

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成23年度～平成24年度

課題番号：22790125

研究課題名（和文） 間葉系幹細胞の糖鎖を指標とした同等性・同質性評価法の開発

研究課題名（英文） Development of evaluation methods for comparability of 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 第一室長

研究者番号：20425672

研究成果の概要（和文）：間葉系幹細胞（MSC）を用いた再生医療の本格的な実用化に向けて、幹細胞と加工細胞を識別する技術の開発が不可欠である。MSCを分化誘導した細胞の糖鎖は、分化初期のステージから変化することが明らかとなった。糖鎖プロファイルは、MSCと分化誘導細胞を区別するための指標として糖鎖プロファイルを利用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：For full-scale practical use of cell therapeutic products from MSCs, development of a method for distinguishing MSCs from differentiated cells is needed. We demonstrated the glycan profile alterations during early-stage of MSC differentiations. Glycan profiles can be used as a molecular index for discrimination of MSCs from differentiated cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	2,100,000	0	2,100,000
平成23年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	0	3,100,000

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

間葉系幹細胞（MSC）は、iPS細胞と同様に、自己の細胞・組織から調製可能な多能性幹細胞であり、細胞の癌化の可能性が低いこと、移植時の拒絶反応が無いことから再生医療に応用されることが期待されている。近年、MSC及びその分化誘導後の細胞（加工細胞）を利用した組織・臓器の再生技術等に関する研究が急速に進展しており、細胞治療薬としての有効性が実証されつつある。

一方、MSCの品質評価に関する研究は遅れている。一般にMSCの未分化性及び可塑性（分化能）は、形態学的変化、及び免疫化学的

手法によりマーカーの発現を確認することで評価されているが、MSCは培養液中の血清等の有無により増殖性及び可塑性に差が生じることが示唆されており、従来のマーカーではMSCの詳細な細胞特性を評価できない。また、現在利用されている多くのマーカーは、神経幹細胞や神経細胞にも発現しており、MSCを神経分化させたとき、従来のマーカーで神経分化前後の細胞を識別することは難しい。MSCを用いた再生医療を実現するためには、MSC由来加工細胞が目的とする方向に分化していることを確認するための手法、即ち、MSCの細胞特性変化に対して鋭敏に反応

する指標を用いた細胞識別技術を開発し、MSC由来加工細胞の同等性・同質性評価の確立がすることが急務である。

細胞に発現した糖タンパク質糖鎖は、分化及び増殖等の様々な現象に関与することが知られている。また、ある種の糖鎖抗原は、特定の臓器の腫瘍に特異的に発現することから、腫瘍マーカーとして臨床応用されている。我々は、これまでの研究で、MSCをウシ胎仔血清 (FCS) 添加培地で培養すると、本来ヒトが産生することができない単糖が糖鎖に付加されることを明らかにしている (*J. Chromatogr A*, 2007, **1160**, 263-269)。糖鎖は、細胞の分化・増殖及び培養条件等の変更に伴い糖鎖構造及び発現量に変化することから、MSC由来加工細胞の特性指標としても利用できる可能性は高い。しかし、MSCの糖鎖に関する報告は僅かであり、分化誘導初期の細胞や神経分化など従来のマーカーでは評価の難しい分化細胞の糖鎖変化は明らかにされていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では、MSCとその分化誘導細胞を識別するための指標としての細胞発現糖鎖の利用可能性を評価することを目的として、① MSC及びMSCの骨、軟骨及び神経様分化誘導初期の細胞について液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)により各細胞の糖鎖プロファイリングを行った。② 取得されたMSデータを用いて多変量解析を行い、MSC及び分化初期細胞を区別するための指標としての糖鎖プロファイルの有用性について検証した。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞及び試薬

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC, MSC-R36) は理化学研究所バイオリソースセンター (RIKEN BRC CELL BANK) より供与された。

### (2) 細胞培養及び分化誘導

#### ① MSCの培養

MSCはL-グルタミンを添加したMSCGM培地で培養 (5%CO<sub>2</sub>, 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) により細胞を剥離した後、約 2×10<sup>5</sup> の細胞を播種して継代培養を行った。

#### ② 神経様分化誘導

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 (HyClone AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cell Expansion Kit, ) を用いて、2×10<sup>5</sup>個のMSC

を24時間培養 (5%CO<sub>2</sub>, 37°C) した後、神経誘導培地 (HyClone AdvanceSTEM Neural Differentiation Kit, Thermo Fisher Scientific, 10 ml/10 cm ディッシュ) で2日間神経誘導した。

#### ③ 軟骨様分化誘導

D-MEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, 1:1 Mixture, Invitrogen) に1% ITS Liquid Media Supplement (Sigma-Aldrich) , 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine , 及び StemXVivo Chondrogenic Supplement (R&D Systems) を添加して、軟骨分化誘導培地とした。軟骨分化誘導培地を用いて 2.5×10<sup>5</sup> 個のMSCを2日間培養 (5%CO<sub>2</sub>, 37°C) した。

#### ④ 骨様分化誘導

骨分化誘導基礎培地 (α-MEM, 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine, Invitrogen) を用いて MSC をセミコンフルエントに達するまで培養した (5%CO<sub>2</sub>, 37°C) 後、骨分化誘導培地 (5% StemXVivo Osteogenic Supplement (R&D Systems)を含む骨分化誘導基礎培地) で2日間培養した。

### (3) 細胞由来タンパク質の調製

細胞を回収した後、RIPA バッファー (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.25% Sodium Deoxycholate, 1% NP-40, 1% protease Inhibitor) で溶解した。不溶性物質を除去した後、上清をタンパク質試料溶液とした。

### (4) 糖鎖の切り出し

タンパク質を還元カルボキシメチル化した後、50 µgのタンパク質を200 µlの100 mM EDTAを含む50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解した。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、遠心分離によりタンパク質を除去した。上清を Speed Vac により乾燥し、遊離したN結合型糖鎖を回収した。

### (5) 還元化糖鎖の調製

乾燥糖鎖試料を500 µlの0.5 M NaBH<sub>4</sub> 溶液を加えて、糖鎖を溶解させた後、室温で16時間還元した。酢酸を用いて反応溶液を中和した後、グラファイトカーボン樹脂を固定相としたカートリッジ (ENVI Carb C, Supelco) を用いて還元化糖鎖を回収した。

## 6. LC/MS

nanoLCはUltiMate 3000 RSLCnano LC systems (Dionex) を使用した。溶離液は2% アセトニトリルを含む5mM 重炭酸アンモニウム溶液 (A 溶媒) 及び80% アセトニト

リルを含む 5mM 重炭酸アンモニウム溶液 (B 溶媒) を使用した。流速は 500 nl/min に設定した。質量分析 (MS) 装置は Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR-MS, LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific) を使用した。尚、分析に使用したカラム、グラジュエント条件等は、以下の通りであった。

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

グラジュエント条件：5–60%B 溶媒 (リニアグラジュエント, 60 分間)

シングル MS スキャンモード：FT-MS

MS/MS ~ MS/MS/MS/MS スキャンモード：IT-MS

スキャン範囲：m/z 700-2,000

キャピラリー温度：200°C

スプレー電圧：2.5ekV

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

## 7. 多変量解析

LC/MS により取得したスペクトルデータの保持時間のずれを、データラインメントソフト (SIEVE ver1.2) を用いて補正した後、検出された各糖鎖のピーク強度をリスト化した。作成されたリストについて、多変量解析ソフト Simca-P+ (Umetrics) により、スコアプロット及び S-plot 解析を行った。尚、ポジティブイオンモードで測定した LC/MS ではシアル酸が付加した高分岐複合型糖鎖の検出が困難であったことから、多変量解析にはネガティブイオンモードで取得されたスペクトルデータを用いた。

## 4. 研究成果

(1) 分化誘導による形態学的変化の確認  
MSC (図 1A) を 2 日間の神経、骨及び軟骨様分化誘導後、各細胞の形態学的変化を観察した。図 1B は神経様分化細胞である。細胞質部分の球状化、及び突起の伸長が観察され、神経細胞様の形態学的変化が生じていることが確認された。一方、2 日間の骨及び軟骨様分化細胞では、顕著な形態学的変化は観察されなかった (図 1C, 1D)。

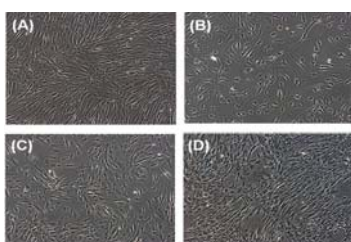


図 1 MSC 及び分化誘導細胞 (2 日目) の光学顕微鏡像。(A), MSC; (B), 神経様分化細胞; (C), 軟骨様分化細胞; (D), 骨様分化細胞。

(2) MSC 及び神経、骨及び軟骨様分化細胞由来 N 結合型糖鎖の解析

タンパク質量に換算して 8  $\mu$ g 相当の還元化糖鎖を分析した。図 2 に、LC/MS により取得された MSC 由来還元化糖鎖のベースピーククロマトグラム (ネガティブイオンモード) を示した。検出された糖鎖の構造は、FTMS により測定された精密質量と多段階 MS/MS (MS/MS ~ MS/MS/MS/MS) により生じたフラグメントの帰属により推定した。解析の結果、高マンノース型糖鎖 (M5 ~ M9, 19 ~ 31 分)、パウチマンノース型糖鎖 (28 ~ 37 分)、及び複合型 2 ~ 4 本鎖糖鎖 (24 ~ 50 分) が主要糖鎖として溶出されていることが明らかとなった。複合型糖鎖については、興味深い糖鎖として、3 本鎖 (又はラクトサミン付加 2 本鎖) 糖鎖に 4 分子の N-アセチルノイラミン酸 (NeuNAc) が付加した糖鎖が検出された。

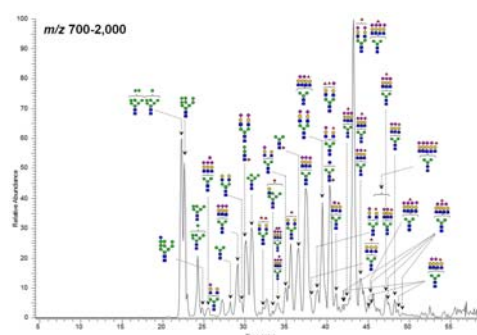


図 2 LC/MS により得られた MSC の糖鎖プロファイル (basepeak chromatogram, negative ion mode)

● galactose; ● mannose; ● glucose; ■ N-acetylglucosamine  
▲ fucose; ◆ N-acetylneuraminic acid

骨及び軟骨様分化細胞から調製した還元化糖鎖についても同様に解析した結果、MSC と比較して検出された糖鎖の種類に違いは認められなかったが、ベースピーククロマトグラムの形状に違いがみられたことから、各糖鎖の結合量に差がみられる可能性が示唆された (図 3)。

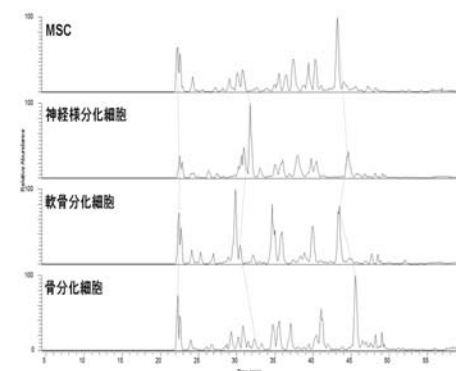


図 3 糖鎖プロファイルの比較

(3) 多変量解析による糖鎖プロファイルの比較

① OPLS 解析

MSC 及び分化誘導細胞 (各 n=3) から調製した N-結合型糖鎖の LC/MS 分析を行った後、取得したスペクトルデータ (ネガティブイオンも一津) を用いて、Orthogonal partial least squares (OPLS) 法による多変量解析を行った。図 4 にスコアプロットを示した。神経様分化細胞及び軟骨様分化細胞は、MSC と離れた位置にプロットされており、糖鎖プロファイルが異なることが確認された。一方、骨分化細胞は、MSC と近接した位置にプロットされており、両者の糖鎖プロファイルは比較的類似していることが明らかとなった。

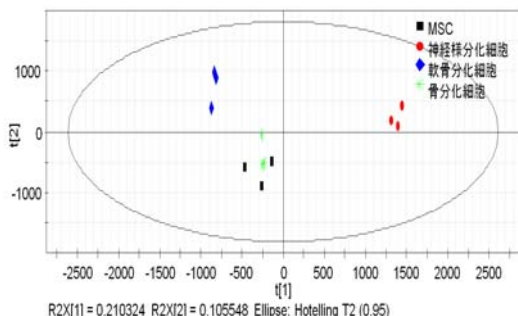


図 4 多変量解析(OPLS, スコアプロット)による糖鎖プロファイルの比較.

② S-plot 解析

MSC と分化誘導細胞間の分離に寄与する変数、すなわち分化誘導により結合量に変化が生じた糖鎖を特定するために、S-plot 解析を行った。まず、神経様分化誘導により結合量が増加した糖鎖を確認した結果、シアル酸付加複合型糖鎖が増加し、高マンノース型糖鎖、パウチマンノース型糖鎖及びアシアロ複合型糖鎖が減少することが明らかとなった(図 5A)。骨分化誘導により発現量が変化した糖鎖を確認した結果、フコシル化複合型鎖糖鎖及びシアロ複合型糖鎖が増加し、高マンノース型糖鎖及びパウチマンノース型糖鎖が減少する傾向がみられた(図 5B)。軟骨分化誘導により発現量が変化した糖鎖を確認した結果、フコースが付加したシアロ複合型糖鎖が増加し、フコースが付加していない複合型糖鎖が減少することが明らかとなった(図 5C)。

S-plot 解析結果の妥当性を検証するために、発現量に変化のみられた糖鎖について LC/MS のピーク面積に基づき差異解析を行った。その結果、神経様分化細胞では、フコシル化トリシアロ 3 本鎖、フコシル化ジシアロ 2 本鎖及びジシアロ 2 本鎖複合型糖鎖がそれぞれ増加し (3.8, 1.6 及び 3.5 倍), 高マンノース型糖鎖 (M9 及び M8) がそれぞれ減少していること (0.5 及び 0.7 倍) が明らかとなった。骨様分化細胞についても同様に

検討した結果、フコシル化ジシアロ 2 本鎖複合型糖鎖が僅かに増加し (1.2 倍), 高マンノース型糖鎖 (M9, M8 及び M7) がそれぞれ著しく減少 (0.3, 0.5 及び 0.5 倍) していた。また、軟骨様分化細胞では、フコシル化ジシアロ複合型 2 本鎖糖鎖、ジシアロ複合型 2 本鎖糖鎖及びトリシアロ複合型 3 本鎖糖鎖が、それぞれ 2.7, 3.5 及び 2.8 倍に増加し、フコシル化トリシアロ複合型 3 本鎖糖鎖及びフコシル化モノシアロ 2 本鎖糖鎖は、0.2 及び 0.8 倍に減少していることが確認された。これらの結果は、S-plot 解析の結果を反映するものであった。

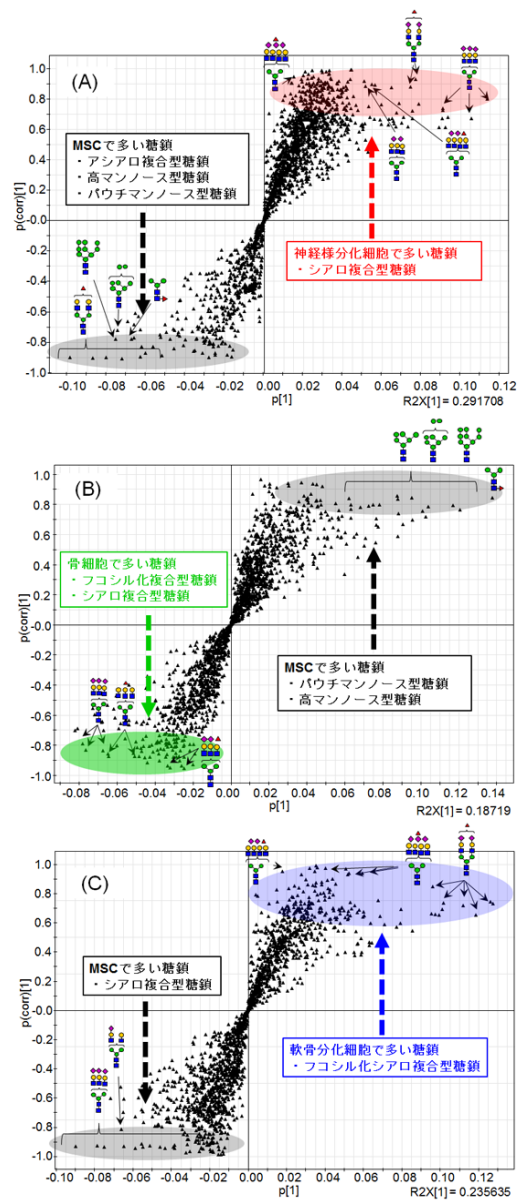


図 5 S-plot 解析. (A) MSC 及び神経様分化細胞; (B), MSC 及び骨様分化細胞; (C), MSC 及び軟骨様分化細胞間の比較.

以上の結果、本研究により MSC を分化誘導した細胞の糖鎖は、分化初期のステージから変化することが明らかとなった。また、MSC は分化誘導の方向により特徴的な糖鎖プロファイルの変化を生じることから、MSC が目的とする方向に分化していることを確認するための指標として糖鎖プロファイルを利用できる可能性が示唆された。

#### 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 2 件)

- (1) N. Hashii, S. Nakazawa, N. Kawasaki. Glycomic analysis by liquid chromatography/mass spectrometry. **YAKUGAKU ZASSHI**, 査読有, 132, 2012, 489-497.
- (2) S.Y. Park, S.H. Lee, N. Kawasaki, S. Itoh, K. Kang, Ryu S. Hee, N. Hashii, J.M. Kim, J.Y. Kim, Kim J. Hoe, Kim.  $\alpha$ 1-3/4 fucosylation at Asn 241 of  $\beta$ -haptoglobin is a novel marker for colon cancer: A combinatorial approach for development of glycan biomarkers. **Int. J. Cancer**, 査読有, 130, 2012, 2366-2376.

[学会発表] (計 5 件)

- (1) N. Hashii, X. Huang, N. Kawasaki, T. Yamaguchi. Differential glycan analysis during neural differentiation of human mesenchymal stem cells by quantitative glycan profiling using liquid chromatography/mass spectrometry. **The 25<sup>th</sup> International Carbohydrate Symposium (ICS2010)**, 2010年8月5日, 幕張メッセ(千葉県).
- (2) N. Hashii, X. Huang, N. Kawasaki. Identification of cell therapeutic products from stem cells based on glycans. **第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会合同大会**, 2010年12月7日, 神戸ポートアイランド(兵庫県).
- (3) N. Hashii, X. Huang, N. Kawasaki, T. Yamaguchi. Quantitative glycan analysis during neural differentiation of human mesenchymal stem cells by liquid chromatography/mass spectrometry. **The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies**, 2010年12月17日, Hawaii Convention Center (Honolulu).
- (4) 橋井則貴, 黄 笑宇, 栗林亮佑, 川崎ナナ. 糖鎖プロファイルによる間葉系幹細胞の分化初期における細胞の識別. **第84**

回日本生化学会大会, 2011年9月22日, 国立京都国際会館 (京都府).

- (5) 橋井則貴, 原園 景, 栗林亮佑, 中澤志織, 川崎ナナ. 液体クロマトグラフィー/質量分析及び主成分分析による糖鎖プロファイルのデータマイニング法の評価. **第59回質量分析総合討論会**, 2011年9月15日, ホテル阪急エキスポパーク (大阪府).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他] 特筆事項なし

#### 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  
第一室長

研究者番号 : 20425672