

図1 昨年度までに得られていた hMSC ロット 4 F1560 株の染色体異常

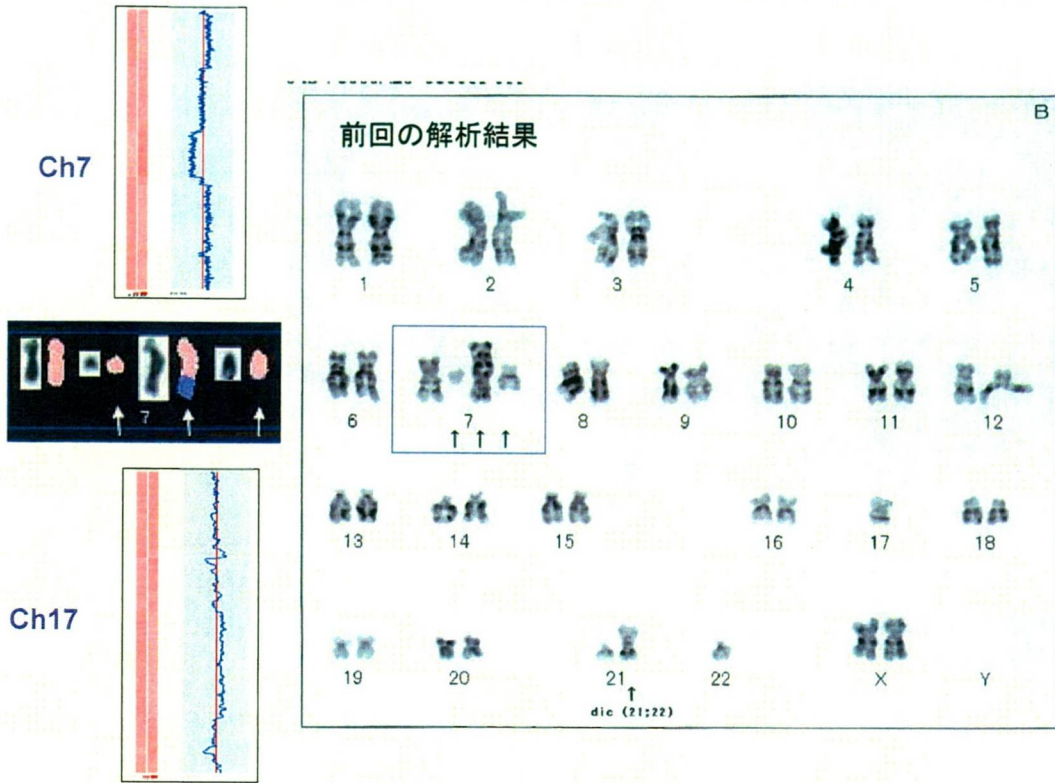


図2 異常を示した細胞と同一ロットの別継代細胞に観察された染色体異常 (G バンド)



図3 同一ロット別継代細胞のセントロメア FISH 解析 (入手後 11 継代)

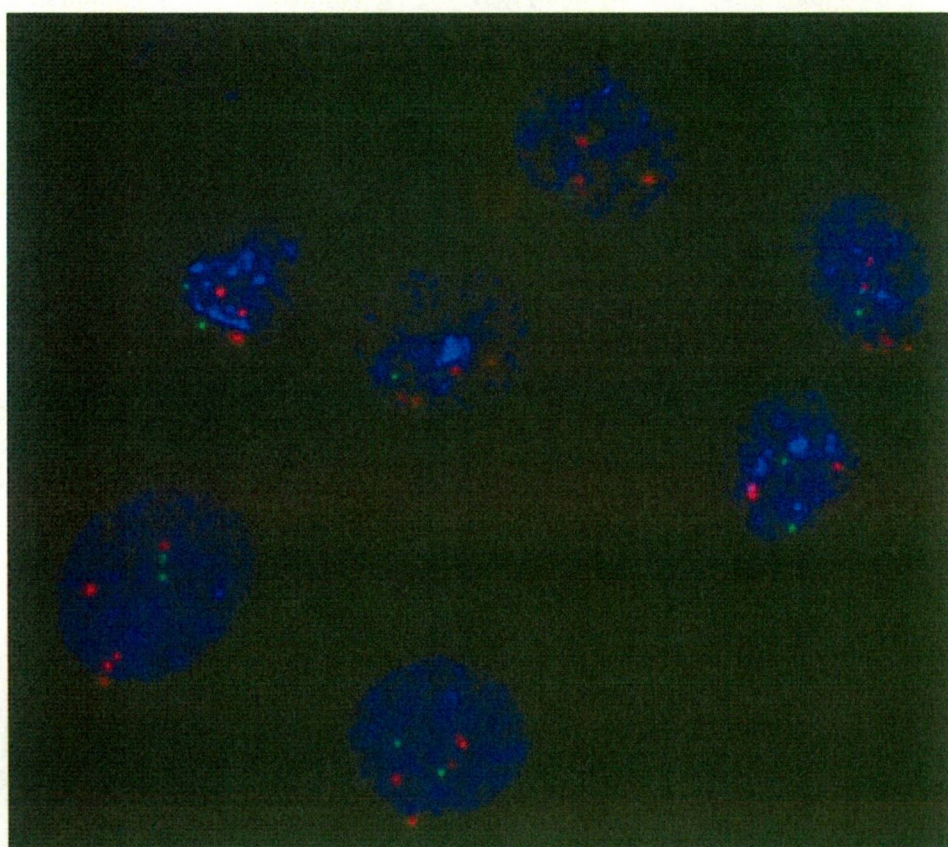
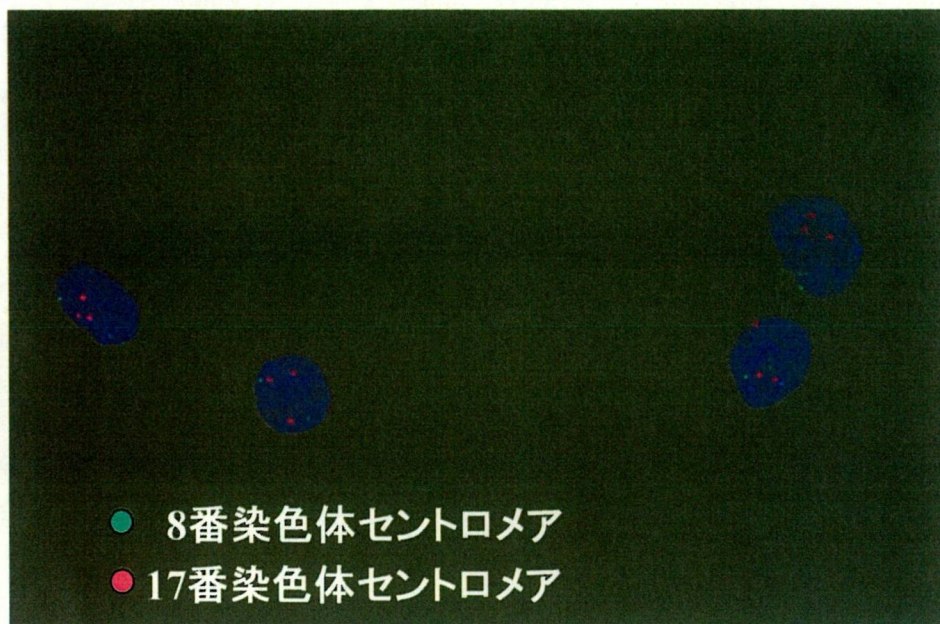
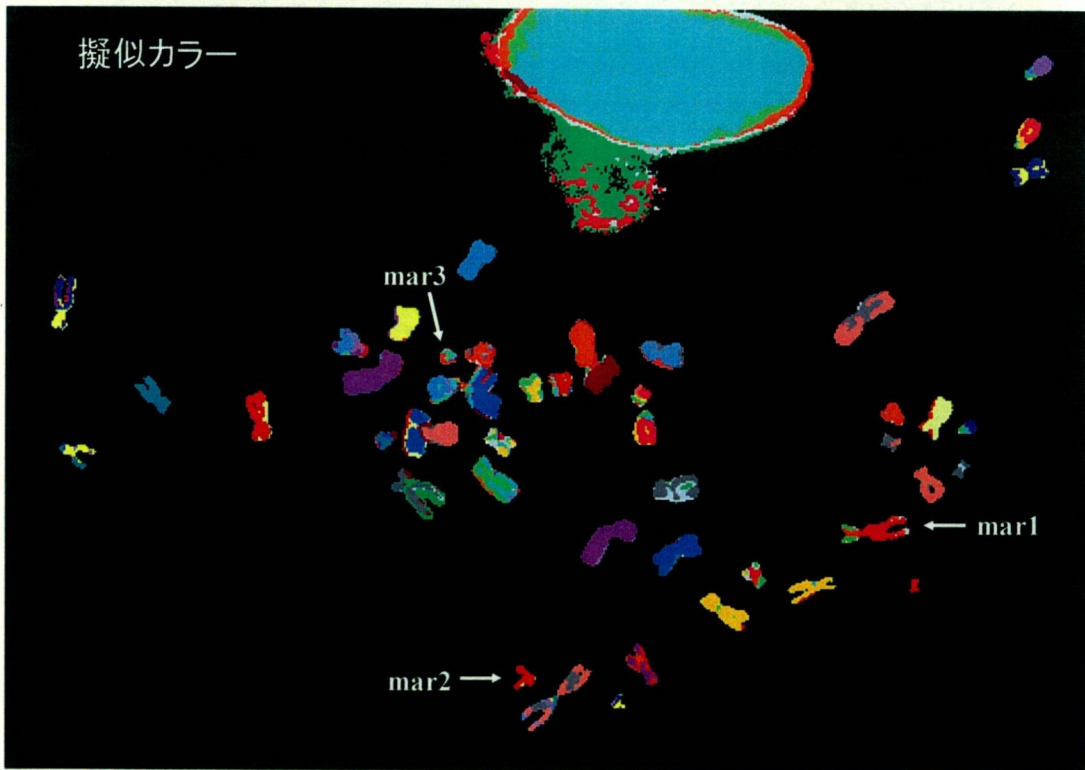
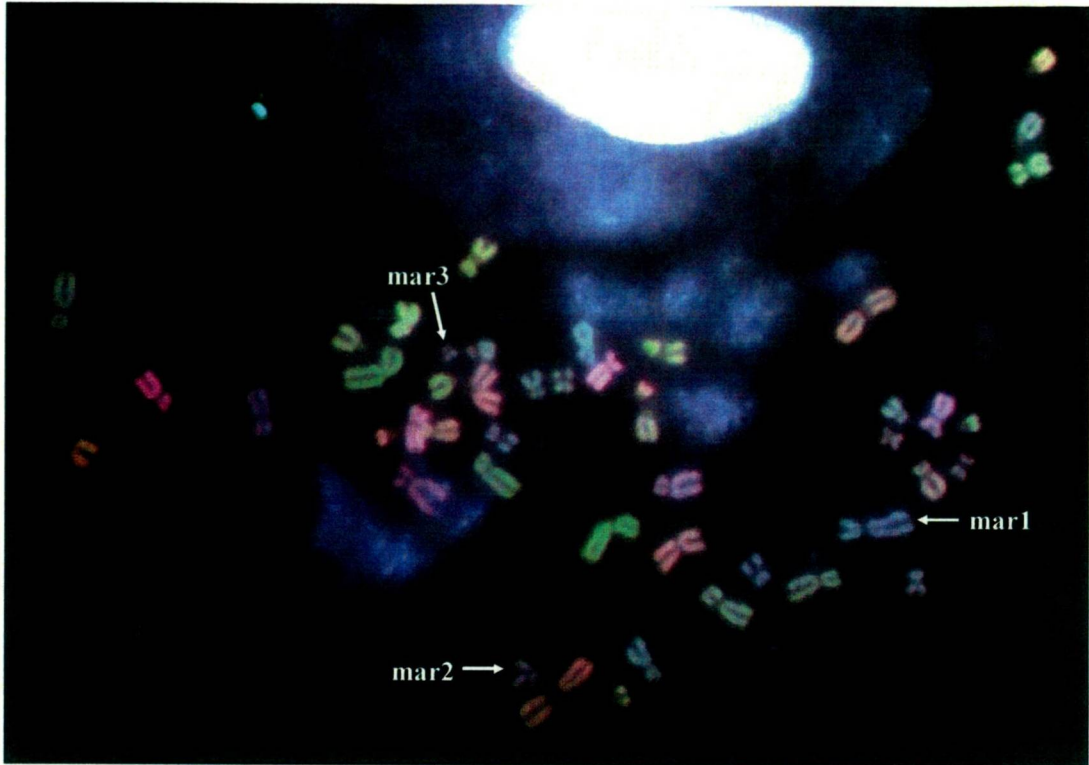


図4 新しく入手した同一ロット hMSC 細胞の m-FISH 解析 (約 20 継代)



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	---	---

図5 新しく入手した同一ロット hMSC 細胞のメタフェーズ FISH

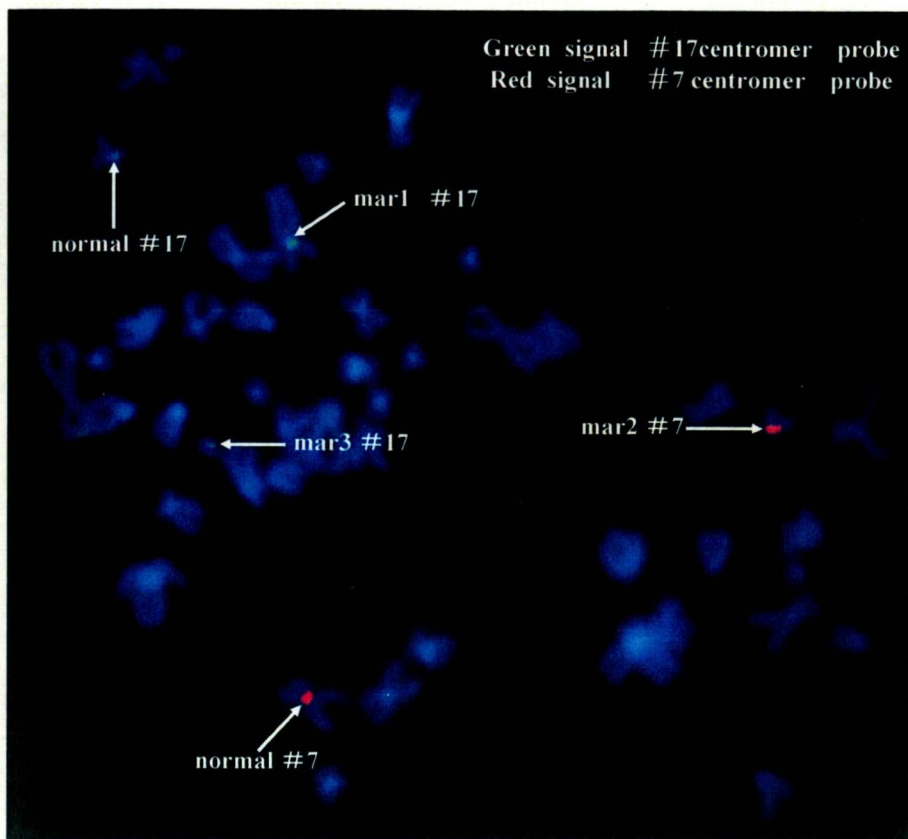


図6 ナノ LC-MS/MS システム (DiNa/LTQ-Orbitrap)



図 7 LTQ-Orbitrap により得られる LC-MS データの例

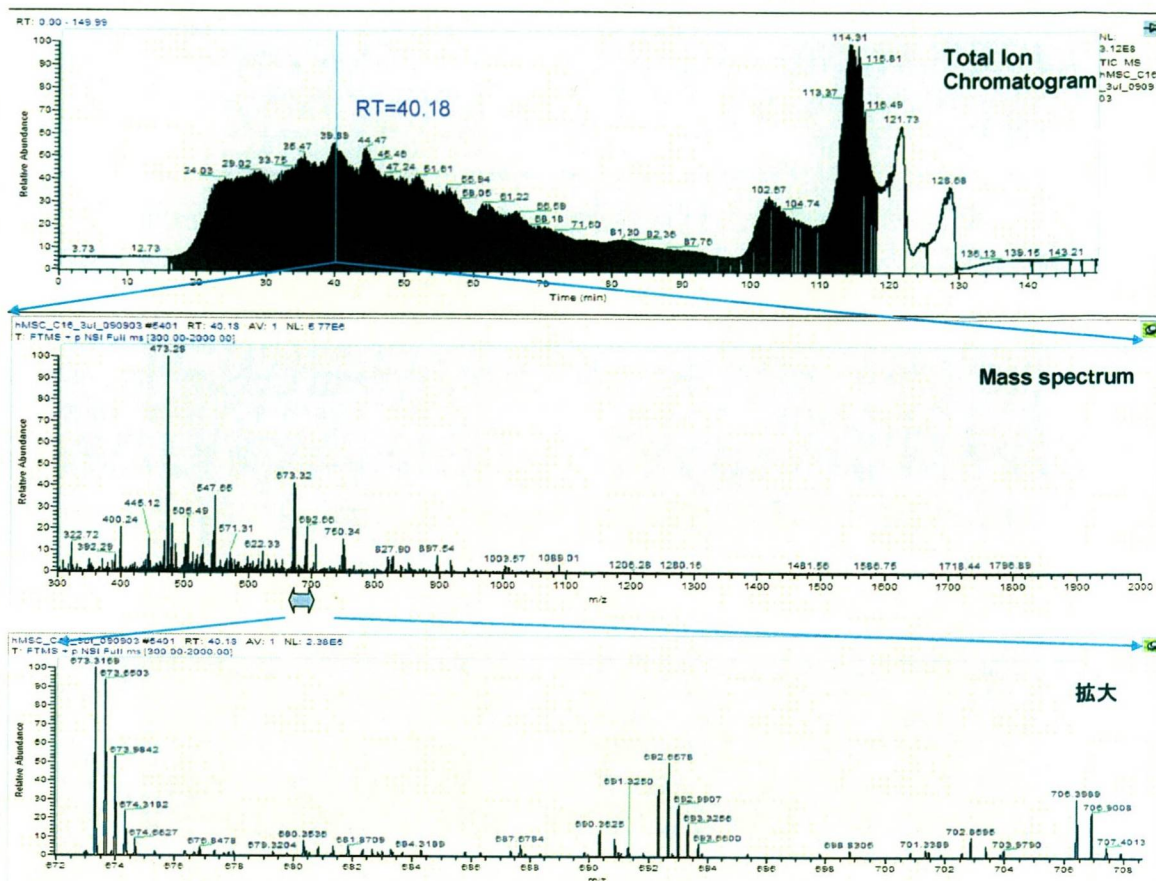


図 8 Progenesis による LC-MS データの可視化と定量比較のためのアラインメント

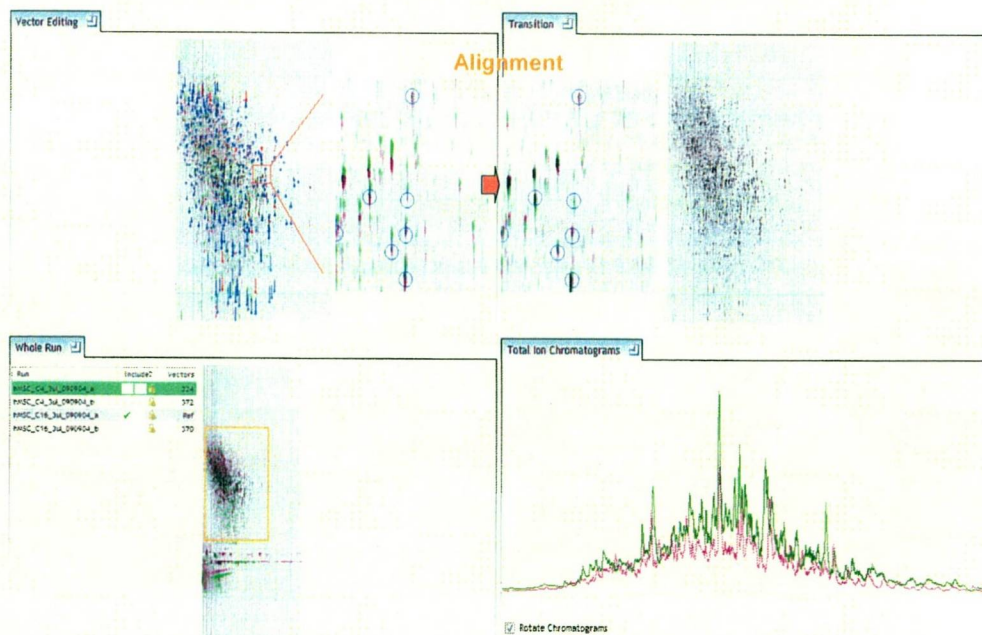


図9 Progenesisにおけるペプチドピーク検出と比較の例

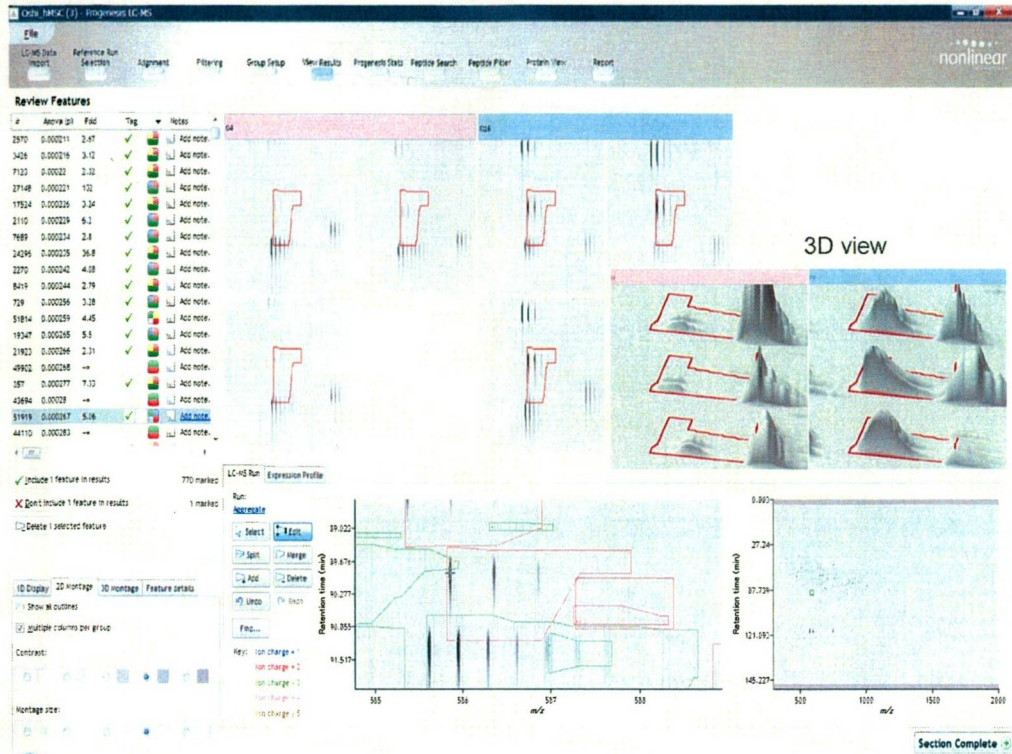


図10 検出された間葉系幹細胞特異的 CD 抗原の 2 次元マップ上の位置

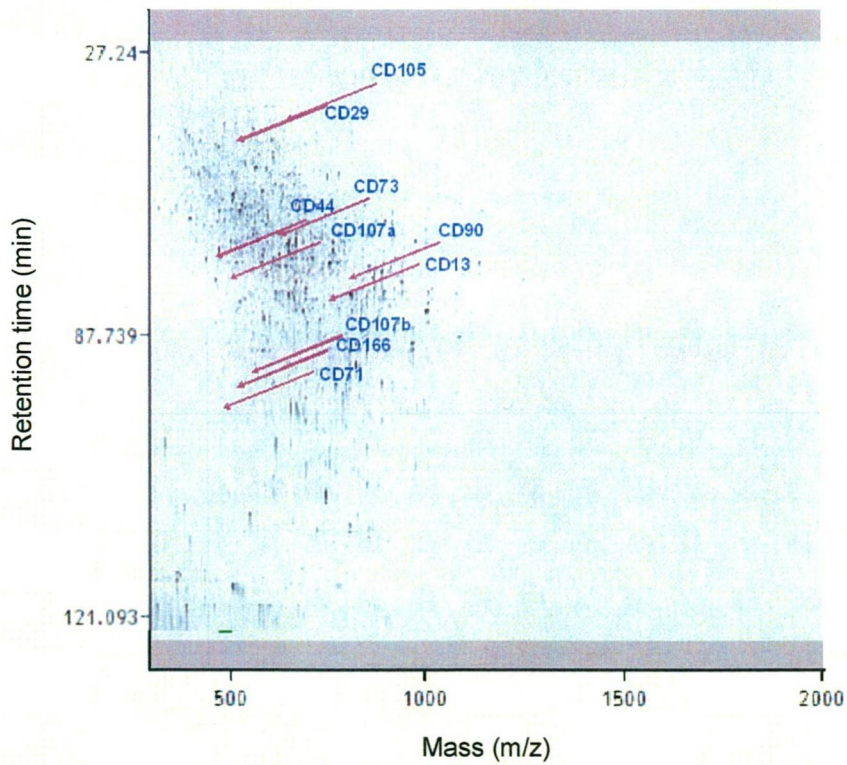
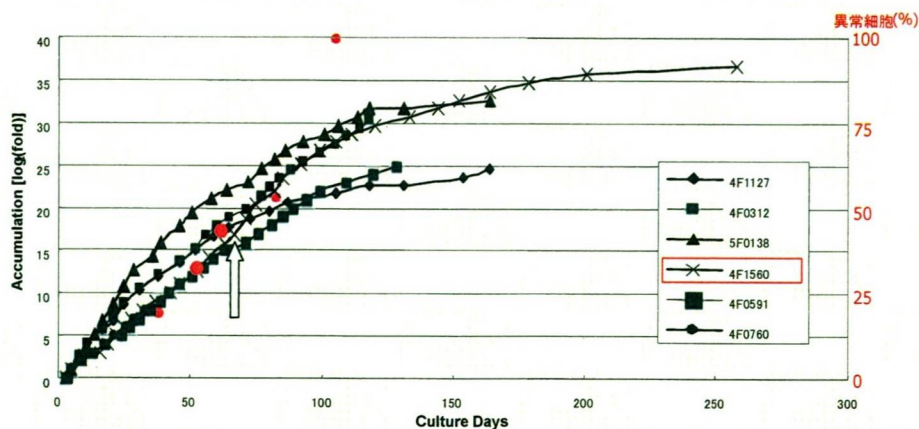
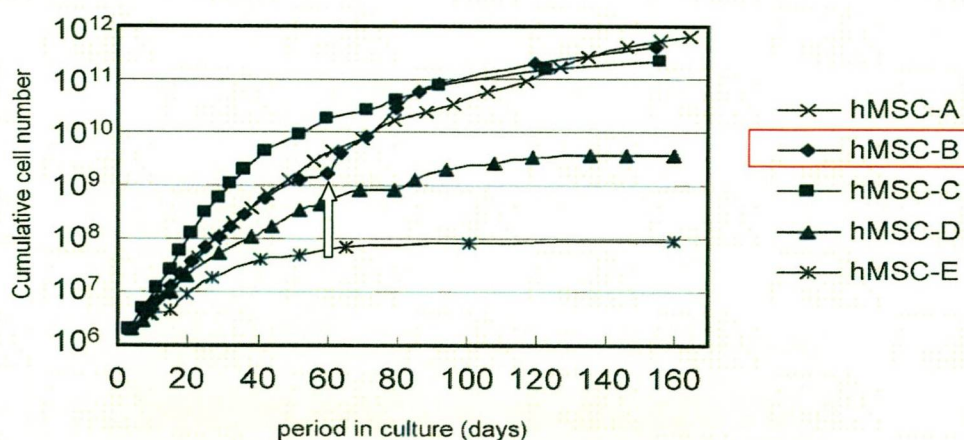


図 11 異常出現hMSC ロットの異なる継代培養間の増殖曲線の比較

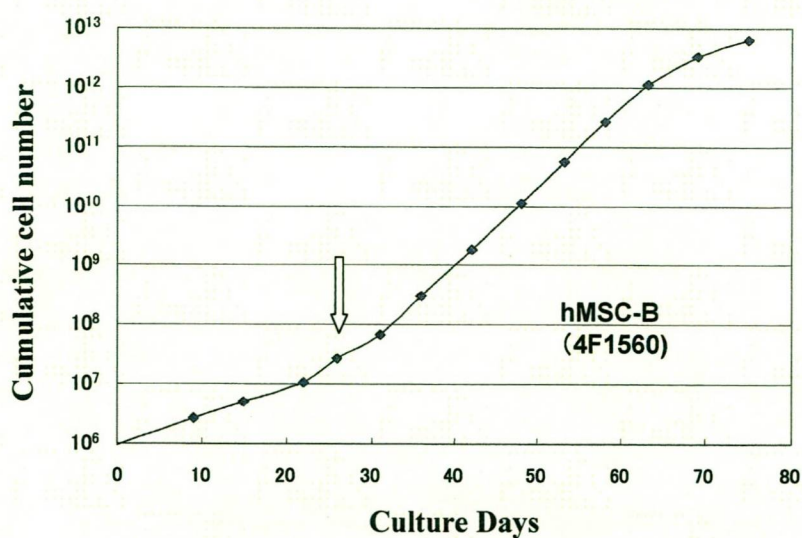


昨年度までに報告した異常ロットの増殖曲線と異常細胞の出現頻度



療品部における同一ロット(hMSC-B)の増殖曲線

(YAKUGAKU ZASSHI 128; 1851-1856, 2008)



療品部由来の同一ロット細胞の再培養による増殖曲線

表 1 新しく入手した同一ロット細胞における 8 及び 17 番染色体セントロメア FISH による異常解析

シグナル個数		判定	細胞数					療品部
Ch8	Ch17		#12	#15	#17	#21	#24	#14
1	2	正常	2	1	3	0	1	1
	3	異常	1	0	1	1	0	4
	6	異常	0	0	1	0	0	3
2	1	正常	1	3	2	0	0	0
	2	正常	75	60	48	41	0	13
	3	異常	11	28	34	33	73	47
	4	異常	5	5	9	13	15	28
	5	異常	0	0	0	4	5	2
	6	異常	0	0	0	1	2	0
	8	異常	0	0	0	0	1	0
3	2	正常	3	0	0	1	0	0
	3	正常	1	0	2	2	0	10
	4	正常	0	1	0	3	2	3
	5	異常	0	0	0	0	0	2
	6	異常	0	0	0	0	0	1
4	4	正常	1	1	0	0	0	1
	5	異常	0	0	0	0	0	1
	6	異常	0	1	0	0	1	0
	7	異常	0	0	0	1	0	0
合計		正常	83	66	55	47	3	28
		異常	17	34	45	53	97	84

今回のデータ

表 2 4 継代と比べ 16 継代の hMSC 細胞で発現が 3 倍以上増加したタンパク質

Accession	Peptides	Score	Anova (p)*	Fold	Description	Average Normalised	
						C4	C16
NDUA5_HUMAN	1	32.83	5.95E-04	5.54	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1	7.26E+05	4.02E+06
SHQ1_HUMAN	2	69.91	5.16E-04	5.12	Protein SHQ1 homolog OS=Homo sapiens	8.25E+05	4.22E+06
EIF3C_HUMAN	3	94.54	6.58E-03	4.16	Eukaryotic translation initiation factor 3	3.14E+05	1.31E+06
HXA10_HUMAN	1	49.08	4.76E-04	3.95	Homeobox protein Hox-A10 OS=Homo	5.09E+04	2.01E+05
FADS3_HUMAN	1	41.46	0.02	3.84	Fatty acid desaturase 3 OS=Homo sapiens	2.38E+05	9.16E+05
RAB36_HUMAN	1	43	4.59E-03	3.54	Ras-related protein Rab-36 OS=Homo	2.55E+04	9.03E+04
RGS3_HUMAN	1	38	4.59E-03	3.54	Regulator of G-protein signaling 3	2.55E+04	9.03E+04
TM87A_HUMAN	2	85.64	1.79E-03	3.22	Transmembrane protein 87A OS=Homo	1.54E+06	4.95E+06
UBF1_HUMAN	3	59.13	0.03	3.13	Nucleolar transcription factor 1 OS=Homo	3.23E+05	1.01E+06

表 3 4 継代と比べ 16 継代の hMSC 細胞で発現が 3 倍以上低下したタンパク質

Accession	Peptides	Score	Anova (p)*	Fold	Description	Average Normalised	
						C4	C16
DUT_HUMAN	1	70.9	5.36E-04	11.22	Deoxyuridine 5'-triphosphate	8.98E+04	8002.85
SPSY_HUMAN	1	78.97	0.23	8.69	Spermine synthase OS=Homo sapiens	1.34E+05	1.55E+04
GRHPR_HUMAN	2	45.4	9.79E-04	6.76	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate	7.08E+06	1.05E+06
PSME3_HUMAN	1	70.23	0.01	6.11	Proteasome activator complex subunit 3	4.72E+05	7.73E+04
HNRPF_HUMAN	3	159.44	5.78E-03	4.37	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	6.97E+05	1.60E+05
EIF3E_HUMAN	2	92.55	8.56E-05	4.07	Eukaryotic translation initiation factor 3	1.21E+05	2.97E+04
TBB2A_HUMAN	16	989.63	1.38E-03	3.78	Tubulin beta-2A chain OS=Homo sapiens	4.03E+07	1.07E+07
HSP74_HUMAN	4	223.15	1.76E-03	3.75	Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo	8.65E+05	2.31E+05
RP1BL_HUMAN	1	91.77	7.73E-03	3.67	Ras-related protein Rap-1b-like protein	8.07E+05	2.20E+05
ACSL3_HUMAN	1	27.88	2.23E-03	3.65	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3	2.42E+05	6.63E+04
ZN225_HUMAN	1	33.74	3.65E-04	3.42	Zinc finger protein 225 OS=Homo sapiens	2.72E+05	7.95E+04
TBB3_HUMAN	18	908.79	2.38E-03	3.38	Tubulin beta-3 chain OS=Homo sapiens	4.05E+07	1.20E+07
HMGL1_HUMAN	2	97.14	7.17E-06	3.35	Putative high mobility group protein 1-	1.38E+06	4.12E+05
TBB2C_HUMAN	18	1137.69	1.43E-03	3.34	Tubulin beta-2C chain OS=Homo sapiens	4.70E+07	1.41E+07
YI016_HUMAN	5	305.49	1.15E-05	3.13	Putative tubulin beta chain-like protein	6.93E+06	2.22E+06
1B53_HUMAN	1	26.96	1.36E-04	3.07	HLA class I histocompatibility antigen, B-	5.37E+05	1.75E+05
1B59_HUMAN	1	26.96	1.36E-04	3.07	HLA class I histocompatibility antigen, B-	5.37E+05	1.75E+05
1A03_HUMAN	1	26.96	1.36E-04	3.07	HLA class I histocompatibility antigen, A-	5.37E+05	1.75E+05
1B57_HUMAN	1	26.96	1.36E-04	3.07	HLA class I histocompatibility antigen, B-	5.37E+05	1.75E+05
1B52_HUMAN	1	26.96	1.36E-04	3.07	HLA class I histocompatibility antigen, B-	5.37E+05	1.75E+05
1B15_HUMAN	1	26.96	1.36E-04	3.07	HLA class I histocompatibility antigen, B-	5.37E+05	1.75E+05
1A30_HUMAN	1	26.96	1.36E-04	3.07	HLA class I histocompatibility antigen, A-	5.37E+05	1.75E+05
PCNA_HUMAN	2	130.08	3.98E-03	3.05	Proliferating cell nuclear antigen	2.32E+05	7.61E+04

細胞組織加工医薬品の同等性評価技術の開発

分担研究者 川崎ナナ（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部室長）

協力研究者 橋井則貴（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部主任研究官）

協力研究者 黄 笑宇（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部）

研究要旨 間葉系幹細胞 (MSC) は神経疾患治療用医薬品として期待されているが、神経様分化の特性指標は未だ確立されていない。本研究では、細胞組織加工医薬品の同等性評価法として開発した定量的糖鎖プロファイリング法を用いて、MSC の一部の N 結合型糖鎖が、神経様分化後に顕著に減少することを見出した。また、アガロースゲルを用いた二次元電気泳動により、MSC の神経様分化後に細胞表層の複数のタンパク質の発現量が変化することを明らかにした。これらの糖鎖やタンパク質は、新規神経様分化指標として利用されることが期待される。

A. 研究目的

間葉系幹細胞 (MSC) は、組織幹細胞の一つであり、軟骨細胞、骨芽細胞及び脂肪細胞等の間葉系細胞だけではなく、神経様細胞にも分化することが知られている。近年、神経疾患モデル動物に MSC を移植すると、神経機能が改善することが報告されており、自家 MSC を用いた神経疾患治療法の開発に期待が集まっている。

一方、幹細胞そのものを治療に用いたとき、移植後に形質転換が起こる可能性が示唆されている。現在までに、移植された MSC が腫瘍化した事例は報告されていないが、*in vitro* において MSC が形質転換することが報告されており、安全性について留意しなければならない。このような幹細胞の形質転換を回避する手段として、幹細胞を目的の細胞に分化誘導し、未分化細胞を除去した後に分化した目的細胞のみを移植する方法がある。このとき、移植する細胞に未分化細胞が残存していると、それらが腫瘍化する可能性があることから、分化させた細胞を高純度で分離する技術が必要である。MSC を用いた神経疾患治療法の開発の実現に向けて、MSC の神経分化誘導法及び分化させた細胞を分離する技術を確立するこ

とが重要であるが、そのためには、MSC と神経分化後の細胞を区別するための特性指標を見出すなくてはならない。

しかし、MSC 陽性指標として利用されている CD29 及び CD271 等は、神経幹細胞等にも発現していることが知られている。また、神経幹細胞、ニューロン、及びアストロサイトのマーカーとして汎用されているネスチン、 β III-チューブリン、及び GFAP 等の分子については MSC にも発現していることが報告されている。神経疾患治療医薬品としての MSC の品質・安全性を確保するためには、神経分化誘導後に特異的に発現もしくは消失する分子を見出すことが急務である。

これまで我々は、定量的糖鎖プロファイリング法を開発し、糖鎖が細胞の同等性評価指標として利用可能であることを報告した。本年度は、定量的糖鎖プロファイリング法の問題点を解決し、その改良法を用いて MSC の神経様分化前後の細胞の糖鎖差異解析を行うことにより、神経様分化指標候補となる糖鎖の探索を行った。また、プロテオミクスの手法を用いて、MSC の神経様分化前後の細胞表層タンパク質の発現差異解析を行い、分

化後に発現量が変化するタンパク質を明らかにした。

B. 研究方法

1) 細胞及び試薬

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC, MSC-R36) は理化学研究所バイオリソースセンター (RIKEN BRC CELL BANK) より供与された。Mesenchymal stem cell growth medium (MSCGM) は Lonza (Basel, Switzerland) より購入した。Peptide-N-glycosidase F (PNGase F) は, Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) から購入した。

2) 細胞培養

MSC は L-glutamine を添加した MSCGM 培地 (10 ml/10 cm ディッシュ) で培養 (5%CO₂, 37°C) した。セミコンフルエントまで培養し, 0.02% EDTA を添加した PBS で洗浄を行い, 0.25% Trypsin-EDTA (GIBCO, MD, USA) により細胞を剥離した後, 10cm ディッシュに約 2×10⁵ の細胞を播種して継代培養を行った。

3) 神経様細胞への分化誘導

以下の2種類の方法で MSC の神経様分化誘導を行った。

3-1) 誘導法 A

細胞分化には, 神経誘導基礎培地, 神経プレ誘導培地及び神経誘導培地の3種類の培地を用いた。神経誘導基礎培地として, 15% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine 及び 1% Sodium pyruvate を添加した Prime DMEM Low-glucose 培地 (Invitrogen, CA, USA) を用いた。神経プレ誘導培地として, 20% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine 及び 10 ng/ml の bFGF を添加した Prime DMEM Low-glucose 培地を用いた。神経誘導培地には, Prime DMEM Low-glucose 培地に 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine, 20ng/ml bFGF, 25 mM KCl, 100 mM Putrescine, 30 nM Sodium

selenite, 2% Dimethyl sulfoxide, 100 mM Butylated hydroxyanisole, 20 nM Progesterone, 5 mg/ml Insulin, 及び 100 mg/ml Transferrin を添加したものをを用いた。

神経誘導基礎培地 (10 ml/10 cm ディッシュ) を用いて, 2×10⁵ 個の MSC を 24 時間培養 (5%CO₂, 37°C) した後, 神経プレ誘導培地を用いて 2 回洗浄し, 神経プレ誘導培地 (10 ml) を添加して 24 時間培養した (10 cm ディッシュ, 5%CO₂, 37°C)。プレ神経誘導が終了後, 神経誘導培地を用いて細胞を 2 回洗浄し, 神経誘導培地 (10 ml/10 cm ディッシュ) で 2 日間神経誘導した。24 時間培養した後に培地を一回交換した。

3-2) 誘導法 B

神経誘導基礎培地には, HyClone AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cell Expansion Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いた。神経誘導培地には HyClone AdvanceSTEM Neural Differentiation Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。神経誘導基礎培地 (10 ml/10 cm ディッシュ) を用いて, 2×10⁵ 個の MSC を 24 時間培養 (5%CO₂, 37°C) した後, 神経誘導培地を用いて細胞を 2 回洗浄後, 神経誘導培地 (10 ml/10 cm ディッシュ) で 2 日間神経誘導した。24 時間培養した後に, 培地を一回交換した。

4) 細胞由来タンパク質の調製

培養終了後, 細胞をプロテアーゼインヒビター (protease inhibitor mix DMSO solution, Sigma, MO, USA) を添加した PBS (pH 7.2, 日本製薬 (株), 東京) を用いて 3 回洗浄した, Cell Lifter (Corning, NY, USA) を用いて回収した。洗浄済み細胞 (2~4×10⁵ 個) を, プロテアーゼインヒビターを添加した LIPA バッファー (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.25% Sodium Deoxycholate, 1% NP-40, 1% protease Inhibitor) で溶解し, 不溶性物質を遠心分離 (4°C, 8,000 ×g, 5分) により除去した後, 上清を分取して, タンパク質試料溶液とした。Non-Interfering Protein Assay Kit

(CALBIOCHEM, CA, USA) を用いてタンパク質濃度を定量した後、タンパク質試料溶液を -20°C で保存した。

5) 還元アルキル化タンパク質の調製

ProteinExtract Protein Precipitation Kit (CALBIOCHEM) を用いて脱塩した乾燥タンパク質 (100 μg) を 50 μl の 8 M グアニジン-HCl / 0.5 M Tris-HCl (pH 8.6) に溶解させた。まず、この溶液に 2 μl の 1 M dithiothreitol (DTT, 終末 40 mM) を加えて 65°C で 30 分間、遮光下で加熱し、タンパク質を還元した。次いで、4.8 μl の 1 M モノヨード酢酸ナトリウム (終末 96 mM) を加えて室温、暗所で 40 分間反応させて、システイン残基のチオール基をカルボキシメチル化した。反応終了後、ProteinExtract Protein Precipitation Kit を用いて脱塩し、還元アルキル化タンパク質とした。

6) 糖鎖の切り出し

回収した還元アルキル化タンパク質を 200 μl の 100 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁させた後、5 unit の PNGase F を加えて、 37°C で 2 日間反応させて *N*-結合型糖鎖を切り出した。反応溶液に、冷エタノール (終末 60%) を加えて、 -20°C で 2 時間インキュベートした後、遠心分離 (4°C , 8,000 $\times\text{g}$, 5 分間) によりタンパク質を除去した。遊離した *N*-結合型糖鎖を含む上清を Speed Vac により乾燥させた。乾燥糖鎖試料は、MSC 及び神経様分化細胞共に 3 種類ずつ調製した。

7) ^{12}C -及び ^{13}C -フェニルヒドラジンによる糖鎖の標識

MSC 由来乾燥糖鎖、及び神経様分化細胞由来乾燥糖鎖に H_2O を 100 μl ずつ加えて溶解し、それぞれに 4 μmol の ^{12}C -PHN 塩酸塩 (Aldrich, MO, USA) 及び ^{13}C -PHN 塩酸塩 (Cambridge Isotope Laboratories, MA, USA) を加えた。それぞれの溶液に 10 μmol の 2-ピコリンボラン (純正化学, 東京)

を加えて攪拌し、遮光下 55°C で 1 時間インキュベートした。2-ピコリンボランを完全に溶解するために、適宜、攪拌操作を繰り返した。反応終了後、100 μl のクロロホルムを加えて激しく攪拌した後、遠心分離 (1,000 $\times\text{g}$, 30 秒) を行った。クロロホルム層を除去した後、再度 100 μl のクロロホルムを加えて同様の操作を 2 回繰り返し、過剰な試薬を除去した。最後に、 H_2O 層を分取した後、タンパク質あたり等量となるように混合し、3 種類の分析試料溶液を調製した(表 1 及び図 1)。

8) 細胞表層タンパク質のイミノビオチン標識

細胞表層タンパク質のイミノビオチン標識には、Iminobiotin Protein Labeling Kit (PerkinElmer, MA, USA) を用いた。細胞を培養後、修飾ビオチン (0.9 mg/10 cm²ディッシュ) により細胞表層のタンパク質を室温で1時間標識した後、0.1M グリシンを含むPBS (2 ml) によりイミノビオチン修飾反応を停止させた。細胞の回収は、3)に従い行った。

9) SDS-PAGE

サンプルと等量のサンプルバッファー (7 M Urea 及び 2M Thioureaを含む) を加えて、 95°C で5分間前処理した。ゲルには5~20% のグラジュエントゲル (e-PAGEL,アトー(株), 東京) 用い、電気泳動装置にはパジェルラン (アトー(株)) を使用した。定電流を40mA に設定して、90分間電気泳動を行った。

10) アガロースゲル二次元電気泳動

10-1) 一次元目等電点電気泳動

一次元目のアガロースゲルには、agar GEL A-M310 pH 3-8 及び pH 3-10 (アトー(株)) を用いた。電気泳動装置には、AE-6541 ディスクラン (アトー(株))を使用した。定電圧を 300 V に設定し、210 分間泳動した。電気泳動終了後、ゲルを固定液 (2.5% トリクロロ酢酸) にて3分間固定し、MilliQで1分間の洗浄を3回、さらに 2 時間の洗浄を 1 回行った。

10-2) 二次元目電気泳動

二次元目の SDS-PAGE ゲルには、e-PAGEL (7.5%) を用いた。電気泳動装置には、AE-6531P パジェルラン (アトー(株)) を使用した。洗浄済み二次元目アガロースゲルを SDS 平衡化液 (50mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 0.001% BPB) 中で 10 分間平衡化後、SDS-PAGE ゲルの上端にアプライし、定電流 40mA で 90 分間電気泳動を行った。

泳動終了後、ゲルを 50% のイソプロパノール溶液に移し、室温で 15 分間固定した後、Rodamin 標識ストレプトアビジンを用いて、室温で一晩染色した。イミノビオチン修飾したタンパク質の画像は、Typhoon 9400 (GE Healthcare Lifesciences, MA, USA) を用いて、レーザー及び蛍光フィルターを 532nm 及び 580 nm BP 30nm に設定して取り込んだ。スポットのマッチング及びスポットの定量等の画像解析には、DeCyder 2D Differential Analysis Software Version 6.0 (GE Healthcare Lifesciences) を用いた。

11) ゲル内消化

画像解析終了後、スポットを切り出し、ゲルを 1.5 ml チューブに移した。チューブ内でゲル内消化を行った。まず、100 μ l の 50% メタノールを含む 50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液で 30 分間振とうし、ゲル片を脱色した。さらに 100 μ l の 100% アセトニトリルで 30 分間インキュベートした後、Speed Vac で完全に乾燥させた。乾燥させたゲル片に 5 μ l のトリプシン溶液 (20 μ g/ml, 0.1% オクチルグルコシドを含む 20 mM 重炭酸アンモニウム) を加え、37°C で一晩反応させた。50 μ l の 1% トリフルオロ酢酸水溶液/50% アセトニトリルを加え、4°C で 5 分間超音波処理し、ペプチド抽出液を回収した。次いで 70 μ l の 0.2% トリフルオロ酢酸水溶液/50% アセトニトリルを加え、再度抽出処理を行った。さらに 100% アセトニトリルを加えて、室温で 15 分間インキュベート下の後に抽出液をすべて回収し、Speed Vac を用いて濃縮した。

12) LC/MS

nanoLC には Paradigm MS4 (Michrom BioResources, CA, USA) を使用した。溶離液には 2% アセトニトリルを含む 0.1% ギ酸溶液 (A 溶媒) 及び 90% アセトニトリルを含む 0.1% ギ酸溶液 (B 溶媒) を使用した。流速は 300 nl に設定した。質量分析 (MS) 装置には ナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源 (AMR, 東京) を接続した Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR-MS, LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific) を使用し、ポジティブイオンモードでデータを取得した。

PHN 標識糖鎖の分析及びタンパク質同定で用いたカラム、グラジュエント条件、シングル MS 及び多段階 MS (MS^n , $n=2\sim 4$) 測定条件は、以下の通りであった。

12-1) PHN 標識糖鎖の分析

カラム : C30 (Develosil Packed Column, 0.075 \times 150 mm, 粒子径 5 μ m, 野村化学, 東京)

トラップカラム : C18 (L-Culumn, 0.3 \times 5.0 mm, 粒子径 5 μ m, (財) 化学物質評価研究機構, 東京)

グラジュエント条件 : 2-45%B 溶媒 (リニアグラジュエント, 60 分間)

シングル MS スキャンモード : FT-MS

MS^n スキャンモード : IT-MS

スキャン範囲 : m/z 700-2,000

キャピラリー温度 : 275°C

スプレー電圧 : 2.5kV

MS^n の衝突エネルギー (コリジョンエネルギー) : 25%

12-2) タンパク質同定

カラム : C18 (L-Culumn, 0.075 \times 150 mm, 粒子径 3 μ m, (財) 化学物質評価研究機構)

トラップカラム : C18 (L-Culumn, 0.3 \times 5.0 mm, 粒子径 5 μ m, (財) 化学物質評価研究機構)

グラジュエント条件 : 2-65%B 溶媒 (リニアグラジュエント, 50 分間)

シングル MS 及び MS/MS スキャンモード：
IT-MS
スキャン範囲： m/z 400-2,000
キャピラリー温度：200°C
スプレー電圧：2.0ekV
MSⁿ の衝突エネルギー（コリジョンエネルギー）：35%
データベース検索エンジン：TurboSEQUEST
(Thermo Fisher Scientific)
データベース：NCBIInr (02 / '09)

13) ウェスタンブロット

SDS-PAGE を行った後、タンク式ブロットイング装置 KS-8451 (System Instruments, 東京) を用いて、タンパク質を PVDF 膜 (Bio-Rad, CA, USA) へ転写した(定電流 400mA, 240 分間). 転写バッファは CAPS バッファ (100 mM CAPS, 10% メタノール, pH 11.0) を使用した. 転写終了後, Cy5 monofunctional reactive dye label antibody or other protein (GE Healthcare) により全タンパク質を染色した後, Membrane blocking agent (GE Healthcare) を用いて 4°C で一晩ブロッキングした. タンパク質 A の一次抗体及び二次抗体を, それぞれ Can Get Signal 1 及び 2 (東洋紡, 東京) を用いて希釈した後, 順次 4°C で 1 時間反応させた. 反応前後の PVDF 膜は, 0.1% Tween 20 を含む PBS を用いて 10 分間洗浄した(合計 3 回). 検出には Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) を用いた. スキャナーは Typhoon 9400 を使用した. アプライしたタンパク質量が等量であることは Cy5 イメージで確認した.

14) 免疫蛍光染色

Rabbit anti-human Nestin IgG (N1602), Goat anti-human GFAP IgG (N18) 及び mouse anti-Human β III-Tubulin IgG (AB14545) は, それぞれ (株) 免疫生物研究所 (群馬), Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) 及び Abcam (Cambridge, UK) から購入した. TRITC 標識 Goat anti-rabbit IgG, FITC 標識 Rabbit anti-goat IgG, 及び FITC 標識 Rat

anti-Mouse IgG2a は, それぞれ Beckman Coulter (CA, USA), Sigma, 及び BD Biosciences (CA, USA) から購入した.

細胞を PBS で 3 回洗浄し, 4% の PFA を含む PBS を用いて, 室温で 15 分間固定した. PBS で 2 回洗浄後, 0.2% TritonX により室温 10 分間の処理により, 細胞膜に穴を開けた. PBS で 2 回洗浄した後, 3% BSA を含む PBS を用いて, 室温で 15 分間ブロッキングした後, PBS を用いて希釈した一次抗体と 37°C で 2 時間反応させた. 0.05% TritonX で 3 回洗浄した後, PBS を用いて希釈した二次抗体と 37°C で 30 分間反応させた. 0.05% TritonX で 3 回洗浄した後, Drop ProLong GOLD Antifade Reagent を用いてスライドガラスに封入し, 共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510, Carl Zeiss, Jena, Germany) により観察した.

15) RNAi

タンパク質 A に対する 3 種類のプライマー及び Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用い, ノックダウントランスフェクションを行った. まず 0.12, 0.36 及び 0.6 pmol/ μ l の RNAi duplex を含む Opti-MEMR I Reduced Serum Medium (GIBCO) (250 μ l) と 5, 15, 及び 25 μ l の Lipofectamine RNAiMAX を含む Opti-MEMR I Reduced Serum Medium (250 μ l) を, それぞれ穏やかに混合し, 室温で 10 分間インキュベーションした後, 2.5 ml の抗生物質を含まない神経誘導基礎培地と混合して, 10nM, 30nM, 50nM の RNAi duplex を調製した. つぎに RNAi duplex を神経誘導基礎培地で 24 時間培養した細胞に添加後, 24 時間 (5%CO₂, 37°C) のインキュベートによりノックダウンした. 反応終了後, 神経誘導培地で 3 回洗浄した後, 神経誘導を行い, 細胞形状の変化を観察した. トランスフェクション効率は, BLOCK-iT Alexa Fluor Red Fluorescent Oligo (invitrogen) を用いて確認した. ノックダウンの細胞毒性を検討するため, プライマーの代わりに同濃度の Negative Control 及び Fluorescent Oligo を添加し, 対照実験を同時に行った. また, ノック

ダウンした細胞から調製したタンパク質を用いて、タンパク質 A のウェスタンブロットを行い、ノックダウン効率を確認した。

C. 結果

1) MSC 及び MSC 由来神経様細胞 (N2d)の糖鎖差異解析

1-1) MSC の神経様分化誘導

近年、MSC を神経様細胞に分化誘導するための様々な誘導培地が開発されている。そこで、以前に報告された誘導法 (誘導法 A), 及び市販の MSC 神経様分化誘導培地を使用する誘導法 (誘導法 B) を用いて MSC の神経様分化誘導を行い、得られた分化細胞の形態学的な特徴の違いを調べた。誘導法 A を用いたとき、神経様分化誘導培地播種後 1 日目で、MSC の細胞質部分が繊維状から球状に変化するとともに、神経細胞様の突起が観察されたが (図 2A, 2B), 誘導後 2 日間目には死細胞の増加が認められたことから、効率良く神経様細胞に誘導することは困難であると判断された (図 2C)。誘導法 B により MSC を分化誘導したとき、播種後 1 日目に細胞質部分の球状化及び突起が認められた (図 2D)。誘導法 A と比較して、2~3 倍の長さの突起が多数みられ、培養 2 日間目でもほとんど死細胞は観察されなかった (図 2E)。これらの結果より、誘導法 B の方が MSC の神経様分化誘導に適していると判断されたことから、本研究では、誘導法 B で 2 日間培養した細胞を MSC 由来の神経様細胞 (N2d) として使用することとした。

1-2) LC/MS 及び LCMS^o による MSC 及び N2d 由来糖鎖の定量的糖鎖プロファイリング

昨年度までに我々は、重水素置換フェニルヒドラジン (PHN) を用いた定量的糖鎖プロファイリング法を開発している。この方法は、糖鎖試料と対象糖鎖をそれぞれ重水素置換 PHN と未置換 PHN で標識した後、それらを混合物して LC/MS 及び LC/MS^o を行うもので、重水素置換 PHN 糖鎖と未置換 PHN 糖鎖のピーク強度比から、各糖鎖の量的比較を行うものである。この方法は、糖鎖

の質的量的変化を解析する方法として優れているが、重水素置換 PHN 糖鎖と未置換 PHN 糖鎖の溶出時間が完全に一致しないことや、試薬の純度が低いことなどの問題があったため、本年度は、¹³C 置換 PHN を用いる方法を検討した。この改良法は、¹²C-PHN 及び ¹³C-PHN で標識した糖鎖の混合物を LC/MS により分析するもので、¹²C-PHN 糖鎖と ¹³C-PHN 糖鎖は同じ時間に溶出され (図 3A, 3B), マススペクトル上は質量が異 6 u なる分子として検出される (図 3C)。本研究では、MSC 及び N2d 由来糖鎖をそれぞれ ¹²C-PHN 及び ¹³C-PHN で標識した後、タンパク質あたり等量となるように混合し、LC/MS を用いて比較定量した (図 1, 3)。3 種類の糖鎖試料溶液について分析した後、統計処理した。

1-2-1) 糖鎖構造解析

図 4 は、糖鎖試料 1 (表 1 参照) の LC/MS により得られたベースピーククロマトグラムである。各糖鎖の精密質量、及び LC/MS^o で取得されたプロダクトイオンスペクトルを解析し、大凡、高マンノース型糖鎖、パウチマンノース型糖鎖及び混成型糖鎖、並びに複合型糖鎖の順に溶出されることが確認された。複合型糖鎖は、2 本鎖、3 本鎖及び 4 本鎖の順に溶出され、シアロ糖鎖よりもアシアロ糖鎖の方が早く溶出される傾向がみられた。5 種類の高マンノース型糖鎖 (M9~M5)、2 種類のパウチマンノース型糖鎖、1 種類の混成型糖鎖、及び 26 種類の複合型糖鎖が帰属された (表 2)。興味深い糖鎖として、フコースを 2 分子有する複合型 2 本鎖糖鎖、N-アセチルラクトサミン構造 (Lac) を有する糖鎖、さらには複合型 3 本鎖糖鎖に 4 個の N-アセチルノイラミン酸 (NeuNAc) が付加した糖鎖が認められた。

1-2-2) MSC 及び N2d 由来糖鎖の分布

つぎに、MSC 及び N2d の糖鎖の分布を比べるため、試料 1~3 で確認された糖鎖の全ピーク強度に対する各糖鎖のピーク強度比率 (存在比率 (%)) を求めた (図 5 及び表 2)。最も多く存在する

糖鎖は、MSC 及び N2d 共にトリマンノースコア構造にフコース付加したパウチマンノース型 (dHex1Hex3HexNAc2 (MSC, 24%; N2d, 27%))であった。その他、存在比率が高い糖鎖は、NeuNAc, Fuc 及び Lac が付加した複合型 2 本鎖糖鎖であった (dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1 (MSC, 7%; N2d, 8%); dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc2 (MSC, 14%; N2d, 16%); dHex1Hex6HexNAc5 (Lac) (MSC, 12%; N2d, 13%))。

MSC と N2d の分布を比較したとき、存在比率に顕著な差がみられた糖鎖は、NeuNAc を 3 及び 4 分子もつ複合型 3 本鎖糖鎖 (Hex6HexNAc5NeuNAc3 (MSC, 8%; N2d, 2%); Hex6HexNAc5NeuNAc4 (MSC, 2%; N2d, 0.6%)) であり、N2d における存在比率は MSC の 1/3 であった。これらの糖鎖は、MS/MS スペクトルの解析により、Lac をもつ 2 本鎖糖鎖ではなく、Lac をもたない 3 本鎖糖鎖であることを確認している(図 6, Hex6HexNAc5NeuNAc4 についてはデータを示さず)。一方、Lac をもつ複合型 3 及び 4 本鎖糖鎖の存在比率は、分化誘導すると増加する傾向がみられ、特に N2d における dHex1Hex8HexNAc7NeuNAc2 (Lac) (MSC, 0.4%; N2d, 0.7%) の存在比率は、MSC の 1.5 倍であった。MSC あるいは N2d にのみ発現している糖鎖は見つからなかった。

1-2-3) 糖鎖差異解析

糖鎖試料 1~3 で帰属された全ての糖鎖について、¹²C-PHN 標識糖鎖のピーク強度に対する ¹³C-PHN 標識糖鎖のピーク強度の比率(¹³C/¹²C)を算出した(図 7 及び表 2)。その結果、MSC を神経様細胞に分化誘導すると、帰属されたほとんどの複合型糖鎖について増加する傾向がみられた。一方、NeuNAc を 3 及び 4 分子もつ複合型 3 本鎖糖鎖 (Hex6HexNAc5NeuNAc3, Hex6HexNAc5NeuNAc4) は分化誘導すると発現量が 1/2 に減少することが明らかとなった。

2) MSC 及び N2d のタンパク質発現差異解析

2-1) MSC 及び N2d における神経細胞マーカーの免疫蛍光染色

神経幹細胞のマーカーとして使用されているネスチン、また、ニューロン及びアストロサイト等成熟した神経細胞のマーカーとして使用されている β III-チューブリン及び GFAP 等が、MSC 及び N2d に発現しているかどうかを免疫蛍光染色法により確認した。図 8A 及び 8B は、ネスチン抗体を用いて免疫蛍光染色した結果であり、N2d だけでなく MSC も染色されることが明らかとなった。 β III チューブリン及び GFAP についても同様に検討した結果、MSC と N2d に共通して発現していることが確認された(図 8C-8F)。従来から使用されてきた神経マーカーの多くは MSC にも発現しており、これらのマーカーで、MSC と神経様分化細胞を区別することは難しいことが示唆された。

2-2) MSC 及び N2d 由来表層タンパク質の発現差異解析

分化指標として利用するタンパク質は、セルソーター等の細胞分画に利用可能な細胞表層タンパク質であることが望ましい。そこで、まず細胞表層のタンパク質をビオチンで標識し、細胞を溶解した後でタンパク質を抽出し、二次元電気泳動を行った。つぎに、蛍光標識ストレプトアビジンでビオチン標識タンパク質を検出し、得られたスポットの蛍光強度に基づく差異解析を行った。最後に、差のみられたスポットにつき、ゲル内消化、LC/MS/MS 及びデータベース検索によるタンパク質同定を行った(図 9)。

2-2-1) MSC 及び N2d 由来細胞表層タンパク質のビオチン標識

まず、イミノビオチンを用いて細胞を標識した後、FITC-標識ストレプトアビジンを用いて細胞染色を行った。神経様分化誘導後の細胞を染色した結果、細胞の輪郭が染色され、細胞表層タンパク質のみがビオチン標識されていることが確認された(図 10)。つぎに、ビオチン標識 MSC 及び N2d から調製したタンパク質について SDS-PAGE

を行い、ビオチン標識タンパク質の分子量を確認した(図 11). FITC-ストレプトアビジンで染色されたバンドの多くは、150 kDa を超える高分子量タンパク質であった。興味深いことに、500 kDa 付近のバンド (バンド A) は N2d のみから検出された。このバンドについてタンパク質同定を行った結果、約 600 kDa のタンパク質 A が含まれていることが明らかとなった。

2-2-2) アガロースゲル二次元電気泳動によるタンパク質発現差異解析

バンド A には複数のタンパク質が混在していたことから、発現量の差が他のタンパク質に起因している可能性があったので、アガロースゲル二次元電気泳動によりタンパク質を展開した後、発現差異解析を行った。図 12 は、pH3.0 から 10.0 の範囲の等電点アガロースゲルを用いたときの二次元電気泳動の結果である。アガロースゲルを使用しているため境界は不明瞭であるが 500 kDa 付近に、N2d で増加しているスポットが検出された。このスポットについてタンパク質同定を行ったところ、タンパク質 A が同定されたことから、MSC の神経様分化に伴いタンパク質 A は増加することが確認された。

スポット A 以外にもピーク面積に変化のみられるスポットがいくつか確認されたので、等電点の範囲を pH3.0 から 8.0 に狭めて二次元電気泳動を行った。その結果、検出された 48 個のスポットのうち、神経様分化後に 24 スポットが 1.5 倍以上増加し、7 スポットが 1.5 倍以下に減少していることが明らかとなった(図 13 及び表 3)。そこで、変動の見られたスポットについてタンパク質同定を行った結果、13 個の増加したスポット、及び 2 個の減少したスポットのタンパク質を同定することができた。

Type IV コラーゲンやラミニンには増加する傾向がみられたが、Type I, III コラーゲン及びフィブロネクチンには減少傾向が認められた。このことは、神経分化に伴い、細胞外マトリクス (ECM) を構成する成分の発現量が変化することを示唆

していると思われる。また、スポット 28~31 及び 44 から同定されたタンパク質は同一タンパク質であったことから、複数の isoform が含まれることが明らかとなった。

2-2-3) MSC の神経様分化指標候補 (タンパク質 A) の発現解析

タンパク質 A の発現量に変化が認められたことから、ウエスタンブロットにより、分化誘導後の経時的变化を調べた。図 14 は、MSC、並びに神経様細胞へ分化誘導した後、3 時間、6 時間及び 1 日培養した細胞から得られた全タンパク質を試料としたウエスタンブロットの結果である。誘導後 3 時間でタンパク質 A のバンドが確認され、誘導時間が長くなるにつれて発現量も増加することが明らかとなった。また、250kDa 付近にもタンパク質 A と同じ挙動を示すバンドが観察され、isoform が存在する可能性が示唆された。一方、MSC にはタンパク質 A の発現は認められなかった。本実験の結果は、二次元電気泳動の結果を支持するとともに、タンパク質 A の発現量は、細胞表層だけでなく、細胞全体において増加していることを示唆していると思われる。

2-2-4) タンパク質 A の RNAi

タンパク質 A の神経様分化への関与を検討するために、タンパク質 A をノックダウンしたときの MSC の神経様分化について観察した。まず、3 種類のプライマーについて、ウエスタンブロットを用いてノックダウン効率を検討した結果、プライマー C による効率が最も良いことが示唆された(図 15A)。そこで、プライマー C を用いてタンパク質 A をノックダウンしたときの形態学的変化を確認したところ、タンパク質 A をノックダウンしても、神経様細胞に分化することわかった(図 15B)。タンパク質 A は MSC の神経様分化の制御に直接関与しているのではなく、分化した結果として発現されるタンパク質であると推察された。

以上のように、MSC 及び MSC 由来神経様分化細胞の表層タンパク質について差異解析を行っ

た結果、タンパク質 A を含む複数のタンパク質の発現量に変化が生じることが示唆された。これらのタンパク質は MSC の神経様分化における分化指標として利用できる可能性があると思われる。

D. 考 察

1) MSC 及び N2d の糖鎖差異解析

定量的糖鎖プロファイリング法を用いて、MSC 及び N2d 糖鎖の差異解析を行った結果、MSC が神経細胞様に分化すると、3 及び 4 個のシアル酸が付加した 3 本鎖糖鎖の発現量が有意に減少すること、逆に Lac をもった 3 及び 4 本鎖糖鎖が増加することが明らかとなった。一般に、複合型 3 及び 4 本鎖糖鎖の分岐鎖は、それぞれ β 1-4-*N*-アセチルグルサミン転移酵素(GnT-IV) 及び β 1-6-*N*-アセチルグルサミン転移酵素 V (GnT-V) による GlcNAc の付加により伸長される。一方、Lac 側鎖は、 β 1-3 *N*-アセチルグルサミン転移酵素(β 3GnT) による GlcNAc の付加により伸長する。本研究の結果から、MSC を神経様細胞に分化させたときに、これらの糖転移酵素に何らかの変化が生じている可能性が示唆された。今後、これら酵素の活性あるいは発現量の変化と糖鎖プロファイルの変化、さらには神経様分化との関連性について調べる必要があると思われる。

Heiskanen らは、MSC を骨細胞に分化させると、高マンノース型糖鎖、及び Lac あるいは α 2-3 NeuNAc をもつ糖鎖が減少すること、逆に硫酸エステル化された糖鎖が増加することを報告している(2009, *Glycoconj J*). MSC を神経様細胞に分化させると、高マンノース型糖鎖はほとんど変化せず、Lac をもつ糖鎖は増加していたことから、MSC は分化の方向により異なる糖鎖プロファイルを示すものと考えられ、糖鎖プロファイルは、MSC の分化誘導に対して鋭敏に反応する特異性の高い指標であることが示唆された。

2) MSC 及び N2d のタンパク質発現差異解析

本研究では、両細胞の表層タンパク質について、アガロースゲル二次元電気泳動及び LC/MS/MS

による発現差異解析を行った。その結果、神経様分化に伴い増加する 13 個のタンパク質、及び減少する 2 個のタンパク質を同定することができた。

タンパク質 A は、ウェスタンブロットによっても、神経様分化に伴い増加することが明らかになったことから、MSC の神経様分化を評価するための指標として利用できる可能性が高い。一方で、タンパク質 A のノックダウンは、神経誘導後の形態学的変化に影響しなかったことから、タンパク質 A は、神経様分化には直接関与していないことが示唆された。

ECM は細胞の増殖、分化及び接着等様々な現象に関与することが知られている。フィブロネクチン(FN)、コラーゲン、ラミニン及びプロテオグリカンなどの ECM の構成成分をコートしたディッシュで MSC の分化誘導を行うと、分化させる細胞の種類、及びコートした ECM 構成成分の組み合わせにより誘導効率が異なることが報告されている。例えば、I型コラーゲンは、骨芽細胞への分化は促進するが、軟骨芽細胞への分化には影響しないこと、またラミニンは脂肪細胞への分化を抑制することなどが報告されている。以前に我々は、FN コートしたディッシュを用いて MSC の神経様分化誘導実験を行ったときに、MSC の増殖速度は増加するが、神経様細胞への分化効率が著しく低下することを確認している(データ示さず)。本研究において神経様分化に伴い FN の発現量が減少していたことは、興味深い結果である。

タンパク質 17 については、神経の変性に関与することが報告されているが、タンパク質 16, 24, 28(1), 29~31, 44 及び 45(2)については、神経分化との関連性は明らかにされていない。今後、これらのタンパク質の神経分化過程における機能について詳細に検討する予定である。また、今回我々は、高分子量タンパク質 (150kDa 以上) の差異解析を行うために、一次元目の等電点電気泳動にアガロースゲルを使用した。アガロースゲルは解像度が低いこと、また発現量の変化が予想される低分子量タンパク質の解析には適していないことから、今後はドライストリップゲルを用い

た分解能の高い二次元電気泳動による差異解析も実施する必要があると考えられる。

近年、ES細胞、iPS細胞等の幹細胞における未分化性指標及び分化能予測指標の開発、及び目的幹細胞の分離技術に関する研究が盛んに行われている。一方で、MSCは幹細胞としての定義そのものが曖昧であり、未だ特異性の高い指標は見出されていない。これは、MSCが骨髄、臍帯血及び脂肪組織など、どの組織から分離されたかにより、細胞特性指標の発現パターンが異なることが影響していると思われる。また、MSCとして組織から分離された細胞は不均一な集団であり、必ずしも単一の細胞で構成されていないこともMSCの細胞特性解析を難しくしている要因の一つになっている。本研究により見出されたMSCとN2dを識別するための分子は、本実験で使用したMSCを用いたときの指標候補である。これらの指標を一般化するためには、起源、培養条件及び誘導条件の異なるMSCについても同様に評価し、共通性を確認することが不可欠であろう。

E. 結論

同位体標識 PHN を用いた定量的糖鎖プロファイリング法を用いて、神経様に分化した MSC では、トリシアロ及びテトラシアロ複合型 3 本鎖糖鎖が減少していることを明らかにした。また、MSC の神経分化前後の細胞表層タンパク質の発現差異解析を行い、タンパク質 A が増加すること、及び ECM を構成するタンパク質の発現が変動することを見出した。これらの分子は、MSC と分化誘導した細胞の識別や分離に利用できるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, Akira Harazono, Toru Kawanishi, Teruhide Yamaguchi: Identification of glycoproteins carrying a target glycan-motif by liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry. Identification of Lewis x-glycoproteins in mouse kidney. *J. Proteome Res.*, 8, 3415-3429 (2009).
2. Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Daisuke Takakura, Yuan Qin, Huang Xiaoyu, Teruhide Yamaguchi: The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals, *Biol. Pharm. Bull.*, 32 (5) 796-800 (2009)
3. Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, Toru Kawanishi, Teruhide Yamaguchi: Alteration of N-glycosylation in the kidney of systemic lupus erythematosus model mouse. Relative quantification of N-glycans by using isotope tagging method. *Immunology*, 336-345 (2009).
4. 川崎ナナ, 糖鎖関連医薬品の開発と分析化学, ぶんせき, 421(1), 17-22 (2010).

2) 学会発表

1. 川崎ナナ: 糖タンパク質性医薬品の開発と質量分析. 第7回日本糖質科学コンソーシアムシンポジウム, 大阪(2009, 12, 7,8)

H-1.

実用新案登録 なし

H-2.

その他 該当事項なし

表 1 糖鎖と PHN の組み合わせ

MSC	¹² C-PHN 標識糖鎖 1	¹² C-PHN 標識糖鎖 2	¹² C-PHN 標識糖鎖 3
神經様細胞	¹³ C-PHN 標識糖鎖 1	¹³ C-PHN 標識糖鎖 2	¹³ C-PHN 標識糖鎖 3
混合	↓	↓	↓
分析試料溶液	試料 1	試料 2	試料 3