

μg/mL)、Fib被覆dish / DMEM/F12で実験を行ったところ、未分化F9細胞では生成物が得られたものの (GlcNAc-C12から3種類)、48時間後には細胞はすべて浮遊してしまった。一方、分化誘導したF9細胞では生成物が得られ (GlcNAc-C12から6種類、Lac-C12から7種類)、48時間後においても、細胞は接着していた。次に10% FBSおよび10% KSR/DMEM (11054、グルコース/グルタミン添加)存在下で同様の検討を行った。両条件ともに、プライマー投与後においても細胞は接着していた。10% FBSでは生成物が全く得られなかったが、10%、15% KSRではLac-C12から3種類、GlcNAc-C12からは4種類の生成物が得られ、KSR下での糖鎖伸長が確認された。

#### D. 考察

糖鎖プライマー法を用いて、ヒト急性前骨髄性白血病細胞株HL60、4種類の神経芽腫細胞株、および胚性癌腫細胞株F9での糖鎖伸長生成物を単離して、構造解析を行った。今回の検討では、内在性の糖脂質糖鎖に関して従来の報告に対応する結果が得られている。また、各細胞でこれまでに報告されていない糖鎖構造の検出も確認された。この事実は、本手法が細胞で発現している糖鎖構造のパネル化を行うのに有効な方法であることを改めて示唆している。今後は、糖鎖伸長生成物をより迅速にかつ高感度に検出する手法の確立が必要になってくる。LC-MSの装置はそれを実現できるひとつの手法である。これを用いることにより、解析する細胞の種類を飛躍的に増やす事が可能になり、糖鎖パネルの作製作業が加速されることが期待される。

#### E. 結論

3種類の糖鎖プライマーを用いて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F9の6種類の細胞に対して、糖鎖伸長生成物の構造解析を行った。神経芽細胞腫の4つの細胞株 (GOTO, NB1, NB9, NB69) および分化誘導したNB1細胞から得られた糖鎖プライマー生成物についてその構造と量からパネル化を行った結果、各細胞株間で発現する糖鎖構造に共通性と相違点を確認された。今回の検討では、細胞間で良く保存されている糖鎖と、細胞毎に特徴的な糖鎖が検出されており、この結果は、細胞に発現している糖鎖パネルの作製において、糖鎖プライマー法が有効であることを示している。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hashimoto M, Morimoto M, Saimoto H, Shigemasa Y, Yanagie H, 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 adhesion, *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. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21: 191-198, 2007

## 2. 学会発表

1) Matsubara T, Sato T. Identification of peptides that inhibit influenza virus infection, *ISBC2006*, 2006.8.6-9

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*, 2006.8.6-9

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日-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日-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日-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日-22日, 2006

7) Matsubara T, Iijima K, Kubota H, Sato T. Selection and functional analysis of oligosaccharide-binding peptides, *43JPS/PEM4*, 11.5-8 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,  
3/25-28, 2008

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.  
3/25-28, 2008

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ブット解析.  
第87日本化学会春季年会. 3/25-28,  
2008

11) 久保田 博之, 松原 輝彦, 佐藤 智  
典. ランダム変異フェージライブラリ  
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. 3/25-28. 2008

G. 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

分担研究報告書

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

分担研究者 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

研究要旨：正常造血系細胞の分化過程における発現糖鎖ライブラリー構築に応用するため、in vitroでの造血細胞の分化誘導培養系構築と、その糖鎖プライマー法実施のための至適化を行った。種々のサイトカインと固層化した接着因子を組合せることにより、低血清あるいは無血清の状態においても、種々の分化段階の単球系細胞、未熟および成熟巨核球の分化誘導は比較的容易に行えることが明らかになり、これらの培養法を用いて糖鎖プライマー法による発現糖鎖解析を行っていく。一方、B前駆細胞の分化誘導は困難であったが、一部の培養条件では数%程度のB前駆細胞を分化誘導することは可能であったことから、今後より高い頻度でB前駆細胞を分化誘導できる培養条件についてさらに検討して行く。

研究協力者

鈴木恭子、竹野内寿美、田口智子

（国立成育医療センター研究所

発生・分化研究部）

A. 研究目的

糖鎖は、核酸、蛋白に続く第三の生命鎖と呼ばれ、細胞機能において重要な機能を発揮することが知られている。また、糖鎖は細胞の成熟やがん化に伴ってその発現様式が複雑に変化することから、これらの過程において重要な役割を担うことが推測される。しかし、糖鎖は非常に多様な構造を有しており、精製・分析が難しく、解析に用いるのに有用な抗体も不足していること

などから、その構造や機能の詳細については不明な点が多く、蛋白質等と比較するとその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を始めとして、幹細胞マーカーや腫瘍マーカーとして糖鎖が有用である点を考慮すると、糖鎖研究の医学・医療応用を積極的に進める必要がある。そこで本研究では、種々の系統の造血系細胞を対象として、その正常の分化過程にある細胞が各分化段階で産生する糖鎖、ならびに分化の破綻の結果としての白血病細胞が産生する糖鎖を、糖鎖大量合成技術である糖鎖プライマー法を応用して網羅的に解析し、発現糖鎖のカタログ化を図ることを目的とする。

また、この方法により得られた糖鎖を使用して抗糖鎖抗体を含む抗糖鎖プローブを作成し上記細胞のプロファイリングや診断・治療に役立てることを目指す。本年は、正常造血系細胞の分化過程における発現糖鎖ライブラリー構築に応用するために、in vitroでの造血細胞の分化誘導培養系構築と、その糖鎖プライマー法実施のための至適化を行った。

## B. 研究方法

あらかじめFibronectin、N-cadherin、V-CAM1、Galectin等の接着関連因子を固層化した24穴培養プレートを用いて、ヒト骨髄由来CD34陽性細胞を10%牛胎児血清（FCS）添加RPMI1640培地、あるいは種々の市販の無血清培地に $1 \times 10^4$ /mlの細胞密度で浮遊し、種々のサイトカインのカクテルを添加して培養した。一定期間培養したのち、細胞の分化の状況を、種々の単クローン抗体を用いた蛍光多重染色により、フローサイトメトリーを用いて解析した。また、細胞の一部を回収してtotal-RNAを抽出し、cDNAを合成して種々の血球の系統特異的遺伝子に対するプライマーを用いたRT-PCRを行った。また、サイトカインの分泌は、Cytokine Beads Array (CBA、BD社)を用いて定量を行った。

マウス骨髄間質細胞株MS-5およびマウス繊維芽細胞株NIH-3T3からtotal-RNAを抽出し、Affimetrix社GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrayにより網羅的遺伝子発現を行った。

(倫理面への配慮)

本年度は培養細胞を用いた実験のみ実施した。ヒト骨髄由来CD34陽性細胞は、米国C

ambryx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。

## C. 研究結果

### 1) 単球系細胞の分化誘導

ヒト骨髄由来CD34陽性細胞をIL-3, IL-6, M-CSF, GM-CSF and Flt-3 ligand(L)添加で培養し、単球系細胞への分化について検討したところ、培養3週間目から、顕微鏡観察下で、接着性の細胞と浮遊系の細胞の2群に分かれた。培養5週間の時点でそれぞれの細胞の表現形を解析したところ、浮遊系の細胞は比較的小型で細胞質に乏しく、CD11b, CD31, CD33, CD97を発現していたものの、その他の成熟単球抗原の発現を認めなかった。これに対して、接着系の細胞は大型で細胞質が豊富であり、浮遊系細胞で発現を認めた上記抗原に加えてCD13, CD14, CD36, CD54, CD64, CD85k, CD105, CD206, 等の成熟単球抗原の発現を認めた。また、サイトカインの分泌について検討したところ、双方の分画で自発的なIL-8 およびIL-6の分泌と、lipopolysaccharide (LPS)-誘導性のinduced tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ の分泌を認めた他、接着系の細胞のみLPS-誘導性のIL-10の分泌を認めた。一方、培養3週間の時点でも同様の解析を行ったところ、浮遊系、接着系ともそれぞれ培養5週目とほぼ同様な細胞形体と細胞表面抗原の発現様式を示していたが、サイトカインの分泌については、双方でIL-8のみ自発的な分泌と、LPS-誘導性のIL-6 およびTNF- $\alpha$ の分泌を認めたがIL-10の分泌は認めなかった。また、10%FCS添加と無血清

培地の双方で比較を行ったが、いずれも同様の結果が得られた。

## 2) 血小板系細胞への分化誘導

これまでの検討で、マウス骨髄細胞に10% FCS存在下で、TPO添加培養を行うと、巨核球の分化が誘導されることを確認していた。そこで、2% FCS存在下でヒト骨髄CD34陽性細胞をTPO 100ng/ml 添加培養したところ、同様に巨核球の分化誘導が可能であった。

## 3) B前駆細胞への分化誘導

これまでの検討で、骨髄間質系細胞MS-5との10%FCS添加での共培養によって、ヒト骨髄CD34陽性細胞をB前駆細胞に分化誘導可能であることを確認していたが、糖鎖プライマー法では1) 血清の添加を2%以下に抑えること、2) 単一の細胞集団の培養系であること、の2点が必須となる。そこで、骨髄間質系細胞なしでもCD34陽性細胞からB前駆細胞を分化誘導可能か否か、種々の培養条件を検討した。

MS-5が発現する接着因子および液性因子の中には、B前駆細胞を分化誘導するのに必要な最低限の因子が含まれていることが推測されるが、NIH-3T3には同様の作用は認めない。そこで、網羅的遺伝子発現解析によって両者の発現遺伝子を比較し、MS-5にのみ発現を認めるか、あるいはNIH-3T3に比して非常に高い発現レベルを示す遺伝子の中から、接着あるいは増殖因子を選び出した。造血幹細胞のex vivoでの増幅が可能とされるSCFと、B細胞の分化誘導に必要とされるFlt3-ligand (L)、IL-7、を中心に、上記解析によって選択されたサイトカインおよびケモカインを様々な組合せて添加し、種々の接着因子を固層化した培養プレート上でヒト骨髄由来CD34陽性細胞を培養して、

その分化の状況を解析した。

その結果、今回検討した大部分の培養条件において、単球系細胞の分化誘導が優位であった。特に、ほとんどの培養条件ではB系細胞の出現を認めなかったが、V-CAM1あるいはN-cadherinを固層化してSCF+IGF1の添加培養を行った場合のみ、0.3~2%のB前駆細胞の分化誘導が確認された。

一方、単球系細胞の分化誘導に関しては、固層化接着因子と組合せることにより、添加するサイトカインの種類を少なくしても分化・増殖の誘導が可能であることが明らかになった。特に、N-cadherinあるいはV-CAM1と組合せることにより、FLT-3Lの単独の添加でも単球系細胞への分化誘導が可能であり、さらに興味深いことに、多核(2-6核程度)の破骨細胞が高頻度で分化誘導されることが明らかとなった。

また、FibronectinとSCFの組合せでは、CD41陽性細胞が70%以上の頻度で分化誘導され、これらは未熟な分化段階の巨核球であることが推測された。

## D. 考察

今回の検討から、低血清あるいは無血清の状態において、種々の分化段階の単球系細胞、未熟および成熟巨核球の分化誘導は比較的容易に行えることが明らかになった。今後、本年度に確立した上記培養法を用いて、糖鎖プライマー法による発現糖鎖解析を順次開始する予定である。

一方、B前駆細胞の分化誘導は困難であった。しかし、V-CAM1あるいはN-cadherinを固層化してSCF+IGF1の添加培養を行うことで数%程度のB前駆細胞を分化誘導することは可能であったことから、今後MS-5で発

現する因子に着目してさらに培養条件を改善することにより、より高い頻度でB前駆細胞を分化誘導できる可能性が考えられる。

#### E. 結論

低血清～無血清の状態、種々の分化段階の単球および血小板系細胞を分化誘導する培養系を確立した。今後、これらの培養法を応用して、糖鎖プライマー法による発現糖鎖解析を行っていく。また、間質細胞を用いないとB前駆細胞の分化誘導は困難であることが明らかとなったが、ごく僅かの割合のB前駆細胞を誘導することは可能であったことから、今後さらに培養法の改良を試みてゆく。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang WR, Itagaki M, Shiozawa Y, Suzuki K, Sakaguchi S, Katagiri 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

2) 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.

3) 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)

4) 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)

##### 2. 学会発表

1) 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.

2) 田口 智子, 宮川 世志幸, 今留謙一, 堀内 保臣, 竹野内 寿美, 大河原明美, 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.

3) 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, 大河原 明美, 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.

G. 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



分担研究報告書

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

分担研究者 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

研究要旨：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った。CD10はその分子量のうち1/4近くを糖鎖が占めるが、二次元電気泳動やnanoLC/ESI-MSで解析した結果、同じCD10であっても、その糖鎖構造は細胞株間で大きく異なり、株によってはその発現糖鎖が高度の多様性を有していることが明らかとなった。糖鎖パネル化を行う上で、同一分子上の糖鎖でも、個体差による構造の多様性の可能性に考慮する必要があると考えられる。糖鎖構造の多様性と蛋白機能や白血病細胞の生物学的特徴との関連についても検討を行っていく。

研究協力者

佐藤 伴

（国立成育医療センター研究所  
発生・分化研究部）

川崎 ナナ、伊藤さつき

（国立医薬品食品衛生研究所  
生物薬品部）

鈴木佑介

（理化学研究所フロンティア  
生体超分子研究グループ）

A. 研究目的

糖鎖は、核酸、蛋白質に続く第三の生命鎖と呼ばれ、細胞機能において重要な機能を発揮することが知られている。ま

た、糖鎖は細胞の成熟やがん化に伴ってその発現様式が複雑に変化することから、これらの過程において重要な役割を担うことが推測される。糖鎖は非常に多様な構造を有しており、精製・分析が難しく、解析に用いるのに有用な抗体も不足していることなどから、その構造や機能の詳細については不明な点が多く、蛋白質等と比較するとその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を始めとして、幹細胞マーカーや腫瘍マーカーとして糖鎖が有用である点を考慮すると、糖鎖研究の医学・医療応用を積極的に進める必要がある。そこで本研究では、種々

の系統の造血系細胞を対象として、その正常の分化過程にある細胞が各分化段階で産生する糖鎖、ならびに分化の破綻の結果としての白血病細胞が産生する糖鎖を、糖鎖大量合成技術である糖鎖プライマー法を応用して網羅的に解析し、発現糖鎖のカタログ化を図ることを目的とする。また、この方法により得られた糖鎖を使用して抗糖鎖抗体を含む抗糖鎖プローブを作成し上記細胞のプロファイリングや診断・治療に役立てることを目指す。本年は、白血病細胞の糖鎖パネル化の端緒として、小児腫瘍でもっとも頻度の高いB前駆細胞性急性リンパ性白血病（B前駆細胞性ALL）に発現する代表的抗原であるCD10をモデルに、糖蛋白質糖鎖構造解析/プロファイリング法のシステム化について検討した。

CD10は、B前駆細胞性ALL（いわゆるCommon ALL）に特異的な抗原Common ALL Antigen (CALLA) として報告されたが、その後endopeptidase活性をもつタイプII型の膜蛋白質であることが明らかにされ、リンパ球前駆細胞の他、初期活性化B細胞、好中球、腎糸球体などの上皮系細胞にも発現していることが判明した。その分子量は、ペプチド部分は750アミノ酸残基からなり約85.5kであるが、N-グリコシド型糖鎖結合部位が6箇所あり、高度にグリコシル化されているためSDS-PAGE上では110kになる。そこで、糖蛋白質糖鎖パネル化の良いモデルになると考え、その解析を行った。

## B. 研究方法

### 1) Nalm6細胞とNalm27細胞のCD10分子

の二次元電気泳動上での同定と精製

1% Tritono X-100に不溶性で低密度の膜画分をショ糖密度勾配超遠心法で分離し、ラフトマイクロドメインを得る。ラフトマイクロドメインをpH4-6/6-8 アンフォライト/10%アクリルアミド SDS-PAGE系の二次元電気泳動で分離し、PVDF膜に転写後、抗CD10単クローン抗体(NCL-L-CD10-270)でプロービングした。CBB染色した二次元ゲルより抗CD10抗体が反応したspotを切り出し、トリプシン消化後、MALDI-QIT-TOF質量分析装置(MALDI-TOFMS AXIMA、SHIMADZU)で解析した。

### 2) CD10糖鎖のLC/MS解析

CBB染色した二次元ゲルからCD10分子を切り出し、還元アルキル化後、50mM リン酸緩衝液pH7.2中で4 unit の Glycopeptidase F (Takara)による消化を19時間おこない、CD10分子からN-グリコシド型糖鎖を遊離させた。遊離してきたN-グリコシド型糖鎖を水素化ホウ素ナトリウムで還元し、nanoLC/ESI-MS/MS質量分析計(LTQ, Thermo Electron Corp. San Jose, USA)を使って、ポジティブ及びネガティブイオンモードでLC/MS解析を行った。

### 3) 糖転移酵素遺伝子発現の解析

Stanford Microarray data base (<http://smd.stanford.edu/schema/>)から得られたデータをもとに、Nalm6及びNalm27の糖転移酵素遺伝子発現をNIA Array Analysis(<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOV>)で解析した。

(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) Nalm6細胞とNalm27細胞のCD10分子の二次元電気泳動による解析

ラフトマイクロドメインを調製し、二次元電気泳動でラフトマイクロドメイン蛋白質を分離した。CBB染色像(図1上)と、抗CD10によるWestern解析像(図1下)、及び質量分析法により両細胞の二次元ゲル上におけるCD10分子の位置が確認された(図1矢印)。アクチン(A)との相対的な位置から考慮して、Nalm6のCD10分子の方がNalm27のそれよりもacidic側に広く展開することが明らかとなった。

#### 2) CD10糖鎖のLC/MS解析

Nalm6細胞およびNalm27細胞、双方のCD10の糖鎖プロファイルをLC/MSによって解析した。positive ion mode及びnegative ion modeでfull MS scanによって得られたtotal ion chromatogramを図2に、MS/MSスペクトルより推察される糖鎖構造を表1に、それぞれ示した。Nalm6のCD10の方がシアル酸で飽和された糖鎖が多く、より不均一性が高いのに対し、同じCD10でもNalm27由来のものはほとんどがシアル酸不飽和の糖鎖で、不均一性が低く、両者の糖鎖構造には明らかな差が認められた。

#### 3) 糖転移酵素遺伝子発現の解析

データベースを活用し、Nalm6細胞およびNalm27細胞の糖転移酵素遺伝子発現を網羅的に解析した。遺伝子発現に有意な差がみられたのは、UDP-Gal:βGlcNAc

β1,4-galactosyltransferaseと

UDP-N-acetyl-α-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2の2酵素で、いずれもNalm6においてその発現が亢進していた。前者は糖蛋白質に普遍的にみられるGalβ1,4GlcNAcの基本構造を合成する酵素であり、後者はO-グリコシド型糖鎖生合成の根幹の糖転移酵素である。

### D. 考察

ヒトB前駆細胞性ALLの代表的なマーカー分子であるCD10は分子量110kのうち25%近くを糖鎖が占める。等電点の違いに起因する二次元ゲル上でのx軸方向の広がり、糖鎖の荷電の多様性を反映していると考えられる。Nalm6とNalm27のCD10分子からN-グリコシド型糖鎖を調製しLC/ESI-MS/MS解析したところ、両者の糖鎖構造には著しい違いがみられた。同一分子で、かつ同じヒトB前駆細胞性ALL細胞であるにも関わらず、このような大きな違いが見られるのは極めてまれである。糖転移酵素全般の発現解析では、糖蛋白質に普遍的にみられる

Galβ1,4GlcNAcの二糖基本構造を合成する転移酵素の発現が、Nalm6で亢進していた。しかし、これのみで双方のCD10の糖鎖構造の違いを説明できるかどうかは疑問があり、今後さらに解析が必要である。

今回明らかになったN-グリコシド型糖鎖の多様性の違いは、CD10分子のもつendopeptidase活性や、予後を含めたB前駆細胞性ALL細胞の生物学的特性の差等を反映している可能性もあり、この点に関して今後さらに解析を行う予定である。

## E. 結論

ヒトB前駆細胞株Nalm6とNalm27のCD10は高度にグリコシル化されているが、両者の糖鎖構造には大きな違いがみられた。Nalm6のCD10ではシアル酸飽和型が大部分を占め、高度な多様性に富むが、一方Nalm27のCD10では不飽和型が多く、Nalm6に比較すると多様性は極めて低い。同一の分子にもかかわらず、細胞によりこれだけ大きく糖鎖構造が異なるのは極めてまれであり、今後は糖鎖構造の違いと蛋白機能、白血病細胞の生物学的特徴、等との関連について検討を行う。また、今後、糖鎖パネル化を行う上で、同一分子上の発現糖鎖であっても、個体差による構造の多様性が存在し得ることも考慮する必要があると考えられた。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
該当なし
2. 学会発表  
該当なし

## G. 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

図1.Nalm6とNalm27のラフトマイクロドメインの二次元電気泳動像と抗CD10抗体によるWestern解析

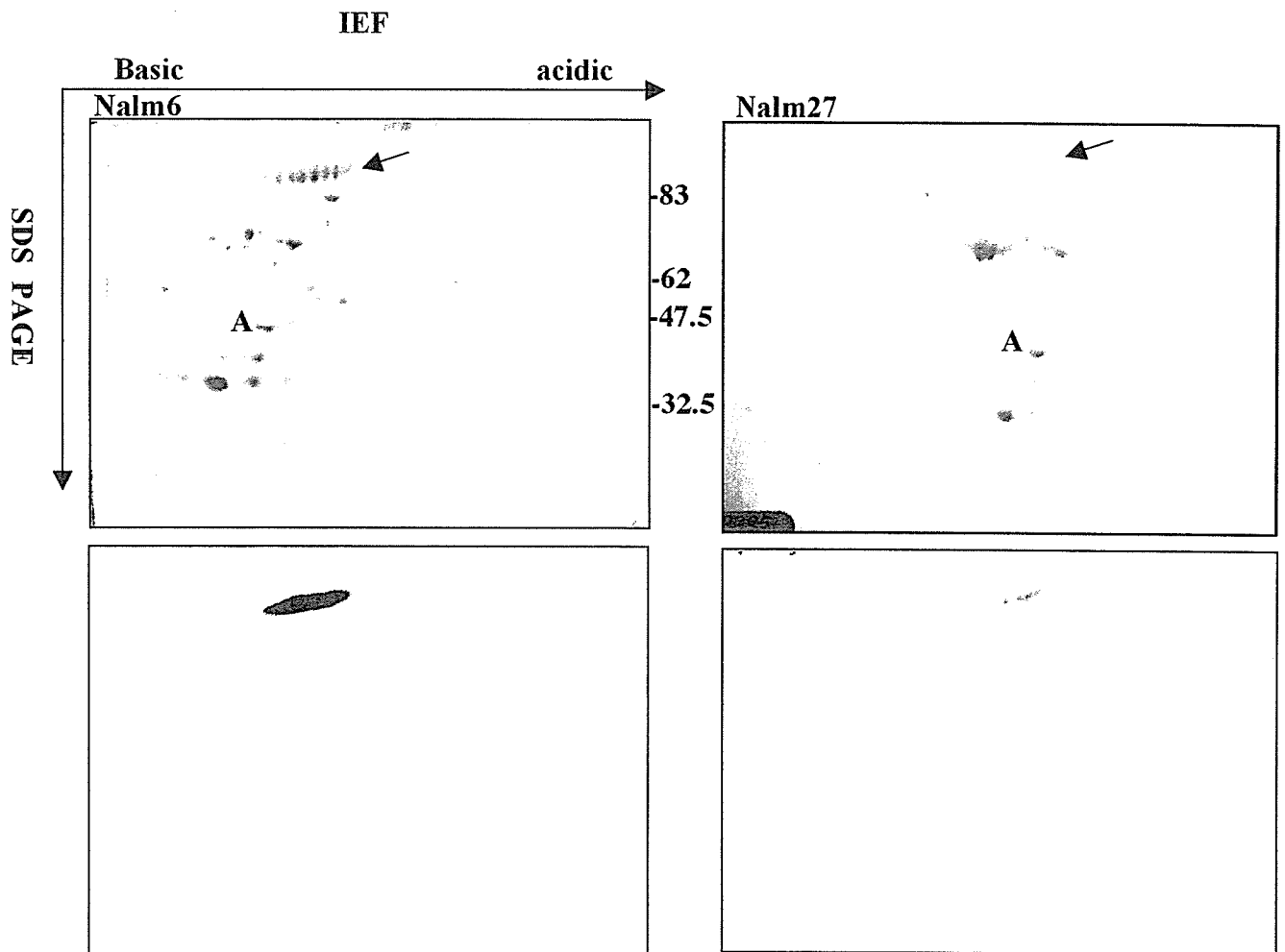


図2. CD10から調製したN-グリコシド型糖鎖のフルマスキャンによって得たトータルイオンクロマトグラム

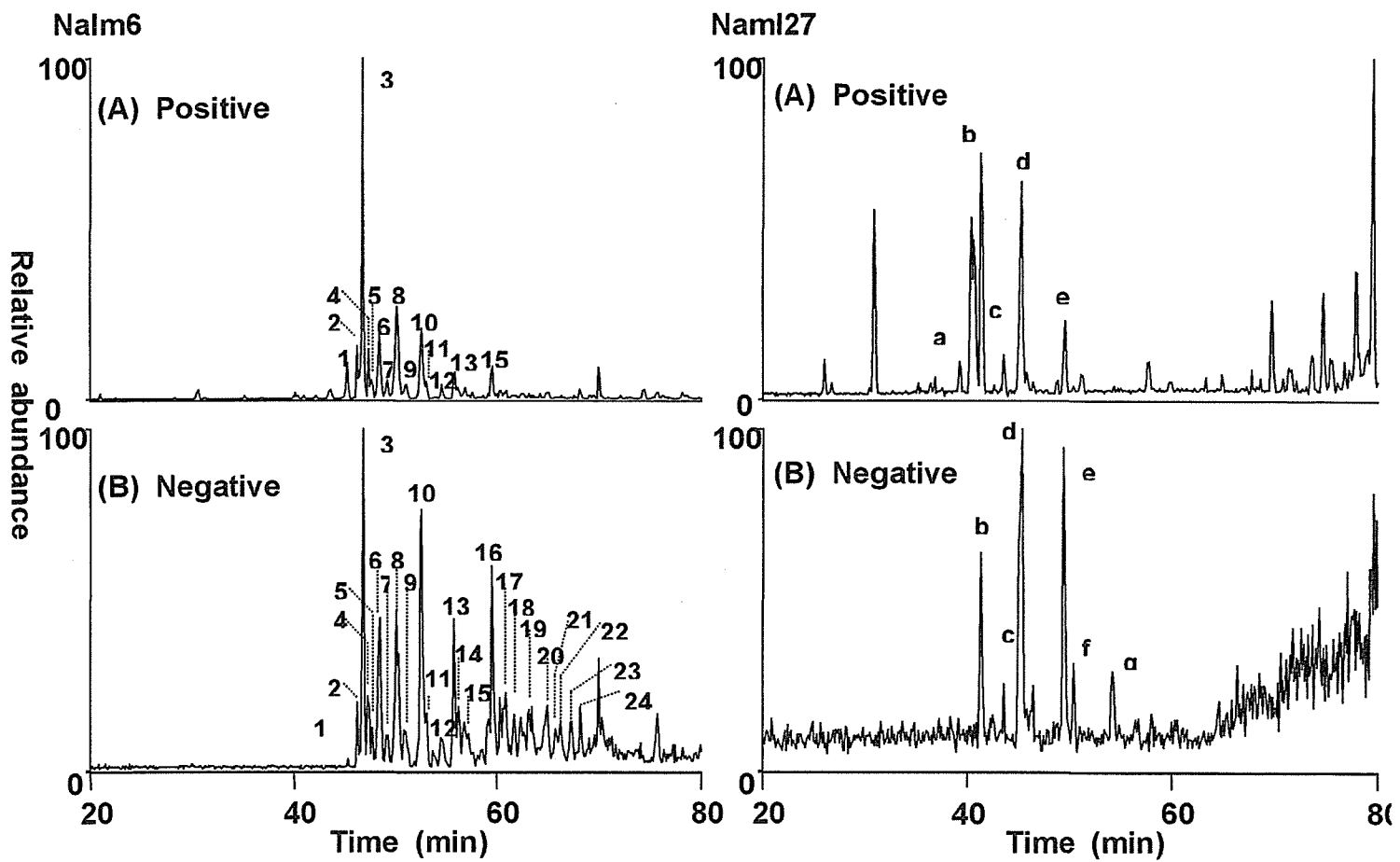


表 1 .MS/MS スペクトルより推定される N-グリコシド型糖鎖

Nalm 6

Peak No.	Observed m/z (charge)		Theoretical mass	composition <sup>a</sup>	Deduced structure <sup>b</sup>
	positive	negative			
1	822.31 (2)		1642.608	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	Bi
2	947.35 (2)	945.42 (2)	1892.677	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>3</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	Hybrid
3	967.86 (2)	965.85 (2)	1933.703	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	BiNA1
4	1150.42 (2)	1148.42 (2)	2298.835	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	TriNA1
5	895.34 (2)	893.33 (2)	1788.666	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	FBi
6	1113.40 (2)	1111.40 (2)	2224.800	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	BiNA2
7	1040.89 (2)	1038.88 (2)	2079.761	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	FBiNA1
8	1040.89 (2)	1038.88 (2)	2079.761	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	FBiNA1
9	1223.45 (2)	1221.45 (2)	2444.893	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	FTriNA1
10	1186.44 (2)	1184.43 (2)	2370.857	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	FBiNA2
11	1150.43 (2)	1148.42 (2)	2298.835	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	BiLac1NA1
12	1223.45 (2)	1221.45 (2)	2444.893	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	FBiLac1NA1
13	1113.41 (2)	1111.40 (2)	2224.800	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	BiNA2
14	1223.44 (2)	1221.45 (2)	2444.893	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	FBiLac1NA1
15		1008.03 (2)	3027.084	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>	
16	1186.44 (2)	1184.43 (2)	2370.857	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	FBiNA2
17	1010.04 (3)	1008.03 (3)	3027.084	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>	FTriNA3
18		1057.39 (3)			
19		1276.14 (3)	3831.185	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>9</sub> [HexNAc] <sub>8</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	
20	1156.42 (3)	1154.42 (3)	3466.253	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>8</sub> [HexNAc] <sub>7</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	FTriLac2NA2
21		1276.14 (3)	3831.385	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>9</sub> [HexNAc] <sub>8</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	
22		1251.46 (3)	3757.349	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>8</sub> [HexNAc] <sub>7</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>	
23		1373.17 (3)	4122.481	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>9</sub> [HexNAc] <sub>8</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>	
24		1129.74 (3)	3392.216	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>7</sub> [HexNAc] <sub>6</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>	

Nalm 27

Peak No.	Observed m/z (charge)		Theoretical mass	composition <sup>a</sup>	Deduced structure <sup>b</sup>
	positive	negative			
a	822.31 (2)		1642.208	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	Bi
b	967.86 (2)	965.85 (2)	1933.703	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	BiNA1
c	895.34 (2)	893.33 (2)	1788.666	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	FBi
d	1040.89 (2)	1038.88 (2)	2079.761	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	FBiNA1
e	1223.45 (2)	1221.45 (2)	2444.893	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	FTriNA1
f		1367.00 (2)	2735.989	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	FTriNA2
g		1367.00 (2)	2735.989	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	FTriNA2

<sup>a</sup>estimated from m/z values obtained by FTMS<sup>1</sup>;

<sup>b</sup>deduced from MS<sup>2</sup> spectra in the positive ion mode; F, fucosyl; NA, N-acetyl neuramic acid; lac, lactosamine. Bi, biantennary, Tri, triantennary;

分担研究報告書

間葉系未分化細胞プロファイリング

分担研究者 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

研究要旨：細胞表面糖鎖は細胞の分化、増殖、老化により刻々と変化し、ヒト遺伝子30,000個では説明できない生体の多様性を担う。間葉系幹細胞は、神経幹細胞、造血幹細胞と共に再生医療という治療戦略の重要な一翼を担う。間葉系幹細胞が中枢神経細胞、心筋細胞、肝細胞に分化したという報告が相次いでいる。間葉系幹細胞が患者個人に対する治療から医薬品として利用されうるためには、これら間葉系幹細胞のバリデーションが必須となる。評価項目として、現在までにさまざまな遺伝子発現解析や一部のモノクローナル抗体による解析が検討されているが、確実に対応できるマーカーは存在しない。本研究遂行のために、ヒト間葉系細胞の分離培養、細胞のプロファイルの確定後、細胞寿命の延長を行い、糖鎖プローブを用いた細胞表面糖鎖の解析によって細胞を規格化することを目指す。本年はその基礎となるヒト間葉系細胞の未分化及び分化誘導させる上での培養条件の最適化をほぼ確立した

A. 研究目的

糖鎖プライマーは擬似糖脂質であり培養液中に添加し細胞に取り込まれると、細胞内でおこっている内在性の糖鎖付加反応にあわせて糖鎖伸長反応をうけ細胞外に分泌される。細胞表面糖鎖は細胞の内外の変化や様々な遺伝子の発現に応じて変化しており、翻訳後修飾として、蛋白質のみでは説明できない生体の多様性を担うと同時に、細胞の種類や分化段階をあらわす優れたバイオマーカーであることが知られている。本研究では、ヒト幹細胞をin vitro で分化さ

せる過程で得られる種々の細胞亜集団を分別する方法を開発し、各細胞に発現している糖鎖の構造・機能を解明し、糖鎖発現情報を得ることを目的とする。ヒト幹細胞の細胞種・分化度による分別は再生医療における細胞の選別に直接応用可能な技術であり、それを応用したヒト難病の病態解明および診断法・治療法開発に応用可能である。

B. 研究方法

1) 糖鎖プローブを用いた糖鎖構造解析のためのヒト細胞の調整とプロファイリング



分離培養したヒト間葉系細胞の性質を細胞表面マーカー、gene arrayを用いたプロファイリングを行い細胞の有する性格を糖鎖関連遺伝子に関して詳細に検討する。そのデータを利用して、これらの細胞が多分化能を有す状態を保つ培養条件、方法等を確立する。また糖鎖プライマー解析のため血清の影響をできるだけ排除した培養の最適条件について検討する。

2) 糖鎖プローブを用いた糖鎖構造解析のためのマウスES細胞及びヒト間葉系細胞の分化誘導

マウスES細胞を、血清代替物を持ちいて未分化性を維持する培養、および細胞系譜の異なる分化誘導系をおこなう培養条件について検討する。各系譜に分化させるのに必要な増殖因子や低分子化合物などについて、添加濃度・時期・期間を詳細に検証する。ヒト間葉系細胞についてもマウスES細胞での系に加え、GeneChipの解析結果を参考に最適な分化誘導法の開発をおこなう。

(倫理面への配慮)

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)。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影

響を十分に考慮する。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

糖鎖プローブを用いた糖鎖構造解析のためのマウスES細胞及びヒト間葉系細胞の分化誘導

多分化能を有するマウスES細胞を効率よくかつ再現的に種々の細胞系譜に分化誘導させることを、血清代替物を用いた培養系で確立できた。形態変化に加え、抗体染色や遺伝子発現を用いたプロファイルについて検討を加えている。ヒト間葉系細胞における未分化能および分化誘導の最適培養条件の検討をおこなった。糖鎖プローブを用いた糖鎖構造解析可能な培養条件をほぼ確立した。

#### D. 考察

ヒト間葉系細胞は自己の細胞を使用できるため倫理的な面からも臨床応用への理解が得られやすく、現段階では、再生医療・細胞移植の最適の対象になっている。間葉系幹細胞は驚くべき多岐に渡る胚葉を越え

た可塑性を有し、試験管内で生体外培養によって増殖させることが可能である。分担研究者は、これまでに間葉系幹細胞の神経組織や、拍動する心筋細胞への分化系を確立してきた。しかし、ヒト間葉系細胞はヘテロな細胞集団であり、この中に確実に含まれている多分化能を有する幹細胞をその他の細胞と分別する方法はいまだ確立されていない。体性幹細胞の利用には、これを分別して純化し、その多分化能が維持されていることをモニタリングするための、細胞品質管理法を標準化する必要があるが、糖鎖プローブを用いた糖鎖の発現様式による細胞分類は、その有用な手段となり得る可能性がある。従来、糖鎖は多様な構造を有している上、精製・分析が困難であったため、その解析は蛋白、核酸に比較すると著しく立ち遅れている。しかし、本研究によってその解析や糖鎖プローブ開発が進むことにより、これを応用したヒト間葉系細胞の規格化が可能になれば、臨床への展開が大きく開かれると期待される。

#### E. 結論

マウス ES 細胞の血清代替物培地条件での未分化性維持および種々の細胞への分化誘導系の培養条件を確立した。また寿命延長したヒト間葉系幹細胞における効率的な分化誘導系がほぼ確立できた。

今後これら培養法を応用し、糖鎖プライマーを投与して糖鎖を培地中に大量産生させる。更に糖鎖プライマー投与時に分化誘導も試みて分化過程で変化する糖鎖の回収も行う。糖鎖含有培地から糖鎖を精製しマスペクトロメトリー等を用いた構造解析を行う。これら分析結果を元に発現糖鎖に

よるプロファイリングを試みるとともに、これを応用した糖鎖プローブ開発をめざす。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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 menstrial blood-derived cells Mol. Biol. Cell, in press
- 2) Umezawa A, Toyoda M. Two MS Cs: Marrow stromal cells and mesenchymal stemcells. Inflammation and Regeneration 27:28-36, 2007
- 3) 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
- 4) 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

5) 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

6) Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, and Umezawa A. Increased mobilization of c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>(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. Cellular Physiology* 208:188-194, 2006

7) 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

G. 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

分担研究報告書

発現糖鎖解析、糖鎖修飾分子合成および抗糖鎖抗体作製

分担研究者 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

研究要旨:分化・がん化に伴い細胞に発現する糖鎖は多様に変化する。その発現糖鎖の変化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、それを用いて糖鎖を分離する条件を市販標準品で検討し、いくつかの糖鎖の分離分析法を確立した。LC/MSによる分析を高精度に行うためには試料の前処理が重要となる。前処理の方法として固相抽出法を採用し、糖脂質のうち電荷を持つガングリオシドと中性糖脂質を分画する方法を確立した。更に糖鎖プライマー法で産生した糖蛋白質O結合型糖鎖をLC/MSで分離・分析する方法を確立し、14種類の糖鎖の糖鎖配列を同定した。今後、更に多種類の糖鎖の分析・同定・構造解析法を確立し、患者検体のように非常に微量な試料でも発現糖鎖を解析する技術を確立する。

研究協力者

宮川世志幸、大喜多肇

(国立成育医療センター研究所

発生・分化研究部)

肥後大輔 (ブルカー・ダルトニクス)

A. 研究目的

糖鎖は核酸・蛋白質に続く第3の生命鎖といわれ、多様な構造が存在する。細胞に発現する糖鎖は、細胞の成熟やがん化に伴

い発現パターンが大きく変化することが知られている。これまで糖鎖の解析は薄層クロマトグラフィー (TLC) やレクチンなどを用いて行われてきたが、感度や特異性が充分ではなかったため、詳細な解析は比較的大量に存在するものに限られていた。

これに対して、マスマスペクトロメトリー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。一方、糖鎖プライマー法は細胞をい