

Fig. 3. Subregional expression pattern of RAR in the hippocampus. (A) Immunostaining for RAR showed a neuronal cell layer-like pattern in CA1 to CA3 and in DG (upper panel). The RAR signals were clearly colocalized with those for NeuN (lower panel). Scale bar=500 μm . (B) Differences in the expression pattern of RAR between subregions of the hippocampus. Images in b–d were obtained from the CA1 region indicated by the square in a. The signals for RAR appeared in ring-forms in CA1 (b; arrows). The signals for NeuN (c) were colocalized with those for RAR (d). Images in f–h were obtained from the CA3 region indicated by the square in e. In the CA3 region, RAR signals were mainly in ring-forms (f; arrows) but a few were in diffusion-forms (f; arrowheads), which were colocalized with those for NeuN (g, h). Images in j–l were obtained from the DG region indicated by the square in i. The RAR signals in DG were observed mainly in diffusion-forms (j; arrows) with a few RARs in ring-forms (j; arrowheads), which were colocalized with the NeuN signals (k, l). (C) RARs exist in the nucleus. RARs in CA1 were colocalized with PI signals (arrows). The insets show high-magnified images of square-selected region. Scale bar=20 μm .

Quantification of the immunostaining

The intensity of NeuN, which is not only a marker for neuronal nuclei but also for neuronal viability in hippocampus (Nakatomi et al., 2002; Liu et al., 2004; Gao et al., 2005), was quantified using Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) (Lyuksyutova, 2003; MacDonald, 2006). The center parts of the neuronal cell layers from CA1 to CA3 or dentate gyrus (DG) were traced and analyzed (analysis-measure) by "line selection from tool bar" and the NeuN intensity was measured by "Analysis-measure" from the menu bar. The mean value was employed as the intensity of the signal.

Statistics

Data were expressed mean \pm S.E.M. unless otherwise indicated. Data were analyzed for statistical significance by ANOVA followed by Student-Neuman-Keuls post hoc test. Significance was imparted at the $P < 0.05$ level.

RESULTS

The protective effect of RA on OGD/Rep-induced neuronal loss of hippocampal slice

Fig. 1A shows the experimental procedure in the present study. The neuronal cell layer of hippocampal slice cultures 12 days after dissection from 11-day-old rats is shown in Fig. 1B(a). The neuronal cell layer was confirmed by immunohistochemistry using an antibody against NeuN. OGD for 40 min and Rep for 24 h shrank the NeuN signal, which also decreased its intensity significantly (Fig. 1B(b)). Hippocampal slices were treated with ATRA 24 h before OGD/Rep. The decrease in the NeuN signal intensity by OGD/Rep was prevented by ATRA at ≥ 10 nM (Fig. 1B(c–e)). In addition to the pre-treatment, post-treatment with ATRA

(1 μM) (c). 9-*cis* RA also showed the protective effect on neuronal cells against OGD/Rep-induced damage (d). The protective effect of 9-*cis* RA was inhibited by LE135 (1 μM) (e) and HX531 (1 μM) (f). Scale bar=500 μm . (C) Quantification of the signals for NeuN. OGD/Rep decreased the NeuN intensity to 40% of the controls, which was restored to 60% by ATRA (100 nM, 24 h). The effect of ATRA was offset by LE135 (1 μM) or HX531 (1 μM). Values were expressed as mean \pm S.E.M. ($n=6-8$). $^{**} P < 0.01$ vs. control. $^{**} P < 0.01$ vs. OGD/Rep. $^{***} P < 0.01$ vs. ATRA/OGD/Rep. (D) RAR/RXR antagonists aggravate DNA damage of neurons. The ATRA-mediated inhibition of the OGD/Rep-increased ssDNA signals (left, upper panel) as well as on the shrinkage of NeuN (left, middle panel), was diminished in the presence of LE135 (1 μM ; center) or HX531 (1 μM ; right). Signals for NeuN were colocalized with ssDNA signals (lower panels, arrows). (E) RAR/RXR antagonists aggravate caspase-3 activation by OGD/Rep. The inhibitory effect of ATRA on the OGD/Rep-induced increase in active caspase-3 (left, upper panel) was diminished in the presence of LE135 (1 μM ; center) or HX531 (1 μM ; right). NeuN (middle panels) was colocalized with active caspase-3 (lower panels). Scale bar=20 μm .

after OGD was also cytoprotective (Fig. 1B(f)). As DNA damage is a marker of ischemia-induced neuronal cell death (Kawase et al., 1999) and caspase-3 activation (Chen et al., 1998), we employed antibodies for ssDNA and active caspase-3. In the negative controls without OGD/Rep, immunostaining for ssDNA was hardly detected (Fig. 1C left, upper panel). After the OGD/Rep, the immunostaining for ssDNA was significantly enhanced (Fig. 1C center, upper panel). The NeuN signals were detected in ssDNA-positive cells and shrunken (Fig. 1C center, arrows). ATRA prevented not only the increases in ssDNA signals but also the decrease in NeuN and its shrinkage (Fig. 1C right). Cells positive for active caspase-3 were detected after OGD/Rep but not in the controls without OGD/Rep (Fig. 1D, upper panels). The signals for active caspase-3 in the OGD/Rep group were colocalized with the NeuN signals. ATRA prevented caspase-3 activation, as well as the shrinkage of NeuN signals (Fig. 1D, right).

The inhibitory effect of selective RAR and RXR antagonists on the ATRA-induced neuroprotection against OGD/Rep

We next examined whether the protective effect of ATRA was mediated by RAR and/or RXR. Hippocampal slices were treated with ATRA 24 h before OGD and during Rep

(Fig. 2A). Antagonists for RAR and RXR were added to the culture medium 30 min before ATRA treatment. As shown in Fig. 2B, both a specific RAR antagonist LE135 (1 μ M) and a specific RXR antagonist HX531 (1 μ M) inhibited the protective effect of ATRA (100 nM, 24 h) (Fig. 2B(b, c)). In addition, 9-*cis* RA (100 nM) had a protective effect against OGD/Rep-induced neuronal death (Fig. 2B(d)), which was reversed by LE135 (1 μ M) or HX531 (1 μ M) (Fig. 2B(e, f)). LE135 and HX531 alone did not attenuate the NeuN signal in hippocampal slices (data not shown). Based on quantitative analyses using the Image J program, OGD/Rep appeared to decrease the intensity of the NeuN signal to 40% of the controls (Fig. 2C). ATRA (100 nM) significantly inhibited the effect of OGD/Rep on the NeuN intensity, which was reversed by LE135 (1 μ M) and HX531 (1 μ M). To confirm that the effect on NeuN reflected the cytoprotective activity of ATRA, hippocampal slices were simultaneously stained with specific antibodies for NeuN, ssDNA and active caspase-3. As shown in Fig. 2D and E, LE135 and HX531 also offset the inhibitory effect of ATRA on the signal intensities for ssDNA and active caspase-3 in the slices treated with OGD/Rep. Thus, the intensities for ssDNA and active caspase-3 were negatively associated with the abundance of NeuN.

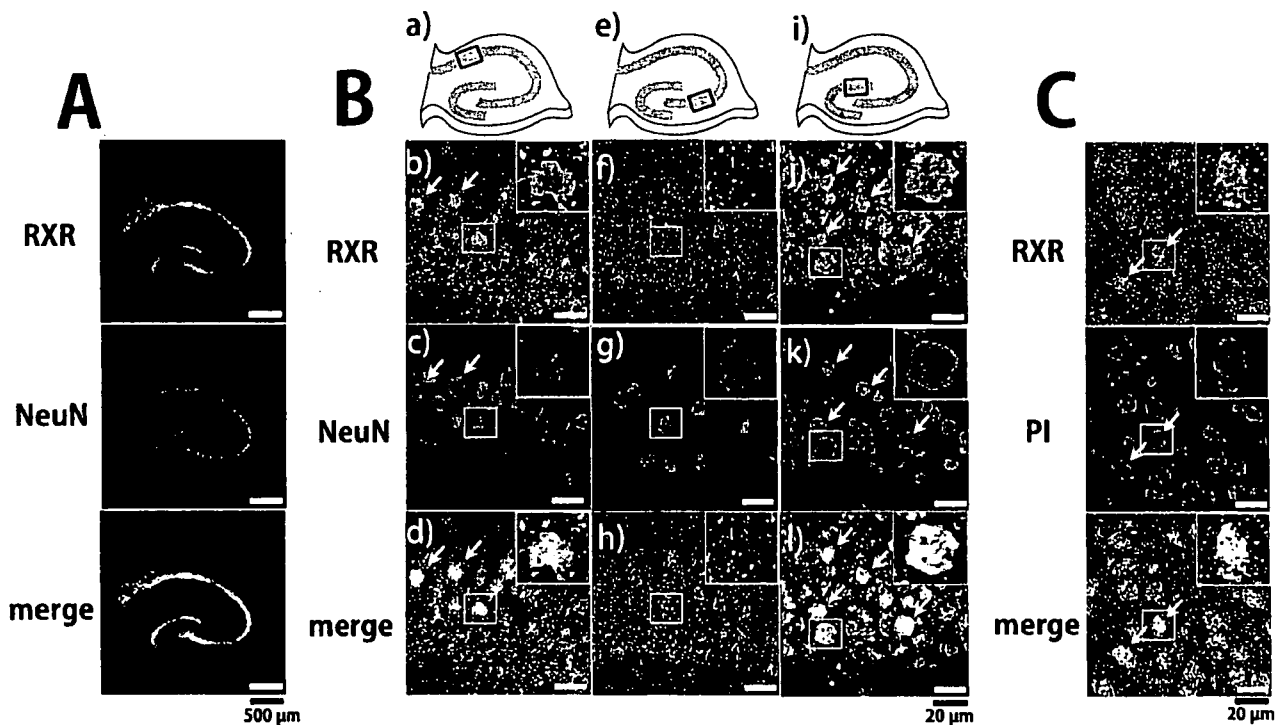


Fig. 4. Subregional expression pattern of RXR in the hippocampus. (A) Immunostaining for RXR showed neuronal cell layer-like pattern in CA1 to CA3 and in DG (upper panel). The signals for RXR were colocalized with those for NeuN (lower panel). Scale bar=500 μ m. (B) Differences in the expression pattern of RXR between subregions of hippocampus. Images in b–d were obtained from the CA1 region indicated by the square in a. The signals for RXR appeared in diffusion-forms in CA1 (b; arrows). The signals for NeuN signals (c) were colocalized with those for RXR (d). Images of f–h were obtained from the CA3 region indicated by the square in e. In contrast to CA1, the RXR signals were barely detectable in CA3 (f), though they were colocalized with the NeuN signals (g, h). Images in j–l were obtained from the DG region indicated by the square in i. The RXR signals in DG were colocalized with those for NeuN (j–l, arrows). RXR-positive neurons were more frequent in DG, compared with CA1. (C) RXRs exist in the nucleus. RXRs in CA1 were colocalized with PI signals (arrows). The insets show highly magnified images of the square-selected region. Scale bar=20 μ m.

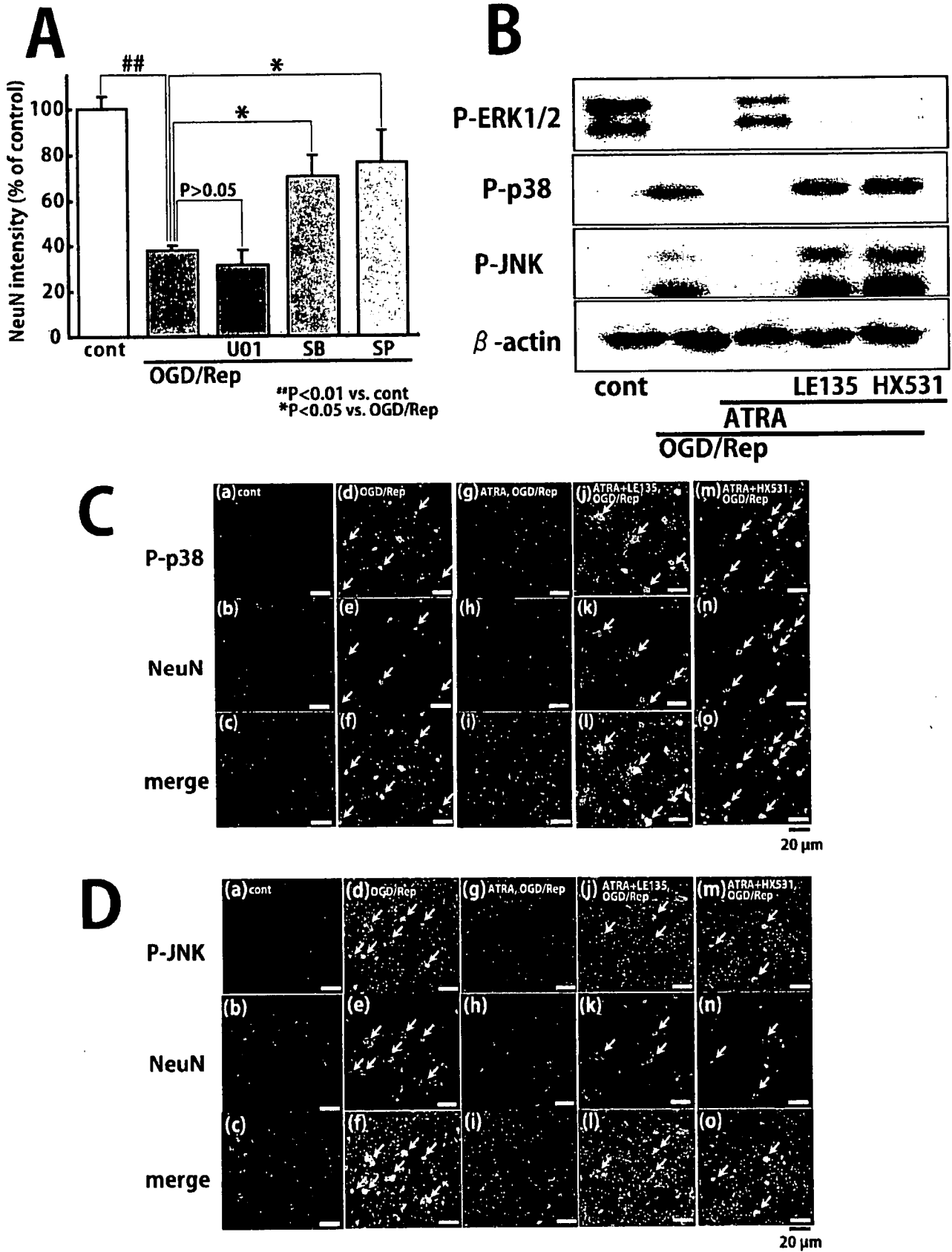


Fig. 5. (Caption overleaf)

Subregional differences of RAR and RXR expression in the hippocampus

To determine the expression of RAR and RXR in the hippocampus, we performed immunohistochemical analyses of the tissue slices using specific antibodies for RAR and RXR. In hippocampal slices fixed right after dissection from rat hippocampus, RAR was expressed in CA1 to CA3 and DG (Fig. 3A) and was colocalized with NeuN. Misner et al. (2001) have shown RA signaling activity in CA1, CA2, CA3 and DG of hippocampus, consistent with our results. RXR was also expressed in CA1 to CA3 and DG, and colocalized with NeuN (Fig. 4A). At higher magnification, subregional differences of RAR and RXR expression were observed in the hippocampus (Figs. 3 and 4). Diffused signals of RAR were observed in DG (Fig. 3B(j), arrows), and parts of them were in ring-formation (Fig. 3B(j), arrowheads). Almost all of RAR in square-selected region of CA3 (Fig. 3B(e)) were in ring-formation (Fig. 3B(f), arrows), and parts of them were in diffusion-forms (Fig. 3B(f), arrowheads). In the CA1 region, almost all of RARs were in ring-formation (Fig. 3B(b), arrows). The RXR signals from cells in CA1 and DG were dots diffused in the nucleus (Fig. 4B, arrows) and those in CA3 subregions were barely detectable (Fig. 4B, center). RAR and RXR were also colocalized with DNA-binding dye PI (Fig. 3C and Fig. 4C, arrows).

Inhibitory effect of ATRA on OGD/Rep-induced MAPK activation

As MAPKs have been associated with various physiological and pathological events including ischemia-induced neuronal cell death (Xia et al., 1995), we examined the role of MAPKs in the OGD/Rep-induced neuronal death, using specific inhibitors for subgroups of MAPK signaling. As shown in Fig. 5A, MEK1/2 (ERK kinase) inhibitor U0126 (10 μ M) had no effect on the decrease in NeuN after OGD/Rep. In contrast, both a p38 inhibitor, SB203580 (20 μ M), and a JNK inhibitor, SP600125 (20 μ M), significantly prevented the OGD/Rep-induced decrease in NeuN. Both inhibitors protected not only CA1 but also CA3 neurons (data not shown), suggesting that the two kinases were activated in both subregions after OGD/Rep. West-

ern blot analyses revealed that the OGD/Rep led to a decrease in P-ERK1/2 and increases in P-p38 and P-JNK. Pretreatment with ATRA (100 nM) prevented these changes in phosphorylated MAPKs, which were abolished in the presence of LE135 (1 μ M) or HX531 (1 μ M). To confirm whether OGD/Rep increased P-p38 and P-JNK in neuronal cells, immunohistochemical analyses were performed. In controls, signals for P-p38 and P-JNK were hardly detectable (Fig. 5C(a–c), 5D(a–c)), but seemed to exist in the cytoplasmic region. OGD/Rep enhanced the signals for both P-p38 and P-JNK, which were colocalized with the signals for NeuN (Fig. 5C(d–f), 5D(d–f), arrows). The NeuN signals were shrunk in OGD/Rep-treated slices, compared with the controls (Fig. 5C(b) and (e), 5D(b) and (e)). Pretreatment with ATRA (100 nM, 24 h) decreased the P-p38 and P-JNK signals, which were faintly detected around the NeuN signals (Fig. 5C(g–i) and 5D(g–i)). The shrinkage of the NeuN signal was also prevented by ATRA treatment. LE135 (1 μ M) and HX531 (1 μ M) inhibited the effects of ATRA (Fig. 5C(j–o), arrows and Fig. 5D(j–o), arrows).

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that ATRA induces a protective effect against OGD/Rep-induced damage in neurons from cultured hippocampal slices. The effect of ATRA was inhibited not only by a RAR antagonist but also by a RXR antagonist, indicating that ATRA-induced protection was mediated by RAR/RXR heterodimer. Selective RXR agonists and antagonists are known to synergistically enhance and inhibit activity of RAR in RAR/RXR heterodimers, respectively, and the opposite is observed in the case of RAR agonists and antagonists (Ebisawa et al., 1999). In the CA3 region, where ATRA had no neuroprotective activity, both a ring-formed and diffusion-formed distribution of RARs in the nucleus was found. However, a ring-formed as well as a diffuse-formed distribution of RARs mediated neuroprotection of ATRA in CA1 and DG, respectively, suggesting that the neuroprotective effect is independent of the pattern of RAR distribution. The signals for RXR were dots diffused in the nucleus. Unlike RAR that forms a heterodimer with RXR, RXR forms not only homo/heterodimers but also a homotetramer (Kersten et al.,

Fig. 5. The role of MAPK activation in the OGD/Rep-induced cell death of hippocampal neurons. (A) The effect of MAPK inhibitors on the OGD/Rep-induced decrease in NeuN. MEK1/2 inhibitor U0126 (10 μ M) had no effect on the decrease in NeuN by OGD/Rep. Both p38 inhibitor, SB203580 (20 μ M), and JNK inhibitor, SP600125 (20 μ M), significantly inhibited the OGD/Rep-induced decrease in NeuN. All the MAPK inhibitors were added to the culture medium during Rep. Values were expressed as means \pm S.E.M. of the fluorescent signal intensities for NeuN ($n=3$). (B) The effect of ATRA on OGD/Rep-induced changes in the levels of phosphorylated MAPKs. P-ERK1/2 was decreased by OGD/Rep, which was prevented by ATRA (100 nM, 24 h). The effect of ATRA on P-ERK1/2 was inhibited by LE135 (1 μ M) or HX531 (1 μ M). The increases in P-p38 and P-JNK, induced by OGD/Rep, were prevented by ATRA (100 nM, 24 h). The effects of ATRA on P-p38 and P-JNK levels were inhibited by LE135 (1 μ M) or HX531 (1 μ M). (C) Immunohistochemical analyses of p38 activation by OGD/Rep. In the controls, P-p38 was hardly detectable (a–c). The OGD/Rep led to an increase in the signals for P-p38 (d), as well as a shrinkage of the signals for NeuN (e; arrows). The P-p38 signals were colocalized with those for NeuN (f; arrows). The OGD/Rep resulted in the shrinkage of the NeuN signals (e; arrows). ATRA (100 nM, 24 h) prevented the increase in the P-p38 signals (g) and the shrinkage of the NeuN signals (h) after OGD/Rep. The effects of ATRA were inhibited by LE135 (1 μ M) (j–l) or HX531 (1 μ M) (m–o). The P-p38 signals were colocalized with signals for NeuN (l, o; arrows). (D) Immunohistochemical analysis of JNK activation by OGD/Rep. In the controls, P-JNK was hardly detectable in the NeuN-positive regions (a–c). In the areas of surrounding the NeuN signals, P-JNK signals were sparsely observed. P-JNK signals were significantly increased by OGD/Rep, which were colocalized with those for NeuN (d–f; arrows). ATRA (100 nM, 24 h) prevented the increase in P-JNK by OGD/Rep (g–i). The effect of ATRA was inhibited by LE135 (1 μ M) (j–l) or HX531 (1 μ M) (m–o). The P-JNK signals were colocalized with those for NeuN (arrows). ATRA (100 nM) was added to the slices 24 h before OGD and during Rep. LE135 (1 μ M) and HX531 (1 μ M) were added to the culture medium 30 min before ATRA treatment. Scale bar=20 μ m.

1995). Such differences in the multimeric structure may lead to the difference in the pattern of receptor distribution. In contrast to RAR, RXR was barely expressed in the CA3 region. Therefore, the lack of the synergistic effect of RXR in CA3 may explain the subregional difference in the cytoprotective effect of ATRA. In addition, 9-*cis* RA, an agonist for both RAR and RXR, also showed no protective effect on CA3, suggesting a deficiency in the receptor heterodimer activity in this region. Furthermore, degradation rates of RAs in CA3 may also contribute to their subregion-selective effects, because the RA degrading enzyme CYP26B1 is known to be strongly expressed in the CA3 region (Abu-Abed et al., 2002). According to the report of Misner et al. (2001), endogenous retinoid signaling is active throughout the hippocampus (i.e. CA1–CA3 and DG). However, they also showed that the retinoid signaling activity is the most potent in the DG, followed by CA1 and hilus, and relatively low in CA3, which is consistent with our results.

We found that ATRA potently inhibited the increases in activated forms of p38 (P-p38) and JNK (P-JNK) after OGD/Rep, which was offset by RAR or RXR inhibitors. In addition, inhibition of JNK and p38 activity by their specific inhibitors prevented neuronal damage by OGD/Rep, indicating the death-promoting functions of JNK and p38 in OGD/Rep. These findings suggest that ATRA, acting through RAR/RXR, protects hippocampal neurons from OGD/Rep stress, at least partly, by preventing the activation of JNK and p38. ATRA is known to increase the expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1), protecting mesangial cells from H₂O₂-induced cell death by dephosphorylation and inactivation of JNK and p38 (Konta et al., 2001). Recently, MKP-1 was found to primarily dephosphorylate JNK and p38, but not ERK1/2 (Wu and Bennett, 2005). Therefore, upregulation of MKP-1 is one possible mechanism in the neuroprotective effects of ATRA, observed in the present study. Recent studies have shown that molecules generally called "nuclear receptors" (i.e. RXR, TR and steroid hormone receptors) elicit non-genomic effects in response to their agonists (Hiroi et al., 2006; Wehling and Losel, 2006; Moraes et al., 2007). Additionally, ATRA is known to phosphorylate neuronal ERK in a nongenomic manner (Canon et al., 2004), which is consistent with its inhibitory effect on OGD/Rep-mediated ERK dephosphorylation. In the present study, selective RAR or RXR antagonists inhibited the neuroprotection by ATRA. Furthermore, ATRA applied after OGD was also neuroprotective. Therefore, it is also possible that ATRA protected hippocampal slices from OGD/Rep-induced cell injuries via the non-genomic action of RAR or RXR.

In contrast to JNK and p38, ERK1/2 mediates the pro-survival functions in staurosporine-treated neurons (Zhu et al., 2002). It has been suggested that BDNF is the mediator for the pro-survival effect of ERK1/2 (Han and Holtzman, 2000). ATRA is known to upregulate Trk B, the receptor for BDNF, NT-3 and NT-4/5, facilitating BDNF signaling (Kaplan et al., 1993; Kobayashi et al., 1994). Although the inhibition of endogenous ERK1/2 activity by a

MEK inhibitor did not facilitate cell death by OGD/Rep, ATRA inhibited an OGD/Rep-induced decrease in P-ERK1/2. Therefore, it is still possible that P-ERK1/2 also contributes to the neuroprotection of ATRA under OGD/Rep.

CONCLUSION

In conclusion, our results suggest that ATRA has a protective effect on hippocampal neurons against OGD/Rep-induced damages, by inactivating JNK and p38 via RAR/RXR heterodimers. As ATRA is a lipophilic molecule, orally applied ATRA can easily reach the CNS through blood–brain barrier (Crandall et al., 2004). Although relatively high concentrations of ATRA (10–100 nM) were necessary for the neuroprotection in our ex vivo model, they are achievable by an oral administration of ATRA not only in rats but also in humans in a clinical setting (Saadeddin et al., 2004; Muindi et al., 1992). Therefore, our findings provide new insights into clinical applications of ATRA for the treatment of CNS diseases such as stroke.

Acknowledgments—We thank Dr. Koichi Shudo for the gracious gift of LE135 and HX531, and we thank Tomoko Obama for technical assistance. We are grateful to Dr. Helen Kiriazis for critical reading of the manuscript. This study was partly supported by grants from National Institute of Biomedical Innovation (MF-16), from the Uehara Memorial Foundation, and from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, and grants-in-aid for Scientific Research (B) and (C), for Young Scientists (A) and on Priority Areas (A) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

REFERENCES

- Abu-Abed S, MacLean G, Fraulob V, Chambon P, Petkovich M, Dolle P (2002) Differential expression of the retinoic acid-metabolizing enzymes CYP26A1 and CYP26B1 during murine organogenesis. *Mech Dev* 110:173–177.
- Ahlemeyer B, Kriegstein J (1998) Retinoic acid reduces staurosporine-induced apoptotic damage in chick embryonic neurons by suppressing reactive oxygen species production. *Neurosci Lett* 246:93–96.
- Behrens A, Sibilia M, Wagner EF (1999) Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* 21:326–329.
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65:663–675.
- Canon E, Cosgaya JM, Scsucova S, Aranda A (2004) Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell* 15:5583–5592.
- Chambon P (1994) The retinoid signaling pathway: molecular and genetic analyses. *Semin Cell Biol* 5:115–125.
- Chambon P (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10:940–954.
- Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP (1998) Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 18:4914–4928.
- Chiang MY, Misner D, Kempermann G, Schikorski T, Giguere V, Sucov HM, Gage FH, Stevens CF, Evans RM (1998) An essential

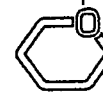
- role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21:1353–1361.
- Corcoran J, So PL, Maden M (2002) Absence of retinoids can induce motoneuron disease in the adult rat and a retinoid defect is present in motoneuron disease patients. *J Cell Sci* 115:4735–4741.
- Crandall J, Sakai Y, Zhang J, Koul O, Mineur Y, Crusio WE, McCaffery P (2004) 13-cis-retinoic acid suppresses hippocampal cell division and hippocampal-dependent learning in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5111–5116.
- de Urquiza AM, Liu S, Sjöberg M, Zetterstrom RH, Griffiths W, Sjövall J, Perlmann T (2000) Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290:2140–2144.
- Ebisawa M, Umemiya H, Ohta K, Fukasawa H, Kawachi E, Christoffel G, Gronemeyer H, Tsuji M, Hashimoto Y, Shudo K, Kagechika H (1999) Retinoid X receptor-antagonistic diazepinylbenzoic acids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 47:1778–1786.
- Gao J, Duan B, Wang DG, Deng XH, Zhanf GY, Xu L, Xu TL (2005) Coupling between NMDA receptor and acid-sensing ion channel contributes to ischemic neuronal death. *Neuron* 48:635–646.
- Goodman AB, Pardee AB (2003) Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2901–2905.
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 271:4138–4142.
- Han BH, Holtzman DM (2000) BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci* 20:5775–5781.
- Haskell GT, LaMantia AS (2005) Retinoic acid signaling identifies a distinct precursor population in the developing and adult forebrain. *J Neurosci* 25:7636–7647.
- Herdegen T, Claret FX, Kallunki T, Martin-Villalba A, Winter C, Hunter T, Karin M (1998) Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J Neurosci* 18:5124–5135.
- Hiroi Y, Kim HH, Ying H, Furuya F, Huang Z, Simoncini T, Noma K, Ueki K, Nguyen NH, Scanlan TS, Moskowitz MA, Cheng SY, Liao JK (2006) Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14104–14109.
- Hu BR, Wieloch T (1994) Tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase in the rat brain following transient cerebral ischemia. *J Neurochem* 62:1357–1367.
- Ishikawa Y, Yokoo T, Kitamura M (1997) c-Jun/AP-1, but not NF-kappa B, is a mediator for oxidant-initiated apoptosis in glomerular mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 240:496–501.
- Jacobs S, Lie DC, DeCicco KL, Shi Y, DeLuca LM, Gage FH, Evans RM (2006) Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3902–3907.
- Kaplan DR, Matsumoto K, Lucarelli E, Thiele CJ (1993) Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells. *Eukaryotic Signal Transduction Group. Neuron* 11:321–331.
- Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupe V, Grondona JM, Chambon P (1997) Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 124:313–326.
- Kawase M, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Chan PH (1999) Reduction of apurinic/apyrimidinic endonuclease expression after transient global cerebral ischemia in rats: implication of the failure of DNA repair in neuronal apoptosis. *Stroke* 30:441–448; discussion 449.
- Kersten S, Kelleher D, Chambon P, Gronemeyer H, Noy N (1995) Retinoid X receptor alpha forms tetramers in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8645–8649.
- Kobayashi M, Kurihara K, Matsuoka I (1994) Retinoic acid induces BDNF responsiveness of sympathetic neurons by alteration of Trk neurotrophin receptor expression. *FEBS Lett* 356:60–65.
- Konta T, Xu Q, Furusu A, Nakayama K, Kitamura M (2001) Selective roles of retinoic acid receptor and retinoid X receptor in the suppression of apoptosis by all-trans-retinoic acid. *J Biol Chem* 276:12697–12701.
- Kuan CY, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G, Schloemer AJ, Dong C, Bao J, Banasiak KJ, Haddad GG, Flavell RA, Davis RJ, Rakic P (2003) A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15184–15189.
- Lee SR, Lo EH (2003) Interactions between p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3 in cerebral endothelial cell death after hypoxia-reoxygenation. *Stroke* 34:2704–2709.
- Li Y, Hashimoto Y, Agadir A, Kagechika H, Zhang X (1999) Identification of a novel class of retinoic acid receptor beta-selective retinoid antagonists and their inhibitory effects on AP-1 activity and retinoic acid-induced apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 274:15360–15366.
- Liu SH, Lau L, Wei JS, Zhu DY, Zou S, Sun HS, Fu YP, Liu F, Lu YM (2004) Expression of Ca²⁺-permeable AMPA receptor channels primes cell death in transient forebrain ischemia. *Neuron* 43:43–55.
- Lyukyutora AI, Lu CC, Milanese N, King LA, Guo N, Wang Y, Nathans J, Tessier NM, Zou Y (2003) Anterior-posterior guidance of commissural axons by wnt-frizzled signaling. *Science* 302:1984–1988.
- MacDonald JM, Beach MG, Porpiglia E, Cheehan AE, Watts RJ, Freeman MR (2006) The Drosophila cell corpse engulfment receptor draper mediates glial clearance of severed axons. *Neuron* 50:869–881.
- Maden M (2001) Role and distribution of retinoic acid during CNS development. *Int Rev Cytol* 209:1–77.
- Marshall CJ (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179–185.
- Misner DL, Jacobs S, Shimizu Y, de Urquiza AM, Solomin L, Perlmann T, De Luca LM, Stevens CF, Evans RM (2001) Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11714–11719.
- Mizukami Y, Yoshioka K, Morimoto S, Yoshida K (1997) A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem* 272:16657–16662.
- Moraes LA, Swales KE, Wray JA, Damazo A, Gibbins JM, Warner TD, Bishop-Bailey D (2002) Non-genomic signalling of the retinoid X receptor through binding and inhibiting Gq in human platelets. *Blood* 109:3741–3744.
- Muindi JR, Frankel SR, Huselton C, DeGrazia F, Garland WA, Young CW, Warrell RP Jr (1992) Clinical pharmacology of oral all-trans retinoic acid in patients with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Res* 52:2138–2142.
- Namgung U, Xia Z (2000) Arsenite-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by c-Jun N-terminal protein kinase 3 and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 20:6442–6451.
- Okuno S, Saito A, Hayashi T, Chan PH (2004) The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 24:7879–7887.
- Saadeddin A, Torres-Molina F, Carcel-Trullols J, Araico A, Peris JE (2004) Pharmacokinetics of the time-dependent elimination of all-trans-retinoic acid in rats. *AAPS PharmSci* 6:E1.
- Sahin M, Karauzum SB, Perry G, Smith MA, Aliciguzel Y (2005) Retinoic acid isomers protect hippocampal neurons from amyloid-beta induced neurodegeneration. *Neurotox Res* 7:243–250.
- Segal RA, Greenberg ME (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 19:463–489.
- Skrede KK, Westgaard RH (1971) The transverse hippocampal slice: a well-defined cortical structure maintained in vitro. *Brain Res* 35:589–593.
- Strahan JE, Raimer S (2006) Isotretinoin and the controversy of psychiatric adverse effects. *Int J Dermatol* 45:789–799.

- Walton KM, DiRocco R, Bartlett BA, Koury E, Marcy VR, Jarvis B, Schaefer EM, Bhat RV (1998) Activation of p38MAPK in microglia after ischemia. *J Neurochem* 70:1764–1767.
- Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ (1998) The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* 333(Pt 2):291–300.
- Wang X, Xu L, Wang H, Young PR, Gaestel M, Feuerstein GZ (2002) Mitogen-activated protein kinase-activated protein (MAPKAP) kinase 2 deficiency protects brain from ischemic injury in mice. *J Biol Chem* 277:43968–43972.
- Watson A, Eilers A, Lallemand D, Kyriakis J, Rubin LL, Ham J (1998) Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 18:751–762.
- Wehling M, Losel R (2006) Non-genomic steroid hormone effects: membrane or intracellular receptors? *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:180–183.
- Wu JJ, Bennett AM (2005) Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling. *J Biol Chem* 280:16461–16466.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326–1331.
- Xu Q, Konta T, Furusu A, Nakayama K, Lucio-Cazana J, Fine LG, Kitamura M (2002) Transcriptional induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 by retinoids. Selective roles of nuclear receptors and contribution to the antiapoptotic effect. *J Biol Chem* 277:41693–41700.
- Yin T, Sandhu G, Wolfgang CD, Burrier A, Webb RL, Rigel DF, Hai T, Whelan J (1997) Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney. *J Biol Chem* 272:19943–19950.
- Yokoo T, Kitamura M (1997) Unexpected protection of glomerular mesangial cells from oxidant-triggered apoptosis by bioflavonoid quercetin. *Am J Physiol* 273:F206–F212.
- Zhu Y, Yang GY, Ahlemeyer B, Pang L, Che XM, Culmsee C, Klumpp S, Kriegstein J (2002) Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. *J Neurosci* 22:3898–3909.

(Accepted 17 April 2007)
(Available online 22 May 2007)

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

川崎 ナナ、橋井 則貴、伊藤 さつき、山口 照英
(国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部)



はじめに

ヒトまたは動物より分離した細胞や組織を培養、加工し、直接患者に投与することにより、様々な疾患を治療する細胞治療/再生医療が著しい進展を遂げている。この細胞治療/再生医療の開発には大きく分けて、2つの流れがある。一つは医療行為としての細胞治療/再生医療技術の開発で、我が国の医療機関における細胞治療/再生医療の臨床応用は200例を超えている。もう一つは、薬事法上の規制を受ける細胞治療薬(細胞組織利用医薬品)の開発である。細胞治療薬(cell therapy products)とは、細胞治療を目的として、自己、同種、あるいは異種の細胞を生体外で選別し、加工し、あるいは増殖した後にヒトに投与する医薬品のこと、近年、細胞治療薬の開発は企業活動として活発化してきた。今後の本格的な実用化に向けて、現在、細胞治療薬の有効性確保と特性解析及び品質・安全性評価技術の開発が求められている。

厚生労働省は、細胞治療薬に関連して表1に

示す指針や通知を出している。細胞治療薬の品質及び安全性の確保に関する基本的な考え方は、医薬発第1314号に示されている。表2は医薬発第1314号に記載されている品質・安全性確保のための製造工程及び最終製品レベルの規格及び試験法に関する事項の要点をまとめたものである。この中の同一性、細胞由来生理活性物質、製造工程由来不純物、細胞の純度、及び細胞由来目的外生理活性物質の確認に対しては、その規格及び試験法の一般化・標準化を目的として、様々な方法が検討されている。現在、染色体、遺伝子、タンパク質レベルでの解析が検討されているが、細胞分化や機能発現に糖鎖が重要な役割を果たしていることが明らかになってきていることを考慮すると、糖鎖構造に着目した品質・安全性評価法の有用性評価が必要になってくると思われる。

糖鎖解析法として、液体クロマトグラフィー(LC)、キャピラリー電気泳動法、質量分析法(MS)、及びレクチンを用いた方法等、多くの優れた方法が報告されている。しかし、これらを

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.

製造工程及び最終製品レベルの規格・試験方法

- 回収率や生存率
- 同一性の確認
- 細胞由来生理活性物質(必要に応じて)
- 無菌試験、マイコプラズマ試験
- エンドキシン試験
- 製造工程由来不純物試験
- 細胞の純度試験
- 細胞由来目的外生理活性物質
- ウイルス等の試験

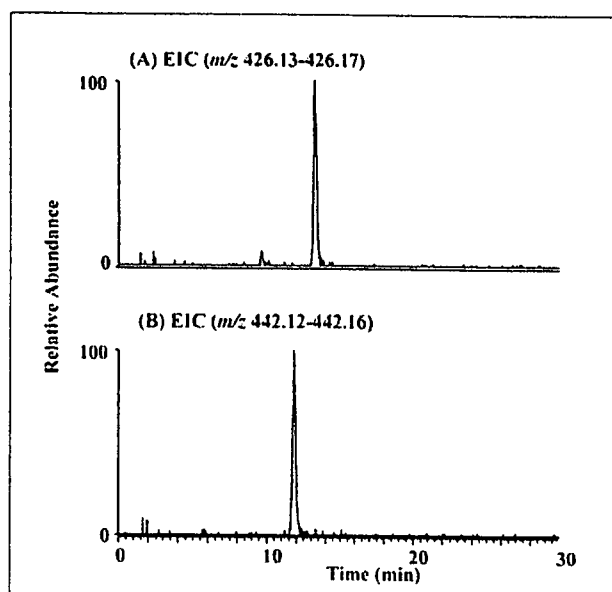


図 1. DMB 誘導体化シアル酸の LC/FTMS
 (A) m/z 426.13-426.17 (DMB-NeuAc) のマスクロマトグラム
 (B) m/z 442.12-442.16 (DMB-NeuGc) のマスクロマトグラム

細胞治療薬の品質・安全性評価に応用するには大きな課題がある。それは、細胞治療薬の品質・安全性試験に使用できる細胞数は限られているということである。検体となる細胞の数は、細胞の性質にも依存するが、自己由来細胞で 10^6 個、また同種由来細胞で 10^8 個程度と推定されている。従って、従来の分析法を試験法として利用するには、感度及び選択性の向上が要求される。国立医薬品食品衛生研究所では、感度と選択性に優れ、一度に多くの情報を得られる nanoLC/MS を細胞治療薬の品質・安全性評価に利用することを検討してきた。本稿ではその一部を紹介する。

1. 製造工程由来不純物試験

製造工程由来不純物とは、医薬品製造中に血清、培地、及び試薬等から混入し、品質・有効性・安全性に影響を及ぼすおそれがある物質のことで、最終製品中に含まれる対象分子の定量試験を設定し、存在を否定するか、もしくは予め規定した存在許容量以下であることを確認する必要がある。現在、製造工程において血清や

FCS、ヒト血清、及び無血清培地で培養した HL-60 細胞 (2.5×10^6 個) の膜成分に存在するシアル酸含量

	NeuAc (pmol \pm SD)	NeuGc (pmol \pm SD)	NeuGc/NeuAc (%)
FCS	13.5 \pm 0.6	0.055 \pm 0.0046	0.41
ヒト血清	21.0 \pm 1.4	0.029 \pm 0.0024	0.14
無血清	20.5 \pm 1.6	N.D.	

表 3.

フィーダー細胞から混入されることが懸念されている物質の一つに、シアル酸の一種である N-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) がある。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¹⁾。2005 年 Martin ら²⁾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。

有効性や安全性への影響を評価するにあたって、まず、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、1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB) 誘導体化と LC/蛍光検出法 (FD) を組み合わせた方法がよく用いられている³⁾。DMB 誘導体化と LC/FD 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確認することができる⁴⁾。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る。

我々は、nanoLC/フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析法(FTMS)及びnanoLC/MS/MSを導入することによって、0.026-50 pmolのNeuGcを定量することに成功した。図1はDMB化NeuAcとDMB化NeuGcのマスキロマトグラムである。本分析法を用いて、10% ウシ胎児血清(FCS)及びヒト血清を含む培地で培養したモデル細胞ヒト骨髄性白血病細胞株HL-60の膜画分由来シアル酸を分析した結果(注入量:細胞 2.5×10^3 個)、それぞれNeuAcの0.4%及び0.1%がNeuGcに置き換わっていることが明らかとなった(表3)。また無血清培地で培養したHL-60細胞中のNeuGcは検出限界(8.6 fmol)以下であった。これは、ヒト血清にはすでにNeuGcが含まれていることを示唆しており、今回得られた結果は、今後NeuGcの有効性・安全性評価、並びに最終製品における規格値設定の必要性を検討する上で、参考になるものと思われる。

2. 細胞の同一性試験

細胞の同一性試験は、製造工程における培養条件の一定性、並びに最終製品の表現型、遺伝型、機能特性及び細胞活性の安定性確認を目的として設定するものである。現在、形態やマルチカラー蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションなどの染色体解析が実施されているが、研究レベルでは、マイクロアレイやプロテオミクスなどを基本とした試験法の実行可能性評価も行われている。糖鎖は、培養条件によって変化することが経験的に知られていることから、糖鎖プロファイルが製造工程や最終製品における細胞の同一性指標としてエピジェネティックな表現型の変化も含めて利用できる可能性は高い。我々は、細胞同一性試験法としての糖鎖解析の応用可能性を評価する目的で、HL-60細胞を用いて、培養条件の変化が細胞の糖鎖プロファイルに及ぼす影響を調べた。

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、NaBH₄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~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~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前駆イオンとして行った。図2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2中に示すように推定された。

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3A及び3B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3C及び3D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3E及び3F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。無血清培地ではbisected 2本鎖糖鎖が著しく増加していることが明らかとなった。

今回用いた無血清培地では、細胞の増殖能が低下していたことから、細胞は同一性を失っていたものと判断される。糖鎖プロファイルが全く異なっていたという今回の結果は、糖鎖プロファイリングが細胞の同一性評価法として応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、細胞治療薬の安定供給を目指して、様々な研究機関で、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、細胞の同一性試験だけでなく、最適培養条件のスクリーニングなどにも利用できるかもしれない。また、プロテオグリカンや糖脂質分子等についても、同一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。

3. 細胞純度試験

細胞純度試験は、細胞が期待した特性を有しているか、胎児性細胞への後退、もしくはがん化など望ましくない方向に向かった細胞が混在していないかを評価する試験で、現在は、細胞形態、細胞に特徴的な膜抗原(CD分類)や、細胞が産生する酵素・ケモカイン等の発現解析が中心となっている。糖鎖関連分子としては、SSEA-3、SSEA-4及びCD34のように、すでに優れた細胞表面分化マーカーとして利用され

ている分子も存在するが、臨床の場で多くの糖鎖関連分子が腫瘍マーカーとして利用されていることを考えると、糖鎖関連分子を細胞純度の指標とした評価法の有用性はより一層増してくると思われる。

ある構造を持つ糖鎖分子の検出には、その構造を特異的に認識する抗体が有用であるが、抗体が入手できないときなど、多段階質量分析(MSⁿ)が糖鎖の特異的検出法として役立つ場合がある。糖鎖のMSⁿでは、例えば、硫酸基 (m/z 80)、Lewis a及びx (Le^a, La^x, m/z 512)、Sialyl Lewis a及びx (m/z 803)、HNK-1 (m/z 622)、ジシアル酸 (m/z 583)のように、糖鎖構造に特徴的なイオン(診断イオン)が生じることがある。これらの診断イオンを利用すると、全糖鎖のプロファイルの中から、関心のある糖鎖構造をもつ糖鎖のマスペクトルだけを選び出すことができる。

図4に、マウス腎臓由来のN結合型糖鎖の中からLe^a部分構造を持つ糖鎖を選び出した例を示す。糖鎖を2-アミノピリジンで誘導体化した後、

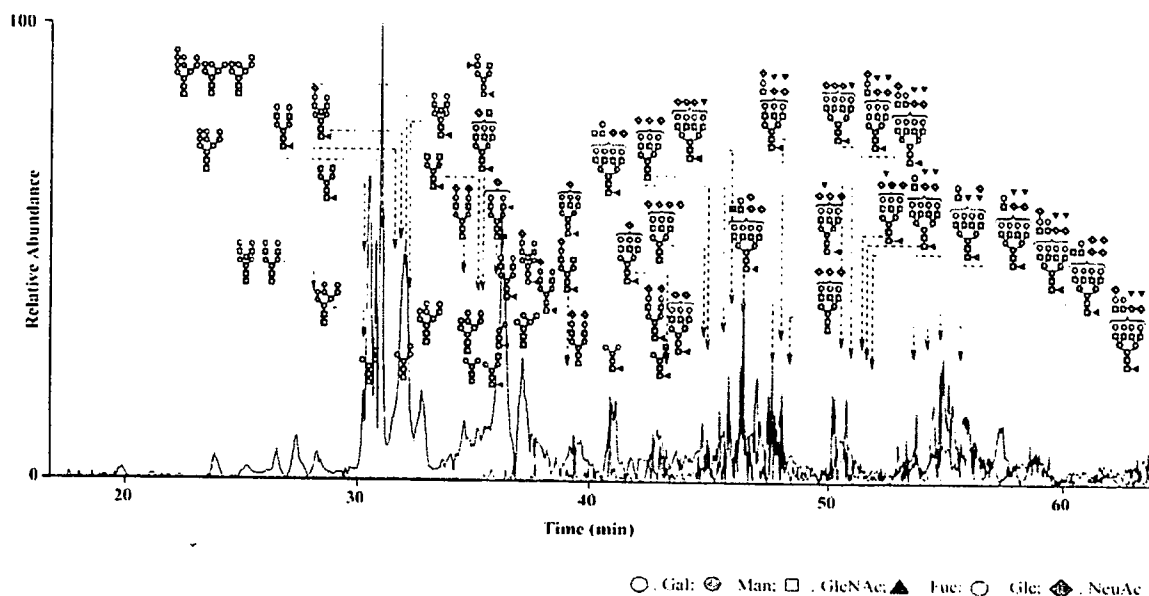


図2 10% FCS添加培地で培養したHL-60細胞由来N結合型糖鎖のプロファイリング
 ポジティブイオンモード(青)、及びネガティブイオンモード(赤) FTMSにより得られたTIC、並びに糖鎖推定構造。
 MS: 装置、LTQ-FT; LC: カラム、グラファイトカーボンカラム (5 μ , 0.1 \times 150mm); A溶媒、2% アセトニトリル / 5 mM 酢酸アンモニウム (pH 9.6); B溶媒、80% アセトニトリル / 5 mM 酢酸アンモニウム (pH 9.6); グラジエント条件、10-40% B (0-60 min) 及び40-70% B (60-70 min)。

LC/MSで全糖鎖のプロファイリングを行った(図4A)。主な糖鎖分子イオンに対してデータ依存的MS/MSを行い、生じたプロダクトイオンの中から、Le^xの構成3糖のナトリウム付加体(m/z 534)に相当するイオンを抜き出した(図4B)。つぎに、 m/z 534のイオンを前駆イオンとしてMS/MS/MSを行い、生成物の中から構成2糖のナトリウム付加体(m/z 388)に相当するイオンを選び出し(図4C)、さらにMS/MS/MS/MSを行った。図4Dは、MS/MS/MS/MSで生じたLe^xに特徴的な環開裂イオンを抜き出したものである。環開裂を生じた糖鎖のマスペクトルを詳細に解析することによって、腎臓中のLe^xの構造を明らかにすることができた²⁾。この方法を糖ペプチドに応用すれば、Le^xを持つ複数のタンパク質を同定することも可能である。

4. 細胞由来生理活性物質及び細胞由来目的外生理活性物質試験

細胞治療薬から分泌される特定の生理活性物質(例えば、いくつかの製品ではケモカインや増殖因子がその有効性に関わることが明らかになりつつある)が、当該細胞治療薬の効能または効能の本質である場合には、その目的生理活性物質の定量及び特性解析が求められる。目的物質が糖タンパク質である場合は、糖鎖を含む構造特性解析が必要になる。我々は、細胞治療薬が発現する生理活性物質の効率的な構造特性解析法として、電気泳動によるタンパク質の分離とLC/MSによる構造特性解析を検討してきた。

図5は、ラット脳のGPIアンカー型タンパク質の一つを解析した例である。ラット脳膜画分からPIPLC処理によってGPI結合タンパク質を切り出し、SDS-PAGEで分離した(図5A)。はじめに、プロテオミクスの手法で、20-25kDaのバンドに含まれるタンパク質をThy-1と同定した(図5B)。Thy-1は分子内に3箇所のN結合

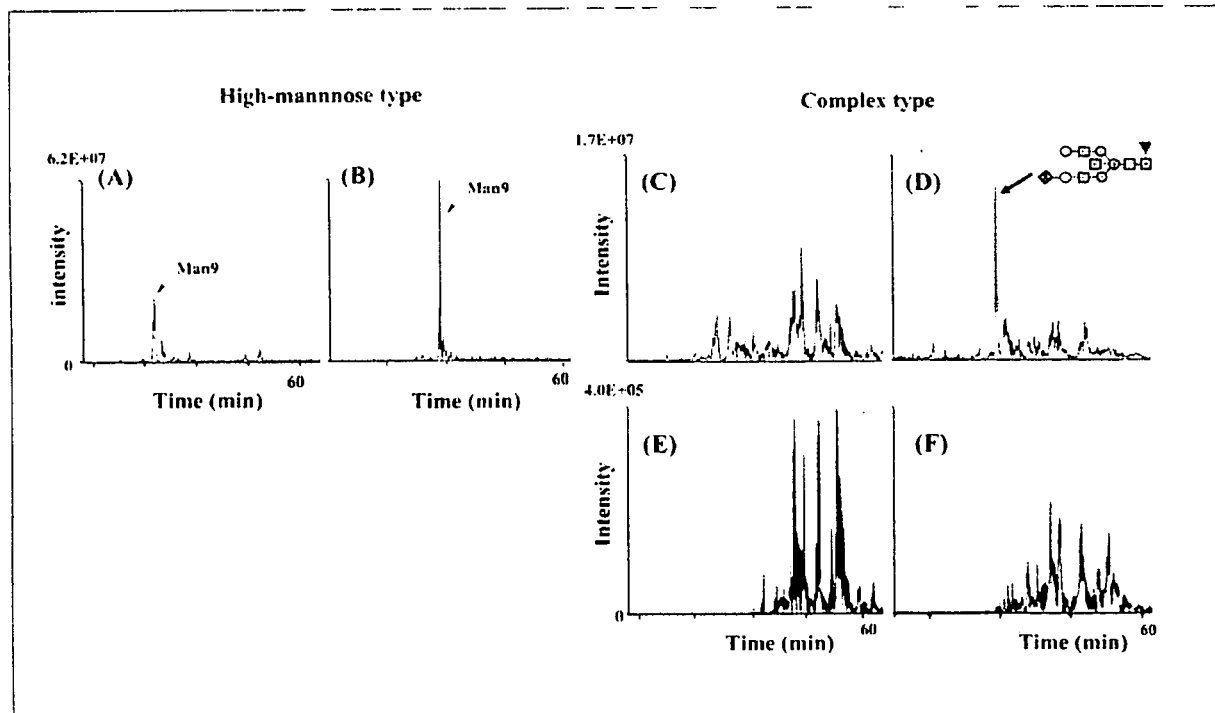


図3. ヒト血清添加培地及び無血清培地で培養したHL-60細胞由来N結合型糖鎖のプロファイリング (A)及び(B)、ポジティブイオンモードで得られた高マンノース型糖鎖のプロファイル; (C)及び(D)、ポジティブイオンモードで得られた複合型糖鎖のプロファイル; (E)及び(F)、ネガティブイオンモードで得られた複合型糖鎖のプロファイル

型糖鎖結合部位をもつ糖タンパク質である。つぎに、ゲル内 *N*グリカナーゼ消化により *N*結合型糖鎖を遊離させ、LC/MS~MS/MS/MS/MS によって Thy-1 に結合している *N*結合型糖鎖を解析した(図5C)。さらに、ゲルから糖タンパク質を抽出した後、トリプシン消化によってペプチド断片とし、LC/MS~MS/MS/MS/MS を用いた部位特異的糖鎖構造解析を行った(図5D)。得られた全マススペクトルの中から糖鎖診断イオン(*m/z* 204, 292, 及び 366 等)を使って糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを選び出し、Thy-1 の部位特異的糖鎖構造を図6のように推定した¹⁾。この手法は、複数の糖タンパク質の混合物に対しても応用が可能であり、糖タンパク質ごとの部位特異的糖鎖構造の概略を明らかにすることができる。また、現在この方法は、糖鎖基礎研究としての微量糖タンパク質の構造特性解析にも利用されている。

おわりに

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、品質試験法としてのLC/MSの応用可能性について示した。BSE問題等に絡む製法変更やバイオ後続品開発が活発に行われている現在、糖鎖構造の変化に着目した製造工程や最終製品の評価は、細胞治療薬だけでなく、バイオ医薬品全般に適用可能な評価手法として再認識されている。バイオ医薬品 細胞治療薬の開発段階から承認審査に至る創薬全般において、糖鎖構造解析技術の開発、糖鎖の機能の解明、及び糖鎖分子マーカー探索研究に対する期待は大きい。

謝辞

シアル酸分析は国立成育医療センター研究所 梅澤明弘部長、片桐洋子室長、並びに豊田雅士博士との共同研究です。本研究は、厚生労働科学研究費補助金ゲノム再生医療研究事業、及びヒューマンサイエンス政策創薬総合研究事業の

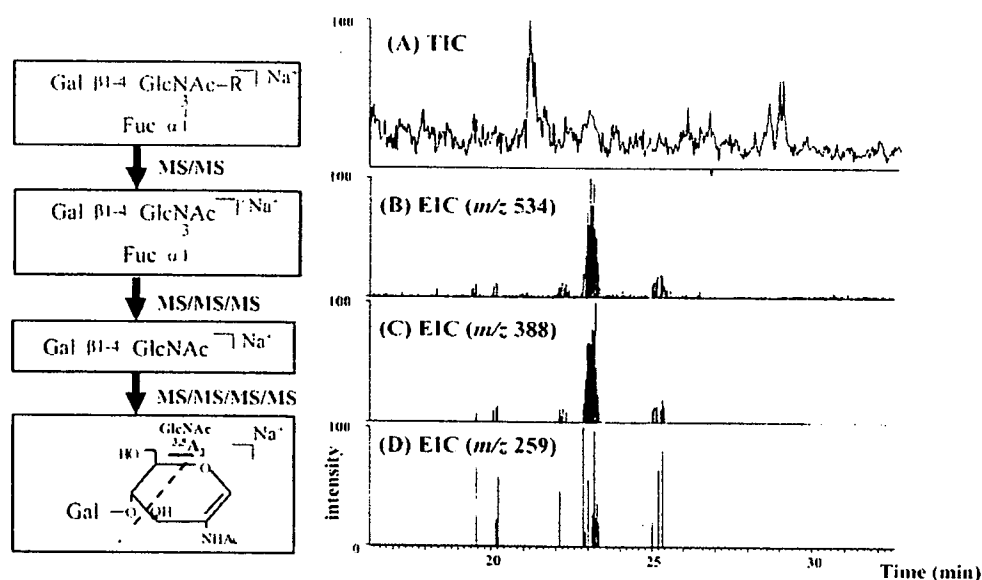


図4 LC/MS/MS/MSによるマウス腎臓由来 *N*結合型 *Le^x* 糖鎖の特異的検出 (A) TIC; (B) MS/MSで得られた *m/z* 534 のマスクロマトグラム; (C) MS/MS/MSで得られた *m/z* 388 のマスクロマトグラム; (D) MS/MS/MS/MSで得られた環開裂フラグメントイオン *m/z* 259 のマスクロマトグラム

一環として行われました。本研究を支援してくださいました(財)ヒューマンサイエンス振興財団、キリンビール(株)、中外製薬(株)、(財)化学及び血清療法研究所、アステラス製薬(株)、大日本住友製薬(株)、協和発酵工業(株)、及び厚生労働省に感謝します。

引用文献

- 1 Higashi, H., Naiki, M., Matuo, S., and Okouchi, K. Antigen of "serum sickness" type of heterophile antibodies in human sera: identification as gangliosides with N-glycolylneuraminic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 79, 388-95, 1977.
2. Martin, M.J., Muotri, A., Gage, F., and Varki, A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat*

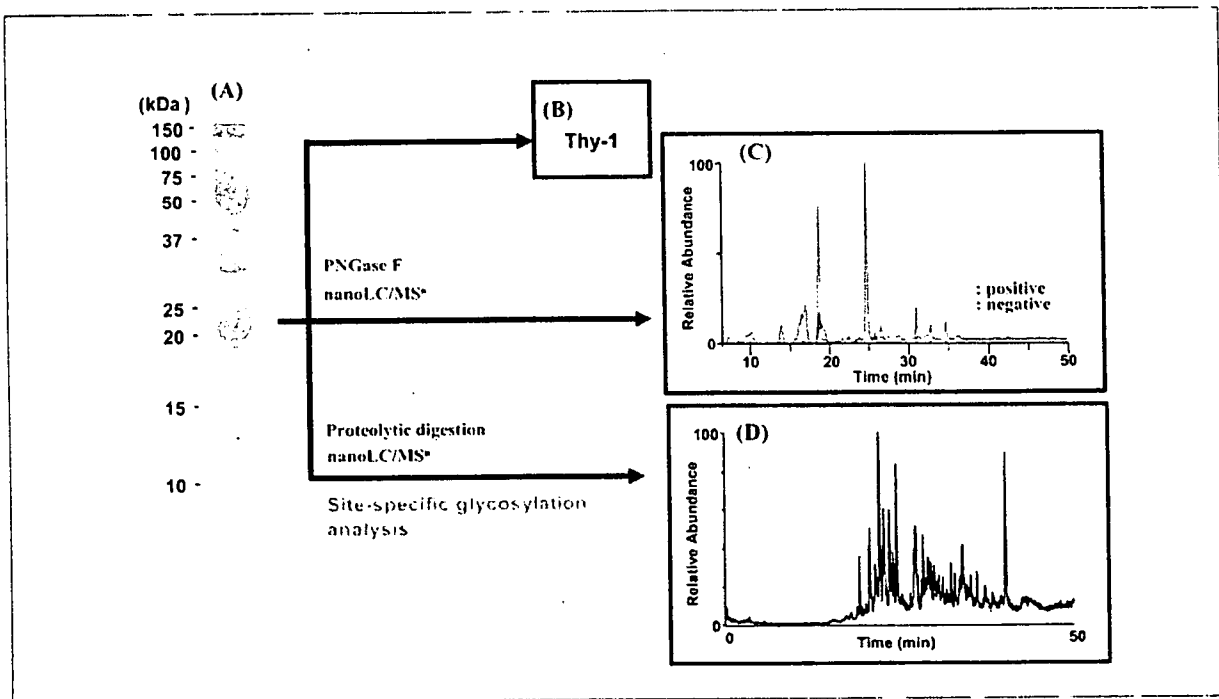


図5. マウス脳由来 GPI 結合タンパク質の構造特性解析
(A) SDS-PAGE; (B) タンパク質同定; (C) 糖鎖プロファイリング; (D) 部位特異的糖鎖構造解析

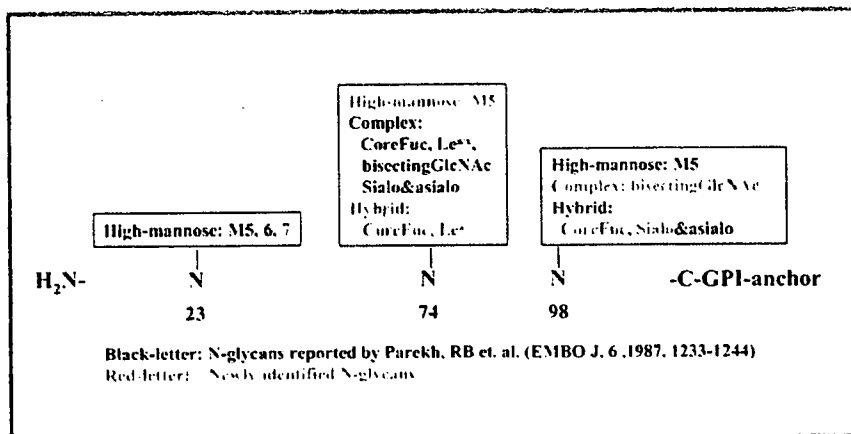


図6. Thy-1 の部位特異的糖鎖構造

- Med 11, 228-32, 2005.
3. Bardor, M., Nguyen, D.H., Diaz, S., and Varki, A. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. *J Biol Chem* 280, 4228-37, 2005.
 4. Klein, A., Diaz, S., Ferreira, I., Lamblin, G., Roussel, P., and Manzi, A.E. New sialic acids from biological sources identified by a comprehensive and sensitive approach: liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) of SIA quinoxalinones. *Glycobiology* 7, 421-32, 1997.
 5. Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Harazono, A., Matsuishi, Y., Hayakawa, T., and Kawanishi, T. Specific detection of Lewis x-carbohydrates in biological samples using liquid chromatography/multiple-stage tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19, 3315-21, 2005.
 6. Itoh, S., Kawasaki, N., Harazono, A., Hashii, N., Matsuishi, Y., Kawanishi, T., and Hayakawa, T. Characterization of a gel-separated unknown glycoprotein by liquid chromatography/multistage tandem mass spectrometry: analysis of rat brain Thy-1 separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Chromatogr A* 1094, 105-17, 2005.

Profile

川崎ナナ

北海道大学薬学部伴義雄教授の下で有機化学を学び、修士課程修了後、厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部に入所。1998年から生物薬品部室長。医薬品医療機器総合機構のJAN（医薬品一般名称）専門員及び日本薬局方名称委員及び生物薬品委員を務める。研究テーマはバイオ医薬品及び細胞治療薬の特性解析及び品質・安全性評価技術の開発。現在の目標は医薬品の糖鎖試験法を整備すること。

山口照英

神戸大学理学部大学院（細胞生化学）修了。東京都臨床医学総合研究所で白血球活性酸素生成酵素の生化学に関する研究に従事し、その後国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部でバイオ医薬品の品質・安全性等に関する研究を行う。2002年から遺伝子細胞医薬部長として、遺伝子治療薬や細胞治療薬の品質・有効性に関する基盤研究を実施。2006年から生物薬品部長としてバイオ医薬品の品質・安全性等に関する研究を行っている。



薬の名前

ステムを知れば薬がわかる

Stems used in drug names : For the better understanding of pharmacological actions of drugs

第7回

国立医薬品食品衛生研究所

川崎ナナ, 内田恵理子

NANA KAWASAKI, ERIKO UCHIDA

National Institute of Health Sciences

名古屋市立大学大学院薬学研究科

宮田直樹

NAOKI MIYATA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

はじめに

本連載第6回(本誌2007年1月号)では、化学薬品類のステムの中で、中枢神経系に作用する薬のステム、

「-ampanel」：アミノヒドロキシメチルイソキサゾールプロピオン酸(AMPA)受容体拮抗薬

「-fylline(-phylline)」：N-メチルキサントシン系中枢神経興奮薬

「-racetam」：ピラセタム系脳機能改善薬

「-piprazole」：フェニルピペラジン系向精神薬

「-azepam」：ジアゼパム系抗不安薬・鎮静薬

「-azenil, -carnil, -quinil」：ベンゾジアゼピン受容体作用薬

「-bamate」：プロバンジオールおよびペンタンジオール系精神安定薬

「-perone」：4'-フルオロ-4-ピペリジノブチロフェノン系精神安定薬

「-peridol」：ハロペリドール系抗精神病薬

「-peridone」：リスベリドン系抗精神病薬

「-pidem」：ゾルピデム系催眠鎮静薬

「-pride」：スルピリド系抗不安薬・鎮静薬

「-spirone」：Buspirone系抗不安薬

「-zafone」：Alozafone系抗不安薬

を紹介した。

今回は、生物薬品類のステムの第2回目として、免疫機能を調節する薬のステム、

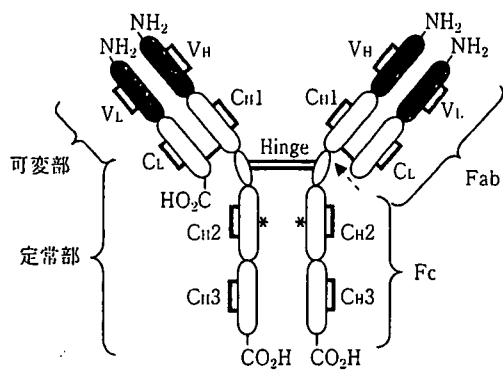
「-mab」：モノクローナル抗体

「-cept」：受容体分子

を紹介する。

「-mab」：モノクローナル抗体

「-mab」は、モノクローナル抗体(monoclonal antibody)を表すステムである。モノクローナル抗体とは、一種類の抗原決定基とだけ反応する免疫グロブリンで、一次構造が均一である。免疫グロブリンは作用と構造から、IgG, IgM, IgA, IgD, およびIgEの5つのクラスに分類される。ヒトのIgGはさらにIgG1, IgG2, IgG3, およびIgG4の4つのサブクラスに分けられる。モノクローナル抗体を本質とする医薬品は抗体医薬品と呼ばれ、その多くはIgG1である。



—:ジスルフィド結合, *:N-結合型糖鎖, ←:パバイン作用部位

図1 IgG1の構造

5つのクラスの基本構造は共通である。図1にIgG1の基本構造を示す。IgG1は2本のH鎖(Heavy chain)と2本のL鎖(Light chain)の計4本のポリペプチド鎖から構成される。H鎖とL鎖の分子量はそれぞれ約50,000と約25,000で、抗体1分子には合計16本のジスルフィド結合が存在する。H鎖とL鎖ともにN末端から約110番目までのアミノ酸残基部分(図1のVLおよびVH部分)は、抗原特異性を決定する部分で、可変部と呼ばれる。可変部の中でも一次構造に特に著しい多様性が見られ、抗原分子と相補的な立体構造を形成して抗体の特性を決める部分は、相補性決定部(complementarity-determining region, CDR)と呼ばれる。CDRの立体構造保持に働く枠組み領域はフレームワーク部と呼ばれ、両者はモザイク状に配置している。H鎖とL鎖の残りの部分(図1のCL, CH1, CH2, およびCH3部分)は抗原特異性とは無関係に一定しているので、定常部と呼ばれる。IgG1にパバインを作用させると、H鎖のほぼ中央にあたる225と226番目のアミノ酸残基の間が切断される。L鎖とH鎖の可変部を含むN末端半分をFab、また、H鎖の定常部からなるC末端半分をFcと呼ぶ。

モノクローナル抗体は、従来は主にマウスなどの異種動物を用いて、免疫グロブリンを産生するB細胞と増殖能力を持つ腫瘍細胞の細胞融合技術によって製造されていた。しかし、現在医薬品として用いられるモノクローナル抗体は、遺伝子組換え技術によってCHO細胞などを用いて製造されている。特に最近では、異種で作製した

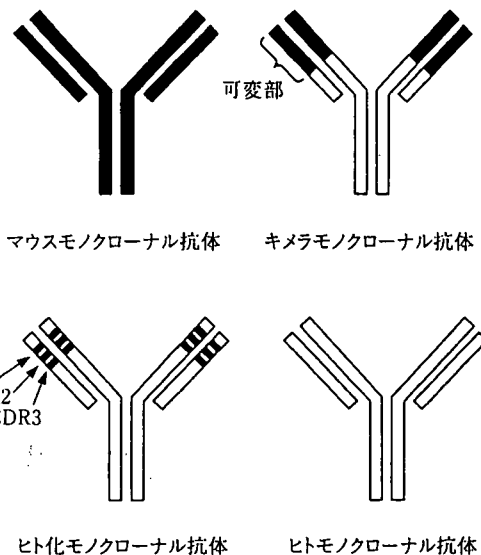


図2 モノクローナル抗体の構造

モノクローナル抗体の免疫原性を低減し、よりヒト抗体に近づけるため、ヒト抗体と異種抗体を融合したモノクローナル抗体の開発が活発である。モノクローナル抗体は種によって、異種モノクローナル抗体(主にマウスモノクローナル抗体)、キメラモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、およびヒトモノクローナル抗体の4つの型に分類される(図2)。キメラモノクローナル抗体は異種モノクローナル抗体の可変部とヒト抗体の定常部を融合した分子である。ヒト化モノクローナル抗体はヒト抗体のCDRのみを異種モノクローナル抗体のCDRと置き換えたモノクローナル抗体である。しかし、これらは異種抗体断片を含むため、HACA(human anti-chimeric antibody)やHAHA(human anti-human antibody)反応が引き起こされる。そこで、すべての領域がヒト型から構成される完全ヒトモノクローナル抗体の開発も進められている。ヒトモノクローナル抗体は、ファージディスプレイ法やトランスジェニック法によって製造されている。

抗体医薬品は、抗原との結合による抗原の直接的な機能阻害作用だけでなく、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性や補体依存性細胞傷害(CDC)活性を持つ。現在、抗がん剤、感染症治療薬、抗血栓剤などの循環器用薬、免疫抑制剤、自己免疫疾患治療薬(クローン病)、慢性関節リウマチ治療薬、抗アレルギー剤、抗炎症剤、血管形成異常に対する治療薬として上市あるいは開発されている。抗体医薬品の売り上げは年間1,000億円ともいわれ、今

表1 構造遺伝子の種によって分類されるサブシステム

	ヒト
	マウス
	ラット
	ハムスター
	霊長類
	キメラ
	ヒト化
	ラット・マウスハイブリッド

表2 対象疾患および標的的部位によって分類されるサブシステム

	バクテリア
	骨
	心血管
	炎症性病変
	免疫調節
	ウイルス

* 暫定サブシステム

表3 腫瘍の種類によって分類されるサブシステム

	大腸がん
	精巣がん
	卵巣がん
	乳がん
	黒色腫
	前立腺がん
	その他腫瘍全体

後その数は増大すると予想されている。

モノクローナル抗体のステム「-mab」は、構造遺伝子の由来(種)によってサブシステムに分類される(表1)。さらに、対象疾患や標的的部位、または対象とする腫瘍の種類によってもサブシステムがつけられる(表2, 表3)。

放射性ラベル化合物や合成化合物が共有結合したモノクローナル抗体には、抗体名の後にその化合物の名前をつける。モノクローナル抗体を放射性同位体のキャリアとして用いる場合は、放射性同位体のINNを抗体名の前につける(例, Technetium (^{99m}Tc) Pintumomab)。また、毒素(toxin)を共有結合したモノクローナル抗体には、「-toxa-」をつける。

(1)「-omab」: マウスモノクローナル抗体

「-omab」は、マウスモノクローナル抗体(mouse monoclonal antibody)を示す。JANにはIbunitumomab Tiuxetan(イブリツモマブ チウキセタン)が収載されている(図3)。イブリツモマブはB細胞性の悪性リンパ腫に多く発現しているCD20を認識するIgG1で、腫瘍を標的とすることを示すサブシステム「-tu(m)-」を持つ。金属キレート剤であるチウキセタンが共有結合したイブリツモマブ チウキセタンは、放射性同位元素と組み合わせることによって、CD20を認識し、B細胞を死滅させる。イブリツモマブ チウキセタンはCD20陽性のB細胞性非ホジキンリンパ腫治療薬として2002年に米国で承認されている。日本では希少疾病用医薬品等指定品目の1つとなっている。

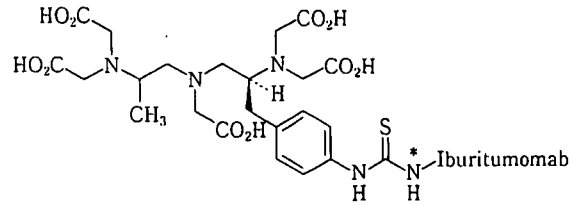


図3 Ibunitumomab Tiuxetan(イブリツモマブ チウキセタン)の構造(日本承認申請中)

他に「-omab」をサブシステムに持つ品目として41種類の抗体がINNに収載されている。

(2)「-ximab」: キメラモノクローナル抗体

「-ximab」は、キメラモノクローナル抗体(chimeric monoclonal antibody)を示す。現在、日本で承認されている医薬品には、以下の3品目がある。

Basiliximab (Genetical Recombination) (バシリキシマブ(遺伝子組換え))

Infliximab (Genetical Recombination) (インフリキシマブ(遺伝子組換え))

Rituximab (Genetical Recombination) (リツキシマブ(遺伝子組換え))

バシリキシマブは活性化T細胞表面のインターロイキン(IL)-2受容体 α 鎖(CD25)を標的とするIgG1で、IL-2によって誘導されるリンパ球の分化・増殖を抑制する。腎移植後の急性拒絶反応抑制薬として2002年に承認された。免疫機能調節薬を示すサブシステム「-li-」を持つ。

インフリキシマブは腫瘍壊死因子(TNF- α , Tumor necrosis factor- α , 本稿で紹介するステム48(1)「TNF- α 阻害薬」を参照)を標的とするIgG1で、クローン病治療薬として利用されている(2002年承認)。また、現在、ベーチェット病による難治性網膜ぶどう膜炎治療薬として希少疾病用医薬品の指定を受けている。免疫機能調節薬を示すサブシステム「-li-」を持つ。

リツキシマブはCD20を標的分子とするIgG1で、2001年にCD20陽性のB細胞性非ホジキンリンパ腫の治療薬として承認された。腫瘍を標的とすることを示すサブシステム「-tu-」がつけられている。

これ以外にJANに収載されている医薬品として以下の品目がある。

Abciximab (Genetical Recombination) (アブキシマブ(遺伝子組換え))

Cetuximab (Genetical Recombination) (セツキシマブ)

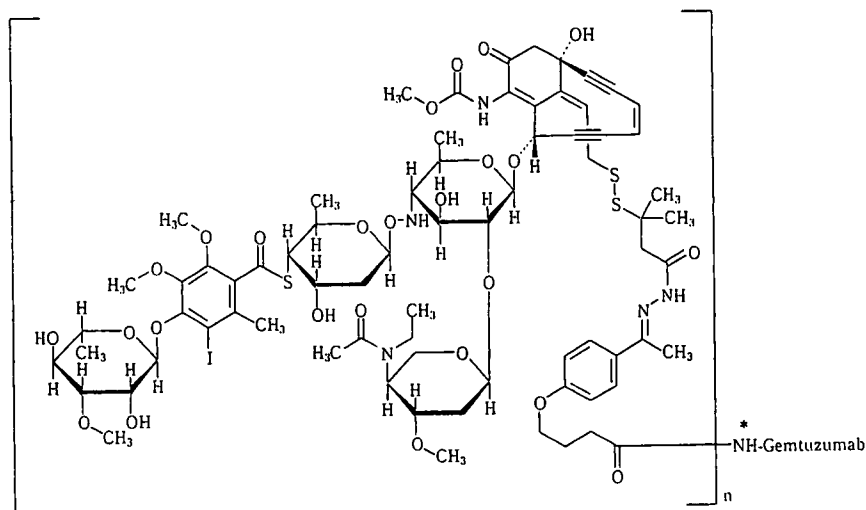


図4 Gemtuzumab Ozogamicin(ゲムツマブ オゾガマイシン)の構造(2005年日本承認)

(遺伝子組換え)

アブキシマブは血小板膜に発現するインテグリン $\alpha 2 \beta 3$ を認識するIgG1で、Fab部分のみからなる。米国では1994年に経皮的冠動脈形成術後の再狭窄治療薬として承認されている。サブステム「-ci-」は心臓血管を標的とすることを意味する。

セツキシマブはEGF受容体を認識するIgG1で、米国では大腸がん治療薬として2004年に承認された。腫瘍を標的とするサブステム「-tu-」を持つ。

2006年6月現在、INNにはこれらの品目を含む15品目が収載されている。

(3) 「-zumab」：ヒト化モノクローナル抗体

「-zumab」は、ヒト化モノクローナル抗体(humanized monoclonal antibody)を示す。現在、日本で承認されている医薬品には、以下の4品目がある。

Gemtuzumab Ozogamicin(Genetical Recombination)
(ゲムツマブ オゾガマイシン(遺伝子組換え))

Palivizumab(Genetical Recombination)(パリーブィズマブ(遺伝子組換え))

Tocilizumab(Genetical Recombination)(トシリズマブ(遺伝子組換え))

Trastuzumab(Genetical Recombination)(トラスツマブ(遺伝子組換え))

ゲムツマブは急性骨髄性白血病細胞の細胞表面抗原CD33を認識するIgG4で、腫瘍を標的とする抗体を示すサブステム「-tu-」を持つ。図4にゲムツマブのリジン残基にオゾガマイシンがアミド結合したゲムツマブ

オゾガマイシンの構造を示す。この医薬品は、白血病細胞のCD33に結合して細胞内に取り込まれると、リソソーム内で分解されてオゾガマイシンを遊離し、細胞を傷害する。ゲムツマブ オゾガマイシンは再発または難治性のCD33陽性の急性骨髄性白血病治療薬として2005年に承認された。

パリーブィズマブはRSウイルス(respiratory syncytial virus)Fタンパク質を認識するIgG1で、小児RSウイルス感染治療薬として2002年に承認された。サブステム「-vi-」はウイルスを標的としていることを示す。

トシリズマブはIL-6受容体を認識するIgG1で、2005年、わが国において世界に先駆けてキャッスルマン病治療薬として承認された。キャッスルマン病は腫瘍リンパ節から大量のIL-6が産生されるリンパ増殖性疾患で、症状および病態にIL-6が関わっている。トシリズマブはIL-6とその受容体の結合を競合的に阻害する。免疫機能調節作用を示すサブステム「-li-」を持つ。関節リウマチ治療薬としての承認申請に向けて、臨床第Ⅲ相試験が実施されている。

トラスツマブは乳がん過剰発現するHER2を認識するIgG1で、HER2陽性転移性乳がん治療薬として2001年に承認された。HER2に結合してシグナルが細胞内に伝わるのを阻害するとともに、免疫細胞を呼び寄せがん細胞を破壊する。腫瘍を標的とすることを示すサブシステム「-tu-」を持つ。

「-zumab」を持つ他の品目としてJANには以下の2品目が収載されている。

Omalizumab(Genetical Recombination)(オマリズマブ)

ブ(遺伝子組換え))

Bevacizumab(Genetical Recombination)(ベバシズマブ(遺伝子組換え))

オマリズマブはヒトIgEモノクローナル抗体を認識するIgG1で、米国では2003年にぜんそく治療薬として承認されている。免疫機能調節作用を示すサブシステム「-li-」を持つ。本邦では承認申請中である。

ベバシズマブはVEGFを認識するIgG1で、米国では大腸がん治療薬として2004年に承認されている。作用部位が心臓血管系であることを示すサブシステム「-ci-」を持つ。日本では承認申請中である。

2006年6月現在、INNにはこれらの品目を含む47品目が収載されている。この数は今後さらに増大することが予想される。

(4)「-umab」：ヒトモノクローナル抗体

「-umab」は、ヒトモノクローナル抗体(human monoclonal antibody)を示す。JANには以下の2品目が収載されている。

Adalimumab(Genetical Recombination)(アダリムマブ(遺伝子組換え))

Regavirumab(レガビルマブ)

アダリムマブはTNF- α を認識するIgG1で、免疫機能調節作用を示す「-li(m)-」を持つ。クローン病および慢性リウマチ治療薬として2003年に米国で承認されている。わが国ではインフリキシマブおよびエタネルセプト(後述)に続く第3のTNF- α 阻害薬として承認申請中である。

レガビルマブはヒトヘルペスウイルスを認識するIgG1で、ウイルスに作用することを示す「-vi(r)-」を持つ。免疫低下時におけるサイトメガロウイルス感染症、悪性腫瘍、後天性免疫不全症候群等を対象とした希少疾病用医薬品等指定品目であったが、現在では取り消されている。

他に「-umab」をサブシステムに持つ品目として29種類の抗体がINNに収載されている。

「-cept」：受容体分子

「-cept」は、受容体分子(receptor molecule)に共通のステムである。受容体のターゲット分子を示す文字を「-cept」の前に挿入する。

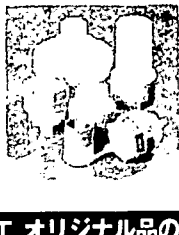
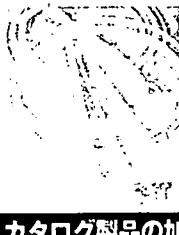


PFA 専門メーカー・サビレックス

あらゆるニーズにお応えします。

テフロン・PFA製品シリーズ

サビレックス製品は耐熱性に優れ、耐薬品性と高品質、使い易いデザイン、豊富な製品群により、研究者・技術者の方々のニーズに必ずお応え致します。



カタログ製品の加工、オリジナル品の製作にも、小ロットより対応致します。

詳しくは下記へお問い合わせ下さい。

サビレックス製品日本総代理店

INOX 東栄株式会社

本 社 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町1-2-6 共同ビル本町

TEL.03-5205-2861 FAX.03-5205-2862

大阪営業所 TEL.06(6908)4880 FAX.06-6906-1285

札幌営業所 TEL.011(709)0101 FAX.011-709-0033

ホームページ: www.labinox.co.jp メールでのお問い合わせは: webmaster@labinox.co.jp

DM資料請求カードNo.4