

Fig. VI-12 細胞培養上清中 MMP-1 の Western blot による検出

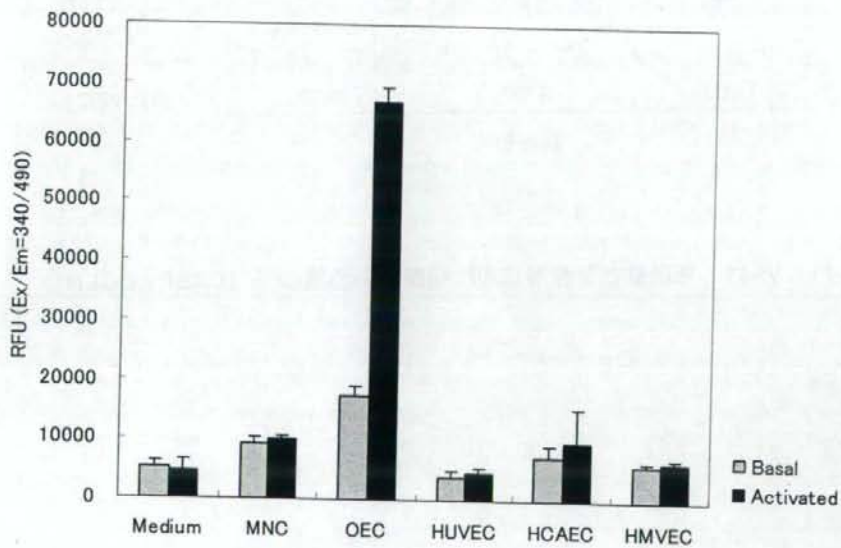


Fig. VI-13 細胞培養上清中 MMP-1 の活性測定

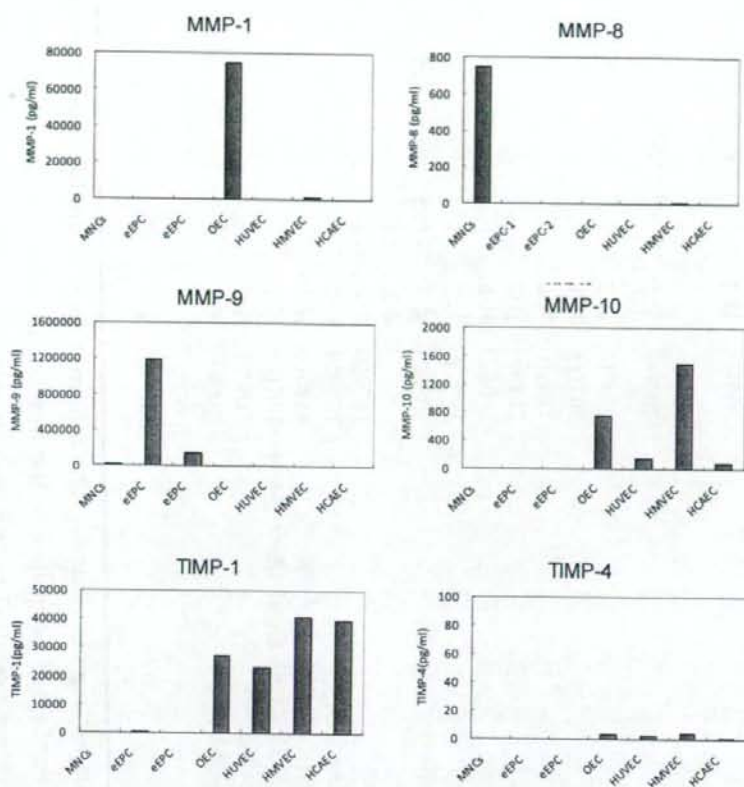


Fig. VI-14 細胞培養上清中 MMP 類の定量解析

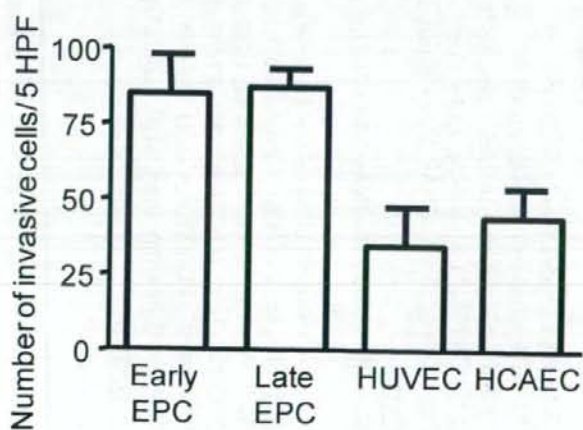


Fig. VI-15 マトリゲルに対する浸潤活性の比較

Table VII-1. O-Glycans found in leukemia cell lines

Structure and monosaccharide compositions	Molecular ions	Peak ID	Relative abundance (%)		
			K562	U937	Jurkat HL-60
Asialo glycan					
Galβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#A2	869(+)	H-1			4.44
Monosialo glycans					
NeuAca2-3Galβ1-3GalNAc-2AA#MS1 (Sialyl T antigen)	795(+)	K-1, U1, H-4	32.3	36.6	20.5
NeuAca2-6GalNAc-2AA (Sialyl Tn antigen)	633(+)	J-1, H-4			15.2
NeuAca2-3Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#MS2	997(+)	H-7, J-2		28.9	1.16
Galβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS3	1159(-)	H-3			4.24
NeuAca2-3Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + Fuc	1143(-)	H-6			4.26
Galβ1-3(Gal-(Fuc)-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS4	1305(-)	H-2			2.08
		H-5			2.26
Disialo glycans					
NeuAca2-3Galβ1-3(NeuAca2-6)GalNAc-2AA#DS1 (Disialyl T antigen)	1085(-)	K-3, U-3, H-14	30.7	30.1	12.9
NeuAca2-3Galβ1-3(NeuAca2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS2	1450(-)	J-5, H-13			25.9
NeuAca2-3Galβ1-3(NeuAca2-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA	1596(-)	J-4, H-12		10.7	0.14
NeuAca2-3Galβ1-3(NeuAca2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS3	1815(-)	H-10			1.49
NeuAca2-3Galβ1-3(NeuAca2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS4	1961(-)	H-10			1.49
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc)2-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS5	2180(-)	H-9			1.11
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc)3-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS6	2545(-)	H-8			2.13
Degradation product					
NeuAca2-3Gal-2AA	592(+)	K-2, U-2, J-3, H-11	17.3	21.2	20.6
					23.7

We showed ms/ms data for the glycan with # marks in supporting information. The information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>. The structures in blue are confirmed according to the analogous consideration on the structures of higher / lower series of O-glycans. The structures in red are not assigned in the present study, because we could not observe good MSⁿ data.

Table VII-2. O-Glycans found in pancreatic cancer cell lines

O-glycans observed in PNC1	Molecular ions	O-glycans observed in BxPC3	Molecular ions
Asialo fraction(peak P-1): 0%		Asialo fraction (Peak B-1): 6.0%	
		Gal β 1-3GalNAc-2AA	504 (+)
		Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA#A1	707 (+)
		Gal β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA#A2	869 (+)
		Gal β 1-3(GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA#A4	1093(+)
		Gal β 1-3(Gal-GlcNAc-Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA#A5	1255(+)
Monosialo fraction (Peak P2, P3): 63%		Monosialo fraction (Peak B-2): 70%	
NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc-2AA#MS1 (Sialyl T antigen)	795(+)	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc-2AA#MS1 (Sialyl T antigen)	795(+)
		Gal β 1-3((Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc) β MS3	1159(-)
		Gal β 1-3(Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc) β MS5	1524(-)
		Gal β 1-3 (Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc-)GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc) β MS6	1670(-)
		Gal β 1-3(((Gal-GlcNAc) $_2$ -Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc) β MS8	1889(-)
		Gal β 1-3(((Gal-GlcNAc) $_2$ -Gal-(Fuc-)GlcNAc β 1-6)-GalNA-2AA + NeuAc) β MS9	2035(-)
		Gal β 1-3(((Gal-GlcNAc) $_3$ -Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc) β MS10	2254(-)
		Gal β 1-3(((Gal-GlcNAc) $_3$ -Gal-(Fuc-)GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc) β MS11	2400(-)
		Gal β 1-3(((Gal-GlcNAc) $_4$ -Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc) β MS12	2619(-)
		Gal β 1-3(((Gal-GlcNAc) $_r$ -Gal-(Fuc-)GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc) β MS13	2765(-)
Disialo fraction (Peak P4): 37%		Disialo fraction (Peak B3, B4, B5): 24%	
NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc-2AA#DS1 (Disialyl T antigen)	1085(-)	NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc-2AA#DS1 (Disialyl T antigen)	1085(-)
		NeuAc $_2$ Hex $_1$ HexNAc $_1$ dHex $_1$ -2AA	1231(-)
		NeuAc-Gal β 1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA#DS2	1450(-)

NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS3	1815(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS4	1961(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS6	2180(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-(Fuc)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS7	2326(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₃ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS9	2545(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₃ -Gal-(Fuc)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA	2691(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₄ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS10	2910(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₄ -Gal-(Fuc)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA	3056(-)

Degradation product
NeuAcα2-3Gal-2AA

592(+)

Degradation product
NeuAcα2-3Gal-2AA

592(+)

We showed ms/ms data for the glycan with # marks in supporting information. The information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>. The structures in blue are confirmed according to the analogous consideration on the structures of higher / lower series of *O*-glycans. The structures in red are not assigned in the present study, because we could not observe good MSⁿ data.

Table VII-3. O-Glycans found in colon cancer cell lines

O-glycans observed in LS174T	Molecular ions	O-glycans observed in HCT-15	Molecular ions
<u>Asialo fraction (peak L-1): 25.6%</u>			
Gal β 1-3GalNAc-2AA	504 (+)	<u>Asialo fraction (Peak H-1): 13.8%</u>	
GlcNAc-GalNAc-2AA	545 (+)	GlcNAc-GalNAc-2AA	545 (+)
Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA ^{#A1}	707 (+)	Fuc-Gal β 1-3GalNAc-2AA	649(+)
Gal β 1-3(Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA ^{#A2}	869 (+)	Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA ^{#A1}	707 (+)
Gal β 1-3(Gal-(Fuc)GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA ^{#A3}	1014(-)	Gal β 1-3(Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA ^{#A2}	869 (+)
Gal β 1-3(GlcNAc-Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA ^{#A4}	1071(-)		
Gal β 1-3(Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA ^{#A5}	1233(-)		
Gal β 1-3(Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc)GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA ^{#A6}	1379(-)		
Gal β 1-3(GlcNAc-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA ^{#A7}	1436(-)		
Gal β 1-3((Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA ^{#A8}	1598(-)		
Gal β 1-3(((Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-(Fuc)GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA ^{#A9}	1744(-)		
<u>Monosialo fraction (Peak L-2): 37.1%</u>			
Gal β 1-3(Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS3}	1159(-)	<u>Monosialo fraction (Peak H-2): 23.8%</u>	
Gal β 1-3(Gal-(Fuc)GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS4}	1305(-)	NeuAc ₂ -3Gal β 1-3GalNAc-2AA ^{#MS1} (Sialyl T antigen)	795(+)
Gal β 1-3(Gal-(Fuc)GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ + SO ₃	1385(-)	Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS2}	997(-)
Gal β 1-3(Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc)-(SO ₃)GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA ^{#SU2}	1459(-)	Gal β 1-3(Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS3}	1159(-)
		Gal β 1-3(Gal-(Fuc)GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS4}	1305(-)
Gal β 1-3(Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS5}	1524(-)		
Gal β 1-3(Gal-(Fuc)GlcNAc-Gal-(Fuc)-(SO ₃)GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA ^{#SU3}	1604(-)		
Gal β 1-3(Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc)GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS6}	1670(-)		
Gal β 1-3(Gal-(Fuc)GlcNAc-Gal-(Fuc)GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS7}	1816(-)		
Gal β 1-3(Gal-(Fuc)GlcNAc-Gal-(Fuc)GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ + SO ₃	1896(-)		
Gal β 1-3((Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ + SO ₃	1969(-)		

Galβ1-3(((Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-(Fuc-GlcNAcβ1-6)-GalNAc-2AA + NeuAc) _{#MS9}	2035(-)
Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc-GlcNAcβ1-6)-GalNAc-2AA + NeuAc)	2181(-)
<u>Disialo fraction (Peak L.3, L.4, L.5): 37.1%</u>	
NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc-2AA _{#DS1} (Disialyl T antigen)	1085(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA _{#DS2}	1450(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-(Fuc-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA	1596(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6) GalNAc-2AA _{#DS3}	1815(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-(SO ₃ -)GlcNAcβ1-6) GalNAc-2AA _{#SU4}	1895(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc-GlcNAcβ1-6) GalNAc-2AA _{#DS4}	1961(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-(Fuc-GlcNAc-Gal-(Fuc-GlcNAcβ1-6) GalNAc-2AA _{#DS5}	2107(-)
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-(Fuc)(SO ₃ -)GlcNAcβ1-6) GalNAc-2AA + NeuAc _{#SU5}	2115(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA _{#DS6}	2180(-)
Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc)(SO ₃ -)GlcNAc-Gal-(Fuc) GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc _{#SU6}	2260(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-(Fuc-GlcNAcβ1-6) GalNAc-2AA _{#DS7}	2326(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc-GlcNAc-Gal-(Fuc-GlcNAcβ1-6) GalNAc-2AA _{#DS8}	2472(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₃ -Gal-(Fuc-GlcNAcβ1-6) GalNAc-2AA	2691(-)
<u>Degradation product</u> (Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-2AA _{#DP2}	
	1029(-)
<u>Degradation product</u> NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-2AA _{#DP1}	
	956(+)

Disialo fraction (Peak H.3, H.4): 62.4%

NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc-2AA _{#DS1} (Disialyl T antigen)	1085(-)
Galβ1-3(Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + SO ₃ + NeuAc _{#SU1}	1238(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA _{#DS}	1450(-)

2

Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + SO ₃ + NeuAc ₁	1604
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6) GalNAc-2AA _{#DS3}	1815(-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-GlcNAcβ1-6) GalNAc-2AA _{#DS8}	2180(-)

Gal·GlcNAc·Gal·(Fuc)·GlcNAc·Gal·2AA#DP3	1176(-)
(Gal·GlcNAc) ₃ ·Gal·2AA + Fuc	1541(-)
NeuAc·Gal·(Fuc)·GlcNAc·Gal·(Fuc)·(SO ₃)·GlcNAc·Gal·2AA#DP6	1691(-)
NeuAc·(Gal·GlcNAc) ₂ ·Gal·2AA + Fuc ₃	1758(-)

We showed ms/ms data for the glycan with # marks in supporting information. The information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>. The structures in blue are confirmed according to the analogous consideration on the structures of higher / lower series of *O*-glycans. The structures in red are not assigned in the present study, because we could not observe good MSⁿ data.

Table VII-4. O-Glycans found in gastric cancer cell lines

O-glycans observed in MKN45	Molecular ions	O-glycans observed in MKN7	Molecular ions
<u>Asialo fraction (Peak M-1): 5.0%</u>			
Galβ1-3GalNAc-2AA	504 (+)		
GlcNAc-GalNAc-2AA	545 (+)		
Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#A1	707 (+)		
<u>Monosialo fraction (Peak M-2, M-3): 21.3%</u>			
NeuAca2-6GalNAc-2AA + Na (Sialyl Tn antigen)	654 (+)	NeuAca2-6GalNAc-2AA + Na (Sialyl Tn antigen)	654 (+)
NeuAca2-3Galβ1-3GalNAc-2AA#MS1 (Sialyl T antigen)	795 (+)	NeuAca2-3Galβ1-3GalNAc-2AA#MS1 (Sialyl T antigen)	795 (+)
Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS2	998 (+)	Galβ1-3(Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS3	1159 (-)
Galβ1-3(Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS3	1159 (-)	Galβ1-3(Gal-(Fuc)-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#MS4	1305
Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS5	1524 (-)		
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS8	1889 (-)		
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₃ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS10	2254 (-)		
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₄ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS12	2619 (-)		
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₅ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc1#MS14	2984 (-)		
<u>Disialo fractions (Peak M-4, M-6): 61.4%</u>			
NeuAca2-3Galβ1-3(NeuAca2-6)GalNAc-2AA#DS1 (Disialyl T antigen)	1085 (-)	Disialo fractions (Peak M7-5): 25.4%	1085 (-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS2	1450 (-)	NeuAca2-3Galβ1-3(NeuAca2-6)GalNAc-2AA#DS1 (Disialyl T antigen)	1085 (-)
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS3	1815 (-)		
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS6	2180 (-)		
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₃ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS9	2545 (-)		
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₄ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA#DS12	2910 (-)		

Ac-2AA #DS10			
NeuAc-Gal β 1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₅ -Gal-GlcNAc β 1-6)GalN			3275(-)
Ac-2AA #DS11			
<u>Trisialo fraction (Peak M⁺5): 12.3%</u>			
NeuAc-Gal-GlcNAc (NeuAc-Gal-GlcNAc)Galb1-3(NeuAca2-6)GalNAc-2AA#TS1			2106(-)
NeuAc-Gal-GlcNAc (NeuAc-Gal-GlcNAc)Galb1-3(NeuAca2-6)GalNAc-2AA + Gal-GlcNAc#TS2			2471(-)
NeuAc-Gal-GlcNAc (NeuAc-Gal-GlcNAc)Galb1-3(NeuAca2-6)GalNAc-2AA + (Gal-GlcNAc) ₂ #TS3			2836(-)
NeuAc-Gal-GlcNAc (NeuAc-Gal-GlcNAc)Galb1-3(NeuAca2-6)GalNAc-2AA + (Gal-GlcNAc) ₃ #TS4			3201(-)
NeuAc-Gal-GlcNAc (NeuAc-Gal-GlcNAc)Galb1-3(NeuAca2-6)GalNAc-2AA + (Gal-GlcNAc) ₄ #TS5			3566(-)
NeuAc-Gal-GlcNAc (NeuAc-Gal-GlcNAc)Galb1-3(NeuAca2-6)GalNAc-2AA + (Gal-GlcNAc) ₅ #TS6			3931(-)
<u>Degradation product</u>			
NeuAca2-3Gal-2AA			592(+)
NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-2AA#DP1			957(+)
NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-2AA#DP4			1321(-)
NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₃ -Gal-2AA#DP5			1686(-)
NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₄ -Gal-2AA#DP7			2051(-)
NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₅ -Gal-2AA			2416(-)
NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₆ -Gal-2AA#DP8			2781(-)
<u>Degradation product</u>			
NeuAca2-3Gal-2AA			592(+)
NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-2AA#DP1			956(+)

We showed ms/ms data for the glycan with # marks in supporting information. The information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>. The structures in blue are confirmed according to the analogous consideration on the structures of higher / lower series of O-glycans. The structures in red are not assigned in the present study, because we could not observe good MSⁿ data.

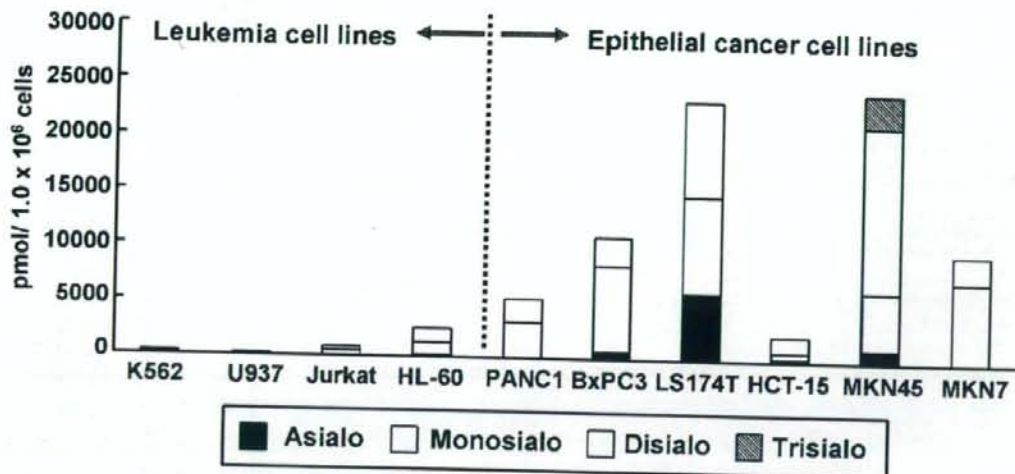


Fig. VII-1 Comparison of the amounts of O-glycans expressed on cancer cells

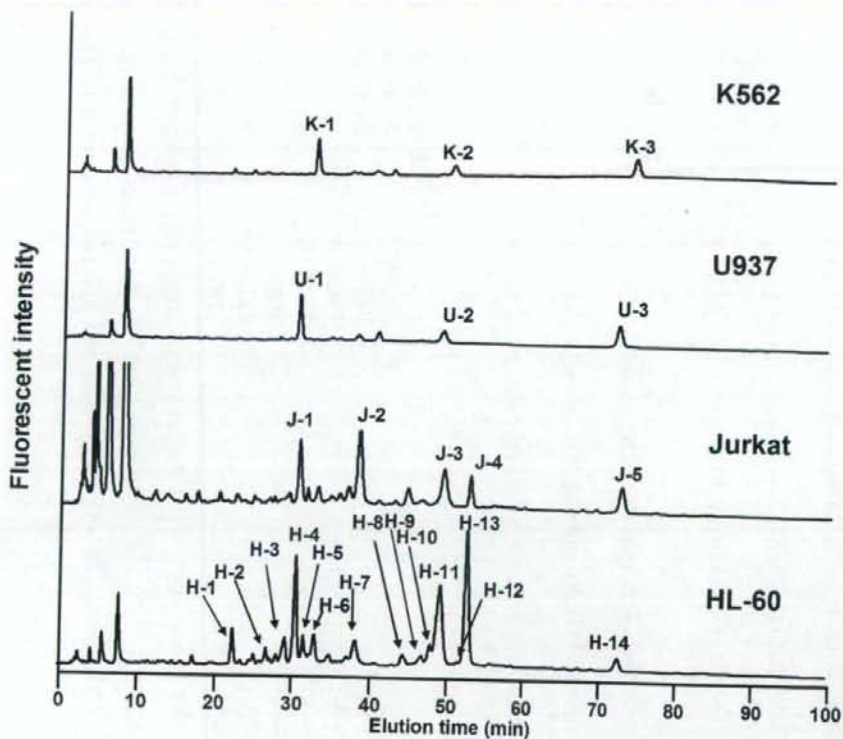


Fig. VII-2 NP-HPLC analysis of O-glycans derived from leukemia cells

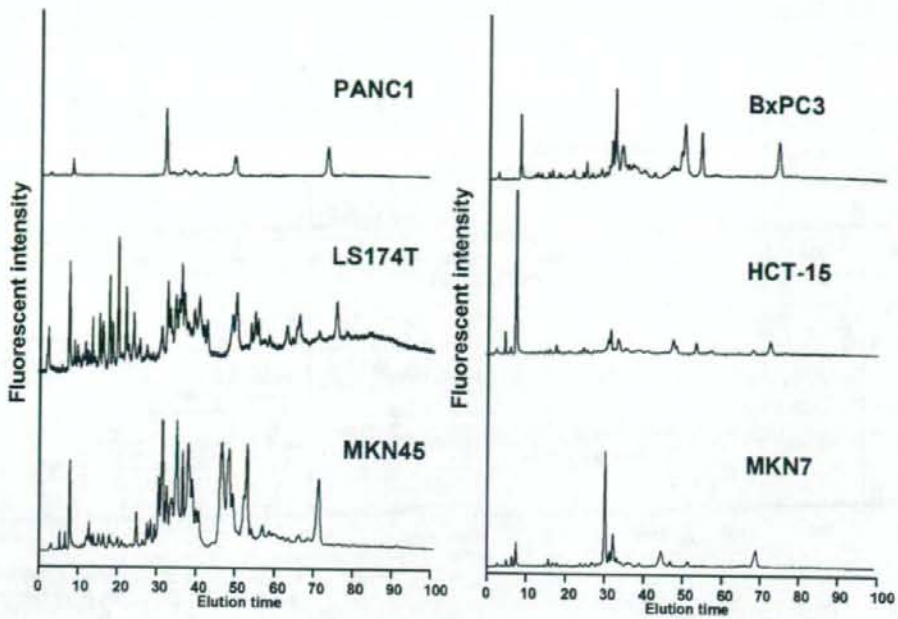


Fig.VII-3 NP-HPLC analysis of O-glycans derived from epithelial cancer cells

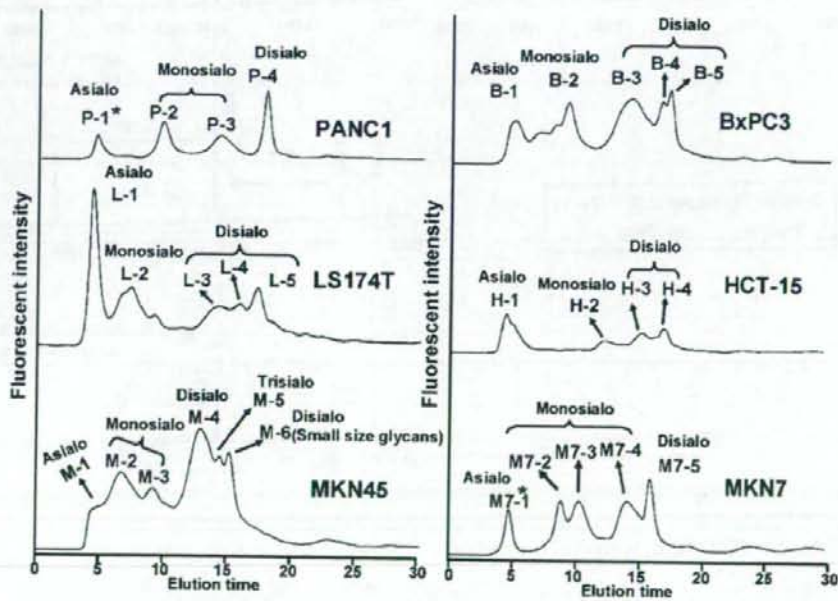


Fig.VII-4 Separation of O-glycan pool derived from epithelial cancer cells by serotonin affinity chromatography

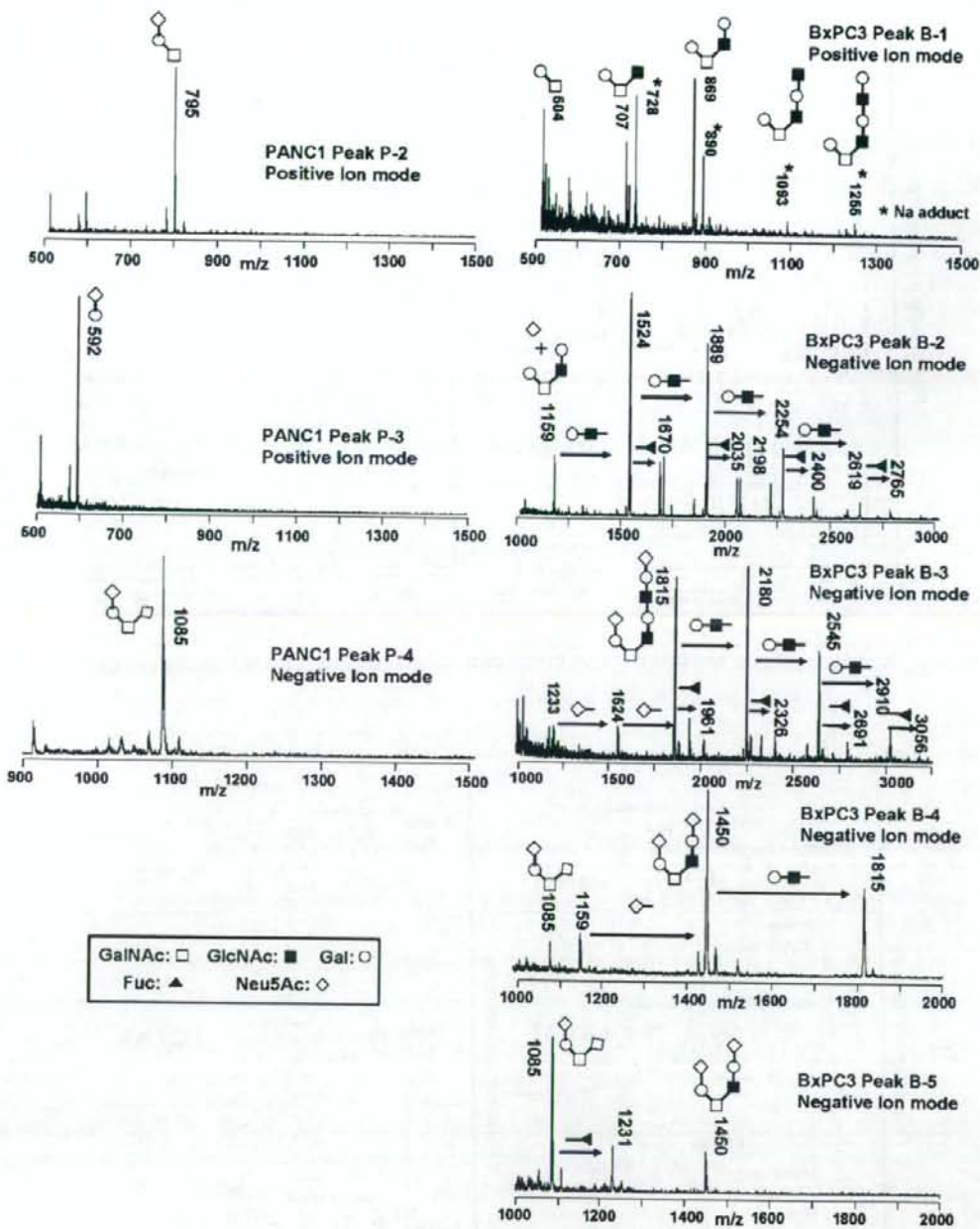


Fig.VII-5 MALDI-TOF MS analysis of O-glycan fractions derived from PANC1 and BxPC3 cells

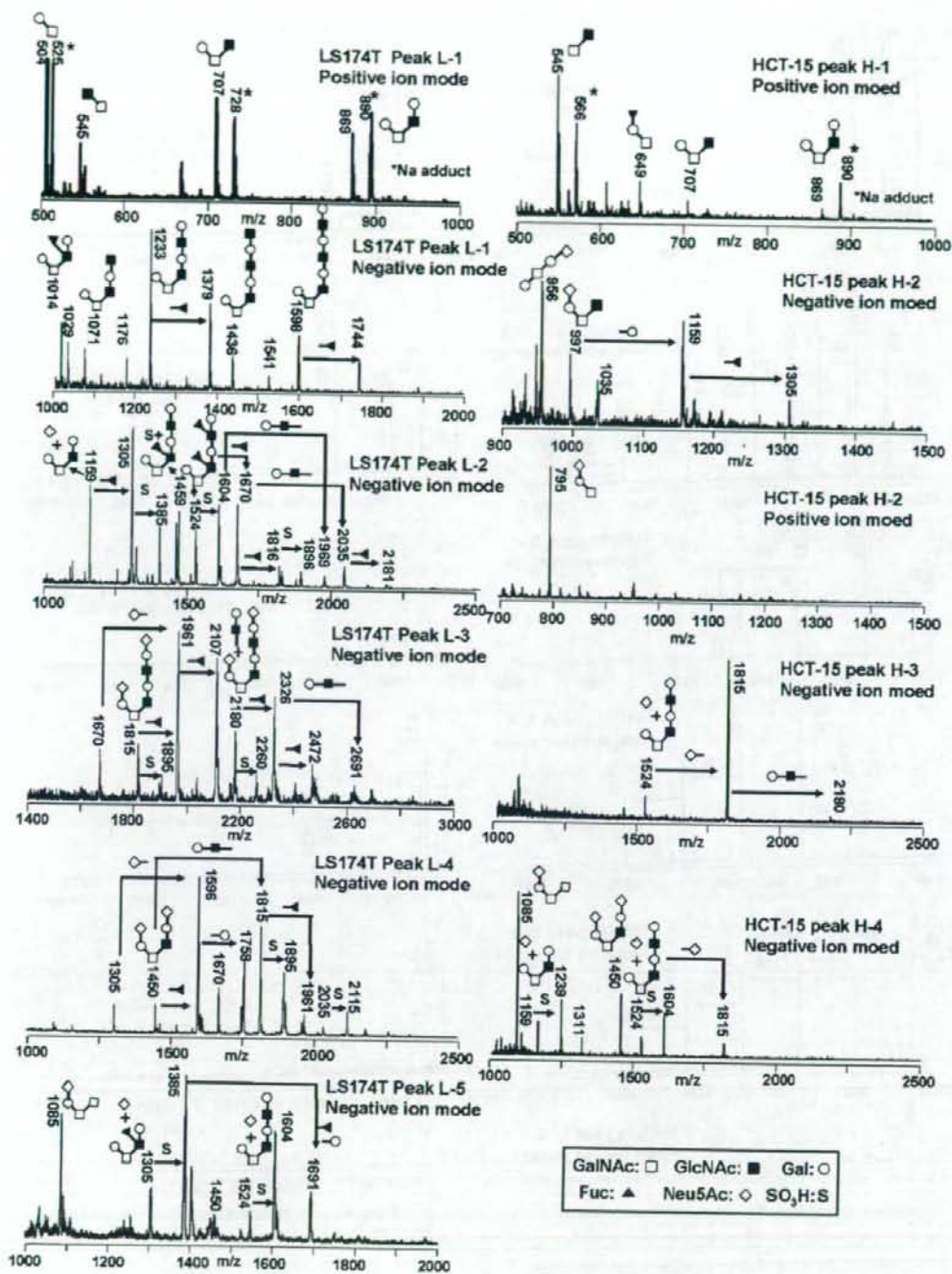


Fig.VII-6 MALDI-TOF MS analysis of O-glycan fractions derived from LS174T and HCT-15 cells

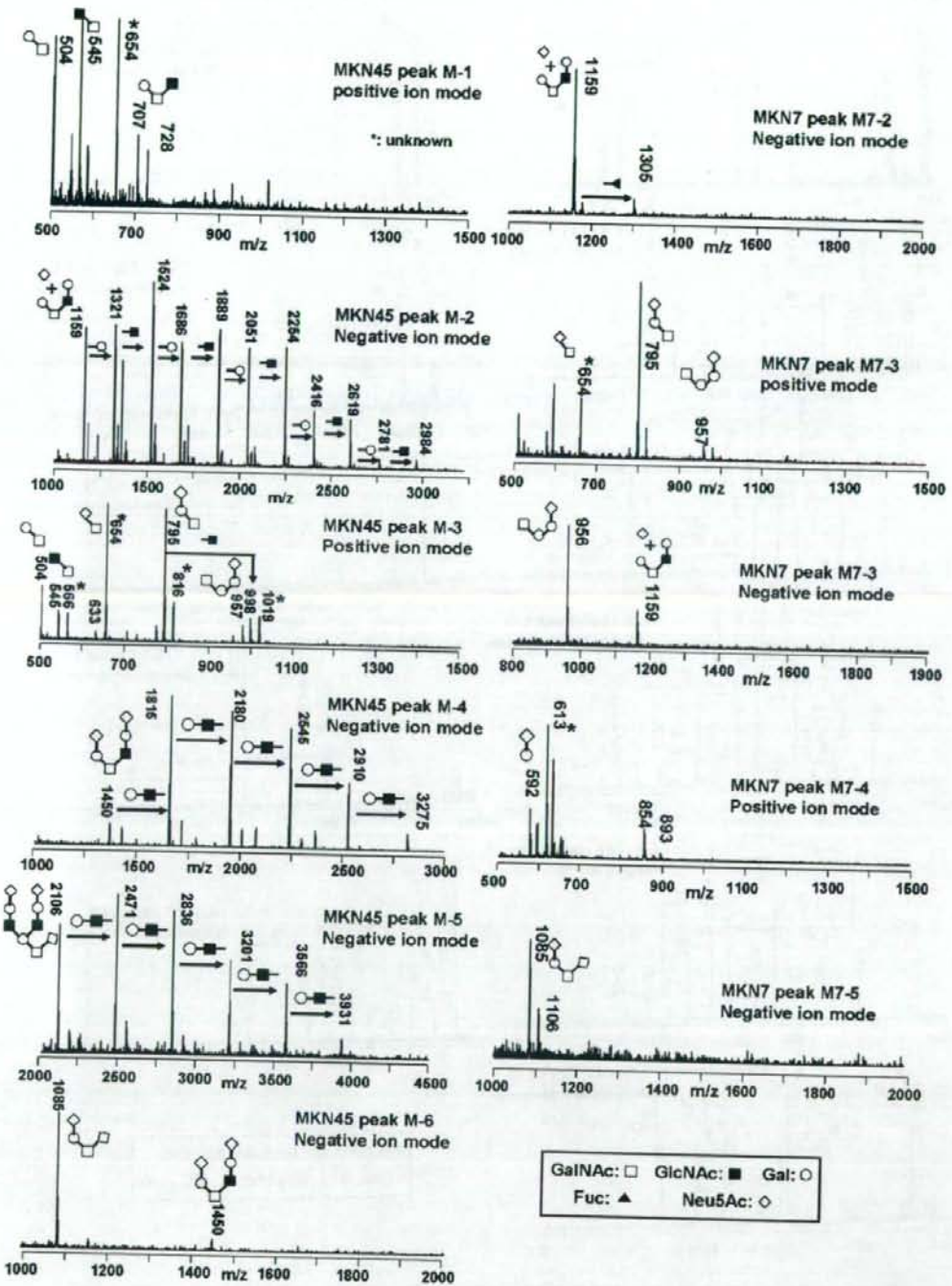


Fig. VII-7 MALDI-TOF MS analysis of O-glycan fractions derived from MKN45 and MKN7 cells

細胞組織加工医薬品のウイルス安全性評価技術の開発

研究分担者 内田 恵理子 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部第1室長

再生医療実用化に向けた細胞組織加工医薬品の安全性・品質用の確保に関する基盤技術開発研究の一環として、細胞組織加工医薬品のウイルス安全性評価技術の開発に関する研究を行っている。今年度は、B型肝炎ウイルス(HBV)の濃縮・高感度検出法の開発とパルボウイルス B19 の感染系の確立について検討した。HBV については、ポリ-L-リジン (PLL) を表面にコートした磁気ビーズ (PLL 磁気ビーズ) により、ごく微量の HBV を含む血漿から HBV を濃縮して HBV DNA 及び HBsAg を高感度に検出することが可能であること、濃縮の際、HBV 表面抗原に対する抗体を共存させるとより濃縮効率が向上すること、HCV やパルボウイルス B19 が共存しても HBV の濃縮が可能であることを示した。本法は低濃度キャリアの高感度ウイルススクリーニング法として有用であることが確認された。一方、パルボウイルス B19 については、エリスロポエチン依存性網状赤血球細胞 Ku812-E2 を樹立し、この Ku812-E2 を用いてパルボウイルス B19 の *in vitro* 感染系を確立した。確立した感染系ではパルボウイルス B19 は持続感染していることを明らかにした。

研究協力者

山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所
佐藤 功栄 埼玉県赤十字血液センター
研究部
岩田 明子 埼玉県赤十字血液センター
研究部

あるいは糖尿病、リウマチ、骨粗しょう症、重篤な肝疾患、神経疾患、熱傷、創傷等に対してきわめて有効な治療法になる可能性が高い。本邦においても、培養皮膚製品が初の細胞組織加工医薬品として承認され、近い将来にはさらに多くの製品の実用化が見込まれている。しかし、細胞組織加工医薬品には未知・未経験の要素が多く、本格的な実用化に至るためには検討すべき課題はまだ多く、特に重要な課題となるのが細胞組織加工医薬品の品質、安全性の確保である。

A. 研究目的

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や再生医学の技術的進歩により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治療に用いる細胞・組織加工医薬品・医療用具の開発が急速に進んでいる。このように細胞や組織を医薬品として用いる治療法はガン、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞などの致死的な疾患、

細胞組織加工医薬品には原料である細胞、組織に由来するウイルス等の感染性因子や製造工程で用いる血清や添加剤等から迷入する感染性因子による汚染のリスクが存在

する。しかし、細胞組織利用医薬品はその性質上、ウイルス等の感染性因子を不活化・除去するための滅菌や高度な精製といった処理を行うことが困難であるため、ウイルス等の感染性因子が混入していると患者や患者の家族等に感染が広がる危険性がある。従って細胞組織加工医薬品ではドナースクリーニング等の検査を行うことによる原材料の安全性確保、及び製造工程中での生物由来原料に由来する汚染リスクの低減が求められる。

本研究では、細胞組織加工医薬品のウイルス安全性評価技術の開発に関する研究として、ウイルス等の感染性因子の高感度検出技術の開発及び安全性評価技術の開発に関する研究を行うことを目的とする。今年度は、B型肝炎ウイルス(HBV)の濃縮・高感度検出法の開発とパルボウイルスB19の感染系の確立について検討した。

B. 研究方法

(1) HBV の濃縮・高感度検出法の開発

1) HBV と HBs 抗原の濃縮

ポリ-L-リジン(PLL)コート磁気ビーズはカルボキシル基を持つ磁気ビーズ(粒径 1 μm)に、PLL を水溶性カルボジイミド存在下でカップリングして作製した。HBV の濃縮は以下のように行った。まず検体 2ml に PLL 磁気ビーズ 2mg (最終濃度 1mg/ml) を添加し、これに 1.1M 酢酸亜鉛溶液を 30 μl 混合して 5 分間静置し、ウイルスと磁性粒子表面のポリ-L-リジンとの凝集体を形成させた。これを磁気スタンド上に 5 分間静置し、血漿成分を除去した後に PBS で 2 回洗浄後、DNA 測定用には 100 μl 、HBsAg 測定用には 0.25ml の 0.4M EDTA 溶液で溶

出して濃縮液とした。

2) HBV-DNA の測定

HBV-DNA はスマイテスト EX-R&D 試薬キット((株)医学生物学研究所, 長野)を用いて、添付の操作手順書に従って抽出した。HBV-DNA は ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いた定量的 PCR 法により行い、NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) の標準品を基に調整した自家標準品を用いて作製した標準曲線を用いて定量した。なお標準曲線から求めた HBV の定量限界は 100 copies/ml 以上で、定性的な 95% 信頼限界は 60 copies/ml であった。

3) HBs 抗原の測定

HBs 抗原は、AxSYM HBsAg assay (Abbott Laboratories ; AbbottPark, IL) を用いて、添付の操作手順に従って測定した。

4) HB s 抗体の影響

ウマを用いて作成した抗 HB s 抗体(タイター: 51200IU/ml) を HBV 陽性試料に添加して検討した。(20ul: 1024mIU/ml, 35ul: 1792mIU/ml)

5) 他のウイルスの影響

HBV 濃縮に及ぼす他のウイルスの影響は、パルボ B19 (非エンベロープ DNA ウィルス)、HCV (エンベロープ RNA ウィルス) を用いて検討した。

(2) パルボウイルス B19 感染系の確立

1) パルボウイルス B19 感受性細胞の樹立
赤芽球系細胞株 Ku812 細胞を 100 ng/ml エリスロポエチン (EPO) 存在下に 96 ウェルプレートを用いて限界希釈して培養を行い、クローナルに EPO 依存的に増幅する細胞を選別した。EPO 依存的に増幅する 2 つの細胞株が得られ、それぞれ Ku812-E2 及び Ku812-E4 とした。

2) パルボウイルス B19 の感染

$10^2 \sim 10^5$ コピー/ml になるようにヒト血漿由来パルボウイルス B19 を 2% ウシ胎児血清 (FCS) 含有 RPMI1640 培地で希釈し、Ku812-E2 及び Ku812-E4 細胞と 1 時間培養した。その後、遠心により細胞を沈殿させ、未感染のウイルスを除去した後、10% FCS RPMI1640 培地、ASF104 無血清培地、GIT 無血清培地に再び細胞を懸濁して培養を続けた。

3) パルボウイルス B19 感染時の抗パルボウイルス B19 抗体の影響

2) で示した感染条件下に、さらに抗パルボウイルス B19 抗体を添加した条件下と比較した。それ以外の条件は同一であった。

倫理面への配慮

動物実験を行う際には、動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施した。また、ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で研究を

実施した。

C. 結果

1) HBV の濃縮・高感度検出法の開発

現在、HBV 感染症のスクリーニング検査には HBV 表面抗原 (HBsAg) 検査、HBc 抗体検査を実施し適合を確認した上で、より高感度な核酸増幅検査 (以下 NAT) によるスクリーニング検査が実施されている。しかし、近年、HBs 抗原陰性にもかかわらず血中や組織中に HBV-DNA が認められる、いわゆるオカルト HBV (潜伏性 HBV) 感染の存在が大きな問題となってきている。従来、HBs 抗原が陰性で、HBs 抗体、HBc 抗体の両者あるいはいずれか一方が陽性である場合は、HBV の一過性感染経過後または HBV キャリアからの離脱後 (HBV 感染の既往) の状態と考えられていた。しかし近年、このような状態にある人の肝臓の中には、ごく微量の HBV が持続感染し、血液中でもごく微量の HBV が存在し続けており、移植により感染する可能性があることが明らかになってきた。今回、このようなごく微量の HBV を検出するための方法として、2 価金属イオン存在下でウイルスと凝集体を形成するポリ-L-リジン (PLL 磁気ビーズ) によりウイルスを濃縮後に検出する方法を検討した。

まず、種々の濃度の HBV を種々の濃度で含む溶液を調製し、PLL 磁気ビーズによる HBV DNA の濃縮効率を検討した。(Table 1)。HBV の濃度が 10^3 copies/ml から 10^6 copies/ml において、HBV は PLL 磁気ビーズで濃縮されるが、HBV のコピー数が増加するにつれて、濃縮効率は 0.76 から 0.49

に低下した。

PLL 磁気ビーズによる HBsAg の濃縮を Fig.1 に示す。高タイターの試料 (s/n 比 266.03) では 1000 倍希釈すると検出限界以下 (s/n 比 1.16) となったが、この希釈液を PLL 磁気ビーズにより 8 倍濃縮すると HBsAg の検出が陽性 (s/n 比 3.24) となった。低濃度の試料 (s/n 比 11.91) でも同様に、10 希釈により検出限界以下 (s/n 比 1.69) となった試料を PLL 磁気ビーズにより 8 倍濃縮すると検出陽性 (s/n 比 4.36) となった。さらに、陰性の試料 (s/n 比 1.66) について PLL 磁気ビーズにより 8 倍濃縮したところ、検出可能 (s/n 比 3.49) となった。濃縮の効率は高濃度試料で約 0.64、低濃度試料で約 0.59 であった。

次に、HBV の PLL 磁気ビーズ濃縮に及ぼす HBs 抗体の影響を検討した (Table 2)。PLL 磁気ビーズによる HBV DNA の 10 倍濃縮の際、抗体を添加しないと濃縮効率が 0.72 であるのに対し、抗 HBs 抗体を添加することにより濃縮効率が 1 倍以上に改善された。しかし、抗 HBs 抗体を添加すると、HBsAg の検出は阻害された (data not shown)。

HBV の PLL 磁気ビーズ濃縮時に他のウイルスが共存する場合の影響を検討した (Table 3)。HBV を正常血漿、HCV 陽性血漿 (10^6 copies/ml)、またはパルボウイルス B19 陽性血漿 (RHA (receptor-mediated haemagglutination assay) 法で²¹⁾で希釈後、PLL 磁気ビーズで濃縮を行ったところ、濃縮効率に差は認められなかった。なお、パルボ B19 はエンベロープがないため PLL 磁気ビーズでは濃縮されないが、HCV RNA は PLL 磁気ビーズにより定量的に濃縮する

ことが可能である。

以上の結果から、ごく微量の HBV を含む血漿から PLL 磁気ビーズを用いることにより HBV を濃縮して HBV DNA 及び HBsAg を高感度に検出することが可能であること、濃縮の際、HBV 表面抗原に対する抗体を共存させるとより濃縮効率が向上すること、HCV やパルボウイルス B19 が共存しても HBV の濃縮が可能であることが示された。

なお本濃縮法については、埼玉県赤十字血液センターにおいて、HBcAb 陽性、HBsAg 陰性の献血血液を用いて実用性を検証した。その結果、これまでの NAT 検査で HBV DNA が陰性であった 61 検体中 25 検体で、PLL 磁気ビーズ濃縮により HBV-DNA が新たに検出されること、また、HBsAg 陰性の 78 検体中 29 検体で PLL 磁気ビーズ濃縮により HBsAg が新たに検出されることを確認した。以上の結果より、PLL 磁気ビーズ濃縮がごく低濃度の HBV の濃縮・高感度検出に有用であり、オカルト HBV 感染でも検出可能であることが実証された。

2) パルボウイルス B19 の感染系の確立

パルボウイルス B19 は網状赤血球細胞でのみ増幅すると言われている。そこで、エリスロポエチン (EPO) 存在下に赤芽球系細胞株 Ku812 細胞を限界希釈して培養を行い、クローナルに EPO 依存的に増幅する細胞を選別した。その結果、EPO 依存的に増幅する 2 つの細胞株 Ku812-E2 及び Ku812-E4 が得られた。これらの細胞は、クローニングに 1 ヶ月を要し、さらに 2 ヶ月間の培養を行っても EPO 依存的な増幅能は維持されていた。また、網状赤血球細胞様

の特性は培養後沈殿させた細胞がヘモグロビンを含んでいることから確認された (Fig.2, 3)。

パルボウイルス B19 を Ku812-E2 細胞及び Ku812-E4 細胞に感染させたところ、両細胞とも細胞変性は起こらなかった。そこで、持続感染している可能性が考えられたために、経時的に細胞を含む培養液から DNA を抽出し、パルボウイルス B19 のコピー数の変化を測定した。その結果、両細胞とも培養の時間経過と共にパルボウイルス B19 のコピー数が増加することが明らかになった。また、Ku812-E4 細胞よりも Ku812-E2 細胞の方がより高いコピー数の増加が認められたことから、以後の検討では Ku812-E2 細胞を用いた (Fig.4)。また、培養上清と細胞から DNA を抽出し、コピー数の比較を行ったところ、培養初期では細胞上清に含まれるウイルス量は細胞とそれほど大きな差はなかった (細胞を除去することによりコピー数は 1/3 ほどに減少した)。細胞あたりの感染ウイルス量が多いほど上清中のウイルス量は増加するものの、細胞との比率はむしろ減少していき、上清に見出されたのは細胞に含まれるウイルス量の約 1/5 量程度であった (Fig.4, Day2 と Day2 sup)。

以上の結果から、Ku812-E2 細胞を用いたパルボウイルス B19 感染系を確立することができたが、本感染系では細胞変性作用 (CPE) は認められず、持続感染系であることが明らかとなった。また、細胞の増幅と共にパルボウイルス B19 も増幅し、一部が細胞上清に放出されるものと考えられた。また、細胞内に含まれるパルボウイルス B19 の感染性が維持されているか確認する

ために、パルボウイルス B19 を感染させた細胞を沈殿させ、低張処理により細胞を破碎し、その上清を再び Ku812-E2 細胞に感染させた。その結果、それほど高い感染性ではないが、再び持続感染させることが可能であった。

次に、Ku812-E2 細胞でのパルボウイルス B19 の増幅に最も適した条件を検討した。Fig.5 に示すように、無血清培地と FCS 含有培地ではウイルスの増幅に大きく差が認められた。ASF104 無血清培地では細胞そのものの増幅が高くないが、GIT 無血清培地では細胞の増幅は血清存在下と同等であったことより、血清培地でのパルボウイルス B19 の高い増幅作用は別の要因が考えられた。以降の検討は 10%FCS 含有培地を用いて行った。

次に、パルボウイルス B19 感染における抗パルボウイルス B19 抗体の影響について検討した。Fig.6 に示すように、抗体存在下に感染させた場合には、パルボウイルス B19 の持続感染は殆ど認められなかった。このことは、十分なパルボウイルス抗体が存在するのであればパルボウイルス B19 の感染性はそれほど高くないと考えられる。

D. 考察

1) HBV の濃縮・高感度検出法の開発

HBV の濃縮・高感度検出法として、PLL 結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法を開発し、PLL 磁気ビーズを用いることにより、ごく微量の HBV を含む血漿から HBV を濃縮して HBV DNA 及び HBsAg を高感度に検出することが可能であり、低濃度キャリアの高感度ウイルススクリーニング法としての有用性を確認した。これまで HBV