

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒトゲノムテーラーメイド研究

糖鎖プライマー法を利用した白血病等の発現糖鎖

パネル化と発現糖鎖プローブの開発による

診断・治療への応用

H18 - ゲノム - 一般 - 005

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤本 純一郎

平成21(2009)年 4月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒトゲノムテーラーメイド研究

糖鎖プライマー法を利用した白血病等の発現糖鎖  
パネル化と発現糖鎖プローブ開発による  
診断・治療への応用

H18 - ゲノム - 一般 - 005

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤本 純一郎

平成21(2009)年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告	1
糖鎖プライマー法を利用した白血病等の 発現糖鎖パネル化と発現糖鎖プローブ開発 による診断・治療への応用	3
藤本 純一郎	
II. 分担研究報告	15
1. 糖鎖プライマー法による糖鎖構造の解析	17
佐藤 智典	
2. 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	25
清河 信敬	
3. 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	33
片桐 洋子	
4. 間葉系未分化細胞プロファイリング	41
梅澤 明弘	
5. 発現糖鎖解析、糖鎖修飾分子合成 および抗糖鎖抗体作製	45
中島英規	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	49
IV. 研究成果の刊行物・別刷	55

# I 総括研究報告書

糖鎖プライマー法を利用した白血病等の発現糖鎖パネル化と

発現糖鎖プローブ開発による診断・治療への応用

主任研究者 藤本 純一郎

別紙3

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業 ヒトゲノムテラーメード研究）

総括研究報告書

糖鎖プライマー法を利用した白血病等の発現糖鎖パネル化と発現糖鎖プローブ開発による  
診断・治療への応用（H18-ゲノム一般-005）

研究代表者

藤本 純一郎

国立成育医療センター研究所  
副所長

研究要旨：細胞の成熟やがん化に伴い発現糖鎖構造は多様に変化し、特定の機能を発揮することが知られている。しかし細胞での発現量が微量であることに加え、構造の多様性や精製・分析の難しさ、特異性の高いプローブの不足などから、医療分野での応用は限られている。本研究では「糖鎖プライマー法」を利用して細胞に糖鎖を大量に産生させ、その構造を網羅的に解析し、白血病細胞や組織幹細胞を始めとする未分化細胞の発現糖鎖パネル化を図り、細胞のプロファイリングに利用する情報を得る。本年度はこの糖鎖プライマー法を白血病細胞等のがん細胞やヒト骨髄由来間葉系・造血系前駆細胞などの未分化細胞・分化誘導細胞に対して適用し、LC/MSで網羅的な解析を行って発現糖鎖パネルの充実を図った。骨髄由来造血系前駆細胞の単球系細胞分化誘導系ではこれまで細胞株で得られていた知見と異なる結果が得られた。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CD10が糖鎖構造の違いでCD10自身の酵素活性が変化することを明らかにすると共にそれに関わるグリコシル化部位を絞り込んだ。本年度はジルコニアを固定化したジルコニア固相を用いて糖脂質を効率よく回収するシステムを構築した。この方法を使用することで、微量の内臓糖脂質のLC/MSによる解析が容易になった。本年度の研究によってLC/MSで糖脂質を含む糖鎖を網羅的に解析する手法が確立され、小児白血病臨床検体の解析を開始している。一部臨床検体では発現糖鎖とこれまでの細胞表面マーカーを用いた分類法との相関を見ることができた。今後数多くの臨床検体を解析することで、発現糖鎖に基づく既存の診断法の細分化が可能になることが期待される。

#### 研究分担者

佐藤智典 慶應義塾大学理工学部 教授

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

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

梅澤明弘 国立成育医療センター研究所

生殖医療研究部 部長

中島英規 国立成育医療センター研究所

副所長室 流動研究員

#### A. 研究目的

本研究では、白血病細胞をはじめとする小児腫瘍細胞やヒト骨髄間葉系及び造血幹細胞を含むヒト未分化細胞が産生し発現している糖鎖の構造・機能を解明すると共に、細胞の発現糖鎖情報をパネル化して、小児腫瘍に対する新規診断・治療法開発や、ヒト幹細胞の標準化などに、臨床応用することを目指す。

糖鎖は糖脂質や糖蛋白質など複合糖質として存在し、結合している蛋白質の機能を調節したり、それ自身が機能を発揮したりして、細胞反応において重要な役割を担っていると考えられているが、その構造の多様性や精製・分析の難しさ、有用な抗体の不足などから、蛋白質に比べると医療分野での応用はごく限られている。しかし、造血幹細胞でのCD34や神経幹細胞でのSSEA-1をはじめとして、幹細胞マーカーや腫瘍マーカーとして糖鎖が用いられている点を考慮すると、糖鎖研究をより積極的に推進することが求められる。

前述のごとく、糖鎖の大量生産や構造解析の困難さ、抗体を含めた特異性の高い糖

鎖プローブ作製の困難さ、等が糖鎖研究の進展を妨げる要素となっていたが、本研究で採用する糖鎖プライマー法は糖鎖を大量に入手することの困難さを克服した方法である。この方法の長所は細胞を工場に見立てて糖鎖を培養液中に大量に分泌させ、細胞を壊すことなく、細胞から抽出するより緩和な条件で夾雑物も少なく、容易に回収できることが可能な点にある。これによってこれまで発現量が微量で難しかった細胞の糖鎖解析を網羅的に行うことが可能となり、それぞれの細胞の発現糖鎖パネルを作製するのが容易になる。そこで、この方法を応用することによって種々の小児腫瘍、その発生母体である正常組織の各分化段階の細胞、骨髄由来間葉系および造血幹細胞を含む種々の幹細胞、等の発現糖鎖情報パネル化を行い、これを小児腫瘍の新規診断法や治療法の開発、幹細胞の標準化などに応用することによって、小児腫瘍医療や再生医療へ貢献することを目的とする。

また、糖鎖プライマー法は、産生された糖鎖を抗体作製の抗原として利用するなど、2次的な利用への応用性も高い。本研究では、得られた糖鎖を化学的に修飾して抗原性を高め、一般に樹立することが難しかった糖鎖に対する優秀な抗体作製法の開発を試みる。この結果樹立された糖鎖抗体を、小児腫瘍に対する抗体療法開発や、ヒト幹細胞の標準化のための検査薬に応用することを目指す。

#### B. 研究方法

本研究では、1) 糖鎖プライマー法への適用を目的とした、正常未分化細胞の分化

誘導培養系の確立と、白血病等培養細胞の糖鎖プライマー法処理条件検討、2) 発現糖鎖解析、効率的プロファイリングのための基盤技術の確立、3) 各種細胞の発現糖鎖パネル化、4) 糖鎖抗体樹立、5) 発現糖鎖パネルと糖鎖抗体の細胞規格化への応用、をそれぞれ順次進めていく。本年度は昨年度行った1)と2)に加え3)5)の糖鎖パネルを充実させるとともにLC/MSによる糖鎖解析技術の充実を図った。4)糖鎖抗体樹立に関しては、これまで樹立した抗体のうち、抗原が糖鎖だと考えられるものの解析を行った。

使用する細胞及び培養技術として、国立成育医療センター研究所が有しているヒト白血病細胞株、凍結白血病細胞、骨髓由来造血幹細胞、ES細胞、ヒト間葉系幹細胞及びそれらの分化誘導技術を用いた。

糖鎖プライマー法で産生した糖鎖は培地より逆相固相カートリッジを使用して抽出した後、昨年度確立した糖鎖を高精度に分離するキャピラリー高速液体クロマトグラフィー (Cap LC)と高度な構造解析が高感度に行うことが可能なマスマスペクトロメトリー (MS) を組み合わせたLC/MSを使用して解析した。糖鎖プライマーに糖鎖が伸長してできたと思われる分子については、MS/MSスペクトルをとり、糖鎖配列を決定した。糖鎖プライマーを用いて得られた発現糖鎖ライブラリーを元に発現糖鎖情報を得て、実際に細胞から抽出した脂質でも同じ糖鎖構造の糖脂質が発現しているか確認した。

CD10分子はB前駆細胞株NALM6をもとにアフィニティークロマトグラフィーで精製し、様々なグリコシダーゼで消化してNeutralendopeptidase(NEP)活性への影響につい

て検討した。

糖脂質は脂質分子であるため、有機溶媒を用いることで効率よく抽出することができるが、共に抽出されるリン脂質に比べてLC/MSでイオン化されにくいという欠点があるため、糖脂質のLC/MSによる網羅的分析は困難であった。ジルコニアは配位結合によりリン酸残基と効率よく結合することが知られている。本年度の研究では、このジルコニアを固定化したジルコニア固相を利用してリン脂質を取り除く系を確立し、糖脂質のLC/MS網羅的な解析を可能とした。

(倫理面への配慮)

ヒト骨髓由来CD34陽性細胞は、米国Cambrex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。

本研究では、患者検体を含むヒト由来細胞および実験動物を用いた研究を予定している。患者から提供される検体ならびに臨床情報の本研究への使用については、個人情報保護に細心の注意を払い、検体を提供することによる不利益・危険性を排除するための最大限の努力を行なう。本研究自体は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究あるいは臨床研究には該当しないが、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」に準拠して行う。全ての研究は、外部委員を含めた倫理審査委員会において、その科学性ならびに倫理性についての審査を受け、同委員会の承認かつ実施機関の長の許可を得て実施する。白血病などの小児がん患者由来検体の中央診断、保存あるいは研究への使用に

つについては、すで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、受付番号75、平成15年度、受付番号126、142、以上平成16年度、受付番号188、216、218、219、以上平成18年度）。国立成育医療センターにおいては、ヒト間葉系細胞の培養と基礎研究への応用に関し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、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）。上記申請の範囲外の研究内容を実施する必要が生じた場合は、新規申請あるいは追加申請を行い、倫理委員会ならびに実施機関の長からの承認を経て実施する。なお、本研究では商品として市販されているヒト骨髄細胞も使用するが、これについては倫理申請の必要がないものと判断している。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の動物実験指針等に準拠して研究を実施する。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。

### C. 研究結果

#### 1) ヒト骨髄由来造血系細胞の発現糖鎖解析

ヒト骨髄由来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。昨年度は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い、発現しているガングリオシドをそれぞれ同定した。本年度はそれぞれの糖脂質分子の脂質部分、すなわちセラミド分子に着目し、そのセラミド分子にも多様性があることを明らかにした。

#### 2) ヒト骨髄由来間葉系細胞の発現糖鎖解析

UET-13、Yub667B等寿命延長されたヒト間葉系幹細胞、に対して確立された骨分化誘導法の確立並びに糖鎖プローブを用いて得られた骨分化誘導に伴う糖鎖構造解析が、ヒト初代間葉系細胞においても十分有効であることを示した。したがって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・精製しマススペクトロメトリー等を用いた詳細な構造解析が可能となった。これらの成果は、ヒト間葉系細胞の骨以外の分化誘導に展開可能であることを示し、糖鎖構造に基づくプロファイリングが有効であることを示した。さらに間葉系以外の幹細胞にも展開できることを示した。



### 3) ヒト胎児肺組織由来線維芽細胞 (MR C5) の発現糖鎖解析

糖鎖プライマー処理48時では3種類、6時間では2種類の糖鎖伸長生成物がそれぞれ確認できた。また、これ以外に48時間でも6時間でも糖鎖伸長生成物ではない分子量が見られたが、得られたMS2フラグメントパターンからは構造の帰属には至らなかった。MS2の結果から、48時間での生成物は、Gb3型、グロボシド型、GM3型であると帰属できた。6時間ではGb3型とGM3型の伸長を確認できた。HPTLC解析で確認できる2つの生成物もGb3型とGM3型であると推測できる。糖鎖プライマー法を用いて、グロボ系とガングリオ系の生合成経路による糖鎖伸長生成物を得ることができた。

### 4) 転移性の異なる肺がん細胞の発現糖鎖解析

転移性の高い肺がん細胞と転移性の低い細胞での、糖鎖プライマー法により発現糖鎖を解析した。糖鎖プライマーLac-C12からは3種類の中性生成物および11種類の酸性生成物が検出された。グロボ系の糖鎖や、ガングリオ系のGM3、GM2およびGM1などには生成量の違いは見られなかった。特に、酸性の生成物2種類では、転移性の違いにより糖鎖伸長生成物の検出された量に大きな違いが見られた。糖鎖プライマーGlcNAc-C12においては、6種類の中性生成物と8種類の酸性生成物が検出された。中性生成物では転移性の低い細胞で発現が高いものが見られた。一方、複数の酸性生成物では転移性の高い細胞で発現が高いものが複数検出された。糖鎖プライマーGalNAc-Thr-C12では、2種類の中性生成物と9種類の酸性

生成物が検出された。ここでも転移性の高い細胞に発現量が高い酸性生成物が複数種類検出された。

これまでに転移に関係すると考えられた糖鎖も含まれていたが、これまで評価されてこなかった糖鎖も含まれていた。

### 5) CD10Neutralendopeptidase活性に及ぼす糖鎖の影響

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は糖蛋白質である。その糖鎖構造は、細胞により大きく異なる事が昨年の本研究であきらかとなっている。CD10分子はNeutralendopeptidase (NEP) 活性を持つことが知られているが、この酵素活性にCD10分子が持つ糖鎖構造が関与するかどうかを検討した。本年は、各種グリコシダーゼ消化によりCD10分子の糖鎖を改変してNEP活性を測定した。Sialidase消化、更に、 $\beta$ -Galactosidase消化しても、活性の大きな低下はなかったが、非変成条件下でGlycopeptidaseF消化すると、NEP活性はほぼ完全に消失した。シアル酸に富む一部の糖鎖が除去されていることが二次元電気泳動で確認され、このN-グリコシド糖鎖がNEP活性発現に必須であることが示された。

### 6) LC/MSによる内在性糖脂質網羅的解析技術の確立

細胞から有機溶媒により脂質を抽出すると主な生体脂質分子として、リン脂質、コレステロール、トリグリセリド、糖脂質が抽出される。薄層クロマトグラフィーにより糖脂質解析を試みる際には、その他の分子が大量に含まれて分析を妨害するためそ

れらを除かなければならない。これはLC/MSでも同様で、特にリン脂質は糖脂質に比べてイオン化しやすいため糖脂質に対して「イオンサプレッション」という現象を惹起して存在しているはずの分子が検出されないということが起こる。本年度は新たに開発されたジルコニア固相で細胞から抽出した総脂質よりリン脂質を取り除き、TLCおよびLC/MSで糖脂質を効率よく検出する手段を確立した。

#### D. 考察

国立成育医療センター研究所では、ヒト白血病細胞株、凍結白血病細胞、骨髄由来細胞、ヒト間葉系幹細胞、胚性幹細胞、胚性癌腫細胞及び正常未分化細胞を多数所有しており、組織・生体からの単離培養技術も有している。さらに一部の細胞では分化誘導することも可能である。糖鎖はがん化や細胞の成熟過程でその発現パターンが大きく変化することが知られているが、構造の多様性や精製・分析の難しさ、有用なプローブの不足などから、蛋白質に比べるとその応用はごく限られていた。本研究で採用した糖鎖プライマー法は生きた細胞をいわば糖鎖工場と見立てて培養液中に糖鎖を大量に生産させる技術である。また培養液中に分泌された糖鎖は固相抽出で比較的緩和な条件で容易に入手することができる。細胞から直接糖鎖を抽出する従来の方法で得られる糖鎖は微量で夾雑物も多く、糖脂質の場合リン脂質を除去するためアルカリ分解をする必要があり、アルカリ条件で不安定な糖鎖の情報を損なってしまうことがあった。糖鎖プライマーは生体内に存在しない人工的な糖鎖生合成基質（アクセプタ

一）であるため、培地中に分泌された糖鎖の量が実際に細胞に発現されているものと相関しない可能性がある。本年度はジルコニア固相を使用してアルカリ分解を行うことなく内在性糖脂質を効率よく回収する方法を確立した。この方法は発現が微量な糖脂質に対してもその量を損なうことなく回収することが可能である。これまでTLCや免疫染色に頼っていた発現糖脂質解析をLC/MSにシフトさせ、非常に微量な糖脂質解析まで網羅的に行うことができるようになった。しかも得られた発現糖鎖構造をパネル化することで、細胞のプロファイリングに利用することも可能である。

糖蛋白質糖鎖の機能としてこれまで様々な報告があるが、我々は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、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。各種グリコシダーゼ処理により、様々なNEP活性を示したということは、CD10の機能に発現糖鎖構造が大きく関わっていることが示唆された。

#### E. 結論

本年度は糖鎖プライマー法の利点を生かして白血病細胞をはじめとした未分化細胞の発現糖鎖パネルを充実させると共に、糖鎖プライマー法と共に非常に有効な手段である内在性糖脂質発現解析法を開発した。LC/MSは微量な糖鎖まで検出する現在の最も高感度な方法であるため網羅的な発現糖鎖解析が可能と考えられる。遺伝子解析等で培ったパイオインフォマティクス技術と融合することで、診断に応用できるように

なると考えられる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* 25:495-501, 2008
- 2) Katagiri YU, Sato B, Miyado K, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Kiyokawa N. Functional significance of stage-specific embryonic antigens in the development of preimplantation embryos. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology.* 20:131-139, 2008
- 3) Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N. Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol.* 28:2125-2137, 2008
- 4) Saito Y, Miyagawa Y, Onda K, Nakajima H, Sato B, Horiuchi Y, Okita H, Katagiri YU, Saito M, Shimizu T, Fujimoto J, Kiyokawa N. B-cell-activating factor inhibits CD20-mediated and B-cell receptor-mediated apoptosis in human B cells. *Immunology.* 125:570-590, 2008.
- 5) Shiozawa Y, Takenouchi H, Taguchi T, Saito M, Katagiri YU, Okita H, Shimizu T, Yamashiro Y, Fujimoto J, Kiyokawa N. Human osteoblasts support hematopoietic cell development in vitro. *Acta Haematol.* 120: 134-145, 2008
- 6) M. Hashimoto, Y. Koyama, and T. Sato In vitro Gene Delivery by pDNA/Chitosan Complexes Coated with Anionic PEG Derivatives That Have a Sugar Side Chain *Chem Lett.*, 37, 266-267 2008
- 7) T. Sato, M. Takashiba, R. Hayashi, X. Zhu, T. Yamagata Glycosylation of dodecyl 2-acetamide-2-deoxy-b-D-glucopyranoside and dodecyl b-D-galactopyranosyl-(1-4)-2-acetamide-2-deoxy-b-D-glucopyranoside as saccharide primers in cells *Carbohydr. Res.* 343, 831-838 2008
- 8) T. Matsubara, M. Iida, T. Tsumuraya, I. Fujii, T. Sato Selection of carbohydrate-binding domain with a helix-loop-helix structure, *Biochemistry*, 47, 6745-6751 2008
- 9) L. Wang, Y. Wang, T. Sato, S. Yamagata, T. Yamagata Ganglioside GD1a suppresses TNF $\alpha$  expression via Pkn1 at the transcriptional level in mouse osteosarcoma-derived FBJ cells *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 230-235 2008
- 10) N. Yamamoto, T. Matsubara, T. Sato, K. Yanagisawa Age-dependent high-density clustering of GM1 ganglioside at presynaptic neuritic terminals promotes amyloid beta-protein fibrillogenesis *Bio*

chim. Biophys. Acta, 1778, 2717-2726  
2008

11) T. Sato, Sugar chain synthesis by the use of cell function, Experimental Glycoscience Glycochemistry, Eds. By N. Taniguchi, A. Suzuki, Y. Ito, H. Nari matsu, T. Kawasaki, S. Hase, Springer, pp166-168 2008

12) Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(35):12921-12926. 2008

13) Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito AT, Nishi J, Ueno H, Umezawa A, Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M, Komuro I. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. Nature. 454(7202):345-349. 2008

14) Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. Stem Cells. 26(7):1695-1704. 2008

15) Kami D, Shiojima I, Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y, Ishii R, Naito AT, Toyoda M, Saito H, Watanabe

M, Komuro I, Umezawa A. Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. PLoS ONE. 3(6):e2407. 2008

16) Kawakita A, Sato K, Makino H, Ikegami H, Takayama S, Toyama Y, Umezawa A. Nicotine acts on growth plate chondrocytes to delay skeletal growth through the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. PLoS ONE. 3(12):e3945. 2008

17) Seko Y, Azuma N, Takahashi Y, Makino H, Morito T, Muneta T, Matsumoto K, Saito H, Sekiya I, Umezawa A. Human sclera maintains common characteristics with cartilage throughout evolution. PLoS ONE. 3(11):e3709. 2008

18) Sullivan S, Ichida JK, Umezawa A, Akutsu H. Elucidating nuclear reprogramming mechanisms: taking a synergistic approach. Reprod Biomed Online. 16(1):41-50. 2008

## 2. 学会発表

1) 金子智典, 大喜多肇, 中島英規, 宮川世志幸, 片桐洋子, 清河信敬, 藤本純一郎, 佐藤智典. 糖鎖プライマー法を用いた神経芽腫に発現する糖鎖のLC-MS/MSによるハイスループット解析. 日本化学会第88春季年会, 東京, 3月26日-30日, 2008.

2) 小笠原尚, 大喜多肇, 中島英規, 宮川世志幸, 片桐洋子, 清河信敬, 藤本純一郎, 佐藤智典. 糖鎖プライマー法を用いたマウス胚性癌腫細胞F9に発現する糖鎖構造の探索. 日本化学会第88春季年会, 東京, 3月26日-30日, 2008.

- 3) Yoshitaka Miyagawa, Hajime Okita, Hideki Nakajima, Yasuomi Horiuchi, Ban Sato, Tomoko Taguchi, Masashi Toyoda, Yohko U. Katagiri, Junichiro Fujimoto, Jun-ichi Hata, Akihiro Umezawa, Nobutaka Kiyokawa. Induction of Ewing's family tumor-like characteristics in human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells by chimeric EWS/ETS proteins. The American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2008, San Diego, CA, Apr 12-16, 2008.
- 4) 片桐 洋子, 佐藤 伴, 中島英規, 宮川 世志幸, 堀内 保臣, 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97回日本病理学会総会, 金沢, 5月15日-17日, 2008.
- 5) 大喜多肇, 松井 淳, 中川温子, 松岡健太郎, 片桐洋子, 藤本純一郎, 秦 順一, 清河信敬. パラフィン切片を用いたChromogenic in situ hybridizationによる神経芽腫におけるMYCN遺伝子増幅の判定. 第97回日本病理学会総会, 金沢, 5月15日-17日, 2008.
- 6) 宮川世志幸, 大喜多肇, 梅澤明弘, 藤本純一郎, 秦 順一, 清河信敬. Ewing'sファミリー腫瘍特異的融合遺伝子EWS/ETSによるDKKファミリー遺伝子群の発現制御. 第97回日本病理学会総会, 金沢, 5月15日-17日, 2008.
- 7) Hajime Okita, Atsuko Nakagawa, Jun Matsui, Kentaro Matsuoka, Yohko U. Katagiri, Junichiro Fujimoto, Jun-ichi Hata, Nobutaka Kiyokawa Determination of MYCN Gene Amplification in Archival Neuroblastic Tumors by Chromogenic in situ hybridization Advances Neuroblastoma Research 2008, Chiba, May 21-24, 2008.
- 8) 小笠原尚, 金子智典, 片桐洋子, 大喜多肇, 中島英規, 佐藤伴, 石田秀治, 木曾真, 佐藤智典, 藤本純一郎, 清河信敬. マウスEC細胞F9の分化に伴う脂質生合成の変動第28回日本糖質学会年会, 筑波, 8月18日-20日, 2008.
- 9) 堀内保臣, 宮川世志幸, 片桐洋子, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. 免疫不全マウスを用いたヒト造血細胞に対する放射線照射生物影響の生体内解析系第50回日本小児血液学会, 千葉, 11月14-16日, 2008.
- 10) 中島英規, 金子智典, 巽国子, 宮川世志幸, 恩田恵子 (08413), 片桐洋子, 大喜多肇, 小児急性リンパ性白血病の質量分析装置による発現糖脂質解析. 第50回日本小児血液学会, 千葉, 11月14-16日, 2008.
- 11) 恩田恵子, 片桐洋子, 藤本純一郎, 清河信敬. BAFFによるB細胞のCD20/B220を介するアポトーシスの抑制. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12月1-3日, 2008.
- 12) 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NALM6に発現するCD10分子のneutralendopeptidase活性と糖鎖構造第81回日本生化学会大会, 神戸, 12月9日-11日, 2008.
- 13) 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. マウス着床前胚におけるSSEA-4とE-cadherinの抗体架橋に伴う動態の解析第81回日本生化学会大会, 神戸, 12月9日-11日, 2008.

14) 中島英規, 巽国子, 太田百絵, 豊田雅士, 宮川世志幸, 大喜多肇, 片桐洋子, 梅澤明弘, 清河信敬, 藤本純一郎. 新たに確立した質量分析装置を用いた糖脂質相対定量法による間葉系前駆細胞の試験管内分化に伴う糖脂質の発現変化の解析. 第81回日本生化学会大会, 神戸, 12月9日-11日, 2008.

15) 宮川 世志幸, 大喜多 肇, 佐藤 伴, 堀内保臣, 中島英規, 片桐 洋子, 梅澤 明弘, 秦順一, 藤本 純一郎, 清河 信敬. Ewingファミリー腫瘍特異的融合遺伝子EWS/ETSによるDickkopf2の発現制御. 第31回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月9日-11日, 2008.

16) 遺伝暗号の拡張によるタンパク質への糖修飾アミノ酸の導入, 飯島 一智・松原輝彦, 渡邊貴嘉・芳坂貴弘, 佐藤智典, 第 57 回 高分子学会年次大会, 2005年5月28-30日

17) シアリルオリゴ糖結合性ペプチドのインフルエンザウイルス感染阻害活性, 松原 輝彦・角 真智子・久保田 博之・佐藤 智典, 第 57 回 高分子学会年次大会, 2005年5月28-30日

3. 糖鎖生命工学に基づく細胞に発現する糖鎖の探索と抗インフルエンザ薬の開発, 佐藤 智典, 国際バイオフォーラム, 2008年7月4日

18) ヘマグルチニン結合性ペプチドの改変および短鎖化によるインフルエン

ザウイルス感染阻害活性の向上, 松原輝彦, 齋藤 智美, 山口 大介, 大西 愛, 佐藤 智典, 第18回バイオ・高分子シンポジウム, 2008年7月26日

19) 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー (43) CE-MS/MSによる糖鎖生成物ハイスループット解析, 朱 性宇・佐藤 智典, 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム2008, 2008年9月18-19日

20)  $\beta$ -アミロイドの形成に関与する膜マイクロドメイン中のGM1分布のペプチドプローブを用いた解析, 松原 輝彦, 飯島 一智, 山本 直樹, 柳澤 勝彦, 佐藤 智典, 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム2008, 2008年9月18-19日

21) 遺伝暗号の拡張を用いたタンパク質への糖アミノ酸の導入, 飯島 一智, 松原 輝彦, 渡邊 貴嘉, 芳坂 貴弘, 佐藤 智典, 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム2008, 2008年9月18-19日

22) 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー (44) ヒト乳がん細胞に発現する糖鎖のLC-MS/MSによるハイスループット解析, 古市 悠, 奥村 恵理子, 尾島 琢磨, 片野 直哉, 朱 性宇, 佐藤 智典, 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム2008, 2008年9月18-19日

23) 細胞表面のシアリ酸含有糖鎖を標的とするペプチドの設計および機能解析, 松原 輝彦・山下 美季・野殿 英恵・佐藤 智典, 第57回高分子討論会, 2008年9月24日~26日

24) シナプス前膜の年齢依存的なGM1 ganglioside集積ドメイン形成はA $\beta$ 線維化を促す, 山本直樹, 松原 輝彦, 湯山 耕平, 佐藤 智典, 柳澤 勝彦, 第51

回日本神経化学会大会、2008年9月11-13日

25) シナプス前膜におけるGM1 gangliosideの年齢依存的な集積はアミロイドβ蛋白質の線維化を促す、山本 直樹松原 輝彦 佐藤 智典 柳澤 勝彦、分子生物学会、2008年12月11日

26) 合成ペプチドによる擬似体液からのヒドロキシアパタイト析出、釜谷 則昭、橋詰 峰雄、松原 輝彦、佐藤 智典、日本化学会第89春季年会、2009年3月27-30日

27) 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー (45) キシロースを有した糖鎖プライマーによるプロテオグリカンの合成、熊澤 知祥・大隅 賢二・水野 真盛・佐藤 智典、日本化学会第89春季年会、2009年3月27-30日

28) インフルエンザウイルス感染阻害ペプチドの活性を向上する化学修飾、千葉 頌子・松原 輝彦・佐藤 智典、日本化学会第89春季年会、2009年3月27-30日

29) 膜マイクロドメインでのガングリオシド複合体の分布と認識、曾我 典弘・松原 輝彦・小鷹 昌明・佐藤 智典 日本化学会第89春季年会、2009年3月27-30日

30) 膜マイクロドメイン中に形成される糖脂質集合体のトポロジー観察とアミロイドβとの相互作用解析、飯島一智・松原 輝彦・山本直樹・柳澤勝彦・佐藤 智典、日本化学会第89春季年会、2009年3月27-30日

31) シナプス前膜におけるGM1ガングリオシドの集積はABの線維化を誘導する、山本直樹、松原 輝彦、佐藤 智典、

柳澤 勝彦、日本薬学会第129年会、2009年3月26-28日

H. 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

## II 分担研究報告書

### 1. 糖鎖プライマー法による糖鎖構造の解析

佐藤 智典

### 2. 血液系未分化細胞プロファイリング及び抗糖鎖抗体作製

清河 信敬

### 3. 血液系未分化細胞プロファイリング及び抗糖鎖抗体作製

片桐 洋子

### 4. 間葉系未分化細胞プロファイリング

梅澤 明弘

### 5. 発現糖鎖解析、糖鎖修飾分子合成及び抗糖鎖抗体作製

中島 英規



## 分担研究報告書

## 糖鎖プライマー法による糖鎖構造の解析

研究分担者 佐藤 智典 慶應義塾大学理工学部生命情報学科 教授

研究要旨：糖鎖パネルを作製するために、ヒト胎児肺組織由来線維芽細胞（MRC5）および転移性の異なる肺がん細胞を用いて発現糖鎖の解析をLC-MS/MSを用いて行った。MRC5からは3種類の短いオリゴ糖鎖が検出された。肺がん細胞ではLac-C12プライマーにより14種類、GlcNAc-C12プライマーにより14種類およびGalNAc-Thr-C12では11種類の糖鎖伸長生成物が検出され、転移性の違いにより検出された糖鎖構造に違いが見られた。

## A. 研究目的

本研究では細胞が産生する糖鎖のカタログ化を行うために、糖鎖プライマー法を応用して細胞での発現糖鎖を解析する。糖鎖プライマーを培養液中に加えると細胞内に取り込まれ、細胞内で糖鎖伸長反応を受けた後に細胞外に分泌される。よって、細胞を壊すことなく糖鎖伸長生成物を単離して構造を解析することが可能である。得られた糖鎖伸長生成物は内在性の糖鎖の種類を反映していることが明らかになっている。複数の糖鎖合成経路の基質となる糖鎖プライマーを、種々の培養細胞に与えることで、細胞で発現している多くの糖鎖を合成することができる。

本年度はヒト胎児肺組織由来線維芽細胞（MRC5）および転移性の異なる肺がん細胞発現糖鎖に関する研究を行った。

近年、再生医療を目指した胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）の研究が注目を集めていて、それらの分化過程における糖鎖構造の変化につ

いて研究することは非常に興味深い。糖鎖プライマー法を用いて分化多能性を有する細胞の未分化状態と分化過程における発現糖鎖の変化を解析することが可能であると考えられる。再生医療への応用が期待されるヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）はES細胞の作製時における倫理的問題や拒絶反応の問題を一挙に解決できるため、ES細胞に代わる細胞として大きな注目を集めている。

ヒトiPS細胞を樹立する際の親株として用いられているヒト胎児肺組織由来線維芽細胞MRC5での糖鎖プライマー生成物の解析を行った。

次に、肺がん細胞の発現する糖鎖構造を、糖鎖プライマー法を用いて解析した。ここでは、転移性の高い細胞と転移性のない細胞を用いて比較解析を行った。がん細胞の転移性と発現等との関係が調べられている。組織での浸潤にはガングリオシドGD3やGD1aが、血管やリンパ管内での移動にはシアリルT抗原が、上皮細胞への接着にはシアリルルイス抗原が、それ

ぞれ関与していることが報告されている。

## B. 研究方法

本研究で用いたヒト胎児肺組織由来線維芽細胞 (MRC5) は、ヒトiPS細胞を樹立する際の親株として利用されている。また肺がん細胞の中で転移性のある細胞と転移性のない細胞を用いた。培養にはDMEM培地に10% FBSとPenicillin-Streptomycinを5 mL添加したものを使用した。細胞は37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下の無菌恒温槽で培養した。継代は、培地を吸引した後PBSを加えて細胞表面を洗い、0.05%トリプシン/PBS 0.02% EDTAを3 mL加え、5分間インキュベーションした後、DMEM培地を2 mL添加し、ピペティングにより細胞をディッシュから剥離した。これらを遠沈管に回収し、ディッシュをPBSで洗浄、回収して1,000 rpmで5分間遠心し、上清を除去してから新たなディッシュに播種した。

糖鎖プライマーとしては1-*O*-dodecyl-4-*O*-β-D-galactopyranosyl-β-D-glucopyranoside (Lac-C12)、1-(*n*-dodecyl)-2-*N*-acetyl-β-D-glucopyranoside (GlcNAc-C12) および $N^6$ -lauryl-*O*-(2-acetamido-2-deoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonine-amido (GalNAc-Thr-C12)を用いた。糖鎖プライマーは100 mMになるようにDMSO (dimethyl sulphoxide, HIBRI-MAX) (D2650, SIGMA) に溶解し、これをプライマーストック溶液とした。この溶液はメンブレンフィルター (DIMEX-13, MILLIPORE) を通して滅菌後-20 °Cで保存した。使用時に溶解し、所定の濃度となるように糖鎖伸長用無血清培地に懸濁

させた。

糖鎖プライマーの投与実験では、無血清培地はDMEM (31053-028, GIBCO) にPenicillin-Streptomycin 5 mL、MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10 mM (100×) 5 mL、GlutaMAX-I Supplement 5 mLを加えたものを使用した。生死細胞判定装置Vi-CELLにより生細胞数を数え、細胞数が6.0-7.0×10<sup>5</sup>個/dishになるように播種をし、これを3、4日培養して細胞を増殖させ、ディッシュの80-90%コンフルエント状態になったところで、培養培地を吸引除去した後、PBSで洗浄し、10 μMの糖鎖プライマー含有無血清培地を6 mL/dish入れることでプライマー投与を行い、37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下で所定時間インキュベーションした。

プライマー投与から所定時間培養後、氷上で反応を停止させた。培地を15 mL遠沈管に回収し、さらにディッシュ表面をPBSで洗浄して遠沈管へと回収した。4 °C、1,000 rpmで5分間遠心して沈殿物を避けて上清を回収して培地面分とした。ディッシュにはPBSを加えてセルスクレイパーで細胞を剥離し、遠沈管に回収した。4 °C、1,000 rpmで5分間遠心分離し上清除去し、沈殿した細胞にはPBS 500 μLを加えて懸濁させ、ここからタンパク質濃度測定用に50 μL分取し、残りを再び4 °C、1,000 rpmで5分間遠心分離した。上清を除去し、沈殿を細胞画分とした。

培地面分はSep-Pak C18 (Waters) を用いて生成物の抽出を行った。Sep-Pakにメタノール10 mLを流しカラムを活性化させ、次いでMilliQ 10 mLを流してカラムを平衡化させた。培地面分を流して脂

質成分をカラムに吸着させ、MilliQを50 mL流してカラムを洗浄した。続いてメタノール5 mLを流して脂質成分をカラムから抽出し、ガラス管に回収した。回収した抽出液は遠心エバポレーターで濃縮して保存した。

培地画分から抽出した脂質成分は、アミノカラム (52635-U, SUPELCO) を用いてさらに酸性成分と中性成分に分離した。はじめにアミノカラムをクロロホルムに浸した状態で真空ポンプで引き、脱気を行った。その後クロロホルムでカラムを活性化した。サンプルをメタノール50  $\mu$ Lとクロロホルム950  $\mu$ Lで溶かし、全量1 mLを流してカラムに吸着させ、クロロホルム10 mLでカラムを洗浄した。続いてメタノールを3 mL流して中性成分の抽出、さらにメタノール/酢酸/トリエチルアミン = 93/3/4 (v/v/v) を3mL流して酸性成分の抽出を行った。回収した抽出液は遠心エバポレーターで濃縮した。

溶媒は全てLC/MS用のものを用いた。1ディッシュから得られたプライマー伸長生成物は全量をクロロホルム/メタノール = 2/1 (v/v)に溶解し、LC-MS/MS測定用に1/5量を用いた。内在性糖脂質はクロロホルム/メタノール = 2/1 (v/v)に溶解して全量をLC-MS/MSの測定に用いた。乾燥したサンプルは、クロロホルム/メタノール = 2/1 (v/v)をプライマー伸長生成物は100  $\mu$ L加えて溶かし、0.45  $\mu$ mコスモスピンフィルター (nacalai tesque)に通して不溶成分をろ過した。ろ液を測定用インサートに移し、遠心エバポレーターで減圧留去した。

乾燥させたインサートに、プライマー

伸長生成物はクロロホルム/メタノール = 9/1 (v/v)を100  $\mu$ L、内在性糖脂質は50  $\mu$ L加えてオートサンプラーにセットし、5  $\mu$ Lをインジェクションした。1つのサンプルにつき3回測定を行った。分離はシリカカラムUnison UK-Silica (0.3 mm  $\phi$   $\times$  150 mm, Imtakt) とAgilent 1100 Series Capillary LC System (Agilent) のHPLCシステムによって行った。

移動相の割合を10分から60分まで50分間かけて0-100%のグラジエントをかけた。移動相の流速は常に3  $\mu$ L/minを保った。インジェクション量は毎回5  $\mu$ Lで、オートサンプラーを用いて行った。同じサンプルは3回インジェクションして測定した。

オンラインの質量分析計はelectrospray ionization (ESI)/ion trap (IT) type mass spectrometer (HCT ultra 11S, Bruker Daltonics)を使用した。糖鎖伸長生成物および糖脂質はalternating ion modeで測定した。

## C. 研究結果

### ヒト胎児肺組織由来線維芽細胞 (MRC 5) での結果

1/5ディッシュ分の培地画分を測定に用いた。フィルターでろ過をしてクロロホルム/メタノール = 9/1 (v/v) 100  $\mu$ Lに溶解させ、5  $\mu$ Lをインジェクションした。理論上、1回の測定で1/100ディッシュ分のサンプルをインジェクションしていることになる。

糖転移反応時間が6時間および48時間でのEICとそれに対応するMSを測定した。48時では3種類、6時間では2種類の糖鎖伸

長生成物がそれぞれ確認できた。また、これ以外に48時間でも6時間でも糖鎖伸長生成物ではない分子量が見られたが、得られたMS2フラグメントパターンからは構造の帰属には至らなかった。

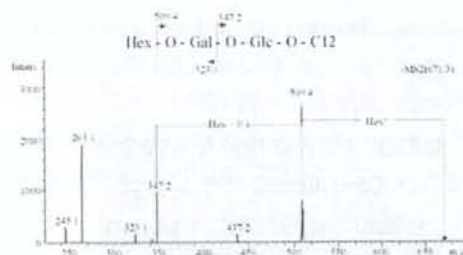


図1 Gb3型生成物のMS/MSのESI-CIDスペクトルと構造解析

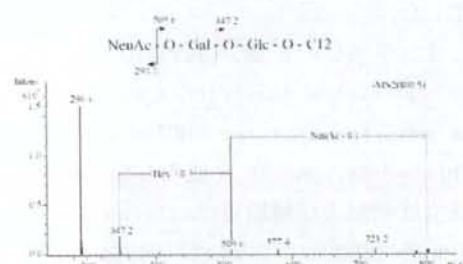


図2 GM3型生成物のMS/MSのESI-CIDスペクトルと構造解析

MS2の結果から、48時間での生成物は、Gb3型(図1)、グロボシド型、GM3型であると帰属できた。6時間ではGb3型とGM3型の伸長を確認できた。HPTLC解析で確認できる2つの生成物もGb3型とGM3型であると推測できる。糖鎖プライマー法を用いて、グロボ系とグングリオ系の生合成経路による糖鎖伸長生成物を得ることができた。

反応時間でも糖鎖伸長生成物を得ることが確認できた。グロボシド型に関

しては6時間では得ることができなかったが、このことからグロボシド型の合成酵素の関与した糖鎖の合成は時間依存的に検出されることが分かった。それに比較して、Gb3型合成酵素やGM3型の合成酵素による生成物は短い時間でも十分に検出できるほど活性が高いことが示された。

### 転移性の異なる肺がん細胞での結果

転移性の高い肺がん細胞と転移性のない細胞での、糖鎖プライマー法により測定された結果を表1に示した。

糖鎖プライマーLac-C12からは3種類の中性生成物および11種類の酸性生成物が検出された。グロボ系の糖鎖や、グングリオ系のGM3、GM2およびGM1などには生成量の違いは見られなかった。特に、酸性の生成物2種類では、転移性の違いにより糖鎖伸長生成物の検出された量に大きな違いが見られた。

糖鎖プライマーGlcNAc-C12においては、6種類の中性生成物と8種類の酸性生成物が検出された。中性生物では転移性のない細胞で発現が高いものがみられた。一方、複数の酸性生成物では転移性の高い細胞で発現が高いものが複数検出された。

糖鎖プライマーGalNAc-Thr-C12では、2種類の中性生成物と9種類の酸性生成物が検出された。ここでも転移性の高い細胞に発現量が高い酸性生成物が複数種類検出された。

これまでに転移に関係すると考えられた糖鎖も含まれていたが、これまで評価されてこなかった糖鎖も含まれていた。