

Figure 5. (A) SLDT assay. (B) National Institutes of Health image analysis quantitation of RT-PCR bands. In both figures, BALB/cJ control cells were treated with 2 and 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1. GJIC was significantly inhibited and mRNA expression was significantly suppressed in BALB/cJ control cells treated with 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 compared with BALB/cJ controls. \*\* $p < 0.01$ . Three dishes were used for one data point (bar) as one experiment. Results shown are representative of two independent experiments.

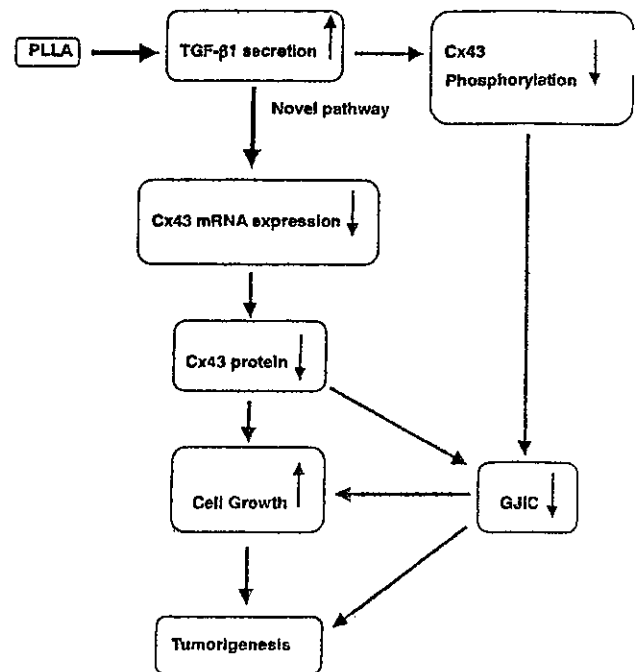


Figure 6. Schematic representation of the pathway of tumorigenesis induced by PLLA in BALB/cJ mice.

the suppression of the function of GJIC (Fig. 1) and at the same time, mRNA expression of Cx43 was suppressed in BALB/cJ mice (higher tumorigenic) but not in SJL/J mice (lower tumorigenic) [Fig. 2(A,B)]. TGF- $\beta$ 1 also suppressed the expression of mRNA of Cx43 and the function of GJIC in the BALB/cJ mouse cells *in vitro* [Fig. 5(A,B)]. These results indicated the novel mechanism of tumorigenesis induced by PLLA (Fig. 6).

## References

1. Tang L, Eaton JW. Inflammatory responses to biomaterials. *Am J Clin Pathol* 1995;103:466-471.
2. Rames A, Williams DF. Immune response in biocompatibility. *Biomaterials* 1992;13:731-743.
3. Anderson JM. Mechanisms of inflammation and infection with implanted devices. *Cardiovasc Pathol* 1993;2:33s-41s.
4. Kulkarni RK, Pani KC, Neuman C, Leonard F. Polylactic acid for surgical implants. *Arch Surg* 1966;93:839-843.
5. Craig PH, Williams JA, Davis KW, Magoun AD, Levy AJ, Bogdanský S, Jones JP Jr. A biological comparison of polyglactin 910 and polyglycolic acid synthetic absorbable sutures. *Surg Gynecol Obstet* 1995;141:1-10.
6. Nakamura T, Shimizu Y, Okumura N, Matsui T, Hyon SH, Shimamoto T. Tumorigenicity of poly-L-lactide (PLLA) plates compared with medical-grade polyethylene. *J Biomed Mater Res* 1994;28:17-25.
7. Nakamura A, Kawasaki Y, Takada K, Aida Y, Kurokama Y, Kojima S, Shintani H, Matsui M, Nohmi T, Matsuoka A, Sofuri T, Kurihara M, Miyata N, Uchima T, Fujimaki M. Difference in tumor incidence and other tissue responses to polyetherurethanes and polydimethylsiloxane in long-term subcutaneous implantation into rats. *J Biomed Mater Res* 1992;26:631-650.

8. Trosko JE, Madhukar BV, Chang CC. Endogenous and exogenous modulation of gap junctional intercellular communication: toxicological and pharmacological implications. *Life Sci* 1993;53:1-19.
9. Trosko JE, Ruch RJ. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci* 1998;3:D208-236.
10. Eiberger J, Degen J, Romualdi A, Deutsch U, Willecke K, Sohl G. Connexin genes in the mouse and human genome. *Cell Commun Adhes* 2001;8:163-165.
11. Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 1996;238:1-27.
12. Loewenstein WR. Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim Biophys Acta* 1979;560:1-65.
13. Guthrie SC, Gilula NB. Gap junctional communication and development. *Trends Neurosci* 1989;12:12-16.
14. Klaurig JE, Ruch RJ. Role of inhibition of intercellular communication in carcinogenesis. *Lab Invest* 1990;62:135-146.
15. Mesnil M, Yamasaki H. Cell-cell communication and growth control of normal and cancer cells: evidence and hypothesis. *Mol Carcinog* 1993;7:14-17.
16. Musil LS, Goodenough DA. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* 1991;115:1357-1374.
17. Musil LS, Goodenough DA. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 1993;74:1065-1077.
18. El-Fouly MH, Trosko JE, Chang CC. Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. *Exp Cell Res* 1987;168:422-430.
19. Turner FC. Sarcomas at sites of subcutaneously implanted bakelite disks in rats. *J Natl Cancer Inst* 1941;2:81-83.
20. Oppenheimer BS, Oppenheimer ET, Danishefsky I, Stout AP, Eirich FR. Further studies of polymers as carcinogenic agents in animals. *Cancer Res* 1955;15:333-340.
21. Bischoff F, Bryson G. Carcinogenesis through solid state surface. *Prog Exp Tumor Res* 1964;5:85-133.
22. Karp RD. Tumorigenesis by Millipore filters in mice: histology and ultrastructure of tissue reactions as related to pore size. *J Natl Cancer Inst* 1973;51:1275-1285.
23. Tsuchiya T, Hata H, Nakamura A. Studies on the tumor-promoting activity of biomaterials: inhibition of metabolic cooperation by polyetherurethane and silicone. *J Biomed Mater Res* 1995;29:113-119.
24. Tsuchiya T. A useful marker for evaluating tissue-engineered products: gap-junctional communication for assessment of the tumor-promoting action and disruption of cell differentiation in tissue-engineered products. *J Biomater Sci Polym Ed* 2000;11:947-959.
25. Nakaoka R, Tsuchiya T, Kato K, Ikada Y, Nakamura A. Studies on tumor-promoting activity of polyethylene: inhibitory activity of metabolic cooperation on polyethylene surfaces is markedly decreased by surface modification with collagen but not with RGDS peptide. *J Biomed Mater Res* 1997;35:391-397.
26. Brand I, Buoen LC, Brand KG. Foreign-body tumors of mice: strain and sex differences in latency and incidence. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:1443-1447.
27. Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA. Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J Cell Biol* 1990;111:2077-2088.
28. Lampe PD, Lau AF. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 2000;384:205-215.
29. Asamoto M, Toriyama-Baba T, Krutovskikh V, Cohen SM, Tsuda H. Enhanced tumorigenicity of rat bladder squamous cell carcinoma cells after abrogation of gap junctional intercellular communication. *Jpn J Cancer Res* 1998;89:481-486.
30. Moorby C, Patel M. Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp Cell Res* 2001;271:238-248.
31. Wyatt LE, Chung CY, Carlsen B, Iida-Klein A, Rudkin GH, Ishida K, Yamaguchi DT, Miller TA. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) alter connexin 43 phosphorylation in MC3T3-E1 cells. *BMC Cell Biol* 2001;2:14.
32. Laird DW, Castillo M, Kasprzak L. Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *J Cell Biol* 1995;131:1193-1203.

# 細胞組織医療機器等の製品化のための ガイドライン、環境整備について

医療機器・細胞組織医療機器関連の薬事法の改正が昨年度からスタートしている。その内容は、(1)多様性に富んだ医療機器のリスクに応じた新クラス分類とその承認制度の見直し、(2)細胞組織医療機器が含まれる生物由来製品の感染リスクに応じた安全対策の充実、(3)市販後安全対策の抜本的見直しが急ピッチで進められている。また、第三者認証制度の導入において必要な規格・基準の整備も行われている。本稿では、細胞組織医療機器や新たな制度である生物由来製品の薬事法の改正内容について記載した。

土 屋 利 江

## 1. 細胞組織医療機器等の薬事法改正について

平成12年12月26日付けでヒトまたは動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保についての医薬安全局長通知(医薬発第1314号)において、別添1「細胞組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」と別添2「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」の2つの文書が示された。

別添1の基本的考え方は、ヒトや動物の細胞・組織から構成される医薬品および医療機器(平成17年度から医療用具は、医療機器に名称変更される予定)について、品質および安全性の確保ならびに細胞・組織の取扱いに関する科学的および倫理的妥当性を確保するための方策をまとめている。

別添2の指針は、「基本的考え方」に基づき、ヒトの細胞・組織に培養処理等の加工を施して製造される医薬品および医療機器について、品質および安全性の確保のために必要な基本的技術要件を定めており、治験前に厚生労働省に提出する品質および安全性の確認申請時に、必要な添付資料の内容を示している。

平成13年3月28日付けで「薬事法施行規則の一部を改正する省令等の施工について(細胞組織医薬品及び細胞組織医療用具に関する取扱いについて)」(医

薬発第266号)省令および告示が公布され、平成13年4月1日より施行されている。

ヒトまたは動物の細胞または組織より構成された医療機器および医薬品に関して科学技術の進歩に伴う感染症への対策が急務となり、ドナースクリーニング、感染因子の不活化など、ドナーに由来する感染症への対策、培養などの処理により細胞または組織が有害な性質のものとならないことの確認など、品質および安全性を確保するために特別の対策が必要とされ、改正された。

## 2. 細胞組織医療機器等の適用範囲

ヒトまたは動物の細胞または組織より構成される医療機器および医薬品であり、動物由来の組織を利用して承認を取得している生体弁や心臓の膜も含んでいる。

## 3. 改正概要

承認申請書の記載方法の変更(詳細は、最新の薬事法で確認のこと)や、GMP<sup>\*</sup>関係省令についても一部改正された。その概要は、細胞組織医療機器などを製造または輸入するにあたり、細胞もしくは組織由来または製造工程中の感染症などの伝播による危険性を排除し、不適切な製造や取扱いによる品質および安全性上の問題の発生を防止するために、製造管理と品質管理に必要な要求事項を定めた。

具体的には、

- (1) 細胞組織医療機器等の製造所の構造設備の基準への適合、原料の受入れ、加工処理、製品の保管等を行う区域について、他区域からの区分、必要な構造及び設備の要求。

\* GMP: 製造許可の要件として製造所の構造設備から製造工程全般にわたる製造管理及び品質管理について製造業者が遵守すべき基準



TSUCHIYA, Toshie 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部(158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)・薬品部長、農学博士。1971年九州大学薬学部卒業。専門は生化学、薬物代謝、腸内細菌学、発生学、安全性評価、医療材料・医療機器の生体適合性、細胞組織医療機器の安全性・有効性など。

Reform of Biological Products Regulation and Guidelines for Manufacturing Tissue Engineered Medical Products

- (2) 加工処理の「加工」とは疾病の治療や組織の修復又は再建を目的として、細胞または組織の人為的増殖、細胞または組織の活性化を目的とした薬剤処理、生物学的特性改変、遺伝子工学的改変、非細胞または非組織成分とのハイブリッド化、カプセル化等を施すこと。
- (3) 細胞組織医療機器等は、生物学的製剤等と同様に原料として使用する人、動物、植物または微生物から得られたものに係る事項や使用動物の規格に関する事項について、製品標準書を作成。
- (4) 細胞組織医療機器等の製造、保管及び出納ならびに衛生管理に関する記録については、遅発性感染症の危険性を否定し得ないことから、安全性の確保上必要な情報を得るために、少なくとも所定の期間記録を保存することとなっている。即ち、特定生物由来製品の場合、医療機関での患者使用記録の保管期間は20年間とし、製造業者等での提供者・製造記録の保管期間は30年間と規定。生物由来製品では、製造業者等での提供者・製造記録の保管が求められ、人血液成分以外の成分に関する記録は、10年間、人血液成分を含む場合の人血液成分に関する記録は、30年間保管となっている。(生物由来製品の特性に応じて保管期間は異なる。最新版の業務公報に目を通し、現時点での正確な情報を入手し、確認すること。)
- (5) 細胞又は組織の取り違えや細菌、真菌、ウイルス等の伝播の危険性を避けるために、製造工程において複数のドナーからの細胞又は、組織を同一室内で同時期に取扱ったり、交叉汚染を引き起こすような保管方法をとらないこと。更に、ドナー又はドナー動物ごとに細胞や組織、中間製品及び製品を管理する必要がある。
- (6) 原料となる細胞又は組織について、後述した内容において、適格なものであることを確認し、その結果に関する記録を作成すること。
- (i) 当該細胞又は組織を採取した施設
- (ii) 当該細胞又は組織を採取した年月日
- (iii) 当該細胞又は組織が人に係るものである場合には、ドナースクリーニング（ドナーについて、問診、検査等による診断を行い、細胞組織医薬品の原料となる細胞又は組織を提供する適格性を有するかどうかを判定することをいう）のためのドナーの問診、検査等による診断の状況。
- (iv) 当該細胞又は組織が動物に係るものである場合には、ドナー動物の受入の状況並びにドナースクリーニング（ドナー動物について、試験検査及び飼育管理を行い、細胞組織医薬品の原料となる細胞又は組織を提供する適格性を有するかどうかを判定することをいう）のためのドナー動物の試験検査及び飼育管理の状況
- (v) 当該細胞又は組織を採取する作業の経過（採取する

作業経過に関する記録と採取作業において微生物等に汚染されていない旨が確認できるものであること。

- (vi) (i) から (v) までに掲げるもののほか、細胞組織医療機器等の品質の確保に関し必要な事項（製造に使用する試薬に関する試験検査結果を指す）。
- (7) 「施設」は組織を採取した医療施設もしくは動物の細胞又は組織を採取した施設を指す。
- (8) 「適格性を有する」とは、「細胞組織医薬品及び細胞組織医療用具に関する基準」の

以下のいずれにも該当し、原料となる条件を満たしているもの。

細胞組織医療機器について、薬事第42条の規定に基づき、品質及び安全性確保の観点から、原料又は材料となる細胞又は組織に関する基準を定めている（平成13年3月厚生労働省告示第101号関係）。この基準を満たさない細胞又は組織は、品質及び安全性についての情報が十分でないことから、製造業者は、これら細胞又は組織を原料又は材料として医薬品又は医療機器として製造すべきでない。

#### 「基準の概要」

医薬品又は医療機器の原料又は材料となる細胞又は組織については、

必要な衛生管理と人員を持つ施設で採取されていること。ドナースクリーニングが適切に行われていることが確認できること。

採取作業が適切に行われていることが確認できること。

必要な記録を確認できること。

が必要である。

ドナースクリーニングの項目等具体的な内容については、個別の製品ごとに異なることから、具体的事項については承認申請書に記録する。

## 4. 生物由来製品に関する制度の概要

### (1) 生物由来製品に関する制度の創設について

人又は動物の細胞、組織等に由来する原材料を用いて製造される生物由来製品は、その特性として、原材料の汚染に由来する感染リスク等について、注意を払う必要がある。生物由来というこの共通特性に着目し、原材料採取・製造から市販後に至る、一貫した安全性確保体制を導入し、製品の安全性を図るために創設された。

### (2) 生物由来製品に関する制度の主な内容

#### (a) 生物由来製品及び特定生物由来製品の指定

製品の感染症リスクを考慮した科学的評価に基づき、指定を行い、生物由来製品は約700製品、特定生物由来製品は約280製品について指定し、公表した。

# バイオマテリアルの安全性について 組織工学用材料を中心として

## Safety evaluation of biomaterials for tissue engineering

国立医薬品食品衛生研究所 療品部

土屋 利江

Toshie TSUCHIYA

Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences

### はじめに

医療用具(平成17年度4月から医療機器に名称変更)に使用されるバイオマテリアルには、金属、セラミックス、高分子、天然材料などがある。それぞれ医療用具として使用される目的、部位により、それらの単体あるいは複合材料が使用されている。近年は、ナノテクノロジー技術を応用した医療材料・医療機器開発が活発に行われており、米国の最近のニュースでは、がん治療分野で、大型の予算がついたとの報道がなされている。

医療材料・医療機器は、従来の承認された既存材料の組み合わせのみでは、限界があり、今後は、生物の仕組みを制御する機能を組み合わせた医療機器開発が盛んになるものと考えられる。薬と医療機器の組合されたステント、さらに、最近では、細胞・組織と医療機器がくみあわされたバイオ皮膚・バイオ軟骨・バイオ骨などがあげられる。細

胞組織医療機器と日本語で表記されるものは、通常 tissue engineered medical products (TEPS)として海外では、標準化すべき課題として取り上げられ、米国規格協会(ASTM)では、すでにいくつかの関連文書ができています。一方、tissue engineering といわれる技術については、近年、複数の学会が立ち上げられ、社会的にも大きな関心事となった。しかし、事業としては、海外を含めて成功しているようにはおもえない。また、いくつかの問題点と課題も浮き彫りにされてきた。

ティッシュエンジニアリング用バイオマテリアルは、既に、医療材料、医療機器として使用されているものが多い。例えば、生分解性材料や、通常、細胞の良い基質となるコラーゲンに代表される天然材料がある。

ティッシュエンジニアリング用バイオマテリアルとしての安全性は、医療材料としての前

臨床評価試験と, 更に, ティッシュエンジニアリング用マテリアルとして使用実態を考慮した評価が必要となる。

例えば, 神経再生用のティッシュエンジニアリング用マテリアルであれば, マテリアルを細胞・組織の足場として評価した時, 神経が目的とする正常な機能等を保っていることを確認しなければならない。また, その状態を維持できることも示す必要があると考える。

ある種のティッシュエンジニアリング用マテリアルが, 軟骨では毒性を示さないが, 神経では毒性を示すことは既に知られている。設計段階で, 神経毒性を示す構成成分が原材料として使用されていれば, 推測可能であり, はじめから, そのような合成方法はさけるべきである。使用範囲や製品としての価値を低くする設計をさけることがポイントとなる。当然のことだが意外とおろそかにされている感がする。

分解性材料は, やがては, 生体内で分解・吸収・代謝・排泄される。通常は, 生体内に残存し続ける医療用具の方が安全性上, リスクが高いと考えやすいが, 薬事法改正による新クラス分類では, 生分解性材料は, 4つのクラスの中でリスクが最も高いクラス IV に分類されている。このクラス分類の考え方は, わが国だけでなく, Global Harmonization Task Force (GHTF) で示された国際レベルでのクラス分類とも整合している。医療材料は, その性質, 使用方法により, ヒトへの安全性の確保について慎重に考

慮すべきであると考え。

現在, 考えられる問題点やこの分野の国際標準化の動向について紹介する。

### 1. ティッシュエンジニアリング用バイオマテリアル製品化のための課題

製品化の上で重要だと考えられるポイントについて以下に私見を列挙する。

- (a) バイオマテリアルの選別が重要である。材料が承認されているからといって, ティッシュエンジニアリング用バイオマテリアルとして適切であるかどうかは, 保証されていない。使用する組織・使用方法により, バイオマテリアルの細胞・組織との反応性が異なるからである。
- (b) 天然材料では, エンドトキシン汚染があると考え, エンドトキシン汚染がないことを事前に確認して使用することが重要である。高分子でもエンドトキシン汚染に留意すべきである。
- (c) 天然材料中に混在するエンドトキシンは, 材料の特性に応じて吸着しやすく, 材料から, 通常の方法に従って溶液を調製し, 測定しても正確な測定値を示しているとは限らない。エンドトキシン汚染濃度は, 回収率を考慮して測定することが重要である。従来の試験溶液調製方法では, 汚染されているエンドトキシンの1%程度以下しか検出されていない例も多い。
- (d) ティッシュエンジニアリング用バイオマテリアルの原材料, 製造工程などを明確にし,

安全性上問題はないか, 検討した後に使用すること. たまたま, 入手したものを出発物質として細胞を接着させ, 培養しても, その結果に対する解釈はあやふやなものとなり, 科学的な説明が困難となる. 同名の材料でも, 細胞の反応は, 阻害・亢進と対照的に著しく異なることに留意すべきである. 製造メーカーの異なる同名の材料を並べて試験した場合, 細胞との反応性は異なる. 学会でも材料の製造工程は, 不明のまま使用されている例が多い.

(e) モノマーやポリマーの種類, 触媒, 添加物などは, 安全性, 有効性に影響を与える因子となる. 設計の段階で, 十分考慮すべきである. 研究計画と同様, 製品化の上で十分な事前評価が重要である.

(f) 優れた医療機器開発と低コスト化をねらった精密な事前計画を練るキーパーソンがヒットメーカーでは活躍している. 材料のみでなく, 人材が活躍できる環境作りも重要と考える.

(g) 医療材料でありながら, 化学発ガン物質もある. 従って, 発ガン性を懸念する場合には, 最低限, 対象材料や対象物質の溶液での形質転換試験等によりチェックしておく必要がある. ガイドラインに記載されている遺伝毒性試験の中で, Ames Test や染色体異常試験では, 陽性とはならないが, 動物実験では発ガン性を示す材料が少なからずある.

(h) バイオ製品では, これから標準化すべき

課題としては, バイオ製品の力学強度の評価指標と評価方法がある. 組織工学製品の標準化を進めている米国 (ASTM F04) は, バイオ軟骨において, いくつかの力学指標を盛り込んだ文書(案)を作成しており, 今年の8月第1回目の投票が行われた. 11月のASTM 会議で投票結果と反対コメントなどが明らかになり, 今後の方針が決定される予定である.

(i) 国際的に掲げられているバイオ製品の課題は, 欠損部位など治療目的とする部位へのバイオ製品の固定, バイオ製品の生体内での機能維持, 目的外細胞・組織形成の否定, 非侵襲的臨床評価による有効性評価指標など, 若年者のみでなく, 対象患者である高齢者での治療効果の提示, バイオ製品の評価のための動物モデル(治癒効果に種差がある. 軟骨の動物モデルに関する文書(案)が ASTM でまとめられている.) 感染因子の否定などである.

(j) 今までに報告されているリスク因子としては, 天然由来材料: 未知の感染因子, アレルギー反応, エンドトキシン等の吸着, 生分解性材料: 炎症反応, ゲッシン類動物での高頻度腫瘍化, 最近の研究から, 腫瘍化の程度に系統差があること, 腫瘍化した細胞は, 軟寒天コロニー試験でコロニー形成能陰性であったが, ヌードマウス移植試験で早期に大きな腫瘍を形成した.

通常の医療材料としての前臨床試験は, 使用部位, 使用期間により, 確認すべき試

験項目は異なる。

一次評価の試験として, 細胞毒性試験, 感作性試験, 刺激性・皮内反応試験, 急性全身毒性試験, 亜急性毒性試験, 遺伝毒性試験, 発熱性試験, 埋植試験, 血液適合性試験がある。補足的な二次評価の試験として, 慢性毒性試験, 発ガン性試験, 生殖・発生毒性試験, 発ガン性試験, 生分解性試験がある。そのほか, 個別の医療機器・医療材料の特性に応じた試験もあり, 各医療機器・医療材料の規格に記載されている。

組織工学用医療材料では, 通常の試験以外にいくつかの試験が付加される。

特に, 分化影響・腫瘍化などは, 考慮すべき項目である。分化指標が確立しているものでは, Key molecule の定量的評価が製品化の上で重要となる。学会発表で多く見られる免疫染色像や電気泳動によるバンド像のみでは定性的であり, 論文には受理されても, 製品化のためには不十分である。各企業は, 個別の製品について, Key molecule を少量のサンプルで迅速に定量的に評価する方法を確立することが, 製品の出荷判定において必要なポイントとなる。はじめにその戦略を立てておかないと, 繰り返し実験が多くなり, 時間・労力・過剰なコストを失いかねない(開発費削減のポイントの一つ)。

腫瘍化の試験として, 材料で腫瘍化した細胞組織での研究から, 軟寒天コロニー形成試験のみでなく, ヌードマウス移植試験を実施する必要があると考える。

また, ある種のモデル生分解性材料を動物に埋植すると, 早期から中期に炎症が起き, 炎症が持続している動物には, 腫瘍発生頻度が高い, また, その埋植量が多いほど腫瘍発生頻度も高い。

医療材料の使用目的, 使用する部位, 使用方法などを考慮し, 慎重に安全な材料を設計すべきである(安全かつ有用な医療材料の選択と開発が, 長期使用後の不具合をなくし有効性の高い製品を上市化する上で重要となる)。

次に細胞・材料の相互作用に関する研究を紹介する。

## 2. 採取組織や種の異なる細胞の分化機能等に及ぼす生分解性材料等の影響

組織工学材料として, 様々なタイプの生分解性ポリマーが使用され, 研究されているが, 代表的な生分解性ポリマーの分解産物である低分子量の  $\epsilon$ -カプロラクトンと L-乳酸共重合体等を用いて, 軟骨前駆細胞や神経前駆細胞の高密度培養での分化および増殖に及ぼす作用を調べることを目的とした。

### 2-1. ラットの胎児肢芽細胞や中脳細胞の細胞分化および増殖に及ぼす影響

組織工学材料として, 様々な生分解性ポリマーが使用されていることから, その代表的な生分解性ポリマーの分解産物である  $\epsilon$ -カプロラクトンと L-乳酸共重合体



P(LA-CL)25 10000)のラット胎児細胞由来軟骨前駆細胞および神経前駆細胞の初代細胞の分化能への影響を, マイクロマスカルチャー(高密度培養)条件下で調べた. その結果, P(LA-CL)25 10000は, 軟骨細胞の分化を促進するが, 神経前駆細胞への増殖・分化を阻害することが明らかになった. 更に3種の生分解性オリゴマーについて, 神経前駆細胞の増殖・分化に及ぼす影響を調べた結果, 類似の化学構造からなるオリゴマーでも, 重合時の配合比や, 置換基が異なる場合では, 阻害強度が異なることも明らかになった. 従って, 組織再生過程で分解され生成する低分子量ポリマーを迅速に評価することが, 組織が再生していく過程に及ぼす影響因子の解析を正確に評価する上で有用である.

## 2-2. ヒトおよびマウス由来細胞の増殖および骨分化に及ぼす影響

細胞・組織加工医療用具の前臨床評価試験として, 細胞を組み込んだ生分解性ポリマーからなる足場について, 動物をモデルとして評価が行われる. ヒトと動物では, 解剖学的組織の構造の違いから, 細胞・組織加工医療用具のヒト臨床成績は, 動物モデルでの結果と異なる可能性がある. ヒト正常骨芽細胞と研究で良く使用されるマウス骨芽細胞様細胞株を用いて生分解性材料の骨分化に及ぼす影響について, 両細胞間で比較した. すなわち, 同じ濃度レベルのポリ乳酸

オリゴマーを培地中に添加して比較した. その結果, 良く使用されるマウス細胞株および正常ヒト細胞では, 細胞分化に及ぼす影響が, 前者では促進, 後者では阻害と全く逆の異なる結果を得た. 組織工学利用医療用具の評価を行う上で, *in vitro*動物モデルからヒト臨床使用するとき, 分化・増殖機能が両検出系で異なる可能性を考慮する必要がある.

## 3. 国際標準化など

現在, 再生医療製品の国際標準化の動きがある団体として3団体があげられる. 一番はじめに活動を開始し, 最も活発な作業をおこなっているのが, American Society for Testing and Materials の F04 のセクションのなかにある Tissue Engineered Medical Products:TEMPS のグループである. 最近では, ASTM は International standard であると主張している. しかし, 欧州の ISO メンバーは, その主張に異議を唱えている状況にある. このような状況下, 2004年の2月26-27日の二日間にわたり, スイス・ジュネーブにある WHO 本部で「The high-level workshop on International Standards for Medical Technologies.」が開催された. ISO, IEC, ITU-T (International Telecommunication union's Telecommunication Standardization) が主催した WSC (World Standard Cooperation)の第一回会議が開かれた. 共催団体は, WHO, GHTF, AAMI, Eucomed,

JFMDA の5つであった。参加者には、各団体議長(高柳 IEC 議長ら)および個別の TC (Technical committee) 議長が参加し、5つのセッションが開かれた(1.Vision, 2.Links between regulators and standards developers, 3.Standard development practice, 4.New Technologies and standards [emerging technology], 5.Development dimension.)。日本からは、JFMDA(日本医療機器団体協議会)の三浦氏(横河)と土屋(国立衛研)が講演した。今後もこのような横断的な標準化に関する世界会議が開かれるであろう。我が国は、現在、様々な医療機器の標準化作業が行われているが、世界の人々に優れた医療機器を提供するためにも、有用な基準を提案し、国際的に理解され認知される標準化活動をする必要があると考える。

組織工学関連の ISO での標準化は、TC150(外科用インプラント)が先行し、WG11では、[General requirements for safety, marking and for information to be provided by the manufacturer]の文書作業が開始されている。

TC194(医療機器・医療材料の生物学的評価)では、新たに Medical Devices utilizing tissues に関する Sub Committee(SC)を設置した。New SC では、三つのワーキンググループ(WG1,2,3)が作られ、文書化作業を開始した。

「Animal tissue and their derivatives utilized in the manufacture of medical devices」

Part 1: Analysis and management of risk. (WG1)

Part 2. Controls on sourcing, collection and handling. (WG2)

Part 3. Validation of the elimination and/or inactivation of viruses and transmissible agents. (WG3)

2004年6月28日—7月2日 Norway の Tromso で第1回目の会議を開催した。草案となった EN 文書が、内容も古いことから、全面的に加筆修正が行われつつある。

再生医療製品の製品化までには、多くの知識・技術が必要である。民間の調査レポートによれば、ある再生医療関連の米国企業は、5億ドルの開発研究費をかけながら、製品化後の売り上げは、0.2—0.3億ドルで、借金返済のめどがたらず倒産におこまれたと報告している。学会発表のみならず、国際市場で治療効果があり、販売価格相等に優良とみとめられる製品でない限り、持続的に売れる製品の事業化は困難であると思われる。そのためには、キーポイントとなる設計段階でのアイデアと合理的なコストダウンが必須となる。

また、今後、開発される必要性があるものとして、安全で機能的にも優れた生分解性材料があげられる。更に、抜いた歯を元どおりにする歯科再生治療が早期に実現することを期待しています。

#### 4. 医療機器フォーラム設立について

医療機器・医療材料の開発には, 医学, 薬学, 工学等, 異種分野の知識, 技術等を必要とします. 異種分野の専門化の横断的な交流による「安全で有用な医療機器開発」を目指し, 医療機器フォーラムを昨年度設立しました(2003年10月). 本年, 10月, 第2回医療機器フォーラムシンポジウムを開催しますので, 関係者への連絡をお願いいたします.

### 第二回医療機器フォーラム プログラム(案)

主催 医療機器フォーラム  
共催 日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会  
協賛 日本バイオマテリアル学会, 日本人工臓器学会, 日本組織工学会, 日本再生歯科医学会  
(学会依頼中)

日時: 平成16年10月23日(土)  
10:00~17:00  
場所: 日本科学未来館7階みらい CAN ホール  
(東京都江東区青海2丁目41番地)  
URL: <http://www.miraikan.jst.go.jp/>  
参加費: 6000円・学生2000円  
事前登録・支払方法等: 参加希望者は, 氏名, 連絡先等を電子メール([iryokiki@nihs.go.jp](mailto:iryokiki@nihs.go.jp))  
あるいは FAX03-3700-9196 で事前登録後, 振り込み口座をお知らせします.  
定員: 200名 (先着順登録, 定員になり次第×切.)

10:00~10:05(5分)

1. 開会の辞 長尾 拓  
国立医薬品食品衛生研究所 所長
2. 規制関連  
(座長 大和 雅之: 東京女子医科大学 先端生命医学研究所 助教授)  
(座長 増田 茂樹: 株式会社 カネカ)  
10:05~10:25(20分)
  - ① 医療機器審査全般(山本 弘史: 厚生労働

省 医薬食品局 医療機器審査管理室長)  
10:25~10:45(20分)

- ② 医療機器規制(安田 尚之: 厚生労働省 医薬食品局 医療機器審査管理室長補佐)  
10:45~11:05(20分)

- ③ 「より有効で」「より安全な」医療機器を「より早く」患者の皆様へお届けするために  
(木下 勝美: 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 医療機器審査部長)

3. 不具合対策講座  
(座長 浜田 良機: 山梨医科大学 整形外科学 教授)

(座長 片倉 健男: テルモ株式会社)  
11:05~11:25(20分)

- ① 医療用セラミックスの摩耗試験とその標準化

(池内 健: 京都大学 再生医科学研究所 教授)

11:25~11:45(20分)

- ② エンドトキシン汚染, 測定のポイントなど  
(配島 由二: 国立医薬品食品衛生研究所 療薬品部室長)

4. コンピューターシミュレーションによる先進的医療技術への貢献と課題  
(座長 堤 定美: 京都大学 再生医学研究所 教授)

(座長 小林 郁夫: 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所)

11:45~12:05(20分)

- ① セメントレス人工股関節開発へのコンピューターシミュレーション

(浜田 良機: 山梨医科大学 整形外科学 教授)

12:05~12:25(20分)

- ② 人工関節の固定法の最適化  
(馬淵 清資: 北里大学 医療衛生学部 教授)

12:25~12:45(20分)

- ③ インプラント系の Risk Simulation  
(堤 定美: 京都大学 再生医学研究所 教授)

12:45~13:45 昼食

5. 前臨床試験としての動物モデル(特徴と限界)

(座長 岡野 光夫: 東京女子医科大学 先端生命医学研究所 教授)

(座長 袴塚 康治: オリンパス光学工業株式会社)

13:45~13:55(10分)

- ① 総論 (土屋 利江:国立医薬品食品衛生研究所 療品部長)

ホームページ: <http://dmd.nihs.go.jp/iryokiki/>  
電子メール: [iryokiki@nihs.go.jp](mailto:iryokiki@nihs.go.jp)

13:55~14:15(20分)

- ② 動物実験の GLP と動物愛護について  
(宮脇 宏彰:新日本科学)

14:15~14:35(20分)

- ③ 大型動物(羊)による脊椎固定デバイス  
(プレート・スクリュー)の評価  
(伊東 学:北海道大学 整形外科 講師)

14:35~14:55(20分)

- ③ 脊椎疾患の動物モデルでの評価  
(四宮 謙一:東京医科歯科大学 整形外科 教授)

14:55~15:15(20分)

- ④ 人工骨の動物モデルの特徴と限界:評  
価方法の開発  
(中村 孝志:京都大学 整形外科 教授)

15:15~15:35(20分)

- ⑤ 軟骨評価の課題と将来展望  
(脇谷 滋之:信州大学 整形外科 講  
師)

15:35~16:00 休憩

#### 6. 新規材料

(座長 赤池 敏宏:東京工業大学 生命理工  
学 教授)

(座長 小川 哲朗:ペンタックス株式会社) 16:  
00~16:20(20分)

- ① 海からのコラーゲン  
(伊藤 博:株式会社 高研)

16:20~16:40(20分)

- ② 接着分子を利用したナノマテリアルの開  
発  
(赤池 敏宏:東京工業大学 生命理工学  
教授)

16:40~16:50(10分)

#### 7. ISOTC194 活動報告

(土屋 利江:国立医薬品食品衛生研究所 療  
品部長)

16:50~16:55(5分)

問い合わせ及び申込み先  
医療機器フォーラム事務局  
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1  
国立医薬品食品衛生研究所 療品部内  
Tel & FAX 03-3700-9196

## Enhancement of Hepatocyte Growth Factor-Induced Cell Scattering in *N*-Acetylglucosaminyltransferase III-transfected HepG2 Cells

Masashi HYUGA,\* Sumiko HYUGA, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, Shingo NIIMI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA

Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. Received January 9, 2004; accepted March 29, 2004; published online April 1, 2004

*N*-Acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III), which catalyzes the synthesis of a bisecting GlcNAc residue of *N*-glycans, is thought to be involved in the function of glycoproteins such as growth factor receptors. We investigated the effects of the overexpression of GnT-III on the hepatocyte growth factor (HGF) receptor c-Met, a glycoprotein, in human hepatocarcinoma HepG2 cells. GnT-III activity was elevated about 250-fold in HepG2 cells stably transfected with the GnT-III gene, whereas no significant change in GnT-III activity was observed in mock transfectants. Cell scattering assay revealed that HGF-induced cell scattering was enhanced depending on the GnT-III activities in the GnT-III transfectants. Western blot analysis and E-PHA lectin blot analysis showed that the level of c-Met protein was the same in both transfectants; however, the bisecting GlcNAc residue on c-Met was detected only in the GnT-III transfectants. Although the peak level of c-Met phosphorylation was not different in both transfectants, the level of tyrosine phosphorylation of c-Met decreased more rapidly in the GnT-III transfectants than in the mock transfectants. Furthermore, HGF-induced extracellular-regulated kinase (ERK) phosphorylation was slightly higher in the GnT-III transfectants than in the mock transfectants. These results show that overexpression of GnT-III in HepG2 cells enhances HGF-induced cell scattering, which may result from, at least in part, enhancement of HGF-induced ERK phosphorylation.

**Key words** *N*-acetylglucosaminyltransferase III; cell scattering; hepatocyte growth factor; c-Met; extracellular-regulated kinase (ERK)

*N*-Acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III; EC 2.4.1.144) is one of the glycosyltransferases and catalyzes the synthesis of a bisecting GlcNAc residue to the  $\beta$ -mannoside of the trimannose core in *N*-glycans.<sup>1)</sup> After introduction of the bisecting GlcNAc residue to the biantennary sugar chain, further processing and elongation of *N*-glycans by the other glycosyltransferases are suppressed,<sup>2–4)</sup> resulting in alterations of structure with reduction of size. It seems that GnT-III may affect the functions of various glycoproteins. In this respect, it is noteworthy that the overexpression of GnT-III affects receptor tyrosine kinases such as the epidermal growth factor (EGF) and NGF receptor Trk, followed by the modulation of signal transductions.<sup>5)</sup> EGF inhibits the growth of U373 MG glioma cells, while the overexpression of GnT-III causes the decreased binding of EGF to its receptor and then autophosphorylation of the receptor, resulting in the increase in the cell growth rate.<sup>6)</sup> In contrast, the overexpression of GnT-III in HeLaS3 cells does not affect EGF receptor autophosphorylation, but enhances internalization of the receptors, resulting in the increase of the EGF-induced phosphorylation of extracellular-regulated kinase (ERK).<sup>7)</sup> In PC 12 cells, nerve growth factor-stimulated Trk receptor autophosphorylation and signal transduction was disrupted by the overexpression of GnT-III.<sup>8)</sup> This evidence suggests that GnT-III may also affect the other growth factors-induced signal transduction by the modulation of the function of their receptors in some ways.

Since the expression of GnT-III is associated with many physiological and pathological processes in the liver, including its regeneration<sup>9)</sup> and hepatocarcinogenesis,<sup>10)</sup> it is assumed that GnT-III is involved in the processes via the modulation of some glycoproteins such as the receptor of the hepatocyte growth factor (HGF), c-Met. In the present study, we investigated the effects of the overexpression of GnT-III

on the scattering of human hepatocarcinoma HepG2 cells, a defined HGF-induced biological response.

### MATERIALS AND METHODS

**Materials** The recombinant human HGF was purchased from R&D systems (Minneapolis, MN, U.S.A.). The Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal calf serum (FCS), ampicillin, G418, Lipofectamine plus, and Opti-MEM were purchased from Life Technologies Inc. (Rockville, MD, U.S.A.). The human brain cDNA was purchased from Origene Technologies Inc. (Rockville, MD, U.S.A.). The mammalian expression vector pCI-neo was purchased from Promega (Madison, WI, U.S.A.). The protease inhibitors cocktail was purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, U.S.A.). The PVDF membrane was purchased from Millipore Corporation (Bedford, MA, U.S.A.). Biotinylated E-PHA was purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA, U.S.A.). Protein G-immobilized magnetic beads (BioMag Protein G) were purchased from Polysciences, Inc. (Warrington, PA, U.S.A.). The anti-human c-Met antibody (C-23), anti-phospho-ERK antibody (E-4) and anti-ERK antibody (K-23) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, U.S.A.). The monoclonal anti-phosphotyrosine antibody (PY20) was purchased from Transduction Laboratories (Lexington, KY, U.S.A.). The biotinylated anti-mouse IgG antibody, biotinylated anti-rabbit IgG antibody, peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG, and ECL chemiluminescence detection kit were purchased from Amersham-Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, U.S.A.). The vectastain ABC kit was purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA, U.S.A.). All other chemicals were obtained from commercial sources, and were of the highest purity available.

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: mhyuga@nihs.go.jp

**Cell Culture** Human hepatocarcinoma HepG2 cells were obtained from the Japanese Cancer Research Resources Bank (Tokyo, Japan). The HepG2 cells and GnT-III gene transfectants were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and 0.1 mg/ml of ampicillin under a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Following incubation for 1 d with serum-free DMEM, the cells were incubated with 50 ng/ml of HGF in serum-free DMEM.

**Expression Vector Construct, Gene Transfection, and Selection of Cells** The human GnT-III cDNA was amplified by PCR using human brain cDNA as a template. The cDNA fragment containing the entire coding sequence was inserted into the pCI-neo *EcoR* I site and the final construct, pCI-GnT-III, was obtained. The pCI-neo is a mammalian expression vector which includes the cytomegalovirus enhancer/promoter and the G418-resistant gene. HepG2 cells were plated in a 6-cm plastic culture dish at a density of  $1 \times 10^6$  cells/ml. After 24 h, the cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, and the medium was changed to serum-free Opti-MEM. The pCI-GnT-III vector or pCI-neo vector (20  $\mu$ g) was mixed with Lipofectamine plus, 100  $\mu$ l of which was added to the HepG2 cells. After 5 h incubation, the medium was changed to DMEM supplemented with 10% FCS. Stable transfectants were selected using 1 mg/ml G418.

**GnT-III Activity** The GnT-III activity was measured according to the methods described previously.<sup>11</sup> Briefly, cell pellets were homogenized in ice-cold PBS containing protease inhibitors, and the supernatant was obtained after removal of the nucleus fraction by centrifugation for 20 min at 900 $\times g$ . The GnT-III activity in the supernatant was assayed by high performance liquid chromatography methods using the fluorescence-labeled sugar chain (GlcNAc $\beta$ -1, 2-Man $\alpha$ -1, 6-[GlcNAc $\beta$ -1, 2-Man $\alpha$ -1, 3-] Man $\beta$ -1, 4-GlcNAc $\beta$ -1, 4-GlcNAc-pyridylamino) as a substrate. The substrate was prepared according to the method of Tokugawa *et al.*<sup>12</sup>

**Cell Scattering Assay** The HepG2 cells were plated in a 6-cm plastic culture dish at a density of  $5 \times 10^4$  cells/ml. The HepG2 cells were allowed to grow as discrete colonies for 2–3 d. The culture medium was then replaced with fresh DMEM medium containing 50 ng/ml HGF. After 24 h, the cells were observed under a phase contrast microscope.

**Immunoprecipitation and Western Blot Analysis** The cultured cells were washed twice with ice-cold PBS and disrupted in the lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.2, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM APMSF, 5 mM aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, and 10 mM iodoacetamide). The protein concentrations were determined using a protein assay kit (Bio-Rad, CA, U.S.A.). The cell-free lysates (1 mg) were immunoprecipitated with the anti-human c-Met antibody and protein G-immobilized magnetic beads (BioMag Protein G). For Western blot analysis, whole cell lysates or immunoprecipitates were subjected to 6 or 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions, and then transferred to a PVDF membrane. The blot was blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBST). For the detection of c-Met, the blot was incubated with anti-human c-Met antibody, and biotinylated anti-rabbit IgG antibody. For the detection of the phosphorylated tyrosine residues of c-Met, the blot was incubated

with a monoclonal anti-phosphotyrosine antibody, and peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG. For the detection of phosphorylated ERK1/2, the blot was incubated with anti-ERK antibody, and biotinylated anti-mouse IgG antibody. Biotinylated antibody was detected using a Vectastain ABC-kit, and the blots were developed using the ECL chemiluminescence detection kit according to the manufacturer's instructions.

**Lectin Blot Analysis** Immunoprecipitated c-Met were subjected to 6% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes, as described above. The blot was blocked with 1% BSA in TBST and then incubated with 1  $\mu$ g/ml biotinylated erythroagglutinating phytohemagglutinin (E-PHA) in TBST for 1 h at room temperature. After washing with TBST, the lectin-reactive proteins were detected using a Vectastain ABC kit and the ECL chemiluminescence detection kit.

## RESULTS

**Establishment of HepG2 Cell Lines Stably Expressing GnT-III** The GnT-III expression vector pCI-GnT-III was transfected into the HepG2 cells. The G418-resistant cells were screened as candidates of the GnT-III transfectants. Two randomly selected G418-resistant clones were evaluated for GnT-III activity. The clones expressing moderately and highly were designated HepG2-III<sub>m</sub> and HepG2-III<sub>h</sub>, respectively. A pCI-neo vector transfectant, designated as HepG2-mock, was also established as a negative control. The GnT-III activity in the HepG2-III<sub>m</sub> and HepG2-III<sub>h</sub> cells was significantly elevated about 20- and 250-fold, respectively, whereas the activity in the HepG2-mock cells did not differ significantly among the parental HepG2 cells (Table 1).

**Enhancement of HGF-Induced Cell Scattering in GnT-III Transfectants** To determine the effect of the overexpression of GnT-III on the HGF-induced cell scattering, the GnT-III transfectants and mock transfectants were examined. When the HepG2-mock cells were cultured, they showed a cobble-stone shape and had formed colonies of the cells (Fig. 1A). No significant difference in cell morphology of the GnT-III transfectants was observed (Figs. 1B, C). HepG2-mock cells scattered following cell-cell dissociation by the stimulation with HGF (Fig. 1D). The cell scattering of the GnT-III transfectants was more pronounced than the HepG2-mock cells; the enhancement of cell scattering was most pronounced in the HepG2-III<sub>h</sub> cells that had a high GnT-III activity (Figs. 1E, F).

**Analysis of c-Met of GnT-III Transfectants** The expression levels of the c-Met protein in GnT-III transfectants were analyzed by Western blot analysis. No significant change of the level of c-Met was observed (Fig. 2). To analyze the alterations of the *N*-glycan structure on c-Met, E-

Table 1. Enzyme Activities of GnT-III in Mock- and GnT-III Transfected HepG2 Cells

Cell line	GnT-III activity [pmol/h/mg protein]
HepG2	79 $\pm$ 30
HepG2-mock	149 $\pm$ 50
HepG2-III <sub>m</sub>	1400 $\pm$ 260
HepG2-III <sub>h</sub>	19600 $\pm$ 1350

Data were mean $\pm$ S.E. of three separate experiments.

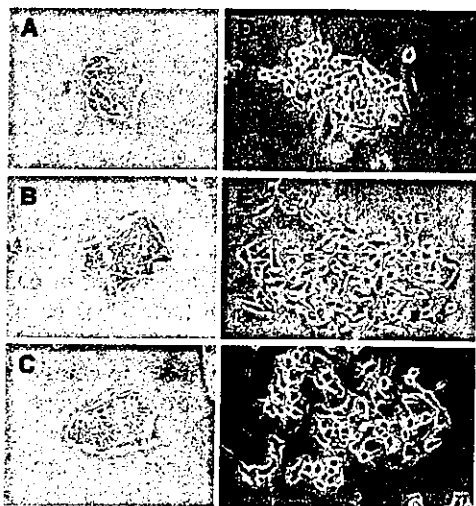


Fig. 1. HGF-Induced Cell Scattering in HepG2-Mock Cells and GnT-III Transfected HepG2 Cells

HepG2 mock-cells (A, D), HepG2-IIIh cells (B, E), and HepG2-IIIh cells (C, F) were cultured with (D, E, F) or without (A, B, C) HGF (50 ng/ml) for 24 h. Representative fields were photographed using a phase-contrast microscope.

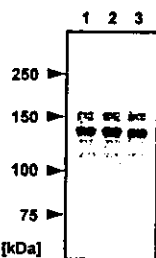


Fig. 2. Western Blot Analysis of c-Met

Total cell lysates from HepG2-mock cells (lane 1), HepG2-IIIh cells (lane 2), and HepG2-IIIh cells (lane 3) were subjected to 6% SDS-PAGE and then transferred to PVDF membrane. The blots were probed with anti-c-Met antibody.

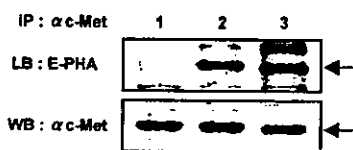


Fig. 3. Lectin Blot Analysis of c-Met

c-Met was immunoprecipitated from cell lysates of HepG2-mock cells (lane 1), HepG2-IIIh cells (lane 2), and HepG2-IIIh cells (lane 3). Immunoprecipitates were subjected to 6% SDS-PAGE and then transferred to PVDF membrane. The blots were probed with E-PHA (upper panel) or anti-c-Met antibody (lower panel). Arrows indicate c-Met.

PHA lectin blot analysis was performed. E-PHA binds specifically to bisecting GlcNAc residues.<sup>13</sup> Immunoprecipitated c-Met from the HepG2-IIIh cells and the HepG2-IIIh cells showed significant reactivity of E-PHA (Fig. 3), showing that *N*-glycan on c-Met was modified with bisecting GlcNAc residues. It was noted that the apparent molecular size of c-Met from the HepG2-IIIh cells were smaller than that from the HepG2-mock cells. The following experiments were performed with HepG2-IIIh cells and HepG2-mock cells.

**Tyrosine Phosphorylation of c-Met in Gn T-III Transfectants** To determine the effect of the GnT-III transfection on HGF signaling, HGF-induced tyrosine phosphorylation of

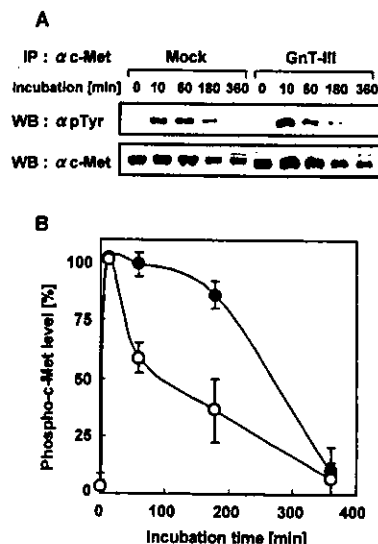


Fig. 4. The Time Course of the Tyrosine Phosphorylation of c-Met

(A) Cells were harvested at the indicated time after HGF treatment (50 ng/ml). c-Met, immunoprecipitated from the cell lysates of HepG2-mock cells (●) and HepG2-IIIh cells (○) were subjected to 6% SDS-PAGE and then transferred to a PVDF membrane. The blot was probed with anti-phosphotyrosine antibody (upper panel) or anti-human c-Met antibody (lower panel). One representative result of three separate experiments is shown. (B) The intensities of the bands obtained with phosphorylated c-Met were normalized to the intensities of the c-Met bands. These values are shown as percentages of the level of c-Met phosphorylation in HepG2-mock cells treated with HGF for 10 min (mean ± S.E., three separate experiments).

c-Met in HepG2-IIIh cells and HepG2-mock cells were examined. The c-Met phosphorylation level reached a peak by 10 min after the HGF treatment in each transfectant. Although no difference in the peak level of c-Met phosphorylation between the HepG2-IIIh cells and HepG2-mock cells was observed, the level of c-Met phosphorylation in the HepG2-IIIh cells was reduced more rapidly than in the HepG2-mock cells (Fig. 4).

**ERK Activation in GnT-III Transfectants** To further clarify the effect of the GnT-III transfection on HGF signaling, the HGF-induced phosphorylation of ERK in the HepG2-IIIh cells and HepG2-mock cells was also examined. The time course of the tyrosine phosphorylation of ERK showed that the phosphorylated ERK level reached a peak by 10 min after treatment in each transfectant. The peak level in the HepG2-IIIh cells was slightly higher than in the HepG2-mock cells (Fig. 5).

DISCUSSION

In this paper we investigated the effects of the overexpression of GnT-III on the scattering of human hepatocarcinoma HepG2 cells, a defined HGF-induced biological response, since the function of the HGF receptor c-Met could be modulated by GnT-III transfection followed by the alteration of its biological functions, as described in the "INTRODUCTION" section. The results showed that GnT-III gene transfection increases GnT-III activity by about 250 fold, followed by a significant increase of E-PHA reactivity with c-Met (Fig. 3), indicating that the transfection of GnT-III increased the amount of bisecting oligosaccharide residue on c-Met. In addition, the molecular size of c-Met in the HepG2-IIIh cells was smaller than that in the HepG2-mock cells (Figs. 2, 3), suggesting that an elongation of *N*-glycans on c-Met was

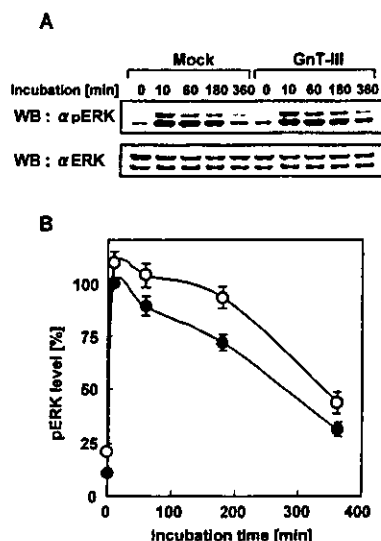


Fig. 5. The Time-Course of the Tyrosine Phosphorylation of ERK

(A) Cells were stimulated with 50 ng/ml HGF and harvested at the indicated times. Whole cell lysates of HepG2-mock cells (●) and HepG2-IIIh cells (○) were subjected to 10% SDS-PAGE and then transferred to a PVDF membrane. The blot was probed with anti-phospho-ERK antibody (upper panel) or anti-ERK antibody (lower panel). One representative result of three separate experiments is shown. (B) The intensities of the bands obtained with phospho-ERK were normalized to the intensities of the ERK bands. These values are shown as percentages of the level of ERK phosphorylation in HepG2-mock cells treated with HGF for 10 min (mean  $\pm$  S.E., three separate experiments).

suppressed by the bisecting GlcNAc residue. The same observation has been shown in various glycoproteins such as the EGF receptor,<sup>7)</sup> E-cadherin,<sup>14,15)</sup> and CD44.<sup>16)</sup>

We investigated the effect of the overexpression of GnT-III on HGF-induced cell scattering using these transfectants, because cell scattering is one of the HGF-induced biological responses and an important component of several physiological and pathological processes. We found that HGF-induced cell scattering in the GnT-III transfectants was enhanced depending on the GnT-III activities. As far as we know, this is the first report of the enhancing effect of HGF-induced cell scattering by the overexpression of GnT-III.

To confirm the effect of GnT-III overexpression on HGF signaling, we first investigated the effect on the HGF-induced tyrosine phosphorylation of c-Met in GnT-III transfectants. Unexpectedly, the peak level of the tyrosine phosphorylation of c-Met did not change by GnT-III. In addition, the level of c-Met phosphorylation was reduced quite a bit more rapidly than that in the HepG2-mock cells. Previous studies shown that HGF stimulation also leads to down-regulation of the receptor.<sup>17)</sup> We assume that the rapid dephosphorylation was caused by up-regulated HGF signaling.

We further examined the effects on the HGF-induced phosphorylation of ERK, because ERK activation is associated with HGF-induced cell scattering.<sup>18)</sup> The ERK phosphorylation was slightly enhanced by the GnT-III overexpression, showing that the enhancement of cell scattering involves the up-regulation of the HGF-induced ERK phosphorylation. The mechanisms by which GnT-III overexpression affects ERK activation is now under investigation. It has been shown that GnT-III overexpression enhances the EGF-induced ERK phosphorylation in HeLaS3 cells by up-regulation of the internalization rate of the receptors.<sup>7)</sup> A possible mechanism by which GnT-III overexpression enhances HGF-in-

duced ERK phosphorylation is that GnT-III affects c-Met internalization.

In this study, we demonstrated that GnT-III overexpression increased the amount of bisecting oligosaccharide structures and shortened the *N*-glycans associated with c-Met. Lectin blot analysis of total showed that *N*-glycans of the other glycoproteins were also changed by GnT-III overexpression (data not shown). Therefore, the glycoproteins involved in cell scattering, such as E-cadherin and integrin, are candidate proteins for involvement in the enhancement of cell scattering by GnT-III overexpression. In fact, it has been reported that GnT-III overexpression affects their biological functions.<sup>14,15,19)</sup> Further study is needed to clarify the mechanism involved in the enhancement of cell scattering.

In evaluating the significance of the present results, it seems worthwhile to examine the relation of the change of GnT-III with the action of HGF *in vivo*. In the normal rat liver, GnT-III activity is very low. However, the activity increased about 4-fold in regenerating rat liver.<sup>9)</sup> HGF is induced in regenerating rat liver, and stimulates hepatocyte growth. In addition, it was shown that hepatocarcinoma exhibited a high level of GnT-III activity, whereas normal liver contains very little.<sup>20)</sup> Autocrine HGF signaling leads to abnormal malignant progression.<sup>21)</sup> Therefore, the increase of GnT-III may contribute to liver regeneration and hepatocarcinoma progression by the enhanced HGF signal.

In conclusion, we demonstrated that the overexpression of GnT-III caused the enhancement of HGF-induced cell scattering, and suggest that the enhancement of cell scattering involves, at least in part, enhancement of the HGF-induced ERK phosphorylation.

**Acknowledgments** This work was supported by a grant-in-aid for research on health sciences focusing on drug innovation from the Japan Health Sciences Foundation.

## REFERENCES

- 1) Nishikawa A., Ihara Y., Hatakeyama M., Kangawa K., Taniguchi N., *J. Biol. Chem.*, **267**, 18199—18204 (1992).
- 2) Easton E. W., Bolscher J. G., van den Eijnden D. H., *J. Biol. Chem.*, **266**, 21674—21680 (1991).
- 3) Gu J., Nishikawa A., Tsuruoka N., Ohno M., Yamaguchi N., Kangawa K., Taniguchi N., *J. Biochem. (Tokyo)*, **113**, 614—619 (1993).
- 4) Sasai K., Ikeda Y., Eguchi H., Tsuda T., Honke K., Taniguchi N., *FEBS Lett.*, **522**, 151—155 (2002).
- 5) Stanley P., *Biochim. Biophys. Acta*, **1573**, 363—368 (2002).
- 6) Rebbaa A., Yamamoto H., Saito T., Meuillet E., Kim P., Kersey D. S., Bremer E. G., Taniguchi N., Moskal J. R., *J. Biol. Chem.*, **272**, 9275—9279 (1997).
- 7) Sato Y., Takahashi M., Shibukawa Y., Jain S. K., Hamaoka R., Miyagawa J., Yaginuma Y., Honke K., Ishikawa M., Taniguchi N., *J. Biol. Chem.*, **276**, 11956—11962 (2001).
- 8) Ihara Y., Sakamoto Y., Mihara M., Shimizu K., Taniguchi N., *J. Biol. Chem.*, **272**, 9629—9634 (1997).
- 9) Miyoshi E., Ihara Y., Nishikawa A., Saito H., Uozumi N., Hayashi N., Fusamoto H., Kamada T., Taniguchi N., *Hepatology*, **22**, 1847—1855 (1995).
- 10) Miyoshi E., Nishikawa A., Ihara Y., Gu J., Sugiyama T., Hayashi N., Fusamoto H., Kamada T., Taniguchi N., *Cancer Res.*, **53**, 3899—3902 (1993).
- 11) Nishikawa A., Fujii S., Sugiyama T., Taniguchi N., *Anal. Biochem.*, **170**, 349—354 (1988).
- 12) Tokugawa K., Oguri S., Takeuchi M., *Glycoconj. J.*, **13**, 53—56 (1996).
- 13) Yamashita K., Hitoi A., Kobata A., *J. Biol. Chem.*, **258**, 14753—14755



- (1983).
- 14) Yoshimura M., Ihara Y., Matsuzawa Y., Taniguchi N., *J. Biol. Chem.*, **271**, 13811—13815 (1996).
  - 15) Kitada T., Miyoshi E., Noda K., Higashiyama S., Ihara H., Matsuura N., Hayashi N., Kawata S., Matsuzawa Y., Taniguchi N., *J. Biol. Chem.*, **276**, 475—480 (2001).
  - 16) Sheng Y., Yoshimura M., Inoue S., Oritani K., Nishiura T., Yoshida H., Ogawa M., Okajima Y., Matsuzawa Y., Taniguchi N., *Int. J. Cancer*, **73**, 850—858 (1997).
  - 17) Hammond D. E., Carter S., McCullough J., Urbe S., Vande Woude G., Clague M. J., *Mol. Biol. Cell.*, **14**, 1346—1354 (2001).
  - 18) Sipeki S., Bander E., Buday L., Farkas G., Bacsy E., Ways D. K., Farago A., *Cell Signal*, **11**, 885—890 (1999).
  - 19) Isaji T., Gu J., Nishiuchi R., Zhao Y., Takahashi M., Miyoshi E., Honke K., Sekiguchi K., Taniguchi N., *J. Biol. Chem.*, in press (2004).
  - 20) Nishikawa A., Fujii S., Sugiyama T., Hayashi N., Taniguchi N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **152**, 107—112 (1988).
  - 21) Vande Woude G. F., Jeffers M., Cortner J., Alvord G., Tsarfaty I., Resau J., *Ciba Found. Symp.*, **212**, 119—130; discussion 130—112, 148—154 (1997).

## LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングによるグライコーム解析

川崎ナナ・橋井則貴・伊藤さつき・日向昌司・川西 徹・早川堯夫

## SUMMARY

Liquid chromatography/mass spectrometry equipped with a graphitized carbon column is useful for the simultaneous analysis of oligosaccharides. By using capillary column and nano-electrospray ion source, the method can be used for the oligosaccharide profiling of sub microgram quantities of glycoproteins. This oligosaccharide profiling is expected to be a powerful tool for the glycome analysis. We demonstrate a potential application of oligosaccharide profiling in glycomics with two examples, the structural analysis of *N*-linked oligosaccharides from a gel-separated glycoprotein, and the differential analysis of *N*-linked oligosaccharides in cells.

Key words: LC/MS, oligosaccharide profiling, 2-dimensional electrophoresis, glycomics.

## はじめに

糖タンパク質の糖鎖の構造や不均一性は、発生・加齢・疾病等に関連して変化することが知られている<sup>1)</sup>。しかし、従来のプロテオミクス的アプローチ、すなわち、2次元電気泳動 (2-DE) 等でタンパク質発現量を比較し、差異の認められたタンパク質を質量分析法 (MS) とデータベース検索により同定するという方法<sup>2)</sup>では、糖鎖の変化によって引き起こされる生命現象を捉えることはできない。糖タンパク質の糖鎖部分に関係する様々な現象を解明するには、糖鎖の定性的・定量的解析に基づくグライコーム解析技術の開発が不可欠である。

MSと液体クロマトグラフィー (LC) をオンラインで結んだ LC/MS は、分子量情報だけでなく、多くの異性体が存在する糖鎖の詳細な構造や不均一性に関する情報を提供してくれることから、今後、糖鎖生物学分野においても有力なツールとなることが期待されている。我々は、極性物質の吸着能が高く、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) に適した溶媒で糖鎖を分離・溶出できるグラファイトカーボンカラム (GCC) を用いることによって、高マンノース型、複合型、混成型糖鎖や、酸性糖鎖、中性糖鎖など様々な糖鎖

を一度に分離・検出できる糖鎖プロファイリング法を開発した<sup>3,4)</sup>。この糖鎖プロファイリング法は、グライコーム解析の様々なステップにおいても役立つと思われる。本稿では、グライコーム解析における糖鎖プロファイリングの可能性として、2-DE で分離されたゲル内糖タンパク質の糖鎖構造解析に応用した例と、細胞発現糖タンパク質の糖鎖の差異解析に応用した例を紹介する。

## I. ゲル内糖タンパク質の糖鎖構造解析

## 1. 糖鎖プロファイリング法の微量化

一般に 2-DE とクマシーブルー (CBB) 染色によって検出可能な糖タンパク質量は 1 μg 程度といわれているが、ゲルからの回収率や操作中の損失等を考慮に入れると、サブマイクログラムのタンパク質に由来する糖鎖を解析できる分析システムが必要となる。そこで、キャピラリーカラムとナノスプレーイオン源を用いて、糖鎖プロファイリングの微量化を検討した。

NS0 細胞産生遺伝子組換え型ヒト肝細胞増殖因子 (HGF) に *N*-グリコシダーゼ F (PNGase F) を作用させて *N* 結合糖鎖を切り出し、anomer の分離を避けるため NaBH<sub>4</sub> で還元した。200 ng の HGF に由来する糖鎖を GCC-LC/MS を

Glycome analysis by oligosaccharide profiling using liquid chromatography/mass spectrometry.

Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Satsuki Itoh, Masashi Hyuga, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa; 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

Correspondence address: Nana Kawasaki; Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

第 53 回日本電気泳動学会シンポジウム

(受付 2003 年 11 月 13 日, 受理 2003 年 11 月 20 日, 刊行 2004 年 3 月 15 日)

用いて分析したところ、トータルイオンクロマトグラム (TIC) 上に2つの大きなピークと、複数の小さいピークが確認された (Fig. 1A)。ピーク A は、マススペクトル (Fig. 1B)、及びプロダクトイオンスペクトル (Fig. 1C) から、*N*-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) 及びヘキソース (Hex)-Hex を部分構造とする複合型糖鎖であることが示唆された。他のピークについても同様に、NeuGc 及び Hex-Hex 構造が存在することが推定された。そこで、Hex-Hex 構造を確認するため、糖鎖を  $\alpha$ -ガラクトシダーゼで消化し、再度 LC/MS で分析を行ったところ、Fig. 1A 上で検出されたピークが消失し、新たに複数のピークが出現することが確認された。これらのピークの分子量は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ消化前の糖鎖から Gal が 1 または 2 分子消失した糖鎖の分子量に一致することから、HGF の非還元末端には 1 または 2 分子の Gal が  $\alpha$  結合していることが確認された<sup>5)</sup>。NS0 細胞産生糖タンパク質には Gal $\alpha$ 1-3Gal を含む糖鎖が結合していることが報告されており<sup>6,7)</sup>、今回検出された Hex-Hex も Gal $\alpha$ 1-3Gal 結合であると推定された。これらのことから、ピーク A の糖鎖構造は Fig. 1C 上図のように推定され、他のピークについても、NeuGc 及び Gal $\alpha$ 1-3Gal 結合を部分構造とする複合型糖鎖であると考えられた。

以上のように、キャピラリーカラムとナノスプレーイオ

ン源を用いることによって、サブマイクログラムの糖タンパク質の糖鎖のプロファイリングが可能となった。また、LC/MS/MS、及びエキソグリコシダーゼ消化と LC/MS を組み合わせることによって、より詳細な構造情報が得られることが確認された。

## 2. ゲル内糖タンパク質の糖鎖構造解析

つぎに、GCC-LC/MS を用いた電気泳動ゲル内糖タンパク質の糖鎖のプロファイリングを検討した。2  $\mu$ g のヒト黒色腫細胞産生ヒト組織プラスミノゲンアクチベータ (tPA) を SDS-PAGE で展開し (Fig. 2A)、ゲル内 PNGase F 消化により糖鎖を切り出した。NaBH<sub>4</sub> 還元糖鎖を LC/MS で分析したところ Fig. 2B のような糖鎖プロファイルが得られ、ゲルから抽出された tPA の糖鎖の分離パターンは、泳動前の分離パターンとほぼ同様であることが確認された。

以上のように、CBB 染色される程度の糖タンパク質があれば、ゲル内タンパク質であっても、GCC-LC/MS による糖鎖プロファイリングが可能であることが確認された。ゲル内タンパク質糖鎖の解析法として、2-aminobenzamide 誘導体化後、イオン交換や順相 LC で分離し、オフライン MALDI-TOFMS で解析する手法が報告されている<sup>8)</sup>。我々は、GCC-LC/MS を用いた解析は誘導体化における糖鎖の分解が生じ

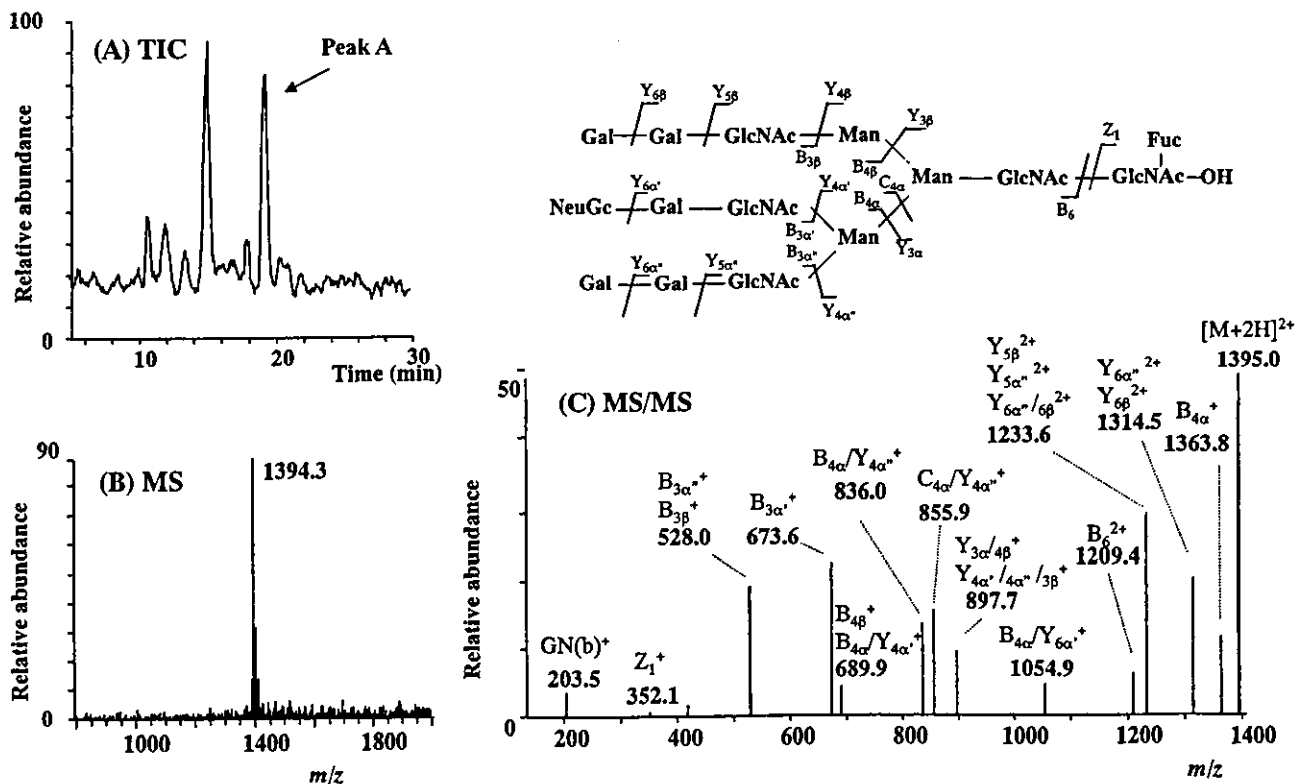


Fig. 1. (A) GCC-LC/MS によって得られた HGF の糖鎖プロファイル, (B) ピーク A のマススペクトル, (C) ピーク A のプロダクトイオンスペクトル及び推定構造

カラム, Hypercarb (0.2 $\times$ 150 mm); 流速, 3  $\mu$ l/min; 溶離液, 5 mM 酢酸アンモニウム/H<sub>2</sub>O-アセトリル; MS, TSQ-7000 (Thermoelectron)

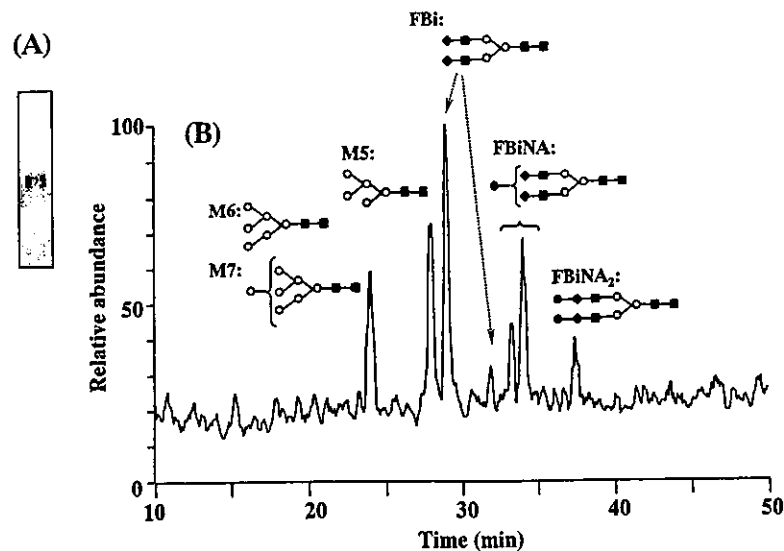


Fig. 2. (A) tPA (2  $\mu$ g) の SDS-PAGE, (B) GCC-LC/MS によるゲル内 tPA 由来糖鎖のプロファイル

ないこと、1 回の LC で異性体を含む様々な糖鎖を分離できること、ESI を用いているのでシアル酸結合糖鎖や硫酸化糖鎖の解析にも応用できること、オンライン MS による簡便・迅速な分析が可能で、マイナー成分の取りこぼしがないこと等の利点があると考えている。

## II. 細胞・組織発現糖タンパク質糖鎖の差異解析

### 1. 糖鎖の差異解析

疾患組織と健常組織に発現している糖タンパク質の糖鎖の分布を直接比較し、疾患関連糖鎖遺伝子や糖タンパク質を見つけ出すことができれば、新たな診断法の開発や糖鎖と疾患の関係の解明につながるものと期待される。そこで、GCC-LC/MS を用いて、簡単な操作と実行可能なサンプル量で、サンプル間の糖鎖の差異解析を行うことを検討した。モデルとして、糖鎖遺伝子導入によって糖鎖の構造と分布が変化していることが予想される細胞を用いた。N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) は、複合型 2 本鎖糖鎖に bisecting GlcNAc を付加する糖転移酵素で、細胞接着や癌転移と関係があることが報告されている<sup>9-11)</sup>。ここでは、GnT-III 遺伝子を導入した CHO 細胞を病態モデルとして、糖鎖プロファイリング法によって糖鎖の変動を捉えることができるかどうかを検証した。

$5 \times 10^6$  個程度の CHO 細胞と GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞を界面活性剤処理し、膜画分及び可溶性画分に分離した。それぞれの画分から PNGase F によって糖鎖を切り出し、 $\text{NaBH}_4$  で還元後、LC/MS によるプロファイリングを行った。Fig. 3A は CHO 細胞の膜画分の糖鎖プロファイルである。各ピークのマススペクトルから、CHO 細胞の膜タンパク質に付加している糖鎖は高マンノース型糖鎖とシアル酸が結合した複合型 2 本鎖糖鎖が中心で、さらに混成型、

トリマンノシルコア部分のみの糖鎖や、1 本鎖糖鎖などの比較的小さな糖鎖も結合していることが確認された。

Fig. 3B は、GnT-III 遺伝子導入細胞の膜画分の糖鎖プロファイルで、矢印で示す位置に CHO 細胞からは検出されない新たなイオンが検出された。GCC で糖鎖を分離した場合、bisecting GlcNAc が付加した糖鎖は付加されていない糖鎖より早く溶出される傾向がある。GnT-III 遺伝子導入によって新たに出現した糖鎖の分子量は、その後溶出された 2 本鎖糖鎖の分子量より N-アセチルヘキソサミン (HexNAc) 1 分子分増加していることから、bisecting GlcNAc を有する 2 本鎖糖鎖であることが示唆された。

同様に可溶性画分についても糖鎖プロファイリングを行ったところ、膜画分とは異なるパターンが得られ、マススペクトルから、可溶性タンパク質に結合している糖鎖は主に高マンノース型であることがわかった。また、膜ほどではないが、GnT-III 遺伝子導入細胞の可溶性画分からも bisecting GlcNAc が付加していると思われる糖鎖が検出された。

Fig. 4 は CHO 細胞、及び GnT-III 遺伝子導入 CHO 細胞から切り出された主な糖鎖のピーク面積をアシアロ 2 本鎖糖鎖のピーク面積を 1.0 として相対的に表したもので、糖鎖分布の変化を示している。このグラフから、GnT-III の発現によって bisecting GlcNAc が付加したと思われる糖鎖は出現するものの、糖鎖全体の分布に大きな変化は生じていないことがわかる。これは、GnT-III 発現によって糖鎖構造に変化が生じたタンパク質が全体の一部であることを示唆していると考えられる。このように、GCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングは糖鎖の構造や分布の違いを簡単に識別できることから、健常及び病態サンプル間の糖鎖の差異解析法として有用であると思われる。