Direction Upstream / Max radius: 6 /  
 Compute FDR: Yes and apply  
 threshold  
 0.05 / Including  
 expression/transregulation reaction:

Yes / Follow curated chains: Yes

上記 4-1.により判明した転写因子から上流側に探索を行い、キーノードタンパク質を推測した。その結果、各解析から判明したキーノードタンパク質の数を以下に示す。

解析タイトル	キーノードタンパク質の数
<ADSC-AF> vs <ADSC-CNT>	64
<ADSC-CF> vs <ADSC-CNT>	72
<ADSC-LF> vs <ADSC-CNT>	40
<233A-AF> vs <233A-CNT>	33
<233A-CF> vs <233A-CNT>	45
<233A-LF> vs <233A-CNT>	68

#### 4-3. カスケード解析

上記解析で得られたキーノードリストからカスケード図を作成した。

カスケードネットワークよりキーと中間層タンパク質のみを抽出しリスト化し、全カスケードネットワークに出現する回数をカウント数として集計したものを「別表：本現象に関係すると思われる因子のリスト」として示す。なお本解析は遺伝子発現変動の絶対値をデータとして使用しているため、見出されたカスケードが活性化されているのか不活性化されているのかは不明であるところに注意が必要である。

「別表：本現象に関係すると思われる因子のリスト」の結果から、ADSC 細胞の A-FABP 刺激時に筋芽細胞の分化マーカーである MYOD1, MYOG のカウント数がそれぞれ 25, 19 と複数の経路から見出され、発現解析の結果を見ると、MYOD1 mRNA が約 3 倍

程度増加増幅されており、転写因子結合サイト解析においても発現変動遺伝子の上流に myogenin, MyoD の結合サイトが存在していた。なお、MyoD1 の関係するカスケードネットワーク図を「別表：カスケード図」に示す。一方、ADSC に L-FABP 及び C-FABP 刺激を行っても、MYOD1 mRNA の上昇は認められず、各種カスケード解析においても上記のような筋原生の遺伝子ファミリーは確認されず、233A 細胞に対してはどの刺激においても上記遺伝子ファミリーは確認されなかった。よって A-FABP は ADSC 特異的に作用し、筋細胞の分化のシグナルに何らかの作用を及ぼしていることが示唆された。これは自己皮下脂肪組織由来幹細胞 (ADSCs) の経尿道的内視鏡下傍尿道注入・移植における尿道括約筋再生において、より効率的な筋細胞分化に A-FABP が利用できるのではないかと考えられる。この作用は A-FABP が、幹細胞にパラクラインに働いていることが考えられるが、それが A-FABP 自身による作用なのか、A-FABP に結合している因子によるものなのかはさらなる解析が必要であると考えられる。

#### 5. 単離ヒト脂肪由来幹/前駆細胞の品質評価法の標準化検討

##### 5-1. 細胞培養

Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs)

ADSCs (T25 フラスコ) の上清培地を除去し、HUNK'S BALANCED



SALT SOLUTION (SIGMA) で一度洗淨した。その後トリプシン-EDTA (invitrogen) を添加して、37°Cのインキュベータで3分ほど静置し、細胞を剥がした。剥がれた細胞は培地で十分に懸濁し、細胞数をカウントした。細胞懸濁液は1200 rpm, 5分間遠心分離を行い、上清を除去した後 MESEN PRO (invitrogen) によって再度懸濁し  $7 \times 10^5$  cells/dish の濃度でセラチンコート 10cm<sup>2</sup> ディッシュに撒き、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件で培養を行った。

Renal epithelial cell line (233A cells)  
233A 細胞の上清培地を除去し、HUNK' S BALANCED SALT SOLUTION (SIGMA) で一度洗淨した。その後トリプシン-EDTA (invitrogen) を添加して、37°Cのインキュベータで3分ほど静置し、細胞を剥がした。剥がれた細胞は培地で十分に懸濁し、細胞数をカウントした。細胞懸濁液は1200 rpm, 5分間遠心分離を行い、上清を除去した後 K-1 培地 (DMEM/Ham' s F-12, ITS mix, ニコチンアミド) を添加し十分に懸濁し  $7 \times 10^5$  cells/dish の濃度でセラチンコート 10cm<sup>2</sup> ディッシュに撒き、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件で培養を行った。

## 5-2. 脂肪細胞への分化刺激

ADSC は広く研究に利用されており、間葉系幹細胞から骨細胞や脂肪細胞へ分化させるための添加剤を含んだ培地が Kit として販売されている。今回は ADSC の脂肪細胞への分化を細

胞培養上清中 A-FABP を測定することでモニターし、品質評価の標準化の検討を目的とした。

2日間培養を行ったADSCsについて、培養上清を除去後 D-PBS で細胞を洗淨し、STEMPRO Adipogenesis Differentiation Medium (A1007001, invitrogen) を添加して同様に培養を行った。培養液は0日, 2日, 6日後に1 mL ずつ採取し、-80°Cにて凍結保存した。

ADSC をセラチンコート 10cm<sup>2</sup> ディッシュに撒き、2日間 MESEN PRO 培地下で培養を行い細胞の形態を倒立顕微鏡にて確認したところ、細胞はセミコンフルエント程度まで増殖していた。そこで STEMPRO Adipogenesis Differentiation Medium に培地を交換し脂肪細胞への分化刺激を行った。分化刺激2日後では細胞の形態にほとんど変化は見られなかったが、6日後ADSCの細胞質に液胞が多数確認された。これは脂肪細胞への分化によって細胞内に蓄積された脂質であると考えられる。一方分化刺激を行っていないADSCは6日間の培養後でも細胞が増殖するのみで、形態に変化は見られなかった。233A細胞をセラチンコート 10cm<sup>2</sup> ディッシュに撒き、2日間 K-1 培地下で培養を行い細胞の形態を倒立顕微鏡にて確認したところ、細胞は50%コンフルエント程度まで増殖していた。そこで培地を新しい K-1 培地に交換し、引き続き6日間培養を行ったところ、

細胞の緩やかな増殖が確認された。

### 5-3. ELISA 測定

L-FABP ELISA Kit (Z-001, CMIC HD) , A-FABP ELISA Kit (RD191036200R, Biovondor) , C-FABP ELISA Kit (E91985Hu, Uscn life science)を用いて ADSC の分化刺激有/無及び233A細胞を0, 2, 6日培養後、培養上清に含まれる各種 FABP 量を測定した。なお、ELISA の操作方法は各 Kit の説明書に従った。

ADSC の分化刺激の有/無と 233A 細胞の培養上清に含まれる L-, A-, C-FABP の濃度を測定した (図 29A2, B2, C2)。また、各 ELISA 測定に用いた検量線を図 29A1, B2, C1 に示す。

なお、図中の ADSC Non-Dif.は ADSC の分化刺激無、ADSC Dif.は ADSC の分化刺激有をそれぞれ示す。

#### L-FABP

233A 細胞の培養上清では培養初期においてはほとんど L-FABP は確認されなかったが、6 日間の培養で 4000 pg/mL 程度の存在が確認された。一方、ADSC では培養初期から6日間の培養を通じて僅かに L-FABP の存在が確認された。また、STEMPRO Adipogenesis Differentiation Medium による分化刺激によっても、僅かに L-FABP の上昇が確認された。

#### A-FABP

233A 細胞、無分化刺激 ADSC においては培養初期から 6 日間にわたって、

培養上清中に A-FABP は確認されなかったが、分化刺激 ADSC においては培養初期ではその培養上清中に A-FABP は確認されなかったが、6 日間培養によって培養上清中 A-FABP 濃度は 6000 pg/mL 程度までの上昇が認められた。これは細胞の形態観察において ADSC の細胞質に液泡が確認された時期と一致していた。

#### C-FABP

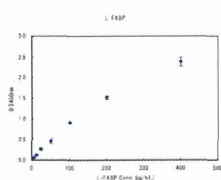
233A 細胞、ADSC 分化刺激有/無のどの培養上清においても培養初期から C-FABP の存在は確認されなかったが、6 日間の培養によって ADSC では 50~60 pg/mL、233A 細胞では 150 pg/mL 程度の C-FABP が確認された。

以上の結果から、L-FABP, A-FABP 及び C-FABP は培養細胞から培養上清に放出されていることが確認された。また、ADSC においては脂肪細胞分化刺激によって特異的に A-FABP の培養上清中濃度が上昇することから、細胞培養上清を ELISA 測定することでヒト皮下脂肪組織由来幹細胞 (ADSCs) の脂肪細胞への分化を簡便にモニタリングできることが示唆された。一方 ADSCs の腫瘍化等への不測の分化をモニタリングする目的で培養上清中 C-FABP 濃度も測定したが、濃度が薄く、明らかな不測の組織への分化を確認することができなかった。そのため、今後は ADSC を長期培養若しくは、何かしらの刺激によって細胞をがん化させ、その培養上清中 C-FABP を測

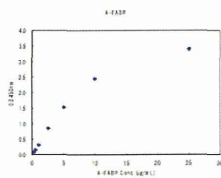
定する必要があると考えた。また、市販の ELISA kit の性能からバックが非常に高く、検量線のバラツキも大きく再現性のある正確なデータを取ることが難しいと考えられた。そこで、今回取得した C-FABP モノクロー抗体を用い、弊社独自の体外診断用医薬品であるレナプロ L-FABP ELISA kit のノウハウを活用して C-FABP の ELISA kit を開発することで、上記分化モニタリングの標準化に寄与できると考えられる。

図 29

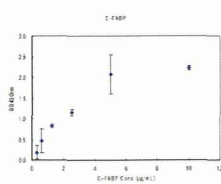
A1. L-FABP ELISA 検量線



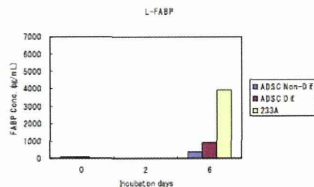
B1. A-FABP ELISA 検量線



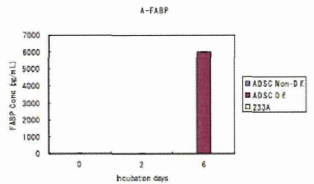
C1. C-FABP ELISA 検量線



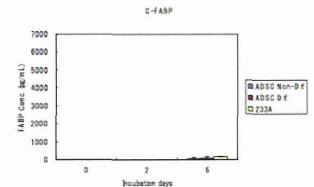
A2. 各培養上清中の L-FABP 濃度



B2. 各培養上清中の A-FABP 濃度



C2. 各培養上清中の C-FABP 濃度



別表：本現象に関与すると思われる因子のリスト1

<ADSC-AFABP>

ノード名	カウント数(KeyNode含む)
IPF1	33
3beta	30
AKT-1	28
MAPKAPK3	25
MYOD1	25
Caspase-3	24
HMG2	24
CKII-alpha: CKII-alpha2: (CKII-beta)2	23
JNK1alpha1	23
JNK1beta1	23
JNK2alpha-1	23
14-3-3zeta	22
ERK2	22
3zeta	20
MYOG	19
IRS-1	18
ERK1	17
2-isoform1	17
CDX1	16
300	16
RSK1	16
MEF2A-isoform1	15
SOX3	15
MAPKAPK2	14
CBP	13
2alpha	13
SHP2-isoform2	13
MEF-2C/delta8	12
MSK1	12
ONECUT1	12
JAK3	11
NR3C1	11
p/CAF	11
POU5F1	11

Src-isoform1	11
Jak2	10
JNK3alpha1	10
MKK4beta	10
53-isoform1	10
RXR-alpha	10