

<p>Wang S, Kawashima N, Sakamoto K, Katsube K, Umezawa A, Suda H. Osteogenic differentiation of mouse mesenchymal progenitor cell, Kusa-A1 is promoted by mammalian transcriptional repressor Rbpj. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> (2010) 400:39-45.</p>
<p>Matsuse D, Kitada M, Kohama M, Nishikawa K, Makinoshima H, Wakao S, Fujiyoshi Y, Heike T, Nakahata T, Akutsu H, Umezawa A, Harigae H, Kira J, Dezawa M. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. <i>J Neuropathol Exp Neurol.</i> (2010) 69:973-985.</p>
<p>Haraguchi Y, Sekine W, Shimizu T, Yamato M, Miyoshi S, Umezawa A, Okano T. Development of a new assay system for evaluating the permeability of various substances through three-dimensional tissue. <i>Tissue Eng Part C Methods.</i> (2010) 16:685-692.</p>
<p>Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, Suzuki J, Satake M, Nakamizo H, Tanaka M, Mori T, Segawa K, Nishiyama N, Inoue J, Makino H, Miyado K, Ogawa S, Yoshimura Y, Umezawa A. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. <i>Circ Res.</i> (2010) 106:1613-1623.</p>
<p>Fujino T, Nomura K, Ishikawa Y, Makino H, Umezawa A, Aburatani H, Nagasaki K, Nakamura T. Function of EWS-POU5F1 in sarcomagenesis and tumor cell maintenance. <i>Am J Pathol.</i> (2010) 176:1973-1982.</p>
<p>Ikegami Y, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Okamoto K, Miyado K, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A. Serum-independent cardiomyogenic transdifferentiation in human endometrium-derived mesenchymal cells. <i>Artif Organs.</i> (2010) 34:280-288.</p>
<p>Muramatsu, S., Fujimoto, K.I., Kato, S., Mizukami, H., Asari, S., Ikeguchi, K., Kawakami, T., Urabe, M., Kume, A., Sato, T., Watanabe, E., Ozawa, K., and Nakano, I.: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. <i>Mol. Ther.</i> 18(9): 1731-1735, 2010.</p>
<p>Lock, M., McGorray, S., Auricchio, A., Ayuso, E., Beecham, E.J., Blouin, V., Bosch, F., Bose, M., Byrne, B., Caton, T., Chiorini, J., Chtarto, A., Clark, K.R., Conlon, T., Darmon, C., Doria, M., Douar, A.M., Flotte, T.R., Francis, J., Francois, A., Giacca, M., Korn, M., Korytov, I., Leon, X., Leuchs, B., Lux, G., Melas, C., Mizukami, H., Moullier, P., Muller, M., Ozawa, K., Philipsberg, T., Poulard, K., Raupp, C., Riviere, C., Roosendaal, S., Samulski, R.J., Soltys, S., Surosky, R., Tenenbaum, L., Thomas, D.L., van Montfort, B., Veres, G., Wright, J.F., Xu, Y., Zeleniaia, O., Zentilin, L., and Snyder, R.O.: Characterization of a recombinant adeno-associated virus type 2 reference standard material. <i>Hum. Gene Ther.</i> 21(10): 1273-1785, 2010.</p>
<p>Oh, I., Ozaki, K., Meguro, A., Hatanaka, K., Kadowaki, M., Matsu, H., Tatara, R., Sato, K., Iwakura, Y., Nakae, S., Sudo, K., Teshima, T., Leonard, W.J., and Ozawa, K.: Altered effector CD4+ T cell function in IL-21R^{-/-} CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease. <i>J. Immunol.</i> 185(3): 1920-1926, 2010.</p>
<p>Meguro, A., Ozaki, K., Oh, I., Hatanaka, K., Matsu, H., Tatara, R., Sato, K., Leonard, W.J., and Ozawa, K.: IL-21 is critical for GVHD in a mouse model. <i>Bone Marrow Transplant.</i> 45(4): 723-729, 2010.</p>

<p>Homma, K., Sone, M., Taura, D., Yamahara, K., Suzuki, Y., Takahashi, K., Sonoyama, T., Inuzuka, M., Fukunaga, Y., Tamura, N., Itoh, H., Yamanaka, S., and Nakao, K. Sirt1 plays an important role in mediating greater functionality of human ES/iPS-derived vascular endothelial cells. <i>Atherosclerosis</i> 212 (1): 42-47, 2010.</p>
<p>Egusa, H., Okita, K., Kayashima, H., Yu, G., Fukuyasu, S., Saeki, M., Matsumoto, T., Yamanaka, S., and Yatani, H. Gingival fibroblasts as a promising source of induced pluripotent stem cells. <i>PLoS One</i>. 5(9):e12743, 2010.</p>
<p>Espejel, S., Roll, G.R., McLaughlin, K.J., Lee, A.Y., Zhang, J.Y., Laird, D.J., Okita, K., Yamanaka, S., and Willenbring, H. Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes have the functional and proliferative capabilities needed for liver regeneration in mice. <i>J Clin Invest</i>. 120(9):3120-3126, 2010.</p>
<p>Saunders, LR., Sharma ,AD., Tawney, J., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S., Willenbring, H., Verdin, E. miRNAs regulate SIRT1 expression during mouse embryonic stem cell differentiation and in adult mouse tissues. <i>Aging</i> 2010 Jul 15.</p>
<p>Nakagawa, M., Takizawa, N., Narita, M., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i>. 107(32):14152-14157, 2010.</p>
<p>Tsuji, O., Miura, K., Okada, Y., Fujiyoshi, K., Mukaino, M., Nagoshi, N., Kitamura, K., Kumagai, G., Nishino, M., Tomisato, S., Higashi, H., Nagai, T., Katoh, H., Kohda, K., Matsuzaki, Y., Yuzaki, M., Ikeda, E., Toyama, Y., Nakamura, M., Yamanaka, S., and Okano, H. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. <i>PNAS</i> 107(28):12704-12709 , 2010.</p>
<p>Tamaoki, N., Takahashi, K., Tanaka, T., Ichisaka, T., Aoki, H., Takeda-Kawaguchi, T., Iida, K., Kunisada, T., Shibata, T., Yamanaka, S., and Tezuka, K. Dental Pulp Cells for Induced Pluripotent Stem Cell Banking. <i>J Dent Res</i> 89(8):773-778, 2010.</p>
<p>Sato, S., Yagi, S., Arai, Y., Hirabayashi, K., Hattori, N., Iwatani, M., Okita, K., Ohgane, J., Tanaka, S., Wakayama, T., Yamanaka, S., and Shiota, K. Genome-wide DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) residing in mouse pluripotent stem cells. <i>Genes Cells</i> 15(6):607-18, 2010.</p>
<p>Washio K, Iwata T, Mizutani M, Ando T, Yamato M, Okano T, Ishikawa I. Assessment of cell sheets derived from human periodontal ligament cells: a pre-clinical study. <i>Cell Tissue Res</i>. 2010 Sep;341(3):397-404.</p>
<p>Takagi R, Murakami D, Kondo M, Ohki T, Sasaki R, Mizutani M, Yamato M, Nishida K, Namiki H, Yamamoto M, Okano T. Fabrication of human oral mucosal epithelial cell sheets for treatment of esophageal ulceration by endoscopic submucosal dissection. <i>Gastrointest Endosc</i>. 2010 Dec;72(6):1253-9.</p>
<p>Iwata T, Yamato M, Zhang Z, Mukobata S, Washio K, Ando T, Feijen J, Okano T, Ishikawa I. Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use. <i>J Clin Periodontol</i>. 2010 Dec;37(12):1088-99.</p>
<p>Takagi R, Yamato M, Murakami D, Kondo M, Yang J, Ohki T, Nishida K, Kohno C, Okano T. Preparation of keratinocyte culture medium for the clinical applications of regenerative medicine. <i>J Tissue Eng Regen Med</i>. 2010 Aug 26.</p>
<p>Hayashi R, Yamato M, Takayanagi H, Oie Y, Kubota A, Hori Y, Okano T, Nishida K. Validation system of tissue-engineered epithelial cell sheets for corneal regenerative medicine. <i>Tissue Eng Part C Methods</i>. 2010 Aug;16(4):553-60.</p>

Miyagawa S, Saito A, Sakaguchi T, Yoshikawa Y, Yamauchi T, Imanishi Y, Kawaguchi N, Teramoto N, Matsuura N, Iida H, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Impaired myocardium regeneration with skeletal cell sheets--a preclinical trial for tissue-engineered regeneration therapy. <i>Transplantation</i> . 2010 Aug 27;90(4):364-72.
佐藤陽治 再生医療・細胞治療の規制等に関する欧米の動向—臨床応用に関する規制当局の支援の比較— ヒューマンサイエンス 2011 (in press)
佐藤陽治 再生医療・細胞治療の規制に関する国際動向 月刊ファームステージ 2011年3月号 PHARMSTAGE 2011;10(12):1-2.
DNA microarray profiling identified a new role of growth hormone in vascular remodeling of rat ductus arteriosus. Jin MH, Yokoyama U, Sato Y, Shioda A, Jiao Q, Ishikawa Y, Minamisawa S. <i>J Physiol Sci</i> . 2011 (in press)
西田基宏, 齋木翔太, 北島直幸, 仲矢道雄, 佐藤陽治, 黒瀬等 TRPC チャネルのリン酸化による心血管機能制御 YAKUGAKU ZASSHI 2010;130:1427-33.
Nishida M, Suda R, Nagamatsu Y, Tanabe S, Onohara N, Nakaya M, Kanaho Y, Shibata T, Uchida K, Sumimoto H, Sato Y, Kurose H. Pertussis toxin upregulates angiotensin type 1 receptors through Toll-like receptor 4-mediated Rac activation. <i>J Biol Chem</i> 2010;285:15268-77.
Sakamoto K, Hiraiwa M, Saito M, Nakahara T, Sato Y, Nagao T, Ishii K. Protective effect of all-trans retinoic acid on NMDA-induced neuronal cell death in rat retina. <i>Eur J Pharmacol</i> . 2010;635:56-61.
Nishida M, Watanabe K, Sato Y, Nakaya M, Kitajima N, Ide T, Inoue R, Kurose H. Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. <i>J Biol Chem</i> 2010;285:13244-53.
Okura H, Saga A, Fumimoto Y, Soeda M, Moriyama M, Moriyama H, Nagai K, Lee CM, Yamashita S, Ichinose A, Hayakawa T, Matsuyama A. Transplantation of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. <i>Tissue Eng Part C Methods</i> . Aug 10. [Epub ahead of print] 2010.
Okura H, Komoda H, Saga A, Yamamoto-Kakuta A, Fumimoto Y, Lee C-M, Ichinose A, Sawa Y, Matsuyama A. Properties of hepatocyte-like cell clusters from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. <i>Tissue Eng Part C Methods</i> . 16(4):761-70. 2010.
Okura H, Yamashita S, Ohama T, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Hamada Y, Ohyama R, Sawa Y, Matsuyama A. HDL/apolipoprotein A-I binds to macrophage-derived progranulin and suppresses its conversion into proinflammatory granulins. <i>J Atheroscler Thromb</i> . 17(6):568-77. 2010.
Okura H, Matsuyama A, Lee CM, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Nagao A, Sougawa N, Sekiya N, Takekita K, Shudo Y, Miyagawa S, Komoda H, Okano T, Sawa Y. Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve left ventricular dysfunction and survival in a rat myocardial infarction model. <i>Tissue Eng Part C Methods</i> . 16(3):417-25. 2010.
Sandoval JC, Nakagawa-Toyama Y, Masuda D, Tochino Y, Nakaoka H, Kawase R, Yuasa-Kawase M, Nakatani K, Inagaki M, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Matsuyama A, Makoto Nishida, Ishigami M, Komuro I and Yamashita S. Molecular Mechanisms of Ezetimibe-Induced Attenuation of Postprandial

Hypertriglyceridemia. J Atheroscler Thromb. 2010 Jun 11. [Epub ahead of print].
Komoda H, Okura H, Lee C-M, Sougawa N, Iwayama T, Hashikawa T, Saga A, Yamamoto-Kakuta A, Ichinose A, Murakami S, Sawa Y, Matsuyama A. Reduction of Neu5GC Xenoantigen on Human ADMSCs lead to Them as Safer and More Useful Cell Sources for Realizing Various Stem Cell Therapies. Tissue Eng Part A. 16(4):1143-55. 2010.
松山晃文：臓器移植・組織移植から再生医療へ—臓器・組織・細胞の procurement の観点から 臓器移植法の研究：第3章8：町野朔編 p277-284. 2010.
松山晃文：「再生医療と薬事法」臓器移植法の研究：第3章9：町野朔編 p285-292. 2010
松山晃文：「再生医療の保険診療化 path」臓器移植法の研究：第3章10：町野朔編 p293-302. 2010
松山晃文：「大動脈炎症候群 —その臨床症状と検査所見」医学のあゆみ 233(4) 274-278. 2010
松山晃文：「再生医療とそれに伴う行政施策」今日の移植 23(2): 165-172. 2010
松山晃文：「再生医療実用化にむけた産学連携の新しいかたち—技術研究組合制度活用による再生医療イノベーションへの提案—」再生医療 9(1)95-99. 2010.
松山晃文：「最低限必要とされる要求事項」の明示による再生医療実現と社会還元の加速を目指して—再生医療研究大国につぼんの再生医療大国への道のり—」再生医療 9(1)100-104. 2010.

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Hyphenated Technique for Releasing and MALDI MS Analysis of O-Glycans in Mucin-Type Glycoprotein Samples

Keita Yamada,[†] Satomi Hyodo,[†] Mitsuhiro Kinoshita,[†] Takao Hayakawa,[‡] and Kazuaki Kakehi^{*†}

School of Pharmacy and Pharmaceutical Research and Technology, Kinki University

We developed an automatic apparatus for the release of O-glycans from mucin-type glycoproteins and proteoglycans (Matsuno, Y.-k.; Yamada, K.; Tanabe, A.; Kinoshita, M.; Maruyama, S.-z.; Osaka, Y.-s.; Masuko, T.; Kakehi, K. *Anal. Biochem.* 2007, 363, 245–257. Yamada, K.; Hyodo, S.; Matsuno, Y. K.; Kinoshita, M.; Maruyama, S. Z.; Osaka, Y. S.; Casal, E.; Lee, Y. C.; Kakehi, K. *Anal. Biochem.* 2007, 371, 52–61). The method allows rapid release of O-glycans as the reducing form within 10 min. In the present study, we connected the device to a MALDI-TOF MS spotter and achieved routine analysis of O-glycans in biological samples for clinical use after *in situ* derivatization of the released O-glycans with phenylhydrazine. We applied the method to the analysis of O-glycans expressed on MKN45 cells derived from human stomach cancer cells and found that MKN45 cells expressed characteristic trisialo-poly-lactosamine-type glycans as reported previously (Yamada, K.; Kinoshita, M.; Hayakawa, T.; Nakaya, S.; Kakehi, K. *J. Proteome Res.* 2009, 8, 521–537). We also applied the method to the analysis of O-glycans in serum samples. The present technique is the first attempt to use MS measurement for routine clinical diagnostic works.

The O-linked glycans (O-glycans) in glycoproteins are covalently linked to Ser/Thr residues of the core protein through N-acetylgalactosamine (GalNAc) at their reducing ends. These glycans are often called as mucin-type glycans due to their predominant presence in tracheas and mucin secretory glands such as salivary glands. Currently, there are eight known core structures for O-glycans,¹ and a number of research works reported the aberrant glycan patterns in relation to the development and metastasis of malignancy.^{2–4} Recently, Lebrilla and co-workers studied O-glycosylations in epithelial ovarian cancer cells

and serum samples of breast cancer patients and proposed the use of O-glycans as clinical markers.^{5,6}

Because various types of O-glycans are linked to the repeating Ser/Thr residues of Ser/Thr/Pro rich tandem repeating units of the core protein, direct analysis of the glycopeptides is difficult even if using the most newly developed analytical techniques such as mass spectrometry. Therefore, we have to release carbohydrate chains from the core proteins prior to the analysis. Various approaches to release glycans from the polypeptide backbone through the enzymatic or chemical procedures have been developed but have been a big challenge in the case of the analysis of O-glycans using a minute amount of glycoproteins.¹

N-Glycanases (N-glycoamidases), the enzymes providing facile cleavage of asparagine-linked glycans (N-glycans), are revolutionary in the analysis of N-glycans.⁷ In contrast, there is no enzyme which is capable of releasing a wide range of O-glycans from the core protein.⁸ Therefore, we usually release O-glycans from the core proteins by chemical methods, typically by β -elimination with alkali in the presence of sodium borohydride or mild hydrazinolysis.^{9,10}

N-Acetylgalactosamine (GalNAc) residues at the reducing end of mucin-type O-glycans are attached to Ser/Thr residues of mucin-type glycoproteins. To release the O-glycans, we usually use the alkali solution under mild conditions. However, if the GalNAc residues at the reducing end of the released glycans are substituted at the C-3 position, further degradation (i.e., peeling) tends to proceed. This is the most critical problem in the analysis of mucin-type O-glycans. Alkali-catalyzed β -elimination in the presence of sodium borohydride under mild conditions to prevent the “peeling” reaction is still the most common method for routine analysis of O-glycans,^{11–13} and the method affords O-glycans as the reduced form (i.e., alditols). Consequently, the hemiacetal group at the reducing terminal is no longer available for chemical modification with fluorescent or UV-absorbing tags for their sensitive and high-resolution analysis. Royle and co-workers

* To whom correspondence should be addressed. Kowakae 3-4-1, Higashi-Osaka, 577-8502 Japan. Phone: +80-6-6721-2332. Fax: +80-6-6721-2353. E-mail: k_kakehi@phar.kindai.ac.jp.

[†] School of Pharmacy.

[‡] Pharmaceutical Research and Technology.

(1) Mechref, Y.; Novotny, M. V. *Chem. Rev.* 2002, 102, 321–369.
(2) Fuster, M. M.; Esko, J. D. *Nat. Rev. Cancer* 2005, 5, 526–542.
(3) Jensen, P. H.; Kolarich, D.; Packer, N. H. *FEBS J.* 2010, 277, 81–94.
(4) An, H. J.; Kronewitter, S. R.; De Leo, M. L.; Lebrilla, C. B. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009, 13, 601–607.

(5) Leiserowitz, G. S.; Lebrilla, C.; Miyamoto, S.; An, H. J.; Duong, H.; Kirmiz, C.; Li, B.; Liu, H.; Lam, K. S. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2007.

(6) Kirmiz, C.; Li, B.; An, H. J.; Clowers, B. H.; Chew, H. K.; Lam, K. S.; Ferrige, A.; Alecio, R.; Borowsky, A. D.; Sulaimon, S.; Lebrilla, C. B.; Miyamoto, S. *Mol. Cell. Proteomics* 2007, 6, 43–55.

(7) Takahashi, N. In *Handbook of Endoglycosidases and Glycoamidases*; Takahashi, N., Muramatsu, T., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1992; p 183.

(8) Umemoto, J.; Bhavanandan, V. P.; Davidson, E. A. *J. Biol. Chem.* 1977, 252, 8609–8614.

(9) Merry, A. H.; Neville, D. C.; Royle, L.; Matthews, B.; Harvey, D. J.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M. *Anal. Biochem.* 2002, 304, 91–99.

(10) Cancilla, M. T.; Penn, S. G.; Lebrilla, C. B. *Anal. Chem.* 1998, 70, 663–672.

employed mild hydrazinolysis to afford O-glycans from microgram quantities of glycoproteins, although a relatively lengthy time (~6 h) and the need for reacylation of de-N-acetylated groups make it unsuitable for rapid analysis of multiple samples.⁹ Karlsson and Packer reported an in-line flow releasing system employing alkaline β -elimination to release the reducing O-glycans from the core protein immobilized on the column, but this method also requires a long reaction time (16 h).¹⁴ Huang et al. developed a method for releasing O-glycans in the presence of ammonia and successfully analyzed O-glycans from fetuin.¹⁵ The method allowed simultaneous determination of both N- and O-glycans.

Recently, we developed an automatic O-glycan releasing apparatus for the release of O-glycans from mucin-type glycoproteins and proteoglycans and named the system "AutoGlycoCutter" (AGC).^{16–19} Alkali-induced degradation of oligosaccharides (i.e., peeling reaction) has been a big problem during the alkali-catalyzed release of mucin-type glycans from the core peptides.²⁰ Use of the automatic device and optimization of experimental parameters dramatically improved the efficiency in the release of O-glycans in mucin-type glycoproteins. We successfully applied the device to the analysis of O-glycans from some leukemia and epithelial cancer cells and achieved identification of more than 80 O-glycans. Also, we found that poly-lactosamine-type O-glycans having larger molecular size than 6000 were present in a stomach cancer cell line (MKN 45 cells).¹⁸ We suggested that these poly-lactosamine-type O-glycans might be a marker molecule of a stomach tumor.

However, to realize the O-glycan analysis in diagnostic works for the clinical purpose, we have to develop a full automatic machine from the releasing of O-glycans in biological samples to the analysis of glycan profiles. In the present study, we attempted hyphenation of the autoglycan releasing system with a sample spotter machine for the MALDI MS apparatus.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials and Equipment. Bovine submaxillary mucin (BSM) was obtained from Sigma-Aldrich Japan (Shinagawa-ku, Tokyo, Japan). Phenylhydrazine and 2-aminobenzoic acid (2AA) for labeling of glycans were obtained from Tokyo Kasei Kogyo (Chuo-ku, Tokyo, Japan). 2,5-Dihydroxy benzoic acid (DHB) as the matrix material for MALDI MS measurement and Triton-X100 were also from Sigma-Aldrich Japan. Pronase (*Streptomyces griseus*) was obtained from Calbiochem (San Diego, CA). The protein inhibitor cocktail for animal cells was obtained from Nacalai

Tesque (Nakagyo-ku, Kyoto, Japan). Ultrapure water by a Milli-Q water system (Millipore, Bedford, MA) was used. Other reagents and solvents were of the highest grade commercially available or HPLC grade.

MALDI-TOF MS spectra of O-glycans were acquired on a MALDI-QIT TOF mass spectrometer (AXIMA-QIT, Shimadzu, Kyoto, Japan). The instrument was operated in the positive-ion mode throughout the work, and acquisition and data processing were controlled by Launchpad software (Kratos Analytical, Manchester, U.K.). For collision-induced dissociation, argon gas was used as the collision gas.

Cell Culture. In the present study, we used MKN45 cells (human gastric adenocarcinoma cell line). The cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum and 1% (v/v) penicillin–streptomycin mixed solution (10 000 u penicillin and 10 mg of streptomycin/mL, Nacalai Tesque). Fetal calf serum was previously kept at 56 °C for 30 min. The cells were cultured at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere and harvested at 80% confluent state. Collected cells (1×10^7 cells) were washed with phosphate buffered saline (PBS) and collected by centrifugation at 800g for 20 min.

Glycopeptide Pool from the Whole Cells. Cancer cells (2.0×10^7 cells) were suspended in 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0, 500 μ L) and mixed with an equal volume of 2% Triton X100 in the same buffer in an ice-bath. After homogenization of the cells for 7 min with a glass homogenizer, the mixture was centrifuged at 8000g for 30 min. The supernatant layer was collected and boiled for 7 min at 100 °C followed by evaporation to dryness by a centrifugal evaporator (SpeedVac, Savant, Sunnydale, CA). The lyophilized material was suspended in water (200 μ L), and ethanol (800 μ L) was added to the mixture to 80% concentration. The precipitate was collected by centrifugation and washed with ethanol (1 mL \times 3) and then with acetone (1 mL \times 2). The residue was dried in vacuo, and Pronase (50 μ g) in 5 mM Tris-HCl (pH 8.0, 200 μ L) was added, and the mixture was kept at 37 °C for 24 h. After the reaction mixture was boiled for 10 min, the supernatant was collected by centrifugation. Because cancer cells often contain a relatively large amount of free glycans in cytosols,²¹ contaminated free glycans were previously reduced to the alditol form with sodium borohydride as follows: an aqueous solution of 2 M NaBH₄ (500 μ L) was added to the supernatant and kept at room temperature for 30 min. Glacial acetic acid was carefully added to the mixture to decompose excess NaBH₄, and the mixture was passed through a centrifugal filter device (5 kDa cutoff). The solution was concentrated to 30 μ L after washing with the water (400 μ L \times 3). A half of the solution (15 μ L) was injected to the AGC-MS system.

Glycoprotein Pool from Serum Samples. A 50 μ L portion of a human pooled serum sample (Wako Pure Chemicals) was diluted with water (200 μ L), and the mixture was passed through a centrifugal filter device (10 kDa cutoff) to remove salts and low-molecular weight materials. The solution was concentrated to 30 μ L after washing with water (250 μ L \times 3). Half of the solution (15 μ L) was injected to the AGC-MS system.

- (11) Kakehi, K.; Susami, A.; Taga, A.; Suzuki, S.; Honda, S. *J. Chromatogr., A* **1994**, *680*, 209–215.
- (12) Schulz, B. L.; Packer, N. H.; Karlsson, N. G. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 6088–6097.
- (13) Backstrom, M.; Thomsson, K. A.; Karlsson, H.; Hansson, G. C. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 538–545.
- (14) Karlsson, N. G.; Packer, N. H. *Anal. Biochem.* **2002**, *305*, 173–185.
- (15) Huang, Y.; Mechref, Y.; Novotny, M. V. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 6063–6069.
- (16) Matsuno, Y.-k.; Yamada, K.; Tanabe, A.; Kinoshita, M.; Maruyama, S.-z.; Osaka, Y.-s.; Masuko, T.; Kakehi, K. *Anal. Biochem.* **2007**, *362*, 245–257.
- (17) Yamada, K.; Hyodo, S.; Matsuno, Y. K.; Kinoshita, M.; Maruyama, S. Z.; Osaka, Y. S.; Casal, E.; Lee, Y. C.; Kakehi, K. *Anal. Biochem.* **2007**, *371*, 52–61.
- (18) Yamada, K.; Kinoshita, M.; Hayakawa, T.; Nakaya, S.; Kakehi, K. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 521–537.
- (19) Yamada, K.; Watanabe, S.; Kita, S.; Kinoshita, M.; Hayakawa, T.; Kakehi, K. *Anal. Biochem.* **2010**, *396*, 161–163.
- (20) Lloyd, K. O.; Kabat, E. A.; Licerio, E. *Biochemistry* **1968**, *7*, 2976–2990.

- (21) Ishiduka, A.; Hashimoto, Y.; Naka, R.; Kinoshita, M.; Kakehi, K.; Seino, J.; Funakoshi, Y.; Suzuki, T.; Kameyama, A.; Narimatsu, H. *Biochem. J.* **2008**.

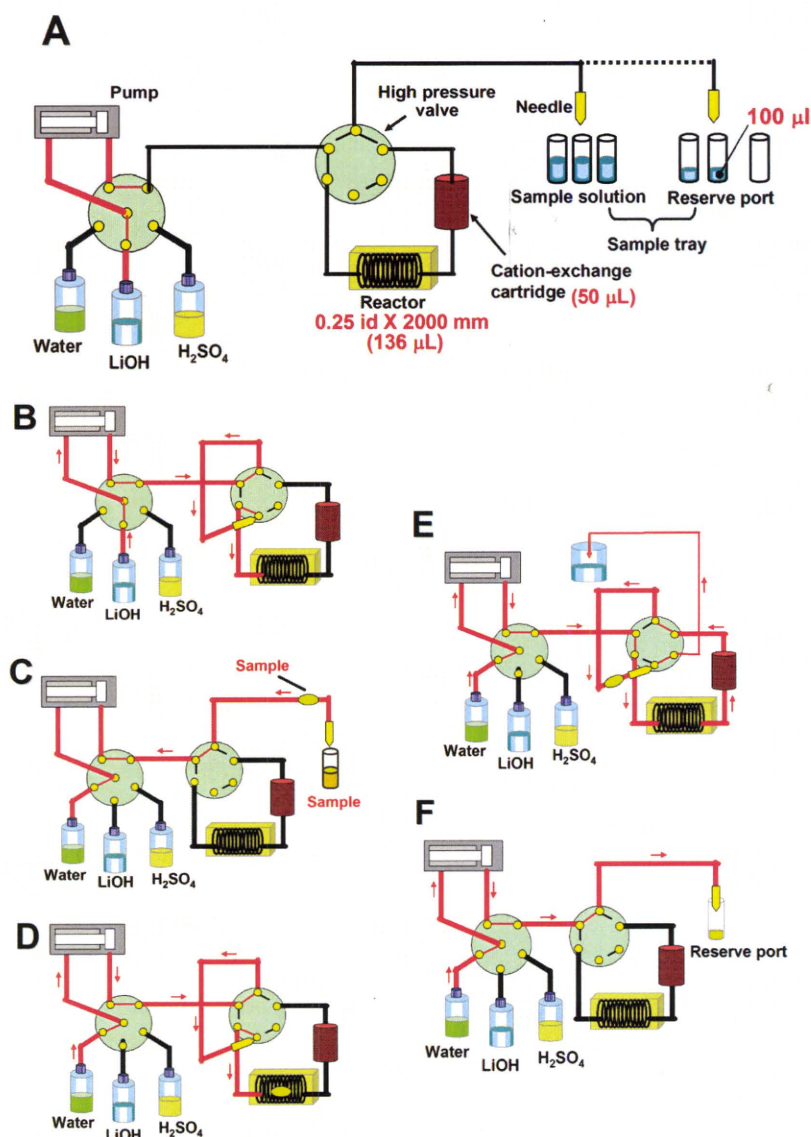


Figure 1. Flow diagram of the autoglycan releasing system.

Releasing Reaction of O-Glycans Using an AutoGlycoCutter System (AGC). The AGC system has been improved from the original version in order to be able to analyze microscale samples (Figure 1).¹⁶ To release the O-glycans from glycoprotein samples, an aqueous solution (15 μL) of a glycoprotein sample was injected into the AGC. The AGC is composed of a pump, a reactor, a cartridge packed with cation exchange resin, a sample tray, and a switching valve (Figure 1A).

The glycan releasing reaction was performed as shown from parts B to F of Figure 1. When the program starts, the tubing of the reactor is filled with the alkali solution (0.5 M LiOH for glycan releasing) (Figure 1B). The introduced sample solution is mixed with the alkali solution and moved to the reactor at 120 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Figure 1C,D). When the mixed solution is introduced to the reactor, the flow is stopped and the solution is kept at the elevated temperature (45 $^{\circ}\text{C}$) for a specified period (3.0 min). After the releasing reaction in the reactor, the mixture is pushed out from the reactor and passed through a small cartridge packed with cation-exchange resin (Figure 1E). The effluent from the cartridge is collected to the fraction collector (Figure 1F). In the present study, the effluent was divided and a portion (one tenth of the

total volume) was introduced to the MALDI spotter (see below). The whole procedure was performed according to the automatic valve changing program and was completed within 4 min. After the run, the cation-exchange cartridge is regenerated with 0.25 M H_2SO_4 . The collected solution ($\sim 100 \mu\text{L}$) containing the released O-glycans were employed for the analysis by high-performance liquid chromatography and/or capillary electrophoresis after derivatization with a fluorescent labeling reagent such as 2-aminobenzoic acid (also see below).

Hyphenation of the AGC Apparatus to an Automatic Spotter Machine (AccuSpot) for MALDI MS Measurement: "AGC-MS System". A 10% portion of the reaction mixture was introduced to the MALDI plate as shown in Figure 2. An aqueous solution of 1.25% phenylhydrazine was mixed with the 10% flow of the eluate using a sheath flow device installed in the spotter machine at the rate of 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. And the mixture was spotted onto the MALDI plate, on which a solution (1 μL) of 2,5-dihydroxybenzoic acid (10 mg/mL in 30% ethanol) had been previously spotted and air-dried at room temperature. The sampling rate was set at 20 s intervals. The solution on the MALDI plate is kept at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h, and MALDI MS spectra of O-glycans

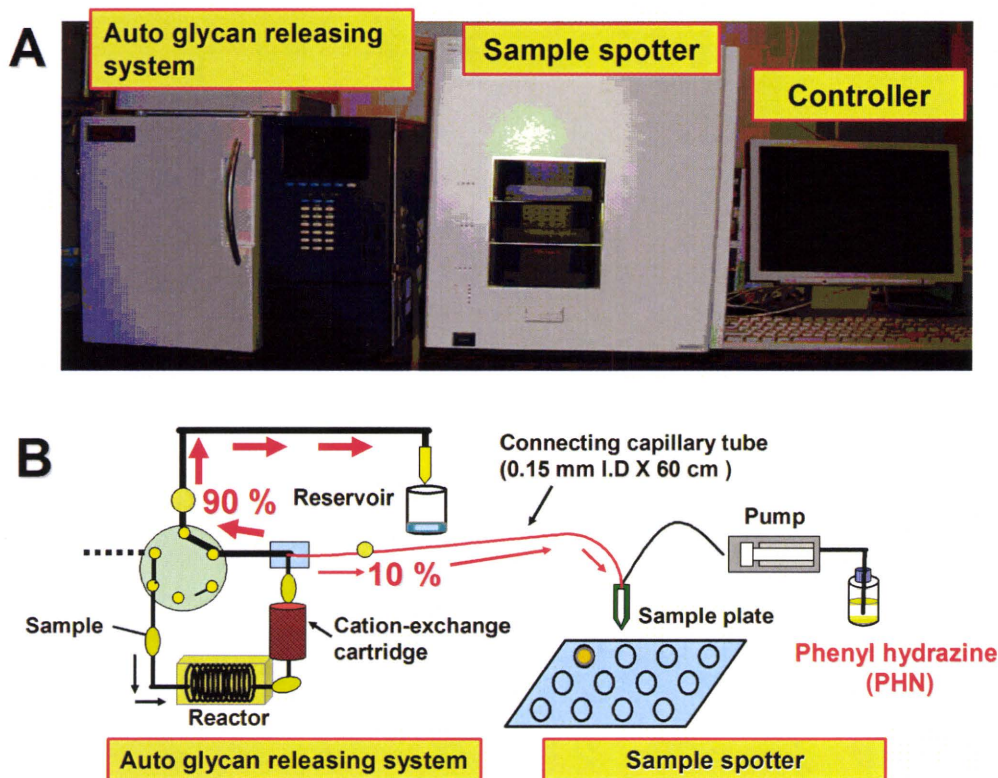


Figure 2. Auto glycan releasing system-MS system: (A) auto glycan releasing system-MS system. (B) Scheme for collection of the effluent from the Auto glycan releasing system. A 10% portion of the effluent is introduced to the spotter machine by adjusting the capillary size. In this case, we used a fused silica capillary (0.15 mm i.d., 60 cm). At the spotter port, an aqueous solution of 1.25% phenylhydrazine is mixed at the rate of 1 $\mu\text{L}/\text{min}$.

were acquired. The 90% portions of the eluate were recovered to the fraction collector and evaporated to dryness for further structural studies as well as quantitative analysis.

Fluorescent Labeling of the Released O-Glycans with 2-AA. The mixture of the released O-glycans in the 90%-portions of the eluate was dissolved in 2-AA solution (100 μL) freshly prepared by dissolution of 2-AA (30 mg) and sodium cyanoborohydride (30 mg) in methanol (1 mL) containing 4% sodium acetate and 2% boric acid. The mixture was kept at 80 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h. Water (100 μL) was added after cooling, and the mixture was applied to a column of Sephadex LH-20 (1.0 cm i.d., 30 cm length) previously equilibrated with 50% aqueous methanol. The earlier eluted fluorescent fractions were pooled and evaporated to dryness under reduced pressure and used for the analysis by HPLC and CE.

CE Analysis of 2-AA Labeled O-Glycans. 2-AA-Labeled oligosaccharides were analyzed with a P/ACE MDQ glycoprotein system (Beckman Coulter, Fullerton, CA) equipped with a helium-cadmium laser-induced fluorescence detector (Ex 325 nm, Em 405 nm). Electrophoresis was performed using a DB-1 capillary (100 μm i.d., 30 cm length) in 100 mM Tris-borate buffer (pH 8.3) containing 5% polyethylene glycol (PEG70000) as the running buffer. Sample solutions were introduced into the capillary by pressure injection at 1 psi for 10 s. Separation was performed by applying the potential of 25 kV at 25 $^{\circ}\text{C}$.

HPLC Analysis of 2-AA Labeled O-Glycans. The HPLC system was composed from a SCL-10A system controller (Shimadzu, Nakagyo-ku, Kyoto, Japan), two LC-10AD pumps (Shimadzu), a 655A-52 column oven (Hitachi, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan), and an FP-920 fluorescence detector (JASCO, Hachi-oji,

Tokyo, Japan) connected with a data processor (SmartChrom, KYA Technologies, Hachi-oji, Tokyo, Japan). Separation was done with a polymer-based Asahi Shodex NH2P-50 4E column (Showa Denko, Hachi-oji, Tokyo, Japan; 4.6 mm i.d., 250 mm length) using a linear gradient formed by 2% acetic acid in acetonitrile (solvent A) and 5% acetic acid in water containing 3% triethylamine (solvent B). The column was initially equilibrated and eluted with 70% solvent A for 2 min, then solvent B was increased to 95% over 80 min and kept at this composition for further 100 min. The flow rate was maintained at 1.0 mL/min through the analysis. Detection was performed by fluorometry at 350 nm for excitation and 425 nm for emission, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Auto Glycan Releasing System (AutoGlycoCutter:AGC) for Online Analysis of O-Glycans in Mucin-Type Glycoproteins. Releasing of O-glycans attached to Ser/Thr residues of mucin-type glycoproteins has been a big problem in their analysis.²² Recently, we developed an apparatus for the automatic release of O-glycans using an in-line flow system (AutoGlycoCutter-1, AGC-1).¹⁶ The original version of the apparatus was designed for relatively large scale samples ($\sim 100 \mu\text{g}$ –1 mg), and a cartridge packed with cation exchange resin (1 mL) and a reactor of 700 μL volume were installed. To apply the method to the analysis of the smaller amount of samples with higher sensitivity, we miniaturized the system by using a cartridge of 50 μL volume packed with cation

(22) An, H. J.; Kronewitter, S. R.; de Leoz, M. L.; Lebrilla, C. B. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 601–607.

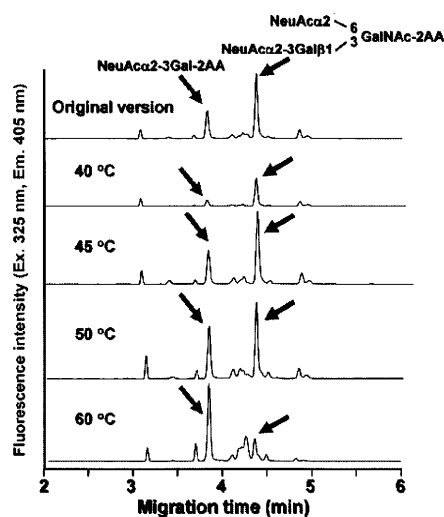


Figure 3. Optimization for oligosaccharide releasing reaction. O-Glycans released from the model glycopeptide by the automatic glycan-releasing system were analyzed by CE after labeling with 2-AA. The most upper panel shows the results on the analysis of O-glycans in the model glycopeptide using the original version of the auto glycan releasing system. The similar results were observed at 45 °C. Analytical conditions for CE: capillary, DB-1 capillary (100 m i.d., 30 cm); running buffer, 100 mM Tris-borate buffer (pH 8.3) containing 5% PEG70000; applied voltage, 25 kV; injection, pressure method (1 psi for 5 s); temperature, 25 °C; detection, helium-cadmium laser-induced fluorescence (excitation 325 nm, emission 405 nm).

exchange resin and a reactor having 136 μL volume. In addition, the dead volume was minimized by removing the detector. The volume (15 μL) of the sample solution was also fixed. In this device (Figure 1), the sample solution is brought to the reactor, then the flow is stopped for a specified time, and the releasing reaction occurs in the reactor. Then, the flow brings the sample zone to the cartridge (50 μL volume). It should be noted that these modifications minimize diffusion of the sample zone, and the reaction mixture was recovered with the minimal dilution.

We optimized the conditions for glycan releasing reaction using a model glycopeptide derived from caseinoglycomacropeptide (cow milk) having the sequence GEPTISTIPT.¹⁷ Disialyl-T antigen, (NeuAca2-3Gal β 1-3(NeuAca2-6)GalNAc, attaches to the fourth Thr residue (shown in bold face with underline) from the N-terminal. NeuAca2-3Gal β 1-3-residue of the disialyl T antigen is labile under alkaline conditions and forms degradation product (NeuAca2-3Gal) by β -elimination (i.e., peeling reaction).^{17,18} After the releasing reaction, the mixture of the released oligosaccharides was labeled with 2AA and analyzed by CE (Figure 3).

The disialyl-T and the degradation product (NeuAca2-3Gal-2AA) were observed at 4.4 and 3.8 min, respectively. The best yield of disialyl-T was observed at 45 °C. At 40 °C, the yield of disialyl-T was lower than that at 45 °C. At the higher temperatures than 50 °C, the abundance of the peeling product (i.e., NeuAca2-3Gal β 1-3) became higher. The yield of the disialyl T from the model peptide obtained under the optimized conditions (reaction solution, 0.5 M LiOH; reaction time, 3 min; reaction temperature, 45 °C) was $58.8 \pm 3\%$ ($n = 5$) when determined by CE. The ratio of the degradation product was $24.4 \pm 1\%$. It should be noted that the present method showed excellent repeatability, although partial degradation was observed.

Hyphenation of AGC with a Spotter Machine for MALDI MS Measurement. We directly connected the auto glycan releasing system to the spotter machine for MALDI MS measurement (Figure 2). The effluent from the cartridge was divided by a splitter, and a 10% portion of the effluent was introduced to the MALDI spotter. By adjusting the length and the internal diameter of tubing (0.15 mm i.d., 60 cm length), we could introduce one tenth of the sample solution to the MALDI plate and the effluent was automatically mixed with an aqueous solution of the matrix (DHB). However, we could not detect the molecular ions due to free O-glycans released from the core peptides with high sensitivity (data not shown). This is probably due to the presence of contaminated peptide fragments and other materials during the releasing reaction.

To improve the sensitivity in detection of the glycans, on-plate derivatization of O-glycans in the effluent collected on the MALDI plate was examined. Lattova et al. reported that phenylhydrazine was a useful derivatization reagent for highly sensitive detection of glycans in clinical samples. The method is based on on-plate derivatization of glycans with phenylhydrazine to form phenylhydrazone. The phenylhydrazone thus formed on the plate was detected by a MALDI-MS apparatus.^{23,24} In the present study, we introduced a 1.25% aqueous solution of phenylhydrazine to be mixed with the effluent from AGC, and the mixture was spotted onto the plate, on which DHB solution had been previously spotted and dried. The mixture on the target was kept at 37 °C for 1 h to complete the derivatization reaction according to the method reported by Lattova et al.^{23,24} We can use a diluted phenylhydrazine solution due to its high reaction efficiency in hydrazone formation. In addition, because the effluent was passed through a cartridge packed with cation exchange resin, it showed acidic property which is preferable for hydrazone formation. It should be noticed that phenylhydrazone derivatives of reducing carbohydrates are easily crystallizable and may be a strong point for MALDI MS measurement. In addition, it was not necessary to

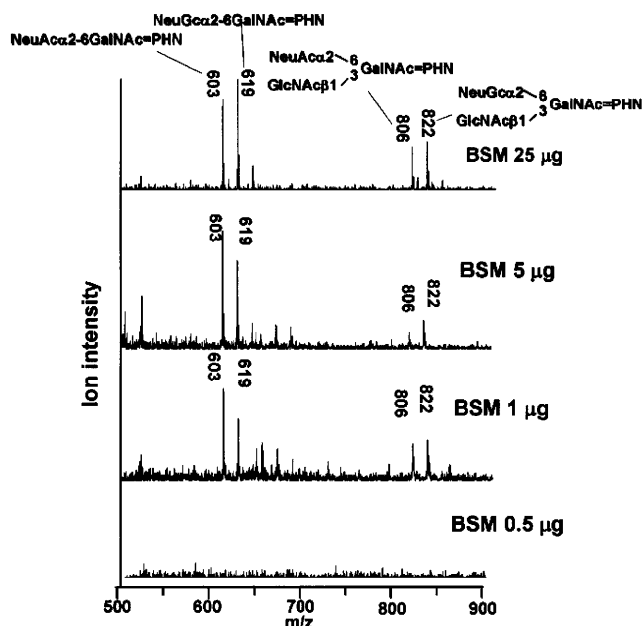


Figure 4. Detection limit of the autoglycan releasing system-MS system as examined using bovine submaxillary mucin as a model sample.

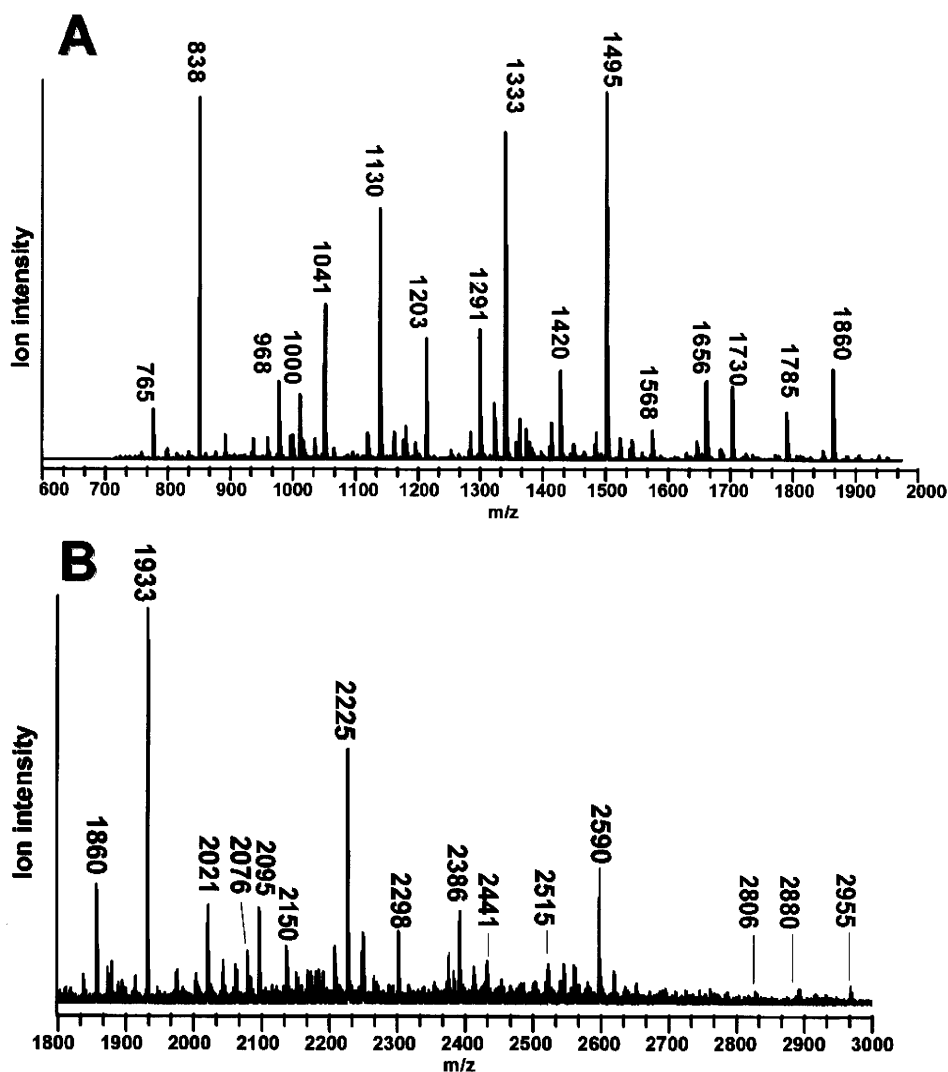


Figure 5. Analysis of O-glycans from MKN45 cells. The results for the low- and high-mass ranges are shown in parts A and B, respectively.

remove the excess phenylhydrazine by washing. Thus, the whole procedure from the releasing of O-glycans to MS measurement was completed within 1.5 h.

On the basis of the studies described above, we applied the present technique to the analysis of O-glycans from bovine submaxillary mucin (BSM). The results are shown in Figure 4.

When using 25 μg of BSM (2.5 μg as the injected amount), we could easily observe the major molecular ions due to O-glycans. Two molecular ions observed at m/z 603 and m/z 619 are due to NeuAc α 2-6GalNAc=PHN and NeuGc α 2-6GalNAc=PHN, respectively. Two molecular ions observed at m/z 806 and 822 are confirmed as sialyl-core 3 structures, GlcNAc β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc=PHN and GlcNAc β 1-3(NeuGc α 2-6)GalNAc=PHN, respectively. Sialic acids of O-glycans in BSM have two forms of *N*-acetyl neuraminic acid and *N*-glycolyl neuraminic acid. Therefore, we could observe two sets of the molecular ions of O-glycans.¹¹ Even at the 1 μg -level of the sample (0.1 μg as the amount injected to the MALDI plate), we clearly observed the molecular ions of these glycans.

Application to the Analysis of O-Glycans Derived from Cancer Cells. We applied the present method to the analysis of O-glycans expressed on MKN45 cells (a human stomach cancer cell line). O-Glycans of glycopeptide fractions obtained from the whole cells after digestion with Pronase were analyzed by the present method. The results observed for low- and high-molecular ranges are shown in parts A and B of Figure 5, respectively, and the list of the proposed structures based on our previously reported data is summarized in Table 1.¹⁸

Two molecular ion peaks observed at m/z 838 and m/z 1041 are due to asialo core 2 type structures, Gal β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc=PHN and Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc=PHN, respectively. Four molecular ion peaks at m/z 1203, 1568, 1933, and 2298 are confirmed as asialo poly-lactosamine-type O-glycans, Gal β 1-3((Gal β -GlcNAc β) $_n$ -Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc=PHN ($n = 1-4$). The molecular ion peak observed at m/z 765 corresponds to sialyl-T, NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc=PHN. Three molecular ion peaks observed at m/z 968, 1130, and 1333 are assigned as monosialo core 2 type glycans, Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc=PHN + NeuAc $_1$, Gal β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc=PHN + NeuAc $_1$, and Gal β 1-3(GlcNAc β -Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc=PHN + NeuAc $_1$, re-

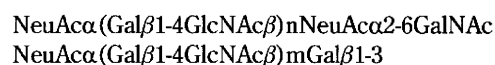
(23) Lattova, E.; Chen, V. C.; Varma, S.; Bezabeh, T.; Perreault, H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1644-1650.

(24) Lattova, E.; Kapkova, P.; Krokhin, O.; Perreault, H. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2977-2984.

Table 1. O-Glycans Observed in MKN45 Cells

proposed structures	observed molecular mass (<i>m/z</i>)
Asialo Glycans	
Galβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	838
Galβ1-3(GlcNAc-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	1041
Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	1203
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₂ -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	1568
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₃ -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	1933
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₄ -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	2298
Monosialo Glycans	
NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAc=PHN	765
Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc ₁	968
Galβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc ₁	1130
Galβ1-3(GlcNAc-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc ₁	1333
Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc ₁	1495
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₂ -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc ₁	1860
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₃ -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc	2225
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₄ -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc	2590
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₅ -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc	2955
Disialo Glycans	
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	1420
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	1785
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	2150
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₃ -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	2515
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₄ -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	2880
Trisialo Glycans	
NeuAc-Gal-GlcNAc-(NeuAc-Gal-GlcNAc)Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc=PHN	2076
NeuAc-Gal-GlcNAc-(NeuAc-Gal-GlcNAc)Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc=PHN + Gal-GlcNAc	2441
NeuAc-Gal-GlcNAc-(NeuAc-Gal-GlcNAc)Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc=PHN + (Gal-GlcNAc) ₂	2806
Degradation Product	
(Gal-GlcNAc) ₂ -Gal=PHN	1000
NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Gal=PHN	1291
NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₃ -Gal=PHN	1656
(Gal-GlcNAc) ₄ -Gal=PHN	1730
NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₄ -Gal=PHN	2021
(Gal-GlcNAc) ₅ -Gal=PHN	2095
NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₅ -Gal=PHN	2386

spectively. Five molecular ion peaks at *m/z* 1495, 1860, 2225, 2590, and 2955 are due to monosialo polyactosamine-type O-glycans, Galβ1-3((Galβ-GlcNAcβ)_{*n*}-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc₁ (*n* = 1–5). Disialo polyactosamine-type O-glycans were also observed in MKN45 cells. Four molecular ion peaks at *m/z* 1785, 2150, 2515, and 2880 are confirmed as disialo core 2 type glycans modified with 1–7 units of lactosamine residues. Three molecular ion peaks containing three sialic acid residues were observed at *m/z* 2076, 2441, and 2806 are due to NeuAc₃Hex₃HexNAc₃=PNH, NeuAc₃Hex₄HexNAc₄=PNH, and NeuAc₃Hex₅HexNAc₅=PNH, respectively. As reported previously, these trisialo glycans are core 1 type glycans having the structures as indicated below.¹⁸



These structures were observed exclusively in MKN45 cells according to our recent research results, and we suggested that these O-glycans might be a specific marker of gastric adenocarcinoma.¹⁸ Seven molecular ion peaks observed at *m/z* 1000, 1291, 1656, 1730, 2021, 2095, and 2386 are due to the degradation products from these trisialo core 1 type polyactosamine glycans, NeuAc-(Galβ-GlcNAcβ)_{*n*}-Gal=PHN (*n* = 1–5), and the presence of these products means that these glycans occupy the 1-3 linked arm of the glycans because of easy

degradation (i.e., peeling). Therefore, these glycans are important keys for structural confirmation of the parent glycans.¹⁸

Analysis of O-Glycans Derived from Serum Glycoproteins Using AGC-MS System. Another application to the analysis of O-glycans in a serum sample is shown in Figure 6. After brief deionization of the diluted solution using an ultramembrane filter, the solution was easily analyzed by the present system. As indicated in Figure 6A, several molecular ions were observed. The molecular ion peaks observed at *m/z* 765 with sodium adduct ion (*m/z* 787) are confirmed as sialyl-T.

The molecular ion peak observed at *m/z* 1056 corresponds to disialyl-T. The molecular ion peaks observed at *m/z* 562 with sodium adduct ion *m/z* 584 are due to a peeling product (NeuAcα2-3Gal=PNH). After the releasing reaction is performed in the flow of an aqueous LiOH solution, the reaction mixture is passed through a cartridge packed with cation exchange resin. Therefore, the effluent from the device does not contain cation(s) as examined by the absence of Li adduct ion in the MS spectra. Then, the effluent from the device is mixed with diluted phenylhydrazine solution and spotted onto the MALDI plate. Accordingly, the phenylhydrazone on the MALDI plate theoretically only shows protonated ions. In this case, however, diluted phenylhydrazine solution probably contains a trace amount of sodium ion, and the MS gives sodium adduct ions as well as protonated ions.

To confirm these peaks, we also analyzed the O-glycans obtained from the split effluent (collected by the fraction collector)

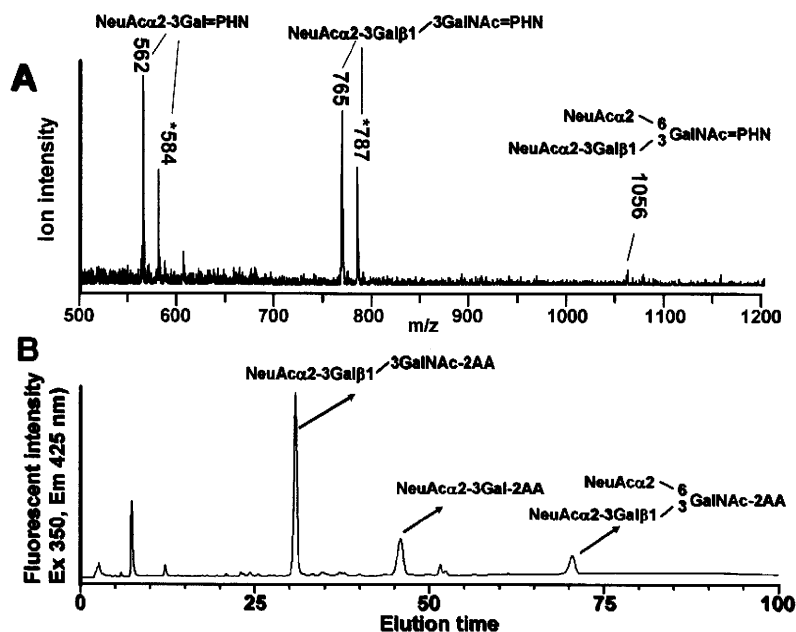


Figure 6. Analysis of O-glycans in a pooled serum sample. (A) MS analysis of the O-glycans by the present method. (B) Analysis of the O-glycans in a pooled serum sample by HPLC. The nine tenth portions of the O-glycans released by the autoglycan releasing system-MS system were labeled with 2-AA and analyzed by HPLC. Analytical conditions for HPLC: column, Asahi Shodex NH2P-50 4E (4.6 mm × 250 mm); eluent, solvent A, 2% CH₃COOH in acetonitrile; solvent B, 5% CH₃COOH/3% triethylamine in water, gradient condition, linear gradient (30–95% solvent B) from 2 to 82 min, maintained for 20 min.

as 2-AA derivatives using HPLC (Figure 6B). Each of the peaks was collected and compared with the standard samples by MALDI-TOF MS as reported previously.¹⁸ The most abundant peak observed at 31 min is due to sialyl-T which shows the molecular ion at m/z 765. The peak observed at 71 min is derived from disialyl-T which shows the molecular ion at m/z 1085. We also observed the peak due to the peeling product (NeuAcα2-3Gal-2AA) at 45 min. These results were in good agreement with the direct MS analysis as shown in Figure 6A, although the relative abundances of these glycans are different between HPLC and MS methods. The HPLC/CE-fluorescent detection method affords accurate amounts of the glycans based on the fluorescent intensity of the 2-aminobenzoic acid residue at the reducing terminal. A combination of both methods will be a powerful tool for accurate diagnosis of the disease or disease states.

CONCLUSIONS

We have been developing an automatic device for releasing O-glycans from the mucin-type glycoproteins.^{17–19} In the present paper, we connected the device to a spotter machine for MALDI MS measurement and attempted direct measurement of O-glycans. Because we could not observe the molecular ions of free glycans by direct measurement due to their low sensitivity and the presence of contaminated materials during releasing reactions, we labeled the released O-glycans with phenylhydrazine by *in situ* derivatization to achieve highly sensitive detection of O-glycans by MS measurement. The derivatization reaction proceeded under mild conditions even in the presence of 2,5-dihydroxybenzoic acid

(matrix material). Accordingly, we performed the analysis from the glycan releasing reaction to MS measurement within 1.5 h.

The system allows MS analysis of O-glycans of bovine submaxillary mucin even when using 1 μg of the protein sample (actual sample amount 100 ng). We applied the present technique to the analysis of the O-glycans expressed on MKN45 cells derived from human stomach adenocarcinoma and found that trisialo-O-glycans were present abundantly as reported previously.¹⁸ In addition, O-glycans in a pooled serum sample were also successfully analyzed. It is well-known that quantitative analysis is often difficult in MS measurement. Fluorescence detection by HPLC/CE gives robust and reproducible results in quantitative analysis. The data in Figure 6 indicate that the proposed method using the hyphenated glycan-releasing and MS analysis shows similar glycan profiles with those obtained by HPLC, but the relative abundances of the glycans are somewhat different from those observed by HPLC/CE analysis. However, extremely high-throughput characteristics of the present method will be quite important in routine analysis of glycans for clinical use. We believe that the present technique is the primary attempt to use MS measurement for routine clinical diagnostic works.

Received for review June 15, 2010. Accepted July 20, 2010.

AC101581N

EUにおける細胞・組織加工製品の規制動向

佐藤 陽治^{*1, #}, 鈴木 和博^{*1}, 早川 堯夫^{*2}

医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス
Vol. 42, No. 2 別刷 (2011年)
財団法人 日本公定書協会

EUにおける細胞・組織加工製品の規制動向

佐藤 陽治^{*1, #}, 鈴木 和博^{*1}, 早川 堯夫^{*2}

(受付:平成22年10月29日, 受理:平成22年12月27日)

Regulation of Cell/Tissue-Based Medicinal Products in the European Union

Yoji SATO^{*1, #}, Kazuhiro SUZUKI^{*1} and Takao HAYAKAWA^{*2}

はじめに

バイオテクノロジーや幹細胞学等の進展に伴い、再生医療・細胞治療などの先端医療でを使用することを目的として、培養・活性化等の加工が施された生細胞を含む医薬品・医療機器（細胞・組織加工製品）が国内外で数多く開発されつつあり、今まで治療が困難であった疾患や重度の損傷への高い効果が期待されている。これらの開発の勢いに呼応し、細胞・組織加工製品の品質及び安全性を確保するための行政施策・規制をいち早く整備することは、細胞・組織加工製品の実用化を促進して患者のもとにいち早く届けるという意味の上からも、製品の国際競争力確保の意味の上からも大きな課題である。また、製品の効率的な国際流通を視野に入れた場合、世界各国・各地域における承認審査での有効性・安全性・品質評価に関する考え方についての理解及び国際的協調が不可欠である。

欧州連合（EU）では、細胞・組織加工製品は体細胞治療薬（somatic cellular therapy products）又は組織工学製品（tissue engineered products）の範疇に分類されている。従来、体細胞治療薬は遺伝子治療薬とともに先端医療医薬品（ATMP, advanced therapy medicinal products）という医薬品の一類型に分類されていたが、2008年12月より組織工学製品もATMPとして規制を受けることになった。また、同時にATMPの審査に特化し

た先端医療委員会（CAT）が創設されるなど、積極的な開発支援策が取られている。本稿ではEUにおける、これらの新しい取り組みについて概説する。

1. ATMPの規制の枠組み

EUでは、ATMPは欧州医薬品庁（EMA, European Medicines Agency）が販売承認審査を担当する。2008年12月以前はATMPの範疇に含まれる製品は、遺伝子治療薬（gene therapy products）と体細胞治療薬のみで組織工学製品が含まれておらず^{1, 2)}、また、これらの製品の販売承認審査における評価基準に関して、EU加盟国間で統一がとれていなかった点が問題とされてきた。なおEUでは、医療機器に関しては、いずれかの加盟国より認定された民間の第三者認証機関の認証を受ければEU内の国境を越えた流通が可能となっており、国による審査は行われていないが、組織工学製品については医薬品³⁾に分類されるか、医療機器^{3, 4)}に分類されるか、その判断は加盟国によりまちまちであった。

欧州委員会（EC）はこれらの問題を、EU内で国境を越えた製品の流通を展開する際の大きな障壁であると考え、その解決策として2007年、ATMPの販売承認規制を定めるRegulation (EC) No 1394/2007⁵⁾を定めた。Regulation (EC) No 1394/2007は、組織工学製品をATMPの範疇に加えること、及びATMPについては加盟国にお

*1 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)
Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kami-yoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

*2 近畿大学薬学総合研究所 大阪府東大阪市小若江 3-4-1 (〒577-8502)
Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan

責任著者 Corresponding author

ける承認審査を経ずに初めからEMAで中央審査を行うことなどを主な柱とし、2008年12月より施行されるに至っている。

2. Regulation (EC) No 1394/2007 の概要

2.1 ATMP の定義

ATMPは、遺伝子治療薬、体細胞治療薬、又は組織工学製品と定義される。ここでの「体細胞治療薬」の定義は、「生物学的医薬品 (biological medicinal product) のうち、(a) 意図する临床上の用途に合うように生物学的性質、生理学的機能又は構造上の特性を変化させる実質的加工 (substantial manipulation) を施された細胞・組織を含む製品又はこれらから成る製品、ないしはドナーの体内での本来の機能と同じ機能を患者の体内でも果たすことを意図して利用するのではない細胞・組織を含む製品又はこれらから成る製品で、(b) 製品に含まれる細胞・組織の薬理的、免疫学的又は代謝的作用を通じて疾患の治療、予防又は診断を行うという観点に合う特性を有するもの、あるいはその観点からヒトに適用ないし投与されるもの」とされている⁹⁾。一方、「組織工学製品」は「工学処理された細胞・組織を含む製品又はこれらから成る製品で、ヒト組織の再生、修復又は置換を行うという観点に合う特性を有するもの、あるいはその観点からヒトに適用ないし投与されるもの」を指す⁹⁾。ここでの、「工学処理された細胞・組織」とは、「意図する再生、修復又は置換に合うように生物学的性質、生理学的機能又は構造上の特性を変化させる実質的加工を施された細胞・組織、ないしはドナーの体内での本来の機能と同じ機能を患者の体内でも果たすことを意図して利用するのではない細胞・組織」を指す (Table 1)。なお、「実質的加工ではない加工」の例としては、切断、研磨、成形、遠心分離、抗生剤・抗菌剤溶液への浸漬、殺菌・消毒・滅菌、放射線照射、細胞の分離・濃縮・精製、濾過、凍結乾燥、凍結、冷凍保存、ガラス化が挙げられている (文献5のAnnex I参照)。

従来、ある特定の組織工学製品が医薬品に該当するのか、医療機器に該当するのかという判断にEU加盟国間で差が生じやすかったことの大きな原因は、製品分類における「主要作用様式の原則」(primary mode of action rule)にあった。そこでRegulation (EC) No 1394/2007では、たとえ医療機器としての側面が主要作用様式であったとしても、組織工学製品の場合には、生きた細胞・組織を含むか否かという条件を優先し、医薬品の一種であるATMPに分類することとなっている。

2.2 ATMP に対する規制

2.2.1 基本原則：リスクベースアプローチ

EUではATMPの販売承認に関する規制の原則として、リスクベースアプローチ (risk-based approach) が採られている (文献6のAnnex I Part IV参照)。リスクベースアプローチとは、審査対象となる各製品の性質に固有、かつその品質・安全性・有効性に関連するリスクの分析をベースにし、その影響の度合いを科学的に評価することにより規制の方針・内容を定めるという方法である。リスクベースアプローチは、日米欧医薬品規制調和会議 (ICH) で2005年に合意された品質リスクマネジメント・ガイダンス (Q9) でも採用されており、今日では医薬品規制・開発の原則として比較的一般的なものとなっている。ATMPのリスクは、細胞の生物学的特性と由来、製造工程、ベクターの生物学的特性、タンパク質発現の様式、非細胞成分及び臨床におけるATMPの具体的な使用方法に大きく左右される。細胞を利用した製品については、その多様性の高さゆえに、患者、医療従事者又は公衆衛生に対するリスクの度合いも製品ごとに非常に異なってくる。したがって、こうした製品の開発計画及び審査要件は、多様な因子を加味したリスクベースアプローチによってケースバイケースで調節する必要があるとEMAは考えている⁹⁾。同時にEMAは、ATMPの製造工程 (製造工程内での検査や最終製品の検査を含む) は当該ATMPのリスクを十分に制限・制御できる能力を備えているべきだと考えており、また、非臨床試

Table 1 EUにおける「体細胞治療薬」と「組織工学製品」の定義

	体細胞治療薬	組織工学製品
1. 使用目的	製品に含まれる細胞・組織の薬理的、免疫学的又は代謝的作用を通じた疾患の治療、予防又は診断	ヒト組織の再生、修復又は置換
2. 以下のいずれかに該当する細胞・組織を含む (又はそうした細胞・組織で構成される)		
・実質的加工*	使用目的に合うように生物学的性質、生理学的機能又は構造上の特性を変化させる実質的加工を施された細胞・組織	
・細胞・組織の機能	ドナーの体内での本来の機能と同じ機能を患者の体内でも果たすことを意図して利用するのではない細胞・組織	

* 実質的加工に含まれない加工の具体例については文献5のAnnex I参照

験及び臨床試験でも、同定されたリスク要因について深く検討すべきだとしている⁹⁾。

(なお著者は、ここでいうリスクとは、所期の目標に対する「不適切性」、「不都合性」、「不合理性」、「非効率性」、「不確実性」などを意味していると解釈している。各ATMPの開発、製造、試験、審査、使用などの各過程や局面において、大小あるいは上位下位のさまざまな目標があり、アプローチがあるが、すべてが患者のためにという最終目的につながっているとの本質を常に認識・理解した上で、リスクアセスメント、コミュニケーション、コントロール、レビューなどを実施していくことが肝要である)。

2.2.2 製品の品質・安全性・有効性に関する規制

ATMPは医薬品の一類型であり、従来の医薬品に関する様々な規制が適用される。つまり、市場で流通させるためには販売承認が必要であり、そのためには製品の品質・安全性・有効性を明示することと同時に、市販後の監視・調査が要求される。ATMPの製造に用いる細胞の提供・採取・検査はEUのGood Tissue Practice (GTP)⁹⁻¹¹⁾に従う必要があり、品質管理に関しては、EUのGood Manufacturing Practice (GMP)¹²⁾に従う必要がある。なお、現在EMAはATMP向けの新しいGMPについても検討中である¹³⁾。更に、ATMPと医療機器との複合製品の場合には、医療機器関連規制^{3,4)}に従うとともに、承認申請時には製品の物理的特性、機能様式及び設計方法に関して明らかにする必要がある。また、製品の特性概要・ラベリング・パッケージングの記載に関してはDirective 2001/83/EC¹⁾の要件に従うが、ATMPでは特に、ドナーの匿名性を尊重しつつも、細胞ないし組織の由来について、患者の知る権利に十分に即するようなものとなっている必要がある。

従来の医薬品・医療機器とは異なり多くのATMPは患者の体の一部となる。したがって、ATMPの有効性・副作用に関するフォローアップ及びリスクマネージメントをECは非常に重要視しており、申請者にはフォローアップ、市販後調査の詳細についての説明、またリスクマネージメント計画が求められる。ATMPの市販後フォローアップ及びリスクマネージメントに関してはEMAから詳細な指針が出されている¹⁴⁾。また、ATMPの承認を受けた者は、その製品を使用する医療施設とともに、血液細胞以外の細胞・組織に関する規制⁹⁾ないし血液細胞に関する規制¹⁵⁾、及び個人情報保護に関する規制¹⁶⁾に従い、患者・製品及び原材料のトレーサビリティを確保するシステムを構築・運用しなければならない。ATMPのトレーサビリティに関する詳細な指針については、現在検討中である。

3. ATMPの臨床試験

EUにおけるATMPの臨床試験は、日本における「治験 vs. 臨床研究」に相当する区分は存在せず、大学等における非商業目的の臨床研究に相当する試験であっても、すべて日本の治験に相当する規制が適用される。臨床試験(治験)後にEU域内で流通させる場合にはEMAによる中央審査が必要となる。ただし、EMAはあくまでも薬事承認審査を行う機関であり、治験の開始・実施に関する手続きはすべて加盟国の管轄となっている。すなわち、EMAは臨床試験には一切関与できない。

臨床試験に関しては、ICHの基準に従ったEUのGood Clinical Practice (GCP)¹⁷⁾を順守することが必要であるが、Regulation (EC) No 1394/2007施行後のATMPの臨床試験に関しては、これに加え、現在策定中のATMP向けGCPに従う必要があるとされる。その詳細についてはトレーサビリティの確保等に関する留意点等がドラフト版¹⁸⁾から垣間見ることができる。

治験に関する裁量がEU加盟各国に属することから、同一の治験届を各国に提出しても結論が国によって異なる恐れがある。逆に、加盟各国の規制や倫理基準に対応できるよう、治験届の内容に国別の修正を余儀なくされる可能性がある。こうした状況は、治験の科学的な価値を下げることになることと危惧される。また、すべてのEU加盟国において治験参加者は等しく保護されるべきであるのが前提であることから、各国民の理解も得られにくくなってしまふ。治験に関するハーモナイゼーションについてはEMAではなく、Heads of Medicines Agency (HMA)の臨床試験推進グループで議論されており、ガイダンス¹⁹⁾を示す等の活動がなされている。

4. 相談制度・販売承認審査

4.1 相談制度

EMAは科学助言ワーキングパーティー (SAWP, Scientific Advice Working Party)を通じて医薬品の製品開発に関する科学的助言やプロトコル支援を開発者に提供している。ATMPの開発者は中小のベンチャー企業等 (SME, Small and Medium-sized Enterprise)が多いことから、現在EMAでは、SMEがATMPについての科学的助言を必要とする場合、通常の手数料の90%割引で相談に応じている。相談者がSMEで、対象となるATMPが公衆衛生上の特別な利益となることが証明できる場合には、更なる割引が考慮される。なお、それ以外の開発者でも対象品目がATMPならば通常の65%割引で相談に応じている。また、オーファン医薬品の場

合のプロトコール支援は無料である。

ATMPに関する場合には、SAWPを通じた相談以外に、より非公式な制度として技術革新タスクフォース (ITF, Innovation Task Force) との相談も利用可能である。ITFはEMA内の多部署から成るグループで、法律・ガイドライン等が未整備な先端の治療・技術に関して規制面での問題点を議論することを目的としている。したがって、既存のガイドラインではカバーしきれないケースの多いATMPのような新規の製品については、開発者から規制面での疑問点をITFに投げかけることができる。この制度はITFから助言を受けるというよりもむしろ意見交換の意味合いが強い。ITFとの相談は無料であるが論議内容の法的拘束力はない。

更にこれらの制度とは別に、EMAの先端医療委員会 (CAT, Committee for Advanced Therapies) は、開発者の品目がATMPに該当するか否かの助言を無料で行うとともに、SMEの非臨床試験・品質試験のデータの科学性に関する暫定認証を無料で行っている (後述)。

4.2 ATMPの中央審査

EU内の国境を越えたATMPの流通に関しては、EMAがECからの委任を受けて一括して承認審査を行っており、そこで品質・安全性・有効性に関する科学的評価が行われている。EMA内でヒト向けの医薬品の販売承認審査を行うのは、ヒト用医薬品委員会 (CHMP; Committee for Human Medicinal Products) であるが、ATMPについては従来の医薬品・医療機器よりも専門的かつ多分野にわたる評価を要することから、CHMPの下部諮問組織として先端医療委員会 (CAT) が2008年12月末に設置され、CATでの品質・有効性・安全性の評価意見書案をもとにしてCHMPが承認審査を行い、CHMPが作成した評価意見書をもとにしてECが承認の判断をする、という体制が取られている。ATMPの品質・安全性・有効性確保に関する要件・評価をEU内で調和させ、直接的で迅速な流通を図る目的から、ATMPはEU加盟国内での審査を経ることなく、直接CATでの評価を受けることになった。

4.3 経過措置

2008年12月30日以前にEU内で流通が承認されたATMPに関しては、経過措置が取られる。組織工学製品ではないATMPの場合には3年の移行期間 (2008年12月31日～2011年12月30日)、組織工学製品である場合には、4年の移行期間 (2008年12月31日～2012年12月30日) が与えられており、それまでにATMPとしての再承認を受ける必要がある。期間内に再承認を受けな

い場合には、EU市場での承認は取り消される。

4.4 先端医療委員会 (CAT) の構成と任務

4.4.1 構成

先端医療委員会 (CAT) は、EU加盟国から各1名 (副委員各1名)、患者団体から2名 (副委員2名)、臨床医が2名 (副委員2名) の、正副合計66名で構成され、会議は毎月1回開催される。患者団体及び臨床医の代表者としての委員はECが選定する。現在は、患者団体としてEGAN (欧州遺伝病連帯ネットワーク European Genetic Alliances' Network) 及びEurordi (欧州希少疾病機構 European Organisation for Rare Diseases)、臨床医の代表者としてESGCT (欧州遺伝子細胞治療学会 European Society of Gene and Cell Therapy) 及びEBMT (欧州血液骨髄移植グループ European Group for Blood and Marrow Transplantation) のメンバーがCATに参加している。なお、CHMPとの連携の必要性から、加盟国代表の委員うち5名はCHMPの委員である必要がある。

ATMPの評価において必要な学問領域としては、医療機器・組織工学・遺伝子治療・細胞治療・バイオテクノロジー・外科学・ファーマコビジランス・リスクマネジメント及び倫理学が挙げられており、委員会全体で必要な領域がカバーできるようにアレンジされている。その内訳は、遺伝子治療専門家が19%、細胞治療専門家が21%、組織工学の専門家が17%、バイオテクノロジー専門家が24%、倫理学専門家が8%、ファーマコビジランス専門家が5%、医療機器専門家が5%、外科学専門家が1%となっている。

4.4.2 CATの任務

CATの任務には、①ATMPの科学的評価、②ATMP該当性に関する助言、③SMEのATMP品質・非臨床データの暫定認証、④SAWPへの協力、そのほか、ATMP以外の製品についてのCHMPとの相談、及びECへの助言などがある。

4.4.2.1 ATMPの科学的評価

CATの任務の中でも主要なのは、ATMPの科学的評価である。個別のATMPについて、CATは品質・安全性・有効性に関する科学的評価結果を意見書案としてCHMPに提出する。評価意見書案の提出は、正式な承認申請日から数えて約200作業日以内に行う。なお、CHMPは正式な承認申請日から数えて210作業日以内に承認に関する評価意見書を確定する。なお、これら作業日には土日祝日を含む。また、CATの質問事項リストが出された時から申請者がこれに回答するまでの間は作業日に勘定しない。ATMPが医療機器との複合製品

の場合には、CATは医療機器認証機関との情報交換も行う。

4.4.2.2 ATMP 該当性に関する助言

CATは特定の品目がATMPに該当するか否かについて、科学的な基準に基づいた検討・判断を行う。製品の分類に関する助言要請は、治験届や承認申請の有無に係らず随時受け付けられており、手数料もかからない。正式な助言要請から60日以内で回答されることになっている。CATの回答は、製品の内容・治療対象・CATによる検討結果について、秘匿事項を除いた後に公開される。また、ATMPのファーマコビジランス及びリスクマネジメントシステムの計画及び実施に関しても、承認申請者・承認取得者からの要請に応じて助言を行う。

4.4.2.3 SMEのATMP品質・非臨床データの暫定認証

中小ベンチャー企業等(SME)はATMPの品質・非臨床データに関し、CATによる科学的評価に基づく暫定認証を受けることができる。暫定認証の審査は治験開始・承認申請の有無に係らず、SMEから申請があった場合に随時行われる。あくまで品質・非臨床データの科学的評価の結果のみを認証するものであって、治験届や承認申請とは独立したものとみなされている。すなわち、認証書は法的には治験届や承認申請の際に提出すべきデータの代用として使うことはできない。ただしECとしては、同じデータを用いて将来、治験あるいは承認の申請が行われる際には、申請の評価が行いやすくなることも期待している。

4.4.2.4 SAWPへの協力

CATはSAWPに協力することにより、ATMPの科学的助言にも関与している。ただし、CATのSAWPへの関わり方の詳細については試行錯誤が続いている。

4.5 ATMP承認審査におけるEMA各組織の役割

4.5.1 CATとCHMPの共同作業

従来の医薬品の場合はCATに諮問されることなく、CHMPラポーターとCHMP副ラポーターがそれぞれ専門家チームを構成して評価し、その評価結果をCHMPで議論する。結論がCHMPで了承されると、それを受けたECが承認をすることになる。一方、ATMPの評価はCATラポーターとCHMPコーディネーター及び品質・安全性・有効性の各専門家からなるチームと、CAT副ラポーターとCHMP副コーディネーター及び品質・安全性・有効性の各専門家からなるチームの2チームで行う。2チームが作成した評価レポートをCHMPのメンバー1名とCATのメンバー1名以上が査読し、その結果をCATの全体会議で議論する。CATは議論した内容を評価意見書案としてCHMPに提出する。CHMPは評価

意見書案をもとに承認審査を行って評価意見書を作成し、更にこれをもとにECが承認の可否を判断する。

4.5.2 CATの役割

先述のようにCATはATMPの科学的評価を行うことになっているが、具体的作業としては、ATMPの評価に関して質問事項のリスト、解決すべき問題点のリスト、及び評価意見書案の内容を議論する。また、必要となれば会議中にEMAのワーキングパーティーメンバー等の外部専門家にもスライドと電話でのプレゼンテーションをさせ、議論を行う。CAT正副ラポーターは、CATの全体会議における評価の過程・議論をコーディネートするとともに、評価レポート、質問事項リスト、問題点リスト等の作成を担当し、またEMAのワーキングパーティーメンバー等の外部専門家との相談の必要性があるかどうかの判断を行う。

4.5.3 CHMPの役割

CHMPはATMPの評価を行う2チームの任命を行うとともに、CATの評価意見書案をもとにした評価意見書を作成する。また、CATでの評価過程でコメントを加えることもできる。全体会議で主なATMPについての科学的意見や議論について情報を共有し、必要であれば審査期間(正式な承認申請日から数えて210日作業日)の最後に問題点リストの作成及び口頭での説明の機会設定を行うことができる。

CHMP正副コーディネーターは、CATの上部組織であるCHMPとCATとの間の情報のパイプ役となるとともに、CHMPにおいてCATの意見についての討議・採択を担当する。また、審査期間中にEMAのワーキングパーティーメンバー等の外部専門家との相談の必要性があるかどうかの判断を行う。

4.5.4 EMA事務局の役割

EMAはCATの評価意見書案及びCHMPの評価意見書がそれぞれ決められた期間内に作成されることをチェックすると同時に、CAT及びCHMPの評価の透明性を確保する。CAT事務局は、CAT正副ラポーターの評価レポートの科学的面及び規制の面での整合性を確保すると同時に、CHMPでの最終承認を受けるための評価意見書案の準備を行う。更に、CAT事務局はATMPの評価や回収に関する情報収集・提供を行う。

5. 市販後安全対策

Regulation (EC) No 1394/2007には、ATMP市販後における安全対策として、トレーサビリティの確保と市販後における安全性監視(ファーマコビジランス)が挙げられている。ATMPのドナー・原材料・製品・製造工程

及び患者のトレーサビリティの確保は従来の関連 Directive に従うことになるが、先述のように、現在 ATMP に特化した指針についても検討中である。

ファーマコビジランスについては、ATMP に特化した指針¹⁶⁾ が出され、2008年12月末より発効している。EU では従来、ファーマコビジランスはファーマコビジランスシステムとリスクマネジメントシステムとで構成されているが、この ATMP 向け指針では有効性フォローアップシステムの構築が要求されている点が特徴的である。また、リスクマネジメントの実施に当たっての ATMP に特有のリスクの例、ファーマコビジランスの実施における注意点、リスクを最小化するための方策なども示されている。

ATMP は生きている細胞・組織を含む。したがって、患者への投与後、長期間の間には細胞・組織の性質に変化が生じる可能性があり、これと同時に ATMP としての有効性にも変化が生じ得る。一方、そうした変化が患者にどのような影響をもたらすか、という点については販売承認前には十分には理解し得ない。ATMP に対する患者の免疫応答性及び反復投与による免疫獲得等も、有効性・安全性に影響する可能性がある。また、ATMP の投与の様式（手術時の患者の状態・前処理、手術及び手術後の処置などまで含む）によっても有効性・安全性は変わり得る。更に、ATMP は作用期間が限定的なものから終生理植され続けるものまで様々である。これらの理由から、ATMP に関しては有効性のフォローアップが重視されることになる。

ATMP の市販後安全対策の課題としては、構築したファーマコビジランスシステム、リスクマネジメントシステム及び有効性フォローアップシステムに関する不透明性が挙げられている。すなわち、データが非公開で、要旨のみが公開されることになっており、新たな ATMP の開発促進・安全性確保の上で問題視されている。また、データの保管及びトレーサビリティシステムの担い手が承認申請者である点も、そのままではよいのかという議論がある。

6. 例外規定—ホスピタルエグゼンプション—

ATMP の中央審査の原則の例外として、Regulation (EC) No 1394/2007 の Article 28 には、①特定の一患者向けの特注品の処方箋に従って、②固有の品質基準に基づき、③非反復的に製造され、④医療従事者の職務責任の下、⑤同一加盟国内で、⑥単一病院において使用されるという条件すべてを満たす場合には中央審査とはならない、という規定がある。これをホスピタルエグゼンプシ

ョン（病院特例、Hospital Exemption）と言う。ただし、ホスピタルエグゼンプションに該当する品目の場合も、生産国において製造工程と品質に関する承認を受ける必要があり、またファーマコビジランス実施とトレーサビリティの確保が必要となる。特に自己由来細胞を用いた ATMP の場合、患者ごとのオーダーメイドであることから「非反復的の生産」と考えがちだが、通常 EU では、一定の標準化された製造工程で工業的（産業的）に製造される場合には、自己細胞を原材料としても患者ごとに互いに別個の製品とはならず、反復的製造と見なされる²⁰⁾。これは製造工程中にあるリスクが多くの製品・患者に拡散するのを防ぐためである。

おわりに

ATMP は目覚ましい進展を見せ、EU でも次々と新たな開発品が出現しているが、細胞・組織・遺伝子といった、これまでにない複雑な構成成分を含むと同時に、その臨床応用に関しては非常に限られた経験と知識しか存在せず、明確な科学的根拠に基づいた品質や安全性等の確保が課題であった。これを克服するための取り組みとして Regulation (EC) No 1394/2007 が発出されたが、その取り組みの中にもまだ問題点が多い。例えば、中小ベンチャー企業向けの ATMP 品質・非臨床データの暫定認証は、臨床試験審査や販売承認審査とは正式な法的繋がりが無いため、その意義付け、位置付けはまだ明確ではない。開発の早い段階で暫定認証が行われてもデータ自体が最終的な製品の規格と乖離したものとなりかねず、逆に遅ければ大企業への技術移転等が進まない。適切なタイミングについての判断もまだ難しい。また、ATMP に関するホスピタルエグゼンプションの要件中の単語の解釈の違いから、EU 地域内でも特定の先端治療が受けられる国と受けられない国が生じ、実施国に患者が集中する、いわゆる「医療難民」が発生することが危惧され、CAT でも「非反復的」「単一の病院」などの単語の定義についてハーモナイゼーションの必要性が説かれている。ATMP 向けの GCP や GMP 及びトレーサビリティに関する詳細な指針等もまだ確定されていない。

こうした問題はあるものの、EU の規制当局は、ATMP に対して品質や安全性等の確保及びリスクベネフィットのバランスを図りつつ、実用化を促進するために試行錯誤をいくつも繰り返しながら、着実に規制の枠組み作りを進めている。既に 2009年6月には培養軟骨製品が、新たな審査体制の下での初の ATMP 品目として販売承認を受けているが、即座に CAT はその審査経験をもとに、培養軟骨製品の承認審査における留意点をまとめた