

5mM AcONH₄ 溶液 (pH 9.6, B 溶媒) を使用した。還元糖鎖は流速 0.4 μl, 10-40 % B 緩衝液 (60 分) のグラジュエント条件で溶出した。測定はポジティブ及びネガティブイオンモードで行った。キャピラリー温度は 275 °C, スプレー電圧は 1.8 ekV, スキャン範囲は *m/z* 800-2000 に設定した。多段階 MS (MS²⁻⁴) の コリジョンエネルギーは 35% に設定した。

7) シアル酸分析法のバリデーション

分析法の直線性は NeuAc 及び NeuGc 標準品を用いて 0.0078-500 pmol の範囲で検討した。分析法の検出限界 (DL) 及び定量限界 (QL) は $DL=3.3*\sigma/slope$ (σ =マスクロマトグラムの平均ノイズ) 及び $QL=10*\sigma/slope$ を用いて算出した。分析法の真度及び精度は、無血清培地で培養した細胞の膜画分に 10 及び 100 fmol の NeuGc を添加した試料を 3 回測定して求めた。真度は回帰直線を用いて計算した NeuGc 量と既知量の比較により示した。精度は NeuGc 添加試料の測定により得られた実測値の相対標準偏差により求めた。

(倫理面への配慮)

ヒト由来サンプル及び動物を使用していないので、特に配慮していない。

C. 研究結果

(1) 製造工程由来不純物試験 : NeuGc 定量法

1) nanoLC/ITMS-FTMS による DMB-NeuAc 及び DMB-NeuGc の測定

シアル酸の定量法として、DMB 誘導体化と LC/蛍光検出法や MS を組み合わせた方法が用いられている。MS には、分子量やフラグメントからシアル酸分子種を同定できるという利点がある反面、DMB シアル酸の分子イオンは脱水しやすいために十分な検出感度が得られないと

いう問題がある。そこで、脱水イオンの生成を抑えるためにイオンの取り込み量 (AGC 値) 及び脱水イオンの生成量の関係について調べたところ、FTMS のイオン取り込み量を 5E+04 に設定することによって、脱水イオンの生成をほぼ抑えられることが明らかとなった (図 1)。本研究ではこの AGC 値を用いて DMB-NeuAc 及び DMB-NeuGc の分析を行った。

まず、nanoLC/FTMS 装置を用いて、DMB で標識した NeuGc 標準品 (MW 442.14) 及び NeuAc 標準品 (MW 426.15) (各 2 pmol) をポジティブイオンモードの Selected ion monitoring (SIM, *m/z* 400-450) により測定した。*m/z* 442.12-442.16 及び *m/z* 426.13-426.17 のエクストラクトイオンクロマトグラム (EIC) を描いたところ、図 2 に示すように、14 及び 15 分周辺に peak a 及び b が出現した。14 分に溶出された分子は、分子イオン ($[M+H]^+$) の *m/z* 値 (*m/z* 442.145) から、DMB-NeuGc であることが示唆された (図 3A)。さらに、*m/z* 442.145 のイオンをプリカーサーイオンとして得られたプロダクトイオンスペクトル (図 3B) 上に、2 分子及び 3 分子の H₂O が解離したイオン (*m/z* 406 及び *m/z* 388), H₂O 3 分子及びグリコリル基が解離して生じたイオン (*m/z* 313), 並びに環開裂フラグメントイオン (*m/z* 229 及び *m/z* 283) が観測されたことから、この分子は DMB-NeuGc であることが確認された。同様に、peak b の分子は、 $[M+H]^+$ (*m/z* 426.150) 及びそれをプリカーサーイオンしたプロダクトイオン (*m/z* 390, 372, 313, 283 及び 229) から、DMB-NeuAc であることが確認された (図 3C 及び 3D)。

nanoLC/ESI-FTMS による DMB-シアル酸測定法の直線性について、500 pmol から 7.8 fmol の範囲で検討した。その結果、0.0078-50 pmol の範囲で直線性が確認された。DMB-NeuGc 及び NeuAc の回帰直線式はそれぞれ $Y=1.31 \times$

$10^6X-9028.5$ ($r=0.9998$) 及び $Y=2.03 \times 10^6X-21548.0$ ($r=0.9995$) であった(図 4). また NeuGc の検出限界 (DL) 及び定量限界 (QL) は 8.6 fmol 及び 26.3 fmol , 並びに NeuAc の DL 及び QL は 5.6 fmol 及び 16.9 fmol であった. NeuGc 分析の精度は 7.3% , また, 真度は 92.4% であった. 以上の結果から, nanoLC/FTMS により DMB-NeuGc 及び DMB-NeuAc の定量が可能であることが確認された.

2) HL-60 細胞膜画分由来 NeuGc 及び NeuAc の定量

モデル細胞として HL-60 細胞を用いて, 細胞膜に存在する NeuGc 及び NeuAc の定量法としての本分析法の実行可能性を評価した.

FCS 添加培地で培養した細胞 (1×10^6 個) の膜画分を超速心分離により調製し, 酸処理 (2 M 酢酸, 80°C , 3 時間) によりシアル酸を遊離させた. DMB でシアル酸を標識した後, 細胞 2.5×10^3 個分のシアル酸を用いて, nanoLC/FTMS 及び nanoLC/MS/MS を行った. 図 5A に示すように, EIC (m/z 442.12-442.16) の 14 分にピークが出現した(peak c). この位置に溶出された分子は, 分子イオン (m/z 442.145) (図 5B), 及び $[\text{M} + \text{H}]^+$ (m/z 442.145) をプリカーサーイオンとして得られたプロダクトイオン(m/z 406, 388, 313, 283 及び 229)から(図 5C), DMB-NeuGc と同定された. 同様に, EIC (m/z 426.13-426.17) 上に出現した 15 分付近のピーク(peak d) (図 6A) の分子は, 分子イオン (m/z 426.150) 及びその分子イオンの MS/MS により得られたプロダクトイオン (m/z 390, 372, 313, 283 及び 229) から, DMB-NeuAc と同定された (図 6B 及び 6C).

10% FCS 添加培地中で培養した HL-60 細胞 (2.5×10^3 個) 膜画分に存在する NeuGc 及び NeuAc 量は, Peak c 及び d のピーク面積から, それぞれ $55.4 \pm 4.6 \text{ fmol}$ 及び $13.5 \pm 0.6 \text{ pmol}$ と算出

された (図 7).

つぎに, ヒト血清添加培地中で HL-60 細胞を 10 日間培養 (培地交換 4 回) した後, 本分析法を用いて, 細胞膜画分に存在する NeuGc 及び NeuAc を定量した. ヒト血清を使用したにも関わらず, EIC (m/z 442.12-442.16) 上の DMB-NeuGc が溶出される 14 分付近にピーク (peak e) が確認された (図 8A). Peak e の位置に溶出された分子は, 分子イオン (m/z 442.145) 及びその MS/MS から, DMB-NeuGc と同定された (図 8B 及び 8C). 細胞 (2.5×10^3 個) 膜画分に存在する NeuGc 及び NeuAc の含量は, それぞれ $29.2 \pm 2.4 \text{ fmol}$ 及び $21 \pm 1.4 \text{ pmol}$ であった (図 7). これらの結果から, ヒト血清添加培地で培養しても, HL-60 細胞膜画分に NeuGc が存在することが明らかとなった. 以上の結果から, nanoLC/FTMS を用いたシアル酸分析法によって, 細胞膜に存在する微量の NeuGc を定量できることが実証された.

さらに, HL-60 細胞を無血清培地で培養し, 膜画分に含まれるシアル酸分子の同定と定量を行った. その結果, EIC (m/z 442.12-442.16) 上に NeuGc に相当するピークは観察されなかった. 尚, NeuAc 量は $20.5 \pm 1.6 \text{ pmol}$ であった (図 7). 以上のことから, NeuGc を含まない無血清培地で培養したヒト細胞には NeuGc は混入しないことが確認された.

(2) 細胞特性確認試験: N 結合型糖鎖のプロファイリング

はじめに, 10% FCS を含む培地で培養した HL-60 細胞から N 結合型糖鎖を酵素的に切り出し, NaBH_4 で還元した後, 細胞 1×10^6 個相当の糖鎖を用いて, ポジティブイオン FTMS, データ依存的 LC/MS/MS \sim MS/MS/MS/MS, 並びにネガティブイオン FTMS, データ依存的 LC/MS/MS \sim MS/MS/MS/MS を行った. データ依存的 MS/MS

~MS/MS/MS/MS は各スキャンで最も強度の高いイオンをプリカーサーイオンとして行った。図9の青で示す部分は、ポジティブイオン FTMS によって得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) で、主に中性糖鎖とシアル酸結合数の小さい糖鎖のプロファイルを示している。赤で示す部分は、ネガティブイオン FTMS によって得られた TIC で、主にシアル酸結合数の大きい糖鎖のプロファイルを表している。主なピークの糖鎖構造は、プロダクトイオンスペクトルから、図9中に示すように推定された。以上のように、nanoLC/MS を利用することによって、 10^6 個程度の細胞の糖鎖プロファイリングが可能になることを確認した。

つぎに、ヒト血清を含む培地、及び無血清培地で培養した HL-60 細胞の糖鎖プロファイリングを行った。図 10A 及び 10B はそれぞれ、ヒト血清及び無血清培地で培養した HL-60 細胞由来高マンノース型糖鎖のプロファイルである。無血清培地で培養すると、Man9 糖鎖が増加することがわかる。図 10C 及び 10D は、ポジティブイオンモードで得られたヒト血清及び無血清培地で培養した細胞由来複合型糖鎖のプロファイルである。また、図 10E 及び 10F はネガティブイオンモードで得られた同糖鎖のプロファイルである。ヒト血清添加培地と無血清培地で培養した細胞の糖鎖プロファイルは全く異なること、特に、無血清培地ではバイセクテッド 2 本鎖糖鎖が著しく増加することが明らかとなった。以上の結果から、糖鎖プロファイリングは細胞の変化を検出する方法として利用可能であることが示唆された。

D. 考察

NeuGc は、ウシなど様々な動物で産生されるが、ヒトでは産生されないために、ヒトに対して抗原性を示すことが知られている。2005 年 Martin らによって、ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) 培養過程で、

異種血清やフィーダー細胞から NeuGc が混入することが報告されて以来、NeuGc が細胞治療薬の有効性や安全性へ及ぼす影響が懸念されるようになってきた。NeuGc の有効性や安全性への影響を正しく評価するにあたって、細胞治療薬に含まれる NeuGc の量を正確に測定する必要がある。

細胞中のシアル酸の定量法として、DMB 誘導体化と LC/蛍光検出法を組み合わせる方法がよく用いられている。DMB 誘導体化と LC/蛍光検出法に MS 及び MS/MS を組み合わせると、分子量やフラグメントからシアル酸分子種を同定することができる。しかし、既存の分析法の検出感度 (検出限界 5 pmol) は、細胞治療薬の品質評価法としては十分ではなく、分析の微量化が求められていた。

本研究において、高分解能質量分析が可能な FTMS を用いて SIM により質量範囲を制限して測定することにより、NeuGc 及び NeuAc の 0.0078-50 pmol の範囲で直線性が得られることが確認された。NeuGc 及び NeuAc の定量限界は 26.3 fmol 及び 16.9 fmol であり、本分析法が微量シアル酸の分析に適していることが確認された。

さらに、この分析法を用いて、FCS 及びヒト血清添加培地を用いて培養した HL-60 細胞の細胞膜画分の NeuGc 及び NeuAc を定量し、僅か 2.5×10^3 個の細胞を使って、NeuGc の含量を測定できることを確認した。本分析法は感度及び特異性が高いことから、細胞治療薬の NeuGc の定量に応用可能であることが示唆された。

尚、今回開発した定量法を用いて、ヒト血清添加培地で培養したヒト培養細胞からも NeuGc が検出されたという結果は、細胞治療薬の製造工程において、NeuGc の混入を完全に避けることは難しいことを示唆していると思われる。細胞治療薬の安全性及び有効性を保証するために、細胞に取り込まれた NeuGc の量を正確に測定し

た上で臨床データや免疫原性のうむについて正しく評価する必要があるだろう。

我々は、平成 12 年度から厚生労働省の再生医療の品質・安全性評価に関わる研究班において、LC/MS を用いた独自の糖鎖プロファイリング法を確立し、細胞発現生理活性物質の構造特性解析や、分化・がん化指標の探索に応用してきた。本年度は、細胞特性確認試験法としての糖鎖プロファイリング法の有用性を評価する目的で、HL-60 細胞を用いて、培養条件の変化によって生じた細胞の変化を糖鎖プロファイリングによって捉えることができるかどうかを調べた。

その結果、培養条件によって生じた細胞の変化は、糖鎖プロファイルの変化として表れること、さらに、LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングは、それを鋭敏に検出できることが確認された。今回の結果は、LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングが細胞特性確認試験法として適用可能であることを示唆していると思われる。

厚生労働省は BSE 等の問題から、血清は増殖や加工の過程で必須でなければ使用しないこととする通達を出しており、現在、多くの機関で細胞培養の無血清化が検討されている。一方で、細胞治療薬の製造における恒常性を確保するために、様々な開発企業や研究機関で、自己血清から異種血清への変更も検討されている。細胞中の糖鎖の解析は、細胞の特性確認試験だけでなく、最適培養条件のスクリーニングなどにも利用できる可能性は高い。また、今後はプロテオグリカンや糖脂質分子等についても、品質特性評価指標としての有用性を検討していく必要があるだろう。

E. 結論

LC/MS を用いて、細胞治療薬の製造工程由来不純物として懸念されている NeuGc の微量定量法を開発し、モデルヒト細胞中に含まれている微

量の NeuGc を定量できることを確認した。また、分担研究者らが独自に開発した糖鎖プロファイリング法を用いてモデル細胞の糖鎖を解析し、糖鎖プロファイリング法は細胞特性確認試験法としての応用可能性が高いことを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshinao Wada, Parastoo Azadi, Catherine E. Costello, Anne Dell, Rudolf Geyer, Kazuki Kakehi, Niclas G. Karlsson, Koichi Kato, Nana Kawasaki, Kay-Hooi Khoo, Soohyun Kim, Akihiro Kondo, Kazuyuki Nakamura, Hisashi Narimatsu, Milos V. Novotny, Nicolle H. Packer, Helene Perreault, Jasna Peter-Katalinic, Gottfried Pohlentz, Vernin N. Reinhold, Pauline M. Rudd, Akemi Suzuki, And Naoyuki Taniguchi: Mass spectrometry of glycoprotein glycans: HUPO HGPI (Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/Proteome Initiative) Multi-institutional study. *Glycobiology*, in press
2. Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Teruhide Yamaguchi: LC/MSⁿ for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides, *Methods in Molecular Biology*, in press
3. Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Toru Kawanishi: LC/MS strategies in the characterization of glycoproteins, *Encyclopedia of mass spectrometry*, Vol. 8, Elsevier, in press
4. Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Teruhide Yamaguchi: LC/MS of oligosaccharides. *Glycoscience Lab. Manual.*, Ed. Naoyuki Taniguchi, in press
5. 川崎ナナ, 早川堯夫: 糖鎖構造解析, バイオ医薬品の品質, 安全性評価, 早川堯夫監修,

- エル・アイ・シー（東京）印刷中
6. 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 山口照英: 液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構造解析. 実験医学増刊号, 印刷中
 7. 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知らば薬がわかる. 第7回, *Pharm. Tech. Japan*, 23, 81-87 (2007)
 8. Yanyang Zhao, Satsuki Itoh, Xiangchun Wang, Tomoya Isaji, Eiji Miyoshi, Yoshinobu Kariya, Kaoru Miyazaki, Nana Kawasaki, Naoyuki Taniguchi, and Jianguo Gu: Deletion of core fucosylation on $\alpha 3\beta 1$ integrin down-regulates its functions, *J. Biol. Chem.*, 281, 38343-38350 (2006)
 9. Yanyang Zhao, Yakatoshi Nakagawa, Satsuki Itoh, Kei-ichiro Inamori, Tomoya Isaji, Yoshinobu Kariya, Akihiro Kondo, Eiji Miyoshi, Kaoru Miyazaki, Nana Kawasaki, Naoyuki Taniguchi, Jianguo Gu: N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on $\alpha 3\beta 1$ integrin-mediated cell migration. *J. Biol. Chem.*, 281: 32122 – 32130 (2006)
 10. 内田恵理子, 川崎ナナ, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知らば薬がわかる第5回, *Pharm. Tech. Japan*, 22, 91-99 (2006)
 11. 川崎ナナ, 原園 景, 川西 徹: 糖タンパク質性医薬品の試験法に関する研究—LC/MS/MSを用いたペプチドマッピング. *医薬品研究*, 37, 438-447 (2006)
 12. 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 日向昌司, 川西 徹: 局方組換えタンパク質性医薬品の糖鎖試験法に関する研究—LC/MSnを用いた糖鎖プロファイリング. *医薬品研究*, 37, 448-456 (2006)
 13. 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 山口照英: 細胞治療薬の品質・安全性評価における糖鎖解析の重要性と LC/MS の応用可能性. *Functional Glycomics.*, News Letter No.9, 17-24 (2007)
2. 学会発表
 - 1) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹: LC/MSⁿを用いた部位特異的糖鎖構造解析. 第6回日本蛋白質科学年会 (2006, 4)
 - 2) Kotone Sano, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Yasunori Miyamoto, Haruko Ogawa: Reduced glycosylation of vitronectin modulates the tissue lytic system and stellate-cell spreading during liver regeneration. International Symposium on Extracellular Glycomatrix in Health and Disease. (2006, 6, 15-17) Awajishima
 - 3) Yanyang Zhao, Jianguo Gu, Xiangchun Wang, Tomoya Isaji, Eiji Miyoshi, Yoshinobu Kariya, Kaoru Miyazaki, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Naoyuki Taniguchi: Deletion of core fucosylation on $\alpha 3\beta 1$ integrin down-regulates its functions. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
 - 4) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Akira Harazono, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, Toru Kawanishi: Differential analysis of N-linked oligosaccharides in kidney of human systemic lupus erythematosus (SLE) model mouse by LC/MS. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
 - 5) Kotone Sano, Kimie Asanuma, Nana

- Kawasaki, Fumio Arisaka, Haruko Ogawa:
How Glycosylation Activates Multifunctional Extracellular Matrix Glycoprotein, Vitronectin, during Liver Regeneration. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 6) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Yukari Nakajima, Akiko Hachisuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada, Takao Hayakawa, Toru Kawanishi:
Glycosylation analysis of IgLON family glycoproteins in rat brain by LC/MSⁿ (II). 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 7) Yasuhiko Kizuka, Nobuaki Maeda, Nana Kawasaki, Toshisuke Kawasaki, Shogo Oka:
A unique type of HNK-1 carbohydrate expressed on phosphacan is biosynthesized by GlcAT-P. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 8) Makoto Baba, Bruce Y. Ma, Matsuishi Yukari, Nana Kawasaki, Makoto Hirano, Nobuko Kawasaki, Shogo Oka, Toshisuke Kawasaki:
The lectin jacalin induces T lymphocyte activation through CD45 signaling. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 9) Makoto Hirano, Yong B. Ma, Nana Kawasaki, Kazumichi Okimura, Nobuko Kawasaki, Shogo Oka, Toshisuke Kawasaki:
Mannan-binding protein binding to metalloproteases meprin α and β results in the proteolytic activity inhibition and the complement activation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 10) Nobuko Kawasaki, Risa Inoue, Motoki Terada, Kay-Hooi Khoo, Nana Kawasaki, Bruce Y Ma, Toshisuke Kawasaki:
Characteristic endogenous ligands for mannan-binding protein expressed on SW1116 human colon cancer cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 11) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 中島 紫, 山口照英, 早川堯夫, 川西徹: LC/MS を用いた血清糖タンパク質の部位特異的糖鎖解析. *Pharmaco-Heamtology シンポジウム* (2006, 6, 30)東京
- 12) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 中島 紫, 川西 徹, 山口照英: LC/MS/MS を用いたヒト血清グライコプロテオームの解析. *日本ヒトプロテオーム機構第4回大会* (2006, 7, 18-19) 東京
- 13) 佐野琴音, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 安川然太, 佐藤ちひろ, 北島 健, 旭美穂, 宮本泰則, 小川温子: 肝再生におけるマトリックス分子ビトロネクチンの糖鎖変化の定量解析とその意義. 平成14~18年度文部科学省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4回夏期シンポジウム (2006, 8, 8-9) 浜松
- 14) 野村一也, 水口惣平, 野村和子, 出嶋克史, 永石貴之, 村田大輔, 安藤恵子, 三谷昌平, 瀬古 玲, 山下克子, 泉川友美, 北川裕之, 菅原一幸, 川崎ナナ, 松石 紫, 權 娟大, 成松 久: 遺伝子破壊による線虫糖鎖関連

遺伝子の機能解析. 第26回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25)仙台

- 15) 旭 美穂, 佐野琴音, 橋井則貴, 伊藤さつき, 川崎ナナ, 柳橋麻衣子, 宮本泰則, 小川温子: 肝再生過程におけるラット血漿フィブロネクチンの糖鎖構造. 第26回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25)仙台
- 16) 吉田奈央, 竹原弥生, 佐野琴音, 向山恵津子, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 穉山 浩, 吉岡靖雄, 米谷民雄, 小川温子: スギヒラタケレクチンの精製とその糖特異性. 第26回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25)仙台
- 17) 井上里抄, Kay-Hooi Khoo, 寺田基剛, 川崎ナナ, Ma Bruce Yong, 川寄敏祐, 川寄伸子: 血清マンナン結合タンパク質(MBP)に結合するヒト結腸ガン細胞上のリガンド糖タンパク質. 第26回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25)仙台
- 18) 馬場亮人, Ma Bruce Yong, 松石 紫, 川崎ナナ, 平野 真, 川寄伸子, 川寄敏祐: レクチン jacalin による CD54 を介した T 細胞の活性化に関する研究. 第26回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25)仙台
- 19) 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 中島 紫, 山口照英: 細胞治療/再生医療における糖鎖解析の重要性と糖鎖を利用した細胞特性解析への挑戦. 第4回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム(2006, 10, 23,24) 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

表1 我が国における細胞治療薬に関連する指針や通知

- 細胞・組織利用医薬品等の品質及び安全性の確保について
(医薬発第906号)
- 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 (医薬発第1314号)
- **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**
(医薬発第1314号)
- 生物由来製品及び特定生物由来製品の指定並びに生物由来原料基準の制定等について(医薬発第052001号)
- 生物由来製品に関する感染症定期報告制度について
(医薬発第051508号)

表2 製造工程評価と工程内管理試験

- 製造での培養・加工操作が細胞の特性や遺伝的性質に望ましくない影響を及ぼさないこと評価すること
- また、製造で用いる血清や培養液等の原材料に由来する感染性因子の伝播の防止
- 製造工程評価に基づき、必要に応じて工程内管理試験の設定を行うこと

表3 細胞特性解析と特性解析に基づく製品の規格・試験方法の設定

- 回収率や生存率
- 確認試験
 - 同一性
 - 細胞特性
- 細胞性能試験・生物活性試験・力価等
- 細胞由来生理活性物質(必要に応じて)
- 無菌試験、マイコプラズマ、ウイルス等の感染因子否定試験
- エンドトキシン試験
- 純度試験
 - 製造工程由来不純物試験
 - 細胞純度
 - 細胞由来目的外生理活性物質等

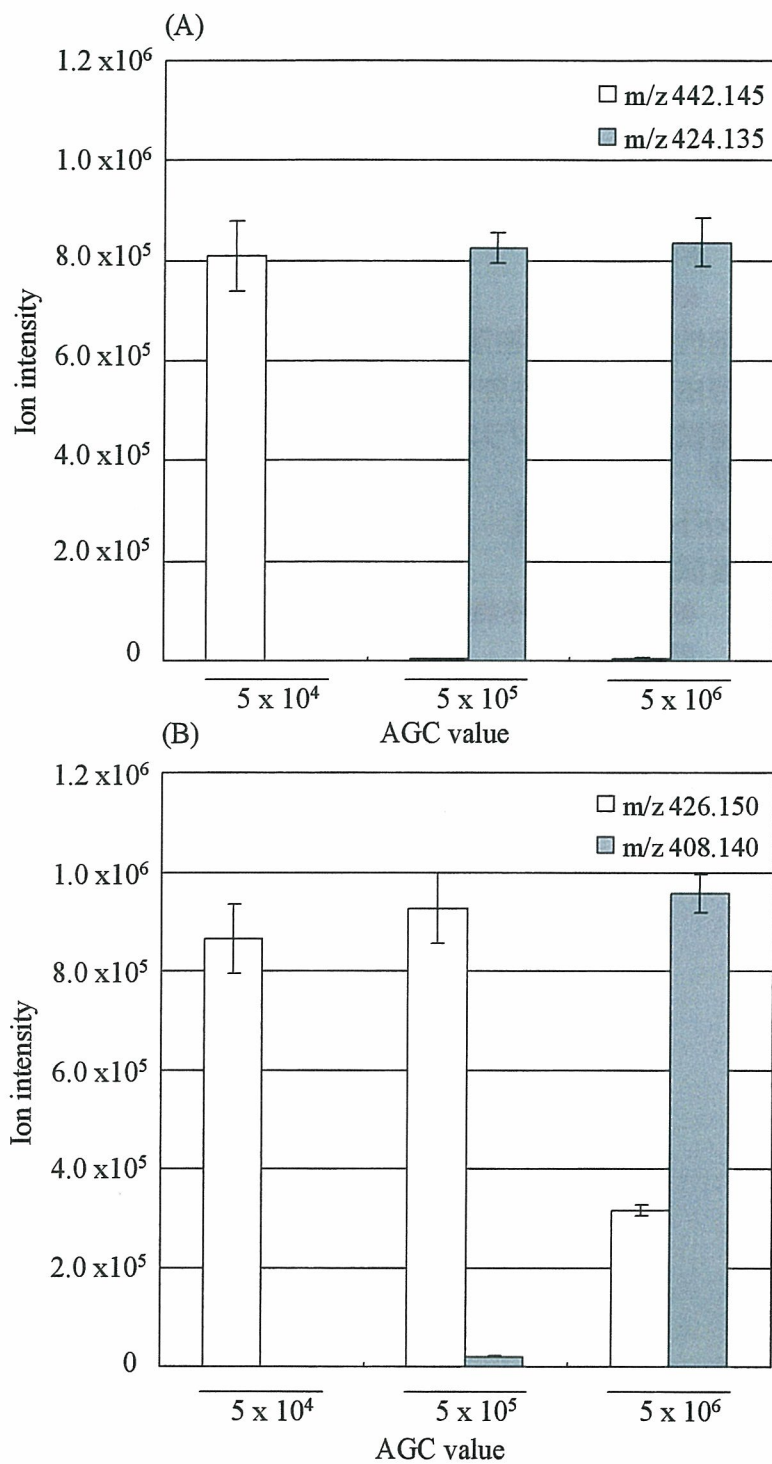


図1. 分子イオン及び脱水イオンのイオン強度に対する最大イオン取り込み量 (AGC 値) の影響. 数値 (イオン強度) は各測定条件における3回分析のイオン強度平均値 \pm S.D. として表す. (A) [DMB-NeuGc + H]⁺ (*m/z* 442.145) 及び [DMB-NeuGc - H₂O + H]⁺ (*m/z* 424.135). (B) [DMB-NeuAc + H]⁺ (*m/z* 426.150) 及び [DMB - NeuAc-H₂O + H]⁺ (*m/z* 408.140)

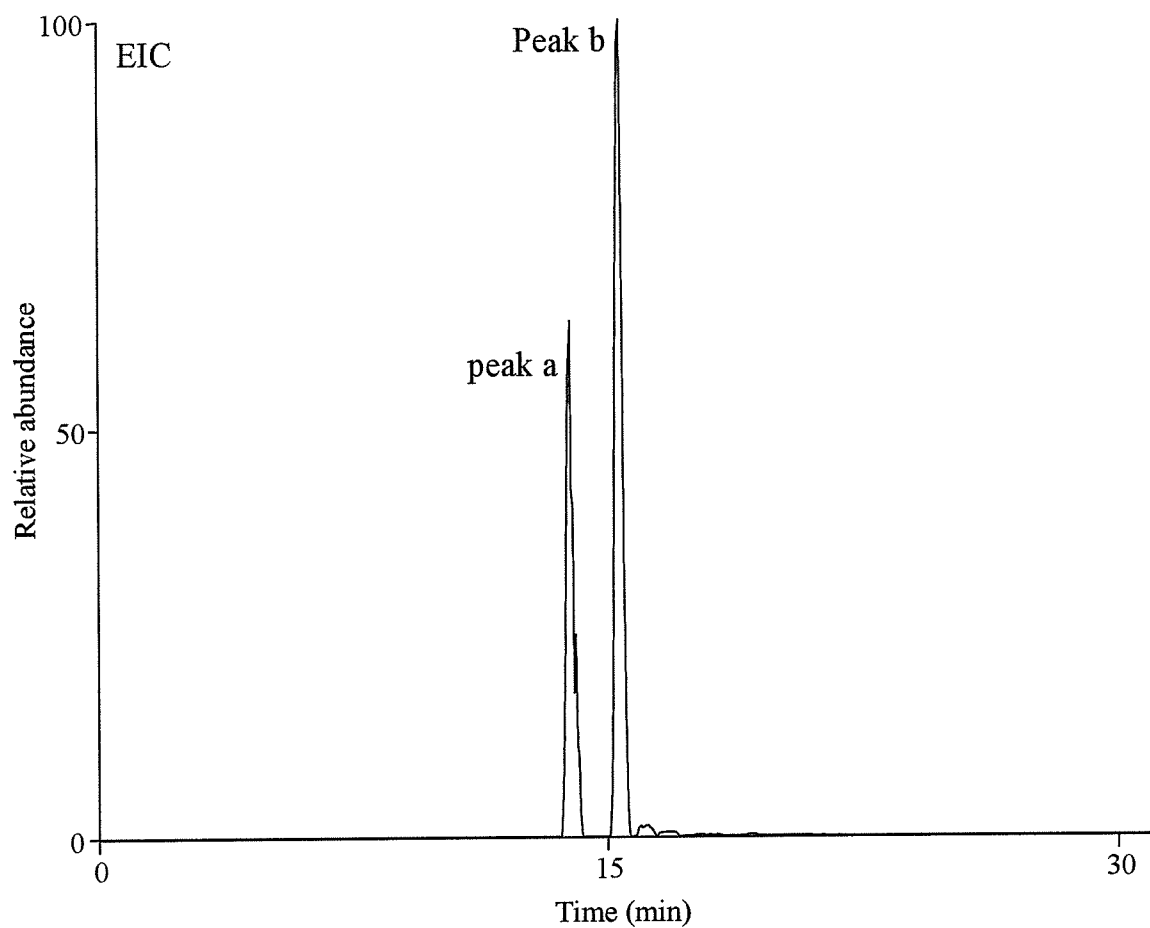


図 2. DMB-NeuGc 及び DMB-NeuAc の SIM (m/z 400-450, ポジティブイオンモード) により得られた m/z 426.13-426.17 及び m/z 442.12-442.16 の EIC.

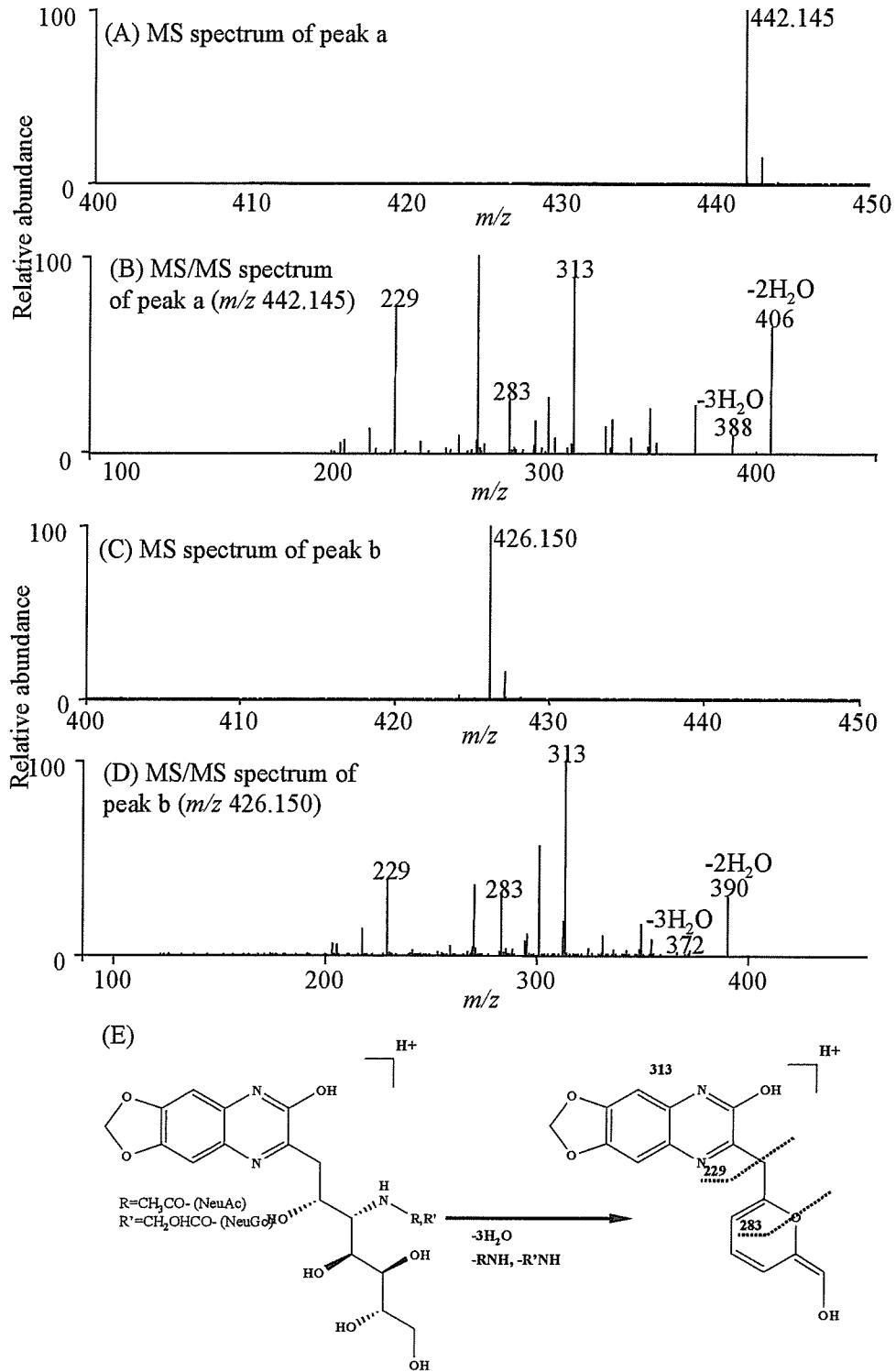


図 3. (A) peak a のマススペクトル, (B) peak a で検出された $[\text{M} + \text{H}]^+$ (m/z 442.145) のMS/MS スペクトル, (C) peak b のマススペクトル, (D) peak b で検出された $[\text{M} + \text{H}]^+$ (m/z 426.150) のMS/MS スペクトル, (E) DMB-NeuGc 及び DMB-NeuAc のフラグメンテーション.

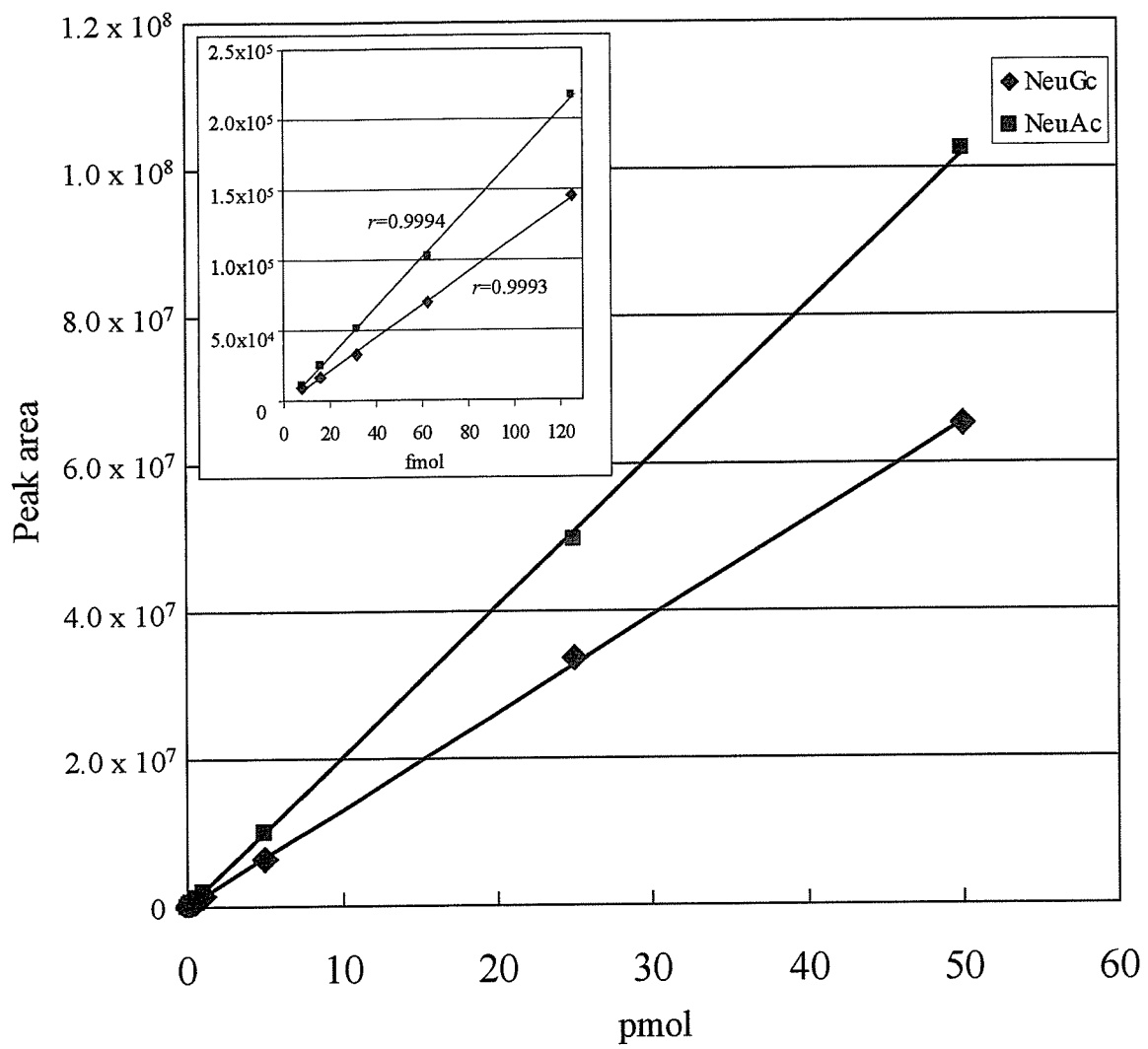


図 4. DMB-NeuGc ($r=0.9998$) 及び DMB-NeuAc ($r=0.9995$) の回帰直線.

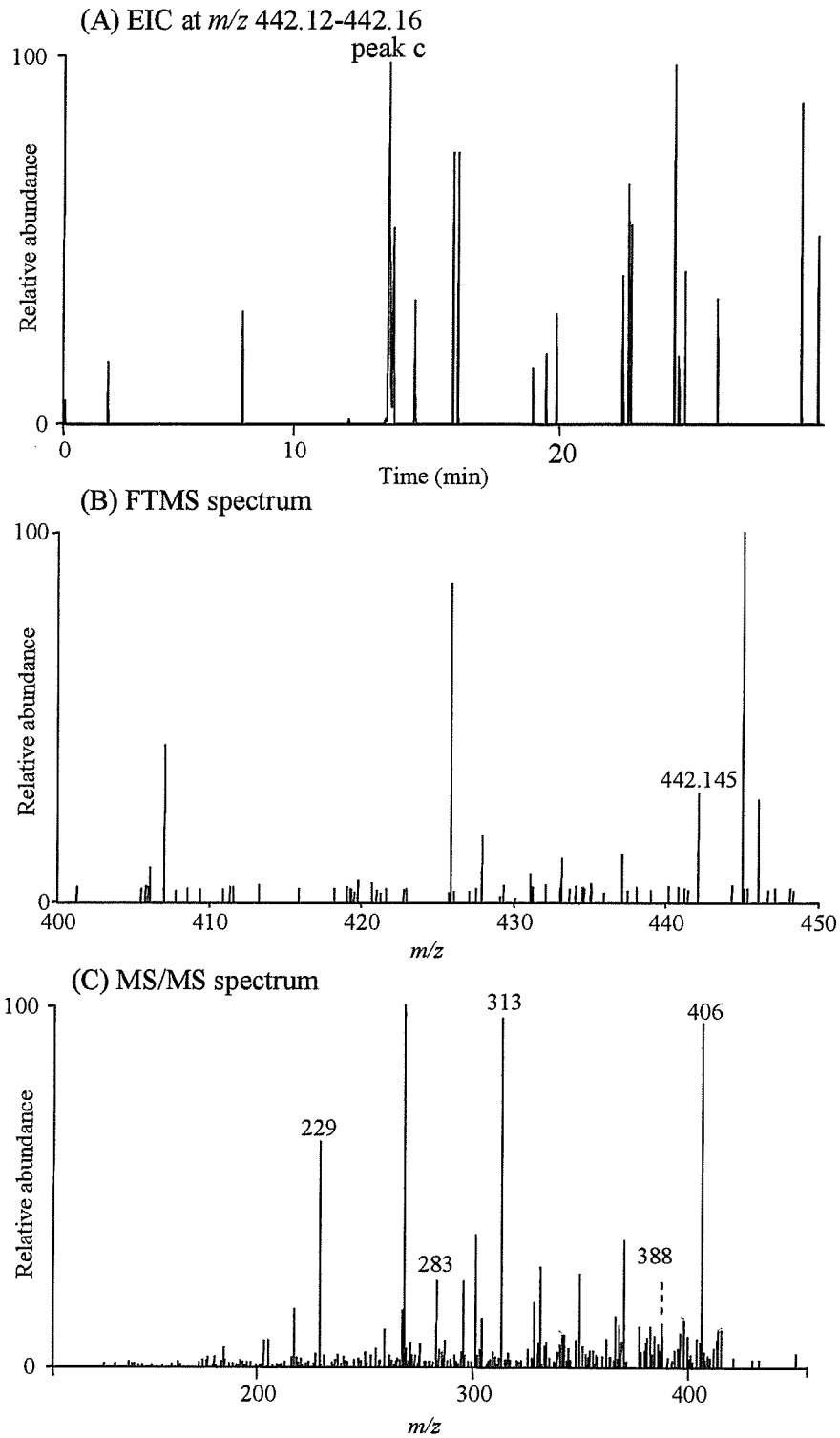


図 5. 10% FCS 添加培地で培養した HL-60 細胞 (2.5×10^3) 膜画分由来 DMB-NeuGc の検出. (A) SIM によって得られた EIC (m/z 442.12-442.16). (B) peak c のマススペクトル, (C) peak c で検出された $[M + H]^+$ (m/z 442.145) の MS/MS スペクトル.

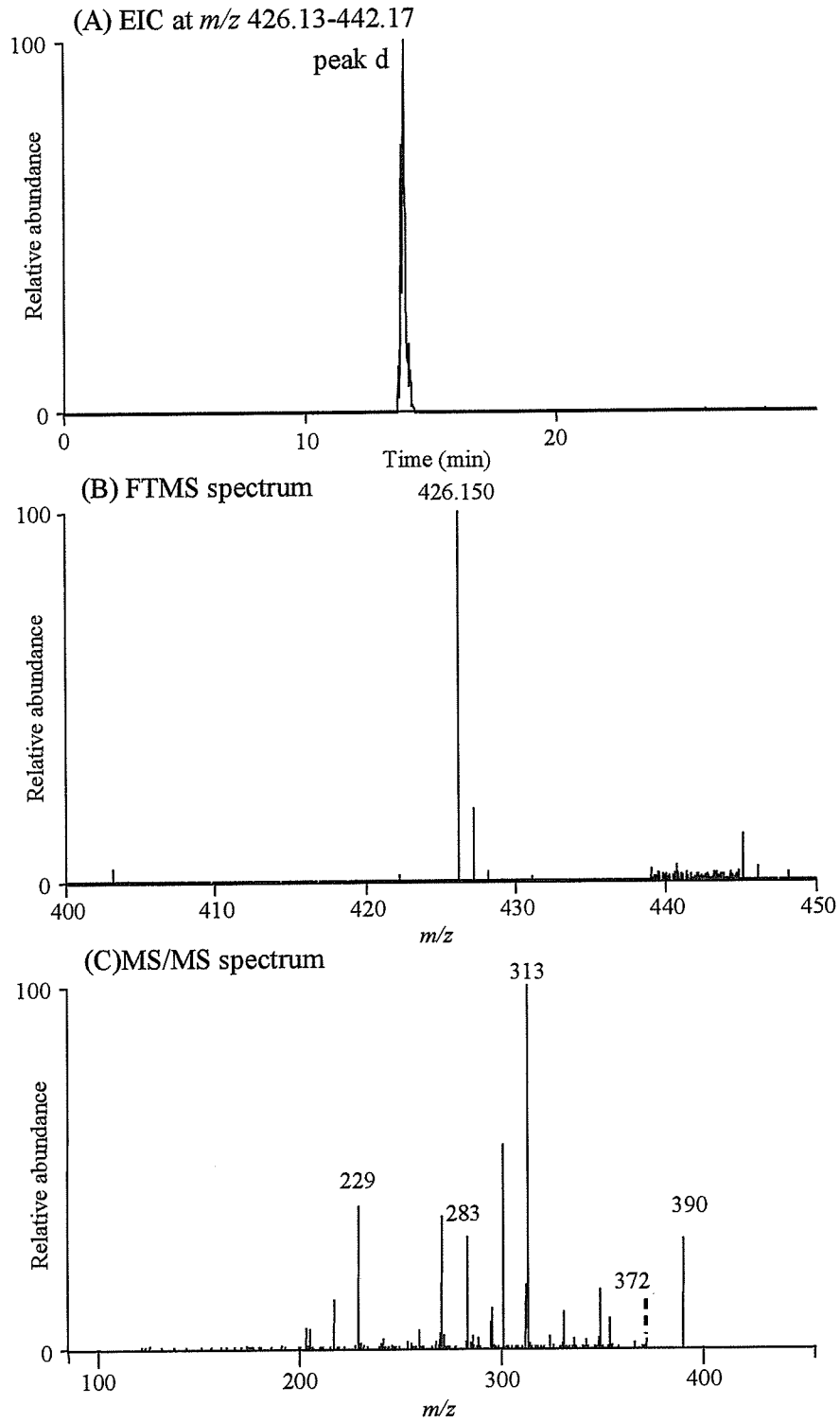


図 6. 10% FCS 添加培地で培養した HL-60 細胞 (2.5×10^3) 膜画分由来 DMB-NeuAc の検出. (A) SIM によって得られた EIC (m/z 426.13-426.17). (B) peak d のマススペクトル, (C) peak d で検出された $[M + H]^+$ (m/z 426.150) の MS/MS スペクトル.

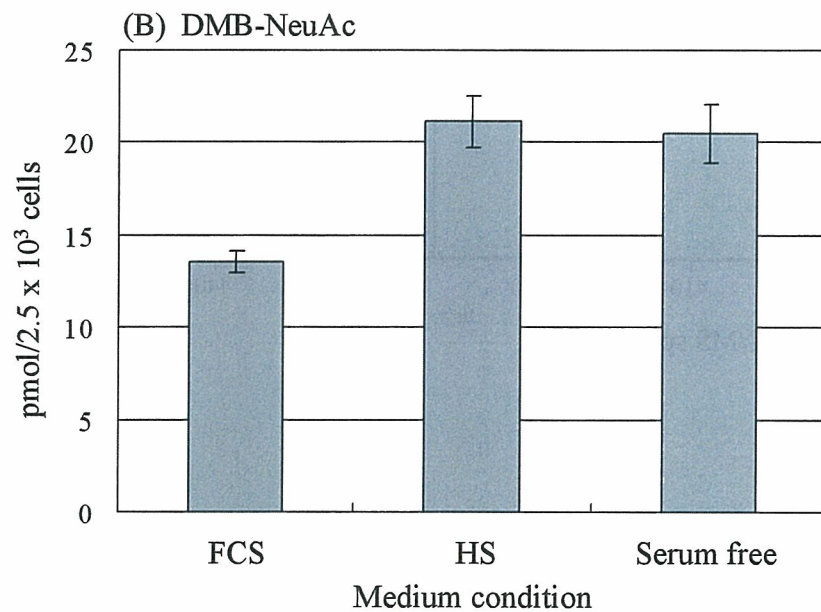
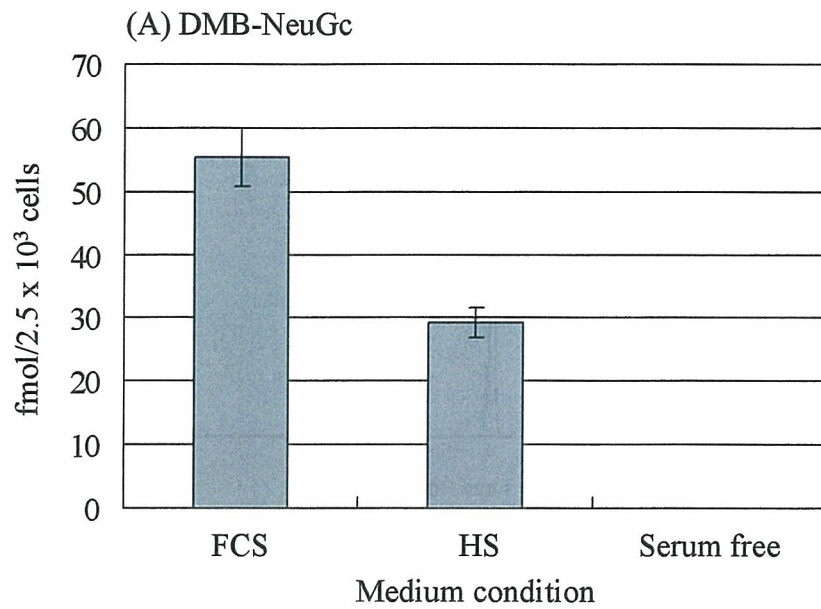


図7. 10% FCS, 10% ヒト血清 (HS) 及び無血清培地で培養した HL-60 細胞 (2.5×10^3) 膜面分由来 (A) NeuGc 及び (B) NeuAc の定量. 数値は平均値 \pm S.D. として示す ($n=3$).

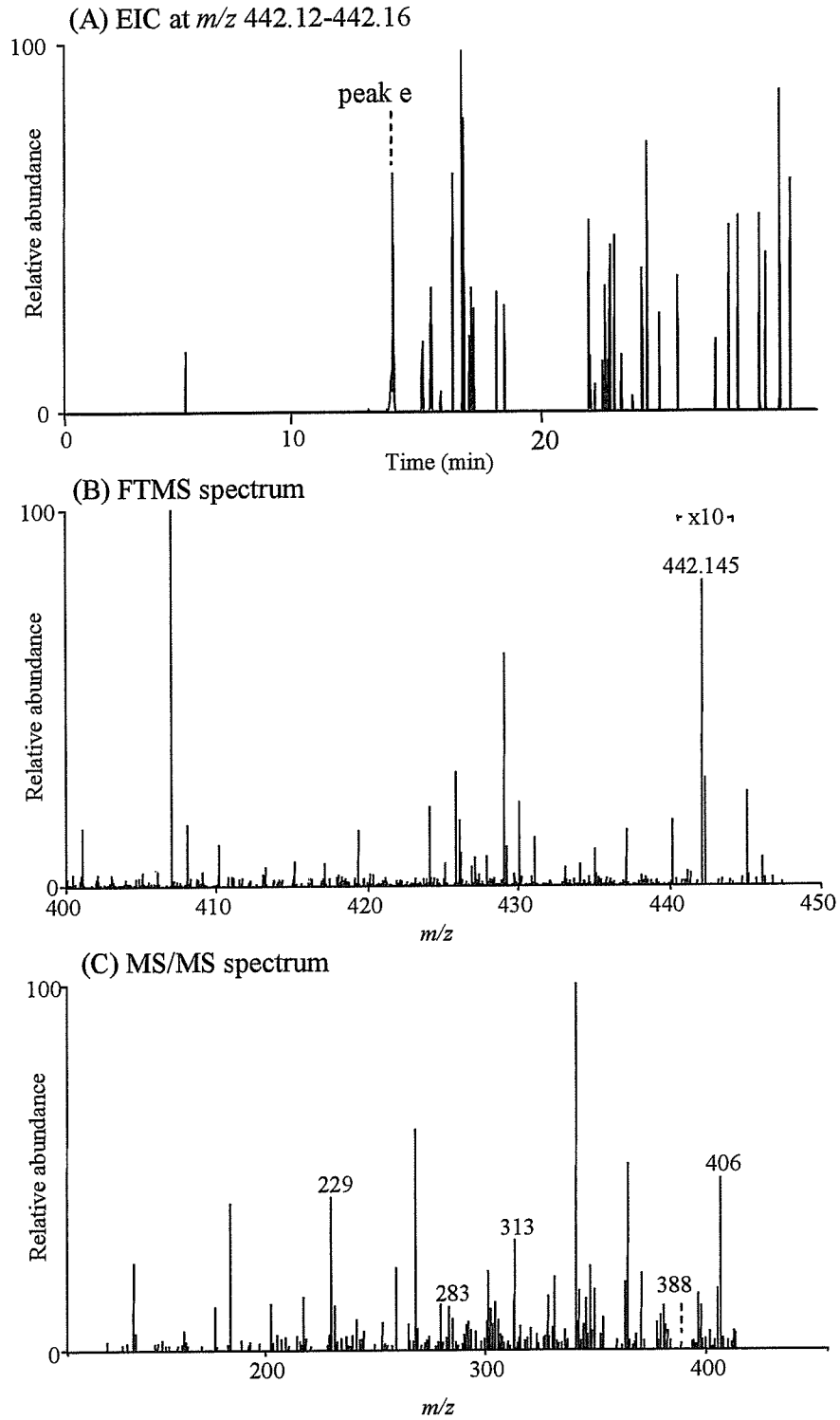


図 8. 10% ヒト血清 添加培地で培養したHL-60 細胞 (2.5×10^3) 膜画分由来DMB-NeuGcの検出. (A) SIM によって得られたEIC (m/z 442.12-442.16). (B) peak e のマススペクトル, (C) peak e で検出された $[M + H]^+$ (m/z 442.145) のMS/MS スペクトル

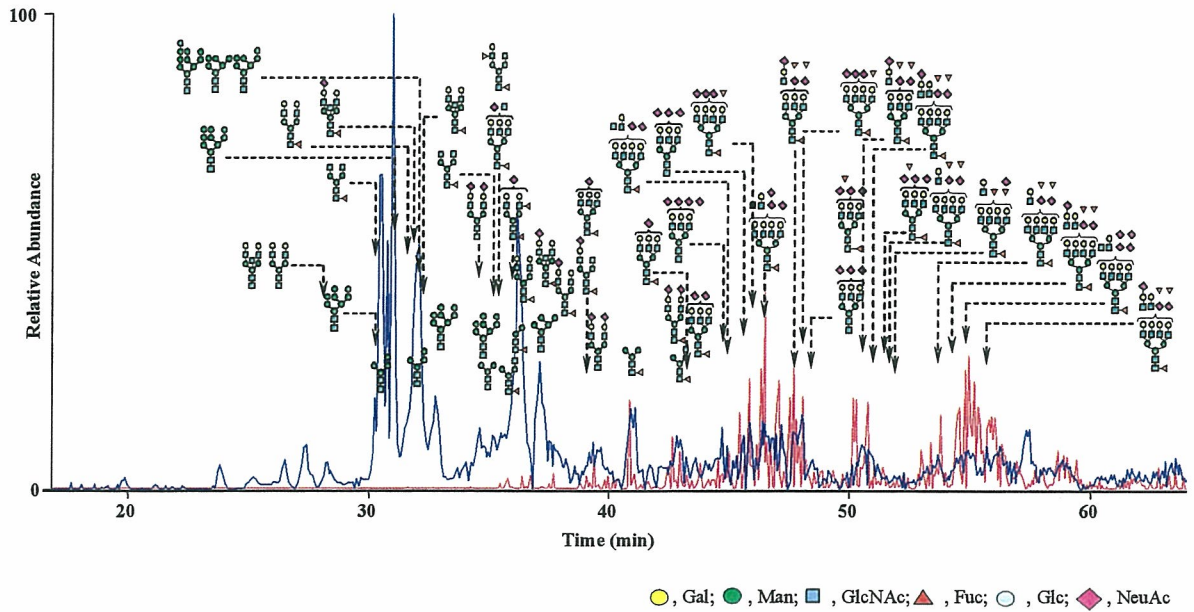


図9. FCS添加培地で培養したHL-60 細胞 の糖鎖プロファイルと糖鎖推定構造.
 青：ポジティブイオンモード；赤：ネガティブイオンモード

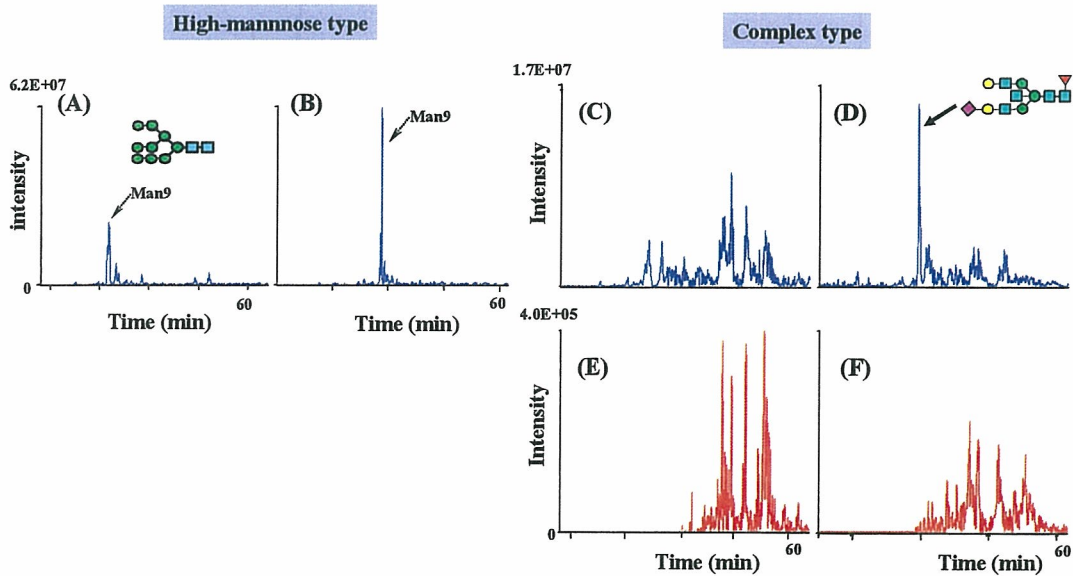


図10. ヒト血清 (HS) 添加培地及び無血清培地で培養した HL-60 細胞 の糖鎖プロファイル. (A) HS 添加培地で培養した細胞の高マンノース糖鎖プロファイル. (B) 無血清培地で培養した細胞の高マンノース糖鎖プロファイル. (C) HS 添加培地で培養した細胞の複合型糖鎖プロファイル(ポジティブイオン測定). (D) 無血清培地で培養した細胞の複合型糖鎖プロファイル(ポジティブイオン測定). (E) HS 添加培地で培養した細胞の複合型糖鎖プロファイル(ネガティブイオン測定). (F) 無血清培地で培養した細胞の複合型糖鎖プロファイル(ネガティブイオン測定).

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）
分担研究報告書

細胞組織利用医薬品の品質・安全性確保に関する研究

分担研究者 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第二室長
協力研究者 豊田淑江 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

細胞組織利用医薬品として血管再生療法での応用が期待される血管内皮前駆細胞 (Endothelial Progenitor Cells: EPC、および、Outgrowth Endothelial Cells: OEC) の効率的な誘導法の確立、ならびに、品質・安全性確保に必要な製造工程関連の要件を明らかにすることを目的に、血液由来細胞からの分離増幅法に関する検討を行った。本年度は、これまでに見出した AC133 陽性細胞由来 CD31 強陽性 EPC の誘導系において、Thrombopoietin が誘導促進効果を示すこと、単核球からの EPC 誘導系では単核球画分に含まれる血小板が EPC 誘導促進作用を持つことを明らかにした。また、OEC 誘導系において、OEC コロニー出現数への培地組成の影響、継代に伴う細胞形態の変化、目的以外の細胞の出現に関する検討を行った。さらに、血管内皮前駆細胞の特性指標と細胞機能の関連に関する解析を進め、CD31 強陽性 EPC の特性指標として同定した IL-8 が OEC の遊走促進効果を持つことを明らかにした。

A. 研究目的

心筋虚血や重症下肢虚血の新たな治療法として期待され、我が国においても多くの臨床研究が行われている血管再生療法は、骨髄由来単核球や G-CSF 投与により末梢に動員した CD34 陽性細胞を局所に投与することにより血管の再生を促進するものである。これらの治療では一定の効果が認められているものの、骨髄液を採取することの患者への負担や、非常にヘテロな細胞集団である単核球画分を用いることに伴う副作用の懸念、G-CSF 投与の安全性、あるいは、糖尿病等の基礎疾患に伴う血管内皮前駆細胞の数および活性の低下などが解決すべき課題として挙げられている。

一方、血管内皮前駆細胞の発見当初から、

VEGF、bFGF 等を含む血管内皮細胞増殖用培地を用いて単核球を Fibronectin (FN) 上で培養することにより、*in vitro* で血管内皮前駆細胞が得られることが報告されている。そのため、患者の血液から単核球を分離して血管内皮前駆細胞を体外増幅し、患部に投与することによって、低侵襲でより高い治療効果を得られる可能性が考えられることから、次世代の血管再生療法を見据えて、細胞組織利用医薬品としての品質・安全性を確保した血管内皮前駆細胞の体外増幅法の確立が望まれている。一般に、バイオテクノロジーを応用して製造した医薬品の品質・安全性は製造工程の影響を大きく受けるが、細胞組織利用医薬品も例外ではなく、体外で培養するという工程が加わることによって、得られる血管内皮前駆細胞の特性や品質の一定性、さら

には安全性の面で、より慎重な配慮が必要となる。

血管内皮細胞増殖用培地を用いて血液由来単核球を培養することで得られる細胞には、培養開始 3～5 日目に出現する Endothelial Progenitor Cells (EPC) と呼ばれる細胞と、培養開始 2～3 週間後に出現する Outgrowth Endothelial Cells (OEC) と呼ばれる細胞の 2 種類があることが知られている (Figs. 1, 2)。EPC は血管形成を促進するサイトカイン類を分泌する細胞であり、OEC はそれ自身が血管を形成しうる細胞であるとされ、特性解析も進みつつあるが、今後の課題として、EPC/OEC の効率のよい誘導法の確立、細胞の品質特性に影響を与える製造工程中の因子の解明、生体内での EPC/OEC の機能解析法の確立等が求められている。本年度は、これらの課題解決に向けて、(1) AC133 陽性細胞からの EPC 誘導系における Thrombopoietin (TPO) の効果、(2) CD31 強陽性 EPC の特性指標としての高 IL-8 産生能の分化誘導への影響、(3) 単核球由来 EPC の誘導に対する血小板の影響、(4) OEC 誘導効率に対する培地添加物の影響、長期間培養後の形態の変化、OEC 以外の細胞の出現、(5) IL-8 の OEC 遊走に対する効果、(6) EPC/OEC の *in vivo* での機能評価系、に関する検討を行った。

B. 研究方法

1) 臍帯血あるいは末梢血 AC133 陽性細胞から CD31 強陽性細胞の調製

1.2L の血液より分離した約 40ml のバッファーコートあるいは臍帯血を 2mM EDTA を含む PBS(-) で 2 倍希釈し、Lymphoprep tube を用いて、2200rpm、18°C、20 分で遠心後、単核球分画を単離し、0.5% BSA、2mM EDTA を含む PBS(-) (分離バッファー) に浮遊

させた。単核球を分離バッファーで洗浄し、500μl の分離バッファーに再浮遊させた。AC133 陽性細胞を分離するため、AC133 マイクロビーズ分離キット (Milteny Biotec) を用い抗 AC133 抗体・マイクロビーズと 4°C、30 min で抗原抗体反応させた。陽性細胞の分離は、Auto MACS (Milteny Biotec) を用いて行った。臍帯血と末梢血 AC133 陽性細胞は 20% 牛胎児血清 (FBS)、50 ng/ml VEGF、50 ng/ml TPO、50 ng/ml SCF を含む EBM-2 培地に浮遊させ、タイプ IV コラーゲンでコートした 24 穴のマルチウェルに分注し、1 週間培養した。細胞を回収し、洗浄後、抗 CD31 抗体-FITC (BD Biosciences PharMingen)、抗 CD110 (TPO 受容体) 抗体-APC (BD Biosciences PharMingen)、抗 CD133/2 抗体-PE (Miltenyi Biotec)、抗 VE-Cadherin (CD144) 抗体-PE (Beckman Coulter) を用いて免疫染色し、フローサイトメーターにより解析した。なお、すべての検体は 7-amino actinomycin D (7-AAD) で染色し、陽性の細胞は死細胞として、解析の際に除去した。

2) 臍帯血あるいは末梢血由来 CD31 強陽性・陽性細胞における各種サイトカインの産生

FACS (Aria) により分画した CD31 強陽性・陽性細胞を 20% FBS-EBM2 培地に浮遊し、96 穴のマルチウェルに培養した。培養 4 日後に培養上清を集め、-20°C で保存した。培養上清中のサイトカインの測定は Bio-Plex サイトカインアッセイのプロトコールに従った。

3) 臍帯血からの単核球調製と血小板の除去

理研より購入した臍帯血由来細胞 (10% DMSO, 1% Dextran, 0.8% Hespán 中で凍結保存されたもの)、あるいは、東京都赤十字