

表1 2種類の肺がん細胞で検出される糖鎖構造

糖鎖プライマー	生成物	転移性の細胞	転移性のない細胞
Lac-C12	Hex-Lac-C12	+++	++
	HexNAc-Lac-C12	+	++
	Hex-HexNAc-Lac-C12	+	+
	酸性生成物	+++	-
	中性生成物	+++	-
	GM3 type	+++	+++
	酸性生成物	-	+
	GM2 type	+++	+++
	GM1 type	++	++
	NeuAc-Hex-HexNAc-Lac-C12	+	+
	GD3 type	+	-
	酸性生成物	-	+
	GD1a type	+	+
	酸性生成物	+	-
GlcNAc-C12	Hex-GlcNAc-C12	++	+++
	中性生成物	+	++
	Hex-Hex-GlcNAc-C12	++	+++
	中性生成物	+	++
	HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-GlcNAc-C12	+	+
	酸性生成物	+++	+
	酸性生成物	++	-
	酸性生成物	++	-
	NeuAc-Hex-GlcNAc-C12	++	++
	酸性生成物	+	-
	酸性生成物	+	+
GalNAc-Thr-C12	T antigen type	+++	+++
	中性生成物	-	++
	酸性生成物	++	-
	酸性生成物	+	-
	Sialyl T type	++	++
	酸性生成物	++	-
	酸性生成物	+++	+++
	酸性生成物	++	+
	酸性生成物	++	-
	酸性生成物	+	-
	酸性生成物	+	-

#### D. 考察

ヒト胎児肺組織由来線維芽細胞(MRC5)では、多くの細胞で一般的に見られるようなGb3やGM3型の様な非常に単純な糖鎖構造のみが発現されていた。iPS細胞へと形質変換された場合に得られる糖鎖構造との関連への興味を持たれる。

肺がん細胞の場合には、非常に多様な糖鎖が検出された。特に酸性の生成物は多様性が高かった。MRC5と比較すると、発現糖鎖の違いは明らかであった。さらに転移性の異なる2種類の細胞での糖鎖構造の違いも明確に検出されていた。細

胞の転移は浸潤、移動および接着などのプロセスにおいて糖鎖の関与が知られている。ここでは糖鎖構造についての詳細を示していないが、検出された糖鎖は、それらのプロセスのどこかで細胞の転移能と関連していることが考えられる。

#### E. 結論

ヒト胎児肺組織由来線維芽細胞および種類の肺がん細胞を用いて、3種類の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。昨年度までに確立したハイスループットな分析手法を活用して、細胞の性質の違いによる糖鎖構造の解析を行った。細胞の種類に依存した糖鎖構造の検出に大変有用であることが示された。

#### F. 健康危機情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 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).
- 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, T. Sato, M. Takashiba, R. Hayashi, X. Zhu, T. Yamagata, Carbohydr. Res., 343, 831-838 (2008). DOI information:

- 10.1016/j.carres.2008.01.022
3. Selection of carbohydrate-binding domain with a helix-loop-helix structure, T. Matsubara, M. Iida, T. Tsumuraya, I. Fujii, T. Sato, *Biochemistry*, **47**, 6745-6751 (2008).
  4. Ganglioside GD1a suppresses TNF $\alpha$  expression via Pkn1 at the transcriptional level in mouse osteosarcoma-derived FBJ cells, L. Wang, Y. Wang, T. Sato, S. Yamagata, T. Yamagata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **371**, 230-235 (2008). doi:10.1016/j.bbrc.2008.04.053
  5. Age-dependent high-density clustering of GM1 ganglioside at presynaptic neuritic terminals promotes amyloid beta-protein fibrillogenesis, N. Yamamoto, T. Matsubara, T. Sato, K. Yanagisawa, *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 2717-2726 (2008).
  6. Sugar chain synthesis by the use of cell function, T. Sato, *Experimental Glycoscience Glycochemistry*, Eds. By N. Taniguchi, A. Suzuki, Y. Ito, H. Narimatsu, T. Kawasaki, S. Hase, Springer, pp166-168 (2008)
2. 学会発表
1. 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
  2. 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、国際バイオフィォラム、2008 年7月4日
  4. 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
  5. 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
  6.  $\beta$ -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
  7. 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
  8. 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
  9. 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

10. 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回日本神経化学学会大会、2008年9月11-13日
11. 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 $\beta$ 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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 $\beta$ 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

17. シナプス前膜におけるGM1ガングリオシドの集積はA $\beta$ 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

研究分担者 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。本年度は特に昨年得られたLC/MSの結果を詳細に解析し、糖脂質における脂質部分（セラミド）の構造多様性について解析を行った。MS/MSスペクトル解析の結果、セラミドとしてのフラグメントイオンは主にネガティブイオンモードで $m/z=536.5$ と $646.5$ のものが大部分を占め、検出できたマススペクトルの95%以上を占めていた。このフラグメントイオンが、分子よりプロトン $[H^+]$ が脱離したものであると考えるなら、セラミドの分子量はそれぞれ537.5、647.5である。昨年発現を同定した正常造血系細胞の*in vitro*での単球系細胞への分化誘導細胞における各糖脂質のセラミド分子種を調べたところ、 $M_w=537.5$ と $647.5$ のもの比率はおよそ4：6で、どの糖脂質もその比率は一致していた。これまでの薄層クロマトグラフィーによる解析ではLC/MSに比べて非常に感度が低かったことに加え、糖鎖構造が同じ糖脂質におけるセラミド部分の相違による比較は困難であった。LC/MSを発現糖脂質解析に使用することで、これまで判別することが難しかった各糖脂質の異なったセラミド構造の比率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發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 $1 \times 10^4$ /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。

本年度は昨年度得られたクロマトグラムの糖鎖溶出時間におけるマススペクトルを詳細に解析し、存在を確認した各糖脂質のセラミド構造と、各セラミドの構成比率について検討した。

(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。ヒト骨髄由来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。昨年、発現しているガングリオシドとしては、GM1, GD1a, GD3, GD2, GD1b, IV3NeuAc $\alpha$ -nLc4Ce, IV3NeuAc $\alpha$ -nLc5Cer, VI3NeuAc $\alpha$ -nLc6Cerの存在を確認したが、それぞれに関してLCの各溶出時間におけるマススペクトルを詳細に解析した。糖脂質に相当するm/z値付近以外にも多種多様なイオンが検出され、MS/MSスペクトルの解析を行っても分子の同定は困難であった。これらのイオンは相対的に糖脂質のシグナルより強力であるため、イオンサプレッション効果による糖脂質の相対的シグナル低下が疑われることが明らかになった。そのため、MSシグナル強度による糖脂質発現量の量比を出すためには、予め糖脂質のみを特異的に回収するシステムを確立する必要があることが分かった。

糖脂質に相当するm/z値において、MS/MSスペクトルをとり、糖脂質の構造を詳細に解析した。その結果、糖鎖構造が共通な糖脂質、例えばGM1のみにおいても、その脂質部分(セラミド)には多様な分子種が存在した。セラミドとしてのフラグメントイオンは主にネガティブイオンモードでm/z=536.5と646.5のものが大部分を占め、検出できなかったマススペクトルの95%以上を占めていた。このフラグメントイオンが、分子よりプロトン[H<sup>+</sup>]が脱離したものであると考えられるなら、セラミドの分子量はそれぞれ537.5, 6

47.5ということになる。

昨年発現を同定した正常造血系細胞の *in vitro*での単球系細胞への分化誘導細胞における各糖脂質のセラミド分子種を調べたところ、 $M_w=537.5$ と $647.5$ のものの比率はおよそ4:6で、どの糖脂質もその比率は一致していた。これまでの薄層クロマトグラフィーによる解析ではLC/MSに比べて非常に感度が低かったことに加え、糖鎖構造が同じ糖脂質におけるセラミド部分の相違による比較は困難であった。LC/MSを発現糖脂質解析に使用することで、これまで判別することが難しかった各糖脂質の異なったセラミド構造の比率を確認することが可能となった。

#### D. 考察

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。前回の検討から、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。今回は糖脂質における糖鎖部分ばかりでなく、脂質部分の構造多様性に着目し、詳細な解析を行った。

糖脂質すなわちスフィンゴ糖脂質分子の脂質部分(疎水部)はセラミドと呼ばれ、スフィンゴシン骨格を持った分子である。細胞膜の大部分を構成するリン脂質は、主にホスファチジルコリンに代表されるグリセロリン脂質が主成分であり、このグリセロリン脂質の疎水部はグリセロールに脂肪

酸が2分子結合したもので、ジアシルグリセロールと呼ばれる。ジアシルグリセロールが情報伝達分子としてプロテインキナーゼCを活性化するように、セラミドも情報伝達分子として働き、細胞内に生成されるとアポトーシスを引き起こすことが知られている。またグリセロリン脂質に比べスフィンゴ脂質では、疎水部に含まれる脂肪酸の不飽和度がスフィンゴ脂質の方が比較的高いため、細胞膜中においてスフィンゴ脂質およびコレステロールが互いに集合したラフトと呼ばれるドメイン構造を作りやすい。このラフトは細胞が刺激を受けた際、情報伝達分子が集合し、情報伝達の間として働いているなど、その重要性が指摘されている。

セラミドは分子内に二重結合やアミド結合を介して結合される脂肪酸に多様性があり、糖脂質では糖鎖と同様に様々な構造のものがある。セラミドの構造が異なると、例えばO157が産生することで知られるペロ毒素とその受容体糖脂質Gb3Cerとの相互作用が変化することが知られているが、細胞自身の機能との関わりについてはほとんど分かっていない。

これまで糖脂質研究では、細胞の外側に糖鎖が向いていること、シアル酸などの電荷を持つものがあることなどから、とかく糖鎖部分の違いについての研究が多くなされてきた。本研究では糖脂質研究に高速液体クロマトグラフィー(LC)と質量分析装置(MS)を組み合わせたLC/MSを用いた。この装置を用いたことから、LCで糖鎖構造に基づいた分離をしつつMSで質量数を決定することができ、そのことから脂質部分の構造多様性について言及することができた。

今後この手法を応用し様々な検体の分析を行えば、糖脂質の更なる機能解明に役立つ可能性がある。

#### 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。昨年度はこれまで微量な検体では解析が困難であった糖脂質発現解析をLC/MSを使用することで解析を可能にすることができた。本年度は昨年確立した方法をさらに発展させ、これまであまり着目されてこなかったそれぞれの糖脂質の疎水部（セラミド）の構造の細胞分化前後における相違に着目して検討を行った。しかしながら糖鎖部分に着目した場合、分化前後で大きく変化が観察された糖脂質発現は、セラミド構造についてはほとんど変化がないことが明らかとなった。寒冷地で主に不飽和脂肪酸を多量に含む食餌を摂取しているイヌイットの細胞では、糖脂質と同様に細胞膜の構成成分であるリン脂質の疎水部に不飽和脂肪酸が他の地方に住むヒトより多く含まれることが知られ、急性心筋梗塞、多発性硬化症、乾せん、糖尿病などの疾患も少ないことが知られている。スフィンゴ脂質の脂肪酸も食餌等により変化することが報告されており、培養液組成が異なればセラミドの構造・組成も変化し、刺激による応答性も異なってくる可能性もある。本研究によってこれまで糖脂質分子中のセラミド構造の相違を判別することが可能となった。前述のようにセラミドはアポトーシス活性を持つなど、重要な機能を持つことが知られている。今後MSの応用により、セラミド構造の

相違がそれぞれの糖脂質自身の整理機能とどの様に関わりがあるのか更なる研究が可能となった。

#### F. 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

##### 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/BCR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.

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

研究分担者 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

研究要旨: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本研究であきらかとなっている。昨年はCD10の持つNeutralendopeptidase (NEP)の比活性の違いは、糖鎖構造の違いに起因すると考えられることを報告した。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。

研究協力者

佐藤 伴 (国立成育医療センター研究所発生・分化研究部)

川崎 ナナ、伊藤さつき (国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部)

中島 英規 (国立成育医療センター研究所)

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、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てきた。さらに、CD10分子の持つNEPの比活性の違いは、糖鎖構造の違いに起因すると推測された。

本年は、各種グリコシダーゼで糖鎖を改変したCD10分子のNEP活性を測定し、糖鎖構造が、NEP活性発現に関わるかどうかを検討した。

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。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

B. 研究方法

1. NALM6細胞のCD10分子の糖鎖解析: NALM6細胞の1%Tritonで可溶される膜タンパクから、抗CD10単クローン抗体をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーでCD10を精製し、さらに二次元電気泳動で分離した。ゲルから切り出し

CD10分子を、常法にのっとり、LC/MS解析を行った。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。ECL発色後、化学発光の強さをPhotostimulated Luminescence (PSL)としてLAS2000(Fuji film)で定量した。

2) NEP活性測定：合成基質50 $\mu$ M Glutaryl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phenylalanine-4-Methyl-Coumaryl-7-Amide (Glt-AAF-MCA)を含むPBS 50  $\mu$ l中に酵素を加え、NEP特異的阻害剤であるPhosphoramidon (50  $\mu$ M) 存在/非存在下で37 $^{\circ}$ Cで30分反応を行った。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で測定した比活性 (CD10単位あたりの活性) 算出のためのCD10定量は、Western Immunoblot後ECL発色し、LASで定量解析した。

2. CD10分子の糖鎖構造の酵素処理による改変：ラフト及び精製CD10を50mUの *Arhrobacter ureafaciens* 由来Sialidase (0.1M Sodium acetate buffer, pH 5.0)、25mUの $\beta$ -Galactosidase (0.1M Phosphate buffer, pH 7.3/1mM MgCl<sub>2</sub>)、5mUのGlycopeptidaseF(GPF) (0.1M Tris-HCl buffer, pH 8.6)で消化し、NEP活性を測定した。なお、改変されたCD10分子の分子量及び等電点は、SDS PAGE及び二次元電気泳動により検証した。シアル酸及びガラクトース除去の確認は、RCAレクチンプロットで行った。

### C. 研究結果

1. NALM6細胞のCD10：CD10分子は、アフィニティー クロマトグラフィーで効率よく精製された。二次元ゲル中 (図1) にみられるBSAは、透析前にキャリヤータンパクとして加えた。このCD10分子のN-グリコシド型糖鎖のpositive ion mode及びnegative ion modeでfull MS scanによって得られたtotal ion chromatogramを図2に、MS/MSスペクトルより推察され

る糖鎖構造を表1に、それぞれ示した。きわめて多様性に富んだプロファイリングを呈する。

3. グリコシダーゼ消化により糖鎖を改変したCD10分子のNEP活性：Sialidase消化により大部分の末端のシアル酸残基が、Sialidase/ $\beta$ -Galactosidase消化でNeuAc $\alpha$ 2,3(6)Gal $\beta$ 1,4が除去されたことが、二次元電気泳動、RCAレクチンプロットで確認された。非変成条件下でのGPF消化により、分子量は全く変わらないが、pI酸性側領域でのheterogeneityがわずかに減少したので、シアル酸に富む糖鎖が一部除去されたと考えられる (図3)。これら糖鎖改変CD10のNEP活性を測定したところ、シアル酸除去CD10、シアル酸/ $\beta$ -ガラクトース除去CD10のNEP活性はそれぞれ、14%及び21%の低下に留まったが、一部のN-グリコシド型糖鎖除去は、95%も低下した (図4.1)。精製CD10の非変成条件下でのGPF消化でも同様の結果が得られた (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110kのうち25%近くをN-グリコシド型糖鎖が占める。LC-MS/MS解析により、NALM6細胞CD10分子のNグリコシド型糖鎖はきわめて多様性に富んでいることが示された。

CD10分子のシアル酸、次に $\beta$ -ガラクトースを除去すると、わずかにNEP活性は低下するが、一部のN-グリコシド型糖鎖を除去しただけで、NEP活性は大きく低下した。活性発現に必須のN-グリコシド型糖鎖が存在することを強く示唆しており、この糖鎖構造の違いがNEP活性の比活性の違いを反映していると推察される。非変成条件下でGPF消化により遊離してくる糖鎖の構造解析と結合サイトの同定が待たれる。

### F. 結論

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(B前駆細胞性ALL)に発現する代表的抗原であるCD10は、同一分子であっても、細胞により糖鎖構造が大きく変わること、CD10の有するNEP活性は、表面に露出してシアル酸に富む糖鎖がNEP活性発現に必須であることが明らかとなった。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

### 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

### 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/BCR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.

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
2. その他  
該当なし

図 2. 精製CD10の二次元電気泳動図

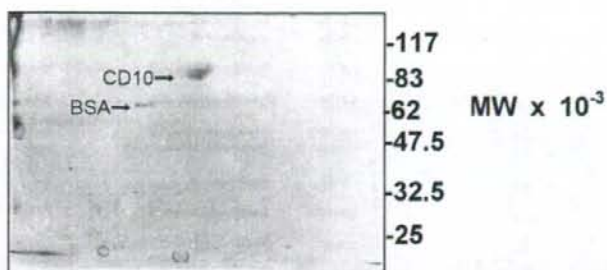


図 3. CD10分子のN-グリコシド型糖鎖のフルマスキャンによって得たトータルイオンクロマトグラム

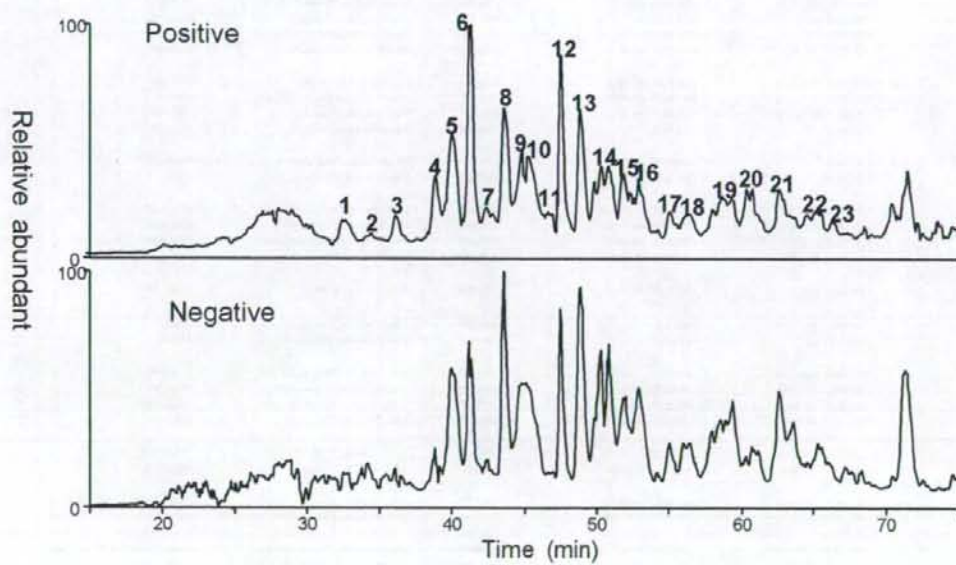


表 1. MS/MSスペクトルより推定されるN-グリコシド型糖鎖

Peak No	Observed m/z (charge)		Theoretical mass	composition *	Deduced structure †
	positive	negative			
1	886.32(2)	884.30(2)	1730.824	[Hex]2[NeuNAc]2[NeuAc]1	Hybrid
2	785.30(2)	783.28(2)	1568.571	[Hex]4[NeuNAc]2[NeuAc]1	Hybrid
3	1393.52(1), 700.24(2)	1391.49(1), 698.24(2)	1560.888	[Hex]7[NeuNAc]2	M7
9	1561.58(1), 761.29(2)	1559.54(1), 759.27(2)	1398.502	[Hex]3[NeuNAc]2	M5
4	947.35(2)	945.33(2)	1892.877	[Hex]3[NeuNAc]2[NeuAc]1	Hybrid
5	1113.41(2)	1111.39(2)	2224.799	[Hex]3[NeuNAc]4[NeuAc]2	BNNA2
6	967.36(2)	965.34(2)	1932.709	[Hex]3[NeuNAc]2[NeuAc]1	BNNA
8	939.36(2)	937.33(2)	1876.682	[Hex]3[NeuNAc]2[NeuAc]1[Fuc]1	Hybrid
7	822.32(2)	820.29(2)	1642.508	[Hex]3[NeuNAc]4	B3
8	1150.43(2)	1148.41(2)	2298.835	[Hex]3[NeuNAc]2[NeuAc]1	TetraB1
9	1186.45(2)	1184.42(2)	2370.857	[Hex]3[NeuNAc]4[NeuAc]1[Fuc]1	FBNNA2
10	1186.45(2)	1184.42(2)	2370.857	[Hex]3[NeuNAc]4[NeuAc]2[Fuc]1	FBNNA2
11	1227.47(1)	1225.44(1)	1238.448	[Hex]3[NeuNAc]2	M5
11	1040.90(2)	1038.87(2)	2079.761	[Hex]3[NeuNAc]4[NeuAc]1[Fuc]1	FBNNA
12	1040.89(2)	1038.87(2)	2079.761	[Hex]3[NeuNAc]4[NeuAc]1[Fuc]1	FBNNA
13	1223.47(2)	1221.44(2)	2444.883	[Hex]3[NeuNAc]2[NeuAc]1[Fuc]1	FTetra1
13	1112.42(2)	1110.39(2)	2224.799	[Hex]3[NeuNAc]4[NeuAc]2	BNNA2
14	895.35(2)	893.32(2)	1788.556	[Hex]3[NeuNAc]2[Fuc]1	B5
14	1333.01(2), 889.00(3)	1330.97(2), 886.98(3)	2663.989	[Hex]7[NeuNAc]2[NeuAc]1	TetraNA1
14	1295.99(2), 864.32(3)	1293.95(2)	2589.831	[Hex]3[NeuNAc]3[NeuAc]2	TetraC
15	1369.02(2), 913.01(3)	1366.98(2), 910.99(3)	2725.969	[Hex]7[NeuNAc]2[NeuAc]1[Fuc]1	FTetra2
15	1295.99(2), 864.32(3)	1293.95(2)	2589.831	[Hex]3[NeuNAc]3[NeuAc]2	BNA1NA2
16	1077.91(2)	1075.88(2)	2163.798	[Hex]3[NeuNAc]2[Fuc]1	FBLNA1
16	1478.55(2), 986.04(3)	1476.52(2), 984.01(3)	2955.063	[Hex]7[NeuNAc]3[NeuAc]2	M5 only
16	1333.01(2), 889.00(3)	1330.97(2), 886.98(3)	2663.989	[Hex]7[NeuNAc]2[NeuAc]1	TetraC1NA1
16	1814.55(2), 1010.04(3)	1812.52(2), 1008.02(3)	3027.064	[Hex]7[NeuNAc]3[NeuAc]2[Fuc]1	FTetra3
16	1295.99(2), 864.32(3)	1293.95(2), 862.30(2)	2589.831	[Hex]3[NeuNAc]3[NeuAc]2	M5 only
16	1150.44(2)	1148.41(2)	2298.835	[Hex]3[NeuNAc]2[NeuAc]1	BNA1NA1
17	1186.45(2)	1184.42(2)	2370.857	[Hex]3[NeuNAc]4[NeuAc]1[Fuc]1	FBNNA2
17	1223.47(2)	1221.44(2)	2444.883	[Hex]3[NeuNAc]2[NeuAc]1[Fuc]1	FTetra1
18	1551.59(2), 1034.72(3)	1549.55(2), 1032.70(3)	3101.121	[Hex]7[NeuNAc]3[NeuAc]1[Fuc]1	FTetraNA2
18	1406.04(2), 937.89(3)	1404.00(2), 935.87(3)	2810.026	[Hex]7[NeuNAc]3[NeuAc]1[Fuc]1	FTetraNA1
18	1389.02(2), 913.01(3)	1386.98(2), 910.99(3)	2735.989	[Hex]3[NeuNAc]2[NeuAc]1[Fuc]1	FBLNA2
18	1478.55(2), 986.04(3)	1476.52(2), 984.01(3)	2955.063	[Hex]7[NeuNAc]3[NeuAc]2	M5 only
19	1333.01(2), 889.00(3)	1330.97(2), 886.98(3)	2663.989	[Hex]7[NeuNAc]2[NeuAc]1	TriLacNA1
17	1186.45(2)	1184.42(2)	2370.857	[Hex]3[NeuNAc]4[NeuAc]2[Fuc]1	FBNNA2
17	1223.47(2)	1221.44(2)	2444.883	[Hex]3[NeuNAc]2[NeuAc]1[Fuc]1	FTetra1
18	1551.59(2), 1034.72(3)	1549.55(2), 1032.70(3)	3101.121	[Hex]7[NeuNAc]3[NeuAc]1[Fuc]1	FTetraNA2
18	1406.04(2), 937.89(3)	1404.00(2), 935.87(3)	2810.026	[Hex]7[NeuNAc]3[NeuAc]1[Fuc]1	FTetraNA1
18	1389.02(2), 913.01(3)	1386.98(2), 910.99(3)	2735.989	[Hex]3[NeuNAc]2[NeuAc]1[Fuc]1	FBLNA2
18	1478.55(2), 986.04(3)	1476.52(2), 984.01(3)	2955.063	[Hex]7[NeuNAc]3[NeuAc]2	M5 only
19	1333.01(2), 889.00(3)	1330.97(2), 886.98(3)	2663.989	[Hex]7[NeuNAc]2[NeuAc]1	TriLacNA1
17	1186.45(2)	1184.42(2)	2370.857	[Hex]3[NeuNAc]4[NeuAc]2[Fuc]1	FBNNA2
17	1223.47(2)	1221.44(2)	2444.883	[Hex]3[NeuNAc]2[NeuAc]1[Fuc]1	FTetra1
20	1406.04(2), 937.89(3)	1404.00(2), 935.87(3)	2810.026	[Hex]7[NeuNAc]3[NeuAc]1[Fuc]1	FTetraC1NA1 or FBLac2NA1
20	1358.02(2), 913.01(3)	1356.98(2), 910.99(3)	2735.989	[Hex]3[NeuNAc]2[NeuAc]1[Fuc]1	FBLac2NA2
21	1734.18(2), 1158.44(3)	1732.14(2), 1156.41(3)	3466.253	[Hex]8[NeuNAc]7[NeuAc]3[Fuc]1	FTetraLac1NA2 or FTetraLac2NA2
21	1697.14(2), 1131.75(3)	1695.10(2), 1129.73(3)	3392.216	[Hex]7[NeuNAc]6[NeuAc]3[Fuc]1	FTetraLac3
21	1551.59(2), 1034.72(3)	1549.55(2), 1032.70(3)	3101.121	[Hex]7[NeuNAc]3[NeuAc]1[Fuc]1	FTetraLac2
21	1478.55(2), 986.04(3)	1476.52(2), 984.01(3)	2955.063	[Hex]7[NeuNAc]3[NeuAc]2	M5 only
21	1260.48(2), 940.89(3)	1258.44(2)	2518.930	[Hex]7[NeuNAc]1[Fuc]1	FTetraLac1 or FBLac2
21	1406.04(2)	1404.00(2)	2810.026	[Hex]7[NeuNAc]3[NeuAc]1[Fuc]1	FTetraLac1NA1 or FBLac2NA1
22	1588.81(2), 1059.40(3)	1586.77(2), 1057.38(3)	3175.158	[Hex]8[NeuNAc]7[NeuAc]3[Fuc]1	FTetraLac1NA1 or FTetraLac2NA1
22	1406.04(2)	1404.00(2)	2810.026	[Hex]7[NeuNAc]3[NeuAc]1[Fuc]1	FTetraLac1NA1 or FBLac2NA1
23	1375.18(3)	1373.15(3)	4122.481	[Hex]9[NeuNAc]8[NeuAc]4[Fuc]1	FTetraLac2NA3 or FTetraLac3NA3
23	1734.18(2), 1156.43(3)	1732.14(2), 1154.41(3)	3466.253	[Hex]8[NeuNAc]7[NeuAc]3[Fuc]1	FTetraLac1NA2 or FTetraLac2NA2
23	1551.59(2), 1034.72(3)	1549.55(2), 1032.70(3)	3101.121	[Hex]7[NeuNAc]3[NeuAc]1[Fuc]1	FTetraLac2
24	1278.15(3)	1276.12(3)	3897.385	[Hex]9[NeuNAc]8[NeuAc]4[Fuc]1	FTetraLac2NA2 or FTetraLac3NA2
24	1588.81(2), 1059.40(3)	1586.77(2), 1057.38(3)	3175.158	[Hex]8[NeuNAc]7[NeuAc]3[Fuc]1	FTetraLac1NA1 or FTetraLac2NA1
24	1406.03(2)	1404.00(2)	2810.026	[Hex]7[NeuNAc]3[NeuAc]1[Fuc]1	M5 only
25	1181.12(3)	1179.08(3)	3540.290	[Hex]9[NeuNAc]8[NeuAc]4[Fuc]1	FTetraLac2NA1 or FTetraLac3NA1
25	1375.18(3)	1373.15(3)	4122.481	[Hex]9[NeuNAc]8[NeuAc]4[Fuc]1	M5 only

\* Estimated from m/z values obtained by FTMS.

† Deduced from MS<sup>n</sup> spectra in positive ion mode. F, fucose; NA, N-acetylneuraminic acid; Lac, lactosamine; B, bisecting; Tri, trisecting; Tetra, tetraecting.



図3. GFP及びsialidase消化CD10の二次元電気泳動図

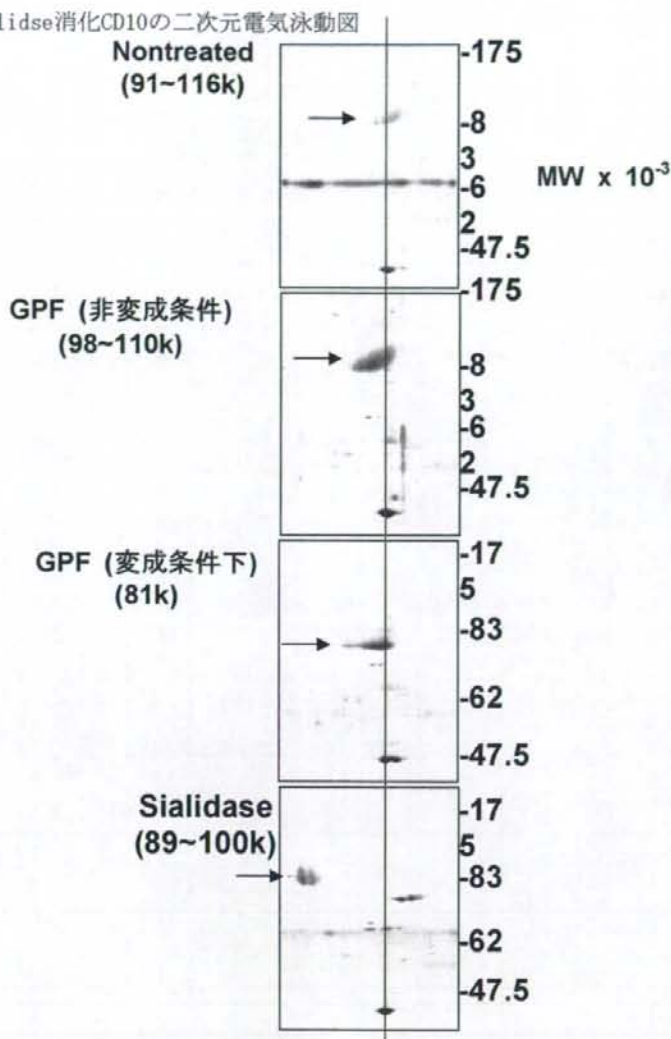
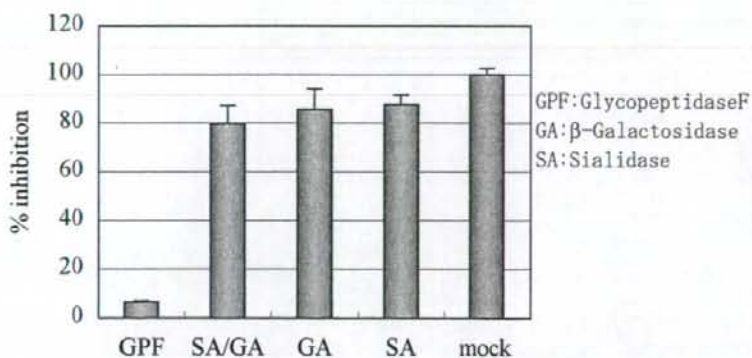
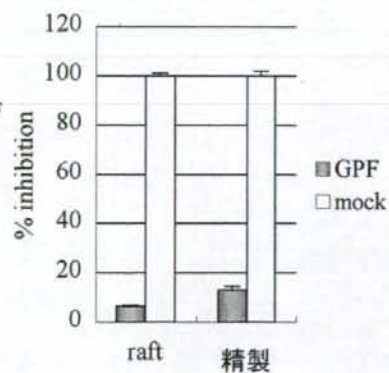


図4. グリコシダーゼ消化による糖鎖改変CD10分子のNEP活性  
4.1: ラフトCD10



4.2: 精製CD10



## 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、これまで本プロジェクトにおいて得られた成果に基づき、ヒト初代間葉系細胞の骨分化誘導とそれに伴う細胞表面糖鎖の構造解析を行い、糖鎖プローブの有用性について検証を行った。

### 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

前年までの成果に基づき、ヒト初代間葉系細胞に対して骨分化誘導を行った。アルカリフォスファターゼ活性ならびに骨分化マーカーの遺伝子発現解析を行い、骨誘導の有無について確認を行う。

### (2) 糖鎖プローブを用いた糖鎖構造解析

寿命延長したヒト間葉系細胞を骨誘導した際の糖鎖プローブを用いた実験から得られた知見をもとに、(1)で用いたヒト初代間葉系細胞の骨分化誘導に伴う糖鎖構造変化を、その制御する糖転移酵素遺伝子発現解析により確認し、糖鎖プローブでの解析の有用性について検証する。

### 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

ヒト初代間葉系細胞3株について、これまでに確立した方法に準じて、骨分化誘導を行った。その結果いずれの細胞株においてもアルカリフォスファターゼの活性の上昇、骨分化マーカー遺伝子の発現増大が認められ、骨誘導の確認ができた。

(2) 糖鎖プローブを用いた糖鎖構造解析  
骨分化が確認されたヒト初代間葉系細胞3株について骨分化過程で変化する糖鎖構造を制御する糖転移酵素遺伝子発現解析をおこなった。ヒト間葉系幹細胞を骨分化誘導する糖脂質糖鎖が大きく変化することがこれまでの糖鎖プローブを用いた実験から明らかになっていることから、糖脂質合成経路に関与する遺伝子を選択し検証を行った。その結果、各細胞とも骨分化に伴い糖脂質合成経路が活性化していることが明らかになった。この経路の活性化は、一部において糖鎖プローブを用いることによって検出された骨分化誘導特異的な糖鎖構造をもたらすことから、糖鎖プローブを用いた実験系の有用性が示唆された。

#### 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。今回本課題において確立された骨分化誘導法が、ヒト初代間葉系細胞においても検証できた。さらに誘導前後における糖鎖構造を決める糖転移酵素遺伝子の発現解析から、糖鎖プローブによる骨分化誘導によって特徴づける糖鎖構造変化が確認できた。このことはヘテロな細胞集団であるヒト間葉系細胞の規格化において糖鎖プローブを用いることの有用性が示唆され、規格化された間葉系細胞の臨床への展開が大きく開かれると考えられる。

#### E. 結論

寿命延長されたヒト間葉系幹細胞におい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・精製しマスマスプロト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可能を示した。

#### 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、受付番号 197、201、平成 18 年 6 月承認、受付番号 237、238 平成 19 年 11 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. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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(7):2125-2137. 2008
6. 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

7. 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
8. Sullivan S, Ichida JK, **Umezawa A**, Akutsu H. Elucidating nuclear reprogramming mechanisms: taking a synergistic approach. *Reprod Biomed Online*. 16(1):41-50. 2008

#### I. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 特許取得  
なし
- 2) 実用新案登録  
なし
- 3) その他  
なし