

には血球に特有に発現している PI3K  $\delta$  が関与していることを明らかにした。更にヌードマウスを用いて *in vivo* での early EPC の活性評価法を確立した。Late EPC に関しては、遺伝子発現プロファイルから発現量と管腔形成能に相関が見出されたオクルディンに着目して解析を進め、オクルディンが late EPC の管腔形成維持に必要な機能的特性指標であることを示した。

## B. 研究方法

### 1) 試薬

VEGF は Strathmann Biotec 社より、IL-8 は Strathmann Biotec 社より、AC133 細胞、CD14 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、抗マウス CD31 抗体-FITC は BD Biosciences Pharmingen 社より購入した。抗 CD14 抗体-FITC は、Dako Cytomation 社から購入した。抗 VEGFR-2 (Flk-1/KDR) 抗体、抗 p110 PI3K $\beta$  抗体、抗 p110 PI3K  $\delta$  抗体は Santa Cruz Biotechnology, Inc. より購入した。抗 p110 PI3K  $\alpha$  抗体は Cell Signaling Technology より購入した。抗 IL-8 受容体抗体は R&G System 社より得た。抗オクルディン抗体は Sigma 社より購入した。p110 PI3K  $\alpha$  の阻害剤である PI-103 は Calbiochem 社より購入した。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。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)、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°C、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 陽性あるいは CD14 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、CD14 マイクロビーズ分離キットを用い Auto MACS (Miltenyi Biotec) で分離した。

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。CD14 陽性細胞は IL-8 に対する遊走実験に用いた。

### 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。

### 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、 $1 \times 10^7$  cells/well 程度とし、1 週間に 2 回、培地交換し、2~3 週間後に出現する敷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、抗 CD14 抗体-FITC、抗 CD14 抗体-FITC、抗 IL-8 抗体で免疫染色した。なお、全ての細胞は対照用抗体で染色し、非特異的な反応でないことを確認した。染色した細胞の蛍光強度は FACS Calibur (Becton Dickinson) で解析した。

#### 7) Late EPC の特性指標の探索

Late EPC および HUVEC の RNA を、RNeasy (QIAGEN) を用いて回収した。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。

#### 8) 各種細胞の遊走

IL-8 や VEGF に対する各種細胞の遊走は改良型ボイデンチャンバー法を用いて解析した。メンブランフィルターはポアサイズが  $8 \mu\text{m}$  のものを用いた。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  $2 \times 10^4$  cells/ $50 \mu\text{l}$ /well になるように上室に播種した。下室には種々の濃度の IL-8、10 ng/ml VEGF を含む 2% FBS-EBM-2 を  $30 \mu\text{l}$ /well 加え、 $37^\circ\text{C}$  の  $\text{CO}_2$  インキュベーターに 3 時間静置した。遊走した細胞は固定・染色し、光顕下で計測した。

PI3K 阻害剤 wortmannin (100 nM)、p110 PI3K  $\alpha$  阻害剤、PI-103 (250 nM) を用いる際には、

15 分細胞に前処理し、さらに阻害剤をチャンバーの上室及び下室の両方に加えた。

#### 9) PI3K アイソフォームとオクルディンのウェスタンブロッティング

種々の細胞は回収後 lysis buffer に溶解した。電気泳動用サンプルバッファーを加え、電気泳動後ウェスタンブロットを行った。抗 PI3K アイソフォーム抗体及び抗オクルジン抗体ブロット後、抗アクチン抗体を細胞内スタンダードとして用いた。

#### 10) マトリゲルを用いた *in vitro*, *in vivo* 管腔形成アッセイ

*In vitro*; マトリゲルを氷上で融解し、48 穴プレートに  $200 \mu\text{l}$ /well 添加した。 $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  インキュベーター中に 30 分静置しゲル化させた。種々の late EPC はトリプシンを用いて回収し、2% FBS-EBM-2 に懸濁し、 $5 \times 10^4$  cells/ $0.5 \text{ ml}$ /well になるようゲル化したマトリゲル上に播種した。 $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  インキュベーターで一晩培養した。形成された管腔の写真有位相差顕微鏡 Axiovert2000 で撮影し、顕微鏡画像解析ソフト AxioVision を用いて管腔の長さを定量化した。

*In vivo*; 6 週令のヌードマウスに early EPC を  $5 \times 10^5$  cells/ $0.5 \text{ ml}$  になるようにマトリゲルに懸濁し、マウスの皮下に移植した。皮下、マウスの体温でゲル化したマトリゲルを 2 週間後に採り出し、凍結超薄切片を作製し、抗マウス CD31 抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡で解析した。

#### 11) PI3K $\delta$ 及びオクルディンの siRNA

PI3K $\delta$  の siRNA はセンダイウイルスベクター (Ishihara Sangyo 社) を用い、early EPC に導入した。以下 3 種類の配列を混合して用いた; UCU UAA AGA UGA UGC CCA CGC UGC C, UCA UGA UGU UGU CGC UGU GCC GAU C, UUC AGC AGC UCG CCC UUC UCA UCU G。オクルディンの siRNA は Lipofectamine™ RNAiMAX

(Invitrogen)を用いて late EPC に導入した。2 種類の以下の配列をそれぞれ別個に用いた ;  
GGUUCUGGUGUGAACUAAAtt (#1) 、  
CCUUUUAGGAGGUAGUGUAtt (#2)。

## 12) 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. Early EPC の特性指標

#### C.1.1. 単核球由来 early EPC の細胞表面マーカー分子発現の確認

まず、本研究で用いる単核球由来 early EPC について、より未分化な幹細胞を起源に持つ AC133 陽性細胞由来 early EPC を陽性対照として、細胞表面マーカー分子の発現を確認した。評価対象としたマーカーは、血管内皮細胞マーカー CD31、単球マーカー CD14、及び、白血球マーカー CD45 である。単核球由来 early EPC は、AC133 陽性細胞由来 early EPC と同様、試験した 3 種類のマーカー分子を発現していることが確認できた (図 1)。Early EPC は CD45 陽性であることから、血球系の細胞であると考えられる。

昨年我々は、early EPC の細胞表面に活性型 MMP-9/MMP-2 が存在すること、及び、early EPC が高い浸潤活性を持つことを見出した。生体内で虚血が起きた場合、図 2 に示すように early EPC が浸潤・遊走して最初に虚血部位に到着し、その場でサイトカインを放出し、既存の血管や late EPC をリクルートすることにより血管再生を促す可能性が考えられる。この仮説に基づくと、遊走能は、細胞組織加工医薬品としての early EPC の有効性に関わる重要な特性であると考えられる。そこで、early EPC の効力の裏づけとなる機構の解明のため、遊走を促進する因子と、その作用機構について解析した。

#### C.1.2. Early EPC の IL-8 応答性の解析

我々は既に、early EPC が IL-8 を多く産生することを見出している。そこで、IL-8 のオートクライン作用を考え、IL-8 を刺激剤として early EPC の遊走能を評価した。同時に、early EPC 由来 IL-8 のパラクライン作用も想定して、late EPC 及び HUVEC についても、IL-8 の遊走促進作用を検討した。その結果、IL-8 は late EPC や HUVEC を濃度依存的に促進したが、early EPC では IL-8 に応答した遊走は認められなかった(図 3)。

IL-8 受容体の発現をフローサイトメーターで解析すると(図 4)、late EPC や HUVEC に比べ early EPC で強く発現していた。また、単核球由来 early EPC は殆どが CD14 陽性細胞である(図 1)ことから、新鮮な CD14 陽性細胞を用いて IL-8 に対する遊走能を検討すると、IL-8 の濃度に依存して遊走が促進された(図 5)。以上のことから、early EPC は分化の過程で IL-8 に対する遊走能を失うと考えられた。

#### C.1.3. Early EPC の VEGF 応答性の解析

次に、遊走促進因子を VEGF に変えて early EPC の遊走能を調べた。その結果、図 6 に示すように、late EPC や HUVEC と同様に、early EPC は VEGF に応答して遊走することが分かった。

細胞遊走を調節するシグナル伝達分子として PI3K が関与していることが報告されている。また、early EPC は血球系由来であると考えられるため、early EPC の遊走には血球に特異的に発現する p110 PI3K $\delta$  が重要と考えられた。そこで、VEGF により惹起される遊走に対する PI3K 阻害剤の効果を調べたところ、early EPC の遊走は、PI3K アイソフォーム非選択的阻害剤である Wortmannin により阻害されたが、p110 PI3K $\alpha$  選択的阻害剤である PI-103 では阻害されなかった(図 7)。Late EPC 及び HUVEC の遊走は、

PI-103 により抑制された。

次に、p110 PI3K のアイソフォーム発現をウエスタンブロット法で解析したところ、Late EPC、HUVEC、及び、ヒト冠状動脈内皮細胞 (HCAEC) は p110 PI3K $\alpha$  を発現しているのに対し、early EPC は p110 PI3K $\delta$  を発現していた (図 8)。Early EPC における p110 PI3K $\delta$  の発現を siRNA により抑制すると p110 PI3K $\delta$  タンパク量は低下し、VEGF に対する遊走も有意に抑制された (図 9)。以上の結果から、early EPC には PI3K のうち $\delta$ アイソフォームが発現しており、遊走には p110 PI3K $\delta$  が関与していると考えられた。

#### C.1.4. Early EPC の *in vivo* 活性評価系

Early EPC の血管形成への寄与を *in vivo* でも確認するため、マウスへの細胞移植による血管形成促進能の評価系を確立した。本評価系では、氷上で溶解したマトリゲルに early EPC を浮遊させ、ヌードマウスの背部に皮下投与する。マウスの体温でゲル化したマトリゲルを 2 週間後に取り出して超薄切片を作成し、マウスの血管内皮細胞を抗マウス CD31 抗体により検出した (図 10)。図 11 に示すように、early EPC とともに移植したマトリゲル内には多くのマウス由来 CD31 陽性細胞から成る血管が観察され、移植した early EPC が血管形成促進作用を持つことが確認された。

### C.2. Late EPC の特性指標

#### C.2.1. Late EPC の管腔形成能とオクルディン発現量の関連

Late EPC は、血液単核球細胞を血管内皮細胞増殖条件下で 2~3 週間培養して得られる細胞で、マトリゲル上での管腔形成する能力を保有している。しかし、管腔形成能は、株ごとに異なっており、細胞組織加工医薬品として用いるためには、管腔形成能の評価が必要である。また、管腔形成に関わる特性指標を明らかにすることが、品質評

価において有用であると考えられる。Late EPC の管腔形成に関する代表的な例を図 12 に示す。Late EPC 株である S3、S2-22、2R32 のうち、2R32 は組織由来血管内皮細胞である HUVEC と同程度の管腔形成能を示す株であり、S2-22 及び S3 は HUVEC より管腔形成能が低い株である。特に、S3 と名付けたセルラインでは殆ど管腔が形成されない。S3 株も CD31 や KDR 等の血管内皮細胞マーカーは発現している (data not shown)。

これらの 3 種類の late EPC 株について、HUVEC を対照として遺伝子の発現プロファイルと比較したところ、管腔形成能の程度によらず、HUVEC と類似したプロファイルを示すことが明らかになった (図 13)。しかし、管腔形成能に相関する遺伝子として、オクルディン (OCLN) が見出され、管腔形成能の低い S3 では、これらの遺伝子の発現が低いことが見出された (図 14 上)。

遺伝子発現プロファイル比較に用いた late EPC とは異なる株で、管腔形成能を持つ S11-11 と S11-12、及び、管腔形成能の極めて低い S3 について、オクルディンのタンパク質レベルでの発現をウエスタンブロットにより確認したところ、S11-11 株、S11-12 株、及び、陽性対照として用いた HUVEC ではオクルディンの発現が検出されたが、S3 株ではオクルディンの発現が検出されなかった (図 14 下)。

オクルディンは図 15 で示すように tight junction を形成する 4 つの膜貫通ドメインをもつタンパクであるが、血管内皮前駆細胞の管腔形成能との関連はこれまで報告されていない。

#### C.2.2. Late EPC の管腔形成におけるオクルディンの機能的役割に関する検討

Late EPC の管腔形成におけるオクルディンの機能的役割を明らかにするため、siRNA を用いたオクルディンのノックダウン実験を行った。管腔形成能の高い Late EPC 株である S11-11 に、オ

クルディン特異的な siRNA (OCLN-KD-1 あるいは OCLN-KD-2) を導入したところ、オクルディンの mRNA (図 16 左) が確認された。また、タンパク質レベルでのオクルディンの減少も確認された (図 16 右)。また、これらの siRNA の導入により、管腔形成が抑制された (図 17、18)。

マトリゲル上に播種した細胞の変化を経時的に観察したところ、オクルディンをノックダウンした細胞も S3 細胞も、コントロールの細胞と同様、細胞が網目状にならび、4 時間後では管腔様構造が認められることが分かった。しかし、20 時間後には、オクルディンをノックダウンした細胞及び S3 細胞では、管腔構造が消失しており、お互いにコンタクトできない様子が観察された。以上のことから、オクルディンは late EPC の管腔形成の後期過程あるいは維持に必要な機能的な指標であると考えられた。

#### D. 考察

昨年度の本研究により、early EPC の細胞表面に MMP-9/MMP-2 が存在すること、及び、early EPC には高い浸潤能があることが明らかとなった。本年度は、early EPC が虚血部位に最初に到着する細胞であるという仮説 (図 2) のもと、浸潤には遊走が関与していることや early EPC が血球系細胞であることを考え、遊走に関するシグナル伝達について解析を進めた。

Early EPC は VEGF に応答して遊走する。しかし、Early EPC は IL-8 受容体を発現していないが (図 4) IL-8 に応答した遊走反応は示さない (図 3)。Early EPC の殆どが CD14 陽性細胞である (図 1)。Early EPC と対照的に、末梢血から分離した直後の CD14 陽性細胞は IL-8 に応答し、IL-8 の濃度に依存した遊走を示す (図 5)。したがって、CD14 陽性細胞が early EPC へ分化する過程で IL-8 に対する遊走能を失うが、VEGF に対する遊走能は失わない可能性が考えられた。これらのことから、early EPC は虚血組織に多く産生される VEGF に応答し、細胞表面に局在する

MMP-9/MMP-2 の作用により、虚血部位に到着する可能性が考えられる (図 2)。Early EPC には VEGF に対する遊走シグナル分子として血球系に多く発現する p110 PI3K  $\delta$  が強く発現し (Graupera et al. Nature 453 662 2008)、機能している (図 7、8、9)。Late EPC、HUVEC、HCAEC では p110 PI3K  $\alpha$  が発現しており、PI3K アイソフォームの違いが early EPC を特徴づける特性指標の一つと考えられる。

Early EPC の *in vivo* での血管形成促進効果は、ヌードマウスの背部への細胞/マトリゲルの移植により示すことができた (図 11)。血管再生療法は移植した細胞が自ら血管を作るより、血管再生促進因子を放出させる細胞を移植する方が治療効果が高いと考えられているため (伊澤淳 実験医学 血管研究と血管治療 高倉伸幸編集 28 2861 2010)、early EPC は血管再生療法に有用な細胞であると考えられた。

Late EPC に関する検討では、オクルディンが管腔形成に関わる機能的特性指標であることを示すことができた。オクルディンは tight junction タンパクであり (Tsukita et al. Oncogene 27 6930 2008)、脳の血管において (Hawkins and Davis Pharmacol Rev 57 173 2005)、内皮細胞どうしが接着している辺縁に連続的に発現している (Hirase et al. J Cell Sci 110 1603 1997)。このことからオクルディンは血液脳関門の重要な働きをしていると考えられている。一方、脳血管以外の内皮細胞ではオクルディンは辺縁に不連続的に発現し、また、オクルディンをノックアウトした ES 細胞では tight junction が形成される報告 (Saitou et al. J Cell Biol 141 397 1998) もあり、オクルディンの役割については明確ではなかった。我々が示した管腔形成の顕著な促進効果はオクルディンの新たな役割と言える。Late EPC を細胞組織加工医薬品として用いる場合には、オクルディンの発現を確認することが、血管形成能保持の確認に有用であると考えられる。

## 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) 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に加えて、浸潤に伴う遊走のシグナル伝達には血球に多く発現する p110 PI3K  $\delta$  が関与することを示した。
- 2) ノードマウスの背部に early EPC を含むマトリゲルを移植する *in vivo* の血管形成活性評価系を開発した。
- 3) Late EPC の管腔形成能と発現量が相関するオクルディンが、管腔形成に寄与する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) 石井明子、川崎ナナ：バイオ治験薬の品質安全性確保 ファームテックジャパン 16, 69-80 (2010)

### 2. 学会発表

- 1) 豊田淑江、石井明子、鈴木琢雄、多田 稔、小林 哲、川崎ナナ、山口照英：血管内皮前駆細胞における MMP-2/MMP-9 の役割 第 83 回日本生化学大会 第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 神戸

## 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

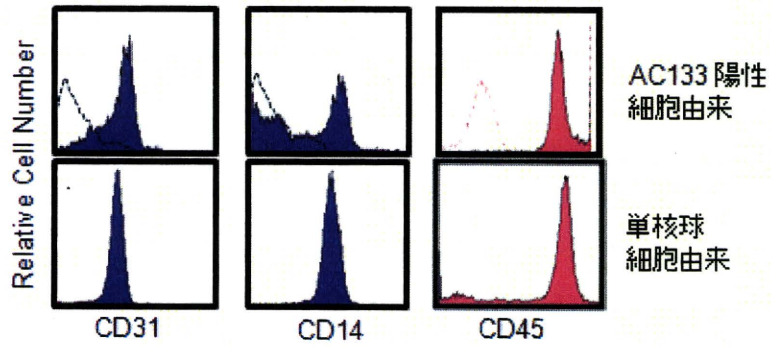


図 1. AC133 陽性細胞及び単核球由来 early EPC の 細胞表面マーカー分子発現の確認

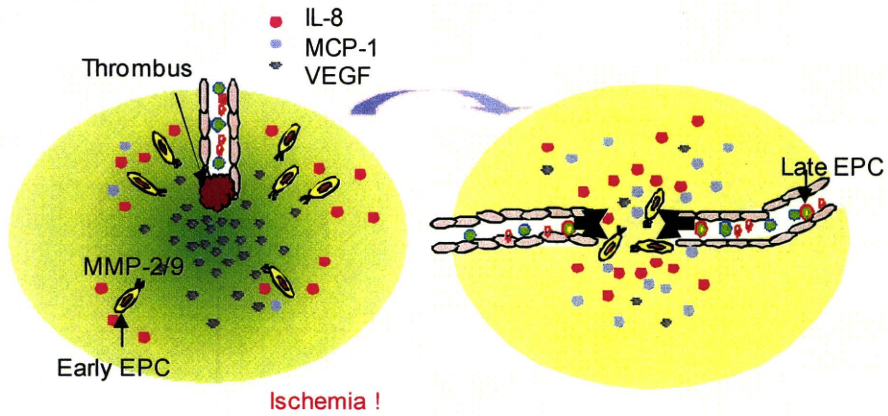


図 2. Early EPC が最も早く虚血部位に浸潤する と考える作業仮説

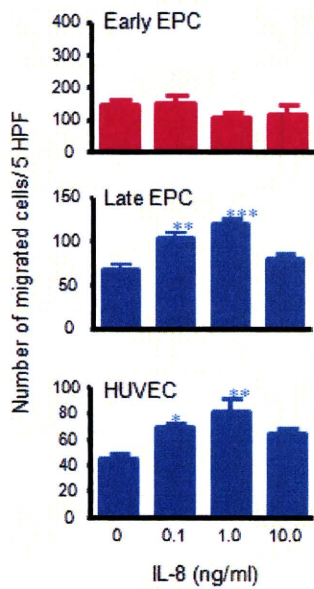


図 3. IL-8 に応答した EPC の遊走

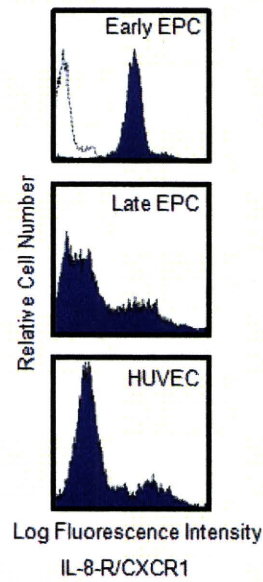


図 4. EPC における IL-8 受容体の発現

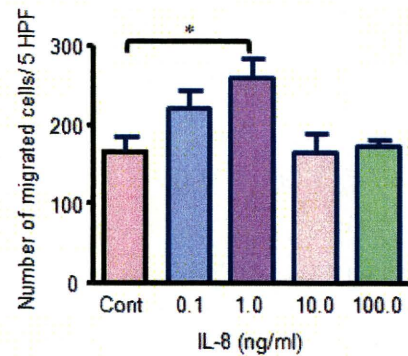


図 5. IL-8 に応答した CD14 陽性細胞の遊走

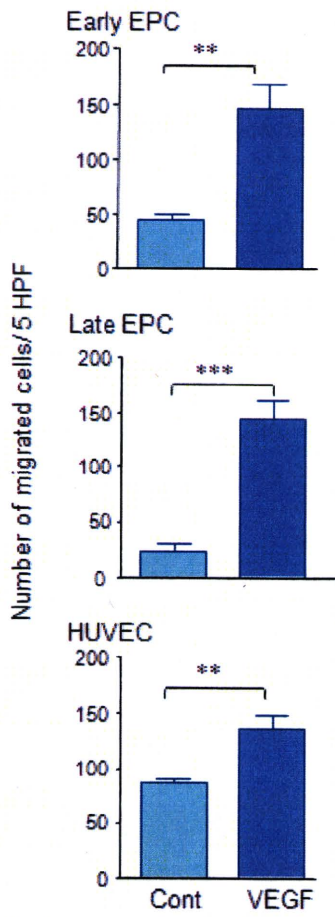


図 6. VEGF に応答した EPC の遊走

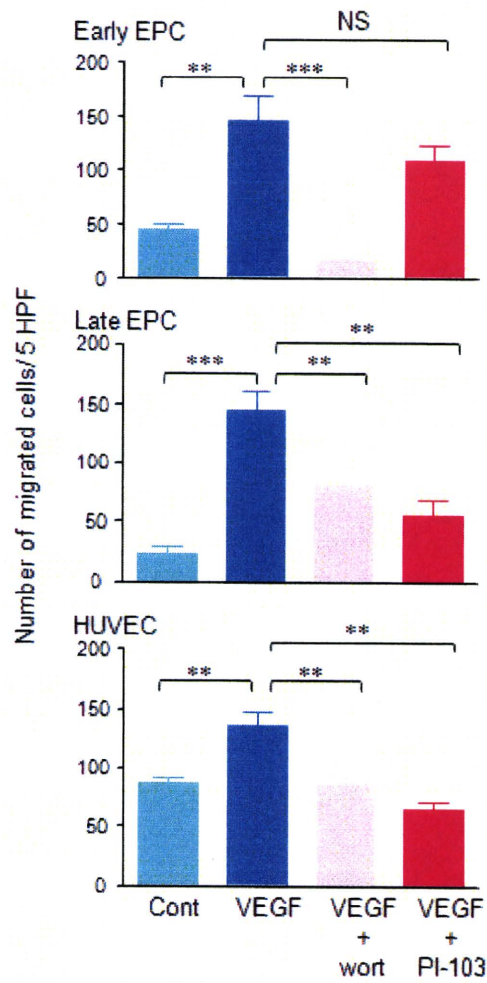


図 7. VEGF により惹起される遊走に対する PI3K 阻害剤の効果

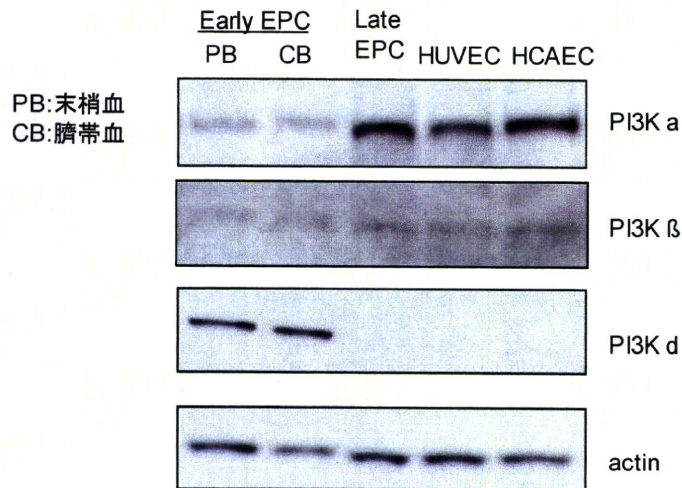


図 8. 種々の細胞における PI3K アイソフォームの発現



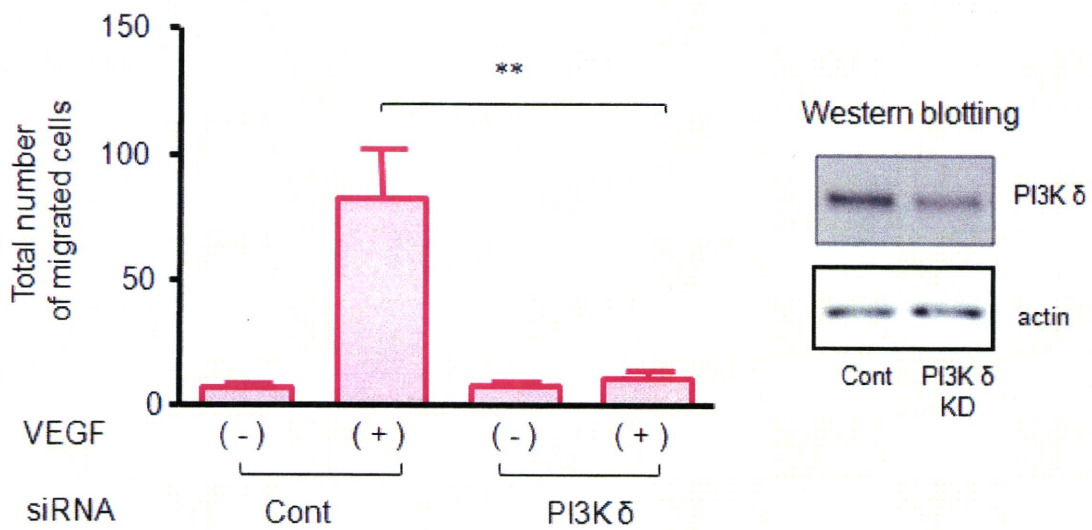


図 9. VEGF に誘導される Early EPC の遊走に対する p110 PI3K  $\delta$  siRNA の効果

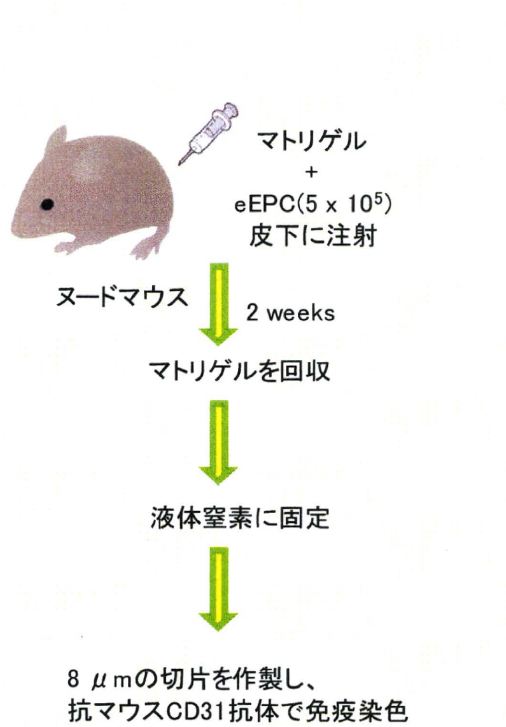


図 10. マトリゲルとともにヌードマウスに移植した eEPC の *in vivo* における血管形成促進効果

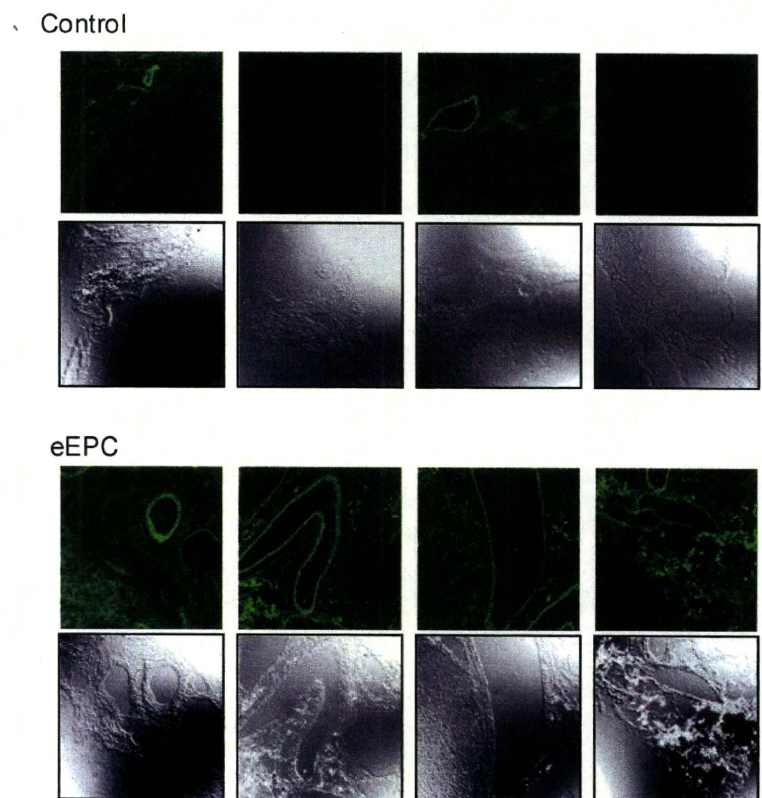


図 11. Early EPC とともに移植したマトリゲル内に観察される宿主マウス由来 CD31 陽性血管内皮細胞

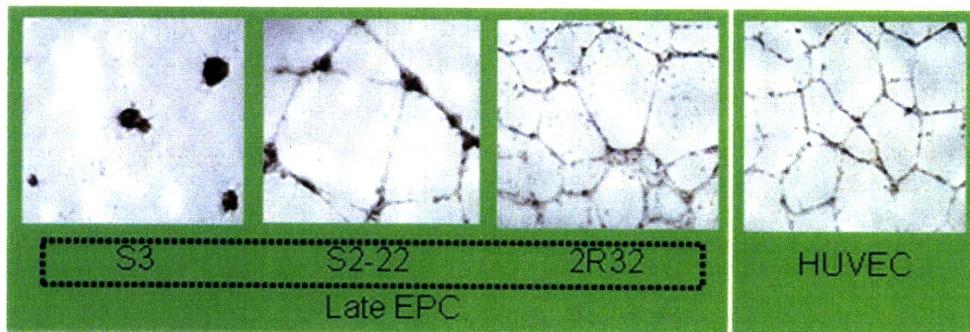


図 12. 種々の late EPC の *in vitro* 管腔形成能

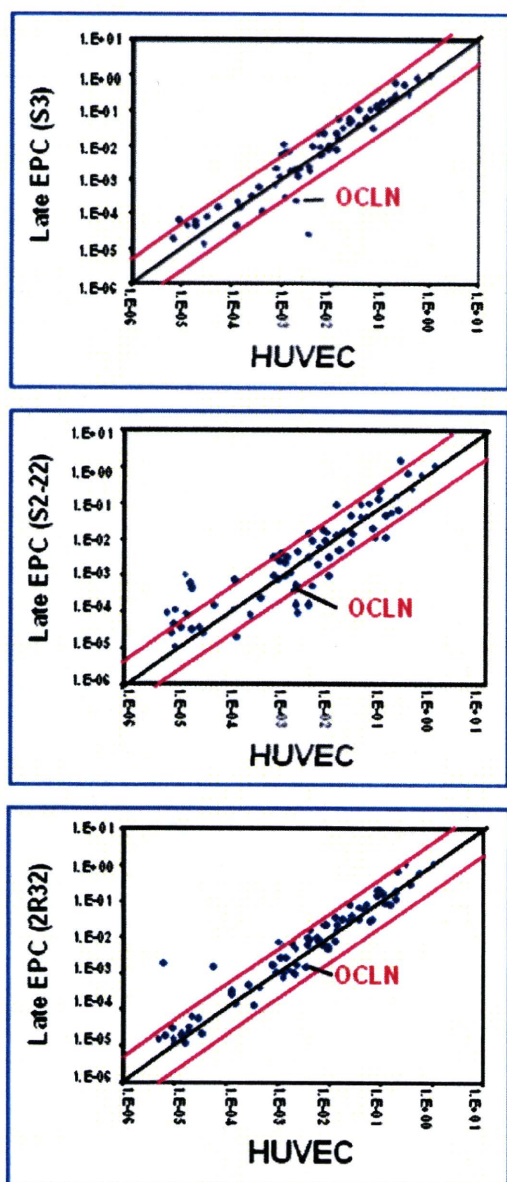


図 13. LateEPC と HUVEC の 遺伝子発現プロファイル比較

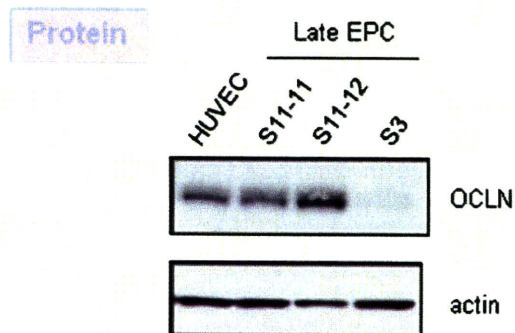
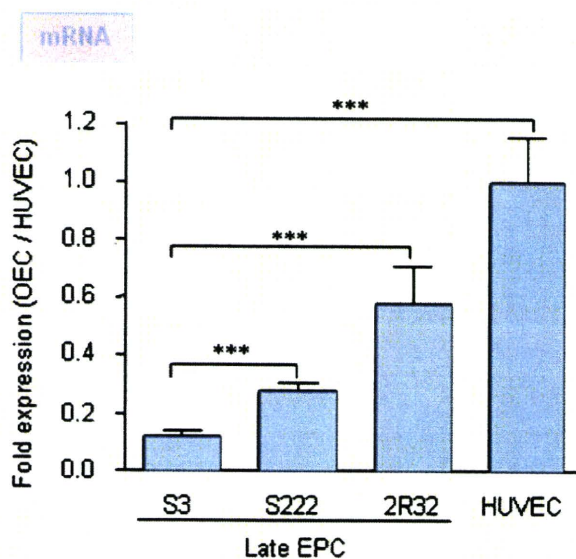


図 14. Late EPC におけるオクルディンの mRNA 及びタンパク質発現

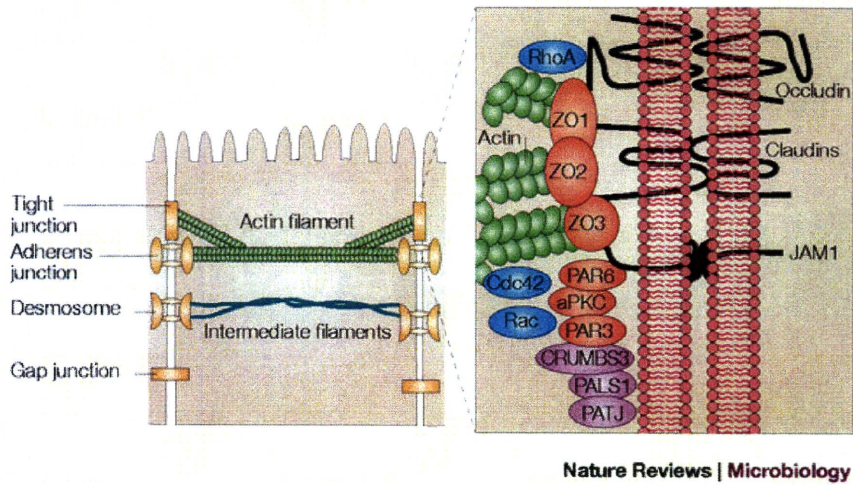


図 15. Tight Junction タンパクとして働くオクルディン

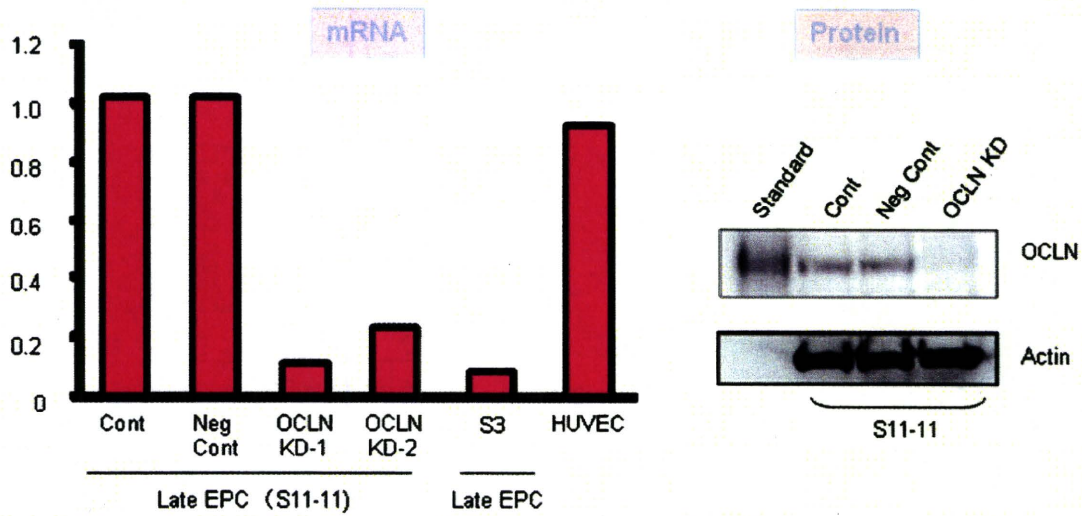


図 16. siRNA 導入によるオクルディンの mRNA 及びタンパク発現の変化

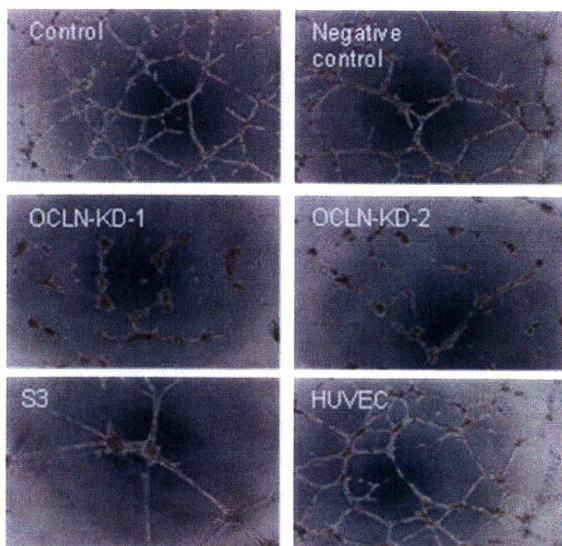


図 17. オクルディン siRNA による管腔形成の抑制

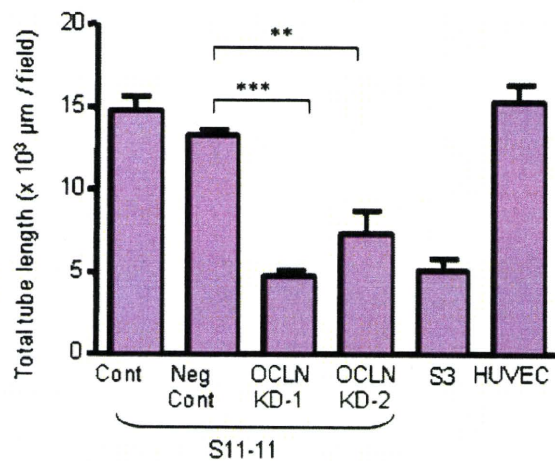


図 18. オクルディン siRNA による管腔形成抑制の定量評価

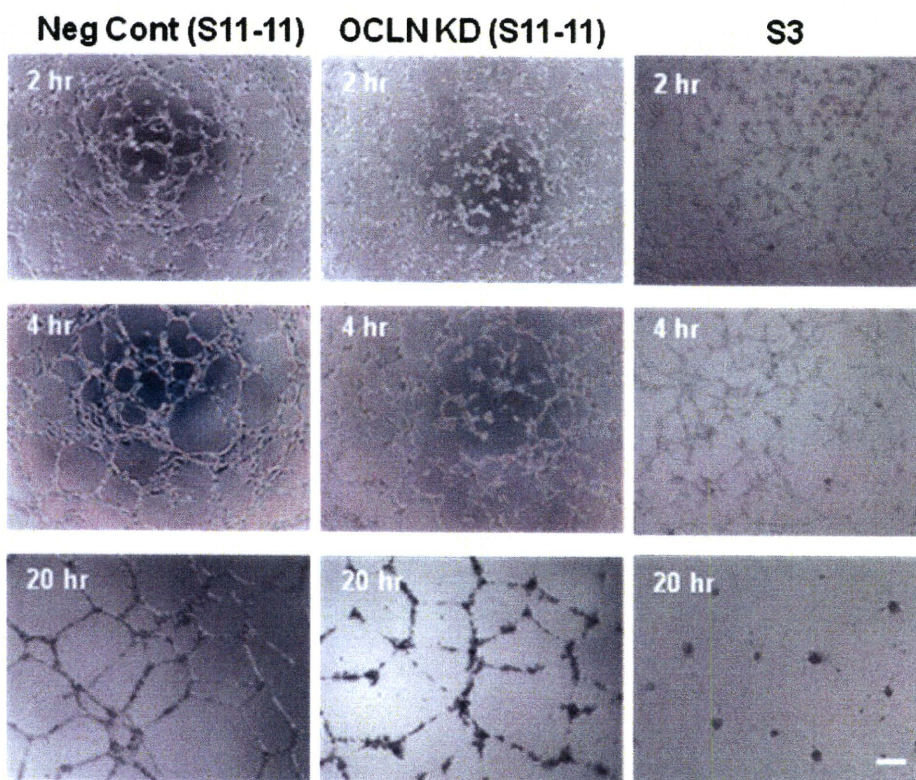


図 19. オクルディン siRNA の管腔形成への影響の経時的観察

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：治療効果を示す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、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ための方法論の確立が急務となっている。そこで、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、識別することができれば、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。本研究課題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することを検討した。具体的には、O-結合型糖鎖とグリコサミノグリカン型糖鎖の比較糖鎖プロファイリング技術を開発し、両O-結合型糖鎖の比較解析による細胞の特性解析技術の有用性について検証した。

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、癌や感染症や免疫等の様々な病気や生理現象に関連することも明らかにされつつあり、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の1つと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」分野でも、その技術の実用化に向けて、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、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、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。細胞の糖鎖を特異的・定量的に解析、識別できれば、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、糖鎖を指標とする細胞の特性解析技術について検討し、昨年度までに O-結合型糖鎖のうちムチン型糖鎖の解析技術を開発してきた。本年度は、開発した技術を O-結合型糖鎖のうちグリコサミノグリカン型糖鎖の解析へと応用し、糖鎖プロファイリング技術の細胞特性解析技術としての有用性について検証した。

## B. 研究方法

### B.1. 細胞総糖タンパク質分画の調製

ヒト培養癌細胞を 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°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. O-結合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°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 O-結合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 O-結合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°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 O-結合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°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°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させ、その後 10 分間、溶出液 B を 1M NaCl とシグリコサミノグリカン型糖鎖を溶出させた。ムチン型糖鎖の各分画は減圧濃縮乾固した。一方、グリコサミノグリカン型糖鎖は透析 (1000 Da cut) を用いて脱塩し、減圧濃縮乾固した。

#### 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% 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。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 グリコサミノグリカン鎖不飽和二糖の調製と蛍光標識

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グリコサミノグリカン分画は酵素消化により不飽和二糖に分解した。コンドロイチン硫酸 PGs は、試料を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0、100  $\mu$ L) に溶解後、Chondroitinase ABC (0.5 unit、10  $\mu$ L) を加え 37°C で 24 時間反応した。ヘパリン/ヘパラン硫酸 PGs は、試料を 100  $\mu$ L 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  $\mu$ L) を加え、37°C で 24 時間反応した。両酵素反応物は、沸騰水浴上で 5 分間煮沸した後、15000 xg で 5 分間遠心分離し、上清を減圧濃縮乾固した。上記操作により遊離されたグリコサミノグリカン鎖不飽和二糖の凍結乾燥物に 2AA および NaBH<sub>3</sub>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°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た。

#### B.7 キャピラリー電気泳動によるグリコサミノグリカン鎖不飽和二糖の分析

装置には 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  $\mu$ m、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 とし電気泳動を行った。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

#### 培養細胞の O-結合型糖鎖の比較解析

10 種類の培養癌細胞より O-結合型糖鎖を調製し、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーで分画後、ムチン型糖鎖とグリコサミノグリカン鎖のそれぞれについて定量的な解析を行

った。ムチン型糖鎖は、アシアロ、モノシアロ、ジシアロ、トリシアロ糖鎖分画ごとに、グリコサミノグリカン鎖はコンドロイチン硫酸類 (CS)、ヘパリン/ヘパラン硫酸類 (HS)、ヒアルロン酸 (HA) ごとに定量解析した結果を Fig.1 に示す。定量解析の結果、Jurkat、U937、K562、HL60 などの血球系細胞は上皮系細胞に比べムチン型糖鎖とグリコサミノグリカン鎖のいずれも発現量が少ないことがわかる。一方、上皮系細胞 6 種類については、ムチン型糖鎖とグリコサミノグリカン鎖の総発現量は高く、各糖鎖の発現量も細胞種ごとに大きく異なることがわかった。例えば、ムチン型糖鎖では大腸癌 LS174T は発現量が高いが、同じ大腸癌であっても HCT-15 では低かった。同様に胃癌細胞である MKN45 と MKN7 では 2 倍以上も糖鎖量が異なり、MKN45 ではジシアロおよびトリシアロ糖鎖の含量が全ムチン型糖鎖の 70% 以上を占めるなど、細胞種によって大きく異なることがわかった。

グリコサミノグリカン鎖については、膵臓癌細胞 BxPC3 は CS 鎖、HS 鎖、HA 鎖のいずれも同じ膵臓癌細胞である PANC1 に比べ発現量が高かった。一方、ムチン型糖鎖で発現量に著しい差が観察された大腸癌 LS174T と HCT-15 はグリコサミノグリカン鎖の発現量に大きな差は観察されなかった。

次に、ムチン型糖鎖とグリコサミノグリカン鎖の発現量のみでは識別が困難であった細胞種について発現糖鎖の比較解析を行った。Fig.2 に K562 と U937 のムチン型糖鎖とコンドロイチン硫酸鎖を解析した結果を示す。ムチン型糖鎖については両細胞ともに、シ

アリル T 抗原とジシアリル T 抗原糖鎖が主たる糖鎖として観察され、その発現量にも大きな違いはなかった。一方、コンドロイチン硫酸については、両細胞に  $\Delta$ diCS-4S のピークが観察されたが、U937 では  $\Delta$ diCS-0S のピークも観察され、U937 は K562 に比べ硫酸化度の低いコンドロイチン硫酸鎖を持つことがわかる。

10 種類の細胞のうち、大腸癌細胞 (LS174T、HCT16) と胃癌細胞 (MKN45、MKN7) に着目しグリコサミノグリカン鎖の発現量を比較した結果を Fig.3 に示す。4 種類のうち MKN7 はコンドロイチン硫酸 A の発現量が高く、また構成 2 糖単位に硫酸基を 2 つ持つコンドロイチン硫酸 E も観察された。一方、LS174T、HCT16、MKN45 はコンドロイチン硫酸鎖の発現量は MKN7 に比べ低い、ヘパラン硫酸鎖の発現量は MKN7 に比べ高いことがわかった。このように細胞中のグリコサミノグリカン鎖はムチン型糖鎖と同様に細胞の個性解析において有用な指標となることがわかった。また、K562 と U937 の場合のように、ムチン型糖鎖だけでは識別が困難な細胞種でもグリコサミノグリカン鎖の情報を利用すれば識別可能となることがわかった。

#### 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、O-結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリング技術を開発し、10 種類のヒト培養癌細胞をモデルにムチン型糖鎖の解析へと応用した。その結果、上皮系癌細胞に含まれる O-結合型糖鎖はムチン型糖



鎖とグリコサミノグリカン型のいずれについても、血球系癌細胞に比べ糖鎖含量が高いことがわかった。また、ムチン型およびグリコサミノグリカン鎖のみでは識別が困難な細胞種についても、両糖鎖情報を組み合わせることで識別可能となることがわかった。

本研究により、細胞中に存在する微量の糖鎖を網羅的かつ定量的に解析でき、各種細胞間で O-結合型糖鎖の糖鎖プロファイル解析が、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明らかにした。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、識別したり、細胞の品質を管理するための迅速、簡便、かつ特異的・定量的な方法の確立が必要不可欠である。細胞の O-結合型糖鎖プロファイルを分析する本技術は、そのような条件を充たし、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

Yamada K, Hyodo S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K.

Hyphenated technique for releasing and MALDI MS analysis of O-glycans in mucin-type glycoprotein samples.

Anal Chem. 2010 82(17):7436-7443.

Kinoshita M, Kakoi N, Matsuno YK, Hayakawa T, Kakehi K.

Determination of sulfate ester content in sulfated oligo- and poly-saccharides by capillary electrophoresis with indirect UV detection.

Biomed Chromatogr. 2010

### 2. 学会発表

三ツ井洋輔、山田佳太、梶直孝、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

グライコミクスによる癌細胞の個性解析とグライコプロテオミクスへの展開  
第 11 回関西グライコサイエンスフォーラム、平成 22 年 5 月 15 日、大阪市立大学（大阪）

Y. Mitsui, Y. Tanaka, K. Yamada, S. Hara, M. Kinoshita, T. Hayakawa, K. Kakehi

Targeted glycoproteomics of polylactosamine-carrier proteins expressed on human histocytic lymphoma cells

The 25th International Carbohydrate Symposium、平成 22 年 8 月 4 日、幕張メッセ（千葉）

K. Yamada, K. Kamisue, S. Watanabe, M. Kinoshita, T. Hayakawa, K. Kakehi

A considerable amount of free glycans derived from glycoproteins are present in sera

The 25th International Carbohydrate Symposium、平成 22 年 8 月 4 日、幕張メッセ（千葉）

A. Nakanishi, M. Sato, M. Kinoshita, K. Kakehi, T. Hayakawa

Analysis of Characteristics of Cells using Glycans as Marker Molecules

The 25th International Carbohydrate Symposium、平成 22 年 8 月 4 日、幕張メッセ (千葉)

仲西暁良、佐藤葵、木下充弘、森山博由、早川堯夫、掛樋一晃

キャピラリー電気泳動を用いる糖鎖を指標とする細胞評価法 - 再生医療実用化に向けた基礎検討 - 第 30 回 キャピラリー電気泳動シンポジウム平成 22 年 11 月 17 日、長良川国際会議場(岐阜)

仲西暁良、佐藤葵、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

糖鎖を指標とする細胞の個性解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、平成 22 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド (兵庫)

三ツ井洋輔、山田佳太、梶直孝、田中佑樹、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃  
グライコプロテオミクスによるポリラクトサミン型糖鎖キャリアータンパク質の解析、学会名：第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、平成 22 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド (兵庫)

三ツ井洋輔、山田佳太、田中佑樹、梶直孝、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃  
癌特異的糖タンパク質のグライコプロテオーム解析、日本薬学会 第 131 年会、平成 23 年 3 月、ツインメッセ静岡 (静岡)

三ツ井洋輔、原沙弥香、山田佳太、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃、  
ヒト胃癌細胞中の高フコシル化糖タンパク質の探索、日本薬学会 第 131 年会、平成 23 年 3 月、ツインメッセ静岡 (静岡)

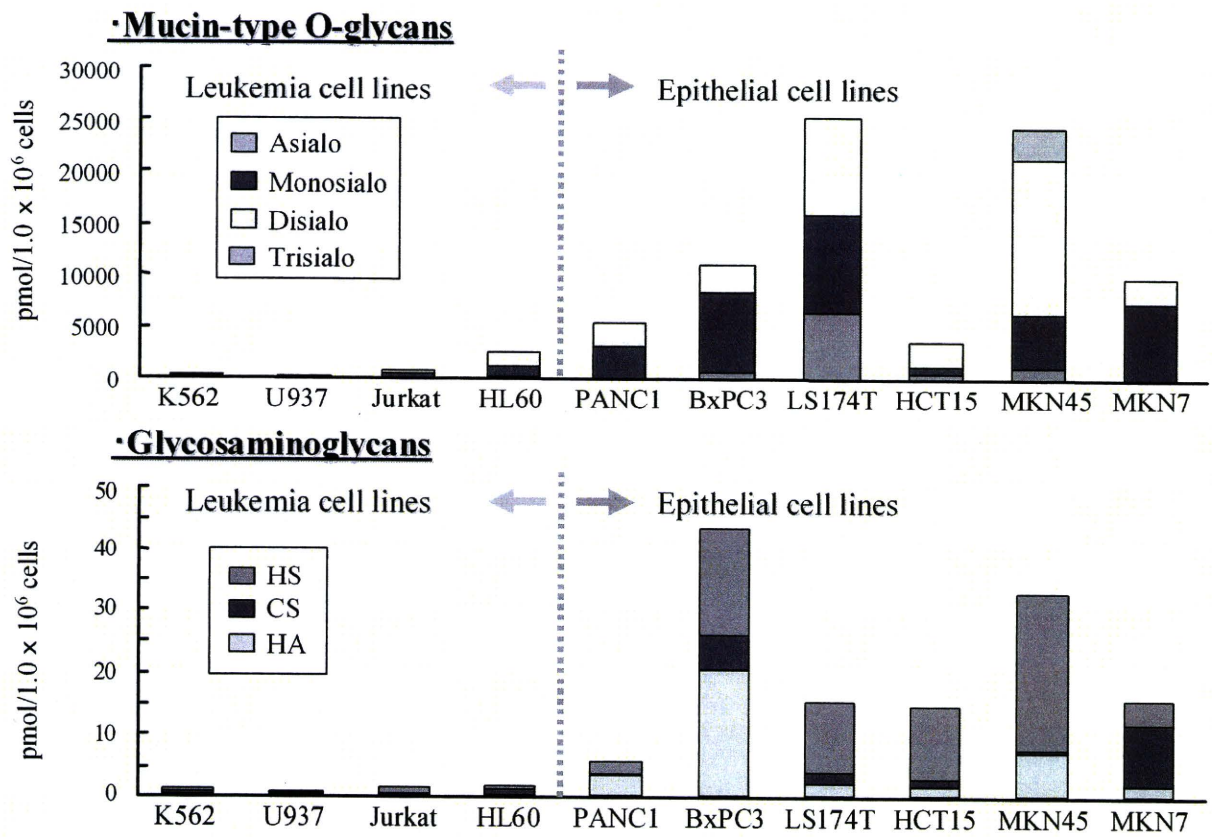
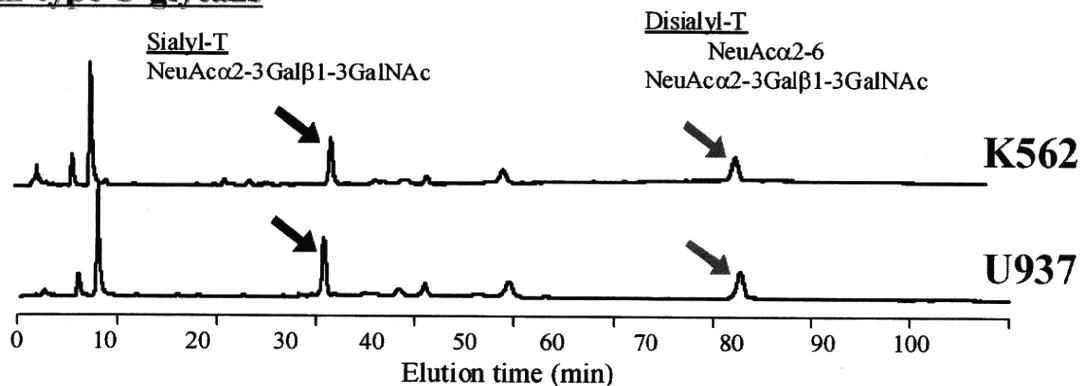


Fig.1 Comparison of the amounts of O-glycans expressed on cancer cells.

**•Mucin-type O-glycans**



**•Glycosaminoglycans (CS)**

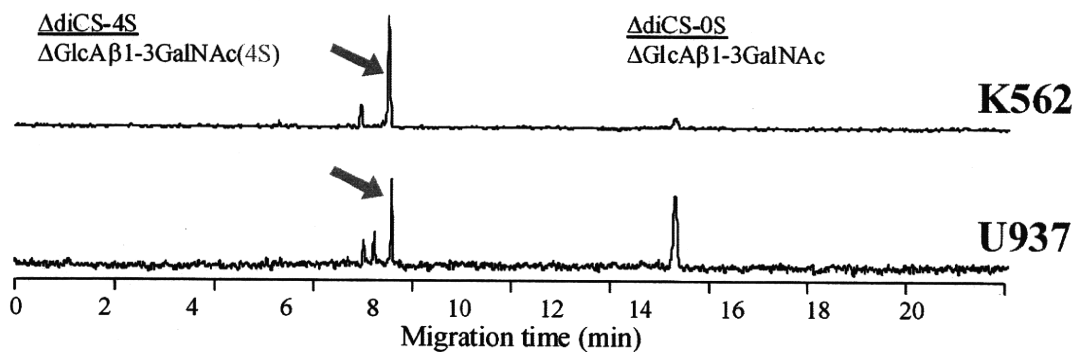


Fig.2 CE analysis of unsaturated disaccharides from K562 and U937 cell. Analytical conditions; Capillary, fused silica (40 cm x 50  $\mu$ m.i.d). Buffer, 100 mM Tris-phosphate buffer (pH 3.0). Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure method (1.0 psi, 10 sec). Temperature, 25 °C. Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).