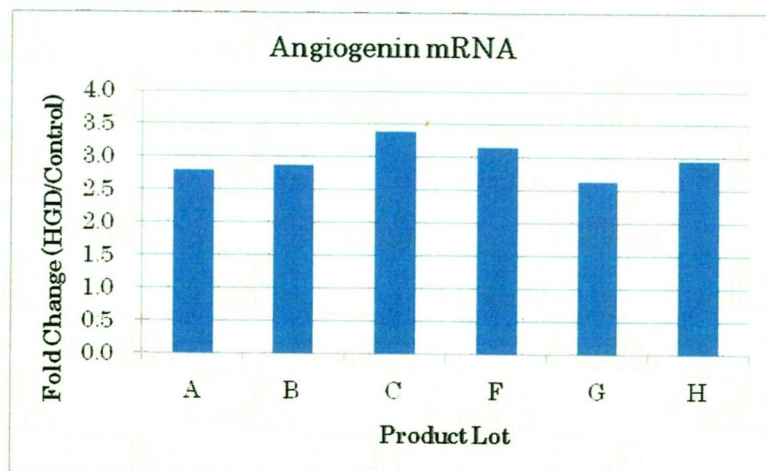
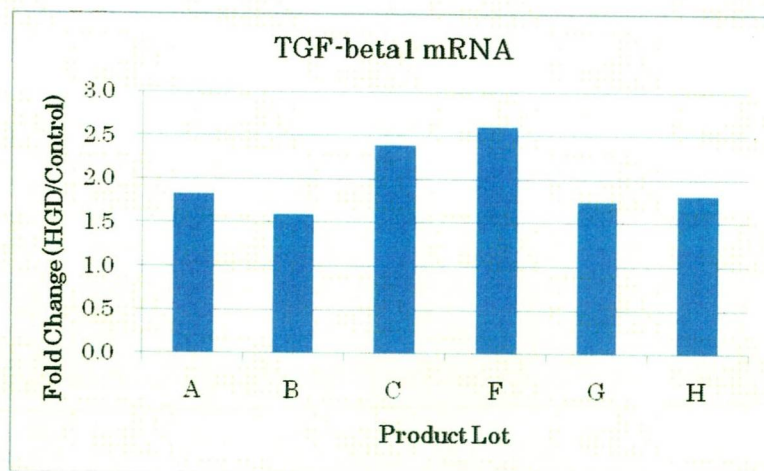


D



E



F

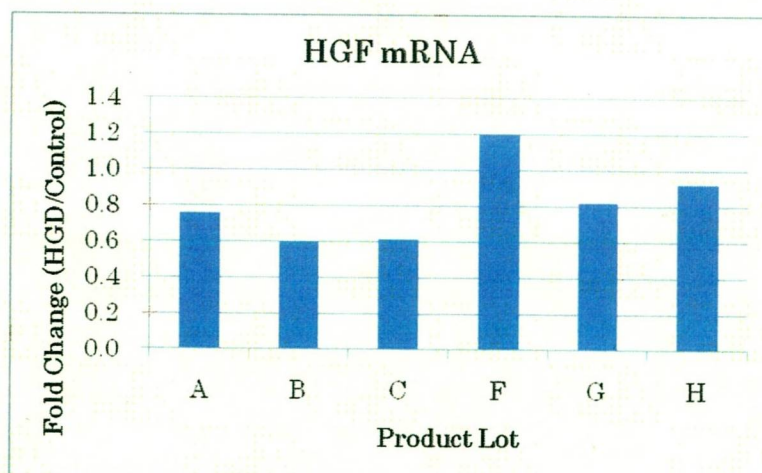


図4 (続き)

細胞組織加工医薬品の特性解析・品質管理に関する研究

研究分担者 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部第二室長

研究協力者 豊田淑江 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

研究協力者 北川博子 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

細胞・組織加工医薬品として血管再生療法での応用が期待される血管内皮前駆細胞（Endothelial Progenitor Cells：EPC）には、early EPC と late EPC の 2 種類が存在することが知られており、それぞれの起源細胞や特性の解明、品質評価法の確立等が実用化に向けた課題となっている。本年度は、early EPC の特性指標について、late EPC 及び組織由来血管内皮細胞との比較も含めて検討を行い、early EPC が白血球共通抗原である CD45 を発現していること、マトリックスメタロプロテアーゼ MMP-9 を高発現していることなど、白血球に類似した性質を持っていることを明らかにした。また、マトリゲルを用いた *in vitro* 細胞浸潤アッセイにより early EPC が高い浸潤活性を示すことを明らかにした。さらに、early EPC の細胞表面に MMP-9 及び MMP-2 が存在し、early EPC の浸潤活性が MMP-2/MMP-9 阻害剤により抑制されることを明らかにし、MMP-9 及び MMP-2 が early EPC の機能的特性指標であることを示した。

A. 研究目的

虚血部位周辺組織の再生を目的として末梢血 CD34 陽性細胞や骨髄単核球を局所に投与する血管再生療法は、我が国でも精力的に臨床研究や先進医療としての治療が行われている再生医療の一つである。これらの治療で血管形成が促進される機構としては、投与された細胞集団に含まれる血管内皮前駆細胞の起源となる細胞が局所で分化し、血管形成を促進する因子を放出することや、血管内皮細胞に分化して血管を形成すること等が考えられる。しかし、骨髄採取等の患者への負担や、幹細胞の異所性分化の懸念があることに加えて、投与された細胞集団のうち、どのような細胞が、どのように働いて奏功しているのかという有効性のメカニズムが不明であるという問題が指摘されている。

血液から単核球あるいは特定の表面マーカー

を持つ細胞を分離し、VEGF 等の存在下で培養すると、培養開始 1 週間程度で early EPC、2～3 週間目から late EPC と呼ばれる 2 種類の血管内皮前駆細胞が誘導されることが知られている。それぞれの細胞の特性に関して詳細は明らかになっていないが、early EPC は血管形成を促進するサイトカイン類を分泌する性質を持ち、late EPC はそれ自身が新生血管に取り込まれる性質を持つ細胞であるとされており、*in vivo* においてもこれらの細胞が血管再生に寄与していると考えられる。Early EPC に関しては、培養条件により血管再生効果が異なるという報告（Urbich et al. *Circ. Res.* 108 2511 2003）があり、実用化に向けては培養条件の最適化や品質評価指標の確立が課題である。

昨年度の本研究において、early EPC の培養上清には冠状動脈内皮細胞の遊走や管腔形成促進

作用があること、遺伝子発現プロファイルから、early EPC は直接、間接的に血管新生を促進する従来の報告以上の多数の因子を産生していることを明らかにしてきた。

虚血性疾患の血管再生療法において early EPC や late EPC は静脈内や虚血部位近傍に投与されるため、虚血部位へ遊走・浸潤していく必要がある。本年度は early EPC が浸潤と深い関わりを持つ MMP-9 を多量に産生していることを示す遺伝子発現プロファイリング結果をもとに、MMP-9 タンパク質の局在や細胞機能への影響について late EPC 等と比較検討した。

B. 研究方法

1) 試薬

トロンボポエチン(TPO)は、キリン・アムジェン社より提供された。VEGF は Strathmann Biotec 社より、IL-8 は Strathmann Biotec 社より、AC133 細胞分離キットは Miltenyi Biotec 社より購入した。抗 CD31 抗体-フルオレッセインイソチオシアネート (FITC) あるいは-フィコエリスリン(PE)、抗 CD45 抗体-FITC は BD Biosciences PharMingen 社より購入した。抗ヒト内皮 NO 合成酵素 (eNOS) 抗体 (Cayman Chemical) を用いたフィブロネクチン (FN) あるいはIV型コラーゲンでコーティングされたプレートは、イワキ社から購入した。抗 CD14 抗体-FITC は、Dako Cytomation 社から購入した。抗 MMP-9 抗体は第一ファインケミカル社より購入した。抗 MMP-2 抗体は Cell Signalling Tech 社より求めた。RT2 Profiler PCR Array は Supper Array 社から購入した。培地は内皮細胞用基礎培地(EBM-2)、血管内皮細胞用増殖培地 (EGM-2、2%牛胎児血清(FCS)FCS、VEGF、bFGF、EGF、R3-IGF、アスコルビン酸、ヒドロコチゾン、ヘパリン) (三光純薬) を用いた。マトリゲルは BD Biosciences 社より購入した。

2) 単核球の分離

インフォームドコンセントを得て採取された臍帯血は、東京赤十字血液センター、臍帯血バンクより提供された。献血用に採取された血液 (液量不足等による規格外品)は、埼玉赤十字血液センターより提供された。

血液サンプルは、2mM の EDTA を含むリン酸緩衝食塩水 (PBS) で希釈してリンフォプレップチューブ (Axis-Shield PoC AS) (密度= 1.077) に添加した。800g、18℃、20 分の遠心により、単核球を集めた。細胞を磁気ビーズで標識する場合は、分画用溶液 {2mM の EDTA、0.5%のウシ血清アルブミン(BSA)を含む PBS} で洗浄した。

3) AC133 陽性細胞の分離

臍帯血あるいは末梢血 AC133 陽性細胞は、Indirect CD133 マイクロビーズ分離キットを用い Auto MACS (Milteny Biotec)で分離した。得られた AC133 陽性細胞は 20% FCS、50 ng/ml VEGF、50 ng/ml TPO、を含む EBM-2 培地に浮遊させ 5 日間、IV型コラーゲンコートディッシュ上で培養した。細胞を全て回収し、EGM-2 培地に懸濁し、FN コートディッシュ上で 24 時間培養し接着した細胞を AC133 陽性細胞由来 early EPC として解析した (図 1)。

4) 単核球由来 early EPC の誘導

リンフォプレップチューブにより分離した単核球を EGM-2 培地に懸濁し、FN コート 6 穴プレートにおよそ $1\sim 2 \times 10^7$ cells/well 播種した。約 1 週間培養後、プレート上に接着した細胞を単核球由来 early EPC とした(図 1)。

5) 単核球由来 late EPC の誘導

臍帯血から調製した単核球を培地 EGM-2 に懸濁し、FN コート 6 穴プレートに播種した。播種細胞数は、 1×10^7 cells/well 程度とし、1 週間に 2 回、培地交換し、2~3 週間後に出現する数石上でコロニーを形成する増殖能の高い細胞を late EPC とした。

6) フローサイトメーターによる解析

Early EPC は培養プレートから非酵素的に剥離・回収した。洗浄後、抗 CD31 抗体-FITC あるいは PE、抗 CD14 抗体-FITC で免疫染色した。抗 MMP-9 抗体、抗 MMP-2 抗体は 1 次抗体でインキュベート後、抗マウス IgG 抗体-FITC あるいは抗ウサギ IgG 抗体-FITC で免疫染色した。その後、抗 CD44 抗体-PE を用いて二重染色した。なお、全ての細胞は対照用血清で染色し、非特異的な反応でないことを確認した。

7) 接着細胞の免疫染色

単核球あるいは AC133 陽性細胞を 1 週間培養後、実験に用いた。細胞を PBS で 3 回洗浄し、1% ホルムアルデヒド-PBS で固定した。抗 eNOS 抗体で染色する場合は更に冷却したエタノール (-20°C) で固定して細胞膜を透過させ、さらに PBS(-) で 3 回洗浄した。1% BSA-PBS を用いて細胞を 4°C、1 時間、ブロッキングした。次に 1 次抗体 (抗 CD45 抗体-FITC、抗 eNOS 抗体、抗 MMP-9 抗体、抗 MMP-2 抗体) で 4°C、1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、4°C、1 時間、抗マウス IgG 抗体-FITC、抗ウサギ IgG 抗体-Rhodamin、抗ウサギ IgG 抗体-FITC とインキュベーションした。抗 MMP-9 抗体あるいは抗 MMP-2 抗体による免疫染色後、抗 CD44 抗体-PE を用いて二重染色した。PBS で洗浄後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 LSM 510 (Carl Zeiss) を用いて解析した。

8) Early EPC の特性指標の探索

Early EPC および HUVEC の RNA を、RNeasy (QIAGEN) を用いて回収した。Early EPC の RNA サンプルは、TURBO DNase (Ambion) で処理後、再度 RNeasy で精製した。調製した RNA の品質を Agilent RNA 6000 Nano Assay を用いたキャピラリー電気泳動により確認した。RT2 First strand kit を用いて、逆転写反

応により 1 本鎖 cDNA を調製し、血管新生に関連する遺伝子 84 種類について、定量的 PCR (RT2 Profiler PCR Arrays; Super Array) により発現プロファイルを解析した。Real-Time PCR の装置は ABI7000 を用いた。β アクチンを内部標準として、各遺伝子について β アクチンとの Ct 値の差を求め、 $2^{-\Delta Ct}$ を各遺伝子と β アクチンの発現量の比とした。

9) 細胞の浸潤活性

マトリゲルに対する各種細胞の浸潤を BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber を用い、BD Biosciences 社の示すプロトコールに従って行った。メンブランフィルターはポアサイズが 8 μm のものを用いた。マトリゲルをコートしたインサートに 2% FBS-EBM-2 に懸濁した early EPC、late EPC、HUVEC あるいはヒト冠状動脈血管内皮細胞 HCAEC を 1.6×10^5 cells/0.5 ml/インサートになるように播種した。下室には 10 ng/ml VEGF を含む 2% FBS-EBM-2 を 0.75 ml/well 加え、37°C の CO₂ インキュベーターに 3 時間静置した。浸潤した細胞は固定・染色し、顕微鏡下で計測した。

MMP-2/MMP-9 阻害剤 V (500 nM、Calbiochem) を用いる際には、インサート及び下室の両方に加えた。

10) MMP-2/MMP9 のウエスタンブロット及びアイモグラフィ

細胞培養上清は非還元下でサンプル調製を行い 10% アクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。転写は 10% Methanol を含む 10 mM CAPS バッファー (pH 11.0) を用いて 0.3 A で 2 時間行った。MMP-2 及び MMP-9 に対する抗体を用いて Western blot を行った。

Early EPC の分画には 0.25M Sucrose/10 mM Tris (pH 7.4) を用い、凍結融解により細胞を破壊し、2000 rpm、4°C、5 min 遠心して核分画である沈査を除去した。さらに 100,000g、4°C、

40 min で遠心し、上清を細胞質分画、沈査を細胞膜分画とした。電気泳動用サンプルバッファーを加え、ウェスタンブロットを行った。

ザイモグラフィーにはゼラチンザイモグラフィー用ゲルを用いた。非還元条件下で培養上清を電気泳動し、MMP-2/MMP9 酵素活性により分解された部分をクーマシー染色液で可視化し、Typhoon 9400 (Amersham)で画像化した。

11)統計解析

統計解析ソフト Prism 4 を用いて検定を行った。p<0.05 の場合に、有意差があると判断した。各々の実験は3回繰り返し、代表的なデータを示した。

C. 研究結果

C-1. AC133 陽性細胞由来 early EPC、単核球由来 early EPC の特性解析

まず、起源細胞画分の違いによる early EPC の特性の差異について検討した。図 1 に AC133 陽性細胞由来 early EPC および単核球 (MNC) 由来 early EPC の分化誘導法を示した。単核球由来 early EPC は AC133 陽性細胞由来 early EPC を含むヘテロな集団と考えられる。AC133 陽性細胞を 1 週間培養した後、CD31 強陽性細胞を FACS で分画し、FN コートディッシュ上で培養すると図 2 左に示すように紡錘状の early EPC が出現した。また、単核球由来 early EPC も同様に紡錘状の形態を示した。

1 週間培養後の AC133 陽性細胞由来 early EPC と単核球由来 early EPC を抗 CD31 抗体-FITC で染色してフローサイトメーターで解析すると、殆どすべての細胞が CD31 陽性であった (図 3)。また、単核球由来 early EPC も CD31 陽性であった。CD14 の発現に関しては、単核球由来 early EPC は殆どが陽性であるのに対し、AC133 陽性細胞由来 early EPC は陽性と陰性を含むヘテロな集団であった (図 3、右上)。

抗 CD45 抗体および抗 eNOS 抗体で蛍光免疫染色後、共焦点顕微鏡で観察した結果、AC133 陽性

細胞由来 early EPC と単核球由来 early EPC のいずれにおいても、すべての細胞が CD45 陽性、eNOS 陽性であった (図 4)。

これらの結果から、CD31、CD45 および eNOS の発現と形態の点では AC133 陽性細胞由来 early EPC と単核球由来 early EPC は類似していると考えられた。一方、 10^8 個の血液単核球から調製可能な細胞数に関して、AC133 陽性細胞由来 early EPC が 10^6 個程度であるのに対して単核球由来 early EPC 血液単核球では 10^7 個程度である。再生医療への応用において細胞数の確保は重要な要素であると考え、以下の検討は単核球由来 early EPC を用いて実施した。

C-2. Early EPC の特性指標の探索

Early EPC の特性指標候補分子を探索するため、血管新生に関わる遺伝子 84 種類について、HUVEC あるいは late EPC を対照として、多検体同時比較 Real Time PCR により発現プロファイルを解析した。図 5 に、early EPC および HUVEC について、各細胞における被験遺伝子の発現量と β アクチン遺伝子発現量の比をプロットした結果を示す。グラフ上に遺伝子名が示してある点は、early EPC と HUVEC で発現量に有意差の認められた遺伝子である。Early EPC は HUVEC と比較して多くのサイトカイン・ケモカイン類の遺伝子を高発現していた。その中で IL-8 は VEGFA と同様に直接血管内皮細胞の遊走や増殖を促進するという報告がある。興味深いことに血管新生に重要と考えられるメタロプロテアーゼである MMP-9 は early EPC で、MMP-2 は HUVEC で、より多く発現されていた。そこで、early EPC の浸潤能および浸潤における MMP-2/MMP-9 の関与について late EPC や HUVEC と比較検討した。

C-3. 種々の細胞における MMP-2/MMP-9 の発現

Early EPC における MMP-9 タンパク質の発現を種々の細胞の培養上清を用いてウェスタン

ブロット法とザイモグラフィで検討した(図 6)。その結果、early EPC の培養上清にのみ MMP-9 のバンドが検出され、Late EPC、HUVEC、HCAEC の培養上清には MMP-2 のバンドが検出された。また、ザイモグラフィでは、ウエスタンブロットでバンドが検出された試料について、ウエスタンブロットと同じ分子量を示す泳動位置にゼラチン分解により生じるバンドが検出された。MMP-2 および MMP-9 の発現パターンは、図 5 の遺伝子発現プロファイルと一致するものであった。

MMP-2 や MMP-9 を産生する細胞は、細胞外マトリックスの分解により周囲に浸潤する活性が高いと考えられる。また、高い浸潤活性には MMP-2 や MMP-9 が細胞表面に存在することが必要であるという報告もある (Brooks et al. Cell 85 683 1996, Yu et al. Gene Dev. 2000 14 163)。そこで、フローサイトメトリーにより MMP-2/MMP-9 の細胞表面局在を検討した。その結果、early EPC の細胞表面には MMP-9 のみならず、培養上清には観察されなかった MMP-2 も検出された。一方、late EPC、HUVEC、HCAEC の細胞表面には、遺伝子発現解析結果に一致して MMP-9 は検出されず、培養上清に検出された MMP-2 も細胞表面には検出されなかった(図 7)。細胞膜タンパク質である CD44 と結合して MMP-9 が細胞表面に存在しているという報告 (Yu et al. Gene Dev. 2000 14 163, Bansal Plos ONE 4 e4911 2009) を参考に、early EPC を免疫染色し、フローサイトメーターと共焦点顕微鏡(図 8)で解析した。その結果、MMP-9、MMP-2、CD44 は、いずれも early EPC の表面に存在することが示された。MMP-9 あるいは MMP-2 と CD44 の 2 重染色 (フローサイトメーター 3 段目) では、MMP-9 陽性あるいは MMP-2 陽性の細胞で CD44 陰性の細胞は殆ど観察されなかった。次に early EPC を細胞質と細胞膜に分画後、ウエスタンブロットで解析した結果(図 9)、共焦点顕微鏡(図 8)で解析した結果と同様に、細胞膜画分に

MMP-9、MMP-2、および CD44 が検出された。

C-4. Early EPC の浸潤活性

マトリゲルに対する early EPC の浸潤活性を、late EPC、HUVEC、HCAEC と比較した。浸潤刺激因子としては VEGF を用いた。マトリゲルは、細胞外マトリックスタンパク質を豊富に含む Engelbreth-Holm-Swarm マウス肉腫から抽出した可溶性基底膜から成り、主成分は、ラミニン、コラーゲン IV、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、およびエンタクチン/ニドジェン 1,2 である。解析の結果、early EPC は late EPC、HUVEC、HCAEC に比べ高い浸潤活性を持つことが明らかになった(図 10)。さらに、VEGF と共に MMP-2/MMP-9 阻害剤を加えると early EPC の VEGF 刺激に応答した浸潤は完全に阻害された(図 11)。これらの結果から、early EPC の浸潤には MMP-2/MMP-9 が関与していることが示され、early EPC が投与局所において新生血管形成のために高効率に浸潤できる可能性が示された。

C-5. AC133 由来 early EPC における MMP-9 の発現

これまでの解析から、単核球由来 early EPC は MMP-9 を発現していることが明らかになった。そこで、AC133 由来 early EPC における MMP-9 の発現を共焦点顕微鏡で検討した。図 12 に示すように AC133 由来 early EPC も MMP-9 を発現し、この点でも単核球由来 early EPC と共通していると考えられた。

D. 考察

血管内皮前駆細胞 (EPC) には少なくとも 2 つのタイプがあることが知られている。1 つは増殖能が低く、自身は管腔形成能をもたないが、血管形成に関与するサイトカイン等を放出する紡錘状の形をした early EPC である。もう 1 つは、高い増殖能と管腔形成能をもち、敷石状を呈した late EPC である。Early EPC と late EPC の定義

は現在に至っても明確でなく、EPCに関する論文においても、early EPCとlate EPCのどちらに関する研究であるのかが表題や要旨からは明らかでなく、methodの内容から読者が判断しなければならない状況にある。したがって、EPCの分化誘導に関わる基礎的研究の観点はもとより、再生医療における実用化に向けた品質管理法の観点からも、early EPCとlate EPCの差異を明確にし、それぞれの特性を明らかにすることが重要である。

我々はEPCの発見当初から幹細胞であるAC133陽性細胞を起源とするEPCに関する研究を進め、トロンボポエチンをAC133陽性細胞に添加するとearly EPC産生が増加すること等を明らかにしてきた(Kanayasu-Toyoda et al., *J Cell Physiol.* 195, 119, 2003, *J Biol Chem* 282, 33507, 2007)。一方で、単核球を起源としてearly EPCの調製が可能であることなどが明らかになり、単核球を投与する臨床研究や先進医療も多く行われるようになってきた。AC133陽性細胞が単核球画分に含まれる細胞であること、また昨年度及び今年度の研究によりAC133陽性細胞由来early EPCと単核球由来early EPCは類似した性質を持つことが明らかになったこと(図2-4)、単核球由来early EPCの方が細胞数の確保が容易であること等を考慮し、early EPCについては、単核球から分化誘導される細胞を用いて解析を進めることとした。

図5に示したように、early EPCとHUVECでは遺伝子発現プロファイルが大きく異なることが明らかになった。Early EPCではサイトカイン類の他にMMP-9の産生が高く、MMP-9が特性指標として有用である可能性が考えられた。MMP-9は、基底膜の構成成分であるIV型コラーゲンを分解することが知られている。また、MMP-9は、c-kitリガンドを切断して可溶性リガンドとして放出させることにより、骨髄由来血管内皮前駆細胞の動員に関与することが報告されて

おり(Heissig et al. *Cell* 109 625 2002)、MMP-9のこれらの活性が、early EPCの血管形成促進作用に寄与している可能性が考えられる。MMP-9は好中球やマクロファージにおいても発現が高いことが知られていることから、MMP-9の発現の点でも、early EPCが血球系に近い特性を持つことが示唆された。

MMP-9は転移能が高いガン細胞では細胞表面に存在することが報告されている(Yu et al. *Gene Dev.* 2000 14 163)。図7-9で示したようにearly EPCの細胞表面にはMMP-9が存在しており、early EPCはlate EPCや組織由来血管内皮細胞と比較して高い浸潤活性を示した(図10)。さらに、early EPCでは、培養上清中には検出されないMMP-2も細胞膜に存在していることが示された。CD44は膜貫通型糖タンパク質で、細胞の分化、増殖、運動性に関わっており、腹腔マクロファージや乳癌細胞、黒色腫細胞ではMMP-9とCD44が結合していることが報告されている(Yu et al. *Gene Dev.* 2000 14 163, *Bansal Plos ONE* 4 e4911 2009)。CD44はearly EPCにおいて大量に産生されるMMP-9のみならず、産生量の少ないMMP-2とも相互作用し、これらのプロテアーゼを細胞膜に留める役割を担っている可能性が考えられる。膜表面に存在するMMP-9はIL-8やIL-1 β のプロセッシングに関わり、より生物活性の高いIL-8やIL-1 β を放出する役割があるという報告(Steen et al. *Blood* 96 2673 2000, Schönbeck et al. *J Immunol* 161 3340 1998)があることから、これらの作用が協調的に作用して血管新生促進作用をもたらすものと思われる。したがって、early EPCにおいて、MMP-2/MMP-9が細胞膜に存在することがearly EPCの血管形成促進能と関連した重要な特性である可能性がある。

ヒト(自己)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保に関する

指針では、細胞・組織加工医薬品の品質管理においては、確認試験として、目的とする細胞・組織の形態学的特徴、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質、その他の適切な遺伝型あるいは表現型の指標を選択して、目的とする細胞・組織であることを確認することが求められている。本研究の結果、early EPC の細胞表面に存在し、細胞浸潤能との関連が示唆された MMP-2 及び MMP-9 は、early EPC を特徴づける生化学的指標として用いることができる可能性がある。

平成 21 年末には、厚生労働省より「細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確認申請書記載要領案」が公表され、治療効果が期待される細胞を医薬品として開発するための規制環境整備が進んでいる。Early EPC は調製可能な細胞数が限られていることから、実用化に向けては、特性指標の同定と共に、限られた細胞数で実施可能な品質試験の確立も必要になると考えられる。特性指標検出法の開発も視野に入れ、EPC の品質試験法に有用な特性指標の探索と機能解析を継続していきたいと考えている。

E. 結論

細胞・組織加工医薬品の品質管理において必要とされる確認試験法や力価試験法の確立に資する研究として、血管内皮前駆細胞をモデルとした研究を行い、以下の結果を得た。

- 1) 形態と細胞表面マーカー CD45、CD31 及び eNOS 発現の観点から、AC133 陽性細胞由来 early EPC が単核球由来 early EPC と類似した性質を示すことを明らかにした。
- 2) Early EPC と HUVEC の遺伝子発現プロファイルが大きく異なっていることを見出し、early EPC において MMP-9 が高発現していることを mRNA 及びタンパク質レベルで明らかにした。

- 3) Early EPC では MMP-9 のみならず、MMP-2 も細胞膜に存在していることを明らかにした。
- 4) Early EPC が高い細胞外マトリックス浸潤活性を持ち、MMP-9 及び MMP-2 が浸潤能に関連した機能的特性指標であることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表、総説

- 1) Takuo Suzuki, Akiko Ishii-Watabe, Minoru Tada, Tetsu Kobayashi, Toshie Kanayasu-Toyoda, Toru Kawanishi, and Teruhide Yamaguchi: Importance of FcRn in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: A comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human FcRn. *J.Immunol.* 184(4), 1968-76 (2010)
- 2) 山口照英、石井明子 早期臨床開発段階でのバイオ医薬品の品質・安全性確保 臨床評価 36, 611-627 (2009)
- 3) 川崎ナナ、石井明子、荒戸照世、山口照英 抗体医薬品の構造及び品質特性解析 抗体医薬品製造の留意点～承認申請をふまえて～サイエンス&テクノロジー社 p.119-132 (2009)

2. 学会発表

- 1) 豊田淑江、北川博子、石井明子、多田 稔、鈴木 琢雄、小林 哲、山口照英：血管内皮前駆細胞の機能解析・Early EPC を中心に 第 9 回日本再生医療学会総会 2010年3月 広島
- 2) 鈴木琢雄、石井明子、多田 稔、小林 哲、豊田淑江、川西 徹、山口照英：抗体医薬品と Fc ドメイン融合タンパク質医薬品におけ

る胎児性 Fc 受容体 (FcRn) 親和性の差異に関する検討 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 岡山

- 3) 多田 稔、伊藤さつき、川崎ナナ、石井 明子、鈴木 琢雄、小林 哲、豊田 淑江、山口照英：Notch リガンド糖タンパク質 Jagged1 の Allagille 症候群関連変異体の機能解析 第 82 回日本生化学大会 2009 年 10 月 神戸
- 4) 鈴木琢雄、石井明子、多田 稔、小林 哲、豊田淑江、川西 徹、山口照英：抗体医薬品および Fc ドメイン融合タンパク質医薬品の Fc 受容体(FcRn および Fc γ RI)との結合特性比較 第 82 回日本生化学大会 2009 年 10 月 神戸
- 5) 北川博子、豊田淑江、石井明子、鈴木琢雄、多田 稔、小林 哲、山口照英：血管内皮細胞である Early EPC の機能解析 第 82 回日本生化学大会 2009 年 10 月 神戸
- 6) 小林哲、鈴木琢雄、石井明子、川崎ナナ、山口照英：MALDI-TOF MS におけるマトリックスの塩基性アミノ酸残基に対する影響 質量分析討論会 2009 年 5 月 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

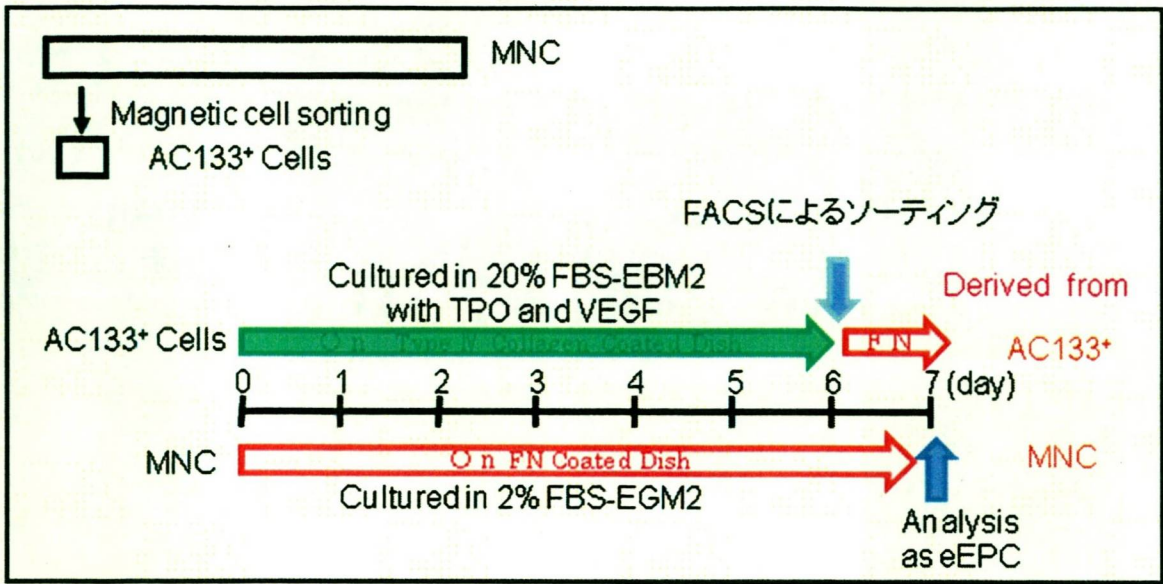
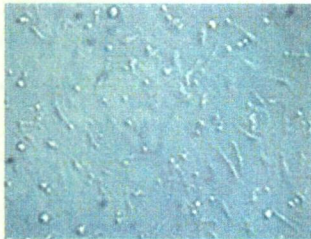


図 1. AC133 由来および単核球由来 early EPC の調製方法

AC133 陽性細胞由来 early EPC



単核球細胞由来 early EPC



図 2. AC133 陽性細胞及び単核球由来 early EPC の光顕画像

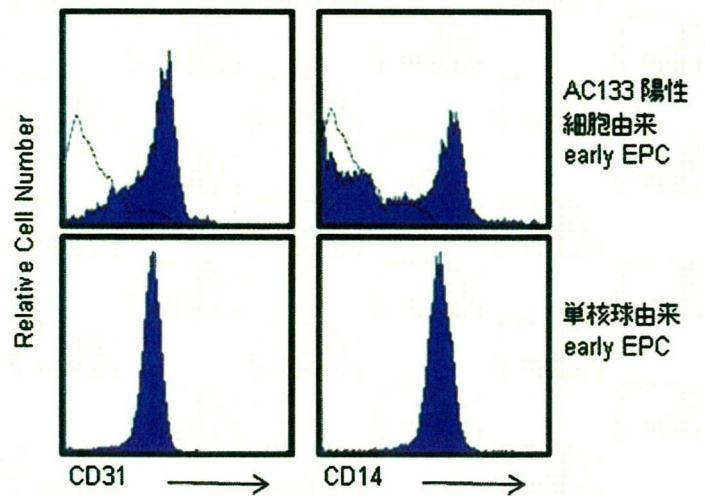


図 3. AC133 陽性細胞及び単核球由来 early EPC における細胞表面マーカーの発現解析

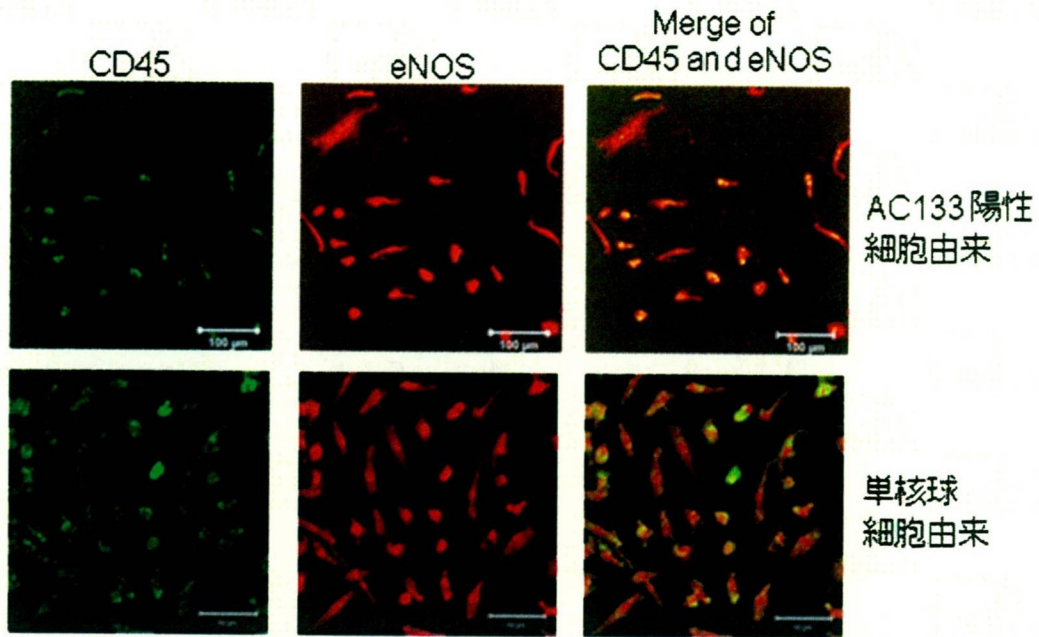


図 4. AC133 陽性細胞及び単核球由来 early EPC における白血球共通抗原 (CD45) と血管内皮細胞マーカー (eNOS) の発現

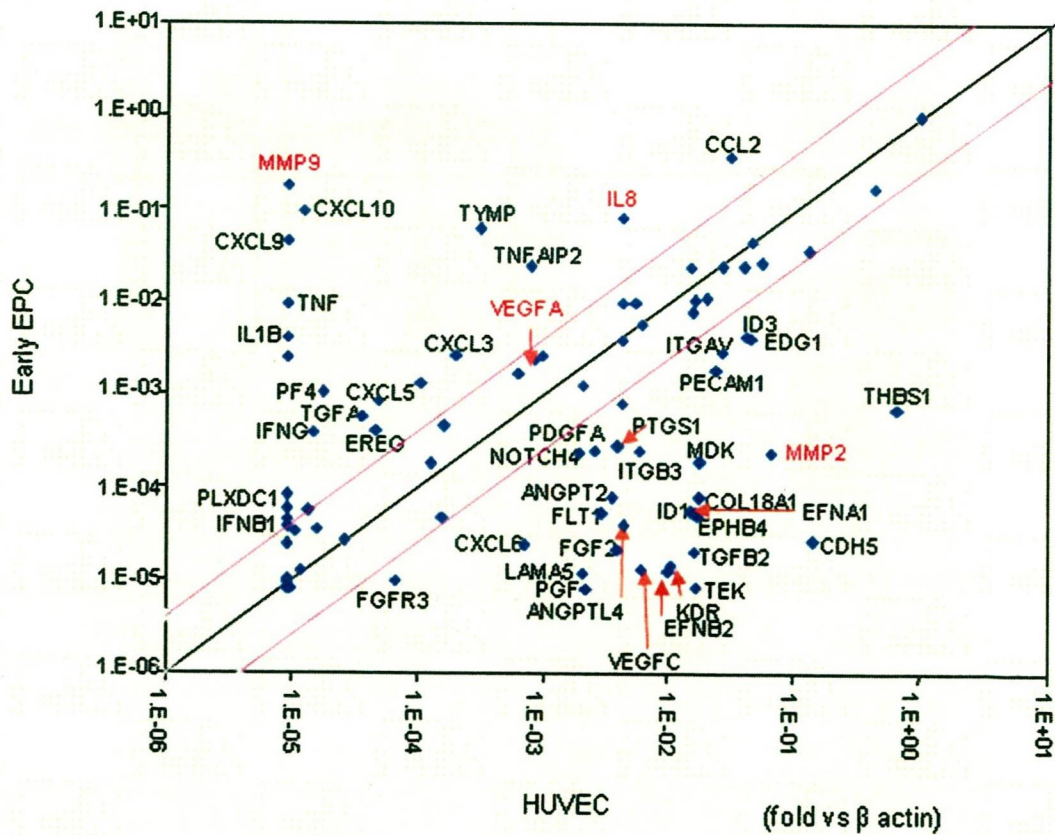


図 5. Early EPC と HUVEC における血管新生関連因子の発現比較

ウエスタンブロッティング

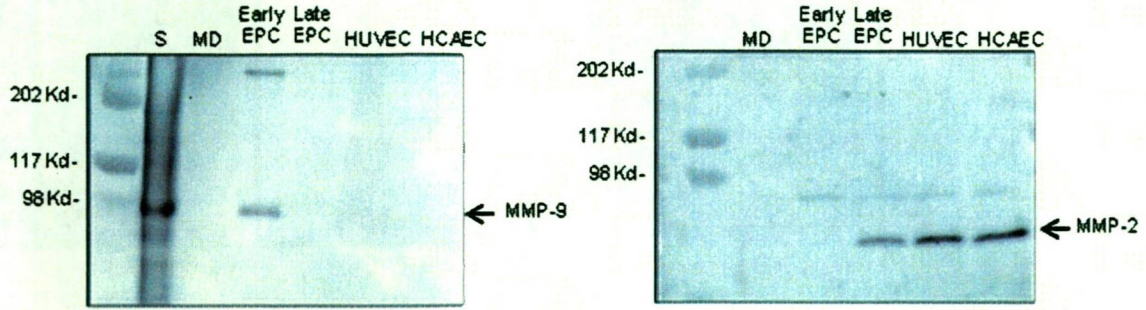


図 6. 種々の細胞の培養上清における MMP-9/MMP-2 タンパク質および活性の検出

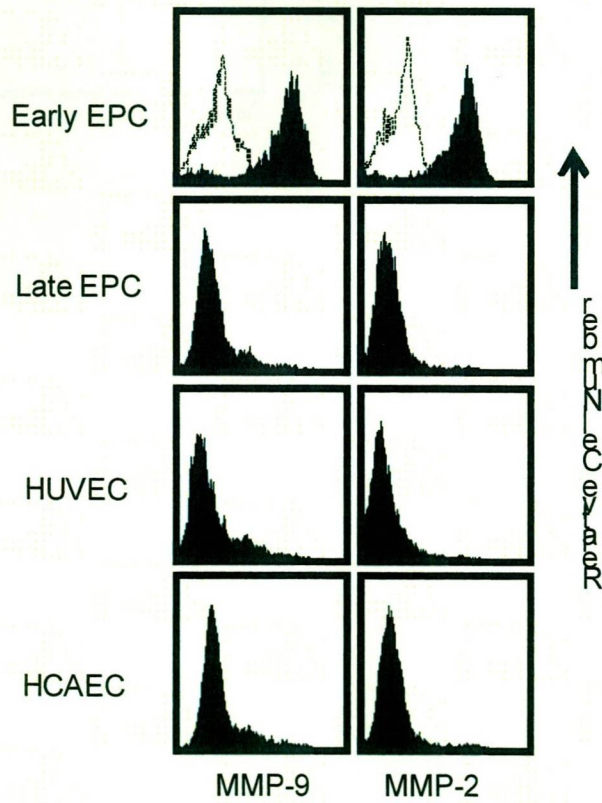


図 7. フローサイトメトリーによる細胞表面 MMP-9/MMP-2 の検出

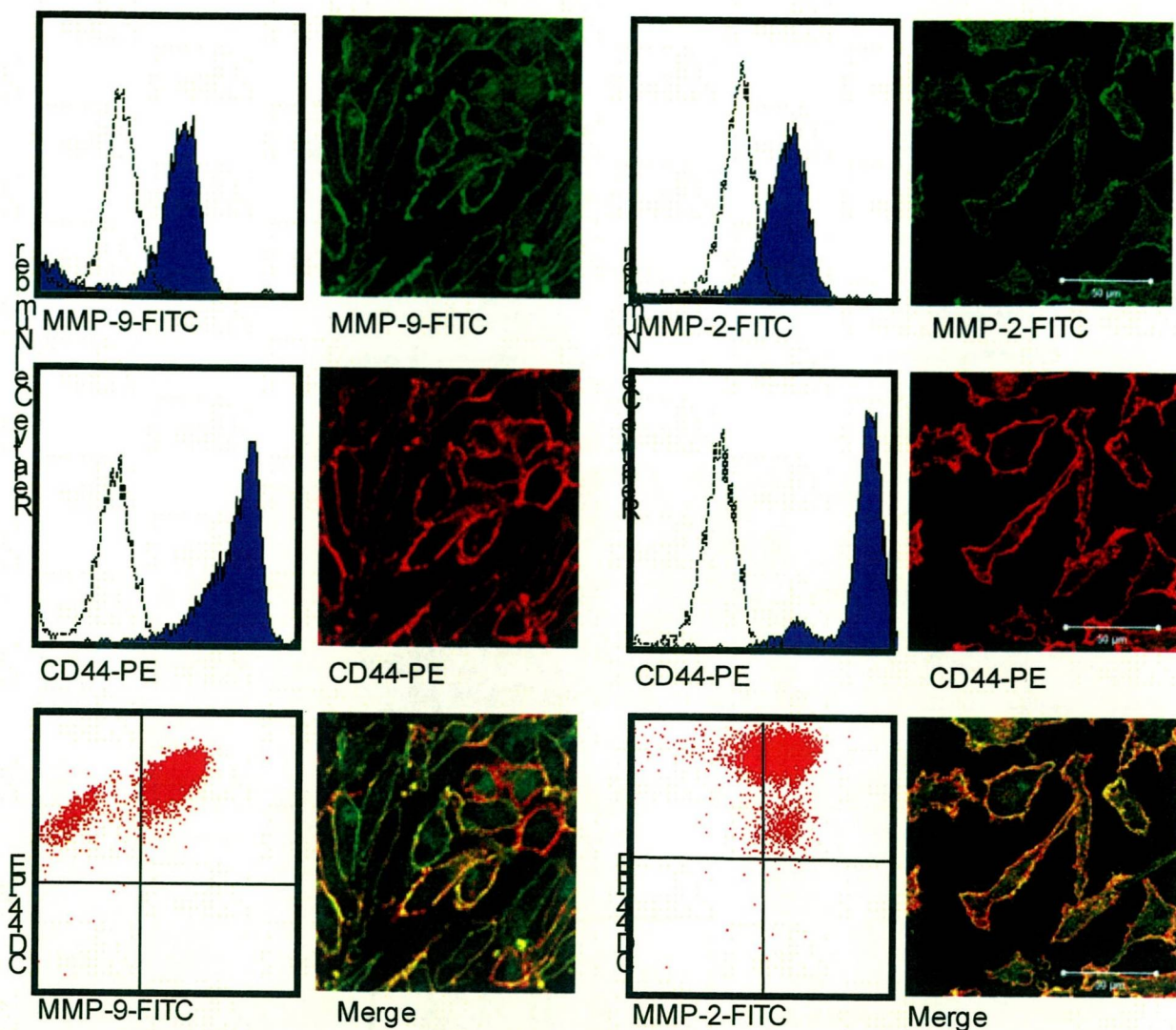


図 8.共焦点レーザー顕微鏡を用いた MMP-9、MMP-2、及び CD44 の蛍光免疫染色

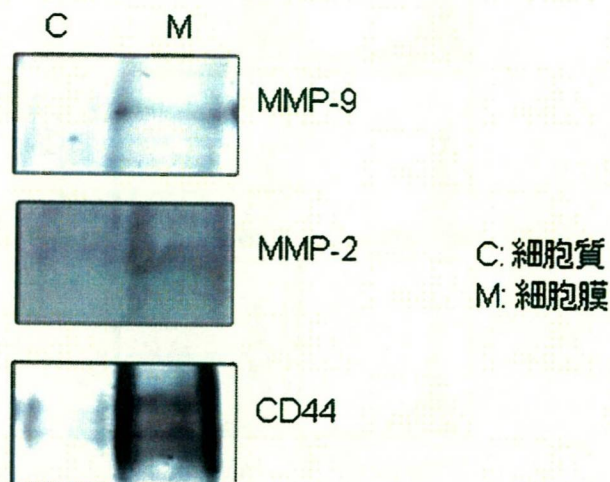


図 9.ウエスタンブロットによる MMP-9、MMP-2、及び CD44 の検出

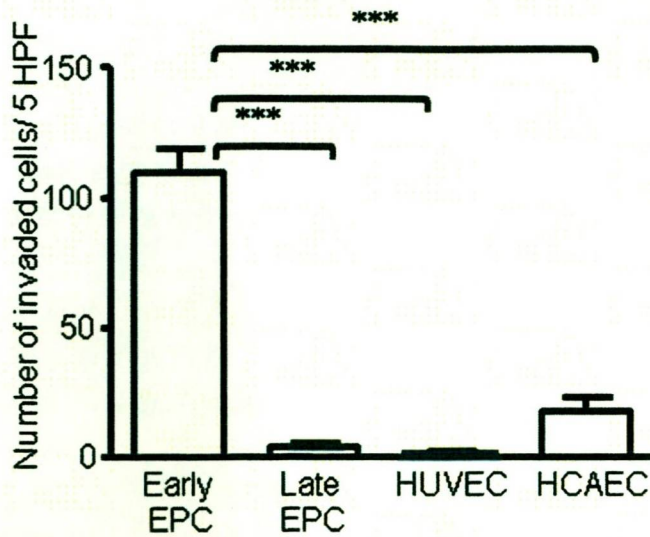


図 10. VEGF 刺激に応答した浸潤活性

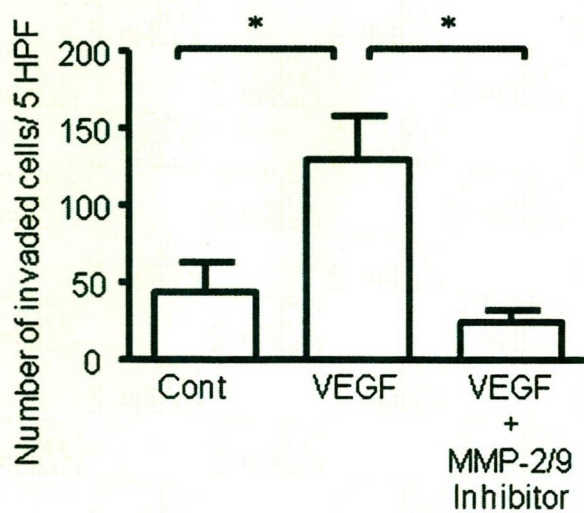


図 11. VEGF 刺激による early EPC の浸潤に対する MMP-2/9 阻害剤の効果



図 12. AC133 由来 Early EPC における MMP-9 の発現

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化に向けた細胞組織加工医薬品の安全性・品質等の
確保に関する基盤技術開発研究分担研究報告書
細胞特性・品質解析技術としての O 結合型糖鎖解析技術の開発

研究分担者 早川堯夫 近畿大学薬学総合研究所

協力研究者 掛樋一晃 近畿大学薬学部、近畿大学薬学総合研究所

協力研究者 木下充弘 近畿大学薬学部

研究要旨：治療効果を有する特定の細胞をヒト体内に移植する先端医療である「再生医療」分野では、その実用化に向けて製品の品質、安全性等を確保する上で、原材料としての細胞、中間製品としての細胞、最終製品としての特定の細胞、混在する可能性のある細胞などの様々な特性を把握し、細胞を確認・同定、識別し、細胞の品質を管理するための方法論の確立が急務となっている。細胞のタンパク質や糖鎖を迅速、簡便、かつ特異的・定量的に解析、識別できれば、細胞の特性・品質を管理し、再生医療を発展させる重要な基盤技術として期待できる。そこで本研究では平成 20 年度本事業で開発した再生医療実用化のための細胞特性解析技術である細胞のムチン型糖タンパク質糖鎖解析技術の応用拡大を目指し、O-結合型糖鎖であるムチン型糖鎖とグリコサミノグリカン (GAG) 型糖鎖を一斉解析し、包括的に O-結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリングを行う技術を開発した。

A. 研究目的

バイオテクノロジー技術を利用する医学・薬学研究の最前線では、ヒトゲノム情報の解読完了後、ゲノム情報から得られるタンパク質の構造と機能の解析が重視されている。生体内タンパク質の多くは翻訳後に糖鎖修飾を受ける場合が多い。タンパク質に結合した糖鎖は、生体内で様々な生理機能を担い、癌や感染症あるいは免疫等の様々な病気や生理現象に関連することが明らかにされ、我が国でも糖鎖研究はポストゲノム研究における最も重要な課題として位置付けられている。

治療効果を有する細胞をそのまま、あるいは原料となる細胞から増殖、薬剤処理、遺伝子改変、分化などの加工を行って治療目的に叶う細胞を得て体

内に移植したり、ヒト体内に増殖・分化能を有する細胞を移植するなどの「再生医療」分野で、実用化に向けた、製品の品質、安全性等を確保する上で、原材料としての細胞、中間製品としての細胞、最終製品としての特定の細胞、あるいは混在する可能性がある細胞の様々な特性を把握し、これらの細胞を確認・同定、識別したり、細胞の品質を管理する方法論の確立が急務となっている。ここでも細胞の糖鎖を迅速、簡便、かつ特異的・定量的に解析、識別する技術が開発できれば、各細胞の特性把握、品質管理、ひいては製品の品質、安全性確保のための重要な基盤技術になると期待される。

本研究では平成 20 年度事業に引き続き、細胞のムチン型糖タンパク質糖

鎖を定量的に解析するための技術を開発し、それらの技術をヒト培養細胞の GAG 型糖鎖のプロファイリングへ適用した結果について報告する。

B. 研究方法

B.1 O-結合型糖鎖を含む糖ペプチド分画の調製

80%コンフルエント状態のヒト大腸癌細胞 (HCT116) 1.0×10^7 cells 相当に対して、1M EDTA を含む PBS を 50 μ L 加え氷上で 15 分間放置した後、2 M thiourea/5 M urea 溶液を 267 μ L、1 M DTT を 16.7 μ L、Benzonase を 25 units/5 μ L 加え室温で 30 分間放置した。10 分間遠心分離(15000 g、4 $^{\circ}$ C)により得られた上清約 300 μ L に対し、5%のトリエチルアミンおよび酢酸、水を含むアセトン溶液を 1.5 mL 加え、-20 $^{\circ}$ C で 1 時間放置した。10 分間遠心分離(15000 g、4 $^{\circ}$ C)後、沈殿物を回収し、75%エタノールにて 2 回沈殿物を洗浄し、糖タンパク質分画とした。得られた糖タンパク質分画は、1 mL の 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)にて懸濁した後、2 mg のプロナーゼを加えて 37 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートした。沸騰水浴上で 5 分間処理し酵素を失活させた後、10 分間遠心分離(15000 g、4 $^{\circ}$ C)して、上清を回収し、不溶性の沈殿を除いた。回収した可溶性分画に、2 M 水素化ホウ素ナトリウム水溶液を 500 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートすることで、細胞中の遊離糖鎖を除去した。氷酢酸により水素化ホウ素ナトリウムを分解し、限外濾過フィルター(分子量 5000 Da cut off)を用いて脱塩した。得られた可溶性の糖ペプチド分画を AGC に導入し、O-結合型糖鎖を遊離させた。

B.2 高速糖鎖自動切断装置による O-結合型糖鎖の遊離

装置は当研究室で開発した O-結合型糖鎖自動切り離し装置 (AutoGlycoCutter-2 (AGC-2): 島津製作所) を使用した。糖鎖切り離しのためのアルカリ溶液として 0.5 M 水酸化リチウム水溶液を用い、糖鎖遊離反応温度は 60 $^{\circ}$ C とし、反応時間は 3 分で行った。細胞から得られた糖ペプチド分画の水溶液 (50 μ l) を AGC-2 に導入し、得られた O-結合型糖鎖を回収し凍結乾燥した。

B.3 O-結合型糖鎖の 2-アミノ安息香酸 (2-AA) による蛍光標識

上記操作により遊離された O-結合型糖鎖の凍結乾燥物に 2-AA および NaBH₃CN をそれぞれ 3% の濃度で含む 2% ホウ酸/4% 酢酸ナトリウム/メタノール溶液 (100 μ l) を加えて 80 $^{\circ}$ C で 1 時間加温した。反応後 SephadexLH-20 のゲルろ過クロマトグラフィーにより最初に溶出される蛍光性画分を回収し細胞由来の糖鎖とした。

B.4 セロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる O-結合型糖鎖の分画

ポンプには JASCO PU-980 型、検出器には JASCO FP-920 型蛍光検出器を使用し、流速 0.5 mL/min で分析した。カラムは LA-Serotonin (Japan Oil Mills, 4.6 x 150 mm)を用い、カラム温度は 25 $^{\circ}$ C とした。検出は励起波長(Ex) 350 nm、蛍光波長(Em) 425 nm により行った。移動相の溶液 A には水、溶液 B には 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液を用いた。グラジエント条件は、試料注入後 2 分間溶出液 B 5 % とし、溶出液 B が 20 分後に 40 % となるように直線グラ

ジエント溶出を行い、O-結合型糖鎖のうちムチン型糖鎖を溶出した。さらに、溶離液を 1M NaCl とし、GAG 型糖鎖を溶出させた。

B.5 順相分配型 HPLC によるムチン型糖鎖の分析

カラムには Shodex NH2P-50 4E (4.6 mm x 250 mm、昭和電工) を用い、溶離液 A を 2% CH₃COOH/CH₃CN、溶離液 B に 5% CH₃COOH、3% Triethylamine/H₂O を用いた。溶出は 70% の溶離液 A によりカラムをあらかじめ平衡化した後、80 分で溶離液 B が 95% となるように直線グラジエント溶出を行った。また、検出は励起波長 350 nm、蛍光波長 425 nm で蛍光検出した。分離された糖鎖は Voyager DE-PRO (Applied Biosystems 製) を用い、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) を試料マトリックスとしてリニア-ネガティブイオンモードにより測定した。

B.6 キャピラリー電気泳動による GAG 不飽和 2 糖の分析

セロトニンアフィニティークロマトグラフィーにより得られた 1M NaCl 溶出分画を、透析(1000 Da cut off)により溶液中の NaCl を脱塩した。その後、酵素消化により GAGs を不飽和 2 糖に分解した。コンドロイチン硫酸 PGs は、試料を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0、100 μL) に溶解後、Chondroitinase ABC(0.5 unit、10 μL) を加え 37°C で 24 時間反応した。ヘパラン硫酸 PGs は、試料を 100 μL の 100 mM Sodium acetate/0.1 mM calcium acetate(pH 7.0) に溶解後、Heparitinase 1 および Heparitinase 2(それぞれ 5 mU/10 μL) を加え、37°C で 24 時間反応した。反応後、沸騰水浴上で 5 分間処理した後、15000 xg で 5 分間

遠心分離し、上清を 2AA により標識後、CE にて分析した。CE の条件は、Beckman MDQ Glycoprotein system を用い、キャピラリーはフューズドシリカキャピラリー(内径 50 μm、有効長 30 cm)を用いた。泳動用緩衝液は 100 mM Tris-phosphate buffer (pH 3.0)を用いた。印加電圧は 25 kV に設定し、陰極から陽極方向に電気泳動した。分析温度は 25 °C で、試料注入は加圧法で 1.0 psi で 10 秒間注入した。検出は、He-Cd レーザー励起蛍光検出を用いた(Ex 325 nm、Em 405 nm)。

C. 研究結果

O-結合型糖鎖の解析は、アルカリ還元法により O-結合型糖鎖を遊離し、HPLC や MS により解析する方法が一般的である。しかしながら同じ O 結合型糖鎖でも、GalNAc を介しコアタンパク質に結合するムチン型糖鎖と Xyl を介しコアタンパク質に結合する GAG 型糖鎖は、糖鎖の物理化学的な特性の違いから、分離分析については異なる手法を用いて行われてきた。平成 20 年度の本研究で、我々はムチン型糖タンパク質から O 結合型糖鎖を切り離し分析する方法を報告した。我々はその研究過程で、幸運にもムチン型糖タンパク質の糖鎖切り話し過程で、プロテオグリカン中のグリコサミノグリカン鎖も効率よく切り離されることを発見した。そこで、本年度は平成 20 年度に報告した高速糖鎖自動切断装置 “AutoGlycoCutter (AGC)” とセロトニンアフィニティークロマトグラフィーを組合わせたムチン型糖鎖の比較糖鎖プロファイリング技術を PG 型糖鎖解析へ応用を図った。

最初にウシフェツイン由来ムチン型糖鎖とヒアルロン酸オリゴ糖混合物をモデル試料として、ムチン型糖鎖とGAG型糖鎖のセロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる分離について検討した。結果をFig.1に示す。ウシフェツイン由来ムチン型糖鎖のうち、シアル酸を1残基持つシアリル T ($\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$) が8分、シアリル T のGalNAc6位に更にシアル酸1残基が付加したシアル酸を2残基持つジシアリル T ($\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-3[\text{NeuAc}\alpha 2-6]\text{GalNAc}$) が15分に観察された。一方、ヒアルロン酸オリゴ糖は15分~30分の間に4糖から順に重合度の小さなものから観察された。セロトニンアフィニティークロマトグラフィーは弱イオン相互作用により糖タンパク質糖鎖をシアル酸残基数の違いにより分離できる手法であるが、GAG型糖鎖のようなカルボキシル基や硫酸基を持つ糖鎖とも相互作用し、分離分析に応用できることがわかった。

次にヒト大腸癌細胞HCT116のO結合型糖鎖混合物についてセロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる分画を試みた。結果をFig.2に示す。その結果、3分~16分の間にシアル酸残基数の異なるムチン型糖鎖と考えられる6つのピークが観察された。一方、1M NaClの溶出により22分~26分にGAG型糖鎖と考えられるピークが観察された。観察された各ピークを分画し、順相HPLCとキャピラリー電気泳動により分析した。

順相HPLCでは、M1~M6の全ての分画においてムチン型糖鎖が観察された (Fig.3, Table 1)。M1分画ではムチ

ン型Core2構造を持つ4糖 ($\text{Gal}\beta 1-3[\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-6]\text{GalNAc}$) を主とし、さらにラクトサミンユニット ($\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$) が1~2ユニット付加したオリゴ糖が観察された。M2分画ではCore2骨格を持つ4糖のいずれかのGalactose残基にN-アセチルノイラミン酸が付加したモノシアロオリゴ糖を主とし、これらのオリゴ糖にさらにラクトサミンユニットが1~2ユニット付加したオリゴ糖が観察された (Fig.3, Table 1)。M3分画では約20分にシアリル T 抗原糖鎖 ($\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$) が観察され、シアリル T 抗原糖鎖にN-acetylglucosamineが付加したオリゴ糖の含量が最も高かった。10分以降に溶出されたM4~M6のうち、M4分画は、N-アセチルノイラミン酸とGalactoseから構成されるオリゴ糖であり、AGCにおいてピーリング反応により生じた分解物であった (Fig.3, Table 1)。一方、M5とM6分画のオリゴ糖はいずれもN-アセチルノイラミン酸を2残基持つジシアロオリゴ糖であり、M5はCore2骨格を持つ4糖およびさらにラクトサミンユニット2ユニットが付加した6糖の非還元末端にN-アセチルノイラミン酸を2残基持つオリゴ糖であった (Fig.3, Table 1)。一方、M6はジシアリル T 抗原糖鎖 ($\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-3[\text{NeuAc}\alpha 2-6]\text{GalNAc}$) が主要なオリゴ糖であった。一方、1MNaClによって溶出される20分以降の分画にはムチン型糖鎖は全く観察されなかった。

1MNaClによって溶出される20分以降の分画は、脱塩濃縮後、3種類のGAG型糖鎖加水分解酵素を組合わせて不飽

和二糖とし蛍光標識化して、キャピラリー電気泳動法による 2 糖組成分析を実施した。Fig.4a に HCT116 細胞由来の 1M NaCl 溶出分画を Chondroitinase ABC により消化し、蛍光標識後 CE により分析した結果を示す。フェログラム上で観察される各不飽和二糖の構造を Fig.5 に示す。不飽和二糖標準品の分析結果との比較、および標準品の添加実験により各ピークを同定した結果、12 分付近のピークは硫酸基を持たない Δ di-HA および Δ diCS-0S、7 分付近のピークは硫酸基を 1 残基有する Δ diCS-4S および Δ diCS-6S、そして 5 分付近のピークは硫酸基を 2 残基有する Δ diCS-SE であった。また、Heparitinase 1 および Heparitinase 2 の同時消化で得られた HS 由来の不飽和二糖を CE により分析した結果(Fig.4b)、15 分に硫酸基を持たない Δ diHS-0S が、7 分に硫酸基を 1 残基有する Δ diHS-NS、 Δ diHS-6S、 Δ diHS-2S が、4.5 分に硫酸基を 2 残基有する Δ diHS-S1、 Δ diHS-S2、 Δ diHS-S3 が、そして 3.7 分に Δ diHS-TriS が観察された。以上の結果、HCT116 では硫酸基を持たない Δ diCS-0S や Δ diHS-0S により構成される GAG 鎖を多く含むと考えられた。培養癌細胞をはじめとする生体試料から抽出したサンプルを解析する際、試料由来と考えられる不純物のピークなどが観察され、ピークの同定や定量が困難となることが多い。しかし、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーにより分画された GAG 糖鎖分画では培養癌細胞由来の GAGs 不飽和二糖を高精度に解析できた。なお、ムチン型糖鎖分画(M1~M6)を酵素消化し 2 糖組成分析した結果、GAGs 由来不飽和二糖のピークは観察

されなかったことから、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーを用いることで、培養癌細胞由来の O-結合型糖鎖群からムチン型糖鎖と GAGs を簡便に分画できることがわかった。また得られた各分画について NP-HPLC、MALDI-TOF MS、CE および各種酵素消化を組み合わせて解析することで培養癌細胞中のムチン型糖鎖と GAG の両方を含む O-結合型糖鎖混合物を一挙に定量的かつ網羅的に解析できた。

D. 考察

本研究では細胞の糖タンパク質糖鎖解析を再生医療実用化のための細胞特性解析技術として応用するため、ムチン型糖鎖の比較糖鎖プロファイリングのための技術を開発した。その結果、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーを用いて、細胞由来の GAGs およびムチン型糖鎖の分離法を検討し、培養癌細胞中の O-結合型糖鎖の一斉解析法を確立することができた。本研究により、これまで高感度分析が困難であり、糖鎖解析に 1 週間以上を要していた O-結合型糖鎖の解析を 3 日以内に完了する技術を開発できた。また、生体試料中に存在する微量の O-結合型糖鎖を網羅的かつ定量的に解析できるようになった。本技術は、O-結合型糖鎖のプロファイルという観点から、各細胞の特性解析、同定・確認、細胞間の差異、品質管理、細胞の機能と細胞を構成する糖タンパク質の関係、さらには各種疾患における原因糖鎖や疾患マーカーの探索など、きわめて広範囲に応用できる可能性を有する。再生医療の実用化においては、製品の品質、安全性を確保する上で、原材料として

の細胞、中間製品としての細胞、最終製品としての特定の細胞、あるいは混在する可能性のある細胞の様々な特性を把握し、これらの細胞を、同定・確認、識別し、細胞の品質を管理するための迅速、簡便、かつ特異的・定量的な方法として、再生医療実用化研究を推進し、支える基盤技術として期待できる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Kakoi N, Kinoshita M, Kawasaki N, Yamaguchi T, Hayakawa T, Kakehi K.

Capillary electrophoresis analysis of contaminants in heparin sodium for the Japanese pharmacopoeia purity test.

Yakugaku Zasshi. 2009, 129(10), 1255-1264.

2) Yamada K, Watanabe S, Kita S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K.

Determination of Tn antigen released from cultured cancer cells by capillary electrophoresis.

Anal Biochem. 2010, 396(1), 161-163.

3) Kinoshita M, Ohta H, Higaki K, Kojima Y, Urashima T, Nakajima K, Suzuki M, Kovacs KM, Lydersen C, Hayakawa T, Kakehi K.

Structural characterization of multibranched oligosaccharides from seal milk by a combination of off-line high-performance liquid chromatography-matrix-assisted laser desorption / ionization-time-of-flight mass spectrometry and sequential exoglycosidase digestion.

Anal Biochem. 2009, 388(2), 242-253.

4) Yamada K, Kinoshita M, Hayakawa T, Nakaya S, Kakehi K.

Comparative studies on the structural features of O-glycans between leukemia and epithelial cell lines.

2. 学会発表

ヒト組織球性リンパ腫細胞に発現する Polylactosamine-Carrier Protein の グライコプロテオーム解析

田中佑樹、三ツ井洋輔、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

第 129 回日本薬学会年会

ヘパリンナトリウム純度試験へのキャピラリー電気泳動法の適用について

梶直孝、木下充弘、川崎ナナ、早川堯夫、掛樋一晃

第 129 回日本薬学会年会

アジアゾウミルク中の高分子中性オリゴ糖の構造解析

仲西暁良、木下充弘、浦島匡、早川堯夫、掛樋一晃

第 129 回日本薬学会年会

ヒト血清糖タンパク質糖鎖の疾患マーカーとしての可能性

山本晃裕、山田佳太、木下充弘、森嶋祥之、早川堯夫、掛樋一晃

第 129 回日本薬学会年会

加齢マーカーとしての糖鎖の可能性

能登啓介、奥田茜、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

第 129 回日本薬学会年会

Tn 抗原の化学的分析法

山田佳太、渡辺沙木絵、木下充弘、中家修一、早川堯夫、掛樋一晃

第 129 回日本薬学会年会