

表 7 図 15 中の各ピークのアミノ酸残基、理論分子量、及び実測値

Peak No.	Amino acid residues	Theoretical mass ^a	Observed m/z					
			M ⁺	M ²⁺	M ³⁺	M ⁴⁺	M ⁵⁺	
1	130-135	726.8	727.5					
	384-392	1036.1	1036.6	519.0				
	428-434	852.0	852.7	426.9				
	435-440	721.8	722.5					
2	41-55	1743.9		872.7	582.2	436.9		
3	506-513	878.0	878.5	439.8				
4	50-55	735.7	736.0					
5	506-513	878.0	878.4	439.8				
6	1-7	926.0	926.5	463.8				
	1-10	1298.4	1298.9	650.0	433.7			
7	146-162	2069.3		1036.6	518.9			
8	90-101	1463.5	1464.0	732.6				
	136-145	1204.3	1204.8	603.0	402.4			
9	450-462	1454.6	1454.7	728.0	485.8			
	343-356	1646.8	1647.8	824.2	549.9			
10	28-40	1689.7	1690.1	845.6	564.1			
	213-228	1617.8	1619.5	809.7	540.3			
	268-275	1053.1	1054.6	527.9				
11	229-247	2369.6		1186.1	790.7	593.4		
	234-247	1637.8	1638.9	819.7	546.9			
12	102-129 ^b (M5)	4235.2		2119.1	1412.4			
	102-129 ^b (M6)	4397.4		2199.9	1466.7			
	102-129 ^b (M7)	4559.5			1520.9			
	463-489	2754.8		1378.8	919.2			
13	163-189	3077.0		1540.5	1026.9			
14	11-27	2184.5		1092.9	729.1	547.1		
	146-159	1813.0	1814.2	907.5	605.3			
	250-267	2263.4		1132.4	755.2			
15	136-159	2999.3		1500.2	1000.7	750.7	601.7	
	251-267	2107.2	2109.2	1054.2				
	357-378	2668.9		1335.2	890.5	668.2		
16	357-378	2668.9		1336.1	890.5	668.3		
	514-522	1179.3	1179.8	590.6				
17	362-378	2028.2	2028.6	1015.0	677.1			
18	56-82 ^c	3299.4		1651.0	1101.2			
	190-212	2460.8		1231.8	821.2			
	514-527	1793.0	1794.6	897.3	598.7			
19	276-296	2241.6	2242.1	1122.0	748.2	561.4		
20	278-296	2000.3	2000.5	1000.9	667.7			
	393-416	2752.0		1376.6	918.1			
21	393-427	4069.4		2035.9	1358.0	1018.3		
22	229-249	2639.9		1320.5	880.0			
	490-513	2581.0		1291.5	861.2	646.2		
23	490-505	1721.0	1722.6	861.2	574.6			
24	305-327	2729.0		1366.1	910.6			

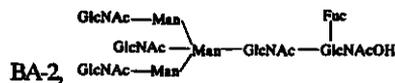
^a Average mass value. ^b Glycopeptide. M5; Man₅GlcNAc₂, M6; Man₆GlcNAc₂, M7; Man₇GlcNAc₂. ^c Peptide with fucose.

表 8 図 18 中の各ピークの糖組成、糖鎖推定構造、理論分子量、及び実測値

Peak No.	Carbohydrate composition ^a	Proposed sugar type ^b	Theoretical mass ^c	Observed mass ^c
1	[dHex] ₂ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	[FucCore]+[dHex] ₁ [Hex] ₂ [HexNAc] ₂	1935.8	1935.8
	[dHex] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₄	[FucCore]+[Hex][HexNAc] ₂	1627.5	1628.0
2	[dHex] ₂ [Hex] ₄ [HexNAc] ₄ [SO ₃] ₁	[FucCore]+[dHex] ₂ [Hex] ₁ [HexNAc] ₂ [SO ₃] ₁	1999.9	1999.0
	[dHex] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅	[FucCore]+[Hex] ₁ [HexNAc] ₃	1976.9	1997.4
	[dHex] ₁ [Hex] ₃ [HexNAc] ₅	[FucCore]+[HexNAc] ₃ (BA-2)	1668.6	1669.0
	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	[FucCore]+[Hex] ₂ [HexNAc] ₂	1789.7	1790.2
3	[Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [SO ₃] ₂	[Core]+[Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [SO ₃] ₂	1885.8	1885.8
	[Hex] ₉ [HexNAc] ₂	[Core]+[Hex] ₆ (M9)	1885.7	1885.8
4	[Hex] ₆ [HexNAc] ₂	[Core]+[Hex] ₃ (M6)	1399.3	1399.5
	[Hex] ₇ [HexNAc] ₂	[Core]+[Hex] ₄ (M7)	1561.4	1521.6
	[dHex] ₁ [Hex] ₆ [HexNAc] ₃	[FucCore]+[Hex] ₃ [HexNAc] ₁	1748.6	1749.6
	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	[FucCore]+[Hex] ₂ [HexNAc] ₂	1789.7	1790.2
6	[dHex] ₃ [Hex] ₅ [HexNAc] ₆	[FucCore]+[dHex] ₂ [Hex] ₂ [HexNAc] ₄	2082.0	2082.8
	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	[FucCore]+[Hex] ₂ [HexNAc] ₂ [NeuAc] ₁ (FucBiNA)	2080.9	2082.8
7	[Hex] ₅ [HexNAc] ₂	[Core]+[Hex] ₂ (M5)	1237.1	1237.8

^aHex, hexose; dHex, deoxyhexose; HexNAc, *N*-acetylhexosamine; NeuAc, *N*-acetylneuramic acid; SO₃, sulfate.

^bFuc, fucose; Core, trimannosyl core; M5, Man₅GlcNAc₂; M6, Man₆GlcNAc₂; M7, Man₇GlcNAc₂; M9, Man₉GlcNAc₂.



^cAverage mass value.

表 9
 フォリスタチン検量線データ
 (2% fetal bovine serum-Ham's F12 medium, n=3)

Follistatin [ng/ml]	Response [RU]	Calculated [ng/ml]	%Recovery	%CV
1,000	191.5 ± 17.6	982.1 ± 95.2	98.2	9.7
500	103.2 ± 6.9	531.8 ± 40.7	106.3	7.7
250	49.6 ± 2.6	258.4 ± 18.7	103.4	7.2
125	22.0 ± 1.1	117.7 ± 11.1	94.2	9.4
62.5	9.4 ± 0.4	53.4 ± 7.5	85.4	14.0
31.3	3.9 ± 0.2	25.4 ± 6.5	81.3	25.6

表 10
 バイオアッセイ及びSPRイムノアッセイを用いたフォリスタチン
 産生細胞培養上清中のフォリスタチンの定量.

Measurement	Follistatin [ng/ml]
Bioassay	600
SPR immunoassay	748

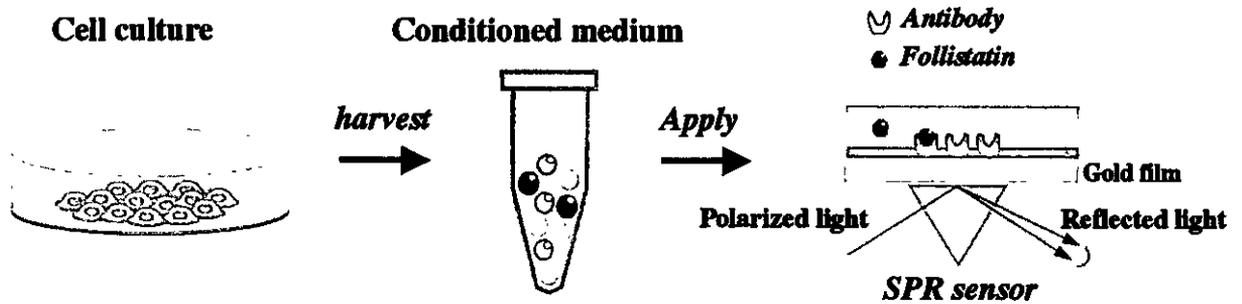


図1 SPRイムノアッセイの概略.

SPRイムノアッセイに供する試料は、培養上清を前処理や精製をせずに測定することが可能である。本研究では、抗フォリスタチン抗体を固定化したセンサーチップを用いて組換えフォリスタチンの濃度測定法を構築した。

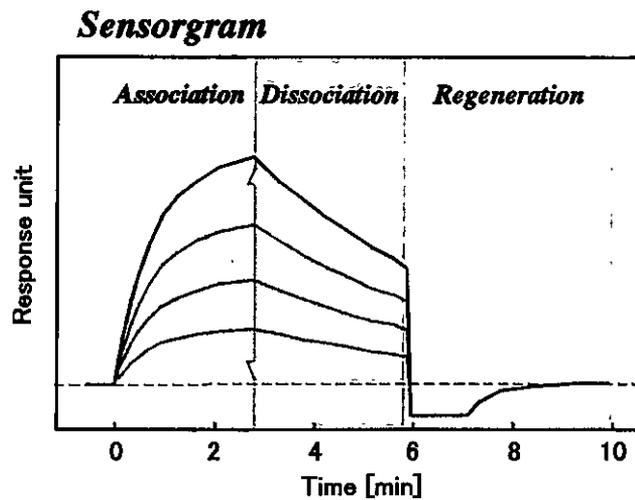


図2 連続希釈した組換えフォリスタチン標品によるセンサーグラム.

本分析は検体あたり10分間以内に測定することが可能で、結合量(矢印)からフォリスタチンの濃度が求められる。

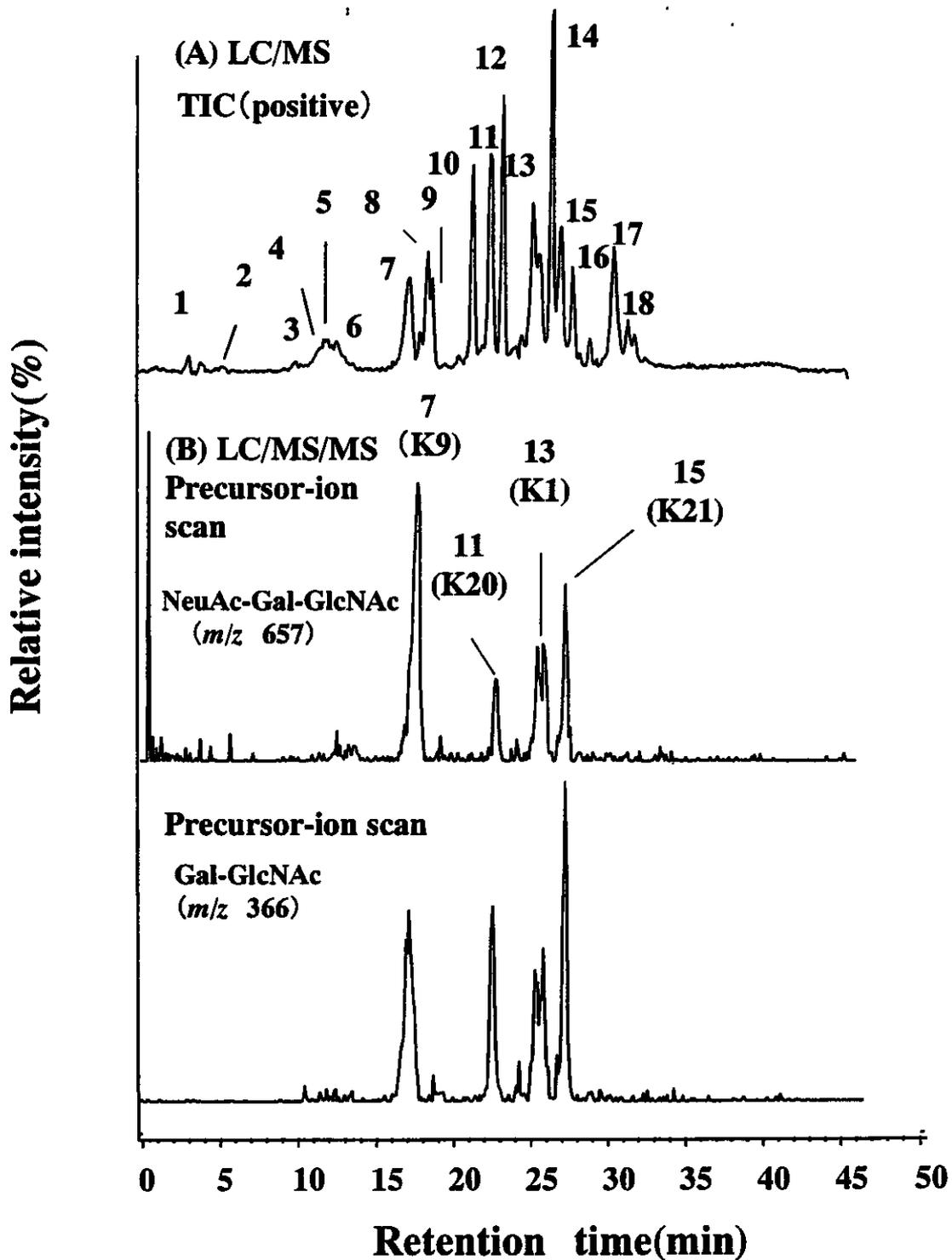


図4 ミクロLC/MS、及びミクロLC/MS/MSによって得られたトロンボモジュリンのペプチド/糖ペプチドマップ(A)、及び糖ペプチドマップ(B)

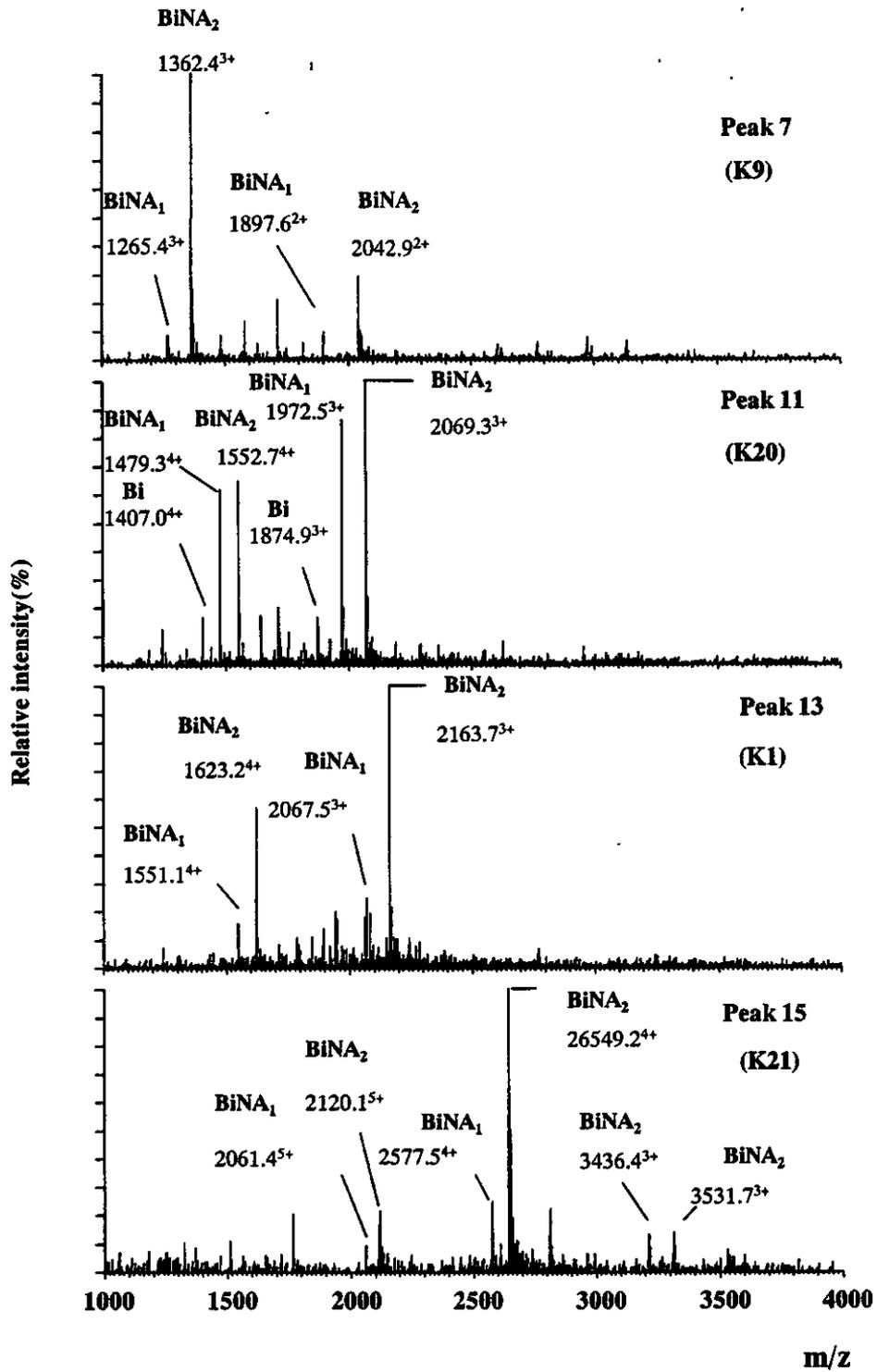


図5 トロンボモジュリン糖ペプチドのマススペクトル
Bi, biantennary; NA, NeuAc

GNCWLRQAKN GRCQVLYKTE LSKEECCSTG RLSTSWTEE/D
 K1
VN /DNTLFKWM IFNGGAPNCI PCKETCENV/D CGPGKKCRMN
 K2 K3
KKNKPRCVCA P /DCSNITWKG PVCGL /DGKTY RNECALLKAR
 K4 K5
CKEQPELEVQYQGRCKKTCR /DVFCPGSSTC VV /DQTNNAYC
 K6 K7
VTCNRICPEP ASSEQYLCGN /DGVTYSSACH LRKATCLLGR
 K8
SIGLAYEGKC IKAKSCE/DIQ CTGGKKCLWD FKVGRGRCSL
 K9 K10 K11
C /DELCP/DSKS /DEPVCAS/DNA TYASECAMKE AACSSGVLL//E
 K12 K13 K14 K15 ①
VKHSGSCN
 K15②

図 6 フォリスタチンの一次構造、及びAsp-Nによる開裂位置
 下線は糖鎖結合可能性部位を示す。//は部分的開裂位置を示す

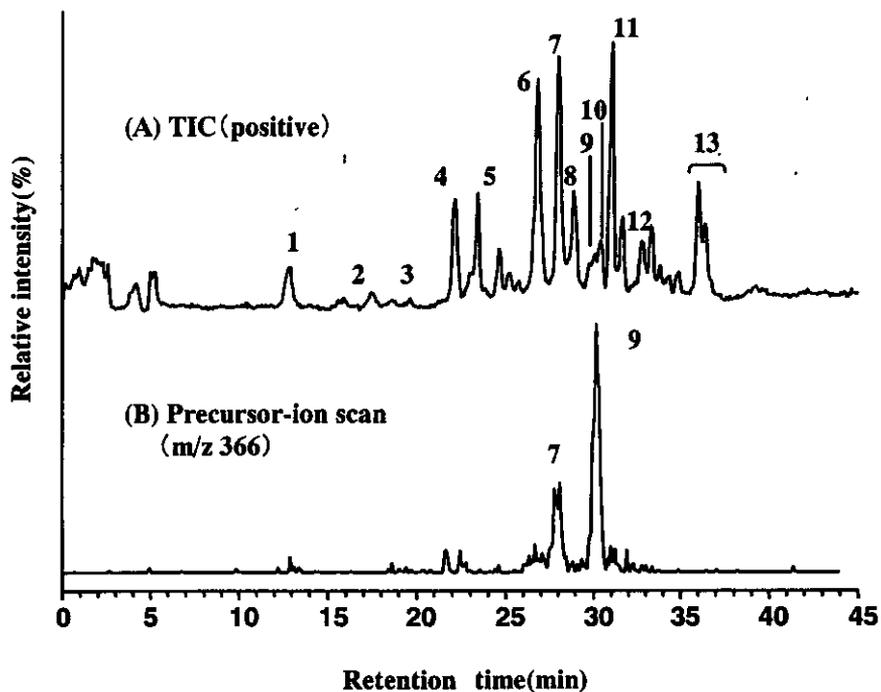


図7 ミクロLC/MS、及びミクロLC/MS/MSによって得られたフォリスタチンのペプチド/糖ペプチドマップ(A)、及び糖ペプチドマップ(B)

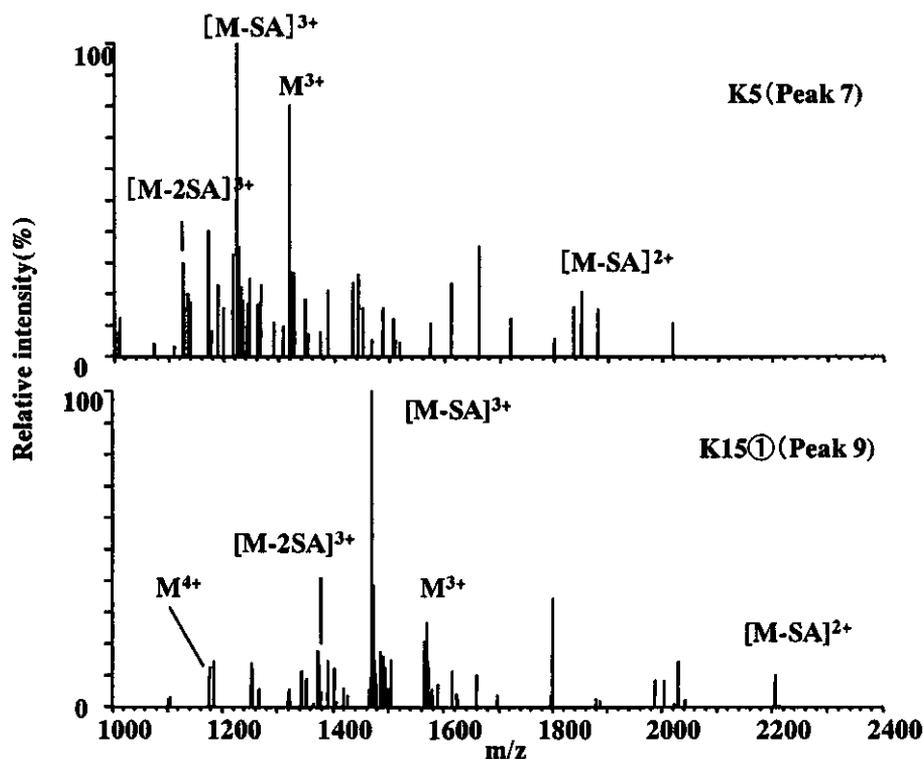


図8 フォリスタチン糖ペプチドのマスペクトル

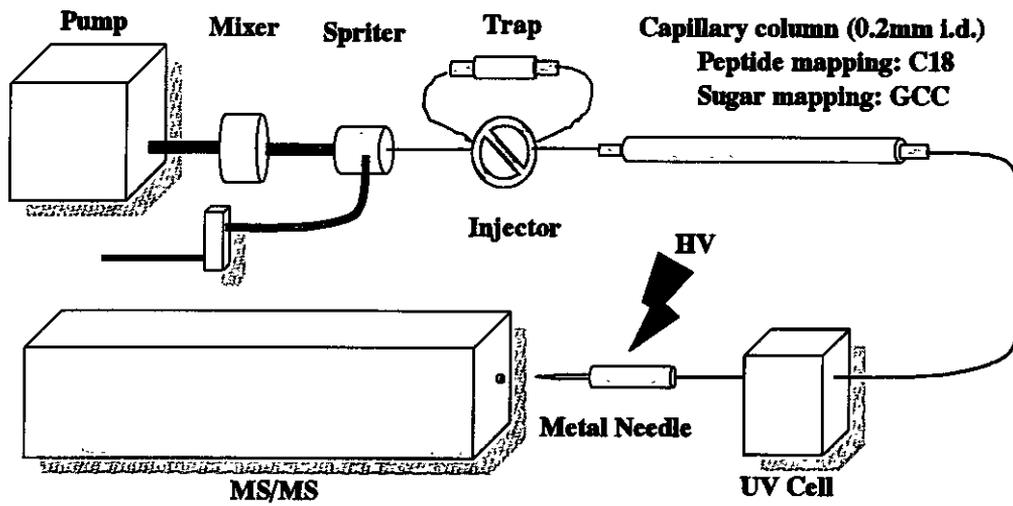


図 9 CapLC/MSの概略

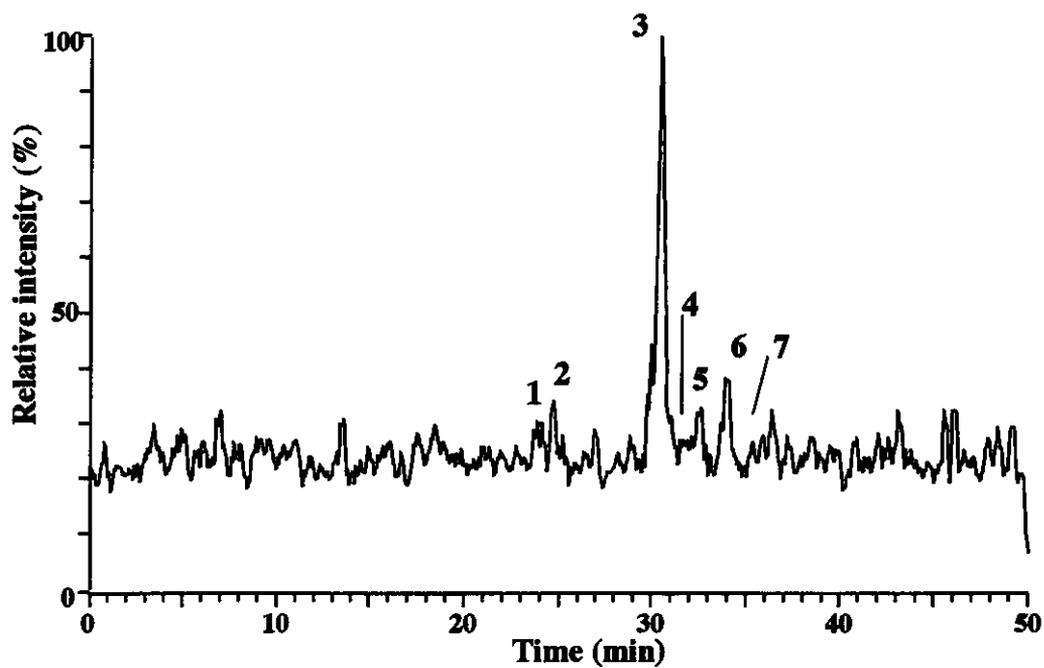


図 10 CapGCC-LC/MSによって得られたrhTMのN結合糖鎖の糖鎖プロファイル

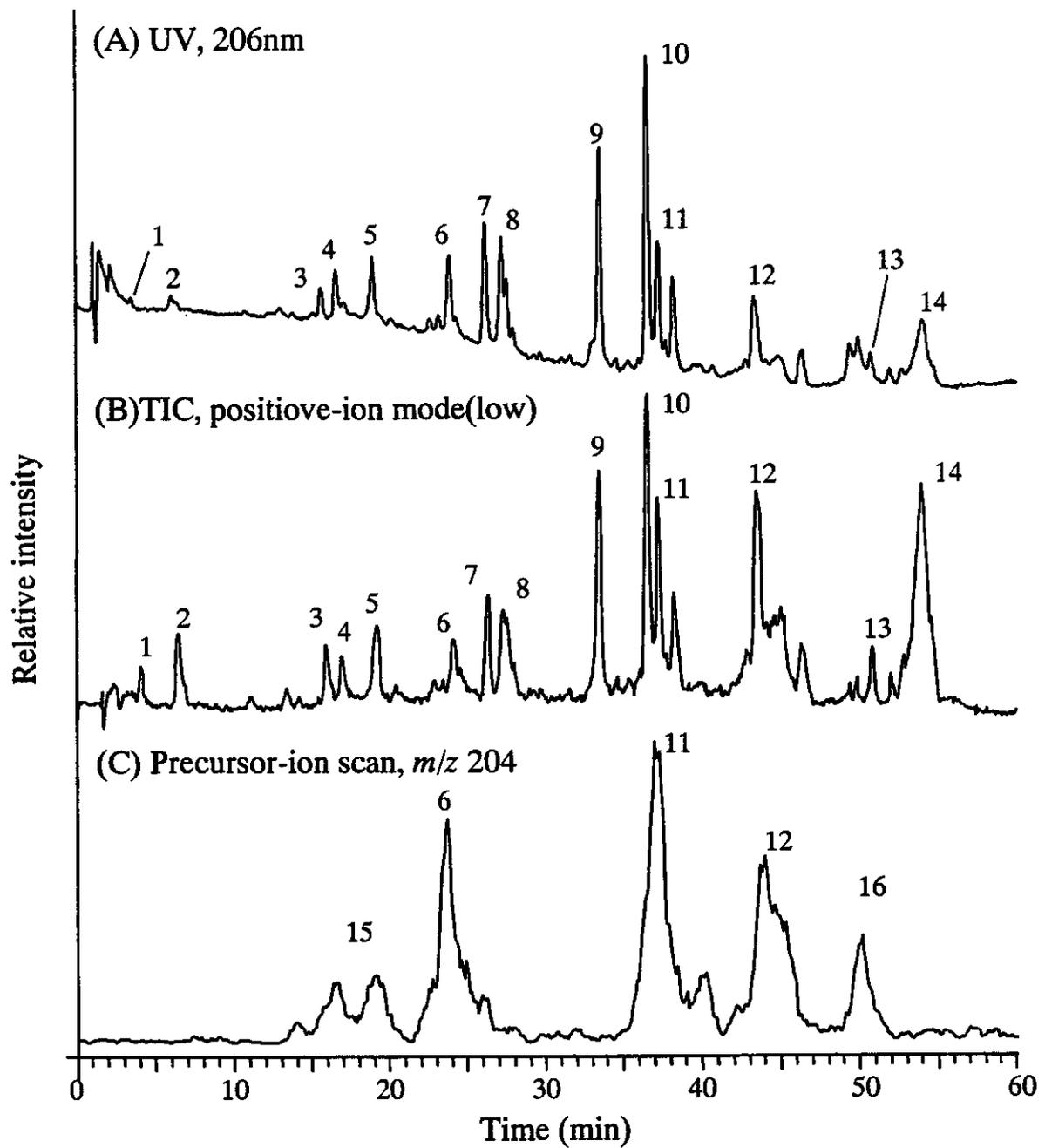


図 11 CapLC/MS及びCapLC/MS/MSによって得られたrhTMのペプチド/糖ペプチドマッピング (A)、(B)、及び糖ペプチドマップ(C).

10	20	30	40	50
SYQVICRDEK	TQMIYQQHQS	WLRPVLRSNR	VEYCWCNSGR	AQCHSVPVKS
60	70	80	90	100
CSEPRCFNGG	TCQQALYFSD	FVCQCPEGFA	GKCCEIDTRA	TCYEDQGISY
	*			
110	120	130	140	150
RGTWSTAESG	AECTNWNSSA	LAQKPYSGRR	PDAIRLGLGN	HNYCRNPDRD
160	170	180	190	200
SKPWCYVFKA	GKYSSEFCST	PACSEGNSDC	YFGNGSAYRG	THSLTESGAS
210	220	230	240	250
CLPWNSMILI	GKVYTAQNPS	AQALGLGKHN	YCRNPDGDAK	PWCHVLKNRR
260	270	280	290	300
LTWEYCDVPS	CSTCGLRQYS	QPOFRIKGGL	FADIASHPWQ	AAIFAKHRRS
310	320	330	340	350
PGERFLCGGI	LISSCWILSA	AHCFQERFPP	HHLTVILGRT	YRVVPGEEEQ
360	370	380	390	400
KFEVEKYIVH	KEFDDDTYDN	DIALLOLKSD	SSRCAQESSV	VRTVCLPPAD
410	420	430	440	450
LQLPDWTECE	LSGYGKHEAL	SPFYSERLKE	AHVRLYPSSR	CTSQHLLNRT
460	470	480	490	500
VTDNMLCAGD	TRSGGPQANL	HDACQGDSGG	PLVCLNDGRM	TLVGIISWGL
510	520	527		
GCGQKDVPGV	YTKVTNYLDW	IRDNMRP		

図 12 t-PA の 1 次構造

トリプシンによる開裂位置を太字で示す。*印はフコース結合位置と示す。下線はN結合糖鎖の結合可能位置を示す。

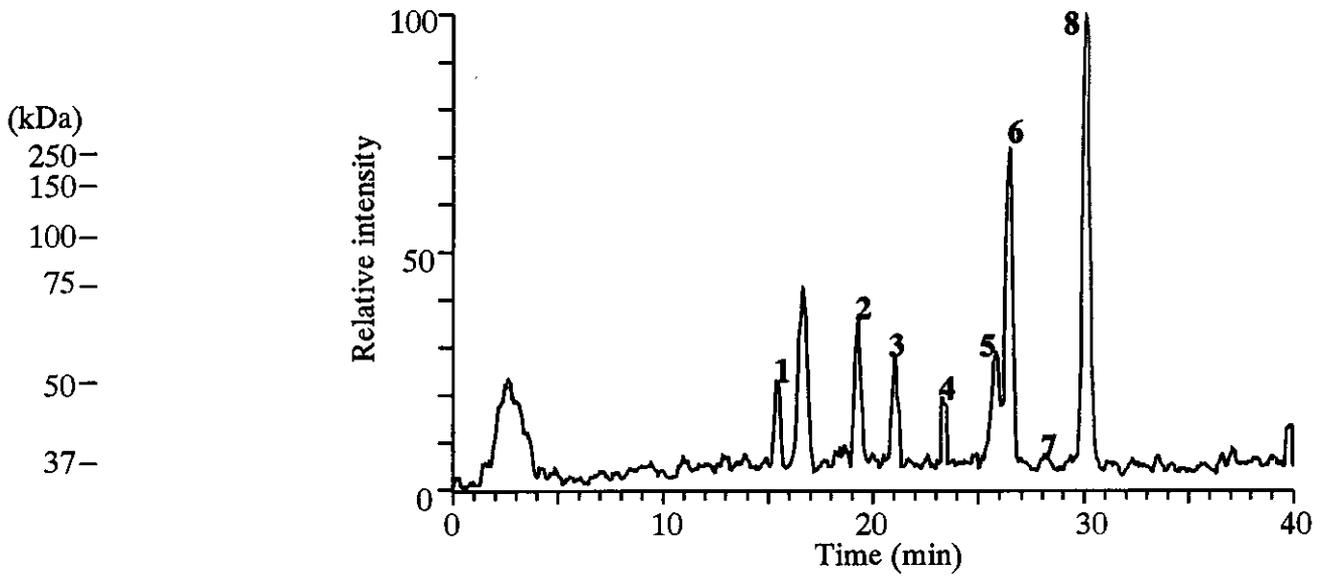


図 13 t-PAのSDS-PAGE

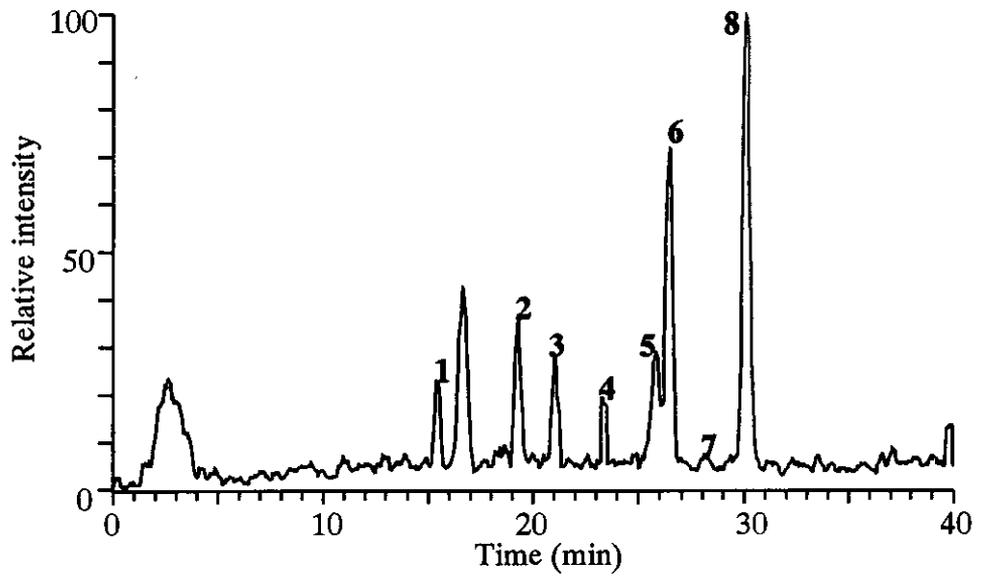


図 14 t-PAの糖鎖プロファイル

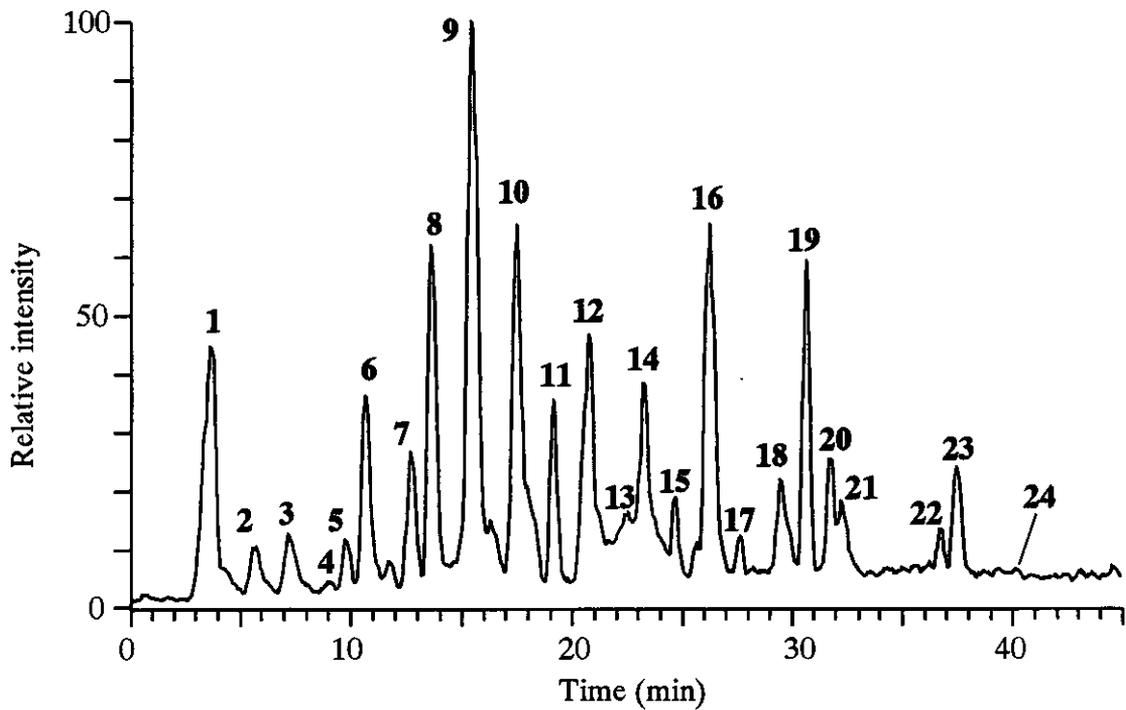


図 15 t-PAのペプチド/糖ペプチドマップ

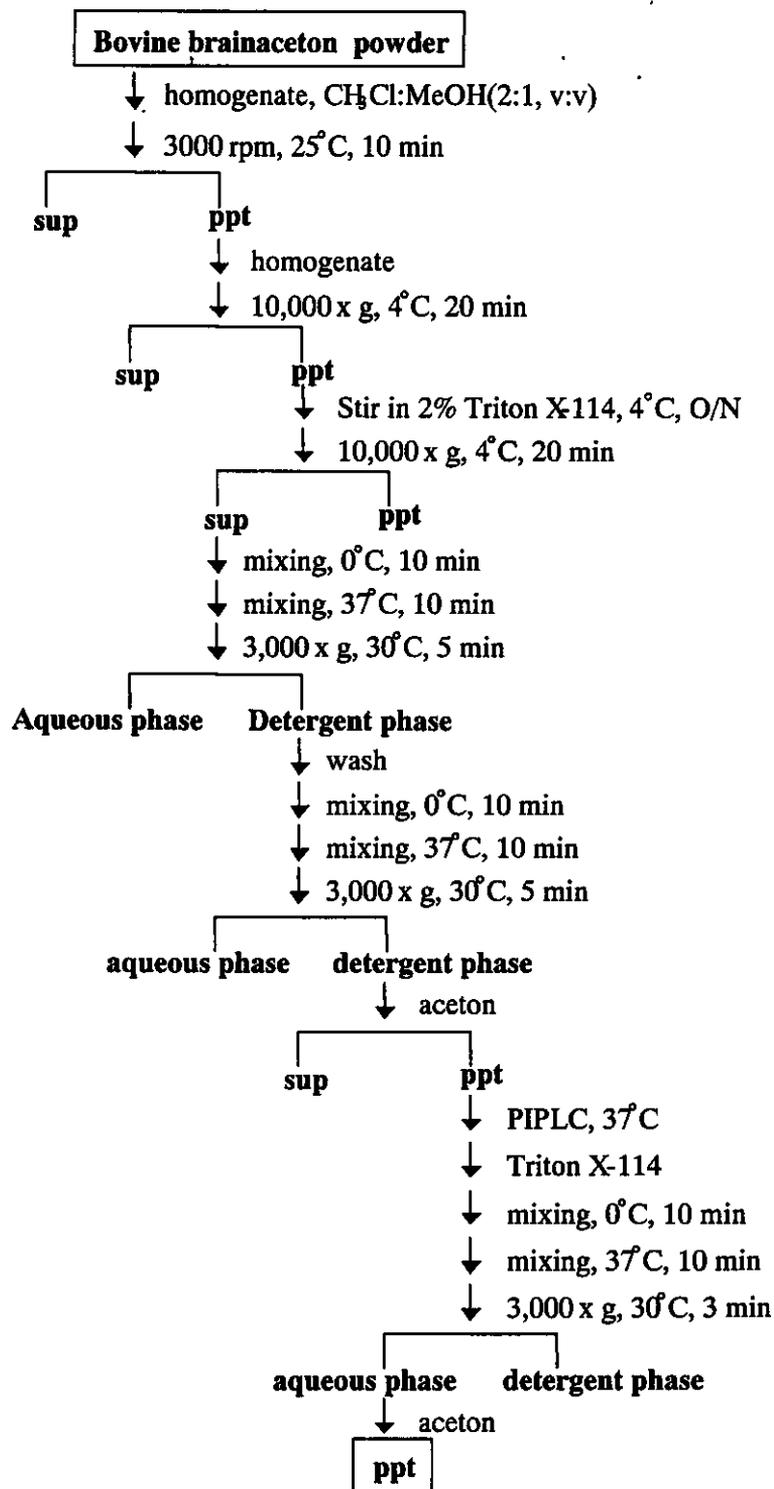


図 16 ウシ脳可溶性膜タンパク質画分の調製方法の概略.

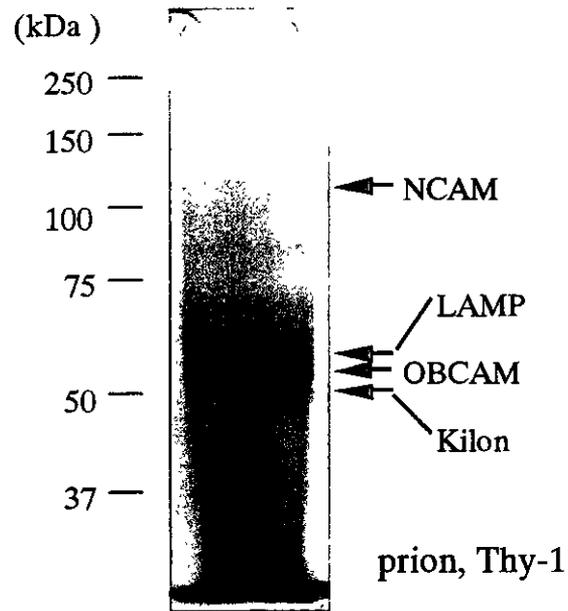


図 17 ウシ脳可溶性膜タンパク質の SDS-PAGE

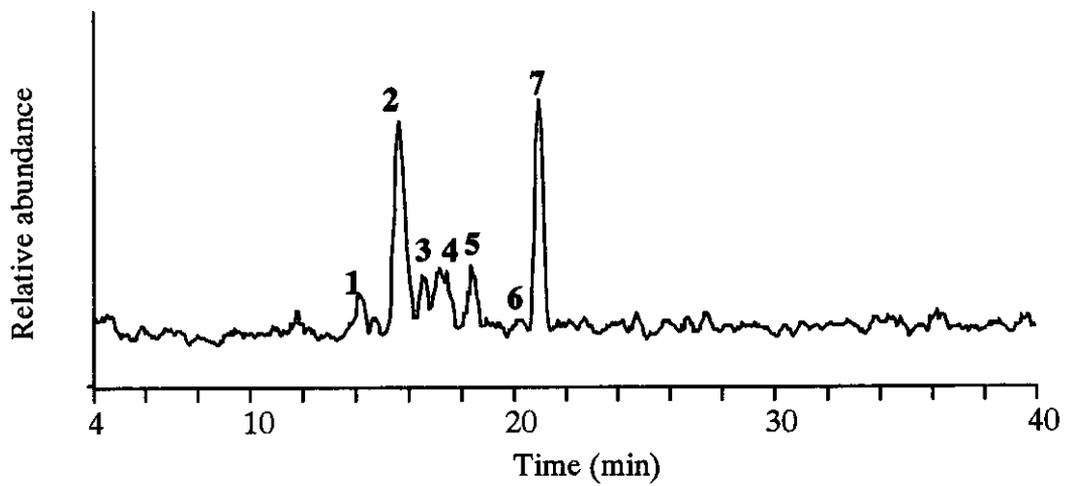


図 18 Kilonの糖鎖プロファイル

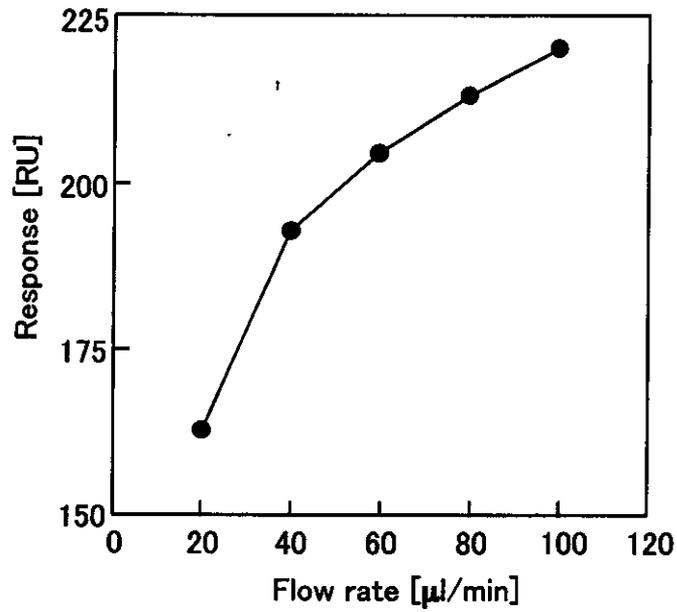


図 19 SPRイムノアッセイにおけるアナライトのリガンドへの結合に及ぼす流速の影響

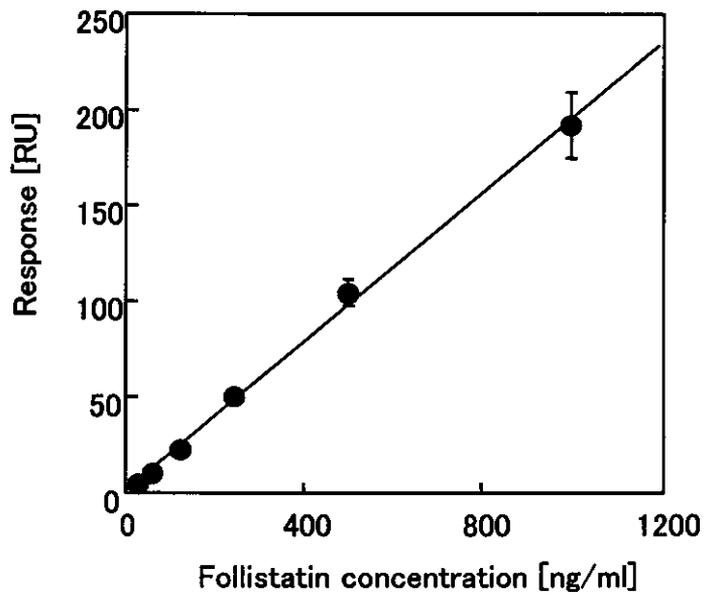


図 20 SPRイムノアッセイにおけるフォリスタチン定量の検量線 (mean ± SD, n=3, r²=0.998).

分担総合研究報告書

細胞・組織加工医薬品・医療用具の品質等の確保に関する研究

分担研究者：新見伸吾（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第2室長）

研究要旨

細胞・組織加工医薬品の品質評価法の開発を目的として肝細胞の幹細胞と考えられている小型肝細胞と成熟肝細胞でその発現が異なるタンパク質の探索を試みた。成熟ラット肝臓から分離した小型肝細胞と成熟肝細胞からそれぞれから抽出したタンパク質を二次元電気泳動にかけ両者で発現量の異なるスポットを得た。そのスポットはやや酸性よりの分子量 35kDa のタンパク質であり、その発現は小型肝細胞においては検出されたが、成熟肝細胞では検出されなかった。そのスポットをゲルから切り出してトリプシン消化し、得られた断片ペプチド混合物を MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) で測定し、質量スペクトルを得た。得られた質量値を元にデータベース検索を行った結果、そのタンパク質はアネキシンⅢと同定された。小型肝細胞におけるアネキシンⅢの特異的な発現を免疫化学的手法によりさらに確認するため、成熟ラット肝臓から分離した小型肝細胞と成熟肝細胞から細胞質画分を調製し、抗アネキシンⅢ抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、小型肝細胞において既知のアネキシンⅢの分子量とよく一致した 37kDa に単一のバンドとしてアネキシンⅢが検出された。一方、成熟肝細胞においてアネキシンⅢは検出されなかった。以上の結果から、小型肝細胞の細胞・組織加工医薬品としての臨床応用において、アネキシンⅢがその品質評価の指標として有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

対象疾患ごとに必要な治療用細胞を大量生産・再構築することにより、それらの細胞が有する機能を利用することによって再生医療が実現しようとしている。特に肝疾患においては死亡者が毎年4万人ともいわれ、そのうち60歳以下の肝移植適応患者は年間3,500~5,000人と見積もられている。しかし適応拡大による移植症例数の急激な増加はドナー肝の有効利用を目的とした分割肝移植や生体部分肝移植などの工夫にも

かかわらず、深刻なドナー不足をもたらしている。最近、全肝移植までのブリッジ、肝不全の際の代謝補助、代謝疾患のための全肝移植に置き換わる方法として、肝細胞移植が有効であるといわれている。さらに、肝細胞移植に加えより高度な肝機能を発揮させるため、組織工学的手法を用いて正常肝に類似した組織を体内あるいは体外で構築し利用することも考えられている。しかしながら、臓器移植同様、肝細胞移植に用いるための肝細胞の不足は明らかであるこ

とから、ヒト肝細胞の培養、増殖、凍結保存技術の開発は大きな課題であり、現在様々の検討が行われている。

最近、特に肝細胞移植への応用で注目されているのは小型肝細胞である。小型肝細胞は成熟ラットの肝臓の非実質画分にその存在が見出され、その表現系並びに超微細構造は成熟肝細胞と類似している点が多い。また、小型肝細胞をある特殊な培地で培養すると、コロニーを形成し、培養を続けるとこの細胞が積み重なるようになって管状あるいは嚢胞状構造を形成する。さらに、小型肝細胞は増殖能力が成熟肝細胞に比べてはるかに旺盛であり、継代培養も可能である。小型肝細胞を移植すると肝臓に生着し旺盛に増殖することも動物モデルで明らかになっている。最近、ヒトにおいても小型肝細胞の存在が報告されていることから、小型肝細胞の細胞治療への応用が期待されている。

このように有用性が明らかになっている小型肝細胞を実際細胞治療薬へと応用しようとする場合、重要な問題点の一つはその品質をどのように評価するかである。小型肝細胞は特に成熟肝細胞と多くの点で表現系が類似しているため両細胞の識別は困難である。現在まで小型肝細胞特異的に発現しているタンパク質を見出し、それを品質確保のマーカースとして使用しようとする試みが世界中の数多くの研究者により行われている。しかしながら、未だ有用なマーカースとして使用可能なタンパク質は見出されていない。そこで、我々は小型肝細胞と成熟肝細胞において発現しているタンパク質を二次元電気泳動により比較することにより小型肝細胞において特異的に発現してい

るタンパク質を探索し、質量分析によるその同定を試みた。

B. 研究方法

1. 成熟及び小型肝細胞の調製

コラゲナーゼ灌流法により調製した細胞懸濁液を 50g×1 分遠心した。沈殿として得られた肝細胞を培地にて懸濁後同様な遠心操作を 3 回繰り返して成熟肝細胞を得た。成熟肝細胞はその細胞懸濁液を 45%パーコール密度勾配で 50g×10 分遠心し沈殿とすることにより更に精製を行った。一方、成熟肝細胞調製時の各遠心上清を集め、150g×5 分遠心した。沈殿として得られた小型肝細胞と他の非実質細胞を培地にて懸濁後同様な遠心操作を 3 回繰り返した。沈殿として得られた細胞を懸濁後 50g×2 分遠心し小型肝細胞を得た。小型肝細胞はその細胞懸濁液を 45%パーコール密度勾配で 50g×24 分遠心し沈殿とすることにより更に精製を行った。

2. 二次元電気泳動のためのサンプル調製

沈殿として得られた成熟及び小型肝細胞を PBS で洗浄後、チオウレアを含む溶解バッファーで細胞を溶かした。細胞溶解物を 20,000g×60 分遠心しその上清を回収した。上清は使用するまで-70°Cで保存した。なお、個々のサンプルにおけるタンパク濃度は Biorad protein assay kit で測定した。

3. 二次元電気泳動

各蛋白質サンプルをゲル膨潤バッファーと共に Immobiline Dry Strip (Immobiline NL, 13cm, Amersham Biosciences 社) に添加して一晩放置した。なお、図 1 に示

した実験においてはゲルあたり 100 μ g のサンプルを使用し、Immobiline Dry Strip は pH3-10 のものを用いた。また、質量分析用のサンプル調製においてはゲルあたり 300 μ g のサンプルを使用し、Immobiline Dry Strip は pH 4-7 のものを用いた。一次元目の等電点電気泳動は Cool Phorestar 電気泳動装置 (アナテック社) で行い、二次元目の SDS-PAGE は、10-20%の グラジエントゲル (バイオクラフト社) で行った。二次元電気泳動で分離したタンパク質スポットは銀染色あるいは CBB 染色で検出した。

4. 二次元解析タンパク質のトリプシンによるゲル内消化

目的スポットを切り出し 20%メタノール 5%酢酸を加え室温で 10 分振盪した。この操作を 3 回繰り返した後 MilliQ 水を加え、室温で 10 分振盪した。この操作をさらに 2 回繰り返した後、アセトニトリルを加え、室温で 10 分振盪した。アセトニトリルを除いた後、減圧濃縮遠心器でゲルを乾固させた。次に、10mM ジチオスレイトール 100mM 炭酸水素アンモニウムを加え、56°Cで 60 分インキュベーションした。チューブを室温に戻した後溶媒を除き先程と等量の 55mM ヨードアセトアミド 100mM 炭酸水素アンモニウムを加えて室温で 45 分反応させた。溶媒を除き 100mM 炭酸水素アンモニウムを加えて、室温で 5 分振盪し、さらにアセトニトリルを加え 5 分振盪した。この操作を二回繰り返し、減圧濃縮遠心器でゲルを乾固させた。乾固したゲルを氷上に置き 0.4 μ g のトリプシンを含むトリプシン消化バッファー (40mM 炭酸水素

アンモニウム 10%アセトニトリル)を 20 μ l 加えた。45 分間インキュベーションして消化バッファーでゲルを膨潤させた後、さらに 30 μ l のトリプシンを含まない消化バッファーを加え、37°Cで一晩インキュベーションした。

5. ゲルからのトリプシン消化ペプチドの抽出

20mM 炭酸水素アンモニウムを加え室温で 20 分振盪し上清を回収した。5%ギ酸 50%アセトニトリルを加え、さらに 20 分振盪し、上清を回収した。この操作を 2 回繰り返して全ての上清を集め、減圧濃縮遠心器で乾燥後 0.1%トリフルオロ酢酸に溶かした。

6. 質量分析計による蛋白質の同定

ペプチド断片を含む溶液を ZipTip μ C18 (ミリポア社) で洗浄後、5 μ l の 0.1%トリフルオロ酢酸 50%アセトニトリルでペプチドを溶出した。上記溶液 0.5 μ l を MALDI target にアプライし、マトリックスとして α -シアノ- β -ヒドロキシシケイ皮酸 (CHCA) の 0.1%トリフルオロ酢酸 50%アセトニトリル飽和溶液を重層した。MALDI TOF-MS (AXIMA-CFR, 島津製作所) を用いて質量分析を行い、得られたペプチド断片の質量数から、Mascot システム (Matrix Science 社) を用いたデータベース検索を行い、蛋白質の同定を試みた。

7. ウェスタンブロット用サンプルの調製

小型及び成熟肝細胞を 2 倍量 (v/v) の抽出緩衝液 (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM Na Cl, 1/100 量 (V/V) プロテアーゼ

阻害剤カクテル, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) に懸濁し、室温で 15 分振盪した。細胞懸濁液を氷水中で 15 秒 5 回超音波処理し、100,000g×1 時間遠心することにより細胞質画分を調製しサンプルとした。サンプルは使用するまで -70°C で保存した。なお、サンプル濃度は Biorad protein assay kit で測定した。

8. ウェスタンブロット解析

サンプル (25 μg) を 10%ゲルで SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い、セミドライブロッティング装置を用いて PVDF 膜に転写した。5%スキムミルクで膜をブロッキング後、ヒト抗アネキシン III ウサギ抗血清 (抗アネキシン III 抗体) (Russo-Marie 博士から供与) を用いてウェスタンブロットを行い、ECL 検出システム (アマシャムバイオサイエンス) を用いてアネキシン III の検出を行った。プロットは Restore Western Blot Stripping Buffer (ピラス) で剥がし、抗ラットアルブミンウサギ抗体 (抗アルブミン抗体) (カッペル) を用いリプローブし、同様にアルブミンの検出を行った。

C. 研究結果

図 1 は成熟肝細胞と小型肝細胞由来タンパク質の二次元電気泳動のタンパク質スポットを比較したものである。その結果、分子量 35kDa のやや酸性よりのスポットが成熟肝細胞においてはみられず、小型肝細胞においてみられた。少なくとも肉眼上、その他のスポットに関して両者で濃さは変わらなかった。なお、異なる日に調製した成熟肝細胞と小型肝細胞においても同様な

結果が得られた。

図 2 はそのタンパク質を還元 S-カルボキシメチル化後トリプシンで消化し、その断片化ペプチド混合物を MALDI-TOF/MS で測定した質量スペクトルを示している。

表 1 は得られた質量値から Mascot システムを用いたペプチドマスフィンガープリンティング法による結果を示している。得られた質量値は予測されるアネキシン III の質量値と極めてよく一致しており、本スポットはアネキシン III と同定された。

図 3 は小型肝細胞のサンプルを用いたアネキシン III のウェスタンブロットにおける抗アネキシン III 抗体の至適濃度を検討した結果を示している。その結果、どの希釈倍率においても既知のアネキシン III の分子量に一致した位置にバンドを認めた。そのバンドの濃さは希釈倍率が高くなる程薄くなる傾向がみられたが、希釈倍率 18000 倍で検出に十分な濃いバンドが得られた。そこで以降 18000 倍の希釈倍率で抗アネキシン III 抗体を用いることにした。

図 4 は図 2 に用いたプロットをリプローブし、アルブミンのウェスタンブロットにおける抗アルブミン抗体の至適濃度を検討した結果を示している。その結果、どの希釈倍率においても既知のアルブミンの分子量に一致した位置にバンドを認めた。そのバンドの濃さは希釈倍率が高くなる程薄くなる傾向がみられたが、希釈倍率 15000 倍で検出に十分な濃いバンドが得られた。そこで以降 15000 倍の希釈倍率で抗アルブミン抗体を用いることにした。

図 5 は以上の予備的検討を基に小型肝細胞及び成熟肝細胞からのサンプルにおけるアネキシン III 及びアルブミンをウェスタン