

図 27. 種々の細胞における PI3K アイソフォームの発現

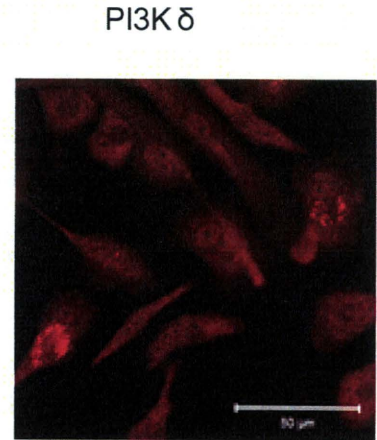


図 28. AC133 由来 Early EPC における p110 PI3K δ の発現

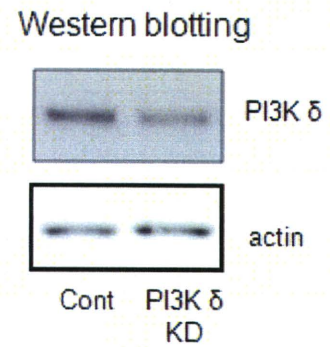
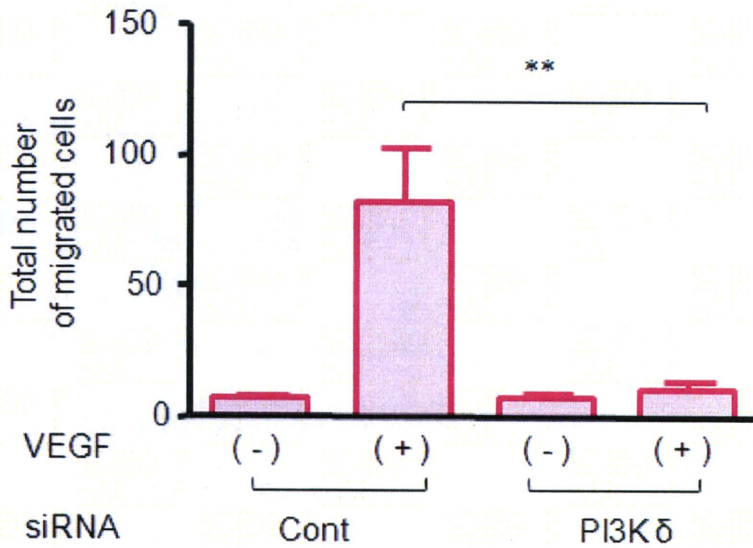


図 29. VEGF に誘導される Early EPC の遊走に対する p110 PI3K δ siRNA の効果

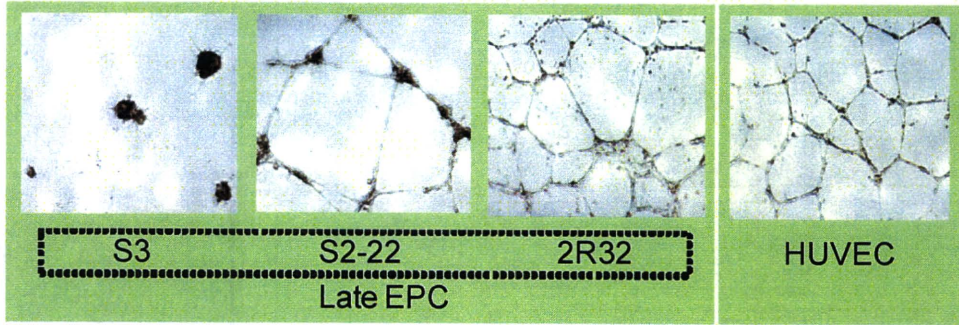


図 30. 種々の late EPC の *in vitro* 管腔形成能

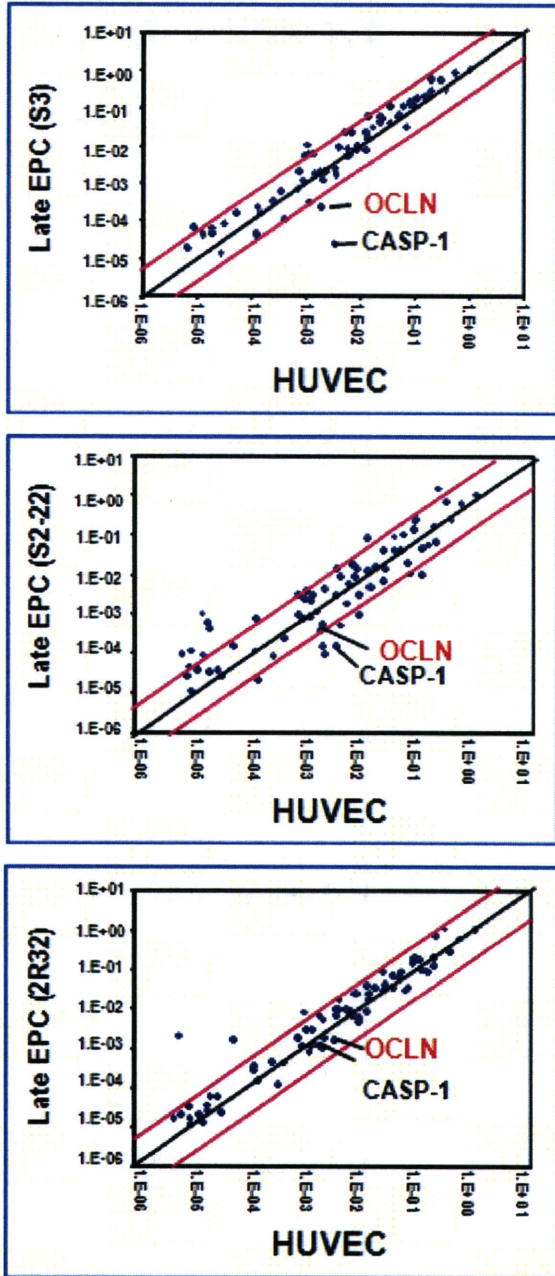


図 32. LateEPCとHUVECにおける  
遺伝子発現プロファイル比較

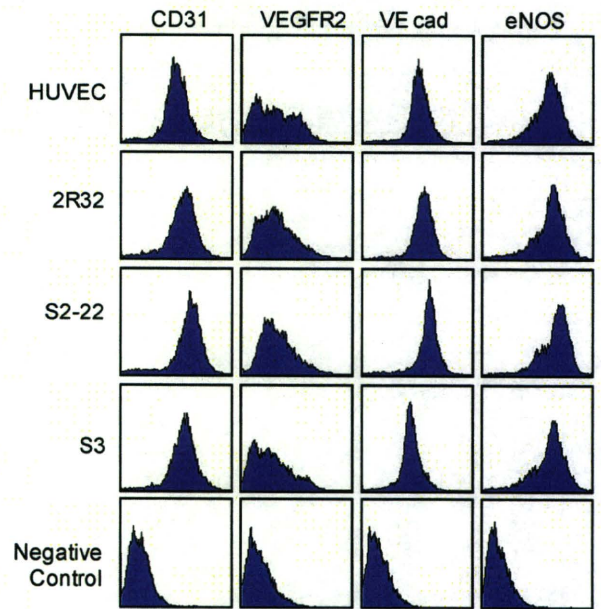


図 31. 種々の late EPC における血管内皮細胞  
マーカー分子の発現

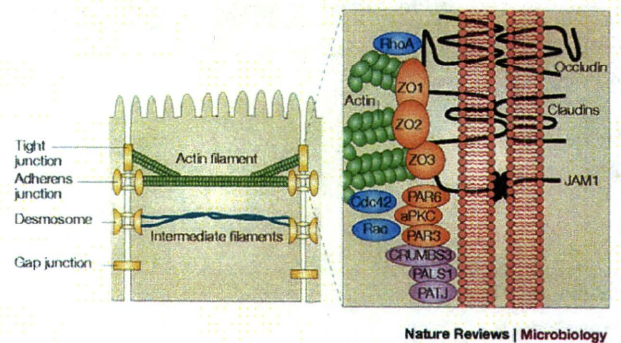


図 33. Tight Junction タンパクとして  
働くオクルディン

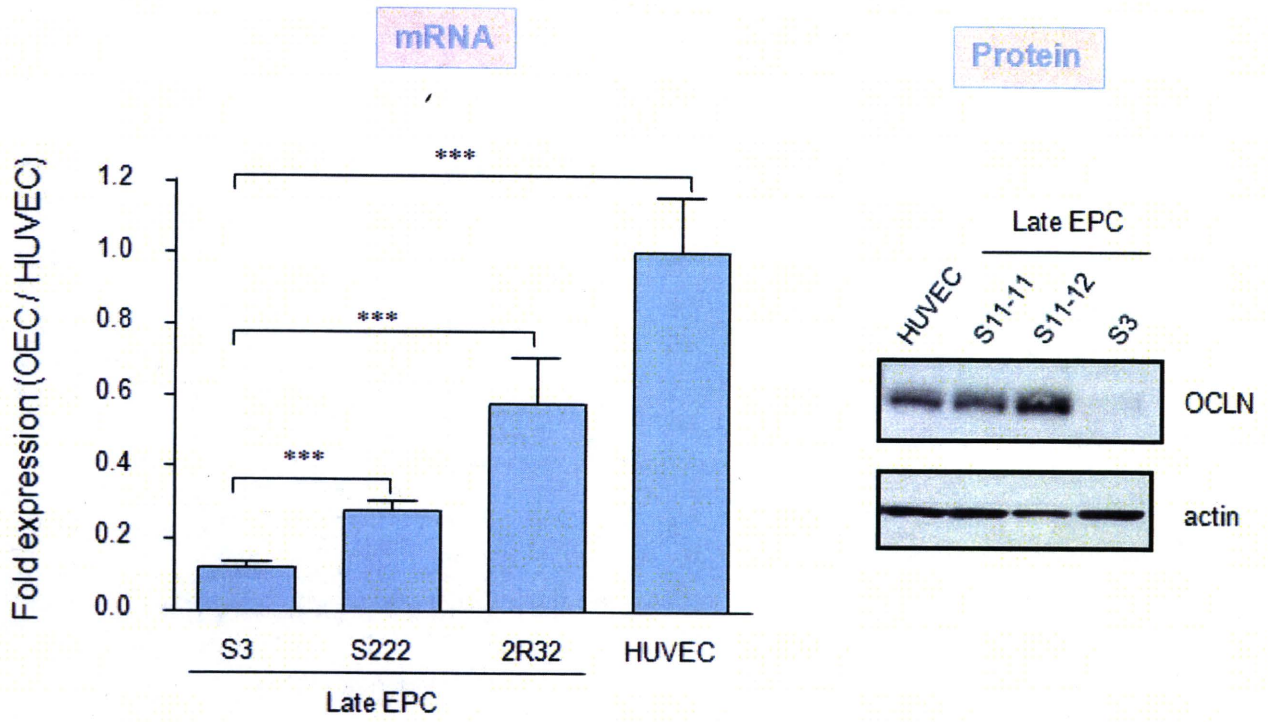


図 34. Late EPC におけるオクルデインの mRNA 及びタンパク質発現

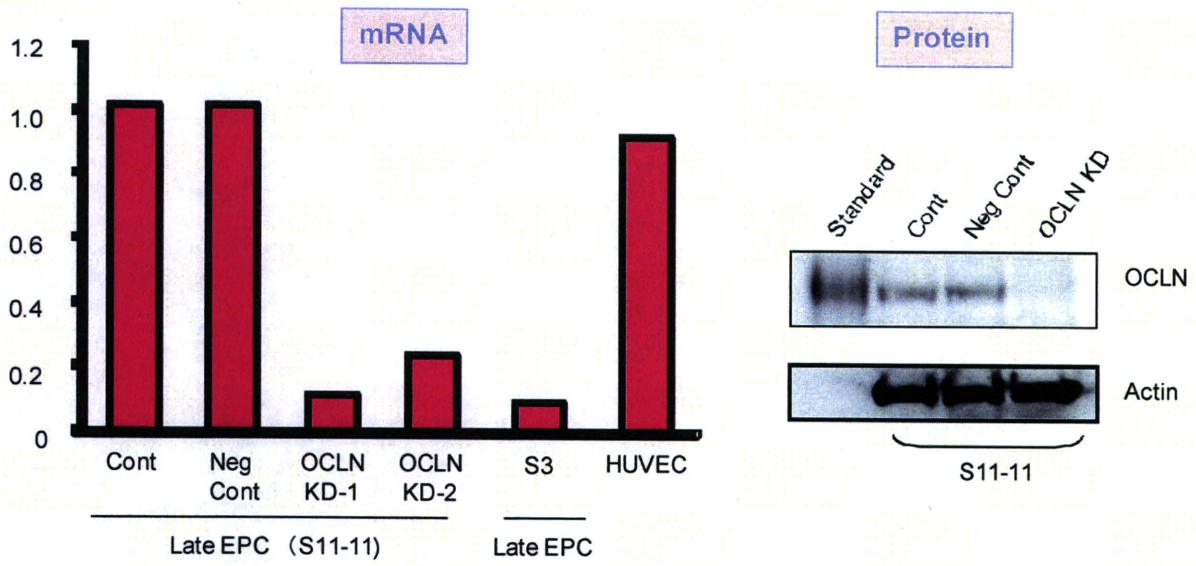


図 35. siRNA によるオクルデインの mRNA 及びタンパク質量の変化

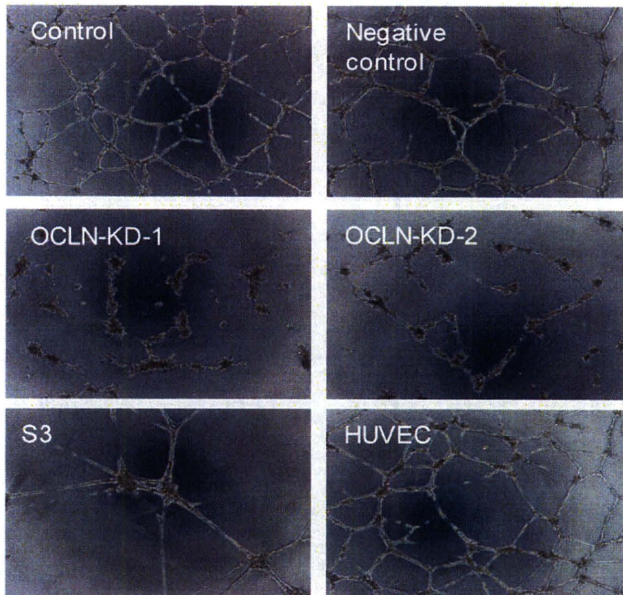


図 36. オクルディン siRNA による管腔形成の抑制

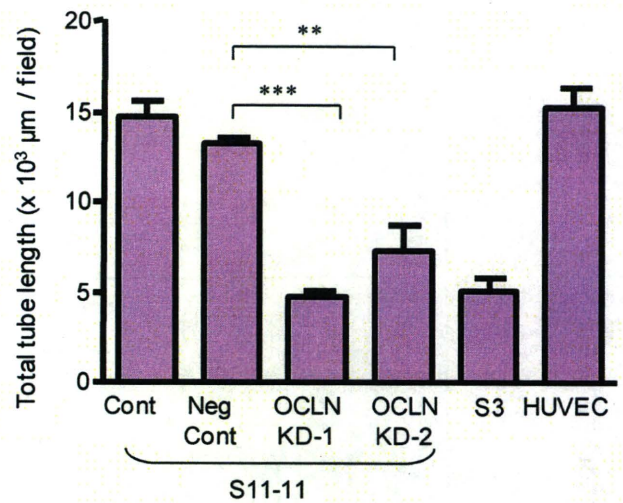


図 37. オクルディン siRNA による管腔形成抑制の定量評価

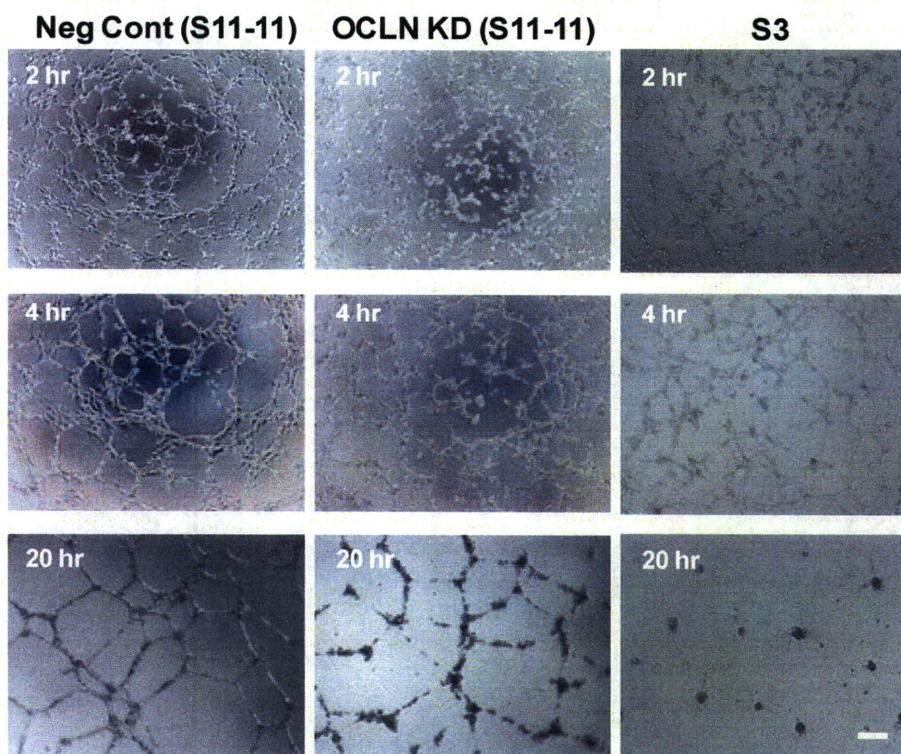


図 38. オクルディン siRNA の管腔形成への影響の経時的観察

## 研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
分担研究報告書

人工多能性幹細胞の品質・安全性に関する研究

京都大学 物質-細胞統合システム拠点/再生医科学研究所 山中 伸弥

研究要旨：細胞組織加工医薬品に供する細胞資源として、人工多能性幹細胞（iPS細胞）の期待が集まっている。iPS細胞は、容易に自己由来多能性幹細胞をもたらす画期的細胞制御技術であるが、現段階では樹立・作製法の改良はもとより、日本人由来iPS細胞の特性把握が必要である。本分担研究では、特に細胞の同一性・同等性評価法の開発、特性解析法の開発を行った。様々な年齢の日本人の線維芽細胞から樹立したiPS細胞は、形態学的特、ES細胞マーカー、細胞表面抗原、*in vitro*および*in vivo*の分化能の点で、ほぼ同様であり、ES細胞に比肩するものであった。また、ヒトiPS細胞の細胞表面抗原に基づく細胞評価法や、DNAマイクロアレイによる特性解析法について、基盤的知見が得られた。

### A. 研究目的

細胞組織加工医薬品は、様々な難治性疾患に対して有効な治療法をもたらすと期待される一方、未知・未経験な要素が多く本格的な実用化に至るために検討すべき課題はまだ数多い。細胞組織加工医薬品は、非常に複雑な構造と「生きている」とうこれまでの医薬品にない性質から、新たな特性解析技術や品質管理法の開発、あるいは安全性確保のための適切な評価技術の開発が望まれている。数多くある細胞資源において、特に、2007年11月に本邦で世界に先駆けて樹立されたヒト体細胞由来の人工多能性幹細胞（iPS細胞）については、容易に自己由来多能性幹細胞をもたらす画期的技術である一方で、現段階では樹立・作製法の改良はもとより、日本人由来iPS細胞の特性把握が必要である。本分担研究ではiPS細胞をベースにした細胞組織加工医薬品の品質

・安全性の確保を目的として、（1）ウイルス安全性確保を目的とした、核酸増幅法（NAT）によるウインドウ期や低濃度キャリアーの高感度ウイルススクリーニング法の開発およびNATのバリデーション手法の標準化に関する研究、（2）細胞表現型プロファイリングによる細胞の同一性・同等性評価法の開発、（3）細胞組織加工医薬品の特性解析法の開発および製造方法・規格設定の評価手法の開発に関する研究を行う。これらの研究によって、iPS細胞に立脚した将来の細胞組織加工医薬品に発展させる知見をもたらし、安全性確保や品質管理法の開発に寄与出来るものと期待される。

### B. 研究方法

- 1) 高感度ウイルススクリーニング法や感染性因子の迅速法の開発  
感染性因子に関する安全性確保の一環と

して、ポリエチレン磁気ビーズを用いたヒト肝炎ウイルス等の濃縮法等と核酸増幅法 (NAT) を組み合わせることにより、ウィンドウ期や低濃度キャリアーの高感度ウイルススクリーニング法の開発を行う。

また、無菌試験の迅速法の基盤技術開発を行う。これらに成果に基づいて日米欧のウイルス検出のためのNATガイドラインによるバリデーション手法への適用やマイコプラズマへの応用について検討を行う。

## 2) 細胞の同一性・同等性評価法の開発

細胞の培養、増幅、加工過程を通じての細胞の恒常性や、目的とする細胞への分化誘導による特性の付与を、細胞表面糖鎖の恒常性・変化から適切に捉えるために、網羅的な全細胞糖鎖の解析法を開発する。同時に、開発した糖鎖プロファイリング技術を細胞特性解析、がん化予測法開発、製造工程由来不純物検出法開発等への応用に関する研究を行う。

## 3) 特性解析法の開発

細胞治療薬は有効性・安全性に関わる品質特性の評価法開発の一環として、ヒト血管内皮前駆細胞やヒト間葉系幹細胞、さらにはiPS細胞由来機能性細胞を用いて、その品質を評価するための特性指標を探索する。DNAマイクロアレイ、プロテインアレイ等を利用した細胞特性指標探索法としての有用性を評価する。開発した小型マイクロアレイを含め特性指標探索法の標準化に必要な要素を明らかにし、指針等への反映を目指す。

(倫理面への配慮)

iPS細胞のソースとして、日本人線維芽細

胞は適切な手続きをとって公的リソースバンクなどから入手使用した。実験動物に対しては、無用な苦痛を与えずに細胞投与などの処置を行い、検体採取時には安楽死させ、無用な苦痛を与えないようガイドラインに従って取り扱った。

## C. 研究結果

### 1) 高感度ウイルススクリーニング法や感染性因子の迅速法の開発

担当する研究3課題のうち、他2課題を優先させており、本研究の成果は次年度以降、報告を行う。

### 2) 細胞の同一性・同等性評価法の開発

これまで分担者が報告したヒトiPS細胞は白人由来のものであり、本邦にてiPS細胞に立脚した将来の細胞組織加工医薬品に発展させるには、日本人由来iPS細胞に関する知見が必要である。そこで、6歳から81歳の男女に由来する線維芽細胞を入手し、レトロウイルスベクターによりOct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycを導入し、iPS細胞を樹立した。これらのiPS細胞のコロニーは典型的なヒトES細胞様の形態を示した。RT-PCRにより、ES細胞マーカーの発現は、ヒトES細胞や、私達の既報の白人由来iPS細胞と同様であった。本研究項目の解析対象である細胞表面抗原について、全日本人iPS細胞について、SSEA-1、SSEA-3、およびTRA-1-81などに対する抗体で染色を行ったところ、それらの結果は、ES細胞と同様であることが明らかとなった。継代を行っていても、これらの特徴が同様に保持されるのか詳細に調査する。また、いくつかの年齢の異なるiPS細胞について胚葉体形成法による*in vitro*分化能や、SCIDマウス移植によるテラ

トーマ形成法で*in vivo*分化能を調べたが、多能性の観点で年齢差は認められなかった。

### 3) 特性解析法の開発

上述の日本人 iPS 細胞を用いて品質特性の評価法開発の一環として、まず DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。Cyanine 3 で標識したトータル RNA を調製し、全ヒトゲノムマイクロアレイにハイブリダイズさせ、解析データ解析をヒートマップなどにまとめた。その結果、線維芽細胞と iPS 細胞は非常に遺伝子発現が異なることが明らかとなった。一方、iPS 細胞間および iPS 細胞と ES 細胞間の違いは極めて小さかった。今後、iPS 細胞を分化誘導させて得られる様々な系譜の細胞について同様の解析を行っていき、細胞機能との相関を調べ、DNA マイクロアレイの細胞評価における有効性を検証していく予定である。

### D. 考察

iPS細胞は、個人の年齢や性別にかかわらず樹立が可能であった。樹立された日本人iPS細胞は、形態学的特徴、ES細胞マーカー、細胞表面抗原、*in vitro*および*in vivo*の分化能の点で、ほぼ同様であり、ES細胞に比肩するものであった。今回は、樹立直後の細胞の解析であったが、継代を重ねていった場合、核型も含めて細胞表面抗原や網羅的遺伝子発現状況などに変動がないか研究を行っていく。

### E. 結論

iPS細胞は、体細胞をES細胞に近似させ

る細胞制御技術である。今回、様々な年齢の日本人からもiPS細胞の樹立は可能であり、それらの特性差は極めて小さいことが確認された。本邦におけるiPS細胞に立脚した細胞組織加工医薬品の開発に資する基盤的知見が得られた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Aiba, K., Nedorezov, T., Piao, Y., Nishiyama, A., Matoba, R., Sharova, LV., Sharov, AA., Yamanaka, S., Niwa, H., and Ko, MS. Defining developmental potency and cell lineage trajectories by expression profiling of differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res in press*, 2008.
2. Okita, K., Nakagawa, M., Hong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322: 949-953, 2008.

#### 2. 学会発表

Takahashi, K., Yokura, M., Okada, A., Tanaka, T., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. : Induction of Pluripotent Stem Cells from Japanese Skin. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008) (2008.12.9神戸)

- ### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 「核初期化方法」(PCT/JP2008/070365)  
「Nuclear reprogramming factor and induced pluripotent stem cells」(米国出願No.12/213,035)
  
2. 「Method for nuclear reprogramming」  
(米国仮出願No.61/193,363)



研究成果の刊行に関する一覧表  
書籍

該当なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
山中伸弥	整形外科から幹細胞研究へ	証券奨学同友会報 2008	33	1-3	2009
青井貴之、山中伸弥	人工多能性 (iPS) 細胞の可能性と課題	CLINICIAN	525	22-26	2009
青井貴之、山中伸弥	iPS細胞が開く近未来の再生医療	総合臨床	58	10-14	2009
長船健二、平家俊男、山中伸弥	超高速シークエンサーを用いた幹細胞研究の今後の展開	実験医学	27	26-31	2009
八戸宏二郎、山中伸弥	iPSテクノロジーによる体細胞の多能性誘導	Medical Science Digest	35	7-8	2009
大貫茉莉、山中伸弥	iPS細胞の樹立	実験医学 別冊 培養細胞実験ハンドブック	—	274-283	2008
Okita, K., and Yamanaka, S.	Recent advance in induced pluripotent stem cells.	Inflammation and Regeneration	28	510-515	2008
山中伸弥、中川誠人	iPS細胞研究の最前線：再生医療の応用に向けて	丸善 平成21年理科学年表	—	898	2008
山中伸弥	ES細胞研究の現状と展開	日本脊椎関節炎研究会誌	1	13-18	2008
青井貴之、八戸宏二郎、山中伸弥	成体マウス肝および胃細胞からの多能性幹細胞樹立	分子消化器病	5	91-93	2008
中村友紀、山中伸弥	人工多能性幹細胞の樹立と展望	科学と生物	46	531-538	2008
吉田善紀、山中伸弥	iPS細胞 (inducible pluripotent stem cell)	Vascular Medicine	4	68-71	2008
梶原正俊、山中伸弥	iPS細胞 (人工多能性幹細胞)	Medical Practice	25	1264-1266	2008
Yamanaka, S.	Pluripotency and nuclear reprogramming	Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci	363	2079-2087	2008
吉田善紀、山中伸弥	臨床応用に向けたES/iPS細胞の研究	Angiology Frontier	7	56-59	2008
沖田圭介、山中伸弥	ヒト体細胞からのオーダーメイド多能性幹細胞の誘導法	医学のあゆみ	225	191-192	2008
福原晶子、青井貴之、山中伸弥	iPS細胞	臨床研修プラクティス	5	94-96	2008

田邊剛士、高橋和利、 山中伸弥	iPS細胞樹立の軌跡と展望	再生医療	7	83-89	2008
小柳三千代、山中伸弥	マウス繊維芽細胞培養から 誘導される多能性幹細胞	進み続ける細胞移植 治療の実際	上巻	124- 127	2008
小柳三千代、中川誠人 、山中伸弥	がん遺伝子 Myc を用いない 人工多能性幹細胞の作成	BIO INDUSTRY	4	89-95	2008

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

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

総合研究報告書

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：治療効果を有する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、その技術の実用化に向けて、特定の細胞を識別分取したり、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。一方、培養細胞膜表面上の複合糖質糖鎖は、細胞種や細胞の分化状態を反映するため細胞の品質管理・標準化のための指標として利用でき、糖鎖の迅速解析技術は再生医療技術を発展させる重要な基盤技術である。本研究では細胞表面の糖タンパク質糖鎖情報を再生医療実用化のために応用するため、ヒト培養細胞表面の糖タンパク質糖鎖の比較糖鎖プロファイリング技術を開発するとともに、糖タンパク質糖鎖の比較解析による細胞の特性解析技術として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療研究の最前線では、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を受けており、糖鎖は生体内の様々な生理機能を担い癌や感染症や免疫等様々な病気に関連することが明らかにされつつある。我が国でも糖鎖研究をポストゲノム研究における最も重要な課題の1つと位置付けている。また治療効果を有する細胞をヒト体内に移植する先端医療である「再生医療」分野でも、その技術の実用化に向けて、特定の細胞を識別分取し

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。この「再生医療」においても細胞膜表面上の糖鎖を迅速に解析、識別する方法は、細胞の品質を管理し、再生医療技術を発展させる重要な基盤技術であるが、現在のところ細胞表面の糖タンパク質糖鎖の定量的解析を達成できる技術はほとんどない。

以上のような背景の下、本研究では細胞表面の糖タンパク質糖鎖を定量的に解析するための技術として、ムチン型糖鎖とプロテオグリカン型糖鎖の2種類のO-結合型糖鎖に的を絞り開発するとともに、O-結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリングの細胞の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 2 M NaBH<sub>4</sub> (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 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 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 とし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 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。ヘパリン/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。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 μl) 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 μm、有効長 30 cm)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

### C.1 細胞ムチン型糖鎖解析技術の開発 (平成 20 年度)

コアタンパク質の Ser/Thr 残基に結合する 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。しかしながらアルカリ還元法では、糖鎖の遊離に数十時間を要し、得られる糖鎖は糖アルコールとなるため高感度検出のための誘導体化反応が行えず、N 型糖鎖の解析に比べ遅れている。我々は O-結合型糖鎖の構造解析における問題点を解決するため、誘導体化反応が可能なヘミアセタール構造を有する O-結合型糖鎖を数分以内に得ることができる高速糖鎖自動切断装置 “AutoGlycoCutter (AGC)” を開発している。そこで、AGC により得られた細胞中のムチン型糖鎖を蛍光標識後、セロトニンアフィニティークロマトグラフィー及び順相分配型 HPLC を用いてムチン型糖鎖のプロファイリング法について検討した。

最初に 4 種類の血球系癌細胞および膵臓癌細胞 2 種 (PANC1、BxPC3)、大腸癌細胞 2 種 (LS174T、HCT15)、胃癌細胞 2 種 (MKN45、MKN7) について、 $1 \times 10^6$  細胞当りのムチン型糖鎖量の比較を行った (Fig.1)。4 種類の血球系癌細胞のムチン型糖鎖の含量は上皮系細胞に比べ低かった。一方、上皮系細胞 6 種のうち、LS174T、MKN45 は血球系癌細胞の 10 倍以上のムチン型糖鎖が発現しており、細胞種によってムチン型糖鎖の含量は大きく異なることがわかった。また、

各細胞に含まれるムチン型糖鎖のプロファイルについて比較を行うと血球系癌細胞のいずれも Sialyl-T と 7Disialyl-T が主要なムチン型糖鎖であった (Fig.2、Table1)。また、HL60 については、Sialyl-T と Disialyl-T 以外に Core2 構造を基本骨格とする糖鎖も観察された (Table1)。

上皮系癌細胞に含まれるムチン型糖鎖のプロファイルについては、膵臓癌細胞 PANC1 と BxPC3、胃癌細胞 MKN7 では血球系癌細胞に似たプロファイルを示し、Sialyl-T と Disialyl-T が主要なムチン型糖鎖であった (Fig.3)。一方、他の癌細胞については、多種多様なムチン型糖鎖が観察された。次に、各癌細胞に含まれるムチン型糖鎖を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し、各分画について MALDI-TOF MS を用いて解析した (Fig.4)。膵臓癌細胞 PANC1 では、モノシアロ分画 (P-2) には Sialyl-T、ジシアロ分画 (P-4) には Disialyl-T のみが、BxPC3 ではモノシアロ糖鎖の含量が最も高く Sialyl-T と Disialyl-T の他、ムチン Core2 構造を基本骨格として持つ糖鎖も観察された (Table2)。

大腸癌細胞 LS174T は多くの種類のムチン型糖鎖を含み、37 種類のムチン型糖鎖を確認できた (Table3)。LS174T 中のムチン型糖鎖は Core2 構造を骨格とし、Gal $\beta$ 1-GlcNAc $\beta$ 1-6 側鎖上に LacNAc (Gal $\beta$ -GlcNAc) が伸張した糖鎖が多く、さらにフコースあるいは硫酸基によって修飾を受けた糖鎖が観察された (Table3)。一

方、HCT15 はムチン型糖鎖含量が低い、Sialyl-T と Disialyl-T の他、Core2 構造を骨格とするムチン型糖鎖と硫酸基が付加した糖鎖が観察された (Table3)。

胃癌細胞のうち MKN45 はジシアロ糖鎖 (M-4) が全体の 60% 以上を占め、さらにトリシアロ糖鎖 (M-5) も多く観察された (Table4)。MKN45 のジシアロ分画 (M-4) およびトリシアロ分画 (M-5) に含まれるムチン型糖鎖は LS174T と同様に LacNAc (Gal $\beta$ -GlcNAc) を数残基持つポリラクタミン型糖鎖が多く観察されたが、LS174T とは異なりフコースや硫酸基で修飾された糖鎖は全く観察されなかった (Table4)。一方、MKN7 はモノシアロ糖鎖が全体の約 75% を占め、主要なムチン型糖鎖は Sialyl-T と Sialyl-Tn であったが LacNAc を 1 残基もつ Core2 タイプの糖鎖も観察された (Table4)。

以上、平成 20 年度は細胞のムチン型糖鎖プロファイリング法について検討し、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。

### C.2 細胞 O-結合型糖鎖の分画技術の開発 (平成 21 年度)

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 21 年度は前年度開発したムチン型糖鎖プロファイリング法を、GAG 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、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる両糖鎖の分離について検討した。結果を Fig.5 に示す通り、シアリル T、ジシアリル T、ヒアルロン酸オリゴ糖を一回の分析で分離できる条件を設定することができた。

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.6 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.7, Table 5)。M1 分画ではムチン型 Core2 構造を持つ 4 糖を主とし、さらにラクタミンユニット (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.7, Table 5)。M3 分画では約 20 分にシアリル T 抗原糖鎖が観察され、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.7, Table 5)。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.7, Table 5)。一方、M6 はジシアリル T 抗原糖鎖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、不飽和二糖とし蛍光標識化し 2 糖組成分析を実施した。Fig.8 に HCT116 細胞由来の 1M NaCl 溶出分画を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.9 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、コンドロイチン硫酸類として、HCT-116 は硫酸基を持たない  $\Delta$ di-HA、 $\Delta$ diCS-0S、

$\Delta$ diCS-4S および  $\Delta$ diCS-6S、 $\Delta$ diCS-SE の 2 糖単位より構成されるコンドロイチン硫酸鎖を持つことがわかった。一方、ヘパリン/ヘパラン硫酸鎖については  $\Delta$ diHS-0S、 $\Delta$ diHS-NS、 $\Delta$ diHS-6S、 $\Delta$ diHS-2S、 $\Delta$ diHS-S1、 $\Delta$ diHS-S2、 $\Delta$ diHS-S3、 $\Delta$ 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。

以上、平成 21 年度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て細胞の O-結合型糖鎖群からムチン型糖鎖と GAGs を簡便に分画しかつ、両糖鎖を定量的に分析する方法を開発した。

### C.3 細胞 O-結合型糖鎖の比較解析 (平成 22 年度)

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.10 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.11 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.12 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。

以上、平成 22 年度は前年度までの 2 年間で開発した細胞の O-結合型糖鎖解析技術を利用し、10 種類の培養癌細胞の比較解析を実施した。その結果、ムチン型糖鎖とグリコサミノグリカン鎖の定量的な発現情報を活用すれば、遺伝子やタンパク質マーカーに匹敵する精度で細胞の個性解析が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た。結果、

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技術は、そのような条件を充たし、再生医療研究の基盤技術としてだけでなく、再生医療実用化研究にブレークスルーをもたらす技術として期待できる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

*J. Proteome Res.* 2009, *in press*

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.

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.

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.

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

### Ion-pair

#### Chromatography/ESI-IT-TOF MS

を用いるグリコサミノグリカン類の  
構造解析

木下充弘、梶直孝、劉人慈、山田佳太、早川堯夫、掛樋一晃

第 28 回日本糖質学会 つくば

ヒト血清糖タンパク質糖鎖の網羅解

析：糖鎖バイオマーカーの可能性

山田佳太、渡部沙木絵、大西康太、山本晃祐、木下充弘、森嶋祥之、早川堯夫、掛樋一晃

第 28 回日本糖質学会 つくば

キャピラリー電気泳動を用いる O-

結合型糖鎖の高速プロファイリング

山田佳太、木下充弘、米澤 傑、早川堯夫、掛樋一晃

第 28 回日本糖質学会 つくば

ヒト血清糖タンパク質糖鎖の網羅解

析：糖鎖バイオマーカーの可能性

山田佳太、渡部沙木絵、大西康太、山本晃祐、木下充弘、森嶋祥之、早川堯夫、掛樋一晃

BMB2008 横浜

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

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 **Polylactosamine-Carrier  
Protein** のグリコプロテオーム解  
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

ヒト組織球性リンパ腫細胞に発現す  
る **Polylactosamine-Carrier  
Protein** のグリコプロテオーム解

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