

平成 22 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790110

研究課題名(和文)ヒト間葉系幹細胞の糖鎖を指標とした神経分化能評価技術の開発に関する研究

研究課題名(英文) Study on neural differentiation of human mesenchymal stem cells based on glycans

研究代表者

橋井 則貴 (HASHII NORITAKA)

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・主任研究官

研究者番号：20425672

研究成果の概要(和文): ヒト間葉系幹細胞 (MSC) の神経様分化過程における分子マーカーの探索を目的として、まず液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) と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法を開発した。次に、本分析法を用いて、MSC の神経様分化前後の細胞の糖鎖差異解析を行い、糖鎖は、MSC とその神経様分化細胞を区別するための分化マーカーとして利用できることを実証した。

研究成果の概要(英文): To find molecular markers during neural differentiation of human mesenchymal stem cell (MSC), first, we developed a quantitative glycan profiling using liquid chromatography/mass spectrometry in combination with the isotope tagging method. And then, we conducted differential glycan analysis between MSC and the neural-lineage cells by the quantitative glycan profiling, and demonstrated that glycans can be used as a molecular marker for discriminating undifferentiated MSC from neural-lineage cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	0	2,300,000
2009 年度	1,100,000	0	1,100,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000		3,400,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬品化学，再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト間葉系幹細胞 (MSC) は、神経様細胞に分化する能力を有することが示唆されている。神経疾患のモデル動物において、MSC を移植すると神経機能が改善することが報告されており、MSC を用いた神経疾患治療が現実味を帯びつつある。MSC を用いた神経疾患

治療における重要な課題の一つは、神経分化させた細胞と未分化 MSC の区別の仕方である。未分化細胞は、異所性分化や制御不能な増殖を引き起こす可能性があることから、MSC を用いた神経疾患治療の安全性及び有効性を保証するためには、MSC の神経様分化過程における分子マーカーを見出すことが

重要であると思われる。糖鎖は、細胞の分化に関係することが知られており、細胞の神経分化における分子マーカーとして利用できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、MSC の神経分化過程における分子マーカーの探索を目的として、まず、細胞由来糖鎖を比較定量するための定量的糖鎖プロファイリング法を開発する。また、本定量法を用いて、MSC の神経様分化前夜の細胞由来糖鎖の比較定量を行い、糖鎖の神経分化マーカーとしての有用性を評価するとともに、マーカーとして利用可能な糖鎖を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) 試薬

フェニルヒドラジン塩酸塩 ( $^{12}\text{C}$ -PHN) 及び  $^{13}\text{C}$  標識フェニルヒドラジン塩酸塩 ( $^{13}\text{C}$ -PHN) は、それぞれ Aldrich (MO, USA) 及び Cambridge Isotope Laboratories (MA, USA) から購入した。2-ピコリンボランは、純正化学 (株) 社製のものを使用した。Peptide-N-glycosidase F (PNGase F) は、Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) から購入した。

### 2) PHN による糖鎖のラベル化

糖鎖試料を 100  $\mu\text{l}$  の  $\text{H}_2\text{O}$  で溶解し、4  $\mu\text{mol}$  の PHN 塩酸塩、及び 10  $\mu\text{mol}$  の 2-ピコリンボランを加えて攪拌し、遮光下 55°C で 1 時間、断続的に攪拌しながらインキュベートした。反応終了後、100  $\mu\text{l}$  のククロホルムを加えて激しく攪拌した後、遠心分離 (1,000 $\times$ g, 30 秒) を行った。ククロホルム層を除去した後、再度 100  $\mu\text{l}$  のククロホルムを加えて同様の操作を 2 回繰り返す、過剰な試薬を除去した。

### 3) 細胞培養

MSC (MSC-R36, 理化学研究所バイオリソースセンター) は L-グルタミンを添加した Mesenchymal stem cell growth medium (MSCGM, Lonza, Basel, Switzerland) 培地 (10 ml/10 cm ディッシュ) で培養 (5%  $\text{CO}_2$ , 37°C) した。セミコンフルエントまで培養し、0.02% EDTA を添加した PBS で洗浄を行い、0.25% Trypsin-EDTA (GIBCO, MD, USA) により細胞を剥離した後、10cm ディッシュに約  $2\times 10^5$  の細胞を播種して継代培養を行った。

### 4) 神経様細胞への分化誘導

神経誘導基礎培地は、HyClone

AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cell Expansion Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いた。神経誘導培地は 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、 $2\times 10^5$  個の MSC を 24 時間培養 (5%  $\text{CO}_2$ , 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。

### 5) 細胞由来タンパク質の調製

培養した細胞をプロテアーゼインヒビター (protease inhibitor mix DMSO solution, Sigma, MO, USA) を添加した PBS (pH 7.2, 日水製薬 (株), 東京) を用いて 3 回洗浄した後、Cell Lifter (Corning, NY, USA) 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 LIPA 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  $\times$ 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, CA, USA) 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。

### 6) 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  $\mu\text{g}$ ) を 50  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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。次に、4.8  $\mu\text{l}$  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。

### 7) 糖鎖の切り出し

回収した還元アルキル化タンパク質を 200  $\mu\text{l}$  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 により乾燥させた。乾燥糖鎖試料は MSC 及び神経様分化細胞共に 3 種類ずつ調製した。

8)  $^{12}\text{C}$ -PHN 及び  $^{13}\text{C}$ -PHN による細胞由来糖鎖の標識

2) に示したラベル化方法に従って, MSC 由来糖鎖を  $^{12}\text{C}$ -PHN で, 神経様分化細胞由来糖鎖を  $^{13}\text{C}$ -PHN で, それぞれ 3 種類ずつ標識した。ラベル化後, もとのタンパク質あたり等量となるように  $^{12}\text{C}$ -PHN 及び  $^{13}\text{C}$ -PHN 糖鎖を混合した(n=3)。得られた 3 種類の分析試料溶液について LC/MS を行い, 同一ピーク内で 6 u 差で検出された両糖鎖イオンの強度比に基づき存在比を算出した(図 1)。

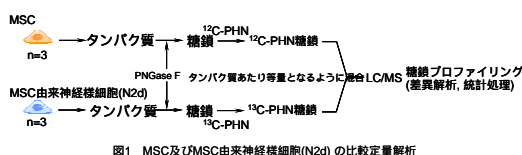


図1 MSC及びMSC由来神経様細胞(N2d)の比較定量解析

9) LC/MS

ナノフローLC (nanoLC) は Paradigm MS4 (Michrom BioResources, CA, USA) 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, 東京) を接続した Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR-MS, 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。

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 ( $\text{MS}^n$ , n=2~4) 測定条件は, 以下の通りであった。

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

トラップカラム: C18 (L-Culumn, 0.3×5.0 mm, 粒子径 5µm, (財) 化学物質評価研究機構, 東京)

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

$\text{MS}^n$  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: 2.5ekV

$\text{MS}^n$  の衝突エネルギー (コリジョンエネルギー): 25%

#### 4. 研究成果

##### 1) LC/MS 及び PHN ラベル化法を用いた定量的糖鎖プロファイリング法の評価

定量的糖鎖プロファイリング法の開発は, 細胞のマーカー糖鎖の探索に不可欠である。我々はこれまでに, LC/MS 及び同位体標識した 2-アミノピリジン (2AP) を用いた糖鎖ラベル化法による定量的糖鎖プロファイリング法を開発してきた。しかし, 2AP による糖鎖ラベル化は, 酢酸溶液中で加熱するため, シアル酸のように結合力の弱い糖は解離する可能性があった。ヒト細胞には多くのシアロ糖鎖が存在するため, より安定した条件で糖鎖標識が可能な試薬を使用する必要がある。本研究では, 中性条件での標識が可能なフェニルヒドラジン (PHN) に着目し, PHN の  $^{13}\text{C}$  置換体を糖鎖のラベル化試薬として使用する糖鎖比較定量法の開発を検討した。まず, PHN の濃度, 反応時間及び反応温度等の様々な反応条件を検討した結果, 研究方法 2) に示した条件で糖鎖をラベル化したとき, 最もラベル化効率が高くなることを明らかにした。また, PHN ラベル化糖鎖の安定性, 分析法の頑健性の向上を目的として, ラベル化糖鎖の還元を検討した。その結果, 2-ピコリン-ボラン複合体を PHN ラベル化試薬に添加することにより, ワンステップで糖鎖をラベル化し, 還元できることを明らかにした(図 2)。

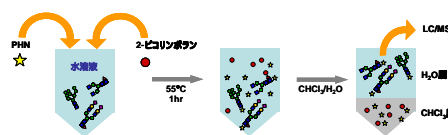


図2 PHN糖鎖ラベル化法の概略

次に, 標準糖鎖を用いて本ラベル化法と LC/MS を組み合わせた方法の比較定量法としての実行可能性について検証した。図 3 は, 市販の標準糖鎖を用いて,  $^{13}\text{C}$ -PHN ラベル化糖鎖に対する  $^{12}\text{C}$ -PHN ラベル化糖鎖の比率の直線性を確認した結果である。横軸は, 両ラベル化糖鎖の混合比率 (理論値), 縦軸は, LC/MS により検出されたラベル化糖鎖のイオン強度比 (実測値) である。高マンノース型糖鎖 (M9), ジシアロ複合型二本鎖糖鎖

(A2) 及びトリシアロ複合型三本鎖糖鎖 (A3(1)及び(2)) とともに高い直線性が得られており、本糖鎖プロファイリング法は、糖鎖の比較定量法として利用可能であることが明らかとなった。

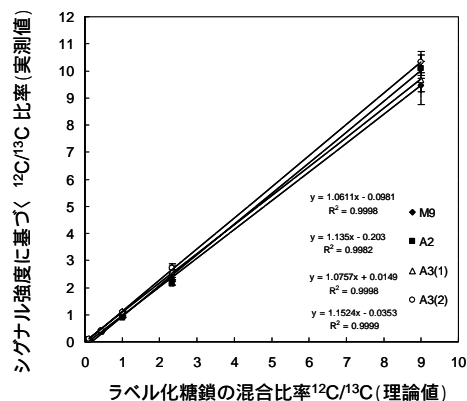
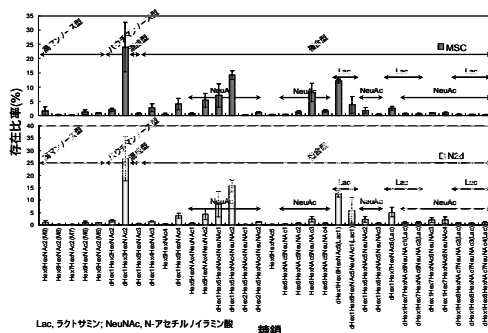


図3 定量的糖鎖プロファイリング法の直線性の確認

## 2) MSC及びMSC由来神経様細胞 (N2d)の糖鎖差異解析

### 2-1) MSC 及び N2d 由来糖鎖の構造及び分布

LC/MS によって検出された各糖鎖の精密質量、及びMS<sup>n</sup>により得られたプロダクトイオンスペクトルを解析した結果、MSC 及び N2d とともに、主要糖鎖は、高マンノース型糖鎖(M5 ~ M9)、パウチマンノース型糖鎖、混成型糖鎖及び複合型糖鎖であった。最も種類の多い糖鎖は複合型糖鎖で 26 種類の糖鎖が検出された。次に、MSC 及び N2d の糖鎖分布を明らかにするために、LC/MS によって検出された糖鎖の総ピーク強度に対する各糖鎖の強度比率(存在比率(%))を求めた (図4)。存在比率の高い糖鎖は、MSC 及び N2d 共に N-結合型糖鎖の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糖鎖であった。その他、N-アセチルノイラミン酸やラクトサミン構造等が付加した複合型2本鎖糖鎖の存在比率が高いことが明らかとなった。



Lac, ラクトサミン; Neu5Ac, N-アセチルノイラミン酸

MSC と N2d の分布を比較した結果、複数の糖鎖について、発現量に顕著な差がみられたが、MSC または N2d にだけ発現している糖鎖は見つからなかった。

### 2-2) 糖鎖差異解析

LC/MS によって帰属された全ての糖鎖について、同一ピーク内に検出された<sup>12</sup>C-PHNラベル化糖鎖及び<sup>13</sup>C-PHNラベル化糖鎖のイオン強度比率(<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C)から、比較定量解析を行った。図5に示したように、MSCを神経様細胞に分化誘導すると、N-アセチルノイラミン酸を3分子もつ複合型3本鎖糖鎖の発現量が1/2に減少すること示唆された。一方、ラクトサミン構造を持つ複合型糖鎖を含む多くの複合型糖鎖については、分化誘導すると増加する傾向がみられた。

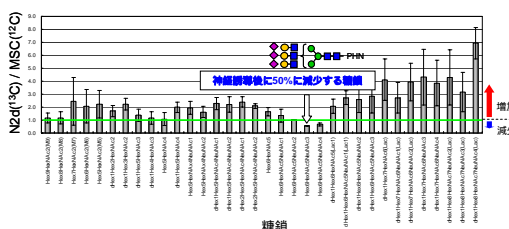


図5 MSC及びN2dの糖鎖差異解析

以上の結果、<sup>13</sup>C-PHNを用いる糖鎖ラベル化法とLC/MSを組み合わせた定量的糖鎖プロファイリング法は、細胞の分化過程におけるマーカー糖鎖の探索法として有用であることが実証された。さらに、本研究において差のみられた糖鎖は、MSC と N2d を区別するための分子マーカーとして有用であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

- (1) Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Nakajima, Y., Harazono, A., Kawanishi, T., Yamaguchi, T.: Identification of glycoproteins carrying a target glycan-motif by liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry: identification of Lewis x-conjugated glycoproteins in mouse kidney. *J. Proteome Res.*, 8, 3415-3429 (2009).
- (2) Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Nakajima, Y., Kawanishi, T., Yamaguchi, T.: Alteration of N-glycosylation in the kidney in a mouse model of systemic lupus

erythematosus: relative quantification of N-glycans using an isotope-tagging method. *Immunology*, 126, 336-345 (2009).

- (3) 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, 10132-10154 (2009).
- (4) 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).

〔学会発表〕(計5件)

- (1) 原園 景, 小林 哲, 川崎ナナ, 伊藤 さつき, 多田 稔, 橋井則貴, 石井明子, 荒戸照世, 柳原繁弘, 八木有紀, 古賀明子, 津田祐里子, 木村美紀子, 崎田政志, 北村 智, 山口秀人, 三村尚志, 村田芳美, 濱詰康樹, 佐藤貴之, 長束俊治, 掛樋一晃, 木下充弘, 渡部沙木絵, 山口照英: 糖タンパク質医薬品の単糖試験法の標準化. 日本薬学会第130年会 (2010.3)
- (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 (2009.3)
- (3) 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 (2009.3)
- (4) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 篠原 聡, 橋井則貴, 山口照英: ヒト間葉系幹細胞のThy-1の糖鎖構造解析. 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(2008.12)
- (5) 橋井則貴, 川崎ナナ, 中島 紫, 伊藤さつき, 山口照英: d<sub>5</sub>-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(2008.12)

〔図書〕(計1件)

- (1) 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 糖鎖異常の網羅的解析. 蛋白質核酸酵素 臨時増刊号 糖鎖情報の独自性と普遍性, 53, 1690-1696, (2008).

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nihs.go.jp/dbcb/dbcb-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋井 則貴 (HASHII NORITAKA)

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・主任研究官

研究者番号: 20425672

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号: