

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

56) 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

57) 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

58) 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

59) 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 スルーブット解析、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) β -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

60) 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

61) 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 スルーブット解析、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

62) 細胞表面のシアル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

63) 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

64) 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

65) 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

66) 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

67) 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

68) 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

69) 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、2
009年3月27-30日

70) 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、20
09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

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：糖鎖プライマー法を用いて、各種細胞に発現している糖鎖の構造を検出し、糖鎖パネルの作成を行った。神経芽腫細胞、白血病細胞、胚性癌腫細胞、ヒト胎児肺組織由来線維芽細胞および肺がん細胞などに糖鎖プライマーを投与して、各細胞の糖転移酵素に依存して合成される糖鎖の解析をLC-MS/MSを用いて行った。糖鎖プライマーとしては、Lac-C12プライマー、GlcNAc-C12プライマー、およびGalNAc-Thr-C12の3種類を用いることで、ガングリオ系列、グロボ系列、ネオラクト系列あるいはムチン型の糖鎖などを検出することができた。これにより、糖鎖の構造による細胞の分類、あるいは細胞の性質の違いによる糖鎖の種類の相違点について明らかにすることができた。

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。複数の糖鎖生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。

未熟神経芽細胞あるいは交感神経母細胞は胎生6週頃には神経堤から前脊椎や副腎原基の尾側に遊走し、分化・成熟し、交感神経節や副腎髄質を形成する。神経芽腫群腫瘍はこの分化・成熟過程の異常により発生するとされている。神経芽腫

は発生する部位、分化段階、そして腫瘍の悪性度の違いなど多様性に富んだ腫瘍である。

胚性癌腫細胞（EC細胞）は自己複製能と多分化能を有していること、極めてはっきりとした条件下で分化誘導できること、フィーダー細胞などの特別な培養が必要ないことなどの利点があるため、初期胚における発生・分化の研究対象として注目され、研究が活発に行われている。現在、EC細胞における糖鎖研究では、主に分化における糖鎖のマーカーはいくつか存在する。しかし、従来から行われている糖鎖マーカーの探索研究では、分化過程において変化する糖鎖を網羅的に解析することは困難である。

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。

これらの細胞を用いて、糖脂質型の糖鎖を検出するためにラクトースを有する糖鎖プライマーLac-C12およびN-アセチルグルコサミンを有するGlcNAc-C12、さらにはO-結合型糖鎖の検出を行うためにN-アセチルガラクトサミンを有するGalNAc α -Thr-C12を投与して糖鎖伸長反応を行い、得られた糖鎖伸長生成物の構造解析をMALDI-TOF MSおよびESI-MS/MSを用いて解析した。

B. 研究方法

糖鎖プライマー法

糖鎖プライマーとしては1-O-dodecyl-4-O- β -D-galactopyranosyl- β -D-glucopyr-

anoside (Lac-C12)、1-(*n*-dodecyl)-2-*N*-acetyl- β -D-glucopyranoside (GlcNAc-C12) および N^{α} -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 \times) 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 $6.0\sim 7.0\times 10^5$ 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 μ M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 $^{\circ}$ C、5% CO₂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 $^{\circ}$ 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画分とした。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 $^{\circ}$ 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 μ Lを加えて懸濁させ、ここからタンパク質濃度測定用に50 μ L分取し、残りを再び4 $^{\circ}$ 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。

培地画分は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。培地画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 μ Lとクロロホルム950 μ 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 μ L加えて溶かし、0.45 μ 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 μ L、内在性糖脂質は50 μ L加えてオートサンプラーにセットし、5 μ 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 ϕ \times 150 mm, Intakt) 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 μ L/minを保った。インジェクション量は毎回5 μ 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。

内在性糖脂質の解析

細胞にクロロホルム/メタノール=2/1 (v/v) を1 mL加えて30分間超音波照射したのち、15000 rpm, 20分間遠心分離した。上清は分取し、窒素気流下で溶媒を蒸発させた。残渣にはクロロホルム/2-プロパノール/水=7/11/2 (v/v/v) 1 mLを加えて30分間超音波照射し、15000 rpm, 20分

間遠心分離し、上清を先述の抽出液と混合して乾燥させた。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逆相カートリッジに吸着させ、MilliQ 10 mLで洗浄した後、メタノールでカラムから溶出させた。遠心エバポレーターでメタノールを蒸発させたものを高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) および液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS) のサンプルとした。

細胞から抽出した糖脂質はHPTLC plate (Silica gel 60) に展開することで分析した。糖脂質は、クロロホルム/メタノール=2/1 (v/v) に溶解し、1レーン当たり細胞数 1.0×10^7 cellsから得られた量となるように載せ、HPTLC plateに展開した。展開溶媒にはクロロホルム/メタノール/0.2% CaCl₂ aq.= 5/4/1 (v/v/v) を用いた。展開後はHPTLC plateを十分に乾かした後、レゾルシノール塩酸試薬で酸性糖を染色し、さらにオルシノール硫酸試薬で中性糖を染色した。これをHPTLC plateに噴霧し、清浄なガラス板ではさみ、120 °Cで約20 分間加熱した。青紫色に染色されたバンドはデンシトメーター (CS-9000, 島津製作所) で波長580 nmで解析した。これをHPTLC plateに噴霧し、ホットプレート上で105 °Cで加熱した。赤紫色に染色されたバンドはデンシトメーターで波長540 nmで解析した。

ガングリオシドのTLC免疫染色は次のように行った。糖脂質をクロロホルム/メタノール=2/1 (v/v) に溶解し、1レーン当たり細胞数 1.0×10^7 cellsから得られた量となるようにHPTLC plateに展開

した。展開溶媒にはクロロホルム/メタノール/0.2% CaCl₂ aq.= 5/4/1 (v/v/v) を用いた。展開後はHPTLC plateを十分に乾燥した後、0.1% ポリイソブチルメタクリレート /シクロヘキサンに1分間浸し、1% BSA/PBSで30分間ブロッキングを行った。1次抗体を90分間反応させた。洗浄後、2次抗体として、HRP標識のウサギ抗マウスポリクローナル抗体を1時間反応させた。TLC上の糖鎖に結合した抗体はECL plus (GE Healthcare Bio-science Corp) を用いてマニュアルに従って化学発光し、LAS-1000 (Fuji Film) にて検出した。

細胞から抽出した糖脂質は順相カラム (imtakt UK-silica, 150 mm×0.3 mm) をつないだ Agilent 1100 Series Capillary LC SystemのHPLCによって分離した。移動相はクロロホルム / メタノール / 50 mM 酢酸-トリエチルアミン (pH 4.2) =83 / 16 / 1およびメタノール / 50 mM 酢酸-トリエチルアミン (pH 4.2) = 3/ 1を用いた。

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、negative ion modeで測定した。測定後、対象のm/zの値でエクストライオンクロマトグラムを作成し、ピーク面積をコンパウンドリストで算出した。各糖鎖成分の全糖脂質の総ピーク面積に対する割合を算出し、発現糖鎖パネルを作成した。

C. 研究結果

神経芽腫細胞により得られた糖鎖構造の解析

各細胞株の内在性ガングリオシド発現様式の比較を行った。神経芽腫細胞株は主にガングリオa系列およびb系列のガングリオシドを生合成していることが考えられる。また、相対的にGD1aの発現が高い群とGD2の発現が高い群の存在が示唆された。

神経芽腫で過去に発現が明らかにされていたガングリオ系のガングリオシドのみではなく、ネオラクト系のガングリオシド、すなわち、シアリルパラグロボシド、さらにHexNAc、Hexを伸長する構造のガングリオシドも発現していることが明らかとなった。GD1a、GD3、GD2、GD1b、GT1bでアセチル化が検出され、特にGD2はアセチル化が強く、NB1とNB16ではその割合が全ガングリオシドの10%以上を占めていた。ガングリオシドのアセチル化は、そのレクチンやシグナル分子との結合能を抑制するなど細胞の機能に何らかの影響を与えていることが報告されている。アセチル化したガングリオシドは抗原性が高い可能性もあり、神経芽腫において新たな腫瘍マーカーとなり得る可能性も考えられる。さらに、他の小児腫瘍由来細胞株の発現糖鎖を解析した結果、そのうちの数株で同様にアセチル化したガングリオシドが発現されていることが明らかとなった。この結果から、ガングリオシドのアセチル化が腫瘍において特徴的な現象である可能性も考えられる。

もう1つ注目すべき点として、GD1a、GD2、AcGD2の割合が細胞株間で大きく異なることが明らかとなった。MYCN非増幅株3株を含むSK-N-SH、SK-N-RA、NB69、GOTO、NB9ではガングリオシドの中に占め

るGD1aの割合が高くGD2およびAcGD2の発現が低いのにに対し、IMR32、NB1、NB16、CHP126では逆にGD1aの発現低く、GD2およびAcGD2の発現が高かった。一方、CHP134、KP-N-NSではGD1a、GD2およびAcGD2いずれの発現も高かった。

定量分析の結果からソフトウェアRのHeatmap関数を用いて全糖脂質の割合から細胞株で階層的クラスタリングを行った。結果、細胞株を大きく2つの群に分けることができた。さらに、同定されたガングリオシド全体に占めるGD1a、GD2、AcGD2の割合が細胞株間で大きく異なっていたことから、これら3成分の発現量をヒストグラムで比較し、階層的クラスタリングを試みることで詳細な解析を行った。この結果から糖鎖の発現様式によって神経芽腫細胞株は詳細にみると3群に分類が可能であると考えられる。

F9細胞での糖鎖伸長実験

Dab2はF9細胞をRA処理すると発現が増加するタンパク質として知られているが、F9細胞にRAおよびdcAMP添加培養することによってその発現上昇が認められた。糖鎖プライマー投与に伴うDab2発現様式の変化は認められなかった。未分化F9細胞に対するDMSO投与により、Oct3の軽度の減少が認められたが、糖鎖プライマー投与群では、DMSO投与群とほぼ同様の発現量であった。以上の結果から、F9細胞の分化誘導系において、糖鎖プライマー自体による明らかな影響は認められなかった。

糖鎖プライマーから得られた糖鎖伸長生成物のLC-MS/MS解析をおこなった。未

処理のF9細胞 (F9-0d) と分化誘導処理4日後から糖鎖プライマーLac-C12とGlcNAc-C12を添加したF9細胞 (F9-4d) から得られた糖鎖伸長生成物の構造解析を行った。

Lac-C12を投与した培地から、グロボ系であるGb3Cer・Gb4Cer・Forssman antigen、ガングリオ系であるGM2・GM1a・GD3・GD2、ラクト・ネオラクト系であるLc₃Cerと同様の糖鎖構造と考えられる生成物が得られた。一方、GlcNAc-C12を投与した培地から、ラクト・ネオラクト系糖脂質および糖タンパク質のポリNアセチルラクトサミン骨格と同様の糖鎖構造と考えられる生成物が得られた。F9細胞をRAによって分化誘導した場合、グロボ系糖脂質の発現が変化することが報告されているため、TLC免疫染色を用いて、F9-0dとF9-4dの内在性糖脂質を解析し、Gb3Cer、Gb4Cer、Forssman antigenの発現を確認した。糖鎖プライマー法によって内在性の糖鎖と同様の構造を有する生成物が得られたことが示唆される。

得られた糖鎖伸長生成物の中で、特に顕著な量的変化を示すNeuAc-Hex-GlcNAc-C12はラクト・ネオラクト系の糖脂質および糖タンパク質の糖鎖生合成経路から生成されている可能性があり、現在までにF9を分化誘導した場合にこの糖鎖構造に対応した糖脂質あるいは糖タンパク質の発現量が変化するという報告はない。そこで、この生成物の定性、定量的解析をおこなった。LC-MS/MS解析によって、生成物はNeuAc-Hex-GlcNAc-C12であることが予想された。また、MS/MSのフラグメントパタ

ーンの解析からネオラクト系構造を有したNeuAc-Hexβ1, 4GlcNAc-C12であることが予測された。LC-MSで得られたピーク面積をもとにして定量化を試みた結果、F9-4dではF9-0dと比較してNeuAc-Hex-GlcNAc-C12の量が約8倍に増加していることが示唆された。

ヒト胎児肺組織由来線維芽細胞 (MRC5) での結果

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。

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。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。

肺がん細胞

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糖鎖伸長反応を解析した。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。

D. 考察

11種類の神経芽腫細胞における糖脂質での構造解析により糖鎖パネルを作成して、クラスタリング解析により細胞の分類を行うことが出来た。胚性癌腫細胞F9での糖鎖プライマー法による糖鎖伸長生成物を単離して構造解析を行った。培養法の改良により、糖鎖プライマー法を適用して、糖鎖伸長生成物の解析が可能になった。これらの実験では、これまでに各細胞で報告されていない糖鎖構造の検出が可能であった。

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。転移性の異なる2種類の細胞での糖鎖構造の違いが明確に検出されていた。これまでに転移との関係が知られていない糖鎖も含まれていた。

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。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

17種類の細胞と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。ハイスループットなLC-MS/MS解析手法による糖鎖解析を確立したことで、各種細胞での糖鎖パネルの作成を可能にした。さらに定量的なデータを活用することが可能になり、糖鎖パネルでは構造と発現量の2種類の情報を示すことができた。細胞の種類や性質の違いを糖鎖構造の違いから議論することを可能にした。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Gene transfer by DNA/mannosylated chitosan complexes into mouse peritoneal macrophages, M. Hashimoto, M. Morimoto, H. Saimoto, Y. Shigemasa, H. Yanagie, M. Eriguchi and T. Sato, *Biotechnology Lett.*, 28, 815-821 (2006)
2. Apparent suppression of MMP-9 activity by GD1a as determined by gelatin zymography, D. Hu, X. Tan, T. Sato, S. Yamagata, T. Yamagata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 349, 426-431 (2006)
3. Hyaluronic acid and its derivative as a multi-functional gene expression enhancer: Protection from non-specific interactions, adhesion to targeted cells, and transcriptional adhesion, T. Ito, N. Iida-Tanaka, T. Niidome, T. Kawano, K. Kubo, K. Yoshikawa, T. Sato,

- Z. Yang, Y. Koyama, J. Controlled Rel. 112, 382-388 (2006)
4. Construction of an oligosaccharide library by cultured cells for use in glyco-biotechnology, Nanotechnology in carbohydrate Chemistry (Ed. by Hideya Yuasa), Transworld Research Network, 167-173 (2006).
 5. Specific binding of GM1-binding peptides to high-density GM1 in lipid membranes, T. Matsubara, K. Iijima, M. Nakamura, T. Taki, Y. Okahata, T. Sato, Langmuir, 23, 708-714 (2007).
 6. The distinction of underivatized monosaccharides using electrospray ionization ion trap mass spectrometry, Xingyu Zhu and Toshinori Sato, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 21, 191-198 (2007).
 7. Positive regulation of tumor necrosis factor- α by ganglioside GM3 through Akt in mouse melanoma B16 cells, P. Wang, P. Wu, J. Zhang, T. Sato, S. Yamagata and T. Yamagata, Biochem. Biophys. Res. Commun., 356, 438-443 (2007)
 8. Ganglioside GD1a negatively regulates matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in mouse FBJ cell lines at the transcriptional level, D. Hu, Z. Man, P. Wang, X. Tan, X. Wang, S. Takaku, S. Hyuga, T. Sato, X.-S. Yao, S. Yamagata, T. Yamagata, Connective Tissue Research, 48, 198-205 (2007)
 9. Selective Precipitation of Salts on the Surface of a Gel State Phosphatidylcholine Membrane, K. Iijima, T. Matsubara, and T. Sato, Chem Lett., 36, 860-861 (2007)
 10. Structural Transition Study of a Fifteen Amino Acid Residue Peptide Induced by GM1, N. Fujitani, H. Shimizu, T. Matsubara, T. Ohta, Y. Komata, N. Muira, T. Sato, and S.-I. Nishimura, Carbohydr. Res., 342, 1895-1903 (2007).
 11. GM3 signals regulating Tnf- α expression are mediated by Rictor and Arhgdib in mouse melanoma B16 cells, P. Wang, X. Yang, P. Wu, J. Zhang, T. Sato, S. Yamagata, T. Yamagata, Oncology, 73, 430-438 (2007)
 12. 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)
 13. Glycosylation of dodecyl 2-acetamide-2-deoxy- β -D-glucopyranoside and dodecyl β -D-galactopyranosyl-(1-4)-2-acetamide-2-deoxy- β -D-glucopyranoside as saccharide primers in cells, T. Sato, M. Takashiba, R. Hayashi, X. Zhu, T. Yamagata, 343, 831-838 (2008)
 14. Syntheses of oligosaccharides using cell function, Toshinori Sato, Kenichi Hatanaka, Hironobu Hashimoto, Tatsuya Yamagata, TIGG, 19, 1-17 (2007)
 15. グライコチップ(糖鎖アレイ)、佐藤 智典、ナノバイオ計測の実際、講談社サイエンティフィック、pp42-51 (2007)
 16. Identification of Oligosaccharide-Recognition Molecules by Phage-Display Technology, M. Matsubara, T. Sato, Trends In Glycoscience and Glycotechnology, 19, 133-145(2007)
 17. 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).
 18. Ganglioside GD1a suppresses TNF α expression via Pknl 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).
 19. 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).
2. 学会発表

1. Identification of peptides that inhibit, influenza virus infection, T. Matsubara, T. Sato, ISBC2006, 2006. 8. 6-9
2. Construction of an oligosaccharide library using cells(35) Biocombinatorial Synthesis of Oligosaccharides, Development of glycan array, and glycome analysis, T. Sato, M. Murakami, T. Kaneko, Y. Ide, R. Hayashi, and T. Yamagata, ISBC2006, 2006. 8. 6-9
3. 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー (34) α -グリカンを合成するための糖鎖プライマー、村上舞、井出好美、水野真盛、佐藤智典、第26回糖質学会年会、2006年8月23日-25日
4. エレクトロスプレーイオン化法質量分析計による単糖の同定、朱 性宇、佐藤 智典、第26回糖質学会年会、2006年8月23日-25日
5. PDNA/糖修飾キトサン複合体の構造と細胞内への遺伝子導入、佐藤 智典、橋本麻由、森本 稔、斎本 博之、重政 好弘、柳衛 宏宣、第55回高分子討論会、2006年9月20日-22日
6. ライブラリー選択で得られたオリゴ糖鎖認識ペプチドの構造と機能、松原 輝彦、飯島 一智、角 真智子、佐藤 智典、第55回高分子討論会、2006年9月20日-22日
7. Selection and functional analysis of oligosaccharide-binding peptides, Teruhiko Matsubara, Kazutoshi Iijima, Hiroyuki Kubota, Toshinori Sato, 43JPS/PEM4, 2006. 11. 5-8
8. 自殺遺伝子/キトサン/ラクトース修飾PEG誘導体からなる3元複合体の抗腫瘍効果、古閑 理恵子、神谷 洋平、小山 義之、柳衛 宏宣、松田 修、佐藤 智典、第87日本化学会春季年会、2008年3/25-28
9. 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー (36) アミノ酸結合型糖鎖プライマーの合成とHL60細胞における糖鎖伸長反応、村上舞、井出 好美、水野 真盛、佐藤 智典、第87日本化学会春季年会、2008年3/25-28
10. 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー (37) キャピラリー電気泳動/質量分析計 (CE/MS) による生成物のハースルーブット解析、朱 性宇、佐藤 智典、第87日本化学会春季年会、2008年3/25-28
11. ランダム変異ファージライブラリーを用いたガングリオシド結合性ペプチドの定向進化、久保田 博之、松原 輝彦、佐藤 智典、第87日本化学会春季年会、2008年3/25-28
12. pTK/キトサン/ラクトース修飾PEG誘導体三元複合体によるin vivoでの抗腫瘍効果、佐藤 智典、古閑 理恵子、神谷 洋平、小山 義之、松田 修、柳衛 宏宣、遺伝子・デリバリー研究会第7回シンポジウム、2007年5月18日
13. 糖修飾キトサンを用いたin vitroおよびin vivoでの遺伝子導入と発現機構の解析、近藤洋子、橋本麻由、森本稔、斎本博之、重政好弘、柳衛宏宣、佐藤智典、遺伝子・デリバリー研究会第7回シンポジウム、2007年5月18日
14. 隠れマルコフモデルによるインフルエンザヘマグルチニン結合性ペプチドの配列パターン解析、山口 大介・島田 亜紀・大西 愛・松原 輝彦・佐藤 智典、第56回高分子学会年次大会、2007年5月29-31日
15. インフルエンザウイルス広域感染阻害を目指したペプチドのヘマグルチニンとの相互作用解析、齋藤 智美・松原 輝彦・佐藤 智典、第56回高分子学会年次大会、2007年5月29-31日
16. 糖鎖結合性ペプチドとB16細胞との相互作用の解析、山下 美季、野殿 英恵、松原 輝彦、佐藤 智典、第56回高分子学会年次大会、2007年5月29-31日
17. 糖鎖クラスターを認識するペプチドの結合解析、松原輝彦・飯島一智・藤谷直樹・清水弘樹・西村紳一郎・佐藤智典、第2回ホスト・ゲスト化学シンポジウム、2007年5月24日-25日 (金)
18. タンパク質をカプセル化したキトサン微粒子のアニオン性高分子による被覆化、芥川 晃士、佐藤 智典、第56回高分子学会年次大会、2007年5月29-31日
19. Construction of an oligosaccharide library using cells (38) Synthesis of oligosaccharides by using amino acid-linked saccharide primer, T. Sato, L. Xue, X. Zhu, M. Murakami, Y. Ide, S. He, M. Mizuno, Glycol9, 2007. 7/15-20
20. 糖鎖集合体を認識するペプチドの構造お

- よび機能解析、松原輝彦、飯島一智、久保田博之、藤谷直樹、清水弘樹、西村紳一郎、佐藤智典、第17回バイオ・高分子シンポジウム、2007年7月30日
21. 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー (39) GalNAc-Thr型糖鎖プライマーによる糖鎖伸長反応、佐藤 智典、朱 性宇、カシューブン、村上 舞、薛 蓮、金子 智典、水野 真盛、第27回日本糖質学会年会、2007年8月1日
 22. 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー (40) CE/MSによる糖鎖のハイスループット解析、朱 性宇、佐藤 智典、第27回日本糖質学会年会、2007年8月1日
 23. アニオン性高分子で被覆したpDNA/キトサン複合体の作製と遺伝子治療への応用、佐藤 智典、古閑 理恵子、神谷 洋平、楊 志宏、小山 義之、松田 修、柳衛 宏宣、第56回高分子討論会、2007年9月20日
 24. 再構成膜を用いた脂質ラフト中の糖脂質集合体の構造および機能解析、松原 輝彦・飯島 一智・曾我 典弘・佐藤 智典、第56回高分子討論会、2007年9月20日
 25. インフルエンザの感染を阻害する糖鎖ミミックペプチドの開発、佐藤 智典、イノベーションジャパン2007、9月13日
 26. 細胞に作らせる糖鎖ライブラリー(42)糖鎖-アミノ酸型糖鎖プライマーによる糖鎖合成、佐藤 智典、薛 蓮、村上 舞、朱性宇、何 シューブン、生命化学研究会シンポジウム、2008年1月11日
 27. インフルエンザウイルス感染を阻害するヘマグルチニン結合性ペプチドの同定、齋藤 智美・松原 輝彦・佐藤 智典、第88回日本化学会年会、2008年3月29日
 28. 隠れマルコフモデルによるインフルエンザヘマグルチニン結合性ペプチドの配列パターン解析、山口 大介・島田 亜紀・大西 愛・松原 輝彦・佐藤 智典、第88回日本化学会年会、2008年3月29日
 29. 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
 30. シアリ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
 31. 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
 32. 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
 33. 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
 34. β -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
 35. 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
 36. 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
 37. 細胞表面のシアル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
 38. 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 β 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
 39. 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
 40. 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
 41. 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

42. 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
43. 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
44. 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
45. シナプス前膜におけるGM1ガングリオシド
の集積はA β 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ライブラリー構築に応用するため、in vitroでの造血細胞の分化誘導培養系構築と、その糖鎖プライマー法実施のための至適化を行った。種々のサイトカインと固着化した接着因子を組合せることにより、低血清あるいは無血清の状態においても、種々の分化段階の単球系細胞の分化誘導系を構築した。を行い、糖脂質の解析をLC/MSで行った。浮遊系の前単球/単球と接着性のマクロファージの2群が得られ、培養期間を変えることでそれぞれ異なる分化段階の細胞が得られた。これらの細胞から有機溶媒で総脂質を抽出し、LC/MSで発現糖脂質解析を行った。浮遊系の細胞では、ネオラクト系ガングリオシドが特異的に発現していた。接着性の細胞では異なる分化段階でガングリオシド組成に大きな変化が見られ、比較的GD1aの発現が多かった。薄層クロマトグラフィーなどの従来の方法では、糖鎖構造の相違しか判別することができなかったが、MSでは質量数を算出することができるためこれまであまり着目されてこなかった糖脂質の疎水部、すなわちセラミド構造の相違についても明らかにできるようになった。本研究における培養系では、糖脂質のセラミドの分子種としては分子量として537.5と647.5のものが大部分を占め、分化前後ではあまりその組成に変化はないことが明らかとなった。これまでの薄層クロマトグラフィーによる解析では詳細な解析は困難であったが、LC/MSを用いることで非常に高感度な分析が可能になったことに加え、糖脂質における疎水部すなわちセラミド構造の相違について検討することが可能になった。

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、細胞機能において重要な機能を発揮することが知られている。また、糖鎖

は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

有しており、精製・分析が難しく、解析に用いるのに有用な抗体も不足していることなどから、その構造や機能の詳細については不明な点が多く、蛋白質等と比較するとその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、糖鎖研究の医学・医療応用を積極的に進める必要がある。そこで本研究では、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球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。本年は、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構築と、その糖鎖プライマー法実施のための至適化を行った。

B. 研究方法

あらかじめFibronectin、N-cadherin、V-CAM1、Galectin等の接着関連因子を固着化した24穴培養プレートを用いて、ヒト骨髄由来CD34陽性細胞を10%牛胎児血清 (FCS) 添加RPMI1640培地、あるいは種々の市販の無血清培地に 1×10^4 /mlの細胞密度で浮遊し、種々のサイトカインのカクテルを添加して培養した。一定期間培養したのち、細

胞の分化の状況を、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。また、細胞の一部を回収してtotal-RNAを抽出し、cDNAを合成して種々の血球の系統特異的遺伝子に対するプライマーを用いたRT-PCRを行った。また、サイトカインの分泌は、Cytokine Beads Array (CBA, BD社)を用いて定量を行った。

マウス骨髄間質細胞株MS-5およびマウス繊維芽細胞株NIH-3T3からtotal-RNAを抽出し、Affimetrix社GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrayにより網羅的遺伝子発現を行った。

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) を使い、カラムはImtakt社製Unison UK-Silica, (150 mm x 0.3 mm ϕ) を使用し、移動相はクロロフォルム/メタノール/50 mM 酢酸トリエチル

アミン (pH4.2) 混合移動相系で、HPLC Pump Aにはクロロフォルム/メタノール/50 mM 酢酸トリエチルアミン (pH4.2) = 83/16/1、Pump Bにはメタノール/50 mM 酢酸トリエチルアミン (pH4.2) = (3/1)をセットしてAとBの混合比を変更させて分離・溶出を行うグラディエントモードで分離した。糖脂質としてガングリオシドGM1より後に溶出したものを中心に解析した。

(倫理面への配慮)

本年度は培養細胞を用いた実験のみ実施した。ヒト骨髄由来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、単球系細胞への分化について検討したところ、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。また、サイトカインの分泌について検討したとこ

ろ、双方の分画で自発的なIL-8 およびIL-6の分泌と、lipopolysaccharide (LPS)-誘導性のinduced tumor necrosis factor (TNF)- α の分泌を認めた他、接着系の細胞でのみLPS-誘導性のIL-10の分泌を認めた。一方、培養3週間の時点でも同様の解析を行ったところ、浮遊系、接着系ともそれぞれ培養5週目とほぼ同様な細胞形態と細胞表面抗原の発現様式を示していたが、サイトカインの分泌については、双方でIL-8のみ自発的な分泌と、LPS-誘導性のIL-6 および TNF- α の分泌を認めたがIL-10の分泌は認めなかった。また、10%FCS添加と無血清培地の双方で比較を行ったが、いずれも同様の結果が得られた。

2) 単球系細胞の発現糖脂質解析

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解析を行った。

発現しているガングリオシドとしては、GM1, GD1a, GD3, GD2, GD1b, IV3NeuAc α -nLc4Ce, IV3NeuAc α -nLc5Cer, VI3NeuAc α -nLc6Cerの存在を確認した。得られた発現糖脂質のシグナル総和におけるそれぞれの比率を算出したところ分化段階、浮遊系、接着系で組成が異なることが明らかとなった(図)。特に浮遊細胞では3週間分化誘導したもの、5週間培養したもの共にネオラクト系ガングリオシドIV3NeuAc α -nLc5Cerが発現していたが、接着系細胞ではいずれもその発現が見られなかった。一方でガングリオシドGD1aは接着した細胞で比較的多

く発現が見られた。

MSでは同時に糖脂質糖鎖構造の相違に加え疎水部すなわちセラミド構造の相違についても検討を行ったが、分化誘導前後では変化はなく、本培養条件下ではセラミドの分子量はそれぞれ537.5, 647.5のものが大部分であった。

D. 考察

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

ヒト骨髄由来CD34陽性細胞から単球系に分化させた状態において、異なる分化段階の単球系細胞における発現糖脂質のパターンに大きな差があることが明らかになった。特に浮遊系の細胞ではネオラクト系ガングリオシドが特異的に発現されていることが明らかになった。ネオラクト系ガングリオシドはHL60などの細胞株を用いた実験で細胞を顆粒球系へと分化させることが報告されているが、幼弱な分化段階での発現や機

能などは明らかになっていない。接着系の細胞では、GD1aが比較的多く発現されていることも明らかになった。GD1aはがん細胞などで細胞移動・運動などに機能していることが報告されている。今後異なった個体や正常末梢血由来単球若しくはマクロファージの発現糖脂質をLC/MSで解析し比較検討することで、幼弱な血球細胞や白血病細胞等の特異的な糖脂質発現パターンを明らかにすることが可能と考えられる。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。

E. 結論

低血清～無血清の状態で、種々の分化段階の単球および血小板系細胞を分化誘導する培養系を確立した。また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。本研究では非常に微量な検体でも高感度に発現糖脂質を解析可能なLC/MSを使用して限られた数の正常細胞で発現糖脂質解析を行い分化段階によって糖脂質発現パターンが異なることを明らかにした。

本研究ではLC/MSを分析に使用したことで、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ついて検討を行うことが可能となった。しかしながら糖鎖部分に着目した場合、本研究における培養条件では、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taguchi T, H, Shiozawa Y, Matsui J, Kitamura N, Miyagawa Y, Katagiri YU, Takahashi T, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. Interleukin-7 contributes to human pro-B-cell development in a mouse stromal cell-dependent culture system. *Exp Hematol.* 35:1398-1407, 2007.
- 2) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Akutsu H, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J-I, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. A novel monoclonal anti-SSEA-4 antibody, 6E2, preferentially stained interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 364:838-843, 2007
- 3) Hashii N, Kawasaki N, Nakajima Y, Toyoda M, Katagiri Y, Itoh S, Harazono A, Umezawa A, Yamaguchi T. Study on the quality control of cell therapy products Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1160: 263-269, 2007.
- 4) Katagiri YU, Sato B, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. The detergent-insoluble microdomains, rafts can be used as an effective immunogen. *Glycoconj J.* 25:495-501, 2008
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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.
- 8) 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) 片桐洋子, 佐藤 伴, 川崎ナナ, 伊藤 さつき, 中島英規, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. ヒトB前駆細胞株に発現するCD10の糖鎖の多様性. 第27回日本糖質学会年会, 福岡, 8月1日-3日, 2007.
- 2) 佐藤 伴, 片桐洋子, 宮戸健二, 阿久津英憲, 中島英規, 大喜多肇, 秦 順一, 藤本純一郎, 梅澤明弘, 年森清隆, 清河信敬. 新規抗-SSEA-4単クローン抗体6E2

のマウス着床前胚との反応性. 第27回日本糖質学会年会, 福岡, 8月1日-3日, 2007.

3) 田口智子, 宮川世志幸, 堀内保臣, 斎藤洋平, 竹野内寿美, 北村紀子, 松井 淳, 佐藤 伴, 鈴木恭子, 斎藤正博, 片桐洋子, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬.

Oncostatin Mの造血調節作用に関するin vitroでの検討. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会学会合同開催, 横浜, 10月11日-13日, 2007.

4) 片桐洋子, 佐藤 伴, 田口智子, 石垣宏仁, 伊藤 靖, 大喜多肇, 小笠原一誠, 藤本純一郎, 清河信敬. 同系腫瘍細胞及びヒト腎癌由来細胞株ACHNラフト免疫により誘導される免疫応答. 第37回日本免疫学会総会. 東京, 11月20日-22日, 2007.

5) 片桐洋子, 佐藤 伴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 中島英規, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. ヒトB前駆細胞株に発現するCD10の糖鎖の多様性とendopeptidase活性. 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 12月11日-15日, 2007.

6) 佐藤 伴, 片桐洋子, 宮戸健二, 阿久津英憲, 中島英規, 大喜多肇, 秦 順一, 藤本純一郎, 梅澤明弘, 年森清隆, 清河信敬. 新規抗-SSEA-4単クローン抗体6E2のマウス着床前胚との反応性. 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 12月11日-15日, 2007.

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

8) 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.

9) 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.

10) 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.

11) 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.

12) 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.

13) 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.

14) 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.

15) 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.

16) 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.

17) 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.

18) 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.

19) 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.

20) 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.

21) 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.

22) 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