

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

糖鎖プライマー法を利用した白血病等の発現糖鎖
パネル化と発現糖鎖プローブ開発による
診断・治療への応用

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 藤本 純一郎

平成19（2007）年 4月

目 次

I. 総括研究報告 -----	1
糖鎖プライマー法を利用した白血病等の 発現糖鎖パネル化と発現糖鎖プローブ開発 による診断・治療への応用 -----	3
藤本 純一郎	
II. 分担研究報告 -----	13
1. 糖鎖プライマー法による糖鎖構造の解析 -----	15
佐藤 智典	
2. 血液系未分化細胞プロファイリング および抗糖鎖抗体作製 -----	25
清河 信敬	
3. 血液系未分化細胞プロファイリング および抗糖鎖抗体作製 -----	31
片桐 洋子	
4. 間葉系未分化細胞プロファイリング -----	39
梅澤 明弘	
5. 発現糖鎖解析、糖鎖修飾分子合成 および抗糖鎖抗体作製 -----	43
中島英規	
6. 発現糖鎖解析、糖鎖修飾分子合成 および抗糖鎖抗体作製 -----	49
齋藤 実	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	55
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	59

I 総括研究報告書

糖鎖プライマー法を利用した白血病等の発現糖鎖パネル化と
発現糖鎖プローブ開発による診断・治療への応用

主任研究者 藤本 純一郎

総括研究報告書

糖鎖プライマー法を利用した白血病等の発現糖鎖パネル化と発現糖鎖プローブ開発による
診断・治療への応用（H18-ゲノム-一般-005）

主任研究者

藤本 純一郎

国立成育医療センター研究所

副所長

研究要旨：細胞の成熟やがん化に伴い発現糖鎖構造は多様に変化し、特定の機能を発揮することが知られている。しかし細胞での発現量が微量であることに加え、構造の多様性や精製・分析の難しさ、特異性の高いプローブの不足などから、糖鎖の医療分野での応用は蛋白質と比べるとごく限られている。本研究では「糖鎖プライマー法」を利用して細胞に糖鎖を大量に産生させ、その構造を網羅的に解析し、白血病細胞や組織幹細胞を始めとする未分化細胞の発現糖鎖パネル化を図り、細胞のプロファイリングに利用する情報を得る。本年度は糖鎖プライマー法を適用できる培養条件を、白血病細胞株6株、正常造血幹細胞の単球、血小板系への分化誘導培養系、マウス胚性幹細胞、胚性癌腫細胞、間葉系幹細胞等の未分化細胞株4株、神経芽腫細胞株4株で決定した。白血病細胞株、神経芽腫細胞株、マウス胚性癌腫細胞等では糖鎖プライマー法による発現糖鎖解析を実施し、特に前骨髄性白血病細胞株HL60では分化誘導条件において糖鎖プライマー法で産生される糖鎖が変化することを確認した。また、糖鎖分析、プロファイリングの基盤技術の確立のために、糖鎖を高精度に分離するキャピラリー高速液体クロマトグラフィー (Cap LC)と高度な構造解析を高感度に行うことが可能なマスマスペクトロメトリー (MS) を組み合わせたLC/MSを用いた糖鎖構造解析法を始めとする分析法の確立を行った。今後、本年度確立した投与条件を基盤に、更に白血病細胞をはじめとする多数の未分化細胞に糖鎖プライマー法を適用し、LC/MS等で分析して発現糖鎖パネルを充実すると共に、産生糖鎖を抗原として利用した優秀な抗糖鎖抗体の樹立を行い、得られた成果を小児難治性疾患の新規診断・治療法開発へ活用していく。

分担研究者

佐藤智典 慶應義塾大学理工学部 教授

清河信敬 国立成育医療センター研究所

発生・分化研究部 部長

片桐洋子 国立成育医療センター研究所

発生・分化研究部形態発生研究室 室長

梅澤明弘 国立成育医療センター研究所

生殖医療研究部 部長

中島英規 国立成育医療センター研究所

副所長室 流動研究員

齋藤実 株式会社グライコメディクス

主任研究員

A. 研究目的

本研究では、白血病細胞をはじめとする小児腫瘍細胞や間葉系幹細胞を含む幹細胞などのヒト未分化細胞が産生し発現している糖鎖の構造・機能を解明すると共に、細胞の発現糖鎖情報をパネル化して、小児腫瘍に対する新規診断・治療法開発や、ヒト幹細胞の標準化などに、臨床応用することを目指す。

糖鎖は糖脂質や糖蛋白質など複合糖質として存在し、結合している蛋白質の機能を調節したり、それ自身が機能を発揮して、細胞反応において重要な役割を担っていると考えられているが、その構造の多様性や精製・分析の難しさ、有用な抗体の不足などから、蛋白質に比べると医療分野での応用はごく限られている。しかし、造血幹細胞でのCD34や神経幹細胞でのSSEA-1をはじめとして、幹細胞マーカーや腫瘍マーカーとして糖鎖が用いられている点を考慮すると、糖鎖研究をより積極的に推進することが求められる。

前述のごとく、糖鎖の大量生産や構造解析の困難さ、抗体を含めた特異性の高い糖鎖プローブ作製の困難さ、等が糖鎖研究の進展を妨げる要素となっていたが、本研究で採用する糖鎖プライマー法は糖鎖を大量に入手することの困難さを克服した方法であり、既に糖脂質と糖蛋白質O結合型糖鎖の生合成系に対する糖鎖プライマーが開発されている。この方法の長所は細胞を工場に見立てて糖鎖を培養液中に大量に分泌させ、細胞を壊すことなく容易に回収できることが可能な点にある。これによってこれまで発現量が微量で難しかった細胞の糖鎖解析を網羅的に行うことが可能となり、それぞれの細胞の発現糖鎖パネルを作製することが容易になる。そこで、この方法を応用することによって種々の小児腫瘍、その発生源母地である正常組織の各分化段階の細胞、間葉系幹細胞を含む種々の幹細胞、等の発現糖鎖情報パネル化を行い、これを小児腫瘍の新規診断法や治療法の開発、幹細胞の標準化などに応用することによって、小児がん医療や再生医療へ貢献することを目的とする。

また、糖鎖プライマー法は、産生された糖鎖を抗体作製の抗原として利用するなど、2次的な利用への応用性も高い。本研究では、得られた糖鎖を化学的に修飾して抗原性を高め、一般に樹立することが難しかった糖鎖に対する優秀な抗体作製法の開発を試みる。この結果樹立された糖鎖抗体を、小児腫瘍に対する抗体療法開発や、ヒト幹細胞の標準化のための検査薬に応用することを目指す。

B. 研究方法

本研究では、1) 糖鎖プライマー法への適用を目的とした、正常未分化細胞の分化誘導培養系の確立と、培養細胞の糖鎖プライマー法処理条件検討、2) 発現糖鎖解析、効率的プロファイリングのための基盤技術の確立、3) 各種細胞の発現糖鎖パネル化、4) 糖鎖抗体樹立、5) 発現糖鎖パネルと糖鎖抗体の細胞規格化への応用、をそれぞれ順次進めていく。本年度は1)と2)を中心に研究を進めた。

使用する細胞及び培養技術として、国立成育医療センター研究所が有しているヒト白血病細胞株、骨髄由来造血幹細胞、ヒト間葉系幹細胞及び単離培養技術を用いる。糖鎖プライマー法では、培地にアルブミンのような脂溶性分子のキャリアーが存在すると、糖鎖産生が抑制されるため、それぞれの細胞に対する糖鎖プライマー法に適した培養処理、分化誘導条件を確立する。それら細胞の状態等は形態観察、分泌液性因子の分析、フローサイトメトリーを用いた表面マーカー分析、DNAマイクロアレイを利用した遺伝子解析で行う。

糖鎖プライマー法で産生した糖鎖は培地より逆相固相カートリッジを使用して抽出した後、TLCによる分離を行い、分離した糖鎖はMatrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF/MS)を用いて、MS/MS測定はElectrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI MS)を用いて行う。

また、これまでの手法では検出の難しかった非常に微量な糖鎖の発現を明らかにするためには糖鎖を高精度に分離し、微量で高感度に検出して構造解析をする手法を確

立する必要がある。その手法として糖鎖を高精度に分離するキャピラリー高速液体クロマトグラフィー (Cap LC)と高度な構造解析が高感度に行うことが可能なマスマスペクトロメトリー (MS) を組み合わせたLC/MSを採用し、LC/MSによる糖鎖分離・構造解析系を確立する。

さらに、発現糖鎖解析、効率的プロファイリングの基盤技術としての糖鎖アレイ確立への応用を目的として、特定のレクチンと糖鎖プライマー産生糖鎖との特異的結合を確認する実験系構築のため、Galectin-1蛋白質をほ乳類細胞で発現させるベクター作製を行う。

以上のような、技術確立と並行して、実際に各種未分化細胞の発現糖鎖解析を実施し、得られた情報を順次パネル化していく。そのモデルの一つとして、小児腫瘍の代表であるB前駆細胞性急性リンパ芽球性白血病のCD10抗原上の糖鎖構造解析を行い、効率的な発現糖鎖プロファイリング法についても検討して行く。

(倫理面への配慮)

ヒト骨髄由来CD34陽性細胞は、米国Cambrex社からインフォームドコンセントを得た上で市販されているものを購入して使用したため、倫理的な配慮は特に必要ないと判断された。

当研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている(国立成育医療センター研究所、受付番号25、26及び27、平成15年1月承認、受付番号49、平成15年10月承認、受付番号55、平成15年11月承認、受付番号88、89、90、91平成16年7月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付

番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認)。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う。

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号2003-002, 2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

1) 白血病等未分化細胞への糖鎖プライマー処理条件最適化

白血病・リンパ腫細胞株として、未分化大細胞性リンパ腫細胞株、前駆B細胞性リンパ性白血病細胞株、パーキットリンパ腫、前骨髄性白血病細胞の全4種6株において糖鎖プライマー投与条件を決定し、糖鎖の産生を確認した。前骨髄性白血病細胞株では、分化誘導条件で発現糖鎖が変化することを確認した。

血球系未分化細胞として、CD34陽性細胞を用いて、単球系、巨核球・血小板系細胞への分化誘導系を確立した。今後、それら分化誘導系に糖鎖プライマー法を適用し、分泌糖鎖の発現パネル作製に着手する。

その他の未分化細胞として、マウス胚性幹細胞(ES)及び胚性癌腫細胞(EC)で糖鎖プライマー処理条件を決定した。また、ヒト間葉系幹細胞において、糖鎖プライマ

ー投与のための、未分化能維持および分化誘導の最適培養条件を決定した。

さらに神経芽腫細胞株4株で至適培養条件を決定し、糖鎖プライマーを投与して、高速液体クロマトグラフィーと質量分析(LC/MS)を用いて、糖鎖プライマー法による糖鎖の産生を確認した。

本年度計画では、約5株で糖鎖プライマー投与条件最適化を行う予定であったが、血球系細胞株では全4種6株、正常CD34陽性細胞では、2方向への分化誘導系、ES、ECおよび間葉系幹細胞では4株、神経芽腫細胞株では4株で、糖鎖プライマー投与条件最適化を行った。これは当初の予定の5株を大幅に上回るものであった。

2) 発現糖鎖構造解析とその基盤技術の確立

TLC及びMALDI TOF/MSを使用して解析した結果、糖鎖プライマー法で産生された糖鎖を、HL60で3種類、神経芽腫細胞株では最大で6種類検出し、糖鎖配列を決定することが出来た。しかし、この方法では、TLC上で一旦プリムリン試薬を用いて検出する必要があるため、その試薬での検出限界以下の糖鎖プライマー由来糖鎖は見いだすことは難しい。

生体分子を高精度に分離することが可能なキャピラリー高速液体クロマトグラフィー(Cap LC)と高度な構造解析が高感度に行うことが可能なマススペクトロメトリー(MS)を組み合わせたLC/MSを用いた解析では、これまでの手法では検出・構造解析が難しかった非常に微量な糖鎖の配列を明らかにすることが可能であった。神経芽腫細胞株を用いた実験では、糖鎖プライマー法で14種類もの糖鎖産生を確認し、糖鎖

配列を明らかにすることが可能であった。現在配列ばかりでなく、糖の結合位置など詳細な構造解析法の確立に着手している。

また、その他の基盤技術確立として、HE K-293A細胞を用いて、糖鎖プライマー法による糖鎖生合成経路のモニタリングについて検討した。さらに、発現糖鎖解析、効率的プロファイリングの基盤技術としての糖鎖アレイ確立への応用を目的として、特定のレクチンと糖鎖プライマー産生糖鎖との特異的結合を確認する実験系構築のため、G alectin-1蛋白質をほ乳類細胞で発現させるベクターを作製した。一方、白血病細胞の糖鎖パネル化の端緒として、小児腫瘍で最も頻度の高いB前駆細胞性急性リンパ性白血病に発現する代表的抗原CD10に着目した糖鎖構造解析を行い、同じ蛋白上の糖鎖であっても、その構造は細胞株間で大きく異なることが明らかにした。

D. 考察

国立成育医療センター研究所では、ヒト白血病細胞株、凍結白血病細胞、骨髄由来細胞、ヒト間葉系幹細胞、胚性幹細胞、胚性癌腫細胞及び正常未分化細胞の生体からの単離培養技術を有している。さらに一部の細胞では分化誘導することも可能である。糖鎖はがん化や細胞の成熟過程でその発現パターンが大きく変化することが知られているが、構造の多様性や精製・分析の難しさ、有用なプローブの不足などから、蛋白質に比べるとその応用はごく限られていた。本研究で採用した糖鎖プライマー法は生きた細胞をいわば糖鎖工場と見立てて培養液中に糖鎖を大量に生産させる技術である。この方法を適用することで、これまで微量

であったため困難であった糖鎖の網羅的解析がきわめて容易となり、未知の糖鎖構造を同定できる可能性もある。しかも得られた発現糖鎖構造をパネル化することで、細胞のプロファイリングに利用することも可能である。

しかしながら糖鎖プライマー法では、培地にアルブミンのような脂溶性分子のキャリアが存在すると、糖鎖産生が抑制されるため、それぞれの細胞に対する糖鎖プライマー法に適した培養処理、分化誘導条件を確立する必要がある。即ち高濃度の血清が存在する場合には、糖鎖プライマー法による糖鎖生産効率が低下するため、糖鎖プライマー法の有利な点が損なわれてしまうことになる。本年度は低血清若しくは無血清の培地で白血病等未分化細胞を培養する条件を確立することが出来た。特に、これまでフィーダー細胞が維持継代に必要なだったES細胞をはじめとしてEC細胞においても、KSR (Knockout Serum Replacement) を使用することで分化誘導を保持したまま糖鎖プライマー法を適用できる培養条件を確立した。これらの培養条件で糖鎖プライマー法を適用し、網羅的な発現糖鎖パネルの作製に着手した。

糖鎖構造解析法に関しては、LC/MSを用いた解析技術の確立について検討を開始した。MSは微量な生体分子を網羅的に高感度で検出できる手段であり、近年蛋白質を網羅的に解析するプロテオミクスに大いに利用されている。糖鎖構造解析にはこれまで試料を大量に用意する必要があったが、ごく微量な試料で糖鎖構造解析をする体制が整った。本プロジェクトでも市販糖鎖標品による構造解析基礎情報も得られ、糖鎖プ

ライマー法で生産した糖鎖や生体試料から抽出した糖脂質などCap LCによる分離条件を確立しつつある。糖脂質の研究では、発現量の多さなどから、ガングリオ系列、グロボ系列の糖脂質の研究が盛んであった。それらの糖脂質は市販品として入手可能であるが、イングロボ系列、ネオラクト系列などの糖脂質は入手することは非常に難しい。糖転移酵素遺伝子の網羅的解析から、これまでTLCで検出が難しかったこのような糖脂質でも生合成されている可能性が示唆されている。Cap LC及びMSではそのようなごく微量に発現している糖脂質でも検出し、構造決定できる能力を持っているが、そのような分析系を確立するため、現在それら微量糖脂質の生合成をになう糖転移酵素遺伝子のクローニングに着手しており、その遺伝子を強制発現させることで入手の難しい糖脂質を発現させてLC/MSの分析系で同定する実験系を確立する。

糖鎖プライマー法では現在までのところ糖脂質糖鎖生合成系と糖蛋白質O結合型糖鎖に対するものが用意されているが、糖蛋白質N結合型糖鎖に対するものはない。糖蛋白質N結合型糖鎖については今後、エンドグリコシダーゼを用いて糖鎖を切り出し、糖鎖の還元末端アルデヒド基を利用して化学的にビーズに糖鎖を結合させ、夾雑物を除く方法を確立する予定である。この方法ではビーズに固定化した糖鎖は、還元剤を用いてビーズより遊離させ、LC/MSで分析することが可能である。

来年度以降は、LC/MSで得られたそれぞれの細胞の糖脂質糖鎖、糖蛋白質糖鎖のマススペクトルの結果から、多変量解析・主成分分析等の統計学的手法で、診断に有用

な発現糖鎖パターンを同定することを目標とする。

E. 結論

白血病等未分化細胞への糖鎖プライマー投与条件最適化を行った。一部の細胞では、糖鎖プライマー法で産生した糖鎖の糖配列を決定した。今後、順次糖鎖プライマー法で産生した糖鎖の構造決定及び定量を行い、発現糖鎖パネルの充実を図る。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hashimoto M, Morimoto M, Saimoto H, Shigemasa Y, Yanagie Y, Eriguchi M, Sato T. Gene transfer by DNA/mannosylated chitosan complexes into mouse peritoneal macrophages. *Biotechnology Letters* 28:815-821, 2006
- 2) Hu D, Tan X, Sato T, Yamagata S, Yamagata T. Apparent suppression of MMP-9 activity by GD1a as determined by gelatin zymography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349:426-431, 2006
- 3) Ito T, Iida-Tanaka N, Niidome T, Kawano T, Kubo K, Yoshikawa K, Sato T, Yang Z, Koyama Y. Hyaluronic acid and its derivative as a multi-functional gene expression enhancer: Protection from non-specific interactions, adhesion to targeted cells, and transcriptional ad

esion. *J Controlled Rel* 112:382-388, 2006

4) Nakajima H, Sato T. Construction of an oligosaccharide library by cultured cells for use in glyco-biotechnology, *Nanotechnology in carbohydrate Chemistry* (Ed. by Hideya Yuasa), Transworld Research Network, 167-173, 2006

5) 佐藤智典. 糖鎖生命工学：細胞機能を利用したオリゴ糖鎖の合成. *野口研究所時報*. 49:21-29, 2006

6) Matsubara T, Iijima K, Nakamura M, Taki T, Okahata Y, Sato T. Specific binding of GM1-binding peptides to high-density GM1 in lipid membranes. *Langmuir* 23:708-714, 2007

7) Zhu X, Sato T. The distinction of underivatized monosaccharides using electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Mass Spectrometry* 21:191-198, 2007

8) Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang WR, Itagaki M, Shiozawa Y, Suzuki K, Sakaguchi S, Ktagiri YU, Takahashi T, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. Involvement of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins in pro-B-cell development. *Exp Hematol* 34:508-518, 2006

9) 塩沢裕介, 北村紀子, 竹野内寿美,

田口智子, 大喜多肇, 林泰秀, 小原明, 花田良二, 土田昌宏, 藤本純一郎, 清河信敬. 4カラーデジタルフローサイトメトリーを用いた小児白血病マーカー中央診断の試み. *Cytometry Research* 16:11-17, 2006.

10) Suzuki K, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi T, Saito M, Shimizu T, Okita H, Fujimoto J. Characterization of monocyte-macrophage lineage cells induced from CD34+ bone marrow cells in vitro. *Int J Hematology* (in press)

11) 清河信敬. 免疫学的分類・診断 [別所文雄 編：新小児がんの診断と治療], 診断と治療社 (印刷中)

12) Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, Umezawa A. Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells. *Mol. Biol. Cell* (in press)

13) Umezawa A, Toyoda M. Two MSCs: Marrow stromal cells and mesenchymal stem cells. *Inflammation and Regeneration* 27:28-36, 2007

14) Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A. Hyaline

cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem* 100:1240-1254, 2007

15) Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp Cell Res* 313:698-706, 2007

16) Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, Umezawa A, Young MJ. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. *Stem Cells* 24:2270-2278, 2006

17) Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, Umezawa A. Increased mobilization of c-kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻(KSL) cells and colony-forming units in spleen (CFU-S) following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification. *J Cell Physiol* 208:188-194, 2006

18) Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of adult stem cells

derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. *Endocrinology* 147:4104-4111, 2006

19) 中島英規. オリゴ糖合成-糖鎖プライマー法で生産した糖鎖の医療分野への応用-. *高分子* 55:25, 2006

2. 学会発表

1) Matsubara T, Sato T. Identification of peptides that inhibit influenza virus infection. ISBC2006, Aug 6-9, 2006.

2) Sato T, Murakami M, Kaneko T, Ide Y, Hayashi R, Yamagata T. Construction of an oligosaccharide library using cells. (35) Biocombinatorial Synthesis of Oligosaccharides, Development of glycan array, and glycome analysis. ISBC2006, Aug 6-9, 2006.

3) 村上舞, 井出好美, 水野真盛, 佐藤智典. 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー(34) O-グリカンを合成するための糖鎖プライマー. 第26回糖質学会年会, 8月23-25日, 2006.

4) 朱性宇, 佐藤智典. エレクトロスプレーイオン化法質量分析計による単糖の同定. 第26回糖質学会年会. 8月23-25日, 2006.

5) 佐藤智典, 橋本麻由, 森本稔, 齋本博之, 重政好弘, 柳衛宏宣. PDNA/糖修飾キトサン複合体の構造と細胞内への遺伝子導入. 第55回高分子討論会.

9月20-22日, 2006.

6) 松原輝彦, 飯島一智, 角真智子, 佐藤智典. ライブラリー選択で得られたオリゴ糖鎖認識ペプチドの構造と機能. 第55回高分子討論会. 9月20-22日, 2006.

7) Matsubara T, Iijima K, Kubota H, Sato T. Selection and functional analysis of oligosaccharide-binding peptides. 43JPS/PEM4, Nov. 5-8, 2006.

8) 古閑理恵子, 神谷洋平, 小山義之, 柳衛宏宣, 松田修, 佐藤智典. 自殺遺伝子/キトサン/ラクトース修飾PEG誘導体からなる3元複合体の抗腫瘍効果. 第87日本化学会春季年会. 3月25-28日, 2006.

9) 村上舞, 井出好美, 水野真盛, 佐藤智典. 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー(36)アミノ酸結合型糖鎖プライマーの合成とHL60細胞における糖鎖伸長反応. 第87日本化学会春季年会. 3月25-28日, 2006.

10) 朱性宇, 佐藤智典. 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー(37)キャピラリー電気泳動/質量分析計(CE/MS)による生成物のハースループット解析. 第87日本化学会春季年会. 3月25-28日, 2006.

11) 久保田博之, 松原輝彦, 佐藤智典. ランダム変異ファージライブラリーを

用いたガングリオシド結合性ペプチドの定向進化. 第87日本化学会春季年会. 3月25-28日, 2006.

12) Miyagawa Y, Okita H, Katagiri Y U, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Kiyokawa N. Identification of the candidate genes involved in the defect of cell regulatory systems in Ewings family tumor. 20th IUMBC International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan. June 18-23, 2006.

13) 田口智子, 宮川世志幸, 今留謙一, 堀内保臣, 竹野内寿美, 松井淳, 北村紀子, 佐藤伴, 片桐洋子, 大喜多肇, 藤原成悦, 藤本純一郎, 清河信敬. EBV感染によってヒトB細胞に誘導される遺伝子発現の変化の解析. 第48回日本小児血液学会学会, 大阪. 11月25-26日, 2006.

14) 清河信敬, 宮川世志幸, 堀内保臣, 竹野内寿美, 田口智子, 佐藤伴, 片桐洋子, 大喜多肇, 藤本純一郎. 培養系を用いたヒト造血幹細胞の放射線照射による遺伝子発現の変化の解析. EBV感染によってヒトB細胞に誘導される遺伝子発現の変化の解析. 第48回日本小児血液学会学会, 大阪. 11月25-26日, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

II 分担研究報告書

1. 糖鎖プライマー法による糖鎖構造の解析

佐藤 智典

2. 血液系未分化細胞プロファイリングおよび抗糖鎖抗体作製

清河 信敬

3. 血液系未分化細胞プロファイリングおよび抗糖鎖抗体作製

片桐 洋子

4. 間葉系未分化細胞プロファイリング

梅澤 明弘

5. 発現糖鎖解析、糖鎖修飾分子合成および抗糖鎖抗体作製

中島 英規

6. 発現糖鎖解析、糖鎖修飾分子合成および抗糖鎖抗体作製

齋藤 実

分担研究報告書

糖鎖プライマー法による糖鎖構造の解析

分担研究者 佐藤 智典 慶應義塾大学理工学部生命情報学科 教授

研究要旨：糖鎖パネルを作製するために、ヒト急性前骨髄性白血病細胞株HL60、4種類のヒト神経芽腫細胞株、およびマウス胚性癌腫細胞株F9を用いて、発現糖鎖に関する研究を行った。HL60細胞にGalNAc α -Thr-C12プライマーを投与することで3種類のO-グリカンが得られた。4種類の神経芽腫細胞株を用いてLac-C12プライマーによりガングリオ系列6種類、GlcNAc-C12プライマーによりネオラクト系列6種類、GalNAc α -Thr-C12プライマーにより3種類のO-グリカンが得られた。F9細胞では無血清培養法を確立して、Lac-C12プライマーにより3種類、GlcNAc-C12プライマーにより4種類の糖鎖伸長生成物を得た。

研究協力者

清河 信敬、大喜多肇

(国立成育医療センター研究所

発生・分化研究部 機能分化研究室)

A. 研究目的

糖は生体内において単に栄養源として働くばかりでなく、様々な生命現象に関わっている。本研究では細胞が産生する糖鎖のカタログ化を行うために、糖鎖プライマー法を応用して網羅的に細胞での発現糖鎖を解析する。糖鎖プライマーは擬似糖脂質であり、培養液中に加えると細胞内に取り込まれ、細胞内で糖鎖伸長反応を受けた後に細胞外に分泌される。よって、細胞を壊すことなく糖鎖伸長生成物を単離して構造を

解析することが可能である。得られた糖鎖伸長生成物は内在性の糖鎖の種類を反映していることが明らかになっている。複数の糖鎖生合成経路の基質となる糖鎖プライマーを、種々の培養細胞に与えることで、細胞で発現している多くの糖鎖を合成することができ、糖脂質糖鎖生産系だけでなく、糖蛋白質O-グリカン生合成系にも応用できる。本年度はヒト急性前骨髄性白血病細胞株HL60、神経芽腫細胞株、および胚性癌腫細胞株を用いて、発現糖鎖に関する解析を行った。

神経芽腫群腫瘍は胎生6週頃に神経堤から前脊椎や副腎原基の尾側に遊走してくる未熟神経芽細胞あるいは交感神経母細胞が分化・成熟して交感神経節や副腎髄質を形

成する過程の異常により発生するとされている。神経芽腫は発生する部位、分化段階、そして腫瘍の悪性度の違いなど多様性に富んだ腫瘍である。この多様性を、細胞表面を覆っている糖鎖で規定できるか検討する。そのために、糖鎖プライマー法を利用して複数の神経芽腫細胞株に発現している糖鎖を網羅的に解析し、細胞株間で比較を行い、発現糖鎖の共通性あるいは非共通性を明らかにし、各細胞株の生物学的性質と糖鎖構造との関係を見いだすことを目的とする。

胚性癌腫細胞 embryonal carcinoma cell (EC細胞) は自己複製能と多分化能を有しており、胚性幹細胞 embryonic stem cell (ES細胞) と比較した場合に、特定の条件下で分化誘導でき、培養維持するためにフィーダー細胞との共培養などの特別な処置が必要ないことなどの利点があるため、初期胚における発生・分化の研究手段として汎用されている。初期発生においては、stage specific embryonic antigen (SSEA) と呼ばれる一連の糖鎖が分化マーカーとして有用であることが明らかにされている。しかし、従来から行われている糖鎖マーカーの探索研究では、分化過程において変化する糖鎖を網羅的に解析することは困難である。そこで、糖鎖プライマー法を用いて、EC細胞の発現糖鎖解析を行い、新たな糖鎖分化マーカーの同定、発現糖鎖による、EC細胞の種類や分化段階の分類法の開発を試みる。その成果は、EC細胞に発現する糖鎖の機能解析にも応用可能と考えられる。

そこで本年度は、これらの細胞を用いて、糖脂質型の糖鎖を検出するためにラクトースを有する糖鎖プライマー Lac-C12 および N-アセチルグルコサミンを有する

GlcNAc-C12、さらには O-結合型糖鎖の検出を行うために N-アセチルガラクトサミンを有する GalNAc α -Thr-C12 を投与して糖鎖伸長反応を行い、得られた糖鎖伸長生成物の構造解析を MALDI-TOF MS および ESI-MS/MS を用いて解析した。

B. 研究方法

1) HL60細胞での実験

ヒト急性前骨髄性白血病細胞株 HL60 の維持には RPMI 1640 (nacalai tesque) にストレプトマイシン 0.1g/L, ペニシリン G カリウム 10万 unit/L を含有させ、非働化したウシ胎児血清 FBS (大日本住友製薬) を 10% 添加したものを使用した。細胞は 5% CO₂-95% air に設定したインキュベーター (SANYO) 中、37 °C で培養した。細胞の継代は、細胞を遠心し、新しい培地に希釈して播種することで行った。

糖鎖プライマーとして GalNAc α -Thr-C12 を用いた。糖鎖伸長反応用の無血清培地として RPMI1640 (11835-030, Invitrogen) にトランスフェリン、インシュリン、二酸化セレンを加えて使用した。糖鎖伸長反応は次のように行った。遠心分離によって培養液から細胞を回収し、PBS(-) で洗浄した後、糖鎖伸長反応に用いる無血清培地で再度洗浄した。この細胞をトリパンブルー染色により所定の細胞密度になるように調製した後、所定濃度のプライマーを含んだ無血清 RPMI 1640 培地に再懸濁することで、糖鎖プライマーと相互作用させた。プライマーと相互作用させた細胞は、48時間培養した後、氷上あるいは 4 °C で静置することにより反応を停止させた。反応容器から培地を回収した後、PBS(-) で洗浄しながら細胞を回収

した。回収した細胞懸濁液を遠心分離し、上清を培地画分として回収した。

培地画分より抽出した脂質成分はHPTLC plate (Silica gel 60, Merck)に展開することで分析した。細胞画分は、試料をクロロホルム/メタノール=2/1 (v/v) に溶解し、全量をHPTLC plateに展開した。培地画分は、試料をクロロホルム/メタノール=2/1 (v/v) に溶解し、所定量をHPTLC plateに展開した。展開溶媒にはクロロホルム/メタノール/ 0.2% CaCl₂ aq.= 5/4/1(v/v/v) を用いた。展開後は溶媒を十分に乾かした後、HPTLC plateをレゾルシノール塩酸試薬で酸性糖脂質を染色し、さらにオルシノール硫酸試薬で中性糖脂質を染色した。レゾルシノール塩酸試薬で青紫色に染色したバンドはデンストメーター(CS-9000, 島津製作所)で波長580 nmで、オルシノール硫酸試薬で赤紫色に染色したバンドはデンストメーターで波長540 nmで解析した。

MSによる分析を行う場合、HPTLC plateで糖脂質を分離した後、プリムリン試薬を十分に噴霧し、365 nmのUVをあてて糖脂質を視覚化して赤鉛筆でマークしたマーキングしたHPTLC plateをブロッティング溶媒(イソプロピルアルコール/メタノール/0.2% CaCl₂ aq.=40/7/20 (v/v/v))に浸して引き上げ、glass fiber filterの上にシリカゲル面を上にして置き、その上にPVDF膜、PTFE膜、glass fiber filterを順にのせてTLCサーマルプロッターで糖脂質をPVDF膜にブロッティングした。この膜からメタノールとクロロホルム/メタノール=2/1 (v/v) で1回ずつ糖脂質の抽出をし、有機溶媒を窒素気流下で蒸発させて糖脂質を単離した。

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)は、AutoflexTM (BRUKER DALTONICS)を用いて測定した。マトリックスには DHB (2,5-Dihydroxybenzoic acid, Aldrich) または α -CHCA (α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid, Sigma) を用いた。TLC Blottingにより単離した糖脂質をクロロホルム/メタノール=2/1溶媒に溶解し、DHB溶液に加えてよく攪拌した。これをサンプルプレート上にのせ、風乾することで測定試料を作製した。試料が中性糖脂質の場合はpositive ion modeで、酸性糖脂質の場合はnegative ion modeで測定を行った。

MS/MS測定は、ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry)により行った。ESI-CIDスペクトルは、esquire3000^{plus}(Bruker Daltmics) を用いて測定した。試料をクロロホルム/メタノール=2/1 (v/v) 溶媒に溶解し、これにアセトニトリル/水=1/1 (v/v) 溶液を加え、さらに試料が中性糖の場合は100 mM酢酸アンモニウム溶液を加えた。試料が中性糖脂質の場合はpositive ion modeで、酸性糖脂質の場合はnegative ion modeで測定を行った。

2) 神経芽腫細胞での実験

GOTO, NB1, NB9, NB69の4種の細胞株で糖鎖プライマー法により発現糖鎖の解析を行った。糖鎖プライマーはLac-C12, GlcNAc-C12, GalNAc-Thr-C12の3種類を用いた。神経芽腫細胞株は以下に示す培養方法で維持した。培養液にはRPMI-1640培地 (Sigma) に非働化したウシ胎児血清 (FBS, JRH) 10 %加えたものを使用した。細胞は37°C、5 % CO₂-95 % air下のインキュベーターで培養した。細胞は100 mm ϕ ディッシュ

(Corning) に播種し、継代では0.25 %トリプシンで1分間処理し細胞を剥離させた。NB1細胞の分化誘導はRPMI-1640培地で無血清条件、Insulin-Transferrin-Selenium-A (ITSA, Gibco, Insulin:10 μ g/mL, Transferrin: 5.5 μ g/mL, Sodium Selenite:6.7 ng/mL, Sodium Pyruvate:110 μ g/mL) を添加した条件下で8日間培養した。

糖鎖プライマーの投与条件を以下に示す。糖鎖プライマー投与培地にはDMEM/Ham's F12 (Gibco) に非働化したFBS 1%加えたものを使用した。添加因子としてITSAを添加した。プライマーの濃度は50 μ Mの濃度で加えた。細胞数 2.5×10^6 cells/dishで播種し、24時間インキュベートして細胞を接着させた。培養培地を吸引し、DMEM/Ham's F12培地で洗浄し、プライマー投与培地に交換することで投与とした。その後48時間インキュベートしプライマーの回収を行った。糖鎖プライマーの回収方法を以下に示す。糖鎖伸長をうけた糖鎖プライマー生成物はプライマー投与培地を回収し、逆相カラムクロマトグラフィーにかけることにより、脂質を担体に吸着させて抽出した。培地全量を前処理したSep-Pak C18 plus (Waters) に吸着させMilliQで洗浄した後、メタノールで溶出させ、糖鎖プライマー生成物を得た。

培地より抽出した糖鎖プライマー生成物は、HPTLC plate (Silica gel 60, Merck) に展開することで分析した。展開溶媒にはクロロホルム/メタノール/0.2% CaCl_2 aq.=5/4/1 (v/v/v) を用いた。展開し溶媒を十分に乾かした後、HPTLC plateをレゾルシノール塩酸試薬で染色し、さらにオルシノール硫酸試薬で染色した。染色されたバンドはデンストメーター (CS-9300PC, Shimazu) によっ

て波長580 nmおよび540 nmで解析した。

糖鎖プライマー生成物の単離精製はTLC Blottingにより行った。HPTLCで生成物を分離した後、Primuline Reagentを十分に噴霧し、365 nmのUVをあてて生成物を可視化し赤鉛筆でマークした。マーキングしたHPTLC plateをプロッティング溶媒 (2-プロパノール/メタノール/0.2% CaCl_2 aq. = 40/7/20(v/v/v)) に20秒浸して引き上げ、glass fiber filter (AC-5972, ATTO) の上にシリカゲル面を上にしておき、その上にポリビニリデンジフルオライド膜 (PVDF膜), (クリアプロットP膜, AC-6665, ATTO), ポリテトラフルオロエチレン膜 (PTFE膜), (AC-5973, ATTO), glass fiber filterを順にのせてTLCサーマルプロッター (AC-5970, ATTO) で生成物をPVDF膜にプロッティングした。PVDF膜を水で洗浄した後、目的部分を切り取った。この膜からメタノールとクロロホルム/メタノール=2/1 (v/v) で一回ずつ生成物を抽出し、加温することで有機溶媒を蒸発させて生成物を単離した。

単離した生成物はMatrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)、autoflexTM (Bruker Daltonics) を用いて測定した。autoflexTMでは、リフレクターモードを使用し、中性糖についてはpositive ion mode、酸性糖についてはnegative ion modeで測定した。

3) F9細胞での実験

DMEM (Gibco) にグルコース、グルタミンを添加し、フェノールレッド以外は普段、培養しているDMEM (Sigma) と同じ組成の培地を調整した。また、その他にDMEM/F12 (Gibco)、DMEM/F12 (Gibco)の培地を使用し

た。24 well plateに 3.5×10^4 cells/wellの密度で細胞を播種し、接着させ、それぞれの培地で一回洗浄し、10% 血清 (FBS) 下で各種培地に交換した。培地交換後、24時間後と48時間後の生細胞数をトリパンブルーで測定した。

培地組成に関しては、1% FBS、5% FBS、10% FBS、1% KSR、5% KSR、10% KSR、15% KSR、Fibronectin (Fib, 5 μ g/mL)+ITSA ($\times 1$)+Fib被覆dish、1% FBS+Fib (5 μ g/mL)+ITSA ($\times 1$)+Fib被覆dish、5% FBS+Fib (5 μ g/mL)+ITSA ($\times 1$)+Fib被覆dish、1% KSR+Fib (5 μ g/mL)+ITSA ($\times 1$)+Fib被覆dish、5% KSR+Fib (5 μ g/mL)+ITSA ($\times 1$)+Fib被覆dishを比較した。KSR (Knockout Serum Replacement) はES細胞を無血清状態で培養する際に、使用される血清代替物である。12 well plateに 5.0×10^4 cells/wellの密度で細胞を播種し、接着させ、DMEM/F12 (Gibco) で一回洗浄した。その後、各種培地に交換し、24時間後と48時間後の細胞の状態を目視で確認した。

未分化F9細胞をレチノイン酸 10^{-7} MとジブチルサイクリックAMP 10^{-3} M下で2日間培養し、継代を行った。その後、同じ濃度でさらに2日間培養し、合計4日間、分化誘導を行った。

未分化F9細胞と4日間分化させたF9細胞を用意し、 1.0×10^6 cells/10cm dishの密度で播種し、接着させ、DMEM/F12 (11039, Gibco) で一回洗浄した。その後、プライマー投与培地10 mLを加え、48時間の糖鎖プライマー投与 (Lac-C12、GlcNAc-C12ともに50 μ M) を行った。その際、プライマー投与培地にはDMEM/F12を基本培地とし、1% FBS、ITSA($\times 1$)、Fib (5 μ g/mL)、Fib被覆dishを用

いた。その後、培地画分を回収し、HPTLC分析および質量分析による構造解析を行った。

未分化F9細胞を 1.0×10^6 cells/10 cm dishの密度で播種し、接着させ、DMEM (グルコース/グルタミン添加)で一回洗浄した。その後、プライマー投与培地10 mLを加え、48時間のプライマー投与 (Lac-C12、GlcNAc-C12) を行った。その際、プライマー投与培地には、10% FBS、10% KSR / DMEM (グルコース/グルタミン添加) を使用した。その後、培地画分を回収し、HPTLC分析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、培養細胞株を用いた実験のみ実施した。

C. 研究結果

1) HL60細胞から糖鎖プライマー法により得られた糖鎖構造の解析

WST-1による細胞増殖活性の検討では、糖鎖プライマーの投与は、50 μ M のGalNAc α -Thr-C12存在下、48時間のインキュベーションという条件下でHL60細胞に対して顕著な毒性は示さなかった。

HL60細胞にGalNAc α -Thr-C12プライマーを投与して48時間インキュベーションした後、培地画分を回収した。HPTLC分析の結果、3種類のプライマー由来糖鎖伸長生成物M1-M3が検出された。そこで、生成物M1-M3の構造解析を行った。生成物M1-M3はレゾレルシノール/塩酸で青紫色に染色され、酸性糖を含むと予想されたため、Negative ion modeで測定を行った。M1の測定の結果、プライマーにヘキソースやシアル酸が伸長した構造をもつと予測された。

M2 とM3の構造解析も行った。

2) 神経芽腫細胞株から糖鎖プライマー法により得られた糖鎖構造の解析

GOTO細胞ではLac-C12プライマーを投与した場合、2種の生成物L1,L2が得られた。その構造は L1:GM3-type, NeuAc-Gal-Glc-C12、L2:GM2-type, GalNAc(NeuAc)-Gal-Glc-C12であった。GM2-typeの生成物L2がメイン生成物として得られた。

NB9細胞ではLac-C12プライマーを投与した場合6種類の生成物L0~L4,L6が得られた。その構造の結果、L0:Gb3, Gal-Gal-Glc-C12といったグロボ系や、L1, L2, L3:GM1-type,

GalNAc-Gal(NeuAc)-Gal-Glc-C12, L4:GD3-type, NeuAc-NeuAc-Gal-Glc-C12, L6:GD2-type, GalNAc(NeuAc)-Gal-Glc-C12などのガングリオ系の糖鎖が含まれていることが明らかとなった。生成物L1が最も多く得られ、次いで生成物L2の量が多かった。

NB69細胞ではLac-C12プライマーを投与することで5種類の生成物L1~L4,L6が得られた。GD2-typeの生成物L6の量がNB1, NB9に比べやや多かった。

NB1細胞ではLac-C12プライマーを投与することで5種類の生成物L1~L4,L6が得られた。その生成物量に関してはNB9とほぼ同様のパターンを示していた。また、NB1を分化誘導させた細胞では新たに生成物L5:GD1a-type, NeuAc-Gal-GalNAc(NeuAc)-Gal-Glc-C12 が得られた。そして、分化前と比べ生成物L2およびL4の割合が高くなっていた。

以上のように、神経芽腫細胞株からは主にガングリオ系列の生成物が得られており、

中でもGM2型の生成物に関しては全ての細胞株で共通して得られた。一方で、GOTOではLac-C12の下流の生成物が得られていないこと、NB9ではガングリオ系の糖鎖に加えてグロボ系の糖鎖構造が得られたという細胞株間での相違も見られた。

GlcNAc-C12プライマーの生成物は全ての細胞株でネオラクト系の糖鎖が得られ、ほぼ共通の糖鎖構造が見られた。生成物量はG1,G4が多く得られたが他の生成物は少なかった。

GalNAc-Thr-C12プライマーを投与した結果ではcore1骨格をもつと考えられる3種類の生成物が得られた。生成物A1が全ての株でメジャー生成物として得られた。生成物A3は分子量から生成物A1に糖鎖がさらに一分子伸長した構造であると考えられる。

3) F9細胞の培養方法と糖鎖伸長実験

糖鎖プライマー法に使用する基本培地検討の目的で、複数の異なる培地を10% FBS添加で使用した場合の48時間後の生細胞数を比較した結果、DMEM (Gibco, グルコース/グルタミン添加) > DMEM (Sigma, Control) > DMEM/F12 (Gibco) > DMEM/F12 (Gibco)の順に細胞数が多かった。新たに調整したDMEMにおいて、通常の継代に使用しているDMEM (Sigma)と同等以上の増殖活性が得られた。また、培地に添加する血清あるいはその代替試薬に関して、10% FBS、10% KSR、15% KSRの三者を比較したところ、15% KSR以外の条件では48時間後に剥離する細胞が多く、プライマー投与条件としては不適であった。

以上での検討をもとに、F9細胞に糖鎖プライマーを投与して糖鎖伸長生成物の検討を行った。まず、1% FBS、ITSA(×1)、Fib (5