

ヒト ES 細胞を用いた臨床応用は大きく期待されている。期待されるが故に、社会に適切に評価、認識されることがこの細胞治療を効果的に推進するために必須であると考えられる。

#### 参考文献

1. ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する研究 (その1) - (その5). 再生医療 9(1):116-180, 2010.

#### D. 研究発表

##### 1. 著書

- 1) Mhendra Rao, (訳) 三浦巧、阿久津英憲: 「アメリカにおける細胞治療システムの課題」医学のあゆみ, 229(9):679-680, 2009.
- 2) 阿久津英憲、梅澤明弘: 第5章 細胞周辺環境のための培養技術 6.フィーダーレイヤー, 遺伝子医学 MOOK 別冊 ますます重要になる細胞周辺環境 (細胞ニッチ) の最新科学技術, 田畑泰彦 (編集) メディカルドゥ, 354-357, 2009.
- 3) 阿久津英憲、梅澤明弘: 第3章 病態解明 1. ES 細胞の病態解明への応用, 幹細胞の分化誘導と応用-ES 細胞・iPS 細胞・体性幹細胞研究最前線-, エヌ・ティー・エス, 413-423, 2009.

##### 2. 論文発表

- 1) Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, Akutsu H, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A. Mesenchymal to embryonic incomplete transition of

human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS. *Exp Cell Res.* 2009; 315(16):2727-2740.

- 2) Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Hum Mol Genet.* 2009; 19(3):480-493.
- 3) Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T. Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. *Genes Cells.* 2009; 14(12):1395-404.
- 4) Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, Akutsu H, Liu DR, Rubin LL, Eggan K. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell.* 2009; 5(5):491-503.
- 5) Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi J, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation.* 2009; 78(2-3):137-42.
- 6) 阿久津英憲、梅澤明弘: 「ヒト由来フィーダー細胞の確立」再生医療 日本再生医療学会雑誌, 8(2):57-62, 2009.

##### 3. 学会発表

- 1) 阿久津英憲: 「ヒト iPS 細胞遺伝子発現動態の多様性」第8回日本再生医療学会総会シンポジウム 3月 5-6日, 2009年
- 2) 阿久津英憲: 「難治性疾患克服に向けたヒト iPS 細胞の可能性」日本人類遺伝

学会第 54 回大会 ワークショップ 4, 9 月  
23~26 日, 2009.

- 3) 阿久津英憲:「Human Embryonic stem cells  
and iPS Cells: Potential tool for Low  
temperature medical experiments」第 36 回  
日本低温医学会総会・学術集会シンポジ  
ウム 2, 11 月 27~29 日, 2009.

E. 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

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化加速に資する評価基準ミニマム・コンセンサス・  
パッケージ策定に関する研究  
糖鎖を用いるミニマム・コンセンサス・パッケージ策定にかかる検討

研究分担者 掛樋一晃 近畿大学薬学部・薬学総合研究所

## 研究要旨

再生医療において多種多様で固有の特性を有するヒト幹細胞や多能性幹細胞を取り扱う場合、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を確立する必要がある。すなわち、様々な特性を持つ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、識別する方法を開発することと、産・学・官が共通参照でき、活用できる評価基準を策定することは、再生医療実用化を加速するうえで不可欠である。本研究では、細胞の糖タンパク質糖鎖解析技術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を目指し検討した。具体的には、培養細胞の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鎖を一斉に比較解析する糖鎖プロファイリング技術を開発し、これをヒト培養細胞に適用し、細胞特性解析技術としての有用性について検証した。また、迅速な細胞糖鎖解析技術を目指して、キャピラリー電気泳動法を用いた細胞糖鎖解析手法について検討し、アスパラギン結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリングを行い、糖鎖を指標とする細胞特性解析技術としての適用可能性の検証と細胞表面糖鎖マーカーの有用性と限界等について検討した。

### A. 研究目的

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い治療目的のための細胞を得て体内に移植したり、増殖・分化能を有する細胞をヒト体内に移植するなどの「再生医療」分野で、その技術の実用化に向けた研究が盛んに行われている。また、「再生医療」の実用化に向けては、製品の品質や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。再生医療における細胞の特性・品質の管理では、細胞表面上のタンパク質が分化あるいは未分化マーカーとして専ら利用されている。一方、細胞表面の糖タンパク質糖鎖は糖鎖遺伝子の発現パターン変動から、細胞表面における糖鎖構造が変化し、さらに癌細胞の分化度によっても変化することから分化あるいは未分化マーカーの策定の有力な標的として期待できる。しかしながら、細胞表面に発現する糖鎖は多種多様であり、糖鎖を分化あるいは未分化マーカーとして応用するためには、細胞表面糖鎖の網羅解析から発現糖鎖プロファイルを

明らかにし、未分化あるいは分化によって発現糖鎖プロファイルがどのように変動するかを明らかにしなければならない。以上のような背景から、本研究では細胞の糖タンパク質糖鎖を定量的解析法としてし、培養細胞の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鎖を一斉に比較解析する糖鎖プロファイリング技術を開発した。また、迅速な細胞糖鎖解析技術として、キャピラリー電気泳動法を用いた手法についても検討し、糖タンパク質糖鎖の比較糖鎖プロファイリングを行い、糖鎖を指標とする細胞特性解析技術としての適用可能性の検証と細胞表面糖鎖マーカーの有用性と限界等について検討した。

## B. 研究方法

### B.1. 細胞膜分画の調製

10種類のヒト培養癌細胞(MKN7、MKN45、HCT15、BxPC3、Panc1、U937、LS174T、K562、Jurkat、HL-60)を1 M EDTAを含むPBS(50  $\mu$ L)中に懸濁し、2 M Thiourea および 5 M Urea 水溶液(267  $\mu$ L)、1 M DTT(16.7  $\mu$ L)および Benzonase 溶液(125 units)を加え室温で30分間インキュベートした。インキュベート後、12000 g、15分間遠心分離後の上清を回収した。回収した上清に5%酢酸、5%水、5%トリエチルアミンを含むアセトン溶液を加え、 $-20^{\circ}\text{C}$ で30分間タンパク質を沈殿させたのち、12000 g、15分間遠心分離した。得られた沈殿に75%エタノールを加え、12000 g、15分間遠心分離後の沈殿を細胞総タンパク質として糖鎖分析に用いた。

### B.2 ムチン型糖鎖を含む糖ペプチド分画の調製

細胞総タンパク質の凍結乾燥物を50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0、0.2 ml)に懸濁し、プロナーゼ(50  $\mu$ g)を加え $37^{\circ}\text{C}$ で24時間反応した。反応後、反応液を沸騰水浴中で10分間煮沸し、遠心分離後の上清に2M  $\text{NaBH}_4$ (500  $\mu$ L)を加え、室温で30分間インキュベートした。反応液に氷酢酸を注意深く滴下し限外ろ過フィルター(MWCO 5000)を用いて脱塩し、フィルター上部をムチン型糖ペプチド分画として回収した。

### B.3 高速糖鎖自動切断装置によるムチン型糖鎖の遊離と蛍光標識

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 $45^{\circ}\text{C}$ 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  $\mu$ l)をAGC-2に導入し、得られたムチン型糖鎖を回収し凍結乾燥した。上記操作により遊離されたムチン型糖鎖の凍結乾燥物に2AA および  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  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  $\mu$ l)を加えて $80^{\circ}\text{C}$ 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 N-結合型糖鎖の遊離と蛍光標識

総タンパク質分画をSDS、2-メルカプトエタノール、NP-40を1%ずつ含むリン酸緩衝液(pH 7.5、50  $\mu$ l)で懸濁した後、N-glycanase F(2 unit)を加え、 $37^{\circ}\text{C}$ で12時間酵素反応を行った。反応後、冷

エタノール (50  $\mu$ l) を加え 12000 g で 15 分間遠心分離し上清を濃縮乾固した。回収した試料に 2 アミノ安息香酸および NaBH<sub>3</sub>CN をそれぞれ 3% 含む 2% ホウ酸 / 4% 酢酸ナトリウム / メタノール溶液を 100  $\mu$ l 加えて 80°C で 1 時間加温した。反応後 Sephadex LH-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膜タンパク質由来 N 結合型糖鎖とした。

#### B.5 セロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる糖タンパク質糖鎖の分画

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°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 37 分後に 75% となるように直線グラジエント溶出を行い、その後 10 分間で溶出液 B が 100% となるようにした。

#### B.6 順相分配型 HPLC による糖タンパク質糖鎖の分析

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% CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>CN、溶離液 B に 5% CH<sub>3</sub>COOH, 3% Triethylamine/H<sub>2</sub>O を用いた。溶出は 70% の溶離液 A により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。

#### B.7 キャピラリー電気泳動による N 結合型糖鎖の分析

装置には Beckman MDQ (Beckman Coulter) を用い、キャピラリーは DB-1 キャピラリー (内径 100  $\mu$ m、全長 40 cm)、緩衝液は 10% PEG70000 を含む 0.1 M トリスホウ酸緩衝液 (pH 8.3) を用いた。印加電圧は 25 kV、カラム温度は 25°C、試料注入は加圧法 (1 psi) により 5 秒間とした。また、検出はヘリウムカドミウムレーザー励起蛍光検出 (励起 325 nm、蛍光 405 nm) で行った。

#### B.8. MALDI-TOF MS

装置には AXIMA-Resonance (Shimadzu 製) を用い、リニア/ポジティブイオンモードにより測定した。試料は DHB/メタノール溶液と等量混合し試料プレート上で風乾させた。

### C. 研究成果

#### C.1 細胞グリコサミノグリカン鎖の解析

糖タンパク質糖鎖のうちタンパク質のアスパラギン残基に結合する N 結合型糖鎖の解析については、コアタンパク質より N-グリカナーゼ F により糖鎖を切断し、2-アミノピリジン (2-AP) や 2-アミノ安息香酸 (2-AA) で蛍光標識化し HPLC や MS を解析する手法が広く浸透している。一方、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。一方、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開発している。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離しに加えてプロテオグリカン (PG) 中のグリコサミノグリカン (GAG) 鎖も効率よく切り離されることを発見した。そこで、本年度は我々の研究室で開発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。

#### C.2.1 培養細胞の O-結合型糖鎖の解析

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 (NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc) 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 (NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3[NeuAc $\alpha$ 2-6]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 (Gal $\beta$ 1-3[Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6]GalNAc) を主とし、さらにラクトサミンユニット (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) 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 (NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc) 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 (NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3[NeuAc $\alpha$ 2-6]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。また、フェログラム上で観察された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  $\Delta$ di-HA および  $\Delta$ diCS-0S、7 分付近のピークは硫酸基を 1 残基有する  $\Delta$ diCS-4S および  $\Delta$ diCS-6S、そして 5 分付近のピークは硫酸基を 2 残基有する  $\Delta$ 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  $\Delta$ diHS-0S が、7 分に硫酸基を 1 残基有する  $\Delta$ diHS-NS、 $\Delta$ diHS-6S、 $\Delta$ diHS-2S が、4.5 分に硫酸基を 2 残基有する  $\Delta$ diHS-S1、 $\Delta$ diHS-S2、 $\Delta$ diHS-S3 が、そして 3.7 分に  $\Delta$ diHS-TriS が観察された。以上の結果、HCT116 では硫酸基を持たない  $\Delta$ diCS-0S や  $\Delta$ 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。

## C.2.新規細胞特性解析技術としての細胞表面糖鎖の適用可能性の検証

本項目では我々が既に開発済みの細胞の糖鎖解析技術の精度を評価するとともに、10 種類のヒト培養癌細胞をモデルとしてアスパラギン結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリングをキャピラリー電気泳動法を用いて行い、糖鎖を指標とする新規細胞特性解析技術としての適用可能性を検証し、細胞表面糖鎖マーカーの有用性と限界等も検討した。

### C.2.2 ヒト胃腺癌細胞 MKN45 の N-結合型糖鎖の解析と解析精度

細胞表面の糖鎖を指標としてヒト幹細胞や多能性幹細胞の評価基準を策定する

ためには、広く一般的に用いられる糖鎖解析技術を利用して、細胞表面の糖鎖を解析し、その精度を明らかにするとともに、実行可能性の範囲を明らかにしなければならない。本研究では、糖鎖解析技術の精度について評価するため、ヒト胃腺癌細胞 MKN45 を 3 ロットに分けてそれぞれ培養し、各ロットから N-結合型糖鎖分画を調製し、各分画をキャピラリー電気泳動法により分析した。結果を Fig.6 に示す。MKN45 には 50 種類以上のアスパラギン結合型糖鎖が発現していることが報告されている。キャピラリー電気泳動において観察されたピークのうち、細胞の種類に係わらず発現が認められるピーク a のモノシアロ糖鎖、ピーク c~e のハイマンノース型の M6、M7、M8 糖鎖と MKN45 に特徴的に発現するピーク b の過フコシル化糖鎖の相対ピーク面積比を算出した。なお、相対ピーク面積比はピーク a~e の総ピーク面積に対する各ピーク面積値とした。Table2 に示すように、各ピークの相対面積比の相対標準偏差 (RSD) は何れも 8% 以下であり、各糖鎖の発現量は細胞ロットの違いによって変動しないことがわかった。以上の結果から、同一細胞中の糖鎖発現パターンは細胞固有であり、ロットを変更しても高い再現性で観察できることがわかった。また、今回検討した糖鎖解析技術を用いれば、細胞の糖タンパク質糖鎖を精度よく定量的に評価できることが示された。

### C.2.3 セロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる N-結合型糖鎖の分画の比較解析

10 種類の細胞の N-結合型糖鎖を LA-Serotonin カラムにより、シアル酸残基数に基づいて分画した結果を Fig.7 に

示す。また、各分画の相対比と総糖鎖量をピーク面積値として Fig.8 にまとめた。最初に観察される主要なピークはハイマンノース型糖鎖およびシアル酸を持たない複合型糖鎖であり、5 分以降にシアル酸を非還元末端に持つ複合型糖鎖がシアル酸残基数に従い溶出された。得られたクロマトグラムから各細胞のハイマンノース/アシアロ糖鎖およびシアロ糖鎖の相対比を比較すると、HL-60、Panc1、HCT-15 を除く 7 種類の細胞ではハイマンノース/アシアロ糖鎖分画が 30~40% であったのに対し、HL-60、Panc1、HCT-15 では 50% 以上がハイマンノース/アシアロ糖鎖であった。また、LS174T と MKN45 ではモノシアロ糖鎖が全体の 15% 以上と高い含量を占めた。一方、100 万細胞から得られた N 結合型糖鎖総量を比較すると、U937、K562、Jurkat、HL-60 などの血球系細胞は発現する糖鎖量が他の 6 種類の上皮系細胞に比べ低いことがわかった。以上のように、細胞種ごとにシアロ糖鎖の発現量は大きく異なり、相対量だけでなく、その絶対量も細胞種ごとに大きく異なることがわかった。

### C.2.4. 細胞表面 N 結合型糖鎖の比較解析

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析により、細胞種ごとに発現する N-結合型糖鎖量と糖鎖非還元末端のシアル酸修飾が大きく異なることがわかった。しかしながら、糖鎖解析技術を細胞特性解析技術として適用するためには、発現糖鎖パターンの細胞間での比較から細胞の特性を識別できるか否かを明らかにしなければならない。そこで、10 種類の癌細胞の N 結合型糖鎖をキャピラリー電気泳動法により分析し、それらの発現糖鎖パターンを比較した。結



果を Fig.9 に示す。膵臓癌細胞である Panc1 と BxPC3 については 15~20 分に観察されるハイマンノース型糖鎖は同様のパターンを示したが、BxPC3 では 20 分前後に特徴的なアシアロ複合型糖鎖が観察された。また、Panc1 は BxPC3 に比べ、10 分前後のシアロ糖鎖が複雑なパターンを示した。大腸癌細胞である LS174T と HCT15 については 7 分から 13 分付近に観察されるシアロ糖鎖のパターンが大きく異なり、また LS174T は 20 分以降のアシアロ複合型糖鎖の含量が高いことが特徴的である。分化度の異なる 2 種類の胃腺癌細胞である MKN45 と MKN7 ではアシアロ複合型糖鎖以外のハイマンノース型糖鎖とシアロ複合型糖鎖のパターンが著しく異なっていた。特に、MKN7 では 5~10 分までのシアル酸含量の高い高分岐のトリシアロ、テトラシアロ糖鎖の含量が高かった。一方、4 種類の血球系細胞については、7 分~14 分までのシアロ糖鎖のパターンが大きく異なり、HL-60 ではシアロ糖鎖含量が最も低いのに対し、U937 と Jurkat では多様なシアロ糖鎖の存在が伺えた。このように、細胞に発現する糖タンパク質糖鎖は、細胞種によって異なるだけでなく、同じ起源の癌細胞であっても、悪性度や分化度の違いなどにより発現する糖鎖パターンは大きく異なることがわかった。

#### C.2.5 細胞表面 N 結合型糖鎖の発現量比較

細胞由来の糖鎖はシアルルイス X など、細胞の識別等に利用できる糖鎖も発現している。そこで、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーで分画した各分画を MALDI-TOFMS を用いて解析し、バイセクティング GlcNAc を持つ

糖鎖、Gal-GlcNAc の繰り返し構造を持つポリラクトサミン型糖鎖、硫酸基を有する糖鎖の発現の有無を 10 種類の細胞で比較した (Table 3)。バイセクティング GlcNAc は Jurkat を除くすべての細胞で観察され、癌細胞に恒常的に発現していることがわかった。ポリラクトサミン型糖鎖は MKN7 を除くすべての細胞で観察され、特に HL-60 では発現量が高いことが特徴的であった。一方、硫酸基を持つ糖鎖は HCT-15 と LS174T の 2 種類のみで観察された。以上のように、細胞の糖鎖として特異的なレクチンや糖鎖認識抗体などによって認識できる特徴的な糖鎖についても、細胞の種類や分化度の違いにより特徴的なパターンを示すことがわかった。

#### D. まとめ

本研究では、培養細胞の 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) 鎖を一斉に比較解析する糖鎖プロファイリング技術を開発し、これをヒト培養細胞に適用し、新規細胞特性解析技術としての有用性について検討した。また、迅速な細胞糖鎖解析技術を目指して、キャピラリー電気泳動法を用いた細胞糖鎖解析手法について検討し、アスパラギン結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリングを行い、糖鎖を指標とする細胞特性解析技術としての適用可能性および細胞表面糖鎖マーカーの有用性と限界等について検討した。

O-結合型糖鎖の解析については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 を簡便に分画し、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手法を開発できた。開発した手法は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る新規細胞特性解析技術として有用性が高いと言える。

細胞表面糖鎖の適用可能性について検討したところ、細胞の糖鎖の発現量は細胞ロットの違いなどによって変動せず、同一細胞の糖鎖発現パターンは細胞固有であることを明らかにすることができた。従って、本研究で用いた一連の技術により糖鎖を指標とした細胞特性解析を精度よく行えることがわかった。さらに、アスパラギン結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリングでは、細胞に発現する糖タンパク質糖鎖が、細胞種によって異なるだけでなく、同じ種類の癌細胞であっても、悪性度や分化度の違いなどにより発現する糖鎖パターンは大きく異なることがわかった。

本研究により、細胞に発現する糖鎖は細胞の個性解析を行う上で有益な情報を与えることがわかった。これらの結果は、糖鎖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など、きわめて広範囲に応用できる可能性を示している。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、細胞の品質を管理することが重要である。細胞のアスパラギン結合型糖鎖プロファイルを分析する技術は、この目的を達成しうる可能性を持ち、再生医療実用化研究を推進するために細胞の糖鎖

がマーカーとして有用であることは明らかである。今後、糖鎖を再生医療の実用化のために応用していくためには、様々な段階の細胞の発現糖鎖情報を蓄積しながら、糖鎖解析技術を共通のプラットフォームとし利用していくための方法論と評価基準の策定を進めていく必要がある。

## 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 Polylectosamine-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

癌細胞上に発現する

山田佳太、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

培養癌細胞中の O 結合型糖鎖の網羅解析

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 29 回日本糖質学会年会

エボラウイルス表面糖タンパク質中の N-及び O-結合型糖鎖解析

山田佳太、宇佐美克明、早川堯夫、掛樋一晃、入村達郎

第 29 回日本糖質学会年会

加齢に伴うラット血清糖タンパク質糖鎖の変化-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 29 回日本糖質学会年会

ヒト組織球性リンパ腫細胞に発現する Polylectosamine-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 59 回日本薬学会近畿支部大会

加齢により変動する血清糖タンパク質糖鎖の解析と加齢マーカーとしての可能性の検証

木下充弘、能登啓介、奥田茜、渡部沙木絵、早川堯夫、掛樋一晃

第 59 回日本薬学会近畿支部大会

キャピラリー電気泳動を用いた

ヒト組織球性リンパ腫細胞に発現する Polylectosamine-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

フコシル化を回復させた HCT116 細胞上に観察される糖タンパク質糖鎖

第 82 回日本生化学会大会  
梶直孝、山田佳太、田中佑樹、岩本竜昇、  
木下充弘、三善英知、森脇健太、早川堯  
夫、掛樋一晃  
第 82 回日本生化学会大会

加齢に伴うラット血清糖タンパク質糖鎖  
の変化  
能登啓介、奥田茜、渡部沙木絵、木下充  
弘、早川堯夫、掛樋一晃  
第 82 回日本生化学会大会

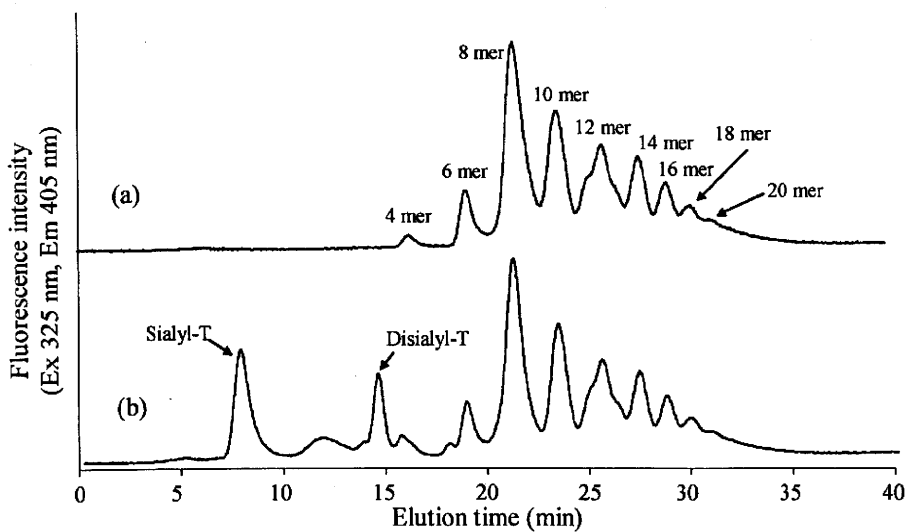


Fig.1 Serotonin affinity chromatography of HA oligosaccharides and mucin-type O-glycans. (a) 2AA-labeled HA oligosaccharides (4-20 mer) and (b) a mixture of mucin-type O-glycans from bovine fetuin and HA oligosaccharides. Analytical conditions; column, LA-serotonin (4.6 x 150 mm). flow rate, 0.5 mL/min. eluent; solvent A, water. solvent B, 50 mM Ammonium acetate in water. gradient conditions, a linear gradient (5-75 % solvent B) from 2 to 45 min and 75% solvent B from 37 to 45 min.

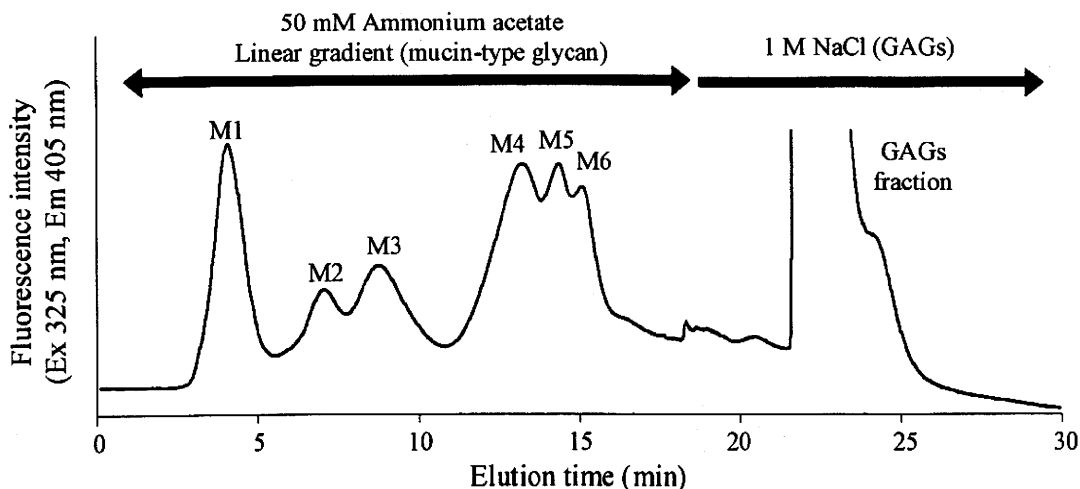


Fig.2 Serotonin affinity chromatography of O-linked glycans derived from HCT116 cell. Analytical conditions; column, LA-serotonin (4.6 x 150 mm). flow rate, 0.5 mL/min. eluent; solvent A, water. solvent B, 50 mM Ammonium acetate in water. gradient conditions, a linear gradient (5-40 % solvent B) from 2 to 20 min and 1 M NaCl from 20 to 45 min.

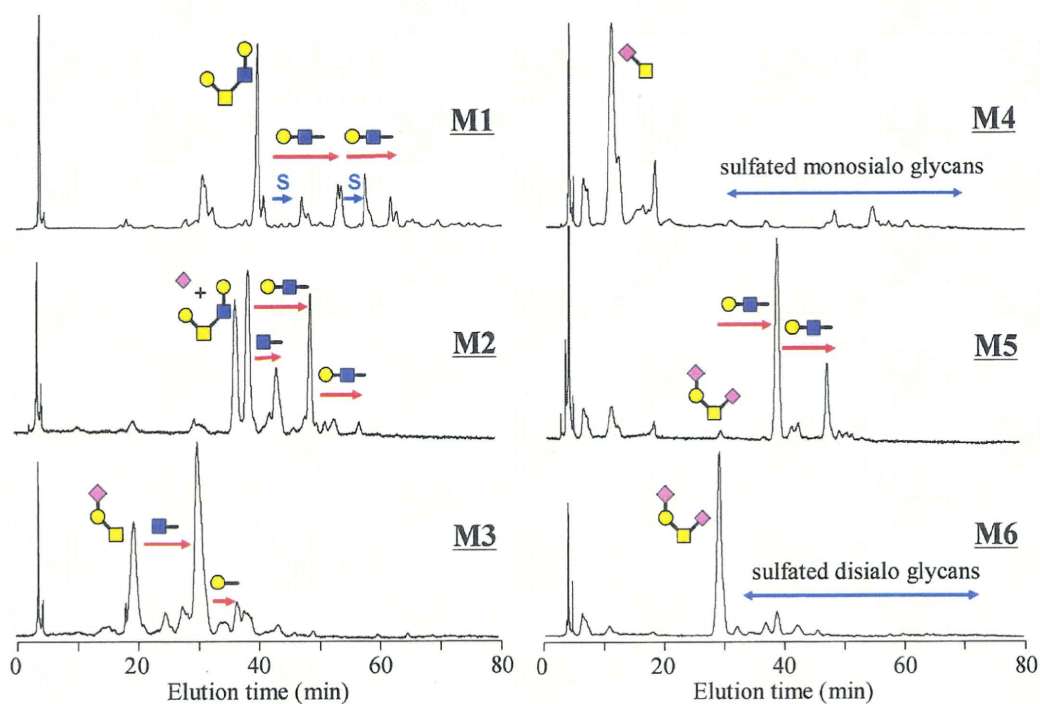


Fig.3 NP-HPLC analysis of mucin-type O-glycans from HCT116 cell. Analytical conditions: column, TSK-GEL Amide-80 (4.6 x 250 mm). flow rate, 0.8 mL/min. eluent, solvent A, 0.1% CH<sub>3</sub>COOH in MeCN. solvent B, 0.2% CH<sub>3</sub>COOH/0.2% triethylamine in water. gradient conditions: a linear gradient (15-50 % solvent B) from 5 to 85 min.

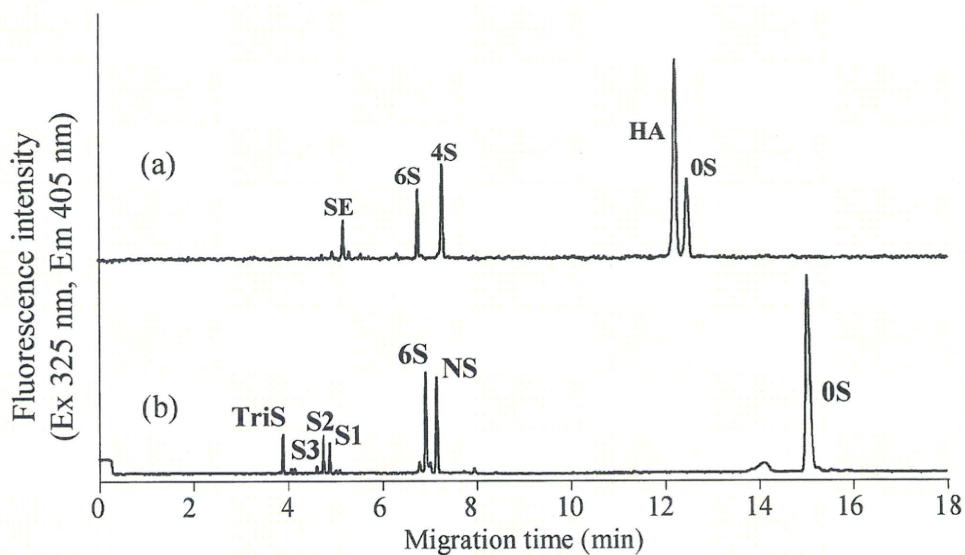
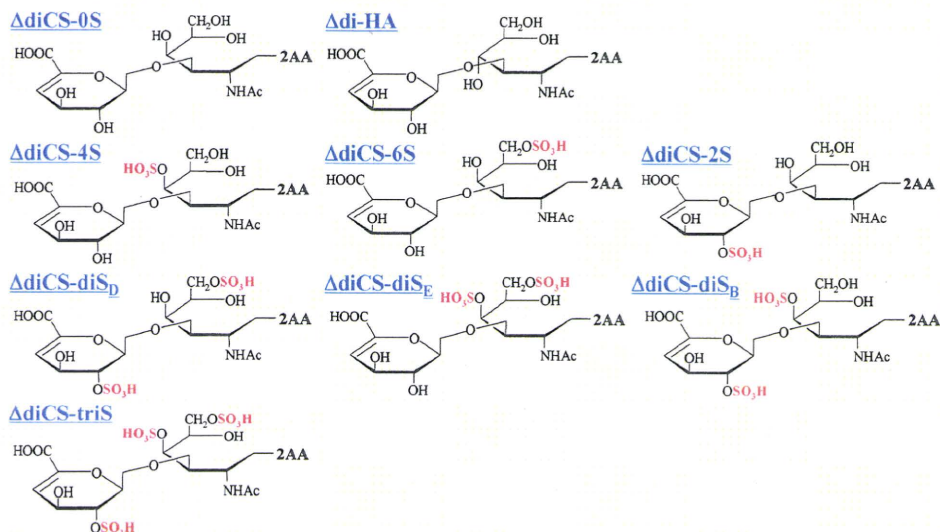


Fig.4 CE analysis of unsaturated disaccharides from HCT116 cell. Analytical conditions; Capillary, fused silica (40 cm x 50 μm.i.d). Buffer, 100 mM Tris-phosphate buffer (pH 3.0). Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure

method (1.0 psi, 10 sec). Temperature, 25 °C. Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).

### CS and HA unsaturated disaccharides



### HS unsaturated disaccharides

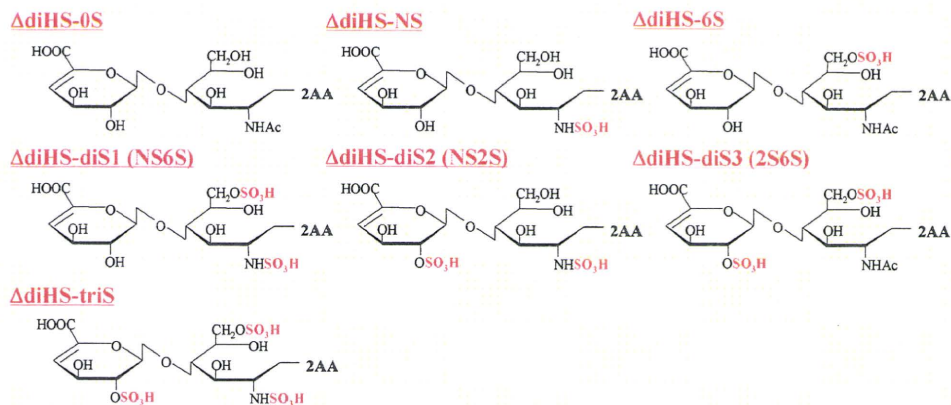


Fig.5 Structures of unsaturated disaccharides from CS and HS.

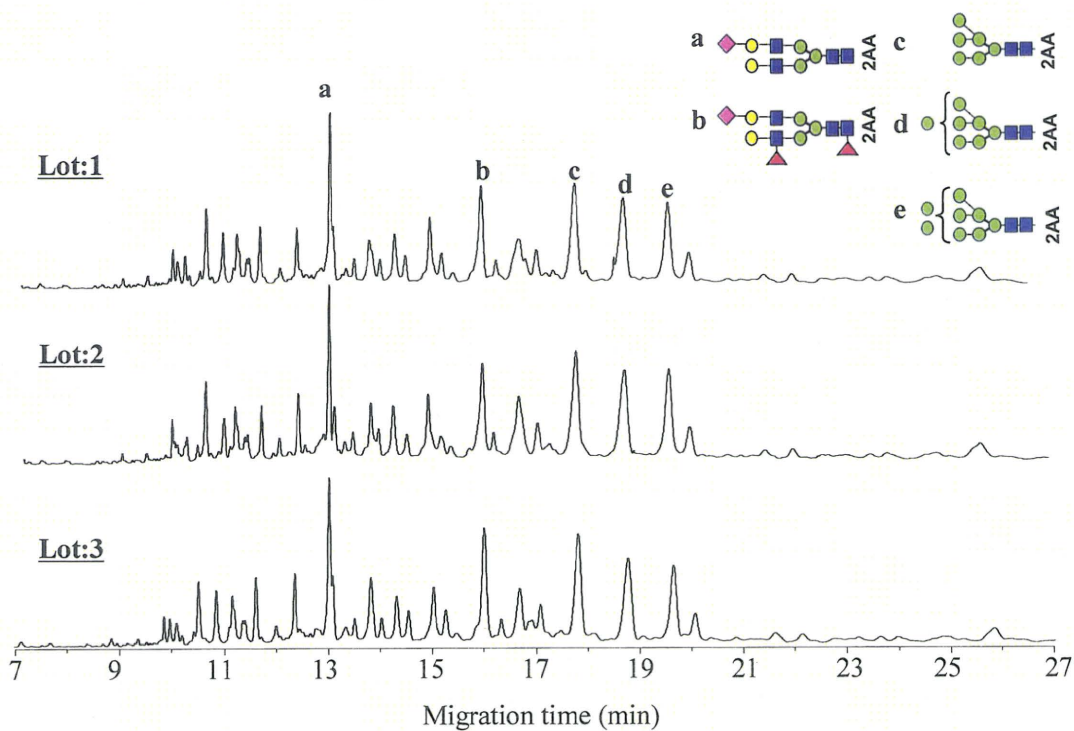


Fig.6 CE analysis of N-linked glycans derived from MKN45 cells. Analytical conditions; capillary, DB-1 capillary (40 cm x 100  $\mu\text{m}$ .i.d). Buffer, 100 mM Tris-borate buffer (pH 8.3) containing 10 %PEG70000. Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure method (1.0 psi, 5 sec). Temperature, 25  $^{\circ}\text{C}$ . Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).



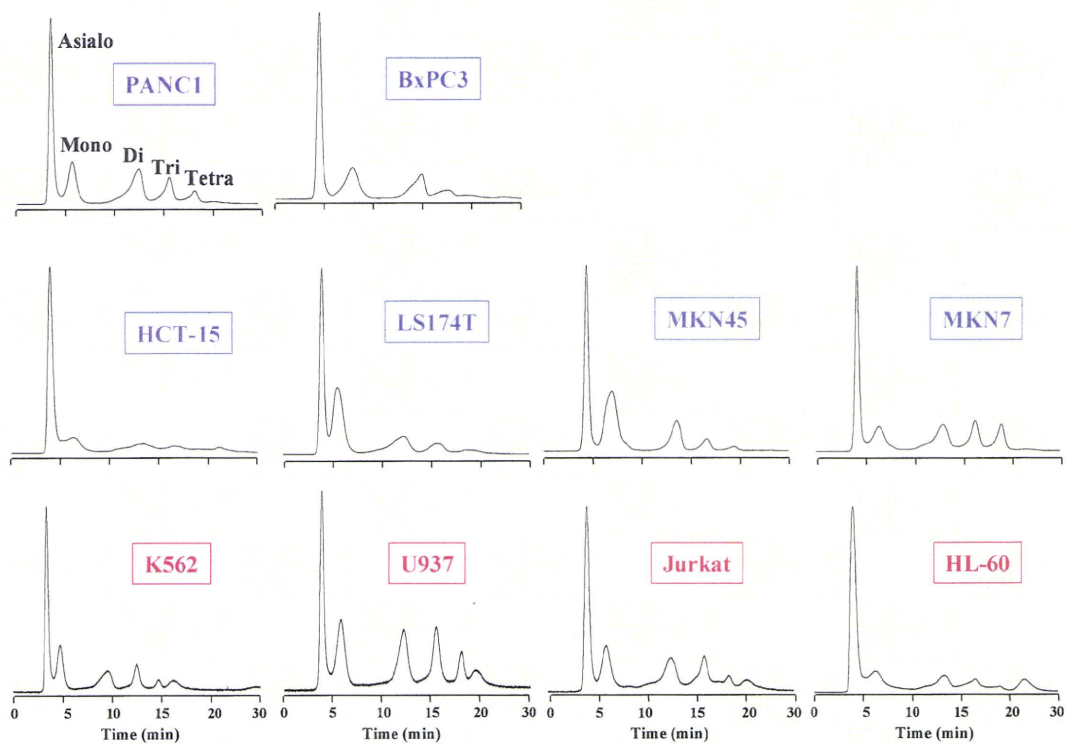


Fig.7 Serotonin affinity chromatography of N-linked glycans derived from various cancer cell lines. Analytical conditions; column, LA-serotonin (4.6 x 150 mm). flow rate, 0.5 mL/min. eluent; solvent A, water. solvent B, 50 mM Ammonium acetate in water. gradient conditions, a linear gradient (5-75 % solvent B) from 2 to 45 min and 75% solvent B from 37 to 45 min.

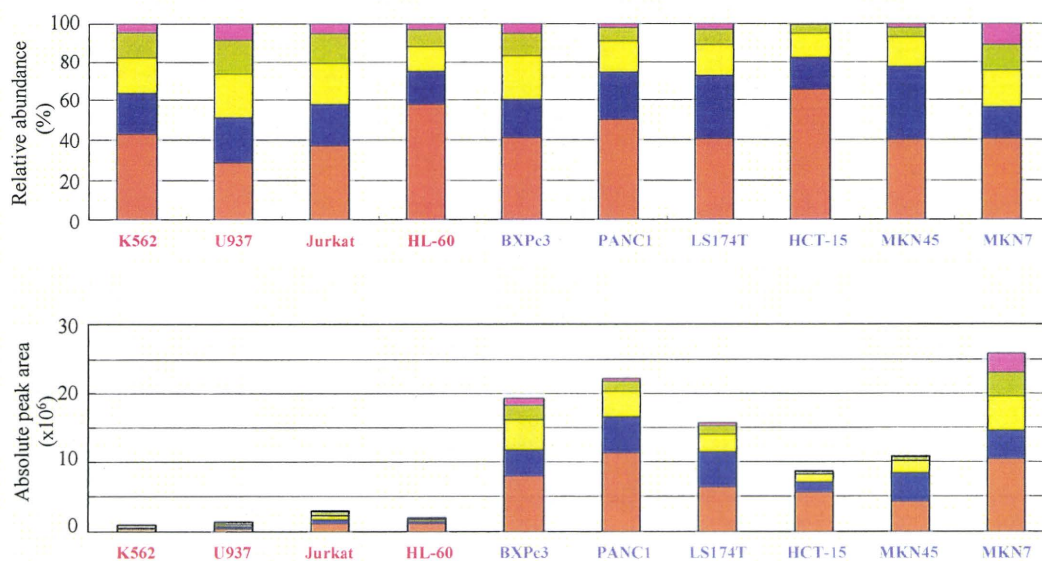


Fig.8 Comparison of the amounts of N-linked glycans expressed on cancer cells  
 Orange, asialo-; blue, monosialo-; yellow, disialo-; green, trisialo-; pink, tetrasialo-glycans.

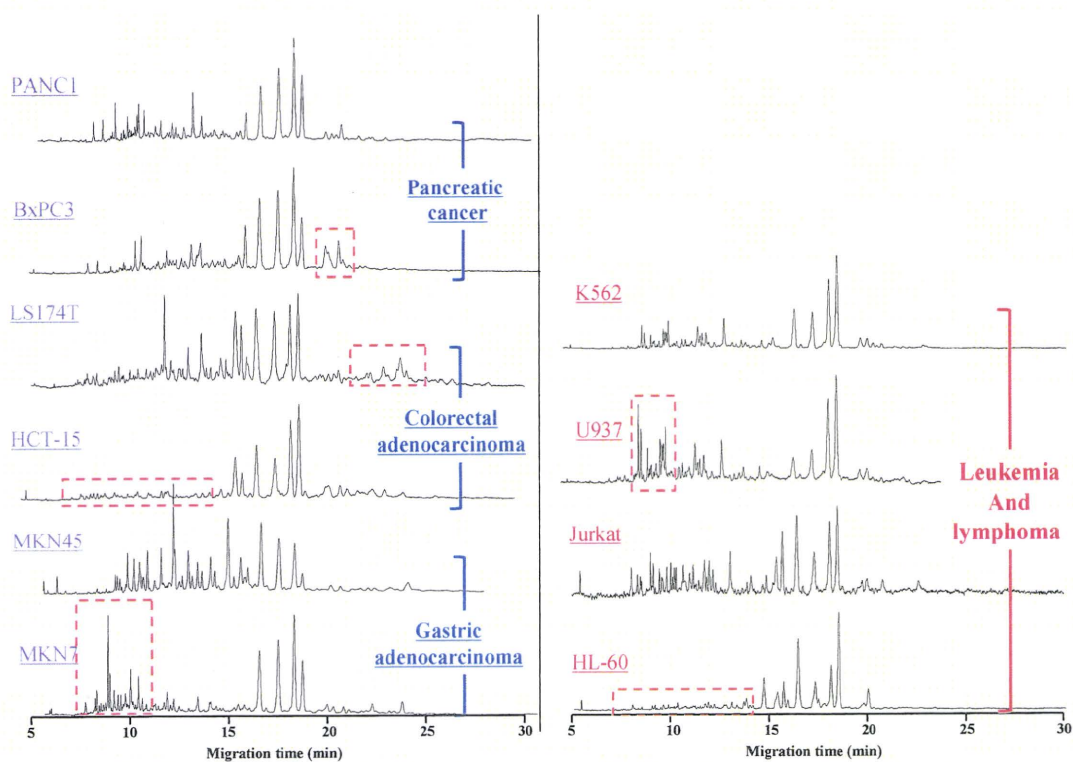


Fig.9 CE analysis of N-linked glycans derived from various cancer cells.

Analytical conditions; capillary, DB-1 capillary (40 cm x 100  $\mu$ m.i.d). Buffer, 100 mM Tris-borate buffer (pH 8.3) containing 10 %PEG70000. Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure method (1.0 psi, 5 sec). Temperature, 25  $^{\circ}$ C. Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).

Table 1 Mucin-type O-glycans observed in HCT116 cell.

M1		M4	
504	Gal-GalNAc-2AA	1815	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 {NeuAc $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_2$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA
546	GlcNAc-GalNAc-2AA	1969	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_3$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc + SO $_3$
625	GlcNAc-GalNAc-2AA + SO $_3$	2180	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 {NeuAc $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_3$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA
706	Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA	2335	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_4$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc + SO $_3$
786	Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + SO $_3$	2546	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 {NeuAc $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_4$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA
868	Gal $\beta$ 1-3 (Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA	M5	
949	Gal $\beta$ 1-3 (Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + SO $_3$	1450	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 (NeuAc $\alpha$ 2-6Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA
1234	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA	1815	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 {NeuAc $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_2$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA
M2		M6	
1158	Gal $\beta$ 1-3 (Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc	1085	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc-2AA
1361	Gal $\beta$ 1-3 (GlcNAc-Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc	1238	Gal $\beta$ 1-3 (Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc + SO $_3$
1523	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc	1440	Gal $\beta$ 1-3 (GlcNAc-Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc + SO $_3$
1888	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_3$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc	1450	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 (NeuAc $\alpha$ 2-6Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA
2253	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_4$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc	1604	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc + SO $_3$
2618	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_5$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc	1684	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_3$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc + 2SO $_3$
M3		1764	Gal $\beta$ 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc + 3SO $_3$
633	NeuAc $\alpha$ 2-6GalNAc-2AA	2260	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 {NeuAc $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_3$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA
795	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc-2AA	2626	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 {NeuAc $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_4$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA
998	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA	2106	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 {NeuAc $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_2$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA
1160	Gal $\beta$ 1-3 (Gal-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc	2471	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 {NeuAc $\alpha$ 2-6(Gal-GlcNAc) $_3$ $\beta$ 1-6} GalNAc-2AA