

## 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：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をnanoLC/ESI-MSによりおこなった。ヒトB前駆細胞株NALM6のCD10のN-グリコシド型糖鎖はNALM27に比して極めて多様性に富み、同一の分子でかつ同じヒトB前駆細胞性ALL細胞であるにもかかわらずこのような大きな違いが見られるのはまれである。糖鎖構造の違いとタンパク機能、白血病細胞の生物学的特徴、等との関連について検討を行うため、CD10分子のNeutralendopeptidase (NEP) 活性に糖鎖構造が関与するかどうかを検証した。グリコシル化の多様性に乏しいNALM27細胞は、NALM6細胞よりも比活性が8倍高く、この高い比活性は、一次構造の違いよりも糖鎖構造の違いに起因すると考えられた。非変成条件下でGlycopeptidaseF消化しても、大部分のN-グリコシド型糖鎖は除去されないが、シアル酸に富む一部の糖鎖のみが除去された。この糖鎖改変により、NEP活性はほぼ完全に消失した。NEP活性発現に必須のN-グリコシド糖鎖があり、その糖鎖は、CD10分子の表面に結合サイトがあると推察される。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。

## 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。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ES細胞でのSSEA-4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解析し、発現糖鎖のカタログ化を図ることを目的とする。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をモデルに、糖タンパク糖鎖構造解析/プロファイリング法のシステム化について検討した。

CD10は、B前駆細胞性ALL (いわゆる Common ALL) に特異的な抗原Common ALL Antigen (CALLA) として報告されたが、その後endopeptidase活性をもつタイプII型の膜タンパクであることが明らかにされ、リンパ球前駆細胞の他、初期活性化B細胞、好中球、腎糸球体などの上皮系細胞にも発現していることが判明した。その分子量は、ペプチド部分は750アミノ酸残基からなり約85.5kであるが、N-グリコシド型糖鎖結合部位が6箇所あり、高度にグリコシル化されているため SDS-PAGE上では110kになる。そこで、糖タンパク糖鎖パネル化の良いモデルになると考え、その解析を行った。

## B. 研究方法

1. B前駆細胞株のCD10: NALM6, NALM16, NALM27, KM3のCD10の発現量、NEP活性、比活性を測定した。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。NEP活性測定は、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 (図1a)。MCAは定量性、linearity、感度ともにすぐれた基質である (図1b)。比活性 (単位CD10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糖鎖のLC/MS解析: CBB染色した二次元ゲルから切り出したCD10分子もしくはAffinity精製したCD10分子を、還元アルキル化後、50mMリン酸緩衝液pH7.2中で4 unit のGlycopeptidase F (Takara)による消化を19時間おこない、CD10分子からN-グリコシド型糖鎖を遊離させた。遊離してきたN-グリコシド型糖鎖を水素化ホウ素ナトリウムで還元し、nanoLC/ESI-MS/MS質量分析計 (LTQ, Thermo Electron Corp. San Jose, USA) を使って、ポジティブ及びネガティブイオンモードでLC/MS解析を行った。

3. 細胞膜マイクロドメイン (ラフト) 画分の調製とCD10精製: ラフトは1% Triton

不溶性で低密度画分としてショ糖密度勾配超遠心法により調製した。精製CD10は可溶性画分から抗CD10単クローン抗体1F6を用いた免疫沈降またはAffinity column chromatographyにより得た。

4. 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Glycopeptidase F (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, NALM16, NALM27, KM3のCD10のフローサイトメトリー及びWestern解析: NALM6, NALM16, KM3は強陽性であったが、NALM27の発現は弱く、不均一であった (図2.1)。またタンパクレベルでもNALM27の発現量は突出して少なく (図2.2)、LASで定量すると、NALM6に比して約1/20であった (図2.3)。

2. NALM6とNALM27細胞のCD10の二次元電気泳動による解析: ラフトを調製し、二

次元電気泳動でラフトタンパクを分離した。CBB染色像(図3上)と、抗CD10によるWestern解析像(図3下)を示す。質量分析法により両細胞の二次元ゲル上におけるCD10分子の位置が確認された(図3矢印)。アクチン(A)との相対的な位置から考慮して、NALM6のCD10分子の方がNALM27のそれよりもacidic側に広く展開している、シアル酸の付加が多いと推察される。

3: CD10糖鎖のLC/MS解析: NALM6細胞およびNALM27細胞、双方のCD10の糖鎖プロファイルをLC/MSによって解析した。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4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。NALM6のCD10の方がシアル酸で飽和された糖鎖が多く、より不均一性が高いのに対し、同じCD10でもNALM27由来のものはほとんどがシアル酸不飽和の糖鎖で、不均一性が低く、両者の糖鎖構造には明らかな差が認められた。

データベースを活用し、NALM6細胞およびNALM27細胞の糖転移酵素遺伝子発現を網羅的に解析した。遺伝子発現に有意な差がみられたのは、UDP-Gal:βGlcNAc β1,4-galactosyltransferaseとUDP-N-acetyl-α-D-galactosamine:polyp eptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2の2酵素で、いずれもNALM6においてその発現が亢進していた。前者は糖タンパクに普遍的にみられるGalβ1,4GlcNAcの基本構造を合成する酵素であり、後者はO-グリコシド型糖鎖生合成の根幹の糖転移酵素である。

3. CD10のNEP活性測定: 酵素源としてインタクトの細胞、ラフト、精製CD10を用いて酵素反応を行い、測定ごとに基準CD10標品の検量線からCD10量を求めた。細胞あたりのNEP活性はNALM6、NALM16、KM3に比べ、NALM27は低かったが、単位CD10あたりの活性で比較すると、NALM27は8倍近く高かった(図5.1)。NALM6とNALM27のラフト(図5.2)、精製CD10(図5.

3)を酵素源として同様の測定を行ったが、インタクトな細胞と同様、NALM27のCD10は高い比活性を示した。

4. 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/β-Galactosidase消化でNeuAcα2,3(6)Galβ1,4が除去されたことが、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GlycopeptidaseF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。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/β-ガラクトース除去CD10のNEP活性はそれぞれ、1.4%及び2.1%の低下に留まったが、一部のN-グリコシド型糖鎖除去は、9.5%も低下した(図6.1)。精製CD10の非変成条件下でのGlycopeptidaseF消化でも同様の結果が得られた(図6.2)。

#### 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、CD10分子のNグリコシド型糖鎖の多様性は、細胞により大きく異なることが明らかとなった。また、CD10分子の持つNEP活性も細胞により異なった。

NALM6のCD10分子は細胞質側のP<sub>26</sub>と膜貫通領域内のT<sub>44</sub>と細胞外領域のT<sub>81</sub>がRに置換している、NALM27等他のヒトB前駆細胞株や正常組織とは異なる。いずれもNグリコシル化や活性部位とは関連性のない位置であり、1次構造の違いが活性に関連している可能性は低い。発現量の違いが細胞内での活性調節に関与している可能性も考えられるが、精製CD10でもNALM27のNEP活性はたかく、構造上の違い、すなわち糖鎖構造の違いが活性の差に影響を与えていると推測された。

CD10分子のシアル酸、次にβ-ガラクトースを除去すると、徐々にNEP活性は低下するにすぎないが、一部のN-グリコシド型糖鎖を除去すると、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GlycopeptidaseF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の比活性の違いは、糖鎖構造に起因すること、表面に露出している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) 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 Nakaijima, 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.

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

図1.NEP活性測定のプロトコールと反応生成物4-Methyl-Coumaryl-7-Amideの検量線

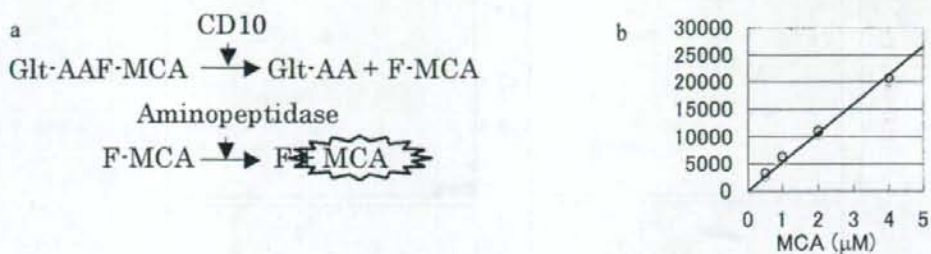


図2. B前駆細胞株4種のCD10発現.

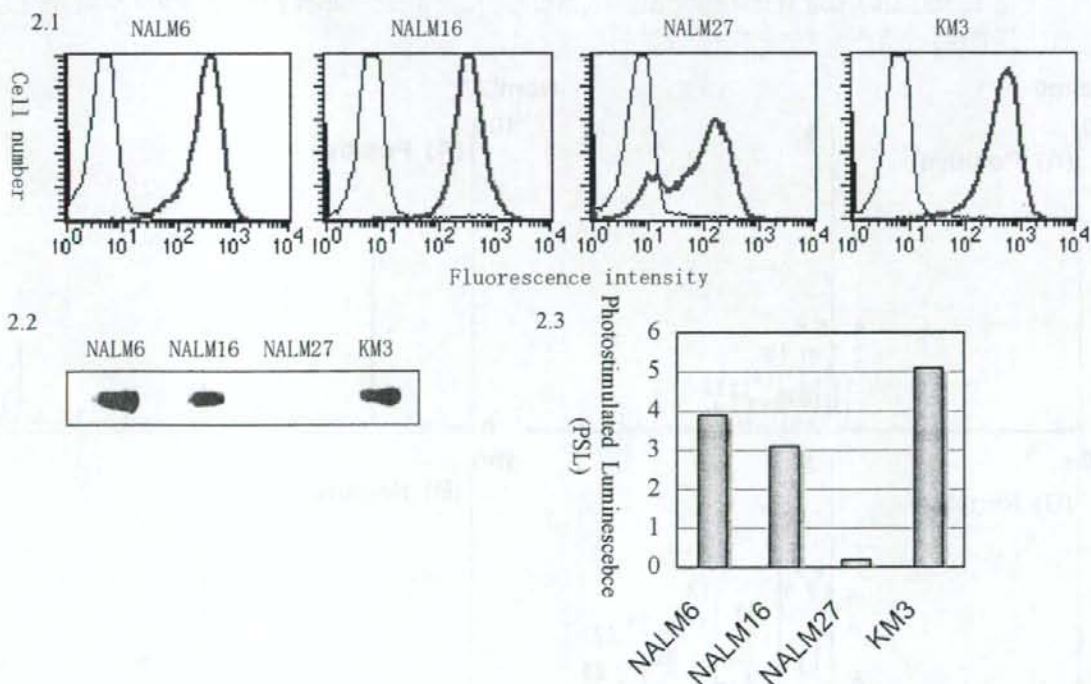


図3.NALM6とNALM27のラフトマイクロドメインの二次元電気泳動像と抗CD10抗体によるWestern解析

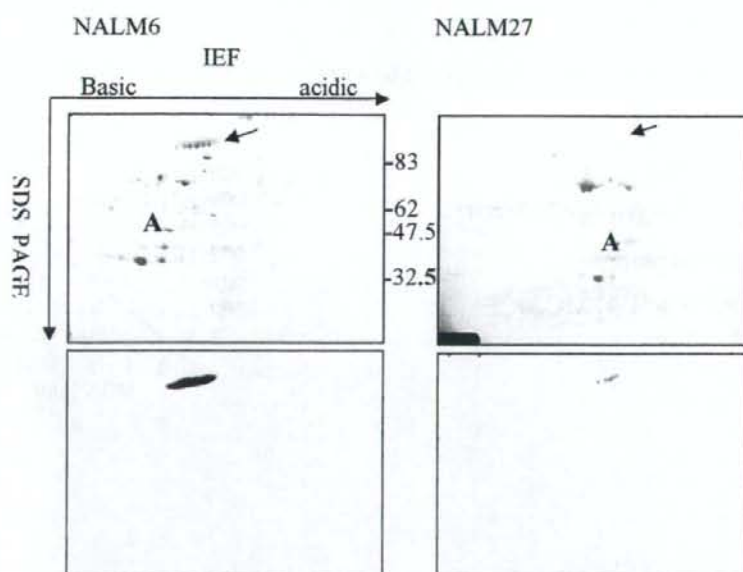


図4.NALM6とNALM27細胞のCD10から調製したN-グリコシド型糖鎖のフルマススキャンによって得たトータルイオンクロマトグラム.

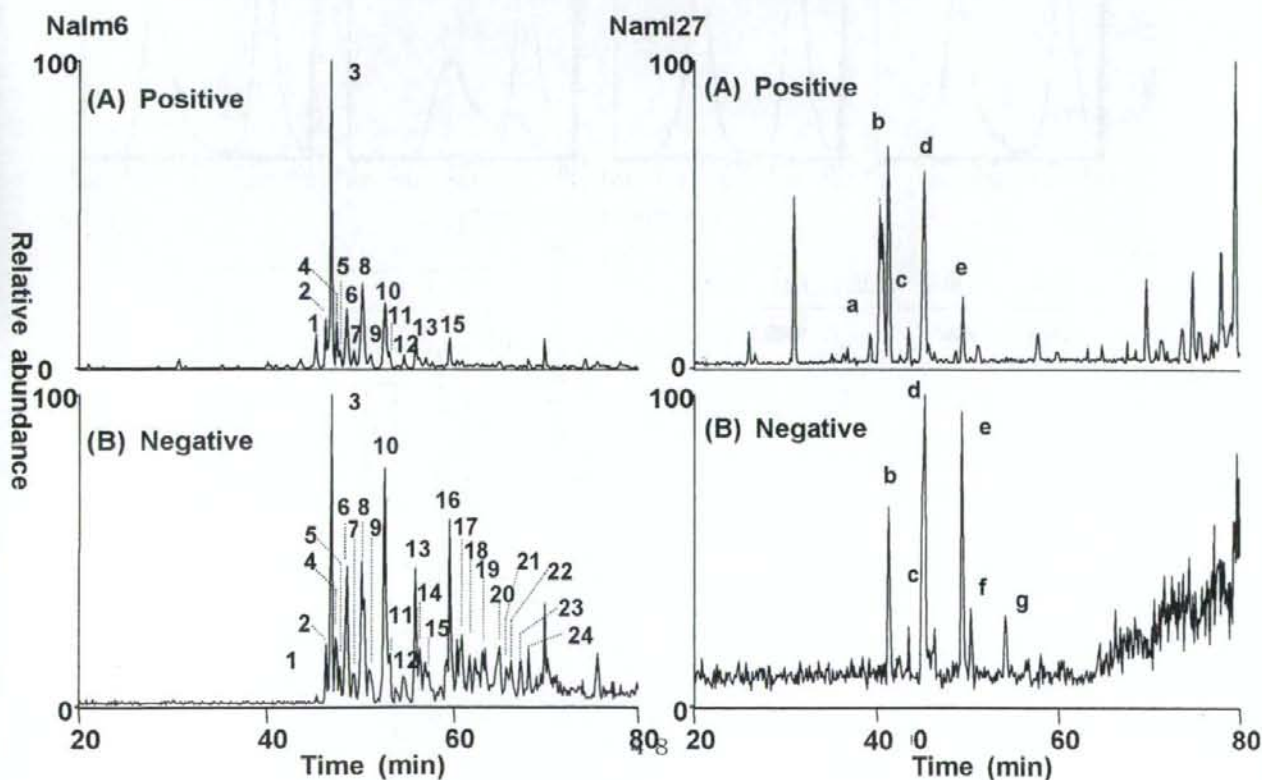




表 1. MS/MS スペクトルより推定される N-グリコシド型糖鎖

Nalm 6

Peak No.	Observed m/z (charge)		Theoretical mass	composition <sup>a</sup>	Deduced structure <sup>b</sup>
	positive	negative			
1	822.31 (2)		1642.608	[Hex] <sub>3</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	Bi
2	947.35 (2)	945.42 (2)	1892.677	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>3</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	Hybrid
3	967.86 (2)	965.85 (2)	1933.703	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	BiNA1
4	1150.42 (2)	1148.42 (2)	2298.835	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	TriNA1
5	895.34 (2)	893.33 (2)	1788.666	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	FBi
6	1113.40 (2)	1111.40 (2)	2224.800	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	BiNA2
7	1040.89 (2)	1038.88 (2)	2079.761	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	FBiNA1
8	1040.89 (2)	1038.88 (2)	2079.761	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	FBiNA1
9	1223.45 (2)	1221.45 (2)	2444.893	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	FTriNA1
10	1186.44 (2)	1184.43 (2)	2370.857	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	FBiNA2
11	1150.43 (2)	1148.42 (2)	2298.835	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	BiLac1NA1
12	1223.45 (2)	1221.45 (2)	2444.893	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	FBiLac1NA1
13	1113.41 (2)	1111.40 (2)	2224.800	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	BiNA2
14	1223.44 (2)	1221.45 (2)	2444.893	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	FBiLac1NA1
15		1008.03 (2)	3027.084	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>	
16	1186.44 (2)	1184.43 (2)	2370.857	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	FBiNA2
17	1010.04 (3)	1008.03 (3)	3027.084	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>	FTriNA3
18		1057.39 (3)			
19		1276.14 (3)	3831.185	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>9</sub> [HexNAc] <sub>8</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	
20	1156.42 (3)	1154.42 (3)	3466.253	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>8</sub> [HexNAc] <sub>7</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	FTriLac2NA2
21		1276.14 (3)	3831.385	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>9</sub> [HexNAc] <sub>8</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	
22		1251.46 (3)	3757.349	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>8</sub> [HexNAc] <sub>7</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>	
23		1373.17 (3)	4122.481	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>9</sub> [HexNAc] <sub>8</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>	
24		1129.74 (3)	3392.216	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>7</sub> [HexNAc] <sub>6</sub> [NeuAc] <sub>3</sub>	

Nalm 27

Peak No.	Observed m/z (charge)		Theoretical mass	composition <sup>a</sup>	Deduced structure <sup>b</sup>
	positive	negative			
a	822.31 (2)		1642.208	[Hex] <sub>3</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	Bi
b	967.86 (2)	965.85 (2)	1933.703	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	BiNA1
c	895.34 (2)	893.33 (2)	1788.666	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	FBi
d	1040.89 (2)	1038.88 (2)	2079.761	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	FBiNA1
e	1223.45 (2)	1221.45 (2)	2444.893	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>1</sub>	FTriNA1
f		1367.00 (2)	2735.989	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	FTriNA2
g		1367.00 (2)	2735.989	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>5</sub> [NeuAc] <sub>2</sub>	FTriNA2

<sup>a</sup>estimated from m/z values obtained by FTMS<sup>1</sup>;

<sup>b</sup>deduced from MS<sup>2</sup> spectra in the positive ion mode; F, fucosyl; NA, N-acetyl neuramic acid; lac, lactosamine. Bi, biantennary, Tri, triantennary;<sup>9</sup>

図5. B前駆細胞株4種のCD10のNEP活性

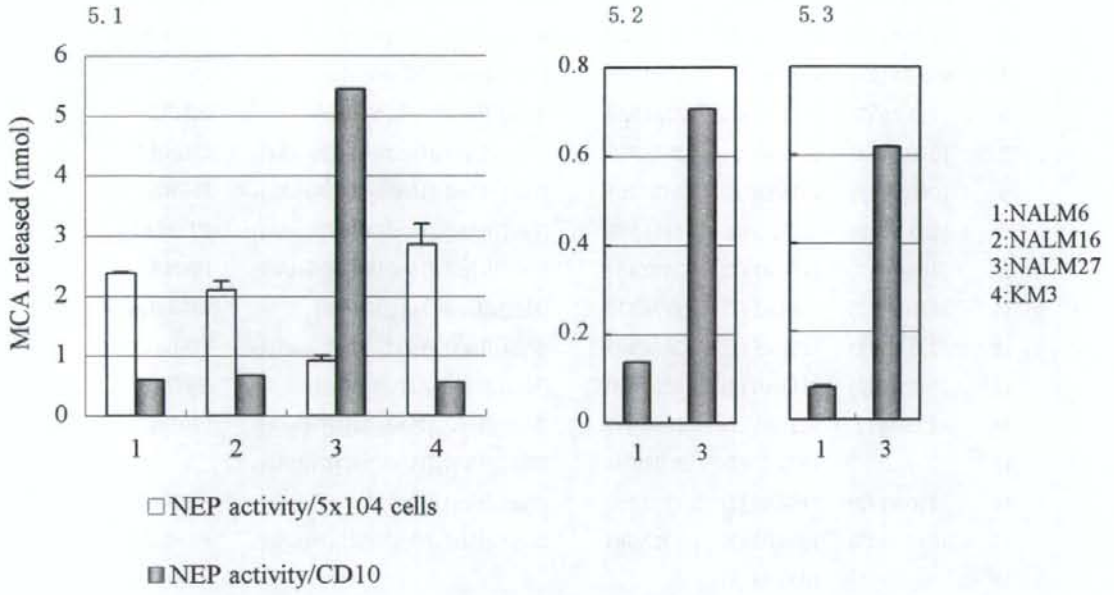
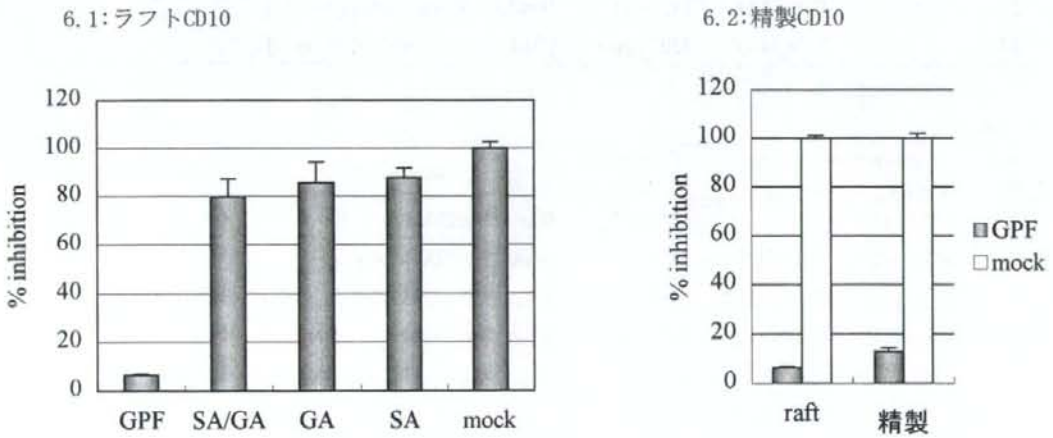


図6. グリコシダーゼ消化による糖鎖改変CD10分子のNEP活性



## 間葉系未分化細胞プロファイリング

研究分担者 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。本研究課題においては、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、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。本プロジェクトにおいて、ヒト初代間葉系細胞の未分化並びに骨分化誘導法の培養系の確立、糖鎖プローブを用いた細胞表面糖鎖の構造解析およびその有用性についての検証を行った。

### 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細胞の調整とプロファイリング

分離培養したヒト間葉系細胞の性質を細胞表面マーカー、gene array を用いたプロファイリングを行い細胞の有する性格を糖鎖関連遺伝子に関して詳細に検討する。そのデータを利用して、これらの細胞が多分化能を有す状態を

保つ培養条件、方法等を確立する。また糖鎖プライマー解析のため血清の影響をできるだけ排除した培養の最適条件について検討する。

#### 2) 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

ヒト間葉系細胞を、細胞系譜の異なる分化誘導系、特に骨分化誘導系をおこなう培養条件について検討する。各系譜に分化させるのに必要な増殖因子や低分子化合物などについて、添加濃度・時期・期間を詳細に検証する。

#### 3) 糖鎖プローブを用いた糖鎖構造解析

ヒト間葉系細胞を、2)の条件のもと糖鎖プローブを用いて分化状態による細胞表面糖鎖解析を行う。さらに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培養条件の確立

ヒト間葉系細胞における未分化能および分化誘導の最適培養条件の検討をおこなった。糖鎖プローブを用いた糖鎖構造解析可能な培養条件をほぼ確立した。

## 2) 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について、1) で確立した方法に準じて、骨分化誘導を行った。その結果骨分化誘導の指標であるアルカリフォスファターゼの活性上昇、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。

## 3) 糖鎖プローブを用いた糖鎖構造解析

ヒト間葉系細胞に対し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・精製シマススペクトロメトリー等を用いた構造解析を行った。その結果、①SSEA-4 タイプの糖鎖が未分化細胞特異的に検出された。②骨分化特異的な糖鎖構造が確認できた。その中で検出されにくいとされる硫酸化糖鎖構造が確認できたことは注目される。そこで骨分化が確認されたヒト初代間葉系細胞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行った。骨分化誘導する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り、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。本研究課題において、安定した未分化維持培養並びに骨分化法を確立し、ヒト初代間葉系細胞においても有効であることが検証できた。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・精製シ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)。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.
- 9) Cui CH, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, Umezawa A. Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. **Mol Biol Cell**. 18(5):1586-1594, 2007.
- 10) Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Terai M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. **Stem Cells**. 25(8):2017-2024, 2007.
- 11) Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, Nishiyama N, Tsuji H, Cui CH, Segawa K, Uyama T, Kami D, Miyado K, Asada H, Matsumoto K, Saito H, Yoshimura Y, Ogawa S, Aeba R, Yozu R, Umezawa A. 'Working' cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. **Exp Cell Res**. 313(12):2550-2562, 2007.
- 12) Toyoda M, Takahashi H, Umezawa A. Ways for a mesenchymal stem cell to live on its own: maintaining an undifferentiated state ex vivo. **Int J Hematol**. 86(1):1-4, 2007.
- 13) Umezawa A, Toyoda M. Two MSCs: Marrow stromal cells and mesenchymal stem cells. **Inflammation and Regeneration** 27:28-36, 2007.
- 14) Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. **J Cell Biochem**. 100(5):1240-1254, 2007.
- 15) Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. **Exp Cell Res**. 313(4):698-706, 2007.
- 16) Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, Umezawa A, Young MJ. A

comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. **Stem Cells**. 24(10):2270-2278, 2006.

- 17) Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, Umezawa A. Increased mobilization of c-kit+ Sca-1+ Lin-(KSL) cells and colony-forming units in spleen (CFU-S) following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification. **J Cell Physiol**. 208(1):188-1894, 2006.
- 18) Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. **Endocrinology**. 147(9):4104-4111, 2006.

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

## 分担研究報告書

## 発現糖鎖解析、糖鎖修飾分子合成および抗糖鎖抗体作製

研究分担者 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

研究要旨: 分化・がん化により細胞に発現する糖鎖は多様に変化する。その発現糖鎖の変化を明らかにするためには糖鎖を高精度に分離し、微量で高感度に検出して構造解析をする手法を確立する必要がある。その手法として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を採用し、それを用いて糖鎖を分離する条件を市販標準品で検討し、いくつかの糖鎖の分離分析法を確立した。LC/MSによる分析を高精度に行うためには試料の前処理が重要となる。前処理の方法として固相抽出法を採用し、糖脂質のうち電荷を持つガングリオシドと中性糖脂質を分離する方法を確立した。更に糖鎖プライマー法で産生した糖蛋白質O結合型糖鎖をLC/MSで分離・分析する方法を確立し、14種類の糖鎖の糖鎖配列を同定した。糖鎖プライマー法は糖脂質糖鎖を解析することは可能であるが、糖蛋白質N結合型糖鎖に対する糖鎖プライマー法は未だ開発されていない。そこで、糖鎖を糖蛋白質より切り出す手法としてヒドラジン分解法を採用し、当研究室でグラファイトカーボン固相を利用して糖鎖遊離反応で使用した余剰ヒドラジンを安全に除去すると共に糖鎖を効率よく回収する方法を確立した。またゲル電気泳動をして単一バンドとなったゲル中の糖蛋白質から同様にヒドラジン分解し、糖鎖を回収する手法を確立した。糖鎖を高精度に分離・構造解析するため、遊離した糖鎖を2-アミノピリジンで修飾し、LC/MSで同時に解析する手法を確立した。また、内在性糖脂質を効率よくLC/MSで解析する方法を確立するために、新たに開発されたジルコニア固相を用いて細胞から得られた脂質画分からLC/MSによる分析に大きな障害となるリン脂質を効率よく除去する方法を確立し、糖脂質を無傷のまま効率よく回収してLC/MSで分析する手法を確立した。これらの成果により、患者検体のように微量の細胞しか得られない試料に発現する糖鎖を網羅的に解析することが可能となったため、クラスタリング解析等統計学的な解析が可能となった。従って解析する検体数を増やすことで今後発現糖鎖による細胞の分類が可能となり、既存の診断法と組み合わせることでテーラーメイド医療をはじめとした治療法も可能になると考えられる。

## A. 研究目的

糖鎖は核酸・タンパク質に続く第3の生命鎖といわれ、多様な構造が存在する。細胞に発現する糖鎖は、細胞の成熟やがん化により発現パターンが大きく変化することが知られている。これまでこの糖鎖の解析は薄層クロマトグラフィー (TLC) やレクチンなどを用いて行われてきたが、感度や特異性が充分ではなかったため、詳細な解

析は比較的大量に存在するものに限られていた。

一方マスマスペクトロメトリーは微量な生体分子を網羅的に高感度で検出できる手段であり、近年タンパク質を網羅的に解析するプロテオミクスに大いに利用されている。また糖鎖プライマー法は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。

本研究ではこのマスマスペクトロメトリー

と糖鎖プライマー法を網羅的発現糖鎖解析(グライコミクス)に利用して、ヒト未分化細胞(白血病細胞やヒト間葉系幹細胞)に発現している糖鎖を網羅的に解析し、これまで微量しか発現していなかったため同定されていなかった糖鎖を同定し、細胞の糖鎖発現パネルを作製すると共に、その発現糖鎖の中から診断に有用な糖鎖を検索し、将来的に診断・治療応用することを目指す。更に糖鎖プライマー法で生産した糖鎖は化学的修飾を施し、抗原として利用して糖鎖抗体の樹立を目指す。

## B. 研究方法

### 1. 固相抽出による糖脂質の分画

LC/MSによる分析では、試料を前処理して余分な夾雑物を出来る限り除いておくことでより高精度な結果が得られる。そこで糖脂質においてシアル酸を持つガングリオシドと中性糖脂質を分離・分画する方法を確立した。その方法として固相抽出(Solid Phase Extraction: SPE)法を採用した。使用した固相としては、シリカゲル担体にアミノプロピル基を結合させた固相(NH<sub>2</sub>)を用いた。このNH<sub>2</sub>担体は分子を極性で分ける順相的な性質とアミノ基によるイオン交換的な性質を併せ持ち、溶出条件を変えることで前記ガングリオシドと中性糖脂質を分離・分画できるばかりでなく、極性の低いコレステロールなどを取り除くことも出来る可能性がある。これらSPEカラムに脂質及び糖脂質標準品を通し、pH・イオン強度・極性の異なった溶媒で溶出して分画する条件を検討した。

### 2. LC/MSによる糖脂質分離条件検討

細胞から抽出した糖鎖や糖鎖プライマー法で生産した糖鎖をLC/MSで糖鎖を高精度で高感度に検出・同定する方法をいくつか確立した。LC/MSのCapLCはAgilent Technology社製1100 systemをMSはBruker Daltonics社製HCT Ultraを使用した。液体クロマトグラフィーの分離モードとしては順相ではImtakt社製Unison UK-Silica, (150 mm x 0.3 mmφ)、または昭和電工社製ShodexNH 2P50 (150 mm x 0.3 mmφ)を使用した。UK-Silicaの場合、(クロロフォルム/メタノール/水)混合移動相で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の双方で検討した。NH<sub>2</sub>P50の場合、(アセトニトリル/水)の混合溶媒系を使用し、水の混合比をリニアグラディエントで増加させて試料を分離・溶出する方法と共に移動相中のイオン強度を上げて溶出する方法を検討した。

### 3. 糖鎖プライマー法で産生した糖鎖の回収及び分析

糖鎖プライマー法による培養細胞での糖鎖生産および糖鎖抽出は慶應義塾大学理工学部佐藤研究室において行われた。即ち糖脂質合成系に対する糖鎖プライマー(LaC12)及び糖蛋白質O結合型糖鎖合成系に対する糖鎖プライマー(Ga1NAcαThrC12)を50 μMの濃度で各培養細胞について培養液中に添加し、48時間後に培地を回収した。この培地よりODS固相抽出カートリッジを使用して産生された糖鎖を回収し、LC/MS分析を行う試料とした。LC/MSによる分析にはカラムに昭和電工社製ShodexNH2P50を使用し、(アセトニトリル/水)の混合溶媒系で水の混合比をリニアグラディエントで増加させ、試料を分離・溶出すると共に、移動相中のイオン強度を上げて溶出する方法で分離した。

### 4. ヒドラジン分解法による糖蛋白質からの糖鎖の遊離とグラファイトカーボンカートリッジによる糖鎖精製

糖蛋白質10 μgまたは1×10<sup>7</sup>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。ここで抽出した総脂質はODSの固相抽出で部分精製し、LC/MSによる発現糖脂質解析に使用した。糖蛋白質の含まれる脂質抽出残渣に対してヒドラジン分解法による糖蛋白質糖鎖検体とした。即ち、充分乾燥した残渣に対して無水ヒドラジン200 μlを加え、100°C, 10時間反応させ、糖蛋白質N結合型糖鎖を遊離させた。反応終了後充分量の酢酸アンモニウム水溶液を添加し、グラファイトカーボンカラムに通して遊離糖鎖を吸着させた。酢酸アンモニウムで充分カラムを洗浄し、無水酢酸を添加したアセトニトリル/水混合溶液で糖鎖を溶出すると共にヒドラジン分解により遊離した糖鎖中の再アセチル化を行った。

ゲル電気泳動を行った糖蛋白質については、ゲルをクマシー染色してバンドを切り出し、凍結乾燥をして水分を充分除去した後、同様にヒドラジンを添加してヒドラジン分解を行った。遊離反応終了後、過剰量の酢酸アンモニウム水溶液を添加して反応終了すると共に超音波照射してゲル中の遊離糖鎖を充分抽出し、同様にグラファイトカーボンカラムで遊離糖鎖を精製した。

### 5. 遊離糖鎖のPA化と固相抽出による精製

親水性の高い遊離糖鎖はLC/MSにおいて



分離後のイオン化が非常に弱いため、検出・構造解析が困難である。また糖は分子自身に特異的な吸収を持たないため、一般に蛍光団による分子修飾を行い、クロマトグラフィーによって分離しながら蛍光をモニターして分離・検出を行うのが一般的である。このような蛍光団による糖鎖の修飾で使用される蛍光団はいくつか存在するが、本研究では2-aminopyridine (2-AP), 2-aminobenzamide (2-AB), 2-aminobenzoic Acid (2-AA) による糖鎖修飾を行い、ESIによるイオン化効率の検討を行った。即ち遊離糖鎖に標識分子の酢酸溶液を添加して90°C、60分反応させ、更にジメチルアミノポランを添加して標識分子と糖鎖間に安定な結合を形成させる。反応終了後、セルロースカラムを用いて糖鎖誘導体を吸着させ、余剰標識試薬を除去してESI/MSによる分析サンプルとした。

#### 6. ジルコニア固相によるリン脂質の除去

ジルコニア固相とはシリカゲル担体にジルコニアを結合させた物である。ジルコニアの4d電子軌道にはリン酸基が効率よく結合することが報告され、リン酸化蛋白質、リン酸化ペプチドなどを回収するのに利用され、リン酸化された蛋白質を解析するプロテオミクスなどに利用されていた。また、血清プロテオミクスにおいては、血中に微量に存在するリン脂質がターゲット蛋白質由来のペプチドのイオン化を抑制（イオンサプレッション）することが知られ、それを可能な限り取り除くために利用されている。そこで本研究においても細胞に含まれるリン脂質のみをジルコニア固相に吸着除去させ、糖脂質を有効に回収することを試みた。

ジルコニアには糖鎖に含まれるシアル酸とも結合する可能性があり、リン脂質と共に除去されてしまう危険性がある。そこでジルコニアに対してリン酸基と同様にルイス酸・塩基として働くギ酸、クエン酸を様々な濃度で糖脂質と共にメタノール中に共存させ、リン酸基特異的に結合・吸着させる条件を検討した。

### C. 研究結果

#### 1. 糖脂質の固相抽出による分画：

細胞に含まれる脂質のうち、コレステロールを固相抽出で除去する方法を確立した。すなわち、Si及びNH<sub>2</sub>の固相に試料を注入した場合、溶出溶媒にクロロフォルムを使用することでコレステロールおよびトリグリセリドは溶出され、その他の両親媒性脂質

は保持させることが可能であった。次にこの固相にアセトン、メタノールのような極性の高い溶媒を用いることで、リン脂質や糖脂質を効率よく溶出することが可能であった。更に固相にNH<sub>2</sub>を用いた場合では、ガングリオシドはメタノールのような極性の高い溶媒でも保持されたままになり、溶媒中のイオン強度を上げることで溶出することが可能であった。

以上のように、細胞から有機溶媒を使って抽出される脂質のうち、(1)コレステロールと単純脂質、(2)中性糖脂質とリン脂質、(3)ガングリオシドの3群に固相抽出法で分画する方法を確立した。

#### 2. LC/MSによる糖鎖解析条件検討：

Unison UK-Silicaを用いた順相モード場合、代表的なガングリオシドであるGM3、GM2、GM1をそれぞれ分離することが可能であった。中性糖脂質では、GlcCer、LacCer、Gb3Cer、Gb4Cerをそれぞれ分離する条件を確立した。現段階では市販標準品が入手可能な糖脂質に関しては全ての分離が可能となっている。

ヒドラジン分解で遊離させ、PA化させた糖蛋白質糖鎖については、ShodexNH2P50で当山奇数に基づいた分離法を確立した。さらに各糖鎖のMS/MSスペクトルのライブラリーの充実を図っている。

#### 3. ジルコニア固相によるリン脂質の除去

細胞より抽出した総脂質試料、アルカリ分解によってリン脂質を分解した試料、ジルコニア固相によってリン脂質を除去した試料をそれぞれHPTLCにアプライして分析した。ルイス酸・塩基としてはクエン酸0.1%を共存させた。結果、総脂質ではTLC上におけるバンドが夾雑物（リン脂質）により大きく乱れたのに対し、ジルコニア固相でリン脂質除去した試料、これまでのようにアルカリ分解でリン脂質を分解させた試料はバンドが乱れず、ジルコニア固相によるリン脂質除去は非常に有効であることが明らかとなった。また、同検体をLC/MSで分析し、Gb4CerとGM3に関してExtracted Ion Chromatogramを各試料に対して描かせたところ、ジルコニア固相でリン脂質除去した試料がもっとも大きなピーク面積が得られた。これはLC/MSにおいてGb4CerとGM3とほぼ同じ時間にLCで溶出するPCの夾雑物によるイオンサプレッション効果が抑えられたためと考えられる。またO<sup>6</sup>アセチルシアル酸を含むガングリオシドを発現しているCHP134細胞より得られた脂質画分からジルコニア

固相によりリン脂質を除去しLC/MSにより分析した。0アセチルシアル酸を持つGD2のm/z値のイオンに対し、MS/MSスペクトルを取ったところ、0アセチルシアル酸に相当するフラグメントイオンを確認することができたことから、ジルコニア固相では0アセチルシアル酸を含んだガングリオシドを無傷のまま回収することができることが明らかとなった。

#### D. 考察

これまで糖脂質を含む糖鎖の分析にはTLCやレクチンなどをプローブとした分析手法が多用されてきたが、感度に大きな問題点があった。中でもTLCでは、細胞から有機溶媒で抽出した総脂質を直接載せてして分離し、糖のみを検出する試薬を噴霧して検出する方法が採られてきたが、この方法ではリン脂質のTLC上での挙動が糖脂質と非常に近いため、しばしば結果に影響を与えることがあった。それを避けるためアルカリ条件下によるリン脂質の分解操作が行われてきたが、透析などで操作途中で試料の一部を損なう可能性があるため、微量の試料を扱う際には問題があった。固相抽出法は微量でも試料のロスが少なく、再現性の良い結果を得ることが出来るため、MSで分析する試料の前処理として現在多用されている。本研究において固相抽出法でガングリオシドと中性糖脂質を分離・分画することが出来た。さらに新たに開発されたジルコニア固相を使用することで、臨床検体のようにわずかな細胞しか得られない場合でも糖脂質を網羅的に解析することが可能となった。

糖脂質は有機溶媒を使用して細胞から抽出する。抽出残渣は蛋白質が主な物であるが、そこから糖蛋白質糖鎖をヒドラジン分解により遊離させ、LC/MSで解析する方法も確立した。すなわち一つの検体から糖脂質および糖蛋白質糖鎖を網羅的に解析することが可能になり、このことから細胞の発現糖鎖によるクラスタリング解析も可能となった。

#### E. 結論

LC/MSを使用することで、細胞に発現する糖鎖を網羅的に解析することが可能になった。その結果を基に発現糖鎖によるクラスタリング解析も可能になったことから、今後解析する検体数をさらに多くして病態との相関・規則性を見いだすことができたなら、既存の診断法と組み合わせつつ更なる

診断の細分化と治療の最適化に役立てることが出来る可能性がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakajima H. and Sato T.: Construction of an oligosaccharide library by cultured cells for use in glyco-biotechnology. NANOTECHNOLOGY IN CARBOHYDRATE CHEMISTRY, Editor H. Yusa 167-173, 2006 Transworld Research Network.
- 2) 中島英規、オリゴ糖合成-糖鎖ブライマー法で生産した糖鎖の医療分野への応用-、高分子1月号55(1): 25、2006
- 3) 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
- 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) 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
- 6) 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.

##### 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発癌融合遺伝子EWS/FLI1による糖質質の変化. 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.

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/B<sub>CR</sub>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neutral endopeptidase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.

該当なし  
3.その他  
該当なし

## 2. 学会発表

なし

## 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