

Gal-GlcNAc-Man<sup>+</sup> , Man-Man-GlcNAc<sup>+</sup> ) , 819(B<sub>6</sub>/Y<sub>6x</sub><sup>2+</sup>) , 1513(B<sub>6</sub>/Y<sub>6x</sub><sup>2+</sup>) , 1432(B<sub>6</sub>/Y<sub>6x</sub><sup>2+</sup>) , 1330(B<sub>6</sub>/Y<sub>4x</sub><sup>2+</sup>) , 並びに 81<sup>2+</sup>(Gal, Man) , 101<sup>2+</sup>(GlcNAc)及び146<sup>2+</sup>(NeuAc)間隔のYイオンが検出された。これに対してネガティブイオンモードのMS<sup>2</sup>及びMS<sup>3</sup>ではシアル酸が解離したYイオンが選択的に検出され、シアル酸の結合数や分子種などの確認に役立つことが分かった。テトラシアロ糖鎖のMS<sup>4</sup>ではTetraNA<sub>2</sub>に由来するB及びYイオンに加え、 $m/z$  470(C<sub>2x</sub><sup>-</sup>) , 1322(Z<sub>6x</sub><sup>2-</sup>, [Y<sub>6x</sub>·H<sub>2</sub>O]<sup>2-</sup>) , 1241(Z<sub>5x</sub><sup>2-</sup>, [Y<sub>5x</sub>·H<sub>2</sub>O]<sup>2-</sup>) 及び 1057(Y<sub>5x</sub><sup>-</sup>/Z<sub>4x</sub><sup>2-</sup>, Y<sub>4x</sub>/Z<sub>5x</sub><sup>2-</sup>, Y<sub>4x</sub><sup>-</sup>/Z<sub>5x</sub><sup>2-</sup>, Y<sub>5x</sub><sup>-</sup>/Z<sub>4x</sub><sup>2-</sup>, [Y<sub>4x</sub>/Y<sub>5x</sub>·H<sub>2</sub>O]<sup>2-</sup>, [Y<sub>4x</sub>/Y<sub>5x</sub>·H<sub>2</sub>O]<sup>2-</sup>)などのC及びZイオンや、内部解離イオン及び環解裂イオンと推定されるイオン等、構造解析に有用なフラグメントイオンが検出され、多くの構造情報が得られることが分かった。

同様に、Tri及びTriNA<sub>3</sub>の分析においても、ポジティブ及びネガティブ両イオンモードにおけるMS<sup>n</sup>測定によって、糖鎖解析に有用なフラグメントイオンを検出することができた。

以上のように、LinerITMS-FT-ICRMSを用いることによって、従来法より精密かつインフォーマティブな改良型糖鎖プロファイリング法を開発することに成功した。また、この糖鎖プロファイリング法を用いた場合、単糖組成を正確に算出できること、ポジティブ及びネガティブイオンモードの切り替えによる連続自動的MS<sup>n</sup>測定によって、一方のイオン化モードではイオン化しにくい糖鎖を見落とすことなく検出し、糖鎖の配列情報が得られることが確認された。そこでつぎに、本分析法を細胞治療用医薬品が発現する糖タンパク質の解析に応用することを目的として、ラット脳由来糖タンパク質を用いて、本分析法の有用性を検証した。

## (2) GCC-LC/liner ITMS-FT ICRMSによるSDS-PAGEで分離されたThy-1の糖鎖プロファイリング

一般的にある特定のタンパク質は、モノクローナル抗体等を用いたアフィニティークロマトグラフィーを含む数段階の過程を経て精製される。しかし、

細胞治療用医薬品においては、目的タンパク質の抗体の入手が困難である場合や、目的タンパク質が極めて微量である場合など、アフィニティー精製が難しいケースが生じることが予想される。そこで、どのような微量タンパク質にも対応できる迅速精製法として、2次元電気泳動が期待されている。本研究では、可溶性GPIアンカー型タンパク質を細胞発現糖タンパク質のモデルとして、ラット脳より簡単な分画とSDS-PAGEによって分離した後、プロテオミクスの方法を用いて目的タンパク質と同定されたタンパク質を回収し、糖鎖分析に用いることを検討した。

図5に示すように、SDS-PAGEの結果、ゲル上には複数のタンパク質のバンドが検出された。各バンドを切り出し、ゲル内トリプシン消化によって得られたペプチドをLC/MS/MS分析し、タンパク質検索を行った。その結果、20-25 kDaのバンドが目的のThy-1と同定された。Thy-1のバンドからゲル内PNGase F消化によりN-結合型糖鎖を遊離させた後、NaBH<sub>4</sub>で還元し、還元化糖鎖とした。そして、liner ITMS-FT ICRMSを用いて、Thy-1由来糖鎖のプロファイリングを行った。

図6は、ポジティブ(赤色表示)及びネガティブ(青色表示)イオンモードにおけるFT ICRMS full MS scanで得られた糖鎖プロファイルの2D表示を重ね合わせたものである。この図から、多種類のN-結合型糖鎖がThy-1に結合していることが明らかとなった。また、FT ICRMSによって得られた精密質量より、これらの糖鎖の単糖組成を決定することができた。例えば、モノシアロ糖鎖 *a* (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>3</sub>HexNAc<sub>ol1</sub>, 理論分子量: 2095.76) と、ジフコシル糖鎖 *b* (dHex<sub>2</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>3</sub>HexNAc<sub>ol1</sub>, 理論分子量: 2096.78)のように、NeuAc 1分子を持つ糖鎖とFuc 2分子を持つ糖鎖の場合、分子量差はわずか1 Daであり、これらの糖鎖が多価イオンで検出されたとき、両者の識別は難しいとされてきた。しかし、高精密かつ高分解能測定が可能であるFT ICRMSを用いた場合、図6の挿入図に示すように、これら2分子は明確に識別され、容易に単糖組成を決定す

ることができた。その結果、Thy-1 に結合する糖鎖の単糖組成は NeuAc<sub>0-3</sub>dHex<sub>0-3</sub>Hex<sub>3-8</sub>HexNAc<sub>1-5</sub>HexNAc<sub>ol1</sub> と決定された。

Thy-1 由来糖鎖の分析においても、ポジティブ、またはネガティブイオンモードのいずれか一方によってのみ検出される糖鎖の存在が確認された。例えば、Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>4</sub>HexNAc<sub>ol1</sub> ( $m/z$  762<sup>2+</sup>) 及び Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>3</sub>HexNAc<sub>ol1</sub> ( $m/z$  822<sup>2+</sup>) は、ポジティブイオンモードでのみ検出され、シアル酸を含む NeuAc<sub>3</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>4</sub>HexNAc<sub>ol1</sub> ( $m/z$  1440<sup>2+</sup>), dHex<sub>1</sub>NeuAc<sub>2</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>5</sub>HexNAc<sub>ol1</sub> ( $m/z$  1387<sup>2+</sup>) 及び dHex<sub>2</sub>NeuAc<sub>2</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>HexNAc<sub>ol1</sub> ( $m/z$  1542<sup>2+</sup>) は、ネガティブイオンモードでのみ検出された。これらの結果は、両イオンモードの切り換えによる連続分析が有用であることを示すものである。

本分析法を用いた糖鎖プロファイリングの結果、ラット脳 Thy-1 には、ハイマンノース型糖鎖(Man<sub>5</sub>, Man<sub>6</sub>, Man<sub>7</sub> 及び Man<sub>8</sub>), NeuAc 0-3 分子及び Fuc 0-3 分子を含む多数の複合型及び混成型糖鎖が結合していることが分かった。

### (3) GCC-LC/liner ITMS による Thy-1 の糖鎖配列解析

データ依存的 MS/MS スペクトルから、Thy-1 糖鎖の配列を決定した。図 7 に、結合位置の異なる 2 分子の Fuc を持つ糖鎖の解析例を、図 8 に、結合位置の異なる 2 分子の NeuAc を持つ糖鎖の解析例を示す。

図 7A は、ポジティブイオンモードで測定されたフコースを 2 分子有する 2 本鎖型糖鎖 dHex<sub>2</sub>Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>3</sub>HexNAc<sub>ol1</sub> ( $m/z$  887.37<sup>2+</sup>, 24 分) のプロダクトイオンスペクトルである。2 つの Fuc の結合可能位置として、非還元末端側 GlcNAc とトリマンノシルコア構造の還元末端側 GlcNAc が候補として考えられた。図 7A では  $m/z$  350 (Fuc-GlcNAc<sup>+</sup>, B<sub>2α</sub>/Y<sub>6α</sub><sup>+</sup>), 370 (Fuc-GlcNAc<sub>ol1</sub><sup>+</sup>, Y<sub>1α</sub><sup>+</sup>) 及び 512 (Gal-(Fuc-)GlcNAc<sup>+</sup>, B<sub>2α</sub><sup>+</sup>) が検出されていることから、2 分子の Fuc は、非還元末端側の

GlcNAc とトリマンノシルコア構造の GlcNAc に結合していることが分かった。

Fuc 以外のその他の特徴として、 $m/z$  1553 (Z<sub>3γ</sub><sup>+</sup>, [Y<sub>3γ</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>) 及び 1570 (Y<sub>3γ</sub><sup>+</sup>) が検出されていることが挙げられる。これらのイオンは、非還元末端側に未置換の HexNAc が結合していることを示唆している。また、 $m/z$  938.03 (Y<sub>3α/3β</sub><sup>+</sup>) が検出されたことから、この未置換の HexNAc は、トリマンノシルコア構造の Man 分子に β1-4 結合する bisecting GlcNAc であることが示唆された。これらの結果から、還元化糖鎖 dHex<sub>2</sub>Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>3</sub>HexNAc<sub>ol1</sub> は、図 7A 中の図に示すような構造であると推定された。

図 7B は、Fuc 2 分子が結合する還元化糖鎖 dHex<sub>2</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>HexNAc<sub>ol1</sub> ( $m/z$  1069.93<sup>2+</sup>, 9 分) のプロダクトイオンスペクトルである。フラグメントイオン、 $m/z$  512 (Gal-(Fuc-)GlcNAc<sup>+</sup>, Fuc-Gal-GlcNAc<sup>+</sup>, B<sub>3α</sub>/Y<sub>6α</sub><sup>+</sup>, B<sub>3α</sub>/Y<sub>5α</sub><sup>+</sup>) 及び 1915 (B<sub>6</sub><sup>+</sup>) が検出されたことから、Fuc はトリマンノシルコア構造の GlcNAc には結合していないことが分かった。また、 $m/z$  350 (B<sub>3α</sub>/Y<sub>5α</sub><sup>+</sup>),  $m/z$  658 (B<sub>3α</sub><sup>+</sup>), 及び  $m/z$  1408 (Y<sub>3β/4α</sub><sup>+</sup>) を検出したことから、Fuc 2 分子は、非還元末端側の Gal-GlcNAc 構造に Lewis b/y 構造 (Fuc-Hex-(Fuc-)GlcNAc-) の様に結合していることが示唆された。さらに、 $m/z$  1936 (Y<sub>4α</sub><sup>+</sup>) から非還元末端側に未置換の HexNAc が存在することが示唆され、 $m/z$  877 (B<sub>4α</sub>/Y<sub>5α</sub><sup>+</sup>, B<sub>4α</sub>/Y<sub>6α</sub><sup>+</sup>)、及び  $m/z$  1610 (Y<sub>3β</sub><sup>+</sup>) から、この未置換の HexNAc は、部分構造 Fuc-Hex-(Fuc-)GlcNAc- の結合するトリマンノシルコア構造の Man に、3 本鎖構造の 1 分岐構造として結合していることが分かった。これらのことから、還元化糖鎖 dHex<sub>2</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>HexNAc<sub>ol1</sub> は、図 7B 中の図に示すような構造であると推定された。

同様に、NeuAc の結合位置をフラグメントイオンから決定することができた。図 8A にジシアロ還元化糖鎖 NeuAc<sub>2</sub>dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub>HexNAc<sub>ol1</sub> ( $m/z$  1084.92<sup>2+</sup>, 30 分) のプロダクトイオンスペクトルを示す。 $m/z$  453 (B<sub>2α</sub><sup>+</sup>), 及び 657 (B<sub>3α</sub>/Y<sub>6α</sub><sup>+</sup>, B<sub>3α</sub>/Y<sub>6α</sub><sup>+</sup>) と共に、フラグメントイオン、 $m/z$  495 (B<sub>3α</sub>/Y<sub>6α</sub><sup>+</sup>), 948 (B<sub>3α</sub><sup>+</sup>) 及び 1110 (B<sub>4α</sub><sup>+</sup>) が検出されたことから、

この糖鎖は、部分構造 NeuAc-Gal-(NeuAc-)GlcNAc-を持つことが分かった。さらに、 $m/z$  1799 ( $B_6^+$ ),  $m/z$  370 ( $Y_{1\alpha}^+$ ), 及び  $m/z$  1059 ( $Y_{3\alpha}^+$ ,  $Y_{4\alpha/4\beta}^+$ )が検出されたことから、Fuc はトリマンノシルコア構造の GlcNAc に結合していることが明らかとなった(図 8A 中の図)。

図 8B に ジ シ ア ロ 還 元 化 糖 鎖 NeuAc<sub>2</sub>dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>3</sub>HexNAc<sub>ol1</sub>( $m/z$  1186.52<sup>2+</sup>, 42分)のプロダクトイオンスペクトルを示す。 $m/z$  454 ( $B_{2x}^+$ ), 657 ( $B_{3x}^+$ ), 及び 819 ( $B_{4x}^+$ )は検出されたが、フラグメントイオン  $m/z$  495 (NeuAc-GlcNAc<sup>+</sup>), 948 (NeuAc-Gal-(NeuAc-)GlcNAc<sup>+</sup>), 及び 1110 (NeuAc-Gal-(NeuAc-)GlcNAc-Man<sup>+</sup>)は検出されなかったことから、NeuAc 2分子は、共に2本鎖型糖鎖の非還元末端側の Gal に結合していることが示唆された。また、 $m/z$  370 ( $Y_{1\alpha}^+$ ) 及び 1059 ( $Y_{4\alpha/4\beta}^+$ )が検出されたことから、Fuc 1分子は、トリマンノシルコア構造の GlcNAc に結合していることが分かった(図 8B 中の図)。

以上のように、FT ICRMSによって得られた精密質量と、liner ITMS のポジティブ及びネガティブ両イオンモード測定によって得られたプロダクトイオンスペクトルをもとに、Thy-1 に結合する多数の N-結合型糖鎖を明らかにすることができた。ラット脳 Thy-1 の N-結合型糖鎖の構造は、アフィニティークロマトグラフィーによるタンパク質の精製、糖鎖のゲルろ過クロマトグラフィー、エキソグリコシダーゼ消化、及びメチル化分析等によって解析され、bisecting GlcNAc や Lewis a/x 構造を持つシアロ及びアシアロ複合型糖鎖糖鎖、高マンノース型糖鎖 (M5, M6), 及びシアロ混成型糖鎖と報告されている。本研究では、SDS-PAGE による簡単な精製と1度の分析で、Thy-1 には、報告されている構造を含むより多様な糖鎖が結合していることを明らかにすることができた。このように、GCC-LC/liner ITMS-FT ICRMS を用いた改良型糖鎖プロファイリングは、電気泳動で分離された微量糖タンパク質の糖鎖解析にも役立つことが確認され、糖タンパク質性医薬品はもとより、細胞治療用医薬品が発現す

る糖タンパク質の糖鎖解析にも応用可能であることが示唆された。

#### D. 結論

GCC-LC/liner ITMS-FT ICRMS を用いた改良型糖鎖プロファイリング法を開発した。モデル糖鎖を用いて、ポジティブ及びネガティブ両イオンモードによる精密質量測定及びデータ依存的多段階 MS 測定によって、従来法より多くの糖鎖構造情報が得られることを実証した。本分析法は、糖タンパク質性医薬品はもとより、細胞治療用医薬品が発現する糖タンパク質の糖鎖解析に応用できることが示唆された。

#### E. 健康危害情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Akira HARAZONO, Yukari MATSUIISHI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: N-linked oligosaccharide analysis by liquid chromatography with graphitized carbon column/ liner quadrupole ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes, Submitted.
- 2) Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Mashashi HYUGA, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Glycomic/ glycoproteomic analysis by LC/MS: Analysis of glycan structural alternation in the cells, Submitted.
- 3) Akira HARAZONO, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, Glycobiology, in Press.
- 4) Jin YUAN, Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Toru KAWANISHI, and Takao

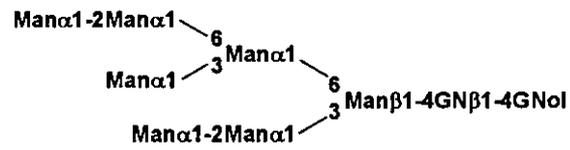
- HAYAKAWA: Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, in Press.
- 5) Kayoko TAKAGI, Reiko TESHIMA, Haruyo OKUNUKI, Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA, Yuichi KOHNO, Atsuo URISU, and Jun-ichi SAWADA: Kinetic analysis of peptide digestion of chicken egg white ovomucoid and allergenic potential pepsin fragments, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 136, 23-32 (2005)
  - 6) Satoru KAMADA, Chie NOMURA, Mitsuhiro KINOSHITA, Saori NISHIURA, Rika ISHIKAWA, Kazuaki KAKEHI, Nana KAWASAKI, and Takao HAYAKAWA: Profiling analysis of oligosaccharides in antibody pharmaceuticals by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 48, 163-168 (2004)
  - 7) Satsuki ITOH, Akira HARAZONO, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Yukari MATSUISHI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS/MS. Analysis of glycosylation sites and of site-specific heterogeneity, *J. Electrophoresis*, 48, 163-168 (2004)
  - 8) Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Glycome analysis by oligosaccharide profiling using liquid chromatography / mass spectrometry, *J. Electrophoresis*, 48, 5-10 (2004)
  - 9) Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, Shingo NIIMI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Enhancement of hepatocyte growth factor-induced cell scattering in N-acetylglucosaminyltransferase III-transfected HepG2 cells, *Biol. Pharm. Bull.* 27, 781-785 (2004)
  - 10) Masashi HYUGA, Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Akiko ISHII, Sumiko HYUGA, and Takao HAYAKAWA: Analysis of site-specific glycosylation in recombinant human follistatin expressed in Chinese hamster ovary cells, *Biologicals*, 32, 70-77 (2004)
2. 学会発表
- 1) Nana Kawasaki, Akira Harazono, Noritaka Hashii, Satsuki Itoh, Toru Kawanishi, And Takao Hayakawa: Glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS. 第2回ヒトプロテオーム学会 (2004. 5)東京
  - 2) 川崎ナナ: 糖タンパク質の質量分析. 第54回日本電気泳動学会シンポジウム(2004. 6)横浜
  - 3) 川崎ナナ: LC/MSによる糖タンパク質の糖鎖解析. シンポジウムゲノムと生物機能 (2004. 7)札幌
  - 4) Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Yukari Matsuishi, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa: Isotope tag method for quantitative glycome analysis by LC/MS. 1<sup>st</sup> Workshop for human disease glycomics/proteome initiative of HUPO. (2004. 8) Osaka
  - 5) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹, 早川堯夫: LC/MSを用いたゲル内糖タンパク質の糖鎖解析. 科学研究費補助金特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」第2回夏期シンポジウム (2004. 8)かずさ
  - 6) Moroki Terada, Risa Inoue, Naoko Kadowaki, Kay-Hooi Khoo, Nana Kawasaki, Toshisuke Kawasaki, Nobuko Kawasaki : Characterization of mannose-binding protein ligands expressed on human colon cancer cells. 第77回日本生化学会大会 (2004. 10)横浜
  - 7) Akira Harazono, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa: Site-specific glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS/MS: Identification of glycopeptides on the basis of

- product ion spectra. 第 77 回日本生化学会大会 (2004. 10)横浜
- 8) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa: Profiling of N-glycans in kidney of mice by GCC-LC/MS. 第 77 回日本生化学会大会 (2004. 10)横浜
- 9) Yayoi Takehara, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Toru Kawanishi, Koh Nomura, Hiroko Matsushita-Oikawa, and Haruko Ogawa: Characterization of the glycans of bovine erythrocyte membrane glycoprotein. 第 77 回日本生化学会大会 (2004. 10)横浜
- 10) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa: N-glycosylation analysis of glycoprotein in polyacrylamide gel by LC/MS. 第 77 回日本生化学会大会 (2004. 10)横浜
- 11) Akira Harazono, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa: Site-specific N-glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using LC/ESI/MS/MS. Join meeting of the Japanese and American consortia for glycomics. (2004. 11) Hawaii
- 12) 野村和子, 水口惣平, 安藤恵子, 三谷昌平, 平林義雄, 松石 紫, 川崎ナナ, 出嶋克史, 野村一也: 二次元電気泳動を用いた線虫 Acetyl CoA トランスポーターの解析. 第 27 回日本分子生物学会年会(2004.12)神戸
- 13) 川崎ナナ, 原園 景, 伊藤さつき, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹, 早川堯夫: 抗体の LC/MS. バイオロジクスフォーラム第 2 回学術集会「新しいバイオロジクスの開発動向と規制」(2004. 11)東京
- 14) 川崎ナナ: 糖鎖結合部位と糖鎖の解析. 蛋白質研究所セミナー「翻訳後修飾のプロテオミクス」(2005. 1)大阪
- 15) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹, 早川堯夫: LC/ESI/MS/MS によるヒト Ceruloplasmin の部位特異的糖鎖解析. 日本薬学会第 125 年会(2005. 3)東京
- 16) 川村義彦, 石井明子, 川崎ナナ, 浦野四郎, 川西 徹, 奥田晴宏, 福原 潔: 平面型カテキンの細胞増殖阻害作用. 日本薬学会第 125 年会 (2005. 3)東京

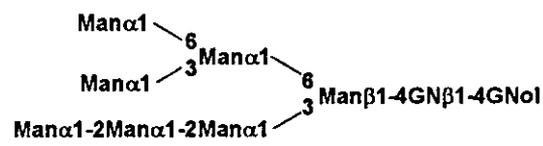
#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

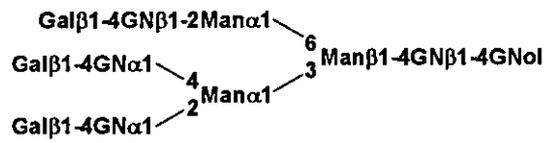
**Man7/D1 :**



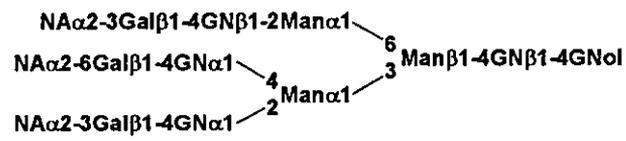
**Man7/D3 :**



**Tri :**



**TriNA<sub>3</sub> :**



**TetraNA<sub>4</sub> :**

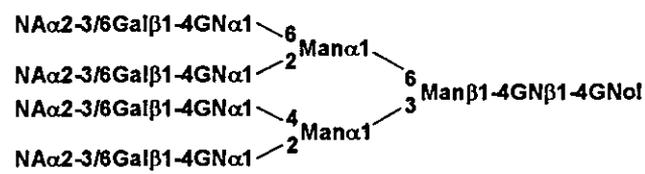


図1 モデル糖鎖の構造

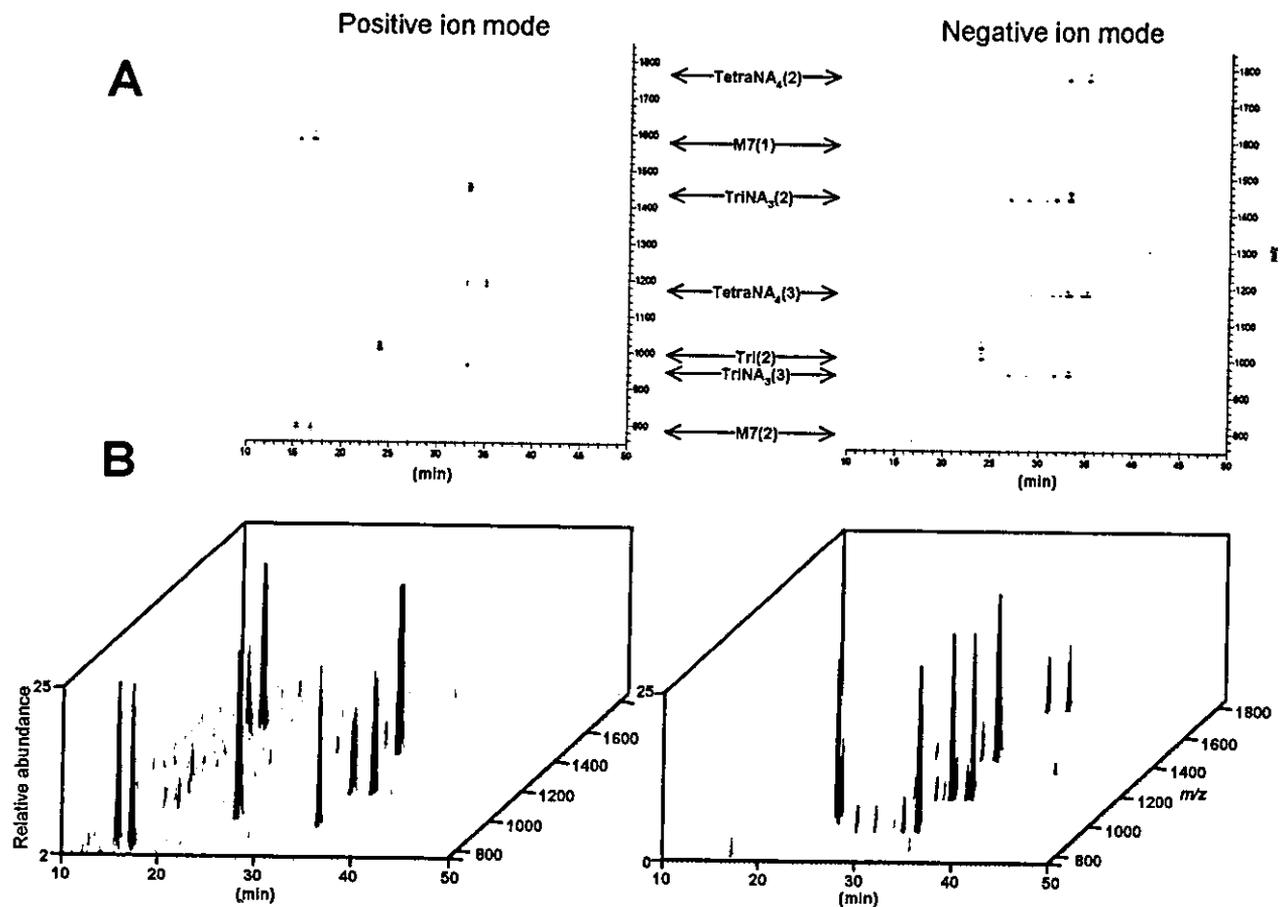


図2 GCC-LC/liner ITMS-FT ICRMSによるモデル糖鎖のプロファイリング  
 (A) 溶出時間 vs m/z値、(B) 溶出時間 vs m/z値 vs イオン強度

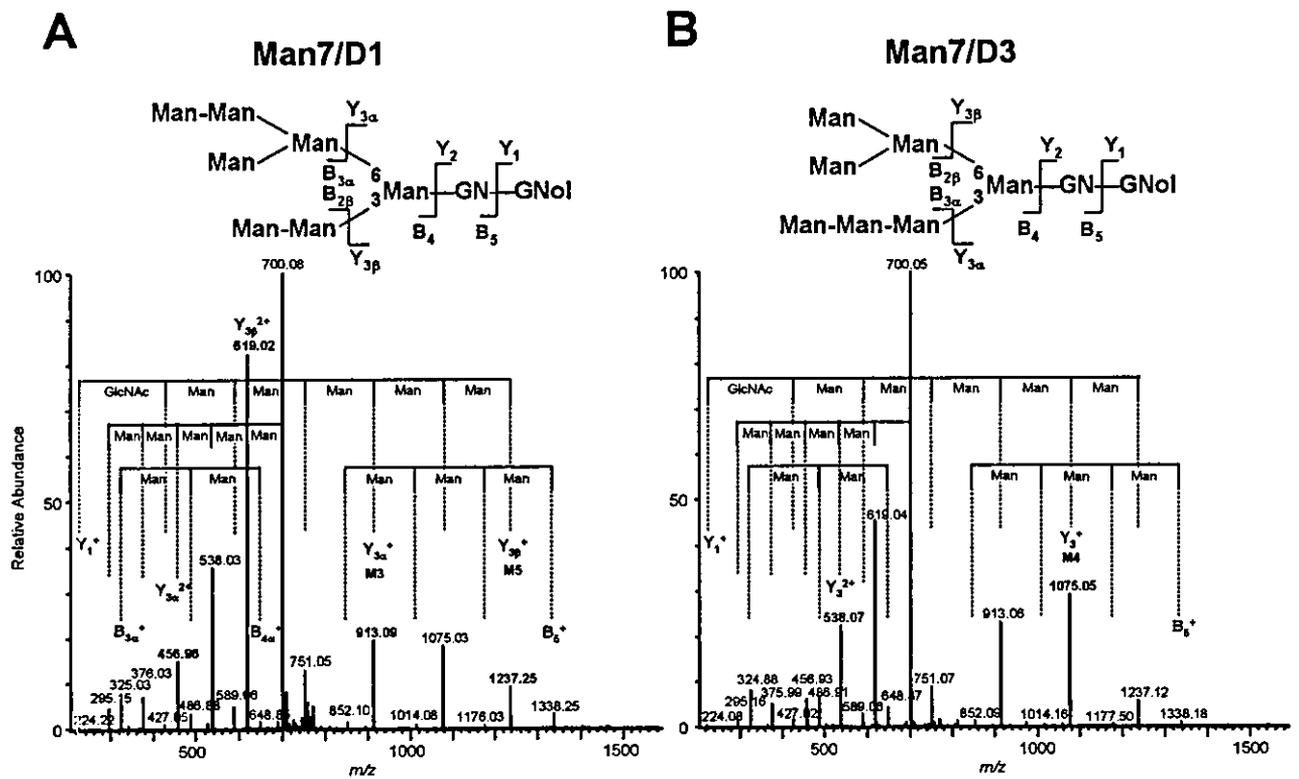


図3 高マンノース型糖鎖のプロダクトイオンスペクトル

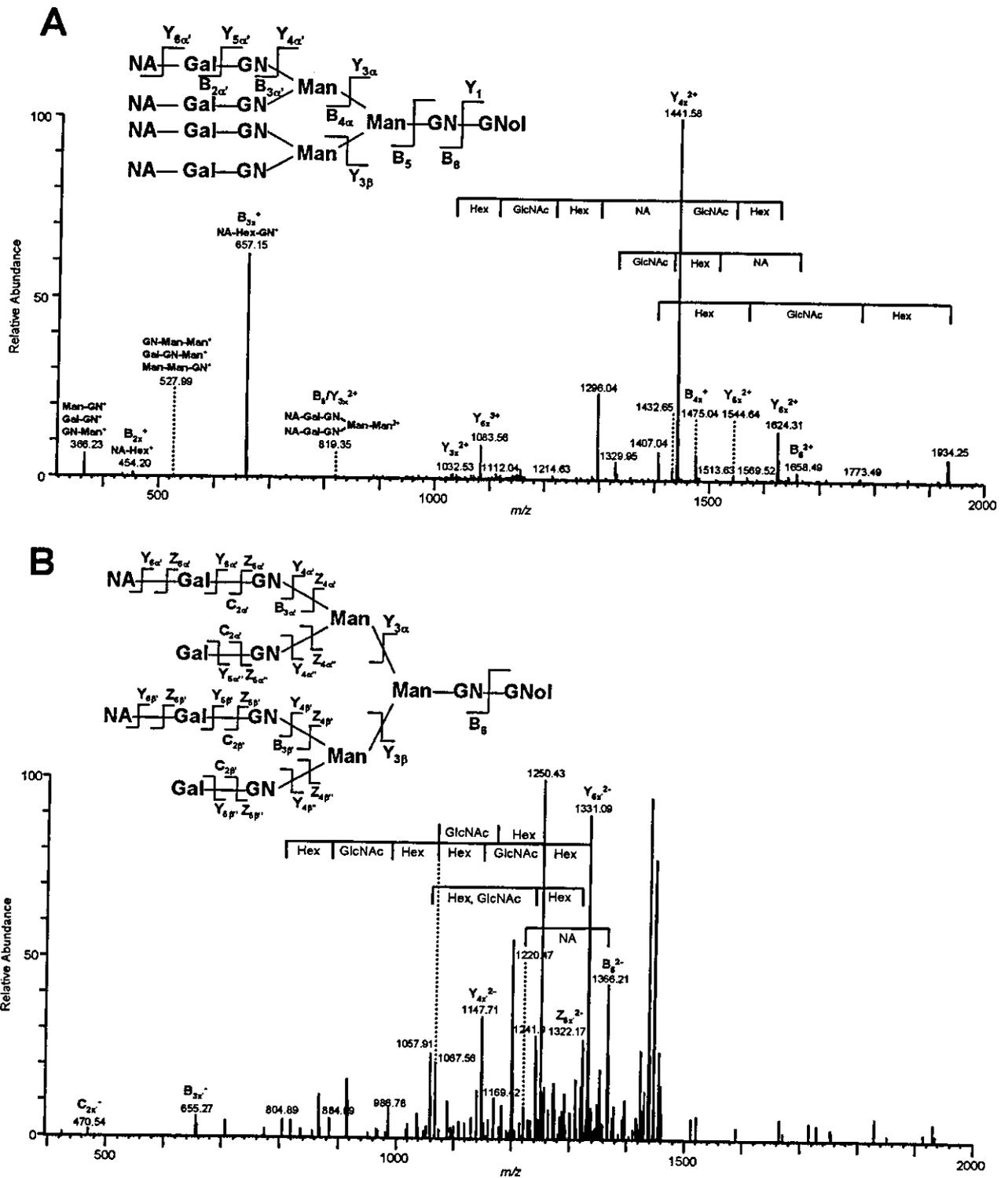


図4 シアロ糖鎖のプロダクトイオンスペクトル

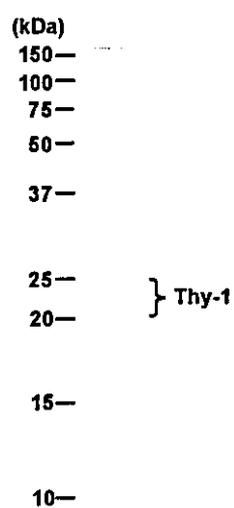


図5 ラット脳膜由来可溶性GPIアンカー型タンパク質のSDS-PAGE



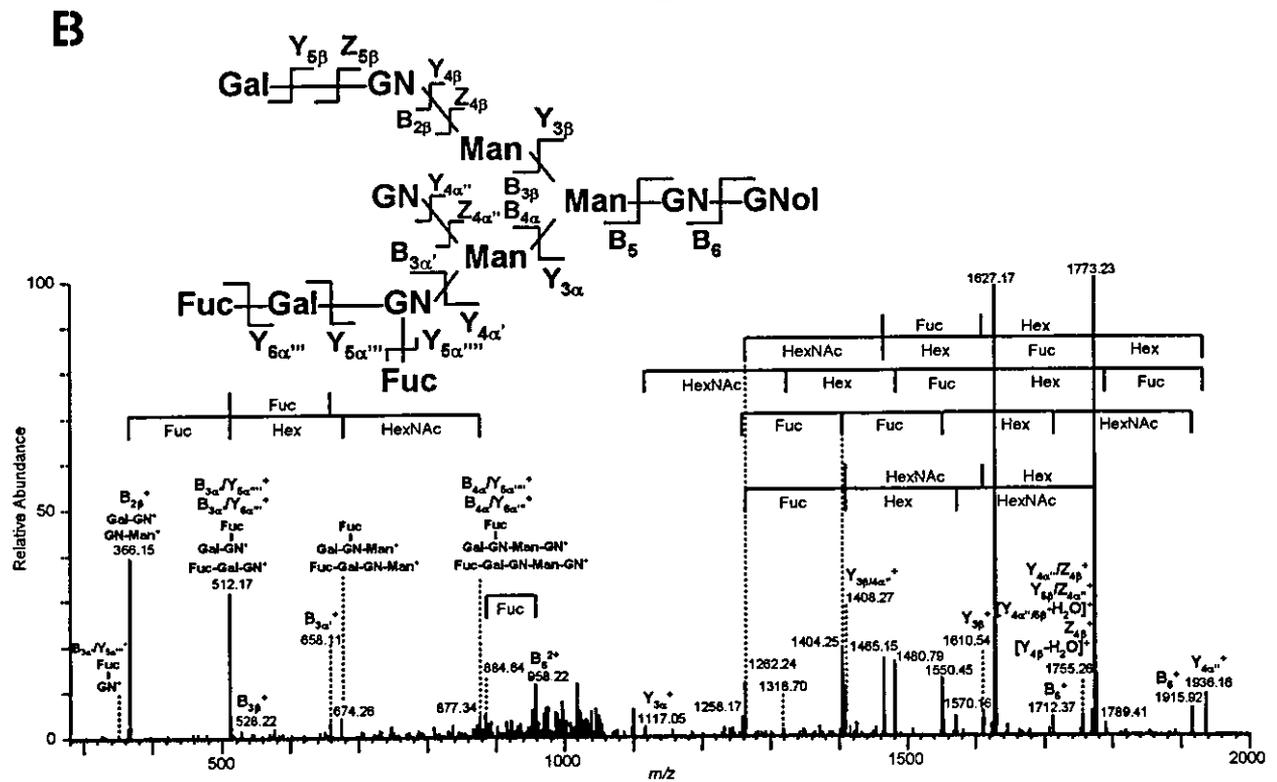
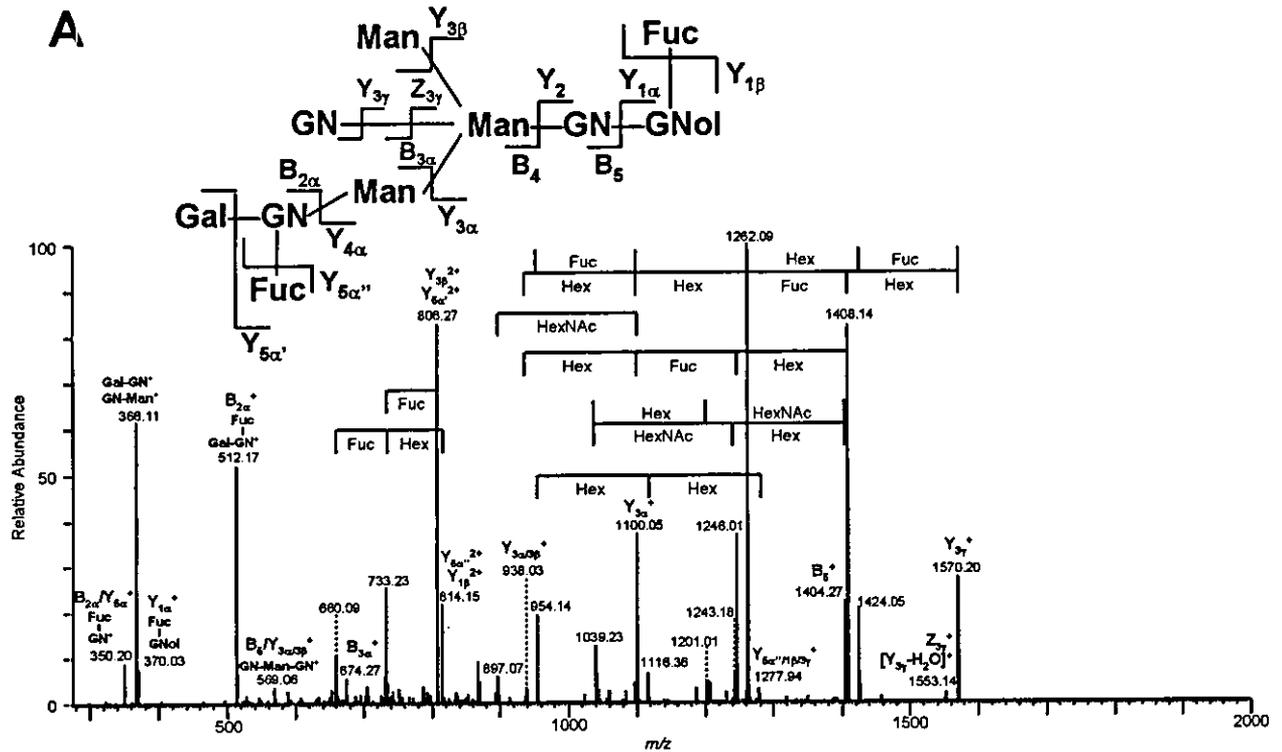


図7 Thy-1由来フォース結合糖鎖のプロダクトイオンスペクトル

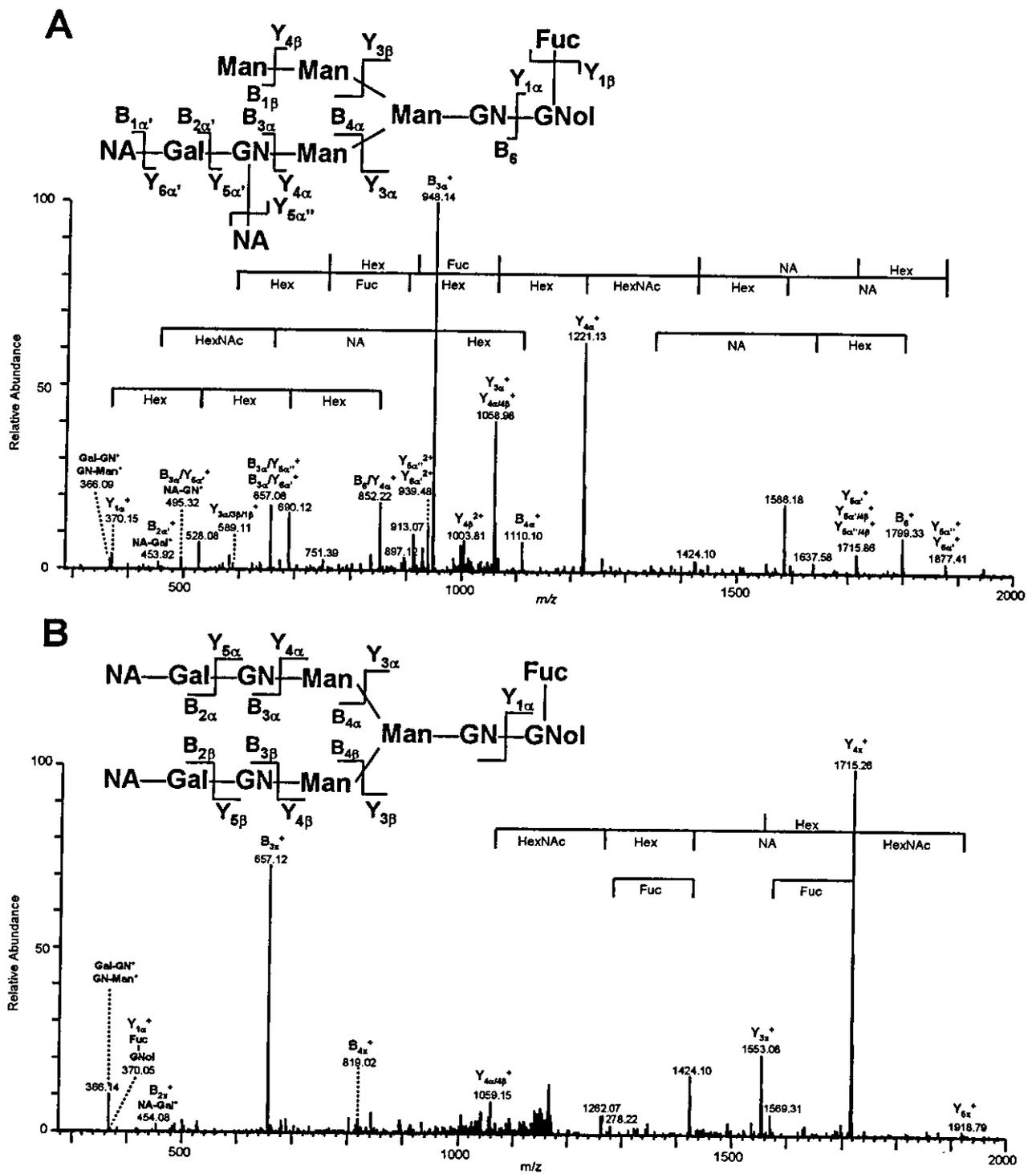


図8 Thy-1由来シアロ糖鎖のプロダクトイオンスペクトル

## 医薬品の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究 肝幹細胞を用いた肝疾患に対する細胞治療の現状と展望

分担研究者 新見 伸吾（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部第三室長）

### 研究要旨

医薬品の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究の一環として、肝幹細胞を用いた肝疾患に対する細胞治療の現状と展望について調査研究を行った。

肝疾患の細胞治療、人工肝臓装置、遺伝子治療の担体としての肝幹細胞の使用が期待されている。肝幹細胞に関する研究の進展により、動物及びヒトにおいて肝幹細胞の存在が確認されている。肝幹細胞の代表的な例として oval cell と骨髄由来細胞があげられる。oval cell は 2-acetylaminofluorene/部分肝切除あるいは carbon tetrachloride に代表される肝障害動物モデルの肝臓において発現が上昇し、肝細胞及び胆管上皮細胞に分化誘導される。その由来としてヘリング管、門脈路、胆道系の枝分かれなどの可能性が提唱されている。Oval cell の増殖及び分化に関与する液性因子として TNF- $\alpha$ 、副甲状腺ホルモン関連ペプチド、TGF- $\beta$ 、HGF、EGF、HSS などが示唆されている。また、feeder layer, コンディションメEDIUM、細胞外マトリックスも関与が示唆されている。同様な肝障害モデル動物などにおいて移植された骨髄細胞は肝細胞及び胆管上皮細胞に分化することが示されている。さらに、男性から採取した骨髄細胞を移植した女性患者や女性患者の肝臓を移植した男性患者には、Y 染色体を持つ肝細胞や胆管上皮細胞が存在した。骨髄由来細胞の肝臓への生着には stromal derived factor-1 の関与が、肝細胞への分化には HGF の関与が示唆されている。その他の肝幹細胞として小型肝細胞、胎児由来肝幹細胞などが知られている。肝細胞を用いた細胞治療として有望な疾患として原発性肝臓病、肝臓における異常な遺伝子発現あるいはタンパク質産生の欠損による肝臓外の疾患がある。人工肝臓装置の作製には多量の細胞が場合によっては長期間必要となる。肝幹細胞は培養において高い増殖能を長期にわたって保持できることから、有用と考えられる。肝幹細胞は遺伝子治療の担体としても有用となる可能性がある。例えば肝臓に欠損している酵素遺伝子や肝臓を標的として疾患の治療に有用なタンパク質の遺伝子を導入した肝幹細胞を肝臓に移植し、長期にわたり肝臓において導入遺伝子の発現がおきるようにすることも期待されている。

### A. 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る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。一方、摘出されたドナー肝の約 50% が何らかの理由で肝移植に用いられず棄却されている。劇症肝炎の年間発症率は約 2,500 例と推定されるが、重大な基礎疾患がなく肝移植の対象となる患者は年間 100 例程度と概算されている。最近、全肝移植までの橋渡しや、肝不全の際の代謝補助や、ある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。また、宿主の肝細胞死の割合が高い特別な状況においては、移植肝細胞が増殖して置き換わることも期待される。しかし、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り、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る。そこで急性肝不全や代謝性肝疾患に対して肝細胞移植や人口肝を利用した治療が肝移植に代わる方法として試されている。これらの方法に加え、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、これを利用することも考えられている。

このような観点において最近注目されているのが肝幹細胞である。肝幹細胞は細胞治療において以下の様な利点を有する。①肝臓に自然に備わっている組織修復のシステムをそのまま模倣できる。②分化の方向性や増殖能がすでに決定されているので腫瘍化の危険性が低い。③増殖能が成熟肝細胞

に比べ極めて高い。④正常細胞と同等の機能発現が期待できる。⑤対象者自身の細胞の利用が可能である。

肝幹細胞の存在については半世紀にわたり論争が行われていた。Wilson らは世界で最初に肝幹細胞を仮定した。彼らの仮説は肝臓が肝臓毒により重篤な障害を受けた時、肝臓が再生できるという事実に基づいている。それは広範囲における肝臓疾患が起きると存在する肝細胞は分裂増殖できないため、新しい肝細胞が肝幹細胞より派生するはずであるというものであった。この仮説を強く支持する知見が広範囲における肝臓の発癌研究から得られた。Fausto らは化学発癌物質を動物に投与すると初期の段階において細胞質が乏しく、卵型の核を有する小型の肝細胞が増殖することを明らかにした。その後肝幹細胞に関する研究は大きく進展し、動物及びヒトにおいて肝幹細胞の存在が確認された。その中で代表的なものは肝臓のヘリング管、門脈、胆道系の分岐に位置すると考えられている oval cell と骨髓由来細胞である。本稿においては肝幹細胞に関する最近の知見、及び肝幹細胞を用いた細胞治療などの臨床応用における現状と今後の展望について紹介する。

## B. 研究方法

肝幹細胞の由来、肝細胞への分化誘導に関する最近の知見及び肝幹細胞を用いた細胞治療などによる肝疾患への臨床応用の現状と展望について、参考文献 1~17 を中心に調査した。

## C. 研究結果

### 1. oval cell

oval cell はエチオニン、2-アセチルアミノフルオレン “2-acetylaminofluorene” (2-AAF)、3-メチル-4-ジメチルアミノアゾベンゼンなどを用いて肝化学発癌過程を研究中にグリソン鞘周囲に増殖する楕円形 (oval) の核をもつ小型の細胞として見出されたことから、この名称が付けられた。oval cell は、肝細胞毒による肝障害、広範囲な肝細胞壊死などによる成熟肝細胞の増殖の著しい阻害及び遅延のような病態が肝臓に起こった時に出現し、小葉内胆管につながった肝細胞索及び胆管を形成する。同様に重篤な実質障害が起きたヒト肝臓病で胆管の増殖がみられる。また、ヒト肝臓の小葉内胆管においても肝細胞の分化がおきることから、重篤な障害の肝実質で再生する小胆管細胞が新しい肝細胞の幹細胞として機能すると考えられようになった。その考えは stem cell factor “SCF” とその受容体である c-kit、Bcl-2、cytokeratin (CK) 14 を含む幹細胞に特徴的と考えられるマーカーを oval cell が発現するという事実により支持される。oval cell は1種類の細胞ではなく、表現型が異なるヘテロな細胞集団の総称である。oval cells は乏しい細胞質と卵型の核を有する小型細胞である。それらはコロニーを形成して肝細胞と胆管上皮細胞の両方に分化する能力を有すると考えられている。

### 1.1 oval cell の活性化

動物モデルにおいて oval cell を誘導するうえで最も重要なポイントは肝実質が障害を受けており、その再生能力は肝毒性物質により消失していることである。これら化学物質は小葉内胆管において増殖を最初に誘導する点については同じであるが、その後の肝細胞への分化の程度は大きく異なる。

モデル系としてはラットにおけるフラン投与、マウスにおけるディピン投与、2-AAF 投与2/3部分肝切除 “partial hepatectomy” (PH) などがある。また、コリン欠乏エチオニン “choline-deficient ethionine” (CDE) 含有食も胆管の増殖を誘導する。他方、アリルアルコールによる門脈周囲の壊死により胆管細胞は増殖するが、胆管構造を形成せず、小型肝細胞に早期に分化する。

このようなアリルアルコールによる胆管細胞の増殖とその他の要因による肝細胞管の増殖を区別することは重要である。増殖は慢性的な肝実質障害において共通に起こり、ハムスターにおいては  $\alpha$ -ナフチルイソチオシアネイト投与により誘導される。その際、胆細管が拡張し、肝細胞索の管腔形成に関与すると考えられている。ヒト肝臓疾患においても、肝細胞小管の増殖に伴い肝細胞索の管腔形成が起きると考えられている。また、増殖の要因が異なると胆管/肝細胞の表現型が発現する場合もある。oval cell の増殖は p21<sup>CIP1/WAF1</sup> トランスジェニックマウス及び Long-Evans-Cinnamon (LEC) ラットの肝臓においてもみられる。

oval cell 活性化の典型的なモデルは改変 Solt-Farber 法であり、ラットに 2-AAF を投与後、2/3 部分肝切除する。phase 1 代謝酵素により 2-AAF は毒性を有し増殖を抑制する N-水酸化誘導体に代謝される。胆管細胞及び oval cell は肝細胞と比べると phase 1 のレベルは低く、phase 2 のレベルは高い。従って、oval cell は肝細胞と異なり、発癌物質の毒性効果に抵抗性である。上記モデルにおいて、肝細胞よりむしろ oval cell が 2/3PH 後増殖する。詳細な検討によると、<sup>3</sup>H チミジンで標識された細胆管

が PH 後 4 時間でみられ、増殖は 24 時間で起こる。この場合、メチレンジアニリンで胆管系を障害すると、oval cell の増殖が阻害されることから、oval cell が胆管由来であるという可能性が強く示唆される。

oval cell の増殖と 2/3PH による門脈内胆管の増殖は以下のように区別できる。2/3PH による門脈内胆管の増殖は小葉サイズの肥大化により活性化される可能性がある。oval cell と他の胆管の増殖においては明らかに形態及び表現型が異なっている。oval cell は胆管領域から放射状に出現し、折れ曲がり分岐した小管として肝実質の中へ深く浸入し、肝細胞のタンパク質を発現する。一方、胆管の結紮により胆汁が滞留し胆管細胞の増殖がおき、その増殖は門脈周囲に限定されるという特徴がある。さらに、2-AAF により誘導される oval cell と異なり、増殖性胆管は肝細胞に分化しない。また、アルファフェトプロテイン“alpha-foetoprotein” (AFP)、アルブミンの発現は誘導されず、肝臓において高発現している転写因子を発現しない。成熟ラット肝臓の胆汁うっ滞によっても AFP, SCF, c-kit のような従来 of oval cell のマーカーは胆管において発現が誘導されない。しかし、幼若ラットの胆管結紮ではこれらマーカーの発現が上昇する。従って初期の新生児の胆管上皮は成熟時におけるよりも強い両能性を有していることが示される。

改変 Solt-Farber 法により誘導される oval cell の初期における増殖反応は小葉胆管に限局されており、小葉胆管においてのみ腫瘍胎児糖タンパク質 AFP の発現が起こる。従って、小葉胆管が肝細胞系統へ分

表1 oval cells、肝細胞、胆管上皮細胞のマーカー

マーカー	Oval cells	肝細胞	胆管上皮細胞
CK7	+	-	+
CK19	+	-	+
Albumin	±	+	-
CYP1A <sub>2</sub>	-	+	-
AFP	+	-	-
CK8	+	+	+
CK18	+	+	+
OV-6	+	-	+

“+”陽性、“-”陰性、“±”陽性及び陰性

化すると考えられる。小葉胆管は肝実質に浸入する際、胆管の CKs だけでなく間葉の中間フィラメントであるビメンチンも発現する。CKs とビメンチンの共発現は多くの癌においてもみられる。これらの発現により上皮系癌細胞が強い浸潤能と転移表現型を獲得すると考えられており、運動能亢進は oval cell の特性でもある。最終的に、胆管 oval cell は肝実質に深く進展して胆管の特徴を失い小型肝細胞に分化する。その際、CKs とビメンチンの発現は停止する。

なお、表1に oval cell、肝細胞、胆管上皮細胞に特徴的なマーカーをまとめて示している。

### 1.2 成人ヒト肝臓における oval cell

成人ヒト肝臓における oval cell の存在部位については統一的な見解は得られていない。形態学的な研究によると障害を受けたヒト肝臓において小型肝細胞が存在し、その細胞は門脈、胆管中あるいは胆管周囲に位置していると考えられる。ラット oval cell に特異的な OV-6, c-kit, CD34 のようなマーカーを用いた解析から、肝芽腫、肝細胞癌、肝硬変の肝臓において oval cell が同定された。さらに、二重免疫染色法を用いた解析から、これらの細胞の中には肝細胞と胆管の表現型を共発現するものも見つかっている。しかしながら、oval cell の出現

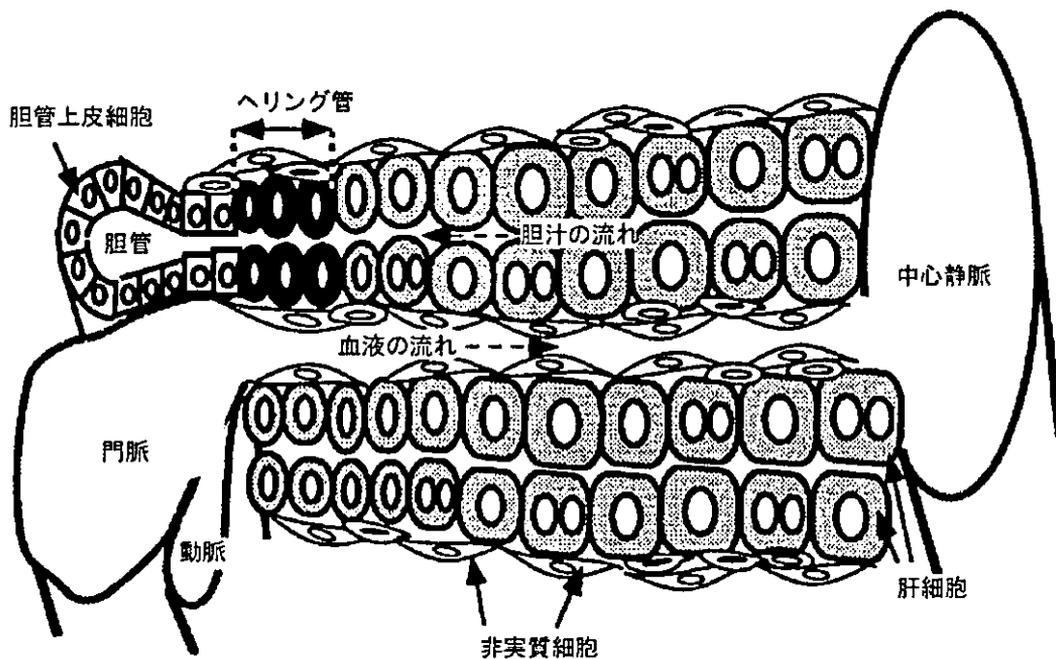


図1 ラット肝臓の模式図

から分化までは複雑なプロセスから成り立っている。従って、これらの研究結果は分化のある特定の時間におけるプロセスのみ示しており、全体を反映していない可能性がある。

### 1.3 oval cell の由来

以上の知見から oval cell の由来は図1に示す肝臓断片のなかで門脈周囲の肝細胞と末端小胆管の間に位置するヘリング管、門脈路、胆道系の枝分かれ部分であるとの可能性が主流を占めている。

### 1.4 oval cell の分離精製

oval cell のマーカーとして Thy-1 に着目し、抗 Thy-1FITC 標識抗体とフローサイトメーターによるソーティング(FACS) を用い、95~97%の純度の Thy-1+oval cell が得られている。これは今までに報告されている最高の純度である。Thy-1 に加えて、これらの細胞は他の oval cell のマーカーである AFP、CK-19、GGT、OC2 及び OV-6 も発現する。

### 1.5 移植した oval cell の肝臓における分化

oval cell を皮下に移植すると、強く凝集し未分化な腫瘍を形成する。他方、肝臓に移植した細胞は悪性の表現系を消失するかあるいは分化する。“Long-Evans Cinnamon” (LEC) ラットから分離した oval cell を LEC/Nagase アルブミン欠損ラットの肝臓に移植するとアルブミンを産生する肝細胞に分化する。遺伝的に改変 (レトロウイルスで  $\beta$ -galactosidase 遺伝子を導入)した分離 oval cell を in vivo に導入すると、肝細胞として機能する。しかしながら、oval cell を肝臓に移植すると胆管癌及び肝癌が生じ、それを遺伝的に改変して移植すると正常肝細胞に分化するという報告もある。

### 1.6 oval cell の分化及び増殖に影響を与える因子

oval cell の増殖に関与する増殖因子は通常の肝再生に関与するものと同じである。しかし、oval cell の増殖分化が起こるには、

促進及び抑制に働く増殖因子の精巧でかつ協調的な発現が必要である。その際、増殖因子の発現する時期及び場所も重要となる。また、増殖因子は細胞・細胞、さらには細胞・細胞外マトリックス“extracellular matrix” (ECM)の相互作用にも影響を与える。

#### 1.6.1 ノックアウトマウスを用いた解析

Knightらはoval cellの増殖時において腫瘍壊死因子“tumor necrosis factor- $\alpha$ ” (TNF- $\alpha$ )の産生が促進され、oval cellの増殖はタイプ1型受容体のノックアウトマウスにおいて顕著に抑制され、タイプ2型受容体のノックアウトマウスでは変わらないことを明らかにした。従って、TNF- $\alpha$ タイプ1のシグナル伝達がoval cellの自己再生及び増殖において重要な役割を担っていると考えられる。

#### 1.6.2 培養レベルにおける液性因子による調節

副甲状腺ホルモン関連ペプチド“parathyroid hormone related peptide” (PTHrP)は肝臓を含む様々なヒト組織の増殖及び分化に重要であると考えられている。ヒトにおいて、PTHrPは胆管癌だけでなく胆汁うっ滞に伴い増殖する胆管及び再生肝において増殖する胆管に発現する。上皮増殖因子“epidermal growth factor” (EGF)のような増殖因子は培養胆管細胞において短時間でPTHrPを誘導することから、PTHrPはオートクラインの様式で胆管の増殖を促進するのかもしれない。

また、oval cellの分化と増殖は上皮と間質細胞の増殖の場合と同様に様々な増殖因子により協調的に制御されている。その1つは類洞周囲細胞においてECM産生を促

進するTGF- $\beta$ の増殖性胆管における発現である。TGF- $\beta$ は胆管周囲のIto細胞でも発現し、オートクライン/パラクラインで作用し、in vitroにおいて肝細胞系統の分化に関与する。Ito細胞はTGF- $\alpha$ 、aFGF、肝細胞増殖因子“hepatocyte growth factor” (HGF)、stem cell factor (SCF)も発現する。oval cellはHGF以外これら全ての増殖因子及びその受容体を発現する。しかしながら、oval cellはこれらの因子が外から供給されない状態でもオートクラインにより分化できる可能性もある。この可能性は胎児性のoval cellと同等と考えられている培養肝芽細胞は増殖因子のない状態で増殖及び移動できることから支持される。

HGF、SCF、EGF、肝促進因子“hepatocyte stimulating factor” (HSS)は以下に示すような異なった機構でoval cellの増殖を促進する。HGFはin vitroにおいて各種胆管上皮細胞の遊走と伸展を促進することから、遊走因子と最初に呼ばれていた。また、HGFはin vitroにおいてヒト胆管上皮細胞及び肝細胞の強力な増殖促進因子であり、特に胎児の組織発達において強力な形態形成因子でもある。従ってoval cellの挙動に影響を与える可能性が強い。HGFはoval cellの増殖時において産生が促進され、oval cellの分岐管腔形成はHGF及び“transforming growth factor- $\alpha$ ” (TGF- $\alpha$ )により促進される。HGF及びTGF- $\alpha$ は上皮組織発達過程において胆管形態形成をパラクラインあるいはオートクラインにより促進する。SCFもoval cellの増殖時において発現し、パラクライン及びオートクラインによりoval cellの生存、増殖、運動性を促進する。oval cellをHGF、SCF

共添加で培養すると、増殖が促進される。oval cell の増殖因子である EGF は DNA 合成及び mRNA への転写を促進し、早期に S 期へ移行させることにより細胞周期が短くなる。一方、TGF- $\beta$  は oval cell のアポトーシスを誘導する。興味深いことに、EGF と TGF- $\beta$  共添加で培養すると増殖及びアポトーシスは誘導されないが、細胞遊走及び分化に特徴的な形態が誘導される。また、TGF- $\beta$  は胎児由来肝幹細胞の未発達な胆管への組み込みを誘導する。さらに、HSS は EGF 受容体発現とシグナル伝達を促進することにより、細胞増殖を促進する。2-AAF/PH モデルにおいて、胆管 oval cell で aFGF mRNA が発現する時期は肝細胞へ分化する時期と一致する。

#### 1.6.3 feeder layer 及びコンディショニングメディウムによる調節

肝幹細胞は肝細胞や胆管細胞に分化するだけでなく、例えば腸管上皮細胞のような他の組織の細胞にも分化する。従って、肝幹細胞を細胞治療に用いるならば分化誘導する必要がある。分化を阻害するには通常 feeder layer, コンディショニングメディウム "conditioned medium" (CM)、分化阻害活性 "differentiation inhibitory activity" (DIA) を用いる。feeder layer には初代マウス胚性繊維芽細胞 "primary mouse embryonic fibroblasts" (PMET)、バッファローラット肝細胞 "buffalo rat liver cell" (BRL)、マウス胚性繊維芽細胞ライン "mouse embryonic fibroblastic lines" (STO) が含まれる。その中で PMET は容易に手に入れることができ、分化の阻害作用が強いため広く用いられている。Feeder layer は FGF を分泌することにより肝幹細胞

の増殖を促進し、分化抑制因子である LIF を生成することにより oval cell の分化を抑制する。STO は肝幹細胞の自己複製に必須である微小環境を供給する。肝細胞の CM は分泌された増殖因子を含むため、oval cell の増殖を促進し、DIA を介して分化を抑制する。CM には以下のような利点がある。(1) Feeder layer の干渉を防ぐことにより、高度に精製した oval cell が得られる。(2) 肝幹細胞はマイトマイシン C の影響から回避される。(3) 因子の影響が feeder layer ほど複雑ではない。

#### 1.6.4 薬剤による調節

ブチル酸ナトリウムは DNA 合成を抑制し、肝幹細胞の分化を誘導する。DMSO は非実質細胞の増殖及び繊維芽細胞の過剰増殖を抑制し、肝幹細胞を肝細胞に誘導する。培地に DMSO を添加すると、oval cells が肥大化し、細胞質に富む細胞となる。分化した細胞は集合後クラスターを形成し、肝臓プレート様構造に組み込まれる。DMSO はサイクリン 1 と 18 の発現を促進するとともにサイクリン B1 と D の発現を抑制し、細胞周期の停止を誘導する。免疫組織化学的及びフローサイトメーターを用いた解析によると、分化した細胞のみがアルブミン陽性で CK19 と CK7 は陰性である。この細胞は 2 週間高いレベルでアルブミンを持続的に分泌する。従って、oval cell は DMSO により形態学的及び機能的に成熟肝細胞へ分化する。DMSO による肝幹細胞の分化誘導には Wnt/ $\beta$ -カテニン系及びファイブロネクチンとラミニンの細胞受容体の発現低下が関与している。

#### 1.6.5 細胞外マトリックスによる調節

ヒト肝臓において増殖性胆管は筋繊維芽