

表6 プロテオーム解析により検出された各種 CD 抗原と間葉系幹細胞特異的表面抗原

CD antigen	proteome解析	hMSCマーカー
CD13	+	+
CD14	-	-
CD29	+	+
CD34	-	-
CD44	+	+
CD45	-	-
CD51	+	
CD59	+	
CD63	+	
CD71	+	+
CD73	+	+
CD81	+	
CD90	+	+
CD91	+	
CD98	+	
CD105	-	+
CD107a	+	+
CD107b	+	+
CD166	+	+
CD225	+	
CD280	+	
CD298	+	

細胞組織加工医薬品の同等性評価法の開発

分担研究者 川崎ナナ（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部室長）

研究要旨 細胞組織加工医薬品の同等性評価法の開発の一環として、培養条件が異なる間葉系幹細胞（MSC）の糖鎖プロファイリングを行い、同等性評価指標候補となる糖鎖構造を明らかにした。また、MSCの分化能保持予測法の開発のための基礎的研究として、MSCの軟骨、骨及び脂肪細胞への分化を定量的に評価する方法、並びに研究目的に適した神経分化誘導方法について確認した。

協力研究者

橋井則貴 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 研究員
黄 笑宇 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 非常勤職員
篠原 聡 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 非常勤職員

A. 研究目的

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の開発が活発化している。本格的な実用化のためには、細胞の同等性評価、並びに分化能保持予測法の開発が急務である。細胞表面は様々な糖タンパク質で覆われており、糖タンパク質の糖鎖の構造と分布は、細胞の環境、分化等の性質の変化、及びがん化によって大きく変動することが明らかにされている。従って、細胞表面糖鎖を細胞の同等性の評価、並びに分化能保持予測に利用できる可能性は高い。

間葉系幹細胞（MSC）は、再生医療への

応用が期待される多分化能を有する細胞であり、これまでに軟骨、骨、脂肪細胞及び、神経細胞に分化誘導することが知られている。しかし、同等性評価法が確立されていないことや、適切な細胞分化能予測法が確立されていないなど、実用化に向けていくつもの課題が残されている。

本研究の目的は、糖鎖を利用したMSCの同等性評価、並びに分化能保持予測法の開発である。本年度は第1に、独自に開発した細胞糖タンパク質糖鎖プロファイリング技術を用いて、培養条件が異なるMSCの糖鎖プロファイリングを行い、細胞同等性評価指標となる糖鎖マーカーの探索を行った。第2に、MSCの分化能保持予測用糖鎖マーカーの探索のための基礎的研究として、MSCの骨、軟骨、及び脂肪細胞への分化を定量的に評価する方法について検討した。神経分化については、現在までに確立された分化誘導法がないことから、研究目的に合った分化誘導法について検討した。

B. 研究方法

1) 細胞及び試薬

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) は理化学研究所バイオリソースセンター (RIKEN BRC CELL BANK) より供与された。Mesenchymal stem cell growth medium (MSCGM) は Lonza、MF-medium は東洋紡績株式会社より購入した。Peptide-N-glycosidase F (PNGase F) は、Roche から購入した。

2) 細胞培養

MSC は MSCGM (基礎培地 MSCBM に Mesenchymal cell growth supplement、L-glutamine、GA-1000 を添加) で培養した (5%CO₂, 37°C)。セミコンフルエントまで培養し、EDTA 添加 PBS で洗浄を行い、Trypsin-EDTA (GIBCO) により細胞を剥離した後、約 2×10⁶ 個ずつの細胞を播種して継代培養を行った。また、無血清培地については MF-medium (ウシ胎仔血清 (FCS)、Growth factor supplement 添加) で 24 時間培養した後、FCS を除いた MF-medium に置換して培養した。培地交換は 2 から 4 日間に 1 回の頻度で行った。回収した細胞をプロテアーゼインヒビター (protease inhibitor mix DMSO solution、Sigma) 添加 PBS で 3 回洗浄した。

3) 膜画分の調製

洗浄済み MSC (1 × 10⁷ 個) をプロテアーゼインヒビター添加 0.25 M ショ糖/10 mM Tris-HCl 緩衝液 (100 µl, pH 7.4) に懸濁させ、4°C で 30 秒間の超音波処理 (40W, 2 回) を行った。核を遠心分離 (4°C,

900 ×g, 10 分) により除去した後、細胞膜画分を超遠心分離 (4°C, 100,000 ×g, 60 分) により沈殿させた。膜画分は 150 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (100 µl, pH 7.4) に懸濁させて、超音波処理及び超遠心分離を行いショ糖を除去した。得られた沈殿に残存する酢酸アンモニウムは Speed Vac. により除去した。

4) 還元アルキル化タンパク質の調製

乾燥させた沈殿物を 500 µl の 8 M グアニジン-HCl / 0.5 M Tris-HCl (pH 8.6) に溶解させた。この溶液に 20 µl の 1 M dithiothreitol (DTT, 終末 40 mM) を加えて 65°C で 30 分間、遮光下で加熱し、タンパク質を還元した。次いで、48 µl の 1 M モノヨード酢酸ナトリウム (終末 96 mM) を加えて室温、暗所で 40 分間反応させて、システイン残基のチオール基をカルボキシメチル化した。反応終了後、溶液を透析 (セルロースチューブ 20/32; 透過分子量, 14,000 Da; 三光純薬) により脱塩した。還元アルキル化タンパク質は凍結乾燥により回収した。

5) 糖鎖の切り出し及び還元糖鎖の調製

得られた還元アルキル化タンパク質を 500 µl の 100 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解させた後、10 unit の PNGase F を加えて、37°C で 2 日間反応させて、N-結合型糖鎖を切り出した。反応溶液に、冷エタノール (終末 70%) を加えて、-20°C で 2 時間インキュベートした後、遠心分離 (4°C, 8,000 ×g, 15 分) によりタンパク質を除去した。遊離した N-結合型糖鎖を含む上清を Speed

Vac により乾燥させた後、沈殿物を 500 μ l の H₂O で再溶解させた。試料溶液中の糖鎖の回収は、グラファイトカーボン樹脂を固定相とした ENVI Carb C カートリッジ (Supelco, PA, USA) を用いて行なった。カートリッジは 1 ml の 100% アセトニトリル、50% アセトニトリル及び H₂O で、それぞれ 2 回ずつ洗浄した。試料溶液を注入して、糖鎖を樹脂に吸着させた。1 ml の H₂O で樹脂を洗浄した後、1.5 ml の 45% アセトニトリル溶液で糖鎖を溶出させた。得られた溶液の Speed Vac 及び凍結乾燥により糖鎖を回収した後、500 μ l の 0.5 M NaBH₄ 溶液を加えて、糖鎖を溶解させた後、室温で 16 時間還元した。還元糖鎖は、ENVI Carb C カートリッジを用いて再度精製した。

5) LC/MS

nanoLC は NanoFrontier nLC (日立ハイテクノロジー) を使用し、カラムはグラファイトカーボンカラム (0.075 x 150mm, 5 μ) を用いた。溶離液として、2% アセトニトリルを含む 5 mM 炭酸水素アンモニウム溶液 (A 溶媒) 及び 80% アセトニトリルを含む 5 mM 炭酸水素アンモニウム溶液 (B 溶媒) を使用した。糖鎖は流速 200 nl、2-90%B 緩衝液 (60 分) のグラジエント条件で溶出した。MS 装置はナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源 (AMR) を接続した Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR-MS, LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific) を使用し、ポジティブイオンモード及びネガティブイオンモードを測定

中に切り換えながらデータを取得した。シングル MS スキャンは、FT-MS モードで、MSⁿ スキャンは IT-MS モードで行なった。キャピラリー温度は 275°C、スプレー電圧は 2.5ekV、スキャン範囲は m/z 600-2,000 に設定した。MSⁿ の衝突エネルギー (コリジョンエネルギー) は 35% に設定した。一回に 5 μ l (2×10^6 個細胞) の試料溶液を LC/MS に注入した。

6) 軟骨分化とグリコサミノグリカン (GAG) 定量

6-1) 軟骨への分化誘導

D-MEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, 1:1 Mixture, Invitrogen) に ITS Liquid Media Supplement (Sigma-Aldrich) 及び Penicillin-Streptomycin-Glutamine 及び StemXVivo Chondrogenic Supplement (R&D Systems) をそれぞれの終濃度が 1% になるように添加したものを軟骨分化誘導培地として用いた。セミコンフルエントまで培養した MSC を、軟骨分化誘導培地に懸濁させた後、15 ml のコニカルチューブに 2.5×10^6 個の細胞を播種した。200 \times g で 5 分間遠心した後、インキュベーター (5% CO₂, 37°C) で 21 日間分化誘導培養した。培地交換は 2~3 日間に 1 回の頻度で行った。

6-2) 軟骨細胞由来 GAG の定量

軟骨細胞により生成された GAG は、Sulfated Glycosaminoglycan Quantitation Kit (生化学工業) を用いて定量した。分化誘導後に生成された不溶性物質 (軟骨) をプロテアーゼで消化 (55°C、2

時間) した後、10 時間の煮沸処理により酵素反応停止させた。GAG を 1, 9-Dimethylmethylene Blue と反応(遮光、常温、5 分間)させた後、Microplate Spectrophotometer (SpectraMax Plus 384 Molecular Devices) を用いて、530 nm における吸光度を測定した。別に作成した硫酸化 GAG 標準原液(サメ軟骨由来、1,000 $\mu\text{g/ml}$) の検量線を用いて、軟骨細胞中の GAG 濃度を算出した。

7) 骨分化とカルシウム定量

7-1) 骨への分化誘導

骨分化誘導基礎培地は α -MEM 培地 (α -Minimum Essential Medium, Invitrogen) に 10% FCS 及び 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine を添加したものを用いた。骨分化誘導培地は骨分化誘導基礎培地に 1% の StemXVivo Osteogenic Supplement (R&D Systems) を添加したものを使用した。

骨分化誘導基礎培地を用いて MSC をセミコンフルエントまで培養した後、 4.2×10^3 cell/cm² の濃度で 24 ウェルマイクロプレート (IWAKI) に播種し、50~70% コンフルエントに達するまで培養した (5% CO₂, 37°C)。骨分化誘導培地に置換した後、21 日間分化誘導培養した。培地交換は 3~4 日間に 1 回の頻度で行った。

7-2) 骨細胞由来カルシウムの定量

骨細胞により生成されたカルシウムは、Stanbio Total Calcium Liquicolor Kit (Stanbio Laboratory) を用いて定量した。まず、分化誘導した骨細胞を 0.5 M HCl を用いて 24 ウェルマイクロプレートから 1.5

ml チューブに移した後、4°C で 20 時間の攪拌により細胞溶解液を調製した。次に、細胞溶解液を 500 \times g で 2 分間遠心分離し、得られた上清中に含まれるカルシウムを Total Calcium Color Reagent 及び Total Calcium Base Reagent を用いて、室温、1 分間発色させた後、Microplate Spectrophotometer を用いて、550 nm における吸光度を測定した。骨細胞中のカルシウム濃度は、別に作成したカルシウム標準液の検量線を用いて算出した。

8) 脂肪細胞分化と脂肪定量

8-1) 脂肪細胞への分化誘導

脂肪分化誘導基礎培地として、10% FCS 及び 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine 添加し α -MEM 培地を用いた。脂肪分化誘導培地は脂肪誘導基礎培地に 1% の StemXVivo Adipogenic supplement (R&D Systems) を添加したものを用いた。脂肪誘導基礎培地を用いて MSC をセミコンフルエントまで培養した後、 2.1×10^4 cell/cm² の濃度で 24 ウェルマイクロプレート (IWAKI) に播種し、100% コンフルエントに達するまで培養した (5% CO₂, 37°C)。脂肪分化誘導培地に置換した後、21 日間分化誘導培養した。培地交換は 3~4 日間に 1 回の頻度で行った。

8-2) 脂肪細胞由来脂肪の定量

脂肪細胞により生成された脂肪は、Adipogenesis Assay Kit (Cayman Chemical) を用いて定量した。まず、分化誘導した脂肪細胞に固定液を添加した後、15 分間インキュベートした。反応終了後、

細胞を洗浄した後、Oil Red で 20 分間染色した後、Microplate Spectrophotometer を用いて、500 nm における吸光度を測定した。

9) 神経細胞分化

9-1) 神経細胞への分化誘導

神経細胞分化誘導基礎培地は、15% FCS、1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine 及び 1% Sodium pyruvate を添加した Prime DMEM Low-glucose (Prime D-Minimum Essential Medium, Invitrogen) 培地を使用した。神経細胞分化誘導プレ培地は 20% FCS、1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine 及び 10 ng/ml FGF 添加 Prime DMEM Low-glucose 培地を使用した。神経細胞分化誘導培地は Prime DMEM Low-glucose 培地に 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine、20ng/ml bFGF、25 mM KCl、100 mM Putrescine、30 nM Sodium selenite、2% Dimethyl sulfoxide、100 mM Butylated hydroxyanisole、20 nM Progesterone、5 mg/ml Insulin、100 mg/ml Transferrin を添加したものをを用いた。神経細胞分化誘導基礎培地を用いて MSC をセミコンフルエントまで培養した後、 5.0×10^3 cell/cm² の濃度で 12 ウェルマイクロプレート (IWAKI) に播種した。70~80% コンフルエントに達するまで培養 (5%CO₂, 37°C) した後、神経細胞分化誘導プレ培地で 1 日間プレ培養した後、神経細胞分化誘導培地で分化誘導を行った。

9-2) 神経細胞の免疫蛍光染色

免疫蛍光染色は、神経細胞の分化マーカー

一として知られている Nestin、βIII-Tublin、MAP2 及び TrkA に対して行なった。

Nestin の検出には、一次及び二次抗体として、それぞれ Anti-Human Nestin (N1602) Rabbit IgG Affinity Purify (免疫生物研究所) 及び Goat F(ab') Fragment Anti-Rabbit IgG (H+L)-TRITC (Beckman Coulter, Inc.) を使用した。MAP2 の検出には、一次抗体として Mouse Anti-MAP2 Monoclonal Antibody (Chemicon) を、二次抗体として FITC-Monoclonal Rat Anti-Mouse IgG1 (Invitrogen) 及び Alexa Fluor 555 Goat anti-Mouse IgG1 (Molecular Probes) を用いた。βIII-Tublin の検出には、一次抗体として Neuron specific beta III Tubulin antibody (TUJ-1) (Abcam) を、二次抗体として FITC-Rat anti-Mouse IgG2a (BD Biosciences) 及び Alexa Fluor 555 Goat anti-Mouse IgG2a (Molecular Probes) を使用した。TrkA の検出には、一次及び二次抗体として Goat IgG Anti-human TrkA Antibody (R&D Systems) 及び Rabbit anti-Goat IgG (whole molecule)-FITC を用いた。

12 ウェルマイクロプレートで分化誘導した細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定(37°C、15min)した後、0.2% TritonX で処理した。5% BSA 溶液を用いて室温下、15 分間ブロッキングした。5% BSA 溶液で希釈した一次抗体で 37°C、2 時間インキュベートした後、5% BSA 溶液で希釈した二次抗体で 37°C、1 時間インキュベートした。Prolong Gold Antifade Reagent with DAPI Special (Invitrogen) で封入した後、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (LSM 510 Carl Zeiss) により観察した。

C. 結果

1) MSC 細胞の同等性評価指標の探索—培養条件が異なる MSC の糖鎖プロファイリング

これまでに我々は、FCS 添加培地と無血清培地を用いて培養したヒト前骨髄性白血病細胞 (HL60-RG) では、糖鎖プロファイルが異なり、一方に特異的な糖鎖が存在することを見出している。そこで、MSC の同等性評価指標となる糖鎖を探索する目的で、10% FCS 添加培地及び無血清培地で培養した MSC の糖鎖プロファイリングを実施した。

1-1) 10% FCS 添加培地で培養した MSC 由来 N-結合型糖鎖のプロファイリング

はじめに、10% FCS 添加培地で培養した MSC から N-結合型糖鎖を遊離させ、LC/MS による糖鎖プロファイリングを行った。Fig. 1A は、ポジティブイオンモードのシングル MS スキャンにより得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) である。Fig. 1B-1E に、それぞれ高マンノース、パウチマンノース、混成型、及び複合型 2 本鎖糖鎖の分布、並びにプロトン化分子の精密質量及び MS/MS ~ MS/MS/MS/MS によって得られたフラグメントイオンから推定された糖鎖構造を示す。

約 25~29 分付近 (ピーク 1~7) に検出された糖鎖は、高マンノース型糖鎖 M9、M8、M7(1, 2)、M6、M9+Hex 及び M5 (Hex₉₋₅HexNAc₂(M5-9) 及び M9 + Hexose (Hex)) と帰属された (Fig. 1B)。高マンノース型糖鎖の中で、結合の比率の高い糖鎖は

M8 (ピーク 2) 及び M9 (ピーク 3) であった。また、M7 には 24.9 分 (ピーク 1) 及び 26.1 分 (ピーク 4) に溶出される 2 種類の異性体が存在することが分かった。

側鎖を持たない低分子量糖鎖はパウチマンノース型糖鎖と呼ばれている。パウチマンノース型糖鎖として、3 分子の Hex と 2 分子の N-acetylhexosamine (GlcNAc) からなるトリマンノシルコアと思われる糖鎖 (Hex₃HexNAc₂、ピーク 8)、deoxyhexose (dHex) が付加し、1 分子の Hex を欠いたトリマンノシルコア (dHex₁Hex₂HexNAc₂、ピーク 9)、及び 1 分子の dHex が付加したトリマンノシルコア (dHex₁Hex₃HexNAc₂、ピーク 10) の 3 種類の糖鎖が確認された (Fig. 1C)。

NeuAc が結合した混成型糖鎖としては、4~6 分子の Hex、3 分子の HexNAc からなる Hex₅HexNAc₃NeuNAc₁ (ピーク 11)、Hex₄HexNAc₃NeuNAc₁ (ピーク 13) 及び Hex₆HexNAc₃NeuNAc₁ (ピーク 14) が確認された。一方、NeuNAc が付加していない混成型糖鎖として、(Hex₄HexNAc₃(1) (ピーク 12)、Hex₅HexNAc₃ (ピーク 15) 及び Hex₄HexNAc₃(2) (ピーク 16)) が帰属された (Fig. 1D)。

複合型 2 本鎖糖鎖では、非還元末端に 1~2 分子の NeuNAc が付加した糖鎖 (Hex₅HexNAc₄NeuNAc₁ 及び Hex₅HexNAc₄NeuNAc₂(1), (2)) (ピーク 17~19) が確認された (Fig. 1E)。また、還元末端の HexNAc に dHex が付加したシアリル糖鎖 (dHex₁Hex₅HexNAc₄NeuNAc₁(1), (2) 及び dHex₁Hex₅HexNAc₄NeuNAc₂(1), (2)) (ピーク 20, 22-24) も帰属された。一方で NeuAc 及び dHex のどちらも付加してい

ない糖鎖 (Hex₅HexNAc₄, ピーク 21) の存在も確認された。

複合型 3 及び 4 本鎖糖鎖の構造は、ネガティブイオンモードで測定したスペクトルから推定した。Fig. 2A、2B 及び 2C は、それぞれネガティブイオンモードで得られた TIC、3 本鎖糖鎖及び 4 本鎖糖鎖の分布である。非還元末端に 1~3 分子の NeuNAc が付加した 3 本鎖糖鎖として、Hex₆HexNAc₅NeuAc₁(1-2)、Hex₆HexNAc₅NeuAc₂(1-2) 及び Hex₆HexNAc₅NeuAc₃ が確認された。また、NeuNAc が付加していない 3 本鎖糖鎖として、Hex₆HexNAc₅、さらに、還元末端の HexNAc に dHex が付加した糖鎖として (dHex₁Hex₆HexNAc₅NeuNAc₁(1-2)、dHex₁Hex₆HexNAc₅NeuNAc₂(1-2) 及び dHex₁Hex₆HexNAc₅NeuNAc₃) (ピーク 30-34) が帰属された。

確認された 4 本鎖糖鎖 (ピーク 35-40) は、いずれも還元末端 HexNAc に dHex が付加していることが示唆された。また非還元末端には、0~4 分子の NeuNAc が付加していることも明らかとなった (dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuAc₀₋₄)。

我々は先に、FCS を添加した培地で HL-60RG を培養すると、NeuAc の約 0.1% が NeuGc に置換されることを報告している。そこで、FCS 添加培地で培養した MSC に NeuGc 付加糖鎖が存在するかどうかを明らかにするため、NeuGc 付加糖鎖を探したところ、25.6 分及び 24.7 分 (ピーク 41 及び 42) に 1 分子の NeuGc が付加した 2 本鎖糖鎖 (Hex₅HexNAc₄NeuGc₁) 及び 1 分子ずつの NeuAc 及び NeuGc が付加した 2 本鎖糖鎖 (Hex₅HexNAc₄NeuAc₁NeuGc₁)

(Fig.3A)、及び 1 分子の NeuGc が付加した 3 本鎖糖鎖 (Hex₆HexNAc₅NeuNAc₂NeuNGc₁) が存在することが明らかとなった (Fig. 3B)。以上のように、MSC を FCS 添加培地で培養すると NeuAc の一部が NeuGc に置換されることが示唆された。

1-2) 無血清培地で培養した MSC 由来 N-結合型糖鎖のプロファイリング

次に、無血清培地で培養した MSC の糖鎖プロファイリングを行なった。Fig. 4A はポジティブイオンモードにより得られた TIC で、糖鎖全体の分布を示している。Fig. 4B は、高マンノース型糖鎖及び M9+Hex の分布を示している (ピーク 1'・7')。FCS 添加培地で培養した MSC の糖鎖プロファイル (Fig. 1B) と比べて、大きな違いはみられなかった。

Fig.4C はパウチマンノース型糖鎖の分布を示している。27.3、28.0 及び 30.2 分 (ピーク 8'・10') の糖鎖は、それぞれ Hex₃HexNAc₂、dHex₁Hex₂HexNAc₂ 及び dHex₁Hex₃HexNAc₂ と帰属された。FCS 添加培地で培養した MSC の糖鎖プロファイル (Fig.1C) と比較すると、dHex₁Hex₃HexNAc₂ (ピーク 10') の割合が僅かに高いことが明らかになった。

混成型糖鎖としては、ピーク 11'・15' に Hex₄HexNAc₃(1)、Hex₅HexNAc₃NeuNAc₁、Hex₄HexNAc₃NeuNAc₁、Hex₆HexNAc₃NeuNAc₁ 及び Hex₅HexNAc₃ が検出された (Fig. 4D) FCS 添加培地で培養した MSC では、2 種類の Hex₄HexNAc₃ が検出されたが、無血

清培地で培養した MSC からは、一方の Hex₄HexNAc₃(ピーク 12') の存在しか確認できなかった。

Fig. 4E は、複合型 2 本鎖糖鎖の分布を示している。検出された糖鎖は、Hex₅HexNAc₄NeuAc₂(1,2)(ピーク 17', 22')、Hex₅HexNAc₄NeuAc₁ (ピーク 18')、dHex₁Hex₅HexNAc₄NeuAc₁(1, 2)(ピーク 20', 23')、Hex₅HexNAc₄ (ピーク 21') 及び dHex₁Hex₅HexNAc₄NeuAc₂ (ピーク 24') であった。FCS 添加培地で培養した MSC の糖鎖プロファイル (Fig. 1E) と比較すると、モノシリアル 2 本鎖糖鎖 (Hex₅HexNAc₄NeuAc₁(ピーク 18')) の比率が相対的に低下していることが分かった。

Fig. 5A はネガティブイオンモードで得られた TIC である。3 本鎖糖鎖及び 4 本鎖糖鎖の分布をそれぞれ Fig. 5B 及び Fig. 5C に示す。3 本鎖糖鎖と帰属された糖鎖は、Hex₆HexNAc₅NeuNAc₁(1, 2)(ピーク 25', 29')、Hex₆HexNAc₅NeuNAc₂(ピーク 26')、Hex₆HexNAc₅NeuNAc₃(ピーク 27')、Hex₆HexNAc₅(ピーク 28')、dHex₁Hex₆HexNAc₅NeuNAc₂(1, 2, 3)(ピーク 30', 33', 34')、dHex₁Hex₆HexNAc₅NeuNAc₃(ピーク 31') 及び dHex₁Hex₆HexNAc₅NeuNAc₁(2)(ピーク 32') であった。FCS 添加培地で培養した場合と比べて、トリシリアル 3 本鎖糖鎖 (Hex₆HexNAc₅NeuAc₃) が著しく減少することが明らかとなった (Fig. 2B 及び Fig. 5B)。これに対して、主な 4 本鎖糖鎖は、dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuNAc₁(1,2)(ピーク 35', 40')、dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuNAc₃(ピーク 36')、dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuNAc₂(ピーク 37')、

dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuNAc₄(ピーク 38') 及び dHex₁Hex₇HexNAc₆(ピーク 40') と、FCS 添加培地で培養した MSC と同じであり、結合比率にも顕著な差はみられなかった (Fig. 2C 及び 5C)。

以上のように、無血清培地及び FCS 添加培地のどちらで培養しても、MSC の主要な糖鎖の構造に差は見られなかった。しかし、一部の糖鎖の比率が変化することが明らかになったので、次に、すべての糖鎖に占める各糖鎖の割合 (%) をピーク面積から算出し、両者を比較した (Fig. 6)。

その結果、FCS 添加培地及び無血清培地のどちらを用いた場合でも、M8 及び M9 が全体の約 3 割を占めており、両糖鎖は培地変更にかかわらず MSC の主要糖鎖であることがわかった。その他の高マンノース型糖鎖は、無血清培地を使用すると、M9 + Hex (Hex₁₀HexNAc₂) の割合が約 8 倍に増加することが示唆された。

パウチマンノース型糖鎖を比べると、無血清培地で培養した MSC では、dHex が付加した糖鎖 (dHex₁Hex₂HexNAc₂ 及び dHex₁Hex₃HexNAc₂) が 1.5~2.0 倍に増加していることが明らかになった。

混成型糖鎖においては、FCS 添加培地で培養した細胞では複数の糖鎖が認められるのに対して、無血清培地で培養することによって、多様性がなくなり、ほぼ NeuAc 付加糖鎖 (Hex₅₋₆HexNAc₃NeuNAc₁) になることが明らかとなった。

さらに大きな差が、複合型糖鎖に認められた。FCS 添加培地で培養した MSC の糖鎖の、13% はモノシリアル 2 本鎖糖鎖 (Hex₅HexNAc₄NeuAc₁ (ピーク 18)) であ

ったが、無血清培地で培養すると2%にまで低下した。同様に、10%を占めていたトリシアリル3本鎖糖鎖(Hex₆HexNAc₅NeuAc₃、ピーク27)も、無血清培地の使用によって、1%と大幅に減少することが明らかになった。その他の複合型糖鎖においても、FCS添加培地で培養したMSCに結合していたジシアリル2本及び3本鎖糖鎖(dHex₁Hex₅HexNAc₄NeuAc₁(1,2)(ピーク20, 20', 23及び23')及びdHex₁Hex₆HexNAc₅NeuAc₂(ピーク30, 30')が約20%程度にまで低下していることが確認された。

このように、FCS添加培地で培養したMSCと無血清培地で培養したMSCの糖鎖分布には大きな差があり、特に、ある種のシアリル2本鎖及び3本鎖糖鎖が、同等性を評価する指標となり得ることが示唆された。

2) MSCの分化能保持予測指標の探索のための基礎的研究

MSCの分化能(軟骨、骨、脂肪及び神経細胞)予測指標を探索するにあたって、はじめに、MSCの分化を定性的・定量的に評価する方法を確立しておく必要がある。そこで初年度は、軟骨、骨、及び脂肪細胞への分化を形態学的に評価する方法及び特異的マーカーを用いて定量的に評価する方法について検討した。また、確立された分化誘導方法がない神経細胞については、形態学観察及び分子マーカーを用いた解析を行うことにより、文献で報告されている分化誘導方法が、本研究目的に合致しているか

どうかの評価を行った。

2-1) 軟骨、骨、及び脂肪細胞への分化を形態学的に評価する方法及び特異的マーカーを用いた定量的評価法の検討

Fig. 7A-7Dは、それぞれ分化誘導前のMSC、軟骨細胞誘導後に形成された不溶性凝集塊軟骨、骨に分化誘導後、及び脂肪細胞に分化誘導後の顕微鏡写真である。MSCを軟骨細胞へ分化誘導すると、2日目から細胞は丸みを帯び始め、分化誘導後20日後になると球状の凝集塊(軟骨)が形成された(Fig. 7B)。骨細胞への分化誘導では、14日目からミネラルの沈着が観察され、21日目には、細胞の約70%にミネラルの沈着がみられた(Fig. 7C)。脂肪細胞への分化では、誘導開始7日目から脂肪滴が観察され始め、21日目にはほぼ全ての細胞で脂肪滴の蓄積が観察された(Fig. 7D)。次に、これら軟骨、骨及び脂肪細胞への分化を定量的に評価する方法について検討した。

2-1-1) グリコサミノグリカン定量による軟骨細胞分化能評価法の検討

軟骨細胞は、コンドロイチン硫酸等のグリコサミノグリカン(GAG)を多量に生合成するので、GAGを定量することによって、軟骨細胞への分化を定量的に評価法できると考えた。しかし、MSCを軟骨細胞に誘導すると不溶性の軟骨が形成され、均一な試料溶液を調製することが困難であった。そこでプロテアーゼにより軟骨を消化した後、GAGを定量する方法を検討した。

1.40×10^3 、 2.80×10^3 、 5.60×10^3 、 1.12×10^4 及び 2.24×10^4 個のMSCを21日間

分化誘導後、プロテアーゼで処理し、市販の Sulfated Glycosaminoglycan Quantification キットを用いて GAG 量を測定した。細胞数と GAG 生成量をプロットした結果、両者間に良好な相関性 ($R^2=0.9781$) が確認できたことから (Fig. 8)、GAG 定量法を軟骨細胞分化能評価法として利用できることが確認された。

2-1-2) カルシウムの定量による骨細胞分化能評価法の検討

骨細胞分化能をカルシウム生成量により評価する方法を検討した。 1.85×10^3 、 3.70×10^3 、 1.11×10^4 、及び 1.48×10^4 個の MSC を 24 ウェルマイクロプレートにそれぞれ播種し、分化誘導後 21 日目の生成カルシウム量を Stanobio Total Calcium LiquiColor kit を用いて測定した。その結果、細胞量と生成カルシウム量の間には良好な相関性 ($R^2=0.9153$) がみられたことから、カルシウムの定量は、骨細胞分化能評価法として利用可能であることが明らかとなった (Fig. 9A)。Fig. 9B は誘導培養後の細胞の顕微鏡写真である。播種した細胞の増加に伴いミネラル沈着量の増加が観察され、定量結果と一致することが示された。

2-1-3) 脂肪の定量による脂肪細胞分化能評価法の検討

脂肪定量による脂肪細胞分化能評価法を検証するために 9.30×10^3 、 1.48×10^4 、 4.00×10^4 、 5.55×10^4 及び 7.40×10^4 個の MSC を 24 ウェルマイクロプレートにそれぞれ播種した後、誘導培養後 21 日目の脂肪量を Adipogenesis Assay Kit を用い

て測定した。Fig. 10A に示すように細胞量と蓄積脂肪量の間には高い相関性 ($R^2=0.9911$) が確認され、本定量法を用いて脂肪細胞分化能を評価できることが確認された。また播種した細胞の増加に伴い脂肪量の増加が認められた (Fig. 10B)。

以上のように、GAG、カルシウム及び脂肪を定量することにより、それぞれ MSC の軟骨、骨及び脂肪細胞への分化能を定量的に評価できることが確認できたことから、これらの方法の応用として、5~7 継代した MSC を用いて、継代回数増加に伴う軟骨、骨及び脂肪細胞分化能の変化を解析した。

2-1-4) 継代数の異なる MSC の軟骨、骨及び脂肪細胞分化能の測定

はじめに、5~7 継代培養した R36 株 MSC (R36P5(+))、R36P6(+)) 及び R36P7(+)) を用いて、軟骨分化能を比較した。Fig. 11A に示すように、分化誘導後 21 日目の R36P5(+))、R36P6(+)) 及び R36P7(+)) の GAG 生成量は、それぞれ $1.20 \pm 0.11 \mu\text{g}$ 、 $0.95 \pm 0.23 \mu\text{g}$ 、及び $1.13 \pm 0.20 \mu\text{g}$ であり、各継代数の MSC の軟骨分化能に差異は認められなかった。

次に、同じ細胞株の骨細胞分化誘導後 21 日目のカルシウム生成量を測定したところ、それぞれ $61.00 \pm 2.86 \mu\text{g}$ 、 $43.93 \pm 5.73 \mu\text{g}$ 、 $15.55 \pm 1.28 \mu\text{g}$ であり、減少していることが分かった (Fig. 11B)。この結果は、継代培養回数の増加により MSC の骨分化能が低下することを示唆していると思われる。

さらに、同細胞株の脂肪細胞分化能を比較するために、分化誘導後 21 日目の脂肪生成量を求めた。その結果、oil red 染色によ

る吸光度 (O.D. 500 nm) はそれぞれ 2.19 ± 0.08 , 2.49 ± 0.07 , 3.01 ± 0.09 であり、継代培養回数の増加により MSC の脂肪分化能は僅かに増加する傾向があることが分かった (Fig. 11C)。

以上のように、来年度の分化能予測指標探索に向けて、MSC の軟骨、骨、及び脂肪細胞分化を定量的に評価する系を確立することができた。

2-2) 神経細胞への分化誘導法の評価

MSC の神経分化については、様々な分化誘導方法が報告されているが、未だ多くの問題が残されており、分化誘導法は確立されていないと言ってよい。J.A. Jeong らは、ジメチルスルホキシド (DMSO) 及びブチルヒドロキシアニソールを用いることより、MSC が速やかに神経細胞に誘導され、 β III-Tubulin、TrkA、GFAP 及び CNPase 等のニューロン及びグリア細胞特異的のマーカを発現することを報告している (2004, *Regeneration and Transplantation*)。本研究では、その神経分化誘導法が、分化能予測指標の探索に利用できるかどうかを評価した。

Fig. 12 は、J.A. Jeong らの方法により分化誘導させた細胞の形態変化を示したものである。神経分化誘導基礎培地で培養した細胞と (Fig. 12A)、プレ培地播種後 1 日目の細胞には差が認められなかったが (Fig. 12B)、神経分化誘導培地播種後 2 日目には、球状の細胞質、長い樹状突起、及び突起の先に見られる扇状末端等の神経細胞に特徴的な形態を示す細胞が現れ始め、誘導後 4 日目には約 50% の細胞が神経細胞に分化していることが示唆された

(Fig. 18D-18F)。同時に、細胞が分化するタイミングには不均一性があることや、分化誘導開始 5 日目以降死細胞が増加し、10 日前後には殆どの細胞が死滅することが明らかとなった。以上のことから、Jeong らの方法では、分化誘導後 3-4 日目が最も神経細胞の観察に適していることが示唆された。

次に、免疫蛍光染色法により神経細胞のマーカータンパク質の発現を確認した。Fig. 13 は、Nestin 及び β III-Tubulin の抗体を用いて二重染色した細胞の顕微鏡写真である。神経幹細胞のマーカーであり、神経分化初期の細胞質と細胞核に発現することが知られている Nestin は、神経分化初期に高発現し、分化が進むにつれて減少することが確認された。一方、ニューロン突起中の微小管構成タンパク質で、成熟神経細胞のマーカーとして知られている β III-Tubulin には、誘導日数が経つにつれて樹状突起の部分が明瞭に染色される傾向が見られた。これらのことから、誘導後 4 日目前後で成熟した神経細胞に分化していることが示唆された。さらに成熟神経細胞の別のマーカーとして知られるチロシンキナーゼレセプター A (TrkA) について検討した結果、誘導後 4 日目には TrkA が細胞表層に高発現していることが明らかとなった (Fig. 14)。以上のように、本分化誘導法により得られた神経細胞は、形態学的特徴、及び特異的マーカーを用いた免疫蛍光染色法により神経分化を評価できることから、神経分化能予測指標の探索に適していることが示唆された。

D. 考察

1) MSC の同等性評価指標の探索

LC/MS による細胞糖鎖のプロファイリングを用いて、細胞同源性評価指標の探索を行った結果、第 1 に、無血清培地で培養した MSC では、シアル酸付加混成型糖鎖の比率が高まることが明らかになった。混成型糖鎖は、高マンノース型糖鎖の側鎖マンノースが α -マンノシダーゼにより完全にトリミングされなかった時に生合成される糖鎖である(Fig. 6 下)。また、混成型糖鎖生合成後であっても、マンノースがトリミングされると、複合型糖鎖に変換される。従って、無血清培地培養細胞にシアル酸付加混成型糖鎖が増加していたことは、 α -マンノシダーゼの発現あるいは活性が低下するような変化が生じている可能性、並びに、この糖鎖が同源性評価指標として利用できる可能性を示唆している。

第 2 に、無血清培地で培養すると、モノシアル 2 本鎖糖鎖及びトリシアル 3 本鎖糖鎖糖鎖が、減少することが明らかとなった。これまでに我々は、無血清培地を用いて HL60-RG を培養すると、ヒト血清添加培地を用いた場合と比べて、成熟した複合型鎖糖鎖が減少することを報告している。本年度は、FCS 添加培地と無血清培地の比較であるが、MSC においても、無血清培地で培養すると一部の複合型糖鎖が減少することが明らかとなったことから、シアル酸が結合したある種の複合型糖鎖も、細胞の同源性指標として利用可能であることが示唆された。

2) MSC 分化能保持予測のためのマーカー糖鎖探索に関する基礎的研究

本研究では、MSC 神経分化能保持予測のためのマーカー糖鎖探索に関する基礎的研究

として、MSC の軟骨、骨及び脂肪細胞への分化程度は、形態学的観察と、それぞれ GAG、カルシウム及び脂肪を定量的に解析することにより評価できることを確認した。また、これらの定量法の応用として、継代数の異なる MSC の軟骨、骨及び脂肪細胞分化能を測定し、継代数の増加は、軟骨細胞への分化能には影響しないが、骨細胞分化能を低下させ、脂肪細胞分化能を増加させることを見出した。今後、これらの細胞に結合している糖鎖の特徴を明らかにすることによって、分化能保持予測指標を見出したいと考えている。

神経分化については、J. A. Jeong らの DMSO 及びブチルヒドロキシアニソールを用いる方法により、樹状突起等の神経細胞に特徴的な形態と、神経分化マーカーを複数発現する神経細胞が得られることが確認できた。しかし、播種した細胞を一斉に分化させることは難しく、誘導開始 5 日目前後から神経細胞と死細胞が混在し始め、50%以上の誘導効率を得ることは困難である等の問題も明らかになり、来年度以降引き続き、適切な神経分化誘導法を検討する必要性も示唆された。

E. 結論

培養条件の異なる MSC の糖鎖プロファイリングにより、細胞同源性評価指標候補糖鎖を見出した。また、MSC の分化能保持予測のためのマーカー糖鎖探索の基礎的研究として、MSC の軟骨、骨、及び脂肪細胞への分化程度を定量的に解析する方法を確認した。さらに、神経分化能予測指標探索のために適した神経分化方法を確認した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

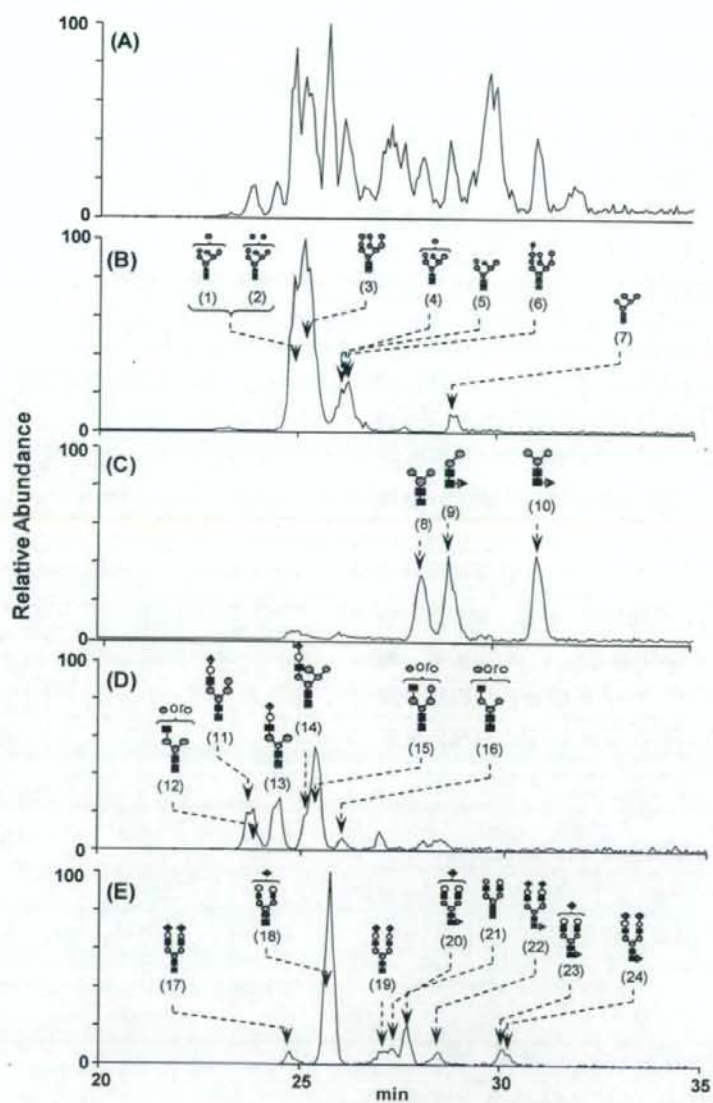
1. Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Takakura, D., Qin, Y., Xiaoyu, H., Yamaguchi, T. The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals, *Biol. Pharm. Bull.*
 2. Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Harazono, A., Takakura, D., Yamaguchi, T. Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products. *Trends in Glycosci. Glycotech.* 2008; 20, 97-116.
 3. Harazono A, Kawasaki N, Itoh S, Hashii N, Matsuishi Nakajima Y, Kawanishi T, Yamaguchi T. Simultaneous glycosylation analysis of human serum glycoproteins by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008; 869: 20-30.
 4. Hashii N, Kawasaki N, Itoh S, Nakajima Y, Kawanishi T, Yamaguchi T. Alteration of N-glycosylation in the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus: relative quantification of N-glycans using an isotope-tagging method. *Immunology* 2008; in press.
 5. Itoh S, Hachisuka A, Kawasaki N, Hashii N, Teshima R, Hayakawa T, Kawanishi T, Yamaguchi T. Glycosylation analysis of IgLON family proteins in rat brain by liquid chromatography and multiple-stage mass spectrometry. *Biochemistry* 2008; 47: 10132-54.
 6. Kizuka Y, Kobayashi K, Kakuda S, Nakajima Y, Itoh S, Kawasaki N, Oka S. Laminin-1 is a novel carrier glycoprotein for the nonsulfated HNK-1 epitope in mouse kidney. *Glycobiology* 2008; 18: 331-38.
 7. Sano K, Asahi M, Yanagibashi M, Hashii N, Itoh S, Kawasaki N, Ogawa H. Glycosylation and ligand-binding activities of rat plasma fibronectin during liver regeneration after partial hepatectomy. *Carbohydr Res.* 2008; 343: 2329-35.
 8. Urayama S, Harada Y, Nakagawa Y, Ban S, Akasaka M, Kawasak N, Sawada H. Ascidian Sperm Glycosylphosphatidylinositol-anchored CRISP-like Protein as a Binding Partner for an Allorecognizable Sperm Receptor on the Vitelline Coat. *J Biol Chem.* 2008; 283: 21725-33.
2. 学会発表
1. 原園 景, 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 低分子量ヘパリンの酸加水分解及びHPAEC-PAD を用いた確認試験及び純

度試験法の検討. 日本薬学会第 129 年会, 京都 (2009 年 3 月) 予定

2. 秦 艶, 橋井則貴, 川崎ナナ, 山口照英
: 強陰イオン交換 HPLC を用いたヘパ
リンナトリウム確認試験及び限度試験
に関する研究. 日本薬学会第 129 年会,
京都 (2009 年 3 月) 予定
3. 橋井則貴, 川崎ナナ, 篠原 聡, 秦 艶
, 黄 笑宇, 伊藤さつき, 山口照英: 糖
鎖を指標とした細胞治療薬の特性解析.
日本薬学会第 129 年会, 京都 (2009 年
3 月) 予定
4. 橋井則貴, 川崎ナナ, 篠原 聡, 秦 艶
, 黄 笑宇, 伊藤さつき, 山口照英: 糖
鎖プロファイルを指標とした細胞治療
薬の特性解析. 第 8 回日本再生医療学
会総会, 東京 (2009 年 3 月) 予定
5. 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 篠原
聡, 山口照英: ヒト間葉系幹細胞の
Thy-1 の糖鎖構造解析. 第 81 回日本生
化学会大会, 神戸 (2008 年 12 月)
6. 橋井則貴, 川崎ナナ, 中島紫, 伊藤さつ
き, 山口照英: d5-フェニルヒドラジン
を用いた同位体標識法及び液体クロマ
トグラフィー/質量分析による糖鎖の定
量解析. 第 81 回日本生化学会大会, 神
戸 (2008 年 12 月)

H-2. 実用新案登録 なし

H-3. その他 該当事項なし



◆ NeuAc, Gal, ● Glc, ■ GlcNAc, ● Man, ▲ Fuc

Fig. 1 10% FCS 添加培地で培養した MSC 由来糖鎖のプロファイルと推定構造 (ポジティブイオンモード), (A) TIC, (B) 高マンノース型糖鎖, (C)パウチマンノース型糖鎖, (D)混成型糖鎖, (E)複合型 2 本鎖糖鎖

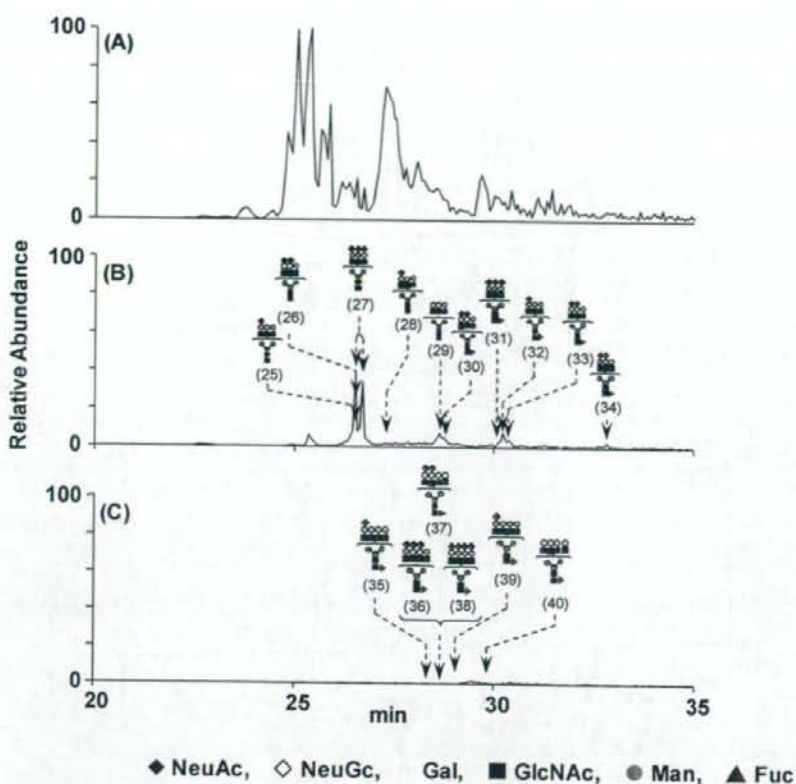


Fig. 2 10% FCS 添加培地で培養した MSC 由来糖鎖のプロファイルと推定構造 (ネガティブイオンモード), (A) TIC, (B) 複合型 3 本鎖糖鎖, (C) 複合型 4 本鎖

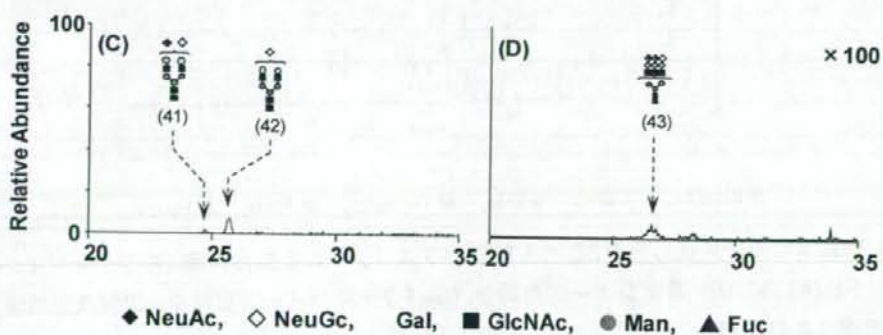


Fig. 3 10% FCS 添加培地で培養した MSC 由来 NeuGc 付加糖鎖のプロファイリング. (A) ポジティブイオンモード, (B) ネガティブイオンモード

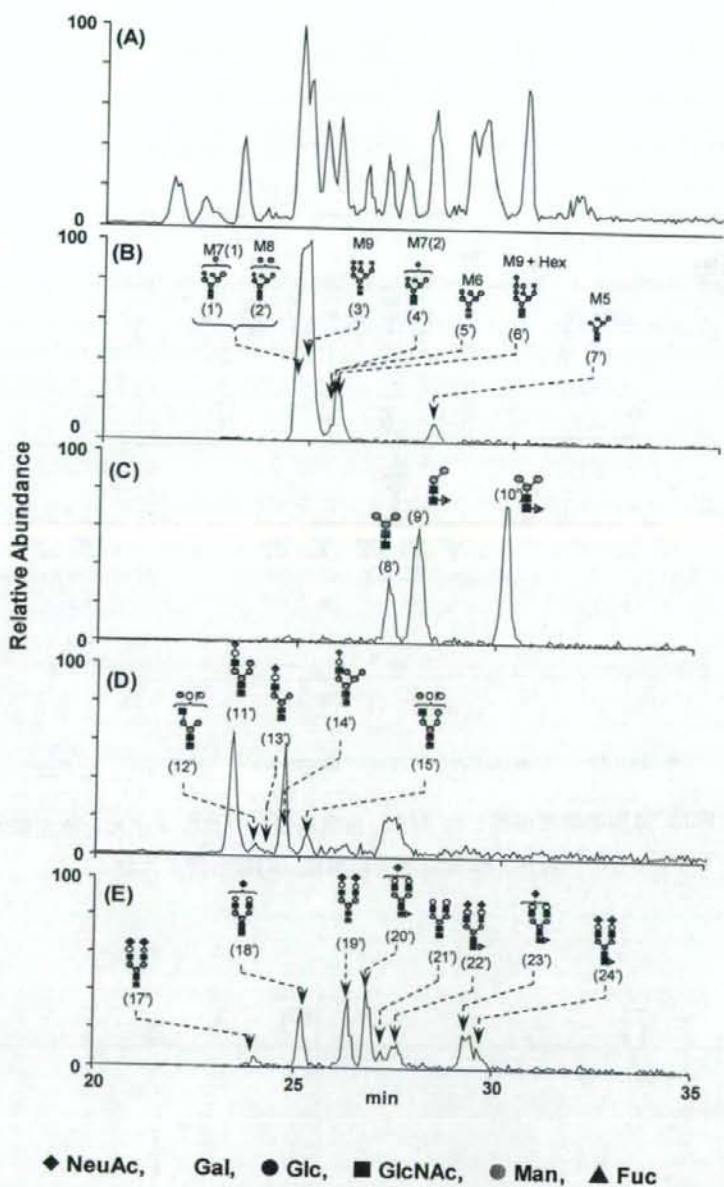


Fig. 4 無血清培地で培養した MSC 由来糖鎖のプロファイルと推定構造 (ポジティブイオンモード), (A) TIC, (B) 高マンノース型糖鎖, (C)パウチマンノース型糖鎖, (D)混成型糖鎖, (E)複合型 2 本鎖糖鎖

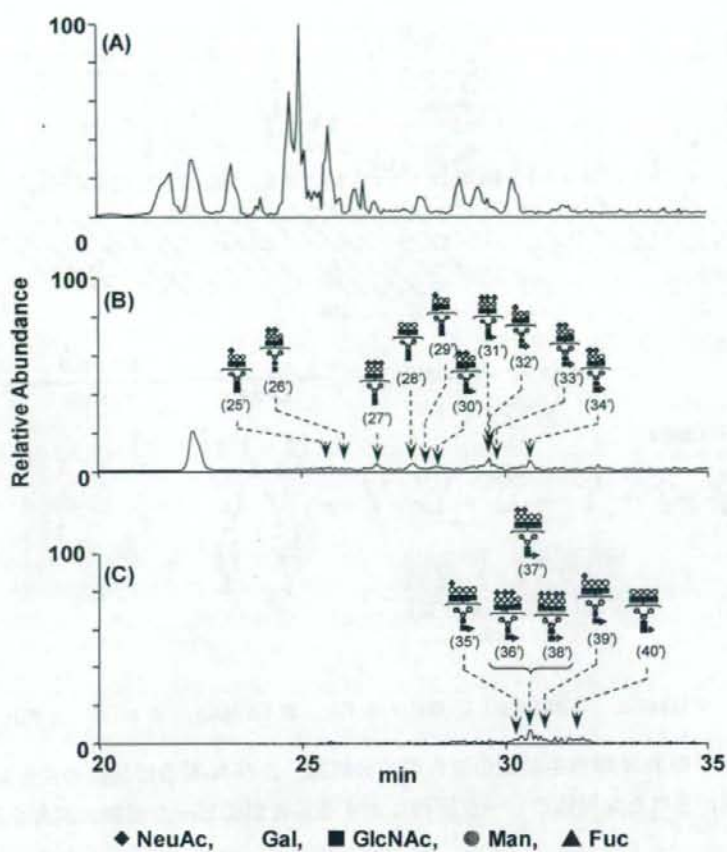


Fig. 5 無血清培地で培養した MSC 由来糖鎖のプロファイルと推定構造 (ネガティブイオンモード), (A) TIC, (B) 複合型 3 本鎖糖鎖, (C) 複合型 4 本鎖