再生医療製品の品質評価におけるグライコミクス

橋井 則 貴, 中 澤 志 織, 川 崎 ナ ナ*

Glycomics in Quality Control of Tissue-engineered Medical Products

Noritaka Hashii, Shiori Nakazawa, and Nana Kawasaki*

National Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.

(Received December 2, 2011)

Glycosylation of cells is known to alter with several biological events such as cell differentiations and proliferations as well as some diseases. “Glycomics approaches”, comprehensive qualitative and quantitative glycan analyses of the cells, have become increasingly important as a means of discovering biomarkers that have the potential of being used as disease diagnostic markers and molecular markers for cell characterizations. In this paper, we introduce a method of quantitative glycan profiling by liquid chromatography/mass spectrometry with a combination of an isotope tagging method. In addition, we demonstrate the potential of glycan profiling as a tool for the identification of differentiated human bone marrow mesenchymal stem cell (hMSC) and non-differentiated hMSC.

Key words—glycan profiling; quantitative glycan analysis; isotope tagging method

1. はじめに

細胞に存在するタンパク質の多くは糖タンパク質であり、糖鎖部分の構造や分布は、がんや自己免疫疾患などある種の疾患、細胞分化等の生命現象、あるいは細胞環境の変化などに伴い変化することが知られている。¹⁻⁶⁾ がん化や分化の過程で変動する糖鎖を見出すことは、疾患の診断マーカーや細胞の分子マーカーの開発等につながる可能性がある。糖鎖は遺伝子の直接的な産物ではなく、様々な酵素反応を経て生合成される二次的産物であるため、遺伝子解析から構造や分布の変化を推定することは容易ではない。糖鎖の変化を明らかにするためには、表現型である細胞中の糖鎖を直接解析することが肝要であり、細胞糖鎖（グライコーム）の質的・量的な変化を網羅的に解析するグライコミクスに高い関心が集まっている。

グライコーム解析の手法として、レクチンを用いる方法、キャピラリー電気泳動法、質量分析法（MS）、及び蛍光標識 HPLC を用いる方法などがあ

る。⁷⁾ これまでにわれわれは、液体クロマトグラフィー/質量分析（LC/MS）を用いた糖鎖プロファイリング法を開発し、疾患モデルマウスのグライコーム解析などに応用してきた。^{8,9)} 本分析法は、遊離糖鎖の還元末端を誘導体化し、グラファイトカーボンカラムを用いた LC により糖鎖を微細構造の違いで分離しながら、オンラインによる分子の質量測定、並びに多段階質量分析（MSⁿ）を行い、糖鎖の分布と各糖鎖の構造を推定する方法である。^{9,10)} 本稿では、本分析法を再生医療での応用が期待されている同種体性幹細胞のグライコーム解析に応用した例を紹介する。

2. ヒト間葉系幹細胞の糖鎖プロファイリング

ヒト幹細胞を用いる臨床研究は、臓器機能再生等を通じて国民の健康の維持並びに疾病の予防、診断及び治療に重要な役割を果たすものと考えられており、2006 年 7 月の「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」の施行以後、2011 年 3 月現在、28 件の臨床研究が承認されている。これらを再生医療品開発につなげるためには、品質管理の一環として、適切な生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質など適切な遺伝型あるいは表現型の指標を選択して、目的とする細胞・組織であることを確認するための手法を確立する必要がある。細胞の糖鎖は

国立医薬品食品衛生研究所（〒158-8501 東京都世田谷区上野 1-18-1）

*e-mail: nana@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第 131 年会シンポジウム S16 で発表したものを中心に記述したものである。

がん化や分化などに伴い変化することから、目的とする細胞・組織の評価指標の1つとして利用できる可能性が高い。

Figure 1は、再生医療への応用が期待されているヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) の糖鎖プロファイルである。hMSCは、多能性を有する体性幹細胞であり、骨、軟骨、脂肪及び神経様の細胞に分化することが知られている。^{11,12} iPS細胞やhMSCなどが再生医療製品として応用可能になったとき、特性解析や品質管理等に利用できる細胞数には制限があると予想されることから、微量分析が可能な試験法の設定が求められる。LC/MSにより、わずか 2×10^5 個のhMSCから糖鎖分布を示すトータルイオンカレントクロマトグラム (TICC) を得ることができた。実線は、ポジティブイオンモードにより得られたTICCで、主に中性糖鎖 (高マンノース

型、パウチマンノース型糖鎖、混成型、及びアシアロ複合型糖鎖) の分布を示している。破線は、ネガティブイオンモードで得られたTICCで、酸性糖鎖 (シアロ糖鎖) の分布を示している。Figure 1中の糖鎖構造は、各ピークに含まれる主な糖鎖の推定構造であり、MSによるフルスキャン (m/z 700–2000) で得られた分子関連イオンの質量と MS^n により取得されたプロダクトイオンの質量から推定している。hMSCに結合している糖鎖の種類は、高マンノース型糖鎖、パウチマンノース型糖鎖、混成型糖鎖、及び複合型糖鎖と幅広く、複合型糖鎖にはNアセチルノイラミン酸 (NeuNAc) とフコース (Fuc) の結合数に不均一性がみられる。LC/MSで得られるピーク間の強度比は、糖鎖の結合比を正確には反映していないが、ピークのパターンから、中性糖鎖では高マンノース型糖鎖 M8 及び M9 が多いこと

Fig. 1. Total Ion Current Chromatogram (TICC) Obtained by LC/MS of Reduced *N*-linked Glycans Prepared from hMSC

The solid line and the dashed line denote chromatograms obtained by LC/MS in the positive ion mode and the negative ion mode, respectively. LC, Paradigm MS4 HPLC system (Michrom BioResources); MS, LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific); column, graphitized carbon column (0.075×150 mm; particle size, 5 μ m); mobile phase, 5 mM ammonium bicarbonate containing 2% acetonitrile (A buffer) and 5 mM ammonium bicarbonate containing 80% acetonitrile (B buffer); flow rate, 300 nL/min; gradient condition, 2–45% B buffer (60 min); electrospray voltage, 2.5 kV in the positive and negative ion modes. ▲, fucose (Fuc); ●, mannose (Man); ○, galactose (Gal); ■, *N*-acetylglucosamine (GlcNAc); ◆, *N*-acetylneuraminic acid (NeuNAc).

Fig. 2. Glycan Distribution in hMSC

The relative peak intensity of each glycan is expressed as a percentage of the total peak intensity of the glycans. Error bars represent the standard deviations. (A), Distribution of neutral glycans (positive ion mode); (B), distribution of sialylated glycans (negative ion mode). dHex, deoxyhexose; Hex, hexose; HexNAc, N-acetylhexosamine; NeuNAc, N-acetylneuraminic acid.

[Fig. 2(A)], また, 酸性糖鎖では, 生合成後期にあらわれる分岐鎖の多い糖鎖が少ないことが示唆された [Fig. 2(B)].

3. 細胞発現糖鎖の比較定量解析

Figure 3(A)は, 未処理 hMSC の光学顕微鏡像である. hMSC を骨細胞に分化誘導し, 顕微鏡により形態学的な変化を観察すると, 14 日目からカルシウムの沈着が観察され, 誘導後 21 日目には, 細胞の約 70% にカルシウムの沈着がみられる [Fig. 3(B)]. 脂肪細胞への分化では, 誘導開始 7 日目から脂肪滴が観察され始め, 21 日目には多くの細胞で脂肪滴の蓄積が観察される [Fig. 3(C)]. Figure 3(D)は MSC を神経様細胞に分化誘導後 2 日目の細胞であり, 細胞質部分の繊維状から球状への変化, 及び突起の伸長が観察され, 神経細胞の形態学的な特徴を有していることがわかる. これらの分化を評価する方法として, 免疫組織化学染色法やフローサイトメトリー法などにより, 分化細胞に特異的に発現するタンパク質の発現の有無を確認する方法が知られている. しかし, 神経様分化細胞のマーカーとして使用されているタンパク質の多くは未分化の hMSC にも発現されており, 特異性に課題があることが指摘されている.¹³⁾ hMSC とその神経様分化細胞で結合量に差異が認められる糖鎖を見出すことができれば, より特異性の高いマーカーとし

て利用できる可能性がある. そのためには, 神経様分化前後の細胞の糖鎖分布を比較できる定量的解析手法が必要である.

LC/MS では, ピーク強度の再現性に依然として問題があり, 複数のサンプル間で量的な比較を行うためには, 同位体標識法や, 統計的解析手法を用いる必要がある. 筆者らは, 重水素 (D) 置換 2-アミノピリジン (2AP) により調製した 4D 置換ピリジルアミノ化 (PA) 糖鎖を用いた比較定量法を開発している (Fig. 4).¹⁴⁾ この方法は, 比較する試料 A 並びに B から酵素的あるいは化学的に糖鎖を切り出し, それぞれ D 未置換 PA 糖鎖 (d_0 -PA 糖鎖) 並びに d_4 -PA 糖鎖とし, 混合して LC/MS で分析する方法である [Fig. 4(A)]. d_0 -PA 糖鎖と d_4 -PA 糖鎖は, 糖鎖部分の構造の差異に基づいて分離されるが [Fig. 4(B)], マススペクトル上, 質量 $4u$ 差のイオンとして分離される [Fig. 4(C)]. 糖鎖量の違いはピーク強度の違いとなってあらわれるので, ピーク強度比を求めることにより, 糖鎖結合比を得ることができる.

われわれの報告に続き, D 標識された 1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン (PMP) や ^{13}C で標識したアラニン, 2-アミノ安息香酸を用いて還元末端を標識する方法が相次いで報告された (Table 1). また ^{13}C で標識されたヨウ化メチルで糖鎖を全メチル

Fig. 3. Cell Images of hMSC and Its Differentiated Cells Taken by a Light Microscope (A), hMSC; (B), osteogenic differentiation; (C), adipogenic differentiation; (D), neural differentiation.

Fig. 4. Quantitative Glycan Analysis by a Combination of Isotope Tagging Method

(A), Strategy for quantitative glycan analysis using d_0 -2AP and d_6 -2AP as labeling reagents; (B), chromatogram obtained by the LC/MS of a mixture of d_0 -PA and d_4 -PA-glycans; (C), mass spectra obtained from a mixture of d_0 -PA and d_4 -PA-glycans.

化する方法も報告されている。¹⁵⁻¹⁹⁾ これらの方法の多くは、酸性溶液中で加熱して糖鎖を誘導体化する方法であり、シアル酸が解離する可能性があることから、シアロ糖鎖が多い hMSC には適切でない。そこでわれわれは、中性水溶液中で標識が可能なフェニルヒドラジン (PHN) を用いた、新たな糖鎖同位体標識法を開発した [Fig. 5 (A)].²¹⁾ この方法は、糖鎖試料溶液に、六炭素が ^{13}C で置換された PHN ($^{13}\text{C}_6\text{-PHN}$) 塩酸塩又は未置換 PHN ($^{12}\text{C}_6\text{-PHN}$) 塩酸塩、並びに還元剤 2-ピコリンボランを加えて遮光下 55°C で 1 時間程度反応させる方法である [Fig. 5 (B)].^{22,23)} 反応終了後、クロロホルム抽出により、過剰な PHN 及び 2-ピコリンボランを除くことができるので、標識後の後処理も簡単である。Figure 6 は、ジシアロ 2 本鎖糖鎖の $^{12}\text{C}_6\text{-PHN}$ 標識体及び $^{13}\text{C}_6\text{-PHN}$ 標識体の等量混合物のマスペクトルであり、 m/z 1231.5 及び m/z 1234.5 に、それぞれ $^{12}\text{C}_6\text{-PHN}$ 標識体及び $^{13}\text{C}_6\text{-PHN}$ 標識体の 2 価イオンが観測されている。両者の質量差は 6 u であり、天然に存在する同位体の影響は少ない。

この PHN 標識法と LC/MS を用いて、未分化 hMSC と神経様に分化した hMSC の糖鎖結合量を比較定量した結果が Fig. 7 である。上向きのカラムは未分化細胞よりも神経様分化細胞で多かった糖鎖で、未分化細胞の糖鎖を 1.0 としたときの相対比、また、下向きのカラムは神経様細胞よりも未分化細胞で多かった糖鎖で、神経様分化細胞の糖鎖を 1.0 としたときの相対比を表している。hMSC を神経様細胞に分化誘導すると、Fuc 結合複合型糖鎖の高分岐化が進む一方で、3 及び 4 個の NeuNAc が結合し、かつ Fuc が結合していない複合型 3 本鎖糖鎖の割合は減少する傾向にあることがわかる。この結果は、hMSC の神経様分化において、2 日間で糖鎖のプロファイルが変わること、換言すれば、糖鎖プロファイルを比べることによって、未分化細胞と神経様分化細胞を識別できる可能性を示唆していると思われる。

4. おわりに

本稿では、再生医療での応用が期待されている hMSC を用いて、LC/MS によるグライコーム解析法が、細胞分化の評価に応用できる可能性があることを示した。これまでグラコミクスは、主にがんなどの診断マーカー探索研究の 1 つとして展開されて

Table 1. Isotope Tagging Method Using Various Reagents

Tagging reagent	Isotope	Mass difference	Solvent	Reaction temperature ($^\circ\text{C}$)	Time (h)	Reducing agent	Reaction temperature ($^\circ\text{C}$)	Time (h)	Sample cleanup	Reported year	Reference
2-Aminopyridine (PA)	^2H (D)	4	30% AcOH in DMSO	90	1	Borane-dimethylamine complex	80	1	Graphitized carbon cartridge (d)	2005	14
Aniline	^{13}C	6	30% AcOH in DMSO	65	2-4	NaCNBH_3	— (b)	—	Paper chromatography cartridge (e) Paper disk (f)	2008, 2009	15, 16
2-Aminobenzoic acid (2-AA)	^{13}C	6	2.7% AcONa, 1.3% boric acid, 33% THF	80	1	NaCNBH_3	— (b)	—	Normal phase cartridge, graphitized carbon cartridge (g)	2010	17
1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP)	^2H (D)	10	10.5% NH_3 in CH_3OH	70	1.5	— (c)	— (c)	—	Extraction with dichloromethane	2011	20
Permethylation	^{13}C	— (a)	DMSO	<25	>4	— (c)	— (c)	—	Extraction with chloroform	2007	18, 19

(a), Mass difference between ^{13}C -labeled sample and ^{12}C -labeled sample changes depending on glycan; (b), amination and reduction were performed by a one-step process; (c), reduction is not performed; (d), Envi-Carb (Supelco); (e), GlycoClean S (Prozyme); (f), 3-MM paper filter (Whatman); (g), normal phase DPA-6S PhyTips and Carbo-pack tips (PhyNeous).

Fig. 5. Tagging of Glycan with Phenylhydrazine (PHN)
(A), Reaction mechanism of glycan tagging with PHN; (B), preparation of PHN labeled glycan.

Fig. 6. Mass Spectrum of a Mixture of $^{12}\text{C}_6$ -PHN and $^{13}\text{C}_6$ -PHN Labeled Disialylated Core-fucosylated Complex Type Biantennary

Fig. 7. Quantitative Glycan Analysis between hMSC (untreated cell) and Its Neural-lineage Cell (treated cell)
Each value is the average of a triplicate. Error bars represent the standard deviations.

きたが、それらの研究を通して確立された様々な技術が、今後、再生医療製品の品質管理手法の1つとしても発展していくことが期待される。

謝辞 本研究は、厚生労働科学研究費補助金並びに科学研究費補助金若手（B）の研究成果の一部である。

REFERENCES

- 1) Feizi T., Gooi H. C., Childs R. A., Picard J. K., Uemura K., Loomes L. M., Thorpe S. J., Hounsell E. F., *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 591–596 (1984).
- 2) Kannagi R., Izawa M., Koike T., Miyazaki K., Kimura N., *Cancer Sci.*, **95**, 377–384 (2004).
- 3) Lau K. S., Partridge E. A., Grigorian A., Silvescu C. I., Reinhold V. N., Demetriou M., Dennis J. W., *Cell*, **129**, 123–134 (2007).
- 4) Heiskanen A., Hirvonen T., Salo H., Impola U., Olonen A., Laitinen A., Tiitinen S., Natunen S., Aitio O., Miller-Podraza H., Wuhrer M., Deelder A. M., Natunen J., Laine J., Lehenkari P., Saarinen J., Satomaa T., Valmu L., *Glycoconj. J.*, **26**, 367–384 (2009).
- 5) Miyoshi E., Shinzaki S., Moriwaki K., Matsumoto H., *Methods Enzymol.*, **478**, 153–164 (2010).
- 6) Hossler P., Khattak S. F., Li Z. J., *Glycobiology*, **19**, 936–949 (2009).
- 7) Hirabayashi J., Kuno A., Tateno H., *Electrophoresis*, **32**, 1118–1128 (2011).
- 8) Hashii N., Kawasaki N., Itoh S., Nakajima Y., Kawanishi T., Yamaguchi T., *Immunology*, **126**, 336–345 (2009).
- 9) Hashii N., Kawasaki N., Itoh S., Hyuga M., Kawanishi T., Hayakawa T., *Proteomics*, **5**, 4665–4672 (2005).
- 10) Itoh S., Kawasaki N., Hashii N., Harazono A., Matsuishi, Hayakawa T., Kawanishi T., *J. Chromatogr. A*, **1103**, 296–306 (2006).
- 11) Prockop D. J., *Science*, **276**, 71–74 (1997).

- 12) Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F., Hazzi C., Stedeford T., Willing A., Freeman T. B., Saporta S., Janssen W., Patel N., Cooper D. R., Sanberg P. R., *Exp. Neurol.*, **164**, 247–256 (2000).
- 13) Tondreau T., Lagneaux L., Dejeneffe M., Massy M., Mortier C., Delforge A., Bron D., *Differentiation*, **72**, 319–326 (2004).
- 14) Yuan J., Hashii N., Kawasaki N., Itoh S., Kawanishi T., Hayakawa T., *J. Chromatogr. A*, **1067**, 145–152 (2005).
- 15) Xia B., Feasley C. L., Sachdev G. P., Smith D. F., Cummings R. D., *Anal. Biochem.*, **387**, 162–170 (2009).
- 16) Lawrence R., Olson S. K., Steele R. E., Wang L., Warrior R., Cummings R. D., Esko J. D., *J. Biol. Chem.*, **283**, 33674–33684 (2008).
- 17) Prien J. M., Prater B. D., Qin Q., Cockrill S. L., *Anal. Chem.*, **82**, 1498–1508 (2010).
- 18) Alvarez-Manilla G., Warren N. L., Abney T., Atwood J. 3rd, Azadi P., York W. S., Pierce M., Orlando R., *Glycobiology*, **17**, 677–687 (2007).
- 19) Kang P., Mechref Y., Kyselova Z., Goetz J. A., Novotny M. V., *Anal. Chem.*, **79**, 6064–6073 (2007).
- 20) Zhang P., Zhang Y., Xue X., Wang C., Wang Z., Huang L., *Anal. Biochem.*, **418**, 1–9 (2011).
- 21) Lattova E., Perreault H., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **793**, 167–179 (2003).
- 22) Sato S., Sakamoto T., Miyazawa E., Kikukawa Y., *Tetrahedron*, **60**, 7899–7906 (2004).
- 23) Ruhaak L. R., Steenvoorden E., Koeleman C. A., Deelder A. M., Wuhrer M., *Proteomics*, **10**, 2330–2336 (2010).