

図 14 hMSC 由来ペプチドにラベル CDmix を添加した際の LC-MS ピークプロファイル

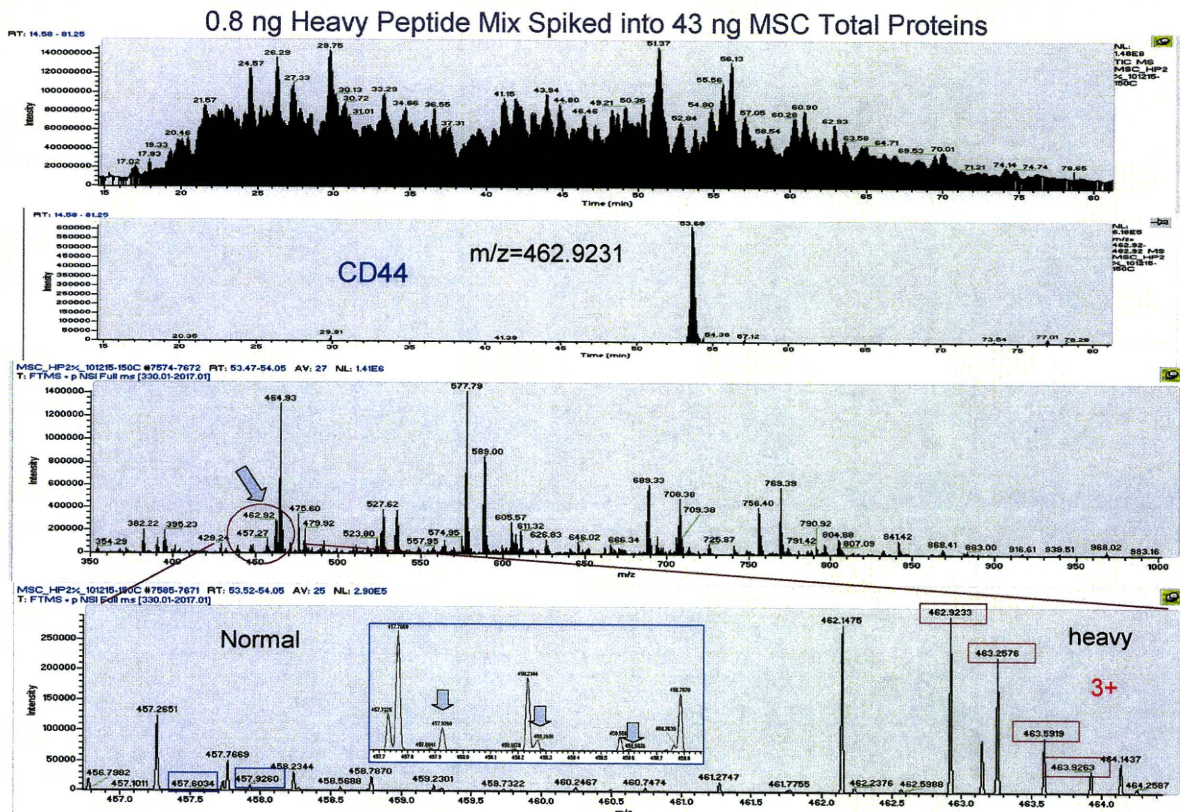


図 15 LTQ-Orbitrap により得られる LC-MS データの例

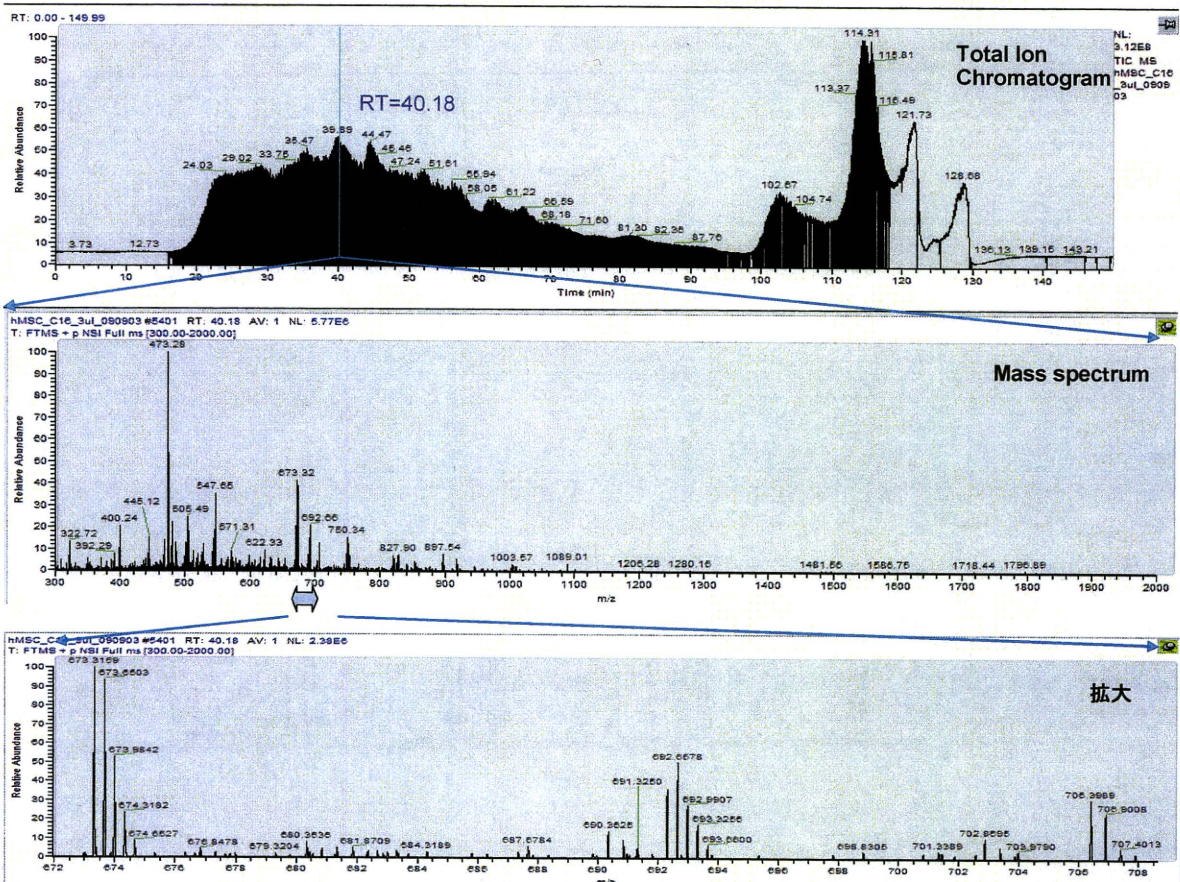


図 16 Progenesis による LC-MS データの可視化と定量比較のためのアラインメント

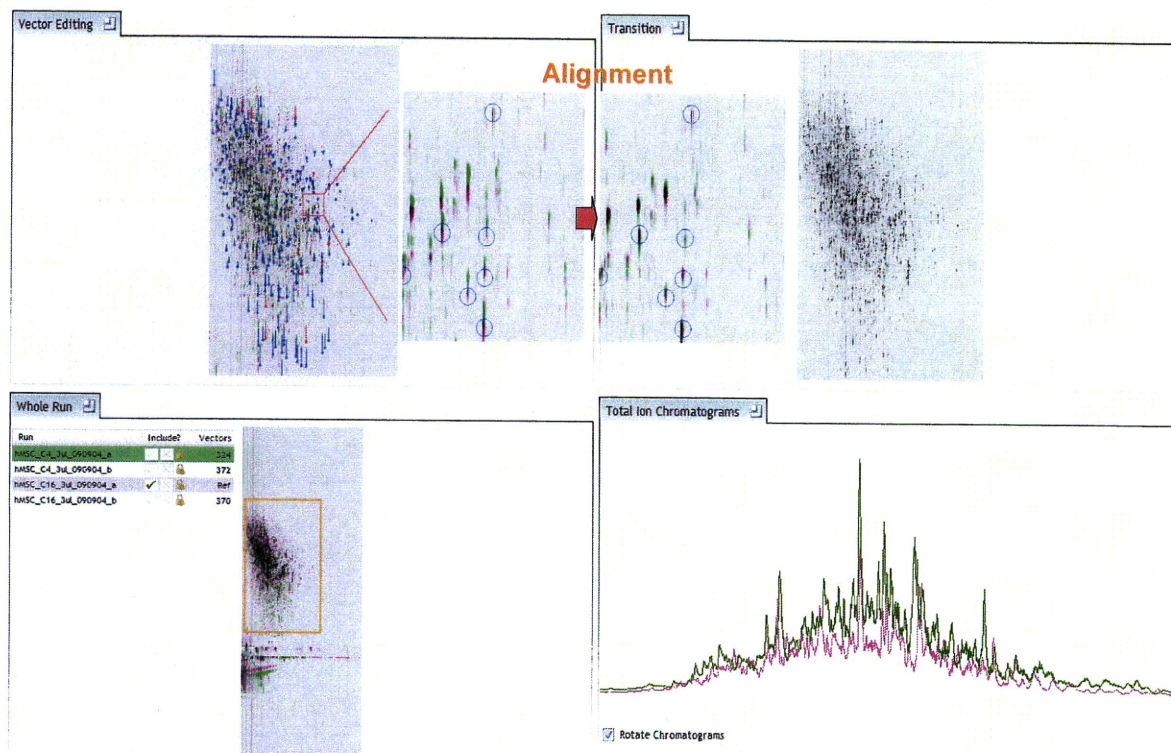


図 17 Progenesis におけるペプチドピーク検出と比較の例

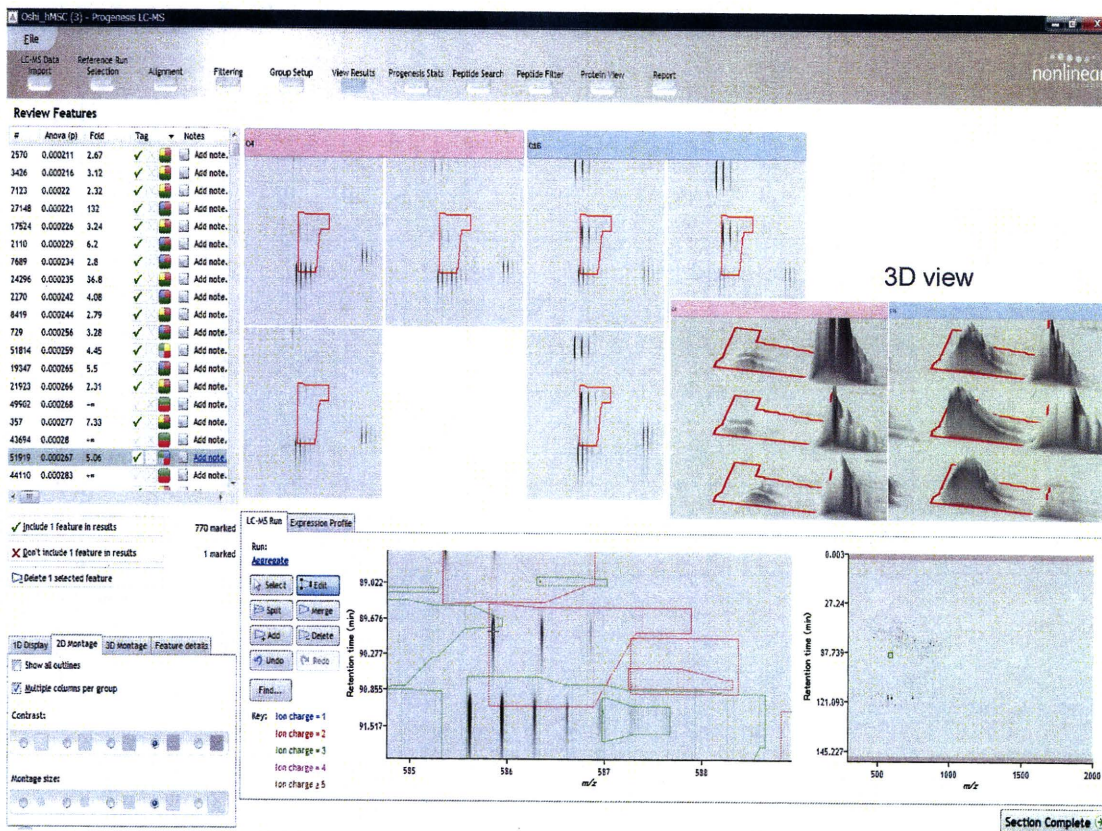


表 1 hMSC 細胞の培養過程における染色体変化の普遍性

Cell	hMSC										HSMM
Lot#	4F1127	4F0312		5F0138		4F1560		4F0591	4F0760		
Passage#	11	11	23	5	23	7	23	25	22	7	
LOH	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
Copy Number Change	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	

表 2 ロット 4F1560 株の継代過程における FISH シグナル数変化と異常頻度

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
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 3 hMSC 細胞の染色体解析用サンプル調整のための Nocodazole 処理の影響

Conc.		Time (h)				
uM	ug/ml	1	3	6	24	48
5	1.51	変化なし	細胞周辺が変化	細胞の端が剥がれる	細胞が剥れる(一部残る)	細胞が剥れる(一部残る)
1	0.30	変化なし	細胞周辺が変化	細胞の端が剥がれる	細胞が剥れる(一部残る)	細胞が剥れる(一部残る)
0.5	0.15	変化なし	変化なし	細胞周辺が変化	細胞が剥がれ始める	一部剥がれる
0.1	0.03	変化なし	変化なし	変化なし	細胞周辺が変化	一部剥がれる
0.75	0.02	変化なし	変化なし	変化なし	細胞周辺が変化	細胞周辺が変化

表 4 hMSC の自然発生小核頻度に関する予備検討

	~1/3	1/3~1/2	Multi-MN	MN	total MN	分裂期細胞	多核細胞	変形核細胞	正常細胞	カウント細胞数
hMSC F #6	8	0	3	11	11	1	3	0	489	500
	6	2	2	8	10	2	4	0	492	500
hMSC F #26	5	0	0	5	5	1	5	0	495	500
	7	0	1	8	8	3	2	0	492	500

自然小核

	~1/3	Multi-MN	total MN	カウント細胞数
hMSC F #6	14	5	19	1000
hMSC F #26	12	1	13	1000

表 6 プロテオーム解析により検出された各種 CD 抗原と間葉系幹細胞特異的表面抗原

CD antigen (description)		proteome解析	hMSCマーカー
CD13	alanyl (membrane) aminopeptidase	+	+
CD14	CD14 antigen	-	-
CD29	integrin; beta 1	+	+
CD34	CD34 antigen	-	-
CD44	CD44 antigen	+	+
CD45	protein tyrosine phosphatase; receptor type, C	-	-
CD51	integrin; alpha V	+	
CD59	CD59 antigen p18-20	+	
CD63	CD63 antigen (melanoma 1 antigen)	+	
CD71	transferrin receptor (p90; CD71)	+	+
CD73	5'-nucleotidase; ecto	+	+
CD81	CD81 antigen (target of antiproliferative antibody 1)	+	
CD90	Thy-1 cell surface antigen	+	+
CD91	low density lipoprotein-related protein 1	+	
CD98	solute carrier family 3, member 2	+	
CD105	endoglin	+	+
CD107a	lysosomal-associated membrane protein 1	+	+
CD107b	lysosomal-associated membrane protein 2	+	+
CD166	activated leukocyte cell adhesion molecule	+	+
CD225	interferon induced transmembrane protein	+	
CD280	mannose receptor, C type 2	+	
CD298	ATPase; Na ⁺ /K ⁺ transporting; beta 3 polypeptide	+	

表 7 同定した CD 分子種と安定同位体導入合成ペプチドの質量

CD分子種	タンパク名	アミノ酸配列(ラベル)	Original m/z	Heavy m/z
SYWC	総代で発現が上昇するタンパク質	PNSSIF(L)TDTAK	647.33 (+2)	650.85
CD13	alanyl (membrane) aminopeptidase	YLSYT(L)NPDLIR	734.40 (+2)	737.91
CD29	integrin; beta 1	SAVTTVVNP(K)	508.29 (+2)	512.30
CD44	CD44 antigen	YGFIEGH(V)VIPR	462.92 (+3)	464.93
CD71	transferrin receptor (p90; CD71)	ILNI(F)GVIK	508.83 (+2)	513.84
CD73	5'-nucleotidase; ecto	Y(P)FIVTSDDGR	635.83 (+2)	638.32
CD90	Thy-1 cell surface antigen	VTSLTACLVDQSL(R)	753.39 (+2)	758.41
CD105	endoglin	GEVTTYTTSQVS(K)	650.33 (+2)	654.33
CD107a	lysosomal-associated membrane protein 1	(P)SLVIAFGR	480.29 (+2)	483.30
CD107b	lysosomal-associated membrane protein 2	YLDVFVAV(K)	551.30 (+2)	555.31
CD166	activated leukocyte cell adhesion molecule	VLH(P)LEGAVVIFK	512.32 (+3)	514.32

¹³Cおよび¹⁵Nで標識

表 8 hMSC (Lot # E-9)の CD 抗原定量結果

antigen	Normal (m/z)	abundance	Heavy (m/z)	abundance	Ratio	Amount (pg/ng protein)
CD13	734.40	55500	737.90	287000	0.193	0.327
CD29	508.29	457000	512.30	5570000	0.082	0.139
CD44	462.92	253000	464.93	1190000	0.213	0.360
CD71	503.83	6450 *	513.84	260000 *	0.025	0.042
CD73	635.83	67100	638.32	1990000	0.034	0.057
CD90	753.39	966 *	758.41	47200 *	0.020	0.035
CD105	650.33	129000	654.33	3860000	0.033	0.057
CD107a	480.29	33400	483.29	125000	0.267	0.452
CD107b	551.30	9630	555.31	212000	0.045	0.077
CD166	512.32	27500	514.32	26900	1.022	1.729

* measured by the peak height in raw data

表 9 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 10 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部长）

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室長）

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 幹細胞を用いた再生医療の実用化には、分化後の細胞を評価する技術の開発が不可欠である。本研究では、LC/MSにより得られた幹細胞の糖鎖プロファイルは、細胞分化前後で異なることを見出した。また、糖鎖プロファイルの主成分分析 (PCA) により、MSC、神経様分化細胞及び骨分化細胞を区別できることを確認し、本分析法が MSC の分化を評価する方法として利用できる可能性があることを示した。

A. 研究目的

近年、幹細胞を培養・加工して、様々な疾患の治療に用いる細胞組織加工医薬品の開発が活発化している。本格的な実用化に向けて、分化誘導した細胞（加工細胞）の分化方向を確認するための手法の開発が求められている。

間葉系幹細胞 (MSC) は、細胞組織加工医薬品への応用が期待されている多能性幹細胞の一つであり、これまでに軟骨、骨、脂肪及び神経様細胞等に分化することが報告されている。しかし、MSC由来加工細胞の適切な分化評価法は確立されていない。

そこで本研究では、細胞組織加工医薬品の同等性評価技術を開発する一環として、MSC の分化能評価法の開発を検討した。まず、液体クロマトグラフィー／質量分析 (LC/MS) 及び同位体ラベル

化法を組み合わせた定量的糖鎖プロファイリングにより、MSC 及び MSC 由来加工細胞の糖鎖差異解析を行い、糖鎖プロファイルが分化能指標として利用できるかどうかを検証した。つぎに、糖鎖プロファイルの主成分分析 (PCA) により、MSC と MSC 由来加工細胞の識別を試みるとともに、糖鎖プロファイリングと PCA を組み合わせた手法の MSC 分化評価方法としての有用性を検証した。

略号：Fuc, フコース; Glc, グルコース; Gal, ガラクトース; Man, マンノース; GlcNAc, N-アセチルグルコサミン; NeuNAc, N-アセチルノイラミン酸; dHex, デオキシヘキソース; Hex, ヘキソース; HexNAc, N-アセチルヘキソサミン; Lac, N-アセチルラクトサミン。

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) 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 より購入した。Peptide-N-glycosidase F (PNGase F) は、Roche から購入した。

2. 細胞培養

MSC は MSCGM (基礎培地 MSCBM) に Mesenchymal cell growth supplement、L-glutamine、GA-1000 を添加で培養した (5%CO₂, 37°C)。セミコンフルエントまで培養し、EDTA 添加 PBS で洗浄を行い、Trypsin-EDTA (GIBCO) により細胞を剥離した後、約 2×10⁵ 個ずつの細胞を播種して継代培養を行った。培地交換は 2 から 4 日間に 1 回の頻度で行った。回収した細胞をプロテアーゼインヒビター (protease inhibitor mix DMSO solution, Sigma) 添加 PBS で 3 回洗浄した。

3. MSC の分化誘導

3-1. 軟骨細胞

D-MEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12、1:1 Mixture、Invitrogen) に ITS Liquid Media Supplement (Sigma-Aldrich) 及び Penicillin-Streptomycin-Glutamine 及び StemXVivo Chondrogenic Supplement (R&D Systems) をそれぞれの終濃度が 1% になるように添加したものを軟骨分化誘導培地として用いた。セミコンフル

エントまで培養した MSC を、軟骨分化誘導培地に懸濁させた後、15 ml のコニカルチューブに 2. 5×10⁵ 個の細胞を播種した。200×g で 5 分間遠心した後、インキュベーター (5% CO₂, 37°C) で 21 日間分化誘導培養した。培地交換は 2~3 日間に 1 回の頻度で行った。

3-2. 骨細胞

骨分化誘導基礎培地は α-MEM 培地 (α-Minimum Essential Medium、Invitrogen) に 10% FCS 及び 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine を添加したものをを用いた。骨分化誘導培地は骨分化誘導基礎培地に 1% の StemXVivo Osteogenic Supplement (R&D Systems) を添加したものをを使用した。

骨分化誘導基礎培地を用いて MSC をセミコンフルエントまで培養した後、4.2×10³ cell/cm² の濃度で 24 ウェルマイクロプレート (IWAKI) に播種し、50~70% コンフルエントに達するまで培養した (5%CO₂, 37°C)。骨分化誘導培地に置換した後、21 日間分化誘導培養した。培地交換は 3~4 日間に 1 回の頻度で行った。

3-3. 脂肪細胞

脂肪分化誘導基礎培地として、10% FCS 及び 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine 添加し α-MEM 培地を用いた。脂肪分化誘導培地は脂肪誘導基礎培地に 1% の StemXVivo Adipogenic supplement (R&D Systems) を添加したものをを用いた。脂肪誘導基礎培地を用いて MSC を

セミコンフルエントまで培養した後、 2.1×10^4 cell/cm²の濃度で24 ウェルマイクロプレート (IWAKI) に播種し、100% コンフルエントに達するまで培養した (5% CO₂, 37°C)。脂肪分化誘導培地に置換した後、21 日間分化誘導培養した。培地交換は 3~4 日間に 1 回の頻度で行った。

3-4. 神経様細胞

神経誘導基礎培地及び神経誘導培地として、それぞれ HyClone AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cell Expansion Kit (Thermo Fisher Scientific) 及び 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、 2×10^5 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。培地は 24 時間培養後に一回交換した。

MSC 及び分化細胞は、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (LSM 510 Carl Zeiss) により形態学的特徴を観察した。

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) を添加した PBS (pH 7.2, 日水製薬(株)) を用いて 3 回洗浄した後、Cell Lifter (Corning) を用いて回収した。洗浄済み細胞 ($2 \sim 4 \times 10^5$ 個) を、プロテアーゼインヒビターを添加した RIPA

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) 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 (50 µg) 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 ×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 により乾燥させて、糖鎖を回収した。

7. ¹²C-及び¹³C-フェニルヒドラジンによる糖鎖の標識

MSC 由来糖鎖は ¹²C-フェニルヒドラジン(PHN)で、神経様分化細胞由来糖鎖は ¹³C-PHN でそれぞれ 3 種類ずつ標識した。まず、乾燥糖鎖試料を 100 µl の H₂O で再溶解させた。次に、4 µmol の ¹²C-PHN 塩酸塩 (Aldrich) あるいは ¹³C-PHN 塩酸塩 (Cambridge Isotope Laboratories)、及び 10 µmol の 2-ピコリンボラン (純正化学) 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×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、H₂O 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. 還元化糖鎖の調製

乾燥糖鎖試料を 500 µl の 0.5 M NaBH₄ 溶液を加えて、糖鎖を溶解させた後、室温で 16 時間還元した。反応溶液を中和した後、還元化糖鎖の回収は、グラファイトカーボン樹脂を固定相とし

た ENVI Carb C カートリッジ (Supelco) を用いて行った。カートリッジは 1 ml の 100% アセトニトリル、50% アセトニトリル及び H₂O で、それぞれ 2 回ずつ洗浄した。試料溶液を注入して、糖鎖を樹脂に吸着させた。1 ml の H₂O で樹脂を洗浄した後、1.5 ml の 45% アセトニトリル溶液で糖鎖を溶出させた。得られた溶液の Speed Vac 及び凍結乾燥により還元化糖鎖試料を調製した。

9. LC/MS

液体クロマトグラフィー (LC) は Paradigm MS4 (Michrom BioResources) を使用した。溶離液は 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) 装置はナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源 (AMR) を接続した Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR-MS) (装置名: 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 ラベル化糖鎖及び還元化糖鎖の分析で用いたカラム、グラジュエント条件、シングル MS 及び多段階 MS (MS/MS ~MS/MS/MS/MS) 測定条件は、以下の通りであった。

9-1. PHN 標識糖鎖の分析

カラム: C30 (Develosil Packed Column, 0.075×150 mm, 粒子径 5µm, 野村化学)

トラップカラム：C18 (L-Culmn, 0.3×5.0 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：2–45%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/MS~MS/MS/MS/MS 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/MS~MS/MS/MS/MS の衝突エネルギー (コリジョンエネルギー)：25%

9-2. 還元化標識糖鎖の分析

カラム：グラファイトカーボンカラム (HyperCarb, 0.1×150 mm, 粒子径 5 μ m, Thermo Fisher Scientific)

トラップカラム：グラファイトカーボンカラム (HyperCarb, 0.3×5.0 mm, 粒子径 7 μ m, Thermo Fisher Scientific)

グラジュエント条件：5–60%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/MS~MS/MS/MS/MS 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：200°C

スプレー電圧：2.5kV

MS/MS~MS/MS/MS/MS の衝突エネルギー (コリジョンエネルギー)：25%

18. 主成分分析 (PCA)

LC/MS 解析により得られ各糖鎖のピ

ーク面積データを用いて、多変量解析ソフト Simca-P+ (Umetrics, Sweden) により、第 2 主成分まで計算して PCA を行った。尚、ポジティブイオンモードで測定した LC/MS では N アセチルノイラミン酸が付加した高分岐複合型糖鎖の検出が困難であったことから、ネガティブイオンモードで測定したデータを用いた。

C. 結果

1.MSC の多分化能確認

MSC の多分化能を確認するために、MSC を軟骨、骨、脂肪及び神経様細胞に分化誘導後、顕微鏡により形態学的な変化を観察した。図 2 は、MSC、軟骨細胞誘導後に形成された不溶性凝集塊軟骨、骨、脂肪、及び神経様細胞の顕微鏡写真である。MSC (図 2A) を軟骨細胞へ分化誘導すると、2 日目から細胞は丸みを帯び始め、分化誘導後 20 日前後になると球状の凝集塊 (軟骨) が形成された (図 2B)。骨細胞への分化誘導では、14 日目からミネラルの沈着が観察され、21 日目には、細胞の約 70% にカルシウムの沈着がみられた (図 2C)。脂肪細胞への分化では、誘導開始 7 日目から脂肪滴が観察され始め、21 日目には多くの細胞で脂肪滴の蓄積が観察された (図 2D)。図 2E は MSC を神経様細胞に分化誘導後 2 日目の細胞である。細胞質部分の繊維状から球状への変化、及び突起の伸長が観察され、神経細胞の形態学的な特徴を有していることが確認された。本研究で用いた細胞株が多分化能を有することが確認された。

2. 定量的糖鎖プロファイリングによる MSC 及び神経様分化細胞の糖鎖差異解析

これまでに我々は、 ^{13}C 標識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きた。この方法は、一方の糖鎖試料を ^{13}C 標識 PHN で、もう一方の試料を未標識 (^{12}C) PHN でラベルしてその等量混合物を LC/MS で分析し、検出された各糖鎖のピーク強度比に基づき、サンプル間の比較定量を行うものである(図 3)。そこで定量的糖鎖プロファイリングにより、MSC 及び MSC 由来加工細胞の糖鎖差異解析を行い、糖鎖プロファイルの変化を検討した。モデル加工細胞として神経様分化細胞を用いた。MSC 及び神経様分化細胞をそれぞれ ^{12}C -PHN 及び ^{13}C -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た糖鎖試料溶液につき定量的糖鎖プロファイリングを行った(図 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。

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 MS/MS \sim MS/MS/MS/MS で取得されたプロダクトイオンスペクトルを解析した結果、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 \sim 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、Lac を有する糖鎖、さらには複合型 3 本鎖糖鎖に 4 個の NeuNAc が付加した糖鎖が認められた。

2-2. 糖鎖分布

次に、MSC 及び神経様分化細胞の糖鎖分布を比べるため、試料 1 \sim 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 及び神経様分化細胞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%; 神経様分化細胞, 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%; 神経様分化細胞, 8%); dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc2 (MSC, 14%; 神経様分化細胞, 16%); dHex1Hex6HexNAc5 (Lac) (MSC, 12%; 神経様分化細胞, 13%))。

MSC と神経様分化細胞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%; 神経様分化細胞, 2%);

Hex6HexNAc5NeuNAc4(MSC, 2%; 神経様分化細胞, 0.6%)) であり、神経様分化細胞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た(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、特に神経様分化細胞における dHex1Hex8HexNAc7NeuNAc2 (Lac) (MSC, 0.4%; 神経様分化細胞, 0.7%) の存在比率は、MSC の 1.5 倍であった。MSC あるいは神経様分化細胞にのみ発現している糖鎖は見つからなかった。

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 (Hex6HexNAc5NeuNAc3-4) 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。

3. 糖鎖プロファイリング及び PCA による MSC 分化評価法の開発

定量的糖鎖プロファイリングにより、MSC と加工細胞で糖鎖プロファイルが

変化することが確認された。糖鎖プロファイルは分化前後の細胞を区別するための指標として利用できる可能性がある。そこで次ぎに、LC/MS による糖鎖プロファイリングと PCA を組み合わせた手法の MSC 分化評価法としての有用性を検討した。

3-1. LC/MS による MSC 及び加工細胞の糖鎖プロファイリング

3-1-1. 糖鎖構造解析

加工細胞のモデルとして、神経様分化細胞及び骨分化細胞を用いた。MSC 及びモデル加工細胞から調製した糖鎖を還元した後、タンパク質量に換算して 5µg 相当の還元化糖鎖を LC/MS 及び MS/MS~MS/MS/MS/MS により分析した。図 8A は、MSC 由来還元化糖鎖の 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。FT-MS を用いたシングル MS スキャンにより測定された精密質量と MS/MS~MS/MS/MS/MS で検出されたフラグメントイオンの帰属により糖鎖構造を推定した結果、19~21 分、20~21 分、及び 21~23 分にそれぞれ 7 種類の高マンノース型糖鎖、3 種類の混成型糖鎖、及び 7 種類のパウチマンノース型糖鎖が溶出されていることが明らかとなった。また、複合型糖鎖については、0~2 分子の NeuNAc と 0~1 分子の Fuc が付加した 2 本鎖糖鎖、0~4 分子のシアル酸と 0~1 分子のフコースが付加した 3 及び 4 本鎖糖鎖 (又は Lac 付加 2 及び 3 本鎖糖鎖) を含む 29 種類 (異性体を含む) の糖鎖が、20~32 分に

かけて溶出されていることが確認された。その他、興味深い複合型糖鎖としては、フコースを2分子有する複合型2本鎖糖鎖、及び3本鎖（又はLac付加2本鎖）糖鎖に4分子のNeuNAcが付加した糖鎖が検出された。

同様に、神経様分化細胞及び骨分化細胞から調製した還元化糖鎖について解析した結果、MSCと比較して検出された糖鎖の種類に違いは認められなかった。

しかし、複合型糖鎖が溶出される位置のベースピーククロマトグラムの形状に違いがみられたことから、複合型糖鎖の結合量が異なる可能性が示唆された（図8B, 8C）。

3-1-2. 糖鎖分布の比較

(1) MSC 及び神経様分化細胞の比較

MSC 及び神経様分化細胞の糖鎖分布を比較するために、還元化糖鎖のピーク面積を求め、糖鎖分布を比較した。まず、ポジティブイオンモード測定により取得されたデータを用いて主に高マンノース型、混成型及びパウチマンノース型糖鎖のピーク面積を比較した結果、両者に顕著な差は認められなかった（図9）。次に、ネガティブイオンモード測定により取得されたデータを用いて、主に複合型糖鎖のピーク面積を比較した結果、神経様分化細胞において1分子のシアル酸及びフコースが付加した複合型2本鎖糖鎖（dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1）、1～3分子のシアル酸及び1分子のフコースが付加した複合型3本鎖（又はLac付加2本鎖）糖鎖（dHex1Hex6HexNAc5NeuNAc1-3）及び1

～3分子のシアル酸及び1～2分子のフコースが付加した複合型4本鎖（又はLac付加3本鎖）糖鎖（dHex1Hex7HexNAc6NeuNAc1-2）の結合量が増加していた。一方、シアル酸が3及び4分子のシアル酸が付加した複合型3本鎖（又はLac付加2本鎖）糖鎖（Hex6HexNAc5NeuNAc3-4）の結合量は、神経様分化細胞で減少していた（図10）。

(2) MSC 及び骨分化細胞の比較

ポジティブイオンモード測定により取得されたデータを用いて高マンノース型、混成型及びパウチマンノース型糖鎖のピーク面積を比較した結果、高マンノース型糖鎖（M10）及び一部のパウチマンノース型糖鎖（Hex3HexNAc2及びdHex1Hex3HexNAc2）の結合量が僅かに変化していたが、他に顕著な差は認められなかった（図11）。一方、ネガティブイオンモード測定により得られた複合型糖鎖のピーク面積を比較した結果、神経様分化細胞において3～4分子のシアル酸が付加した複合型3本鎖（又はLac付加2本鎖）糖鎖（Hex6HexNAc5NeuNAc3-4）の結合量が著しく増加していた（図12）。また、2～3分子のシアル酸及び1分子のフコースが付加した複合型糖鎖（dHex1Hex6HexNAc5NeuNAc2-4、dHex1Hex7HexNAc6NeuNAc2-4）の結合量についても骨分化細胞で増加する傾向がみられた。

3-2. PCA による細胞の区別

まず、MSC 及び神経様分化細胞の糖

鎖分布の比較 (図 13) に使用した各糖鎖のピーク面積の情報を用いて PCA を行った。スコアプロット (図 13A) に示したように、両細胞は分離してプロットされ、N 結合型糖鎖の分布を指標として MSC と神経様分化細胞を区別することができた。また、ローディングプロットの結果から、MSC では Hex6HexNAc5NeuNAc3-4、神経様分化細胞では dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1、dHex1Hex6HexNAc5NeuNAc1 及び dHex1Hex7HexNAc6NeuNAc2 の結合量が多く、これらの糖鎖が両細胞の分離に関与していることが確認された (図 13B)。

つぎに、MSC 及び骨分化細胞の糖鎖分布の比較 (図 14) に使用した糖鎖ピーク面積情報を用いて PCA を行った。その結果、スコアプロットにおける両細胞の分離度は良好であった。また、ローディングプロットの結果から、骨分化細胞では Hex6HexNAc5NeuNAc3-4 の結合量が多く、これらの糖鎖が両細胞の分離に関与していることが明らかとなった (図 14A,14B)。

さらに、MSC、神経様分化細胞、及び骨分化細胞の糖鎖ピーク面積情報を用いて PCA を行った (図 15)。スコアプロットでは、3 種類の細胞は分離してプロットされること、また骨分化細胞は神経様分化細胞よりも MSC から離れた位置にプロットされることが確認された (図 15A)。また、ローディングプロットにより、MSC では dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1、骨分化細胞では Hex6HexNAc5NeuNAc3-4 の結合量が多

く、これらの糖鎖が 3 種類の細胞の分離に関与していることが明らかとなった (図 15B)。

D. 考 察

1. 定量的糖鎖プロファイリングによる MSC 及び神経様分化細胞の糖鎖差異解析

定量的糖鎖プロファイリング法を用いて、MSC 及び神経様分化細胞の糖鎖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、分岐鎖が伸長される。一方、Lac 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、側鎖が伸長する。これらの結果から、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。

神経細胞に特徴的に発現している糖鎖として、HNK-1 糖鎖やポリシアル酸付加糖鎖が知られているが (Morita, I., *et al. J. Biochem.*, 2008; Yanagishita, M., *et al. Glycobiology* 2007)、これらの糖鎖は検出されなかった。HNK-1 糖鎖やポリシアル酸付加糖鎖は、神経回路形成や神経細胞接に関係することが示唆されていることから、本研究で調製した神経様分化細

胞は、機能的には未成熟な段階の細胞である可能性が示唆された。

2. 糖鎖プロファイリング及びPCAによるMSC分化評価法の開発

2-1. LC/MSによるMSC及び加工細胞の糖鎖プロファイリング

MSC及び加工細胞から還元化糖鎖を調製して、LC/MSにより糖鎖プロファイリングを行った結果、MSCを神経様細胞に分化させると、

dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1及び

dHex1Hex6HexNAc5NeuNAc1-3の結合量が増加すること、及び

Hex6HexNAc5NeuNAc3-4が減少することを明らかにした。この結果は、定量的糖鎖プロファイリングの結果とよく一致していた。

MSCを骨細胞に分化させたときの糖鎖分布の変化については、Heiskanen, A.ら(*Glycoconj. J.*, 2009)が、MSCを骨分化させると、高マンノース型糖鎖の結合量が減少し、dHex0-1Hex5HexNAc4、dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1及びdHex0-1Hex6HexNAc5の結合量が増加することを報告している。本研究では、dHex0-1Hex5HexNAc4、dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1及びHex6HexNAc5については同じ傾向を示したが、高マンノース型糖鎖及びdHex1Hex6HexNAc5の変化はみられなかった。さらに、最も変化のみられたHex6HexNAc5NeuNAc3-4はHeiskanenらの報告では検出されていなかった。この原因としては、MSCの細胞株や分化誘導法等の違いが考えられた。

5-2. PCAによる細胞の区別

本研究では、糖鎖分布の比較に使用した糖鎖のピーク面積情報を用いてPCAを行い、分化前後の細胞の識別を試みた。スコアプロットにおいて、神経様分化細胞及び骨分化細胞はMSCとは異なる位置にプロットされることが確認され、LC/MSによる糖鎖プロファイリングとPCAを組み合わせた手法は、幹細胞と加工細胞の識別方法として有用であることが確認された。

E. 結論

(1) 定量的糖鎖プロファイリングにより、MSCの神経様分化前後の細胞で糖鎖プロファイルが変化することを明らかにした。(2) 糖鎖プロファイルの主成分分析(PCA)により、MSC、神経様分化細胞及び骨分化細胞を区別できることを確認した。糖鎖プロファイリングとPCAを組み合わせた手法は、MSCの分化能を評価する方法として利用できる可能性が実証された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Harazono A, Kawasaki N, Itoh S, Hashii N, Matsuishi-Nakajima Y, Kawanishi T, Yamaguchi T. Simultaneous glycosylation analysis of

- human serum glycoproteins by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*,869, 20-30 (2008).
- 2) Itoh S, Hachisuka A, Kawasaki N, Hashii N, Teshima R, Hayakawa T, Kawanishi T, Yamaguchi T. Glycosylation analysis of IgLON family proteins in rat brain by liquid chromatography and multiple-stage mass spectrometry. *Biochemistry*, 47, 10132-54 (2008).
 - 3) 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).
 - 4) 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).
 - 5) 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) 橋井則貴, 川崎ナナ, 篠原 聡, 秦 艶, 黄 笑宇, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖を指標とした細胞治療薬の特性解析. 日本薬学会第 129 年会, 京都 (2009 年 3 月)
 - 2) 橋井則貴, 川崎ナナ, 篠原 聡, 秦 艶, 黄 笑宇, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖プロファイルを指標とした細胞治療薬の特性解析. 第 8 回日本再生医療学会総会, 東京 (2009 年 3 月)
 - 3) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 篠原聡, 山口照英: ヒト間葉系幹細胞の Thy-1 の糖鎖構造解析. 第 81 回日本生化学会大会, 神戸 (2008 年 12 月)
 - 4) 橋井則貴, 川崎ナナ, 中島紫, 伊藤さつき, 山口照英: d5-フェニルヒドラジンを用いた同位体標識法及び液体クロマトグラフィー/質量分析による糖鎖の定量解析. 第 81 回日本生化学会大会, 神戸 (2008 年 12 月)
 - 5) 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 年 12 月)
 - 6) Hashii, N., Huang, X., Kawasaki, N., Yamaguchi, T.: Differential glycan analysis during neural differentiation of human mesenchymal stem cells by quantitative glycan profiling using liquid chromatography/mass spectrometry. The 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010)