

が共通してガングリオシドGM2を高発現していることが明らかとなった。スタンダードとしたガングリオシドマーカーとの比較により、神経芽腫細胞株は主にガングリオa系列およびb系列のガングリオシドを生合成していることが考えられる。また、HPTLC上でGD1aとGD2の間に分離される糖脂質の発現が細胞株によって大きく異なっていることが明らかとなった。各バンドの濃さをデンストメトリーによって数値化した判定量的な解析では、相対的にGD1aの発現が高い群とGD2の発現が高い群の存在が示唆された。

LC-MS/MSによって細胞から抽出した糖脂質の構造解析および検出されたイオン強度の定量的解析を行った。主な2種類のセラミド（検出された質量電化比は $m/z=535.6$ と 646.6 ）それぞれについて検出された各ガングリオシド成分の発現量を総ガングリオシド量に対する割合を計算した。

神経芽腫で過去に発現が明らかにされていたガングリオ系のガングリオシドのみではなく、ネオラクト系のガングリオシド、すなわち、シアリルパラグロボシド、さらにHexNAc、Hexを伸長する構造のガングリオシドも発現していることが明らかとなった。従来は、HPTLCによる化学染色による解析が主であり、ネオラクト系統脂質を同定するには感度が不十分であったと考えられ、LC-MS/MS解析によってHPTLC解析に比較して微量のサンプルで、より高感度に構造情報と相対量の2つの情報を同時に得ることが可能であることが示された。

ガングリオシドの中にはアセチル化し

たシアル酸を有するものも存在した。GD1a, GD3, GD2, GD1b, GT1bでアセチル化が検出され、特にGD2はアセチル化が強く、NB1とNB16ではその割合が全ガングリオシドの10%以上を占めていた。ガングリオシドのアセチル化は、そのレクチンやシグナル分子との結合能を抑制するなど細胞の機能に何らかの影響を与えていることが報告されている。例えば、シグレック-1（シアロアドヘジン）やシグレック-2（CD22）はそれぞれ複合糖質上の $\alpha 2, 3-$ 、 $\alpha 2, 6-$ 結合シアル酸を認識して結合するが、これらの結合は9-O-アセチル化によって妨害される。また、アセチル化したガングリオシドは通常のものよりもアセチル基とアミノ酸残基との相互作用の観点から抗原性が高い可能性もあり、このガングリオシドが神経芽腫において重要な役割を果たしており、新たな腫瘍マーカーとなり得る可能性も考えられる。さらに、他の小児腫瘍由来細胞株の発現糖鎖を解析した結果、そのうちの数株で同様にアセチル化したガングリオシドが発現されていることが明らかとなった。この結果から、ガングリオシドのアセチル化が腫瘍において特徴的な現象である可能性も考えられる。

もう1つ注目すべき点として、GD1a, GD2, AcGD2の割合が細胞株間で大きく異なることが明らかとなった。MYCN非増幅株3株を含むSK-N-SH, SK-N-RA, NB69, GOTO, NB9ではガングリオシドの中に占めるGD1aの割合が高くGD2およびAcGD2の発現が低いのに対し、IMR32, NB1, NB16, CHP126では逆にGD1aの発現低く、GD2およびAcGD2の発現が高かった。一方、CHP134,

KP-N-NSではGD1a, GD2およびAcGD2いずれの発現も高かった。

定量分析の結果からソフトウェアRのHeatmap関数を用いて全糖脂質の割合から細胞株で階層的クラスタリングを行った。結果、細胞株を大きく2つの群に分けることができた。さらに、同定されたガングリオシド全体に占めるGD1a, GD2, AcGD2の割合が細胞株間で大きく異なっていたことから、これら3成分の発現量をヒストグラムで比較し、階層的クラスタリングを試みることで詳細な解析を行った。この結果から糖鎖の発現様式によって神経芽腫細胞株は詳細にみると3群に分類が可能であると考えられる。また、ソフトウェアRのheatmap関数を用いて上述した3成分で階層的クラスタリングを行った結果も同様の分類結果を示した。さらに、同定されたガングリオシド全てを用いた階層的クラスタリングにおいても同様の結果であった。また、A-typeの細胞5株の形態 (Fig. 4-1 A-E) を比較してみると、細長く、線維芽細胞類似の形態を示しており糖脂質の発現様式と細胞の形態との間の関連性が示唆された。

F9細胞の培養方法と糖鎖伸長実験

糖鎖プライマー法を用いた解析に先立ち、糖鎖プライマー自体がF9細胞に与える影響について検討した。未処理、RAおよびdcAMPによる分化誘導4日目のF9細胞に50 μ MでLac-C12、GlcNAc-C12、GalNAc-Thr-C12を投与したが (Fig. 3(a))、3種類すべての糖鎖プライマーにおいて、投与前および投与後24時間の顕微鏡下での観察で細胞の形態に顕著な変化は認め

られなかった。

Dab2はF9細胞をRA処理すると発現が増加するタンパク質として知られているが、今回の検討でも、F9細胞にRAおよびdcAMP添加培養することによってその発現上昇が認められた。これに対して、糖鎖プライマー投与に伴うDab2発現様式の変化は認められなかった。一方、Oct3は胚性幹細胞や未分化なEC細胞に発現する転写因子で幹細胞の未分化性維持に重要と考えられている。未分化F9細胞に対するDMSO投与により、Oct3の軽度の減少が認められたが、糖鎖プライマー投与群では、DMSO投与群とほぼ同様の発現量であった。以上の結果から、F9細胞の分化誘導系において、糖鎖プライマー自体による明らかな影響は認められなかった。

糖鎖プライマーから得られた糖鎖伸長生成物のHPTLC解析をおこなった。未処理、RAおよびdcAMPによる分化誘導4日目のF9細胞にLac-C12とGlcNAc-C12を投与し、培地から得られた脂質成分をHPTLCに展開した。Lac-C12では2つ、GlcNAc-C12では4つの糖鎖伸長生成物が検出された。

次に、糖鎖プライマーから得られた糖鎖伸長生成物のLC-MS/MS解析をおこなった。未処理のF9細胞 (以下F9-0d) と分化誘導処理4日後から糖鎖プライマーを添加したF9細胞 (F9-4d) から得られた糖鎖伸長生成物の構造解析を行った。

Lac-C12を投与した培地から、グロボ系であるGb3Cer・Gb4Cer・Forssman antigen、ガングリオ系であるGM2・GM1a・GD3・GD2、ラクト・ネオラクト系であるLc₃Cerと同様の糖鎖構造と考えられる生成物が得られた。一方、GlcNAc-C12を投与した培地か

ら、ラクト・ネオラクト系糖脂質および糖タンパク質のポリN-アセチルラクトサミン骨格と同様の糖鎖構造と考えられる生成物が得られた。F9細胞をRAによって分化誘導した場合、グロボ系糖脂質の発現が変化することが報告されているため、TLC免疫染色を用いて、F9-0dとF9-4dの内在性糖脂質を解析し、Gb3Cer、Gb4Cer、Forssman antigenの発現を確認した。糖鎖プライマー法によって内在性の糖鎖と同様の構造を有する生成物が得られたことが示唆される。従って、糖鎖プライマー法による解析が内在性糖鎖の生成状況のある程度反映していることが推測された。

得られた糖鎖伸長生成物の中で、特に顕著な量的変化を示すNeuAc-Hex-GlcNAc-C12はラクト・ネオラクト系の糖脂質および糖タンパク質の糖鎖生合成経路から生成されている可能性があり、現在までにF9を分化誘導した場合にこの糖鎖構造に対応した糖脂質あるいは糖タンパク質の発現量が変化するという報告はない。そこで、この生成物の定性、定量的解析をおこなった。GlcNAc-C12にHex一分子とNeuAc一分子が結合した生成物の分子量は842.9であり、LC-MS/MS解析によって、この生成物はネガティブイオンモードでm/z 841.5 ([M-H]⁻)と検出された。HexとGlcNAcが結合していることを示すm/z 366.1、およびNeuAcとHexが結合していることを示すm/z 454.1のシグナルが検出されていることから、GlcNAc-C12にHex一分子とNeuAc一分子が結合した生成物はNeuAc-Hex-GlcNAc-C12と直鎖状につなが

った糖鎖伸長生成物であることが予想された。また、MS/MSのフラグメントパターンの解析から、NeuAc-Hex-GlcNAc-C12の生合成前駆体であるHex-GlcNAc-C12では、GlcNAcの0,2開裂を示すピークが検出されたため、Hex-GlcNAc間の結合はβ1,3ではなく、β1,4であることが示唆された。以上の結果を総合すると、ネガティブイオンモードでm/z 841.5の生成物はネオラクト系構造を有したNeuAc-Hexβ1,4GlcNAc-C12であることが予測された。LC-MSで得られたピーク面積をもとにして定量化を試みた結果、F9-4dではF9-0dと比較してNeuAc-Hex-GlcNAc-C12の量が約8倍に増加していることが示唆された。

得られたNeuAc-Hex-GlcNAc-C12は糖鎖プライマーが糖脂質生合成経路に取り込まれた可能性と、糖タンパク質の糖鎖生合成経路に取り込まれた可能性の2通りが考えられる。糖脂質生合成経路に取り込まれた場合、ネオラクト系糖脂質であるNeuAc α2,3または6 Gal β1,4 GlcNAc β1,3 Gal β1,4 GlcCer (α2,3の場合、シアリルパラグロボシド Sialylparagloboside (SPG)) の非還元末端三糖に相当する。一方、糖タンパク質の糖鎖生合成経路に取り込まれた場合、糖タンパク質ポリN-アセチルラクトサミン構造の非還元末端のNeuAc α2,3または6 Gal β1,4 GlcNAc-Rに相当する。

NeuAc α2,3または6 Gal β1,4 GlcNAc β1,3 Gal β1,4 GlcCerが内在性糖脂質に発現しているか確認するため、F9-0dとF9-4dの内在性糖脂質をLC-MS/MSを用いて解析した。F9に発現する糖脂質の主要

なセラミド (Cer) 構造はネガティブイオンモードでm/z 536.4と検出された。そのCer構造を有し、NeuAc α 2,3または6 Gal β 1,4 GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 GlcCerと同じ糖組成[NeuAc]₁ [Hex]₃ [HexNAc]₁を有する糖脂質 (分子量1518.8) も同じm/zで検出される。F9-0dとF9-4dの内在性糖脂質をLC-MS/MSを用いて解析したところ、この糖組成を有する糖脂質はネガティブイオンモードでm/z 1516.9 ([M-H]⁻)と検出された。

F9-4dのEICスペクトルから、顕著な3つのピークが得られた。3つのピークは、同じ糖組成[NeuAc]₁ [Hex]₃ [HexNAc]₁を有するが、単糖構造 (例えば、GalとGlc) または結合様式 (例えば、 β 1-3と β 1-4) の異なる糖脂質が3つ存在することを示唆していた。[NeuAc]₁ [Hex]₃ [HexNAc]₁の糖組成を有する内在性糖脂質として、NeuAc α 2,3または6 Gal β 1,4 GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 GlcCer以外にGM1a、GM1b、GM1 α が考えられる。ひとつの糖脂質は、MS/MSの結果m/z 1151.8のフラグメントが検出されたことから、LacCerにNeuAcが結合した構造が分子内に存在することが示唆された。このフラグメントはNeuAc α 2,3または6 Gal β 1,4 GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 GlcCer、GM1bおよびGM1 α のMS/MSでは生成し得ないためGM1aであると考えられる。ピーク2と3のMS/MSのフラグメントはほぼ同一であった。このフラグメントから、ピーク2の糖脂質はGM1b・GM1 α あるいは、NeuAc α 2,3または6 Gal β 1,4 GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 GlcCerの可能性が考えられる。

D. 考察

11種類の神経芽腫細胞における糖脂質、および胚性癌腫細胞F9での糖鎖プライマー法による糖鎖伸長生成物を単離して構造解析を行った。内在性の糖脂質の一部に関してはこれまでに報告例があるが、LC-MS/MSによる分析により、これまでに各細胞で報告されていない糖鎖構造の検出も可能であった。また、定量的なデータにより細胞のクラスタリングにも応用できることを示すことができた。この事実は、本年度は、細胞に発現する糖鎖や糖鎖プライマー法による糖鎖伸長生成物を迅速にかつ高感度に検出する手法としてLC-MS/MSの手法を確立した。本手法では、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が示された。

E. 結論

2種類の糖鎖プライマーと11種類の神経芽腫細胞、および胚性癌腫細胞Fを用いて、内在性の糖脂質および糖鎖プライマーによる糖鎖伸長生成物をLC-MS/MSにより解析した。これにより、これまで報告されていない新たな糖鎖の発現を見出すことができた。よって、迅速かつ精度良く、細胞に発現している糖鎖パネルの作成を行うことが可能となった。

F. 健康危惧情報 該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Positive regulation of tumor necrosis factor-alpha by ganglioside GM3 through Akt in mouse melanoma B16 cells,

- Pu Wang, Peixing Wu, Jinghai Zhang, Toshinori Sato, Sadako Yamagata and Tatsuya Yamagata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 356, 438-443 (2007)
2. Ganglioside GD1a negatively regulates matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in mouse FBJ cell lines at the transcriptional level, D. Hu, Z. Man, P. Wang, X. Tan, X Wang, S. Takaku, S. Hyuga, T. Sato, X-S. Yao, S. Yamagata, T. Yamagata, *Connective Tissue Research*, 48, 198-205 (2007)
 3. Selective Precipitation of Salts on the Surface of a Gel State Phosphatidylcholine Membrane, Kazutoshi Iijima, Teruhiko Matsubara, and Toshinori Sato, *Chem Lett.*, 36, 860-861 (2007)
 4. Structural Transition Study of a Fifteen Amino Acid Residue Peptide Induced by GM1, N. Fujitani, H. Shimizu, T. Matsubara, T. Ohta, Y. Komata, N. Muira, T. Sato, and S.-I. Nishimura, *Carbohydr. Res.*, 342, 1895-1903 (2007).
 5. In vitro Gene Delivery by pDNA/Chitosan Complexes Coated with Anionic PEG Derivatives That Have a Sugar Side Chain, M. Hashimoto, Y. Koyama, and T. Sato, *Chem Lett.*, 37, 266-267 (2008).
 6. Glycosylation of dodecyl 2-acetamide-2-deoxy- β -D-glucopyranoside and dodecyl β -D-galactopyranosyl-(1-4)-2-acetamide-2-deoxy- β -D-glucopyranoside as saccharide primers in cells, T. Sato, M. Takashiba, R. Hayashi, X. Zhu, T. Yamagata, *Carbohydr. Res.*, **343**, 831-838 (2008).
 7. Syntheses of oligosaccharides using cell function, Toshinori Sato, Kenichi Hatanaka, Hironobu Hashimoto, Tatsuya Yamagata, *TIGG*, 19, 1-17 (2007)
 8. グライコチップ(糖鎖アレイ)、佐藤 智典、ナノバイオ計測の実際、講談社サイエンティフィック、pp42-51 (2007)
 9. Identification of Oligosaccharide-Recognition Molecules by Phage-Display Technology, M. Matsubara, T. Sato, *Trends In Glycoscience and Glycotechnology*, 19, 133-145(2007)
2. 学会発表
1. pTK/キトサン/ラクトース修飾PEG誘導体三元複合体によるin vivoでの抗腫瘍効果、佐藤 智典、古閑 理恵子、神谷 洋平、小山 義之、松田 修、柳衛 宏宣、遺伝子・デリバリー研究会第7回シンポジウム、2007年5月18日
 2. 糖修飾キトサンを用いたin vitroおよびin vivoでの遺伝子導入と発現機構の解析、近藤洋子、橋本麻由、森本稔、齋本博之、重政好弘、柳衛宏宣、佐藤智典、遺伝子・デリバリー研究会第7回シンポジウム、2007年5月18日
 3. 隠れマルコフモデルによるインフルエンザヘマグルチニン結合性ペプチドの配列パターン解析、山口 大介・島田 亜紀・大西 愛・松原 輝彦・佐藤 智典、第56回 高分子学会年次大会、2007年5月29-31日
 4. インフルエンザウイルス広域感染阻害を目指したペプチドのヘマグルチニンとの相互作用解析、齋藤 智美・松原 輝彦・佐藤 智典、第56回 高分子学会年次大会、2007年5月29-31日
 5. 糖鎖結合性ペプチドとB16細胞との相互作用の解析、山下 美季、野殿 英恵、松原 輝彦、佐藤 智典、第56回 高分子学会年次大会、2007年5月29-31日
 6. 糖鎖クラスターを認識するペプチドの結合解析、松原輝彦・飯島一智・藤谷直樹・清水弘樹・西村紳一郎・佐藤智典、第2回ホスト・ゲスト化学シンポジウム、2007年5月24日-25日(金)

7. タンパク質をカプセル化したキトサン微粒子のアニオン性高分子による被覆化、芥川晃士、佐藤 智典、第 56 回 高分子学会年次大会、2007年5月29-31日
 8. Construction of an oligosaccharide library using cells (38) Synthesis of oligosaccharides by using amino acid-linked saccharide primer, Toshinoti Sato, Lian Xue, Xingyu Zhu, Mai Murakami, Yoshimi Ide, Shuwen He, Mamoru Mizuno, Glycol9, 2007.7/15-20
 9. 糖鎖集合体を認識するペプチドの構造および機能解析、松原輝彦、飯島一智、久保田博之、藤谷直樹、清水弘樹、西村紳一郎、佐藤智典、第 17 回バイオ・高分子シンポジウム、2007年 7 月 30 日
 10. 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー (39) GalNAc-Thr型糖鎖プライマーによる糖鎖伸長反応、佐藤 智典、朱 性宇、カ シューブン、村上 舞、薛 蓮、金子 智典、水野 真盛、第 27 回日本糖質学会年会、2007年8月1日
 11. 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー (40) CE/MSによる糖鎖のハイスループット解析、朱 性宇、佐藤 智典、第 27 回日本糖質学会年会、2007年8月1日
 12. アニオン性高分子で被覆したpDNA/キトサン複合体の作製と遺伝子治療への応用、佐藤 智典、古閑 理恵子、神谷 洋平、楊 志宏、小山 義之、松田 修、柳衛 宏宣、第56回高分子討論会、2007年9月20日
 13. 再構成膜を用いた脂質ラフト中の糖脂質集合体の構造および機能解析、松原 輝彦・飯島 一智・曾我 典弘・佐藤 智典、第56回高分子討論会、2007年9月20日
 14. インフルエンザの感染を阻害する糖鎖ミックペプチドの開発、佐藤 智典、イノベーションジャパン2007、9月13日
 15. 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー(42)糖鎖-アミノ酸型糖鎖プライマーによる糖鎖合成、佐藤 智典、薛 蓮、村上 舞、朱性宇、何 シューブン、生命化学研究会シンポジウム、2008年1月11日
 16. インフルエンザウイルス感染を阻害するヘマグルチニン結合性ペптаペプチドの同定、齋藤 智美・松原 輝彦・佐藤 智典、第 88 回日本化学会年会、2008年3月29日
 17. 隠れマルコフモデルによるインフルエンザヘマグルチニン結合性ペптаデカペプチドの配列パターン解析、山口 大介・島田 亜紀・大西 愛・松原 輝彦・佐藤 智典、第 88 回日本化学会年会、2008年3月29日
- H. 知的財産権の出願・登録情報
1. 特許取得
無し
 2. 実用新案登録
無し
 3. その他
無し

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パネル構築に応用するため、*in vitro*で造血細胞から単球系細胞を分化誘導する培養系構築をした。浮遊系の前単球/単球と接着性のマクロファージの2群が得られ、培養期間を変えることでそれぞれ異なる分化段階の細胞が得られた。これらの細胞から有機溶媒で総脂質を抽出し、LC/MSで発現糖脂質解析を行った。浮遊系の細胞では、ネオラクト系ガングリオシドが特異的に発現していた。接着性の細胞では異なる分化段階でガングリオシド組成に大きな変化が見られ、比較的GD1aの発現が多かった。これまで培養細胞の発現糖脂質の分析では薄層クロマトグラフィーで行われていたため、糖脂質を解析するのに多くの細胞を必要とし、正常細胞のように限られた細胞数しか得られない検体では微量な糖脂質を分析することは困難であった。LC/MSを発現糖脂質解析に使用することで、これまで検出することが難しかった糖脂質の発現を確認することが可能となった。

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、細胞において重要な機能を発揮することが知られ、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、精製・分析が難しく、解析に有用な抗体が少ないことなどから、その構造や機能の詳細については不明な点が多く、医療分野での応用は限られている。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、糖鎖研究を積極的に進めることは重要である。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もしくは高感度解析手段であるLC/MSを使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製し上記細胞のプロファイリングや造血系疾患診断・治療に役立てることを目指す。昨年は、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の構築を行った。本年度はそれら分化誘導系のうち単球分化誘導系を用いて単球の分化過程で発現する糖脂質をLC/MSで解析した。

B. 研究方法

ヒト骨髓由来CD34陽性細胞を10%牛胎児血清 (FCS) 添加RPMI1640培地に 1×10^4 /mlの細胞密度で浮遊し、Interleukin (IL)-3、IL-6、GM-CSF (各20 ng/ml)、M-CSF、Flt-3 ligand(各100 ng/ml)のサイトカインのカクテルを添加して培養し、1週間ごとに培養液の1/2をM-CSF単独添加した新たな培養液と交換していき、培養開始3週間目に完全にM-CSF単独添加培養液と置換してさらに2週間培養を行ない、単球系細胞を分化誘導した。培養開始3週間後と5週間後の細胞を回収し、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。糖脂質分析については、それぞれの細胞群について細胞のペレットを調製し、クロロフォルム:メタノール=2:1に続き、クロロフォルム:イソプロパノール:水=7:11:2で総脂質を抽出した。乾燥させた抽出物を50 mM NaCl溶液8 mLに溶解させ、活性化および平衡化したSep-Pak C18 plus逆相カートリッジ (No. 020515, Waters) に吸着させ、MilliQ 10 mLで洗浄した後、メタノールでカートリッジから溶出した。溶出液を乾燥し、適当な溶媒に

溶解したものをLC/MSによる分析検体とした。

LC/MSによる発現糖脂質解析は、Agilent Technology社製1100 CapLC systemで分離、Bruker Daltonics社製IT/MS System HCT Ultraに導入してMSおよびMS/MSスペクトルを解析した。

液体クロマトグラフィー (LC) の分離モードとしてHILIC (逆-逆相) を用い、カラムはImtakt社製Unison UK-Silica, (150 mm x 0.3 mmφ)を使用し、移動相はクロロフォルム/メタノール/50 mM 酢酸トリエチルアミン (pH4.2)混合移動相系で、HPLC Pump Aにはクロロフォルム/メタノール/50 mM 酢酸トリエチルアミン (pH4.2) = 83/16/1、Pump Bにはメタノール/50 mM 酢酸トリエチルアミン (pH4.2) = (3/1)をセットしてAとBの混合比を変更させて分離・溶出を行うグラディエントモードで分離した。糖脂質としてガングリオシドGM1より後に溶出したものを中心に解析した。

(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。ヒト骨髓由来CD34陽性細胞は、米国Cambryx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

ヒト骨髓由来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3および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。それぞれの分画につき、3週目と5週目で表面抗原の発現には大きな差は認めなかった。しかしサイトカイン分泌能については3週目と5週目で差を認めた。また、無血清培地で比較を行ったが、同様の結果が得られた。

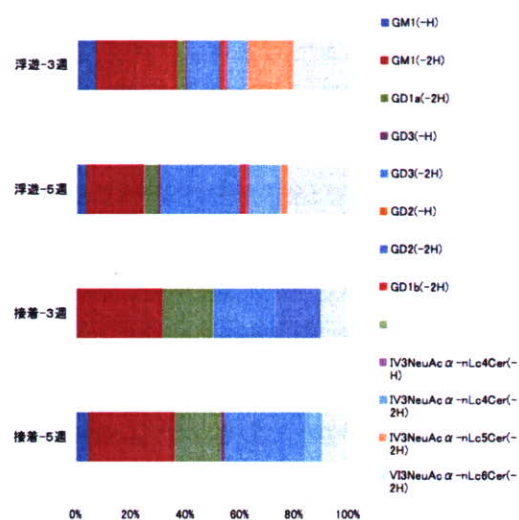
2) 発現糖脂質

発現糖脂質の解析には、上記の分化誘導した単球系細胞の3週間培養したものと5週間培養したものを使用した。それぞれ接着性の細胞と浮遊系の細胞の2群を分離し、有機溶媒で脂質を抽出してLC/MSでGM1以降に溶出・検出されるガングリオシドの分析を行った。

発現しているガングリオシドとしては、GM1, GD1a, GD3, GD2, GD1b, IV3NeuAc α -nLc4Cer, IV3NeuAc α -nLc5Cer, VI3NeuAc α -nLc6Cerの存在を確認した。得られた発現糖脂質のシグナル総和におけるそれぞれの比率を算出したところ分化段階、浮遊系、接着系で組成が異なることが明らかとなった

(図)。特に浮遊細胞では3週間分化誘導したもの、5週間培養したもの共にネオラクト系ガングリオシドIV3NeuAc α -nLc5Cerが発現していたが、接着系細胞ではいずれもその発現が見られなかった。一方でガングリオシドGD1aは接着した細胞で比較的多

く発現が見られた。



D. 考察

今回用いた培養系では、CD34陽性細胞は培養開始3週間後から浮遊系と接着系の細胞の2群に分画されたが、細胞形態や細胞表面抗原の発現様式から、浮遊系細胞は前駆単球あるいは単球、接着系細胞はより分化したマクロファージの形質を有すると考えられた。さらに、接着系のマクロファージは培養期間によってサイトカインの分泌能に差を認めることから、それぞれマクロファージとしての分化段階が異なることが示唆された。従って、この培養系を用いて、浮遊系と接着系に分画し、さらに培養期間を変化させることで、異なる分化段階の単球・マクロファージ系細胞を分化誘導することが可能と考えられる。

これまで正常骨髄由来細胞やその細胞を分化誘導した細胞の糖鎖発現を網羅的に調べられた例はほとんど無い。今回の検討から、ヒト骨髄由来CD34陽性細胞から単球系に分化させた状態において、異なる分化段階の単球系細胞における発現糖脂質のパターンに大きな差があることが明らかになっ

た。特に浮遊系の細胞ではネオラクト系ガングリオシドが特異的に発現されていることが明らかになった。ネオラクト系ガングリオシドはHL60などの細胞株を用いた実験で細胞を顆粒球系へと分化させることが報告されているが、幼弱な分化段階での発現や機能などは明らかになっていない。接着系の細胞では、GD1aが比較的多く発現されていることも明らかになった。GD1aはがん細胞などで細胞移動・運動などに機能していることが報告されている。今後異なった個体や正常末梢血由来単球若しくはマクロファージの発現糖脂質をLC/MSで解析し比較検討することで、幼弱な血球細胞や白血病細胞等の特異的な糖脂質発現パターンを明らかにすることが可能と考えられる。

E. 結論

これまで正常血球の糖脂質の発現変化を物質生物学的レベルで検索・同定することは方法論的な制約から至難の業であった。従って、様々な血球系の細胞株を樹立して分化を誘導し、その過程でできるだけ均一な細胞集団を充分量採集して生化学的分析を行い、正常血球分化における変化を推定することが多かった。樹立細胞株の多くは白血病や悪性リンパ腫由来であるが、これらはその正常な分化過程に何らかの障害を受け、あるステージで分化が停止してクローン性に腫瘍性増殖したものと考えられており、様々な変異により糖鎖発現が正常の分化とは異なっている可能性がある。今回の検討で非常に微量な検体でも高感度に発現糖脂質を解析可能なLC/MSを使用して限られた数の正常細胞で発現糖脂質解析を行い分化段階によって糖脂質発現パターンが

異なることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki K, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Saito M, Shimizu T, Okita H, Fujimoto J. Characterization of monocyte-macrophage-lineage cells induced from CD34+ bone marrow cells in vitro. *Int J Hematol.* 2007; 85(5): 384-389.
- 2) Taguchi T, Takenouchi H, Shiozawa Y, Matsui J, Kitamura N, Miyagawa Y, Katagiri YU, Takahashi T, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. Interleukin-7 contributes to human pro-B-cell development in a mouse stromal cell-dependent culture system. *Exp Hematol.* 2007; 35(5):1398-1407.
- 3) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Akutsu H, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J-I, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. A novel monoclonal anti-SSEA-4 antibody, 6E2, preferentially stained interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 364(4): 838-843.
- 4) Katagiri YU, Sato B, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. The detergent-insoluble microdomains, rafts can be used as an effective immunogen. *Glycoconj J.* (in press)

2. 学会発表

- 1) 片桐 洋子, 佐藤 伴, 川崎 ナナ, 伊藤 さつき, 中島 英規, 大喜多 肇, 藤本 純一郎, 清河 信敬. ヒトB前駆細胞株に発現するCD10の糖鎖の多様性. 第27回日本糖質学会年会, 福岡, 8月1日-3日, 2007.
- 2) 佐藤 伴, 片桐 洋子, 宮戸 健二, 阿久津 英憲, 中島 英規, 大喜多 肇, 秦 順一, 藤本 純一郎, 梅澤 明弘, 年森 清隆, 清河 信敬. 新規抗SSEA-4単クローン抗体6E2のマウス着床前胚との反応性. 第27回日本糖質学会年会, 福岡, 8月1日-3日, 2007.
- 3) 中島 英規, 宮川 世志幸, 大喜多 肇, 梅澤 明弘, 清河 信敬, 藤本 純一郎. 間葉系幹細胞株UET-13のEwing肉腫原因融合遺伝子EWS-Flt1誘導による発現糖鎖の変化. 第27回日本糖質学会年会, 福岡, 8月1日-3日, 2007.
- 4) 田口 智子, 宮川 世志幸, 堀内 保臣, 斎藤 洋平, 竹野内 寿美, 北村 紀子, 松井 淳, 佐藤 伴, 鈴木 恭子, 斎藤 正博, 片桐 洋子, 大喜多 肇, 藤本 純一郎, 清河 信敬. oncostatin Mの造血調節作用に関するin vitroでの検討. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会 合同開催, 横浜, 10月11日-13日, 2007.
- 5) 片桐 洋子, 佐藤 伴, 田口 智子, 石垣 宏仁, 伊藤 靖, 大喜多 肇, 小笠原 一誠, 藤本 純一郎, 清河 信敬. 同系腫瘍細胞及びヒト腎癌由来細胞株ACHNラフト免疫により誘導される免疫応答. 第37回日本免疫学会総, 東京, 11月20日-22日, 2007.
- 6) 片桐 洋子, 佐藤 伴, 川崎 ナ

ナ, 伊藤 さつき, 中島 英規, 大喜多 肇, 藤本 純一郎, 清河 信敬. ヒトB前駆細胞株に発現するCD10の糖鎖の多様性とendopeptidase活性. 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 12月11日-15日, 2007.

7) 佐藤 伴, 片桐 洋子, 宮戸 健二, 阿久津 英憲, 中島 英規, 大喜多 肇, 藤本 純一郎, 梅澤 明弘, 年森 清隆, 清河 信敬. 新規抗SSEA-4単クローン抗体6E2のマウス着床前胚との反応性. 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 12月11日-15日, 2007.

8) 中島 英規, 宮川 世志幸, 大喜多 肇, 佐藤 伴, 堀内 保臣, 片桐 洋子, 梅澤 明弘, 清河 信敬, 藤本 純一郎. ヒト間葉系前駆細胞を用いたEwing's family tumor発現融合遺伝子EWS/FLI1による糖脂質の変化. 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 12月11日-15日, 2007.

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

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に発現する代表的抗原であるCD10に着目した糖鎖構造解析から、同一の分子にもかかわらず、細胞により大きく糖鎖構造が異なる事が昨年の本研究であきらかとなっている。糖鎖構造の違いとタンパク機能、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端緒として、本年はCD10分子のNeutralendopeptidase(NEP)活性に糖鎖構造が関与するかどうかを検討した。インタクト細胞のCD10のNEP活性を測定する条件を検討し、B前駆細胞株4種のCD10のNEP活性を比較した。グリコシル化の多様性に乏しいNALM27細胞は、インタクト細胞、膜マイクロドメイン分画、精製CD10いずれを酵素源としても他の3種より比活性が8倍高く、この高い比活性は、一次構造の違いよりも、糖鎖構造の違いに起因すると考えられた。今後、糖鎖パネル化を行う上で、CD10などの機能性分子の糖鎖構造解析にあたっては、糖鎖が機能発現に関与している事を考慮して、糖鎖の個体差を解析する必要があると考えられた。

A. 研究目的

糖鎖は細胞の成熟やガン化に伴ってその発現様式が複雑に変化し、これらの過程において重要な役割を担う事が推測される。本研究では、種々の系統の造血系細胞が産生する糖鎖を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。昨年は、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、二次元電気泳動で精製したCD10分子のNグリコシド型糖鎖の構造解析をnanoLC/ESI-MS/MS質量分析計を使って解析し、細胞株によって糖鎖構造に著しい違いが見られる事を明らかにした。

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を考慮する必要性のあることが示唆された。CD10はB前駆細胞性ALLに特異的な抗原Common ALL Antigen (CALLA)として報告されたが、その後Neutral endopeptidase(NEP)活性をもつタイプII型の膜タンパクである事が明らかにされ、E nkephalin、TNF- α 、Substance P、Oxitocin、Angiotensin I、Bradykinin、Neurotensin等の炎症性サイトカインを分解し、局所での炎症の鎮静化に関与すると考えられている。本年は、この糖鎖構造の違いがCD10の有するEndopeptidase活性に影響を与えるかどうかを検討した。

B. 研究方法

1. B前駆細胞株：NALM6、NALM16、NALM27、KM3のCD10の発現量、NEP活性、比活性を測定した。CD10の発現は、抗CD10単クローン抗体1F6染色後のフローサイトメトリーと、抗CD10単クローン抗体NCL-L-CD10-270によるWestern 解析で行った。

2. NEP活性測定条件の検討：PBS 50 μ l中に酵素源であるB前駆細胞株NALM6を $0.6 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4$ 個と、オリゴペプチドのC末端側に蛍光色素を結合させた合成基質Glutaryl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phenylalanine-4-Methyl-Coumaryl-7-Amide (Glt-AAF-MCA)を0 ~ 200 μ M 加え、NEP特異的阻害剤であるPhosphoramidon (50 μ M) 存在/非存在下で37°Cで反応を行った。一次生成物であるF-MCAのPhenylalanine残基をウシAminopeptidaseで切断し、遊離してきたMCAをexcitation 390 nm, emission 460 nmで測定した。また、Benzoyloxycarbonyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Leucine *p*-Nitroanilide (Z-AAL-*p*-NA)を基質として酵素反応を行い、反応生成物を0.1 N HClで20倍に希釈してLC-MS/MSで解析した(図1)。

3. 細部膜マイクロドメインラフト画分は1% Triton不溶性で低密度画分としてショ糖密度勾配超遠心法により調製した。

精製CD10は可溶性画分から抗CD10単クローン抗体1F6を用いた免疫沈降により得た。

C. 研究結果

1. NALM6、NALM16、NALM27、KM3のCD10のフローサイトメトリー及びWestern解析：NALM6、NALM16、KM3は強陽性であったが、NALM27の発現は弱く、不均一であった。またタンパクレベルでも、NALM27の発現量は突出して少なかった(図2)。

2. CD10のNEP活性測定条件の検討：細胞数は 1×10^5 まで、反応時間は30分まで、基質濃度は200 μ Mまでほぼ直線状に生成物が増加したので(図3.1)、基質濃度50 μ M、細胞数 5×10^4 、反応時間30分で細胞4種のCD10のNEP活性を測定した。

1段階目での一次生成物(L-*p*NA)がLC-MS/MSで検出され、このNEP活性測定条件で、基質ペプチドが酵素反応により切断されていることが確認された。CD10の定量には、NALM6を基準として作製した検量線(図3.2)を使用した。

3. CD10のNEP活性測定：酵素源としてインタクトなままの細胞、ラフト膜マイクロドメイン、精製CD10を用いて酵素反応を行い、測定ごとに基準CD10標品の検量線からCD10量を求めた。細胞あたりのNEP活性はNALM6、NALM16、KM3に比べ、NALM27は低かったが、単位CD10あたりの活性で比較すると、NALM27は8倍近く高かった(図4.1)。NALM6とNALM27のラフト膜マイクロドメイン、精製CD10を酵素源として同様の測定を行ったが、インタクトな細胞と同様、NALM27のCD10は高い比活性を示した(図4.2)。

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Nグリコシド型糖鎖結合可能位置が6カ所あり、分子量110 kのうち25%近くを糖鎖が占める。昨年度NALM6とNALM27のCD10分子のNグリコシド型糖鎖構造には大きな違いがあることを報告した。この糖鎖構造の違いはC

D10分子のNEP活性に反映しているのかどうかを解明するために、ヒトB前駆細胞株4種のNEP活性を測定したところ、糖鎖構造の多様性の低いNALM27の比活性は他の3種の8倍も高かった。インタクトな細胞のみならず、ラフト画分（膜マイクロドメイン）、精製CD10でも同様な結果が得られた。

NALM6のCD10分子は細胞質側のP₂₆と膜貫通領域内のT₄₄と細胞外領域のT₈₁がRに置換していて、NALM27等他のヒトB前駆細胞株や正常組織とは異なる。いずれもNグリコシル化や活性部位とは関連性のない位置であり、1次構造の違いが活性に関連している可能性は低い。発現量の違いが細胞内での活性調節に関与している可能性も考えられるが、精製CD10でもNALM27のNEP活性はたかく、構造上の違い、すなわち糖鎖構造の違いが活性の差に影響を与えていると推測される。今後、糖鎖構造改変細胞株でNEP活性が影響を受けるのかなどのアプローチが必要と考えられる。

E. 結論

ヒトB前駆細胞株NALM27のCD10の有するNEP活性は、NALM6、NALM16、KM3に比べて、8倍比活性が高い。NALM27のCD10のNグリコシド型糖鎖は多様性に乏しく、他の3種と大きく異なり、糖鎖構造の違いがNEP活性に関与していると推察された。今後、糖鎖パネル化を行う上で、CD10などの機能性分子の糖鎖構造解析にあたっては、糖鎖が機能発現に関与している事を考慮して、糖鎖の個体差を解析する必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Taguchi T, Takenouchi H, Shiozawa Y, Matsui J, Kitamura N, Miyagawa Y, Katagiri YU, Takahashi T, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. Interleukin-7 contributes to human pro-B-cell development in a mouse stromal cell-dependent culture system. *Exp Hematol*. 2007; 35(5):1398-1407.

2) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Akutsu H, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J-I, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. A novel monoclonal anti-SSEA-4 antibody, 6E2, preferentially stained interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 364(4): 838-843.

3) Katagiri YU, Sato B, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. The detergent-insoluble microdomains, rafts can be used as an effective immunogen. *Glycoconj J*. (in press)

該当なし

2. 学会発表

1) 片桐 洋子, 佐藤 伴, 川崎 ナナ, 伊藤 さつき, 中島 英規, 大喜多 肇, 藤本 純一郎, 清河 信敬. ヒトB前駆細胞株に発現するCD10の糖鎖の多様性. 第27回日本糖質学会年会, 福岡, 8月1日-3日, 2007.

2) 佐藤 伴, 片桐 洋子, 宮戸 健二, 阿久津 英憲, 中島 英規, 大喜多 肇, 秦 順一, 藤本 純一郎, 梅澤 明弘, 年森 清隆, 清河 信敬. 新規抗SSEA-4単クローン抗体6E2のマウス着床前胚との反応性. 第27回日本糖質学会年会, 福岡, 8月1日-3日, 2007.

3) 中島 英規, 宮川 世志幸, 大喜多 肇, 梅澤 明弘, 清河 信敬, 藤本 純一郎. 間葉系幹細胞株 UET-13のEwing肉腫原因融合遺伝子 EWS-Flil1誘導による発現糖鎖の変化. 第27回日本糖質学会年会, 福岡, 8月1日-3日, 2007.

4) 田口 智子, 宮川 世志幸, 堀内 保臣, 斎藤 洋平, 竹野内 寿美, 北村 紀子, 松井 淳, 佐藤 伴, 鈴木 恭子, 斎藤 正博, 片桐 洋子, 大喜多 肇, 藤本 純一郎, 清河 信敬. oncostatin Mの造血調節作用に関するin vitroでの検討. 第69回日本血液学会総会・第49回日本

臨床血液学会総会 合同開催，横浜，
10月11日-13日，2007.

5) 片桐 洋子，佐藤 伴，田口 智
子，石垣 宏仁，伊藤 靖，大喜多
肇，小笠原 一誠，藤本 純一郎，
清河 信敬. 同系腫瘍細胞及びヒト
腎癌由来細胞株ACHNラフト免疫によ
り誘導される免疫応答. 第37回日本
免疫学会総，東京，11月20日-22日，
2007.

6) 片桐 洋子，佐藤 伴，川崎 ナ
ナ，伊藤 さつき，中島 英規，大
喜多 肇，藤本 純一郎，清河 信
敬. ヒトB前駆細胞株に発現する
CD10の糖鎖の多様性と
endopeptidase活性. 第30回日本分
子生物学会第80回日本生化学会大会
合同大会，横浜，12月11日-15日，2007.

7) 佐藤 伴，片桐 洋子，宮戸 健
二，阿久津 英憲，中島 英規，大
喜多 肇，藤本 純一郎，梅澤 明
弘，年森 清隆，清河 信敬. 新規
抗SSEA-4単クローン抗体6E2のマウ
ス着床前胚との反応性. 第30回日本
分子生物学会第80回日本生化学会大
会合同大会，横浜，12月11日-15日，
2007.

8) 中島 英規，宮川 世志幸，大喜
多 肇，佐藤 伴，堀内 保臣，片
桐 洋子，梅澤 明弘，清河 信敬，
藤本 純一郎. ヒト間葉系前駆細胞
を用いたEwing's family tumor発現
融合遺伝子EWS/FLI1による糖脂質の
変化. 第30回日本分子生物学会第80
回日本生化学会大会合同大会，横浜，
12月11日-15日，2007.

①第27回日本糖質学会年会，福岡，
ヒトB前駆細胞株に発現するCD10の
糖鎖の多様性.

②第30回日本分子生物学会第80回日
本生化学会大会合同大会，横浜
ヒトB前駆細胞株に発現するCD10の
糖鎖の多様性とendopeptidase活性.

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. NEP活性測定のプロシーア

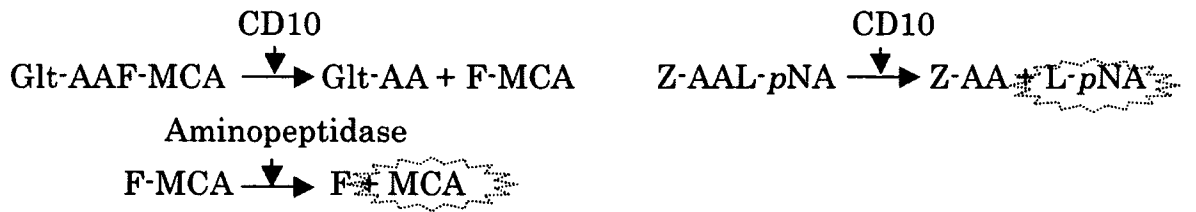


図2. B前駆細胞株4種のCD10発現

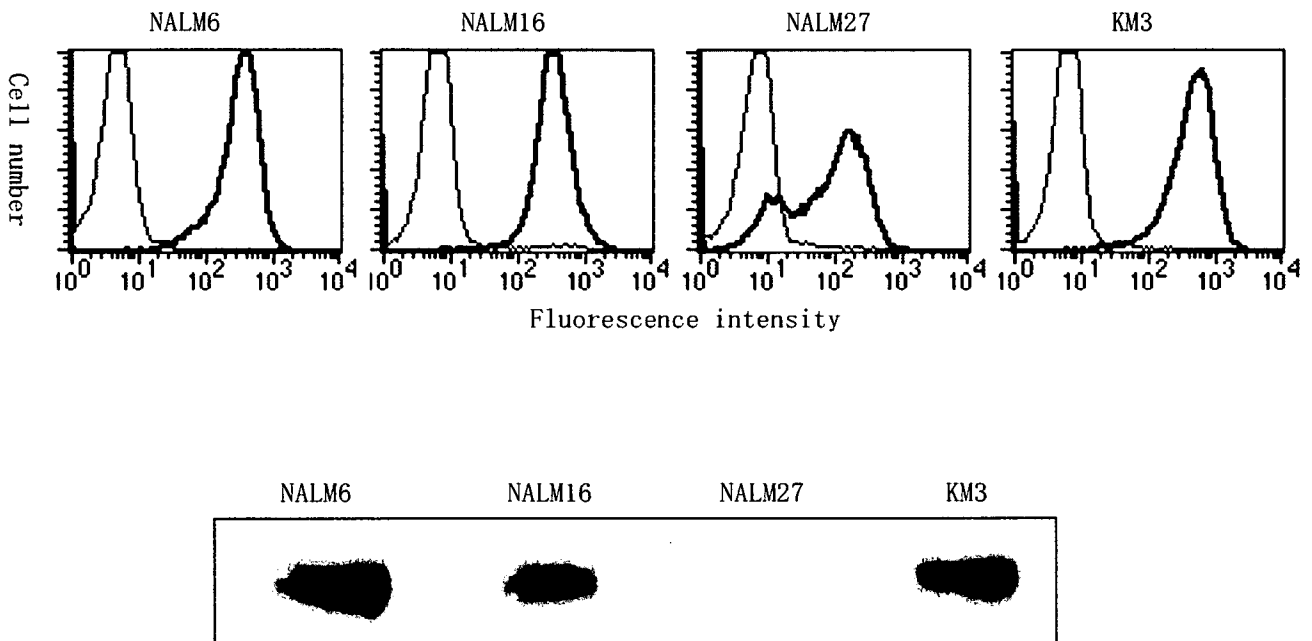


図3.1 CD10のNEP活性測定条件の検討

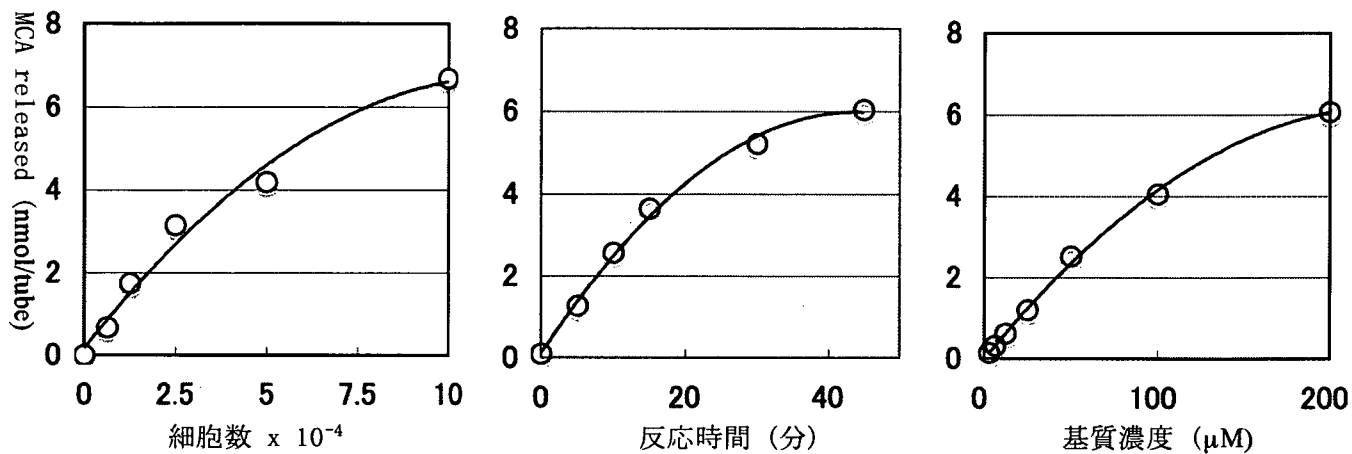


図3.2 CD10定量のための検量線

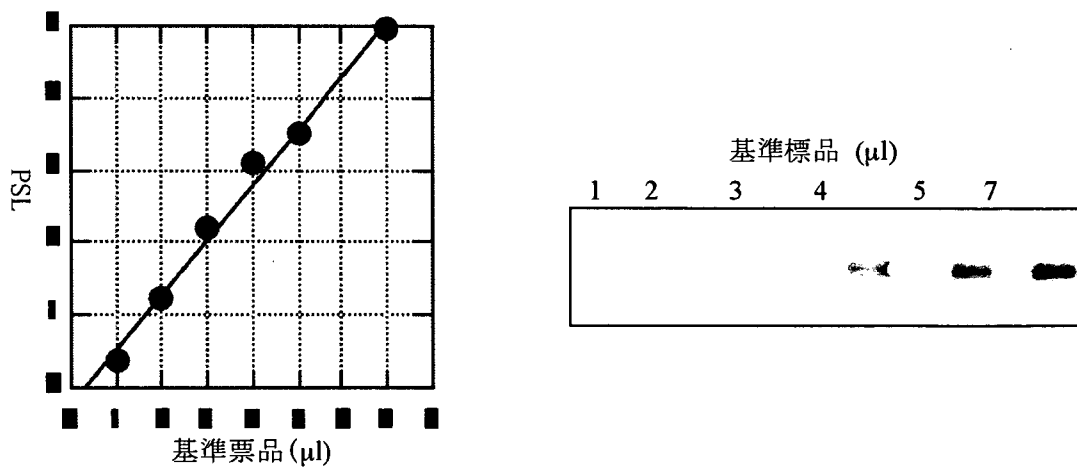


図4.1 B前駆細胞株4種のCD10のNEP活性

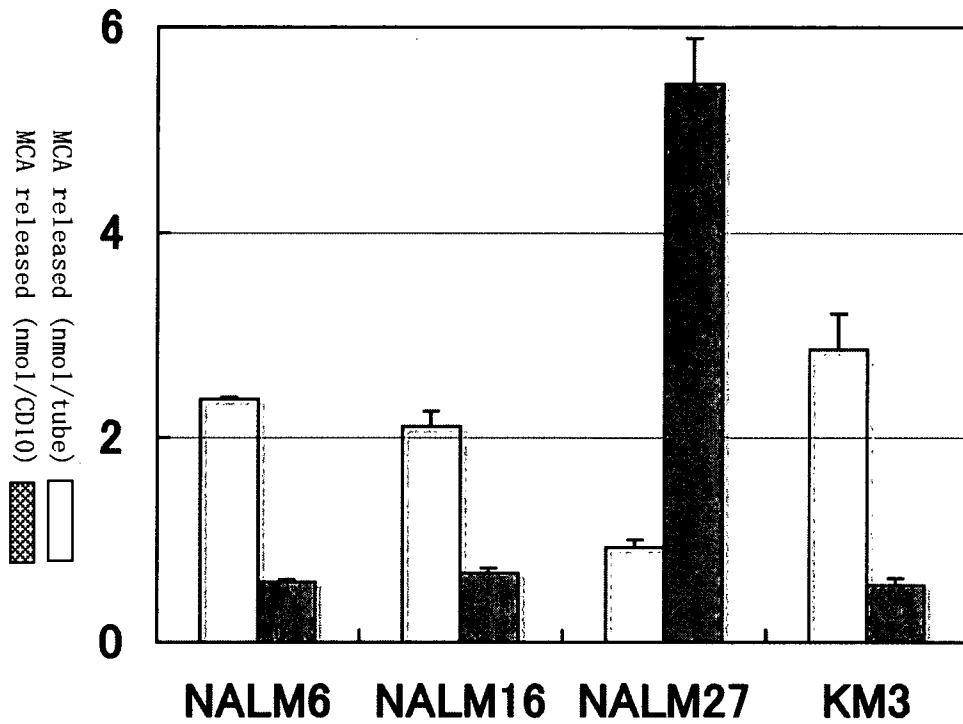
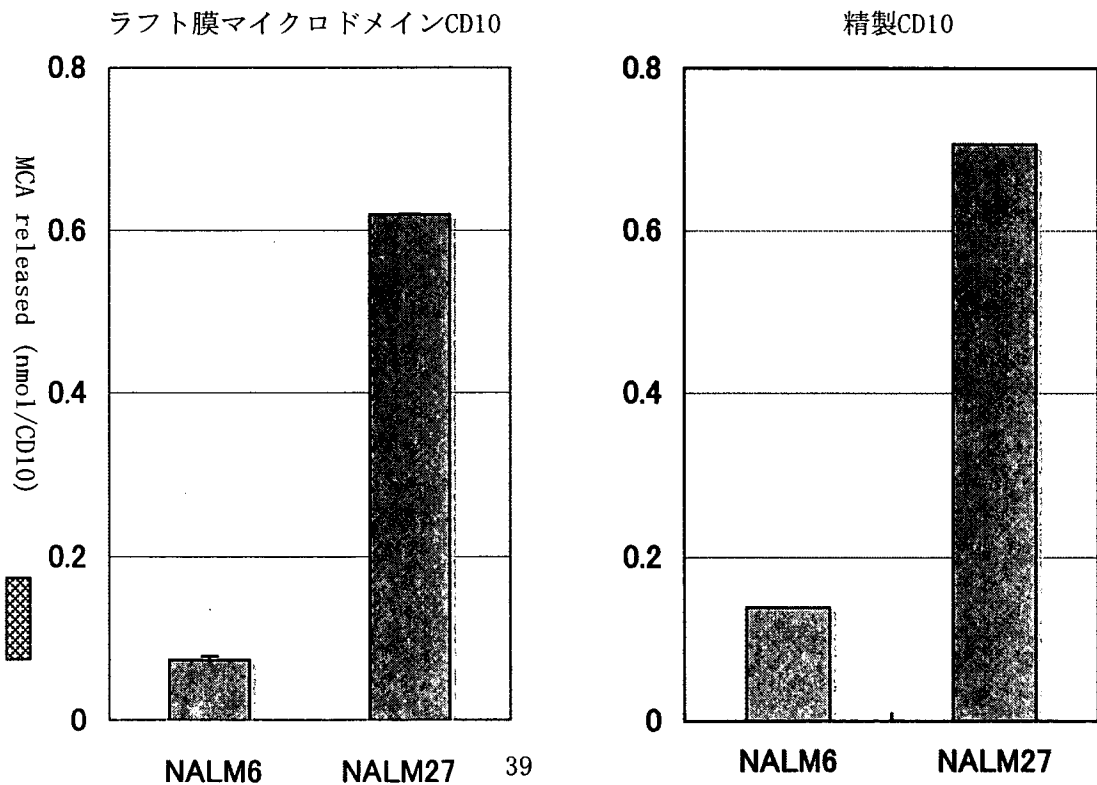


図4.2 NALM6とNALM27のラフト膜マイクロドメインと精製CD10のNEP活性



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生殖医療研究部長

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た時の糖鎖プローブによる細胞表面糖鎖解析を行った。

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間葉系細胞の分化誘導

ヒト間葉系細胞を、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。

2. 糖鎖プローブを用いた糖鎖構造解析

ヒト間葉系細胞を、(1)の条件のもと糖鎖プローブを用いて分化状態による細胞表面糖鎖解析を行う。

C. 研究結果

(1) 糖鎖プローブを用いた糖鎖構造解析のためのヒト間葉系細胞の分化誘導

ヒト間葉系細胞における未分化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（骨、脂肪）についてほぼ確立した。また分化誘導時における糖鎖プローブを用いた糖鎖構造解析のための培養条件についても確立した。

(2) 糖鎖プローブを用いた糖鎖構造解析 (1)の条件のもとヒト間葉系細胞(UET-13, Yub667B)に対して糖鎖プライマー(Lac-C12, GlcNac-C12)を投与して糖鎖

を培地中に大量産生させ、分化過程で変化する糖鎖の回収・精製しマスマスペクトロメトリー等を用いた構造解析を行った。その結果、①SSEA-4タイプの糖鎖が未分化細胞特異的に検出された。②骨または脂肪分化特異的な糖鎖構造が確認できた。特に骨分化させた場合、検出されにくいとされる硫酸化糖鎖構造が確認できた。

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、試験管内においても生体外培養にて増殖させることが可能である。これまでに間葉系幹細胞の神経組織への分化、拍動する心筋細胞への分化を確立してきた。この体性幹細胞の利用は、細胞品質管理の標準化の必要があり、糖鎖解析は有用な手段である。多様な構造を有し、精製・分析が困難であった糖鎖解析が、糖鎖プローブを用いることによりそれが可能となる。今回未分化、分化（骨、脂肪）によってそれぞれ特徴づける糖鎖構造が確認できたことにより、ヘテロな細胞集団であるヒト間葉系細胞の規格ができれば、臨床への展開が大きく開かれると考えられる。

E. 結論

糖鎖プローブを用いた糖鎖構造解析のための、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、糖鎖プローブを用いた細胞表面糖鎖解析のための培養条件をほぼ確立できた。また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、分化過程で変化する糖鎖の回収・精製しマスマスペクトロメトリー等を用いた構造解析が可能となった。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。

F. 健康危険情報

なし

G. 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。

H. 研究発表

論文発表

1. Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and Umezawa A Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells Mol. Biol. Cell, 18(5):1586-1594.2007
2. Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Miss, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Terai M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The Significant Cardiomyogenic