(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-516241
(P2010-516241A)
(43)公表日　平成22年5月20日(2010.5.20)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		2G041
C12Q 1/34	(2006.01)	C12Q	1/34		4B063
C12Q 1/48	(2006.01)	C12Q	1/48		4B065
C12N 5/071	(2010.01)	C12N	5/00	202A	
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	S	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 225 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-545967 (P2009-545967)
(86)(22)出願日　平成20年1月18日 (2008.1.18)
(85)翻訳文提出日　平成21年9月17日 (2009.9.17)
(86)国際出願番号　PCT/FI2008/050019
(87)国際公開番号　WO2008/087260
(87)国際公開日　平成20年7月24日 (2008.7.24)
(31)優先権主張番号　20075033
(32)優先日　平成19年1月18日 (2007.1.18)
(33)優先権主張国　フィンランド(FI)
(31)優先権主張番号　20070368
(32)優先日　平成19年5月10日 (2007.5.10)
(33)優先権主張国　フィンランド(FI)
(31)優先権主張番号　20070650
(32)優先日　平成19年8月28日 (2007.8.28)
(33)優先権主張国　フィンランド(FI)

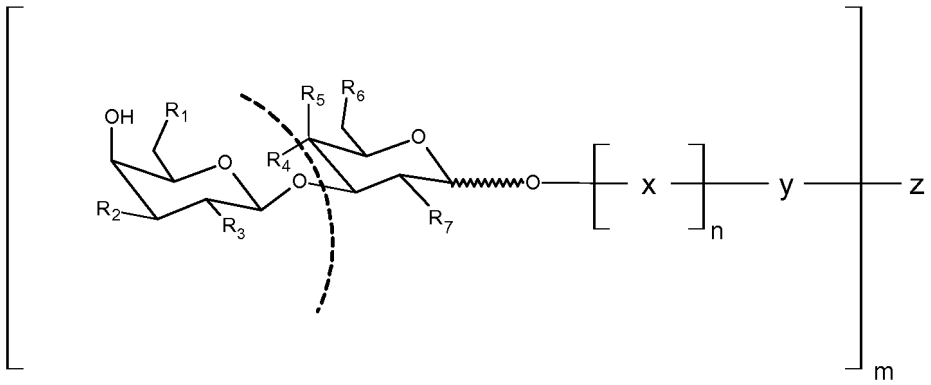
(71)出願人　509205250
スオメン　プナイネン　リスティ，ヴェリパルベル
フィンランド共和国　ヘルシンキ　エフアイ－００３１０，キビハーンティ　７
(71)出願人　509205261
グリコス　フィンランド　リミテッド
フィンランド共和国　ヘルシンキ　エフアイ－００７９０，ヴィッキンカーリ　６
(74)代理人　100096024
弁理士　柏原　三枝子
(74)代理人　100125520
弁理士　高橋　剛一
(74)代理人　100155310
弁理士　柴田　雅仁

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規の特異的細胞結合剤

(57)【要約】
本発明は幹細胞のグリカン構造に対する特異的結合剤のための試薬および方法を記載する。さらに本発明は、幹細胞の表面上の特異的グリカンエピトープに対するさらなる結合試薬のスクリーニングに関する。グリカン構造の好ましい結合剤としては酵素、レクチンおよび抗体等のタンパク質などが挙げられる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
間葉系細胞調製物の状態を評価する方法であって、前記調製物中の伸長グリカン構造、または、少なくとも２つの、グリカン構造の群の存在を検出するステップを含み、前記グリカン構造またはグリカン構造の群は、幹細胞の状態の分析および／または幹細胞の操作のための式Ｔ１



であり、Ｘは結合位置であり、
Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、およびＲ$_6$はＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基シアル酸、好ましくはＮｅｕ５Ａｃα２またはＮｅｕ５Ｇｃα２、最も好ましくはＮｅｕ５Ａｃα２であり；
Ｒ$_3$はＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基Ｆｕｃα１（Ｌ－フコース）またはＮ－アセチル（Ｎ－アセトアミド、ＮＣＯＣＨ$_3$）であり；
Ｒ$_4$はＨ、ＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基Ｆｕｃα１（Ｌ－フコース）であり、Ｒ$_4$がＨである場合、Ｒ$_5$はＯＨであり、Ｒ$_4$がＨではない場合、Ｒ$_5$はＨであり；
Ｒ７はＮ－アセチルまたはＯＨであり；
Ｘは前記細胞由来の天然オリゴ糖主鎖構造、好ましくはＮ－グリカン、Ｏ－グリカンもしくは糖脂質構造であり、またはｎが０である場合、Ｘは無であり；
Ｙはリンカ基、好ましくはＯ－グリカンおよびＯ－結合末端オリゴ糖および糖脂質のための酸素、ならびにＮ－グリカンのためのＮ、またはｎが０である場合、無であり；
Ｚは担体構造、好ましくは細胞により産生された天然担体であり、例えばタンパク質または脂質であって、好ましくは担体上のセラミドもしくは分岐グリカンコア構造、またはＨであり；
アーチはガラクトピラノシルからの結合が左側の残基の３位または４位いずれかに対するものであること、およびＲ４構造が他の４または３位にあることを表し；
ｎは０または１の整数であり、ｍは１ないし１０００、好ましくは１ないし１００、および最も好ましくは１ないし１０の整数（担体上のグリカンの数）であり、
ただし、
Ｒ２およびＲ３のうち１つはＯＨまたはＲ３はＮ－アセチルであり、
左側の第１の残基が右側の残基の４位に結合する場合、Ｒ６はＯＨであり、
ＸはＧａｌα４Ｇａｌβ４Ｇｌｃではなく、（ＳＳＥＡ－３または４のコア構造）またはＲ３はフコシルであり、
前記細胞調製物は胚性幹細胞調製物であり、
ならびに、前記グリカン構造が伸長構造である場合、ここで、前記結合剤は前記構造およびさらに少なくとも１つの還元末端伸長エピトープ、好ましくは式Ｅ１：
ＡｘＨｅｘ（ＮＡｃ）$_n$の単糖エピトープ（Ｘおよび／またはＹを置換）に結合し、Ａはアノマー構造アルファまたはベータであり、ｘは結合位置２、３または６であり；および
Ｈｅｘはヘキソピラノシル残基Ｇａｌ、またはＭａｎであり、ｎは０または１の整数であ

り、
ｎが１である場合、ＡｘＨｅｘＮＡｃはβ４ＧａｌＮＡｃまたはβ６ＧａｌＮＡｃであり、
ただし、
ＨｅｘがＭａｎである場合、ＡｘＨｅｘはβ２Ｍａｎであり、
ＨｅｘがＧａｌである場合、ＡｘＨｅｘはβ３Ｇａｌまたはβ６Ｇａｌまたはα３Ｇａｌまたはα４Ｇａｌであり、
または、
前記結合剤エピトープはさらに還元末端伸長エピトープ、
還元末端ＧａｌＮＡｃα含有構造に結合するＳｅｒ／Ｔｈｒもしくは、
ＧａｌＢ４Ｇｌｃ含有構造に結合するβＣｅｒに結合し、前記グリカン構造は関連するまたは混入した細胞集団から決定される幹細胞集団であることを特徴とする方法。
【請求項２】
幹細胞の状態の分析のための、および／または幹細胞の操作のための方法であって、幹細胞の試料から伸長グリカン構造または少なくとも２つのグリカン構造を検出するステップを含み、前記グリカン構造は：末端ラクトサミン構造
（Ｒ１）$_{n1}$Ｇａｌ（ＮＡｃ）$_{n3}$β３／４（Ｆｕｃα４／３）$_{n2}$ＧｌｃＮＡｃβＲであって、Ｒ１はＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃに結合するＦｕｃα２、またはＳＡα３、またはＳＡα６であり、ＲはＮ－グリカン、Ｏ－グリカンおよび／または糖脂質の還元末端コア構造である、末端ラクトサミン構造、
または、構造
（ＳＡα３）$_{n1}$Ｇａｌβ３（ＳＡα６）$_{n2}$ＧａｌＮＡｃであって、
ｎ１、ｎ２およびｎ３は０または１であって構造の存在または非存在を表し、
式中、ＳＡはシアル酸である構造、
または、分岐エピトープ
Ｇａｌβ３（ＧｌｃＮＡｃβ６）ＧａｌＮＡｃ、または
R_1Ｇａｌβ４（R_3）ＧｌｃＮＡｃβ６（R_2Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃであって、
R_1およびR_2は独立に無またはＳＡα３であり；およびR_3は独立に無またはＦｕｃα３である分岐エピトープ、
または、Ｎ－結合グリカンのコア構造中のＭａｎβ４ＧｌｃＮＡｃ構造；またはエピトープＧａｌβ４Ｇｌｃ、
または末端マンノース、
または末端ＳＡα３／６Ｇａｌであって、ＳＡはシアル酸であり、ただし
ｉ）幹細胞は癌細胞株の細胞ではない
末端ＳＡα３／６Ｇａｌからなる群より選択されることを特徴とする方法。
【請求項３】
請求項１に記載の方法において、前記結合物質が式Ｔ８Ｅベータ
［Ｍα］$_m$ＧａｌＢ１－３／４［Ｎα］$_n$ＧｌｃＮＡｃβｘＨｅｘ（ＮＡｃ）$_p$
の構造を認識し、
ｘは結合位置２、３、または６であり、
ｍ、ｎおよびｐは独立に０または１の整数であり、
ＭおよびＮは単糖残基であって
ｉ）独立に無（その位置における遊離水酸基）
および／または
ｉｉ）Ｇａｌの３位または／およびＧｌｃＮＡｃの６位に結合するシアル酸であるＳＡ
および／または
ｉｉｉ）ＧａｌがＧｌｃＮＡｃの他の位置（４または３）に結合する場合に、Ｇａｌの２位および／またはＧｌｃＮＡｃの３もしくは４位に結合するＦｕｃ（Ｌ－フコース）残基であり、

ただし、ｍ、ｎおよびｐは独立に０または１であり、
Ｈｅｘはヘキソピラノシル残基ＧａｌまたはＭａｎであり、
ただし、
ｐが１の場合、βｘＨｅｘＮＡｃはβ６ＧａｌＮＡｃであり、
ｐが０の場合、ＨｅｘはＭａｎであり、かつβｘＨｅｘはβ２Ｍａｎであり、またはＨｅｘはＧａｌであり、かつβｘＨｅｘはβ３Ｇａｌもしくはβ６Ｇａｌであることを特徴とする方法。
【請求項４】
請求項１ないし３のいずれかに記載の方法において、前記結合物質が
式Ｔ１０Ｅ
［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１－４［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβｘＨｅｘ（ＮＡｃ）$_{p}$のＩＩ型ラクトサミンを基盤とする構造を認識し、
ただし、
ｐが１である場合、βｘＨｅｘＮＡｃはβ６ＧａｌＮＡｃであり、
ｐが０である場合、ＨｅｘはＭａｎであり、かつβｘＨｅｘはβ２Ｍａｎであり、または、ＨｅｘはＧａｌであり、かつβｘＨｅｘはβ６Ｇａｌであることを特徴とする方法。
【請求項５】
請求項４に記載の方法において、前記結合物質が式Ｔ１０ＥＭａｎ：
［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１－４［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ
のＩＩ型ラクトサミンを基盤とする構造を認識し、変数は請求項２の式Ｔ８Ｅベータに対して記載されるものと同様であることを特徴とする方法。
【請求項６】
請求項５に記載の方法において、前記構造がＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、ＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎからなる群より選択されることを特徴とする方法。
【請求項７】
請求項５に記載の方法において、前記構造がＨＩＩ型構造Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎであることを特徴とする方法。
【請求項８】
請求項５に記載の方法において、前記構造がＬｅｗｉｓ　ｘ構造Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎであることを特徴とする方法。
【請求項９】
請求項４に記載の方法において、前記結合物質が
式Ｔ１０ＥＧａｌ（ＮＡｃ）：
［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１－４［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβ６Ｇａｌ（ＮＡｃ）$_{p}$
のＩＩ型ラクトサミンを認識し、変数は請求項２の式Ｔ８Ｅベータに対して記載されるものと同様であることを特徴とする方法。
【請求項１０】
請求項９に記載の方法において、前記構造が、
Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６Ｇａｌ、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃａ３）ＧｌｃＮＡｃβ６（ＲＧａｌβ３）ＧａｌＮＡｃからなる群より選択され、ＲはＳＡα３または無であることを特徴とする方法。
【請求項１１】
請求項１ないし３のいずれかに記載の方法において、前記結合物質が、
式Ｔ９Ｅ

［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１－３［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ
のＩ型ラクトサミンを基盤とした構造を認識することを特徴とする方法。
【請求項１２】
請求項１１に記載の方法において、前記構造が、
Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）βＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、ＳＡα３Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ
からなる群より選択されることを特徴とする方法。
【請求項１３】
請求項１１に記載の方法において、前記構造がＨＩ型構造Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３ＧａｌまたはＩ型ＬＡｃＮＡｃ－構造Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌであることを特徴とする方法。
【請求項１４】
請求項１ないし１３のいずれか１項に記載の方法において、前記検出が、前記調製物における少なくとも１種のグリカン構造の量または存在を特異的結合物質または管理された結合剤により分析することによって行われることを特徴とする方法。
【請求項１５】
請求項１ないし１３のいずれか１項に記載の方法において、前記構造が少なくとも１個のＦｕｃα残基を有することを特徴とする方法。
【請求項１６】
請求項２に記載の方法において、前記伸長オリゴ糖構造が（ＳＡα３）$_{0\text{または}1}$Ｇａｌβ３／４（Ｆｕｃα４／３）ＧｌｃＮＡｃ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃα／βおよびＦｕｃα２Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）$_{0\text{または}1}$ＧｌｃＮＡｃβからなる群より選択されることを特徴とする方法。
【請求項１７】
請求項２のいずれかに記載の方法において、前記の伸長オリゴ糖が、Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃ、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ、Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ／α、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ、ＧａｌＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ、ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ／α、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ、ＳＡα６Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、ＳＡα６Ｇａｌβ４Ｇｌｃβ、ＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、ＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ、Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃ　（Ｌｅｗｉｓ　ａ）、ＳＡα３Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃ　（シアリル－Ｌｅｗｉｓ　ａ）、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ　（Ｈ－１型）、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃ　（Ｌｅｗｉｓ　ｂ）、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ　（２型ラクトサミン基盤）、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ　（Ｌｅｗｉｓ　ｘ）、ＳＡα３Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃ　（シアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘ）、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ　（Ｈ－２型）およびＦｕｃα２Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ　（Ｌｅｗｉｓ　ｙ）からなる群より選択されることを特徴とする方法。
【請求項１８】
請求項１ないし１７のいずれかに記載の方法において、当該方法が少なくとも１つの末端ＭａｎαＭａｎ－構造で共に用いられることを特徴とする方法。
【請求項１９】
請求項１ないし１８のいずれかに記載の方法において、前記検出がモノクローナル抗体、グリコシダーゼ、グリコシル転移酵素、植物レクチン、動物レクチンおよびそれらのペプチド模倣物からなる群より選択される組み替えタンパク質である結合剤により行われることを特徴とする方法。
【請求項２０】

請求項１９に記載の方法において、前記結合物質がＧＦ２８７、ＧＦ２７９、ＧＦ２８８、ＧＦ２８４、ＧＦ２８３、ＧＦ２８６、ＧＦ２９０、ＧＦ２８９、ＧＦ２７５、ＧＦ２７６、ＧＦ２７７、ＧＦ２７８、ＧＦ２９７、ＧＦ２９８、ＧＦ３０２、ＧＦ３０３、ＧＦ３０５、ＧＦ２９６、ＧＦ３００、ＧＦ３０４、ＧＦ３０７、ＧＦ３５３、およびＧＦ３５４からなる群より選択される抗体と同一のエピトープに結合することを特徴とする方法。

【請求項２１】

請求項１９に記載の方法において、前記結合物質がＧＦ２８７、ＧＦ２７９、ＧＦ２８８、ＧＦ２８４、ＧＦ２８３、ＧＦ２８６、ＧＦ２９０、ＧＦ２８９、ＧＦ２７５、ＧＦ２７６、ＧＦ２７７、ＧＦ２７８、ＧＦ２９７、ＧＦ２９８、ＧＦ３０２、ＧＦ３０３、ＧＦ３０５、ＧＦ２９６、ＧＦ３００、ＧＦ３０４、ＧＦ３０７、ＧＦ３５３、ＧＦ３５４、およびＧＦ３６７からなる群より選択されることを特徴とする方法。

【請求項２２】

請求項１９に記載の方法において、前記組み替えタンパク質が少なくとも部分的に２つの単糖構造および前記単糖残基間の結合構造を認識する高特異性結合剤であることを特徴とする方法。

【請求項２３】

請求項１９に記載の方法において、前記結合剤が、生体材料または他の細胞型を含む細胞材料を含む試料からヒト幹細胞を選別または選択するために用いられることを特徴とする方法。

【請求項２４】

請求項１９に記載の方法において、前記結合剤が、異なるヒト幹細胞型間の選別または選択のために用いられることを特徴とする方法。

【請求項２５】

請求項１９に記載の方法において、選別または選択ステップがＦＡＣＳまたは細胞集団を濃縮するための任意の他の手段により行われることを特徴とする方法。

【請求項２６】

請求項２５に記載の方法により得られた細胞集団。

【請求項２７】

請求項２４に記載の方法において、前記細胞調製物が血液関連細胞集団からなる群より選択されることを特徴とする方法。

【請求項２８】

請求項１に記載の方法において、分析されるべき細胞の量が10^3ないし10^6の細胞であることを特徴とする方法。

【請求項２９】

請求項１ないし３のいずれかに記載の方法において、前記グリカン構造がＮ－グリカンコア構造を有するＮ－グリカンを含むＮ－グリカンサブグライコーム中に存在し、前記Ｎ－グリカンがＮ－グリコシダーゼにより細胞から遊離できることを特徴とする方法。

【請求項３０】

請求項２９に記載の方法において、前記Ｎ－グリカンコア構造がＭａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４（Ｆｕｃα６）$_n$ＧｌｃＮＡｃであり、ｎが０または１であることを特徴とする方法。

【請求項３１】

請求項１ないし３のいずれかに記載の方法において、前記グリカン構造が、Ｏ－グリカンコア構造を有するＯ－グリカンを含むＯ－グリカンサブグライコーム中に存在し、または前記グリカン構造が、糖脂質コア構造を有する糖脂質を含む糖脂質サブグライコーム中に存在し、前記グリカンがグリコシルセラミダーゼにより遊離できることを特徴とする方法。

【請求項３２】

請求項１ないし３のいずれかに記載の方法において、前記グリカン構造の群が本明細書

の表および図に示される特異的な量のオリゴ糖を含むことを特徴とする方法。
【請求項３３】
請求項１ないし３２のいずれかに記載の方法において、前記細胞調製物の細胞表面グライコームの存在または非存在が検出されることを特徴とする方法。
【請求項３４】
請求項１ないし３３のいずれかに記載の方法において、前記細胞調製物が前記細胞調製物の細胞集団内の混入する構造、時間依存的変化または細胞集団の状態の変化に関して、前記細胞調製物内のグリカンの質量分析を用いたグリコシル化分析により、評価／検出されることを特徴とする方法。
【請求項３５】
請求項３４に記載の方法において、前記細胞状態が、細胞培養中または細胞精製中に、低温における細胞貯蔵もしくは操作と関連して、または細胞の凍結保存と関連して、制御されることを特徴とする方法。
【請求項３６】
請求項３４に記載の方法において、細胞状態の時間依存的変化が、前記細胞の栄養状態、前記細胞培養の密集度（ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｙ）、前記細胞の密度、前記細胞の遺伝的安定性の変化、前記細胞構造の完全性もしくは細胞齢、または前記細胞に影響する化学的、物理的、もしくは生化学的要素に依存することを特徴とする方法。
【請求項３７】
哺乳動物細胞の集団内の幹細胞を同定、分析、選択または単離するための方法であって、結合剤または結合物質の使用を含み、前記結合剤／結合物質は請求項１ないし１８のいずれかに記載のグリカン構造またはグリカン構造群に結合し、前記構造は、
（ｉ）幹細胞上／内における発現、およびフィーダ細胞または分化した細胞における発現の非存在または低発現を示し；
（ｉｉ）幹細胞における発現の非存在または低発現、およびフィーダ細胞または分化した細胞における発現または高発現または主な発現を示し；
（ｉｉｉ）幹細胞の亜集団における発現を示し；または、
（ｉｖ）分化した幹細胞の亜集団における発現を示す；
ことを特徴とする方法。
【請求項３８】
請求項３７に記載の方法において、前記幹細胞が全能性、多能性または多分化能であることを特徴とする方法。
【請求項３９】
請求項３８に記載の方法において、前記胚幹細胞結合剤が多能性または多分化能間葉系幹細胞の同定のために用いられ、前記方法がさらに同定された多能性または多分化能幹細胞を回収のために選択するステップを含むことを特徴とする方法。
【請求項４０】
請求項３９に記載の方法において、前記選択された多能性または多分化能幹細胞を哺乳動物細胞の集団から分離するステップをさらに含むことを特徴とする方法。
【請求項４１】
請求項４０に記載の方法において、前記分離された多能性または多分化能幹細胞を単離するステップをさらに含むことを特徴とする方法。
【請求項４２】
請求項４０に記載の方法において、前記細胞集団が臍帯血、胚体液（ｅｍｂｒｙｏｎａｌ　ｂｏｄｙ　ｆｌｕｉｄｓ）、胚組織試料、胚組織培養物、細胞株および非間葉系成体起源の細胞培養物より選択されることを特徴とする方法。
【請求項４３】
請求項４０に記載の方法において、前記幹細胞が成体幹細胞、胚幹細胞または胎児起源の幹細胞、好ましくは母親細胞集団内のヒト胎児起源のものであることを特徴とする方法。

【請求項４４】
請求項４０に記載の方法において、前記幹細胞が脱分化した体細胞であることを特徴とする方法。
【請求項４５】
請求項１記載の方法において、前記抗体がポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、および抗体フラグメントからなる群より選択されることを特徴とする方法。
【請求項４６】
請求項１のいずれかに記載の方法において、前記結合剤が管理された結合剤であることを特徴とする方法。
【請求項４７】
請求項１のいずれかに記載の方法において、前記結合剤が、請求項１ないし１８のいずれかに記載のグリカン構造の少なくとも１つのエピトープに特異的な、抗体、レクチン、またはグリコシダーゼの、少なくとも前記グリカン構造の結合部位を含み、前記グリカン構造が幹細胞および／または分化した細胞に付着することを特徴とする方法。
【請求項４８】
哺乳動物の体液または組織からの胚幹細胞の同定、選択または分析のための方法であって、請求項１ないし１８のいずれかに記載のグリカン構造の少なくとも１つのエピトープに特異的な抗体、レクチン、またはグリコシダーゼを得るステップと、前記抗体、レクチンまたはグリコシダーゼを幹細胞と接触させてこのような細胞を同定、選択、単離および／または分析するステップとを含むことを特徴とする方法。
【請求項４９】
請求項４８に記載の方法により単離される哺乳動物幹細胞。
【請求項５０】
請求項１ないし１８のいずれかのグリカン構造に対する選択的幹細胞結合剤を同定するための方法が、
幹細胞内／上の特異的発現ならびにフィーダ細胞および／または分化した体細胞内／上の発現の非存在を示すグリカン構造を選択するステップと、幹細胞内／上の前記グリカン構造への前記結合剤の結合を確認するステップとを含むことを特徴とする方法。
【請求項５１】
試料内の幹細胞の濃縮および検出のためのキットであって、請求項１ないし１８のいずれかに記載のグリカン構造を検出するための結合剤を含む少なくとも１つの試薬と、前記試薬を用いて幹細胞の濃縮を行うための説明書とを含み、任意に幹細胞の濃縮を行うための手段を含むことを特徴とするキット。
【請求項５２】
請求項５１記載のキットにおいて、前記試薬が検出可能なトレーサで標識されことを特徴とするキット。
【請求項５３】
幹細胞、および幹細胞上の請求項１ないし１８のいずれかに記載のグリカン構造と結合する結合剤を有する、請求項１ないし１８のいずれかに記載のグリカン構造を含む組成物。
【請求項５４】
幹細胞調製物の状態を評価する方法であって、前記調製物中のグリカン構造またはグリカン構造の群の存在を検出するステップを含み、前記グリカン構造またはグリカン構造の群が式Ｔ１１：
［Ｍ］$_{m}$Ｇａｌβ１－ｘ［Ｎα］$_{n}$Ｈｅｘ（ＮＡｃ）$_{p}$
によるものであり、
ｍ、ｎおよびｐは独立に０または１の整数であり、
ＨｅｘはＧａｌまたはＧｌｃであり、Ｘは結合位置であり；
ＭおよびＮは単糖残基であって、独立に無（前記位置の遊離水酸基）であり、
ならびに／または 、

Ｇａｌの３位もしくは／およびＨｅｘＮＡｃの６位に結合したシアル酸であるＳＡα、
Ｇａｌの３もしくは４位に結合したＧａｌα、または
Ｇａｌの４位に結合するＧａｌＮＡｃβ、ならびに／または
Ｇａｌの２位；および／もしくは、Ｇａｌが他の位置（４または３）に結合し、ＨｅｘＮＡｃがＧｌｃＮＡｃである場合、ＨｅｘＮＡｃの３もしくは４位；または、Ｇａｌが他の位置（３）に結合する場合、Ｇｌｃの３位；に結合したＦｕｃ（Ｌ－フコース）残基であり、
ただし、ｍおよびｎの合計は２であり
好ましくはｍおよびｎは独立に０または１であり、ならびに
ＭがＧａｌαである場合、Ｇａｌβ１に結合するシアル酸は存在せず、ならびに
ｎは０であり、ｘは好ましくは４であり、
ＭがＧａｌＮＡｃβである場合、Ｇａｌβ１にα６結合するシアル酸は存在せず、ｎは０であり、ｘは４であることを特徴とする方法。

【請求項５５】

請求項５４に記載の方法において、前記構造が式Ｔ１２：
［Ｍ］［ＳＡα３］$_{n}$ＧａｌＧａｌβ１－４Ｇｌｃ（ＮＡｃ）$_{p}$
によるものであり、
ｎおよびｐは独立に０または１の整数であり、
ＭはＧａｌの３もしくは４位に結合したＧａｌα、またはＧａｌの４位に結合したＧａｌＮＡｃβであり、および／またはＳＡαはＧａｌの３位に結合したシアル酸分岐であり、
ＭがＧａｌαである場合、Ｇａｌβ１に結合するシアル酸は存在しない（ｎは０である）ことを特徴とする方法。

【請求項５６】

請求項５４または５５に記載の方法において、前記構造がグロボトリオース（Ｇｂ３）非還元末端の末端構造ＧａｌＧａｌα４Ｇａｌを含むことを特徴とする方法。

【請求項５７】

新規標的／マーカ構造を含む幹細胞からの細胞成分の単離のための、請求項１ないし５６のいずれかに記載の結合剤分子の使用。

【請求項５８】

請求項５７に記載の使用において、前記単離された細胞成分が遊離グリカン、またはタンパク質もしくは脂質もしくはその断片に結合したグリカンであることを特徴とする使用。

【請求項５９】

請求項５７ないし５８に記載の結合剤分子を用いる次のステップを含む、細胞成分を単離するための方法であって、

１）幹細胞試料を提供するステップと、

２）本発明の結合剤分子を対応する標的構造に接触させるステップと、

３）前記結合剤および標的構造の複合体を少なくとも細胞材料の一部から単離するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

【請求項６０】

請求項５９に記載の方法により産生される標的構造組成物であって、幹細胞において、または幹細胞に特徴的な割合で特異的に発現する、前記結合剤構造に対応するグリカン構造およびペプチドまたはタンパク質エピトープを含む糖タンパク質または糖ペプチドを含み、前記組成物が請求項に記載の方法によって産生されることを特徴とする標的構造組成物。

【請求項６１】

複数のオリゴ糖の本質的に純粋なオリゴ糖グライコーム組成の分析のための方法であって、式
ＮｅｕＡｃ$_{m}$ＮｅｕＧｃ$_{n}$Ｈｅｘ$_{o}$ＨｅｘＮＡｃ$_{p}$ｄＨｅｘ$_{q}$ＨｅｘＡ$_{r}$Ｐｅｎ$_{s}$Ａｃ$_{t}$

$ModX_x$ （Ｉ）
による単糖組成を含み、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、およびｘは≧０および約１００未満の値の独立の整数であり、ただし各グリカンマス成分（ｇｌｙｃａｎ　ｍａｓｓ　ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ）に対して主鎖単糖変数ｏ、ｐ、またはｒのうち少なくとも２つは≧１であり、
Ｈｅｘはヘキソースを表し、Ｐｅｎはペントースを表し、ＭｏｄＸは修飾を表し、前記方法は、
ａ）単離されたヒト幹細胞試料を提供するステップと；
ｂ）前記幹細胞試料から全グリカンまたは全グリカン群を遊離させるステップ、または前記幹細胞試料から遊離グリカンを抽出するステップと；
ｃ）前記試料からグライコームを単離するステップと；
ｄ）質量分析プロファイリングにより組成を分析するステップと；
を含むことを特徴とする方法。
【請求項６２】
請求項６１または１に記載の方法において、当該方法が質量分析プロファイルの定量的な比較を伴い、前記方法が抗体、酵素および／またはレクチン等の結合分子による分析のためのマーカの選択に用いられることを特徴とする方法。
【請求項６３】
細胞表面上の本質的にグライコーム組成の分析のための方法であって、
ａ）単離されたヒト幹細胞試料を提供するステップと；
ｂ）前記細胞試料を、前記グライコーム組成内のグリカン構造またはグリカン構造群を認識する少なくとも１種の結合分子と接触させるステップと；
ｃ）結合した結合分子の量を分析するステップと；
を含むことを特徴とする方法。
【請求項６４】
請求項６２または６３に記載の方法であって、前記方法が群：
ａ）マンノース型構造、特にアルファ－Ｍａｎ構造、
ｂ）α３－シアル化および／またはフコシル化構造、
ｃ）Ｇａｌ／ＧａｌＮａｃ結合特異性、好ましくはＧａｌ１－３／ＧａｌＮＡｃ１－３結合特異性、より好ましくはＰＮＡに類似のＧａｌβ１－３／ＧａｌＮＡｃβ１－３結合特異性、
からの１つまたはいくつかの構造に対する結合特異性を有する好ましい結合分子を含むことを特徴とする方法。
【請求項６５】
請求項６２または６３に記載の方法において、前記検出が、モノクローナル抗体、グリコシダーゼ、グリコシル転移酵素、植物レクチン、動物レクチンまたはそれらのペプチド模倣物からなる群より選択される組み替えタンパク質である結合剤により行われることを特徴とする方法。
【請求項６６】
請求項６２または６３に記載の方法において、前記組み替えタンパク質が、少なくとも部分的に２つの単糖構造と前記単糖残基間の結合構造とを認識する高特異性結合剤であることを特徴とする方法。
【請求項６７】
請求項６２または６３に記載の方法において、前記結合剤が、異なるヒト幹細胞型間の選別または選択のために用いられることを特徴とする方法。
【請求項６８】
請求項６２または６３に記載の方法において、前記結合剤が、胚性幹細胞およびフィーダ細胞集団の選別または選択のために用いられることを特徴とする方法。
【請求項６９】
請求項６１または６２に記載の方法において、当該方法が：

ａ）前記分析のためのグリカンを含んだ幹細胞試料を調製するステップと；
ｂ）前記幹細胞試料から全グリカンまたは全グリカン群を遊離するステップ、または前記幹細胞試料から遊離グリカンを抽出するステップと；
ｃ）任意にグリカンを修飾するステップと；
ｄ）前記試料の生体材料からグリカン画分／画分群を精製するステップと；
ｅ）任意にグリカンを修飾するステップと；
ｆ）前記遊離されたグリカンの組成を質量分析により分析するステップと；
ｇ）任意に、遊離されたグリカンに関するデータを定量的に示し、前記定量的データセットを他の幹細胞試料からの他のデータセットと比較するステップと；
ｈ）前記遊離されたグリカンに関するデータを定量的または定性的に他の幹細胞試料から生成されたデータと比較するステップと；
を含むことを特徴とする方法。

【請求項７０】

Ｎ－グリカンコアマーカ構造であって、二糖エピトープが、
式ＣＧＮ：
［Ｍａｎα３］$_{n1}$（Ｍａｎα６）$_{n2}$Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４（Ｆｕｃα６）$_{n3}$ＧｌｃＮＡｃｘＲ
のＮ－結合グリカンのコア構造におけるＭａｎβ４ＧｌｃＮＡｃ構造であり、
ｎ１、ｎ２およびｎ３は０または１の整数であり、独立に残基の存在または非存在を表し、
非還元末端の末端Ｍａｎα３／Ｍａｎα６－残基は、幹細胞の状態の分析および／または幹細胞の操作のための、複合型、特に二分岐構造に、またはマンノース型（高Ｍａｎおよび／または低Ｍａｎ）に、またはハイブリッド型構造に伸長してよく、ｘＲはβＡｓｎもしくはβＡｓｎ－ペプチドもしくはβＡｓｎ－タンパク質等のタンパク質もしくはペプチドに結合するＮ－グリカンの還元末端構造、またはＮ－グリカンの遊離還元末端、またはヒト胚幹細胞の分析のために生成された前記還元の化学的誘導体を表すことを特徴とするＮ－グリカンコアマーカ構造。

【請求項７１】

請求項７０に記載のマーカ構造を含むＮ－グリカンコアであって、前記構造が式Ｍ２：
［Ｍα２］$_{n1}$［Ｍα３］$_{n2}${［Ｍα２］$_{n3}$［Ｍα６）］$_{n4}$}［Ｍα６］$_{n5}${［Ｍα２］$_{n6}$［Ｍα２］$_{n7}$［Ｍα３］$_{n8}$}Ｍβ４ＧＮβ４［{Ｆｕｃα６}］$_{m}$ＧＮｙＲ$_{2}$
のマンノース型グリカンであり、
ｎ１、ｎ２、ｎ３、ｎ４、ｎ５、ｎ６、ｎ７、ｎ８、およびｍは独立に０または１のいずれかであり；ただしｎ２が０である場合、ｎ１も０であり；ｎ４が０である場合、ｎ３も０であり；ｎ５が０である場合、ｎ１、ｎ２、ｎ３およびｎ４も０であり；ｎ７が０である場合、ｎ６も０であり；ｎ８が０である場合、ｎ６およびｎ７も０であり；
ｙはアノマー結合構造αおよび／もしくはβまたは誘導体化アノマー炭素からの結合であり、
Ｒ$_{2}$は還元末端水酸基、化学的還元末端誘導体、または、タンパク質由来のアスパラギンＮ－グリコシドアミノ酸および／もしくはペプチドを含むアスパラギンＮ－グリコシド等の天然アスパラギンＮ－グリコシド誘導体であり；
［］はｎ１、ｎ２、ｎ３、ｎ４、ｎ５、ｎ６、ｎ７、ｎ８、およびｍの値によって存在するかまたは存在しないかのいずれかである決定基を表し；
{} は前記構造中の分岐を表し；
前記構造は任意に高マンノース構造であり、さらにグルコース残基またはｎ６で表されるマンノース残基に結合する残基で置換されることを特徴とするＮ－グリカンコア。

【請求項７２】

請求項７１に記載の方法であって、少なくとも１つの構造の量が分化中の幹細胞における減少または増加によって変化し、前記構造が単糖

$H_nN_2F_m$組成Hに対応し、Hはヘキソース、好ましくはＭａｎまたはＧｌｃであり、ＮはＮ－アセチルヘキソサミン、好ましくはＧｌｃＮＡｃであり、Ｆはデオキシヘキソース、好ましくはフコースであり、ｎは１ないし１１の整数であり、ｍは０または１であることを特徴とする方法。

【請求項７３】

請求項７２に記載の方法において、前記構造が、その由来する分化した細胞よりも間葉系幹細胞と関連することを特徴とする方法。

【請求項７４】

請求項７２または７３に記載の方法において、前記構造の量が、間葉系幹細胞において、その分化したバリアントよりも増加することを特徴とする方法。

【請求項７５】

請求項７４に記載の方法において、前記構造が、間葉系幹細胞に特異的な単糖組成を表す表に示されることを特徴とする方法。

【請求項７６】

請求項７２または７３に記載の方法において、前記構造の量が間葉系幹細胞において、その分化したバリアントよりも減少することを特徴とする方法。

【請求項７７】

請求項７６に記載の方法において、表中に示されるものが間葉系幹細胞に特異的な単糖組成を示すことを特徴とする方法。

【請求項７８】

請求項７０に記載の方法において、前記構造が式ＧＮβ２：

$[R_1GN\beta 2]_{n1}[M\alpha 3]_{n2}\{[R_3]_{n3}[GN\beta 2]_{n4}M\alpha 6\}_{n5}M\beta 4GNXyR_2$

の複合型Ｎ－グリカンであり、任意に、Ｍα６、Ｍα３、またはＭβ４に結合する１または２または３個の式$[R_xGN\beta z]_{nx}$のさらなる分岐を有し、R_xは各分岐で異なっていてよく、

ｎ１、ｎ２、ｎ３、ｎ４、ｎ５およびｎｘは独立に０または１のいずれかであり、

ただしｎ２が０である場合、ｎ１は０であり、ｎ３が１および／またはｎ４が１である場合、ｎ５も１であり、少なくともｎ１もしくはｎ４は１、またはｎ３は１であり；

ｎ４が０であり、かつｎ３が１である場合、R_3はマンノース型置換基または無であり、

Ｘはグリコシド結合二糖エピトープβ４（Ｆｕｃα６）$_n$ＧＮであり、ここでｎは０もしくは１、またはＸは無であり、

ｙはアノマー結合構造αおよび／もしくはβ、または誘導体化アノマー炭素からの結合であり、

R_1、R_XおよびR_3は独立に、コア構造に結合する１、２または３個の天然置換基を表し、

R_2は還元末端水酸基、化学的還元末端誘導体、または、タンパク質由来のアスパラギンＮ－グリコシドアミノ酸および／もしくはペプチドを含むアスパラギンＮ－グリコシド等の天然アスパラギンＮ－グリコシド誘導体であり、

［］は直鎖配列中に存在するまたは存在しない基を表し、｛｝が更に存在しても存在しなくてもよい分岐を表すことを特徴とする方法。

【請求項７９】

請求項７８に記載の方法において、前記構造はそれに由来する分化した細胞よりも胚性幹細胞と関連することを特徴とする方法。

【請求項８０】

請求項７９に記載の方法において、前記構造が、Ｈ６Ｎ５、およびＨ６Ｎ５Ｆ１等の大型の複合型Ｎ－グリカンであるｈＥＳＣ－ｉｉの群に属し、

または、前記構造が、Ｈ５Ｎ４Ｆ１、Ｈ５Ｎ４Ｆ２、およびＨ５Ｎ４Ｆ３等の二分岐サイズ複合型Ｎ－グリカンであるｈＥＳＣ－ｉｉｉの群に属し、

または、前記構造が、Ｈ５Ｎ４Ｆ２、Ｈ５Ｎ４Ｆ３、およびＨ４Ｎ５Ｆ３等の複合フコシル化Ｎ－グリカンであるｈＥＳＣ－ｉｖの群に属し、

または、前記構造が、Ｈ４Ｎ３、およびＨ４Ｎ３Ｆ１等の単分岐型Ｎ－グリカンであるｈＥＳＣ－ｖｉｉの群に属し、
または、構造が、Ｈ４Ｎ５Ｆ３等の末端ＨｅｘＮＡｃ　Ｎ－グリカンであるｈＥＳＣ－ｖｉｉｉの群に属し、
または、前記構造が、胚性幹細胞よりも、胚幹細胞に由来する分化した胚性幹細胞と関連し、
または、前記構造が、Ｈ５Ｎ６Ｆ２、Ｈ３Ｎ４、Ｈ３Ｎ５、Ｈ４Ｎ４Ｆ２、Ｈ４Ｎ５Ｆ２、Ｈ４Ｎ４、Ｈ４Ｎ５Ｆ１、Ｈ２Ｎ４Ｆ１、Ｈ３Ｎ５Ｆ１、およびＨ３Ｎ４Ｆ１等の末端ＨｅｘＮＡｃ　Ｎ－グリカンであるＤｉｆｆ－ｉｖの群に属し、
または、前記構造が、Ｈ３Ｎ３、Ｈ３Ｎ３Ｆ１、およびＨ２Ｎ３Ｆ１等の末端ＨｅｘＮＡｃ単分岐Ｎ－グリカンであるＤｉｆｆ－ｖｉの群に属し、
または、前記構造が、Ｈ５Ｎ５Ｆ１、Ｈ５Ｎ５、およびＨ５Ｎ５Ｆ３等のＨ＝Ｎ型末端ＨｅｘＮＡｃ　Ｎ－グリカンであるＤｉｆｆ－ｖｉｉの群に属し、
または、前記構造が、Ｈ４Ｎ３Ｆ２等の複合フコシル化単分岐型Ｎ－グリカンであるＤｉｆｆ－ｉｘの群に属し、
または、前記構造が、胚性幹細胞よりも、胚幹細胞に由来する分化した胚性幹細胞と関連する、ハイブリッド型Ｎ－グリカンであり、
または、前記構造が、Ｈ６Ｎ４、およびＨ７Ｎ４等の伸長ハイブリッド型Ｎ－グリカンであるＤｉｆｆ－ｖｉｉｉの群に属し、
または、前記構造が、Ｈ５Ｎ３Ｆ１、Ｈ５Ｎ３、Ｈ６Ｎ３Ｆ１、およびＨ６Ｎ３等のハイブリッド型Ｎ－グリカンであるＤｉｆｆ－ｖの群に属することを特徴とする方法。

【請求項８１】

請求項７０に記載のＮ－グリカンコアマーカ構造において、Ｍａｎα３／Ｍａｎα６残基が複合型、特に二分岐構造に伸長し、ｎ３が１であり、Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃエピトープがＧｌｃＮＡｃ置換または置換群を含むことを特徴とするＮ－グリカンコアマーカ構造。

【請求項８２】

ヒト血液関連、好ましくは造血、幹細胞調製物および／または混入細胞集団の状態を評価する方法であって、伸長グリカン構造、または、少なくとも２つの、前記調製物中のグリカン構造の群の存在を検出するステップを含み、前記グリカン構造またはグリカンの群ＴｎおよびシアリルＴｎ構造は、式ＭＵＣ
（Ｒ）$_{n}$ΓαλＮＡχα（Ｓｅｒ／Ｔｈｒ）$_{m}$
によるものであり、ｎおよびｍは独立に０または１であり、ＲはＳＡα６またはＧａｌβ３であり、ＳＡはシアル酸、好ましくはＮｅｕ５Ａｃであり、ＲがＧａｌβ３の場合、ｎは１であり、
好ましくはＴｎ抗原：
（ＳＡα６）$_{n}$ＧａｌＮＡｃα（Ｓｅｒ／Ｔｈｒ）$_{m}$、
によるものであり、ｎおよびｍは独立に０または１であり、ＳＡはシアル酸、好ましくはＮｅｕ５Ａｃであり、
またはＴＦ抗原
ＧａｌΒ３ＧａｌＮＡｃα（Ｓｅｒ／Ｔｈｒ）$_{m}$
によるものであることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は特定の種類のヒト細胞のグリカン構造に対する特異的結合剤のための試薬および方法を記載するものである。さらに本発明は、間葉系細胞（間葉系幹細胞およびその分化した細胞）表面の特定のグリカンエピトープに対するさらなる結合剤のスクリーニングに関する。グリカン構造の好ましい結合剤としては、酵素、レクチンおよび抗体等のタンパク質などが挙げられる。

【背景技術】
【０００２】
幹細胞
幹細胞は一連の成熟した機能細胞を生じうる未分化の細胞である。例えば、造血幹細胞は任意の各種の最終分化した血液細胞を生じうる。胚性幹（ＥＳ）細胞は胚に由来し、多能性であり、そのため任意の器官または組織に、または、少なくとも潜在的に、完全な胚へと発生する能力を有する。
【０００３】
幹細胞の存在を示す最初の証拠は、生殖細胞由来の腫瘍である奇形腫の未分化幹細胞、胚性癌腫（ＥＣ）細胞の研究によってもたらされた。これらの細胞は多能性であって不死化しているが、限定的な発生能しか有しておらず、異常な核型を示していることが明らかになった（Ｒｏｓｓａｎｔ ａｎｄ Ｐａｐａｉｏａｎｎｏｕ，Ｃｅｌｌ Ｄｉｆｆｅｒ １５，１５５－１６１，１９８４）。一方、ＥＳ細胞は奇形腫環境による選択圧を受けずに正常な胚細胞に由来したものであるため、より高い発生能を保持していると考えられる。
【０００４】
多能性胚幹細胞は従来、主に２種類の供給源より得られてきた。１つは着床前胚の内部細胞塊の細胞の培養で単離することができ、胚性幹（ＥＳ）細胞と呼ばれる（Ｅｖａｎｓ ａｎｄ Ｋａｕｆｍａｎ，Ｎａｔｕｒｅ ２９２，１５４－１５６，１９８１；米国特許第６，２００，８０６号）。多能性幹細胞の第２の種類は、胚の腸間膜または生殖隆起中の始原生殖細胞（ＰＧＣＳ）から単離することができ、胚性生殖細胞（ＥＧ）と名付けられた（米国特許第５，４５３，３５７号、米国特許第６，２４５，５６６号）。ヒトＥＳおよびＥＧ細胞は多能性である。これはｉｎ ｖｉｔｒｏで細胞を分化させることにより、また免疫不全（ＳＣＵＭ）マウスにヒト細胞を注射し、それによって生じた奇形腫を分析することにより（米国特許第６，２００，８０６号）、示された。本明細書で用いられる「幹細胞」という語は、胚幹細胞または胚性幹細胞、およびより組織特異的な幹細胞に分化したその幹細胞；間葉系幹細胞等の成体幹細胞；ならびに骨髄または臍帯血より得られる幹細胞等の血液幹細胞；等を含む幹細胞を意味する。
【０００５】
本発明は間葉系幹細胞およびその分化した細胞のための、新規マーカおよび標的構造、ならびにこれらに対する結合剤を提供する。造血ＣＤ３４＋細胞等の他の種類の細胞からは、ＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ（Ｍａｇｎａｎｉ Ｊ．ＵＳ６３６２０１０）等の末端シアル化２型Ｎ－アセチルラクトサミン、低発現Ｓｌｅｘ型構造ＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ（Ｘｉａ Ｌ ｅｔ ａｌ Ｂｌｏｏｄ（２００４）１０４（１０）３０９１－６）などの特定の末端構造が示されている。グリコシル化の細胞型特異性によると、これらは間葉系幹細胞に関連していない。本発明は、特定の特徴的なＯ－グリカンおよびＮ－グリカンからＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ等の構造を記載する。
【０００６】
ヒトＥＳ、ＥＧおよびＥＣ細胞、ならびに霊長類ＥＳ細胞は、アルカリホスファターゼ、時期特異的胚抗原ＳＳＥＡ－３およびＳＳＥＡ－４、ならびにＴＲＡ－１－６０およびＴＲＡ－１－８１抗体により認識される表面プロテオグリカンを発現する。典型的にはこれらのマーカは全てこれらの細胞を染色するが、幹細胞に完全に特異的ではなく、そのため器官または末梢血から幹細胞を単離するのに用いることはできない。
【０００７】
ＳＳＥＡ－３およびＳＳＥＡ－４構造はガラクトシルグロボシドおよびシアリルガラクトシルグロボシドとして知られており、胚幹細胞の数少ない示唆されている構造のうちの一部であるが、これらの構造の性質は不明確ではない。一部の特異性の低い植物レクチン試薬が胚幹細胞様物質に結合することが報告されている。Ｖｅｎａｂｌｅ ｅｔ ａｌ ２００５，（Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．５：１５）は胚幹細胞のＳＳＥＡ－４抗体陽性サブポピ

ュレーションからレクチンの結合を測定し、Ｗｅａｒｎｅ ＫＡ ｅｔ ａｌ Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ （２００６）１６（１０）９８１－９９０はＥＳ細胞へのレクチンの結合を研究した。Ｋ２１と呼ばれる抗体が胚性癌腫細胞上の硫酸化多糖を結合することが示唆された（Ｂａｄｃｏｃｋ Ｇ ｅｔ ａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ（１９９９）４７１５－１９）。グリコシル化の細胞型、種、組織および他の特性によると（Ｆｕｒｕｋａｗａ，Ｋ．，ａｎｄ Ｋｏｂａｔａ，Ａ．（１９９２）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．３，５５４－５５９，Ｇａｇｎｅｕｘ，ａｎｄ Ｖａｒｋｉ，Ａ．（１９９９）Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ ９，７４７－７５５；Ｇａｗｌｉｔｚｅｋ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．（１９９５），Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．４２，１１７－１３１；Ｇｏｅｌｚ，Ｓ．，Ｋｕｍａｒ，Ｒ．，Ｐｏｔｖｉｎ，Ｂ．，Ｓｕｎｄａｒａｍ，Ｓ．，Ｂｒｉｃｋｅｌｍａｉｅｒ，Ｍ．，ａｎｄ Ｓｔａｎｌｅｙ，Ｐ．（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９，１０３３－１０４０；Ｋｏｂａｔａ，Ａ（１９９２）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０９（２）４８３－５０１）、この結果は天然の胚幹細胞上の構造の存在を示すものではない。本発明はヒト間葉系細胞を対象とする。

【０００８】

本発明は、質量分析プロファイリング、ＮＭＲ分光法、およびグリカン修飾酵素等の結合試薬により特異的構造を明らかにした。レクチンは一般に低特異性の分子である。本発明は、これまでに記載された単糖エピトープよりも大きな結合エピトープを明らかにした。この大きなエピトープにより、少なくとも二糖類に対して典型的な結合特異性を有するより特異的な結合物質を設計することができた。本発明はまた、幹細胞の分析に対して有用な特異性を有するレクチン試薬も明らかにした。

【０００９】

幹細胞の分離および使用のための一般的な方法は当該分野で公知である。

【００１０】

造血幹細胞よりも初期の分化段階の多能性（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ）または多分化能（ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｔ）幹細胞を実質的に純粋なまたは純粋な形で診断、置換療法、および遺伝子治療の目的において単離するため、多くの試みが為されてきた。幹細胞は遺伝子治療の重要な標的であり、挿入遺伝子は幹細胞が移植された個体の健康を促進するように意図されている。さらに、幹細胞を単離できればそれがリンパ腫および白血病、ならびに他の癌疾患の治療に役立つ場合があり、この際、幹細胞は骨髄または末梢血中の腫瘍細胞から精製され、骨髄抑制化学療法または骨髄破壊的化学療法後の患者に再注入される。

【００１１】

様々な成体幹細胞集団が各種の成体組織から発見されている。造血幹細胞に加え、神経幹細胞が成体の哺乳類の中枢神経系において同定された（Ｏｕｒｅｄｎｉｋ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．５６，２６７，１９９９）。成体幹細胞は上皮組織および脂肪組織からも同定されている（Ｚｕｋ ｅｔ ａｌ．Ｔｉｓｓｕｅ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ７，２１１，２００１）。間葉系幹細胞（ＭＳＣ）は肝臓や膵臓等の多くの供給源から培養されている（Ｈｕ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｌａｂ Ｃｌｉｎ Ｍｅｄ．１４１，３４２－３４９， ２００３）。近年の研究では、一部の体性幹細胞が完全に異なる系統の細胞へと分化する能力を有するようであることが示された（Ｐｆｅｎｄｌｅｒ ＫＣ ａｎｄ Ｋａｗａｓｅ Ｅ，Ｏｂｓｔｅｔ Ｇｙｎｅｃｏｌ Ｓｕｒｖ ５８，１９７－２０８，２００３）。ある程度の多分化能を有する単球由来（Ｚｈａｏ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １００，２４２６－２４３１，２００３）および中胚葉由来（Ｓｃｈｗａｒｔｚ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ １０９，１２９１－１３０１，２００２）細胞が同定された。血液中の多分化能「胚様」前駆細胞（“ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ－ｌｉｋｅ” ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ ｃｅｌｌ）の存在も骨髄移植後のｉｎ ｖｉｖｏ実験によって示唆された（Ｚｈａｏ ｅｔ ａｌ．Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ Ｐｒｏｔｏｃ １１，３８－４５，２００３）。しかし、このような多分化能「胚様」幹細胞は公知のマーカを用いて同定および単離することができない。

【００１２】
胎児細胞を母体循環系から回収できる可能性は、胎児異常の診断における、胎児に対し非侵襲的で適切な手段としての興味をもたらした（Ｓｉｍｐｓｏｎ ａｎｄ Ｅｌｉａｓ，Ｊ．Ａｍ．Ｍｅｄ．Ａｓｓｏｃ．２７０，２３５７－２３６１，１９９３）。出生前診断は世界中の病院において広く行われている。ダウン症等の染色体異常、および嚢胞性線維症等の単一遺伝子欠陥の診断のための、胎児、肝臓または絨毛生検といった従来の方法は非常に侵襲的であり、胎児に対してかなりのリスクがある。例えば羊水穿刺は、子宮に針を挿入して胎児組織または羊水から細胞を回収することを伴う。ダウン症および他の染色体異常を検出し得るこの検査には、１％と見積もられる流産のリスクがある。胎児治療は極めて初期段階であり、広範な障害のための早期検査の可能性は、この領域における研究のペースを間違いなく大幅に速めることになるであろう。そのため、出生前診断の比較的非侵襲的な方法は、非常に侵襲的な従来の方法に対する魅力的な代替手段である。母体血液を基盤とした方法は、より早期かつより容易な診断を妊娠第１期（ｆｉｒｓｔ ｔｒｉｍｅｓｔｅｒ）においてより広く利用可能にし、親および産科医の選択肢を増やし、特定の胎児治療の結果的な進歩を可能にするであろう。

【００１３】
本発明は、診断、治療および組織工学のための、間葉系幹細胞（ＭＳＣ）の特徴を有する幹細胞およびその分化した派生物を、同定、分析および分離する方法を提供する。特に、本発明は、間葉系細胞を同定、選択および分離する方法、または診断および組織工学に用いるための試薬を提供する。本発明は組織および器官からの貴重な幹細胞の同定、分離および分析のために用いられ得る特異的マーカ／結合剤（ｂｉｎｄｅｒ）／結合物質（ｂｉｎｄｉｎｇ ａｇｅｎｔ）を初めて提供し、胚性および他の幹細胞を得るための現在利用可能な方法における倫理上およびロジスティック（ｌｏｇｉｓｔｉｃａｌ）な困難を克服する。

【００１４】
本発明は、高い特異性を有する非常に特異的な種類のマーカ／結合剤構造を開示することにより、間葉系細胞の同定および分離のための公知の結合剤／マーカの限界を克服する。本発明の他の態様においては、間葉系細胞上では反応しない（すなわち発現しない）が潜在的な混入細胞型上では反応する、特異的な結合剤／マーカ／結合物質が提供され、それにより混入細胞のポジティブセレクションおよび幹細胞のネガティブセレクションが可能となる。

【００１５】
以下、例示により、式（Ｉ）に対する結合剤が、各種細胞系統へと分化する能力を有する血液由来間葉系細胞等の間葉系細胞の同定、選択および単離に対して有用なものとして開示される。

【００１６】
本発明の一態様により、末梢血、臍帯血、骨髄および他の器官における間葉系細胞を同定するための新規方法が開示される。この態様により、間葉系細胞結合剤／マーカが、間葉系細胞におけるその選択的発現、ならびに他の分化した細胞および／または幹細胞におけるその非存在に基づいて選択される。従って、幹細胞に発現するグリカン構造は、本発明により、血液、組織および器官からの多能性または多分化能幹細胞の単離のための選択的結合剤／マーカとして用いられる。好ましくは、前記血液細胞および組織試料は哺乳類起源、より好ましくはヒト起源のものである。

【００１７】
特定の一様態によると、本発明は：
ｉ．幹細胞内／上で特異的発現を示し、分化した細胞内／上および／または他の混入細胞に存在しないグリカン構造を選択するステップと；
ｉｉ．幹細胞内／上の該グリカン構造に対する結合剤の結合を確認するステップと；
を含む、式（Ｉ）のグリカン構造に対する選択的幹細胞結合剤を同定するための方法：
のステップを含む、選択的間葉系細胞結合剤／マーカを同定するための方法を提供する。

【００１８】
限定されない実施例により、前記結合剤を用いて選択された成体、間葉系、胚性、または造血幹細胞は、任意の種類の幹細胞が欠損した宿主の造血または他の組織系を再生するのに用いることができる。疾患を有する宿主は、幹細胞の再移植を行う前に、骨髄の除去、幹細胞の単離、および薬剤または放射線照射を用いた治療を行うことにより治療され得る。本発明の新規マーカは各種幹細胞の同定および単離；幹細胞自己再生に関わる増殖因子の検出および評価；幹細胞系統の発生；および幹細胞の発生と関連した因子のアッセイ；に用いることができる。
【図面の簡単な説明】
【００１９】
【図１Ａ】ヒト骨髄ＭＳＣのＮ－グライコーム。図１Ａは、ＭＳＣからの中性Ｎ－グリカン画分のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量スペクトルである。
【図１Ｂ】ヒト骨髄ＭＳＣのＮ－グライコーム。図１Ｂは、ＭＳＣおよびそれらから分化した骨芽細胞からの５０個の最も豊富なグリカンシグナル（ポジティブモード）の相対シグナル強度（全シグナルに対する％）の模式図である。
【図１Ｃ】ヒト骨髄ＭＳＣのＮ－グライコーム。図１Ｃは、ＭＳＣからの酸性Ｎ－グリカン画分のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量スペクトルである。
【図１Ｄ】ヒト骨髄ＭＳＣのＮ－グライコーム。図１Ｄは、ＭＳＣおよびそれらから分化した骨芽細胞からの５０個の最も豊富なグリカンシグナル（ネガティブモード）の相対シグナル強度（全シグナルに対する％）の模式図である。示した構造は公知の生合成経路、ＮＭＲ分析およびエキソグリコシダーゼ実験に基づくものである。柱（ｃｏｌｕｍｎ）は各グリカンシグナルの平均存在量（全グリカンシグナルに対する％）を表す。提案されたＮ－グリカン単糖組成をＸ軸上に示す：Ｓ： ＮｅｕＡｃ、Ｈ： Ｈｅｘ、Ｎ： ＨｅｘＮＡｃ、Ｆ： ｄＨｅｘ、Ａｃ： アセチル。質量分析グリカンプロファイルを再整理し、グリカンシグナルを主要なＮ－グリカン構造群にグループ分けした。間葉系細胞の単離されたＮ－グリカン画分をプロトンＮＭＲ分光法によって構造的に分析して主要なＮ－グリカンコアおよび主鎖構造の特性を調べ、またα－マンノシダーゼ（タチナタマメ（Ｊａｃｋ ｂｅａｎｓ））、α１，２－およびα１，３／４－フコシダーゼ（Ｘ． ｍａｎｉｈｏｔｉｓ／組み替え）、β１，４－ガラクトシダーゼ（Ｓ． ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、ならびにノイラミニダーゼ（Ａ． ｕｒｅａｆａｃｉｅｎｓ）を用いた特異的エキソグリコシダーゼ消化を行って非還元末端エピトープの特性を調べた。主要なＮ－グリカンシグナルに対して提案された構造を棒グラフ中の模式図で示す。主要なシアル化Ｎ－グリカン構造はＮＭＲ分析において示された、トリマンノシルコアのコアフコシル化の有無に基づくものである。ガラクトース結合または分岐（ａｎｔｅｎｎａｅ）の分岐特異性（ｂｒａｎｃｈ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ）は本データには記さない。Ｌｅｗｉｓ ｘ構造は、特異的結合試薬を用いた染色により同一細胞内で検出され得る。
【図２Ａ】間葉系幹細胞からの中性Ｎ－グリカン画分のα３／４－フコシダーゼ処理。この反応は、式Ｇａｌβ４／３（Ｆｕｃα３／４）ＧｌｃＮＡｃの構造の存在を示す。Ｌｅｗｉｓ ｘ、すなわちＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ構造がこの種類の主要な構造であることが他の実験により示された。図２Ａは処理前のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量スペクトルの一部である。。
【図２Ｂ】間葉系幹細胞からの中性Ｎ－グリカン画分のα３／４－フコシダーゼ処理。この反応は、式Ｇａｌβ４／３（Ｆｕｃα３／４）ＧｌｃＮＡｃの構造の存在を示す。Ｌｅｗｉｓ ｘ、すなわちＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ構造がこの種類の主要な構造であることが他の実験により示された。図２Ｂは処理後のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量スペクトルの一部である。
【図２Ｃ】間葉系幹細胞からの中性Ｎ－グリカン画分のα３／４－フコシダーゼ処理。この反応は、式Ｇａｌβ４／３（Ｆｕｃα３／４）ＧｌｃＮＡｃの構造の存在を示す。Ｌｅｗｉｓ ｘ、すなわちＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ構造がこの種類の主要な構造であることが他の実験により示された。図２ｃに図１および図２で用いられる単糖残基

のカラー記号および１文字記号を示す
【図３】抗シアリルＬｅｗｉｓ　ｘ抗体を用いた免疫蛍光染色は、構造Ｎｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃが幹細胞状態と関連した主要な間葉系細胞マーカであることを示す。　ａ）骨髄ＭＳＣ　ｂ）骨髄ＭＳＣから分化した骨芽細胞
【図４】ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析プロファイリングによって分析された骨髄間葉系幹細胞（ＢＭ　ＭＳＣ）のフコシル化酸性Ｎ－グリカン。好ましい末端構造の種類はシアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘ、すなわちＮｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃである。
【図５】ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析プロファイリングによって分析されたＢＭ　ＭＳＣの複合フコシル化中性（上部パネル）および酸性（下部パネル）Ｎ－グリカン。ヒト間葉系幹細胞の複合フコシル化（Ｆｕｃ≧２）Ｎグリカンおよび分化におけるそれらの相対的存在量の変化。この群はＬｅｗｉｓ　ｘ、すなわちＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ、およびシアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘ、すなわちＮｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃという好ましい構造を含む。
【図６】ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析プロファイリングによって分析されたＢＭ　ＭＳＣの硫酸化Ｎ－グリカンおよびリン酸化Ｎ－グリカン。ヒト間葉系幹細胞の硫酸化Ｎ－グリカンは分化の過程でその相対的存在量が変化する。
【図７】本発明を記載するのに用いられる幹細胞の名称。
【図８】単離されたヒト幹細胞中性スフィンゴ糖脂質グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析プロファイル。ｘ軸：表中に記載された［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$イオンのｍ／ｚ概算値。ｙ軸：プロファイル中の各グリカン成分の相対モル存在量。ｈＥＳＣ、ＢＭ　ＭＳＣ、ＣＢ　ＭＳＣ、ＣＢ　ＭＮＣ：本文中に記載された幹細胞試料。
【図９】単離されたヒト幹細胞酸性スフィンゴ糖脂質グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析プロファイル。ｘ軸：表中に記載された［Ｍ－Ｈ］$^{-}$イオンのｍ／ｚ概算値。ｙ軸：プロファイル中の各グリカン成分の相対モル存在量。ｈＥＳＣ、ＢＭ　ＭＳＣ、ＣＢ　ＭＳＣ、ＣＢ　ＭＮＣ：本文中に記載された幹細胞試料。
【図１０】ＭＳＣおよび骨原性に分化した（ｏｓｔｅｏｇｅｎｉｃａｌｌｙ　ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｅｄ）細胞におけるＣＡ１５－３の免疫染色（ＭＵＣ－１におけるシアル化炭水化物エピトープ、＝ＧＦ２７５）。ＭＳＣにおいては点状染色が認められ、骨原性に分化した細胞（分化６週目、集密（ｃｏｎｆｌｕｅｎｔ）培養）においてはより細胞膜に局在化した染色パターンが認められる。ＦＡＣＳ分析においてはＧＦ２７５免疫染色されるＭＳＣの割合を示す。骨原性に分化した細胞の大部分（８０－９０％超）がＧＦ２７５を発現している。
【図１１】ＭＳＣおよび骨原性に分化した細胞の免疫染色。血液型Ｈ１（０）抗原、Ｌｅｗｉｓ　ｄ（ＢＧ４＝ＧＦ３０３）。ＭＳＣにおいては明瞭な染色は認められないが、骨原性に分化した細胞においては明瞭な免疫染色が７０－９０％超の細胞において認められる。
【図１２】ＭＳＣおよび骨原性に分化したＭＳＣのＨタイプ２血液型抗原（＝　ＧＦ３０２）免疫染色。ＭＳＣの免疫染色が両細胞型の約２０ないし７５％に認められる。
【図１３】ＭＳＣおよび骨原性に分化したＭＳＣのＬｅｗｉｓ　ｘ（ＳＳＥＡ－１　＝　ＧＦ３０５）免疫染色。ＭＳＣにおいては１０％未満という極めて少数の細胞しかＧＦ３０５で染色されない。骨原性に分化したＭＳＣは免疫染色を示さないか、または極めてわずかの免疫染色しか示さない。ＭＳＣおよび骨原性に分化したＭＳＣのシアリルＬｅｗｉｓ　ｘ（＝　ＧＦ３０７）免疫染色。シアリルＬｅｗｉｓ　ｘ免疫染色は、ＭＳＣが骨原性方向に分化すると減少する。
【図１４】ＭＳＣおよび骨原性に分化したＭＳＣのＣＤ７７（グロボトリオース（ＧＢ３）、ｐｋ－血液型　＝　ＧＦ２９８）免疫染色。ＭＳＣおよび骨原性方向に分化したＭＳＣ（のサブポピュレーション）はＣＤ７７を発現している。ＭＳＣおよび骨原性に分化したＭＳＣのグロボシドＧＢ４（＝ＧＦ２９７）免疫染色。骨原性に分化した細胞と比べ、より断続的なＧＢ４の染色がＭＳＣにおいて認められる。

【図１５】ＭＳＣおよび骨原性に分化したＭＳＣのＳＳＥＡ－３（＝　ＧＦ３５３）およびＳＳＥＡ－４（＝　ＧＦ３５４）免疫染色。ＳＳＥＡ－３免疫染色はＭＳＣが骨原性方向に分化すると減少する。ＳＳＥＡ－４（＝　ＧＦ３５４）免疫染色はＭＳＣが骨原性方向に分化すると減少する。
【図１６】ＭＳＣおよび骨原性に分化したＭＳＣのＴｎ（ＣＤ１７５　＝　ＧＦ２７８）免疫染色。骨原性方向に分化した細胞と比べて少数（５－４５％）のＭＳＣがＣＤ１７５を発現している。
【図１７】ＭＳＣおよび骨原性に分化したＭＳＣのシアリルＴｎ（ｓＣＤ１７５　＝　ＧＦ２７７）免疫染色。５－４５％という少数のＭＳＣがシアリルＴｎを発現している。骨原性に分化した細胞はより多くの、または主にこのエピトープを発現している。
【図１８】ＭＳＣおよび骨原性に分化したＭＳＣの腫瘍胎児抗原（ＴＡＧ－７２　＝　ＧＦ２７６）免疫染色。ＴＡＧ７２免疫染色はＭＳＣが骨原性方向に分化すると増加するか、またはアップレギュレートされる。
【図１９】骨ＢＭ－ＭＳＣおよびそれに由来する骨原性細胞のＦＡＣＳ分析の結果。ＦＡＣＳの結果は、細胞集団（各実験でｎ＝１－３）中の陽性細胞の平均割合として示す。
【図２０】ＢＭ－ＭＳＣおよび骨原性方向に分化した細胞のＦＡＣＳ分析。
【図２１】ＣＢ－ＭＳＣおよび骨原性および脂質生成方向に分化した細胞のＦＡＣＳ分析。

【発明の概要】
【００２０】
　本発明は、特異的結合剤（結合）分子による、幹細胞試料からの広範なグリカン混合物の分析に関する。
【００２１】
　本発明は特に、式Ｉ：
R_1Ｈｅｘβｚ{R_3}$_{n1}$ＨｅｘＮＡｃＸｙR_2　　（Ｉ）
［式中、Ｘは無であるかグリコシド結合した二糖エピトープβ４（Ｆｕｃα６）$_n$ＧＮであり、ここでｎは０または１であり；
ＨｅｘはＧａｌまたはＭａｎまたはＧｌｃＡであり；
ＨｅｘＮＡｃはＧｌｃＮＡｃまたはＧａｌＮＡｃであり；
ｙはアノマー結合構造αおよび／もしくはβ、または誘導体化アノマー炭素からの結合であり、
ｚは結合位置３または４であり、ただしｚが４である場合にはＨｅｘＮＡｃはＧｌｃＮＡｃであり、ＨｅｘはＭａｎであるか、またはＨｅｘはＧａｌであるか、またはＨｅｘはＧｌｃＡであり、ｚが３である場合には、ＨｅｘはＧｌｃＡまたはＧａｌであり、ＨｅｘＮＡｃはＧｌｃＮＡｃまたはＧａｌＮＡｃであり；
R_1はコア構造に結合した１ないし４個の天然型炭化水素置換基を表し；
R_2は還元末端水酸基、化学的還元末端誘導体、あるいは、タンパク質由来のアスパラギン、Ｎ－グリコシドアミノ酸および／もしくはペプチドを含む天然アスパラギン結合Ｎ－グリコシド誘導体、または、タンパク質由来のアスパラギン、Ｎ－グリコシドアミノ酸および／またはペプチドを含む天然セリンまたはスレオニン結合Ｏ－グリコシド誘導体であり；
ＨｅｘＮＡｃがＧａｌＮＡｃである場合、Ｒ３は無であるか、もしくはＧｌｃＮＡｃβ６を示す分岐構造であるか、もしくはそのＧａｌＮＡｃに結合する還元末端にＧｌｃＮＡｃβ６を有するオリゴ糖であり、または、ＨｅｘがＧａｌ、ＨｅｘＮＡｃがＧｌｃＮＡｃ、およびｚが３である場合、Ｒ３は無もしくはＦｕｃα４であり、または、ｚが４である場合、Ｒ３は無もしくはＦｕｃα３である］
のグリカンマス成分（ｇｌｙｃａｎ　ｍａｓｓ　ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ）のそれぞれに対する単糖組成を有するグリカン材料を含む、本発明の間葉系細胞（間葉系幹細胞およびそれらから分化した細胞）のグライコームに関する。
【００２２】

典型的なグライコームはＮ－グリカン、Ｏ－グリカン、糖脂質グリカン、ならびに中性および酸性サブグライコーム（ｓｕｂｇｌｙｃｏｍｅ）等のグリカンの亜群を含む。

【００２３】

本発明は試料中に存在するグリカンの分析に基づく幹細胞試料の臨床状態の診断に関する。本発明は特に、幹細胞および悪性細胞の分離、優先的には幹細胞と癌性細胞との区別、ならびに幹細胞株および標本における癌化の検出に関する。

【００２４】

本発明はさらに間葉系細胞試料中に存在するグリカン混合物の構造的分析にも関する。

【００２５】

グライコーム　－　幹細胞からの新規グリカン混合物

本発明は幹細胞から各種サイズの新規グリカンを明らかにした。幹細胞は小さなオリゴ糖から大きな複合構造にまでわたる範囲のグリカンを含んでいる。本分析は多数の成分と構造タイプとを相当量有する組成を明らかにする。これまで、これらの希少材料からの全グライコームは入手できず、幹細胞の遊離可能なグリカンの混合物、すなわちグライコームの性質は未知であった。

【００２６】

本発明は細胞表面のグリカン構造が初期のヒト細胞の各種集団、すなわち本発明の好ましい標的細胞集団、の間で異なることを明らかにした。該細胞集団は特異的に増加した「レポータ構造」を有していることが明らかになった。

【００２７】

細胞表面のグリカン構造は一般に多数の生物学的役割を有することが知られている。そのため、細胞表面からの正確なグリカン混合物についての知識は、細胞の状態に関する知識のために重要である。本発明は、複数の条件が細胞に影響し、そのグライコームに変化をもたらすことを明らかにした。本発明は、ヒト間葉系細胞から新規グライコーム成分および構造を明らかにした。本発明は特に、特異的結合剤分子によって分析することができる、特異的な末端グリカンエピトープを明らかにした。

【００２８】

関連するデータおよび明細はＰＣＴ　ＦＩ　２００６／０５０３３６、ＦＣＴ／ＦＩ２００６／０５０４８３、およびＦＣＴ／ＦＩ２００６／０５０４８５に示されており、参考文献として全体が含められる。

【００２９】

本発明は固有の単糖組成を有する新規の間葉系幹細胞特異的グリカンを明らかにしたものであり、該間葉系幹細胞特異的グリカンは、幹細胞の分化状態、および／またはいくつかの種類の幹細胞、および／または一種類の幹細胞の分化レベル、および／または幹細胞株間の系統特異的相違と関連している。

【００３０】

幹細胞の分化と関連するＮ－グリカン構造および組成

本発明は、

ｉ）未分化ヒト間葉系幹細胞ｈＭＳＣ、または

ｉｉ）ｈＭＳＣ由来の分化した細胞、好ましくは骨芽細胞もしくは脂肪細胞型細胞

と関連した特異的グリカン単糖組成および対応する構造を明らかにした。

【００３１】

明らかになった構造は発生の各種段階にある細胞の分析に有用であると考えられる。本発明は該構造を間葉系幹細胞の分化のマーカとして用いることに関する。本発明はさらに特異的グリカンを、分化の特定の段階で豊富になる、または増加するマーカとして、特定の分化段階の細胞の分析に用いることに関する。

【００３２】

細胞に影響する任意の条件が変化した際にグリコシル化が変化することが多いと考えられることから、本発明はさらに細胞の一般状態の分析に関する。本発明はさらに、分化が任意の次の条件に関連すると期待される場合の細胞の分化状態の分析に関する：栄養条件

、増殖因子の種類または量、利用可能なガスの量、細胞培養培地のｐＨ等の、細胞培養条件の変化；培地のタンパク質、脂質、または炭水化物含有量；圧力、振とう、温度、低温保存、凍結および／または解凍ならびにそれと関連した条件等の、細胞に影響する物理的要因；異なる細胞培養容器表面やポリマおよびゲル等の細胞培養マトリクスとの接触、ならびに他の細胞型またはこれらによって分泌された物質との接触。

【００３３】

Ｎ－グリカン構造および組成は幹細胞株またはバッチ間の個々の特異的相違と関連している

本発明はさらに、固有の種類のグリカン型が間葉系幹細胞試料中に各種様式で提示されていることを明らかにした。変化するグリカン型のほとんどは特定の分化段階に関連するものである。このような個々に変化するグリカンは個々の幹細胞株およびバッチの分析に有用であると認められる。個々の細胞試料の特異的構造は幹細胞株およびその調製された細胞の比較および標準化に対して有用である。個々の細胞調製物の特異的構造は、個々に異なるグリカンを認識する抗体または細胞性免疫防御を有する場合のある患者における、幹細胞治療のための特定の幹細胞株またはバッチまたは調製物の有用性を分析するために用いられる。

【００３４】

本発明は特にグライコームにおいて高度および中程度に個々の変化を示すグリカンの分析に関する。

【００３５】

質量分析または特異的結合試薬による分析法

本発明は特に、グリカン構造の特異的結合試薬および／または質量分析プロファイリングによる末端構造の識別に関する。好ましい方法の例としてはＮ－グリカンの識別が挙げられ、好ましくは二分岐Ｎ－グリカン、または三分岐Ｎ－グリカンが質量分析および／または結合試薬により識別される。好ましくは該Ｎ－グリカンは質量分析により識別され、該結合試薬は好ましくはグリコシダーゼ酵素である。

【００３６】

本発明の好ましい一様態は、前記構造に対応する質量分析シグナルに基づいて構造および／または組成を識別することに関する。

【００３７】

好ましい結合試薬は、末端エピトープおよび／または特徴的分岐エピトープ等の前記構造の特徴的エピトープ、例えばシアリルＬｅｗｉｓ　ｘおよびＬｅｗｉｓ　ｘ構造等のフコシル化構造ならびに硫酸化構造に対するものである。本発明は前記の好ましい末端エピトープを認識する特異的抗体に関するものであり、本発明はさらに、その好ましい抗体と同一または類似の特異性を有する、好ましくは同一の特異性を有する、他の結合剤に関するものである。

【００３８】

好ましい結合剤は炭水化物に結合するタンパク質またはペプチド、好ましくはレクチン、酵素もしくは抗体、またはその炭水化物結合断片である。好ましい一様態において、前記結合剤は抗体であり、より好ましくはモノクローナル抗体である。

【００３９】

本発明の好ましい一様態は、本発明の末端エピトープ構造のうち少なくとも１種を特異的に認識するモノクローナル抗体に関する。

【００４０】

遊離Ｎ－グリカンの質量分析プロファイリングにより、グリカンプロファイルにおける特徴的な変化が明らかになった。質量分析法は複数のグリカンおよびグリカン型を同時に検出することを可能にする。質量プロファイルにより特定の細胞型に特異的な個々のグリカン構造が明らかになる。本発明は特に、非常に少ない量の材料、例えば１０００細胞から５，０００，０００細胞、好ましくは１０，０００細胞から１００万細胞までの間、最も好ましくは１００，０００細胞から１００万細胞までの間の材料からグリカン構造を識

別することに関する。

【００４１】

細胞相互作用の分析のための結合試薬の使用

細胞表面の糖鎖構造は他の細胞および周囲の細胞マトリクスとの接触に関連していることが分かっている。従って、同定された細胞表面グリカン構造、および特にこれらを特異的に認識する結合試薬は細胞の分析に有用である。好ましい分析法は細胞を結合試薬と接触させ、結合試薬の細胞に対する効果を評価するステップを含む。好ましい一様態において、細胞は細胞培養条件下で結合剤と接触させられる。好ましい一様態において、結合剤はマルチバレント（ｍｕｌｔｉｖａｌｅｎｔ）、より好ましくはポリバレント（ｐｏｌｙｖａｌｅｎｔ）の形態で提示され、他の好ましい一様態においては表面に付着した形態で提示される。前記効果は細胞における増殖特性または細胞シグナリングの変化であってよい。

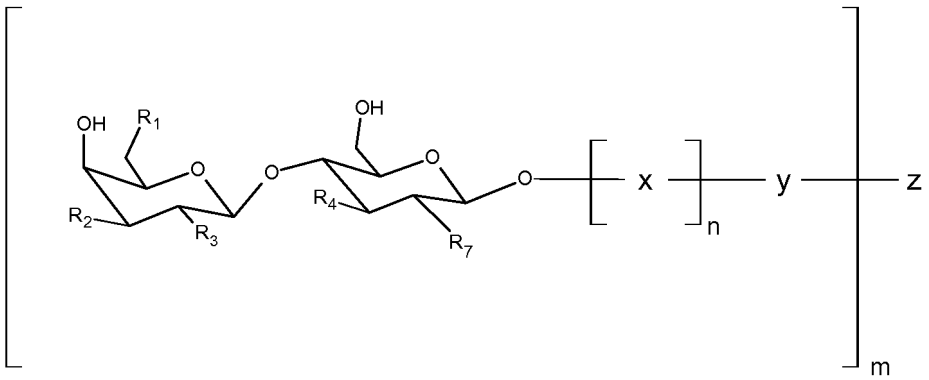
【００４２】

好ましい末端構造エピトープ

本発明は、ＬａｃｄｉＮＡｃ（ＧａｌＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃ）およびラクトシル（Ｇａｌβ４Ｇｌｃ）構造等の非常に相同な構造を含んだＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン型構造を間葉系幹細胞およびその誘導体の評価に用いることに関する。

【００４３】

本発明は好ましくはヒト間葉系幹細胞調製物の状態を評価することに関しており、前記調製物中のグリカン構造またはグリカン構造の一群の存在を検出するステップを含み、ここで前記グリカン構造またはグリカン構造の一群は式ＬＮ１：



［式中、

Ｘは結合位置であり、

R_1およびR_2はＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基シアル酸であり、好ましくはＮｅｕ５ＡｃαまたはＮｅｕ５Ｇｃαであり、最も好ましくはＮｅｕ５Ａｃαまたは硫酸エステル基であり、または

R_3はＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基Ｆｕｃα（Ｌ－フコース）またはＮ－アセチル（Ｎ－アセトアミド、$NCOCH_3$）であり；

R_4はＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基Ｆｕｃα（Ｌ－フコース）であり、

Ｒ７はＮ－アセチルまたはＯＨであり

Ｘは細胞由来の天然オリゴ糖主鎖構造、好ましくはＮ－グリカン、Ｏ－グリカンもしくは糖脂質構造；またはｎが０の場合、Ｘは無であり、

Ｙは連結基、好ましくはＯ－グリカンおよびＯ－連結末端オリゴ糖および糖脂質のための酸素、ならびにＮ－グリカンのためのＮ、またはｎが０である場合は無であり；

Ｚは担体構造、好ましくは細胞により産生された天然担体、例えば好ましくはセラミドであるタンパク質もしくは脂質、または該担体上の分岐グリカンコア構造、またはＨであり；

ｎは０または１の整数であり、ｍは１ないし１０００、好ましくは１ないし１００、最も好ましくは１ないし１０の整数（担体上のグリカンの数）であり、ただしＲ７がＮ－アセチルである場合はＧｌｃＮＡｃ残基の６位水酸基は硫酸エステルによって置換されてもよい］
によるものである。

【００４４】

本発明はさらに式ＬＮ２：
［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１－４［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβｘＭａｎ
［式中、
ｍ、ｎおよびｐは独立に０または１の整数であり、
ｘは２、４または６の群から選択される結合位置であり、
ＭおよびＮは置換基または単糖残基であって
Ｉ．独立に無（その位置に遊離水酸基）、および／または
ＩＩ．Ｇａｌの３位または６位に結合したシアル酸ＳＡ、および／または
ＩＩＩ．Ｇａｌの２位および／またはＧｌｃＮＡｃの３位に結合したＦｕｃ（Ｌ－フコース）残基、および／または
ＩＶ．Ｇａｌの３もしくは６位の、および／またはＧｌｃＮＡｃの６位の、硫酸エステル
であり、
シアル酸が６位に結合している場合は好ましくはｎは０である］
の構造にも関する。

【００４５】

本発明はさらに式ＬＮ３：
［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１－４［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ
［式中、変数は式ＬＮ２に記載した通りであり、該構造は好ましくはＮ－グリカンコアに結合する］
の構造にも関する。

【００４６】

特に好ましい構造は式ＬＮ４：
［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１－４（Ｆｕｃα３）$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ
［式中、Ｍはα３結合シアル酸（ＳＡα３）、好ましくはＮｅｕ５Ａｃα３またはＦｕｃα２である］
のフコシル化構造である。

【００４７】

好ましいＬＮ４構造はＮ－グリカン結合構造であって：Ｌｅｗｉｓ　ｘ構造、Ｇａｌβ１－４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、またはシアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘ構造Ｎｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ１－４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎである。

【００４８】

他の好ましい構造群の例としては式ＬＮ４ａ：
［ＳＡα３］$_{m}$Ｇａｌβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ
［式中、ＳＡはシアル酸、好ましくはＮｅｕ５Ａｃであり、該構造はＮ－グリカン結合ＩＩ型ＬａｃＮＡｃ構造、Ｇａｌβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、またはシアリル－ＩＩ型ＬａｃＮＡｃ構造　Ｎｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎである］
の構造が挙げられる。

【００４９】

本発明はさらに式ＬＮ５：
［ＳＥ３／６］$_{m}$Ｇａｌβ１－４［ＳＥ６］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ
［式中、ＳＥは硫酸エステルであり、３／６は３または６のいずれかを表し、該構造は少なくとも１個の硫酸残基を有する］
の構造にも関する。

【００５０】
本発明はさらに、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、ＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、およびＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎからなる群より選択されるＬＮ２の構造にも関する。
【００５１】
異性体フコシル化およびシアル化構造、ＨＩＩ型Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、およびＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎは他の構造のための対照として好ましい。該構造は特定の分化した細胞集団とも関連する。
【００５２】
好ましい様態において、前記構造は分化した細胞に関連したＨＩＩ型構造である。
【００５３】
本発明は、さらに式ＬＮ４ｂ：
［ＳＡα３］$_{m}$Ｇａｌβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ４Ｍａｎ
［式中、ＳＡはシアル酸、好ましくはＮｅｕ５Ａｃであり、該構造はＮ－グリカン結合ＩＩ型ＬａｃＮＡｃ構造、Ｇａｌβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ４Ｍａｎ、またはシアリル－ＩＩ型ＬａｃＮＡｃ構造　Ｎｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ４Ｍａｎである］の三分岐末端構造の識別を含む方法に関する。
【００５４】
間葉系幹細胞およびその分化したバリアントのＮ－グリカンの分析
間葉系細胞Ｎ－グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析を図１に示す。パネルａ）は、ＭＳＣからの中性Ｎ－グリカン画分のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量スペクトルであり；パネルｂ）は、ＭＳＣおよびそれらから分化した骨芽細胞からの５０個の最も豊富なグリカンシグナル（ポジティブモード）の相対シグナル強度（全シグナルに対する％）の模式図である。
【００５５】
図１のパネルｃ）は、ＭＳＣからの酸性Ｎ－グリカン画分のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量スペクトルであり；パネルｄ）は、ＭＳＣおよびそれらから分化した骨芽細胞からの５０個の最も豊富なグリカンシグナル（ネガティブモード）の相対シグナル強度（全シグナルに対する％）の模式図である。パネルｂ）およびｄ）における相対強度の比較により、未分化細胞および分化した細胞に特異的な構造の決定が可能となった。
【００５６】
図１はさらにＮ－グリカンの、色付き記号で符号化した構造を示す。記号は基本的にＣｏｎｓｏｒｔｉｕｍ　ｆｏｒ　Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　Ｇｌｙｃｏｍｉｃｓに用いられているものと同様に用いられる。
【００５７】
簡単に述べると、表５および６において、Ｎ－グリカンの還元末端は左側であり、β１－４結合（Ｍａｎβ４，ＧｌｃＮＡｃβ４，Ｇａｌβ４）およびＧｌｃＮＡｃβ２は水平線－で示されており、１－６結合（Ｍａｎα６，ＮｅｕＡｃ／シアル酸α６，ＧｌｃＮＡｃβ６）は上向き線「／」で示されており、ただし上記還元末端ＧｌｃＮＡｃ上のＦｕｃα６はその限りではなく、１－３結合（Ｍａｎα３，Ｆｕｃα３，Ｎｅｕ５Ａｃ／Ｎｅｕ５Ｇｃ／シアル酸α３）は「＼」で示されており、Ｆｕｃα２はＧａｌβの下の垂直線で示されており、またはＨ構造およびＧｌｃＮＡｃフコシル化が同一エピトープ中の代替構造である場合、線は両残基へと描かれる。ＳＰはＬａｃＮＡｃユニットに結合した硫酸またはホスホリルエステルであり、該ＳＰ記号の部分は鏡像として示されている。表５および６は代表的な構造を含むものであり、異性体構造が存在すると考えられ、例えばＮ－グリカンが異なる末端エピトープを有する場合、シアリル、フコシルまたは硫酸部分の２つ以上のＮ－アセチルラクトサミンに対する実際の分岐位置は明示されていないが、異性体バリアントも含まれる。好ましい単糖組成のために記された式は、記号で描かれた構造の確認に用いることができる。同一の構造が図１および２において反時計回りに９０度回転

しており、還元末端は下を向いており、同様なまたは同一のオリゴ糖の結合が表７および８に示されている。

【００５８】

複数の異性体構造を含むグリカン構造は線および分離された単糖または二糖（ＬａｃＮＡｃ）エレメントによって示され、本発明に記載されるようにシアル酸残基（Ｎｅｕ５ＡｃおよびＮｅｕ５Ｇｃ）が好ましくは末端Ｇａｌ残基に、フコースがＧａｌに、またはＧｌｃＮＡｃおよびＬａｃＮＡｃがＧａｌ（他のＬａｃＮＡｃユニット）に結合する。

【００５９】

示された構造は公知の生合成経路、ＮＭＲ－分析およびエキソグリコシダーゼ実験に基づくものである。柱（ｃｏｌｕｍｎ）は各グリカンシグナルの平均存在量（全グリカンシグナルに対する％）を表す。提案されたＮ－グリカン単糖組成がｘ軸上に示される：Ｓ：ＮｅｕＡｃ、Ｈ：　Ｈｅｘ、Ｎ：　ＨｅｘＮＡｃ、Ｆ：　ｄＨｅｘ、Ａｃ：　アセチル、ＳＰ　リン酸エステルの硫酸エステル。質量分析グリカンプロファイルを再整理し、グリカンシグナルを主要なＮ－グリカン構造群にグループ分けした。「その他」の群におけるグリカンのシグナルは、それらの［Ｍ＋Ｎａ］＋（左パネル）または［Ｍ－Ｈ］－イオン（右パネル）のｍ／ｚ比および単糖組成でマークされた。間葉系細胞の単離されたＮ－グリカン画分をプロトンＮＭＲ分光法によって構造的に分析して主要なＮ－グリカンコアおよび主鎖構造の特性を調べ、またα－マンノシダーゼ（タチナタマメ（Ｊａｃｋ　ｂｅａｎｓ））、α１，２－およびα１，３／４－フコシダーゼ（Ｘ．　ｍａｎｉｈｏｔｉｓ／組み替え）、β１，４－ガラクトシダーゼ（Ｓ．　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、ならびにノイラミニダーゼ（Ａ．　ｕｒｅａｆａｃｉｅｎｓ）を用いた特異的エキソグリコシダーゼ消化を行って非還元末端エピトープの特性を調べた。主要なＮ－グリカンシグナルに対して提案された構造を棒グラフ中の模式図で示す。主要なシアル化Ｎ－グリカン構造はＮＭＲ分析において示された、トリマンノシルコアのコアフコシル化の有無に基づくものである。Ｌｅｗｉｓ　ｘ構造は、特異的結合試薬を用いた染色により同一細胞内で検出され得る。

【００６０】

好ましい末端非フコシル化構造

２型Ｎ－アセチルラクトサミン構造

Ｎ－グリカン上の好ましい複合型エピトープ（ｃｏｍｐｌｅｘ　ｔｙｐｅ　ｅｉｐｔｏｐｅ）の例としては、二分岐Ｎ－グリカンであるＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα６、およびＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３／６の、２型Ｎ－アセチルラクトサミン構造エピトープが挙げられる。ガラクトシダーゼ分析は、該構造が二分岐Ｎ－グリカンの両腕上に存在することを明らかにした。

【００６１】

シアリル２型Ｎ－アセチルラクトサミン構造

Ｎ－グリカン上の好ましい複合型エピトープの例としては、二分岐Ｎ－グリカンであるＮｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２、Ｎｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、Ｎｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα、Ｎｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３、Ｎｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα６、およびＮｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３／６の、シアリル２型Ｎ－アセチルラクトサミン構造エピトープが挙げられる。

【００６２】

好ましいフコシル化構造型

本発明は間葉系細胞のＮ－グライコームにおけるフコシル化グリカン構造を明らかにした。好ましい構造型の例としては、特異的フコシダーゼ消化によって明らかになった、α３／４結合フコースを含む末端構造が挙げられる。これらの例としては特にＩＩ型構造Ｌｅｗｉｓ　ｘおよびシアリルＬｅｗｉｓ　ｘ、また、ならびに、Ｌｅｗｉｓ　ａおよびシ

アリルＬｅｗｉｓ　ａが挙げられる。β４および末端α３－シアル化としてのガラクトースの主要な結合型が特異的ガラクトシダーゼ消化により明らかになった。末端構造型を本発明の間葉系細胞からの各種グリカン型から分析した。本発明は、本発明の特定の好ましいＮ－グリカン構造上のＬｅｗｉｓ　ｘ（例えばＤｕｂｅｔ　ｅｔ　ａｌ　ａｂｓｔｒａｃｔ　Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　Ｓｏｃｉｅｔｙ　Ｍｅｅｔｉｎｇ　２００６，　Ｌｏｓ　Ａｎｇｅｌｅｓ）およびシアリルＬｅｗｉｓ　ｘを認識することが知られている特異的抗体に関する。

【００６３】

本発明はさらに、間葉系幹細胞の分析のための、Ｏ－グリカンまたは糖脂質上の構造に特異的な抗体の使用および試験／選択に関する。本発明はさらに、Ｎ－グリカン、Ｏ－グリカンおよび糖脂質から選択される全てまたは少なくとも２種のグリカン型上の末端エピトープを認識する、より低特異性の抗体および／または他の結合剤に関する。本発明はさらに、セルソーティング、細胞操作または細胞培養といった、細胞に対して試薬を結合させるステップを含む方法のための、抗体および／または他の相当する結合試薬の使用に関する。

【００６４】

複合型Ｎ－グリカン上のフコシル化構造

本発明は特に複合型Ｎ－グリカン上にあるフコシル化構造（複合フコシル化構造とも呼ばれる）に関する。複合フコシル化構造中の末端エピトープは主にＮ－グリカンコア構造のＭａｎα残基に結合しており、この結合は二分岐構造中のβ２結合、また好ましくは三分岐構造中のβ４結合でもあり、四分岐およびより多分岐の構造はさらにβ６結合を含む。本発明はさらに、ラクトサミンが互いにβ３および／またはβ６結合で結合してＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２のようなエピトープを形成し、これがさらにシアル化および／またはフコシル化され得るポリラクトサミン構造を有する、非常に大型のＮ－グリカンを明らかにした。

【００６５】

本発明は特に二分岐の、しかし三分岐であってもよい、より大きなＮ－グリカンを明らかにし、また本発明は好ましい一様態において特にフコース残基を有するこれらのＮ－グリカンに関する。

【００６６】

Ｎ－グリカン上の好ましい複合型エピトープの例としては二分岐Ｎ－グリカンであるＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα６、およびＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３／６のＬｅｗｉｓ　ｘ構造エピトープが挙げられる。フコシダーゼ分析により、Ｌｅｗｉｓ　ｘ構造が二分岐Ｎ－グリカンの両腕上に存在することが明らかになった。

【００６７】

Ｎ－グリカン上の好ましい複合型エピトープの例としては、二分岐Ｎ－グリカンである Ｎｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２、Ｎｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、Ｎｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα、Ｎｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３、Ｎｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα６、およびＮｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３／６のシアリルＬｅｗｉｓ　ｘ構造エピトープが挙げられる。

【００６８】

図２は間葉系幹細胞からの中性Ｎ－グリカン画分のα３／４－フコシダーゼ処理を示すものである。この反応は式Ｇａｌβ４／３（Ｆｕｃα３／４）ＧｌｃＮＡｃを有する構造の存在を示す。Ｌｅｗｉｓ　ｘ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ、またはＬｅｗｉｓ　ａ構造は、他の実験により、このタイプの主要な構造であることが明らかになった

。ａ）処理前；ｂ）処理後；のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量スペクトルの一部である。パネルｃに、図１および図２で用いた、単糖残基の色付き符号および単糖残基の１文字記号を示す。

【００６９】

図３は抗－シアリルＬｅｗｉｓ　ｘ抗体（ＧＦ３０７）を用いた免疫蛍光染色を示すものであり、構造Ｎｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃが幹細胞状態と関連した主要な間葉系細胞マーカであることを示す。パネルａ）：骨髄ＭＳＣが効果的に染色されている；パネルｂ）：抗シアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘ抗体は骨髄ＭＳＣから分化した骨芽細胞上には全く、または非常にわずかしか結合しないことを示す。

【００７０】

図４は、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析プロファイリングによって分析した、骨髄間葉系幹細胞（ＢＭ　ＭＳＣ）のフコシル化酸性Ｎ－グリカンを示すものである。好ましい末端構造型はシアリルＬｅｗｉｓ　ｘ、すなわちＮｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃである。

【００７１】

図５はＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析プロファイリングで分析されたＢＭ　ＭＳＣの選択された複合フコシル化中性（上部パネル）および酸性（下部パネル）Ｎ－グリカンを示すものである。ヒト間葉系幹細胞の複合フコシル化（Ｆｕｃ≧２）Ｎグリカンおよび分化におけるそれらの相対的存在量の変化である。この群はＬｅｗｉｓ　ｘ、すなわちＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ、およびシアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘ、すなわちＮｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃという好ましい構造を含む。複合型Ｎ－グリカンのフコシル化の程度は分化の過程で増加し、本発明は、好ましい一様態において、間葉系細胞の分析のためのＮ－グリカン上のフコシル化構造の量の使用に関する。

【００７２】

硫酸化Ｎ－アセチルラクトサミン構造

本発明はさらに、図６に示すように、複合型Ｎ－グリカン上の硫酸化が分化した骨芽細胞型細胞に非常に特徴的であることを明らかにした。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析プロファイリングによって分析されたＢＭ　ＭＳＣの硫酸化Ｎ－グリカンおよびリン酸化Ｎ－グリカンである。ヒト間葉系幹細胞の硫酸化Ｎ－グリカンは分化の過程でその相対的存在量が変化する。

【００７３】

本発明は特に、Ｇａｌの３－および／もしくは６－位に、ならびに／またはＧｌｃＮＡｃの６位に硫酸エステルを有する、末端硫酸化Ｎ－アセチルラクトサミン（ＬａｃＮＡｃ）構造に関する。ＬａｃＮＡｃは好ましくは２型ＬａｃＮＡｃ　Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃであり、より好ましくはＮ－グリカン結合ＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミンである。

【００７４】

末端Ｎ－グリカン構造および完全なＮ－グリカン（ｃｏｍｐｌｅｔｅ　Ｎ－ｇｌｙｃａｎ）の組み合わせ

末端２型Ｎ－アセチルラクトサミンはＮ－グリカンコア構造に結合しており、高特異性試薬もしくは質量分析またはこれらの組み合わせにより、より大きなＮ－グリカン構造の一部として認識され得ると考えられる。質量分析は、構造とシグナルまたは組成との関係が間葉系細胞のための本発明におけるように確立している場合、質量分析シグナルおよび／または対応する単糖組成に基づく特異的末端構造の認識も対象とする。

【００７５】

Ｎ－グリカンの末端エピトープを認識する方法および試薬ならびにこれらの組み合わせは、好ましい一様態において、特異的Ｎ－グリカン構造の識別のためにも用いられる。完全なＮ－グリカン構造を対象とした方法により効果的に幹細胞が分析されると考えられる。

【００７６】

未分化ヒト間葉系幹細胞と関連した構造

表１および３に、ヒト間葉系幹細胞の分化状態と関連した特異的単糖組成を有する特異的構造群を示す。

【００７７】

変化している、または変化し得る好ましいグリカンの好ましい単糖組成に対応する、前記構造の好ましい帰属については、表５および６を参照されたい。該構造は表１ないし４の質量数および単糖組成、ならびにグリコシダーゼ表番号９、および単糖；ならびにグリカンに対して図中で記載された組成および構造に対応する。

【００７８】

グリカンシグナルの個々の特異的相違の分析

測定を行った５つのＭＳＣ系列におけるグリカンシグナル間の相違を、平均グリカンシグナルに対する標準偏差の割合として測定した。ほとんどの相違は：

ａ）多フコシル化（ｍｕｌｔｉｆｕｃｏｓｙｌａｔｅｄ）グリカンにおける、末端Ｎ－アセチルヘキソサミンを有するグリカンにおける、および末端ヘキソースを有するグリカンにおける、中性画分において；

ｂ）多フコシル化グリカンにおける、多シアル化（ｍｕｌｔｉｓｉａｌｙｌａｔｅｄ）グリカンにおける、末端Ｎ－アセチルヘキソサミンを有するグリカンにおける、および硫酸エステルを有するグリカンにおける、酸性分画において；

検出された（表２および４）。結論として、ほとんどの細胞株間の相違は、Ｎ－グリカンのフコシル化、シアル化、硫酸化、および末端Ｎ－アセチルヘキソサミンによるグリカン主鎖形成において存在する。

【００７９】

ｈＭＳＣにおいて、対応する分化した細胞におけるよりも多量に存在する構造

本発明は、ｈＭＳＣにおいて、対応する分化した細胞におけるよりも多量に存在する新規構造を明らかにした。

【００８０】

ｈＭＳＣにおいて豊富な好ましいグリカン群を、いくつかの種類のＮ－グリカンに対応するｈＭＳＣ　１ないしｈＭＳＣ　８の群により表す。該グリカンは、未分化ｈＭＳＣに対する相対的特異性に基づいてｈＭＳＣ　１からｈＭＳＣ　８の順に好ましいものであり、発現の相違を表１および３に示す。該グリカンは、存在する類似した組成および類似した構造に基づいて、複合型（Ｃｏｍｐｌｅｘ　ｔｙｐｅ）Ｎ－グリカン、または高マンノース型Ｎ－グリカン、および他の好ましいグリカン群にグループ分けされる。

【００８１】

複合型グリカン

ｈＭＳＣ　１、ジシアル化二分岐サイズ複合型Ｎ－グリカン

ｈＭＳＣにおける特異的発現が二分岐複合型Ｎ－グリカン構造の特定の群に対して明らかになった。この群はＳ２Ｈ５Ｎ４、Ｓ２Ｈ５Ｎ４Ｆ１、およびＳ２Ｈ５Ｎ４Ｆ２等のジシアル化グリカンを含む。

【００８２】

二分岐複合型グリカンの好ましい構造的亜群は、ＮｅｕＡｃ含有グリカン、およびフコシル化グリカンを含む。

ＮｅｕＡｃ含有グリカン

前記シアル化グリカンは組成：

$S_2H_5N_4F_q$

を共有するＮｅｕＡｃ含有グリカンを含む。

式中、Ｈは好ましくはＧａｌまたはＭａｎであり、ＮはＧｌｃＮＡｃであり、ＳはＮｅｕ５Ａｃであり、ＦはＦｕｃであり、ｑは０ないし３の整数である。

【００８３】

この群は全ての水準のフコシル化を有するジシアル化グリカンを含む。このカテゴリーの好ましい亜群の例としては、フコース残基を何も有しないか、または１個のフコース残基を有する（低フコシル化）、低フコシル化水準（ｌｏｗ　ｆｕｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ

ｌｅｖｅｌ）グリカン、および２または３個のフコース残基を有するグリカンが挙げられる。

【００８４】

好ましい低フコシル化の二分岐構造

本発明の好ましい二分岐構造の例として、式：

［ＮｅｕＡｃα］$_{0-1}$ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα３（［ＮｅｕＡｃα］$_{0-1}$ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα６）ＭａｎβＧＮβ（Ｆｕｃα６）$_{0-1}$ＧＮ

の構造が挙げられる。

【００８５】

ＧａｌβＧｌｃＮＡｃ構造は好ましくはＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ構造（ＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン分岐）である。２型構造の存在は特異的β４結合開裂ガラクトシダーゼ（Ｄ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）により明らかになった。

【００８６】

好ましい一様態において、前記シアル酸はＮｅｕＡｃα３－であり、前記グリカンは分子のＭａｎα３－腕またはＭａｎα６－腕に結合するＮｅｕＡｃを有する。この帰属は特異的シアリダーゼ消化により、およびＭＡＡ等の結合剤により、明らかになった、α３結合シアル酸の存在に基づくものである。

【００８７】

ＮｅｕＡｃα３ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα３／６（［ＮｅｕＡｃα］$_{0-1}$ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα６／３）ＭａｎβＧＮβ（Ｆｕｃα６）$_{0-1}$ＧＮ、より好ましくはＩＩ型構造：

ＮｅｕＡｃα３Ｇａｌβ４ＧＮβ２Ｍａｎα３／６（［ＮｅｕＡｃα］$_{0-1}$Ｇａｌβ４ＧＮβ２Ｍａｎα６／３）ＭａｎβＧＮβ（Ｆｕｃα６）$_{0-1}$ＧＮ。

【００８８】

本発明は従って、好ましい末端エピトープ、ＮｅｕＡｃα３ＧａｌβＧＮ、ＮｅｕＡｃα３ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎ、ＮｅｕＡｃα３ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα３／６が特異的結合剤分子により認識されることを明らかにした。類似構造を対象とした用途において好ましい、より高い特異性は、より大きなエピトープを認識する結合剤を用いて、例えばＮ－グリカンと他のグリカン型とを末端エピトープとの関連で識別することによって得ることができると考えられる。

【００８９】

好ましいジフコシル化およびシアル化構造

好ましいジフコシル化シアル化構造としては、１個のフコースがＮ－グリカンのコアに存在し、

ａ）分子の１個の腕上に１個のフコース、およびシアル酸が他の腕上に存在し（該分子の分岐および該フコースはＬｅｗｉｓ　ｘまたはＨ－構造：

ＧａｌＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧＮβ２Ｍａｎα３／６（ＮｅｕＮＡｃαＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα６／３）ＭａｎβＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ、

および／または

Ｆｕｃα２ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα３／６（ＮｅｕＮＡｃαＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα６／３）ＭａｎβＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ

内に存在し、また、前記シアル酸がα３結合している場合、好ましい分岐構造は好ましくは式：

ＧａｌＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧＮβ２Ｍａｎα６（ＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４ＧＮβ２Ｍａｎα３）ＭａｎβＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ、

および／または

Ｆｕｃα２ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα６（ＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４ＧＮβ２Ｍａｎα３）ＭａｎβＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ。

および／または

ＧａｌＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧＮβ２Ｍａｎα３（ＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４ＧＮβ２Ｍ

ａｎα６）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ、
および／または
Ｆｕｃα２ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα３（ＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４ＧＮβ２Ｍａｎα６）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ
の分子のα３結合またはα６結合した腕上にシアリル－ラクトサミンを有する；
構造などが挙げられる。

【００９０】

シアル酸およびフコースが分子の異なる腕上に存在する前記構造は特徴的な特異的エピトープとして認識され得ると考えられる。

ｂ）フコースおよびＮｅｕＡｃが構造：
ＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ３／４（Ｆｕｃα４／３）ＧＮβ２Ｍａｎα３／６（ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα６／３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ
内の同一の腕上に存在し、より好ましくは該構造はＮ－グリカンシアリル－Ｌｅｗｉｓｘ構造：
ＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧＮβ２Ｍａｎα３／６（ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα６／３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ
である。

【００９１】

好ましいシアル化トリフコシル化構造

好ましいシアル化トリフコシル化構造の例としては、コアフコースおよび末端シアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘもしくはシアリル－Ｌｅｗｉｓ　ａ、好ましくは２型ラクトサミンの比較的高度に豊富な存在のためシアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘ、を有するグリカン、または式：ＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧＮβ２Ｍａｎα３／６（［Ｆｕｃα］ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα６／３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ、および／または
Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧＮβ２Ｍａｎα３／６（ＮｅｕＮＡｃα３／６ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα６／３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ
の二分岐Ｎ－グリカンのいずれかの腕上のＬｅｗｉｓ　ｙが挙げられる。ＮｅｕＡｃは、公知の生合成上の優先傾向およびシアリダーゼ分析のため、好ましくはフコースと同一の腕上にα３－結合している。好ましくは前記構造はＮｅｕＮＡｃα３を有する。

【００９２】

ｈＭＳＣ　５、ジシアル化ハイブリッド型、単分岐（ｍｏｎｏａｎｔｅｎｎａｒｙ）、および他のグリカン

Ｓ２Ｈ５Ｎ３Ｆ２Ｐ１、Ｓ２Ｈ５Ｎ３Ｆ１、Ｓ２Ｈ５Ｎ３、Ｓ２Ｈ６Ｎ３Ｆ１Ｐ１、Ｓ２Ｈ３Ｎ３Ｆ１、Ｓ２Ｈ３Ｎ３、Ｓ２Ｈ４Ｎ３およびＳ２Ｈ４Ｎ３Ｆ１等が挙げられ、これらは他のグリカン群に対して記載された通常のコア構造上の通常と異なる量のシアル酸に対応する。

さらに、特徴的な質量分析シグナルＳ２Ｈ４Ｎ２Ｆ１、Ｓ２Ｈ３Ｎ２Ｆ１、Ｓ２Ｈ２Ｎ２、およびＳ２Ｈ１Ｎ３Ｆ１にも対応する極めて通常と異なるグリカン組成等も挙げられる。

【００９３】

好ましい前記グリカンとしては組成：
$S_2H_pN_3F_qP_s$
を共有する複合フコシル化グリカン等が挙げられる。ここで、Ｈは好ましくはＧａｌまたはＭａｎであり、ＮはＧｌｃＮＡｃであり、ＳはＮｅｕ５Ａｃであり、ＦはＦｕｃであり、Ｐは硫酸残基であり、ｐは１ないし６の整数であり、ｒは２ないし３の整数であり、ｑは０ないし２の整数であり；およびｓは０または１の整数である。前記の通常と異なるシアル酸構造としては天然に知られている多数の有り得るバリアントが含まれる。

【００９４】

ｈＭＳＣ　６、大型のモノシアル化複合型Ｎ－グリカン

Ｓ１Ｈ６Ｎ５、Ｓ１Ｈ６Ｎ５Ｆ１、Ｓ１Ｈ６Ｎ５Ｆ２、Ｓ１Ｈ６Ｎ５Ｆ３、Ｓ１Ｈ６Ｎ

５Ｆ４、Ｓ１Ｈ６Ｎ６Ｆ１、Ｓ１Ｈ７Ｎ６Ｆ１、Ｓ１Ｈ７Ｎ６Ｆ２、Ｓ１Ｈ７Ｎ６Ｆ３、Ｓ１Ｈ７Ｎ６Ｆ４、Ｓ１Ｈ７Ｎ６Ｆ５、Ｓ１Ｈ８Ｎ７、Ｓ１Ｈ８Ｎ７Ｆ１、Ｓ１Ｈ８Ｎ７Ｆ３、およびＳ１Ｈ１１Ｎ１０等が挙げられる。

【００９５】

前記シアル化グリカンとしては組成：

$S_1H_pN_rF_q$

を共有するＮｅｕＡｃ含有グリカン等が挙げられる。ここで、Ｈは好ましくはＧａｌまたはＭａｎであり、ＮはＧｌｃＮＡｃであり、ＳはＮｅｕ５ＡｃでありＦはＦｕｃであり、Ｐは硫酸残基であり、ｐは６ないし１１、好ましくは６ないし８または１１の整数であり、ｒは５ないし１０、好ましくは５ないし７または１０の整数であり、ｑは０ないし４の整数である。

【００９６】

この群のグリカンの通常と異なる特徴は、複数のＮ－アセチルラクトサミンユニットを有するグリカン中に単一のシアル酸残基（ＮｅｕＮＡｃ／Ｎｅｕ５Ａｃ）しか存在しないことである。このモノシアル化は、多分岐構造の分岐特異的シアル化および反復的なＮ－アセチルラクトサミン（限られた量のシアル化部位のみを提供するＬａｃＮＡｃ）の存在を示す。末端シアル酸構造は特異的レクチンにより観察可能である。

【００９７】

この群は、コア組成Ｈ６Ｎ５を有する３個のＬａｃＮＡｃユニット、コア組成Ｈ７Ｎ６を有する４個のＬａｃＮＡｃユニット、コア組成Ｈ８Ｎ７を有する５個のＬａｃＮＡｃユニット、およびコア組成Ｈ１１Ｎ１０を有する８個のＬａｃＮＡｃユニット、を有するＮ－グリカンを含む。この群のグリカンは、多分岐Ｎ－グリカン、およびグリカンを有するポリ－Ｎ－セチルラクトサミン、を含む。８個のＮ－アセチルラクトサミンユニットの存在は、ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン構造を示す。

【００９８】

Ｓ１Ｈ６Ｎ５Ｆ１－４を含むこの群の好ましい構造として、トリ－ＬａｃＮａｃ分子三分岐Ｎ－グリカンおよび伸長（ｅｌｏｎｇａｔｅｄ）二分岐Ｎ－グリカン等が挙げられる。好ましい一様態において、この群は：

ａ）β１，４－結合Ｎ－アセチルラクトサミン分岐を有する三分岐Ｎ－グリカンであって、好ましくは該Ｎ－グリカンのＭａｎα６－腕に結合しているもの（ｍｇａｔ４産物Ｎ－グリカン）

Ｇβ４ＧＮβ２Ｍα３（Ｇβ４ＧＮβ２｛Ｇβ４ＧＮβ４｝Ｍα６）Ｍβ４ＧＮβ４（Ｆα６）ＧＮ、

［式中、ＧはＧａｌであり、ＧｎはＧｌｃＮＡｃであり、ＭはＭａｎであり、ＦはＦｕｃであり、（）および｛｝は構造中の分岐を表し、ＬａｃＮＡｃユニットのうちの１つはＧａｌに結合する末端Ｎｅｕ５Ａｃα３－ユニットを有し、各ＬａｃＮＡｃユニットはＧｌｃＮＡｃに結合したＦｕｃα３残基またはＧａｌに結合したＦｕｃα２残基を有していてよく、これはシアル化されておらず、そのため前記構造は１ないし３個のフコース残基を有していてよい。］

および／または、

ｂ）ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン伸長二分岐複合型Ｎ－グリカンであって、ＬａｃＮＡｃユニットが通常の二分岐構造の末端Ｇａｌに結合するもの。

［Ｇβ４ＧＮβ３］$_{n1}$Ｇβ４ＧＮβ２Ｍα３（［Ｇβ４ＧＮβ３］$_{n2}$Ｇβ４ＧＮβ２Ｍα６）Ｍβ４ＧＮβ４（Ｆα６）ＧＮ、

［式中、ＧはＧａｌであり、ＧｎはＧｌｃＮＡｃであり、ＭはＭａｎであり、ＦはＦｕｃであり、（）は構造中の分岐を表し、［］は伸長ＬａｃＮＡｃユニットを表し、存在していてもしていなくてもよく、ｎ１およびｎ２は個々に０または１いずれかの整数であり、いずれかの非還元末端の末端ＬａｃＮＡｃユニットはＧａｌに結合した末端Ｎｅｕ５Ａｃα３－ユニットを有し、各ＬａｃＮＡｃユニットはＧｌｃＮＡｃユニットに結合したＦｕｃα３残基またはＧａｌに結合したＦｕｃα２残基を有していてよく、これはシアル化さ

れておらず、そのため前記構造は１ないし３個のフコース残基を有していてよい。］
【００９９】
ｈＭＳＣ　７、モノシアル化ハイブリッド型および単分岐Ｎ－グリカン
単分岐グリカンＳ１Ｈ３Ｎ３、Ｓ１Ｈ４Ｎ３、Ｇ１Ｈ４Ｎ３、Ｓ１Ｈ４Ｎ３Ｆ１、Ｓ１Ｈ４Ｎ３Ｆ３、およびＳ１Ｈ４Ｎ３Ｆ１Ｐ１；
ならびにハイブリッド型グリカンＳ１Ｈ５Ｎ３、Ｇ１Ｈ５Ｎ３、Ｓ１Ｈ５Ｎ３Ｆ１、Ｓ１Ｈ６Ｎ３、およびＳ１Ｈ７Ｎ３；
等が挙げられる。
【０１００】
好ましいグリカンとしては、組成：
$S_1H_pN_3F_qP_5$
［式中、Ｈは好ましくはＧａｌまたはＭａｎであり、ＮはＧｌｃＮＡｃであり、ＳはＮｅｕ５ＡｃまたはＮｅｕ５Ｇｃ、好ましくはＮｅｕ５Ａｃであり、ＦはＦｕｃであり、Ｐは硫酸残基（表５および６のＳＰ）であり；
ｐは３ないし７の整数であり、ｑは０、１または３の整数であり；およびｓは０または１の整数である］
を共有するハイブリッド型および単分岐グリカン等が挙げられる。
【０１０１】
本発明は単一のＬａｃＮＡｃ、好ましくはＩＩ型ＬａｃＮＡｃユニットのみを有する特徴的なモノシアル化構造を明らかにした。生合成上の理由から、該シアリル－ｌａｃＮＡｃユニットは好ましくはＮ－グリカンコア中のＭａｎα３－構造に結合する。従って、このデータは新規の好ましいＩＩ型シアリルＮ－アセチルラクトサミン構造エピトープＳＡα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３、より好ましくはＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３を明らかにし、ここでＳＡはＮｅｕ５ＡｃまたはＮｅｕ５Ｇｃ、より好ましくはＮｅｕ５Ａｃである。
【０１０２】
Ｈ３－７Ｎ３（Ｆ）グリカンの好ましいコア構造は：
$Gal\beta4GlcNAc\beta2Man\alpha3(\{Man\alpha\}_pMan\alpha6)Man\beta4GlcNAc\beta4(Fuc\alpha6)_qGlcNAc$
であって、ここでｐは０ないし３の整数であり、α３、および／またはａ６および／またはａ２－結合Ｍａｎ残基の存在を表し、単分岐（ｐは０）／ハイブリッド型（ｐは１ないし３）Ｎ－グリカン中に存在し、ｑは０または１の整数であり、好ましくはさらなるフコースはＧａｌに結合したＦｕｃα２および／またはＧｌｃＮＡｃに結合したＦｕｃα３であり；ならびに硫酸エステルはＧａｌまたはＧｌｃＮＡｃに、シアル酸はＧａｌに、より好ましくはＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン分岐を有する、本発明に記載されるＬａｃＮＡｃユニット上で結合する。
【０１０３】
ｈＭＳＣ８、複合フコシル化シアル化グリカン
Ｓ１Ｈ７Ｎ６Ｆ３、Ｓ２Ｈ７Ｎ６Ｆ３、Ｓ３Ｈ７Ｎ６Ｆ３、Ｓ１Ｈ７Ｎ６Ｆ４、Ｓ２Ｈ７Ｎ６Ｆ４、Ｓ３Ｈ７Ｎ６Ｆ４、Ｓ１Ｈ７Ｎ６Ｆ５、Ｓ１Ｈ６Ｎ５Ｆ２、Ｓ１Ｈ６Ｎ５Ｆ３、Ｓ１Ｈ６Ｎ５Ｆ４、Ｓ１Ｈ５Ｎ４Ｆ２、Ｓ２Ｈ５Ｎ４Ｆ２、Ｓ１Ｈ４Ｎ３Ｆ３、Ｓ２Ｈ３Ｎ５Ｆ２、Ｓ１Ｈ５Ｎ４Ｆ４、Ｓ２Ｈ３Ｎ４Ｆ２、Ｓ１Ｈ４Ｎ４Ｆ２、Ｓ１Ｈ８Ｎ７Ｆ３、Ｓ１Ｈ７Ｎ６Ｆ２、Ｓ２Ｈ５Ｎ３Ｆ２Ｐ１、Ｈ５Ｎ３Ｆ２Ｐ１、およびＨ３Ｎ６Ｆ３Ｐ１等が挙げられる。
【０１０４】
Ｎ－グリカンの好ましい群として複数のフコース残基を有する構造が挙げられる。該構造は本発明に記載のＬａｃＮＡｃに結合する少なくとも１個のフコース残基を有する。コア構造は他の群に対して記載されており、フコース残基は本発明に記載のＬａｃＮＡｃユニットに結合する。
【０１０５】

好ましいグリカンとして、組成：
$S_nH_pN_rF_qP_s$
［式中、Ｈは好ましくはＧａｌまたはＭａｎであり、ＮはＧｌｃＮＡｃであり、ＳはＮｅｕ５Ａｃであり、ＦはＦｕｃであり、Ｐは硫酸残基（表５および６のＳＰ）であり；
ｎは０ないし２の整数であり；ｐは３ないし８の整数であり、ｒは３ないし７の整数であり、ｑは２ないし４の整数であり；およびｓは０または１の整数である］
を共有する複合フコシル化グリカン等が挙げられる。

【０１０６】

高マンノース型グリカン
ｈＭＳＣ　２、大型高マンノース型グリカン

本発明は非フコシル化構造Ｈ６Ｎ２、Ｈ７Ｎ２、Ｈ８Ｎ２、およびＨ９Ｎ２；ならびにＨ６Ｎ２Ｆ１等のフコシル化構造；などの大型高マンノース型Ｎ－グリカンの群に関する。

【０１０７】

好ましい高マンノース型グリカンは式ＬＨＭ：
$[M\alpha2]_{n1}M\alpha3\{[M\alpha2]_{n3}M\alpha6\}M\alpha6\{[M\alpha2]_{n6}[M\alpha2]_{n7}M\alpha3\}M\beta4GN\beta4[Fuc\alpha6]_{n8}GNyR_2$
［式中、ｎ１、ｎ３、ｎ６、およびｎ７ならびにｎ８はそれぞれ独立に０または１であり；ｎ８が１である場合は前記グリカンは６個のマンノース残基を有し、好ましくはｎ６およびｎ３は０であり、ｎ１またはｎ７のいずれかは０であり；
ｙはアノマー結合構造αおよび／もしくはβまたは誘導体化アノマー炭素からの結合であり；
R_2は還元末端水酸基、化学的還元末端誘導体、または、タンパク質由来のアミノ酸および／もしくはペプチドを含むアスパラギンＮ－グリコシド等の天然アスパラギンＮ－グリコシド誘導体であり；
［］はｎ１、ｎ３、ｎ６、ｎ７の値によって存在するかまたは存在しないかのいずれかである決定基を表し；そして
｛｝は前記構造中の分岐を表し；
ＭはＤ－Ｍａｎであり、ＧＮはＮ－アセチル－Ｄ－グルコサミンであり、ｙはアノマー構造または結合型、好ましくはベータからＡｓｎである］
によるものである。

【０１０８】

この群の好ましい非フコシル化構造としては：
Ｍａｎα２Ｍａｎα６（Ｍａｎα２Ｍａｎα３）Ｍａｎα６（Ｍａｎα２Ｍａｎα２Ｍａｎα３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４ＧＮ、
Ｍａｎα２Ｍａｎα６（［Ｍａｎα２］$_{n3}$Ｍａｎα３）Ｍａｎα６（［Ｍａｎα２］$_{n6}$Ｍａｎα２Ｍａｎα３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４ＧＮ、
Ｍａｎα２Ｍａｎα６（Ｍａｎα３）Ｍａｎα６（Ｍａｎα２Ｍａｎα２Ｍａｎα３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４ＧＮ
Ｍａｎα２Ｍａｎα６（Ｍａｎα２Ｍａｎα３）Ｍａｎα６（Ｍａｎα２Ｍａｎα３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４ＧＮ
Ｍａｎα２Ｍａｎα６（Ｍａｎα３）Ｍａｎα６（Ｍａｎα２Ｍａｎα３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４ＧＮ
等が挙げられる。

【０１０９】

好ましいフコシル化構造としては：
［Ｍａｎα２］$_{n1}$Ｍａｎα６（Ｍａｎα３）Ｍａｎα６（［Ｍａｎα２］$_{n7}$Ｍａｎα３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ、
Ｍａｎα２Ｍａｎα６（Ｍａｎα３）Ｍａｎα６（Ｍａｎα３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ、

Ｍａｎα６（Ｍａｎα３）Ｍａｎα６（Ｍａｎα２Ｍａｎα３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ、
等が挙げられる。
【０１１０】
ｈＭＳＣ　４、グルコシル化高マンノース型Ｎ－グリカン
　グルコシル化高マンノース型Ｎ－グリカンの好ましい群としてＨ１０Ｎ２、Ｈ１１Ｎ２およびＨ１２Ｎ２等が挙げられる。
【０１１１】
　グルコシル化高マンノース型グリカンのこの群は高マンノースグリカンに対して連続的である。この群のグリカンは細胞のＥＲにおける特性の制御に関与している。グルコシル化高マンノースグリカンの存在は細胞におけるタンパク質合成活性およびフォールディング効率に対応すると考えられている。末端グルコース残基はこの群のグリカンの特徴的構造であり、好ましい一様態において本発明は特異的結合物質による末端Ｇｌｃ残基の識別に関する。さらに、高マンノースグリカンを識別する試薬は、特に分子の非グルコシル化腕上の末端Ｍａｎα２－構造に対して認識が行われる場合に、この構造も認識すると考えられる。
【０１１２】
　本発明は、分化した細胞、特に骨原性に分化した骨髄由来幹細胞におけるよりも、間葉系幹細胞において、実質的により多くのこの型のグリカンを明らかにした。
【０１１３】
　好ましい構造は式：
Ｍα２Ｍα６（Ｍα２Ｍα３）Ｍα６（［Ｇα２］$_{n1}$［Ｇα３］$_{n2}$［Ｇα３］$_{n3}$Ｍα２Ｍα２Ｍα３）Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮ
［式中、ｎ１、ｎ２およびｎ３は独立に０または１のいずれかであり；
Ｍはマンノース、Ｇはグルコース、ＧＮはＮ－アセチルグルコサミン残基である］
のものである。
【０１１４】
ｈＭＳＣ　３、可溶性オリゴマンノースグリカン
　Ｈ２Ｎ１、Ｈ３Ｎ１、Ｈ４Ｎ１、Ｈ５Ｎ１、Ｈ６Ｎ１、Ｈ７Ｎ１、Ｈ８Ｎ１、およびＨ９Ｎ１等が挙げられる。
【０１１５】
分化した間葉系細胞と関連した構造および組成
　本発明は、対応する未分化ｈＭＳＣと比べ、分化した間葉系幹細胞中により多くの量で存在する新規構造を明らかにした。
【０１１６】
　好ましいグリカン群はＮ－グリカンのいくつかの型に相当するＤｉｆｆ　１からＤｉｆｆ　７群で表される。該グリカンは、未分化ｈＭＳＣに対する相対的特異性に基づいてＤｉｆｆ　１からＤｉｆｆ　７の順に好ましいものであり、発現の相違を表１に示す。
【０１１７】
Ｄｉｆｆ　１、硫酸化グリカン
　二分岐サイズ複合型グリカンＨ５Ｎ４Ｐ１、Ｈ５Ｎ４Ｆ１Ｐ１、Ｓ２Ｈ５Ｎ４Ｆ１Ｐ１、Ｈ５Ｎ４Ｆ２Ｐ１、Ｈ５Ｎ４Ｆ３Ｐ１、Ｓ１Ｈ５Ｎ４Ｐ１、Ｓ１Ｈ５Ｎ４Ｆ１Ｐ１；
大型複合型グリカンＨ６Ｎ５Ｆ１Ｐ１、Ｓ２Ｈ６Ｎ５Ｆ１Ｐ１、Ｈ７Ｎ６Ｆ１Ｐ１、Ｈ６Ｎ５Ｆ３Ｐ１、およびＳ１Ｈ６Ｎ５Ｆ１Ｐ１；
末端Ｈｅｘ含有グリカンＨ６Ｎ４Ｆ３Ｐ１、Ｇ１Ｈ６Ｎ４Ｐ１、およびＨ７Ｎ４Ｐ１；
末端ＨｅｘＮＡｃ含有グリカンＳ２Ｈ４Ｎ５Ｆ２Ｐ２、Ｈ４Ｎ４Ｆ１Ｐ１、Ｈ３Ｎ６Ｆ１Ｐ１、Ｈ４Ｎ５Ｆ２Ｐ１、Ｈ３Ｎ５Ｆ１Ｐ１、Ｈ３Ｎ４Ｐ１、Ｈ３Ｎ４Ｆ１Ｐ１、およびＨ４Ｎ４Ｐ１；
ならびに、ハイブリッド型または単分岐グリカンＳ２Ｈ４Ｎ３Ｆ１Ｐ１、Ｈ４Ｎ３Ｆ１Ｐ１、Ｈ４Ｎ３Ｐ１、Ｈ５Ｎ３Ｆ１Ｐ１、Ｈ４Ｎ３Ｆ２Ｐ１、Ｓ１Ｈ３Ｎ３Ｆ１Ｐ２、Ｈ３

Ｎ３Ｆ１Ｐ１、Ｈ３Ｎ３Ｐ１、およびＳ２Ｈ５Ｎ３Ｐ２；
ならびに、Ｈ１０Ｎ２Ｆ１Ｐ２等の高マンノース型グリカンであって、好ましくはリン酸化されているもの；
等が挙げられる。
【０１１８】
好ましい硫酸化グリカンはＮ－グリカンコアおよび好ましいＮ－アセチルラクトサミン型ユニットまたは硫酸化されているユニットを有し、ＧｌｃＮＡｃβまたはＧａｌＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃ等の末端ＨｅｘＮＡｃユニットの場合は、これらはさらに硫酸化されていてもよい。Ｎ－グリカンを有するラクトサミン／ＧｌｃＮＡｃ上の硫酸残基の存在を高分解能質量分析および／または特異的ホスファターゼ酵素消化により分析した。前記グリカンはさらにＮｅｕ５Ａｃおよびフコース残基を有していてもよい。
【０１１９】
前記硫酸化グリカンとしては、組成：
$S_nH_pN_rF_qP_s$
［式中、Ｈは好ましくはＧａｌまたはＭａｎであり、ＮはＧｌｃＮＡｃであり、ＳはＮｅｕ５Ａｃであり、ＦはＦｕｃであり、Ｐは硫酸残基（表５および６のＳＰ）であり；
ｎは０ないし２の整数であり；ｐは３ないし７の整数であり、ｒは３ないし６の整数であり、ｑは０、１または３の整数であり；ｓは１または２の整数である］
を共有する複合型および関連するグリカン等が挙げられる。
【０１２０】
硫酸化グリカン大型複合型グリカンＨ６Ｎ５Ｆ１Ｐ１、Ｓ２Ｈ６Ｎ５Ｆ１Ｐ１、Ｈ７Ｎ６Ｆ１Ｐ１、Ｈ６Ｎ５Ｆ３Ｐ１、およびＳ１Ｈ６Ｎ５Ｆ１Ｐ１としては、組成：
$S_nH_pN_rF_qP_1$
［式中、Ｈは好ましくはＧａｌまたはＭａｎであり、ＮはＧｌｃＮＡｃであり、ＳはＮｅｕ５Ａｃであり、ＦはＦｕｃであり、Ｐは硫酸残基（表５および６のＳＰ）であり；
ｎは０ないし２の整数であり；ｐは６ないし７の整数であり、ｒは５ないし６の整数であり、ｑは１ないし３の整数である］
を共有する複合型および関連するグリカン等が挙げられる。コア組成Ｈ６Ｎ５含有グリカンを有する好ましいコア構造はｈＭＳＣ　６に対して記載され、Ｈ７Ｎ６の組成を有するグリカンは４個のＬａｃＮＡｃユニットを四分岐および／またはポリ－ｌａｃＮＡｃ含有構造として有する。ジアシアル化（ｄｉａｓｉａｌｙｌａｔｅ）構造は２個のＮｅｕ５Ａｃユニットを末端ＬａｃＮＡｃユニットに有し、１個のフコース残基は好ましい一様態においてＮ－グリカンのコアに結合する。
【０１２１】
好ましい硫酸化二分岐Ｎ－グリカンとしては組成：
$S_nH_5N_4F_qP_1$
［式中、Ｈは好ましくはＧａｌまたはＭａｎであり、ＮはＧｌｃＮＡｃであり、ＳはＮｅｕ５Ａｃであり、およびＦはＦｕｃであり；
ｎは０からまたは２の整数であり、ｑは０ないし３の整数である］
を共有するグリカン等が挙げられる。
【０１２２】
好ましい構造はｈＭＳＣ群中の二分岐Ｎ－グリカンに対して記載される通りであるが、前記グリカンはさらに、末端２型ＬａｃＮＡｃユニットを有する好ましい硫酸エステル末端Ｎ－グリカン構造に対して記載されるように、Ｎ－アセチルラクトサミンユニットに結合する硫酸基を有する。ジシアル化構造の存在は、前記グリカンがＧｌｃＮＡｃおよび／またはＧａｌ残基の６位に結合する硫酸残基の少なくとも一部を有することを示す。
【０１２３】
前記グリカンの好ましいコア構造を表および他の好ましい群に示した。本発明はさらに硫酸化ＬａｃＮＡｃまたはＧｌｃＮＡｃを有する次の好ましいコア構造群に関する。
【０１２４】

好ましいコアＨ４Ｈ５構造、Ｈ４Ｎ５およびＨ４Ｎ５Ｆ２としては、ＬａｃｄｉＮＡｃを有する次の好ましい構造：
［Ｆｕｃα］$_{n3}$｛Ｇａｌ［ＮＡｃ］$_{n1}$βＧＮβ２Ｍａｎα３（Ｇａｌ［ＮＡｃ］$_{n2}$βＧＮβ２Ｍａｎα６）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）$_{n2}$ＧＮ
［式中、ｎ１およびｎ２は０または１のいずれかであり、ただしｎ１またはｎ２のいずれかが０であって他方が１であり、ｎ３は０または１のいずれかである］
等が挙げられる。フコース残基は好ましくはＬｅｗｉｓ　ｘまたはフコシル化ＬａｃｄｉＮＡｃ構造ＧａｌＮＡｃβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃを形成する。

【０１２５】

ハイブリッド型Ｎ－グリカンの好ましいコア構造は、式：
［Ｇａｌβ］$_{n1}$ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３（Ｍａｎα３／６［Ｍａｎα６／３］$_{n3}$Ｍａｎα６）Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４（Ｆｕｃα６）$_{n2}$ＧｌｃＮＡｃ
［式中、ｎ１およびｎ２およびｎ３は０または１のいずれかであり、ただし５個のヘキソース（Ｇａｌ／Ｍａｎ）ユニットが存在する］
の、Ｈ５Ｎ３を含んでいる。

【０１２６】

好ましいＨ５Ｎ３含有構造は式：
ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３（Ｍａｎα３［Ｍａｎα６］Ｍａｎα６）Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４（Ｆｕｃα６）$_{n2}$ＧｌｃＮＡｃ
［式中、ｎ２は０または１のいずれかである］
のコア構造を有する。

【０１２７】

Ｈ３Ｎ３Ｆ１のコア構造組成を有する末端ＨｅｘＮＡｃ単分岐Ｎ－グリカン；
好ましくはコア構造：
（Ｇａｌβ４）$_{0-1}$ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３（［Ｍａｎα６］$_{0-1}$）Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４（Ｆｕｃα６）ＧｌｃＮＡｃ
［より好ましくはＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン分岐を有する（Ｍａｎα６分岐は有しない）；式中、ガラクトース残基はβ１，４結合する］
を含む。

【０１２８】

Ｄｉｆｆ　２、低マンノース型Ｎ－グリカン
非フコシル化グリカンＨ１Ｎ２、Ｈ３Ｎ２、およびＨ４Ｎ２；
ならびに、フコシル化グリカンＨ２Ｎ２Ｆ１、Ｈ３Ｎ２Ｆ１、およびＨ４Ｎ２Ｆ１；
等が挙げられる。

【０１２９】

Ｄｉｆｆ　３、小型高マンノース型（Ｍａｎ５）Ｎ－グリカン
非フコシル化Ｈ５Ｎ２およびフコシル化Ｈ５Ｎ２Ｆ１等が挙げられる。

【０１３０】

Ｄｉｆｆ　４、中性ハイブリッド型および単分岐Ｎ－グリカン
単分岐グリカンＨ２Ｎ３、Ｈ２Ｎ３Ｆ１、Ｈ３Ｎ３、Ｈ３Ｎ３Ｆ１、Ｈ３Ｎ３Ｆ２；
ハイブリッド型および／または単分岐グリカンＨ４Ｎ３およびＨ４Ｎ３Ｆ１；ならびにハイブリッド型グリカンＨ４Ｎ３Ｆ２、Ｈ５Ｎ３、Ｈ５Ｎ３Ｆ１、Ｈ５Ｎ３Ｆ２、Ｈ６Ｎ３、Ｈ６Ｎ３Ｆ１およびＨ７Ｎ３
等が挙げられる。

【０１３１】

Ｄｉｆｆ　５、中性複合型Ｎ－グリカン
二分岐サイズ複合型グリカンＨ５Ｎ４、Ｈ５Ｎ４Ｆ１、Ｈ５Ｎ４Ｆ２、およびＨ５Ｎ４Ｆ３；
大型複合型グリカンＨ６Ｎ５、Ｈ６Ｎ５Ｆ１、Ｈ６Ｎ５Ｆ２、Ｈ６Ｎ５Ｆ３、Ｈ６Ｎ５Ｆ４、Ｈ７Ｎ６、Ｈ７Ｎ６Ｆ１、およびＨ８Ｎ７；

末端ＨｅｘＮＡｃ含有グリカンＨ５Ｎ５、Ｈ５Ｎ５Ｆ１、Ｈ５Ｎ５Ｆ２、Ｈ５Ｎ５Ｆ３、Ｈ６Ｎ６、Ｈ３Ｎ４、Ｈ４Ｎ４、Ｈ４Ｎ４Ｆ１、Ｈ４Ｎ４Ｆ２、Ｈ４Ｎ５、Ｈ４Ｎ５Ｆ２、およびＨ３Ｎ６Ｆ１；
末端Ｈｅｘ含有グリカンＨ６Ｎ４、Ｈ６Ｎ４Ｆ１、Ｈ７Ｎ４、Ｈ６Ｎ４Ｆ２、Ｈ７Ｎ４Ｆ１、およびＨ８Ｎ４；
等が挙げられる。

【０１３２】

前記グリカンの好ましいコア構造が、他のグリカン群との関連において、ならびに以下のＨ４Ｎ５（Ｄｉｆｆ　１）およびＨ５Ｎ５構造に対して、記載された。

【０１３３】

Ｄｉｆｆ　６を表１に示す。

【０１３４】

コア組成Ｈ＝Ｎ＝５型を有するグリカンは好ましくはＨ５Ｎ５Ｆ１、Ｈ５Ｎ５、Ｈ５Ｎ５Ｆ３等の末端ＨｅｘＮＡｃ含有Ｎ－グリカンである。二分岐Ｎ－グリカンコア構造および末端ＨｅｘＮＡｃ、特にＮ－グリカンのコアに結合する末端ＧｌｃＮＡｃグリカンを有する。

【０１３５】

Ｄｉｆｆ　７、モノシアル化二分岐サイズ複合型Ｎ－グリカン
Ｇ１Ｈ５Ｎ４、Ｓ１Ｈ５Ｎ４Ｐ１、Ｓ１Ｈ５Ｎ４Ｆ１、Ｇ１Ｈ５Ｎ４Ｆ１、Ｓ１Ｈ５Ｎ４Ｆ１Ｐ１、およびＳ１Ｈ５Ｎ４Ｆ３
$S_1H_5N_4F_qP_S$
［式中、Ｈは好ましくはＧａｌまたはＭａｎであり、ＮはＧｌｃＮＡｃであり、ＳはＮｅｕ５ＡｃまたはＮｅｕ５Ｇｃ、好ましくはＮｅｕ５Ａｃであり、ＦはＦｕｃであり、Ｐは硫酸残基であり；
ｑは０ないし３の整数、好ましくは０、１または３であり、ｓは０または１の整数である］
等が挙げられる。前記二分岐Ｎ－グリカンの好ましいコア構造は本発明の他の群において記載される。該グリカンは１個の好ましいシアリル－ＬａｃＮＡｃユニットおよび１個のＬａｃＮＡｃユニットを有し、これがさらに硫酸化および／またはフコシル化されていてもよい。

【０１３６】

好ましいＮ－グリカン構造型
本発明は、分化により、および／または個々の細胞株間で、変化するＮ－グリカンの共通コア構造を有するＮ－グリカンを明らかにした。該構造の帰属については表５および６を参照されたい。該構造は表１ないし４の質量数および単糖組成、グリコシダーゼ表番号９、ならびに、分化と関連して変化するグリカンについて図中で記載された単糖組成および構造にも対応する。グリカン構造に対応する単糖組成はＧａｌおよびＭａｎをＨｅｘ（または短くはＨ）として示すことにより得られ、Ｈｅｘユニットの数はＭａｎおよびＧａｌ残基の量の合計であり；およびＧｌｃＮＡｃ（またはＧａｌＮＡｃ）残基はＨｅｘＮＡｃまたはＮとして示し、フコース残基（Ｆ）、シアル酸残基（Ｓ／Ｎｅｕ５ＡｃまたはＧ／Ｎｅｕ５Ｇｃ）の数を示し、ＡｃはＯ－アセチル残基を示し、可能な硫酸またはリン酸残基は類似した分子量を共有するＳＰまたはＰの後の数で示す。

【０１３７】

間葉系幹細胞のＮ－グリカンは、式ＣＧＮ：
$[Man\alpha 3]_{n1}(Man\alpha 6)_{n2}Man\beta 4GlcNAc\beta 4(Fuc\alpha 6)_{n3}GlcNAcxR$
［式中、ｎ１、ｎ２およびｎ３は０または１の整数であり、独立に残基の存在または非存在を示し；
式中、非還元末端の末端Ｍａｎα３／Ｍａｎα６残基は、複合型、特に二分岐構造に、またはマンノース型（高Ｍａｎおよび／または低Ｍａｎ）に、またはハイブリッド型構造（

幹細胞の状態の分析および／または幹細胞の操作のためのもの）に、伸長してよく、式中、ｘＲはタンパク質もしくはペプチドに結合したＮ－グリカンの還元末端構造、例えばβＡｓｎもしくはβＡｓｎ－ペプチドもしくはβＡｓｎ－タンパク質、またはＮ－グリカンの遊離還元末端もしくは分析のために産生された還元末端の化学的誘導体を示す］
のＮ－結合グリカンのコア構造中内にＭａｎβ４ＧｌｃＮＡｃ構造を有するコア構造を有する。

【０１３８】

好ましいマンノース型グリカンは式：

式Ｍ２：

［Ｍα２］$_{n1}$［Ｍα３］$_{n2}${［Ｍα２］$_{n3}$［Ｍα６）］$_{n4}$}［Ｍα６］$_{n5}${［Ｍα２］$_{n6}$［Ｍα２］$_{n7}$［Ｍα３］$_{n8}$}Ｍβ４ＧＮβ４［{Ｆｕｃα６}］$_{m}$ＧＮｙＲ$_{2}$

［式中、ｎ１、ｎ２、ｎ３、ｎ４、ｎ５、ｎ６、ｎ７、ｎ８、およびｍは独立に０または１のいずれかであり；ただしｎ２が０である場合、ｎ１も０であり；ｎ４が０である場合、ｎ３も０であり；ｎ５が０である場合、ｎ１、ｎ２、ｎ３およびｎ４も０であり；ｎ７が０である場合、ｎ６も０であり；ｎ８が０である場合、ｎ６およびｎ７も０であり；ｙはアノマー結合構造αおよび／もしくはβまたは誘導体化アノマー炭素からの結合であり、そして

Ｒ$_{2}$は還元末端水酸基、化学的還元末端誘導体、または、タンパク質由来のアスパラギンＮ－グリコシドアミノ酸および／もしくはペプチドを含むアスパラギンＮ－グリコシド等の天然アスパラギンＮ－グリコシド誘導体であり；

［］はｎ１、ｎ２、ｎ３、ｎ４、ｎ５、ｎ６、ｎ７、ｎ８、およびｍの値によって存在するかまたは存在しないかのいずれかである決定基を表し；そして

{} は前記構造中の分岐を表し；

ＭはＤ－Ｍａｎであり、ＧＮはＮ－アセチル－Ｄ－グルコサミンであり、ＦｕｃはＬ－フコースであり、そして前記構造は任意に高マンノース構造であり、これはさらにグルコース残基またはｎ６で表されるマンノース残基に結合する残基で置換される］
のものである。

【０１３９】

上記のいくつかの好ましい低Ｍａｎグリカンは単一の式：

［Ｍα３］$_{n2}${［Ｍα６）］$_{n4}$}［Ｍα６］$_{n5}${［Ｍα３］$_{n8}$}Ｍβ４ＧＮβ４［{Ｆｕｃα６}］$_{m}$ＧＮｙＲ$_{2}$

［式中、ｎ２、ｎ４、ｎ５、ｎ８、およびｍは独立に０または１のいずれかであり；ただしｎ５が０である場合、ｎ２およびｎ４も０であり；ｎ２、ｎ４、ｎ５、およびｎ８の合計は（ｍ＋３）以下であり；［］はｎ２、ｎ４、ｎ５、ｎ８、およびｍの値によって存在するかまたは存在しないかのいずれかである決定基を表し；そして

{} は前記構造中の分岐を表し；

ｙおよびＲ２は上記に示したとおりである］
で表すことができる。

【０１４０】

好ましい非フコシル化低マンノースグリカンは式：

［Ｍα３］$_{n2}$（［Ｍα６）］$_{n4}$）［Ｍα６］$_{n5}${［Ｍα３］$_{n8}$}Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_{2}$

［式中、ｎ２、ｎ４、ｎ５、ｎ８、およびｍは独立に０または１のいずれかであり、ただしｎ５が０である場合、ｎ２およびｎ４も０であり、好ましくはｎ２またはｎ４のいずれかは０であり；

［］はｎ２、ｎ４、ｎ５、ｎ８の値によって存在するかまたは存在しないかのいずれかである決定基を表し、

{} および（）は前記構造中の分岐を表し、

ｙおよびＲ２は上記に示したとおりである］

のものである。
【０１４１】
非フコシル化低マンノースグリカンの好ましい個々の構造
特別な小型構造
小型非フコシル化低マンノース構造は公知のＮ－結合グリカンの中で特に通常と異なるものであり、本発明の細胞の分離にとって有用な特徴的グリカン群である。これらとしては：
Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_2$
Ｍα６Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_2$
Ｍα３Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_2$　および
Ｍα６｛Ｍα３｝Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_2$
等が挙げられる。Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_2$三糖エピトープは、その単マンノース誘導体Ｍα６Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_2$および／またはＭα３Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_2$とともに、単独で好ましい共通構造であり、これは、これらが本発明のグライコーム中に共通に存在する特徴的な構造であるためである。本発明は特に１または複数種の小型非フコシル化低マンノース構造を有するグライコームに関する。四糖は、特定の様態において、好ましい末端認識エレメントとして、α結合の、好ましくはα３／６結合の、マンノースに対する特異的認識のために好ましい。
【０１４２】
特別な大型構造
本発明はさらに、公知のＮ－結合グリカンの中でも通常と異なっており、本発明の好ましい細胞の間で特別で特徴的な発現特性を有する、大型非フコシル化低マンノース構造を明らかにした。好ましい大型構造としては：
［Ｍα３］$_{n2}$（［Ｍα６］$_{n4}$）Ｍα６｛Ｍα３｝Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_2$、
より具体的には、
Ｍα６Ｍα６｛Ｍα３｝Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_2$
Ｍα３Ｍα６｛Ｍα３｝Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_2$　および
Ｍα３（Ｍα６）Ｍα６｛Ｍα３｝Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_2$
等が挙げられる。六糖エピトープは、好ましい細胞型における希で特徴的な構造として、また好ましい末端エピトープを有する構造として、特定の様態において好ましい。七糖も、本発明の細胞の分析にとって有用な、好ましく通常とは異なる末端エピトープＭα３（Ｍα６）Ｍαを有する構造として好ましい。
【０１４３】
好ましいフコシル化低マンノースグリカンは式：
［Ｍα３］$_{n2}$｛［Ｍα６］$_{n4}$｝［Ｍα６］$_{n5}$｛［Ｍα３］$_{n8}$｝Ｍβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮｙＲ$_2$
［式中、ｎ２、ｎ４、ｎ５、ｎ８、およびｍは独立に０または１のいずれかであり、ｎ５が０である場合、ｎ２およびｎ４も０であり、
［］はｎ２、ｎ４、ｎ５、ｎ８、およびｍの値によって存在するかまたは存在しないかのいずれかである決定基を表し；
｛｝および（）は前記構造中の分岐を表す］
に由来する。
【０１４４】
フコシル化低マンノースグリカンの好ましい個々の構造
小型フコシル化低マンノース構造は公知のＮ－結合グリカンの中で特に通常と異なるものであり、本発明の細胞の分離にとって有用な特徴的グリカン群を形成する。これらとしては：
Ｍβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮｙＲ$_2$
Ｍα６Ｍβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮｙＲ$_2$
Ｍα３Ｍβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮｙＲ$_2$　および

Ｍα６｛Ｍα３｝Ｍβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮｙＲ$_2$
等が挙げられる。Ｍβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮｙＲ$_2$四糖エピトープは、その単マンノース誘導体Ｍα６Ｍβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮｙＲ$_2$および／またはＭα３Ｍβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮｙＲ$_2$とともに、単独で好ましい共通構造であり、これは、これらが本発明のグライコーム中に共通に存在する特徴的な構造であるためである。本発明は特に１または複数種の小型フコシル化低マンノース構造を有するグライコームに関する。四糖は、特定の様態において、好ましい末端識別エレメントとして、α－結合の、好ましくはα３／６－結合の、マンノースに対する特異的認識のために好ましい。

【０１４５】

特別な大型構造

本発明はさらに、公知のＮ－結合グリカンの中でも通常と異なっており、本発明の好ましい細胞の間で特別で特徴的な発現特性を有する、大型フコシル化低マンノース構造を明らかにした。好ましい大型構造としては：
［Ｍα３］$_{n2}$（［Ｍα６］$_{n4}$）Ｍα６｛Ｍα３｝Ｍβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮｙＲ$_2$、
より具体的には、
Ｍα６Ｍα６｛Ｍα３｝Ｍβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮｙＲ$_2$
Ｍα３Ｍα６｛Ｍα３｝Ｍβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮｙＲ$_2$　および
Ｍα３（Ｍα６）Ｍα６｛Ｍα３｝Ｍβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮｙＲ$_2$
等が挙げられる。七糖エピトープは、好ましい細胞型における希で特徴的な構造として、また好ましい末端エピトープを有する構造として、特定の様態において好ましい。八糖も、本発明の細胞の分析にとって有用な、好ましく通常とは異なる末端エピトープＭα３（Ｍα６）Ｍαを有する構造として好ましい。

【０１４６】

好ましい非還元末端の末端マンノースエピトープ

本願発明者らは、特定の細胞型の細胞表面もしくは細胞由来画分／材料上でマンノース構造を標識することが、および／または、そうでなければ特異的に識別することが、できることを明らかにした。本発明は、細胞表面上の特定のマンノース構造に結合する試薬による、細胞表面上の特定のマンノースエピトープの識別に関する。

【０１４７】

本発明の任意の構造の識別のための好ましい試薬としては、特異的抗体および他の炭水化物認識結合分子等が挙げられる。抗体は、各種免疫化および／または抗体の可変領域を提示するファージディスプレイ法等のライブラリ手法によって特異的構造のために産生できることが知られている。抗体ライブラリ手法と同様、アプタマー手法などや、ペプチドに対するファージディスプレイなどが、ペプチド、特に環状ペプチド等のポリアミド分子、またはアプタマー分子等のヌクレオチド型分子などのライブラリ分子の合成のために存在する。

【０１４８】

本発明は特に本発明の高マンノースおよび低マンノース構造の特異的認識に関する。本発明は特に、式：
［Ｍα２］$_{m1}$［Ｍαｘ］$_{m2}$［Ｍα６］$_{m3}${｛［Ｍα２］$_{m9}$［Ｍα２］$_{m8}$［Ｍα３］$_{m7}$｝$_{m10}$（Ｍβ４［ＧＮ］$_{m4}$）$_{m5}$｝$_{m6}$ｙＲ$_2$
［式中、ｍ１、ｍ２、ｍ３、ｍ４、ｍ５、ｍ６、ｍ７、ｍ８、ｍ９およびｍ１０は独立に０または１のいずれかであり；ただしｍ３が０である場合、ｍ１は０であり；ｍ７が０である場合、ｍ１ないし５は０、ｍ８およびｍ９は１であってＭα２Ｍα２二糖を形成するか、または、ｍ８およびｍ９は０であるか、のいずれかであり；
ｙはアノマー結合構造αおよび／もしくはβ、または誘導体化アノマー炭素からの結合であり；そして
Ｒ$_2$は還元末端水酸基または化学的還元末端誘導体であり
ｘは結合位置３もしくは６であり、または３および６の両者が分岐構造を形成しており、

{} は構造中の分岐を表す]
の非還元末端の末端Ｍａｎα－エピトープ、好ましくは少なくとも二糖エピトープ、の識別に関する。
【０１４９】
本発明はさらに、少なくとも１個のＭα２基、好ましくは、ｍ１と、ｍ８またはｍ９の少なくとも１つとが１になるような各分岐上のＭα２基、を有する末端Ｍα２含有グリカンに関する。本発明はさらに、ｍ１、ｍ８およびｍ９が全て１である場合の、末端Ｍα２基を有しない、末端Ｍα３および／またはＭα６エピトープに関する。
【０１５０】
本発明はさらに、好ましい一様態において、Ｍβ残基に結合する末端エピトープに関するものであり、また、より大きなエピトープを対象とした用途のためのものである。本発明は特にＭβ４ＧＮ含有還元末端の末端エピトープに関する。
【０１５１】
好ましい末端エピトープは典型的には２ないし５個の単糖残基を直鎖内に有する。本発明によると、少なくとも２個の単糖残基を有する短いエピトープを適した背景条件の下で認識することができ、本発明は特に２ないし４個の単糖ユニット、より好ましくは２ないし３個の単糖ユニットを有するエピトープに関するものであり、さらに好ましいエピトープは直鎖二糖ユニットおよび／または分岐鎖三糖非還元残基を、還元末端の天然アノマー結合構造とともに有する。より短いエピトープは、構造の識別を目的とした潜在的結合試薬のためのコントロール分子の効果的な産生などの実用上の理由により、特定の用途において好ましい場合がある。
【０１５２】
Ｍα２Ｍ等のより短いエピトープは、本発明のいくつかの共通構造の複数の腕上に存在するため、標的細胞表面上により豊富であることが多い。
【０１５３】
好ましい二糖エピトープとしては、
Ｍａｎα２Ｍａｎ、Ｍａｎα３Ｍａｎ、Ｍａｎα６Ｍａｎ、ならびにより好ましいアノマー型　Ｍａｎα２Ｍａｎα、Ｍａｎα３Ｍａｎβ、Ｍａｎα６Ｍａｎβ、Ｍａｎα３Ｍａｎα、およびＭａｎα６Ｍａｎα
等が挙げられる。好ましい分岐鎖三糖としては、
Ｍａｎα３（Ｍａｎα６）Ｍａｎ、Ｍａｎα３（Ｍａｎα６）Ｍａｎβ、およびＭａｎα３（Ｍａｎα６）Ｍａｎα
等が挙げられる。
【０１５４】
本発明は特に、特に高マンノース構造との関連において、非還元末端Ｍａｎα２構造の特異的識別に関する。
【０１５５】
本発明は特に、次の直鎖末端マンノースエピトープに関する：
ａ）次のオリゴ糖配列：
Ｍａｎα２Ｍａｎ、
Ｍａｎα２Ｍａｎα、
Ｍａｎα２Ｍａｎα２Ｍａｎ、Ｍａｎα２Ｍａｎα３Ｍａｎ、Ｍａｎα２Ｍａｎα６Ｍａｎ、
Ｍａｎα２Ｍａｎα２Ｍａｎα、Ｍａｎα２Ｍａｎα３Ｍａｎβ、Ｍａｎα２Ｍａｎα６Ｍａｎα、
Ｍａｎα２Ｍａｎα２Ｍａｎα３Ｍａｎ、Ｍａｎα２Ｍａｎα３Ｍａｎα６Ｍａｎ、Ｍａｎα２Ｍａｎα６Ｍａｎα６Ｍａｎ
Ｍａｎα２Ｍａｎα２Ｍａｎα３Ｍａｎβ、Ｍａｎα２Ｍａｎα３Ｍａｎα６Ｍａｎβ、Ｍａｎα２Ｍａｎα６Ｍａｎα６Ｍａｎβ
等の好ましい末端Ｍａｎα２エピトープ；

本発明はさらに、本発明の特に重要な低マンノースグリカンの特徴的な特性である、非還元末端の末端Ｍａｎα３および／またはＭａｎα６含有標的構造の識別およびそれを対象とした方法に関する。好ましい構造群としては、特に標的材料の状態により、ｂ）の直鎖エピトープおよびｃ３）の分岐鎖エピトープが挙げられる。

ｂ）次のオリゴ糖配列：

Ｍａｎα３Ｍａｎ、Ｍａｎα６Ｍａｎ、Ｍａｎα３Ｍａｎβ、Ｍａｎα６Ｍａｎβ、Ｍａｎα３Ｍａｎα、Ｍａｎα６Ｍａｎα、Ｍａｎα３Ｍａｎα６Ｍａｎ、Ｍａｎα６Ｍａｎα６Ｍａｎ、Ｍａｎα３Ｍａｎα６Ｍａｎβ、Ｍａｎα６Ｍａｎα６Ｍａｎβ

等の好ましい末端Ｍａｎα３－および／またはＭａｎα６－エピトープ

および次の：

ｃ）分岐鎖末端マンノースエピトープが特に高マンノース構造（ｃ１およびｃ２）および低マンノース構造（ｃ３）の特徴的構造として好ましく、好ましい分岐鎖エピトープとしては、

ｃ１）分岐鎖末端Ｍａｎα２－エピトープ

Ｍａｎα２Ｍａｎα３（Ｍａｎα２Ｍａｎα６）Ｍａｎ、Ｍａｎα２Ｍａｎα３（Ｍａｎα２Ｍａｎα６）Ｍａｎα、

Ｍａｎα２Ｍａｎα３（Ｍａｎα２Ｍａｎα６）Ｍａｎα６Ｍａｎ、

Ｍａｎα２Ｍａｎα３（Ｍａｎα２Ｍａｎα６）Ｍａｎα６Ｍａｎβ、

Ｍａｎα２Ｍａｎα３（Ｍａｎα２Ｍａｎα６）Ｍａｎα６（Ｍａｎα２Ｍａｎα３）Ｍａｎ、

Ｍａｎα２Ｍａｎα３（Ｍａｎα２Ｍａｎα６）Ｍａｎα６（Ｍａｎα２Ｍａｎα２Ｍａｎα３）Ｍａｎ、

Ｍａｎα２Ｍａｎα３（Ｍａｎα２Ｍａｎα６）Ｍａｎα６（Ｍａｎα２Ｍａｎα３）Ｍａｎβ

Ｍａｎα２Ｍａｎα３（Ｍａｎα２Ｍａｎα６）Ｍａｎα６（ＭａｎαＭａｎα２Ｍａｎα３）Ｍａｎβ

ｃ２）式においてｍ１および／またはｍ８および／ｍ９が１であり、分子が少なくとも１個の非還元末端の末端Ｍａｎα３またはＭａｎα６エピトープを有する場合の、分岐鎖末端Ｍａｎα２およびＭａｎα３またはＭａｎα６エピトープ

ｃ３）分岐鎖末端Ｍａｎα３またはＭａｎα６－エピトープ

Ｍａｎα３（Ｍａｎα６）Ｍａｎ、Ｍａｎα３（Ｍａｎα６）Ｍａｎβ、Ｍａｎα３（Ｍａｎα６）Ｍａｎα、Ｍａｎα３（Ｍａｎα６）Ｍａｎα６Ｍａｎ、Ｍａｎα３（Ｍａｎα６）Ｍａｎα６Ｍａｎβ、Ｍａｎα３（Ｍａｎα６）Ｍａｎα６（Ｍａｎα３）Ｍａｎ、Ｍａｎα３（Ｍａｎα６）Ｍａｎα６（Ｍａｎα３）Ｍａｎβ

等が挙げられる。

【０１５６】

本発明はさらに、末端Ｍａｎα２およびＭａｎα３および／またはＭａｎα６含有構造のための識別法を組み合わせることにより、標的グリカンの識別における選択性および感度を増加させることに関する。このような方法は特に、高マンノースおよび低マンノースグリカンの両者を有する本発明の細胞材料に関して有用であると考えられる。

【０１５７】

複合型Ｎ－グリカン

本発明によると、複合型構造は優先的には質量分析により、優先的にはＨｅｘＮＡｃ≧４およびＨｅｘ≧３である特徴的な単糖組成に基づいて、同定される。本発明のより好ましい一様態においては、４≦ＨｅｘＮＡｃ≦２０および３≦Ｈｅｘ≦２１、および本発明のさらに好ましい様態においては、４≦ＨｅｘＮＡｃ≦１０および３≦Ｈｅｘ≦１１である。複合型構造はさらに優先的にはエンドグリコシダーゼ消化に対する感受性、優先的には糖タンパク質からのＮ－グリコシダーゼＦ遊離（Ｎ－ｇｌｙｃｏｓｉｄａｓｅ　Ｆ　ｄｅｔａｃｈｍｅｎｔ）により同定される。複合型構造はさらに優先的には、ＮＭＲ分光法において、Ｍａｎα３（Ｍａｎα６）Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃ　Ｎ－グ

リカンコア構造ならびにＭａｎα３および／またはＭａｎα６残基に結合したＧｌｃＮＡｃ残基の特徴的な共鳴に基づいて同定される。

【０１５８】

マンノース型グリカンに加えて、好ましいＮ－結合グライコームとして、ＧｌｃＮＡｃβ２分岐のみを有する複合型グリカン；ならびにマンノース型分岐およびＧｌｃＮＡｃβ２分岐の両者を有するハイブリッド型グリカン；等のＧｌｃＮＡｃβ２型グリカンなどが挙げられる。

【０１５９】

ＧｌｃＮＡｃβ２型グリカン

本発明は本発明のグライコーム中のＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ構造を明らかにした。好ましくは、ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ構造は１または複数個のＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα構造、より好ましくはＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３またはＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα６構造を有する。

【０１６０】

本発明の複合型グリカンは好ましくは２個のＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα構造を有し、これは好ましくはＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３およびＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα６である。ハイブリッド型グリカンは好ましくはＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３構造を有する。

【０１６１】

本発明は、式ＣＯ１（ＧＮβ２とも呼ばれる）：

$[R_1GN\beta2]_{n1}[M\alpha3]_{n2}\{[R_3]_{n3}[GN\beta2]_{n4}M\alpha6\}_{n5}M\beta4GNXyR_2$、

［任意に、Ｍα６、Ｍα３、またはＭβ４に結合する１または２または３個の式$[R_xGN\beta z]_{nx}$のさらなる分岐を有し、Ｒｘは各分岐で異なっていて良く；

式中、ｎ１、ｎ２、ｎ３、ｎ４、ｎ５およびｎｘは独立に０または１のいずれかであり、ただしｎ２が０である場合、ｎ１は０であり、ｎ３が１および／またはｎ４が１である場合、ｎ５も１であり、少なくともｎ１もしくはｎ４は１、またはｎ３は１であり；

ｎ４が０であり、かつｎ３が１である場合、R_3はマンノース型置換基または無であり、

式中、Ｘはグリコシド結合二糖エピトープβ４（Ｆｕｃα６）$_n$ＧＮであり、ここでｎは０もしくは１、またはＸは無であり、そして

ｙはアノマー結合構造αおよび／もしくはβ、または誘導体化アノマー炭素からの結合であり、そして

R_1、R_XおよびR_3は独立に、１、２または３個のコア構造に結合する天然置換基を表し、

R_2は還元末端水酸基、化学的還元末端誘導体、または、タンパク質由来のアスパラギンＮ－グリコシドアミノ酸および／もしくはペプチドを含むアスパラギンＮ－グリコシド等の天然アスパラギンＮ－グリコシド誘導体であり；［］は直鎖配列中に存在するまたは存在しない基を表し、｛｝もまた存在しても存在しなくてもよい分岐を表す］

の天然オリゴ糖配列構造；および該Ｎ－グリカンの還元末端から短くなった構造；の少なくとも１つに関する。

【０１６２】

複合型／ハイブリッド型構造を形成するＧｌｃＮＡｃβ２型構造の伸長

置換基R_1、R_XおよびR_3は伸長構造を形成してもよい。伸長構造において、R_1およびR_XはＧｌｃＮＡｃ（ＧＮ）の置換基を表し、R_3はＧｌｃＮＡｃの置換基であるか、または、ｎ４が０であり、かつｎ３が１である場合、Ｒ３はハイブリッド型構造を形成するＭａｎα６分岐に結合するマンノース型置換基である。ＧＮの置換基は単糖Ｇａｌ、ＧａｌＮＡｃ、もしくはＦｕｃ、および／またはシアル酸もしくは硫酸もしくはリン酸エステル等の酸性残基である。

【０１６３】

ＧｌｃＮＡｃまたはＧＮは、ＧａｌβＧＮとも記されるＮ－アセチルラクトサミニル、または、ジ－Ｎ－アセチルラクトースジアミニル（ｄｉ－Ｎ－ａｃｅｔｙｌｌａｃｔｏｓ

ｄｉａｍｉｎｙｌ）ＧａｌＮＡｃβＧｌｃＮＡｃ、好ましくはＧａｌＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃに伸長してもよい。ＬＮβ２Ｍはさらに１個またはいくつかの他の単糖残基、例えばガラクトース、フコース、ＳＡまたはＬＮ－ユニットで伸長および／または分岐してもよく、これがさらにＳＡα構造により置換されてもよく、
ならびに／または、Ｍα６残基および／もしくはＭα３残基はさらに１もしくは２個のβ６および／もしくはβ４結合した前記式のさらなる分岐により置換されてもよく；
ならびに／または、Ｍα６残基またはＭα３残基のいずれかは存在しなくてもよく；
ならびに／または、Ｍα６残基はさらに他のＭａｎαユニットにより置換され、ハイブリッド型構造を形成してもよく；
ならびに／または、ＭａｎＢ４はさらにＧＮβ４により置換されてもよく；
ならびに／または、ＳＡはシアル酸の天然置換基を有していてもよく、および／もしくはこれは他のＳＡ残基に、好ましくはα８もしくはα９結合により、置換されてもよい。

【０１６４】

ＳＡα基は隣接するＧａｌ残基の３もしくは６位、またはＧｌｃＮＡｃの６位、好ましくは隣接するＧａｌ残基の３もしくは６位に結合する。別個の好ましい様態において、本発明は３位結合ＳＡのみもしくは６位結合ＳＡのみ、またはその混合を有する構造に関する。

【０１６５】

好ましい複合型構造
不完全単分岐Ｎ－グリカン

本発明は、通常とは異なっており、本発明のグライコームの分析に有用な不完全複合単分岐Ｎ－グリカンを明らかにした。不完全単分岐構造のほとんどは潜在的な二分岐Ｎ－グリカン構造の分解を示しており、そのため細胞状態の指標として好ましい。不完全複合型単分岐グリカンは単一のＧＮβ２構造のみを有する。

【０１６６】

本発明は特に、ｎ１のみが１、またはｎ４のみが１、およびこのような構造の混合物である場合の、上記の式ＣＯ１または式ＧＮｂ２の構造に関する。

【０１６７】

好ましい混合物は
Ａ）分解的生合成過程に由来すると思われる単分岐の
$R_1GN\beta2M\alpha3\beta4GNXyR_2$
$R_3GN\beta2M\alpha6M\beta4GNXyR_2$ および
Ｂ）マンノース分岐を有する二分岐の
Ｂ１） $R_1GN\beta2M\alpha3\{M\alpha6\}_{n5}M\beta4GNXyR_2$
Ｂ２） $M\alpha3\{R_3GN\beta2M\alpha6\}_{n5}M\beta4GNXyR_2$
のうち少なくとも１つの単分岐複合型グリカンを有する。構造Ｂ２が分解的生合成（ｄｅｇｒａｄａｔｉｖｅ　ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｓｉｓ）の産物として構造Ａよりも好ましく、特にＭａｎα３構造の分解の程度がより低いという点で好ましい。構造Ｂ１は分解的生合成または生合成過程の遅延の指標として有用である。

【０１６８】

二分岐および多分岐構造

本願発明者らは、本発明の細胞からの二分岐および多分岐Ｎ－グリカンの主要な群を明らかにした。好ましい二分岐および多分岐構造は２個のＧＮβ２構造を有する。これらは本発明のグライコームのさらなる特徴的な群として好ましく、式ＣＯ２：
$R_1GN\beta2M\alpha3\{R_3GN\beta2M\alpha6\}M\beta4GNXyR_2$
［任意に、Ｍα６、Ｍα３、またはＭβ４に結合する１または２または３個の式［$R_xGN\beta z$］$_{nx}$のさらなる分岐を有し、Ｒｘは各分岐で異なっていてよく
式中、ｎｘは０または１のいずれかであり、
他の変数は式ＣＯ１によるものである］
により表される。

【０１６９】
好ましい二分岐構造
２個の末端ＧＮβエピトープを有する二分岐構造が分解的生合成および／または生合成過程の遅延の潜在的な指標として好ましい。より好ましい構造は、R_1およびR_3が無である場合の式ＣＯ２によるものである。
【０１７０】
伸長構造
本発明は、ＧａｌおよびＧａｌＮＡｃ構造を有する特定の伸長複合型グリカンならびにその伸長バリアントを明らかにした。このような構造は、末端エピトープが本発明の細胞型を特徴付けるラクトサミン型の情報的に有用な修飾を複数有することから、情報的に有用な構造として特に好ましい。本発明は式ＣＯ３：
［R_1Ｇａｌ［ＮＡｃ］$_{o2}$βｚ２］$_{o1}$ＧＮβ２Ｍα３｛［R_1Ｇａｌ［ＮＡｃ］$_{o4}$βｚ２］$_{o3}$ＧＮβ２Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙR_2
［任意に、Ｍα６、Ｍα３、またはＭβ４に結合する１または２または３個の式［R_xＧＮβｚ１］$_{nx}$のさらなる分岐を有し、Ｒｘは各分岐で異なっていてよく
式中、ｎｘ、ｏ１、ｏ２、ｏ３、およびｏ４は独立に０または１のいずれかであり、
ただし少なくともｏ１またはｏ３は１であり、好ましい一様態においては両者が１であり；
ｚ２は３位または４位であるＧＮへの結合位置であり、好ましい一様態においては４位であり；
ｚ１はさらなる分岐の結合位置であり；
R_1、R_XおよびR_3は１または２個のＮ－アセチルラクトサミン型伸長群または無を表し、
｛｝および（）は存在しても存在しなくてもよい分岐を表し、
他の変数は式ＧＮｂ２に示す通りである］
の、天然オリゴ糖配列構造または構造群および該Ｎ－グリカンの還元末端から短くなった対応する構造（群）の少なくとも１つに関する。
【０１７１】
ガラクトシル化構造
本願発明者らは特にジガラクトシル化構造
ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα３｛ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙR_2
およびモノガラクトシル化構造：
ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα３｛ＧＮβ２Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙR_2、
ＧＮβ２Ｍα３｛ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙR_2、
および／または、グリカン材料の分析に有用な、さらなる特徴的末端構造を有するために好ましいその伸長バリアント
R_1ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα３｛R_3ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙR_2
R_1ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα３｛ＧＮβ２Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙR_2、および
ＧＮβ２Ｍα３｛R_3ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙR_2
に対して有用な構造を分析した。好ましい伸長材料としてはR_1がシアル酸、より好ましくはＮｅｕＮＡｃまたはＮｅｕＧｃである構造等が挙げられる。
【０１７２】
ＬａｃｄｉＮＡｃ構造含有Ｎ－グリカン
本発明は初めてＬａｃｄｉＮＡｃ、ＧａｌＮＡｃβＧｌｃＮＡｃ構造を本発明の細胞から明らかにした。好ましいＮ－グリカンｌａｃｄｉＮＡｃ構造は、変数ｏ２およびｏ４のうち少なくとも１つが１である場合に式ＣＯ１の構造中に含まれる。
【０１７３】
主要な酸性グリカン型
酸性グライコームとは、シアル化グライコームを形成するシアル酸（特にＮｅｕＮＡｃおよびＮｅｕＧｃ）、ＨｅｘＡ（特にＧｌｃＡ、グルクロン酸）、ならびに／またはリン

酸および／もしくは硫酸エステル等の酸修飾基（ａｃｉｄ　ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｇｒｏｕｐ）等の酸性単糖残基を少なくとも１つ有するグライコームを意味する。

【０１７４】

本発明によると、酸性グリカン構造中の硫酸および／またはリン酸エステル（ＳＰ）基の存在は、優先的には１または複数個のＳＰ基を有する特徴的単糖組成により示される。ＳＰ基を有する好ましい組成としては１または複数個のＳＰ基をＳＰ基非含有グリカン組成に加えることにより形成されるものが挙げられるが、本発明のＳＰ基を有する最も優先的な組成は、本発明の酸性Ｎ－グリカン分画グリカン群の表中に記載される組成から選択される。酸性グリカン構造中のリン酸および／または硫酸エステル基の存在は、優先的には、フラグメンテーション質量分析（ｆｒａｇｍｅｎｔａｔｉｏｎ　ｍａｓｓ　ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ）において観察される１または複数個のＳＰ基の喪失に対応する特徴的なフラグメント、シアリダーゼ消化に対するＳＰ基含有グリカンの非感受性によってさらに示される。酸性グリカン構造中のリン酸および／または硫酸エステル基の存在は、優先的には、本発明の実施例中に記載されるように、陽イオンモード質量分析において、このようなグリカンがナトリウム塩等の塩を形成する傾向によっても示される。硫酸およびリン酸エステル基は、さらに優先的には、それぞれ、特異的なスルファターゼおよびホスファターゼ酵素処理に対するそれらの感受性、および／または質量分析等の分析手法においてそれらが陽イオンプローブと形成する特異的な複合体に基づいて同定される。

【０１７５】

シアル化複合Ｎ－グリカングライコーム

本発明は、式：

［｛ＳＡα３／６｝$_{s1}$ＬＮβ２］$_{r1}$Ｍα３｛（｛ＳＡα３／６｝$_{s2}$ＬＮβ２）$_{r2}$Ｍα６｝$_{r8}$

｛Ｍ［β４ＧＮ［β４｛Ｆｕｃα６｝$_{r3}$ＧＮ］$_{r4}$］$_{r5}$｝$_{r6}$　（Ｉ）

［任意に、１または２または３個の式

｛ＳＡα３／６｝$_{s3}$ＬＮβ　（ＩＩｂ）

のさらなる分岐を有し、

式中、ｒ１、ｒ２、ｒ３、ｒ４、ｒ５、ｒ６、ｒ７およびｒ８は独立に０または１のいずれかであり、

式中、ｓ１、ｓ２およびｓ３は独立に０または１のいずれかであり、

ただし少なくともｒ１は１またはｒ２は１であり、および少なくともｓ１、ｓ２またはｓ３のうちの１個は１である。

ＬＮは、ＧａｌβＧＮとも記されるＮ－アセチルラクトサミニル、または、ジ－Ｎ－アセチルラクトースジアミニルＧａｌＮＡｃβＧｌｃＮＡｃ、好ましくは、ＧａｌＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃであり、ＧＮはＧｌｃＮＡｃであり、Ｍはマンノシルであり、ただしＬＮβ２ＭまたはＧＮβ２Ｍは１個またはいくつかの他の単糖残基、例えばガラクトース、フコース、ＳＡ、またはさらにＳＡα構造で置換されてもよいＬＮ－ユニット、でさらに伸長および／もしくは分岐してよく、

ならびに／または、１個のＬＮβは短くなってＧＮβとなってよく

ならびに／または、Ｍα６残基および／もしくはＭα３残基はさらに１もしくは２個のβ６および／もしくはβ４結合した前記式のさらなる分岐により置換されてもよく、

ならびに／または、Ｍα６残基またはＭα３残基のいずれかは存在しなくてもよく；

ならびに／または、Ｍα６残基はさらに他のＭａｎαユニットにより置換され、ハイブリッド型構造を形成してもよく；

ならびに／または、Ｍａｎβ４はさらにＧＮβ４により置換されてもよく；

ならびに／または、ＳＡはシアル酸の天然置換基を有していてもよく、および／もしくはこれは他のＳＡ残基に、好ましくはα８もしくはα９結合により、置換されてもよい。

（）、｛｝、［］および［］は直鎖配列中に存在するまたは存在しない基を表す。｛｝も存在しても存在しなくてもよい分岐を表す。

ＳＡα基は隣接するＧａｌ残基の３または６位のいずれかに、またはＧｌｃＮＡｃの６位

上に、好ましくは隣接するＧａｌ残基の３または６位に結合する。］
の天然オリゴ糖配列構造；および該Ｎ－グリカンの還元末端から短くなった構造；の少なくとも１つに関する。別の好ましい様態において、本発明は３位結合ＳＡのみもしくは６位結合ＳＡのみ、またはその混合を有する構造に関する。好ましい一様態において、本発明は、ｒ６が１であり、かつｒ５が０であり、還元末端ＧｌｃＮＡｃ構造を欠いたＮ－グリカンに相当するグリカンに関する。

【０１７６】

各種置換基を有するＬＮユニットは、好ましい一般的一様態において、式：
［Ｇａｌ（ＮＡｃ）$_{n1}$α３］$_{n2}$｛Ｆｕｃα２｝$_{n3}$Ｇａｌ（ＮＡｃ）$_{n4}$β３／４｛Ｆｕｃα４／３｝$_{n5}$ＧｌｃＮＡｃβ
［式中、ｎ１、ｎ２、ｎ３、ｎ４およびｎ５は独立に１または０のいずれかであり、
ただしｎ２およびｎ３により定義される置換基は非還元末端の末端構造におけるＳＡの存在に対して代替的であり；
還元末端ＧｌｃＮＡｃユニットはさらにポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン構造を形成する他の類似したＬＮ構造にβ３および／またはβ６結合してもよく、ただしこのＬＮユニットｎ２、ｎ３およびｎ４は０であり、
Ｇａｌ（ＮＡｃ）βおよびＧｌｃＮＡｃβユニットは硫酸エステル基に結合したエステルであってもよく；
（）および［］は直鎖配列中に存在するまたは存在しない基を表し；｛｝は存在しても存在しなくてもよい分岐を表す］
により表すことができる。

【０１７７】

ＬＮユニットは好ましくはＧａｌβ４ＧＮおよび／またはＧａｌβ３ＧＮである。本願発明者らはｈＭＳＣが両方の型のＮ－アセチルラクトサミンを発現し得ることを明らかにし、そのため本発明は特に両構造の混合物に関する。さらに本発明は、ｈＭＳＣの新規マーカとして、特別で比較的希な、非還元末端／部位修飾を何も有しない、ｌｅｗｉｓ　ｃ構造とも呼ばれる、１型Ｎ－アセチルラクトサミン、Ｇａｌβ３ＧＮ、およびその置換誘導体に関する。

【０１７８】

ハイブリッド型構造

本発明によると、ハイブリッド型または単分岐構造は、優先的には質量分析により、優先的にはＨｅｘＮＡｃ＝３かつＨｅｘ≧２である特徴的な単糖組成に基づき、同定される。本発明のより好ましい一様態において、２≦Ｈｅｘ≦１１であり、本発明のさらに好ましい一様態において２≦Ｈｅｘ≦９である。ハイブリッド型構造はさらに優先的にはエキソグリコシダーゼ消化、優先的にはα－マンノシダーゼ消化に対する感受性により、構造が非還元末端α－マンノース残基を有しており、Ｈｅｘ≧３である場合に、さらに好ましくはＨｅｘ≧４である場合に、同定され、ならびにエンドグリコシダーゼ消化、優先的には糖タンパク質からのＮ－グリコシダーゼＦ遊離に対する感受性により、同定される。ハイブリッド型構造はさらに優先的には、ＮＭＲ分光法において、Ｍａｎα３（Ｍａｎα６）Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃ　Ｎ－グリカンコア構造、該Ｎ－グリカンコア中のＭａｎα残基に結合したＧｌｃＮＡｃβ残基の特徴的な共鳴に基づき、および非還元末端αマンノース残基または残基群の特徴的な共鳴の存在に基づき、同定される。

【０１７９】

単分岐構造はさらに優先的には、α－マンノース消化に対する非感受性により、およびエンドグリコシダーゼ消化、優先的には糖タンパク質からのＮ－グリコシダーゼＦ遊離に対する感受性により、同定される。単分岐構造はさらに優先的には、ＮＭＲ分光法において、Ｍａｎα３Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃ　Ｎ－グリカンコア構造、該Ｎ－グリカンコア中のＭａｎα残基に結合したＧｌｃＮＡｃβ残基の特徴的な共鳴に基づき、および、Ｎ－グリカンコアの$Ｍａｎα^{Ｍａｎβ}$配列中に存在する末端α－マンノース残基から生ずる共鳴の他にさらなる非還元末端α－マンノース残基の特徴的な共鳴が無いこ

とに基づき、同定される。

【０１８０】

本発明はさらに、Ｎ－グリカンが式ＨＹ１：

$R_1GN\beta2M\alpha3\{[R_3]_{n3}M\alpha6\}M\beta4GNXyR_2$

［式中、ｎ３は独立に０または１のいずれかであり、

Ｘはグリコシド結合した二糖エピトープβ４（$Fuc\alpha6)_n$ＧＮであり、ここでｎは０もしくは１、またはＸは無であり、そして

ｙはアノマー結合構造αおよび／もしくはβまたは誘導体化アノマー炭素からの結合であり、そして

R_1は無またはＧｌｃＮＡｃに結合した置換基もしくは置換基群を表し、

R_3は無またはマンノース残基に結合したマンノース置換基を表し、従ってR_1およびR_3のそれぞれは１、２、または３個、より好ましくは１または２個、最も好ましくは少なくとも１個の、コア構造に結合した天然置換基に対応してよく、

R_2は還元末端水酸基、化学的還元末端誘導体、あるいは、タンパク質由来のアスパラギンＮ－グリコシドアミノ酸および／もしくはペプチドを含むアスパラギンＮ－グリコシド等の天然アスパラギンＮ－グリコシド誘導体であり；［］は直鎖配列内に存在するまたは存在しない基を表し、｛｝は存在しても存在しなくてもよい分岐を表す］

のハイブリッド型構造を有している場合の前記Ｎ－グリカンに関する。

【０１８１】

好ましいハイブリッド型構造

好ましいハイブリッド型構造としては、好ましいコア構造上の１または２個のさらなるマンノース残基等が挙げられる。

式ＨＹ２

$R_1GN\beta2M\alpha3\{[M\alpha3]_{m1}([M\alpha6])_{m2}M\alpha6\}M\beta4GNXyR_2$

［式中、ｍ１およびｍ２は独立に０または１のいずれかであり、

｛｝および（）は存在してもしなくてもよい分岐を表し、

他の変数は式ＨＹ１に記載される通りである。］

【０１８２】

さらに本発明は、さらなるラクトサミン型構造をＧＮβ２分岐上に有する構造に関する。好ましいラクトサミン型伸長構造としてはＮ－アセチルラクトサミンおよび誘導体、ガラクトース、ＧａｌＮＡｃ、ＧｌｃＮＡｃ、シアル酸およびフコース等が挙げられる。

【０１８３】

式ＨＹ２の好ましい構造としては：

非還元末端の末端ＧｌｃＮＡｃをグリカンの特異的な好ましい基として有する構造

$GN\beta2M\alpha3\{M\alpha3M\alpha6\}M\beta4GNXyR_2$、

$GN\beta2M\alpha3\{M\alpha6M\alpha6\}M\beta4GNXyR_2$、

$GN\beta2M\alpha3\{M\alpha3(M\alpha6)M\alpha6\}M\beta4GNXyR_2$、

および／またはその伸長バリアント

$R_1GN\beta2M\alpha3\{M\alpha3M\alpha6\}M\beta4GNXyR_2$、

$R_1GN\beta2M\alpha3\{M\alpha6M\alpha6\}M\beta4GNXyR_2$、

$R_1GN\beta2M\alpha3\{M\alpha3(M\alpha6)M\alpha6\}M\beta4GNXyR_2$、

式ＨＹ３

$[R_1Gal[NAc]_{o2}\beta z]_{o1}GN\beta2M\alpha3\{[M\alpha3]_{m1}[(M\alpha6)]_{m2}M\alpha6\}_{n5}M\beta4GNXyR_2$、

［式中、ｎ５、ｍ１、ｍ２、ｏ１およびｏ２は独立に０または１のいずれかであり、

ｚはＧＮへの結合位置であって３または４であり、好ましい一様態においては４であり、

R_1は１または２個のＮ－アセチルラクトサミン型伸長基または無であり、

｛｝および（）は存在してもしなくてもよい分岐を表し、

他の変数は式ＨＹ１において記載される通りである］

等が挙げられる。

【０１８４】
式ＨＹ３の好ましい構造としては、特に、非還元末端の末端Ｇａｌβを、好ましくは末端Ｎ－アセチルラクトサミン構造を形成するＧａｌβ３／４を、有する構造が挙げられる。これらはハイブリッド型構造の特別な群として好ましく、複合Ｎ－グリカングライコームおよび高マンノースグライコーム：
ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα３Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$、
ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα６Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$、
ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα３（Ｍα６）Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$、
および／またはグリカン材料の分析に有用なさらなる特徴的な末端構造を有するために好ましいその伸長バリアント
Ｒ$_1$ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα３Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$、
Ｒ$_1$ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα６Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$、
Ｒ$_1$ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα３（Ｍα６）Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$
のバランスの分析における固有の値の群として好ましい。好ましい伸長材料としては、Ｒ$_1$がシアル酸、より好ましくはＮｅｕＮＡｃまたはＮｅｕＧｃである構造等が挙げられる。

【０１８５】
グライコーム材料由来の構造の、および細胞表面上の構造の、結合法による識別
本発明は、ＮＭＲおよび／または質量分析による物理化学的分析に加え、いくつかの方法が前記構造の分析に有用であることを明らかにした。本発明は特に、方法：
ｉ）結合剤と呼ばれる、グリカンを結合する分子による識別
に関する。これらの分子はグリカンを結合し、結合剤に連結した標識等の、結合の観察を可能にする特性を有する。好ましい結合剤としては、
ａ）抗体、レクチンおよび酵素等のタンパク質
ｂ）タンパク質の結合ドメインおよび部位等のペプチド、ならびにファージディスプレイペプチド等の合成ライブラリ由来類似体
ｃ）ペプチド材料を模倣する他のポリマまたは有機骨格分子（ｏｒｇａｎｉｃ　ｓｃａｆｆｏｌｄ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ）
等が挙げられる。

【０１８６】
ペプチドおよびタンパク質は、好ましくは組み替えタンパク質またはそれに由来する対応する炭水化物認識ドメインであり、該タンパク質はモノクローナル抗体、グリコシダーゼ、グリコシル転移酵素、植物レクチン、動物レクチンまたはそれらのペプチド模倣物から選択され、結合剤は検出可能な標識構造を有していてよい。

【０１８７】
炭水化物識別における酵素の属（ｇｅｎｕｓ）はレクチン（酵素活性を有しない炭水化物結合タンパク質）の属に対して連続的である。
ａ）天然糖転移酵素（Ｒａｕｖａｌａ　ｅｔ　ａｌ．（１９８３）　ＰＮＡＳ　（ＵＳＡ）　３９９１－３９９５）およびグリコシダーゼ（Ｒａｕｖａｌａ　ａｎｄ　Ｈａｋｏｍｏｒｉ　（１９８１）　Ｊ．　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．　８８，　１４９－１５９）はレクチン活性を有する。
ｂ）炭水化物結合酵素は触媒アミノ酸残基を変異させることによりレクチンに改変することができる（ＷＯ９８４２８６４；　Ａａｌｔｏ　Ｊ．　ｅｔ　ａｌ．　Ｇｌｙｃｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｊ．　（２００１），１８（１０）；　７５１－８；　Ｍｅｇａ　ａｎｄ　Ｈａｓｅ　（１９９４）　ＢＢＡ　１２００　（３）　３３１－３を参照）。
ｃ）グリコシダーゼに構造的に相同な天然レクチンも知られており、酵素属およびレクチン属の連続性を示唆している（Ｓｕｎ，　Ｙ－Ｊ．　ｅｔ　ａｌ．　Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．　（２００１）　２７６　（２０）　１７５０７－１４）。

【０１８８】
酵素活性を有しない炭水化物結合タンパク質としての抗体の属もレクチンの概念に非常

に近いが、抗体は通常レクチンとしては分類されない。

【０１８９】

ペプチド概念の明白性および炭水化物結合タンパク質概念との連続性

タンパク質はペプチド鎖を有しており、そのためペプチドによる炭水化物の認識は明白であるとさらに考えられる。例えば、炭水化物結合タンパク質の活性部位由来のペプチドは炭水化物を認識し得ることが当業者に公知である（例えばＧｅｎｇ　Ｊ－Ｇ．　ｅｔａｌ　（１９９２）　Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．　１９８４６－５３）。上記の通り、抗体断片は記載に含まれ、結合タンパク質の遺伝子組み替えバリアントである。明白な遺伝子組み替えバリアントは酵素、抗体およびレクチンの、短くなった、または断片のペプチドを含みうる。

【０１９０】

細胞または分化および構造の個々の特異的末端バリアントの解明

本発明は、特定の分化段階のマーカとしてのオン・オフ変化；またはグライコームの定量的比較に基づく量的相違；によって、構造的特徴を明らかにするための、グライコミクスプロファイリング法の使用に関する。個々の特異的バリアントは、糖転移酵素の遺伝的変異、および／または、個々の特異的構造の合成を妨げる、または引き起こすグリコシル化機構の他の要素に基づくものである。

【０１９１】

本願発明者らはこれまでにヒトグライコームのグライコーム組成を明らかにしており、本明細書において本願発明者らは、間葉系幹細胞グライコームの、特に特異的結合剤による、分析に有用な構造的末端エピトープを提供する。

【０１９２】

変化する特徴的な末端構造の例としては、主要な相同コアＧａｌβエピトープの修飾として生成された競合的（ｃｏｍｐｅｔｉｎｇ）末端エピトープの発現等が挙げられ、該修飾は結合位置Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃが異なる同一の単糖のいずれかによるもの；および結合位置Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃが異なる同一の単糖のいずれかを有する類似体；または同一の結合であるが４位のエピマー主鎖（ｅｐｉｍｅｒｉｃ　ｂａｃｋｂｏｎｅ）Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃによるものである。これらは構造の生物学的認識および機能を修飾する特異的コア構造により提示され得る。他の共通の特徴は、同様なＧａｌβ構造が、タンパク質結合物（Ｏ－およびＮ－グリカン）および脂質結合物（糖脂質構造）の両者として発現されることである。α２フコシル化の代わりに、末端ＧａｌはＮＡｃ基をフコースと同じ２位上に有していてよい。これは相同エピトープＧａｌＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃ、およびさらに関連するＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌ構造を本発明の特徴的な特別な糖脂質上に生ずる。

【０１９３】

本発明はヒト幹細胞、好ましくは間葉系幹細胞からの新規の末端二糖および誘導体エピトープに関する。グリコシル化は種、細胞および組織特異的であり、通常、癌細胞からの結果は正常な細胞のものとは顕著に異なっており、そのため、ヒト胚性癌腫から得られた膨大かつ様々なグリコシル化のデータは、ヒト胚幹細胞または任意の間葉系細胞に実際に関連性のある、または明らかなものではない（ただし偶然の類似を除く）と考えられるべきである。さらに、奇形腫の正確な分化程度は知ることができず、そのため特異的修飾機構下の末端エピトープの比較は知ることができない。グリコシダーゼおよび抗体等の特異的結合分子による末端構造、および該構造の化学的分析。

【０１９４】

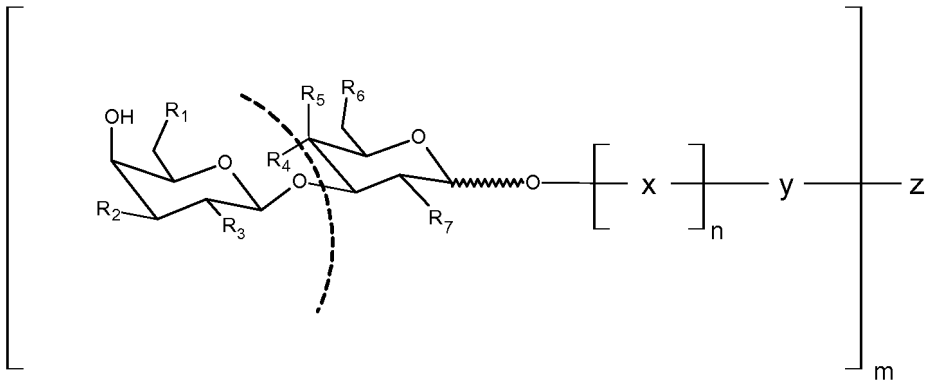
本発明は、特異的フコシル化／ＮＡｃ修飾による類似の修飾、および末端二糖エピトープの対応する位置上のシアル化を有する、末端Ｇａｌ（ＮＡｃ）β１－３／４Ｈｅｘ（ＮＡｃ）構造の群を明らかにする。末端構造は遺伝的に調節されたフコース転移酵素およびシアル酸転移酵素の相同なファミリにより制御されると考えられる。この制御により、細胞間の伝達のための、および細胞の分析に用いられる他の特異的結合剤による認識のための、特徴的な構造パターンが生成する。主要エピトープを表１９に示す。データは各型の

細胞の末端エピトープの特徴的パターン、例えば特にＩ型およびＩＩ型ラクトサミンの発現ならびに誘導体分化、複数の主鎖構造の類似した修飾、例えば１型ラクトサミン（Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ）上のＦｕｃα２－構造、同様にβ３結合したコアＩ　Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃα、ならびに特定の型の糖脂質上に存在する４型構造、ならびにα３－フコシル化構造の発現を明らかにする。例えば末端型ラクトサミンおよびポリラクトサミンは間葉系幹細胞を他の型から区別する。末端Ｇａｌβ構造情報は、好ましくはシアル化および／またはフコシル化Ｇａｌβ構造に関する情報および／またはＧａｌＮＡｃを有するＧａｌＮＡｃ含有Ｏ－グリカンコア構造に関する情報および／または糖脂質構造と組み合わせられる。

【０１９５】

本発明は特に、構造の識別のための、モノクローナル抗体等の高特異性結合分子に関する。該構造は式Ｔ１により表すことができる。この式では第１の単糖残基が左側に記され、これはβ－Ｄ－ガラクトピラノシル構造であって、R_5がＯＨの場合はα－またはβ－Ｄ－（２－デオキシ－２－アセトアミド）ガラクトピラノシル構造の、R_4がＯ－を有する場合はβ－Ｄ－（２－デオキシ－２－アセトアミド）グルコピラノシルの、３または４位いずれかに結合する。式Ｔ１およびＴ２において、還元末端の特定されない立体化学式はさらに（請求の範囲において）曲線で示される。シアル酸残基はＧａｌの３もしくは６位、またはＧｌｃＮＡｃの６位に結合してよく、フコース残基はＧａｌの２位、またはＧｌｃＮＡｃの３もしくは４位、またはＧｌｃの３位に結合してよい。

式Ｔ１：



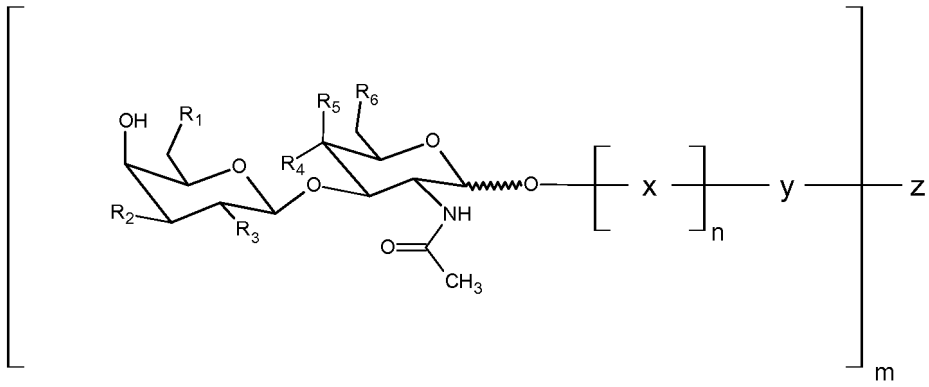
［式中、
Ｘは結合位置であり、
R_1、R_2およびR_6はＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基シアル酸、好ましくはＮｅｕ５Ａｃα２またはＮｅｕ５Ｇｃα２、最も好ましくはＮｅｕ５Ａｃα２であり、または
R_3はＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基Ｆｕｃα１（Ｌ－フコース）またはＮ－アセチル（Ｎ－アセトアミド、$NCOCH_3$）であり；
R_4はＨ、ＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基Ｆｕｃα１（Ｌ－フコース）であり、R_4がＨである場合、R_5はＯＨであり、R_4がＨでない場合、R_5はＨであり；
Ｒ７はＮ－アセチルまたはＯＨであり
Ｘは細胞由来の天然オリゴ糖主鎖構造、好ましくはＮ－グリカン、Ｏ－グリカンもしくは糖脂質構造であり；またはｎが０である場合、Ｘは無であり、
Ｙはリンカ基（ｌｉｎｋｅｒ　ｇｒｏｕｐ）、好ましくはＯ－グリカンおよびＯ－結合末端オリゴ糖および糖脂質のための酸素、ならびにＮ－グリカンのためのＮ、またはｎが０である場合、無であり；
Ｚは担体構造、好ましくは細胞により産生された天然担体であり、例えばタンパク質また

は脂質であって、好ましくは担体上のセラミドもしくは分岐グリカンコア構造、またはＨであり；
アーチはガラクトピラノシルからの結合が左側の残基の３位または４位いずれかに対するものであること、およびＲ４構造が他の４または３位にあることを表し、
ｎは０または１の整数であり、ｍは１ないし１０００、好ましくは１ないし１００、および最も好ましくは１ないし１０の整数（担体上のグリカンの数）であり、
ただしＲ２およびＲ３のうち１つはＯＨまたはＲ３はＮ－アセチルであり、
左側の第１の残基が右側の残基の４位に結合する場合、Ｒ６はＯＨであり：
ＸはＧａｌα４Ｇａｌβ４Ｇｌｃではなく、（ＳＳＥＡ－３または４のコア構造）またはＲ３はフコシルであり
Ｒ７は左側の第１の残基が右側の残基の３位に結合している場合、好ましくはＮ－アセチルである。］

【０１９６】

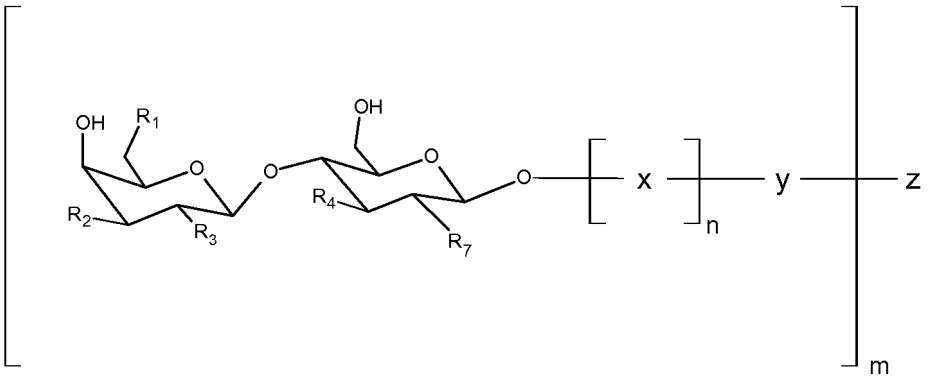
好ましい末端β３結合亜群は、左側の第１の残基が主鎖構造Ｇａｌ（ＮＡｃ）β３Ｇａｌ／ＧｌｃＮＡｃと３位で結合する場合の状態を示す、式Ｔ２により表される。

式Ｔ２



［式中、R_1ないしR_7等の変数はＴ１に対して記載される通りである］

【０１９７】



好ましい末端β４結合亜群は式Ｔ３により表される：
［式中、R_1ないしR_4およびＲ７を含む変数はＴ１に対して記載される通りであり、ただしR_4はＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基Ｆｕｃα１（Ｌ－フコース）である］

【０１９８】

あるいは、末端構造のエピトープは式Ｔ４およびＴ５で表される
コアＧａｌβエピトープ式Ｔ４：

ＧａｌβＩ－ｘＨｅｘ（ＮＡｃ）$_{p}$、
［ｘは結合位置３または４であり、
および、ＨｅｘはＧａｌまたはＧｌｃであり、
ただし
ｐが０または１であり、
ｘが結合位置３である場合、ｐは１であり、ＨｅｘＮＡｃはＧｌｃＮＡｃまたはＧａｌＮＡｃであり、
ｘが結合位置４である場合、ＨｅｘはＧｌｃである。
コアＧａｌβ１－３／４エピトープは、好ましくはＧａｌ結合ＳＡα３またはＳＡα６またはＦｕｃα２、およびＧｌｃ結合Ｆｕｃα３またはＧｌｃＮＡｃ結合Ｆｕｃα３／４の群より選択される、１または２個の構造ＳＡαまたはＦｕｃαにより、任意に水酸基に置換される。］

【０１９９】

式Ｔ５

［Ｍα］$_{m}$ＧａｌβＩ－ｘ［Ｎα］$_{n}$Ｈｅｘ（ＮＡｃ）$_{p}$、
［式中、ｍ、ｎおよびｐは独立に０または１の整数であり、
ＨｅｘはＧａｌまたはＧｌｃであり、
Ｘは結合位置であり
ＭおよびＮは、単糖残基であって
独立に無（前記位置の遊離水酸基）
ならびに／または
Ｇａｌの３位もしくは／およびＨｅｘＮＡｃの６位に結合したシアル酸であるＳＡ
ならびに／または
Ｇａｌの２位；および／もしくは、Ｇａｌが他の位置（４または３）に結合し、ＨｅｘＮＡｃがＧｌｃＮＡｃである場合、ＨｅｘＮＡｃの３もしくは４位；または、Ｇａｌが他の位置（３）に結合する場合、Ｇｌｃの３位；に結合したＦｕｃ（Ｌ－フコース）残基
であり、
ただし、ｍおよびｎの合計は２であり
好ましくはｍおよびｎは独立に０または１である。］

【０２００】

正確な構造の詳細は、細胞の分析および／または操作のために設計された特異的結合分子による最適な認識にとって重要である。末端主要Ｇａｌβエピトープは同一の修飾単糖ＮｅｕＸ（Ｘはシアル酸の５位修飾ＡｃもしくはＧｃ）またはＦｕｃにより、同一の結合型アルファで修飾される（両構造の同一の水酸基位置の修飾）。
全てのエピトープの末端Ｇａｌβ上のＮｅｕＸα３、Ｆｕｃα２、および
ＧａｌβＩＧｌｃＮＡｃの末端Ｇａｌβを修飾するＮｅｕＸα６、または結合が６競合である場合はＨｅｘＮＡｃ
またはＧｌｃＮＡｃに残存する遊離アキシャル位（ａｘｉａｌ）第１級水酸基を修飾するＦｕｃα（ＧａｌＮＡｃ残基に遊離アキシャル位水酸基が存在しない）。

【０２０１】

好ましい構造は、Ｔ２と同様に、好ましいＧａｌβ１－３構造に分類することができ、
式Ｔ６：
［Ｍα］ｍＧａｌβ１－３［Ｎα］$_{n}$ＨｅｘＮＡｃ、
［式中、変数はＴ５に対して記載される通りである。］

【０２０２】

好ましい構造は、Ｔ４と同様に、好ましいＧａｌβ１－４構造に分類することができ、
式Ｔ７：
［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１－４［Ｎα］$_{n}$Ｇｌｃ（ＮＡｃ）$_{p}$、
［式中、変数はＴ５に対して記載される通りである］である。これらは好ましいＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造および関連するラクトシル誘導体であり、好ましい一様態に

おいて、ｐは１であり、構造は２型Ｎ－アセチルラクトサミンのみを含む。本発明はこれらが間葉系細胞、好ましくは間葉系幹細胞、その分化したバリアント（組織型特異的に分化した間葉系幹細胞）の特定の亜型の識別に非常に有用であることを明らかにした。各種フコシルおよび／またはシアル酸修飾が幹細胞型に特徴的なパターンを生成したことは注目に値する。

【０２０３】

好ましいＩ型およびＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造

好ましい構造は、Ｔ４と同様に、オリゴ糖コア配列Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃ構造を有する好ましい１（Ｉ）型および２（ＩＩ）型Ｎ－アセチルラクトサミン構造に分類することができ、

式Ｔ８：

［Ｍα］$_{m}$ＧａｌΒ１－３／４［Ｎα］$_{n}$ＧＩｃＮＡｃ

［式中、変数はＴ５に対して記載される通りである］である。

【０２０４】

好ましい構造は、Ｔ８と同様に、好ましいＧａｌβ１－３構造に分類することができ、

式Ｔ９：

［Ｍα］$_{m}$ＧａｌΒ１－３［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃ

［式中、変数はＴ５に対して記載される通りである］である。これらは好ましいＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造である。本発明は、これらが間葉系細胞、好ましくは間葉系幹細胞、またはその分化したバリアント（組織型特異的に分化した間葉系幹細胞）の特定の亜型の識別に非常に有用であることを明らかにした。各種フコシルまたはシアル酸修飾が細胞または幹細胞型に特徴的なパターンを生成したことは注目に値する。

【０２０５】

好ましい構造は、Ｔ８と同様に、好ましいＧａｌβ１－４ＧｌｃＮＡｃコア配列含有構造に分類することができ、

式Ｔ１０：

［Ｍα］$_{m}$ＧａｌΒ１－４［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃ

［式中、変数はＴ５に対して記載される通りである］である。これらは好ましいＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造である。本発明は、これらが幹細胞、好ましくは間葉系幹細胞、またはその分化したバリアント（組織型特異的に分化した間葉系幹細胞）の特定の亜型の識別に非常に有用であることを明らかにした。

【０２０６】

各種フコシルおよび／またはシアル酸修飾Ｎ－アセチルラクトサミン構造が幹細胞／細胞型に特に特徴的なパターンを生成することは注目に値する。本発明はさらに、少なくとも１個のフコシル化またはシアル化バリアント、およびより好ましくは少なくとも２個のフコシル化バリアントまたは２個のシアル化バリアントを含む、少なくとも２個の異なるＩ型およびＩＩ型アセチルラクトサミンを認識する結合試薬の組み合わせの使用に関する。

【０２０７】

末端Ｆｕｃα２／３／４構造を有する好ましい構造

本発明はさらに、各種幹細胞およびその分化したバリアント、特に間葉系幹細胞およびその分化したバリアントの：

ａ）Ｉ型およびＩＩ型アセチルラクトサミンおよびそれらのフコシル化バリアント、ならびに好ましい一様態において

ｂ）非シアル化フコシル化、ならびにより好ましくは

ｃ）好ましくはＦｕｃα２末端および／またはＦｕｃα３／４分岐構造を有する、フコシル化Ｉ型およびＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造、ならびにさらに好ましくは

ｄ）好ましくはＦｕｃα２末端を有する、フコシル化Ｉ型およびＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造

を認識する、本発明の方法のための結合試薬の組み合わせの使用に関する。

【０２０８】
好ましいＦｕｃα２構造の亜群としては、モノフコシル化Ｈ型およびＨＩＩ型構造、ならびにジフコシル化Ｌｅｗｉｓ　ｂおよびＬｅｗｉｓ　ｙ構造等が挙げられる。
【０２０９】
好ましいＦｕｃα３／４構造の亜群としては、モノフコシル化Ｌｅｗｉｓ　ａおよびＬｅｗｉｓ　ｘ構造、シアル化シアリル－Ｌｅｗｉｓ　ａおよびシアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘ構造、ならびにジフコシル化Ｌｅｗｉｓ　ｂおよびＬｅｗｉｓ　ｙ構造等が挙げられる。
【０２１０】
Ｆｕｃα３構造の好ましいＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン亜群としては、モノフコシル化Ｌｅｗｉｓ　ｘ構造、ならびにシアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘ構造およびＬｅｗｉｓ　ｙ構造等が挙げられる。
【０２１１】
Ｆｕｃα４構造の好ましいＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン亜群としては、モノフコシル化Ｌｅｗｉｓ　ａ、シアリル－Ｌｅｗｉｓ　ａおよびジフコシル化Ｌｅｗｉｓ　ｂ構造等が挙げられる。
【０２１２】
本発明はさらに、好ましくは、モノフコシル化または少なくとも２個のジフコシル化、または少なくとも１個のモノフコシル化および１個のジフコシル化構造の群から選択される、少なくとも２個の異なってフコシル化された１型および／または　および２型Ｎ－アセチルラクトサミン構造の使用に関する。
【０２１３】
本発明はさらに、フコシル化Ｉ型およびＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造を認識する結合試薬と；Ｆｕｃα２／３／４含有構造を有する他の末端構造、好ましくはＦｕｃα２末端構造であって、好ましくはＦｕｃα２Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃ末端、より好ましくはＦｕｃα２Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃα／βを有する構造、を認識する結合剤、および特に好ましい様態において、好ましくはグロボ（Ｇｌｏｂｏ）構造の末端構造中のＦｕｃα２Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβを認識する抗体と；の組み合わせの使用に関する。
【０２１４】
好ましいグロボおよびガングリオコア型構造
本発明はさらに、式：
式Ｔ１１
［Ｍ］$_{m}$Ｇａｌβ１－ｘ［Ｎα］$_{n}$Ｈｅｘ（ＮＡｃ）$_{p}$
［式中、ｍ、ｎおよびｐは独立に０または１の整数であり
ＨｅｘはＧａｌまたはＧｌｃであり、Ｘは結合位置であり；
ＭおよびＮは単糖残基であって
独立に無（前記位置の遊離水酸基）
ならびに／または
Ｇａｌの３位もしくは／およびＨｅｘＮＡｃの６位に結合したシアル酸であるＳＡα
Ｇａｌの３もしくは４位に結合したＧａｌα、または
Ｇａｌの４位に結合するＧａｌＮＡｃβ、ならびに／または
Ｇａｌの２位；および／もしくは、Ｇａｌが他の位置（４または３）に結合し、ＨｅｘＮＡｃがＧｌｃＮＡｃである場合、ＨｅｘＮＡｃの３もしくは４位；または、Ｇａｌが他の位置（３）に結合する場合、Ｇｌｃの３位；に結合したＦｕｃ（Ｌ－フコース）残基
であり、
ただし、ｍおよびｎの合計は２であり
好ましくはｍおよびｎは独立に０または１であり、ならびに
ＭがＧａｌαである場合、Ｇａｌβ１に結合するシアル酸は存在せず、
ならびに
ｎは０であり、ｘは好ましくは４であり、
ＭがＧａｌＮＡｃβである場合、Ｇａｌβ１にα６結合するシアル酸は存在せず、ｎは０

であり、ｘは４である］
の、グロボおよびガングリオ型グリカンコア構造を有する一般式に関する。
【０２１５】
本発明はさらに、式
式Ｔ１２
［Ｍ］［ＳＡα３］$_{n}$Ｇａｌβ１－４Ｇｌｃ（ＮＡｃ）$_{p}$、
［式中、ｎおよびｐは独立に０または１の整数であり、
ＭはＧａｌの３もしくは４位に結合したＧａｌα、またはＧａｌの４位に結合したＧａｌＮＡｃβであり、および／またはＳＡαはＧａｌの３位に結合したシアル酸分岐であり
ＭがＧａｌαである場合、Ｇａｌβ１に結合するシアル酸は存在しない（ｎは０である）
］
の、グロボおよびガングリオ型グリカンコア構造を有する一般式に関する。
【０２１６】
本発明はさらに、式
式Ｔ１３
［Ｍ］［ＳＡα］$_{n}$Ｇａｌβ１－４Ｇｌｃ
［式中、ｎおよびｐは独立に０または１の整数であり、
ＭはＧａｌの３もしくは４位に結合したＧａｌα、または
Ｇａｌの４位に結合したＧａｌＮＡｃβ
および／または
Ｇａｌの３位に結合したシアル酸であるＳＡαであり
ＭがＧａｌαである場合、Ｇａｌβ１に結合するシアル酸は存在しない（ｎは０である）
］
の、グロボおよびガングリオ型グリカンコア構造を有する一般式に関する。
【０２１７】
本発明はさらに、式
式Ｔ１４
Ｇａｌα３／４Ｇａｌβ１－４Ｇｌｃ
の、グロボ型グリカンコア構造を有する一般式に関する。好ましいグロボ型構造としては、Ｇａｌα３／４Ｇａｌβ１－４Ｇｌｃ、ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα３／４Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、Ｇａｌα４Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（グロボトリオース、Ｇｂ３）、Ｇａｌα３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（イソグロボトリオース）、ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα４Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（グロボテトラオース、Ｇｂ４（またはＧｌ４））、およびＦｕｃα２Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα３／４Ｇａｌβ４Ｇｌｃ等が挙げられる。または、前記結合剤が間葉系幹細胞に関して使用されない、もしくは前記結合剤が本発明の他の好ましい結合剤と一緒に使用される場合、好ましい結合剤標的に対する他のグロボ型結合剤として、好ましくはさらにＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα４Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（ＳＳＥＡ－３抗原）および／またはＮｅｕＡｃα３Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα４Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（ＳＳＥＡ－４抗原）またはその末端の非還元末端二もしくは三糖エピトープ等が挙げられる。
【０２１８】
好ましいグロボテトラオシルセラミド（ｇｌｏｂｏｔｅｔｒａｏｓｙｌｃｅｒａｍｉｄｅ）抗体はＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα４Ｇａｌβ４Ｇｌｃの非還元末端伸長バリアントを認識しない。実施例中の抗体はこのような特異性を・・？
【０２１９】
本発明はさらに、好ましくは、糖脂質に結合しない場合のＮｅｕＡｃα３Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃ、ＮｅｕＡｃα３Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ、ＮｅｕＡｃα３Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα４Ｇａｌ；ならびに新規フコシル化標的構造：Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα３／４Ｇａｌ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡ

ｃβ３、およびＦｕｃα２Ｇａｌβ３ＧａＩＮＡｃ；等の、より長いオリゴ糖配列の特異的エピトープのための結合剤に関する。

【０２２０】

本発明はさらに、式

式Ｔ１５

［ＧａｌＮＡｃβ４］［ＳＡα］$_{n}$Ｇａｌβ１－４Ｇｌｃ

［式中、ｎおよびｐは独立に０または１の整数であり

Ｇａｌの４位に結合したＧａｌＮＡｃβ、および／またはＧａｌの３位に結合したシアル酸分岐であるＳＡα］

の、グロボおよびガングリオ型グリカンコア構造を有する一般式に関する。好ましいガングリオ型構造としては、ＧａｌＮＡｃβ４Ｇａｌβ１－４Ｇｌｃ、ＧａｌＮＡｃβ４［ＳＡα３］Ｇａｌβ１－４Ｇｌｃ、およびＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ４［ＳＡα３］Ｇａｌβ１－４Ｇｌｃ等が挙げられる。好ましい結合剤標的構造としては、さらに、好ましいオリゴ糖配列の糖脂質および可能な糖タンパク質複合体等が挙げられる。好ましい結合剤は好ましくは少なくとも二および三糖エピトープを特異的に認識する。

【０２２１】

ＧａｌＮＡｃα構造

本発明はさらに、式Ｔ１６：

［ＳＡα６］$_{m}$ＧａｌＮＡｃα［Ｓｅｒ／Ｔｈｒ］$_{n}$－［Ｐｅｐｔｉｄｅ］$_{p}$

［式中、ｍ、ｎおよびｐは独立に０または１の整数であり、

式中、ＳＡは好ましくはＮｅｕＡｃであるシアル酸であり、Ｓｅｒ／Ｔｈｒはセリンまたはスレオニン残基を表す］

のペプチド／タンパク質結合ＧａｌＮＡｃα構造の識別に関する。「Ｐｅｐｔｉｄｅ」はｍまたはｎのいずれかが１である場合の、結合残基に近いペプチド配列の部分を表す。

【０２２２】

Ｓｅｒ／Ｔｈｒおよび／またはＰｅｐｔｉｄｅは、任意に、少なくとも部分的に、結合剤による結合のための認識に必要である。Ｐｅｐｔｉｄｅが特異性に含まれる場合、抗体はタンパク質構造の一部を伴う高い特異性を有すると考えられる。シアリル－Ｔｎの好ましい抗原配列：ＳＡα６ＧａｌＮＡｃα、ＳＡα６ＧａｌＮＡｃαＳｅｒ／Ｔｈｒ、およびＳＡα６ＧａｌＮＡｃαＳｅｒ／Ｔｈｒ－Ｐｅｐｔｉｄｅ、ならびにＴｎ－抗原：ＧａｌＮＡｃαＳｅｒ／Ｔｈｒ、およびＧａｌＮＡｃαＳｅｒ／Ｔｈｒ－Ｐｅｐｔｉｄｅ。本発明はさらに、ＧａｌＮＡｃα構造の組み合わせ、ならびに少なくとも１個のＧａｌＮＡｃα構造と他の好ましい構造との組み合わせの使用に関する。

【０２２３】

好ましい結合基の組み合わせ

本発明は特に、少なくとも、ａ）フコシル化、好ましくはα２／３／４フコシル化構造、および／またはｂ）グロボ型構造、および／またはｃ）ＧａｌＮＡｃα型構造の組み合わせにおける使用に関する。異なる生合成を伴い、そのため幹細胞集団に対して特徴的な結合プロファイルを有する構造を認識する結合剤の組み合わせの使用が考えられる。より好ましくは、フコシル化構造およびグロボ構造、またはフコシル化構造およびＧａｌＮＡｃα型構造のための少なくとも１種の結合剤が用いられ、最も好ましくはフコシル化構造およびグロボ構造のためのものが用いられる。

【０２２４】

フコシル化および非修飾構造

本発明はさらに、コア二糖エピトープ構造であって該構造がシアル酸により修飾されていないものに関する（式Ｔ１ないしＴ３のＲ基または式Ｔ４ないしＴ７のＭもしくはＮがいずれもシアル酸ではない）。本発明は好ましい一様態において、少なくとも１個の本発明のフコース残基を有する構造に関する。これらの構造は新規特異的フコシル化末端エピトープであり、本発明の幹細胞の分析に有用である。好ましくは天然幹細胞が分析される。好ましいフコシル化構造としては、（ＳＡα３）$_{0\text{または}1}$Ｇａｌβ３／４（Ｆｕｃα

４／３）ＧｌｃＮＡｃ、例えばＬｅｗｉｓ　ｘおよびそのシアル化バリアント等の、ヒト幹細胞の新規α３／４フコシル化マーカなどが挙げられる。

【０２２５】

末端Ｆｕｃα１－２を有する構造の中で、本発明はＦｕｃα２ＧａｌＮＡｃα／βおよびＦｕｃα２Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）$_{0\text{または}1}$ＧｌｃＮＡｃβを有する特に有用な新規マーカ構造を明らかにし、これらは間葉系細胞中に存在することが見出された（表１９）。この群の中で特に好ましい抗体／結合剤群はＦｕｃα２Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβに特異的な抗体であり、高い幹細胞特異性のために好ましい。他の好ましい構造群としては、特異的構造群を形成することが明らかな糖脂質を有するＦｕｃα２Ｇａｌ等が挙げられる。Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβを認識する抗体の中で、結合における実質的な相違は担体構造に基づくものであるらしいことが明らかになった。本発明は特に、この種類の構造を認識し、抗体の特異性がフコースを有する間葉系細胞構造に結合するものと類似している抗体に関するものである。本発明は好ましくは、末端エピトープ表１９中に共通構造型として示されるＮ－グリカン上のＦｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβを認識する抗体に関する。別の一様態において、非結合クローンの抗体は他の細胞型の認識を対象とする。

【０２２６】

好ましい非修飾構造としては、Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃ、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ、Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ／α、およびＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ等が挙げられる。これらは各種幹細胞、特に間葉系細胞に特徴的な好ましい新規コアマーカである。好ましくは該構造を本発明の糖脂質コア構造が有しており、またはそれはＯ－グリカン上に存在する。非修飾マーカは、細胞状態の分析のための少なくとも１種のフコシル化または／およびシアル化構造との組み合わせにおける使用において好ましい。さらなる好ましい非修飾構造としては、ＧａｌＮＡｃβ構造等が挙げられ、末端ＬａｃｄｉＮＡｃ、ＧａｌＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃ、好ましくはＮ－グリカン上、およびグロボ系列糖脂質内にグロボテトラオース構造の末端として存在するＧａｌＮＡｃβ３ＧａｌＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌ等が挙げられる。これらのうち、Ｇａｌ（ＮＡｃ）β３含有Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃ、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ、Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ／α、およびＧａｌＮＡｃβ３ＧａｌＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌの特徴的亜群、ならびにＧａｌ（ＮＡｃ）β４含有Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、およびＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃの特徴的亜群が別々に好ましい。

【０２２７】

好ましいシアル化構造

好ましいシアル化構造としては、特徴的ＳＡα３Ｇａｌβ構造であるＳＡα３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ、ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ／α、およびＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ；ならびに生合成的に部分的に競合するＳＡα６Ｇａｌβ構造であるＳＡα６Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、ＳＡα６Ｇａｌβ４Ｇｌｃβ；ＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、およびＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ；ならびにジシアロ構造であるＳＡα３Ｇａｌβ３（ＳＡα６）ＧａｌＮＡｃβ／α、およびＳＡα３Ｇａｌβ３（ＳＡα６）ＧｌｃＮＡｃβ等が挙げられる。

【０２２８】

本発明は好ましくは、Ｇａｌ（ＮＡｃ）β３含有ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ、ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ／α、およびＳＡα３Ｇａｌβ３（ＳＡα６）ＧａｌＮＡｃβ／αの特異的亜群、ならびにＧａｌ（ＮＡｃ）β４含有シアル化構造に関する。ＳＡα３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、およびＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ；およびＳＡα６Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、ＳＡα６Ｇａｌβ４Ｇｌｃβ；ＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃおよびＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ、これらは各種間葉系幹細胞また

はその分化した派生物に対して特徴的な好ましい新規調節マーカ（ｒｅｇｕｌａｔｅｄ　ｍａｒｋｅｒ）である。

【０２２９】

末端ＭａｎαＭａｎα構造との併用

末端非修飾または修飾エピトープは好ましい様態において少なくとも１種のＭａｎαＭａｎ構造と併用される。これは、該構造が他のエピトープとは異なるＮ－グリカンまたはグリカン亜群中に存在するため好ましい。

【０２３０】

末端エピトープのコア構造

前記標的エピトープ構造は、特異的Ｎ－グリカン、Ｏ－グリカン上で、または糖脂質コア構造上で、最も効果的に認識されると考えられる。

【０２３１】

伸長エピトープ　－　エピトープの還元末端上の隣接する単糖／構造

本発明は特に、最適化された結合剤およびその生産に関するものであり、該結合剤の結合エピトープは隣接する結合構造、および、より好ましくは標的エピトープの還元側上に隣接する構造（Ｏ－グリカンについては単糖もしくはアミノ酸、または糖脂質についてはセラミド）の少なくとも一部を含む。本発明は実施例および表１９における要約に示すような末端エピトープのためのコア構造を明らかにした。

【０２３２】

より長い結合エピトープを有する抗体はより高い特異性を有しており、そのため所望の細胞または細胞由来成分をより効果的に認識すると考えられる。好ましい一様態において、伸長したエピトープに対する前記抗体が間葉型幹細胞の効果的な分析のために選択される。

【０２３３】

本発明は特に、抗体の選択の方法、および任意に、さらに、本発明の伸長エピトープを用いた、新規抗体または他の結合剤の精製の方法に関する。好ましい選択はグリカン構造（特異的配列を有する、合成、または分離された天然のグリカン）を血清または抗体またはファージディスプレイライブラリ等の抗体ライブラリに接触させることにより行われる。これらの方法に関するデータは当業者に周知であり、例えばｐｕｂｍｅｄ－医学文献データベース（ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｅｎｔｒｅｚ）、または特許、例えばｅｓｐａｃｅｎｅｔ（ｆｉ．ｅｓｐａｃｅｎｅｔ．ｃｏｍ）を検索することによりインターネットから入手できる。特異的抗体は、実施例および表１９の要約に示すようなグリカン型特異的末端構造の最適化された認識の使用に対して特に好ましい。

【０２３４】

本発明の実施例に示す抗体の一部は、伸長エピトープに対する特異性を有するとさらに考えられる。本願発明者らは、例えばＬｅｗｉｓ　ｘエピトープはＮ－グリカン上において、特定の末端Ｌｅｗｉｓ　ｘ特異的抗体により認識され得るが、ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミンまたはネオラクト系列糖脂質上に存在するＬｅｗｉｓ　ｘβ１－３Ｇａｌを認識する抗体によってはそれほど効果的には、あるいは全く、認識されないことを発見した。

【０２３５】

Ｎ－グリカン

本発明は特に、二分岐Ｎ－グリカン上の末端Ｎ－グリカンエピトープの識別に関する。Ｎ－グリカンのための好ましい非還元末端単糖エピトープとしてはβ２Ｍａｎおよびその還元末端がさらに伸長したバリアント、β２Ｍａｎ、β２Ｍａｎα、β２Ｍａｎα３、およびβ２Ｍａｎα６等が挙げられる。

【０２３６】

本発明は特に、Ａｊｉｔ　Ｖａｒｋｉほか　Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　（２００６）　Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　ｓｏｃｉｅｔｙ　ｍｅｅｔｉｎｇ　２００６　Ｌｏｓ　Ａｎｇｅｌｅｓの要旨に本発明によるこの種類の抗体と関連しない（放棄される）神経細胞

に関与する可能性とともに記載されたＮ－グリカンＬｅｗｉｓ　ｘ特異的抗体による、Ｎ－グリカン上のＬｅｗｉｓ　ｘの識別に関する。発明はさらに、Ｏｚａｗａ　Ｈ　ｅｔ　ａｌ　（１９９７）　Ａｒｃｈ　Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　３４２，　４８－５７に記載される、２型Ｎ－アセチルラクトサミンβ２Ｍａｎを認識する、二分岐Ｎ－グリカンを対象とする抗体の特異性を有する抗体に関する。

【０２３７】

Ｏ－グリカン、還元末端伸長エピトープ

本発明は特に、末端コアＩエピトープとしての、ならびにコアＩおよびコアＩＩ　Ｏ－グリカンの伸長バリアントとしての、末端Ｏ－グリカンエピトープの識別に関する。Ｏ－グリカンのための好ましい非還元末端単糖エピトープとしては：

ａ）αＳｅｒ／Ｔｈｒ－［Ｐｅｐｔｉｄｅ］$_{0-1}$に結合したコアＩエピトープ、［式中、Ｐｅｐｔｉｄｅは存在するまたは存在しないペプチドを表す。］を含む。本発明は好ましくは

ｂ）好ましくはコアＩＩ型エピトープ

Ｒ１β６［Ｒ２β３Ｇａｌβ３］$_{n}$ＧａｌＮＡｃαＳｅｒ／Ｔｈｒ

［式中、ｎは＝または１であって、該構造の有りうる分岐を表し、Ｒ１およびＲ２は末端エピトープの好ましい位置である］であり、Ｒ１はより好ましくは

ｃ）伸長コアＩエピトープ

［β３Ｇａｌおよびその還元末端がさらに伸長したバリアントβ３Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃα、β３Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃαＳｅｒ／Ｔｈｒ］

である。

【０２３８】

Ｏ－グリカンコアＩ特異的およびガングリオ／グロボ型コア還元末端エピトープが（Ｓａｉｔｏ　Ｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　（１９９４）２６９、５６４４－５２）において記載されており、本発明は好ましくは本発明のエピトープの同様な特異的認識に関する。Ｏ－グリカンコアＩＩシアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘ特異的抗体がＷａｌｃｈｅｃｋ　Ｂ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｌｏｏｄ（２００２）９９，４０６３－６９に記載されている。Ｏ－グリカンの識別のためのペプチド特異性を有する抗体としては、さらにＧａｌＮＡｃアルファ（Ｔｎ）またはＧａｌｂ３ＧａｌＮＡｃアルファ（Ｔ／ＴＦ）構造を認識するムチン特異的抗体（Ｈａｎｉｓｃｈ　Ｆ－Ｇ　ｅｔ　ａｌ（１９９５）ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５５、４０３６－４０；Ｋａｒｓｔｅｎ　Ｕ　ｅｔ　ａｌ．Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ（２００４）１４，６８１－９２）等が挙げられる。

【０２３９】

糖脂質コア構造

本発明はさらに、脂質構造上の構造の識別に関する。好ましい脂質コア構造としては、

ａ）Ｇａｌβ４Ｇｌｃに対するβＣｅｒ（セラミド）およびそのフコシルまたはシアリル誘導体

ｂ）ラクトシルＣｅｒ－糖脂質上のＩ型およびＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミンに対するβ３／６Ｇａｌであって、好ましい伸長バリアントとしてβ３／６［Ｒβ６／３］$_{n}$Ｇａｌβ、β３／６［Ｒβ６／３］$_{n}$Ｇａｌβ４およびβ３／６［Ｒβ６／３］$_{n}$Ｇａｌβ４Ｇｌｃが挙げられ、これはさらに、部分的により大きなエピトープとして認識され得る他のラクトサミン残基により分岐していてよく、ｎは０または１であって分岐を表し、Ｒ１およびＲ２は末端エピトープの好ましい位置である。好ましい直鎖（非分岐）共通構造としてはβ３Ｇａｌ、β３Ｇａｌβ、β３Ｇａｌβ４およびβ３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ等が挙げられる

ｃ）グロボ系列エピトープに対するα３／４Ｇａｌ、および伸長バリアントα３／４Ｇａｌβ、α３／４Ｇａｌβ４Ｇｌｃであって、好ましいグロボエピトープは伸長エピトープα４Ｇａｌ、α４Ｇａｌβ、α４Ｇａｌβ４Ｇｌｃを有し、そして、好ましいイソグロボエピトープは伸長エピトープα３Ｇａｌ、α３Ｇａｌβ、α３Ｇａｌβ４Ｇｌｃを有する

ｄ）ガングリオ系列エピトープ含有に対するβ４Ｇａｌであって、好ましい伸長バリアントとしてβ４Ｇａｌβ、およびβ４Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃが挙げられる
等が挙げられる。

【０２４０】

Ｏ－グリカンコア特異的およびガングリオ／グロボ型コア還元末端エピトープが（Ｓａｉｔｏ Ｓ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ（１９９４）２６９、５６４４－５２）に記載されており、本発明は好ましくは本発明のエピトープの同様な特異的認識に関する。

【０２４１】

ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン

Ｏ－グリカン、Ｎ－グリカン、または糖脂質上のポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン主鎖構造はＩ型（ラクト系列）およびＩＩ型（ネオラクト）糖脂質上のラクトシル（ｃｅｒ）コア構造に類似した特徴的構造を有するが、末端エピトープは他のＩ型またはＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミンに結合しており、これは分岐構造からのものでありうる。好ましい伸長エピトープとしては：
Ｉ型およびＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミンエピトープに対するβ３／６Ｇａｌ等が挙げられ、好ましい伸長バリアントとしてＲ１β３／６［Ｒ２β６／３］$_{n}$Ｇａｌβ、Ｒ１β３／６［Ｒ２β６／３］$_{n}$Ｇａｌβ３／４およびＲ１β３／６［Ｒ２β６／３］$_{n}$Ｇａｌβ３／４ＧｌｃＮＡｃ等が挙げられ、これはさらに、部分的により大きなエピトープとして認識され得る他のラクトサミン残基により分岐していてよく、ｎは０または１であって分岐を表し、Ｒ１およびＲ２は末端エピトープの好ましい位置である。好ましい直鎖（非分岐）共通構造としてはβ３Ｇａｌ、β３Ｇａｌβ、β３Ｇａｌβ４およびβ３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ等が挙げられる。

【０２４２】

数多くの抗体が直鎖（ｉ－抗原）および分岐ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン（Ｉ－抗原）に対して知られており、本発明はさらに、Ｉ－抗原の識別のためのレクチンＰＷＡの使用、およびｉ－抗原の識別のためのレクチンＳＴＡの使用に関する。本願発明者らは、ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミンが特定の型のヒト間葉系細胞に対して特徴的な構造であることを明らかにした。他の好ましい結合試薬、酵素エンド－ベーター－ガラクトシダーゼを用いて幹細胞の糖脂質上および糖タンパク質上のポリ－Ｎ－アセチルラクトサミンの分析を行った。この酵素はさらに、特定の型の幹細胞上の、本発明のフコシル化および／またはシアル化等の特異的末端修飾を有する直鎖および分岐鎖両者のポリ－Ｎ－アセチルラクトサミンの特徴的発現を明らかにした。

【０２４３】

伸長コアエピトープの組み合わせ

同一の末端エピトープが主要な担体型であるＯ－グリカン、Ｎ－グリカンおよび糖脂質の２種または３種上に存在する標的構造に結合する抗体に認識される場合、より強い標識が得られうると考えられる。さらに、このような使用に関して、末端エピトープは、有りうる混入細胞または混入細胞材料上に存在するエピトープと比べて十分に特異的である必要があると考えられる。さらに、高度に末端特異的な（ｔｅｒｍｉｎａｌｌｙ ｓｐｅｃｉｆｉｃ）抗体が存在し、これはいくつかの伸長構造上への結合を可能にすると考えられる。

【０２４４】

本発明は、幹細胞に関して有用なそれぞれの伸長結合剤型（ｅｌｏｎｇａｔｅｄ ｂｉｎｄｅｒ ｔｙｐｅ）を明らかにした。従って本発明は、１または複数種の本発明の伸長構造上の末端構造を認識する結合剤に関する。

【０２４５】

単糖伸長構造の好ましい群

本発明は伸長特異性（ｅｌｏｎｇａｔｅｄ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ）を有する結合剤の使用に関するものであり、該結合剤は式

ＡｘＨｅｘ（ＮＡｃ）$_{n}$、
［式中、Ａはアノマー構造アルファまたはベータであり、Ｘは結合位置２、３、４または６であり
ならびに、Ｈｅｘはヘキソピラノシル残基Ｇａｌ、またはＭａｎであり、ｎは０または１の整数であり、ｎが１である場合、ＡｘＨｅｘＮＡｃはβ４ＧａｌＮＡｃまたはβ６ＧａｌＮＡｃであり、ＨｅｘがＭａｎである場合、ＡｘＨｅｘはβ２Ｍａｎであり、および、ＨｅｘがＧａｌである場合、ＡｘＨｅｘはβ３Ｇａｌまたはβ６Ｇａｌである］
の少なくとも１種の還元末端伸長単糖エピトープを認識するか、またはそこに結合することができる。単糖伸長構造以外に、αＳｅｒ／Ｔｈｒが還元末端ＧａｌＮＡｃ含有Ｏ－グリカンのための好ましい還元末端伸長構造であり、βＣｅｒがラクトシル含有糖脂質エピトープのために好ましい。

【０２４６】

伸長構造の好ましい亜群としては、ｉ）Ｏ－グリカン、ポリラクトサミンおよび糖脂質コア上に存在する類似する構造エピトープ：β３／６Ｇａｌまたはβ６ＧａｌＮＡｃ；好ましいさらなる亜群は、ｉａ）β６ＧａｌＮＡｃ／β６Ｇａｌ、およびｉｂ）β３Ｇａｌ；ｉｉ）Ｎ－グリカン型エピトープβ２Ｍａｎ；ならびにｉｉｉ）グロボ系列エピトープα３Ｇａｌまたはα４Ｇａｌ等が挙げられる。前記群は、群内の有り得る交差反応における構造的類似性のために好ましく、背景となる材料が伸長構造型を欠くように制御されている場合に標識強度を高めるために用いることができる。

【０２４７】

有用な結合剤特異性を有するレクチンおよび伸長抗体エピトープは、（Ｄｅｂａｒａｙ ａｎｄ Ｍｏｎｔｒｅｕｉｌ （１９９１） Ａｄｖ. Ｌｅｃｔｉｎ Ｒｅｓ ４、５１－９６；“Ｔｈｅ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ｏｆ ｃｏｍｐｌｅｘ ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅｓ” Ａｄｖ Ｅｘｐ Ｍｅｄ Ｂｉｏｌ （２００１） ４９１ （ｅｄ Ａｌｂｅｒｔ Ｍ Ｗｕ） Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ／Ｐｌｅｎｕｍ ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；“Ｌｅｃｔｉｎｓ” ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ （２００３） （ｅｄｓ Ｓｈａｒｏｎ、Ｎａｔｈａｎ ａｎｄ Ｌｉｓ、Ｈａｌｉｎａ） Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ Ｄｏｒｄｒｅｃｈｔ、Ｔｈｅ Ｎｅａｔｈｅｒｌａｎｄｓ等の総説およびモノグラフ、および、ｐｕｂｍｅｄ／ｅｓｐａｃｅｎｅｔ等のインターネットデータベース、またはｗｗｗ．ｇｌｖｃｏ．ｉｓ．ｒｉｔｓｕｍｅｉ．ａｃ．ｊｐ／ｅｐｉｔｏｐｅ／等のモノクローナル抗体グリカン特異性を列挙した抗体データベース）から入手可能である。

【０２４８】

好ましい結合剤分子

本発明は、本発明の細胞、より具体的には本発明の好ましい細胞群および細胞型の分析に有用な各種の型の結合剤分子を明らかにした。好ましい結合剤分子は、細胞表面の炭水化物上の特異的な構造または構造的特徴に関する結合特異性に基づいて分類される。好ましい結合剤は特異的に複数の単糖残基を認識する。

【０２４９】

現在の結合剤分子のほとんど、例えば植物レクチンの全てまたはほとんどは、その特異性において最適ではなく、通常、各種結合を有する１種または数種の単糖を大まかに認識すると考えられる。さらに、該レクチンの特異性は、通常、ヒト型の数種のグリカンによって十分に分析されていない。

【０２５０】

好ましい高特異性結合剤は、

Ａ）少なくとも１種の単糖残基、およびそれらと他の単糖隣接単糖残基（ｍｏｎｏｓａｃｃｈａｒｉｄｅｓ ｎｅｘｔ ｍｏｎｏｓａｃｃｈａｒｉｄｅ ｒｅｓｉｄｕｅ）との間の特異的結合構造を認識し、ＭＳ１Ｂ１結合剤と称され、

Ｂ）より好ましくは少なくとも第２の単糖残基の一部を認識し、ＭＳ２Ｂ１結合剤と称され、

Ｃ）さらに好ましくは第２の結合構造および／または第３の単糖残基の少なくとも一部を認識し、ＭＳ３Ｂ２結合剤と称され、好ましくはＭＳ３Ｂ２は特異的な完全な三糖構造を認識し、

Ｄ）最も好ましくは前記結合構造は３個の結合構造を有する四糖を少なくとも部分的に認識し、ＭＳ４Ｂ３と称され、好ましくは該結合剤は完全な四糖配列を認識する。

【０２５１】

好ましい結合剤としては、天然のヒトおよび／または動物の、またはグリカンの特異的識別のために開発された他のタンパク質等が挙げられる。好ましい高特異性結合剤タンパク質は特異的抗体、好ましくはモノクローナル抗体；レクチン、好ましくは哺乳動物または動物レクチン；または、特異的糖転移酵素、より好ましくはグリコシダーゼ型酵素、糖転移酵素もしくはトランスグリコシル化酵素である。

【０２５２】

結合剤による細胞の調節

本発明は細胞型と関連する特異的結合剤を細胞の調節に用いることができることを明らかにした。好ましい一様態においては、（幹）細胞が炭水化物媒介相互作用に関して調節される。本発明は、グリカンの構造を変え、それにより受容体の構造および該グリカンの機能を変える特異的結合剤を明らかにした。これらは特にグリコシダーゼ、ならびに糖転移酵素および／またはトランスグリコシル化酵素等の糖転移酵素である。非酵素結合剤の結合それ自体が細胞を選択および／または操作するとさらに考えられる。操作は典型的には、グリカン受容体のクラスタリング；またはグリカン受容体の、細胞と関連する生物学的系またはモデルに存在するレクチン等のカウンタレセプタ（ｃｏｕｎｔｅｒ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ）との相互作用の影響；に依存する。本発明はさらに、細胞培養における結合剤による調節は細胞の増殖速度に関する効果を有することを明らかにした。

【０２５３】

好ましい結合剤の組み合わせ

本発明は、細胞の状態の分析のための、特異的末端構造の有用な組み合わせを明らかにした。好ましい一様態において、本発明は、本発明の２種の異なる末端構造の水準を、好ましくは特異的結合分子により、好ましくは少なくとも２種の異なる結合剤により、測定することに関する。好ましい一様態において、該結合分子は、末端受容体グリカン構造の修飾を示す構造を対象とし、好ましくは該構造は連続的な（基質構造およびその修飾、例えば末端Ｇａｌ構造および対応するシアル化構造）または競合的な生合成段階（例えば、末端Ｇａｌβ、または末端Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃおよびＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃの、フコシル化およびシアル化）を示す。他の様態において、前記結合剤は連続的または競合的な段階、例えば末端Ｇａｌ構造および対応するシアル化構造、を示す３種の異なる構造を対象とする。

【０２５４】

本発明はさらに、本発明の非修飾（非シアル化または非フコシル化）Ｇａｌ（ＮＡｃ）β３／４－コア構造、本発明の好ましいフコシル化構造および好ましいシアル化構造の群から選択される本発明の少なくとも２種の異なる構造の識別に関する。さらに、３種、より好ましくは４種、およびさらに好ましくは５種の、好ましくは、好ましい一構造群内に含まれる、異なる構造を識別することが有用であると考えられる。

【０２５５】

特異的結合剤の標的構造、および結合分子の例

末端構造の、特異的グリカンコア構造との組み合わせ

構造要素の一部は特異的に特定のグリカンコア構造と関連していると考えられる。特定のコア構造に結合する末端構造の識別は特に好ましく、このような高特異性試薬は本発明の物理化学的分析の水準にまでほとんど完全な個々のグリカンを識別する能力を有する。例えば本発明の多くの特異的マンノース構造は一般に本発明のＮ－グリカングライコームに極めて特徴的である。本発明は特に末端エピトープの識別に関する。

【０２５６】

いくつかのグリカンコア構造上の共通末端構造

本発明は、いくつかのグリカン型上に特定の共通構造の特徴が存在すること、および、前記試薬の特異性が末端構造に限定され、コア構造に対する特異性を有していない場合、異なるグリカン構造上の特定の共通エピトープを特異的試薬により識別することが可能であることを明らかにした。本発明は特に、本発明の特定の細胞型の特徴的末端特性を明らかにした。本発明において、共通エピトープが識別の効果を高めることが認められた。この共通末端構造は、該共通末端構造を実質的な量含んでいない、有り得る他の細胞型または材料との関連において、識別に特に有用である。本発明はＮ－グリカン、Ｏ－グリカンおよび／または糖脂質等の特定のコア構造上の末端構造の存在を明らかにした。本発明は好ましくは特定のグリカンコア型の識別を含む、前記構造のための特異的結合剤の選択に関する。

【０２５７】

本発明はさらに、Ｎ－グリカンおよびＯ－グリカン等のタンパク質結合グライコームならびに糖脂質のグライコーム組成に関するものであり、各組成は特異的な量のグリカン亜群を含む。本発明はさらに、特定の量の所定の末端構造を有する場合の前記組成に関する。

【０２５８】

特異的な好ましい構造群

本発明は、任意にさらに特異的コア構造を含んだ、特異的末端単糖型を有するオリゴ糖配列の識別に関する。好ましいオリゴ糖配列は、好ましい一様態において、末端単糖構造に基づき分類される。本発明はさらに、末端（非還元末端の末端）二糖エピトープのファミリを、β結合ガラクトピラノシル構造に基づき明らかにしたものであり、これはさらに、末端Ｇａｌ残基をＧａｌＮＡｃに変える、フコースおよび／もしくはシアル酸残基により、またはＮ－アセチル基により修飾されていてよい。このような構造はＮ－グリカン、Ｏ－グリカンおよび糖脂質サブグライコーム（ｓｕｂｇｌｙｃｏｍｅ）中に存在する。さらに、本発明は末端ＭａｎαＭａｎを有するＮ－グリカンの末端二糖エピトープに関する。

【０２５９】

前記構造は質量分析および任意にＮＭＲ分析により、および本発明の高特異性結合剤により得られ、糖脂質構造の分析に対してはパーメチル化（ｐｅｒｍｅｔｈｙｌａｔｉｏｎ）およびフラグメンテーション質量分析を用いた。Ｎ－グリカン、Ｏ－グリカンおよび糖脂質への公知の生合成経路を含む生合成分析を、グリカン組成の分析のためにさらに用いた。

【０２６０】

末端マンノース単糖を有する構造

好ましいマンノース型標的構造が本発明により特異的に分類された。これらは本発明の各種の高および低マンノース構造ならびにハイブリッド型構造を含む。

【０２６１】

好ましい末端Ｍａｎα－標的構造エピトープ

本発明は低マンノースＮ－グリカンおよび高マンノースＮ－グリカン上のＭａｎαの存在を明らかにした。生合成の知識に基づき、ならびに生合成酵素のｍＲＮＡの分析による、およびＮＭＲ分析による、この見解の支持に基づき、

前記構造および末端エピトープは：

Ｍａｎα２Ｍａｎ、Ｍａｎα３Ｍａｎ、Ｍａｎα６ＭａｎおよびＭａｎα３（Ｍａｎα６）Ｍａｎ

［式中、還元末端Ｍａｎは好ましくはαまたはβ結合グリコシド、およびＭａｎα２Ｍａｎの場合はα結合グリコシドである］であると明らかにすることができた。末端Ｍａｎα構造の一般構造は

$Man\alpha x(Man\alpha y)_z Man\alpha/\beta$

［式中、ｘは結合位置２、３または６であり、ｙは結合位置３または６であり、

ｚは０または１の整数であり、分岐の存在または非存在を表し、
ただしｘおよびｙは同一の位置ではなく、および
ｘが２の場合、ｚは０であり、還元末端Ｍａｎは好ましくはα結合する］
である。低マンノース構造は好ましくは他のマンノース残基に結合するα３および／またはα６マンノースを有する構造
Ｍａｎαｘ（Ｍａｎαｙ）$_{z}$Ｍａｎα／β
［式中、ｘおよびｙは３または６の結合位置であり、
ｚは０または１の整数であって分岐の存在または非存在を表す］
を有する非還元末端の末端エピトープを含む。高マンノース構造は末端α２結合マンノース：Ｍａｎα２Ｍａｎ（α）、ならびに任意に上記のα３および／またはα６マンノース構造のｏｎまたはいくつかを含む。末端Ｍａｎα構造の存在は幹細胞において制御されており、末端Ｍａｎα２構造を有する高Ｍａｎ構造の、Ｍａｎα３／６を有する低Ｍａｎ構造に対する、および／またはＧａｌ主鎖エピトープを有する複合型Ｎ－グリカンに対する割合は、細胞型特異的に相違する。データは、特異的末端Ｍａｎα２Ｍａｎおよび／またはＭａｎα３／６Ｍａｎを明らかにする結合剤が間葉系細胞の分析において非常に有用であることを示した。これまでの科学ではエピトープは細胞型または状態の特異的シグナルとして分析されなかった。本発明は特に、好ましくは２つの構造型、Ｍａｎα２Ｍａｎ構造およびＭａｎα３／６Ｍａｎ構造を同一試料から定量することにより、低Ｍａｎおよび高Ｍａｎ構造両者の量を測定することに関する。

【０２６２】

本発明は特に、本発明の好ましい幹細胞からの末端Ｍａｎα構造の識別のための酵素またはモノクローナル抗体等の高特異性結合剤に関する。本発明は特に、好ましくは、成体幹細胞、より好ましくは間葉系幹細胞からの、特に間葉系幹細胞の表面からの、および別の様態においては血液由来間葉系細胞、また別の好ましい群として臍帯血および骨髄幹および間葉系細胞からの、構造の検出に関する。好ましい一様態において、前記臍帯血および／または末梢血幹細胞は造血幹細胞ではない。

【０２６３】

低特異性または未分析の特異性の結合剤

末端マンノース構造の識別に好ましいものとしてマンノース単糖結合植物レクチン等が挙げられる。本発明は好ましい様態において、間葉系幹細胞等の幹細胞または間葉系細胞の、レクチンＰＳＡ（コアフコース構造に対する特異性も有する）等のＭａｎα認識レクチンによる識別に関する。好ましい一様態において、前記識別は透過性細胞中の細胞内グリカンを対象とする。他の一様態において、Ｍａｎα結合レクチンは、対応する実施例に示すように、線維芽細胞型細胞またはフィーダ細胞等の混入細胞集団から末端Ｍａｎαを識別するために、無傷の非透過性細胞に対して用いられる。

【０２６４】

好ましい高特異性結合剤

ｉ）特異的マンノース残基遊離酵素（ｒｅｌｅａｓｉｎｇ　ｅｎｚｙｍｅ）、例えば結合特異的マンノシダーゼ、より好ましくはα－マンノシダーゼまたはβ－マンノシダーゼ。

好ましいα－マンノシダーゼとしては、好ましくは非還元末端の末端を開裂するα－マンノシダーゼ等の結合特異的α－マンノシダーゼなどが挙げられ、好ましいマンノシダーゼの一例はタチナタマメα－マンノシダーゼ（Ｃａｎａｖａｌｉａ　ｅｎｓｉｆｏｒｍｉｓ；　Ｓｉｇｍａ，　ＵＳＡ）および相同なαマンノシダーゼ
特異的にもしくは他の結合よりも効果的にα２結合マンノース残基を、より好ましくは特異的にＭａｎα２構造を開裂するもの；または
特異的にもしくは他の結合よりも効果的にα３結合マンノース残基を、より好ましくは特異的にＭａｎα３構造を開裂するもの；または
特異的にもしくは他の結合よりも効果的にα６結合マンノース残基を、より好ましくは特異的にＭａｎα６構造を開裂するもの；

である。
好ましいβ－マンノシダーゼとしては、β４結合マンノースをＮ－グリカンコアＭａｎβ４ＧｌｃＮＡｃ構造の非還元末端の末端から開裂することができ、グライコーム中の他のβ結合した単糖を開裂しないβ－マンノシダーゼ等が挙げられる。
ｉｉ）本発明の好ましいマンノース構造を認識する特異的結合タンパク質。好ましい試薬として抗体および抗体の結合ドメイン（Ｆａｂフラグメント等）、ならびに他の改変された炭水化物結合タンパク質等が挙げられる。本発明はＭＳ２Ｂ１およびより好ましくはＭＳ３Ｂ２構造を認識する抗体に関する。
【０２６５】
中性Ｎ－グリカンのマンノシダーゼ分析。
α－マンノシダーゼ結合剤によるマンノシル化グリカンの検出、ならびに臍帯血および末梢血間葉系細胞および実施例１の分化した細胞のグリカンの質量分析プロファイリングの例；本発明によって記載される$Man_{1-4}GlcNAc\beta4(Fuc\alpha6)_{0-1}GlcNAc$含有低マンノースグリカンのＭａｎβ４、Ｍａｎα３／６末端構造の全ての種類の存在を示す。
【０２６６】
レクチン結合
α結合マンノースは実施例２においてヒト間葉系細胞に対してレクチンＨｉｐｐｅａｓｔｒｕｍ　ｈｙｂｒｉｄ（ＨＨＡ）およびＰｉｓｕｍ　ｓａｔｉｖｕｍ（ＰＳＡ、特にコアフコースも認識）により示された。レクチンの結果は、ｈＭＳＣがＮ－グリカン等のその表面複合糖質上にマンノース、より具体的にはα結合マンノース残基を発現していることを示唆している。有り得るα－マンノース結合としてはα１→２、α１→３、およびα１→６等が挙げられる。Ｇａｌａｎｔｈｕｓ　ｎｉｖａｌｉｓ（ＧＮＡ）レクチンの低結合は、細胞表面上の一部のα－マンノース結合が他と比べて優勢であることを示唆している。末端Ｍａｎα認識低親和性試薬の組み合わせは有用であり、マンノシダーゼスクリーニングにより得られた結果；ＮＭＲおよび質量分析の結果に対応すると思われる。
【０２６７】
マンノース結合レクチン標識
実施例２における間葉系細胞の標識は、蛍光標識に結合したヒト血清マンノース結合レクチン（ＭＢＬ）でも検出された。これは、この先天性免疫系成分のためのリガンドがｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養されたＢＭ　ＭＳＣ細胞表面上で発現され得ることを示唆している。本発明は特に、細胞表面上の末端Ｍａｎαの分析に関するものであり、それは該構造がＭＢＬおよび先天性免疫の他のレクチンに対するリガンドであるためである。さらに、末端Ｍａｎα構造は、血液循環中で細胞を肝臓のＫｕｐｆｅｒ細胞等のマンノース受容体含有組織に導くと考えられる。本発明は特に、末端Ｍａｎα構造を認識する結合剤の結合による、前記構造の量の制御に関する。
【０２６８】
好ましい一様態において、本発明は、幹細胞へのレクチン（精製または好ましくは組み替え型のレクチン、好ましくは標識された形態）の結合の試験により、ヒトに存在するレクチン、例えば先天性免疫のレクチンおよび／または組織もしくは白血球のレクチンの、幹細胞上のリガンドの存在を試験することに関する。このようなレクチンとして、特に本発明のＭａｎαおよびＧａｌβ／ＧａｌＮＡｃβ構造（末端の非還元末端またはα６シアル化型も）等に結合するレクチンが挙げられると理解される。
【０２６９】
マンノース結合抗体
高マンノース結合抗体は例えばＷａｎｇ　ＬＸ　ｅｔ　ａｌ　（２００４）　１１　（１）　１２７－３４に記載されている。トリマンノシルコア構造等の短いマンノシル化構造に対する特異的抗体も公開されている。
【０２７０】
末端Ｇａｌ単糖を有する構造

好ましいガラクトース型標的構造が特に本発明により分類された。これらは本発明の各種のＮ－アセチルラクトサミン構造を含む。

【０２７１】

末端Ｇａｌのための、低特異性または未分析の特異性の結合剤

末端ガラクトース構造の識別に好ましいものとして、リシンレクチン（トウゴマ（ｒｉｃｉｎｕｓ　ｃｏｍｍｕｎｉｓ）凝集素ＲＣＡ）、ピーナッツレクチン（／凝集素ＰＮＡ）等の植物レクチンなどが挙げられる。低分解能結合剤（ｌｏｗ　ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ　ｂｉｎｄｅｒ）は様々な広範な特異性を有する。

【０２７２】

好ましい高特異性結合剤としては

ｉ）特異的ガラクトース残基遊離酵素、例えば結合特異的ガラクトシダーゼ、より好ましくはα－ガラクトシダーゼまたはβ－ガラクトシダーゼ。好ましいα－ガラクトシダーゼとしては、特定の細胞調製物から明らかになったＧａｌα３Ｇａｌ構造を開裂し得る結合ガラクトシダーゼ（ｌｉｎｋａｇｅ　ｇａｌａｃｔｏｓｉｄａｓｅ）等が挙げられる。

【０２７３】

好ましいβ－ガラクトシダーゼとしては、β４結合ガラクトースを非還元末端の末端Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ構造から開裂することができ、グライコーム中の他のβ結合単糖は開裂しない、およびβ３結合ガラクトースを非還元末端の末端Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ構造から開裂することができ、グライコーム中の他のβ結合単糖は開裂しない
β－ガラクトシダーゼなどが挙げられる。

ｉｉ）本発明の好ましいガラクトース構造を認識する特異的結合タンパク質。好ましい試薬としては抗体および抗体の結合ドメイン（Ｆａｂフラグメント等）、ならびに他の改変された炭水化物結合タンパク質およびガレクチン等の動物レクチンなどが挙げられる。

【０２７４】

特異的結合剤実験およびＧａｌβ構造に対する実施例

前記構造の特異的エキソグリコシダーゼ分析が、間葉系細胞に対しては実施例に、および糖脂質に対しては実施例７に含まれる。末端Ｇａｌβおよびシアル酸発現に関連するシアル化度分析が実施例４に含まれる。

【０２７５】

本発明のＧａｌβエピトープの結合のために好ましい酵素結合剤としては、β１，４－ガラクトシダーゼ、例えばＳ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅからのもの（大腸菌における組み替え体、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、ＵＳＡ）、β１，３－ガラクトシダーゼ（大腸菌における組み替え体、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、等）；糖転移酵素：α２，３－（Ｎ）－シアル酸転移酵素（ラット、Ｓ．　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａにおける組み替え体、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）、特異的Ｎ－アセチルラクトサミンエピトープＦｕｃ－ＴＶＩ、特にＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃを認識することが知られるα１，３－フコシルトランスフェラーゼＶＩ（ヒト、Ｓ．　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａにおける組み替え体、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）等が挙げられる。植物低特異性レクチン、例えばＲＣＡ、ＰＮＡ、ＥＣＡ、ＳＴＡ、およびＰＷＡ、データはＭＳＣに対しては実施例２に、臍帯血に対しては実施例３に、細胞増殖のためのレクチン結合剤の効果は実施例６に、臍帯血細胞の選択は実施例に示す。実施例８に、特にフコシル化およびガラクトシル化された構造の抗体標識を示す。

【０２７６】

ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン配列。

アメリカヤマゴボウ（ｐｏｋｅｗｅｅｄ）（ＰＷＡ）およびＳｏｌａｎｕｍ　ｔｕｂｅｒｏｓｕｍ（ＳＴＡ）レクチンによる細胞の標識は、細胞が、Ｎ－および／またはＯ－グリカンおよび／または糖脂質等のそれらの表面複合糖質上に、ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン配列を発現することを明らかにするであろう。結果はさらに、細胞表面ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン鎖が直鎖および分岐鎖配列の両者を有することを示唆する。

【０２７７】

末端ＧａｌＮＡｃ－単糖を有する構造

好ましいＧａｌＮＡｃ型標的構造が特に本発明により明らかにされた。これらは特に、本発明のＬａｃｄｉＮＡｃ、ＧａｌＮＡｃβＧｌｃＮＡｃ型構造を含む。

【０２７８】

末端ＧａｌＮＡｃのための、低特異性または未分析の特異性の結合剤

いくつかの植物レクチンが末端ＧａｌＮＡｃの認識に関して報告されている。一部のＧａｌＮＡｃ認識レクチンは好ましいＬａｃｄｉＮＡｃ構造の低特異性認識のために選択されてよいと理解される。

【０２７９】

Ｗｉｓｔｅｒｉａ ｆｌｏｒｉｂｕｎｄａ凝集素およびＬｏｔｕｓ ｔｅｔｒａｇｏｎｏｌｏｂｕｓ凝集素等の低特異性結合剤植物レクチンは、オリゴ糖配列に結合する（Ｓｒｉｖａｔｓａｎ Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ（１９９２）２（５）４４５－５２：Ｄｏ、ＫＹ ｅｔ ａｌ．Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ（１９９７）７（２）１８３－９４；Ｙａｎ、Ｌ．，ｅｔ ａｌ（１９９７）Ｇｌｙｃｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｊ．１４（１）４５－５５）。論文は、前記レクチンが、細胞が該レクチンに認識される他の構造を有していないと確認される場合に、構造の識別に有用であることも示している。

【０２８０】

好ましい一様態において、低特異性レアクチン（ｌｅａｃｔｉｎ）試薬が、結合を確認する他の試薬と組み合わせて用いられる。

【０２８１】

好ましい高特異性結合剤として

ｉ）本発明は、β結合ＧａｌＮＡｃが、β－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼ酵素と組み合わせた特異的β－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼ酵素によって認識され得ることを明らかにした。この組み合わせは、末端単糖および少なくとも結合構造の一部を示す。

【０２８２】

好ましいβ－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼとしては、非還元末端の末端ＧａｌＮＡｃβ４／３構造からβ結合ＧａｌＮＡｃを開裂することができるがグライコーム中のα結合したＨｅｘＮＡｃは開裂しない酵素等が挙げられる；好ましいＮ－アセチルグルコサミニダーゼとしては、β結合したＧｌｃＮＡｃは開裂し得るがＧａｌＮＡｃは開裂しない酵素等が挙げられる。特異的結合タンパク質が本発明の好ましいＧａｌＮＡｃβ４、より好ましくはＧａｌＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃの構造を認識する。好ましい試薬としては抗体および抗体の結合ドメイン（Ｆａｂフラグメント等）、ならびに他の改変された炭水化物結合タンパク質等が挙げられる。

【０２８３】

ＬａｃｄｉＮＡｃ構造を認識する抗体の例として、Ｎｙａｍｅ Ａ．Ｋ．ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ ９（１０）１０２９－３５；ｖａｎ Ｒｅｍｏｏｒｔｅｒｅ Ａ．ｅｔ ａｌ（２０００）Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ １０（６）６０１－６０９；および、ｖａｎ Ｒｅｍｏｏｒｔｅｒｅ Ａ．ｅｔ ａｌ（２００１）Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６９（４）２３９６－２４０１の文献が挙げられる。前記抗体はマウスおよびヒトの寄生虫（Ｓｈｉｓｔｏｓｏｍａ）との関連で分析されたが、本発明によると、これらの抗体は間葉系幹細胞のスクリーニングにおいても用いることができる。本発明は特に、本発明のＮ－グライコーム中に存在するサブグライコームおよびグリカン構造に特異的なＬａｃｄｉＮａｃ認識抗体の特異的クローンの選択に関する。

【０２８４】

前記論文は、本発明と類似した抗体結合特異性およびこのような抗体を生産する方法を開示しており、そのため、前記抗体結合剤は当業者にとって明白である。特定のＬａｃｄｉＮＡｃ構造の免疫原性はヒトおよびマウスにおいて示される。

【０２８５】

グリコシダーゼを前記構造の識別に用いることは本発明におけると同様に従来技術にお

いて公知であり、例えばＳｒｉｖａｔｓａｎ Ｊ．ｅｔ ａｌ．（１９９２） ２（５） ４４５－５２が挙げられる。

【０２８６】

末端ＧｌｃＮＡｃ単糖を有する構造

好ましいＧｌｃＮＡｃ型標的構造が本発明により具体的に明らかになった。これらは特に本発明のＧｌｃＮＡｃβ－型構造を含む。

【０２８７】

末端ＧｌｃＮＡｃに対する低特異性または未分析の特異性の結合剤

いくつかの植物レクチンでは末端ＧｌｃＮＡｃの認識が報告されている。一部のＧｌｃＮＡｃ認識レクチンは好ましいＧｌｃＮＡｃ構造の低特異性認識のために選択され得ると考えられる。

【０２８８】

好ましい高度に特異的な高特異性結合剤として

ｉ）本発明は、β結合ＧｌｃＮＡｃが特異的β－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼ酵素により認識され得ることを明らかにした。好ましいβ－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼとしては、非還元末端の末端ＧｌｃＮＡｃβ２／３／６構造からβ結合ＧｌｃＮＡｃを開裂することができるが、グライコーム中のβ結合ＧａｌＮＡｃまたはα結合ＨｅｘＮＡｃは開裂しない酵素等が挙げられる；

ｉｉ）本発明の構造である、好ましいＧｌｃＮＡｃβ２／３／６、より好ましくはＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎαを認識する特異的結合タンパク質。好ましい試薬としては抗体および抗体の結合ドメイン（Ｆａｂフラグメント等）、ならびに他の改変された炭水化物結合タンパク質等が挙げられる。

【０２８９】

特異的結合剤実験および末端ＨｅｘＮＡｃ（ＧａｌＮＡｃ／ＧｌｃＮＡｃおよびＧｌｃＮＡｃ構造に対する実施例

前記構造のための特異的エキソグリコシダーゼ分析が間葉系細胞に対しては実施例１に、および糖脂質に対しては実施例７に含まれる。ＷＦＡおよびＧＮＡＩＩ等の植物性低特異性レクチン、およびデータを、ＭＳＣに対する実施例２に、該レクチン結合剤の細胞増殖に対する効果を実施例６に示す。

【０２９０】

前記構造の識別のために好ましい酵素としては、一般的なヘキソサミニダーゼであるタチナタマメからのβ－ヘキソサミニダーゼ（Ｃ．ｅｎｓｉｆｏｒｍｉｓ、Ｓｉｇｍａ、ＵＳＡ）、およびＳ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅからのβ－グルコサミニダーゼ（大腸菌における組み替え体、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、ＵＳＡ）等の特異的Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼまたはＮ－アセチルガラクトサミニダーゼ等が挙げられる。これらの組み合わせによりＬａｃｄｉＮＡｃの決定が可能となる。

【０２９１】

本発明はさらに、Ｈｏｌｍｅｓ ａｎｄ Ｇｒｅｅｎｅ（１９９１） ２８８（１） ８７－９６に記載されるような末端ＧｌｃＮＡｃβ構造を認識し、いくつかの末端ＧｌｃＮＡｃ構造に対する特異性を有する特異的モノクローナル抗体による、前記構造の分析に関する。本発明は特に、前記構造に対する抗体の選択および生産のための、本発明の末端構造の使用に関する。

【０２９２】

標的構造の確認は、糖脂質構造のための質量分析およびパーメチル化／フラグメンテーション分析を含む。

【０２９３】

末端フコース－単糖を有する構造

好ましいフコース型標的構造が本発明により特異的に分類された。これらは本発明の各種のＮ－アセチルラクトサミン構造を含む。本発明はさらに、Ｎ－グリカンコア、ＧｌｃＮＡｃβ４（Ｆｕｃα６）ＧｌｃＮＡｃのラクトサミン類似α６－フコシル化エピトープ

に対する識別および他の方法に関する。本発明は、レクチンＰＳＡ（Ｋｏｒｎｆｅｌｄ（１９８１）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２５６、６６３３－６６４０； Ｃｕｍｍｉｎｇｓ ａｎｄ Ｋｏｒｎｆｅｌｄ（１９８２）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２５７、１２３５－４０）によって認識され得るこのような構造が例えば胚幹細胞および間葉系幹細胞中に存在することを明らかにした。

【０２９４】

末端Ｆｕｃのための、低特異性または未分析の特異性の結合剤

末端フコース構造の識別に好ましいものとして、フコース単糖結合植物レクチンが挙げられる。Ｕｌｅｘ ｅｕｒｏｐｅａｕｓおよびＬｏｔｕｓ ｔｅｔｒａｇｏｎｏｌｏｂｕｓのレクチンは、例えば末端フコースを認識し、それぞれα２結合構造および分岐α３フコースに対するある程度の特異性結合（ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ ｂｉｎｄｉｎｇ）を有することが報告されている。データをＭＳＣに対する実施例２に、および細胞増殖に対するレクチン結合剤の効果を実施例６に示す。

【０２９５】

好ましい高特異性結合剤として

ｉ）特異的フコース残基遊離酵素、例えば結合フコシダーゼ（ｌｉｎｋａｇｅ ｆｕｃｏｓｉｄａｓｅ）、より好ましくはα－フコシダーゼ。

好ましいα－フコシダーゼとしては、特定の細胞調製物から明らかになったＦｕｃα２ＧａｌおよびＧａｌβ４／３（Ｆｕｃα３／４）ＧｌｃＮＡｃ構造を開裂することができる結合フコシダーゼ等が挙げられる。

【０２９６】

特異的エキソグリコシダーゼおよび前記構造に対しては間葉系細胞のための実施例１に、および糖脂質に対しては実施例７に示す。好ましいフコシダーゼとしてはα１，３／４－フコシダーゼ、例えばＸａｎｔｈｏｍｏｎａｓ ｓｐ．由来のα１，３／４－フコシダーゼ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、ＵＳＡ）、およびα１，２－フコシダーゼ、例えばＸ．ｍａｎｉｈｏｔｉｓ由来のα１，２－フコシダーゼ（Ｇｌｙｋｏ）等が挙げられる，

【０２９７】

ｉｉ）本発明の好ましいフコース構造を認識する特異的結合タンパク質。好ましい試薬としては抗体および抗体の結合ドメイン（Ｆａｂフラグメント等）、ならびに他の改変された炭水化物結合タンパク質、ならびに、Ｌｅｗｉｓ ｘであるＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ、およびシアリルＬｅｗｉｓ ｘであるＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ等のＬｅｗｉｓ型構造を特に認識する、セレクチン等の動物レクチンなどが挙げられる。好ましい抗体としては、特異的にＬｅｗｉｓ ｘ、およびシアリル－Ｌｅｗｉｓ ｘ等のＬｅｗｉｓ型構造を認識する抗体が挙げられる。より好ましくは前記Ｌｅｗｉｓ ｘ抗体は典型的なＳＳＥＡ－１抗体ではないが、該抗体は、Ｎ－グリカンコアに結合したＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα等の特異的タンパク質結合Ｌｅｗｉｓ ｘ構造を認識する。

【０２９８】

ｉｉｉ）本発明はさらに、Ｎ－グリカンコア、ＧｌｃＮＡｃβ４（Ｆｕｃα６）ＧｌｃＮＡｃのα６フコシル化エピトープの識別に関する。本発明はレクチンＰＳＡまたはレンズ豆（ｌｅｎｔｉｌ）レクチン（Ｋｏｒｎｆｅｌｄ（１９８１）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２５６、６６３３－６６４０）による構造による、または特異的モノクローナル抗体（例えばＳｒｉｋｒｉｓｈｎａ Ｇ．ｅｔ ａｌ（１９９７）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ２７２、２５７４３－５２）による、このような構造の識別に関する。本発明はさらに、グリカンエピトープを含む細胞グリカン成分の単離、および、さらなる分析のための対照画分としての、レクチンに結合していない幹細胞Ｎ－グリカンの単離の方法に関する。

【０２９９】

末端シアル酸－単糖を有する構造

好ましいシアル酸型標的構造が本発明により特異的に分類された。

【０３００】
末端シアル酸のための、低特異性または未分析の特異性の結合剤
末端シアル酸構造の識別に好ましいものとして、シアル酸単糖結合植物レクチンが挙げられる。
【０３０１】
好ましい高度に特異的な高特異性結合剤として
ｉ）特異的シアル酸残基遊離酵素、例えば結合シアリダーゼ、より好ましくはα－シアリダーゼ。
好ましいα－シアリダーゼとしては、本発明の特定の細胞調製物から明らかになった、ＳＡα３ＧａｌおよびＳＡα６Ｇａｌ構造を開裂し得る結合シアリダーゼ等が挙げられる。 結合特異性を有する好ましい低特異性レクチンとしては、ＳＡα３Ｇａｌ構造に特異的なレクチン、好ましくはＭａａｃｋｉａ ａｍｕｒｅｎｓｉｓレクチン、および／またはＳＡα６Ｇａｌ構造に特異的なレクチン、好ましくはＳａｍｂｕｃｕｓ ｎｉｇｒａ凝集素等が挙げられる。
【０３０２】
ｉｉ）本発明の好ましいシアル酸オリゴ糖配列構造を認識する特異的結合タンパク質。好ましい試薬として抗体および抗体の結合ドメイン（Ｆａｂフラグメント等）、ならびに他の改変された炭水化物結合タンパク質、ならびに、シアリルＬｅｗｉｓ ｘであるＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ等のＬｅｗｉｓ型構造を特に認識するセレクチンまたはシアル酸を認識するシグレック（Ｓｉｇｌｅｃ）タンパク質などの動物レクチン等が挙げられる。好ましい抗体としては特異的にシアリル－Ｎ－アセチルラクトサミンおよびシアリル－Ｌｅｗｉｓ ｘを認識する抗体などが挙げられる。
【０３０３】
ＮｅｕＧｃ構造のための好ましい抗体としては、構造ＮｅｕＧｃα３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（ＮＡｃ）$_{0\text{または}1}$および／またはＧａｌＮＡｃβ４［ＮｅｕＧｃα３］Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（ＮＡｃ）$_{0\text{または}1}$を認識する抗体等が挙げられ、式中、［］は構造中の分岐を表し、（）$_{0\text{または}1}$は存在するまたは存在しない構造を表す。好ましい一様態において、本発明は抗体による、好ましくはモノクローナル抗体またはヒト／ヒト化モノクローナル抗体による、Ｎ－グリコリル－ノイラミン酸構造の識別に関する。好ましい抗体はＰ３抗体の可変領域を含む。
【０３０４】
特異的結合剤実験およびα３／６シアル化構造に対する実施例
前記構造に対する特異的エキソグリコシダーゼ分析が、間葉系細胞に対しては実施例１に、および糖脂質に対しては実施例７に含まれる。末端Ｇａｌβおよびシアル酸発現と関連したシアル化水準の分析を実施例４に示す。本発明のシアル酸エピトープの結合のために好ましい酵素結合剤としては：Ａ．ｕｒｅａｆａｃｉｅｎｓ由来の一般的シアリダーゼα２，３／６／８／９シアリダーゼ（Ｇｌｙｋｏ）、Ｓ． ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ由来のα２，３－シアリダーゼ等のα２，３－シアリダーゼ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、ＵＳＡ）などの、シアリダーゼなどが挙げられる。他の有用なシアリダーゼは大腸菌およびコレラ菌から知られている。特異的Ｎ－アセチルラクトサミンエピトープ、特にＳα１，３－フコシルトランスフェラーゼＶＩ（ヒト、Ｓ．ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａにおける組み替え体、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）はＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃを有するＦｕｃ－ＴＶＩを認識することで知られる。ＭＡＡおよびＳＮＡ等の植物低特異性レクチン、およびデータは、ＭＳＣに対しては実施例２に、臍帯血に対しては実施例３に、細胞増殖に対するレクチン結合剤の効果は実施例６に、臍帯血細胞選択は実施例に示す。実施例８においては、シアリル構造の抗体標識を示す。
【０３０５】
幹細胞型特異的ガレクチンおよび／またはガレクチンリガンドのための好ましい使用
実施例に記載されるように、本願発明者らは各種幹細胞が異なったガレクチン発現プロファイルおよび異なったガレクチン（グリカン）リガンド発現プロファイルを有すること

も見出した。本発明はさらに、ガラクトース結合試薬、優先的にはガラクトース結合レクチン、より優先的には特異的ガレクチンを幹細胞型特異的な様式で用い、記載の使用に対して本発明に記載されるように特定の幹細胞を調節する、またはそれに結合させることに関する。さらに好ましい一様態において、本発明は、ガレクチンリガンド構造、その誘導体、またはリガンド模倣試薬を、本発明に記載される使用に対して幹細胞型特異的な様式で用いることに関する。

【０３０６】

本発明は好ましい一様態において、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃおよびＧａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ構造の識別のための、上記のガレクチンによる、細胞からの末端Ｎ－アセチルラクトサミンの識別に関する：結果はさらに、幹細胞および間葉系細胞における豊富なガレクチンリガンドの発現、特に非還元末端β－ＧａｌおよびＩＩ型ＬａｃＮＡｃ、ポリＬａｃＮＡｃ、β１，６－分岐ポリＬａｃＮＡｃならびに複合型Ｎ－グリカンの発現、を示すグリカン分析の結果と相関している。

【０３０７】

幹細胞グライコーム分析の特定の技術的態様

グリカンおよびグリカン画分の単離

本発明のグリカンは当該分野で公知の方法により単離することができる。好ましいグリカン調製法は次のステップからなる：

１°　グリカン含有画分を試料から単離するステップ

２°　．．．任意に前記画分をグライコーム分析に有用な純度に精製するステップ

好ましい単離法は分析されるべき所望のグリカン画分に応じて選ばれる。単離法は次の方法：

１°　水または他の親水性溶媒による抽出であって、水溶性グリカンまたは遊離オリゴ糖もしくは糖ペプチド等の複合糖質を生成するもの

２°　疎水性溶媒による抽出であって、糖脂質等の疎水性複合糖質を生ずるもの

３°　Ｎ－グリコシダーゼ処理、特にＦｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｍｅｎｉｎｇｏｓｅｐｔｉｃｕｍ　Ｎ－グリコシダーゼＦ処理であって、Ｎ－グリカンを生ずるもの

４°　ホウ化水素等の還元剤を用いた、または用いない、アルカリ処理、例えば弱い（０．１Ｍ等）水酸化ナトリウムまたは濃アンモニア処理であって、前者の場合、炭酸塩等の保護剤の存在下で処理が行われ、Ｏ－グリカン等のβ脱離産物（β－ｅｌｉｍｉｎａｔｉｏｎ　ｐｒｏｄｕｃｔ）および／もしくはＮ－グリカン等の他の脱離産物を生ずるもの

５°　エンドグリコシダーゼ処理、例えばエンド－β－ガラクトシダーゼ処理、特にＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｆｒｅｕｎｄｉｉエンド－β－ガラクトシダーゼ処理であって、ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミングリカン鎖もしくは酵素特異性に応じて類似の産物からの断片を生ずるもの、ならびに／または

６°　プロテアーゼ処理、例えば広範囲のまたは特異的なプロテアーゼ処理、特にトリプシン処理であって、糖ペプチド等のタンパク質分解断片を生ずるもの

の１つまたは組み合わせ、またはもとの試料の画分を生ずる他の分画法であってよい。

【０３０８】

遊離したグリカンは任意にシアル化および非シアル化亜画分（ｓｕｂｆｒａｃｔｉｏｎ）に分けられ、別々に分析される。本発明によると、これは中性グリカン成分の改善された検出のために、特にそれらが分析対象の試料中で希な場合に、および／または試料の量が少ないもしくは質が低い場合に、好ましい。好ましくは、このグリカン分画はグラファイトクロマトグラフィ（ｇｒａｐｈｉｔｅ　ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ）により達成される。

【０３０９】

本発明によると、シアル化グリカンは任意に、上記の非シアル化グリカン特異的単離手順において非シアル化グリカン画分とともに単離されるような様式で修飾され、非シアル化およびシアル化グリカン成分の両者に対して同時に改善された検出がもたらされる。好

ましくは、この修飾は非シアル化グリカン特異的単離手順の前に行われる。好ましい修飾方法としてはノイラミニダーゼ処理およびシアル酸カルボキシル基の誘導体化等が挙げられ、好ましい誘導体化法として該カルボキシル基のアミド化およびエステル化等が挙げられる。

【０３１０】

グリカン遊離法

好ましいグリカン遊離法としては次の方法：

遊離グリカン　－　遊離グリカンの、例えば水または適した水－溶媒混合物による抽出。

Ｏ－およびＮ－結合グリカン等のタンパク質結合グリカン　－　タンパク質結合グリカンのアルカリ脱離（ａｌｋａｌｉｎｅ　ｅｌｉｍｉｎａｔｉｏｎ）、次いで任意に遊離したグリカンの還元を行う。

ムチン型および他のＳｅｒ／Ｔｈｒ　Ｏ－結合グリカン　－　グリカンのアルカリβ脱離（ａｌｋａｌｉｎｅ　β－ｅｌｉｍｉｎａｔｉｏｎ）、次いで任意に遊離したグリカンの還元を行う。

Ｎ－グリカン　－　酵素的遊離（ｅｎｚｙｍａｔｉｃ　ｌｉｂｅｒａｔｉｏｎ）、任意に、例えばＣ．　ｍｅｎｉｎｇｏｓｅｐｔｉｃｕｍ由来のＮ－グリコシダーゼＦ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来のエンドグリコシダーゼＨ、またはアーモンド由来のＮ－グリコシダーゼＡ等のＮ－グリコシダーゼ酵素を用いる。

スフィンゴ糖脂質等の脂質結合グリカン　－　エンドグリコセラミダーゼ酵素を用いた酵素的遊離；化学的遊離；オゾン分解遊離。

グリコサミノグリカン　－　グリコサミノグリカンを開裂するエンドグリコシダーゼ、例えばコンドロイナーゼ（ｃｈｏｎｄｒｏｉｎａｓｅ）、コンドロイチンリアーゼ、ヒアルロンダーゼ（ｈｙａｌｕｒｏｎｄａｓｅ）、ヘパラナーゼ、ヘパラチナーゼ、もしくはケラタナーゼ／エンド－ベーター－ガラクトシダーゼを用いた処理；またはＯ－グリコシドグリコサミノグリカンに対するＯ－グリカン遊離法の使用；またはＮ－グリコシドグリコサミノグリカンに対するＮ－グリカン遊離法もしくは特異的グリコサミノグリカンコア構造を開裂する酵素の使用；または特異的化学的亜硝酸開裂法、特にアミン／Ｎ－硫酸エステル含有グリコサミノグリカンに対するもの

グリカン断片　－　特異的エキソまたはエンドグリコシダーゼ酵素、例えばケラタナーゼ、エンド－β－ガラクトシダーゼ、ヒアルロニダーゼ、シアリダーゼ、または他のエキソおよびエンドグリコシダーゼ酵素；化学的開裂法；物理的方法

等が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３１１】

本発明の分析のための好ましい標的細胞集団および型

初期ヒト細胞集団

ヒト幹細胞および多分化能細胞

最も広い様態において、本発明は全ての型のヒト間葉系細胞および間葉系幹細胞に関するものであり、これは新鮮な、かつ培養されたヒト間葉系細胞を意味する。本発明の細胞は、天然の細胞に似た分化を示し得るが典型的には染色体の変化またはウイルス感染による非天然の発生を示す、従来の癌細胞株は含まない。間葉系細胞には、他の細胞型に分化することができる全ての型の良性多分化能細胞が含まれる。幹細胞は細胞分裂後に幹細胞のまま存在できる特別な能力、自己複製能を有する。間葉系細胞の好ましい型は臍帯血細胞および／または骨髄由来細胞等の血液組織（ｂｌｏｏｄ　ｔｉｓｓｕｅ）由来間葉系細胞である。

【０３１２】

ヒト間葉系細胞に対する最も広い様態において、本発明は、新規の特別なグリカンプロファイル、および該グリカンプロファイルを対象とした新規の分析論、試薬および他の方法を記載する。本発明は、ヒト幹細胞の新規グリカンプロファイルに関して、細胞集団における特有の相違を示す。

【０３１３】
本発明はさらに、本発明の好ましい細胞集団に関する新規構造および関連した発明に関する。本発明はさらに、特定の好ましい細胞集団に関連する特異的グリカン構造、特に末端エピトープに関するものであり、該細胞集団に対して該構造は新しいものである。
【０３１４】
間葉系初期ヒト細胞の好ましい型
本発明は細胞の組織起源（ｔｉｓｓｕｅ　ｏｒｉｇｉｎ）および／またはその分化状態に基づく、間葉系初期ヒト細胞の特異的な型に関する。
【０３１５】
本発明は特に、ドナー個体の年齢、ならびに細胞が由来する組織の種類、例えば年上の個体または成人からの好ましい臍帯血および骨髄、などの細胞の由来に基づく、初期ヒト細胞集団、すなわち多分化能間葉系細胞およびそれに由来する細胞集団に関する。分化状態を基盤とした好ましい分類は、好ましくは「固形組織前駆」細胞、より好ましくは「間葉系幹細胞」、または固形組織に分化する細胞、もしくは外胚葉、中胚葉、もしくは内胚葉、より優先的には特に間葉系幹細胞に分化し得る細胞を含む。
【０３１６】
本発明はさらに、細胞培養に関連する状態に基づく初期ヒト細胞の分類および２つの主要な種類の細胞材料に関する。本発明は好ましくは、新鮮な、冷凍の、および培養の細胞を含む初期ヒト細胞の２つの主要な細胞材料型に関する。
【０３１７】
臍帯血細胞、胚性細胞および骨髄細胞
本発明は特に、ドナー個体の年齢および細胞が由来する組織の種類などの細胞の由来に基づく、間葉系初期ヒト細胞集団、すなわち多分化能細胞および
ａ）１）ヒト新生児、好ましくは臍帯血および関連する材料に関するもの、および２）胚細胞型材料、などの若齢（ｅａｒｌｙ　ａｇｅ　ｃｅｌｌ）細胞から
ｂ）年上の個体（非新生児、好ましくは成人）由来の幹および前駆細胞から、好ましくはヒト「血液関連組織」由来の、好ましくは骨髄細胞を含むものから
由来する細胞集団に関する。
【０３１８】
固形組織、好ましくは間葉系幹細胞に分化する細胞
本発明は特に、好ましい一様態の下で、「固形組織前駆細胞」と称する非造血組織に分化することができる細胞、すなわち血液細胞以外の細胞に分化する細胞に関する。より好ましくは、固形組織に分化するために産生される前記細胞集団は「間葉系細胞」であり、これは中胚葉起源の細胞、より好ましくは間葉系幹細胞に効果的に分化し得る多分化能細胞である。
【０３１９】
グリコシル化の従来技術のほとんどは本発明の間葉系細胞および間葉系幹細胞と極めて異なる特徴を有する造血細胞に関するものである。
【０３２０】
本発明の好ましい固形組織前駆細胞としては、臍帯血の選択された間葉系多分化能細胞集団、臍帯血から培養された間葉系幹細胞、骨髄から培養された／得られた間葉系幹細胞、および胚性細胞由来の間葉系細胞等が挙げられる。より具体的な一様態において、好ましい固形組織前駆細胞は間葉系幹細胞、より好ましくは「血液関連間葉系細胞」、さらに好ましくは骨髄または臍帯血に由来する間葉系幹細胞である。
【０３２１】
具体的一様態の下で、臍帯血のさらなる造血幹細胞型としてのＣＤ３４＋含有幹細胞またはＣＤ３４＋細胞一般は、前記固形組織前駆細胞から除外される。
【０３２２】
初期血液細胞（ｅａｒｌｙ　ｂｌｏｏｄ　ｃｅｌｌ）集団および対応する間葉系幹細胞
臍帯血

前記初期血液細胞集団は多分化能細胞に富んだ血液細胞材料を含む。好ましい初期血液細胞集団としては、多分化能細胞に富む末梢血細胞、骨髄血細胞および臍帯血細胞等が挙げられる。好ましい一様態において、本発明は初期血液または初期血液由来細胞集団に由来する間葉系幹細胞、好ましくは該細胞集団の分析に関する。

【０３２３】

骨髄

初期血液細胞の他の別に好ましい群は骨髄血細胞である。これらの細胞も多分化能細胞を含む。好ましい一様態において、本発明は骨髄細胞集団に由来する間葉系幹細胞、好ましくは該細胞集団の分析に関する。

【０３２４】

間葉系初期ヒト血液由来細胞の好ましい亜集団

本発明は特に、初期ヒト細胞の亜集団に関する。好ましい一様態において、該亜集団は抗体による選択によって産生され、他の様態においては特定の細胞型に有利な細胞培養により産生される。好ましい一様態において、前記細胞は抗体選択法により、好ましくは初期血液細胞から産生される。好ましくは、前記初期ヒト血液細胞は臍帯血細胞に由来する。

【０３２５】

好ましくは、均質な細胞集団は該細胞集団の細胞表面マーカに対する特異的結合剤の結合により選択される。好ましい一様態において、前記の均質な細胞は、ＣＤ３４マーカと低い相関を有し、細胞表面上の間葉系細胞マーカと高い相関を有する細胞表面マーカにより選択される。

【０３２６】

本発明は、好ましい一様態において、天然細胞、すなわち遺伝的に改変されていない細胞に関する。遺伝的改変は細胞および改変された細胞からの背景を変えることが知られている。本発明はさらに、好ましい一様態において、新鮮な非培養細胞に関する。

【０３２７】

本発明は、特別な分化能の細胞、好ましくはヒト血液細胞、またはより好ましくはヒト臍帯血骨髄もしくは末梢血細胞に由来する細胞の分析のためのマーカの使用に関する。

【０３２８】

ヒト臍帯血由来の再現可能に高度に精製された単核完全細胞（ｍｏｎｏｎｕｃｌｅａｒ　ｃｏｍｐｌｅｔｅ　ｃｅｌｌ）集団の好ましい純度

本発明は特に、ヒト臍帯血由来の精製された間葉系細胞集団の産生に関する。上記の通り、ヒト臍帯血由来の高度に精製された完全細胞（ｃｏｍｐｌｅｔｅ　ｃｅｌｌ）調製物の産生は当該分野において問題であった。最も広い様態において、本発明は本発明のヒト臍帯血の生物学的等価物に関するものであり、これらは同様なマーカを有し、本発明のＣＤ１３３＋細胞集団および等価物と同様に分離された際に同様な細胞集団を生ずるか、または臍帯血と等価な細胞が、さらに他の細胞型も含む試料に含まれる。臍帯血と同様の特性は少なくとも部分的にヒトの出生前に存在し得ると考えられる。本願発明者らは、高度に精製された細胞集団を、シアル化グリカンおよび関連するマーカの正確な分析に有用な純度で初期ヒト細胞から生成することが可能であることを見出した。

【０３２９】

好ましい骨髄由来間葉系細胞

本発明はヒト骨髄由来の間葉系多分化能細胞集団または初期ヒト血液細胞に関する。もっとも好ましいのは骨髄由来間葉系幹細胞である。好ましい一様態において、本発明は、骨および／または軟骨等の、構造的な支持機能を有する細胞に分化する間葉系幹細胞に関する。

【０３３０】

これまでに言及されている各種因子が幹細胞の生き残り、複製、および分化の能力に影響する。例えば、栄養に関しては、アミノ酸タウリンは特定の条件下で齧歯類骨髄細胞が破骨細胞を形成するのを優先的に阻害し（Ｋｏｉｄｅ、ｅｔ　ａｌ．、１９９９、Ａｒｃ

ｈ Ｏｒａｌ Ｂｉｏｌ ４４：７１１－７１９）、アミノ酸Ｌ－アルギニンは赤血球の分化および赤血球前駆細胞の増殖を刺激し（Ｓｈｉｍａ，ｅｔ ａｌ．，２００６、Ｂｌｏｏｄ １０７：１３５２－１３５６）、Ｐ２Ｙ受容体を介して作用する細胞外ＡＴＰは造血および非造血幹細胞の両者に対して多種多様な変化を媒介し（Ｌｅｅ、ｅｔ ａｌ．，２００３，Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ １７：１５９２－１６０４）、多孔質高分子足場（ｐｏｒｏｕｓ ｐｏｌｙｍｅｒ ｓｃａｆｆｏｌｄ）に付着したアルギニン－グリシン－アスパラギン酸は骨芽細胞前駆体の分化および生き残りを促進する（Ｈｕ、ｅｔ ａｌ．，２００３，Ｊ Ｂｉｏｍｅｄ Ｍａｔｅｒ Ｒｅｓ Ａ ６４：５８３－５９０）：これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする。従って、各種栄養を特定の型の幹細胞および／またはその子孫の分化の誘導または生存能力の維持のために用いることは当業者にとって公知であろう。

【０３３１】

胚性細胞に由来する間葉系細胞集団

本発明は特に、胚性細胞集団に由来する間葉系細胞を対象とした方法に関するものであり、好ましくは該間葉系細胞は血液組織／細胞由来間葉系細胞に類似しているかまたはそれらと等価である、好ましい一様態において、前記使用はヒト胚の商業的または産業的使用も、ヒト胚の破壊も伴わない。本発明は特定の一様態の下で、法律上許容される任意の時と場合における、胚細胞、および胚幹細胞等の胚由来材料の使用に関する。法律は国や地域によって異なることが理解される。

【０３３２】

本発明はさらに、胚関連の、廃棄された、または自然に損傷を受けた材料であって、ヒト胚として生存能力が無く、ヒト胚とは見なされ得ない材料の使用に関する。さらに他の様態において、本発明は、偶然損傷を受けた胚材料であってヒト胚として生存能力が無く、ヒト胚とは見なされ得ない材料の使用に関する。本発明はさらに、Ｙａｍａｎａｋａ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２００７のヒト線維芽細胞由来細胞等の再プログラムされた（ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｅｄ）胚様細胞由来細胞から得られた細胞に関する。

【０３３３】

さらに、出生および正常分娩過程の臍帯の除去後のヒト臍帯または胎盤に由来する初期ヒト血液は倫理的に議論の対象とならない廃棄物であり、ヒトの部分を形成しないと理解される。

【０３３４】

本発明はさらに、本発明の細胞材料と等価な細胞材料に関する。さらに、機能的におよび生物学的にも類似した細胞がクローニング技術等の人為的な方法により得ることができると理解される。

【０３３５】

間葉系細胞および間葉系多分化能／幹細胞

本発明は「間葉系細胞」すなわち間葉系幹細胞およびそれらから分化した細胞に関する。本発明はさらに、本発明の好ましい細胞集団としての間葉系幹細胞または多分化能細胞に関する。好ましい間葉系幹細胞としては初期ヒト細胞、好ましくはヒト臍帯血またはヒト骨髄から得られた細胞等が挙げられる。好ましい一様態において、本発明は、骨および／もしくは軟骨等の構造的な支持機能を有する細胞または脂肪組織等の軟組織を形成する細胞に分化する間葉系幹細胞に関する。分化した間葉系細胞としては、骨および／もしくは軟骨等の構造的な支持機能を有する細胞または脂肪組織等の軟組織を形成する細胞などの、間葉系幹細胞に由来する分化した細胞型等が挙げられる。前記の分化した細胞は、好ましい一様態において、組織に変化し得る、かつ組織に組み込まれ得る能力を有する細胞である。前記の分化した細胞はさらに、標的組織細胞型へと分化する能力を有していてよい。好ましい一様態において、前記の分化した細胞はｉｎ ｖｉｔｒｏで間葉系幹細胞から、好ましくはｉｎ ｖｉｔｒｏ細胞培養法により、産生される。該細胞培養法は、より特異的な組織型細胞への間葉系幹細胞の分化を完全にまたは部分的に引き起こし、より好ましい一様態において、この分化は幹細胞の分化に対して当該分野に公知のｒａｎｅ ｓ

ｉｍｉｌａにおいて起こり、および／または数週間ないし数ヶ月、例えば２週間ないし６ヶ月、好ましくは１ないし３ヶ月などの実施例における分化した細胞の分化の範囲内で起こり、ならびにこの分化はより短い時間枠で起こるように最適化されてよいと理解される。

【０３３６】

細胞状態の制御およびグリコシル化分析による潜在的混入

細胞状態の制御

原料細胞集団の制御

本発明は治療において用いるための細胞集団のグリコシル化の制御に関する。

【０３３７】

本発明は特に、細胞材料のグリコシル化の制御に関するものであり、好ましくはここで、

１）細胞材料の由来と移植材料の潜在的レシピエントとの間に相違がある。好ましい一様態においては、潜在的な個体間の特異性の相違が細胞材料のドナーと該細胞材料のレシピエントとの間に存在する。好ましい一様態においては、本発明は動物またはヒト、より好ましくはヒトに特異的、個体特異的なグリコシル化の相違に関する。個体特異的な相違は好ましくは初期ヒト細胞、初期ヒト血液細胞および胚性細胞の単核細胞集団中に存在する。本発明は好ましくは公知の個体特異的相違、例えば赤血球上の血液型抗原の変化の観察に関するものではない。

２）材料中の疾患特異的変異による変異の可能性がある。本発明は特に、感染性疾患、炎症性疾患または悪性疾患と関連する本発明の初期細胞集団中のグリコシル化の相違の探索に関する。本願発明者らの一部は多数の癌および腫瘍を分析し、初期細胞中の特定のグリコシル化型と類似した型のグリコシル化を観察した。しかし、本発明の治療的に有用な良性間葉系細胞と有害な癌細胞とでは細胞型および個々の試料間の変異に明らかな違いが存在すると理解される。癌は現在のところ予測不能な細胞グリコシル化の変化を引き起こし、これはグライコームのレベルで、および単一グリカンのエピトープのレベルでさえも、偶然一部が類似し、ほとんどの部分では他の天然グリコシル化とは異なっている場合があり、そのためこれらを識別するための綿密な分析が有用である。

３）例えば細胞材料における、種、系統、集団、隔離集団、または品種特異的相違に関し、細胞が得られた動物、好ましくはヒトにおける特異的な個体間の生物学的相違の可能性がある。

４）特定の細胞集団が細胞治療用途に用いられ得ることが証明された場合、グリカン分析は、該細胞集団を臨床の場において有用であることが知られている細胞集団と同一の特徴を有するように制御するために用いることができる。

【０３３８】

細胞培養中の時間依存的変化

さらに、細胞の長期培養において、自然突然変異が培養細胞材料中に生ずる場合がある。培養細胞株中の突然変異はグリコシル化度に対して有害な欠陥を生じさせることが多いことに留意されたい。

【０３３９】

さらに留意すべきは、細胞の培養はグリコシル化の変化を引き起こす場合があるということである。各種の生物学的、有機および無機分子の質や濃度；温度、細胞密度または撹拌の度合い等の任意の物理的条件；などの細胞培養の任意のパラメータにおけるわずかな変化が、細胞材料およびグリコシル化における相違を引き起こす場合がある。本発明は、細胞に影響を与える任意の細胞培養パラメータによって引き起こされる細胞状態の変化を観察するために、本発明のグリコシル化変化をモニタリングすることに関する。

【０３４０】

本発明は好ましい一様態において、細胞の密度が変化した場合のグリコシル化変化の分析に関する。本願発明者らは、これが細胞培養においてグリコシル化の大きな影響を有することに気付いた。

【０３４１】
細胞の遺伝的または分化安定性に制限がある場合、これらはグリカン構造の変化の可能性を高めることがさらに理解される。分化の初期段階の細胞集団は異なった細胞集団を産生する能力を有している。本願発明者らは、初期ヒト細胞集団におけるグリコシル化変化を発見することができた。
【０３４２】
細胞株の分化
本発明は特に、細胞株の分化が観察される場合に本発明のグリコシル化変化を観察することに関する。好ましい一様態において、本発明は、本発明の初期ヒト細胞または他の好ましい細胞型から、中胚葉性の幹細胞への分化の観察のための方法に関する。
【０３４３】
細胞材料に不均一性が存在する場合、グリコシル化において観察し得る変化または有害な効果が引き起こされる場合がある。
【０３４４】
さらに、糖鎖構造における変化は、それが有害でなくとも、または機能的に未知であっても、細胞の正確な遺伝的状態に関する情報を得るのに用いることができる。
【０３４５】
本発明は特に、細胞培養中の細胞状態の変化を観察するための、グリコシル化の変化；好ましくはグリカンプロファイル、個々のグリカンシグナル、および／または個々のグリカンもしくはグリカン群の相対存在量における変化；の分析に関する。
【０３４６】
支持／フィーダ細胞株の分析
本発明は特に、幹細胞および初期ヒト細胞または他の好ましい細胞型の培養において用いられる支持／フィーダ細胞上の本発明のグリコシル化の相違を観察することに関する。一部の細胞は他の細胞よりも支持／フィーダ細胞として作用する優れた活性を有することが当該分野において知られている。好ましい一様態において、本発明はこれらの支持／フィーダ細胞上のグリコシル化の相違の観察のための方法に関する。この情報は幹細胞および初期ヒト細胞または他の好ましい細胞型の増殖を補助するための新規試薬の設計において用いることができる。
【０３４７】
作業条件による混入または細胞の変化
細胞操作中に細胞に対して有害なグリコシル化または有害なグリコシル化関連作用を誘発する条件および試薬
本願発明者らはさらに、混入グリカンと同一の関連する問題を伴う、有害なグリカンが細胞により発現されるように誘導する条件および試薬を明らかにした。本願発明者らは、通常の細胞精製過程において用いられるいくつかの試薬が初期ヒト細胞材料において変化を引き起こすことを見出した。細胞の操作中の前記物質は細胞材料のグリコシル化に影響する場合があると考えられる。これは作業下の細胞における前記構造の付着、吸収、または代謝的蓄積に基づくものであり得る。
【０３４８】
好ましい一様態において、前記細胞操作試薬は、抗原性の、または有害な構造であるグリカン成分、例えば細胞表面ＮｅｕＧｃ、Ｎｅｕ－Ｏ－Ａｃまたはマンノース構造の存在に関して試験される。この試験は特にヒト初期細胞集団およびその好ましい亜集団に対して好ましい。
【０３４９】
本願発明者らは、糖鎖構造の吸収または代謝的移送（ｍｅｔａｂｏｌｉｃ　ｔｒａｎｓｆｅｒ）が行われなかった場合の、細胞により発現されているグリカンに対する細胞培養中の各種エフェクタ分子の効果に注目する。エフェクタは典型的には、例えば細胞表面受容体の結合により、細胞へシグナルを媒介する。前記エフェクタ分子としては各種サイトカイン、増殖因子、ならびにそれらのシグナリング分子およびコレセプタ等が挙げられる

。エフェクタ分子は炭水化物またはレクチン等の炭水化物結合タンパク質であってもよい。

【０３５０】

有害なグリカンの混入またはグライコームレベルでの他の改変を回避するための制御された細胞単離／精製および培養条件

細胞の操作により引き起こされるストレス

単離／精製等の細胞の操作ならびに細胞貯蔵および細胞培養過程と関連する操作は細胞にとって自然な条件ではなく、物理的および化学的ストレスを細胞に対して引き起こすと考えられる。本発明は該ストレスによって引き起こされる潜在的な変化の制御を可能にする。この制御は常法と組み合わせられてよく、他の手法による、細胞の生存能力または細胞構造が無傷であることの通常の確認と組み合わせられてもよい。

【０３５１】

細胞操作ステップにおける物理的および／または化学的ストレスの例

細胞の洗浄および遠心分離は物理的ストレスを引き起こし、細胞膜構造を破壊または損傷する場合がある。非生理的流れ（ｎｏｎ－ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ｆｌｏｗ）条件下での細胞の精製および分離または分析も、細胞を特定の非生理的なストレスに曝露する。低温での細胞貯蔵過程および細胞保存および操作は膜構造に影響を与える。培地または他の溶液、特に細胞周囲の洗浄溶液、の組成の変化を伴う全ての操作ステップは、例えば変化した水と塩とのバランスにより、または細胞の生化学的および生理学的調節に影響する他の分子の濃度を変えることにより、細胞に影響を与える。

【０３５２】

細胞操作ステップにおけるストレスによるグライコーム変化の観察および制御

本願発明者らは、本発明の方法が、本発明により観察されるグライコームの少なくとも一部を通常効果的に改変する、細胞膜における変化を観察するのに有用であることを明らかにした。これは正確な構成および無傷構造細胞膜ならびに該構成の一部の特異的グリカン構造に関連すると理解される。

【０３５３】

本発明は特に、全グライコームおよび／または細胞表面グライコームの観察に関するものであり、これらの方法はさらに、特に細胞に対してストレスが大きい条件との関連において、特に細胞が物理的および／または化学的ストレスに曝露される場合に、細胞が無傷であるか分析するのに用いられることを目的とする。それぞれの新しい細胞操作ステップおよび／または細胞操作ステップのための新しい条件は、本発明の方法により制御されることに対して有用であると理解される。さらに、グライコームの分析は、特に炭水化物結合タンパク質（炭水化物結合活性を有する、レクチン、抗体、酵素および改変タンパク質）等の特異的炭水化物結合物質による結合などの他の方法による分析のための、もっとも効果的に変わるグリカン構造の探索のために有用であると考えられる。

【０３５４】

試薬に関して制御された細胞調製（単離または精製）

本願発明者らは一般的な細胞調製法の処理ステップを分析した。動物材料による潜在的混入の複数の発生源が発見された。

【０３５５】

本発明は特に、細胞調製過程の制御のための炭水化物分析法に関する。本発明は特に、該過程の各種ステップにおける、動物性グリカン、好ましくはＮ－グリコリルノイラミン酸による潜在的な混入を制御する方法に関する。

【０３５６】

本発明はさらに、細胞の単離において用いる特異的グリカン管理試薬（ｇｌｙｃａｎ　ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　ｒｅａｇｅｎｔ）に関する。

【０３５７】

前記グリカン管理試薬は３つのレベル：

１．観察可能な量の有害なグリカン構造、好ましくはＮ－グリコリルノイラミン酸ま

たはそれに関連した構造を含まないように管理された試薬
２．観察可能な量の、細胞調製に用いられるものと類似したグリカン構造を含まないように管理された試薬
３．観察可能な量の任意のグリカン構造を含まないように管理された試薬
において制御されてよい。管理レベル２および３は特に細胞状態がグリカン分析および／またはプロファイリング法により制御される場合に有用である。細胞調製における試薬が示されたグリカン構造を含んでいる場合、この制御がより困難になるか、または妨げられるであろう。さらに、前記グリカン構造は細胞状態を変える生物学的活性を示す場合があることに留意されたい。

【０３５８】

グリカン管理試薬を含む細胞調製法

本発明はさらに、グリカン管理試薬を含む特異的細胞精製法に関する。

【０３５９】

好ましい制御された細胞精製過程

結合剤が細胞の精製または他の方法のために用いられ、その後該結合剤のグリカンが生物学的作用を有し得る方法において細胞が用いられる場合、該結合剤は好ましくはグリカン管理またはグリカン中和（ｇｌｙｃａｎ　ｎｅｕｔｒａｌｉｚｅｄ）タンパク質である。

【０３６０】

本発明は特に、１または複数の以下のステップを含む、ヒト初期細胞の制御された産生に関する。次の方法における通常の試薬を用いた各ステップにおいては、外来グリカン材料による混入のリスクがあると考えられた。該方法は本発明の制御された試薬および材料の、該方法のステップ内における使用に関する。

【０３６１】

細胞の好ましい精製は、少なくとも１つの、管理された試薬の使用を含むステップを含み、より好ましくは少なくとも２つのステップが含まれ、より好ましくは少なくとも３つのステップ、および最も好ましくは少なくともステップ１、２、３、４、および６が含まれる。

１．細胞材料を管理された試薬で洗浄するステップ

２．抗体を基盤とした方法が用いられる場合、細胞材料は、好ましい一様態において、管理されたＦｃ受容体ブロッキング試薬によりブロックされるステップ。さらに、グリコシル化の一部が抗体の調製において必要とされる場合があり、より好ましい一様態においては末端除去（ｔｅｒｍｉｎａｌｌｙ　ｄｅｐｌｅｔｅｄ）グリカンが用いられると理解される。

３．細胞を、管理されたブロッキング材料と管理された細胞結合剤材料とを有する固定化された細胞結合剤材料に接触させるステップ。より好ましい一様態において、該細胞結合剤材料は本発明の磁性ビーズと管理されたゼラチン材料とを有する。好ましい一様態において、細胞結合剤材料は管理されており、好ましくは細胞結合剤抗体材料は管理されている。さもなくば、特に該抗体がＮ－グリコリルノイラミン酸を産生して産物を汚染する細胞株により産生される場合に、該細胞結合剤抗体はＮ－グリコリルノイラミン酸を含む場合もある。

４．固定化された細胞を管理されたタンパク質製剤または非タンパク質製剤で洗浄するステップ。好ましい方法において磁性ビーズは管理されたタンパク質製剤、より好ましくは管理されたアルブミン製剤で洗浄される。

５．固定化からの細胞の任意の解放ステップ。

６．精製された細胞の、管理されたタンパク質製剤または非タンパク質製剤による洗浄ステップ。

好ましい一様態において、好ましい方法は、初期ヒト細胞の精製、好ましくは臍帯血細胞の精製のための、免疫磁性ビーズを用いる方法である。

【０３６２】

本発明はさらに、細胞精製キット、好ましくは少なくとも１つの管理された試薬、より好ましくは少なくとも２個の管理された試薬、さらに好ましくは３つの管理された試薬、さらになお好ましくは４つの試薬を含む免疫磁性細胞精製キットに関するものであり、最も好ましくは好ましい管理された試薬は：アルブミン、ゼラチン、細胞精製のための抗体、および抗体であってもよいＦｃ受容体ブロッキング試薬の群から選択される。

【０３６３】

抗原性動物性グリカン等の有害なグリカンの混入

いくつかのグリカン構造混入細胞産物は産物の生物学的活性を弱める場合がある。

【０３６４】

有害なグリカンは細胞の操作中の生存能力、または細胞の治療的使用における生存能力および／または所望の生物活性および／または安全性に影響する場合がある。

【０３６５】

有害なグリカン構造はｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏにおける細胞の生存能力を、有害なレクチンまたは抗体の細胞への結合を引き起こしたり増加させたりすることによって低下させる場合がある。このようなタンパク質材料は、例えば細胞操作材料において用いられるタンパク質製剤中に含まれる場合がある。炭水化物標的レクチンはヒト組織および細胞上、特に血液中および内皮表面にも存在する。ヒト血中の炭水化物結合抗体は補体を活性化し、他の免疫反応をｉｎ　ｖｉｖｏで引き起こす場合がある。さらに、血中の免疫防御レクチンまたは白血球は通常と異なるグリカン構造に対する免疫防御を引き起こす場合がある。

【０３６６】

さらに有害なグリカンはｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏで細胞の有害な凝集を引き起こす場合がある。該グリカンは凝集および／または細胞表面レクチンに媒介される生物学的制御の変化によって細胞の発生状態における望ましくない変化を引き起こす場合がある。

【０３６７】

さらなる問題としては、有害なグリカンのアレルゲン性、および内皮／細胞の炭水化物受容体によるｉｎ　ｖｉｖｏでの細胞の誤ったターゲッティング等が挙げられる。

【０３６８】

全グライコームの共通構造の特徴および好ましい共通の準特徴（ｓｕｂｆｅａｔｕｒｅ）

本発明は幹細胞のための有用なグリカンマーカおよびその組み合わせ、ならびに特異的な量の主要グリカン構造を有するグライコーム組成を明らかにする。本発明はさらに、特異的末端およびコア構造ならびにその組み合わせに関する。

【０３６９】

本発明の細胞由来の好ましいグライコームグリカン構造および／またはグライコームは、

式Ｃ０：

R_1Ｈｅｘβｚ{R_3}$_{n1}$Ｈｅｘ（ＮＡｃ）$_{n2}$ＸｙR_2

［式中、Ｘはグリコシド結合した二糖エピトープβ４（Ｆｕｃα６）$_n$ＧＮであり、ここでｎは０または１であり、またはＸは無であり、そして

ＨｅｘはＧａｌまたはＭａｎまたはＧｌｃＡであり、

ＨｅｘＮＡｃはＧｌｃＮＡｃまたはＧａｌＮＡｃであり、

ｙはアノマー結合構造αおよび／またはβまたは誘導体化アノマー炭素からの結合であり、

ｚは結合位置３または４であり、ただしｚが４の場合、ＨｅｘＮＡｃはＧｌｃＮＡｃであり、およびその場合ＨｅｘはＭａｎであるか、または

ＨｅｘはＧａｌであるか、またはＨｅｘはＧｌｃＡであり、ならびに

ｚが３である場合、ＨｅｘはＧｌｃＡまたはＧａｌであり、ＨｅｘＮＡｃはＧｌｃＮＡｃまたはＧａｌＮＡｃであり；

ｎ１は０または１であってR_3の存在または非存在を表し；

ｎ２は０または１であってＮＡｃの存在または非存在を表し、ただしｎ２はＨｅｘβｚがＧａｌβ４である場合にのみ０であってよく、およびｎ２は好ましくは０であり、ｎ２構造は好ましくは糖脂質に由来するものであり；
R_1はコア結合に結合する１－４、好ましくは１－３、天然型炭水化物置換基、または無であり；
R_2は還元末端水酸基、化学的還元末端誘導体、またはタンパク質由来のアスパラギンＮ－グリコシドアミノ酸および／もしくはペプチドを含むアスパラギンＮ－グリコシド等の天然アスパラギンＮ－グリコシド誘導体、またはタンパク質由来のアスパラギンＮ－グリコシドアミノ酸および／もしくはペプチドを含むセリンもしくはスレオニン結合Ｏ－グリコシド等の天然セリンもしくはスレオニン結合Ｏ－グリコシド誘導体であり、または、ｎ２が１である場合、Ｒ２は無もしくはセラミド構造もしくはセラミド構造の誘導体、例えばリゾ脂質およびそのアミド誘導体であり；
Ｒ３は無であるか、または、ＧｌｃＮＡｃβ６、もしくはＧａｌＮＡｃ（ＨｅｘＮＡｃがＧａｌＮＡｃである場合）に結合するその還元末端にＧｌｃＮＡｃβ６を有するオリゴ糖、を示す分岐構造であり；またはＨｅｘがＧａｌであり、ＨｅｘＮＡｃがＧｌｃＮＡｃである場合、およびｚが３である場合、Ｒ３はＦｕｃα４もしくは無であり、およびｚが４である場合、Ｒ３はＦｕｃα３または無である］
の構造を有する。

【０３７０】

本発明のグリカン構造およびグライコームにおいて好ましい二糖エピトープとしては構造Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃ、ＧｌｃＡβ４ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃ、ＧｌｃＡβ３ＧｌｃＮＡｃ、ＧｌｃＡβ３ＧａｌＮＡｃ、およびＧａｌβ４Ｇｌｃ等が挙げられ、これはさらに還元末端炭素原子および非還元単糖残基から誘導体化されてよく、別の一様態においては還元末端残基から分岐してもよい。好ましい分岐エピトープとしてはＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃ、およびＧａｌβ３（ＧｌｃＮＡｃβ６）ＧａｌＮＡｃ等が挙げられ、これはさらに還元末端炭素原子および非還元単糖残基から誘導体化されてよい。

【０３７１】

本発明の方法のための好ましいエピトープ
Ｎ－アセチルラクトサミンＧａｌβ３／４ＧｌｃＮＡｃ末端エピトープ

２つのＮ－アセチルラクトサミンエピトープＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃおよび／またはＧａｌβ３ＧｌｃＮＡｃは、好ましい末端エピトープであって、幹細胞上またはこの好ましい末端エピトープの主鎖構造上に存在するものを表し、例えばさらに本発明のシアル酸またはフコース誘導体化を有する。好ましい一様態において、本発明はフコシル化および／または非置換グリカン非還元末端型の末端エピトープ、より好ましくはフコシル化および非置換型に関する。本発明は特に、ヒト幹細胞グライコームからの非還元末端の末端（非置換）天然Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃおよび／またはＧａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ構造に関する。本発明は特定の様態においてヒト幹細胞グライコームからの非還元末端の末端フコシル化天然Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃおよび／またはＧａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ構造に関する。

【０３７２】

好ましいフコシル化Ｎ－アセチルラクトサミン

好ましいフコシル化エピトープは式ＴＦ：
$(Fuc\alpha 2)_{n1}Gal\beta 3/4(Fuc\alpha 4/3)_{n2}GlcNAc\beta-R$
［式中、
ｎ１は０または１であってＦｕｃα２の存在または非存在を表し；
ｎ２は０または１であってＦｕｃα４／３（分岐）の存在または非存在を表し、および
ＲはＮ－グリカン、Ｏ－グリカンおよび／または糖脂質の還元末端コア構造である］
のものである。

【０３７３】

好ましい構造としては、従って、１型ラクトサミン（Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ基盤）：
Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃ（Ｌｅｗｉｓ　ａ）、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ　Ｈ－１型、構造、および、
Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃ　（Ｌｅｗｉｓ　ｂ）および
２型ラクトサミン（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ基盤）：
Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ（Ｌｅｗｉｓ　ｘ）、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ　Ｈ－２型、構造、および、
Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ　（Ｌｅｗｉｓ　ｙ）
等が挙げられる。

【０３７４】

２型ラクトサミン（フコシル化および／または末端非置換）は、成体幹細胞およびこれらに直接由来する分化した細胞に関して特に好ましい群を形成する。１型ラクトサミン（Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ構造）は、胚性幹細胞に関して特に好ましい。

【０３７５】

ラクトサミンＧａｌβ３／４ＧｌｃＮＡｃ、およびラクトース構造（Ｇａｌβ４Ｇｌｃ）を有する糖脂質構造

ラクトサミンはラクトース基盤の糖脂質とともに好ましい構造群を形成する。これらの構造はβ３／４Ｇａｌ転移酵素の産物としての類似した特徴を共有する。β３／４ガラクトース基盤の構造はタンパク質結合および糖脂質グライコームの特徴的な特性を生ずることが観察された。

【０３７６】

本発明はさらに、Ｇａｌβ３／４ＧｌｃＮＡｃ構造が、各種幹細胞型の糖脂質上の、分化と関連する構造の主要な特徴であることを明らかにした。このような糖脂質は２つの本発明の好ましい構造エピトープを有する。最も好ましい糖脂質型としては、従って、ラクトシルセラミド基盤のスフィンゴ糖脂質および特にラクト－（Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ）、例えばラクトテトラオシルセラミドＧａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４ＧｌｃβＣｅｒが挙げられ、好ましい構造はさらに：Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃ（Ｌｅｗｉｓ　ａ）、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ（Ｈ－１型）、構造、およびＦｕｃα２Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃ（Ｌｅｗｉｓ　ｂ）またはシアル化構造ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃもしくはＳＡα３Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃ［式中、ＳＡはシアル酸、好ましくはＮｅｕ５Ａｃであって好ましくはラクトテトラオシルセラミドのＧａｌβ３ＧｌｃＮＡｃを置換する］の群から選択される非還元末端構造を有しならびに好ましくは式：

$(Sac\alpha 3)_{n5}(Fuc\alpha 2)_{n1}Gal\beta 3(Fuc\alpha 4)_{n3}GlcNAc\beta 3[Gal\beta 3/4(Fuc\alpha 4/3)_{n2}GlcNAc\beta 3]_{n4}Gal\beta 4Glc\beta Cer$

［式中、
ｎ１は０または１であってＦｕｃα２の存在または非存在を表し；
ｎ２は０または１であってＦｕｃα４／３（分岐）の存在または非存在を表し、
ｎ３は０または１であってＦｕｃα４（分岐）の存在または非存在を表し
ｎ４は０または１であって（フコシル化）Ｎ－アセチルラクトサミン伸長の存在または非存在を表し；
ｎ５は０または１であってＳａｃα３伸長の存在または非存在を表し；
Ｓａｃは末端構造、好ましくはα３結合を有するシアル酸であって、ただしＳａｃが存在する場合、ｎ５は１であり、その場合ｎ１は０である］
などのそのフコシル化および／または伸長バリアント
ならびに
ネオラクト（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ）含有糖脂質、例えばネオラクトテトラオシルセラミドＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４ＧｌｃβＣｅｒであって、好ましい構造はさらにその非還元末端のＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ　（Ｌｅｗｉｓ　ｘ）、Ｆ

ｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ　Ｈ－２型、構造、および、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ（Ｌｅｗｉｓ　ｙ）を有するもの
ならびに
好ましくは
（Ｓａｃα３／６）$_{n5}$（Ｆｕｃα２）$_{n1}$Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）$_{n3}$ＧｌｃＮＡｃβ３［Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）$_{n2}$ＧｌｃＮＡｃβ３］$_{n4}$Ｇａｌβ４ＧｌｃβＣｅｒ
［ｎ１は０または１であってＦｕｃα２の存在または非存在を表し；
ｎ２は０または１であってＦｕｃα３（分岐）の存在または非存在を表し、
ｎ３は０または１であってＦｕｃα３（分岐）の存在または非存在を表し
ｎ４は０または１であって（フコシル化）Ｎ－アセチルラクトサミン伸長の存在または非存在を表し；
ｎ５は０または１であってＳａｃα３／６伸長の存在または非存在を表し；
Ｓａｃは末端構造、好ましくはα３結合を有するシアル酸（ＳＡ）、またはα６結合を有するシアル酸であって、ただしＳａｃが存在する場合、ｎ５は１であり、その場合ｎ１は０であり、およびシアル酸がα６結合により結合する場合、好ましくはｎ３も０である］
などのそのフコシル化および／または伸長バリアント
等が挙げられる。

【０３７７】

好ましい幹細胞スフィンゴ糖脂質グリカンプロファイル、組成、およびマーカ構造

本願発明者らは幹細胞糖脂質グライコームを、遊離させた遊離グリカンの質量分析プロファイリングにより記載し、約８０個のグリカンシグナルを各種幹細胞型から明らかにすることができた。中性グリカンの提案された単糖組成は２－７Ｈｅｘ、０－５ＨｅｘＮＡｃ、および０－４ｄＨｅｘからなっていた。酸性グリカンシグナルの提案された単糖組成は０－２ＮｅｕＡｃ、２－９Ｈｅｘ、０－６ＨｅｘＮＡｃ、０－３ｄＨｅｘ、および／または０－１硫酸もしくはリン酸エステルからなっていた。本発明は特に、このような幹細胞グリカンプロファイルならびに／または本発明において幹細胞に関して記載される使用のための構造の、分析およびターゲッティングに関する。

【０３７８】

本発明はさらに、特に、実施例に記載されるような幹細胞型に特異的なスフィンゴ糖脂質グリカンシグナルに関する。好ましい一様態において、ＭＳＣ、特にＣＢ　ＭＳＣに典型的なグリカンシグナル、優先的には１４６０および１２９８等、ならびに大型中性糖脂質、特にＨｅｘ$_{2-3}$ＨｅｘＮＡｃ$_{3}$Ｌａｃ、より優先的にはポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン鎖、さらに優先的にはβ１，６－分岐、および優先的には上記のＩＩ型ＬａｃＮＡｃエピトープを末端とするものが、本発明に記載される使用のＭＳＣとの関連で使用される。

【０３７９】

本実験で幹細胞スフィンゴ糖脂質グリカンにおいて示された末端グリカンエピトープは、幹細胞の識別またはグリカンを介した幹細胞に対する特異的結合、および本発明の他の使用において有用であり：Ｇａｌ、Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（Ｌａｃ）、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ（ＬａｃＮＡｃ　２型）、Ｇａｌβ３、非還元末端ＨｅｘＮＡｃ、Ｆｕｃ、α１，２－Ｆｕｃ、α１，３－Ｆｕｃ、Ｆｕｃα２Ｇａｌ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ（Ｈ　２型）、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（２’－フコシルラクトース）、Ｆｕｃα３ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ（Ｌｅｘ）、Ｆｕｃα３Ｇｌｃ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）Ｇｌｃ（３－フコシルラクトース）、Ｎｅｕ５Ａｃ、Ｎｅｕ５Ａｃα２，３、およびＮｅｕ５Ａｃα２，６の末端エピトープ等が挙げられる。本発明はさらに、全幹細胞スフィンゴ糖脂質グライコームおよび／またはグライコーム内の全末端エピトーププロファイルに関する。

【０３８０】

本願発明者らはさらに、ｈＥＳＣにおいて、ＳＳＥＡ－３およびＳＳＥＡ－４発生関連抗原に対応するグリカンシグナル、および幹細胞グライコーム中におけるそのモル比を分

析することができた。本発明はさらに、全グライコームまたはサブグライコーム中のこのような幹細胞エピトープの定量的分析に関するものであり、これは表面抗原のみを認識する抗体のより効果的な代替として有用である。さらなる一様態において、本発明は、マウスＥＳ細胞におけるＳＳＥＡ－１発現と対比した、ｈＥＳＣにおけるα１，２－フコシル化抗原の発現に関する実施例において示されるように、全グリカンプロファイルの研究によって全グライコームプロファイル中の隠れた発生および／または幹細胞抗原の発現を発見および分析することに関する。

【０３８１】

本発明は、本発明の各種細胞材料中の両者の構造型の特徴的変異（同様な対照細胞または混入細胞等と比較して上昇または低下した発現）を明らかにした。該構造は３つの異なるグライコーム型：Ｎ－グリカン、Ｏ－グリカン、および糖脂質、内の特徴的かつ相違する発現により明らかにされた。本発明は、グリカン構造が幹細胞の特徴的な特性であり、本発明の各種分析に有用であることを明らかにした。これらの量ならびにエピトープおよび／または誘導体の相対量は、細胞株間で、または増殖中、貯蔵中、もしくはサイトカインおよび／もしくはホルモン等のエフェクタ分子による誘導中に異なった条件に曝露された細胞間において、相違する。

【０３８２】

特に間葉系細胞の分析のための好ましいエピトープおよび抗体結合剤

本発明は、間葉系細胞、好ましくは間葉系細胞および特に間葉系幹細胞の検出、単離、ならびに分化段階および／または多能性の評価に用いることができるグリカン構造およびそのエピトープを明らかにした。検出はｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ＦＡＣＳ用途のため、および／または細胞系統特異的な用途のため、行われ得る。抗体等の結合試薬は、フィーダまたは他の混入細胞型と間葉系細胞または間葉系幹細胞とを含む細胞の混合物から、間葉系細胞、好ましくはヒト幹細胞をポジティブに単離および／または分離および／または濃縮するために用いることができる。

【０３８３】

染色された幹細胞、すなわち幹細胞上の本発明のグリカン構造の、染色強度および細胞数は、単離および分化マーカのための結合剤の適合性および有用性を表す。例えば、グリカン構造発現細胞の数が比較的少ないことは系統特異性、およびそのコロニから選択／単離され、培養される場合のサブセットの選択に対する有用性を表す場合がある。少ない発現数とは、５％未満、１０％未満、１５％未満、２０％未満、３０％未満、または４０％未満である。さらに、発現量が１ないし１０％、１０％ないし２０％、１５ないし２５％、２０ないし４０％、２５ないし３５％、または３５ないし５０％である場合には少ない発現数と考えられる。典型的には、ＦＡＣＳ分析を行って、グリカン構造を発現する細胞のサブセットを濃縮、単離および／または選択することができる。

【０３８４】

グリカン発現細胞の数が多いことは、多能性／多分化能マーカにおける有用性、および結合剤が哺乳動物細胞の集団内の多能性または多分化能幹細胞を同定、分析、選択または単離するのに有用であることを表す場合がある。多い発現数とは５０％超、より好ましくは６０％超、さらに好ましくは７０％超、および最も好ましくは８０％、９０または９５％超である。さらに、発現量が５０ないし６０、５５％ないし６５％、６０ないし７０％、７０ないし８０、８０ないし９０％、９０ないし１００、または９５ないし１００％である場合には多い発現数と考えられる。典型的には、ＦＡＣＳ分析を行って、グリカン構造を発現する細胞のサブセットを濃縮、単離および／または選択することができる。

【０３８５】

本明細書で用いられる百分率は、分析または実験にかけられた全細胞に対してどれだけ多くの細胞がグリカン構造を発現しているかの平均割合を意味する。例えば、幹細胞コロニ内でグリカン構造を発現する２０％の幹細胞は、視覚的に評価された際に、結合剤、例えば抗体染色が約２０％の細胞において観察され得ることを意味する。

【０３８６】

間葉系幹細胞およびそれに由来する分化した組織型幹細胞
間葉系幹細胞の分化状態の評価のために有用な抗体。
【０３８７】
実施例８および表１５（下部）に、間葉系幹細胞および分化した間葉系幹細胞の標識を示す。実施例２０および表２６。
【０３８８】
本発明は、抗体ＧＦ３０３、好ましくはＦｕｃα２ＧａｌＮＡｃβ３ＧｌｃＮＡｃ、およびＧＦ２７６により認識される構造が、間葉系幹細胞が骨原性に分化した幹細胞へと分化する際に現れることを明らかにした。さらに、Ｔｎ抗原に対応するＧａｌＮＡｃα基構造ＧＦ２７８、およびＧＦ２７７、シアリル－Ｔｎが同時に増加することも明らかにした。
【０３８９】
本発明はさらに、間葉系幹細胞（特に骨髄由来）および骨原性に分化した間葉系幹細胞の両者に特徴的ないくつかの標的構造に対する結合剤のための本発明による好ましい使用に関する。好ましい標的構造は抗体ＧＦ２７５により認識され得る１つのＧａｌＮＡｃα基構造を含み、該抗体の抗原は好ましくは該抗体に対して公知のシアル化Ｏ－グリカン糖ペプチドエピトープである。間葉系および骨原性に分化した幹細胞の両者に発現するエピトープはさらに２つの特徴的グロボ型抗原構造：結合がグロボトリオース（Ｇｂ３）型抗原に対応するＧＦ２９８の抗原、およびグロボテトラオース（Ｇｂ４）型抗原に対応するＧＦ２９７の抗原、を含む。本発明はさらに、末端２型ラクトサミンエピトープが特に両型の間葉系幹細胞に発現していることを明らかにしたものであり、これは、実施例８表１５において、両細胞をＨＩＩ型抗原を認識する抗体で染色することにより例示された。
【０３９０】
本発明はさらに、間葉系幹細胞（特に骨髄由来）がより分化した、好ましくは骨原性に分化した間葉系幹細胞に分化する際に、実質的に減少する、または事実上観察できない程度にまで低下／減少するいくつかの標的構造に対する結合剤のための、本発明の好ましい使用に関する。これらの標的構造は２つのグロボ系列構造を含み、これらは好ましくは、抗原ＳＳＥＡ－３として認識されるガラクトシル－グロボシド型構造、抗原ＳＳＥＡ－４として認識されるシアリル－ガラクトシルグロボシド型構造である。好ましい減少する標的構造はさらに、２つの２型Ｎ－アセチルラクトサミン標的構造、Ｌｅｗｉｓ　ｘおよびシアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘを含む。グロボシド型スフィンゴ糖脂質構造が、本願発明者らにより、ＭＳＣにおいて、直接的な構造分析、より具体的にはＳＳＥＡ－３およびＳＳＥＡ－４グリカン抗原単糖組成に対応するグリカンシグナルによって、ｈＥＳＣと比較して少量、しかし有意な量検出された。これらの抗原はＭＳＣにおいてモノクローナル抗体によっても検出された。本発明は従って、特に、本発明に記載の使用における、ＭＳＣおよびそれらから得られた細胞と関連したこれらのグロボシド構造に関する。
【０３９１】
本発明の好ましい一様態において、ＧＦ２７５、ＧＦ２７７、ＧＦ２７８、ＧＦ２９７、ＧＦ２９８、ＧＦ３０２、ＧＦ３０５、ＧＦ３０７、ＧＦ３５３、またはＧＦ３５４と同一のエピトープに結合する抗体または結合剤は、好ましくは骨髄由来の、間葉系幹細胞の検出／識別に有用である（該抗体に認識される対応するエピトープを実施例８に列挙する）。これらのエピトープは、培養における、またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける、好ましくは骨髄由来の（間葉系）幹細胞の検出、単離および評価に適しており、用いることができる。検出はｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ＦＡＣＳ用途のため、および／または細胞系統特異的な用途のため、行われ得る。これらの抗体は、他の骨髄由来細胞を含んだ細胞の混合物から、好ましくは間葉系および／または骨髄由来の幹細胞を、ポジティブに単離および／または分離および／または濃縮するために用いることができる。
【０３９２】
幹細胞、好ましくはヒト幹細胞に結合する他の結合剤は、ＧＦ２７５（ＭＵＣ－１糖タンパク質のシアル化炭水化物エピトープ）と同一のエピトープに結合する結合剤を含む。より好ましい抗体はＡｃｒｉｓによるクローンＢＭ３３５９の抗体を含む。このエピトー

プは培養における、またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける、好ましくは骨髄由来の（間葉系）幹細胞の検出、単離および評価に適しており、用いることができる。検出はｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ＦＡＣＳ用途のため、および／または細胞系統特異的な用途のため、行われ得る。これらの抗体または結合剤は、他の骨髄由来細胞を含んだ細胞の混合物から、好ましくは間葉系および／または骨髄由来の、または骨原性方向に分化した幹細胞を、ポジティブに単離および／または分離および／または濃縮するために用いることができる。

【０３９３】

幹細胞、好ましくはヒト幹細胞に結合する他の結合剤は、ＧＦ３０５（Ｌｅｗｉｓ　ｘ）と同一のエピトープに結合する結合剤を含む。より好ましい抗体はＣｈｅｍｉｃｏｎによるクローンＣＢＬ１４４の抗体を含む。このエピトープは培養における、またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける、好ましくは骨髄由来の（間葉系）幹細胞の検出、単離および評価に適しており、用いることができる。検出はｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ＦＡＣＳ用途のため、および／または細胞系統特異的な用途のため、行われ得る。この抗体または結合剤は、細胞の混合物から、好ましくは間葉系および／または骨髄由来の幹細胞を、ポジティブに単離および／または分離および／または濃縮するために用いることができる。

【０３９４】

幹細胞、好ましくはヒト幹細胞に結合する他の結合剤は、ＧＦ３０７（シアリルＬｅｗｉｓ　ｘ）と同一のエピトープに結合する結合剤を含む。より好ましい抗体はＣｈｅｍｉｃｏｎによるクローンＭＡＢ２０９６の抗体を含む。このエピトープは培養における、またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける、好ましくは骨髄由来の（間葉系）幹細胞の検出、単離および評価に適しており、用いることができる。検出はｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ＦＡＣＳ用途のため、および／または細胞系統特異的な用途のため、行われ得る。この抗体または結合剤は、細胞の混合物から、好ましくは間葉系および／または骨髄由来の幹細胞を、ポジティブに単離および／または分離および／または濃縮するために用いることができる。

【０３９５】

好ましい一様態において、ＧＦ３０５、ＧＦ３０７、ＧＦ３５３またはＧＦ３５４と同一のエピトープに結合する抗体または結合剤は間葉系幹細胞のポジティブセレクションおよび／または濃縮に有用である（該抗体により認識される対応するエピトープを実施例８に列挙する）。

【０３９６】

本発明の他の好ましい様態において、ＧＦ２７５、ＧＦ２７６、ＧＦ２７７、ＧＦ２７８、ＧＦ２９７、ＧＦ２９８、ＧＦ３０２、ＧＦ３０３、ＧＦ３０７またはＧＦ３５３と同一のエピトープに結合する抗体または結合剤は、分化した、好ましくは骨髄由来の、および／または骨原性方向に分化した、間葉系幹細胞を検出／識別するのに有用である（該抗体により認識される対応するエピトープを実施例８に列挙する）。これらのエピトープは培養における、またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける、好ましくは骨髄由来の（間葉系）幹細胞の検出、単離および評価に適しており、用いることができる。検出はｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ＦＡＣＳ用途のため、および／または細胞系統特異的な用途のため、行われ得る。これらの抗体は、他の骨髄由来細胞を含んだ細胞の混合物から、好ましくは間葉系および／または骨髄由来の幹細胞を、ポジティブに単離および／または分離および／または濃縮するために用いることができる。

【０３９７】

幹細胞、好ましくはヒト幹細胞に結合する他の結合剤は、ＧＦ２９７（グロボシドＧＬ４）と同一のエピトープに結合する結合剤を含む。より好ましい抗体はＡｂｃａｍによるクローンａｂ２３９４９の抗体を含む。このエピトープは培養における、またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける、好ましくは骨髄由来の未分化（間葉系）幹細胞、および好ましくは骨原性方向に分化したものの検出、単離および評価に適しており、用いることができる。検出はｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ＦＡＣＳ用途のため、および／または細胞系統特異的な用途のため、行われ得る。この抗体または結合剤は、細胞の混合物から、細胞、好ましくは骨原性方向の間葉系幹細胞を、ポジティブに単離および／または分離および／または濃縮するた

めに用いることができる。

【０３９８】

幹細胞、好ましくはヒト幹細胞に結合する他の結合剤は、ＧＦ２９８（ヒトＣＤ７７；ＧＢ３）と同一のエピトープに結合する結合剤を含む。より好ましい抗体はＡｃｒｉｓによるクローンＳＭ１１６０の抗体を含む。このエピトープは培養における、またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける、好ましくは骨髄由来の未分化（間葉系）幹細胞、および好ましくは骨原性方向に分化したものの検出、単離および評価に適しており、用いることができる。検出はｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ＦＡＣＳ用途のため、および／または細胞系統特異的な用途のため、行われ得る。この抗体または結合剤は、細胞の混合物から、細胞、好ましくは骨原性方向の間葉系幹細胞を、ポジティブに単離および／または分離および／または濃縮するために用いることができる。

【０３９９】

幹細胞、好ましくはヒト幹細胞に結合する他の結合剤は、ＧＦ３０２（Ｈ２型血液抗原）と同一のエピトープに結合する結合剤を含む。好ましい一様態において、抗体はＦｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃエピトープに結合する。より好ましい抗体はＡｃｒｉｓによるクローンＤＭ３０１５の抗体を含む。このエピトープは培養における、またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける、好ましくは骨髄由来の未分化（間葉系）幹細胞、および好ましくは骨原性方向に分化したものの検出、単離および評価に適しており、用いることができる。検出はｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ＦＡＣＳ用途のため、および／または細胞系統特異的な用途のため、行われ得る。この抗体または結合剤は、細胞の混合物から、細胞、好ましくは骨原性方向の間葉系幹細胞を、ポジティブに単離および／または分離および／または濃縮するために用いることができる。

【０４００】

本発明の好ましい一様態において、ＧＦ２７６、ＧＦ２７７、ＧＦ２７８、ＧＦ３０３、ＧＦ３０５、ＧＦ３０７、ＧＦ３５３、またはＧＦ３５４と同一のエピトープに結合する抗体または結合剤は、好ましくは骨髄由来の、および骨原性方向に分化した、間葉系幹細胞を検出／識別するのに有用である（該抗体により認識される対応するエピトープを実施例８に列挙する）。これらのエピトープは培養における、またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける、好ましくは骨髄由来の（間葉系）幹細胞の検出、単離および評価に適しており、用いることができる。検出はｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ＦＡＣＳ用途のため、および／または細胞系統特異的な用途のため、行われ得る。これらの抗体は、他の骨髄由来細胞を含んだ細胞の混合物から、好ましくは間葉系および／もしくは骨髄由来の、または骨原性方向に分化した、幹細胞を、ポジティブに単離および／または分離および／または濃縮するために用いることができる。

【０４０１】

さらに、ＧＦ２７６もしくはＧＦ３０３と同一のエピトープに結合する結合剤、または抗体ＧＦ２７６および／もしくはＧＦ３０３は、培養における、またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける、骨原性に分化した幹細胞の検出、単離および評価に特に有用である（該抗体により認識される対応するエピトープを実施例８に列挙する）。

【０４０２】

幹細胞、好ましくはヒト幹細胞に結合する他の結合剤は、ＧＦ２７６（癌胎児性抗原）と同一のエピトープに結合する結合剤を含む。より好ましい抗体はＡｃｒｉｓによるクローンＤＭ２８８の抗体を含む。このエピトープは培養における、またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける、好ましくは骨髄由来の、および骨原性方向の、分化した（間葉系）幹細胞の検出、単離および評価に適しており、用いることができる。検出はｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ＦＡＣＳ用途のため、および／または細胞系統特異的な用途のため、行われ得る。この抗体または結合剤は、細胞の混合物から、細胞、好ましくは骨原性方向の間葉系幹細胞を、ポジティブに単離および／または分離および／または濃縮するために用いることができる。

【０４０３】

幹細胞、好ましくはヒト幹細胞に結合する他の結合剤は、ＧＦ２７７（ヒトシアロシル

－Ｔｎ抗原；ＳＴｎ、ｓＣＤ１７５）と同一のエピトープに結合する結合剤を含む。より好ましい抗体はＡｃｒｉｓによるクローンＤＭ３１９７の抗体を含む。このエピトープは培養における、またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける、好ましくは骨髄由来の、および骨原性方向の、分化した（間葉系）幹細胞の検出、単離および評価に適しており、用いることができる。検出はｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ＦＡＣＳ用途のため、および／または細胞系統特異的な用途のため、行われ得る。この抗体または結合剤は、細胞の混合物から、細胞、好ましくは骨原性方向の間葉系幹細胞を、ポジティブに単離および／または分離および／または濃縮するために用いることができる。

【０４０４】

幹細胞、好ましくはヒト幹細胞に結合する他の結合剤は、ＧＦ２７８（ヒトシアロシル－Ｔｎ抗原；ＳＴｎ、ｓＣＤ１７５　Ｂ１．１）と同一のエピトープに結合する結合剤を含む。より好ましい抗体はＡｃｒｉｓによるクローンＤＭ３２１８の抗体を含む。このエピトープは培養における、またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける、好ましくは骨髄由来の、および骨原性方向の、分化した（間葉系）幹細胞の検出、単離および評価に適しており、用いることができる。検出はｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ＦＡＣＳ用途のため、および／または細胞系統特異的な用途のため、行われ得る。この抗体または結合剤は、細胞の混合物から、細胞、好ましくは骨原性方向の間葉系幹細胞を、ポジティブに単離および／または分離および／または濃縮するために用いることができる。

【０４０５】

幹細胞、好ましくはヒト幹細胞に結合する他の結合剤は、ＧＦ３０３（血液型Ｈ１抗原、ＢＧ４）と同一のエピトープに結合する結合剤を含む。好ましい一様態において、抗体はＦｕｃα２Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃエピトープに結合する。より好ましい抗体はＡｂｃａｍによるクローンａｂ３３５５の抗体を含む。このエピトープは培養における、またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける、好ましくは骨髄由来の、および骨原性方向の、分化した（間葉系）幹細胞の検出、単離および評価に適しており、用いることができる。検出はｉｎ　ｖｉｔｒｏで、ＦＡＣＳ用途のため、および／または細胞系統特異的な用途のため、行われ得る。この抗体または結合剤は、細胞の混合物から、細胞、好ましくは骨原性方向の間葉系幹細胞を、ポジティブに単離および／または分離および／または濃縮するために用いることができる。

【０４０６】

さらに、前記抗体または結合剤は骨原性系統（ｏｓｔｅｏｇｅｎｉｃ　ｌｉｎｅａｇｅ）のための幹細胞を単離および濃縮するのに有用である。これは、例えば抗体ＧＦ２７６、ＧＦ２７７、ＧＦ２７８、およびＧＦ３０３を用いた、ポジティブセレクションにより行うことができる（該抗体に認識される対応するエピトープを実施例８に列挙する）。ネガティブディプリーション（ｎｅｇａｔｉｖｅ　ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ）については、好ましいエピトープは抗体ＧＦ２９６、ＧＦ３００、ＧＦ３０４、ＧＦ３０５、ＧＦ３０７、ＧＦ３５３、またはＧＦ３５４で認識されるものと同じである。ネガティブディプリーションについては、好ましいエピトープは抗体ＧＦ３５４（ＳＳＥＡ－４）またはＧＦ３０７（シアリルＬｅｗｉｓ　ｘ）で認識されるものと同じである。Ｍｉｔｅｎ　ａｄｉｐｏｊｅｎ　ｄｉｓｋｕｔｏｉｎｔｉ？

【０４０７】

各種幹細胞型間の比較

本データは、１型および２型Ｎ－アセチルラクトサミンの群の比較が、間葉系幹細胞および胚幹細胞等の幹細胞の分析のために、および／または線維芽細胞様フィーダ細胞等の混入細胞集団からの細胞の分離のために、有用な方法であることを明らかにした。未分化間葉系細胞はｈＥＳＣ細胞から明らかになったＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン抗原を欠いていたが、両細胞型および潜在的混入線維芽細胞はＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン認識抗体による一様でない標識を有している。

【０４０８】

「主に」という語は好ましくは少なくとも６０％、より好ましくは少なくとも７５％、

および最も好ましくは少なくとも９０％を表す。幹細胞との関連において、「主に」という語は、グリカン構造を発現し、哺乳動物細胞の集団中の多能性または多分化能幹細胞を同定、分析、選択または単離するのに有用な、好ましくは少なくとも６０％、より好ましくは少なくとも７５％、および最も好ましくは少なくとも９０％の細胞を表す。

【０４０９】

細胞成分およびその混合物の単離のための結合剤の使用

本発明は、新規結合試薬が好ましい一様態において新規標的／マーカ構造を有する幹細胞からの細胞成分の単離に用いられることを明らかにした。単離された細胞は好ましくは遊離グリカン、またはタンパク質もしくは脂質もしくはその断片に結合したグリカンである。

【０４１０】

本発明は特に、構造が１つまたはいくつかの型のグリカン材料ｓｅｌｅ

ａ）幹細胞材料から遊離した遊離グリカンならびに／または

ｂ）グリカン複合体材料、例えば

ｂ１）糖アミノ酸材料、例えば

ｂ１ａ）糖タンパク質

ｂ１ｂ）糖オリゴペプチドおよび糖ポリペプチド等の糖ペプチド

および／もしくは

ｂ２）本発明により明らかになった好ましい炭水化物構造を有する脂質結合材料

を含む場合の、前記構造を含む細胞成分の単離に関する。

【０４１１】

標的構造を有する細胞成分の単離のための一般的方法

本発明の細胞成分の単離とは、特異的結合剤によって結合されるグリカン構造である対応する標的構造に本発明の結合剤分子を結合させるステップを含む方法において、本発明の標的構造を有する増加した（または濃縮された）量のグリカンを含んだ分子画分を産生することを意味する。

【０４１２】

前記画分の単離の過程は、本発明の結合剤分子を幹細胞由来の対応する標的構造と接触させることと、濃縮された標的構造組成物を単離することとを伴う。

【０４１３】

細胞成分を単離するための好ましい方法は次のステップ

１）幹細胞試料を提供するステップと、

２）本発明の結合剤分子を対応する標的構造と接触させるステップと、

３）前記結合剤と標的構造との複合体を少なくとも細胞材料の一部から単離するステップと、

を含む。

【０４１４】

前記成分は一般に細胞構造の特定の画分、例えば原形質膜を含む細胞膜画分；およびオルガネラ画分；および可溶性タンパク質、脂質または遊離グリカン画分等の可溶性グリカン含有画分；において豊富に存在すると理解される。前記結合剤は全細胞画分に対して用いることができると理解される。好ましい一様態において、標的構造は、プロテアーゼにより遊離する細胞表面タンパク質または界面活性剤可溶性膜タンパク質等の、細胞タンパク質の画分内に豊富に存在する。

【０４１５】

好ましい標的構造組成物は、幹細胞において、または幹細胞に特徴的な割合で、特異的に発現する、結合剤構造に対応するグリカン構造を有する糖タンパク質または糖ペプチド、およびペプチドまたはタンパク質エピトープを含む。

【０４１６】

より好ましくは、本発明は、前記単離ステップにおける標的構造画分の精製に関する。精製は本発明の好ましい一様態において、少なくとも部分的精製である。好ましくは、標

的グリカン含有材料は、好ましくはそれが発現される細胞画分の成分の中で、少なくとも２倍に精製される。より好ましい精製水準としては５倍および１０倍精製、より好ましくは１００、さらに好ましくは１０００倍精製等が挙げられる。好ましくは、精製された画分は少なくとも１０％の標的グリカン含有分子を含み、より好ましくは少なくとも３０％、さらに好ましくは少なくとも５０％、さらになお好ましくは少なくとも７０％の純粋、および最も好ましくは少なくとも９０％の純粋を含む。好ましくは前記％値は他の標的グリカン非含有複合糖質分子に対するモルパーセントであり、より好ましくは前記材料は本質的に他の主要な有機混入分子を含まない。

【０４１７】

好ましい精製標的グリカン組成物および標的グリカン－結合剤複合体

本発明は単離または精製された標的グリカン－結合剤複合体および単離された標的グリカン分子組成物に関するものであり、ここで該標的グリカンは本発明の特異的標的構造に富む。好ましくは、精製された標的グリカン－結合剤複合体組成物は少なくとも１０％の、結合剤と複合した標的グリカン含有分子、より好ましくは少なくとも３０％、さらに好ましくは少なくとも５０％、さらになお好ましくは少なくとも７０％の純粋な、および最も好ましくは少なくとも９０％の純粋な、結合剤と複合した標的グリカン含有分子を含む。

【０４１８】

好ましくは、精製された標的グリカン組成物は少なくとも１０％の標的グリカン含有分子、より好ましくは少なくとも３０％、さらに好ましくは少なくとも５０％、さらになお好ましくは少なくとも７０％の純粋な、および最も好ましくは少なくとも９０％の純粋な、標的グリカン含有分子を含む。

【０４１９】

本発明はさらに、本発明の結合剤分子を幹細胞由来の対応する標的構造に接触させて濃縮された標的構造を単離するステップを伴う画分の単離の方法によって産生された、濃縮された標的グリカン組成物に関する。

【０４２０】

標的グリカンの精製のための結合剤技術

細胞の糖タンパク質、糖ペプチド、遊離オリゴ糖および他のグリカン複合体の親和性精製のための方法は、当該分野において周知である。好ましい方法としては、アフィニティクロマトグラフィ等の固相を用いる結合剤技術、免疫沈降等の沈降、免疫磁性ビーズ法等の結合剤－磁性法などが挙げられる。アフィニティクロマトグラフィは、レクチン（Ｗａｎｇ Ｙ ｅｔ ａｌ （２００６） Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ １６ （６） ５１４－２３）を用いた、もしくは抗体による、糖ペプチドの精製に対して、または、抗体（例えばＰｒａｔ Ｍ ｅｔ ａｌ ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ （１９８９） ４９， １４１５－２１； Ｋｉｍ ＹＤ ｅｔ ａｌ ｅｔ ａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ （１９８９） ４９、２３７９）および／もしくはレクチン（例えばＣｕｍｍｉｎｇ ａｎｄ Ｋｏｒｎｆｅｌｄ （１９８２） Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２５７、１１２３５－４０； Ｙａｅ Ｅ ｅｔ ａｌ． （１９９１） １０７８ （３） ３６９－７６； Ｓｈｉｂｕｙａ Ｎ ｅｔ ａｌ （１９８８） ２６７ （２） ６７６－８０； Ｇｏｎｃｈｏｒｏｆｆ ＤＧ ｅｔ ａｌ． １９８９、３５、２９－３２； Ｈｅｎｔｇｅｓ ａｎｄ Ｂａｕｓｅ （１９９７） Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ３７８ （９） １０３１－８）を用いた糖タンパク質／ペプチドの精製に対して、記載されている。遊離オリゴ糖の識別も対象とする弱く結合する抗体のための具体的な方法が例えば（Ｏｈｌｓｏｎ Ｓ ｅｔ ａｌ． Ｊ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ Ａ （１９９７） ７５８ （２） １９９－２０８）， Ｏｈｌｓｏｎ Ｓ ｅｔ ａｌ．Ａｎａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ （１９８８） １６９ （１） ２０４－８）に記載のように開発されている。該方法は例えば（Ｃｕｍｍｉｎｇｓ ａｎｄ Ｋｏｒｎｆｅｌｄ （１９８２） Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２５７、１１２３５－４０）に示されるように異なった特異性の結合剤による複数のステップを伴っている場合がある。オリゴ糖混合物のための抗体またはタンパク質（レク

チン）結合剤アフィニティクロマトグラフィも、例えば（Ｋｉｔａｇａｗａ Ｈ ｅｔ ａｌ．（１９９１） Ｊ Ｂｉｏｃｈｅｍ １１０（４９ ５９８－６０４； Ｋｉｔａｇａｗａ Ｈ ｅｔ ａｌ．（１９８９） Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２８（２２） ８８９１－７； Ｄａｋｏｕｒ Ｊ ｅｔ ａｌ Ａｒｃｈ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ（１９８８） ２６４， ２０３－ １３）、糖脂質のためのものが、例えば（Ｂｏｕｈｏｕｒｓ Ｄ ｅｔ ａｌ（１９９０） Ａｒｃｈ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ ２８２（１） １４１－６）に記載されている。グリカンを対象とするアフィニティクロマトグラフィおよび／または有用なレクチンおよび抗体特異性のさらなる情報は、（Ｄｅｂａｒａｙ ａｎｄ Ｍｏｎｔｒｅｕｉｌ（１９９１） Ａｄｖ． Ｌｅｃｔｉｎ Ｒｅｓ ４、５１－９６；“Ｔｈｅ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ｏｆ ｃｏｍｐｌｅｘ ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅｓ” Ａｄｖ Ｅｘｐ Ｍｅｄ Ｂｉｏｌ（２００１） ４９１（ｅｄ Ａｌｂｅｒｔ Ｍ Ｗｕ） Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ／Ｐｌｅｎｕｍ ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ， Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；“Ｌｅｃｔｉｎｓ” ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ（２００３）（ｅｄｓ Ｓｈａｒｏｎ、Ｎａｔｈａｎ ａｎｄ Ｌｉｓ、Ｈａｌｉｎａ） Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ Ｄｏｒｄｒｅｃｈｔ， Ｔｈｅ Ｎｅａｔｈｅｒｌａｎｄｓ）等の総説およびモノグラフから入手可能である。

【０４２１】

前記方法は常圧またはＨＰＬＣクロマトグラフィを用い、従来のクロマトグラフィ法または他のタンパク質およびペプチド精製法を用いるさらなるステップを含んでいてよいく、好ましいさらなる単離法は、特に低Ｍｗグリカンおよび複合体、好ましくは糖ペプチドの単離のためのゲル濾過（サイズ排除）クロマトグラフィである。

【０４２２】

さらに、単離されたタンパク質およびペプチドは質量分析法、例えば（Ｗａｎｇ Ｙ ｅｔ ａｌ（２００６） Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ １６（６） ５１４－２３）により識別され得ることが知られている。本発明は特に、質量分析、ペプチドシーケンシング、化学的分析、アレイ分析等の方法または他の当該分野に公知の方法によるグリカンおよび／またはその複合体の精製、および単離された成分の識別、のための、本発明の結合剤の使用に関する。

【０４２３】

トリプシン感受性型グリカン標的の存在の解明

本発明は実施例１０において本グリカン結合剤、特にモノクローナル抗体、の標的構造の一部が、トリプシン感受性であることを明らかにした。細胞がトリプシンにより処理（培養から解放）されると、細胞表面抗原のＦＡＣＳ分析において、抗原構造は本質的に観察されないか、またはこれらは少ない量で観察されるが、Ｖｅｒｓｅｎｅ処理（ＰＢＳ中の０．０２％ＥＤＴＡ）後には観察可能である。これは例えば、ＳＳＥＡ－４抗原に結合することが示されている抗体ＧＦ３５４による間葉系幹細胞の標識において観察された。この標的抗原構造は従来、シアリル－ガラクトシルグロボシド糖脂質と考えられてきたが、明らかに抗体はグリカン配列の非還元末端のエピトープのみを認識する。本発明はそこで特に、ＳＳＥＡ－４抗体によって結合・濃縮される、間葉系幹細胞糖ペプチド結合グリカン構造の単離および分析の方法、および対応する糖ペプチドおよび糖タンパク質の分析に関する。本発明はさらに、幹細胞、特に間葉系幹細胞および胚幹細胞由来のトリプシン非感受性グリカン材料の分析に関する。本発明はまた、ａｂ ＧＦ２７５のシアリルムチン型標的の大部分はトリプシン感受性であり、少数は非トリプシン感受性であることも明らかにした。本発明は、トリプシン感受性およびトリプシン非感受性の両者のグリカン画分、好ましくは糖タンパク質および糖ペプチドの、本発明の方法による単離に関する。本発明はさらに、好ましくは材料が間葉系幹細胞から単離された場合の、抗体ＧＦ３０２によって結合されるタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）感受性様糖ペプチドおよび糖タンパク質の単離および分析に関する。

【０４２４】

本明細書において、「結合剤」、「結合物質」および「マーカ」は互換的に用いられる。

【０４２５】

抗体

本発明の有用なレクチンおよび有用な抗体特異性、および還元末端伸長抗体エピトープに関する情報は、（Ｄｅｂａｒａｙ ａｎｄ Ｍｏｎｔｒｅｕｉｌ （１９９１） Ａｄｖ．Ｌｅｃｔｉｎ Ｒｅｓ ４，５１－９６；“Ｔｈｅ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ｏｆ ｃｏｍｐｌｅｘ ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅｓ” Ａｄｖ Ｅｘｐ Ｍｅｄ Ｂｉｏｌ （２００１） ４９１ （ｅｄ Ａｌｂｅｒｔ Ｍ Ｗｕ） Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ／Ｐｌｅｎｕｍ ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；“Ｌｅｃｔｉｎｓ” ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ （２００３） （ｅｄｓ Ｓｈａｒｏｎ，Ｎａｔｈａｎ ａｎｄ Ｌｉｓ，Ｈａｌｉｎａ） Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ Ｄｏｒｄｒｅｃｈｔ、Ｔｈｅ Ｎｅａｔｈｅｒｌａｎｄｓ等の総説およびモノグラフならびにｐｕｂｍｅｄ／ｅｓｐａｃｅｎｅｔ等のインターネットデータベース、またはモノクローナル抗体特異性を列挙するｗｗｗ．ｇｌｙｃｏ．ｉｓ．ｒｉｔｓｕｍｅｉ．ａｃ．ｊｐ／ｅｐｉｔｏｐｅ／等の抗体データベース）から入手可能である。

【０４２６】

当該分野で公知の各種方法を用いて、ペプチドモチーフおよびその領域または断片に対するポリクローナル抗体を産生することができる。抗体の産生においては、任意の適した宿主動物（ウサギ、マウス、ラット、またはハムスター等であるが限定されない）がペプチド（免疫原性断片）の注射により免疫される。宿主動物種により、各種アジュバントを用いて免疫反応を高めることができ、例えばフロイントの（完全および不完全）アジュバント、水酸化アルミニウム等のミネラルゲル（ｍｉｎｅｒａｌ ｇｅｌ）、リゾレシチン等の界面活性物質、プルロニック（ｐｌｕｒｏｎｉｃ）ポリオール、ポリアニオン、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、および、ＢＣＧ｛Ｂａｃｉｌｌｅ Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ）およびＣｏｒγｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒｖｕｍ等の潜在的に有用なヒトアジュバント等が挙げられるがこれらに限定されない。

【０４２７】

ペプチドモチーフに対するモノクローナル抗体は、培養における連続細胞系による抗体分子の産生のために提供される任意の手法を用いて調製してよい。これらとしては、Ｋδｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ，（Ｎａｔｕｒｅ、２５６：４９５－４９７，１９７５）により最初に記載されたハイブリドーマ技術、およびより最近のヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Ｋｏｓｂｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ，４：７２、１９８３）およびＥＢＶハイブリドーマ技術（Ｃｏｌｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ａｌａｎ Ｒ Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，ｐｐ．７７－９６、１９８５）等が挙げられるがこれらに限定されない。これらは全て参照により具体的に本明細書に組み込まれる。抗体はクローン化された免疫グロブリンｃＤＮＡから細菌内で産生することもできる。組み替えファージ抗体系の使用により、細菌培養物中の抗体を速やかに産生および選択することができ、また遺伝的にその構造を操作することができる場合がある。

【０４２８】

ハイブリドーマ技術が用いられる場合、ミエローマ細胞株を用いてよい。このようなハイブリドーマ産生融合法において用いるために適した細胞株は、好ましくは抗体非産生性であり、高い融合効率を有し、また、所望の融合細胞（ハイブリドーマ）のみの増殖を補助する特定の選択的培地においてそれらを増殖できなくする酵素欠損を示す。例えば、免疫した動物がマウスである場合、Ｐ３－Ｘ６３／Ａｇ８、Ｐ３－Ｘ６３－Ａｇ８．６５３、ＮＳ１／１．Ａｇ ４ １、Ｓｐ２１０－Ａｇ１４、ＦＯ、ＮＳＯ／Ｕ、ＭＰＣ－１１、ＭＰＣ１１－Ｘ４５－ＧＴＧ １．７およびＳ１９４／５ＸＸ０ ＢｕＩを使用してよ

く；ラットである場合、Ｒ２１０．ＲＣＹ３、Ｙ３－Ａｇ　１．２．３、ＩＲ９８３Ｆおよび４Ｂ２１０を使用してよく；ならびにＵ－２６６、ＧＭ１５００－ＧＲＧ２、ＬＩＣＲ－ＬＯＮ－ＨＭｙ２およびＵＣ７２９－６は全て細胞融合において有用である。

【０４２９】

モノクローナル抗体の産生に加え、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術、すなわちマウス抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子につないで適当な抗原特異性および生物活性を有する分子を得る技術、を用いることができる（Ｍｏｒｒｉｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ，　Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｄ　８１：　６８５１－６８５５，　１９８４；　Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ，　Ｎａｔｕｒｅ　３１２：　６０４－６０８，　１９８４；　Ｔａｋｅｄａ　ｅｔ　ａｌ，　Ｎａｔｕｒｅ　３１４：　４５２－４５４；　１９８５）。あるいは、一本鎖抗体の産生のために記載された技術（米国特許第４，９４６，７７８号）を適合させ、インフルエンザ特異的一本鎖抗体を産生することができる。

【０４３０】

前記分子のイディオタイプを有する抗体断片は、公知の手法により生成することができる。例えば、このような断片として、抗体分子のペプシン消化により生成し得るＦ（ａｂ’）２フラグメント；Ｆ（ａｂ’）２フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより生成し得るＦａｂ’フラグメント、ならびに抗体分子をパパインおよび還元剤で処理することにより生成し得る２つのＦａｂフラグメント等が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３１】

非ヒト抗体は当該分野で公知の任意の手法を用いてヒト化することができる。好ましい「ヒト化抗体」は、ヒト定常領域を有するが、該抗体の可変領域、または少なくとも相補性決定領域（ＣＤＲ）は非ヒト動物由来である。ヒト軽鎖定常領域はκまたはλ軽鎖のいずれからのものであってもよく、一方ヒト重鎖定常領域はＩｇＭ、ＩｇＧ（ＩｇＧｌ、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、もしくはＩｇＧ４）、ＩｇＤ、ＩｇＡ、またはＩｇＥ免疫グロブリンのいずれからのものであってもよい。

【０４３２】

非ヒト抗体のヒト化のための方法は、当該分野で周知である（米国特許第５，５８５，０８９号、および５，６９３，７６２号を参照）。一般に、ヒト化抗体は、そのフレームワーク領域に導入された、非ヒト供給源からの１または複数個のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、例えば、Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．｛Ｎａｔｕｒｅ　３２１：　５２２－５２５，　１９８６）、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ，｛Ｎａｔｕｒｅ，　３３２：　３２３－３２７，　１９８８）およびＶｅｒｈｏｅｙｅｎ　ｅｔ　ａｌ．　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３９：　１５３４－１５３６，　１９８８）に記載される方法を用い、齧歯類相補性決定領域（ＣＤＲ）の少なくとも一部をヒト抗体の対応する領域に対して置換することにより行うことができる。改変抗体の調製のための数多くの手法が、例えばＯｗｅｎｓ　ａｎｄ　Ｙｏｕｎｇ，　Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　Ｍｅｔｈ．，　１６８：　１４９－１６５，　１９９４において、記載されている。そして、さらなる変化を抗体フレームワークに導入し、親和性または免疫原性を調節することができる。

【０４３３】

同様に、ＣＤＲを単離するための当該分野に公知の手法を用いて、ＣＤＲを含んだ組成物が生成される。相補性決定領域は６個のポリペプチドループ、重鎖または軽鎖の可変領域のそれぞれに対する３個のループを特徴とする。ＣＤＲおよびフレームワーク領域におけるアミノ酸部位はＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．、“Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，”　Ｕ．Ｓ．　Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、（１９８３）に記述されており、これは参照により本明細書に組み込まれたものとする。例えば、ヒト抗体の超可変領域はおおまかには重鎖および軽鎖可変領域の残基２８ないし３５、残基４９ないし５９、および残基９２ないし１０３にあると定義される（Ｊａｎｅｗａｙ　ａｎｄ　Ｔｒａｖｅｒｓ，　Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ，　２ｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏ

ｎ，Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９９６）。任意の所定の抗体におけるＣＤＲ領域は、上述のこれらのおおよその残基のうちのいくつかのアミノ酸の内部に存在し得る。免疫グロブリン可変領域もＣＤＲを囲む「フレームワーク」領域を有する。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域配列は種内で高度に保存されており、ヒトおよびマウスの配列間でも保存されている。

【０４３４】

モノクローナル抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域の１、２、および／または３個のＣＤＲを有する組成物が生成される。ハイブリドーマから分泌されるモノクローナル抗体の１、２、３、４、５および／または６個の相補性決定領域を含むポリペプチド組成物も考えられる。ＣＤＲを囲む保存されたフレームワーク配列を用いて、これらのコンセンサス配列に相補的なＰＣＲプライマーが生成され、プライマー領域間に位置するＣＤＲ配列が増幅される。ヌクレオチドおよびポリペプチド配列のクローニングおよび発現のための手法は当該分野において確立されている［例えばＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９）を参照］。増幅されたＣＤＲ配列は適当なプラスミドに連結される。１、２、３、４、５および／または６個のクローニングされたＣＤＲを有するプラスミドは任意に、該ＣＤＲに連結されたさらなるポリペプチドコード領域を有する。

【０４３５】

好ましくは、前記抗体は式（Ｉ）のグリカン構造またはその断片に対して特異的な任意の抗体である。本発明で用いられる該抗体は、幹細胞の指標である、式（Ｉ）のグリカン構造に特異的に結合するのに十分な特異性を保持した、天然または組み替えの、合成または天然由来の、モノクローナルまたはポリクローナルの、任意の抗体またはその断片を含む。本明細書で用いられる「抗体（ａｎｔｉｂｏｄｙ）」または「抗体群（ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ）」という用語は、抗体全体、およびその機能的部分を含んだ抗体断片を包含する。「抗体」という用語は、抗体全体が結合特異性を有するエピトープに結合を達成するのに十分な軽鎖可変領域および／または重鎖可変領域の部分を有する、任意の単一特異性または二重特異性化合物を包含する。前記断片は少なくとも１個の重鎖または軽鎖免疫グロブリンポリペプチドの可変領域を含むことができ、ならびにＦａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）．ｓｕｂ．２フラグメント、およびＦｖフラグメントを含むことができるがこれらに限定されない。

【０４３６】

前記抗体は、酵素、磁性ビーズ、コロイド磁性ビーズ（ｃｏｌｌｏｉｄａｌ ｍａｇｎｅｔｉｃ ｂｅａｄｓ）、ハプテン、蛍光色素、金属化合物、放射性化合物、クロマトグラフィ樹脂、固相または薬物等ではあるが限定されない他の適した分子および化合物に結合させることができる。前記抗体に結合させることができる前記酵素としてはアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ウレアーゼおよびベーターガラクトシダーゼ等が挙げられるがこれらに限定されない。前記抗体に結合させることができる前記蛍光色素としてはフルオレッセインイソチオシアネート、イソチオシアン酸テトラメチルローダミン、フィコエリトリン、アロフィコシアニンおよびテキサスレッド等が挙げられるがこれらに限定されない。抗体に結合させることができるさらなる蛍光色素についてはＨａｕｇｌａｎｄ、Ｒ．Ｐ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ：Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｂｅｓ ａｎｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（１９９２－１９９４）を参照のこと。前記抗体に結合させることができる前記金属化合物としてはフェリチン、金コロイド、および特に、コロイド超磁性ビーズ（ｃｏｌｌｏｉｄａｌ ｓｕｐｅｒｐａｒａｍａｇｎｅｔｉｃ ｂｅａｄｓ）等が挙げられるがこれらに限定されない。前記抗体に結合させることができる前記ハプテンとしては、ビオチン、ジゴキシゲニン、オキサザロン、およびニトロフェノール等が挙げられるがこれらに限定されない。前記抗体に結合させるまたは組み込むことができる前記放射性化合物は当該分野において公知であり、テクネチウム９９ｍ、．ｓｕｐ．１２５ Ｉ、ならびに、．ｓｕｐ

．１４　Ｃ、．ｓｕｐ．３　Ｈ、および．ｓｕｐ．３５　Ｓ等の限定されない任意の放射性核種を有するアミノ酸などが挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３７】

式（Ｉ）のグリカン構造に対する抗体は任意の供給源から入手してよい。これらは市販されている場合がある。事実上、幹細胞上のグリカン構造の存在を検出する任意の手段が本発明に含まれる。このような抗体の一例はＡｂｃａｍからのＨ１型（クローン１７－２０６；ＧＦ２８７）抗体である。

【０４３８】

幹細胞上の式（Ｉ）のグリカン構造の存在の検出は、幹細胞上の式（Ｉ）のグリカン構造を同定するための任意の方法により行われてよい。好ましくは、この検出は幹細胞上の式（Ｉ）のグリカン構造に対するマーカまたは結合タンパク質の使用によるものである。幹細胞上の式（Ｉ）のグリカン構造のための該結合剤／マーカは上記で議論されるマーカのいずれのものであってもよい。しかし、幹細胞上の式（Ｉ）のグリカン構造に対する抗体または結合タンパク質が特に幹細胞上の式（Ｉ）のグリカン構造に対するマーカとして有用である。

【０４３９】

最初に特化した系統（ｄｅｄｉｃａｔｅｄ　ｌｉｎｅａｇｅ）の細胞を取り出すことによって細胞を分離または濃縮するために、各種手法を用いることができる。モノクローナル抗体、結合タンパク質およびレクチンが、細胞系統および／または分化の段階を同定するために特に有用である。抗体を固相に結合し、粗分離を可能にすることができる。用いる分離手法は回収される画分の生存能力の保持を最大限にするものであるべきである。効果の異なる各種手法を用いて「比較的粗精製の」分離物を得ることができる。用いられる個々の手法は分離の効率、関連する細胞毒性、簡便性および実施スピード、ならびに高度な器具および／または技術的手腕の必要性によって異なる。

【０４４０】

分離および濃縮の手順としては、抗体被覆磁性ビーズを用いた磁気分離；アフィニティクロマトグラフィ；モノクローナル抗体に結合した、またはモノクローナル抗体と併せて用いられる、細胞毒性薬、例えば補体および細胞毒等が挙げられるが限定されないもの；ならびに、プレート等の固体マトリクスに結合した抗体による「パンニング」；エルトリエーション（ｅｌｕｔｒｉａｔｉｏｎ）；または任意の他の好都合な手法；などが挙げられるがこれらに限定されない。

【０４４１】

分離または濃縮手法の使用としては、物理的な（密度勾配遠心および対流遠心エルトリエーション（ｃｏｕｎｔｅｒ－ｆｌｏｗ　ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　ｅｌｕｔｒｉａｔｉｏｎ））、細胞表面の（レクチンおよび抗体親和性）、および生体染色特性の（ミトコンドリア結合色素ｒｈｏ１２３およびＤＮＡ結合色素Ｈｏｅｓｃｈｔ　３３３４２）相違に基づくもの等が挙げられるがこれらに限定されない。

【０４４２】

正確な分離を提供する手法としては、複数のカラーチャネル、低角度および鈍角の光散乱検出チャネル、インピーデンスチャネル等、様々な程度の精巧さを有し得るＦＡＣＳなどが挙げられるが、これらに限定されない。これらの細胞を幹細胞上の式（Ｉ）のグリカン構造の発現量によって単離および識別できる任意の方法を用いることができる。

【０４４３】

最初の分離においては、典型的には約１．ｔｉｍｅｓ．１０．ｓｕｐ．１０、好ましくは約５．ｔｉｍｅｓ．１０．ｓｕｐ．８－９細胞で開始し、幹細胞上の式（Ｉ）のグリカン構造に対する抗体または結合タンパク質またはレクチンは少なくとも１種の蛍光色素で標識することができ、一方、各種の特化した系統に対する抗体または結合タンパク質は少なくとも１種の異なる蛍光色素に結合することができる。それぞれの系統は別々のステップで分離することができるが、望ましくはこれらの系統は、幹細胞マーカ上の式（Ｉ）のグリカン構造に対するポジティブセレクションを行っている際に同時に分離される。死細

胞と関連する色素（ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）等が挙げられるがこれに限定されない）を用いることにより、前記細胞から死細胞を選択的に除くことができる。

【０４４４】

さらに任意の細胞集団を濃縮するため、それらの細胞集団に対する特異的マーカを用いることができる。例えば、リンパ、骨髄、または赤血球系統等の特異的細胞系統に対する特異的マーカを用いて、これらの細胞を濃縮し、または減らすことができる。これらのマーカは、間葉系またはケラチノサイト幹細胞を除去または選び出すことによってＨＳＣまたはその子孫を濃縮するために用いることができる。

【０４４５】

上記方法はさらに、他の幹細胞特異的マーカに対するポジティブセレクションにより細胞をさらに濃縮するステップを含むことができる。適した他のポジティブな幹細胞マーカとしては、ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、Ｔｒａ　１－６０、ＣＤ３４．ｓｕｐ．＋、Ｔｈｙ－１．ｓｕｐ．＋、およびｃ－ｋｉｔ．ｓｕｐ．＋等が挙げられるがこれらに限定されない。これらは一部で非間葉系幹細胞型に対するマーカも含んでおり、該マーカは、該マーカを欠く特異的間葉系幹細胞型との関連においてネガティブセレクションのために用いることができる。個々の要素による適当な選択、ＭＳＣまたはその子孫の自己再生を可能にするバイオアッセイの開発、およびＭＳＣまたはその子孫のそのマーカに関するスクリーニングにより、生存能力のあるＭＳＣまたはその子孫を多く含む組成物を各種目的のために生成することができる。

【０４４６】

幹細胞またはＭＳＣまたはその子孫の集団が単離されると、さらなる単離技術を用いて該ＭＳＣまたはその子孫内部の亜集団を単離することができる。細胞系統に対するＦＡＣＳ等の細胞選択システムなどの特異的マーカを用いて、各種細胞系統を同定および単離することができる。

【０４４７】

本発明のさらに他の態様において、間葉系細胞またはＭＳＣまたはその子孫の含有量を測定する方法が提供され、該方法は：

幹細胞またはその子孫（分化した細胞）を含んだ細胞集団を得るステップと；

前記細胞集団を、その幹細胞上の式（Ｉ）のグリカン構造に対する結合タンパク質または結合剤と結合させるステップと；

その幹細胞上の式（Ｉ）のグリカン構造に対する前記結合タンパク質または結合剤により同定されるそれらの細胞を選択するステップと；

選択された細胞の量を、結合タンパク質による選択前の細胞集団内の細胞の量との比較において定量するステップと；

を含む。

【０４４８】

結合剤－標識複合体

本発明は特に、前記結合剤が「標識構造」と結合させられる場合の、本発明の構造の結合に関する。この標識構造とは、アッセイにおいて観察可能な分子、例えば蛍光分子、放射性分子、西洋わさびペルオキシダーゼ等の検出可能な酵素またはビオチン／ストレプトアビジン／アビジンを意味する。標識された結合分子を本発明の細胞に接触させると、細胞を細胞表面上の標識の存在に基づいてモニタリング、観察および／または選別することができる。モニタリングおよび観察は標識を観察するための常法、例えば蛍光測定装置、顕微鏡、シンチレーションカウンターおよび他の放射能を測定するための装置により行うことができる。

【０４４９】

細胞選別のための、結合剤および標識結合剤複合体の使用

本発明は特に、他の細胞型を含んだ細胞材料等の生体材料または試料からのヒト幹細胞の選別または選択のための、結合剤およびその標識された複合体の使用に関する。好ましい細胞型としては、臍帯血、骨髄、末梢血に由来する間葉系細胞等の間葉系細胞、および

胚幹細胞、および間葉系細胞以外の対応する関連した細胞などが挙げられる。標識は本発明の細胞型を他の類似した細胞から選別するために用いることができる。他の様態において、前記細胞は、血液細胞；または培養細胞については好ましくはフィーダ細胞；例えば間葉系幹細胞については対応する関連した／フィーダ（支持）非間葉系細胞；または骨髄間葉系幹細胞と関連したヒト骨髄ストローマ細胞等の組織内の細胞；等の各種細胞型から選別される。好ましい細胞選別法はＦＡＣＳ選別である。他の選別法では固定化した結合剤構造が用いられ、結合および未結合細胞の分離のために未結合細胞が除去される。

【０４５０】

固定化した結合剤構造の使用

好ましい一様態において、前記結合剤構造は固相に結合される。細胞が固相と接触させられ、材料の一部が表面に結合する。この方法は細胞の分離および細胞表面構造の分析、または固定化による細胞の細胞生物学的変化の研究に用いることができる。分析を伴う方法において、細胞は好ましくは試薬によってタグをつけられ、または標識され、固相上の結合剤構造を介して固相に結合した細胞が検出される。この方法は好ましくはさらに１または複数個の、未結合細胞除去のための洗浄のステップを含むことができる。

【０４５１】

好ましい固相としては、細胞を接触させるのに用いる、細胞に適したプラスチック材料、例えば細胞培養瓶、シャーレおよびマイクロタイターウェル；発酵槽表面材料等が挙げられる。

【０４５２】

好ましい幹細胞と混入細胞との間の特異的識別

本発明はさらに、幹細胞を、フィーダ細胞等の分化した細胞、好ましくは動物フィーダ細胞およびより好ましくはマウスフィーダ細胞から識別する方法に関する。さらに、本試薬は特異的結合試薬を用いた任意の分別法による幹細胞の精製のために用いることができると理解される。

【０４５３】

好ましい分別法としては、蛍光活性化細胞選別法（ＦＡＣＳ）、アフィニティクロマトグラフィ法、および磁性ビーズ法等のビーズ法などが挙げられる。

【０４５４】

本発明はさらに、間葉系細胞集団への特異的結合を示すが混入細胞集団には示さない、ポジティブセレクション法に関する。本発明はさらに、混入細胞集団への特異的結合を示すが間葉系細胞集団には示さない、ネガティブセレクション法に関する。間葉系細胞の識別のさらに他の様態においては、間葉系細胞集団はフィーダ細胞集団等の均質な細胞集団とともに識別され、好ましくはこれは他の材料の分離が必要な場合に行われる。ポジティブセレクションのための試薬は、本発明における間葉系細胞に結合し、混入細胞集団には結合しないように選択することができ、ネガティブセレクションのための試薬は、反対の特異性を示すように選択することができると理解される。本発明の細胞の１つの集団が本発明で研究されていない新規細胞集団から選択される必要がある場合、本発明の結合分子は、該新規細胞集団に対して適した特異性（結合または非結合）を有すると確認されれば用いることができる。本発明は特に、本発明の新規結合または選択法の開発のための、このような結合特異性の分析に関する。

【０４５５】

本発明の好ましい特異性としては、

ｉ）マンノース型構造、特にレクチンＰＳＡのようなアルファ－Ｍａｎ構造であって好ましくは混入細胞の表面上のもの

の認識等が挙げられる。

【０４５６】

結合剤による細胞の操作

本発明は特に、特異的結合タンパク質による細胞の操作に関する。記載されたグリカンは細胞間の相互作用において重要な役割を担っており、従って結合剤または結合分子を細

胞の特定の生物学的操作のために用いることができると考えられる。この操作は遊離または固定化結合剤により行われ得る。好ましい一様態において、細胞は、該細胞の増殖速度に影響する細胞培養条件下で細胞の操作のために用いられる。

【０４５７】

幹細胞の命名

本発明は全ての幹細胞型、好ましくはヒト幹細胞の分析に関する。幹細胞の一般的な命名を図７に記す。本発明の別の命名基準は、図７に示すように、好ましい一様態において成体幹細胞（臍帯血型材料等）の同等物である、初期ヒト細胞を記載する。骨髄および血液中の成体幹細胞は「血液関連組織」由来の幹細胞に対する同等物である。

【０４５８】

特に細胞培養条件下での幹細胞の操作のためのレクチン

本発明は特に、幹細胞の状態の分析のための、および／または幹細胞の操作のための、特異的結合タンパク質としてのレクチンの使用に関する。

【０４５９】

本発明は特に、レクチンの存在下で幹細胞を増殖させる細胞培養条件下での幹細胞の操作に関する。操作は好ましくは細胞培養槽の表面上の固定化されたレクチンにより行われる。本発明は特に、表１８に示すようなレクチンの存在下で細胞を増殖させることによる幹細胞の増殖速度の操作に関する。

【０４６０】

本発明は、好ましい一様態において、細胞表面からの本発明の特異的グリカンマーカ構造を認識する特異的レクチンによる、幹細胞の操作に関する。本発明は、好ましい一様態において、ＥＣＡレクチン等のＧａｌ認識レクチン；または細胞表面から同定されるガレクチンリガンドグリカンの識別のためのガレクチン等の類似のヒトレクチン；の使用に関する。さらに、幹細胞中のゲノムレベルでのガレクチン発現の特異的変異が、特にガレクチン－１、－３および－８について、存在すると考えられた。

【０４６１】

レクチン等の特異的結合剤による幹細胞の選別

本発明は、特にＦＡＣＳ法による、幹細胞の選別のための、本発明の細胞表面グリカンエピトープを認識するレクチン型等の特異的結合剤の使用を明らかにした。最も好ましくは選別される細胞型として血液および骨髄中の成体幹細胞、特に臍帯血由来間葉系細胞等の臍帯血細胞、などの間葉系細胞等が挙げられる。

【０４６２】

幹細胞のＯ－グリカングライコームの好ましい構造

本発明は特に、幹細胞の次のＯ－グリカンマーカ構造に関する：

マーカ組成$NeuAc_2Hex_1HexNAc_1$に従うコア１型Ｏ－グリカン構造、好ましくは構造ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧａＩＮＡｃおよび／またはＳＡα３Ｇａｌβ３（Ｓａα６）ＧａｌＮＡｃを含み；

ならびに、マーカ組成$NeuAc_{0-2}Hex_2HexNAc_2dHex_{0-1}$に従うコア２型Ｏ－グリカン構造、より優先的にはさらにグリカン系列$NeuAc_{0-2}Hex_{2+n}HexNAc_{2+n}dHex_{0-1}$［式中、ｎは１、２または３であり、より優先的にはｎは１または２であり、さらに優先的にはｎは１である］を含み；

より具体的に好ましくは$R_1Galβ4(R_3)GlcNAcβ6(R_2Galβ3)GalNAc$

［式中、R_1およびR_2は独立に無またはシアル酸残基、好ましくはα２，３－結合シアル酸残基、または$Hex_nHexNAc_n$による伸長であって、ここでｎは独立に少なくとも１、好ましくは１ないし３、最も好ましくは１ないし２、最も好ましくは１、の整数であり、前記伸長はシアル酸残基、好ましくはα２，３－結合シアル酸残基で終結してよく；そして

R_3は独立に無またはフコース残基、好ましくはα１，３－結合フコース残基である］を含む。これらの構造はコア２構造を合成するβ６ＧｌｃＮＡｃ転移酵素の発現と相関して

いると考えられる。
【０４６３】
好ましい分岐Ｎ－アセチルラクトサミン型スフィンゴ糖脂質
本発明はさらに、分岐した、Ｉ型の、２個の末端Ｇａｌβ４残基を有するポリ－Ｎ－アセチルラクトサミンを、ヒト幹細胞の糖脂質から明らかにした。この構造は、ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミンを分岐させることができるβ６ＧｌｃＮＡｃ転移酵素の発現と、またさらに分岐ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミンに特異的なレクチンの結合と、相関している。さらに、ＰＷＡレクチンは幹細胞の操作、特にその増殖速度における作用を有していることが注目された。
【０４６４】
幹細胞の好ましい定性的および定量的完全Ｎ－グライコーム
幹細胞選別および単離のための好ましい結合剤
本発明は特に、幹細胞結合試薬、優先的にはタンパク質、優先的にはマンノース結合またはα１，３／６結合マンノース結合、ポリ－ＬａｃＮＡｃ結合、ＬａｃＮＡｃ結合、および／またはフコースもしくは優先的にはα１，２－結合フコース結合のもの；好ましい一様態においては幹細胞結合もしくは非結合のレクチン、より優先的にはＧＮＡ、ＳＴＡ、および／またはＵＥＡ；ならびに、さらに好ましい一様態においてはそれらの組み合わせ；に関するものであり、また、選択的に幹細胞に結合するまたは結合しないグリカン結合試薬を利用した本発明に記載される使用に関するものである。
【０４６５】
幹細胞型特異的ガレクチンおよび／またはガレクチンリガンドのための好ましい使用
実施例に記載されるように、本願発明者らは、異なる幹細胞が異なったガレクチン発現プロファイル、および異なったガレクチン（グリカン）リガンド発現プロファイルを有していることも見出した。本発明はさらに、ガラクトース結合試薬、優先的にはガラクトース結合レクチン、より優先的には特異的ガレクチンを；幹細胞型特異的様式で、記載の前記使用に対して本発明に記載される特定の幹細胞を調節するために、またはそれに結合するために、使用することに関する。
【０４６６】
各種グリカン型と関連したポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン配列および非還元末端エピトープの分析および利用
本発明は、本発明の細胞型と関連したポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン配列（ポリ－ＬａｃＮＡｃ）に関する。本願発明者らは、本発明の実施例に記載のように、異なる種類のポリ－ＬａｃＮＡｃが異なる細胞型に特徴的であることを見出した。具体的には、ＣＢＭＮＣは直鎖２型ポリ－ＬａｃＮＡｃにより特徴付けられ；ＭＳＣ、特に主に関連する細胞型ＣＢ　ＭＳＣは、分岐２型ポリ－ＬａｃＮＡｃにより特徴付けられる。本発明は特に、本発明のこれらグリカン特性の分析および使用に関する。本発明はさらに、本発明の本実施例に示す特異的細胞型関連グリカン配列の分析および使用に関する。
【０４６７】
本発明は、Ｎ－およびＯ－グリカン、スフィンゴ糖脂質グリカン、ならびにポリ－ＬａｃＮＡｃ等の異なるグリカンクラスの非還元末端エピトープに関する。本願発明者らは、特にβ１，４－結合Ｇａｌ、β１，３－結合Ｇａｌ、α１，２－結合Ｆｕｃ、α１，３／４－結合Ｆｕｃ、α－結合シアル酸、およびα２，３－結合シアル酸の相対量が、調査した細胞型間で特徴的に異なることを見出し；また、本発明は特に、本発明のこれらグリカン特性の分析および使用に関する。
【０４６８】
本発明はさらに、実施例に記載のようにｍ／ｚ　７７１および９１７の中性Ｏ－グリカンシグナル等の指標となるグリカンシグナルを比較することにより、Ｏ－グリカンにおけるフコシル化度を分析することに関する。本願発明者らは、中性Ｏ－グリカンシグナルの、ｍ／ｚ　９１７における、７７１と比較した際の低い相対存在量は、ｍ／ｚ　７７１におけるシグナルに対応する、末端β１，４－結合Ｇａｌを有するＯ－グリカン配列の低い

フコシル化度を示すことを見出した。ｍ／ｚ　５５２におけるシグナルは、α１，２－フコシル化コア１　Ｏ－グリカン配列を含むＨｅｘ$_1$ＨｅｘＮＡｃ$_1$ｄＨｅｘ$_1$に対応する。ＣＢ　ＭＮＣにおいては、ｍ／ｚ　９１７のグリカンシグナルが比較的豊富であり、ｍ／ｚ７７１のシグナルに対応する、末端β１，４－結合Ｇａｌを有するＯ－グリカン配列の高いフコシル化度を表す。本発明において分析される好ましい細胞型も構造の特徴的なフコシル化度を有していた。

【０４６９】

特に、本発明は間葉系細胞のポリ－ＬａｃＮＡｃと関連する末端エピトープの分析に関するものであり、より好ましくはこれらのエピトープがポリ－ＬａｃＮＡｃ鎖と関連して、最も好ましくはＯ－グリカンまたはスフィンゴ糖脂質において、提示されている場合におけるものである。本発明はさらに、グリカンの構造的分析および特異的グリコシル化型の同定ならびに本発明の他の使用における、このような特徴的ポリ－ＬａｃＮＡｃ、末端エピトープ、およびフコシル化プロファイルの本発明の方法による分析に関するものであり；特にこの分析はエンド－β－ガラクトシダーゼ消化に基づいて、非還元末端断片およびそのプロファイルの分析により、ならびに／または還元末端断片およびそのプロファイルの分析により、本発明の実施例に記載されるように行われる。本願発明者らは、細胞型特異的グリコシル化特性が効果的にエンド－β－ガラクトシダーゼ反応産物およびそのプロファイルに反映されることを見出した。本発明はさらに、本発明によるこのような反応産物プロファイルおよびその分析に関する。

【０４７０】

本願発明者らは、特徴的非還元ポリ－ＬａｃＮＡｃ関連配列が、好ましい一様態において、Ｆｕｃα２Ｇａｌ、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ、およびα３’－シアル化Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃを含むことを見出した。本発明は特に、間葉系幹細胞および幹細胞の分化との関連における、好ましくはヒト胚幹細胞およびその分化との関連における、本方法によるこのようなグリカン構造の分析に関する。

【０４７１】

本願発明者らはさらに、最も詳しく分析された３つの細胞グリカンクラス、Ｎ－グリカン、Ｏ－グリカン、およびスフィンゴ糖脂質グリカンの全てが、互いの比較において、特に本発明の実施例および表に記載される非還元末端グリカンエピトープおよびポリ－ＬａｃＮＡｃ配列に関して、異なった制御を受けていることを見出した。従って、複数のグリカンクラスからの定量的グリカンプロファイル分析データを組み合わせれば、有意により多くの情報が生成されるであろう。本発明は特に、本発明の方法により得られる、Ｎ－グリカン、Ｏ－グリカン、およびスフィンゴ糖脂質グリカンから選択される複数のグリカンクラスからのグリカンデータを組み合わせることに関し；より好ましくは３種全てのクラスが分析され；ならびに、本発明によるこの情報の使用に関する。好ましい一様態において、Ｎ－グリカンデータがＯ－グリカンデータと組み合わせられ；およびさらに好ましい一様態において、Ｎ－グリカンデータがスフィンゴ糖脂質グリカンデータと組み合わせられる。

【０４７２】

間葉系幹細胞マーカ

本発明は特定の一様態において、グリカン構造を明らかにしたものであり、該構造は間葉系幹細胞または分化した細胞、好ましくは間葉由来の骨原性に分化した細胞、好ましくは骨髄間葉系幹細胞に対するマーカである。

【０４７３】

本発明は分析のための最適な条件、いくつかの抗体（または結合剤型）に対する好ましいフローサイトメトリ（ＦＡＣＳ）条件および免疫組織化学に対するいくつかの好ましい条件も明らかにした。本発明は、特定の細胞集団が前記抗体を用いて分別され得ることも明らかにした。本発明はさらに、特異的抗体結合試薬を用いることによる遊離細胞成分（糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質またはオリゴ糖）の単離および分析に関する。本発明は特に、トリプシン感受性およびトリプシン抵抗性成分に関する。

【０４７４】
特に骨髄間葉系幹細胞に対して好ましいマーカ
分化した細胞との比較における、マーカ構造間葉系幹細胞
本発明は３つの好ましい高度に優勢なマーカｓＬｅｘ、ＳＳＥＡ－３およびＳＳＥＡ－４、ならびにそれほど優勢ではないが特徴的な発現を示す第２のマーカ（ＳＴｎおよびＴＮ、ｐＬｎおよびｓＬｅａ）を、間葉系幹細胞に対して、骨原性に分化した細胞との比較において明らかにした。ｓＬｅｘ、ｓＬｅａおよびｐＬＮはＮ－アセチルラクトサミンマーカの群、幹細胞の分化抗原の特徴的パネル（ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃ ｐａｎｅｌ）のための１型およびＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミンに属する。ＧａｌＮＡｃ型構造としてはＳＳＥＡ－３およびＳＳＥＡ－４型構造、ならびにムチン構造ｓＴｎおよびＴｎなどが挙げられる。ムチン型およびグロボ系列型エピトープは、交差反応性であり、新規標的構造を含み得ると考えられる。特に骨髄間葉系幹細胞のための好ましい間葉系幹細胞マーカは、従って：
ｉ）好ましいＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造シアリル－Ｌｅｗｉｓ ｘ［ＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ、ＳＡはシアル酸、好ましくはＮｅｕ５Ａｃ、ｓＬｅｘ］
ｉｉ）段階特異的胚抗原様構造ＳＳＥＡ－３およびＳＳＥＡ－４、ＳＳＥＡ－３型およびＳＳＥＡ－４型構造と称される。
ｉｉｉ）２つのムチン型エピトープｓＴｎ ＳＡα６ＧａｌＮＡｃα（Ｓｅｒ／Ｔｈｒ）、およびＴｎ ＧａｌＮＡｃα（Ｓｅｒ／Ｔｈｒ）、前記特異的抗体が特にＦＡＣＳ分析との関連において間葉系細胞マーカとして好ましい
ｉｖ）２つのＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造ＧａｌΒ３ＧｌｃＮＡｃ（ｐＬＮ）およびＮｅｕＮＡｃα３ＧａｌΒ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃ（ｓＬｅａ）
である。
【０４７５】
好ましいＳＳＥＡ－３およびＳＳＥＡ－４型標的構造およびその使用
用いられる特異的抗体クローンは特に骨髄間葉系幹細胞およびその骨原性構造への分化を分析するのに有用であると考えられる。さらに、本発明は、前記ＳＳＥＡ－４構造の少なくとも一部は、それが少なくとも部分的に細胞表面においてプロテアーゼ感受性であることから、従来の細胞表面糖脂質マーカＳＳＥＡ－４（Ｎｅｕ５Ａｃα３ＧａｌΒ３ＧａｌＮＡｃβ３ＧａｌΑ４ＧａｌΒ４ＧｌｃβＣｅｒ）とは異なることを明らかにした。前記プロテアーゼ感受性は間葉系細胞の約３分の１であり、ＦＡＣＳ分析においては標識された細胞の約２３％の減少が見られ、およびマーカが遊離した分化した細胞上ではさらに劇的であり、事実上全体で約２０％の単位の減少であった。図１９、実施例１６を参照。本発明は特に、実施例１６に示すようなプロテアーゼ感受性および非感受性標的分子の分析の方法に関する。
【０４７６】
分化する／分化した間葉系幹細胞に対するマーカ構造
本発明は、分化した間葉系幹細胞、より好ましくは骨原性に分化した間葉系幹細胞に特徴的ないくつかの構造を明らかにした。前記構造としては、特にアシアロＧＭ１およびアシアロＧＭ２等の糖脂質ならびにグロボトリオースおよびグロボテトラオースから知られる、ならびに、ムチン、好ましくはＭｕｃ １からのシアル化エピトープを認識することが示されたＣＡ１５．３クローン上の、エピトープを有するＧａｌＮＡｃ含有構造、ならびにＩ型（Ｌｅｗｉｓ ａ）およびＩＩ型ラクトサミンＨ２型等の特異的フコシル化ラクトサミンなどが挙げられる。
【０４７７】
ｉ）アシアロガングリオシドエピトープ アシアロ－ＧＭ２（ＧａｌＮＡｃβ４ＧａｌΒ４ＧｌｃβＣｅｒ）およびアシアロＧＭ１（ＧａｌΒ３ＧａｌＮＡｃβ４ＧａｌΒ４ＧｌｃβＣｅｒ）。抗体は必ずしも末端エピトープ以外のオリゴ糖配列全体を認識しないと考えられる。本発明はさらに、末端ＧａｌＮＡｃβ４－、ＧａｌＮＡｃβ４Ｇａｌ－、Ｇ

ａｌＮＡｃβ４Ｇａｌβ４、およびＧａｌＮＡｃβ４Ｇａｌβ４Ｇｌｃ；ならびにＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃ、Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ、Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ４およびＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ４Ｇａｌβ４Ｇｌｃを有する類似したより短いエピトープの識別に関する。本発明はさらに好ましくは、タンパク質上の次の非還元末端の末端エピトープ：ＧａｌＮＡｃβ４－、ＧａｌＮＡｃβ４Ｇａｌ－、ＧａｌＮＡｃβ４Ｇａｌβ４－および／またはＧａｌＮＡｃβ４Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ；ならびにアシアロＧＭ１の末端エピトープ：Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃ（特定の一様態においてはＯ－グリカンコアＩと交差反応性）および／またはＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃβの識別に関する。エピトープはプロテアーゼ感受性であることが示されており、発明は特定の一様態においてタンパク質に共有結合したエピトープに関する。Ｇｌｃはタンパク質に結合した構造ではないであろうと考えられるが、例えばＧａｌＮＡｃβ４Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃはＮ－グリカンおよびＯ－グリカンから知られる対応するタンパク質エピトープである。アシアロガングリオシド標的および抗体は、ＦＡＣＳおよび類似した条件下での分化した間葉系幹細胞の分析に特に好ましい。

【０４７８】

ｉｉ）グロボ系列エピトープであるグロボチラシルセラミド（Ｇａｌα４Ｇａｌβ４ＧｌｃβＣｅｒ）およびグロボテトラソイルセラミドＧｂ４／Ｇｌ４（ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα４Ｇａｌβ４ＧｌｃβＣｅｒ）、本発明はさらに、末端オリゴ糖配列：Ｇａｌα４Ｇａｌ、Ｇａｌα４Ｇａｌβ、Ｇａｌα４Ｇａｌβ４、およびＧａｌα４Ｇａｌβ４Ｇｌｃ；ならびにＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌ、ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα、ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα４Ｇａｌ、ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα４Ｇａｌβ、ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα４Ｇａｌβ４、およびＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα４Ｇａｌβ４Ｇｌｃを有する類似したより短いエピトープの識別に関する。前記の２つのグロボ系列コア構造はファクス分析（ｆａｘ　ａｎａｌｙｓｉｓ）により、間葉系細胞において本質的にトリプシン非感受性であることが明らかにされた。従って本発明は、好ましくは、特に脂質複合体としての、構造／エピトープの識別に関する。

【０４７９】

興味深いことに、Ｇｂ３は骨原性に分化した細胞においてトリプシン感受性である（５４．３％ヴェルセン（ｖｅｒｓｅｎｅ）、４．９％トリプシン）。本発明は従って、骨原性に分化した細胞からのトリプシン感受性Ｇｂ３エピトープの研究に関するものであり、好ましい一様態において該エピトープとしてはＧｌｃ残基を有しない末端エピトープ：Ｇａｌα４Ｇａｌ、Ｇａｌα４Ｇａｌβ、Ｇａｌα４Ｇａｌβ４および公知の類似したタンパク質結合エピトープＧａｌα４Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃなどが挙げられる。

【０４８０】

ｉｉｉ）ムチン関連エピトープＣＡ１５－３。ＣＡ１５．３のシアル化ムチンエピトープはα結合単糖含有グロボ系列構造およびＧａｌＮＡｃ／Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃ含有アシアロガングリオシド構造と部分的類似性を有するであろうと考えられる。

【０４８１】

さらなる有望なムチン型構造関連抗体ＧＦ２７６（腫瘍胎児抗原）は、免疫組織化学および類似の条件下における分化した間葉系幹細胞の分析に対して特に好ましい。さらに、ムチン抗原ｓＴｎ　ＳＡα６ＧａｌＮＡｃα（Ｓｅｒ／Ｔｈｒ）、およびＴｎ　ＧａｌＮＡｃα（Ｓｅｒ／Ｔｈｒ）、ならびに対応する特異的抗体は、免疫組織化学および類似の条件下における分化した間葉系幹細胞の分析に対して特に好ましい。

【０４８２】

ｉｖ）特異的フコシル化Ｎ－アセチルラクトサミン、例えばＩ型ラクトサミン構造Ｇａｌβ（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ（Ｌｅｗｉｓ　ａ、Ｌｅａ）およびＩＩ型ラクトサミンＨ２型、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ。両構造は異なる位置および立体配座上の特異的α－フコースエピトープを有する。該エピトープは各種のＩ型および２型ラクトサミン認識抗体のパネルにおいて、各種条件下での幹細胞の特異的識別に対して有用であると考えられる。Ｌｅｗｉｓ　ａ抗原および対応する抗体は、特にＦＡＣＳおよび類似の条件

下における分化した間葉系幹細胞の分析を対象とする。さらなるＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造Ｈ１型（Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ）および対応する抗体（ＧＦ３０３等）は、免疫組織化学および類似の条件下における分化した間葉系幹細胞の分析に対して特に好ましい。

【０４８３】

好ましいエピトープの識別のための好ましい抗体としては、ＧＦ２７５（ＣＡ１５－３）、ＧＦ２９６（アシアロＧＭ１）、ＧＦ２９７（ＧＬ４）、ＧＦ２９８（Ｇｂ３）、ＧＦ３００（アシアロＧＭ２）、ＧＦ３０２（Ｈ２型）、およびＧＦ３０４（Ｌｅａ）、ＧＦ２７６（腫瘍胎児抗原）およびＧＦ３０３（Ｈ１型）ならびに同様な特異性を有する抗体等があげられる。

【０４８４】

トリプシン感受性エピトープおよび隠れたエピトープ

トリプシン感受性エピトープ

データは、表２３に示すように、構造の一部がトリプシン処理に対して感受性であることを明らかにした。トリプシン遊離を伴うＦＡＣＳの結果も、ＭＳＣおよび骨原性細胞に対して、２番目のＦＡＣＳの列として示す。トリプシンはプロテアーゼであり、特にタンパク質エピトープ等のトリプシン感受性エピトープの少なくとも一部はトリプシン処理により遊離すると推定することができる。

【０４８５】

トリプシンによりさらに明らかになった隠れたエピトープ

ＦＡＣＳ分析は、トリプシン処理後に安定であるかまたは増加さえするエピトープを明らかにした。これは間葉系細胞試料グロボトリオースから観察することができる（１６．９％から２８．４％への増加）。本発明はさらに、トリプシン抵抗性エピトープの単離および研究に関する。

【０４８６】

増加したトリプシン条件感受性はネガティブＩＨＦ染色と相関する

免疫組織化学はグリカン構造の検出においてより感度が低いように見受けられた。興味深いことに、免疫組織化学の結果は、エピトープのトリプシン感受性と相関している。エピトープが免疫組織化学によって視認されない場合、ＦＡＣＳにおけるトリプシン後の陽性細胞の量も極めて少なく、多くの場合０．５ないし１．０％である。この例として、アシアロＧＭ２骨原性、アシアロＧＭ１骨原性およびＬｅｗｉｓ　ａが挙げられる。

【０４８７】

最初の細胞型において免疫蛍光によりエピトープが視認される場合は少ないが、ヴェルセンＦＡＣＳシグナルは第２の細胞型において高く、これらの場合、トリプシンＦＡＣＳシグナルは免疫蛍光と相関し、最初の細胞型においてエピトープはよりトリプシン抵抗性であるかまたは隠れてさえいる（トリプシン後に増加）ようである。　この例として、ＨＩ型、Ｔｎ、およびｓＴｎが挙げられる。

【０４８８】

効果的なポジティブおよび／またはネガティブ結合剤およびその組み合わせの選択のための拡張されたＭＳＣ結合剤標的の表

表２７に、本願発明者らによる、ＭＳＣおよび分化した細胞に特異的なグリコシル化の構造的割当て（質量分析プロファイリング、ＮＭＲ、グリコシダーゼ、およびグリカンフラグメンテーション実験を記載する本発明の実施例、ならびに本発明の表２８ないし３０および他の表および実施例を含むＮ－グリカンプロファイルの比較による構造の解明）、生合成経路およびグリコシル化遺伝子発現の知識を含む生合成情報、ならびに本発明に記載の結合剤特異性（特異的細胞型および分子クラスに結合するレクチン、抗体、および他の結合剤分子を記載する本発明の実施例）の結果を組み合わせたものを示す。

【０４８９】

表２７に、特異的細胞型における適した結合剤標的を、ｑ、＋／－、＋および＋＋記号、特に好ましくは＋および＋＋記号；ならびに有用な非存在または低発現を－、ｑ、およ

び＋／－記号、特に好ましくは－および＋／－記号により示す。本願発明者らは、このようなデータを特異的に選択された細胞型を識別するのに用いることができると考えた。本発明は、本発明の特定の様態：特異的細胞型と関連する標的を認識する結合剤を用いたポジティブセレクション；特異的細胞上に少量しか存在しない標的を用いることによるネガティブセレクション；ならびにポジティブセレクションとネガティブセレクションとの組み合わせ；または複数のポジティブおよび／もしくはネガティブ標的のさらなる組み合わせの、本発明の特異性および／もしくは効果を高めるための使用；のような各種の異なる原理による使用に関する。

【０４９０】

以下に本発明の結合剤の特に好ましい標的を記載する。

【０４９１】

１）ＭＳＣ結合剤構造：

本発明は好ましくは：

ＬＮ１型（Ｌｅｃ、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ）、

ｓＬｅｘ、より具体的にはｓＬｅｘβ３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ［ＮＡｃ］β、

大型高マンノース型Ｎ－グリカン、より具体的にはＭａｎα２Ｍａｎ末端エピトープを含むもの、

グリコシル化Ｎ－グリカン、より具体的にはＧｌｃαを含むもの、好ましくは末端Ｇｌｃα３Ｍａｎα、

コアフコシル化Ｎ－グリカン、

末端ＧｌｃＮＡｃβエピトープであって、より好ましくは、優先的にはＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ末端構造を有するＮ－グリカンにおけるものであり、好ましくは他のＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ末端構造も含み、さらに好ましくはＧｌｃＮＡｃβ４Ｍａｎ末端構造も含むもの；

特に好ましい結合剤構造はｓＬｅｘ、より具体的にはｓＬｅｘβ３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ［ＮＡｃ］βであって、任意に上記リストからの１または複数個の他のエピトープも有するもの、

から選択される、表２７に示す末端グリカンエピトープに基づきＭＳＣを識別することに関する。

【０４９２】

さらなる一様態において、本発明は表２７に示すＭＳＣおよび骨芽細胞に分化した細胞の識別に関するものであり、好ましくはＬＮ２型、より好ましくはＮ－グリカン末端エピトープＬＮβ２Ｍａｎに基づく。

【０４９３】

さらなる一様態において、本発明は表２７に示すＭＳＣおよび脂肪細胞分化細胞の識別に関するものであり、好ましくは：

Ｌｅｘ、Ｇｂ５（ＳＳＥＡ－３）、ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ、および／またはＳＳＥＡ－４（ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα４Ｇａｌβ４Ｇｌｃ）

等のエピトープに基づくものであり；特に好ましい結合剤構造はＳＳＥＡ－４であり、任意に上記リストからの１または複数個の他のエピトープ、好ましくはＬｅｘも有する。

【０４９４】

さらなる一様態において、本発明は、好ましくはＧＤ２に基づき、表２７に示すＭＳＣ、骨芽細胞分化および脂肪細胞分化細胞を識別することに関する。

【０４９５】

２）ＭＳＣから分化した細胞に対する結合剤構造

本発明はＭＳＣから分化した細胞、好ましくは本発明に記載される脂肪細胞、骨芽細胞および／または軟骨細胞に分化した細胞の、表２７に示す末端グリカンエピトープに基づく特異的識別に関するものであり、該末端グリカンエピトープは好ましくは：

Ｌｅａ、

ｓＬｅａ、

α３’－シアリルＬｅｃ、
ＬＮβ４Ｍａｎ、より好ましくは分岐Ｎ－グリカン構造内のもの
ＬＮβ２（ＬＮβ４）Ｍａｎα３（ＬＮβ２Ｍａｎα６）Ｍａｎ
Ｌｅｘ、より好ましくはＬｅｘβ３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ［ＮＡｃ］β
Ｈ２型、
Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ、
アシアロ－ＧＭ１、
ＧａｌＮＡｃβ、より好ましくはアシアロ－ＧＭ２、
Ｇｂ４、
Ｇｂ３、
ＧａｌＮＡｃα、より好ましくはＴｎエピトープ内のもの、
シアリルＴｎ、
オリゴシアル酸、より好ましくはＮｅｕＡｃα８ＮｅｕＡｃα末端エピトープ、
ＧＤ３、
低マンノース、小型高マンノース、またはハイブリッド型Ｎ－グリカンであって、好ましくは末端Ｍａｎα３Ｍａｎ、および／またはＭａｎα６Ｍａｎを含むもの、
Ｍａｎα３（Ｍａｎα６）Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃ［β４ＧｌｃＮＡｃ］、
Ｍａｎβ、好ましくはＭａｎβ４ＧｌｃＮＡｃ末端エピトープ内のもの；
から選択され、
ここで、特に好ましい結合剤構造はアシアロ－ＧＭ１、アシアロ－ＧＭ２、Ｔｎ、シアリル－Ｔｎ、Ｌｅａ、およびｓＬｅａであり；
ここから好ましくは１または複数個の他のエピトープが選択されて本発明の特定の様態において用いられ、より好ましくはアシアロ－ＧＭ１、アシアロ－ＧＭ２、Ｔｎ、またはシアリル－Ｔｎのいずれかを含み；
任意に上記の完全なリストからの１または複数種の他のエピトープも含む。

【０４９６】

さらなる一様態において、本発明は表２７に示す脂肪細胞分化細胞の識別に関するものであり、好ましくは：Ｌｅａ、ｓＬｅａ、シアリルＬｅｃ、および／またはＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ等のエピトープに基づくものであり；特に好ましい結合剤構造はＬｅａまたはｓＬｅａであり、任意に上記リストからの１または複数個の他のエピトープも有する。

【０４９７】

さらなる一様態において、本発明は、好ましくは：Ｇｂ３、Ｇｂ４、および／またはＬＮβ４Ｍａｎであって後者は好ましくは分岐Ｎ－グリカン構造内であるもの等のエピトープに基づき、表２７に示す骨芽細胞分化細胞を識別することに関するものであり；特に好ましい結合剤構造はＧｂ３および／またはＧｂ４であり、任意に上記リストからの１または複数個の他のエピトープも有する。

【０４９８】

好ましいＬｅｘ／ｓＬｅｘ抗体結合剤

本願発明者らは、特定の細胞型が本発明の異なるグリカン主鎖上にＬｅｘ／ｓＬｅｘエピトープを有していることを見出した。有用なこのような試薬が本発明において記載され、さらに有用な試薬が次に列挙される。本発明は特に、異なる細胞型内および異なるグリカン主鎖上のＬｅｘ／ｓＬｅｘエピトープの構造特異的識別のための、１または複数種の列挙された抗体の使用に関する。このリストは好ましいグリカン主鎖特異性に従って整列されている。各主鎖上のＬｅｘおよび／またはｓＬｅｘに対する適した結合剤は本発明により各種細胞型に対して選択することができる。

【０４９９】

記号	生産者記号	製造者／文献	クローン
	抗**Lex** 抗体:		
GF 305	CBL144 (抗CD15) Le^x	Chemicon	28
GF 517	ab34200 (CD15)	Abcam	TG-1
GF 515	557895 抗ヒトCD15	BD Pharmingen	W6D3
GF 525	ab17080-1 (CD15)		MMA
	ab20138	Abcam	29
	ab1252	Abcam	BRA4F1
	ab49758	Abcam	BY87
	ab51369	Abcam	CLB-gran/2, B4
	ab13453	Abcam	DU-HL60-3
	ab53997	Abcam	LeuM1
	ab6414	Abcam	MC-1
	ab665	Abcam	MEM-158
	ab754	Abcam	MY-1
	ab15614	Abcam	VIM-C6
	Lewis x	Abcam	
	ab3358	Abcam	P12
	抗CD15	Beckman Coulter	80H5
	抗CD15	BioLegend	HI98
	抗CD15	Chemicon	ZC-18C
	抗CD15	Chemicon	MCS-1
	抗CD15	Chemicon	DT07 & BC97
	抗CD15	Labvision	15C02
	抗CD15	Labvision	SPM490
	抗CD15	Ancell	AHN1.1
	抗CD15	Quartett Immunodiagnostika, Berlin	Tu9
	抗CD15	Patricell	B-H8
	抗CD15	Patricell	HIM.....
	抗CD15	Santa Cruz	C3D-1
	抗CD15	Santa Cruz	3G75
	抗Lewis x	Santa Cruz	4C9
	抗CD15	ScyTek Laboratories	FR4A5
	抗CD15	USBio	5F17
	抗CD15	USBio	8.S.288
	抗CD15	USBio	0.N.80

次頁につづく

【０５００】

	ポリ-LacNAc および／または 糖脂質特異性を有する 抗Lex抗体：		
GF 518	ab16285 (SSEA1)	Abcam	MC480
	N-グリカンのための 抗Lex抗体：		
	中性N-グリカンにおける抗Lex	Lucka et al. Glycobiology 15:87-100, 2005	L5
	中性N-グリカンにおける抗Lex	Lanctot et al. Current Opinion in Chemical Biology 11, Issue 4, 2007, 373-380; Lanctot et al. 2006, Poster presentation in Glycobiology Society Meeting, Universal City, CA, poster 238	3A8
	コア2 O-グリカンのための 抗Lex抗体：		
	コア２O-グリカンにおける抗Lex	Sekine et al. Eur. J. Biochem. 268:1129-1135, 2001	SA024
	抗スルホLex抗体：		
	抗CD15u=スルホCD15	USBio	5F18
	抗sLex抗体：		
GF 516	551344 抗ヒトCD15s	BD Pharmingen	CSLEX1
GF 307	MAB2096 (抗sLewis X)	Chemicon	KM93
	抗 sLex	Seikagaku	73-30
	抗 sLex	Meridianlifesciences	258-12767
	抗 sLex	USBio	2Q539
	コア2 O-グリカンのための 抗sLex抗体：		
GF 526	MAB996 (抗hP-セレクチン- 糖タンパク質リガンド1 ab)	R&D systems	CHO131

【０５０１】

間葉系細胞のグリカンの識別

一般的観察

ＭＳＣの１つの集団全体または骨原性系統に分化した１つの細胞集団だけに完全に特異的な、分析された特異的グリカンエピトープは、１つも存在しないと思われる。その代わり、幹細胞および分化した細胞には特定のグリカンエピトープの増加が認められる。場合により、抗体は、特定の細胞型内の高度に、もしくは数倍多い；または細胞集団の一部において現在のＦＡＣＳの検出限界を超えて存在するが、他の対応する細胞集団においてはそうではない；エピトープを認識する。このような抗体は特に、特定の細胞集団の特異的識別に有用であると考えられる。さらに、特定の細胞型の独立した集団を認識するいくつかの抗体の組み合わせは、ポジティブまたはネガティブな様式において、より大きな細胞集団の識別に有用である。

【０５０２】

本発明は間葉系細胞集団全般に共通の、または間葉系幹細胞もしくは分化した間葉系幹細胞全般等の間葉系細胞の特定の分化段階のための、または脂肪細胞もしくは骨芽細胞等の特異的に分化した細胞集団に特異的な、試薬を提供する。さらに本発明は、臍帯血または骨髄等の特定の組織型に由来する間葉系幹細胞のための特異的マーカ構造を明らかにする。

【０５０３】

本発明はさらに、さらなる結合剤、好ましくは末端グリカン構造を認識する特異的抗体またはレクチン、のスクリーニングのための、標的構造および特異的グリカン標的構造の使用、ならびに本発明のスクリーニングにより産生された結合剤の使用に関する。前記スクリーニングのための好ましい手法の一つは、１種または数種の本発明の造血幹細胞グリカンエピトープおよび追加の対照グリカンを含んだグリカンアレイである。本発明は、高特異性抗体を見出すための、公知の抗体のスクリーニング、またはそれらの公開されている特異性の情報の探索に関する。

【０５０４】
大部分の細胞で認められる個々のマーカは、対象となる細胞がその特異的グリカンエピトープを発現しない場合に、細胞の識別および／または単離のために用いることができると考えられる。これらのマーカは例えば、該マーカの発現が対象細胞に少ないかまたは存在しない場合に、組織または細胞培養物等の生体材料からの細胞集団の単離に用いることができる。幹細胞を含む組織は通常これらを原始幹細胞の段階で含むと考えられ、そのため、高度に発現するマーカを細胞の単離のために最適化または選択することができる。特定の分化状態を保つための細胞培養条件を選択することが可能であり、大部分または事実上全ての細胞集団を認識する本発明の抗体はこれらの点で細胞の分析または単離に有用である。

【０５０５】
ＦＡＣＳ分析等の方法では細胞上の構造の定量的な測定が可能であり、従って細胞集団の一部を認識する抗体も細胞集団に対して特徴的である。

【０５０６】
間葉系細胞集団の特異的分析のためのいくつかの抗体の組み合わせは細胞集団を特徴付けるであろう。好ましい一様態において、細胞集団の大部分（３５％超）またはほとんど（５０％）を認識する（好ましくは３０％超；４０％超、５０％超、６０％超、７０％超、８０％超の順で後者ほど好ましい；最も好ましくは９０％超）少なくとも１種の「効果的に結合する抗体」が、好ましくは前記細胞集団のわずかな部分（好ましくは方法の検出限界から低レベルの認識までであって、好ましい順に細胞の１０％未満、７％未満、５％未満、２％未満、１％未満、例えば細胞の０．２ないし１０％、より好ましくは細胞の０．２ないし５％、さらに好ましくは０．５ないし２％、または最も好ましくは０．５％ないし１．０％）を認識する、または該集団を何も認識しない（検出限界またはそれ未満、例えば好ましい順に５％未満、２％未満、１％未満、０．５％未満、および０．２％未満）、およびより好ましくは本発明の細胞集団を事実上全く認識しない、少なくとも１種の「非結合抗体」との組み合わせによる分析法のために、選択される。さらに他の様態において、前記組み合わせ法は「中程度に結合する抗体」の使用を含み、該抗体は細胞の実質的な部分、好ましくは５ないし５０％、より好ましくは７％ないし４０％、および最も好ましくは１０ないし３５％を認識する。

【０５０７】
本発明はさらに、さらなる結合剤、好ましくは末端グリカン構造を認識する特異的抗体またはレクチン、のスクリーニングのための標的構造および特異的グリカン標的構造の使用、ならびに本発明のスクリーニングにより産生された結合剤の使用、に関する。前記スクリーニングのための好ましいツールの一つは、１種または数種の本発明の造血幹細胞グリカンエピトープおよび追加の対照グリカンを含んだグリカンアレイである。本発明は、高特異性抗体を見出すための、公知の抗体のスクリーニング、またはそれらの公開されている特異性の情報の探索に関する。さらに本発明は、ファージディスプレイライブラリからの構造の探索に関する。

【０５０８】
さらに、大部分の細胞で認められる個々のマーカは、対象となる細胞がその特異的グリカンエピトープを発現しない場合に、細胞の識別および／または単離のために用いることができる。これらのマーカは例えば、該マーカの発現が対象細胞に少ないかまたは存在しない場合に、組織または細胞培養物等の生体材料からの細胞集団の単離に用いることができる。幹細胞を含む組織は通常これらを原始幹細胞の段階で含むと考えられ、そのため、高度に発現するマーカを細胞の単離のために最適化または選択することができる。好ましい一様態において、本発明は、本発明の結合剤により、例えば好ましくは本発明のグリカンエピトープ（表２７）を認識するモノクローナル抗体等のシアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘ認識タンパク質により、間葉系細胞を選択することに関する。別の一様態において、本発明は、前記認識に対して最適化されたセレクチンまたはセレクチン相同タンパク質の使用に関する。

【０５０９】
特定の分化状態を保つための細胞培養条件を選択することが可能であり、大部分または事実上全ての細胞集団を認識する本発明の抗体はこれらの点で細胞の分析または単離に有用である。
【０５１０】
ＦＡＣＳ分析等の方法では細胞上の構造の定量的な測定が可能であり、従って細胞集団の一部を認識する抗体も細胞集団に対して特徴的である。
【０５１１】
組み合わせ
細胞集団のための、造血または関連する集団の特異的分析のためのいくつかの抗体の組み合わせは、該細胞集団を特徴付けるであろう。好ましい一様態において、細胞集団の大部分（３５％超）またはほとんど（５０％）を認識する（好ましくは３０％超；４０％超、５０％超、６０％超、７０％超、８０％超の順で後者ほど好ましい；最も好ましくは９０％超）少なくとも１種の「効果的に結合する抗体」が、好ましくは前記細胞集団のわずかな部分（好ましくは方法の検出限界から低レベルの認識までであって、好ましい順に細胞の１０％未満、７％未満、５％未満、２％未満、または１％未満、例えば細胞の０．２ないし１０％、より好ましくは細胞の０．２ないし５％、さらに好ましくは０．５ないし２％、または最も好ましくは０．５％ないし１．０％）を認識する、または該集団を何も認識しない（検出限界またはそれ未満、例えば好ましい順に５％未満、２％未満、１％未満、０．５％未満、および０．２％未満）、およびより好ましくは本発明の細胞集団を事実上全く認識しない、少なくとも１種の「非結合抗体」との組み合わせによる分析法のために、選択される。さらに他の様態において、前記組み合わせ法は「中程度に結合する抗体」の使用を含み、該抗体は細胞の実質的な部分、好ましくは５ないし５０％、より好ましくは７％ないし４０％、および最も好ましくは１０ないし３５％を認識する。
【０５１２】
本発明は、末端エピトープを認識するいくつかの試薬の同時使用に関するものであり、好ましくは少なくとも２種の試薬、より好ましくは少なくとも３種のエピトープ、さらに好ましくは少なくとも４種、さらになお好ましくは少なくとも５種、さらになお好ましくは少なくとも６種、さらになお好ましくは少なくとも７種、および最も好ましくは少なくとも８種を、十分なポジティブおよびネガティブ標的の識別のために使用することに関する。伸長エピトープを選択的および特異的に認識する高特異性結合剤を用いれば、必要な結合剤は少数であってよく、例えばこれらは好ましくは少なくとも２種の試薬、より好ましくは少なくとも３種のエピトープ、さらに好ましくは少なくとも４種、さらになお好ましくは少なくとも５種、最も好ましくは少なくとも６種の抗体の組み合わせとして用いられる。伸長エピトープを選択的および特異的に認識する高特異性結合剤は、少なくとも５、１０、２０、５０、または１００倍の順で後者ほど好ましい親和性の、伸長エピトープの１つと結合する。抗体結合親和性の測定のための方法は当該分野において周知である。本発明は、１種の伸長エピトープ；および、さらなる、少なくとも１種、好ましくは１種、の同一の末端構造を有する伸長エピトープ；の効果的な識別が可能な、より低特異性の抗体の使用にも関する。
【０５１３】
前記試薬は好ましくは細胞標識実験において示す５種、１０種、２０種、４０種もしくは７０種または全ての試薬の順で後者ほど好ましい試薬を含むアレイ内で用いられる。
【０５１４】
本発明はさらに、フコシル化および／またはシアル化構造の、これらの修飾を有していない構造との組み合わせに関する。１型Ｎ－アセチルラクトサミンの２型構造との、１型（Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ）構造との、ならびに／またはムチン型および／もしくは糖脂質構造との、組み合わせ。好ましいある組み合わせにおいては、少なくとも１種の結合抗体が、異なる構造型を認識する非結合抗体と組み合わせられる
【０５１５】

前記抗体は、本発明の標的構造として明らかになった特定のグリカンエピトープを認識する。該抗体の特異性および親和性はクローン毎に異なると考えられる。特定のグリカン構造を認識することが知られる特定のクローンは同一細胞集団を必ずしも認識しない。

【０５１６】

炭水化物阻害による細胞からの結合剤または結合剤複合体の遊離

本発明は、好ましい一様態において、結合剤からのグリカンの遊離に関する。これは：

ａ）結合剤を伴う方法による細胞の濃縮または単離後の、可溶性結合剤からの細胞の遊離

ｂ）細胞の濃縮もしくは単離後の、または細胞培養中の、例えば細胞の継代のための、固相に結合した結合剤からの遊離

等のいくつかの方法のために好ましい

【０５１７】

阻害炭水化物はレクチンの結合エピトープまたはその一部に対応するように選択される。好ましい炭水化物としてはオリゴ糖、単糖およびその複合体等が挙げられる。炭水化物の好ましい濃度としては、１ｍＭないし５００ｍＭ、より好ましくは１０ｍＭないし２５０ｍＭ、およびさらに好ましくは１０ないし１００ｍＭの細胞が耐性を有する濃度が挙げられ、より高い濃度が単糖、および固相に結合した結合剤を用いる方法にとって好ましい。オリゴ糖および還元末端複合体を含む好ましいオリゴ糖配列は、Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃ、ならびに表および本発明の式中に記載されるこれらのシアル化およびフコシル化バリアント等が挙げられる。複合体中の好ましい還元末端構造は、ＡＲ［式中、Ａはアノマー構造であって好ましくはＧａｌβ４Ｇｌｃ、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃに対するベータ、およびＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃに対するアルファであり、Ｒは糖にグリコシド結合する有機残基であり、好ましくは方法、エチルもしくはプロピル等のアルキル、またはシクロヘキシルもしくは芳香環構造等の環構造であって、任意にさらなる官能基により修飾される］である。

【０５１８】

好ましい単糖としては、Ｆｕｃ、Ｇａｌ、ＧａｌＮＡｃ、ＧｌｃＮＡｃ、Ｍａｎ等の結合エピトープの末端のまたは２個もしくは３個の末端の単糖などが挙げられ、好ましくはアノマー複合体：例えばＦｕｃαＲ、ＧａｌβＲ、ＧａｌＮＡｃβＲ、ＧａｌＮＡｃαＲ　ＧｌｃＮＡｃβＲ、ＭａｎαＲとしてのものである。例えばＰＮＡレクチンは好ましくはＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃまたはラクトースまたはＧａｌにより阻害され、ＳＴＡはＧａｌβ４Ｇｌｃ、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡまたはその由来するオリゴマーもしくはポリ－ＬａｃＮＡｃエピトープにより阻害され、およびＬＴＡはフコシララクトースＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）Ｇｌｃ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃまたはＦｕｃもしくはＦｕｃαＲにより阻害される。一価の阻害条件の例はＶｅｎａｂｌｅ　Ａ．　ｅｔ　ａｌ．（２００５）　ＢＭＣ　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ　ｂｉｏｌｏｇｙに示されており、細胞が多価で固相に結合する場合の阻害については、より大きなエピトープおよび／または濃度またはマルチ／ポリバレント複合体が好ましい。

【０５１９】

本発明はさらに、ＣＤ３４＋磁性ビーズからの細胞の遊離に対して知られるものと同様な、プロテアーゼ消化による結合剤の遊離の方法に関する。

【０５２０】

固定化結合剤、好ましくは結合剤タンパク質のタンパク質

本発明は、幹細胞の培養のための、またはそれに関連する、特異的結合剤の使用に関するものであり、ここで該結合剤は固定化される。前記固定化には、非共有結合的固定化、および共有結合を伴う固定化法、ならびにさらに部位特異的固定化および非特異的固定化が含まれる。

【０５２１】

好ましい非共有結合的固定化法は受動的吸着法を含む。好ましい一つの方法においては

、細胞培養皿またはウェルのプラスチック表面等の表面に結合剤を受動的に吸収させる。好ましい方法としては溶媒中または湿潤状態の結合剤タンパク質の前記表面への吸収、好ましくは該表面への均一な吸収、などが挙げられる。好ましい均一な分布は、好ましくは形成１０分間ないし３日間、より好ましくは１時間ないし１日間、および最も好ましくは約８ないし２０時間の一晩の吸収時間の間、弱い振とうを用いて生成される。固定化の洗浄ステップは、レクチンの脱落を回避するために、好ましくは低速の液体の流れを用いて穏やかに行われる。

【０５２２】

特異的固定化

特異的固定化は、結合剤の結合部位がそのリガンドグリカンド、例えば本発明の幹細胞の特異的細胞表面グリカン、に結合するのを妨げないタンパク質領域からの固定化を目的とする。

【０５２３】

好ましい特異的固定化法としては、結合剤タンパク質／ペプチドの表面からの特異的アミノ酸残基からの化学的結合などが挙げられる。好ましい一つの方法においては、システイン等の特定のアミノ酸残基が固定化の部位にクローン化され、システインから結合が行われる。他の好ましい方法においては、Ｎ－末端システインが過ヨウ素酸により酸化され、アミノ－オキシ－メチルヒドロキシルアミンまたはヒドラジン構造等のアルデヒド反応性試薬に結合される。さらに好ましい薬品としてはＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎにより販売される「ｃｌｉｃｋ」薬品ならびにＰｉｅｒｃｅおよびＭｏｌｅｃｕｌａｒ ｐｒｏｂｅｓにより販売されるアミノ酸特異的カップリング試薬などが挙げられる。好ましくはグリカンが結合部位に近接していない、またはより長いｓｐｅｃａｒが用いられる場合に、好ましい特異的固定化は結合剤のＯ－またはＮ－グリカン等のタンパク質結合炭水化物から起こる。

【０５２４】

グリカン固定化結合剤タンパク質

好ましいグリカン固定化はグリカンの反応性化学選択的連結基（ｒｅａｃｔｉｖｅ ｃｈｅｍｏｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｌｉｇａｔｉｏｎ ｇｒｏｕｐ）Ｒ１を介して起こり、ここで該化学基は第二の化学選択的連結基Ｒ２に特異的に、結合剤のタンパク質部分に大きなまたは結合破壊性の変化をもたらすことなく、結合され得る。アルデヒドおよびケトンと反応する化学選択的基としてはアミノ－オキシ－メチルヒドロキシルアミンまたはヒドラジン構造等が挙げられる。好ましいＲ１基の一つはタンパク質の表面上に化学的に合成されたアルデヒドまたはケトン等のカルボニルである。他の好ましい化学選択的基としては、マレイミドおよびチオール；ならびにアジドおよびそれに対する反応性基を含んだ「Ｃｌｉｃｋ」試薬等が挙げられる。好ましい合成ステップは、

ａ）炭水化物選択的酸化化学による、好ましくは過ヨウ素酸による、化学酸化、または、

ｂ）ガラクトース酸化酵素等の、非還元末端の末端単糖酸化酵素による、または、修飾単糖残基のグリカンの末端単糖への転移による、酵素的酸化、

を含む。酸化酵素または過ヨウ素酸の使用は当該分野に公知であり、Ｋａｂｉ－Ｆｒｅｎｓｅｎｉｕｓ（ＷＯ２００５ＥＰ０２６３７、ＷＯ２００４ＥＰ０８８２１、ＷＯ２００４ＥＰ０８８２０、ＷＯ２００３ＥＰ０８８２９、ＷＯ２００３ＥＰ０８８５８、ＷＯ２００５０９２３９１、ＷＯ２００５０１４０２４；参照により全体が組み込まれたものとする）およびドイツの研究機関によるＨＥＳ－多糖の組み替えタンパク質への結合に関する特許出願に記載されている。末端単糖残基の転移のための好ましい方法としては、本願発明者らの一部による特許出願ＵＳ２００５０１４７１８（参照により全体が組み込まれたものとする）もしくはＱａｓｂａおよびＲａｍａｋｒｉｓｈｍａｎほかによるＵＳ２００７２５８９８６（参照により全体が組み込まれたものとする）に記載されるような、またはＮｅｏｓｅの糖ペグ化（ｇｌｙｃｏｐｅｇｙｌａｔｉｏｎ）特許（ＵＳ２００４１３２６４０；参照により全体が組み込まれたものとする）に記される方法を用いることによ

る、変異ガラクトシルトランスフェラーゼの使用などが挙げられる。

【０５２５】

高特異性化学タグを含む複合体

好ましい一様態において、結合剤はリガンドＬによって特異的に認識され得るタグ（Ｔと呼ぶ）に特異的にまたは非特異的に結合する。タグの例としてはビオチン結合リガンド（ストレプト）アビジン、または他のフルオロカルボニルに結合するフルオロカルボニル、またはペプチド／抗原および該ペプチド／抗原に対する特異的抗体等が挙げられる。

【０５２６】

好ましい複合体構造

好ましい複合体構造は、

式ＣＯＮＪ

Ｂ－（Ｇ－）$_{m}$Ｒ１－Ｒ２－（Ｓ１－）$_{n}$Ｔ－、

［式中、Ｂは結合剤であり、Ｇはグリカン（前記結合剤がグリカン複合体である場合）であり、Ｒ１およびＲ２は化学選択的連結基であり、Ｔはタグ、好ましくはビオチンであり、Ｌは前記タグに特異的に結合するリガンドであり；Ｓ１は任意のスペーサー基、好ましくは炭素数１ないし１０のアルキルであり、ｍおよびｎは独立に０または１のいずれかの整数である］

によるものである。

【０５２７】

結合剤の複合体

本発明はさらに、固相、またはポリマ等を含むマトリクスなどの表面への結合を伴う結合剤の複合体に関する。グリカンからの結合剤を結合することは、結合剤の交差連結（ｃｒｏｓｓ　ｂｉｎｄｉｎｇ）または結合剤の細胞への影響を回避するために特に有用であると考えられる。

【０５２８】

複合体は、式ＣＯＭＰ

Ｂ－（Ｇ－）$_{m}$Ｒ１－Ｒ２－（Ｓ１－）$_{n}$（Ｔ－）$_{p}$（Ｌ－）$_{r}$－（Ｓ２）$_{s}$－ＳＯＬ、

［式中、Ｂは結合剤であり、ＳＯＬは固相またはマトリクスまたは表面または標識（リガンド結合標識であってもよい）であり、Ｇはグリカンであり（結合剤がグリカンに結合する場合）、Ｒ１およびＲ２は化学選択的連結基であり、Ｔはタグ、好ましくはビオチンであり、Ｌは該タグに特異的に結合するリガンドであり；Ｓ１およびＳ２は任意のスペーサー基、好ましくは炭素数１ないし１０のアルキルであり、ｍ、ｎ、ｐ、ｒおよびｓは独立に０または１の整数である］

の構造を有する。好ましい伸長エピトープ。

【０５２９】

好ましい伸長エピトープ

伸長グリカンエピトープは本発明の間葉系細胞の識別のために有用であると考えられる。本発明は、全ての細胞型を分析するために前記構造の一部を用いることに関するが、特定の構造モチーフは特定の分化段階においてより一般的である。さらに、前記末端構造の一部は特に高度に発現されており、そのため１または複数の型の細胞の識別のために特に有用であると考えられる。末端エピトープおよびグリカン型を、グリカン型の構造分析に基づき表２７に列挙する。以下の好ましい伸長構造エピトープは、間葉系細胞のためのおよび本発明の使用のための新規マーカとして好ましい。

【０５３０】

好ましい末端Ｇａｌβ３／４構造

ＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミンを基盤とした構造

末端ＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造

本発明は、特異的Ｏ－グリカン、Ｎ－アグリカン（Ｎ－ａｇｌｙｃａｎ）および糖脂質エピトープ等の、好ましいＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミンを明らかにした。本発明は、好ましい一様態において、特に、豊富なＯ－グリカンおよびＮ－グリカンエピトープに関

する。本発明はさらに、特徴的糖脂質ＩＩ型ＬａｃＮＡｃ末端の識別に関する。本発明は特に、間葉系細胞および類似の細胞の識別のための、または分化段階の分析のための、ＩＩ型ＬａｃＮＡｃの使用に関する。しかし、該構造の実質的な量はより分化した細胞に存在すると考えられる。

【０５３１】

伸長ＩＩ型ＬａｃＮＡｃ構造は特にＮ－グリカン上に発現している。好ましいＩＩ型ＬａｃＮＡｃ構造は二分岐Ｎ－グリカンコア構造、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３／６Ｍａｎβ４にβ２結合する。

【０５３２】

本発明はさらに、間葉細胞に効果的に発現する、末端ＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造を有する新規Ｏ－グリカンエピトープを明らかにした。Ｏ－グリカン構造の分析は、特に前記末端構造を有するコアＩＩ　Ｎ－アセチルラクトサミンを明らかにした。好ましい伸長ＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミンは、従って、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃα、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃ、およびＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃαを含む。

【０５３３】

本発明はさらに、ＩＩ型ＬａｃＮＡｃの糖脂質上における存在を明らかにした。本発明は初めて末端型Ｎ－アセチルラクトサミンを糖脂質上に明らかにする。ネオラクト糖脂質ファミリは、特定の組織上に特徴的に発現し、他では発現しない重要な糖脂質ファミリである。好ましい糖脂質構造としては、エピトープ、好ましくは直鎖ネオラクトテラオシルセラミドの非還元末端の末端エピトープおよびその伸長バリアントＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（ＮＡｃ）、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、およびＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ等が挙げられる。さらに、直鎖ポリラクトサミンを認識する特異的試薬を前記構造の識別のために訴えることができると考えられ、この場合これらはタンパク質結合グリカンに結合する。好ましい一様態において、本発明はＮ－グリカンに結合したポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン、好ましくはＮ－グリカン上のＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ等のβ２結合構造に関する。本発明はさらに、好ましい細胞のポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン構造；ならびにＳＡα３、ＳＡα６、Ｆｕｃα２による非還元末端Ｇａｌに対する、およびＦｕｃα３によるＧｌｃＮＡｃ残基に対する、それらの修飾；の分析に関する。

【０５３４】

本発明は好ましくは四糖、六糖、および八糖の識別に関する。本発明はさらに、末端ＩＩ型ｌａｃＮＡｃエピトープを含む分岐糖脂質ポリラクトサミンを明らかにしたものであり、好ましくはこれらとしてＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６Ｇａｌ、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６Ｇａｌβ、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３）Ｇａｌ、およびＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３）Ｇａｌβ３、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３）Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（ＮＡｃ）、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３）Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、およびＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３）Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃなどが挙げられる。

【０５３５】

直鎖分岐（ｌｉｎｅａｒ　ｂｒａｎｃｈｅｄ）ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミンに特異的に結合する抗体は当該分野において周知であると理解される。本発明はさらに、分岐ポリＬａｃＮＡｃおよび類似したβ６Ｇａｌ（ＮＡｃ）エピトープを有するコアＩＩ　Ｏ－グリカンの両者を認識する試薬に関する。

【０５３６】

Ｌｅｗｉｓ　ｘ構造

伸長Ｌｅｗｉｓ　ｘ構造は特にＮ－グリカン上に発現する。好ましいＬｅｗｉｓ　ｘ構

造は二分岐Ｎ－グリカンコア構造、Ｇａｌ（Ｆｕｃα３）β４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３／６Ｍａｎβ４にβ２結合する

【０５３７】

本発明はさらに、糖脂質上のＬｅｗｉｓ　ｘの存在を明らかにした。好ましい糖脂質構造としてはＧａｌ（Ｆｕｃα３）β４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（ＮＡｃ）、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、およびＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ等が挙げられる。

【０５３８】

本発明はさらに、Ｏ－グリカン上のＬｅｗｉｓ　ｘの存在を明らかにした。好ましい糖脂質構造としては好ましくはコアＩＩ構造Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ６ＧＡｌＮＡｃ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃα、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃ、およびＧａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃα等が挙げられる。

【０５３９】

ＨＩＩ型構造

特異的伸長ＨＩＩ型エピトープは特にＮ－グリカン上に発現する。好ましいＨＩＩ型構造は二分岐Ｎ－グリカンコア構造、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３／６Ｍａｎβ４にβ２結合する。

【０５４０】

本発明はさらに、糖脂質上のＨＩＩ型の存在を明らかにした。好ましい糖脂質構造としては、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（ＮＡｃ）、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、およびＦｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ等が挙げられる。

【０５４１】

本発明はさらに、Ｏ－グリカン上のＨＩＩ型の存在を明らかにした。好ましい糖脂質構造としては、好ましくはコアＩＩ構造Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧＡｌＮＡｃ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃα、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃ、およびＦｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃα等が挙げられる。

【０５４２】

シアル化ＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造

本発明は、特異的Ｏ－グリカン、およびＮ－アグリカン（Ｎ－ａｇｌｙｃａｎ）および糖脂質エピトープ等の、好ましいシアル化ＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミンを明らかにした。本発明は、好ましい一様態において、特に、豊富なＯ－グリカンおよびＮ－グリカンエピトープに関する。ＳＡは本明細書においてシアル酸、好ましくはＮｅｕ５ＡｃまたはＮｅｕ５Ｇｃ、より好ましくはＮｅｕ５Ａｃのことを指す。該シアル酸残基はＳＡα３ＧａｌまたはＳＡα６Ｇａｌであり、これらの構造は特異的伸長エピトープとして提示された場合、特徴的末端構造をグリカン上に形成すると考えられる。

【０５４３】

シアル化ＩＩ型ＬａｃＮＡｃ構造エピトープは、特にＮ－グリカン上に発現する。好ましいＩＩ型ＬａｃＮＡｃ構造は二分岐Ｎ－グリカンコア構造にβ２結合し、ＳＡα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、ＳＡα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα、およびＳＡα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３／６Ｍａｎβ４等の好ましい末端エピトープが挙げられる。本発明はＮ－グリカン上の、ＳＡα３構造（ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα、およびＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３／６Ｍａｎβ４）ならびにＳＡα６エ

ピトープ（ＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、ＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα、およびＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３／６Ｍａｎβ４）の両者に関する。

【０５４４】

本発明はさらに、間葉型細胞に効果的に発現する、末端シアル化ＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造を有する新規Ｏ－グリカンエピトープを明らかにした。Ｏ－グリカン構造の分析は、特に前記末端構造を有するコアＩＩ　Ｎ－アセチルラクトサミンを明らかにした。好ましい伸長ＩＩ型シアル化Ｎ－アセチルラクトサミンは、従って、ＳＡα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃα、ＳＡα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃ、およびＳＡα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃαを含む。ＳＡα３構造は、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃα、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃ、およびＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃα等のＯ－グリカンとの関連で好ましい構造であることが明らかになった。

【０５４５】

特異的な好ましい四糖ＩＩ型ラクトサミンエピトープ

好ましい一様態において、高度に効果的な試薬は三糖より大きいエピトープを認識し得ると考えられる。従って本発明はさらに、好ましい伸長または大型グリカン構造エピトープとしての分岐末端ＩＩ型ラクトサミン誘導体Ｌｅｗｉｓ　ｙ　Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃおよびシアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘ　ＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃに関する。前記構造は好ましい末端三糖シアリル－ラクトサミン、Ｈ－ＩＩ型およびＬｅｗｉｓ　ｘエピトープの組み合わせであると考えた。該エピトープの分析は、他の末端ＩＩ型エピトープの分析に関連するさらに有用な方法として好ましい。本発明は特に、各種の型のグリカン上にＬｅｗｉｓ　ｙ型およびシアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘエピトープを有するコア構造をさらに定義すること、および、好ましいグリカンコア構造の識別を含めることによる該構造の識別の最適化に関する。

【０５４６】

ＩＩ型ラクトサミンと類似する構造

本発明はさらに、特にＮ－グリカンおよびラクトシルセラミド（Ｇａｌβ４ＧｌｃβＣｅｒ）糖脂質構造上のＬａｃｄｉＮＡｃ等のＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミンに類似の伸長エピトープの識別に関する。これらはＬａｃＮＡｃと類似性を共有しており、唯一の相違は単糖残基の位置上のＮＡｃ残基の数である。

【０５４７】

ＬａｃｄｉＮＡｃ構造

ＬａｃｄｉＮａｃは比較的希で特徴的なグリカン構造であると考えられ、間葉系細胞の分析のためにこの特に好ましい。本発明は少なくともβ２結合によるＮ－グリカン上のＬａｃｄｉＮＡｃの存在を明らかにした。該構造は特異的グリコシダーゼ開裂により分析された。該ＬａｃｄｉＮＡｃ構造は、構造表１３における２つの末端存在ＧｌｃＮＡｃ含有構造を有する構造と同一の質量を有し、特異的質量数に対する一つだけの異性体構造を示している。好ましい伸長ＬａｃｄｉＮＡｃエピトープとしては従って、ＧａｌＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、ＧａｌＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα、およびＧａｌＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３／６Ｍａｎβ４等が挙げられる。本発明はさらに、フコシル化ＬａｃｄｉＮＡｃ含有グリカン構造を明らかにしたものであり、好ましいエピトープとしては従って、さらにＧａｌＮＡｃβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、ＧａｌＮＡｃβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα、ＧａｌＮＡｃβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３／６Ｍａｎβ４
Ｇａｌ（Ｆｕｃα３）β４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３／６Ｍａｎβ４等が挙げられる。質量数２２６３の構造のＬａｃＮａｃのａ６結合シアル酸の存在が考えられ、α６シアル化およびα３フコシル化の競合的な性質に基づくと、表１３はフコースの少なくとも一部

が前記分子のＬａｃｄｉＮＡｃ腕上に存在することを示している。

【０５４８】

Ｉ型Ｎ－アセチルラクトサミンを基盤とする構造

末端Ｉ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造

本発明は、好ましいＩ型Ｎ－アセチルラクトサミンを有する特異的Ｏ－グリカン、Ｎ－グリカンおよび糖脂質エピトープを明らかにした。本発明は好ましい一様態において、特に豊富な糖脂質エピトープに関する。本発明はさらに、特徴的Ｏ－グリカンＩ型ＬａｃＮＡｃ末端の識別に関する。

【０５４９】

本発明はさらに、糖脂質上のＩ型ＬａｃＮＡｃの存在を明らかにした。本発明は初めて糖脂質上の末端Ｉ型Ｎ－アセチルラクトサミンを明らかにする。ラクト糖脂質ファミリは、特定の組織上に特徴的に発現し、他では発現しない重要な糖脂質ファミリである。好ましい糖脂質構造としては、エピトープ、好ましくは直鎖ネオラクトテラオシルセラミドの非還元末端の末端エピトープおよびその伸長バリアントＧａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（ＮＡｃ）、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、およびＧａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ等が挙げられる。さらに、直鎖ポリラクトサミンを認識する特異的試薬を前記構造の識別のために用いることができると考えられ、この場合これらはタンパク質結合グリカンに結合する。特に、好ましいＯ－グリカンおよび糖脂質上の末端三およびテラ糖エピトープは本質的に同一であると考えられる。本発明は好ましい一様態において、モノクローナル抗体等の同一の結合剤による両構造の識別に関する。

【０５５０】

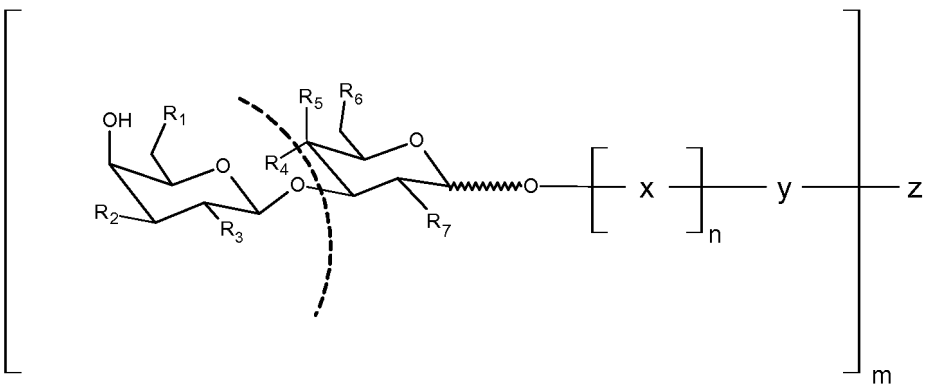
本発明はさらに、好ましい細胞の末端Ｉ型ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン構造；ならびにＳＡα３、Ｆｕｃα２による非還元末端Ｇａｌに対する、およびＳＡα６またはＦｕｃα３によるＧｌｃＮＡｃ残基に対する、それらの修飾；ならびに誘導体化Ｉ型Ｎ－アセチルラクトサミンの他のコアグリカン構造の分析に関する。

【０５５１】

好ましい伸長Ｉ型ＬａｃＮＡｃ構造はＮ－グリカン上に発現する。好ましいＩ型ＬａｃＮＡｃ構造は、好ましいエピトープＧａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ２ＭａｎαおよびＧａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３／６Ｍａｎβ４を有する二分岐Ｎ－グリカンコア構造にβ２結合する。

【０５５２】

本発明は間葉系細胞、好ましくは間葉系幹細胞調製物の状態を評価する方法に関するものであり、伸長グリカン構造、または、少なくとも２つの、前記調製物中のグリカン構造の群の存在を検出するステップを含み、ここで前記グリカン構造またはグリカン構造の群は、幹細胞の状態の分析および／または幹細胞の操作のための式Ｔ１



［式中、Ｘは結合位置であり

R_1、R_2、およびR_6はＯＨもしくはグリコシド結合した単糖残基シアル酸、好ましくはＮｅｕ５Ａｃα２もしくはＮｅｕ５Ｇｃ　α２、最も好ましくはＮｅｕ５Ａｃα２であり、または
R_3はＯＨもしくはグリコシド結合した単糖残基Ｆｕｃα１（Ｌ－フコース）またはＮ－アセチル（Ｎ－アセトアミド、$NCOCH_3$）であり；
R_4はＨ、ＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基Ｆｕｃα１（Ｌ－フコース）であり、R_4がＨである場合、R_5はＯＨであり、R_4がＨではない場合、R_5はＨであり；
Ｒ７はＮ－アセチルまたはＯＨであり
Ｘは細胞由来の天然オリゴ糖主鎖構造、好ましくはＮ－グリカン、Ｏ－グリカンもしくは糖脂質構造であり；またはｎが０である場合、Ｘは無であり、
Ｙはリンカ基、好ましくはＯ－グリカンおよびＯ－結合末端オリゴ糖および糖脂質のための酸素、ならびにＮ－グリカンのためのＮ、またはｎが０である場合、無であり；
Ｚは担体構造、好ましくは細胞により産生された天然担体であり、例えばタンパク質または脂質であって、好ましくは担体上のセラミドもしくは分岐グリカンコア構造、またはＨであり；
アーチはガラクトピラノシルからの結合が左側の残基の３位または４位いずれかに対するものであること、およびＲ４構造が他の４または３位にあることを表し；
ｎは０または１の整数であり、ｍは１ないし１０００、好ましくは１ないし１００、および最も好ましくは１ないし１０の整数（担体上のグリカンの数）であり、
Ｒ２およびＲ３がＯＨまたはＲ３がＮ－アセチルである場合、
左側の第１の残基が右側の残基の４位に結合する場合、Ｒ６はＯＨであり：
ＸはＧａｌα４Ｇａｌβ４Ｇｌｃではなく、（ＳＳＥＡ－３または４のコア構造）またはＲ３はフコシルである］
であり、ここで前記細胞調製物は間葉系細胞調製物であり、
ならびに、グリカン構造が伸長構造である場合、ここで、前記結合剤は該構造およびさらに少なくとも１つの還元末端伸長エピトープ、好ましくは式Ｅ１：
$Ax Hex (NAc)_n$、［式中、Ａはアノマー構造アルファまたはベータであり、Ｘは結合位置２、３または６であり；およびＨｅｘはヘキソピラノシル残基Ｇａｌ、またはＭａｎであり、ｎは０または１の整数であり、
ただし
ｎが１である場合、ＡｘＨｅｘＮＡｃはβ４ＧａｌＮＡｃまたはβ６ＧａｌＮＡｃであり、
ＨｅｘがＭａｎである場合、ＡｘＨｅｘはβ２Ｍａｎであり、および、
ＨｅｘがＧａｌである場合、ＡｘＨｅｘはβ３Ｇａｌまたはβ６Ｇａｌまたはα３Ｇａｌまたはα４Ｇａｌである］；
の単糖エピトープ（Ｘおよび／またはＹを置換）に結合し、
または
前記結合剤エピトープはさらに還元末端伸長エピトープ
還元末端ＧａｌＮＡｃα含有構造に結合するＳｅｒ／Ｔｈｒもしくは
Ｇａｌβ４Ｇｌｃ含有構造に結合するβＣｅｒに結合し、および前記グリカン構造は関連するまたは混入した細胞集団から決定される幹細胞集団である。

【０５５３】

本発明は幹細胞の状態の分析のための、および／または幹細胞の操作のための方法に関するものであり、幹細胞の試料から伸長グリカン構造または少なくとも２つのグリカン構造を検出するステップを含み、ここで前記グリカン構造は：末端ラクトサミン構造
$(R1)_{n1}$Ｇａｌ$(NAc)_{n3}$β３／４$(Fucα4／3)_{n2}$ＧｌｃＮＡｃβＲ［式中、Ｒ１はＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃに結合するＦｕｃα２、またはＳＡα３、またはＳＡα６であり、および
ＲはＮ－グリカン、Ｏ－グリカンおよび／または糖脂質の還元末端コア構造である］；ａ、

または、構造
（ＳＡα３）$_{n\,1}$ＧａｌＮＡｃ；［式中
ｎ１、ｎ２およびｎ３は０または１であって構造の存在または非存在を表し、
式中、ＳＡ
はシアル酸である］；または分岐エピトープ
ＧａｌＮＡｃまたは
R_1ＧａｌＮＡｃ、
［式中、R_1およびR_2は独立に無またはＳＡα３であり；およびR_3は独立に無または
Ｆｕｃα３である］；または
Ｎ－結合グリカンのコア構造中のＭａｎＧｌｃＮＡｃ構造；またはエピトープＧａｌ
ＧｌｃＮＡｃ、
または末端マンノース
または末端ＳＡα３構造α３／６Ｇａｌ［式中、ＳＡはシアル酸であり、ただし
ｉ）幹細胞は癌細胞株の細胞ではなく、そして
ｉｉ）細胞は造血ＣＤ３４$^{+}$細胞ではなく、構造がＮ－アセチルラクトサミンを有する場合、それは特異的伸長構造であってフコシル化され、またはＳＡα３ＧａｌＧｌｃＮＡｃ
ＧａｌＮＡｃ構造ではない］
からなる群より選択される。

【０５５４】

本発明は、式Ｔ８Ｅベータ
［Ｍα］$_{m}$ＧａｌＮ［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβｘＨｅｘ（ＮＡｃ）$_{p}$
［式中
式中、ｘは結合位置２、３、または６であり
式中、ｍ、ｎおよびｐは独立に０または１の整数であり
ＭおよびＮは単糖残基であって
ｉ）独立に無（その位置における遊離水酸基）
および／または
ｉｉ）Ｇａｌの３位または／およびＧｌｃＮＡｃの６位に結合するシアル酸であるＳＡ
および／または
ｉｉｉ）Ｇａｌの２位および／またはＧｌｃＮＡｃの３もしくは４位に結合するＦｕｃ（Ｌ－フコース）残基（ＧａｌがＧｌｃＮＡｃの他の位置（４または３）に結合する場合）
であり、
ＧａｌがＧｌｃＮＡｃの他の位置（４または３）に結合する場合、
ただしｍ、ｎおよびｐは独立に０または１であり。
Ｈｅｘはヘキソピラノシル残基ＧａｌまたはＭａｎであり、
ただしｐが１の場合、βｘＨｅｘＮＡｃはβ６ＧａｌＮＡｃであり、
ｐが０の場合
ＨｅｘはＭａｎであり、かつβｘＨｅｘはβ２Ｍａｎであり、またはＨｅｘはＧａｌであり、かつβｘＨｅｘはβ３Ｇａｌもしくはβ６Ｇａｌである］
の構造のＩＩ型ラクトサミンを基盤とする構造を識別する方法および結合物質に関する。

【０５５５】

本発明は式Ｔ１０Ｅ
［Ｍα］$_{m}$ＧａｌＮ［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβｘＨｅｘ（ＮＡｃ）$_{p}$
［ただしｐが１である場合、βｘＨｅｘＮＡｃはβ６ＧａｌＮＡｃであり、
ｐが０である場合、ＨｅｘはＭａｎであり、かつβｘＨｅｘはβ２Ｍａｎであり、または、ＨｅｘはＧａｌであり、かつβｘＨｅｘはβ６Ｇａｌである］
のＩＩ型ラクトサミンを基盤とする構造を識別する方法および結合物質に関する。

【０５５６】

本発明は式Ｔ１０ＥＭａｎ：
［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１－４［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、
［式中、変数は請求項２の式Ｔ８Ｅベータに対して記載されるものと同様である］
のＩＩ型ラクトサミンを基盤とする構造を識別する方法および結合物質に関する。
【０５５７】
ヒト血液関連、好ましくは造血、幹細胞調製物および／または混入細胞集団の状態を評価する方法であって、伸長グリカン構造、または、少なくとも２つの、前記調製物中のグリカン構造の群の存在を検出するステップを含み、ここで前記グリカン構造またはグリカンＴｎおよびシアリル－Ｔｎ構造の群は式ＭＵＣ
（Ｒ）$_{n}$ＧａｌＮＡｃα（Ｓｅｒ／Ｔｈｒ）$_{m}$
［式中、ｎおよびｍは独立に０または１であり、ＲはＳＡα６またはＧａｌβ３であり、ＳＡはシアル酸、好ましくはＮｅｕ５Ａｃであり、ＲがＧａｌβ３の場合、ｎは１である］、好ましくはＴｎ抗原：
（ＳＡα６）$_{n}$ＧａｌＮＡｃα（Ｓｅｒ／Ｔｈｒ）$_{m}$、
［式中、ｎおよびｍは独立に０または１であり、ＳＡはシアル酸、好ましくはＮｅｕ５Ａｃである］、
またはＴＦ抗原
Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃα（Ｓｅｒ／Ｔｈｒ）$_{m}$
によるものである。
［実施例］
【実施例１】
【０５５８】
臍帯血由来および骨髄由来間葉系幹細胞株のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析によるＮ－グリカンプロファイリング、グリコシダーゼおよびレクチンプロファイリング
細胞試料生成の例
臍帯血由来間葉系幹細胞株
臍帯血の採取
ヒト出産臍帯血（ＵＣＢ）ユニットを母親のインフォームドコンセントを得て出産後に採取し、該ＵＣＢを採取後２４時間以内に処理した。該ＵＣＢをリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）に１：１で希釈し、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ　Ｐｌｕｓ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，　Ｕｐｐｓａｌａ，　Ｓｗｅｄｅｎ）密度勾配遠心（４００ｇ／４０分間）を行って、単核球（ＭＮＣ）を各ＵＣＢユニットから単離した。単核球フラグメントをグラジエントから回収し、ＰＢＳで２回洗浄した。
【０５５９】
臍帯血細胞の単離および培養
ＣＤ４５／グリコホリンＡ（ＧｌｙＡ）陰性細胞選択を、免疫標識磁性ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を用いて行った。ＭＮＣをＣＤ４５およびＧｌｙＡ磁性マイクロビーズの両者と同時に３０分間インキュベートし、ＬＤカラムを用いて製品の使用説明書に従って（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）ネガティブに選択した。ＣＤ４５／ＧｌｙＡ陰性溶出画分および陽性画分の両者を回収し、培地中に懸濁して計数した。ＣＤ４５／ＧｌｙＡ陽性細胞はフィブロネクチン（ＦＮ）被覆６ウェルプレート上に１ｘ１０^{6}／ｃｍ^{2}の密度でプレーティングした。ＣＤ４５／ＧｌｙＡ陰性細胞はＦＮ被覆９６ウェルプレート（Ｎｕｎｃ）上に約１ｘ１０^{4}細胞／ウェルでプレーティングした。翌日培地を交換したため、非接着細胞のほとんどが除去された。残った非接着細胞はそれに続く週２回の培地交換で除去した。
【０５６０】
細胞は最初に５６％ＤＭＥＭ低グルコース（ＤＭＥＭ－ＬＧ、Ｇｉｂｃｏ、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ．ｃｏｍ）４０％　ＭＣＤＢ－２０１（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）２％ウシ胎児血清（ＦＣＳ）、１ｘペニシリン－ストレプトマイシン（両型ともＧｉｂｃｏ）、１ｘＩＴＳ液体培地サプリメント（インシュリン－トランスフェ

リン－セレン）、１ｘリノール酸－ＢＳＡ、５ｘ１０$^{-8}$Ｍ デキサメタゾン、０．１ｍＭ Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸（３者とも全てＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、１０ｎＭ ＰＤＧＦ（Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ＲｎＤＳｙｓｔｅｍｓ．ｃｏｍ）および１０ｎＭ ＥＧＦ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）からなる培地中で培養した。後の継代（継代７の後）において、細胞はＦＣＳ濃度を１０％に増やした以外は同一の増殖培地中でも培養した。

【０５６１】

プレートをコロニに対してスクリーニングし、コロニ中の細胞が８０－９０％コンフルエントである場合に細胞を継代培養した。最初の継代において、細胞数がまだ少ない場合は、細胞を最小量のトリプシン／ＥＤＴＡ（０．２５％／１ｍＭ、Ｇｉｂｃｏ）を用いて室温で剥がし、トリプシンをＦＣＳで抑制した。細胞を無血清培地で洗い、血清濃度を２％に調整した通常の培地中に懸濁した。細胞を約２０００ないし３０００／ｃｍ^{2}でプレーティングした。後の継代において、細胞をトリプシン／ＥＤＴＡを用いて、特定の領域で、特定の時点で剥がし、血球計数器を用いてカウントし、２０００ないし３０００細胞／ｃｍ^{2}の密度で再プレーティングした。

【０５６２】

骨髄由来間葉系幹細胞株

骨髄由来幹細胞の単離および培養

骨髄（ＢＭ）由来ＭＳＣを、Ｌｅｓｋｅｌａ ｅｔ ａｌ．（２００３）による記載のように得た。簡単に述べると、整形外科手術中に得られた骨髄を、２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１０％ ＦＣＳ、１ｘペニシリン－ストレプトマイシンおよび２ｍＭ Ｌ－グルタミン（全てＧｉｂｃｏから）を添加した最小必須アルファ培地（α－ＭＥＭ）中で培養した。２日間の細胞接着期の後、細胞をＣａ$^{2+}$およびＭｇ$^{2+}$不含ＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）で洗浄し、さらに同一培地中に２０００ないし３０００細胞／ｃｍ２の密度でプレーティングし、週２回、半分の培地を除去し、新鮮な培地に置き換えることにより、ほぼコンフルエントになるまで継代培養した。

【０５６３】

実験手順

間葉系幹細胞表現型のフローサイトメトリ分析

ＵＢＣおよびＢＭの両者に由来する間葉系幹細胞をフローサイトメトリ（ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ，Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）によって表現型分析した。ＣＤ１３、ＣＤ１４、ＣＤ２９、ＣＤ３４、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ７３およびＨＬＡ－ＡＢＣ（全てＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ，ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｄｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ．ｃｏｍから）、ＣＤ１０５（Ａｂｃａｍ Ｌｔｄ．，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＵＫ，ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ａｂｃａｍ．ｃｏｍ）ならびにＣＤ１３３（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）に対するフルオレセインイソチシアネート（ＦＩＴＣ）またはフィコエリトリン（ＰＥ）結合抗体を用いて直接標識を行った。適当なＦＩＴＣおよびＰＥ結合アイソタイプコントロール（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いた。ＣＤ９０およびＨＬＡ－ＤＲ（両者ともＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから）に対する非結合抗体を用いて間接標識を行った。間接標識のため、ＦＩＴＣ結合ヤギ抗マウスＩｇＧ抗体（Ｓｉｇｍａ－ａｌｄｒｉｃｈ）を二次抗体として用いた。

【０５６４】

ＵＢＣ由来細胞は造血マーカＣＤ３４、ＣＤ４５、ＣＤ１４およびＣＤ１３３に対して陰性であった。該細胞はＣＤ１３（アミノペプチダーゼＮ）、ＣＤ２９（β１－インテグリン）、ＣＤ４４（ヒアルロン酸受容体）、ＣＤ７３（ＳＨ３）、ＣＤ９０（Ｔｈｙ１）、ＣＤ１０５（ＳＨ２／エンドグリン）およびＣＤ４９ｅに対して陽性に染色された。細胞はＨＬＡ－ＡＢＣに対しても陽性に染色されたが、ＨＬＡ－ＤＲに対しては陰性であった。ＢＭ由来細胞は類似の表現型を有することが示された。これらはＣＤ１４、ＣＤ３４、ＣＤ４５およびＨＬＡ－ＤＲに対して陰性であり、ＣＤ１３、ＣＤ２９、ＣＤ４４、Ｃ

Ｄ９０、ＣＤ１０５およびＨＬＡ－ＡＢＣに対して陽性であった。

【０５６５】

脂質生成の相違

ＵＣＢ由来ＭＳＣの脂質生成能力を評価するために、細胞を３ｘ１０^{3}／ｃｍ^{2}の密度で２４ウェルプレート（Ｎｕｎｃ）中に３ウェルずつの重複で播種した。ＵＣＢ由来ＭＳＣを、試料がグライコーム分析のために調製される前に、５週間、ＤＭＥＭ低グルコース、２％　ＦＣＳ（両者ともＧｉｂｃｏから）、１０μｇ／ｍｌ　インシュリン、０．１ｍＭ　インドメタシン、０．１μＭ　デキサメタゾン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）およびペニシリン－ストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ）からなる脂質生成誘導培地中で培養した。培地は週に２回、分化培養中に交換した。

【０５６６】

骨原性分化

ＢＭ由来ＭＳＣの骨原性分化を誘導するため、細胞をそれらの通常の増殖培地に３ｘ１０^{3}／ｃｍ^{2}の密度で２４ウェルプレート（Ｎｕｎｃ）上に播種した。翌日、培地を、１０％　ＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）、０．１μＭ　デキサメタゾン、１０ｍＭ　β－グリセロリン酸、０．０５ｍＭ　Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）およびペニシリンーストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ）を添加したα－ＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ）からなる骨原性誘導培地に交換した。ＢＭ由来ＭＳＣを、グライコーム分析のための試料を調製する前に、３週間、週２回の培地交換を行いながら培養した。

【０５６７】

グライコーム分析のための細胞収穫

１ｍｌの細胞培養液をグライコーム分析のために確保し、残りの培地を吸引により除去した。細胞培養プレートをＰＢＳ緩衝液ｐＨ７．２で洗浄した。ＰＢＳを吸引し、細胞を掻き取り、５ｍｌのＰＢＳで回収した（２回反復した）。この時点で少量の細胞画分（１０μｌ）を細胞計数のために採取し、残りの試料を５分間４００ｇで遠心分離した。上清を吸引し、ペレットをＰＢＳ中でさらに２回洗浄した。細胞を１．５ｍｌのＰＢＳで回収し、５０ｍｌチューブから１．５ｍｌ回収チューブ内に移し、７分間５４００ｒｐｍで遠心分離した。上清を吸引し、もう１回洗浄を繰り返した。細胞ペレットを－７０℃で貯蔵し、グライコーム分析のために用いた。

【０５６８】

レクチン染色

ＦＩＴＣ標識したＭａａｃｋｉａ　ａｍｕｒｅｎｓｉｓ凝集素（ＭＡＡ）をＥＹ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（ＵＳＡ）より購入し、ＦＩＴＣ標識したＳａｍｂｕｃｕｓ　ｎｉｇｒａ凝集素（ＳＮＡ）をＶｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（ＵＫ）より購入した。骨随由来間葉系幹細胞株を上記のように培養した。培養後、細胞を５回ＰＢＳ（１０ｍＭ　リン酸ナトリウム、ｐＨ７．２、１４０ｍＭ　ＮａＣｌ）で洗浄し、４％　ＰＢＳ緩衝パラホルムアルデヒドｐＨ７．２で室温（ＲＴ）において１０分間固定した。固定後、細胞を３回ＰＢＳで洗浄し、非特異的結合部位を３％　ＨＳＡ－ＰＢＳ（ＦＲＣ　Ｂｌｏｏｄ　Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｆｉｎｌａｎｄ）または３％　ＢＳＡ－ＰＢＳ（純度＞９９％のＢＳＡ、Ｓｉｇｍａ）で３０分間、ＲＴでブロックした。レクチンインキュベーションの前に、製品の使用説明書記載の方法により、細胞をＰＢＳ、ＴＢＳ（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　$CaCl_2$）またはＨＥＰＥＳ緩衝液（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ）で２回洗浄した。ＦＩＴＣ標識したレクチンをバッファ中の１％　ＨＳＡまたは１％　ＢＳＡ中で希釈し、細胞とともに６０分間、ＲＴで暗所においてインキュベートした。さらに、細胞を３回、１０分間、ＰＢＳ／ＴＢＳ／ＨＥＰＥＳで洗浄し、ＤＡＰＩ染色剤を含有するＶｅｃｔａｓｈｉｅｌｄ封入剤（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、ＵＫ）中に封入した。レクチン染色を、Ｚｅｉｓｓ　Ａｘｉｏｓｋｏｐ　２　ｐｌｕｓ蛍光顕微鏡（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ　Ｖｉｓｉｏｎ　ＧｍｂＨ、ドイツ）を用いて、ＦＩＴＣおよびＤＡＰＩフィルタとともに観察した。像をＺｅｉｓｓ　ＡｘｉｏＣａｍ　ＭＲｃカメラを用いて、

ＡｘｉｏＶｉｓｉｏｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ ３．１／４．０（Ｃａｒｌ Ｚｅｉｓｓ）を使用し、４００Ｘの倍率で撮影した。

【０５６９】

結果

間葉系幹細胞集団からのグリカンの単離

本結果は２つの臍帯血由来間葉系幹細胞株および脂質生成方向に分化するように誘導された細胞、ならびに２つの骨髄由来間葉系幹細胞株および骨原性方向に分化するように誘導された細胞から生成される。細胞株およびそれらに由来する分化した細胞の分析は上記の通りである。Ｎ－グリカンを試料から単離し、グリカンプロファイルを、先の例に記載されるように単離された中性およびシアル化Ｎ－グリカン画分のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＦ質量分析データから生成した。

【０５７０】

臍帯血由来間葉系幹細胞（ＣＢ ＭＳＣ）株

中性Ｎ－グリカンの構造特性

２つのＣＢ ＭＳＣ株に対して提案された中性Ｎ－グリカンのグルーピングは互いによく類似しており、それらの中性Ｎ－グリカン構造特性において大きな相違は無いことを示している。しかし、ＣＢ ＭＳＣはＣＢ単核球集団と異なり、それらはプロファイルにおいて、例えば他の構造群と比較して比較的多量の中性複合型Ｎ－グリカンおよびハイブリッド型または単分岐中性Ｎ－グリカンを有している。

【０５７１】

可溶性グリカン成分の同定

ＣＢ単核球集団と同様に、本分析において、グリカン群$Hex_{2-12}HexNAc_{1}$からの成分を含む提案された単糖組成に基づいて可溶性グリカンと同定された中性グリカン成分が全ての細胞型において同定された（図参照）。これらのグリカン成分の存在量は、互いに対して、また他のグリカンシグナルに対して、個々の試料および細胞型間で異なる。

【０５７２】

シアル化Ｎ－グリカンプロファイル

２つのＣＢ ＭＳＣ株から得られたシアル化Ｎ－グリカンプロファイルは、そのシアル化Ｎ－グリカンプロファイル全体に関して互いによく類似している。しかし、プロファイル間で小さな相違が観察され、一部のグリカンシグナルは１つの細胞株においてのみ観察することができ、この２つの細胞株が違いに異なるグリカン構造を有することを示している。分析は、各細胞型において、酸性Ｎ－グリカン成分に割り当てられる約５０ないし７０個のグリカンシグナルの相対的な割合を明らかにした。典型的には、グリカンプロファイルにおける細胞集団間の有意な相違は複数の実験を通じて一貫性がある。

【０５７３】

グリカンプロファイルの分化と関連した変化

ＣＢ ＭＳＣの中性Ｎ－グリカンプロファイルは脂質生成細胞培養液中での分化の際に変化する。本結果は、いくつかの個々のグリカンシグナルおよびグリカンシグナル群の相対存在量が分化培地内での細胞培養により変化することを示す。分化と関連したグリカン構造群の主要な変化は中性複合型Ｎ－グリカン、例えば$Hex_{5}HexNAc_{4}$および$Hex_{5}HexNAc_{4}dHex_{1}$単糖組成にそれぞれ対応するｍ／ｚ １６６３およびｍ／ｚ １８０９におけるシグナルの量の増加などである。変化はシアル化グリカンプロファイルでも観察された。

【０５７４】

中性Ｎ－グリカンのグリコシダーゼ分析

特異的エキソグリコシダーゼ消化を、実施例に記載のように、ＣＢ ＭＳＣ株から単離した中性Ｎ－グリカン画分に対して行った。α－マンノシダーゼ分析の結果は、ＣＢ ＭＳＣ株の中性Ｎ－グリカンプロファイルにおけるどのＮ－グリカンシグナルがαマンノシダーゼ消化に感受性であるかを詳細に示し、非還元末端α－マンノース残基の、対応する

グリカン構造における存在を示す。例えば、提案された単糖組成$Hex_{5-9}HexNAc_2$によって予備的に高マンノース型Ｎ－グリカンに割り当てられたｍ／ｚ　１２５７、１４１９、１５８１、１７４３、および１９０５の主要な中性Ｎ－グリカンシグナルは、末端α－マンノース残基を含んでいることが示され、従って前記の予備的な割当てが確認された。結果は、対応するグリカン構造における非還元末端β１，４－ガラクトース残基の存在を示す。例えば、ｍ／ｚ　１６６３およびｍ／ｚ　１８０９における主要な中性複合型Ｎ－グリカンシグナルは末端β１，４－結合ガラクトース残基を含むことが示された。

【０５７５】

骨髄由来間葉系幹細胞（ＢＭ　ＭＳＣ）株

中性Ｎ－グリカンプロファイル、およびグリカンプロファイルにおける分化と関連した変化

増殖培地中および骨原性培地中で増殖させたＢＭ　ＭＳＣ株から得られた中性Ｎ－グリカンプロファイルは、その中性Ｎ－グリカンプロファイル全体がＣＢ　ＭＳＣ株と類似している。しかし、２つの供給源に由来する細胞株間の相違が観察され、一部のグリカンシグナルは１つの細胞株においてのみ観察することができ、これらの細胞株が違いに異なるグリカン構造を有することを示している。ＢＭ　ＭＳＣの主要な特徴的構造特性は、ＣＢ　ＭＳＣ株と比べてさらに豊富な中性複合型Ｎ－グリカンである。ＣＢ　ＭＳＣと同様、これらのグリカンもＢＭ　ＭＳＣの分化の際の主要な増加したグリカンシグナル群であった。分析は、各細胞型において、非シアル化Ｎ－グリカン成分に割り当てられる約５０ないし７０個のグリカンシグナルの相対的な割合を明らかにした。典型的には、グリカンプロファイルの細胞集団間の有意な相違は複数の実験を通じて一貫性がある。

【０５７６】

シアル化Ｎ－グリカンプロファイル

シアル化Ｎ－グリカンプロファイルが増殖培地中および骨原性培地中で増殖させたＢＭ　ＭＳＣ株から得られた。未分化のおよび分化した細胞はそのシアル化Ｎ－グリカンプロファイル全体が互いによく類似している。しかし、プロファイル間の小さな相違が観察され、一部のグリカンシグナルは１つの細胞株においてのみ観察することができ、２つの細胞型が違いに異なるグリカン構造を有することを示している。分析は、各細胞型において、酸性Ｎ－グリカン成分に割り当てられた約５０個のグリカンシグナルの相対的な割合を明らかにした。典型的には、グリカンプロファイルの細胞集団間の有意な相違は複数の実験を通して一貫性がある。

【０５７７】

シアリダーゼ分析

ＢＭ　ＭＳＣから単離されたシアル化Ｎ－グリカン画分を先の実施例に記載のように広範なシアリダーゼで消化した。反応後、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析により、シアル化Ｎ－グリカンの大部分が脱シアル化され、対応する中性Ｎ－グリカンに変換されたことが観察され、それらが、提案された単糖組成により示唆されるように、シアル酸残基（ＮｅｕＡｃおよび／またはＮｅｕＧｃ）を有していたことが示された。増殖培地中および骨原性培地中で増殖させたＢＭ　ＭＳＣの中性および脱シアル化（元シアル化）Ｎ－グリカン画分の組み合わせのグリカンプロファイルは、（脱シアル化型の）細胞試料から単離された全Ｎ－グリカンプロファイルに対応する。未分化ＢＭ　ＭＳＣ（骨原性培地中で増殖）においては、およそ５３％のＮ－グリカンシグナルが高マンノース型Ｎ－グリカン単糖組成、８％が低マンノース型Ｎ－グリカン、３１％が複合型Ｎ－グリカン、および７％がハイブリッド型または単分岐Ｎ－グリカン単糖組成に対応すると算出される。分化したＢＭ　ＭＳＣ（骨原性培地中で増殖）においては、およそ２８％のＮ－グリカンシグナルが高マンノース型Ｎ－グリカン単糖組成、９％が低マンノース型Ｎ－グリカン、５０％が複合型Ｎ－グリカン、および１１％がハイブリッド型または単分岐Ｎ－グリカン単糖組成に対応すると算出される。

【０５７８】

間葉系幹細胞のレクチン結合分析

実験手順の下で記載されるように、骨髄由来間葉系幹細胞を、それらの表面上のα２，３－結合シアル酸特異的（ＭＡＡ）およびα２，６－結合シアル酸特異的（ＳＮＡ）レクチンのリガンドの存在に関して分析した。ＭＡＡは強く細胞と結合したのに対し、ＳＮＡは弱く結合したことが明らかになり、細胞培養条件において細胞が、α２，６－結合シアル酸よりも有意に多いα２，３－結合シアル酸をその表面複合糖質上に有していたことが示された。本結果はレクチン染色を異なる細胞型の識別のためのさらなる手段として用いることができ、それが質量分析プロファイリングの結果を補完することを示唆する。

【０５７９】

細胞培養試薬からの潜在的グリカン混入の検出

ＭＳＣ株のシアル化Ｎ－グリカンプロファイルにおいて、異常なシアル酸残基による間葉系幹細胞複合糖質の汚染を示す特異的Ｎ－グリカンシグナルが観察された。まず、細胞を、ウマ血清のウシ等の添加動物血清とともに細胞培地中で培養した際、Ｎ－グリコリルノイラミン酸（Ｎｅｕ５Ｇｃ）による潜在的混入が検出された。$NeuGc_1Hex_5HexNAc_4$の［Ｍ－Ｈ］$^-$イオンに対応するｍ／ｚ　１９４６、ならびに$NeuGc_1NeuAc_1Hex_5HexNAc_4$および$NeuGc_2Hex_5HexNAc_4$の［Ｍ－Ｈ］$^-$イオンにそれぞれ対応するｍ／ｚ　２２３７およびｍ／ｚ　２２５３におけるグリカンシグナルは、Ｎｅｕ５Ｇｃ、すなわちＮ－アセチルノイラミン酸（Ｎｅｕ５Ａｃ）よりも１６Ｄａ大きい質量を有するシアル酸残基の存在を示した。さらに、細胞がウマ血清を添加した細胞培養液中で培養された際、Ｏ－アセチル化シアル酸による潜在的な混入が検出された。Ｏ－アセチル化シアル酸含有シアル化Ｎ－グリカンの検出のために用いられた特徴的シグナルには、算出されたｍ／ｚ　１９７２．７、２２６３．８および２３０５．８における、それぞれ、$Ac_1NeuAc_1Hex_5HexNAc_4$、$Ac_1NeuAc_2Hex_5HexNAc_4$、および$Ac_2NeuAc_2HeX_5HeXNAc_4$の［Ｍ－Ｈ］$^-$イオンが含まれた。

【０５８０】

結論

グリカンプロファイリング法の使用

本結果は、本グリカンプロファイリング法がＣＢ　ＭＳＣ株およびＢＭ　ＭＳＣ株を互いに、また臍帯血単核球集団等の他の細胞型から、識別するのに用いることができることを示している。分化に誘導された変化、および細胞培養液等からの潜在的グリカン混入もグリカンプロファイルにおいて検出することができ、細胞状態の変化が本方法により検出され得ることを示している。本方法は、以下で議論されるものを含むＭＳＣ特異的グリコシル化特性の検出にも用いることができる。

【０５８１】

培養細胞および天然ヒト細胞間におけるグリコシル化の相違

本結果は、ＢＭ　ＭＳＣ株が、臍帯血から単離された単核球よりも、他のＮ－グリカン構造群と比較して多くの高マンノース型Ｎ－グリカンおよび少ない低マンノース型Ｎ－グリカンを有することを示す。以下の実施例で培養ヒト胚幹細胞から得られた結果と併せて考えると、これは、天然の単離された幹細胞との比較における、培養された幹細胞の一般的傾向であることが示唆される。しかし、ＢＭ　ＭＳＣの骨原性培地中での分化は有意な複合型Ｎ－グリカンの量の増加および高マンノース型Ｎ－グリカンの量の減少をもたらす。

【０５８２】

間葉系幹細胞株特異的なグリコシル化特性

本結果は、間葉系幹細胞株がそのグリコシル化の特異的特性：

１）ＣＢ　ＭＳＣ株およびＢＭ　ＭＳＣ株の両者が固有の中性およびシアル化Ｎ－グリカンプロファイルを有する；

２）ＣＢおよびＢＭ　ＭＳＣ株の主要な特徴的構造特性は豊富な中性複合型Ｎ－グリカンである；

３）さらなる特徴的な特性は複合型Ｎ－グリカンの低シアル化水準である；
等に関して、本研究で研究された他の細胞型と異なることを示唆する。
【実施例２】
【０５８３】
ヒト間葉系幹細胞のレクチンおよび抗体プロファイリング
実験手順
細胞試料
骨髄由来ヒト間葉系幹細胞株（ＭＳＣ）を生成し、上記のように増殖培地中で培養した。
【０５８４】
ＦＩＴＣ標識レクチン
フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）標識レクチンをいくつかの製造者から購入した：ＦＩＴＣ－ＧＮＡ、－ＨＨＡ、－ＭＡＡ、－ＰＷＡ、－ＳＴＡおよび－ＬＴＡはＥＹ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（ＵＳＡ）から；ＦＩＴＣ－ＰＳＡおよび－ＵＥＡはＳｉｇｍａ（ＵＳＡ）から；およびＦＩＴＣ－ＲＣＡ、－ＰＮＡおよび－ＳＮＡはＶｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（ＵＫ）から。レクチンはリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中の１％ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ；ＦＲＣ Ｂｌｏｏｄ Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｆｉｎｌａｎｄ）中において５μｇ／10^5細胞に希釈して用いた。
【０５８５】
フローサイトメトリ
レクチン結合のフローサイトメトリ分析を用いてＭＳＣの細胞表面炭水化物発現を分析した。継代９ないし１１における９０％コンフルエントのＭＳＣ層をＰＢＳで洗浄し、０．２５％トリプシン－１ｍＭ ＥＤＴＡ溶液（Ｇｉｂｃｏ）により回収し、単細胞懸濁液にした。トリプシン処理は穏やかに行うようにしたが、抗体による実験と比較して、認識される構造の一部は部分的に失われるか、または減少する場合があると考えられる。剥がされた細胞を６００ｇで５分間室温にて遠心分離した。細胞ペレットを２回１％ ＨＳＡ－ＰＢＳで洗浄し、６００ｇで遠心分離し、１％ ＨＳＡ－ＰＢＳ中に再懸濁した。細胞を、コニカルチューブ中に７００００ないし８３０００細胞ずつに小分けにして入れた。小分けした細胞をＦＩＴＣ標識レクチンの一つとともに２０分間室温にてインキュベートした。インキュベート後、細胞を１％ ＨＳＡ－ＰＢＳで洗浄し、遠心分離し、１％ ＨＳＡ－ＰＢＳ中に再懸濁した。非処理細胞を対照として用いた。レクチン結合はフローサイトメトリ（ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ, Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）により検出した。データ分析はＷｉｎｄｏｗｓ（登録商標） Ｍｕｌｔｉ Ｄｏｃｕｍｅｎｔ Ｉｎｔｅｒｆａｃｅ ｆｏｒ Ｆｌｏｗ Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ （ＷｉｎＭＤＩ ２．８）を用いて行った。２回の独立した実験を行った。
【０５８６】
蛍光顕微鏡標識実験を先の実施例において記載されるように行った。
【０５８７】
結果および考察
表１６に、試験したＦＩＴＣ標識レクチン、その標的単糖配列の例、および穏やかなトリプシン処理後のＦＡＣＳ分析における陽性レクチン結合を示す細胞の量（％）を示す。表１７に、試験したＦＩＴＣ標識レクチン、その標的単糖配列の例、および、顕微鏡スライド上の増殖させた固定細胞の蛍光顕微鏡検査における、表の説明文中に記載されるようにグレード分けされたレクチン結合強度を示す。用いたレクチンの結合特異性は当該分野において記載されており、一般に本実験におけるレクチンの結合は細胞がその表面上にレクチンに対する特異的リガンドを発現していることを意味する。以下に議論される特異性の一部および表中に記されるものの例は、従って事実上非排他的である。
【０５８８】
α結合マンノース
Ｈｉｐｐｅａｓｔｒｕｍ ｈｙｂｒｉｄ（ＨＨＡ）およびＰｉｓｕｍ ｓａｔｉｖｕｍ

（ＰＳＡ）レクチン両者による細胞の多量の標識は、それらがマンノース、より具体的にはＮ－グリカン等のそれらの表面複合糖質上のα結合マンノース残基を発現することを示唆する。有り得るα－マンノース結合としては、α１→２、α１→３、およびα１→６等が挙げられる。Ｇａｌａｎｔｈｕｓ　ｎｉｖａｌｉｓ　（ＧＮＡ）レクチンの低結合は、細胞表面上の一部のα－マンノース結合が他よりも優勢であることを示唆する。

【０５８９】

β結合ガラクトース

Ｒｉｃｉｎｕｓ　ｃｏｍｍｕｎｉｓレクチンＩ（ＲＣＡ－Ｉ）による細胞の多量の標識およびピーナッツレクチン（ＰＮＡ）によるより弱い標識は、細胞がβ結合非還元末端ガラクトース残基をＮ－および／またはＯ－グリカン等のその表面複合糖質上に発現していることを示唆する。より具体的には、強いＲＣＡ－Ｉ結合は、細胞が多量の非置換Ｇａｌβエピトープをその表面上に有していることを示唆する。ＲＣＡ－Ｉの結合はレクチン結合前の細胞のシアリダーゼ処理により増加し、ＭＳＣ上のＲＣＡ－Ｉのリガンドが本来部分的にシアル酸残基に被覆されていたことを示唆している。ＰＮＡ結合は、コア１　Ｏ－グリカンエピトープ等の他の型の非置換Ｇａｌβエピトープの細胞表面上における存在を示唆する。ＰＮＡの結合もレクチン結合前の細胞のシアリダーゼ処理により増加し、ＭＳＣ上のＰＮＡのリガンドが本来ほとんどシアル酸残基により被覆されていたことを示唆する。これらの結果は、ＲＣＡ－ＩおよびＰＮＡの両者を、ＢＭ　ＭＳＣの細胞表面上のそれらの特異的リガンドの量を評価するために、それらの特異的エピトープのシアル化水準を評価するためのシアリダーゼ処理と併せて、または併せずに、用いることができることを示唆する。

【０５９０】

シアル酸

Ｍａａｃｋｉａ　ａｍｕｒｅｎｓｉｓ（ＭＡＡ）による細胞の多量の標識、およびＳａｍｂｕｃｕｓ　ｎｉｇｒａ（ＳＮＡ）レクチンによるより弱い標識は、細胞がシアル酸残基を、Ｎ－および／もしくはＯ－グリカンならびに／または糖脂質等のその表面複合糖質上に発現していることを示唆する。より具体的には、強いＭＡＡ結合は、細胞が多量のα２，３－結合シアル酸残基をその表面上に有していることを示唆する。ＳＮＡ結合は、α２，６－結合シアル酸残基が細胞表面上に存在するが、しかしα２，３－結合シアル酸よりも少量であることを示唆する。これら両者のレクチン結合活性はシアリダーゼ処理により減少する可能性があり、ＢＭ　ＭＳＣにおけるレクチンの特異性がほぼシアル酸を標的としていることを示唆している。

【０５９１】

ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン配列

Ｓｏｌａｎｕｍ　ｔｕｂｅｒｏｓｕｍ（ＳＴＡ）による細胞の標識およびアメリカヤマゴボウ（ＰＷＡ）レクチンによるより弱い標識は、細胞がポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン配列をＮ－および／もしくはＯ－グリカンならびに／または糖脂質等のその表面複合糖質上に発現していることを示唆する。ＳＴＡによる、ＰＷＡによるよりも強い標識は、細胞表面ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン配列のほとんどが直鎖であり、分岐または置換された鎖ではないことを示唆する。

【０５９２】

フコシル化

Ｕｌｅｘ　ｅｕｒｏｐａｅｕｓ（ＵＥＡ）による細胞の標識およびＬｏｔｕｓ　ｔｅｔｒａｇｏｎｏｌｏｂｕｓ（ＬＴＡ）レクチンによるより弱い標識は、細胞がフコース残基をＮ－および／もしくはＯ－グリカンならびに／または糖脂質等のその表面複合糖質上に発現していることを示唆する。より具体的には、ＵＥＡの結合は、細胞がα１，２－結合フコース残基等のα結合フコース残基をその表面上に有していることを示唆する。ＬＴＡの結合は、α１，３－結合フコース残基等のα結合フコース残基が細胞表面上に存在するが、しかしＵＥＡリガンドフコース残基よりも少量であることを示唆する。

【０５９３】

マンノース結合レクチン標識
弱い標識強度が、フルオレセイン標識に結合したヒト血清マンノース結合レクチン（ＭＢＬ）でも検出され、この先天性免疫系成分に対するリガンドがｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養したＢＭ　ＭＳＣ細胞表面上に発現している場合があることを示唆している。
【０５９４】
ＮｅｕＧｃ高分子プローブ（Ｌｅｃｔｉｎｉｔｙ　Ｌｔｄ．，　Ｒｕｓｓｉａ）の非固定ｈＥＳＣへの結合は、ＮｅｕＧｃ特異的レクチンの細胞表面上における存在を示唆する。一方、高分子ＮｅｕＡｃプローブは本実験において同一の強度で細胞に結合しなかった。
【０５９５】
特異的抗体のｈＥＳＣへの結合は、Ｌｅｘおよびシアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘエピトープのその表面上における存在を示唆しており、ＮｅｕＧｃ特異的抗体のｈＥＳＣへの結合はＮｅｕＧｃエピトープのその表面上における存在を示唆している。
【実施例３】
【０５９６】
ヒト臍帯血細胞集団のレクチンおよび抗体プロファイリング
結果および考察
図１に、ＣＢ　ＭＳＣ調製物に関して主に関連した／対照細胞の例として７つの個々の臍帯血単核球（ＣＢ　ＭＮＣ）に結合するＦＩＴＣ標識レクチンのＦＡＣＳ分析の結果を示す（実験は上記の通り行った）。ＧＮＡ、ＨＨＡ、ＰＳＡ、ＭＡＡ、ＳＴＡ、およびＵＥＡ　ＦＩＴＣ標識されたレクチンによる強い結合が全ての試料で観察され、それらの特異的リガンド構造のＣＢ　ＭＮＣ細胞表面上における存在が示唆される。中程度（ｍｅｄｉｏｃｒｅ）の結合（ＰＷＡ）、ＣＢ試料間で異なる結合（ＰＮＡ）、および弱い結合（ＬＴＡ）も観察され、これらレクチンに対するリガンドはＣＢ　ＭＮＣ細胞表面上において上記レクチンのように様々であるかまたはより希であることが示唆される。
【実施例４】
【０５９７】
ヒト幹細胞および細胞集団の全Ｎ－グライコームの分析
実験手順
細胞およびグリカン試料を実施例およびＰＣＴ　ＦＩ２００７　０５０３３６に記載のように調製した。
【０５９８】
実施例／ＰＣＴに記載のように、Ａ．ｕｒｅａｆａｃｉｅｎｓシアリダーゼを用いて、単離された酸性グリカン画分を脱シアル化し、次いで脱シアル化グリカンを同一試料から単離された中性グリカンと組み合わせることにより、中性および酸性Ｎ－グリカン画分の相対的な割合を分析した。次に、組み合わせられたグリカン画分を陽イオンモードＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＦ質量分析により、実施例／ＰＣＴに記載されるように分析した。組み合わせられたＮ－グリカンのシアル化Ｎ－グリカンの割合は、組み合わせられたＮ－グリカン画分の中性Ｎ－グリカンの、本来の中性Ｎ－グリカン画分との比較における、相対強度のパーセント減少の算出により、式：

$$\text{割合} = \frac{I^{neutral} - I^{combined}}{I^{neutral}} \times 100\%,$$

［式中、Ｉ^{neutral}およびＩ^{combined}は、中性および併せられたＮ－グリカン画分それぞれにおける、ｍ／ｚ　１２５７、１４１９、１５８１、１７４３および１９０５における５つの高マンノース型Ｎ－グリカンの［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$イオンシグナルの相対強度の合計に相当する］
に従って計算された。
【０５９９】
結果および考察

分析された幹細胞型における酸性Ｎ－グリカン画分の相対的割合は次の通りであった：ヒト胚幹細胞（ｈＥＳＣ）においては約３５％（シアル化および中性Ｎ－グリカンの割合は約１：２）、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（ＢＭ　ＭＳＣ）においては約１９％（シアル化および中性Ｎ－グリカンの割合は約１：４）、骨芽細胞に分化したＢＭ　ＭＳＣにおいては約２８％（シアル化および中性Ｎ－グリカンの割合は約１：３）、およびヒト臍帯血（ＣＢ）ＣＤ１３３＋細胞においては約３８％（シアル化および中性Ｎ－グリカンの割合は約２：３）。

【０６００】

結論として、ＢＭ　ＭＳＣは、それらが中性Ｎ－グリカンと比べ有意に少ない量のシアル化Ｎ－グリカンを有するという点において、ｈＥＳＣおよびＣＢ　ＣＤ１３３＋細胞とは異なる。しかし、ＢＭ　ＭＳＣの骨芽細胞分化後、シアル化Ｎ－グリカンの割合は増加する。

【実施例５】

【０６０１】

ヒトおよびマウス線維芽（フィーダ）細胞株の分析

マウス（ｍＥＦ）およびヒト（ｈＥＦ）線維芽細胞フィーダ細胞を調製し、それらのＮ－グリカン画分を先の実施例に記載するように分析した。

【０６０２】

結果および考察

結果は、ｍＥＦおよびｈＥＦ細胞Ｎ－グリカン画分は互いに有意に相違することを示した。この相違としては、該細胞試料から得られた、異なったグリカン群の割合、主要なグリカンシグナル、およびグリカンプロファイル等が挙げられる。さらに、主要な相違はｍＥＦ細胞におけるＧａｌα３Ｇａｌエピトープの存在である。

【実施例６】

【０６０３】

幹細胞増殖速度に対するレクチンの影響

実験手順

リン酸緩衝生理食塩水中での一晩のインキュベーションにより、レクチン（ＥＹ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、ＵＳＡ）を受動的に４８ウェルプレート（Ｎｕｎｃｌｏｎ　ｓｕｒｆａｃｅ、ｃａｔａｌｏｇ　Ｎｏ　１５０６８７、Ｎｕｎｃ、Ｄｅｎｍａｒｋ）上に吸着させた。

【０６０４】

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（ＢＭ　ＭＳＣ）を、２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１０％　ＦＣＳ、ペニシリン－ストレプトマイシン、および２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（全てＧｉｂｃｏから）を添加した最小必須α－培地（α－ＭＥＭ）中で、各種レクチンで被覆した４８ウェルプレート上において培養した。細胞をＣｅｌｌ　ＩＱ（ＣｈｉｐＭａｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｔａｍｐｅｒｅ、Ｆｉｎｌａｎｄ）中で、＋３７℃において、５％CO_2とともに培養した。１５分間毎に画像を撮影した。データをＣｅｌｌ　ＩＱ　Ａｎａｌｙｚｅｒソフトウェアを用いて、Ｕｌｌａ　Ｉｍｐｏｌａ博士（Ｆｉｎｎｉｓｈ　Ｒｅｄ　Ｃｒｏｓｓ　Ｂｌｏｏｄ　Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｈｅｌｓｉｎｋｉ、Ｆｉｎｌａｎｄ）によって構築されたアナライザプロトコルにより分析した。

【０６０５】

結果および考察

ＢＭ　ＭＳＣの増殖速度は各種レクチン被覆表面において、互いに、および非被覆プラスチック表面との比較において、異なっており（表１８）、幹細胞表面グリカンに結合する異なるグリカン結合特異性を有するタンパク質は特異的にその増殖速度に影響することが示唆された。

【０６０６】

ＢＭ　ＭＳＣ増殖速度を高める効果を有するレクチンは、相対的な効果の順に：ＧＳ　ＩＩ（β－ＧｌｃＮＡｃ）　＞　ＥＣＡ（ＬａｃＮＡｃ／β－Ｇａｌ）　＞　ＰＷ

Ａ（Ｉ－分岐ポリ－ＬａｃＮＡｃ）　＞　ＬＴＡ（α１，３－Ｆｕｃ）　＞　ＰＳＡ（α－Ｍａｎ）、を含んでおり、式中、レクチンの好ましいオリゴ糖特異性を括弧内に示す。しかし、ＰＳＡは本実験においてほぼプラスチックに等しかった。

【０６０７】

ＢＭ　ＭＳＣの増殖速度に阻害的な効果を有するレクチンは、相対的な効果の順に：ＲＣＡ（β－Ｇａｌ／ＬａｃＮＡｃ）　＞＞　ＵＥＡ（α１，２－Ｆｕｃ）　＞　ＷＦＡ（β－ＧａｌＮＡｃ）　＞　ＳＴＡ（直鎖ポリ－ＬａｃＮＡｃ）　＞　ＮＰＡ（α－Ｍａｎ）　＞　ＳＮＡ（α２，６－結合シアル酸）　＝　ＭＡＡ（α２，３－結合シアル酸／α３’－シアリルＬａｃＮＡｃ）、を含んでおり、式中、レクチンの好ましいオリゴ糖特異性を括弧内に示す。しかし、ＮＰＡ、ＳＮＡ、およびＭＡＡは本実験においてほぼプラスチックに等しかった。

【実施例７】

【０６０８】

ヒト幹細胞のスフィンゴ糖脂質グリカン

実験手順

ＭＳＣからの試料、および比較のための細胞集団（ＣＢ　ＭＳＣ関連細胞型）ＣＢ　ＭＮＣを、実施例およびＰＣＴ／ＦＩ２００７　０５０３３６に記載のように生成した。中性および酸性スフィンゴ糖脂質画分を細胞から、基本的に記載（Ｍｉｌｌｅｒ－Ｐｏｄｒａｚａ　ｅｔ　ａｌ，　２０００）されるように単離した。グリカンをＭａｃｒｏｂｄｅｌｌａ　ｄｅｃｏｒａエンドグリコセラミダーゼ消化（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ，　ＵＳＡ）により、基本的に製品の説明書に従って遊離し、試料からの全グリカンオリゴ糖画分を生成した。オリゴ糖を精製し、タンパク質結合オリゴ糖画分のための先の実施例に記載のようにＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析によって分析した。

【０６０９】

結果および考察

ヒト間葉系幹細胞（ＭＳＣ）

骨髄由来（ＢＭ）ＭＳＣ中性脂質グリカン

ＢＭ　ＭＳＣスフィンゴ糖脂質中性グリカン画分の分析された質量分析プロファイルを図８に示す。６つの主要なグリカンシグナルが合わせて全グリカンシグナル強度の９４％超を構成しており、単糖組成$Hex_3HexNAc_1$（７３０）、$Hex_2HexNAc_1$（５６８）、Hex_2dHex_1（５１１）、$Hex_2HexNAc_2dHex_2$（１０６３）、$Hex_3HexNAc_2dHex_2$（１２２５）、および$Hex_3HexNAc_2dHex_1$（１０７９）に対応した。４つの最も多量なシグナル（７３０、５６８、５１１、および１０６３）は合わせて全強度の７５％超を含んでいた。

【０６１０】

臍帯血由来（ＣＢ）ＭＳＣ中性脂質グリカン

ＣＢ　ＭＳＣスフィンゴ糖脂質中性グリカン画分の分析された質量分析プロファイルを図８に示す。１０個の主要なグリカンシグナルが合わせて全グリカンシグナル強度の９２％超を構成しており、単糖組成$Hex_2HexNAc_1$（５６８）、$Hex_3HexNAc_1$（７３０）、$Hex_4HexNAc_2$（１０９５）、$Hex_5HexNAc_3$（１４６０）、$Hex_3HexNAc_2$（９３３）、Hex_2dHex_1（５１１）、$Hex_2HexNAc_2dHex_2$（１０６３）、$Hex_4HexNAc_3$（１２９８）、$Hex_3HexNAc_2dHex_2$（１２２５）、および$Hex_2HexNAc_2$（７７１）に対応した。５つの最も多量なシグナル（５６８、７３０、１０９５、１４６０、および９３３）は合わせて全強度の８２％超を含んでいた。

【０６１１】

β１，４－ガラクトシダーゼ消化においては、１０９５、１４６０、および７３０の相対シグナル強度がそれぞれ約９０％、９５％、および２０％減少した。これは、ＣＢ　ＭＳＣが、好ましくは構造Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ［$Hex_1HexNAc_1$］Ｌａｃ、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ［$Hex_2HexNAc_2$］Ｌａｃ、およびＧａｌβ４ＧｌｃＮ

ＡｃＬａｃ等の非還元末端β１，４－Ｇａｌエピトープを有する主要グリカン成分を有していたことを示唆する。さらに、グリカンシグナル$Hex_5HexNAc_3$（１４６０）は消化されて$Hex_4HexNAc_3$（１２９８）に、および多くは$Hex_3HexNAc_3$（１１３６）になり、本来のシグナルが１または２個のβ１，４－Ｇａｌを有するグリカン構造を含んでいたこと、および本来のグリカンの大部分が２個のβ１，４－Ｇａｌ、優先的には構造ＧａｌβＧｌｃＮＡｃ（ＧａｌβＧｌｃＮＡｃ）$[Hex_1HexNAc_1]$Ｌａｃ等を有していたことが示唆された。同様に、１０９５は消化されて、９３３に加え、$Hex_2HexNAc_2$（７７１）になり、本来のシグナルが１または２個のβ１，４－Ｇａｌを有するグリカン構造を含んでいたこと、および本来のグリカンの少数が２個のβ１，４－Ｇａｌ、優先的には構造ＧａｌβＧｌｃＮＡｃ（ＧａｌβＧｌｃＮＡｃ）Ｌａｃ等を有していたことが示唆された。

【０６１２】

主要ＣＢ　ＭＳＣスフィンゴ糖脂質中性グリカンシグナルの実験に基づく構造はこのように決定された（‘＞’はＭＳＣの脂質グリカン構造の中で好ましい順を表し；‘［］’は括弧内のオリゴ糖配列が分岐または非分岐のいずれであってもよいことを表し；‘（）’は構造内の分岐を表す）：

５６８　$Hex_2HexNAc_1$ ＞ ＨｅｃＮＡｃＬａｃ

７３０　$Hex_3HexNAc_1$ ＞ $Hex_1HexNAc_1$Ｌａｃ ＞ ＧａｌβＧｌｃＮＡｃＬａｃ

１０９５　$Hex_4HexNAc_2$ ＞ $[Hex_2HecNAc_2]$Ｌａｃ ＞ ＧａｌβＧｌｃＮＡｃ $[Hex_1HecNAc_1]$Ｌａｃ ＞ ＧａｌβＧｌｃＮＡｃ（ＧａｌβＧｌｃＮＡｃ）Ｌａｃ

１４６０　$Hex_5HexNAc_3$ ＞ $[Hex_3HecNAc_3]$Ｌａｃ ＞ ＧａｌβＧｌｃＮＡｃ$[Hex_2HecNAc_2]$Ｌａｃ ＞ ＧａｌβＧｌｃＮＡｃ（ＧａｌβＧｌｃＮＡｃ）$[Hex_1HecNAc_1]$Ｌａｃ

９３３　$Hex_3HexNAc_2$ ＞ $Hex_1HexNAc_2$Ｌａｃ

【０６１３】

シアル化脂質グリカン

ｈＥＳＣスフィンゴ糖脂質シアル化グリカン画分の分析された質量分析プロファイルを図９に示す。ＢＭ　ＭＳＣの５個の主要なグリカンシグナルが合わせて全グリカンシグナル強度の９６％超を構成しており、単糖組成$NeuAc_1Hex_2HexNAc_1$（８３５）、$NeuAc_1Hex_1HexNAc_1dHex_1$（８１９）、$NeuAc_1Hex_3HexNAc_1$（９９７）、$NeuAc_1Hex_3HexNAc_1dHex_1$（１１４３）、および$NeuAc_2Hex_1HexNAc_2dHex_1$（１３１３）に対応した。ＣＢ　ＭＳＣの６つの主要なシグナルが合わせて全グリカンシグナル強度の９２％超を構成しており、単糖組成$NeuAc_1Hex_2HexNAc_1$（８３５）、$NeuAc_1Hex_3HexNAc_1$（９９７）、$NeuAc_2Hex_2$（９０５）、$NeuAc_1Hex_4HexNAc_2$（１３６２）、$NeuAc_1Hex_5HexNAc_3$（１７２７）、および$NeuAc_2Hex_2HexNAc_1$（１１２６）に対応した。

【０６１４】

ヒト臍帯血単核球（ＣＢ　ＭＮＣ）

ＣＢ　ＭＮＣ中性脂質グリカン

ＣＢ　ＭＮＣスフィンゴ糖脂質中性グリカン画分の分析された質量分析プロファイルを図８に示す。５つの主要なグリカンシグナルが全グリカンシグナル強度の合わせて９１％超を含んでおり、単糖組成$Hex_3HexNAc_1$（７３０）、$Hex_2HexNAc_1$（５６８）、$Hex_3HexNAc_1dHex_1$（８７６）、$Hex_4HexNAc_2$（１０９５）、および$Hex_4HexNAc_2dHex_1$（１２４１）に対応した。

【０６１５】

β１，４－ガラクトシダーゼ消化においては、７３０および１０９５の相対シグナル強度がそれぞれ約５０％および９０％減少した。これは、該シグナルが、好ましくは構造Ｇ

ａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβＬａｃおよびＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ［$Ｈｅｘ_{1}$$ＨｅｘＮＡｃ_{1}$］Ｌａｃ等の非還元末端β１，４－Ｇａｌエピトープを有する主要成分を有していたことを示唆する。さらに、グリカンシグナル$Ｈｅｘ_{5}ＨｅｘＮＡｃ_{3}$（１４６０）は消化されて$Ｈｅｘ_{4}ＨｅｘＮＡｃ_{3}$（１２９８）および$Ｈｅｘ_{3}ＨｅｘＮＡｃ_{3}$（１１３６）になり、本来のシグナルが１または２個のβ１，４－Ｇａｌを有するグリカン構造を含んでいたことが示唆された。

【０６１６】

主要ＣＢ　ＭＳＣスフィンゴ糖脂質中性グリカンシグナルの実験に基づく構造はこのように決定された（‘＞’は脂質グリカン構造の中で好ましい順を表し；‘［］’は括弧内のオリゴ糖配列が分岐または非分岐のいずれであってもよいことを表し；‘（）’は構造内の分岐を表す）：

７３０　$Ｈｅｘ_{3}ＨｅｘＮＡｃ_{1}$ ＞ $Ｈｅｘ_{1}ＨｅｘＮＡｃ_{1}$Ｌａｃ ＞ Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃＬａｃ

５６８　$Ｈｅｘ_{2}ＨｅｘＮＡｃ_{1}$ ＞ ＨｅｃＮＡｃＬａｃ

８７６　$Ｈｅｘ_{3}ＨｅｘＮＡｃ_{1}ｄＨｅｘ_{1}$ ＞ ［$Ｈｅｘ_{1}ＨｅｃＮＡｃ_{1}ｄＨｅｘ_{1}$］Ｌａｃ ＞ Ｆｕｃ［$Ｈｅｘ_{1}ＨｅｃＮＡｃ_{1}$］Ｌａｃ

１０９５　$Ｈｅｘ_{4}ＨｅｘＮＡｃ_{2}$ ＞ ［$Ｈｅｘ_{2}ＨｅｃＮＡｃ_{2}$］Ｌａｃ ＞ Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ ［$Ｈｅｘ_{1}ＨｅｃＮＡｃ_{1}$］Ｌａｃ

１２４１　$Ｈｅｘ_{4}ＨｅｘＮＡｃ_{2}ｄＨｅｘ_{1}$ ＞ ［$Ｈｅｘ_{2}ＨｅｃＮＡｃ_{2}ｄＨｅｘ_{1}$］Ｌａｃ ＞ Ｆｕｃ［$Ｈｅｘ_{2}ＨｅｃＮＡｃ_{2}$］Ｌａｃ

１４６０　$Ｈｅｘ_{5}ＨｅｘＮＡｃ_{3}$ ＞ ［$Ｈｅｘ_{3}ＨｅｃＮＡｃ_{3}$］Ｌａｃ ＞ Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ［$Ｈｅｘ_{2}ＨｅｃＮＡｃ_{2}$］Ｌａｃ ＞ Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ）［$Ｈｅｘ_{1}ＨｅｃＮＡｃ_{1}$］Ｌａｃ

【０６１７】

シアル化脂質グリカン

ＣＢ　ＭＮＣスフィンゴ糖脂質シアル化グリカン画分の分析された質量分析プロファイルを図９に示す。ＣＢ　ＭＮＣの３個の主要なグリカンシグナルが合わせて全グリカンシグナル強度の９６％超を構成しており、単糖組成$ＮｅｕＡｃ_{1}Ｈｅｘ_{3}ＨｅｘＮＡｃ_{1}$（９９７）、$ＮｅｕＡｃ_{1}Ｈｅｘ_{4}ＨｅｘＮＡｃ_{2}$（１３６２）、および$ＮｅｕＡｃ_{1}Ｈｅｘ_{5}ＨｅｘＮＡｃ_{3}$（１７２７）に対応した。

【０６１８】

ヒト幹細胞のスフィンゴ糖脂質グリカンプロファイルの概要

全ての本試料型の中性グリカン画分は合わせて４５個のグリカンシグナルを含んでいた。シグナルの提案された単糖組成は２－７Ｈｅｘ、０－５ＨｅｘＮＡｃ、および０－４ｄＨｅｘからなっていた。グリカンシグナルは５１１ないし２２６３の間のモノアイソトピックｍ／ｚ値で検出された（［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$イオンに対して）。

【０６１９】

全試料型に共通の主要な中性グリカンシグナルは７３０、５６８、１０９５、および９３３であり、グリカン構造群$Ｈｅｘ_{0-1}ＨｅｘＮＡｃ_{1}Ｌａｃ$（５６８または７３０）および$Ｈｅｘ_{1-2}ＨｅｘＮＡｃ_{2}Ｌａｃ$（９３３または１０９５）に対応し、前者のグリカンはより多く、後者はより少なかった。これらの共通のグリカンの一般式は$Ｈｅｘ_{m}ＨｅｘＮＡｃ_{n}Ｌａｃ$であり、式中、ｍはｎまたはｎ－１のいずれかであり、ｎは１または２のいずれかである。

【０６２０】

ヒト幹細胞型の中性糖脂質プロファイル

ＣＢおよびＢＭ　ＭＳＣの両者に典型的なグリカンシグナルは優先的には７７１、１０６３、１２２５を含んでおり；より優先的には組成$ｄＨｅｘ_{0/2}Ｈｅｘ_{0-1}ＨｅｘＮＡｃ_{2}Ｌａｃ$を含む。

【０６２１】

特にＢＭ　ＭＳＣに典型的なグリカンシグナルは優先的には５１１およびフコシル化構

造、優先的には多フコシル化構造を含む。
【０６２２】
特にＣＢ　ＭＳＣに典型的なグリカンシグナルは優先的には１４６０および１２９８ならびに大型中性糖脂質、特にＨｅｘ$_{2-3}$ＨｅｘＮＡｃ$_{3}$Ｌａｃを含む。さらに、末端β１，４－Ｇａｌの低フコシル化および／または高発現が特にＣＢ　ＭＳＣに典型的であった。
【０６２３】
ＣＢ　ＭＮＣに典型的なグリカンシグナルは優先的には組成ｄＨｅｘ$_{0-1}$［ＨｅｘＨｅｘＮＡｃ］$_{1-2}$Ｌａｃ、より優先的には他のシグナルと比較して高い相対量の７３０；およびフコシル化構造；および他の幹細胞型よりもばらつきおよび／または複雑さの程度が低いグリカンプロファイルを有していた。
【０６２４】
本試料型全ての酸性グリカン画分は全体で３８個のグリカンシグナルを含んでいた。該シグナルの提案された単糖組成は０－２ＮｅｕＡｃ、２－９Ｈｅｘ、０－６ＨｅｘＮＡｃ、０－３ｄＨｅｘ、および／または０－１硫酸またはリン酸エステルからなっていた。グリカンシグナルは７８６ないし２７８１の間のモノアイソトピックｍ／ｚ値で検出された（［Ｍ－Ｎａ］$^{-}$イオンに対して）。
【０６２５】
ＣＢ　ＭＮＣの酸性スフィンゴ糖脂質グリカンは主にＮｅｕＡｃ$_{1}$Ｈｅｘ$_{n+2}$ＨｅｘＮＡｃ$_{n}$からなっており、式中、１≦ｎ≦３であり、その構造がＮｅｕＡｃ$_{1}$［ＨｅｘＨｅｘＮＡｃ］$_{1-3}$Ｌａｃであることが示唆された。
【０６２６】
幹細胞スフィンゴ糖脂質グリカンにおける本実験において示された末端グリカンエピトープとしては：
Ｇａｌ
Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（Ｌａｃ）
Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ（ＬａｃＮＡｃ２型）
Ｇａｌβ３
非還元末端ＨｅｘＮＡｃ
Ｆｕｃ
α１，２－Ｆｕｃ
α１，３－Ｆｕｃ
Ｆｕｃα２Ｇａｌ
Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ（Ｈ２型）
Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（２’－フコシルラクトース）
Ｆｕｃα３ＧｌｃＮＡｃ
Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ（Ｌｅｘ）
Ｆｕｃα３Ｇｌｃ
Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）Ｇｌｃ（３－フコシルラクトース）
Ｎｅｕ５Ａｃ
Ｎｅｕ５Ａｃα２，３
Ｎｅｕ５Ａｃα２，６
等が挙げられる。
【０６２７】
発生関連グリカンエピトープの発現
本発明によると、スフィンゴ糖脂質グリカン組成Ｈｅｘ$_{4}$ＨｅｘＮＡｃ$_{1}$は優先的には（イソ）グロボ構造に対応する。ＳＳＥＡ－３糖脂質抗原のグリカン配列はＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα４Ｇａｌβ４Ｇｌｃと同定され、これも本実験において検出されたグリカンシグナルＨｅｘ$_{4}$ＨｅｘＮＡｃ$_{1}$（８９２）に対応する。高解像度分析（実施例１２）において、グリカンシグナル　Ｈｅｘ$_{4}$ＨｅｘＮＡｃ$_{1}$およびＮｅｕＡｃ$_{1}$Ｈｅ

x_4ＨｅｘＮＡｃ$_1$がＭＳＣにおいても少量検出され、ＭＳＣにおいてはグロボシド型スフィンゴ糖脂質が比較的希ではあるが有意な構造であることが示唆された（表２０および２１）。マウスＥＳ細胞とは対照的に、ｈＥＳＣはＳＳＥＡ－１抗原を発現しない；これと一致して、α１，３／４－フコシル化中性糖脂質グリカンは低水準の発現しか見出されなかった。一方、ｈＥＳＣスフィンゴ糖脂質グリカンの主要なフコシル化構造はα１，２－Ｆｕｃを有するということを示すことができた。これはＳＳＥＡ－１反応性におけるマウス－ヒト間の相違に対する分子レベルでの説明となる。

【実施例８】

【０６２８】

間葉系細胞の免疫組織化学的染色

特異的抗体による幹細胞試料における細胞表面上の炭水化物構造の検出

材料および方法

細胞試料

骨髄からの間葉系幹細胞（ＭＳＣ）を生成し、増殖培地中で上記のように培養した。ＭＳＣを分化培地（４ｎｇ／ｍｌ　デキサメタゾン、１０ｍｍｏｌ／Ｌ　β－グリセロリン酸、および５０μｍｏｌ／Ｌ　アスコルビン酸を含む増殖培地）中で６週間培養し、骨原性分化を誘導した。分化培地は分化期間を通じて週２回新しいものに換えた。

【０６２９】

抗体

一次抗グリカン抗体を表２５に列挙する。

【０６３０】

免疫染色

継代９ないし１２における骨髄由来間葉系幹細胞を、０．０１％　ポリ－Ｌ－リジン（Ｓｉｇｍａ，　ＵＳＡ）で被覆したガラス８チャンバースライド（Ｌａｂ－ＴｅｋＩＩ、Ｎａｌｇｅ　Ｎｕｎｃ、Ｄｅｎｍａｒｋ）上で、３７℃、５％CO_2の下、２ないし４日間増殖させた。骨原性細胞を同一の８チャンバースライドを用いて分化培地中で６週間培養した。培養後、細胞を５回ＰＢＳ（１０ｍＭ　リン酸ナトリウム、ｐＨ７．２、１４０ｍＭ　ＮａＣｌ）で洗浄し、４％　ＰＢＳ緩衝パラホルムアルデヒドｐＨ７．２で室温（ＲＴ）において１０ないし１５分間固定し、次いでＰＢＳで３回５分間洗浄した。非特異的結合部位を３％　ＨＳＡ－ＰＢＳ（ＦＲＣ　Ｂｌｏｏｄ　Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｆｉｎｌａｎｄ）で３０分間、ＲＴでブロックした。一次抗体を１％　ＨＳＡ－ＰＢＳ（１：１０ないし１：２００）中で希釈し、６０分間ＲＴでインキュベートし、次いでＰＢＳで３回１０分間洗浄した。１％　ＨＳＡ－ＰＢＳ中の二次抗体、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８ヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ；１：１０００）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８ヤギ抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ；１：１０００）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、またはＦＩＴＣ－結合ウサギ抗ラットＩｇＧ（１：３２０）（Ｓｉｇｍａ）を６０分間ＲＴで暗所においてインキュベートした。さらに、細胞をＰＢＳで３回１０分間洗浄し、ＤＡＰＩ染色剤を含有するＶｅｃｔａｓｈｉｅｌｄ封入剤（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、ＵＫ）に封入した。免疫染色を、Ｚｅｉｓｓ　Ａｘｉｏｓｋｏｐ　２　ｐｌｕｓ蛍光顕微鏡（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ　Ｖｉｓｉｏｎ　ＧｍｂＨ、ドイツ）を用いて、ＦＩＴＣおよびＤＡＰＩフィルタとともに観察した。像をＺｅｉｓｓ　ＡｘｉｏＣａｍ　ＭＲｃカメラを用いて、ＡｘｉｏＶｉｓｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　３．１／４．０（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ）を使用し、４００Ｘの倍率で撮影した。

【０６３１】

蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）分析

継代１２における増殖中ＭＳＣを、０．０２％　Ｖｅｒｓｅｎｅ溶液（ｐＨ７．４）、４５分間、３７℃により、培養プレートから遊離させた。抗体標識の前に、細胞を２回、０．３％　ＨＳＡ－ＰＢＳ溶液で洗浄した。一次抗体を３０分間ＲＴでインキュベート（４μｌ／１００μｌ　細胞懸濁液／５００００細胞）し、１回０．３％　ＨＳＡ－ＰＢＳで洗浄した後、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８ヤギ抗マウス（１：５００）による二次

抗体検出を３０分間ＲＴで暗所中において行った。ネガティブコントロールとして、細胞を一次抗体無しでインキュベートした以外は標識細胞と同様に処理した。細胞をＢＤ　ＦＡＣＳＡｒｉａ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）により、波長４８８のＦＩＴＣ検出器を用いて分析した。結果をＢＤ　ＦＡＣＳＤｉｖａソフトウェア　バージョン５．０．１（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）により分析した。

【０６３２】

結果は表１５を、抗体は表２５を参照のこと。

【実施例９】

【０６３３】

ヒト間葉系幹細胞のエキソグリコシダーゼ分析

エキソグリコシダーゼ消化結果表における変化は記録された質量スペクトルの相対的な変化であり、グリコシダーゼ処理で生じたグリカンプロファイルにおける絶対的な変化を反映するものではない。実験手順は先の実施例に記載される。

【０６３４】

結果

未分化ＢＭ　ＭＳＣ

中性および酸性Ｎ－グリカン画分を、記載されたようにＢＭ　ＭＳＣから単離した。中性（表１０）および酸性（データ不掲載）グリカン画分の並行的なエキソグリコシダーゼ消化の結果を以下に考察する。以下の章においては、グリカンシグナルは、本発明の表の、その提案された単糖組成によって参照され、対応するｍ／ｚ値を表から読み取ることができる。

【０６３５】

α－マンノシダーゼ感受性構造

中性Ｎ－グリカン画分のαマンノシダーゼ消化の際に減少を示した全てのグリカンシグナル（表１０）は末端α－マンノース残基を有するグリカンに対応することが示唆される。本結果は、ＢＭ　ＭＳＣの中性Ｎ－グリカンの大部分が末端α－マンノース残基を有することを示している。一方、増大したシグナルはその反応産物に対応する。中性Ｎ－グリカン画分中の一連のα－マンノシル化グリカンを形成する構造群および個々のα－マンノシル化グリカンについて以下に詳細に考察する。$Hex_{1-9}HexNAc_1$グリカン系列は、$Hex_{3-9}HexNAc_1$が消化されて$Hex_1HexNAc_1$に変換されるように消化され（データ不掲載）、それらが末端α－マンノース残基を有していたことが示唆される。これらは$Hex_1HexNAc_1$に変換されたことから、それらの実験に基づく構造は$(Man\alpha)_{1-8}Hex_1HexNAc_1$であった。

【０６３６】

$Hex_{1-10}HexNAc_2$グリカン系列は、$Hex_{4-10}HexNAc_2$が消化されて$Hex_{1-4}HexNAc_2$に、および、特に、反応前は存在しておらず、主要な反応産物であった$Hex_1HexNAc_2$に、変換されるように消化された。これは、１）グリカン$Hex_{4-10}HexNAc_2$が末端α－マンノース残基を有するグリカンを含む、２）グリカン$Hex_{1-4}HexNAc_2$がより大型のα－マンノシル化グリカンから形成され得る、および、３）グリカン$Hex_{4-10}HexNAc_2$の大部分が新たに形成された$Hex_1HexNAc_2$に変換され、そのため実験に基づく構造$(Man\alpha)_nHex_1HexNAc_2$［式中、ｎ≧１］を有する、ということを示す。α－マンノシダーゼ反応が多くのシグナルに対して部分的にしか完了しなかったとう事実は、他のグリカン成分も$Hex_{1-10}HexNAc_2$グリカン系列中に含まれるということを示唆している。特に、$Hex_{10}HexNAc_2$成分は１個のヘキソース残基を最大の典型的哺乳動物高マンノース型Ｎ－グリカンよりも多く有しており、それが（Ｇｌｃα→）$Hex_8HexNAc_2$等のグリコシル化構造、優先的にはα３－結合Ｇｌｃを含み、および、より優先的にはグリコシル化Ｎ－グリカン（Ｇｌｃα３→）$Man_9GlcNAc_2$に存在することが示唆される。

【０６３７】

$Hex_{1-6}HexNAc_1dHex_1$グリカン系列は、$Hex_{3-9}HexNAc_1dHex_1$が消化されて$Hex_1HexNAc_1dHex_1$に変換されるように消化され、それらが末端α－マンノース残基を有しており、その実験に基づく構造は$(Manα)_{2-5}Hex_1HexNAc_1dHex_1$であったことが示唆された。$Hex_1HexNAc_1dHex_1$は新たなシグナルとして現れ、構造$(Manα)_nHex_1HexNAc_1dHex_1$［式中、n≧1］を有するグリカンが試料中に存在していたことをが示唆された。$Hex_{2-7}HexNAc_3$グリカン系列は、$Hex_{6-7}HexNAc_3$が消化されて該系列の他のグリカンに変換されるように消化され、それが末端α－マンノース残基を有していたことが示唆された。$Hex_2HexNAc_3$は新たなシグナルとして現れ、構造$(Manα)_nHex_2HexNAc_3$［式中、n≧1］を有するグリカンが試料中に存在していたことをが示唆された。

【0638】

$Hex_{2-7}HexNAc_3dHex_1$グリカン系列は、$Hex_{6-7}HexNAc_3dHex_1$が消化されて該系列の他のグリカンに変換されるように消化され、それが末端α－マンノース残基を有していたことが示唆された。$Hex_2HexNAc_3dHex_1$は新たなシグナルとして現れ、構造$(Manα)_nHex_2HexNAc_3dHex_1$［式中、n≧1］を有するグリカンが試料中に存在していたことをが示唆された。$Hex_3HexNAc_3dHex_2$および$Hex_3HexNAc_4$は新たなシグナルとして現れ、それぞれ構造$(Manα)_nHex_3HexNAc_3dHex_2$および$(Manα)_nHex_3HexNAc_4$［式中、n≧1］を有するグリカンが試料中に存在していたことをが示唆された。

【0639】

β－グルコサミニダーゼ感受性構造

$Hex_3HexNAc_{2-5}dHex_1$グリカン系列は、$Hex_{3-9}HexNAc_1dHex_1$が消化されて$Hex_1HexNAc_1dHex_1$に変換されるように消化され、それが末端α－マンノース残基を有していたことが示唆され、その実験に基づく構造が$(Manα)_{2-5}Hex_1HexNAc_1dHex_1$であったことが示唆された。$Hex_1HexNAc_1dHex_1$は新たなシグナルとして現れ、構造$(Manα)_nHex_1HexNAc_1dHex_1$［式中、n≧1］を有するグリカンが試料中に存在していたことをが示唆された。しかし、$Hex_3HexNAc_6dHex_1$は消化されず、それがβ結合GlcNAc残基以外の末端HexNAc残基を有していたことが示唆された。

【0640】

$Hex_2HexNAc_3$および$Hex_2HexNAc_3dHex_1$は消化されて$Hex_2HexNAc_2$および$Hex_2HexNAc_2dHex_1$となり、それらがそれぞれ構造（GlcNAcβ→）$Hex_2HexNAc_2$および（GlcNAcβ→）$Hex_2HexNAc_2dHex_1$を有していたことが示唆された。

【0641】

$Hex_4HexNAc_4dHex_1$、$Hex_4HexNAc_4dHex_2$、$Hex_4HexNAc_5dHex_2$、および$Hex_5HexNAc_5dHex_1$も消化され、それらがそれぞれ、（GlcNAcβ→）$Hex_4HexNAc_3dHex_1$、（GlcNAcβ→）$Hex_4HexNAc_3dHex_2$、（GlcNAcβ→）$Hex_4HexNAc_4dHex_2$、および（GlcNAcβ→）$Hex_5HexNAc_4dHex_1$を有していたことが示唆された。

【0642】

β１，４－ガラクトシダーゼ感受性構造

β１，４－ガラクトシダーゼに感受性だったグリカンシグナルは、ＢＭ　ＭＳＣグリカンの大きな割合を構成しており、β１，４－結合ガラクトースがＢＭ　ＭＳＣ中性Ｎ－グリカンにおける一般的な末端エピトープであることが示唆された。

【0643】

$Hex_5HexNAc_4$および$Hex_5HexNAc_4dHex_1$は消化されてHex

$_3$ＨｅｘＮＡｃ$_4$および　Ｈｅｘ$_3$ＨｅｘＮＡｃ$_4$ｄＨｅｘ$_1$となり、それらがそれぞれ構造（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ→）$_2$Ｈｅｘ$_3$ＨｅｘＮＡｃ$_2$および（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ→）$_2$Ｈｅｘ$_3$ＨｅｘＮＡｃ$_2$ｄＨｅｘ$_1$を有していたことが示唆された。一方、Ｈｅｘ$_5$ＨｅｘＮＡｃ$_4$ｄＨｅｘ$_2$は消化されてＨｅｘ$_4$ＨｅｘＮＡｃ$_4$ｄＨｅｘ$_2$となり、それがそれぞれ構造（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ→）Ｈｅｘ$_4$ＨｅｘＮＡｃ$_3$ｄＨｅｘ$_2$を有していたことが示唆され、Ｈｅｘ$_5$ＨｅｘＮＡｃ$_4$ｄＨｅｘ$_3$は全く消化されなかった。まとめると、ＢＭ　ＭＳＣにおいて、ｎ－１ヘキソース残基は、Ｎ－グリカン構造Ｈｅｘ$_5$ＨｅｘＮＡｃ$_4$ｄＨｅｘ$_n$［式中、０≦ｎ≦３］中において、デオキシヘキソース残基により、β１，４－ガラクトシダーゼの作用から保護されている。β１，４－結合ガラクトースを有するこのようなｄＨｅｘ保護構造としては、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃおよびＦｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ等が挙げられる。

【０６４４】

同様に、Ｈｅｘ$_6$ＨｅｘＮＡｃ$_5$、Ｈｅｘ$_5$ＨｅｘＮＡｃ$_5$ｄＨｅｘ$_1$、Ｈｅｘ$_6$ＨｅｘＮＡｃ$_5$、およびＨｅｘ$_5$ＨｅｘＮＡｃ$_5$ｄＨｅｘ$_1$が消化されてＨｅｘ$_3$ＨｅｘＮＡｃ$_5$、Ｈｅｘ$_3$ＨｅｘＮＡｃ$_5$ｄＨｅｘ$_1$、およびＨｅｘ$_3$ＨｅｘＮＡｃ$_6$ｄＨｅｘ$_1$となり、それらがそれぞれ構造（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ→）$_3$Ｈｅｘ$_3$ＨｅｘＮＡｃ$_2$、（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ→）$_2$Ｈｅｘ$_3$ＨｅｘＮＡｃ$_3$ｄＨｅｘ$_1$、および（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ→）$_3$Ｈｅｘ$_3$ＨｅｘＮＡｃ$_3$ｄＨｅｘ$_1$を有することが示唆された。一方、Ｈｅｘ$_4$ＨｅｘＮＡｃ$_5$ｄＨｅｘ$_2$、Ｈｅｘ$_5$ＨｅｘＮＡｃ$_5$ｄＨｅｘ$_3$、Ｈｅｘ$_6$ＨｅｘＮＡｃ$_5$ｄＨｅｘ$_2$、およびＨｅｘ$_6$ＨｅｘＮＡｃ$_5$ｄＨｅｘ$_3$は消化されず、これらの構造中のヘキソース残基がデオキシヘキソース残基により保護されていたことが示唆された。β１，４－結合ガラクトースを有するこのようなｄＨｅｘ保護構造としては、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃおよびＦｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ等が挙げられる。しかし、Ｈｅｘ$_4$ＨｅｘＮＡｃ$_5$ｄＨｅｘ$_3$は消化され、それが１または複数個の末端β１，４－結合ガラクトース残基を有していたことが示唆された。

【０６４５】

Ｈｅｘ$_7$ＨｅｘＮＡｃ$_3$、Ｈｅｘ$_6$ＨｅｘＮＡｃ$_3$ｄＨｅｘ$_1$、Ｈｅｘ$_6$ＨｅｘＮＡｃ$_3$、およびＨｅｘ$_5$ＨｅｘＮＡｃ$_3$ｄＨｅｘ$_1$は消化されてＨｅｘ$_5$ＨｅｘＮＡｃ$_3$およびＨｅｘ$_4$ＨｅｘＮＡｃ$_3$ｄＨｅｘ$_1$等の産物となり、それらがそれぞれ構造（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ→）Ｈｅｘ$_{5-6}$ＨｅｘＮＡｃ$_2$および（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ→）Ｈｅｘ$_{4-5}$ＨｅｘＮＡｃ$_3$ｄＨｅｘ$_1$を有することが示唆された。Ｈｅｘ$_3$ＨｅｘＮＡｃ$_3$、およびＨｅｘ$_3$ＨｅｘＮＡｃ$_3$ｄＨｅｘ$_1$の相対量が増加し、それらがそれぞれ、（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ→）Ｈｅｘ$_3$ＨｅｘＮＡｃ$_2$および（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ→）Ｈｅｘ$_3$ＨｅｘＮＡｃ$_2$ｄＨｅｘ$_1$の産物であったことが示唆された。

【０６４６】

β１，３－ガラクトシダーゼ感受性構造

ＢＭ　ＭＳＣ中性Ｎ－グリカン画分中のわずかな構造のみがβ１，３－ガラクトシダーゼの作用に対し感受性であることから、末端ガラクトース残基の大部分はβ１，４－結合しているようである。β１，３－ガラクトシダーゼ感受性グリカンに対応するグリカンシグナルとしてはＨｅｘ$_5$ＨｅｘＮＡｃ$_5$ｄＨｅｘ$_1$およびＨｅｘ$_4$ＨｅｘＮＡｃ$_5$ｄＨｅｘ$_3$等が挙げられる。

【０６４７】

グリコシダーゼ抵抗性構造

本実験において、Ｈｅｘ$_2$ＨｅｘＮＡｃ$_3$ｄＨｅｘ$_2$、Ｈｅｘ$_4$ＨｅｘＮＡｃ$_3$ｄＨｅｘ$_2$、およびＨｅｘ$_{11}$ＨｅｘＮＡｃ$_2$は試験したエキソグリコシダーゼに対し抵抗性であった。最初の２つの提案された単糖組成は２つ以上のデオキシヘキソース残基を有しており、それらが、優先的にはＦｕｃα２Ｇａｌ、Ｆｕｃα３ＧｌｃＮＡｃ、および／またはＦｕｃα４ＧｌｃＮＡｃエピトープに存在する、α２－、α３－、またはα４－結合フコース残基等の第２のｄＨｅｘ残基によりグリコシダーゼ消化から保護されていることが示唆される。最後の提案された単糖組成は、２個のヘキソース残基を最大の典型的哺乳動

物高マンノース型Ｎ－グリカンよりも多く有しており、それが（Ｇｌｃα→）$_2$Ｈｅｘ$_9$ＨｅｘＮＡｃ$_2$等のグリコシル化構造を、より優先的にはジグルコシル化Ｎ－グリカン（ＧｌｃαＧｌｃα→）Ｍａｎ$_9$ＧｌｃＮＡｃ$_2$中に存在するものを、有していることが示唆される。ＢＭ　ＭＳＣのエキソグリコシダーゼ消化に基づいてまとめられた中性Ｎ－グリカン画分グリカン構造を表１１に示す。

【０６４８】

骨芽細胞分化ＢＭ　ＭＳＣ

骨芽細胞分化ＢＭ　ＭＳＣの分析を、ＣＢ　ＭＳＣにおける分化特異的変化の比較ができるように表１２に示す。ＢＭ　ＭＳＣおよび骨芽細胞分化ＢＭ　ＭＳＣに対して生成されたエキソグリコシダーゼプロファイルはこれら２つの細胞型に特徴的である。例えば、ｍ／ｚ　１３３９、１７８４、および２４６６のシグナルはこの２つの実験において異なって消化される。特に、骨芽細胞分化ＢＭ　ＭＳＣにおけるβ１，３－ガラクトシダーゼ感受性中性Ｎ－グリカンシグナルは、分化した細胞が未分化細胞よりも多くのβ１，３－結合ガラクトース残基を有することを示唆する。ＢＭ　ＭＳＣの酸性Ｎ－グリカン画分に対して行われたシアリダーゼ分析は、該酸性Ｎ－グリカン画分中のシアル化（ＮｅｕＡｃまたはＮｅｕＧｃ含有）Ｎ－グリカンに基づき、提案された単糖組成を支持した。

【０６４９】

エキソグリコシダーゼによるＣＢ　ＭＳＣ中性グリカンの分析

β１，４－ガラクトシダーゼおよびβ－グルコサミニダーゼによる分析の結果を表１３に示す。結果は、ＣＢ　ＭＳＣにおいても、非還元末端β１，４－結合ガラクトース残基を有する中性Ｎ－グリカンが豊富であり、それらは、観察されたグリカンシグナルのほとんどに対して特徴的非還元末端エピトープの存在を示唆する。ＢＭ　ＭＳＣに対して上記に記載されたものと同様に、脂肪細胞分化ＣＢ　ＭＳＣの分析を、ＣＢ　ＭＳＣにおける分化特異的変化の比較ができるように表１４に示す。ＣＢ　ＭＳＣの酸性Ｎ－グリカン画分に対して行われたシアリダーゼ分析は、該酸性Ｎ－グリカン画分中のシアル化（ＮｅｕＡｃまたはＮｅｕＧｃ含有）Ｎ－グリカンに基づき、提案された単糖組成を支持した。

【実施例１０】

【０６５０】

プロテアーゼ感受性および非感受性抗体標的構造の解明

上記実施例中に記載された骨髄間葉系幹細胞をＦＡＣＳ分析により分析した。細胞がトリプシンにより処理（培養から解放）されると、細胞表面抗原のＦＡＣＳ分析において、いくつかの抗原構造は本質的に観察されないか、またはこれらは減少した量で観察されるが、Ｖｅｒｓｅｎｅ処理（ＰＢＳ中の０．０２％ＥＤＴＡ）後には観察可能である。これは例えば、大部分のトリプシンに感受性の標的構造である抗体ＧＦ３５４およびＧＦ２７５による、ならびに標的構造が事実上完全にトリプシン感受性である抗体ＧＦ３０２による、間葉系幹細胞の標識により観察された。

【実施例１１】

【０６５１】

特異的結合剤標的構造を有するプロテアーゼ遊離糖ペプチドの単離および分析

糖ペプチドをトリプシン等のプロテアーゼによる幹細胞の処理によって遊離させる。糖ペプチドをクロマトグラフ的に単離し、好ましい方法はＳｕｐｅｒｄｅｘ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ（ＧＥ））カラム（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　ｐｅｐｔｉｄｅまたはｓｕｐｅｒｄｅｘ　７５）におけるゲル濾過クロマトグラフィを使用し、ペプチドは、該ペプチドを特異的標識でタギングすることにより、または該ペプチド（またはグリカン）の紫外吸光度により、クロマトグラフィ内で観察することができる。前記方法のための好ましい試料としては比較的多量（数百万細胞）の間葉系幹細胞等が挙げられ、本実施例で用いられる好ましい抗体としては、例えば抗体ＧＦ３５４、ＧＦ２７５もしくはＧＦ３０２、または同様の特異性を有する抗体もしくはレクチン等の他の結合剤が挙げられる。

【０６５２】

次に、単離された糖ペプチドを固定化抗体（例えばＡｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃ

ｉａのシアンプロミド（ｃｙａｎｏｇｅｎｓ　ｐｒｏｍｉｄｅ）活性化カラムに固定化した抗体（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　ｄｉｖｉｓｉｏｎまたはＰｉｅｒｃｅカタログに記載のように固定化された抗体）のカラムに通す。結合する、および／または、弱く結合し、クロマトグラフ的に遅延する画分を、標的ペプチド画分として回収する。高親和性結合の場合、グリカンを、抗体の標的エピトープに対応する１００ないし１０００ｍＭの単糖または単糖群を用いて、または単糖もしくはオリゴ糖の混合物により、および／または５００ないし１０００ｍＭ　ＮａＣｌ等の高塩濃度を用いて、溶出する。糖ペプチドをグライコプロテオミクス法により、分子量を得るために質量分析を用いて、ならびに好ましくは糖ペプチドのペプチドおよび／またはグリカンをシーケンシングするためにフラグメンテーション質量分析も用いて、分析する。

【０６５３】

別の方法においては、糖ペプチドを結合剤アフィニティクロマトグラフィによる単一のアフィニティクロマトグラフィステップにより単離し、質量分析により分析する。これはＷａｎｇ　Ｙ　ｅｔ　ａｌ　（２００６）　Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　１６　（６）　５１４－２３等の記載と本質的に同様に行うが、しかし、レクチンアフィニティクロマトグラフィは、固定化抗体、例えばこの実施例における上記の好ましい抗体または結合剤によるアフィニティクロマトグラフィで置き換えられる。

【実施例１２】

【０６５４】

細胞グリカン型の糖脂質およびＯ－グリカン分析

スフィンゴ糖脂質グリカンおよび還元Ｏ－グリカン試料を調査する細胞型から単離し、質量分析により分析し、さらに、本発明および先の実施例に記載されるように質量分析と組み合わせたエキスポグリコシダーゼ（ｅｘｐｏｇｌｙｃｏｓｉｄａｓｅ）消化により分析した。非還元末端エピトープをＳ．　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ　β１，４－ガラクトシダーゼ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）、ウシ精巣β－ガラクトシダーゼ（Ｓｉｇｍａ）、Ａ．　ｕｒｅａｆａｃｉｅｎｓ　シアリダーゼ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）、Ｓ．　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ　α２，３－シアリダーゼ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）、Ｓ．　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ　β－Ｎ－　アセチルグルコサミニダーゼ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）、Ｘ．　ｍａｎｉｈｏｔｉｓ　α１，３／４－フコシダーゼ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）、およびα１，２－フコシダーゼ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）によるグリカン試料の消化により分析した。結果は本発明に記載されるように定量的質量分析プロファイリングデータ分析により分析した。スフィンゴ糖脂質グリカンによる結果を表２１にまとめる。該表は、表の脚注に記載されるように、提案された単糖組成に基づいて決定されたコア構造の分類も含む。中性Ｏ－グリカン画分の分析は、次の末端エピトープグリコシル化における量的な相違を明らかにした：非還元末端１型ＬａｃＮＡｃ（β１，３－結合Ｇａｌ）はｈＥＳＣのみにおいて５％超の割合を有しており、非還元末端２型ＬａｃＮＡｃ（β１，４－結合Ｇａｌ）は９５％超の割合をＣＢ　ＭＮＣ、ＣＢ　ＭＳＣ、およびＢＭ　ＭＳＣにおいて有していた。ｍ／ｚ　７７１（$Hex_2HexNAc_2$）および９１７（$Hex_2HexNAc_2dHex_1$）における２型ＬａｃＮＡｃ含有Ｏ－グリカンシグナルのフコシル化度はＣＢ　ＭＮＣにおいて６４％、ＣＢ　ＭＳＣにおいて４７％、およびｈＥＳＣにおいて２８％であった。

【０６５５】

結論として、Ｏ－グリカンおよびスフィンゴ糖脂質グリカンからのこれらの結果は、有意な細胞型特異的相違を明らかにするものであり、また本発明で分析した各細胞型内のＮ－グリカン末端エピトープからも有意に異なっていた。

【実施例１３】

【０６５６】

細胞グリカン型のエンド－β－ガラクトシダーゼ分析

エンド－β－ガラクトシダーゼの反応条件

基質グリカンを０．５ｍｌ反応チューブ内で乾燥した。エンド－β－ガラクトシダーゼ

（Ｅ．ｆｒｅｕｎｄｉｉ、Ｓｅｉｋａｇａｋｕ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、ｃａｔ ｎｏ １００４５５、２．５ ｍＵ／反応）反応を５０ｍＭ Ｎａ－酢酸バッファ、ｐＨ５．５内において３７℃で２０時間行った。インキュベーション後、反応混合液を３分間煮沸し、反応を停止した。基質グリカンを本発明のクロマトグラフィ法を用いて精製し、先の実施例に記載のようにＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析で分析した。

【０６５７】

２ｎｍｏｌの各所定のオリゴ糖対照を用いた類似の反応条件において、反応はｍ／ｚ ５６８（$Hex_2HexNAc_1$）のシグナルをラクト－Ｎ－ネオテトラオースおよびパラ－ラクト－Ｎ－ネオヘキサオースからの主要な反応産物として生成したが、内部ＧｌｃＮＡｃ残基の３位でモノフコシル化されたラクト－Ｎ－ネオヘキサオースまたはパラ－ラクト－Ｎ－ネオヘキサオースからは生成せず；ならびに、α３’－シアリル－ラクト－Ｎ－ネオテトラオースからの$NeuAc_1Hex_2HexNAc_1$に対応するシアル化シグナルを生成した。これらの結果は、用いた反応条件において前記酵素に対して報告された特異性を裏付けるものであった。

【０６５８】

ＢＭおよびＣＢ ＭＳＣのＯ－グリカン

ＢＭ ＭＳＣおよびＣＢ ＭＳＣの中性Ｏ－グリカンにおける主要な消化産物は、非還元非フコシル化末端グリカン断片に対応するｍ／ｚ ５６８（$Hex_2HexNAc_1$）のシグナルであった。ＣＢ ＭＮＣのＯ－グリカンはフコシル化断片に対応するｍ／ｚ ７１４（$Hex_2HexNAc_1dHex_1$）の主要な消化産物も含んでいた。

【０６５９】

ＢＭ ＭＳＣのＮ－グリカン

ＢＭ ＭＳＣの中性Ｎ－グリカンにおける主要な消化産物はｍ／ｚ ５６８（$Hex_2HexNAc_1$）のシグナルであり、Ｎ－グリカン中のポリ－ＬａｃＮＡｃ配列の存在が示唆された。主要な感受性構造は、１８２５（$Hex_6HexNAc_4$）および１９８７（$Hex_7HexNAc_4$）のシグナルであり、これらのシグナルに含まれるＮ－グリカン構造がハイブリッド型およびポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン配列を含むことが示唆された。

【０６６０】

ＣＢ ＭＮＣ スフィンゴ糖脂質グリカン

ＣＢ ＭＮＣ中性スフィンゴ糖脂質グリカンにおける主要な消化産物はｍ／ｚ ５６８（$Hex_2HexNAc_1$）のシグナルであり、非フコシル化ポリ－ＬａｃＮＡｃ配列の存在が示唆された。さらに、７１４（$Hex_2HexNAc_1dHex_1$）および１２２５（$Hex_3HexNAc_2dHex_2$）におけるシグナルはフコシル化ポリ－ＬａｃＮＡｃ配列の存在を示した。

【０６６１】

主要な感受性シグナルは１０９５（$Hex_4HexNAc_2$）、１２４１（$Hex_4HexNAc_2dHex_1$）、８７６（$Hex_3HexNAc_1dHex_1$）、１６０６（$Hex_5HexNAc_3dHex_1$）、１４６０（$Hex_5HexNAc_3$）、および９３３（$Hex_3HexNAc_2$）を含み、直鎖非フコシル化および多フコシル化ポリ－ＬａｃＮＡｃの両者の存在が示唆された。消化後の感受性シグナル内に残る残存シグナルは、分岐ポリ－ＬａｃＮＡｃ配列も、より少量存在することを示唆した。

【０６６２】

ＣＢ ＭＳＣスフィンゴ糖脂質グリカン

ＣＢ ＭＳＣ中性スフィンゴ糖脂質グリカンにおける主要な消化産物はｍ／ｚ ５６８（$Hex_2HexNAc_1$）であり、非フコシル化ポリ－ＬａｃＮＡｃ配列の存在が示唆された。主要な感受性シグナルはｍ／ｚ １０９５（Ｈ４Ｎ２）、９３３（$Hex_3HexNAc_2$）、および１４６０（$Hex_5HexNAc_3$）のシグナルであった。ＣＢ ＭＮＣの結果と比べると、ＣＢ ＭＳＣは、グリカンプロファイルはＣＢ ＭＮＣと同一の本来のシグナルを含んでいたものの、より非感受性の構造を有しており、ＣＢ ＭＳＣ

においてはＣＢ　ＭＮＣにおけるよりもスフィンゴ糖脂質グリカンのポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン配列が分岐していたことが示唆された。

【０６６３】

結論として、エンド－β－ガラクトシダーゼ反応産物は、先の実施例において記載された細胞型特異的グリコシル化特性を効果的に反映するものであり、それらは細胞グリカン型の分析のための代替的および補完的な方法の代表である。さらに、本結果は直鎖、分岐、およびフコシル化ポリ－ＬａｃＮＡｃの存在を全ての調査した細胞型ならびにＮ－およびＯ－グリカンおよびスフィンゴ糖脂質グリカン等の各種グリカン型において明らかにし；また、さらに各細胞型における、各細胞型に特徴的な、これらの定量的および細胞型特異的割合を明らかにした。

【実施例１４】

【０６６４】

幹細胞および分化した細胞におけるＯ－グリコシル化の分析

骨髄間葉系幹細胞（ＢＭ　ＭＳＣ）および骨芽細胞に分化したＢＭ　ＭＳＣ（ＯＢ）について、それらのＯ－グリコシル化に関する比較を行った。

【０６６５】

実験手順

細胞試料を先の実施例に記載のように調製した。基本的にＨｕａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（Ａｎａｌ．　Ｃｈｅｍ．　２０００、７３　（２４）　６０６３－９）に記載されるように、濃アンモニア中の飽和炭酸アンモニウムを用いた６０℃における非還元的β脱離により、Ｏ－グリカンを細胞糖タンパク質から遊離させ、Ｃ１８シリカ、陽イオン交換樹脂、および黒鉛化炭素を用いた固相抽出ステップにより精製した。Ｏ－グリカンプロファイルを、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析により、単離された中性および酸性Ｏ－グリカン画分に対して別々に分析し、結果を、検出されたＯ－グリカン成分それぞれに対する全Ｏ－グリカンプロファイルの％として表した。精製および分析ステップは基本的にＷＯ２００７０１２６９５に記載のように行った。

【０６６６】

結果

酸性Ｏ－グリカン

表２２にＢＭ　ＭＳＣおよびＯＢにおけるＯ－グリカンの分析の結果およびその比較を記す。

【０６６７】

ＢＭ　ＭＳＣにおいては、硫酸またはリン酸エステル、優先的には硫酸エステルを有する、ＯＢと比べて２倍超過剰発現された、非シアル化Ｏ－グリカン成分が：Ｈ７Ｎ２Ｐ２、Ｈ５Ｎ４Ｐ２、Ｈ６Ｎ２Ｆ１Ｐ１、Ｈ６Ｎ４Ｐ２、Ｈ３Ｎ３Ｐ１、Ｈ５Ｎ４Ｆ１Ｐ１、Ｈ６Ｎ２Ｐ２、Ｈ４Ｎ３Ｐ１、Ｈ５Ｎ４Ｆ１Ｐ１、およびＨ４Ｎ３Ｆ１Ｐ１；を含んでいた。

【０６６８】

さらに、非フコシル化鎖およびＨ３Ｎ３またはより大型のコア組成を有する、２倍超過剰発現されたＯ－グリカン成分が、ＢＭ　ＭＳＣにおいて：Ｓ１Ｈ３Ｎ３、Ｈ３Ｎ３Ｐ１、Ｓ２Ｈ３Ｎ３、Ｓ１Ｈ４Ｎ４を含んでいた；一方、ＯＢは、ＢＭ　ＭＳＣにおいて発現されなかったフコシル化バリアントＳ１Ｈ３Ｎ３Ｆ１のみを発現していた。

【０６６９】

さらに、シアル化、フコシル化、およびｎ（Ｈｅｘ）＝ｎ（ＨｅｘＮＡｃ）＋１であるコア組成を有する、ＢＭ　ＭＳＣにおける主要な過剰発現されたＯ－グリカン成分は：Ｓ２Ｈ２Ｎ１Ｆ１およびＳ２Ｈ３Ｎ２Ｆ１を含んでいた。

【０６７０】

ＯＢは優先的にはＨ１Ｎ１またはＨ２Ｎ２コア組成：Ｓ２Ｈ２Ｎ２、Ｓ１Ｈ２Ｎ２、Ｓ２Ｈ１Ｎ１、およびＳ１Ｈ２Ｎ２Ｐ１を有するシアル化Ｏ－グリカン成分を発現しており、この発現はＢＭ　ＭＳＣにおいてはそれほど顕著ではなかった。

【０６７１】
Ｈ２Ｎ２コア組成、Ｈ２Ｎ２Ｐ１を有する非シアル化Ｏ－グリカン成分は、ＢＭ　ＭＳＣおよびＯＢの両者において主要なＯ－グリカンとして発現していた。
【０６７２】
中性Ｏ－グリカン
４つの最も一般的な中性Ｏ－グリカン成分が次の通り検出された：ＢＭ　ＭＳＣにおいて、それらはＨ３Ｎ１、Ｈ２Ｎ２、Ｈ２Ｎ１、およびＨ１Ｎ２であった；ならびに、ＯＢにおいて、それらはＨ２Ｎ２、Ｈ３Ｎ１、Ｈ２Ｎ１、およびＨ１Ｎ２であった。従って、細胞型間に有意な相違は検出されなかった。
【０６７３】
結論
ＢＭ　ＭＳＣおよびそれらから分化したＯＢは次のＯ－グリコシル化特性により特徴付けられた。
【０６７４】
ＢＭ　ＭＳＣおよびＯＢの両者における発現：
１）顕著な硫酸および／またはリン酸化、優先的には硫酸化、より優先的にはＯ－グリカン鎖において酸性決定基（ａｃｉｄｉｃ　ｄｅｔｅｒｍｉｎａｎｔ）として硫酸化がシアル化を置換する場合。両細胞型における主要な硫酸化Ｏ－グリカン成分は優先的にはＨ２Ｎ２Ｐ１であり、ここで硫酸またはリン酸がシアル酸を置換する。優先的には、前記構造はＨ２Ｎ２　Ｏ－グリカンの、より優先的には、非還元末端のＮ－アセチルラクトサミンおよび還元末端のＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃを有する硫酸化ムチン型Ｏ－グリカンの、最も優先的にはコア２型Ｏ－グリカンの、硫酸エステルを含む。
【０６７５】
ＯＢと比較したＢＭ　ＭＳＣにおける過剰発現：
１）シアル化を伴わない硫酸化またはリン酸化Ｏ－グリカン、優先的には硫酸化Ｏ－グリカン。
２）非フコシル化鎖およびＨ３Ｎ３またはより大型のコア組成を有するＯ－グリカン成分、優先的にはポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン修飾Ｏ－グリカン等。
３）シアル化、フコシル化、およびｎ（Ｈｅｘ）＝ｎ（ＨｅｘＮＡｃ）＋１であるコア組成を有するＯ－グリカン成分、優先的にはＳ２Ｈ２Ｎ１Ｆ１およびＳ２Ｈ３Ｎ２Ｆ１等。
【０６７６】
ＢＭ　ＭＳＣと比較したＯＢにおける過剰発現
１）Ｈ１Ｎ１またはＨ２Ｎ２コア組成を有するシアル化Ｏ－グリカン成分。優先的には、該構造は、非還元末端のＮ－アセチルラクトサミンおよび還元末端のＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃを有するまたは有しないシアル化ムチン型Ｏ－グリカン、最も優先的にはコア１および／またはコア２型Ｏ－グリカンを含む。
【実施例１５】
【０６７７】
間葉系幹細胞およびそれらから分化した骨原性細胞の免疫組織化学的染色
実験手順
細胞試料
骨髄からの間葉系幹細胞（ＭＳＣ）を生成し、増殖培地中で上記のように培養した。ＭＳＣを分化培地（０．１μｍｏｌ／Ｌ　デキサメタゾン、１０ｍｍｏｌ／Ｌ　β－グリセロリン酸、および５０μｍｏｌ／Ｌ　アスコルビン酸を含む増殖培地）中で６週間培養し、骨原性分化を誘導した。分化培地は分化期間を通じて週２回新しいものに換えた。
【０６７８】
抗体
免疫染色に用いられる抗体、その抗原／エピトープおよび記号を表２５に列挙する。
【０６７９】

免疫組織化学（ＩＨＣ）

継代９ないし１２における骨髄由来間葉系幹細胞をＣＣ２処理したガラス８チャンバースライド（Ｌａｂ－ＴｅｋＩＩ、Ｎａｌｇｅ　Ｎｕｎｃ、Ｄｅｎｍａｒｋ）上で、３７℃、５％CO_2の下、２ないし４日間増殖させた。骨原性細胞を同一の８チャンバースライドを用いて分化培地中で６週間培養した。培養後、細胞を５回ＰＢＳ（１０ｍＭ　リン酸ナトリウム、ｐＨ７．２、１４０ｍＭ　ＮａＣｌ）で洗浄し、４％　ＰＢＳ緩衝パラホルムアルデヒドｐＨ７．２で室温（ＲＴ）において１０ないし１５分間固定し、次いでＰＢＳで３回５分間洗浄した。非特異的結合部位を３％　ＨＳＡ－ＰＢＳ（ＦＲＣ　Ｂｌｏｏｄ　Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｆｉｎｌａｎｄ）で３０分間、ＲＴにおいてブロックした。一次抗体を１％　ＨＳＡ－ＰＢＳ（１：１０ないし１：２００）中で希釈し、６０分間ＲＴでインキュベートし、次いでＰＢＳで３回１０分間洗浄した。二次抗体、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８ヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ；１：１０００）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８ヤギ抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ；１：１０００）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、またはＦＩＴＣ－結合ウサギ抗ラットＩｇＧ（１：３２０）（Ｓｉｇｍａ）を１％　ＨＳＡ－ＰＢＳ中に希釈し、６０分間ＲＴで暗所においてインキュベートした。さらに、細胞をＰＢＳで３回１０分間洗浄し、ＤＡＰＩ染色剤を含有するＶｅｃｔａｓｈｉｅｌｄ封入剤（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、ＵＫ）に封入した。免疫染色を、Ｚｅｉｓｓ　Ａｘｉｏｓｋｏｐ　２　ｐｌｕｓ蛍光顕微鏡（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ　Ｖｉｓｉｏｎ　ＧｍｂＨ、ドイツ）を用いて、ＦＩＴＣおよびＤＡＰＩフィルタとともに観察した。像をＺｅｉｓｓ　ＡｘｉｏＣａｍ　ＭＲｃカメラを用いて、ＡｘｉｏＶｉｓｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　３．１／４．０（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ）を使用し、４００Ｘの倍率で撮影した。

【０６８０】

蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）分析

継代１２における増殖中ＭＳＣを、０．０２％　Ｖｅｒｓｅｎｅ溶液（ｐＨ７．４）、４５分間、３７℃により、培養プレートから遊離させた。抗体標識の前に、細胞を２回、０．３％　ＨＳＡ－ＰＢＳ溶液で洗浄した。一次抗体を３０分間ＲＴでインキュベート（４μｌ／１００μｌ　細胞懸濁液／５００００細胞）し、１回０．３％　ＨＳＡ－ＰＢＳで洗浄した後、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８ヤギ抗マウス（１：５００）による二次抗体検出を３０分間ＲＴで暗所中において行った。ネガティブコントロールとして、細胞を一次抗体無しでインキュベートした以外は標識細胞と同様に処理した。細胞をＢＤ　ＦＡＣＳＡｒｉａ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）により、波長４８８のＦＩＴＣ検出器を用いて分析した。結果をＢＤ　ＦＡＣＳＤｉｖａソフトウェア　バージョン５．０．１（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）により分析した。

【０６８１】

結果および考察

ＦＡＣＳおよびＩＨＣの両者の結果に基づくと、抗体ＧＦ３０７（ｓＬｅｘ）、ＧＦ３５３（ＳＳＥＡ－３）およびＧＦ３５４（ＳＳＥＡ－４）は、その細胞表面上での発現が骨原性分化の間に明らかに減少する（表２３、図１９）ことから間葉系幹細胞に対するマーカである。さらに、ＦＡＣＳ分析において、抗体ＧＦ２７７（ｓＴｎ）、ＧＦ２７８（Ｔｎ）、ＧＦ２９５（ｐＬＮ）およびＧＦ３０６（ｓＬｅａ）は骨原性細胞よりもＭＳＣとより高い反応性を示し、これらのマーカも間葉系幹細胞と関連しているであろうことが示唆される。

【０６８２】

ＦＡＣＳ分析に基づくと、ＢＭ－ＭＳＣが骨原性方向に６週間分化した際、その細胞表面は次のグリカンをより多く発現した。ＧＦ２７５（ＣＡ１５－３）、ＧＦ２９６（アシアロＧＭ１）、ＧＦ２９７（ＧＬ４）、ＧＦ２９８（Ｇｂ３）、ＧＦ３００（アシアロＧＭ２）、ＧＦ３０２（Ｈ２型）、およびＧＦ３０４（Ｌｅａ）（表２３、図１９）。一方、ＩＨＣの結果は、ＧＦ２７６（腫瘍胎児抗原）、ＧＦ２７７（ｓＴｎ）、ＧＦ２７８（Ｔｎ）、およびＧＦ３０３（Ｈ１型）の染色が骨原性分化の間に明らかに増加したことを

示した（表２３）。興味深いことに、抗体ＧＦ２７６（腫瘍胎児抗原）およびＧＦ３０３（Ｈ１型）はＦＡＣＳに用いられた際には反応性を示さなかったが、代わりに、ＩＨＣにおいては骨原性細胞だけで明瞭な染色を示し、従って骨原性分化に対するマーカである。さらに、抗体ＧＦ２９６（アシアロＧＭ１）、ＧＦ３００（アシアロＧＭ２）およびＧＦ３０４（Ｌｅａ）はＩＨＣにおいて完全に陰性であったが、ＦＡＣＳ分析において反応性を示し、骨原性系統に対するマーカである。

【０６８３】

一部の抗体におけるＦＡＣＳとＩＨＣとの間の不一致はいくつかの理由で生じた可能性がある。まず、細胞は抗体とのインキュベート前に異なる処理を受ける。例えば細胞はＩＨＣでは固定されるがＦＡＣＳでは固定されず、細胞はＩＨＣでは接着しているがＦＡＣＳ分析では懸濁されている。さらに、通常脂質に付着するグリカンエピトープ、例えばＧＦ２９６（アシアロＧＭ１）およびＧＦ３００（アシアロＧＭ２）は、ＩＨＣおよびＦＡＣＳにおいて実験手順の生化学的相違のために異なった挙動を示す場合がある。さらに、抗体の親和性および結合力が異なり、ＦＡＣＳ分析における流体系と比較して安定なＩＨＣという結果に作用する場合がある。しかし、両方法は生物学的研究に広く用いられており、結果は両方法論とも有効であると考えるべきである。

【実施例１６】

【０６８４】

プロテアーゼ感受性および非感受性抗体標的構造の解明

先の実施例で記載された骨髄間葉系幹細胞およびそれに由来する骨原性細胞をＦＡＣＳ分析により分析した。細胞がトリプシン（０．２５％）により処理（培養から解放）されると、細胞表面抗原のＦＡＣＳ分析において、いくつかの抗原構造は本質的に観察されないか、またはこれらは少ない量で観察されるが、Ｖｅｒｓｅｎｅ処理（ＰＢＳ中の０．０２％ＥＤＴＡ）後には観察可能である。いくつかのグリカンエピトープ、例えばＧＦ２７７（ｓＴｎ）、ＧＦ２７８（Ｔｎ）、ＧＦ２９５（ｐＬＮ）、ＧＦ２９６（アシアロＧＭ１）、ＧＦ２９９（フォルスマン抗原）、ＧＦ３００（アシアロＧＭ２）、ＧＦ３０２（Ｈ２型）、ＧＦ３０４（Ｌｅａ）、およびＧＦ３０６（ｓＬｅａ）は、ＢＭ－ＭＳＣおよびそれに由来する骨原性細胞の両者において、事実上完全にトリプシン処理によって破壊された（表２４）。一部のグリカンエピトープ、例えばＧＦ２７５（ＣＡ１５－３）、ＧＦ３０７（ｓＬｅｘ）、およびＧＦ３５４（ＳＳＥＡ－４）は、トリプシン処理に部分的に感受性であった。

【実施例１７】

【０６８５】

分化したおよび未分化のＭＳＣの比較およびフコシルグリカンマーカの同定

間葉系幹細胞

間葉系幹細胞（ＭＳＣ）は、骨髄または臍帯血等の各種供給源から単離することができる線維芽細胞様成体多分化能前駆細胞である。ＭＳＣは骨芽細胞、軟骨芽細胞および脂肪細胞のような間葉系細胞型に分化することができる。

【０６８６】

目的

本研究はヒト間葉系幹細胞のＮ－グライコームを分析するために行った。幹細胞は再生医療における極めて大きな治療上の可能性を有している。しかし、幹細胞が臨床診療に使用可能となる前に、それらを十分に分析し、他の細胞と区別し、そして各種細胞株内および細胞株間の相違を制御するための方法が必要である。幹細胞を研究するためのグライコミクス解析法は、これらの問題を解決するための理想的な基盤を提供する。最新の質量分析法は、グライコームを、入手可能な試料の量が極めて限られている場合においても分析するための手段を提供する。

【０６８７】

材料および方法

ヒト間葉系幹細胞を骨髄から単離し、培養した。細胞を骨原性誘導培地中に入れること

により、骨原性分化誘導した。約１００　０００ないし１　０００　０００個の細胞から、Ｎ－結合グリカンをタンパク質Ｎ－グリコシダーゼＦにより酵素的に遊離させた。全グリカンプール（ピコモル量）をマイクロスケール固相抽出により精製し、中性およびシアル化グリカン画分に分けた。グリカン画分をＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析により、Ｂｒｕｋｅｒ　Ｕｌｔｒａｆｌｅｘ　ＴＯＦ／ＴＯＦ装置を用いて分析した。エキソグリコシダーゼ消化を行い、末端エピトープをさらに分析した。さらに、炭水化物エピトープを免疫蛍光染色により分析し、質量分析データの裏付けを行った。

【０６８８】

結果および考察

１００個を超えるグリカンシグナルが両細胞型に検出された。これらのうち、一部のシグナルは幹細胞に特徴的であり、分化の際に減少したが、他のシグナルは分化の際により顕著になった。幹細胞または分化した細胞と関連した特異的な構造的特性をエキソグリコシダーゼ消化および免疫蛍光染色により見出すことができる。結論として、間葉系幹細胞は分化の際に変化する特徴的なＮ－グリカンプロファイルを有する。幹細胞グライコームに関する情報は、幹細胞の分化段階の評価、および（例えば抗体の開発のための）新規幹細胞マーカの開発、ならびに幹細胞のそれらのニッチとの相互作用の研究、ひいては改良されたｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養系の開発に用いることができる。

【０６８９】

図１にＭＳＣ細胞およびそれらの分化したバリアントのＮ－グリカンプロファイルにおける相違を示す。中性グリカンに対する図１ｂおよび酸性グリカンに対する図１ｄにおけるシグナルの相違を用いて、分化中に変化する主要な構造を同定した。図２に、ジ－およびトリフコシル化二分岐中性Ｎ－グリカンからの、特異的フコシダーゼによるフコシル残基の開裂を示す。この結果とβ４－ガラクトシダーゼによる開裂との組み合わせは、Ｌｅｗｉｓ　ｘ構造のＮ－グリカン上における存在を示唆する。図３に、Ｌｅｗｉｓ　ｘ類似のシアル化末端エピトープに結合する抗シアリルＬｅｗｉｓ　ｘ抗体による染色を示す。詳細は実施例１９を参照のこと。

【実施例１８】

【０６９０】

間葉系幹細胞のグリコシル化

幹細胞および分化した細胞試料を得て、基本的にＷＯ／２００７／００６８７０に記載されるように分析した。より具体的な手順を以下に列挙する。

【０６９１】

骨髄由来幹細胞の単離および培養

骨髄（ＢＭ）由来ＭＳＣを、Ｌｅｓｋｅｌａ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）による記載のように得た。簡単に述べると、整形外科手術中に得られた骨髄を、２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１０％　ＦＣＳ、１ｘペニシリン－ストレプトマイシンおよび２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（全てＧｉｂｃｏから）を添加した最小必須アルファ培地（α－ＭＥＭ）中で培養した。２日間の細胞接着期の後、細胞をCa^{2+}およびMg^{2+}不含ＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）で洗浄し、さらに同一培地中に２０００ないし３０００細胞／ｃｍ２の密度でプレーティングし、週２回、半分の培地を除去し、新鮮な培地に置き換えることにより、ほぼコンフルエントになるまで継代培養した。

【０６９２】

本分析では５つのＢＭ　ＭＳＣ株およびそれらに由来する骨芽細胞分化細胞を分析し、ＭＳＣおよび分化した細胞のグリコシル化に関する統計的に有意な結果を得た。

【０６９３】

グリカンの単離

アスパラギン結合グリカンを、基本的に記載（Ｎｙｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，　１９９８）の通りに、Ｆ．　ｍｅｎｉｎｇｏｓｅｐｔｉｃｕｍ　Ｎ－グリコシダーゼＦ消化（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、ＵＳＡ）によって細胞糖タンパク質から遊離させた。遊離したグリカンを、シアル酸残基の負電荷に基づき、シアル化および非シアル化画分に分けた。細胞の

混入を、基本的に先に記載（Ｖｅｒｏｓｔｅｋ ｅｔ ａｌ．， ２０００）のように、グリカンの８０－９０％（ｖ／ｖ）含水アセトンを用いた－２０℃における沈殿および６０％（ｖ／ｖ）氷冷メタノールを用いたそれらの抽出により除去した。次いでグリカンを水中でC_{18}シリカ樹脂（ＢｏｎｄＥｌｕｔ、Ｖａｒｉａｎ、ＵＳＡ）に通し、先の方法（Ｄａｖｉｅｓ ｅｔ ａｌ．， １９９３）に基づき多孔質グラファイトカーボン（Ｃａｒｂｏｇｒａｐｈ、Ａｌｌｔｅｃｈ、ＵＳＡ）に吸着させた。カーボンカラムを水で洗浄し、次いで中性グリカンを水中の２５％（ｖ／ｖ）アセトニトリルで溶出し、シアル化グリカンを水中の２５％アセトニトリル（ｖ／ｖ）中の０．０５％（ｖ／ｖ）トリフルオロ酢酸で溶出した。両グリカン画分をさらに水中で強陽イオン交換樹脂（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，ＵＳＡ）およびC_{18}シリカ樹脂（ＺｉｐＴｉｐ，Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，ＵＳＡ）に通した。シアル化グリカンをさらに、それらをｎ－ブタノール：エタノール：水（１０：１：２、ｖ／ｖ）中で微結晶性セルロースに吸着させ、同一の溶媒で洗浄し、５０％エタノール：水（ｖ／ｖ）で溶出することにより、精製した。上記の全てのステップは小型クロマトグラフィカラム上で行い、少ない溶出および処理容量を用いた。グリカン分析法はヒト細胞試料を５人の異なる個人による分析にかけることで確実なものとした。結果は、特に個々のグリカンシグナルおよびその相対シグナル強度の検出に関して、高度に類似しており、本方法の信頼性が異なる細胞型からの分析結果の比較に適したものであることが示された。

【０６９４】

質量分析およびデータ分析

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析を、Ｂｒｕｋｅｒ Ｕｌｔｒａｆｌｅｘ ＴＯＦ／ＴＯＦ装置（Ｂｒｕｋｅｒ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いて、基本的に記載（Ｓａａｒｉｎｅｎ ｅｔ ａｌ．， １９９９）のように行った。中性およびシアル化グリカン成分の相対モル存在量は、質量スペクトル中のそれらの相対シグナル強度に基づき正確に付与され得る（Ｎａｖｅｎ ａｎｄ Ｈａｒｖｅｙ，１９９６；Ｐａｐａｃ ｅｔ ａｌ．，１９９６；Ｓａａｒｉｎｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９９；Ｈａｒｖｅｙ，１９９３）。質量分析法の各ステップは合成グリカンの混合物またはヒト細胞から抽出されたグリカン混合物によってその再現性を管理した。質量分析の粗データを、同位体パターン重複、複数のアルカリ金属付加物（ａｌｋａｌｉ ｍｅｔａｌ ａｄｄｕｃｔ）のシグナル、還元オリゴ糖からの水の除去産物、および、試料の本来のグリカンから生じたものではない他の干渉する質量分析シグナルの影響を注意深く排除することにより、本グリカンプロファイルに変換した。示されたグリカンプロファイル中に生じたグリカンシグナルは試料間の比較を可能にするために１００％に対して標準化した。

【０６９５】

グリコシダーゼ分析

グリカン画分を、好ましくは次の酵素を用いて特異的エキソグリコシダーゼ消化にかけた：タチナタマメα－マンノシダーゼ（Ｃａｎａｖａｌｉａ ｅｎｓｉｆｏｒｍｉｓ；Ｓｉｇｍａ，ＵＳＡ）；Ｓ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅからのβ１，４－ガラクトシダーゼ（大腸菌における組み替え体；Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、ＵＳＡ）；組み替えβ１，３－ガラクトシダーゼ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ，ＵＳＡ）；Ｓ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅからのβ－グルコサミニダーゼ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ，ＵＳＡ）；Ｓ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅからのα２，３－シアリダーゼ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、ＵＳＡ）；Ａ．ｕｒｅａｆａｃｉｅｎｓからのα２，３／６／８／９－シアリダーゼ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、ＵＳＡ）；Ｘ．ｍａｎｉｈｏｔｉｓからのα１，２－フコシダーゼおよびα１，３／４－フコシダーゼ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ，ＵＳＡ）。反応は質量分析を用いて、未消化試料に対する比較により、基本的に記載（Ｓａａｒｉｎｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９９）のように実施および分析した。酵素の特異性は、ヒト組織から単離されたグリカンおよび精製されたオリゴ糖を分析用の反応と同様に質量分析で分析したものを用いて調節された。

【０６９６】

結果

ＢＭ　ＭＳＣおよび骨芽細胞分化細胞試料から単離されたＮ－グリカン画分に関するＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析プロファイリングの結果の相対的な比較を表１および３に示す。発明の詳細な説明において分析されたように、特異的なＭＳＣ関連および分化細胞関連グリカンシグナル、グリカン構造特性、ならびにこのような構造特性を発現するグリカンシグナル群が明らかになった。分析された５つの細胞株間の相違の分析を表２および４に示す。これらの表はどのグリカンシグナルおよびグリカンシグナル群が、さらにそれに続き、どのグリカン構造特性が、分析された試料間で小さくまたは大きく相違する傾向があるかを示す。

【０６９７】

ＢＭ　ＭＳＣにおいて検出されたＮ－グリカンシグナル内で提案された単糖組成に対する構造の割当てを表５および６に示す。

【０６９８】

ＢＭ　ＭＳＣ試料からの１Ｈ　ＮＭＲ　分析の結果を表７および８に示し、ＭＳＣ試料における主要なＮ－グリカン成分およびグリカンの構造的特性を示す。

【０６９９】

表９はＢＭ　ＭＳＣ中性およびシアル化Ｎ－グリカン画分からのエキソグリコシダーゼ消化の結果を例示するものであり、検出されたグリカンシグナルそれぞれの下でのグリカン構造内の主要な非還元グリカンエピトープを示し；表は同一構造内のエピトープの組み合わせも示し、本発明の検出されたグリカン成分の構造データを示す。

【０７００】

β１，４－結合ガラクトースを有することが検出された主要な構造は：

H4N3	1298	0-1 β1,4-Gal 残基
H5N3	1460	0-2 β1,4-Gal 残基
H6N2F1	1565	1 β1,4-Gal 残基
H5N3F1	1606	0-1 β1,4-Gal 残基
H6N3	1622	0-3 β1,4-Gal 残基
H5N4	1663	2 β1,4-Gal 残基
H6N3F1	1768	1-2 β1,4-Gal 残基
H7N3	1784	1-4 β1,4-Gal 残基
H5N4F1	1809	1-2 β1,4-Gal 残基
H5N4F2	1955	1 β1,4-Gal 残基
H6N4F1	1971	2-3 β1,4-Gal 残基
H5N5F1	2012	2 β1,4-Gal 残基
H6N5	2028	3 β1,4-Gal 残基
H4N5F3	2142	0-1 β1,4-Gal 残基
H6N5F1	2174	3 β1,4-Gal 残基
H11N2	2229	1 β1,4-Gal 残基
H7N6	2393	1-4 β1,4-Gal 残基
H7N6F1	2539	4 β1,4-Gal 残基

であった。

【０７０１】

検出された構造はハイブリッド型（Ｈ７Ｎ３等）、二分岐複合型（Ｈ５Ｎ４、Ｈ５Ｎ４Ｆ１、Ｈ５Ｎ４Ｆ２等）、三分岐（Ｈ６Ｎ５等）および四分岐複合型（Ｈ７Ｎ６Ｆ１等）Ｎ－グリカン、ならびに検出された中性Ｎ－グリカンのシアル化したもの（シアル化Ｈ５Ｎ４Ｆ１、Ｈ５Ｎ４Ｆ２等）を含み；表９により詳細なデータを示す。結果は、構造中の非還元ＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン（ＬａｃＮＡｃ、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ）エピトープを示唆した。

【０７０２】

α１，３／４結合フコースを有することが検出された主要な構造は：

H2N2F1	917	0-1 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H3N2F1	1079	0-1 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H4N2F1	1241	0-1 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H3N3F1	1282	0-1 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H5N2F1	1403	0-1 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H4N3F1	1444	0-1 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H3N4F1	1485	0-1 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H4N3F2	1590	0-2 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H5N3F1	1606	0-1 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H3N5F1	1688	0-1 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H5N3F2	1752	0-2 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H6N3F1	1768	0-1 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H4N4F2	1793	1 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H5N4F1	1809	0-1 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H6N4F1	1971	0-1 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H6N5F1	2174	0-1 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H5N5F3	2304	0-3 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H6N5F2	2320	0-2 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基
H6N5F4	2612	0-4 α1,3-またはα1,4-結合フコース残基

であった。

【０７０３】

検出された構造はハイブリッド型（Ｈ５Ｎ３Ｆ２等）、二分岐複合型（Ｈ５Ｎ４Ｆ２、Ｈ５Ｎ４Ｆ３等）、三分岐（Ｈ６Ｎ５Ｆ２等）複合型Ｎ－グリカン、および検出された中性Ｎ－グリカンのシアル化したもの（シアル化Ｈ５Ｎ４Ｆ１、Ｈ５Ｎ４Ｆ２等）を含み；表９により詳細なデータを示す。結果は、ＩＩ型ＬａｃＮＡｃがＮ－グリカン分岐主鎖（ａｎｔｅｎｎａｅ　ｂａｃｋｂｏｎｅｓ）を形成する構造中のＬｅｗｉｓ　ｘエピトープ（Ｌｅｘ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ）を示唆し；ＢＭ　ＭＳＣにおいてＩＩ型ＬａｃＮＡｃが主要な分岐主鎖であることが示された。

【０７０４】

表９に示すような対応するシアル化グリカン組成の存在は、主要な類似のシアル化エピトープが、シアリル－ＬａｃＮＡｃ、主にα２，３－シアル化ＩＩ型ＬａｃＮＡｃ、およびシアリルフコシル化ＬａｃＮＡｃ、主にシアリル－Ｌｅｘ（ｓＬｅｘ、Ｎｅｕ５Ａｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ）であったことを示唆する。対応する構造の割当てを本発明の表に示し、発明の詳細な説明中に記載する。

【０７０５】

消化の結果は、α１，２－結合フコースエピトープも示唆し、ＩＩ型ＬａｃＮＡｃがＮ－グリカン分岐主鎖を形成する構造中のＨ２型エピトープ（Ｈ－２、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ）を示唆し；抗Ｈ－２抗体を用いたモノクローナル抗体の結果はさらに、このようなエピトープが骨芽細胞分化細胞においてＢＭ　ＭＳＣにおけるよりも一般的であったことを示した。

【０７０６】

同様に、表９に例示される本結果は、非還元末端α－マンノース、β１，３－結合ガラクトース、β－結合Ｎ－アセチルグルコサミン、および直鎖ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミンの；より具体的には表９に明記されるようなＮ－グリカン組成および典型的な量における；存在を示した。これらは発明の詳細な説明の下でより詳細に記載する。

【０７０７】

本発明よると、また発明の詳細な説明中に記載する通り、表９に例示される本エキソグリコシダーゼ消化の結果ならびに本願発明者らにより示された他の構造的特徴および分類データの組み合わせは、ＢＭ　ＭＳＣおよびそれに由来する細胞の主要な非還元末端Ｎ－グリカン構造を明らかにした。

【実施例１９】

【０７０８】

免疫染色

免疫組織化学（ＩＨＣ）

継代９ないし１２における骨髄由来間葉系幹細胞を、ＣＣ２処理したガラス８チャンバ

ースライド（Ｌａｂ－ＴｅｋＩＩ、Ｎａｌｇｅ　Ｎｕｎｃ、Ｄｅｎｍａｒｋ）上で、３７℃、５％CO_2の下、２ないし４日間増殖させた。骨原性細胞を同一の８チャンバースライドを用いて分化培地中で６週間培養した。培養後、細胞を５回ＰＢＳ（１０ｍＭ　リン酸ナトリウム、ｐＨ７．２、１４０ｍＭ　ＮａＣｌ）で洗浄し、４％　ＰＢＳ緩衝パラホルムアルデヒドｐＨ７．２で室温（ＲＴ）において１０ないし１５分間固定し、次いでＰＢＳで３回５分間洗浄した。非特異的結合部位を３％　ＨＳＡ－ＰＢＳ（ＦＲＣ　Ｂｌｏｏｄ　Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｆｉｎｌａｎｄ）で３０分間、ＲＴでブロックした。一次抗体を１％　ＨＳＡ－ＰＢＳ（１：１０ないし１：２００）中で希釈し、６０分間ＲＴでインキュベートし、次いでＰＢＳで３回１０分間洗浄した。二次抗体、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８ヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ；１：１０００）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８ヤギ抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ；１：１０００）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、またはＦＩＴＣ－結合ウサギ抗ラットＩｇＧ（１：３２０）（Ｓｉｇｍａ）を１％　ＨＳＡ－ＰＢＳ中に希釈し、６０分間ＲＴで暗所においてインキュベートした。さらに、細胞をＰＢＳで３回１０分間洗浄し、ＤＡＰＩ染色剤を含有するＶｅｃｔａｓｈｉｅｌｄ封入剤（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、ＵＫ）に封入した。免疫染色を、Ｚｅｉｓｓ　Ａｘｉｏｓｋｏｐ　２　ｐｌｕｓ蛍光顕微鏡（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ　Ｖｉｓｉｏｎ　ＧｍｂＨ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いて、ＦＩＴＣおよびＤＡＰＩフィルタとともに観察した。像をＺｅｉｓｓ　ＡｘｉｏＣａｍ　ＭＲｃカメラを用いて、ＡｘｉｏＶｉｓｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　３．１／４．０（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ）を使用し、４００Ｘの倍率で撮影した。

【０７０９】

シアリルＬｅｗｉｓ　ｘ（ＧＦ３０７）に対する抗体の特異的クローンによる間葉系細胞の染色の結果を図３に示す。特異的抗体型は未分化ｈＭＳＣに対する特異性を示した。抗体の詳細を表２５に示す。

【実施例２０】

【０７１０】

骨髄由来および臍帯血由来間葉系幹細胞株の抗体プロファイリング

実験手順

骨髄由来間葉系幹細胞株（ＢＭ－ＭＳＣ）

ＢＭ－ＭＳＣの単離および培養、ならびにＢＭ－ＭＳＣの骨原性分化を、実施例１に記載されるように行った。

【０７１１】

臍帯血間葉系幹細胞（ＣＢ－ＭＳＣ）の単離および培養

ＣＢ－ＭＳＣの単離および培養を、実施例１の記載のように、ただし一部を改変して行った。ＣＢ－ＭＳＣの骨原性分化をＢＭ－ＭＳＣに対する記載のように１６日間誘導した。

【０７１２】

ＣＢ－ＭＳＣの脂質生成分化

細胞を、ほぼコンフルエントになるまで増殖培地中で増殖させ、その後、１０％　ＦＣＳ、２０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、１ｘペニシリン－ストレプトマイシン、０．１ｍＭ　インドメタシン（全てＳｉｇｍａから）、０．５ｍＭ　ＩＢＭＸ－２２、０．４μｇ／ｍｌ　デキサメタゾンおよび０．５μｇ／ｍｌ　インシュリン（３者とも全てＰｒｏｍｏｃｅｌｌから）を添加したα－ＭＥＭ　Ｇｌｕｔａｍａｘを含む脂質生成誘導培地を加えた。３日後、１０％　ＦＣＳ、２０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、１ｘペニシリン－ストレプトマイシン、０．１ｍＭ　インドメタシン（全てＳｉｇｍａから）、０．５μｇ／ｍｌ　インシュリンおよび３．０μｇ／ｍｌ　Ｃｉｇｌｉｔａｚｏｎｅ（２者ともＰｒｏｍｏｃｅｌｌから）を添加したα－ＭＥＭ　Ｇｌｕｔａｍａｘを含む最終脂質生成分化培地を加え、細胞を１４日間（合わせて１７日間）、５％CO_2、３７℃において培養した。分化培地は分化期間を通じて週２回新しいものに換えた。

【０７１３】

間葉系幹細胞表現型のフローサイトメトリ分析

ＢＭおよびＣＢ由来ＭＳＣの両者をフローサイトメトリ（ＢＤ　ＦＡＣＳＡｒｉａ、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）により表現型分析した。ＣＤ１３、ＣＤ１４、ＣＤ２９、ＣＤ３４、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ７３、ＣＤ９０、ＨＬＡ－ＤＲおよびＨＬＡ－ＡＢＣ（全てＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから）ならびにＣＤ１０５（Ａｂｃａｍ　Ｌｔｄ．）に対するＦＩＴＣ、ＡＰＣまたはＰＥ結合抗体を直接標識のために用いた。小容量の細胞、例えば５ｘ１０^{4}細胞／１００μｌの染色のため、０．３％超高純度ＢＳＡ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ－ＰＢＳバッファをＦＡＣＳチューブに分注した。１マイクロリットルの各抗体を細胞に添加し、３０分間、＋４℃でインキュベートした。細胞を２ｍｌのバッファで洗浄し、３００ｘｇで４分間遠心分離した。細胞を２００μｌのフローサイトメトリ分析用バッファに懸濁した。

【０７１４】

抗体染色のための細胞の回収

ＢＭおよびＣＢ－ＭＳＣの両者を、２ｍＭ　ＥＤＴＡ－ＰＢＳ溶液（Ｖｅｒｓｅｎｓｅ）、ｐＨ７．４を用い、約３０分間、３７℃で細胞培養プレートから遊離させた。骨原性および脂質生成細胞の両者を、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ－ＰＢＳ溶液、ｐＨ７．４を用い、３７℃においてそれぞれ約３０分間および５分間で遊離させた。分化した細胞は培養プレートからクラスターとして遊離したため、それらをパスツールピペットを用いたピペッティングにより、またはボルテックスにより、および１８ゲージの注射針を通す懸濁により、懸濁し、単細胞懸濁液を得た。最後に、細胞懸濁液を５０μｍフィルタを通して濾過し、未懸濁細胞の凝集体を除去した。回収した細胞を３００ｘｇで４分間遠心分離し、小容量の０．３％超高純度ＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ）、２ｍＭ　ＥＤＴＡ－ＰＢＳバッファに対して懸濁した。

【０７１５】

一次抗体染色

ＢＭおよびＣＢ由来細胞をＦＡＣＳチューブに小容量、例えば5ないし７ｘ１０^{4}細胞／１００μｌ　０．３％超高純度ＢＳＡ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ－ＰＢＳバッファで分注した。４マイクロリットルの抗グリカン一次抗体を細胞懸濁液に添加し、ボルテックスし、３０分間室温でインキュベートした。細胞を２ｍｌのバッファで洗浄し、４分間３００ｘｇで遠心分離し、その後上清を除去した。染色に用いた一次抗体を表２５に列挙する。

【０７１６】

二次抗体染色

ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ　４８８結合抗マウス（１：５００、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）および抗ウサギ（１：５００、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）、ならびにＦＩＴＣ結合抗－ラット（１：３２０、Ｓｉｇｍａ）および抗ヒトλ（１：１０００、Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）二次抗体を、適当な一次抗体に対して用いた。二次抗体を０．３％超高純度ＢＳＡ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ－ＰＢＳバッファ中に希釈し、１００μｌの希釈物を細胞懸濁液に加えた。試料を３０分間室温で暗所にてインキュベートした。細胞を２ｍｌのバッファで洗浄し、４分間３００ｘｇで遠心分離した。上清を除去し、細胞をフローサイトメトリ分析用の２００μｌのバッファ中に懸濁した。ネガティブコントロールとして、細胞を一次抗体無しでインキュベートした以外は標識細胞と同様に処理した。

【０７１７】

フローサイトメトリ分析

蛍光標識された抗体を有する細胞をＢＤ　ＦＡＣＳＡｒｉａ　（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）により、ＦＩＴＣ検出器を波長４８８で用いて分析した。結果をＢＤ　ＦＡＣＳＤｉｖａソフトウェア　バージョン５．０．１（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）により分析した。

【０７１８】

結果および考察

間葉系幹細胞表現型のフローサイトメトリ分析

ＢＭおよびＣＢ－ＭＳＣの両者は造血マーカＣＤ３４、ＣＤ４５およびＣＤ１４に対して陰性であった。細胞はＣＤ１３（アミノペプチダーゼＮ）、ＣＤ２９（β１－インテグリン）、ＣＤ４４（ヒアルロン酸受容体）、ＣＤ７３（ＳＨ３）、ＣＤ９０（Ｔｈｙ－１）、ＣＤ１０５（ＳＨ２／エンドグリン）およびＣＤ４９ｅに対して陽性に染色された。細胞はＨＬＡ－ＡＢＣに対しても陽性に染色されたが、ＨＬＡ－ＤＲに対しては陰性であった。

【０７１９】

ＢＭ－ＭＳＣの抗グリカン抗体プロファイリング

ＢＭ－ＭＳＣおよびその分化した骨原性細胞（ＢＭ－ＯＧ）を、６０種までの抗グリカン抗体でフローサイトメトリにより、および２９種の抗体で免疫組織化学（ＩＨＣ）によっても、分析した。ＢＭ－ＭＳＣ染色の結果を表２６および図中に示す。

【０７２０】

一般的な観察

特定のＭＳＣの１つの集団全体または骨原性系統に分化した１つの細胞集団だけに完全に特異的であるが他の細胞集団には特異的ではない、分析された特異的グリカンエピトープは、１つも存在しないようである。その代わり、幹細胞および分化した細胞には特定のグリカンエピトープの増加が存在するようである。場合により、抗体は、特定の細胞型内の高度に、もしくは数倍多い；または細胞集団の一部において現在のＦＡＣＳの検出限界を超えて存在するが、他の対応する細胞集団においてはそうではない；エピトープを認識する。このような抗体は特に、特定の細胞集団の特異的識別に有用であると考えられる。さらに、特定の細胞型の細胞の独立した亜集団を認識するいくつかの抗体の組み合わせは、より大きな細胞集団の識別ポジティブまたはネガティブ識別に有用である。

【０７２１】

本発明は間葉系細胞集団全般に共通の、または間葉系幹細胞もしくは分化した間葉系幹細胞全般等の間葉系細胞の特定の分化段階のための、または脂肪細胞もしくは骨芽細胞等の特定の分化した細胞集団に特異的な、試薬を提供する。さらに本発明は、臍帯血または骨髄等の特定の組織型に由来する間葉系幹細胞のための特異的マーカ構造を明らかにする。本発明はさらに、標的構造および特異的マーカの使用に関する。

【０７２２】

大部分の細胞で認められる個々のマーカは、対象となる細胞がその特異的グリカンエピトープを発現しない場合に、細胞の識別および／または単離のために用いることができる。これらのマーカは例えば、該マーカの発現が対象細胞に少ないかまたは存在しない場合に、組織または細胞培養物等の生体材料からの細胞集団の単離に用いることができる。幹細胞を含む組織は通常これらを原始幹細胞の段階で含むと考えられ、そのため、高度に発現するマーカを細胞の単離のために最適化または選択することができる。特定の分化状態を保つための細胞培養条件を選択することが可能であり、大部分または事実上全ての細胞集団を認識する本発明の抗体はこれらの点で細胞の分析または単離に有用である。

【０７２３】

ＦＡＣＳ分析等の方法では細胞上の構造の定量的な測定が可能であり、従って細胞集団の一部を認識する抗体も細胞集団に対して特徴的である。

【０７２４】

間葉系細胞集団の特異的分析のためのいくつかの抗体の組み合わせは細胞集団を特徴付けるであろう。好ましい一様態において、細胞集団の大部分（３５％超）またはほとんど（５０％）を認識する（好ましくは３０％超；４０％超、５０％超、６０％超、７０％超、８０％超の順で後者ほど好ましい；最も好ましくは９０％超）少なくとも１種の「効果的に結合する抗体」が、好ましくは前記細胞集団のわずかな部分（好ましくは方法の検出限界から低レベルの認識までであって、好ましい順に細胞の１０％未満、７％未満、５％未満、２％未満、または１％未満、例えば細胞の０．２ないし１０％、より好ましくは細胞の０．２ないし５％、さらに好ましくは０．５ないし２％、または最も好ましくは０．５％ないし１．０％）を認識する、または該集団を何も認識しない（検出限界またはそれ

未満、例えば好ましい順に５％未満、２％未満、１％未満、０．５％未満、および０．２％未満）、およびより好ましくは本発明の細胞集団を事実上全く認識しない、少なくとも１種の「非結合抗体」との組み合わせによる分析法のために、選択される。さらに他の様態において、前記組み合わせ法は「中程度に結合する抗体」の使用を含み、該抗体は細胞の実質的な部分、好ましくは５ないし５０％、より好ましくは７％ないし４０％、および最も好ましくは１０ないし３５％を認識する。抗体はｐｒｅｆｅｒａｎｌｙである

【０７２５】

前記抗体は本発明の標的構造であることが明らかになった特定のグリカンエピトープを認識する。該抗体の特異性および親和性はクローンごとに異なると考えられる。特定のグリカン構造を認識することが知られる特定のクローン群は必ずしも同一のコール集団を認識しないと考えられ、実際、異なる抗体による任意のＦＡＣＳの結果は全く同一の認識の認識パターンを生ずる。

【０７２６】

幹細胞における最も顕著な増加はＳＳＥＡ－４であり、骨原性細胞においてはアシアロＧＭ１，アシアロＧＭ２およびグロボ系列構造：グロボトリアシルセラミドＧｂ３およびグロボシド（ＧＬ４またはＧｂ４）としても知られるグロボテトラオース等の一部の糖脂質エピトープガングリオ系列、ならびにＬｅｗｉｓ　ａおよびシアル化Ｃａ１５－３である。

【０７２７】

Ｌｅｗｉｓ　ｘ構造は、５種の異なる抗Ｌｅｘ抗体を用いた染色に基づくと、ＭＳＣの調製物中のＭＳＣ細胞の大部分または分化した細胞において、ＦＡＣＳ分析条件下で検出水準を超える量では存在しないようである。しかし、特異的抗Ｌｅｗｉｓ　ｘクローンにより認識され得る特定のＬｅｗｉｓ　ｘ発現が存在する。一方、シアリルＬｅｗｉｓ　ｘ構造は両幹細胞上および骨原性細胞内に存在し、割合は異なる抗ｓＬｅｘ抗体間で相違しており、これに対して最も考えられる原因はｓＬｅｘエピトープに対する異なる担体である。例えばＧＦ５２６抗ｓＬｅｘ抗体は特定のＯ－グリカンコアＩＩ構造が有するｓＬｅｘエピトープのみを認識する。ＧＦ５２６の結合は、特定の非幹細胞材料上の多量のＯ－グリカンを事実上代表するＰ－セレクチンリガンド糖タンパク質ＰＳＧＬ－１と関連することが確認されている。しかし、コアＩＩ　Ｏ－グリカンはいくつかのムチン型Ｏ－グリカン上で報告し、本発明は間葉系幹細胞上におけるＰＳＧＬ－１上のコアＩＩ　ｓＬｅｘの分析に限定されないと考えられる。他の２つの抗ｓＬｅｘ抗体（ＧＦ５１６およびＧＦ３０７）に認識されるｓＬｅｘの担体および正確な結合エピトープは、ＧＦとは異なる最適微細特異性（ｏｐｔｉｍａｌ　ｆｉｎｅ　ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ）を有するコアＩＩ以外の構造を含むようである。抗体は、異なるサイズの、異なる微細およびコア／担体グリカン特異性細胞集団を伴う。

【０７２８】

ＣＢ－ＭＳＣの抗グリカン抗体プロファイリング

ＣＢ－ＭＳＣならびにその分化した骨原性および脂肪細胞を６１種までの各種抗グリカン抗体を用いてフローサイトメトリにより分析した。ＣＢ－ＭＳＣ染色の結果を表２６および図に示す。同様にＢＭ由来抗体プロファイリングにおいては、ＣＢ－ＭＳＣまたは骨原性もしくは脂肪細胞系統に分化した細胞を決定する特異的グリカンエピトープは１つも存在しないようである。一部のグリカン、例えばＨ二糖（ＧＦ３９４）、ＴＦ（ＧＦ２８１）、グリコデリン（ＧＦ３７５）、Ｌｅｗｉｓ　ｘ（ＧＦ５１７）およびＧａｌα３Ｇａｌ（ＧＦ４１３）はＣＢ由来ＭＳＣにおいて高度に豊富であるが、全幹細胞集団におけるその割合はむしろ低い（１０％以下）。興味深いことに、幹細胞および脂肪細胞においては豊富であるが骨原性細胞においては豊富でないグリカン、例えばＳＳＥＡ－４（ＧＦ３５４）、Ｌｅｗｉｓ　ｃ（ＧＦ２９５）、ＳＳＥＡ－３（ＶＰＵ００９）、ＧＤ２（ＧＦ４０６）、シアリルＬｅｗｉｓ　ｘ（ＧＦ３０７）およびＴｒａ－１－６０（ＧＦ４１５）も存在するようである。ＢＭ由来細胞は脂肪細胞方向に分化しなかったため、異なる供給源からの異なる脂肪細胞間でデータの比較を行うことはできない。骨原性分化はＢＭ

およびＣＢ由来細胞の両者において類似したグリカンの増加を誘導する。ＢＭ由来骨原性細胞において増加するＧｂ３のみがＣＢ由来骨原性細胞において増加しない。さらに、ＢＭ由来細胞では試験されなかったガングリオシドＧＴ１ｂ、ＧＤ２、ＧＤ３およびＡ２Ｂ５はＣＢ由来骨原性細胞において高度に豊富である。実施例の特異的抗体により明らかになった、ＣＢ由来骨原性細胞中に豊富なグリカンエピトープのほとんどは、ＣＢ由来脂肪細胞中においても豊富である（より高い割合でさえある）が、本発明は、これらの標的についても細胞型間で発現量の相違が存在し、両分化系統の特徴付けが可能であることを明らかにする。分化後のグリカンエピトープの興味深い群の一つはガングリオシドに対する公知の抗体によって認識され得るグリカンエピトープであり一般に幹細胞（＜１０％）から骨芽細胞および脂肪細胞（５０ないし１００％）へと増加する。ＢＭ由来ＭＳＣとは異なり、ＣＢ由来細胞においては抗Ｌｅｗｉｓ　ｘ抗体ＧＦ５１７およびＧＦ５２５によるある程度の陽性が存在するようである。抗シアリルＬｅｗｉｓ　ｘ抗体を用いた結果は両細胞型で類似する。

【実施例２１】

【０７２９】

ＣＢ　ＭＳＣおよび骨芽細胞分化細胞からの構造

臍帯血ＭＳＣおよびその骨芽細胞分化細胞を回収し、その細胞スフィンゴ糖脂質グリカンを本質的に先の実施例に記載されるように単離およびパーメチル化し、ＭＳ／ＭＳ分析（フラグメンテーション質量分析）により分析した。以下の結果リストにおいて、フラグメントは特に断りの無い限り主にＮａ＋付加イオンであり、［］は未定義の単糖配列を表す。以下のグリカンは構造を示唆するシグナルを生成した（命名はＤｏｍｏｎ　ａｎｄ　Ｃｏｓｔｅｌｌｏ，　１９８８，　Ｇｌｙｃｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｊ．の記載の通りである）。

【０７３０】

骨芽細胞分化細胞からの酸性糖脂質グリカン

ｍ／ｚ８３８．３９に対応する単糖組成ＮｅｕＡｃＨｅｘ２であって、構造ＧＭ３；ＮｅｕＡｃα２－３Ｇａｌβ１－４Ｇｌｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当するもの。この構造はフラグメントＢ１（ｍ／ｚ　３７５．９４　（Ｍ＋Ｈ$^{+}$））およびY_2（ｍ／ｚ　４６３．０１）で確認される。

【０７３１】

ｍ／ｚ　１０８３．５６に対応する単糖組成であって、構造ＧＭ２；ＮｅｕＡｃα２－３（ＧａｌＮＡｃβ１－４）Ｇａｌβ１－４Ｇｌｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当するもの。この構造はフラグメントB_1（ｍ／ｚ　３７６．０３（Ｍ＋Ｈ＋））、$Y_{2\alpha}$ｍ／ｚ（ｍ／ｚ　７０８．２１）、$Y_{2\beta}$（ｍ／ｚ　８２４．３０）、$Y_{2\alpha}$／$Y_{2\beta}$（ｍ／ｚ　４４９．０３）、Y_1（ｍ／ｚ　２５８．９５）で確認される。

【０７３２】

ｍ／ｚ　１１９９．６３に対応する単糖組成ＮｅｕＡｃ２Ｈｅｘ２であって、構造ＧＤ３；ＮｅｕＡｃα２－８ＮｅｕＡｃα２－３Ｇａｌβ１－４Ｇｌｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当するもの。この構造はフラグメントB_1（ｍ／ｚ　３７５．９４（Ｍ＋Ｈ＋））、B_2（ｍ／ｚ　７５９．１３）、Y_2（ｍ／ｚ　４６３．０）およびY_3（ｍ／ｚ　８２４．２２）で確認される。

【０７３３】

ｍ／ｚ　１５３２．８３に対応する単糖組成（ＮｅｕＡｃＨｅｘ３ＨｅｘＮＡｃ２）であって、構造ＮｅｕＡｃα２－３（ＧｌｃＮＡｃβ１－４）Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｇａｌβ１－３／４Ｇｌｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当し、これは得られたフラグメントB_1（ｍ／ｚ　３７５．８８（Ｍ＋Ｈ＋））、B_2／$Y_{4\alpha}$（ｍ／ｚ　４７１．８７）、Y_3（ｍ／ｚ　７０８．０４）、B_2（ｍ／ｚ　８４７．１２）、$Y_{4\alpha}$（ｍ／ｚ　１１５７．５０）および$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　１２７３．６６）で確認することができた。

【０７３４】

ｍ／ｚ　１７３６．９０に対応する単糖組成（ＮｅｕＡｃＨｅｘ４ＨｅｘＮＡｃ２）であって、構造ＮｅｕＡｃα２－３Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｇａｌβ１－３／４Ｇｌｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当し、これは得られたフラグメント$Ｂ_{1}$（ｍ／ｚ　３７５．７３（Ｍ＋Ｈ＋））、$Ｙ_{2}$（ｍ／ｚ　４６２．７６）、$Ｙ_{6}$／$Ｂ_{4}$または$Ｙ_{4}$／$Ｂ_{6}$（ｍ／ｚ　７０７．７３）、$Ｂ_{3}$（ｍ／ｚ　８４６．９３）、$Ｙ_{4}$（ｍ／ｚ　９１１．９８）、$Ｙ_{5}$（ｍ／ｚ　１１５６．３６）、$Ｂ_{5}$（ｍ／ｚ　１２９６．２４）および$Ｙ_{6}$（ｍ／ｚ　１３５９．９５）で確認することができた。

【０７３５】

骨芽細胞分化細胞からの中性糖脂質グリカン

ｍ／ｚ　１３７５．７０に対応する単糖組成（Ｈｅｘ４ＨｅｘＮＡｃ２）であって、構造Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｇａｌβ１－３／４Ｇｌｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当し、これは得られたフラグメント$Ｙ_{2}$（ｍ／ｚ　４６２．８３）、$Ｂ_{2}$（ｍ／ｚ　４８５．７８）、$Ｙ_{5}$／$Ｂ_{3}$または$Ｙ_{3}$／$Ｂ_{5}$（ｍ／ｚ　４７１．８３）、$Ｙ_{3}$（ｍ／ｚ　７０７．８８）、$Ｙ_{4}$（ｍ／ｚ　９１２．１０）および$Ｙ_{5}$（ｍ／ｚ　１１５７．４２）で確認することができた。この試料は分岐構造、すなわち二置換Ｈｅｘβ１－３／４ユニットに相当する少量の成分も含んでいた。この観察はフラグメント$Ｙ_{3\alpha}$／$Ｙ_{3\beta}$（ｍ／ｚ　８９７．４６）およびフラグメント$Ｙ_{2\alpha}$／$Ｙ_{2\beta}$（ｍ／ｚ　４４８．８０）に基づく。

【０７３６】

まとめると、本結果は特に、骨芽細胞分化ＭＳＣの糖脂質グリカンにおける次の特異的構造：ＧＭ３、ＧＤ３、およびＧＭ２ガングリオシド型構造であって特にジシアル酸残基を有するもの、ならびに直鎖および分岐ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン鎖であってシアル化非還元末端を有するまたは有しないもの、に対する直接的な証拠をもたらし、本発明による構造的割り当てがさらに確認された。

【０７３７】

ＭＳＣ中性脂質グリカンからの特異的構造

ｍ／ｚ　１３７５．７７に対応する単糖組成（Ｈｅｘ４ＨｅｘＮＡｃ２）であって、構造Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｇａｌβ１－３／４Ｇｌｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当し、これは得られたフラグメント$Ｙ_{2}$（ｍ／ｚ　４６３．００）、$Ｂ_{2}$（ｍ／ｚ　４８５．７９）、$Ｙ_{5}$／$Ｂ_{3}$または$Ｙ_{3}$／$Ｂ_{5}$（ｍ／ｚ　４７１．８６）、$Ｙ_{3}$（ｍ／ｚ　７０７．９０）および$Ｙ_{4}$（ｍ／ｚ　９１２．３５）で確認することができた。分岐構造を示すフラグメントシグナルは観察されなかった（ｍ／ｚ　８９７または４４８）。

【０７３８】

まとめると、本結果は特に、ＭＳＣ糖脂質グリカンにおける次の特異的構造：直鎖ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン鎖（ｍ／ｚ　１３７５参照）、および分化した細胞におけるよりも少ない分岐ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン鎖、に対する直接的な証拠をもたらし、本発明による構造的割り当てがさらに確認された。

【実施例２２】

【０７３９】

臍帯血ＭＳＣ　Ｏ－グリコシル化分析

Ｏ－グリカンのエキソグリコシダーゼ分析

あらかじめＮ－グリコシダーゼＦで処理してＮ－グリカンを除去した臍帯血由来ＭＳＣ（ＵＣＢ－ＭＳＣ；先の実施例参照）細胞系統を非還元的β脱離にかけ、Ｏ－グリカンを回収した。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ分析を用いて酸性Ｏ－グリカンプールから生じた主要なピーク［Ｍ－Ｈ］$^{-}$はｍ／ｚ　６７３．２３（ＮｅｕＡｃＨｅｘＨｅｘＮＡｃ）、ｍ／ｚ　９６４．３３（ＮｅｕＡｃ２ＨｅｘＨｅｘＮＡｃ）、ｍ／ｚ　１０３８．３６（ＮｅｕＡｃＨｅｘ２ＨｅｘＮＡｃ２）、およびｍ／ｚ　１３２９．４６（ＮｅｕＡｃ２Ｈｅｘ２ＨｅｘＮＡｃ２）であった。これらのピークは酸性Ｎ－グリカンスペクトル中には存在しな

かった。検出された有り得るより小さな酸性Ｏ－グリカンピーク［Ｍ－Ｈ］$^-$は、ｍ／ｚ　８３５．２８（ＮｅｕＡｃＨｅｘ２ＨｅｘＮＡｃ）、ｍ／ｚ　８７６．３１（ＮｅｕＡｃＨｅｘＨｅｘＮＡｃ２）、ｍ／ｚ　９７３．２８（Ｈｅｘ２ＨｅｘＮＡｃ２ｄＨｅｘＳＰ）、ｍ／ｚ　９８１．３４（ＮｅｕＡｃＨｅｘ２ＨｅｘＮＡｃｄＨｅｘ）、ｍ／ｚ　９９７．３４（ＮｅｕＡｃＨｅｘ３ＨｅｘＮＡｃ）、ｍ／ｚ　１０３０．３０（Ｈｅｘ２ＨｅｘＮＡｃ３ＳＰ）、ｍ／ｚ　１１１０．３８（ＮｅｕＡｃ２ＨｅｘＨｅｘＮＡｃｄＨｅｘ）、ｍ／ｚ　１１２６．３８（ＮｅｕＡｃ２Ｈｅｘ２ＨｅｘＮＡｃ）、ｍ／ｚ　１２００．４２（ＮｅｕＡｃＨｅｘ３ＨｅｘＮＡｃ２）、ｍ／ｚ　１２７２．４４（ＮｅｕＡｃ２Ｈｅｘ２ＨｅｘＮＡｃｄＨｅｘ）、ｍ／ｚ　１３５４．４１（Ｈｅｘ４ＨｅｘＮＡｃ３ＳＰ）、ｍ／ｚ　１３７０．４８（ＮｅｕＡｃ２ＨｅｘＨｅｘＮＡｃ３）、ｍ／ｚ　１３９５．４４（Ｈｅｘ３ＨｅｘＮＡｃ４ＳＰ）、ｍ／ｚ　１４０３．４９（ＮｅｕＡｃＨｅｘ３ＨｅｘＮＡｃ３）、ｍ／ｚ　１４２８．５３（ＮｅｕＡｃＨｅｘＨｅｘＮＡｃ４ｄＨｅｘ）およびｍ／ｚ　１４７５．４４（ＮｅｕＡｃ２Ｈｅｘ２ＨｅｘＮＡｃ２ｄＨｅｘ）であった。

【０７４０】

酸性Ｏ－グリカンをα２，３－シアリダーゼで処理した。主要な酸性Ｏ－グリカンをこの処理で消化した。ピークｍ／ｚ　１０３８．３６　［Ｍ－Ｈ］$^-$（ＮｅｕＡｃＨｅｘ２ＨｅｘＮＡｃ２）およびｍ／ｚ　１３２９．４６　［Ｍ－Ｈ］$^-$（ＮｅｕＡｃ２Ｈｅｘ２ＨｅｘＮＡｃ２）マイナスシアル酸が中性Ｏ－グリカンプールの質量スペクトルにおいて検出可能であった（ｍ／ｚ　７７１．２６　［Ｍ＋Ｎａ］$^+$＝Ｈｅｘ２ＨｅｘＮＡｃ２）。従って、ピークｍ／ｚ　１０３８．３６　［Ｍ－Ｈ］$^-$（ＮｅｕＡｃＨｅｘ２ＨｅｘＮＡｃ２）およびｍ／ｚ　１３２９．４６　［Ｍ－Ｈ］$^-$（ＮｅｕＡｃ２Ｈｅｘ２ＨｅｘＮＡｃ２）の消失ならびにそれと同時のピークｍ／ｚ　７７１．２６　［Ｍ＋Ｎａ］$^+$の出現は、両シアル酸が優先的にα２，３－結合することを示す。ピークｍ／ｚ　６７３マイナスシアル酸（ｍ／ｚ　４０６．１３　［Ｍ＋Ｎａ］$^+$）はマトリクスピークにより隠れた。ピークｍ／ｚ　９６４．３３　［Ｍ－Ｈ］$^-$（ＮｅｕＡｃ２ＨｅｘＨｅｘＮＡｃ）はα２，３－シアリダーゼ処理後には認められず、少なくとも１つのシアル酸がα２，３－シアリダーゼによって消化されたことが示唆された。これら全ての構造はさらに本来のＯ－グリカンのパーメチル化およびそのフラグメンテーション分析によって確認された。

【０７４１】

基質特異性α２，３－シアリダーゼを、２種の合成オリゴ糖、すなわちＮｅｕＡｃα２，３Ｇａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃβ１，３Ｇａｌβ１，４ＧｌｃおよびＮｅｕＡｃα２，６［Ｇａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃβ１－３（Ｇａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃβ１，６）Ｇａｌβ１，４Ｇｌｃを用いて試験した。酵素は基質としてα２，３－結合シアル酸を用い、α２，６－結合シアル酸は無傷のまま残すことができた。

【０７４２】

α２，３－シアリダーゼ処理後、これらの中性Ｏ－グリカンをβ１，４－ガラクトシダーゼ処理にかけた。主要な中性Ｏ－グリカンピーク（ｍ／ｚ　７７１．２６）［Ｍ＋Ｎａ］$^+$はこのエキソグリコシダーゼ処理の結果として消失し、新規の主要な中性Ｏ－グリカンピークｍ／ｚ　６０９．２１　［Ｍ＋Ｎａ］$^+$（ＨｅｘＨｅｘＮＡｃ２）が生じた。このピークはｍ／ｚ　７７１．２６ピークマイナスヘキソース単糖、この場合ガラクトースに相当した。このデータをＯ－グリカンコア構造の一般的な知識と合わせると、消失したガラクトースは好ましくはコア２　Ｏ－グリカン構造のＧｌｃＮＡｃβ１，６分岐にβ１，４－結合していたものである。

【０７４３】

β１，４－ガラクトシダーゼの基質特異性を、合成オリゴ糖の混合物を用いて試験した。これらのコントロール糖は末端β１，３－結合またはβ１，４－結合したガラクトース残基を有していた。酵素は基質としてβ１，４－結合ガラクトースを用い、β１，３－結合ガラクトースは無傷のまま残すことができた。

【０７４４】

１個のより小さな酸性Ｏ－グリカンピーク（ｍ／ｚ　１４７５．４４　［Ｍ－Ｈ］$^{-}$＝ＮｅｕＡｃ２Ｈｅｘ２ＨｅｘＮＡｃ２ｄＨｅｘ）が脂肪細胞分化ＵＣＢ－ＭＳＣの酸性Ｏ－グリカンプールにおいて分析された。このグリカンを連続的に次のエキソグリコシダーゼ処理にかけた。これをまずα２，３－シアリダーゼ処理により、次いでα１，２－フコシダーゼにより、そして最後にα１，３／４－フコシダーゼにより、消化した。α２，３－シアリダーゼ処理後、２つのシアル酸ユニットが失われ、それらがアルファ２，３－結合していたことが示唆された。残った中性Ｏ－グリカン（ｍ／ｚ　＝　９１７．３２）［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$はα１，２－フコシダーゼによって消化されなかったが、α１，３／４－フコシダーゼはフコース残基をさらに除去した。さらに、このエキソグリコシダーゼデータをＯ－グリカンコア構造の一般的な知識と合わせると、この構造はＮｅｕＡｃα２，３Ｇａｌβ１，３［ＮｅｕＡｃα２，３Ｇａｌβ１，４（Ｆｕｃα１，３）ＧｌｃＮＡｃβ１，６］ＧａｌＮＡｃであろう。

【０７４５】

α１，２－およびα１，３／４－フコシダーゼの基質特異性を、合成オリゴ糖の混合物を用いて試験した。これらのコントロール糖はα１，２－結合またはα１，３／４－結合したフコース残基を有していた。α１，２－フコシダーゼはα１，２－結合フコースを開裂し、α１，３／４－結合フコース残基を無傷のまま残した。α１，３／４－フコシダーゼは基質としてα１，３／４－結合フコースを用いて全く異なって作用し、α１，２－結合フコースは無傷のまま残した。

【０７４６】

パーメチル化Ｏ－グリカン構造のフラグメンテーション分析

ｍ／ｚ　８７９．５０　（ＮｅｕＡｃＨｅｘＨｅｘＮＡｃ）は、フラグメント：B_1（ｍ／ｚ　３７５．９２、H^{+}付加イオンを伴う）、C_2（ｍ／ｚ　６２０．１８、Na^{+}付加イオンを伴う）およびY_2（ｍ／ｚ　５０４．０９、Na^{+}付加イオンを伴う）を生じ、コア１　Ｏ－グリカン構造ＮｅｕＡｃα２，３／６Ｇａｌβ１，３ＧａｌＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７４７】

ｍ／ｚ　１２４０．６３（ＮｅｕＡｃ２ＨｅｘＨｅｘＮＡｃ）は、フラグメント：$B_{1\alpha}$または$B_{1\beta}$（ｍ／ｚ　３７５，８８、H^{+}付加イオンを伴う）、$Y_{2\alpha}$／$Y_{2\beta}$（ｍ／ｚ　４８９．９２、Na^{+}付加イオンを伴う）、$C_{2\alpha}$（ｍ／ｚ　６２０．０１、Na^{+}付加イオンを伴う）、$Z_{1\alpha}$（ｍ／ｚ　６４３．０３、Na^{+}付加イオンを伴う）、$Y_{1\alpha}$（ｍ／ｚ　６６０．９６、Na^{+}付加イオンを伴う）および$Y_{2\alpha}$または$Y_{1\beta}$（ｍ／ｚ　８６５．１７、Na^{+}付加イオンを伴う）を生じ、コア１　Ｏ－グリカン構造ＮｅｕＡｃα２，３／６Ｇａｌβ１，３（ＮｅｕＡｃα２，６）ＧａｌＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７４８】

ｍ／ｚ　１３２８．７１（ＮｅｕＡｃＨｅｘ２ＨｅｘＮＡｃ２）は、フラグメント：$B_{1\alpha}$または$B_{1\beta}$（ｍ／ｚ　３７５．８７、H^{+}付加イオンを伴う）、$C_{2\alpha}$または$C_{2\beta}$（ｍ／ｚ　６１９．９５、Na^{+}付加イオンを伴う）、$Z_{2\alpha}$または$Z_{1\beta}$（ｍ／ｚ　７３１．０８、Na^{+}付加イオンを伴う）、$Y_{2\alpha}$または$Y_{1\beta}$（ｍ／ｚ　７４９．０６、Na^{+}付加イオンを伴う）、$Y_{1\alpha}$または$C_{3\alpha}$（ｍ／ｚ　８６５．０１、Na^{+}付加イオンを伴う）および$Y_{3\alpha}$または$Y_{2\beta}$（ｍ／ｚ　９５３．２４、Na^{+}付加イオンを伴う）を生じ、コア２　Ｏ－グリカン構造ＮｅｕＡｃα２，３／６Ｇａｌβ１、３（Ｇａｌβ１，３／４ＧｌｃＮＡｃβ１，６）ＧａｌＮＡｃまたはＧａｌβ１，３（ＮｅｕＡｃα２，３／６Ｇａｌβ１，３／４ＧｌｃＮＡｃβ１，６）ＧａｌＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７４９】

ｍ／ｚ　１６８９．８６（ＮｅｕＡｃ２Ｈｅｘ２ＨｅｘＮＡｃ２）は、フラグメント：$B_{1\alpha}$または$B_{1\beta}$（ｍ／ｚ　３７５．７５、H^{+}付加イオンを伴う）、$Z_{3\alpha}$／$Z_{1\alpha}$または$Z_{2\beta}$／$Z_{1\alpha}$（ｍ／ｚ　４７１．６８、Na^{+}付加イオンを伴う）、$Y_{2\alpha}$／Ｙ

$_{1\beta}$（ｍ／ｚ　５３０．６４、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）、$C_{2\alpha}$／$C_{2\beta}$（ｍ／ｚ　６１９．８６、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）、$Z_{3\alpha}$／$Z_{1\beta}$または$Z_{2\alpha}$／$Z_{2\beta}$（ｍ／ｚ　７１６．７７、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）、$C_{3\alpha}$／$Y_{1\alpha}$（ｍ／ｚ　８６４．９５、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）、$Y_{3\alpha}$／$Y_{2\beta}$（ｍ／ｚ　９３９．４８、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）、$Z_{1\beta}$／$Z_{2\alpha}$（ｍ／ｚ　１０９２．１６、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）および$Y_{3\alpha}$／$Y_{2\beta}$（ｍ／ｚ　１３１４．７１、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）を生じ、コア２Ｏ－グリカン構造ＮｅｕＡｃα２，３／６Ｇａｌβ１，３（ＮｅｕＡｃα２，３／６Ｇａｌβ１，３／４ＧｌｃＮＡｃβ１，６）ＧａｌＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７５０】

決定されたＯ－グリカン構造

エキソグリコシダーゼのデータおよびフラグメンテーションデータをＯ－グリカンコア構造の一般的な知識と合わせると、分析したＵＣＢ－ＭＳＣ細胞系統における主要な酸性Ｏ－グリカン構造は次の通りである：ｍ／ｚ　６７３．２３　［Ｍ－Ｈ］$^{-}$＝ＮｅｕＡｃα２，３Ｇａｌβ１，３ＧａｌＮＡｃ、ｍ／ｚ　９６４．３３　［Ｍ－Ｈ］$^{-}$　＝　ＮｅｕＡｃα２，３Ｇａｌβ１，３（ＮｅｕＡｃα２，６）ＧｌｃＮＡｃ、ｍ／ｚ　１０３８．３６　［Ｍ－Ｈ］$^{-}$　＝　ＮｅｕＡｃα２，３Ｇａｌβ１，３（Ｇａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃβ１，６）ＧａｌＮＡｃまたはＧａｌβ１，３（ＮｅｕＡｃα２，３Ｇａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃβ１，６）ＧａｌＮＡｃ、およびｍ／ｚ　１３２９．４６　［Ｍ－Ｈ］$^{-}$　＝　ＮｅｕＡｃα２，３Ｇａｌβ１，３（ＮｅｕＡｃα２，３Ｇａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃβ１，６）ＧａｌＮＡｃ。

【０７５１】

エキソグリコシダーゼのデータによると、より少量の酸性Ｏ－グリカン構造の１つは次の通りである：ｍ／ｚ　１４７５．４４　［Ｍ－Ｈ］$^{-}$　＝　ＮｅｕＡｃα２，３Ｇａｌβ１，３［ＮｅｕＡｃα２，３Ｇａｌβ１，４（Ｆｕｃα１，３）ＧｌｃＮＡｃβ１，６］ＧａｌＮＡｃ。

【０７５２】

まとめると、コア１およびコア２が主要な検出されたＯ－グリカンコアであり、フコシル化は優先的には酸性および中性画分における、それぞれコア２シアリルＬｅｗｉｓ　ｘエピトープおよびコア２Ｌｅｗｉｓ　ｘエピトープとして生ずる。硫酸化／リン酸化グリカンも検出され、Ｎ－グリカンに対する類似性によりそれらは硫酸エステルに割り当てられた。コア２およびより大型のＯ－グリカンに検出された全てのシアル酸はα２，３－結合しており、全ての分析されたコア２分岐ガラクトース残基はβ１，４－結合していた。

【実施例２３】

【０７５３】

臍帯血ＭＳＣのパーメチル化Ｎ－グリカン構造のフラグメンテーション分析

Ｎ－グリカンを、臍帯血由来ＭＳＣおよびそれらから脂肪細胞方向に分化した細胞ならびに骨髄由来ＭＳＣおよびそれらから骨芽細胞方向に分化した細胞からのパーメチル化グリカンとしてＭＳ／ＭＳ分析し、結果を先の実施例に記載するように示す。

【０７５４】

脂肪細胞分化ＭＳＣの脱シアル化全Ｎ－グリカン

ｍ／ｚ　１８６５．７８（Ｈｅｘ４ＨｅｘＮＡｃ４）は、フラグメント：Y_{1}（ｍ／ｚ　２９９．６６、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）、Y_{2}（ｍ／ｚ　５４４．６６、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）、$B_{2\alpha}$（ｍ／ｚ　４８５．６８、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）、$Y_{3\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　７３４．７８、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）、$B_{5\alpha}$／$Y_{4\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　８６５．６７、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）、$B_{3\beta}$／$Y_{4\alpha}$（ｍ／ｚ　８７９．２４、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）、$B_{3\beta}$／$Y_{5\alpha}$（ｍ／ｚ　１１２４．８、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）、$Y_{4\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　１１４２．６、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）、$B_{4\alpha}$（ｍ／ｚ　１３４３．９、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）、$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　１４０２．３３、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）を生じ、構造Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅ

ｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＧａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３－（ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－６）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７５５】

ｍ／ｚ　１８２４．７６（Ｈｅｘ５ＨｅｘＮＡｃ３）は、フラグメント：Y_1（ｍ／ｚ　２９９．７２、Na^+付加イオンを伴う）、$B_{2\alpha}$（ｍ／ｚ　４８５．７４、Na^+付加イオンを伴う）、$B_{5\alpha}$／$Y_{4\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　６６１．６１、Na^+付加イオンを伴う）、$Y_{3\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　７３４．８、Na^+付加イオンを伴う）、$B_{4\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　１０８３．３８、Na^+付加イオンを伴う）、$B_{4\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　１３６０．９５、Na^+付加イオンを伴う）を生じ、構造Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＧａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３（Ｍａｎα１－３／６Ｍａｎα１－６）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７５６】

ｍ／ｚ　１７９４．７５（Ｈｅｘ４ＨｅｘＮＡｃ３ｄＨｅｘ１）は、フラグメント：Ｉ；Y_1（ｍ／ｚ　４７３．９５９、Na^+付加イオンを伴う）、B_4／Y_4（ｍ／ｚ　６３５．１３、Na^+付加イオンを伴う）、$B_{3\beta}$／$Y_{3\alpha}$（ｍ／ｚ　６７５．８９、Na^+付加イオンを伴う）、$B_{4\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　８８０．１１、Na^+付加イオンを伴う）、$B_{5\alpha}$（ｍ／ｚ　１３４３．５６、Na^+付加イオンを伴う）を生じ、構造Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＧａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３－（Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４（Ｆｕｃα１－６）ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。ＩＩ；Ｙ１（ｍ／ｚ　２９９．８６、Na^+付加イオンを伴う）、Ｙ２（ｍ／ｚ　５４４．８７、Na^+付加イオンを伴う）、Ｂ４／Ｙ４（ｍ／ｚ　６３５．１３、Na^+付加イオンを伴う）、Ｂ２α（ｍ／ｚ　６６１．９７、Na^+付加イオンを伴う）、Ｂ３β／Ｙ３α　６７５．８９、Na^+付加イオンを伴う）、Ｙ３α／Ｙ３β（ｍ／ｚ　７３４．９８、Na^+付加イオンを伴う）、Ｂ３α（ｍ／ｚ　８６５．９９、Na^+付加イオンを伴う）、Ｙ３α（ｍ／ｚ　９５３．１６、Na^+付加イオンを伴う）を生じ、構造Ｈｅｘ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＧａｌβ１－３／４（Ｆｕｃα１－２／３／４－）ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３－（Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７５７】

ｍ／ｚ　２４１８．０３（Ｈｅｘ５ＨｅｘＮＡｃ４ｄＨｅｘ２）は、フラグメント：Y_1（ｍ／ｚ　４７３．５７、Na^+付加イオンを伴う）、$B_{2\beta}$（ｍ／ｚ　４８５．６、Na^+付加イオンを伴う）、$B_{3\beta}$（ｍ／ｚ　６８９．６、Na^+付加イオンを伴う）、$B_{2\alpha}$（ｍ／ｚ　６５９．６８、Na^+付加イオンを伴う）、$B_{4\alpha}$／$B_{4\beta}$／$Y_{4\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　６２０．３８、Na^+付加イオンを伴う）、$B_{5\alpha}$／$Y_{4\alpha}$／$Y_{4\beta}$または$B_{3\alpha}$（ｍ／ｚ　８６５．７４、Na^+付加イオンを伴う）、Ｙ４α／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　１３１６．３８、Na^+付加イオンを伴う）、$Y_{3\alpha}$（ｍ／ｚ　１７７９．３２、Na^+付加イオンを伴う）を生じ、構造Ｈｅｘ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＧａｌβ１－３／４（Ｆｕｃα１－３／４）ＧｌｃＮＡｃβ１－２（Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４（Ｆｕｃα１－６－）ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７５８】

m／z ３１４２．４３（Ｈｅｘ７ＨｅｘＮＡｃ６ｄＨｅｘ１）は、フラグメント：Y_1（m／z ４７３）、$B_{2\alpha}$／$B_{2\beta}$（m／z ４８５．５６）、$B_{4\alpha}$／$B_{4\beta}$（m／z ９３４．７２）、$Y_{4\alpha}$／$Y_{3\beta}$（m／z １１１２．４１）、$Y_{3\alpha}$／$Y_{6\beta}$（m／z １５６１．２７）、$Y_{3\alpha}$（m／z ２０２５．３）、$Y_{4\alpha}$（m／z ２２２８．９３）、$Y_{6\alpha}$（m／z ２６７９．２７）を生じ、構造Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＧａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３（Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－６）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４（Ｆｕｃα１－６）ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７５９】

m／z １３４５．５８（Ｈｅｘ３ＨｅｘＮＡｃ２ｄＨｅｘ１）は、フラグメント：Y_1（m／z ４７３．９）、B_2（m／z ６４８．９５）、C_2（６６６．９）、B_3（８９４．０８）、$Y_{3\alpha}$（m／z １１２７．３）を生じ、構造Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮＡｃに相当し、恐らく構造Ｍａｎα１－３（Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃ１－４（Ｆｕｃα１－６－）ＧｌｃＮＡｃに相当する。

【０７６０】

m／z １６２０．６９（Ｈｅｘ４ＨｅｘＮＡｃ３）は、フラグメント：Y_1（m／z ２９９．８３）、$B_{2\alpha}$（m／z ４８５．８）、Y_2（m／z ５４４．６８）、$B_{5\alpha}$／$Y_{4\alpha}$／$Y_{3\beta}$（m／z ６６１．７４）、$B_{3\alpha}$（m／z ６８９．９２）、$Y_{3\alpha}$／$Y_{3\beta}$（m／z ７３４．４）、$B_{4\alpha}$／$Y_{3\beta}$（m／z ８７９．７５）、$Y_{3\alpha}$（m／z ９５２．２４）、$Y_{4\alpha}$（m／z １１５７．２５）、$Y_{5\alpha}$（m／z １４０２．２９）、$B_{3\beta}$／$Y_{3\alpha}$（m／z ６７５．４９）を生じ、構造Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－ＨｅｘＮＡｃに相当し、恐らく構造Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３（Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃに相当する。

【０７６１】

m／z ９６７．４５（Ｈｅｘ２ＨｅｘＮＡｃ２）は、フラグメント：Y_1（m／z ２９９．８８）、B_2（m／z ４４４．４８）、B_3／Y_3（m／z ４７１．７８）、B_3（m／z ６９０．１２）、Y_3（m／z ７４９．０５）、C_2（m／z ４６２．９５）を生じ、構造Ｈｅｘ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－ＨｅｘＮＡｃに相当し、恐らく直鎖構造Ｍａｎα１－３Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃに相当する。

【０７６２】

m／z １１７１．６１（Ｈｅｘ３ＨｅｘＮＡｃ２）は、フラグメント：Y_1（m／z ２９９．８７）、B_3／$Y_{3\alpha}$／$Y_{3\beta}$（m／z ４５７．７７）、Y_2（m／z ５４４．９９）、B_3（m／z ８９４．２９）、B_3／Y_3（m／z ６７６）$Y_{3\alpha}$／$Y_{3\beta}$（７３５）、$Y_{3\beta}$（m／z ９５３．３）を生じ、構造Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－ＨｅｘＮＡｃに相当し、恐らく構造Ｍａｎα１－３（Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃに相当する。

【０７６３】

臍帯血由来ＭＳＣの脱シアル化全Ｎ－グリカン

m／z ２６９３．２（Ｈｅｘ６ＨｅｘＮＡｃ５ｄＨｅｘ１）は、フラグメント：Ｉ；Y_1（m／z ４７４）、$B_{2\alpha}$（m／z ４８５．５３）、$Y_{6\alpha}$／$Y_{4\beta}$（m／z １７６６．６８）、$Y_{4\alpha}$（m／z １７８１．４１）であって、構造Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮＡｃに相当し、恐らく構造Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｍａｎα１－３（Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｍａｎα１－６）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡ

ｃβ１－４（Ｆｕｃα１－６－）ＧｌｃＮＡｃに相当するものと、ＩＩ；$Ｂ_{2β}$（ｍ／ｚ　４８５．５３）、$Ｂ_{2α}$（ｍ／ｚ　６６１．６６）、$Ｙ_{4α}$（ｍ／ｚ　２２３０．２３）であって、構造Ｈｅｘ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＧａｌβ１－３／４（Ｆｕｃα１－２／３／４－）ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３（Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃ－β１－４ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当するものと、を生じた。

【０７６４】

ｍ／ｚ　２２４３．９７（Ｈｅｘ５ＨｅｘＮＡｃ４ｄＨｅｘ１）は、フラグメント：Ｉ；$Ｙ_{1}$（ｍ／ｚ　４７３．５８）、$Ｂ_{2α}$／$Ｂ_{2β}$（ｍ／ｚ　４８５．７１）、$Ｂ_{5}$／$Ｙ_{5α}$／$Ｙ_{5β}$（ｍ／ｚ　８６５．８）　$Ｙ_{4α}$／$Ｙ_{3β}$（ｍ／ｚ　１１１２．８４）　$Ｙ_{4α}$／$Ｙ_{4β}$（ｍ／ｚ　１３１６．９９）であって、構造Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＧａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３（Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４（Ｆｕｃα１－６－）ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当するものと、ＩＩ；$Ｂ_{2β}$（ｍ／ｚ　４８５．７１）、$Ｙ_{2}$（ｍ／ｚ　５４４．８）、$Ｂ_{2α}$（ｍ／ｚ　６６１．３９）、$Ｙ_{3α}$／$Ｙ_{3β}$（ｍ／ｚ　７３４．７７）、$Ｂ_{3α}$（８６５．８）、$Ｙ_{3β}$（ｍ／ｚ　１５７６．２２）、$Ｙ_{4β}$（ｍ／ｚ　１７８０．７）であって、構造Ｈｅｘ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＧａｌβ１－３／４（Ｆｕｃα１－２／３／４－）ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３（Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当するものと、を生じた。

【０７６５】

ｍ／ｚ　３１４２．５６（Ｈｅｘ７ＨｅｘＮＡｃ６ｄＨｅｘ１）は、フラグメント：Ｉ；$Ｂ_{2α}$／$Ｂ_{2β}$（ｍ／ｚ　４８７．３６）、$Ｙ_{5α}$（ｍ／ｚ　２２９７．１５）、$Ｙ_{6β}$（ｍ／ｚ　２６８３．２５）であって、構造Ｈｅｘ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＧａｌβ１－３／４（Ｆｕｃα１－２／３／４－）ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３（Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１．３／４Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当するものと、ＩＩ；$Ｂ_{2α}$／$Ｂ_{2β}$（ｍ／ｚ　４８７．３６）、$Ｙ_{6β}$（ｍ／ｚ　２６８３．２５）であって、構造Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＧａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３（Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４（Ｆｕｃα１－２／３／４－）ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当するものと、を生じた。

【０７６６】

脂肪細胞方向に分化したＵＣＢ間葉系幹細胞とは異なり、ＭＳＣは２つの異性体（ｍ／ｚ　２５３９　Ｈｅｘ７ＨｅｘＮＡｃ６ｄＨｅｘ１）構造を有する。

【０７６７】

ｍ／ｚ　１１７１．６１（Ｈｅｘ３ＨｅｘＮＡｃ２）は、フラグメント：$Ｙ_{1}$（ｍ／ｚ　３００．１２）、$Ｂ_{3}$／$Ｙ_{3α}$／$Ｙ_{3β}$（ｍ／ｚ　４５７．９１）、$Ｙ_{2}$（ｍ／ｚ　５４４．２１）、$Ｂ_{3}$（ｍ／ｚ　８９４．４１）を生じ、構造Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ

－ＨｅｘＮＡｃ－ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＭａｎα１－３（Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７６８】

骨芽細胞分化ＭＳＣの脱シアル化全Ｎ－グリカン

ｍ／ｚ　２１５６．１５（ＮｅｕＡｃＨｅｘ４ＨｅｘＮＡｃ３ｄＨｅｘ１）は、フラグメント：$B_{1\alpha}$（ｍ／ｚ　３７５．９、H^{+}付加イオンを伴う）、$B_{3\alpha}$／$Y_{6\alpha}$（ｍ／ｚ　４７１．９７）、$B_{3\alpha}$（ｍ／ｚ　８４７．２７）、$B_{5\alpha}$／$Y_{6\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　８６６．０８）、$Y_{4\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　１３３１．３１）、$Y_{6\alpha}$（ｍ／ｚ　１７８０．２５）を生じ、構造ＮｅｕＡｃ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－）－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮａｃに相当し、さらにＮｅｕＡｃα１－２／３／６Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３（Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４（ＦｕｃＡ１－６）ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７６９】

骨芽細胞に分化したＢＭ　ＭＳＣ、中性Ｎ－グリカン、質量は特に断りの無い限り、Na^{+}付加イオンを伴う

ｍ／ｚ　２０７０．０３（Ｈｅｘ５ＨｅｘＮＡｃ４）は、フラグメント：Y_{2}（ｍ／ｚ　５４４．８）、$B_{2\alpha}$／$B_{2\beta}$（ｍ／ｚ　４８５．９５）、$B_{5\alpha}$／Ｙ３α／Ｙ４β（ｍ／ｚ　６６２．０５）、$Y_{4\alpha}$（ｍ／ｚ　９３８．９９）、B_{5}／$Y_{4\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　８６６．１６）、$Y_{4\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　１１４３．５１）、$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　１４０２．６５）、$Y_{4\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　１６０７．４４）を生じ、構造Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＧａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３－（Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７７０】

ｍ／ｚ　１６２０．６９（Ｈｅｘ４ＨｅｘＮＡｃ３）は、フラグメント：Y_{1}（ｍ／ｚ　２９９．８９）、$B_{2\alpha}$（ｍ／ｚ　４８５．８９）、Y_{2}（ｍ／ｚ　５４４．８３）、B_{5}／$Y_{4\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　６６１．７１）、$Y_{3\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　７３４．９５）、$B_{4\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　８７９．９９）、$Y_{3\alpha}$（ｍ／ｚ　９５２．５４）、$Y_{4\alpha}$（ｍ／ｚ　１１５７．１８）、$B_{3\beta}$／$Y_{3\alpha}$（ｍ／ｚ　６７５．９６）、$B_{4\alpha}$／$Y_{4\alpha}$（ｍ／ｚ　６３４．９３）、$B_{5\alpha}$／$Y_{3\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　４５７．８７）を生じ、構造Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＧａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３（Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７７１】

ｍ／ｚ　２２４５．１４（Ｈｅｘ５ＨｅｘＮＡｃ４ｄＨｅｘ１）は、フラグメント：Ｉ；Y_{1}（ｍ／ｚ　４７４．１７）、$B_{5\alpha}$／$Y_{3\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　６６２．３９）、Y_{2}（ｍ／ｚ　７１９．２８）、$B_{5\alpha}$／$Y_{4\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　８６６．５４）、$Y_{4\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　１３１８）、$B_{2\alpha}$／$B_{2\beta}$（ｍ／ｚ　４８６．２８）、$Y_{4\alpha}$（ｍ／ｚ　１７８２．０３）であって、構造Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＧａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３（Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４（ＦｕｃＡ１－６－）ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当するものと、ＩＩ；Y_{2}（ｍ／ｚ　５４５．１３）、$B_{2\alpha}$／$B_{2\beta}$（ｍ／ｚ　４８６．２８）、$B_{5\alpha}$／$Y_{3\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　６６２．３９）、$B_{2\alpha}$（ｍ／ｚ　６６０）、$B_{5\alpha}$／$Y_{4\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　８６６．５４）、$Y_{4\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　１１４３）であって、構

造Ｈｅｘ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＧａｌβ１－３／４（Ｆｕｃα１－２／３／４－）ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３（Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当するものと、を生じた。

【０７７２】

骨芽細胞に分化したＢＭ　ＭＳＣ、酸性Ｎ－グリカン、全ｍ／ｚは特に断りの無い限り（Ｍ＋Ｎａ$^{+}$）として示される

ｍ／ｚ　１９８１．９９（ＮｅｕＡｃ１Ｈｅｘ４ＨｅｘＮＡｃ３）は、フラグメント：Y_{2}（ｍ／ｚ　５４４．９２）、$B_{4\alpha}$／$Y_{6\alpha}$（ｍ／ｚ　６７５．９３）、$B_{5\alpha}$／$Y_{4\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　４１６．９９）、B_{5}／Y_{5}／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　６６１．９５）、$B_{3\alpha}$（ｍ／ｚ　８４６．７４）、Y_{4}、（ｍ／ｚ　１１５７．４１）、Y_{6}（ｍ／ｚ　１６０６．９８）、$B_{1\alpha}$（ｍ／ｚ　３７５．９５、Ｈ$^{+}$付加イオンを伴う；ｍ／ｚ　３９７．８２、Ｎａ$^{+}$付加イオンを伴う）、$B_{3\alpha}$／$Y_{6\alpha}$（ｍ／ｚ　４７１．９１）を生じ、構造ＮｅｕＡｃ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＮｅｕＡｃα１－２／３／６Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３（Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７７３】

ｍ／ｚ　３０５４．５９（ＮｅｕＡｃＨｅｘ６ＨｅｘＮＡｃ５ｄＨｅｘ１）は、フラグメント：$B_{1\beta}$（ｍ／ｚ　３７６．９６、Ｈ$^{+}$付加イオンを伴う）、$B_{3\beta}$／$Y_{6\beta}$（ｍ／ｚ　４７２．９８）、$B_{3\beta}$（ｍ／ｚ　８４８．３９）、$Y_{4\alpha}$（ｍ／ｚ　２１４１．６９）、$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　２２３２．７３）、$Y_{6\alpha}$（ｍ／ｚ　２５９４．６）、$Y_{5\beta}$（ｍ／ｚ　２６８２．９２）を生じ、構造Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（ＮｅｕＡｃ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＧａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－３／４Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３（ＮｅｕＡｃα２／３／６Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４（Ｆｕｃα６－）ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７７４】

ｍ／ｚ　１７７７．７９（ＮｅｕＡｃｌＨｅｘ３ＨｅｘＮＡｃ３）は、フラグメント：B_{1}（ｍ／ｚ　３７５．５２、Ｈ$^{+}$付加イオンを伴う）、B_{3}／Y_{6}またはB_{4}／Y_{5}またはB_{6}／Y_{3}（ｍ／ｚ　４７１．８）、B_{4}／Y_{6}（ｍ／ｚ　６７５．６７）、Y_{4}（ｍ／ｚ　９５２．４３）、B_{3}（ｍ／ｚ　８４７．４６）、C_{3}（ｍ／ｚ　８６５．７３）を生じ、構造ＮｅｕＡｃ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＮｅｕＡｃα１－２／３／６Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７７５】

ｍ／ｚ　２６０５．２４（ＮｅｕＡｃＨｅｘ５ＨｅｘＮＡｃ４ｄＨｅｘ１）は、フラグメント：B_{1}（ｍ／ｚ　３７５．８４、Ｈ$^{+}$付加イオンを伴う）、$B_{3\alpha}$／$Y_{6\alpha}$（ｍ／ｚ　４７２）、$B_{5\alpha}$／$Y_{5\alpha}$／Ｙ３β（ｍ／ｚ　６６１．８３）、$B_{3\alpha}$（ｍ／ｚ　８４６．８１）、$B_{5\alpha}$／$Y_{6\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　８６５．６８）、$Y_{4\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　１１１２．７８）、$Y_{4\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　１３１７．１５）、$Y_{5\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　１５７５．６７）、$Y_{5\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　１７８０．５６）、$B_{6\alpha}$（ｍ／ｚ　２１４１．６２）、$Y_{6\alpha}$（ｍ／ｚ　２２３０．４）を生じ、構造ＮｅｕＡｃ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－（ｄＨｅｘ－）ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＮｅｕＡｃα１－２／３／６Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３（Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１

－２Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４（Ｆｕｃα１－６）ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７７６】

ｍ／ｚ　２１８５．９７（ＮｅｕＡｃＨｅｘ５ＨｅｘＮＡｃ３）は、フラグメント：$B_{1\alpha}$（ｍ／ｚ　３７５．９、H^{+}付加イオンを伴う）、$B_{3\alpha}$／$Y_{6\alpha}$（ｍ／ｚ　４７１．８９）、$B_{5\alpha}$／$Y_{5\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　６６１．９）、$B_{4\alpha}$／$Y_{4\alpha}$／$Y_{3\beta}$または$B_{5\alpha}$／$Y_{6\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ　８６６）、$Y_{4\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ　１１４３．１１）、$Y_{4\alpha}$（１３６１．６１）、$Y_{6\alpha}$（ｍ／ｚ　１８１０．６７）を生じ、構造ＮｅｕＡｃ－Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－Ｈｅｘ－（Ｈｅｘ－Ｈｅｘ－）Ｈｅｘ－ＨｅｘＮＡｃ－ＨｅｘＮＡｃに相当し、さらにＮｅｕＡｃα１－２／３／６Ｇａｌβ１－３／４ＧｌｃＮＡｃβ１－２Ｍａｎα１－３（Ｍａｎ－α１－３／６Ｍａｎα１－６－）Ｍａｎβ１－４ＧｌｃＮＡｃβ１－４ＧｌｃＮＡｃと同一の同重体単糖配列を有する構造に相当する。

【０７７７】

ｍ／ｚ　３６０３．０９　（ＮｅｕＡｃ３Ｈｅｘ６ＨｅｘＮＡｃ５）は、フラグメント：$Y_{8\alpha}$または$Y_{6\beta}$（ｍ／ｚ　３７８．２３）、$B_{3\alpha}$／$Y_{8\alpha}$または$B_{3\beta}$／$Y_{6\beta}$（ｍ／ｚ　４７４．４）、$B_{3\alpha}$または$_{B3\beta}$（ｍ／ｚ　８５０．５４）、$Y_{4\beta}$または$Y_{6\alpha}$（ｍ／ｚ　２７８６．０１）を生じ、少なくとも二分岐であって少なくとも１個のＮ－アセチルノイラミン酸残基を両分岐内に有する構造に相当する。

【０７７８】

まとめると、本結果は、特にＭＳＣ　Ｎ－グリカン中およびそれらから分化した細胞中の次の特異的構造：Ｎ－グリカン単分岐コア構造、Ｎ－グリカン二分岐コア構造、ハイブリッド型Ｎ－グリカンコア構造、ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン分岐、三分岐コア構造、非還元ＧｌｃＮＡｃ分岐、シアル化二分岐Ｎ－グリカン非シアル化分岐上の非還元末端Ｌｅｘ、ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミン分岐上の非還元末端Ｌｅｘ、およびＭａｎ－３分岐構造を有する低マンノース型Ｎ－グリカン、に対する直接的な証拠をもたらし、本発明による構造的割当てが上記に示されるような、および／または考察されるような細胞型特異的様式でさらに確認された。

【実施例２４】

【０７７９】

臍帯血ＭＳＣの分化と関連したＮ－グリカンプロファイルにおける変化の差異分析（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ　ａｎａｌｙｓｉｓ）

臍帯血ＭＳＣならびにそれらから１）脂肪細胞、２）骨芽細胞、および３）軟骨細胞方向に分化した細胞を、先の実施例に記載のように、そのＮ－グリカンプロファイルにより分析した。分析の結果を、先の実施例において構築された表２８、２９、および３０に示す。

【０７８０】

結果および結論：

表２８、２９、および３０のそれぞれにおけるより大きなｄｉｆｆ．変数は各分化方向における分化との関連を示し、表２８、２９、および３０のそれぞれにおけるより大きなｄｉｆｆ．変数は各分化方向における分化との関連を示す。前記表中の結果を本発明の他の分析に対して関連付け、分析すると、それらは明瞭な分化株特異的な構造の変化を示しており、それがＮ－グリカンにおける非シアル化末端ＬａｃＮＡｃ発現、低マンノース型Ｎ－グリカン発現、およびＮ－グリカンのコアフコシル化において最も顕著であると結論づけることができる。これらおよびさらなる細胞型特異的な結果をさらに分析し、各種分化系統における細胞型特異的な末端エピトープおよびグリカンコア構造の発現の証拠として表２７に示す。

【実施例２５】

【０７８１】

骨髄由来および臍帯血由来間葉系幹細胞の抗体プロファイリング

実験手順

骨髄由来間葉系幹細胞株（ＢＭ－ＭＳＣ）
ＢＭ－ＭＳＣの単離および培養、ならびにＢＭ－ＭＳＣの骨原性分化を、実施例１に記載されるように行った。
【０７８２】
臍帯血間葉系幹細胞（ＣＢ－ＭＳＣ）の単離および培養
ＣＢ－ＭＳＣの単離および培養を、実施例１の記載のように、ただし一部を改変して行った。ＣＢ－ＭＳＣの骨原性分化をＢＭ－ＭＳＣに対する記載のように１６日間誘導した。
【０７８３】
ＣＢ－ＭＳＣの脂質生成分化
細胞を、ほぼコンフルエントになるまで増殖培地中で増殖させ、その後、１０％ ＦＣＳ、２０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、１ｘペニシリン－ストレプトマイシン、０．１ｍＭ インドメタシン（全てＳｉｇｍａから）、０．５ｍＭ ＩＢＭＸ－２２、０．４μｇ／ｍｌ デキサメタゾンおよび０．５μｇ／ｍｌ インシュリン（３者とも全てＰｒｏｍｏｃｅｌｌから）を添加したα－ＭＥＭ Ｇｌｕｔａｍａｘを含む脂質生成誘導培地を加えた。３日後、１０％ ＦＣＳ、２０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、１ｘペニシリン－ストレプトマイシン、０．１ｍＭ インドメタシン（全てＳｉｇｍａから）、０．５μｇ／ｍｌ インシュリンおよび３，０μｇ／ｍｌ Ｃｉｇｌｉｔａｚｏｎｅ（２者ともＰｒｏｍｏｃｅｌｌから）を添加したα－ＭＥＭ Ｇｌｕｔａｍａｘを含む最終脂質生成分化培地を加え、細胞を１４日間（合わせて１７日間）、５％CO_2、３７℃において培養した。分化培地は分化期間を通じて週２回新しいものに換えた。
【０７８４】
間葉系幹細胞表現型のフローサイトメトリ分析
ＢＭおよびＣＢ由来ＭＳＣの両者をフローサイトメトリ（ＢＤ ＦＡＣＳＡｒｉａ、Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）により表現型分析した。ＣＤ１３、ＣＤ１４、ＣＤ２９、ＣＤ３４、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ４９ｅ、ＣＤ７３、ＣＤ９０、ＨＬＡ－ＤＲおよびＨＬＡ－ＡＢＣ（全てＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから）ならびにＣＤ１０５（Ａｂｃａｍ Ｌｔｄ．）に対するＦＩＴＣ、ＡＰＣまたはＰＥ結合抗体を直接標識のために用いた。小容量の細胞、例えば$5x10^4$細胞／１００μｌの染色のため、０．３％ 超高純度ＢＳＡ、２ｍＭ ＥＤＴＡ－ＰＢＳバッファをＦＡＣＳチューブに分注した。１マイクロリットルの各抗体を細胞に添加し、３０分間、＋４℃でインキュベートした。細胞を２ｍｌのバッファで洗浄し、３００ｘｇで４分間遠心分離した。細胞を２００μｌのフローサイトメトリ分析用バッファに懸濁した。
【０７８５】
抗体染色のための細胞の回収
ＢＭおよびＣＢ－ＭＳＣの両者を、２ｍＭ ＥＤＴＡ－ＰＢＳ溶液（Ｖｅｒｓｅｎｓｅ）、ｐＨ７．４を用い、約３０分間、３７℃で細胞培養プレートから遊離させた。骨原性および脂質生成細胞の両者を、１０ｍＭ ＥＤＴＡ－ＰＢＳ溶液、ｐＨ７．４を用い、３７℃においてそれぞれ３０分間および５分間で遊離させた。分化した細胞は培養プレートからクラスターとして遊離したため、それらをパスツールピペットを用いたピペッティングにより、またはボルテックスにより、および１８ゲージの注射針を通す懸濁により、懸濁し、単細胞懸濁液を得た。最後に、細胞懸濁液を５０μｍフィルタを通して濾過し、未懸濁細胞の凝集体を除去した。回収した細胞を３００ｘｇで４分間遠心分離し、小容量の０．３％超高純度ＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ）、２ｍＭ ＥＤＴＡ－ＰＢＳバッファに対して懸濁した。
【０７８６】
一次抗体染色
ＢＭおよびＣＢ由来細胞をＦＡＣＳチューブに小容量、例えば５ないし$7x10^4$細胞／１００μｌ ０．３％超高純度ＢＳＡ、２ｍＭ ＥＤＴＡ－ＰＢＳバッファで分注した。４マイクロリットルの抗グリカン一次抗体を細胞懸濁液に添加し、ボルテックスし、３

０分間室温でインキュベートした。細胞を２ｍｌのバッファで洗浄し、４分間３００ｘｇで遠心分離し、その後上清を除去した。染色に用いた一次抗体を表２６に列挙する。

【０７８７】

二次抗体染色

ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ　４８８結合抗マウス（１：５００、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）および抗ウサギ（１：５００、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）、ならびにＦＩＴＣ結合抗－ラット（１：３２０、Ｓｉｇｍａ）および抗ヒトλ（１：１０００、Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）二次抗体を、適当な一次抗体に対して用いた。二次抗体を０．３％超高純度ＢＳＡ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ－ＰＢＳバッファ中に希釈し、１００μｌの希釈物を細胞懸濁液に加えた。試料を３０分間室温で暗所にてインキュベートした。細胞を２ｍｌのバッファで洗浄し、４分間３００ｘｇで遠心分離した。上清を除去し、細胞をフローサイトメトリ分析用の２００μｌのバッファ中に懸濁した。ネガティブコントロールとして、細胞を一次抗体無しでインキュベートした以外は標識細胞と同様に処理した。

【０７８８】

フローサイトメトリ分析

蛍光標識された抗体を有する細胞をＢＤ　ＦＡＣＳＡｒｉａ　（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）により、ＦＩＴＣ検出器を波長４８８で用いて分析した。結果をＢＤ　ＦＡＣＳＤｉｖａソフトウェア　バージョン５．０．１（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）により分析した。

【０７８９】

結果および考察

間葉系幹細胞表現型のフローサイトメトリ分析

ＢＭおよびＣＢ－ＭＳＣの両者は造血マーカＣＤ３４、ＣＤ４５およびＣＤ１４に対して陰性であった。細胞はＣＤ１３（アミノペプチダーゼＮ）、ＣＤ２９（β１－インテグリン）、ＣＤ４４（ヒアルロン酸受容体）、ＣＤ７３（ＳＨ３）、ＣＤ９０（Ｔｈｙ－１）、ＣＤ１０５（ＳＨ２／エンドグリン）およびＣＤ４９ｅに対して陽性に染色された。細胞はＨＬＡ－ＡＢＣに対しても陽性に染色されたが、ＨＬＡ－ＤＲに対しては陰性であった。

【０７９０】

ＢＭ－ＭＳＣの抗グリカン抗体プロファイリング

ＢＭ－ＭＳＣおよびその分化した骨原性細胞（ＢＭ－ＯＧ）を、６０種までの抗グリカン抗体を用いてフローサイトメトリにより、および２９種の抗体を用いて免疫組織化学（ＩＨＣ）によっても、分析した。ＢＭ－ＭＳＣ染色の結果を表２６および図２０に示す。

【０７９１】

幹細胞における最も顕著な増加はＳＳＥＡ－４であり、骨原性細胞においてはガングリオ系列アシアロＧＭ１およびアシアロＧＭ２等の一部の糖脂質エピトープ；グロボ系列構造グロボトリアシルセラミドＧｂ３およびグロボシド（ＧＬ４またはＧｂ４）としても知られるグロボテトラオース；ならびにＬｅｗｉｓ　ａおよびシアル化Ｃａ１５－３である。

【０７９２】

Ｌｅｗｉｓ　ｘ構造は、５種の異なる抗Ｌｅｘ抗体を用いた染色に基づくと、ＭＳＣの調製物中のＭＳＣの大部分または分化した細胞において、ＦＡＣＳ分析条件下で検出水準を超える量では存在しないようである。しかし、特異的抗Ｌｅｗｉｓ　ｘクローンにより認識され得る特定のＬｅｗｉｓ　ｘ発現が存在する。一方、シアリルＬｅｗｉｓ　ｘ構造は両幹細胞上および骨原性細胞内に存在し、割合は異なる抗ｓＬｅｘ抗体間で相違しており、これに対して最も考えられる原因はｓＬｅｘエピトープに対する異なる担体である。例えばＧＦ５２６抗ｓＬｅｘ抗体は特定のＯ－グリカンコアＩＩ構造が有するｓＬｅｘエピトープのみを認識する。ＧＦ５２６の結合は、特定の非幹細胞材料上の多量のＯ－グリカンを事実上代表するＰ－セレクチンリガンド糖タンパク質ＰＳＧＬ－１と関連することが確認されている。しかし、コアＩＩ　Ｏ－グリカンはいくつかのムチン型Ｏ－グリカン

上で報告されており、本発明は間葉系幹細胞上におけるＰＳＧＬ－１上のコアＩＩ　ｓＬｅｘの分析に限定されないと理解される。他の２つの抗ｓＬｅｘ抗体（ＧＦ５１６およびＧＦ３０７）に認識されるｓＬｅｘの担体および正確な結合エピトープは、β３Ｇａｌ伸長を有するポリラクトサミンを含むコア２とは異なる最適微細特異性を有するコアＩＩ以外の構造を含むようである。抗体は異なるサイズの、異なる微細およびコア／担体グリカン特異性細胞集団を伴う。

【０７９３】

ＣＢ－ＭＳＣの抗グリカン抗体プロファイリング

ＣＢ－ＭＳＣならびにその分化した骨原性および脂肪細胞を６１種までの各種抗グリカン抗体を用いてフローサイトメトリにより分析した。ＣＢ－ＭＳＣ染色の結果を表２７および図２１に示す。同様にＢＭ由来抗体プロファイリングにおいては、ＣＢ－ＭＳＣまたは骨原性もしくは脂肪細胞系統に分化した細胞を決定する特異的グリカンエピトープは１つも存在しないようである。一部のグリカン、例えばＨ二糖（ＧＦ３９４）、ＴＦ（ＧＦ２８１）、グリコデリン（ＧＦ３７５）、Ｌｅｗｉｓ　ｘ（ＧＦ５１７）およびＧａｌα３Ｇａｌ（ＧＦ４１３）はＣＢ由来ＭＳＣにおいて高度に豊富であるが、全幹細胞集団におけるその割合はむしろ低い（１０％以下）。興味深いことに、幹細胞および脂肪細胞においては豊富であるが骨原性細胞においては豊富でないグリカン、例えばＳＳＥＡ－４（ＧＦ３５４）、Ｌｅｗｉｓ　ｃ（ＧＦ２９５）、ＳＳＥＡ－３（ＶＰＵ００９）、ＧＤ２（ＧＦ４０６）、シアリルＬｅｗｉｓ　ｘ（ＧＦ３０７）およびＴｒａ－１－６０（ＧＦ４１５）も存在するようである。ＢＭ由来細胞は脂肪細胞方向に分化しなかったため、異なる供給源からの異なる脂肪細胞間でデータの比較を行うことはできない。骨原性分化はＢＭおよびＣＢ由来細胞の両者において類似したグリカンの増加を誘導する。ＢＭ由来骨原性細胞において増加するＧｂ３のみがＣＢ由来骨原性細胞において増加しない。さらに、ＢＭ由来細胞では試験しなかったガングリオシドＧＴ１ｂ、ＧＤ２、ＧＤ３およびＡ２Ｂ５はＣＢ由来骨原性細胞において高度に豊富である。実施例の特異的抗体により明らかになった、ＣＢ由来骨原性細胞中に豊富なグリカンエピトープのほとんどは、ＣＢ由来脂肪細胞中においても豊富である（より高い割合でさえある）が、本発明は、これらの標的についても細胞型間で発現量の相違が存在し、両分化系統の特徴付けが可能であることを明らかにする。分化後のグリカンエピトープの興味深い群の一つはガングリオシドに対する公知の抗体によって認識され得るグリカンエピトープであり一般に幹細胞（＜１０％）から骨芽細胞および脂肪細胞（５０ないし１００％）へと増加する。ＢＭ由来ＭＳＣとは異なり、ＣＢ由来細胞においては抗Ｌｅｗｉｓ　ｘ抗体ＧＦ５１７およびＧＦ５２５によるある程度の陽性が存在するようである。抗シアリルＬｅｗｉｓ　ｘ抗体を用いた結果は両細胞型で類似する。

［表］

【０７９４】

［表１］

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析プロファイリングにより分析された、骨髄間葉系幹細胞（ＭＳＣ）と骨芽細胞に分化した細胞（ＯＢ）とにおける酸性Ｎ－グリカンシグナルの異なる発現。データは５つの分析された細胞株の平均である。シグナル強度の相対的変化（ｒｅｌａｔ．）および絶対的変化（ｄｉｆｆ．）（全プロファイルの％）を示す。組成記号：Ｓ、Ｎ－アセチルノイラミン酸；Ｇ、Ｎ－グリコリルノイラミン酸；Ｈ、ヘキソース；Ｎ、Ｎ－アセチルヘキソサミン；Ｆ、デオキシヘキソース；Ｐ、硫酸またはリン酸エステル；Ａ、アセチルエステル。構造記号：Ａ、酸性グリカン；Ｓｘ、ｘ　シアル酸基；Ｍ、高マンノース型；Ｌ、低マンノース型；Ｓ、可溶性グリカン；Ｈ、ハイブリッド型；Ｃ、複合型；Ｎ、単分岐；Ｂ、二分岐サイズ；Ｒ、大型複合型；Ｆ、１個のフコース；Ｅ、多フコシル化；Ｐ、硫酸化またはリン酸化；Ｔ／Ｑ、末端Ｎ－アセチルヘキソサミン；Ｘ、末端ヘキソース；Ｔ、Ｎｅｕ５Ｇｃ；Ａ、アセチル化。シグナルはサブタイトルに示すように、ＭＳＣにおけるＯＢと比較した相対発現量（ｒｅｌａｔ．）により並べられている。

【０７９５】
【表１－１】

組成	構造								m/z	MSC	OB	relat.	diff.
OBにおいて検出されない：													
S2H5N3F2P1	A	S2	H		E	P			2390	0,62	0,00	∞	0,62
S1H6N5F4	A	S1	C	R	E				2880	0,27	0,00	∞	0,27
S1H5N5	A	S1	C				Q		2133	0,20	0,00	∞	0,20
S2H3N3F1	A	S2	H	N	F				1840	0,13	0,00	∞	0,13
H5N3F2P1	A		H		E	P			1808	0,11	0,00	∞	0,11
S1H4N5	A	S1	C				T		1971	0,11	0,00	∞	0,11
S1H8N7	A	S1	C	R					3026	0,11	0,00	∞	0,11
S2H5N3F1	A	S2	H		F				2164	0,09	0,00	∞	0,09
S3H7N6F3	A	S3	C	R	E				3681	0,08	0,00	∞	0,08
S2H4N2F1	A	S2	O		F				1799	0,07	0,00	∞	0,07
S1H11N10	A	S1	C	R					4121	0,06	0,00	∞	0,06
S2H4N3	A	S2	H	N					1856	0,06	0,00	∞	0,06
S3H7N6F4	A	S3	C	R	E				3827	0,06	0,00	∞	0,06
S2H2N2	A	S2	O						1329	0,06	0,00	∞	0,06
S1H4N3F3	A	S1	H	N	E				2003	0,06	0,00	∞	0,06
S2H5N5	A	S2	C				Q		2424	0,05	0,00	∞	0,05
S2H3N5F2	A	S2	C		E		T		2392	0,05	0,00	∞	0,05
G1H3N2	A	S1	O					Y	1216	0,05	0,00	∞	0,05
S3H6N4F1P1	A	S3	C		F	P	X		2900	0,04	0,00	∞	0,04
G1H4N3	A	S1	H	N				Y	1581	0,04	0,00	∞	0,04
S1H7N6F5	A	S1	C	R	E				3391	0,04	0,00	∞	0,04
S1H3N4	A	S1	C				T		1606	0,04	0,00	∞	0,04
S2H4N4	A	S2	C				Q		2059	0,04	0,00	∞	0,04
S1H5N4F4	A	S1	C	B	E				2514	0,03	0,00	∞	0,03
S2H3N4F2	A	S2	C		E		T		2189	0,03	0,00	∞	0,03
S1H7N6F4	A	S1	C	R	E				3245	0,02	0,00	∞	0,02
S2H3N3	A	S2	O						1694	0,02	0,00	∞	0,02
S1H4N4F2	A	S1	C		E		Q		2060	0,02	0,00	∞	0,02
G1H5N3	A	S1	H					Y	1743	0,02	0,00	∞	0,02
S1H8N7F3	A	S1	C	R	E				3464	0,02	0,00	∞	0,02
MSCにおいて2倍超過剰発現する：													
S1H8N7F1	A	S1	C	R	F				3172	0,49	0,03	14,52	0,46
S1H7N6F3	A	S1	C	R	E				3099	0,80	0,10	8,16	0,71
S1H4N2	A	S1	O						1362	2,39	0,43	5,50	1,95
S1H2N2	A	S1	O						1038	0,11	0,02	4,92	0,09
S3H8N7F1	A	S3	C	R	F				3754	0,06	0,01	4,48	0,05
H4N2P1	A		L			P			1151	0,07	0,02	3,94	0,05
S1H7N5F1A1	A	S1	C		F		X		2645	0,11	0,03	3,70	0,08

表1は次頁につづく

【０７９６】

【表１－２】

S1H4N3F1P1	A	S1	H	N	F	P			1791	0,11	0,04	2,88	0,07
S2H3N2F1	A	S2	O		F				1637	0,08	0,03	2,84	0,05
S1H6N5F3	A	S1	C	R	E				2733	0,96	0,37	2,60	0,59
S2H6N3F1P1	A	S2	H		F	P			2406	0,67	0,26	2,60	0,41
S1H4N4	A	S1	C				Q		1768	1,29	0,50	2,60	0,80
S2H7N6F3	A	S2	C	R	E				3390	0,47	0,19	2,46	0,28
S2H2N3F1	A	S2	O		F				1678	1,60	0,66	2,44	0,95
S1H7N6F1	A	S1	C	R	F				2807	2,67	1,22	2,20	1,46
S1H7N6F2	A	S1	C	R	E				2953	0,06	0,03	2,15	0,03
S2H4N3F1	A	S2	H	N	F				2002	0,31	0,15	2,07	0,16
S1H7N3	A	S1	H						2051	0,09	0,04	2,03	0,05
S1H4N3	A	S1	H	N					1565	2,70	1,33	2,03	1,36
MSCにおける1.5倍超の過剰発現：													
H3N6F3P1	A		C		E	P	T		2239	0,27	0,15	1,77	0,12
S1H5N2	A	S1	O						1524	0,04	0,02	1,75	0,02
S3H6N5F1	A	S3	C	R	F				3024	0,32	0,19	1,70	0,13
S2H5N4F1	A	S2	C	B	F				2367	5,31	3,13	1,70	2,19
S2H7N6F4	A	S2	C	R	E				3536	0,06	0,04	1,61	0,02
S2H6N5F1	A	S2	C	R	F				2732	1,84	1,16	1,58	0,68
S1H5N5F1	A	S1	C		F		Q		2279	0,61	0,40	1,55	0,22
S1H6N5F1	A	S1	C	R	F				2441	7,44	4,89	1,52	2,55
S2H7N6	A	S2	C	R					2952	0,18	0,12	1,50	0,06
MSCにおける1.5倍未満の過剰発現：													
S2H5N4F2	A	S2	C	B	E				2513	0,07	0,05	1,47	0,02
S1H7N5	A	S1	C				X		2457	0,07	0,05	1,43	0,02
G1S2H5N4F1	A	S3	C	B	F			Y	2674	0,13	0,09	1,41	0,04
S1H5N3	A	S1	H						1727	2,36	1,68	1,40	0,68
S1H5N3F1	A	S1	H		F				1873	1,92	1,43	1,34	0,48
H3N2P1	A		L			P			989	0,04	0,03	1,31	0,01
S1H3N2	A	S1	O						1200	0,75	0,57	1,31	0,18
S1H6N5	A	S1	C	R					2295	2,15	1,65	1,31	0,50
S1H7N4	A	S1	C				X		2254	0,13	0,10	1,29	0,03
S1H4N4F1	A	S1	C		F		Q		1914	1,19	0,95	1,24	0,23
S2H5N4	A	S2	C	B					2221	4,54	3,66	1,24	0,88
S1H6N3	A	S1	H						1889	2,70	2,28	1,18	0,41
S2H5N3	A	S2	H						2018	0,21	0,19	1,13	0,02
S2H7N6F1	A	S2	C	R	F				3098	0,46	0,40	1,13	0,05
S1H6N5F2	A	S1	C	R	E				2587	0,44	0,40	1,09	0,04
S1H5N4F2	A	S1	C	B	E				2222	1,70	1,58	1,08	0,12
S1H4N3F1	A	S1	H	N	F				1711	2,28	2,15	1,06	0,13
S1H6N6F1	A	S1	C	R	F		Q		2644	0,10	0,09	1,05	0,00
S2H1N3F1	A	S2	O		F				1516	0,06	0,06	1,04	0,00
S1H3N3	A	S1	H	N					1403	0,30	0,29	1,03	0,01
S2H3N5F1	A	S2	C		F		T		2246	0,10	0,09	1,02	0,00
S1H5N4	A	S1	C	B					1930	10,39	10,24	1,01	0,14
OBにおける1.5倍未満の過剰発現：													
S1H6N4F1	A	S1	C		F		X		2238	0,82	0,86	-1,04	-0,04
S1H6N3F1	A	S1	H		F				2035	0,32	0,34	-1,04	-0,01
S1H6N4F1A1	A	S1	C		F		X		2280	0,15	0,16	-1,05	-0,01
S1H7N6	A	S1	C	R					2660	0,36	0,40	-1,09	-0,03
S2H8N7F1	A	S2	C	R	F				3463	0,14	0,17	-1,19	-0,03
S1H2N1	A	S1	O						835	0,04	0,05	-1,23	-0,01

表1は次頁につづく

【０７９７】

【表１－３】

S1H5N4F1	A	S1	C	B	F				2076	27,61	33,96	-1,23	-6,35
S2H6N5	A	S2	C	R					2586	0,61	0,76	-1,24	-0,14
S1H5N4F3	A	S1	C	B	E				2368	1,00	1,33	-1,32	-0,32
S1H9N8F1	A	S1	C	R	F				3537	0,12	0,17	-1,34	-0,04
G1H3N5	A	S1	C				T	Y	1825	0,06	0,07	-1,34	-0,02
S1H3N3F1	A	S1	H	N	F				1549	0,20	0,29	-1,44	-0,09
OBにおいて1.5倍超過剰発現する：													
G1H5N4F1	A	S1	C	B	F			Y	2092	0,68	1,23	-1,80	-0,55
G1H5N4	A	S1	C	B				Y	1946	0,11	0,21	-1,84	-0,09
S2H2N2F1	A	S2	O		F				1475	0,13	0,26	-1,96	-0,13
OBにおいて2倍超過剰発現する：													
S2H6N5F2	A	S2	C	R	E				2879	0,23	0,53	-2,26	-0,30
S3H6N5	A	S3	C	R					2878	0,56	1,59	-2,85	-1,03
H10N2F1P2	A		M		F	P			2349	0,07	0,20	-2,86	-0,13
S2H4N3F1P1	A	S2	H	N	F	P			2082	0,05	0,18	-3,64	-0,13
S1H7N5F1	A	S1	C		F		X		2603	0,02	0,08	-4,81	-0,06
S3H7N6F1	A	S3	C	R	F				3389	0,01	0,05	-4,96	-0,04
H4N3F1P1	A		H		F	P			1500	0,12	0,60	-5,03	-0,48
S2H6N4	A	S2	C				X		2383	0,03	0,19	-5,88	-0,16
S2H6N5F4	A	S2	C	R	E				3171	0,07	0,39	-6,00	-0,33
H5N4P1	A		C	B		P			1719	0,50	3,85	-7,75	-3,35
S2H6N5F3	A	S2	C	R	E				3025	0,02	0,17	-8,97	-0,16
H4N3P1	A		H			P			1354	0,06	0,55	-9,55	-0,50
H5N4F1P1	A		C	B	F	P			1865	0,09	2,38	-25,3	-2,28
MSCにおいて検出されない：													
S1H9N8F3	A	S1	C	R	E				3829	0,00	0,01	-∞	-0,01
S1H5N5F3	A	S1	C		E		Q		2571	0,00	0,02	-∞	-0,02
H5N3F1P1	A		H		F	P			1662	0,00	0,02	-∞	-0,02
S1H6N6F3	A	S1	C	R	E		Q		2937	0,00	0,03	-∞	-0,03
S3H4N4	A	S3	C				Q		2350	0,00	0,03	-∞	-0,03
H4N3F2P1	A		H		E	P			1646	0,00	0,03	-∞	-0,03
S2H5N4F1P1	A	S2	C	B	F	P			2447	0,00	0,03	-∞	-0,03
S2H6N5F1P1	A	S2	C	R	F	P			2812	0,00	0,03	-∞	-0,03
S3H7N6	A	S3	C	R					3243	0,00	0,03	-∞	-0,03
H3N6F1P1	A		C		F	P	T		1947	0,00	0,03	-∞	-0,03
H4N5F2P1	A		C		E	P	T		2052	0,00	0,03	-∞	-0,03
H3N5F1P1	A		C		F	P	T		1744	0,00	0,03	-∞	-0,03
H3N4F1P1	A		C		F	P	T		1541	0,00	0,03	-∞	-0,03
S1H3N3F1P2	A	S1	H	N	F	P			1709	0,00	0,03	-∞	-0,03
S1H4N5F3	A	S1	C		E		T		2409	0,00	0,04	-∞	-0,04
S2H4N5	A	S2	C				T		2262	0,00	0,04	-∞	-0,04
S3H8N7F3	A	S3	C	R	E				4046	0,00	0,04	-∞	-0,04
S2H5N4F3	A	S2	C	B	E				2659	0,00	0,04	-∞	-0,04
S2H8N7F2	A	S2	C	R	E				3609	0,00	0,04	-∞	-0,04
S4H7N6F1	A	S4	C	R	F				3680	0,00	0,05	-∞	-0,05
H7N4P1	A		C			P	X		2043	0,00	0,05	-∞	-0,05
H7N6F1P1	A		C	R	F	P			2595	0,00	0,05	-∞	-0,05
S2H8N7	A	S2	C	R					3317	0,00	0,06	-∞	-0,06
S2H9N8F1	A	S2	C	R	F				3828	0,00	0,06	-∞	-0,06
H6N5F3P1	A		C	R	E	P			2522	0,00	0,06	-∞	-0,06
S1H6N5F1P1	A	S1	C	R	F	P			2521	0,00	0,06	-∞	-0,06
H3N3F1P1	A		H	N	F	P			1338	0,00	0,06	-∞	-0,06

表1は次頁につづく

【０７９８】

【表１－４】

H6N4F3P1	A		C		E	P	X		2319	0,00	0,06	-∞	-0,06
S1H9N8F2	A	S1	C	R	E				3683	0,00	0,07	-∞	-0,07
H3N3P1	A		H	N		P			1192	0,00	0,07	-∞	-0,07
G1S1H5N3	A	S2	H					Y	2034	0,00	0,07	-∞	-0,07
S1H5N5F2	A	S1	C		E		Q		2425	0,00	0,08	-∞	-0,08
S1H3N5	A	S1	C				T		1809	0,00	0,08	-∞	-0,08
S2H8N7F4	A	S2	C	R	E				3901	0,00	0,08	-∞	-0,08
S2H4N5F2P2	A	S2	C		E	P	T		2714	0,00	0,08	-∞	-0,08
S2H4N4F1	A	S2	C		F		Q		2205	0,00	0,08	-∞	-0,08
S1H10N9	A	S1	C	R					3756	0,00	0,09	-∞	-0,09
H3N4P1	A		C			P	T		1395	0,00	0,09	-∞	-0,09
H5N4F2P1	A		C	B	E	P			2011	0,00	0,10	-∞	-0,10
S2H5N3P2	A	S2	H			P			2178	0,00	0,11	-∞	-0,11
S2H5N5F1	A	S2	C		F		Q		2570	0,00	0,11	-∞	-0,11
H5N4F3P1	A		C	B	E	P			2157	0,00	0,12	-∞	-0,12
S1H4N6	A	S1	C				T		2174	0,00	0,12	-∞	-0,12
G1S2H6N5	A	S3	C	R				Y	2893	0,00	0,12	-∞	-0,12
S1H5N4P1	A	S1	C	B		P			2010	0,00	0,17	-∞	-0,17
G1H6N4P1	A	S1	C			P	X	Y	2188	0,00	0,19	-∞	-0,19
H4N4F1P1	A		C		F	P	Q		1703	0,00	0,25	-∞	-0,25
S1H5N4F1P1	A	S1	C	B	F	P			2156	0,00	0,58	-∞	-0,58
H4N4P1	A		C			P	Q		1557	0,00	0,75	-∞	-0,75
H6N5F1P1	A		C	R	F	P			2230	0,00	0,88	-∞	-0,88

【０７９９】

［表２］

グリカンシグナルと関連して発現する酸性Ｎ－グリカンの相違。データは５つの細胞株および分化した細胞からのものである。ＭＳＣ：骨髄間葉系細胞株；ＯＢ：分化した骨芽細胞。

【０８００】

【表２－１】

組成	m/z	MSC	OB
MSCにおける大きな差異:			
S3H7N6F3	3681	4,08	0,00
S1H11N10	4121	4,08	0,00
S3H7N6F4	3827	4,08	0,00
S1H4N3F3	2003	4,08	0,00
S3H8N7F1	3754	4,08	4,08
S2H3N5F1	2246	4,08	2,04
S2H4N3F1P1	2082	4,08	1,53
S1H6N5F4	2880	4,03	0,00
S1H9N8F1	3537	3,35	1,83
S2H6N5F4	3171	2,88	1,71
S1H2N1	835	2,04	2,04
H5N3F2P1	1808	2,04	0,00
S2H2N2	1329	2,04	0,00
S2H3N5F2	2392	2,04	0,00
S3H6N4F1P1	2900	2,04	0,00
S1H7N6F5	3391	2,04	0,00
S1H3N4	1606	2,04	0,00
S2H4N4	2059	2,04	0,00
S1H7N6F4	3245	2,04	0,00
S2H3N3	1694	2,04	0,00
G1H5N3	1743	2,04	0,00
S1H8N7F3	3464	2,04	0,00
S1H7N5F1A1	2645	2,04	2,04
S1H5N2	1524	2,04	2,04
H3N2P1	989	2,04	2,04
S1H7N5F1	2603	2,04	2,04
S3H7N6F1	3389	2,04	1,17
S2H6N4	2383	2,04	1,61
S1H4N5	1971	2,04	0,00
S2H4N3	1856	2,04	0,00
S2H5N5	2424	2,04	0,00
G1H3N2	1216	2,04	0,00
G1H4N3	1581	2,04	0,00
S2H3N4F2	2189	2,04	0,00
S1H4N4F2	2060	2,04	0,00
S1H4N3F1P1	1791	2,04	2,04
G1S2H5N4F1	2674	2,04	2,04
H10N2F1P2	2349	2,04	2,04
S2H7N6F3	3390	1,98	1,71
S1H6N5F2	2587	1,82	0,98
S3H6N5F1	3024	1,79	1,27
S2H7N6F4	3536	1,67	4,08
S2H5N3	2018	1,61	1,67
S2H6N5F2	2879	1,60	1,33
S1H8N7	3026	1,58	0,00
S1H7N6F2	2953	1,56	2,04
S2H8N7F1	3463	1,51	1,48
S2H5N3F2P1	2390	1,50	0,00
S1H5N5F1	2279	1,50	0,61
中程度の差異:			
S1H7N6F3	3099	1,49	1,42
H3N6F3P1	2239	1,48	0,92
S2H6N3F1P1	2406	1,44	2,04
S2H1N3F1	1516	1,43	2,04
S2H6N5F3	3025	1,42	1,68
S1H5N4F4	2514	1,39	0,00
S1H7N5	2457	1,38	4,08
S2H3N2F1	1637	1,37	2,04
H5N4F1P1	1865	1,37	0,94
S1H6N6F1	2644	1,35	1,65
H4N3F1P1	1500	1,35	0,98
H4N2P1	1151	1,35	2,04
H4N3P1	1354	1,33	0,94
S2H4N2F1	1799	1,33	0,00
S2H3N3F1	1840	1,32	0,00
S1H5N5	2133	1,32	0,00
S1H6N3F1	2035	1,32	0,78
S2H7N6	2952	1,31	2,04
S2H4N3F1	2002	1,31	0,97
G1H5N4	1946	1,31	1,08
S2H5N3F1	2164	1,30	0,00
S1H7N4	2254	1,30	1,34
G1H3N5	1825	1,30	2,04
S2H5N4F2	2513	1,30	2,04
S1H2N2	1038	1,29	2,04
S1H3N3F1	1549	1,29	0,76
S1H7N3	2051	1,29	2,04
S2H2N2F1	1475	1,29	0,66
S2H7N6F1	3098	1,26	1,03
S1H3N3	1403	1,23	0,82
H5N4P1	1719	1,18	0,97
S3H6N5	2878	1,18	1,08
S1H6N5F3	2733	1,11	0,76
S1H8N7F1	3172	1,08	2,04
S1H3N2	1200	1,02	0,40
S2H6N5	2586	1,01	0,87
MSCにおけるわずかな差異:			
S1H7N6	2660	0,98	0,74
S2H6N5F1	2732	0,98	0,65
S1H5N4F3	2368	0,96	0,42
S1H6N4F1A1	2280	0,95	0,91
G1H5N4F1	2092	0,76	0,27
S2H2N3F1	1678	0,72	0,58
S1H6N4F1	2238	0,69	0,43
S2H5N4F1	2367	0,57	0,71

表2は次頁につづく

【０８０１】

【表２－２】

S1H5N3F1	1873	0,56	0,33
S1H4N2	1362	0,54	0,76
S1H6N3	1889	0,49	0,32
S1H4N4F1	1914	0,47	0,15
S1H7N6F1	2807	0,44	0,49
S2H5N4	2221	0,43	0,64
S1H4N3	1565	0,40	0,29
S1H4N4	1768	0,39	0,16
S1H5N4F2	2222	0,37	0,63
S1H5N4	1930	0,28	0,19
S1H6N5F1	2441	0,25	0,15
S1H6N5	2295	0,24	0,15
S1H5N3	1727	0,22	0,25
S1H4N3F1	1711	0,16	0,21
S1H5N4F1	2076	0,16	0,20
OBのみに検出される：			
S1H9N8F3	3829	0,00	4,08
S1H5N5F3	2571	0,00	2,04
H5N3F1P1	1662	0,00	2,04
S1H6N6F3	2937	0,00	2,04
S3H4N4	2350	0,00	2,04
H4N3F2P1	1646	0,00	2,04
S2H5N4F1P1	2447	0,00	4,08
S2H6N5F1P1	2812	0,00	2,04
S3H7N6	3243	0,00	2,04
H3N6F1P1	1947	0,00	2,04
H4N5F2P1	2052	0,00	2,04
H3N5F1P1	1744	0,00	2,04
H3N4F1P1	1541	0,00	2,04
S1H3N3F1P2	1709	0,00	2,04
S1H4N5F3	2409	0,00	2,04
S2H4N5	2262	0,00	2,04
S3H8N7F3	4046	0,00	2,04
S2H5N4F3	2659	0,00	4,08
S2H8N7F2	3609	0,00	2,04
S4H7N6F1	3680	0,00	2,04
H7N4P1	2043	0,00	2,04
H7N6F1P1	2595	0,00	2,04
S2H8N7	3317	0,00	2,04
S2H9N8F1	3828	0,00	3,30
H6N5F3P1	2522	0,00	1,40
S1H6N5F1P1	2521	0,00	1,34
H3N3F1P1	1338	0,00	2,04
H6N4F3P1	2319	0,00	2,04
S1H9N8F2	3683	0,00	2,04
H3N3P1	1192	0,00	2,04
G1S1H5N3	2034	0,00	2,04
S1H5N5F2	2425	0,00	2,04
S1H3N5	1809	0,00	4,08
S2H8N7F4	3901	0,00	2,00
S2H4N5F2P2	2714	0,00	2,04
S2H4N4F1	2205	0,00	2,04

S1H10N9	3756	0,00	2,04
H3N4P1	1395	0,00	2,04
H5N4F2P1	2011	0,00	2,65
S2H5N3P2	2178	0,00	4,08
S2H5N5F1	2570	0,00	1,33
H5N4F3P1	2157	0,00	1,78
S1H4N6	2174	0,00	1,91
G1S2H6N5	2893	0,00	2,04
S1H5N4P1	2010	0,00	1,75
G1H6N4P1	2188	0,00	1,70
H4N4F1P1	1703	0,00	1,37
S1H5N4F1P1	2156	0,00	0,61
H4N4P1	1557	0,00	1,58
H6N5F1P1	2230	0,00	0,65

【０８０２】

［表３］

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析プロファイリングにより分析された、骨髄間葉系幹細胞（ＭＳＣ）と骨芽細胞に分化した細胞（ＯＢ）とにおける中性Ｎ－グリカンシグナルの異なる発現。データは５つの分析された細胞株の平均である。シグナルはサブタイトルに示すように、ＭＳＣにおけるＯＢと比較した相対発現量（ｒｅｌａｔ．）により並べられている。記号は先の表におけるものと同様である。

【０８０３】

【表３－１】

組成	構造								m/z	MSC	OB	relat.	diff.
OBにおいて検出されない:													
H3N2F4	O		E						1517	0,02	0,00	∞	0,02
H4N5F3	C		E	T					1850	0,02	0,00	∞	0,02
H9N1	S								1702	0,21	0,00	∞	0,21
MSCにおいて2倍超過剰発現する:													
H7N1	S								1378	0,70	0,12	5,84	0,58
H6N1	S								1216	1,92	0,48	4,01	1,44
H3N1	S								730	1,93	0,50	3,90	1,44
H5N1	S								1054	3,65	0,97	3,76	2,68
H4N1	S								892	2,74	0,75	3,64	1,99
H4N5F3	C		E	T					2142	0,03	0,01	3,57	0,02
H2N1	S								568	0,77	0,23	3,41	0,55
H2N2F3	O		E						1209	0,06	0,02	3,02	0,04
MSC における1.5倍超の過剰発現:													
H8N1	S								1540	0,57	0,34	1,69	0,24
H9N2	M								1905	12,31	7,70	1,60	4,61
H6N2F1	M		F						1565	0,20	0,13	1,57	0,07
H8N2	M								1743	13,88	8,96	1,55	4,92
MSCにおける1.5倍未満の過剰発現:													
H3N5F1	C		F	T					1688	0,41	0,28	1,47	0,13
H6N2	M								1419	13,73	10,06	1,37	3,68
H7N2	M								1581	10,76	8,31	1,29	2,45
H11N2	M	G							2229	0,06	0,05	1,23	0,01
H3N4F1	C		F	T					1485	0,73	0,60	1,22	0,13
H10N2	M	G							2067	0,88	0,75	1,17	0,13
H2N2	L								771	1,09	0,94	1,16	0,15
H12N2	M	G							2391	0,03	0,02	1,07	0,00
OBにおける1.5倍未満の過剰発現:													
H3N2F1	L		F						1079	2,93	3,03	-1,03	-0,09
H4N5F2	C		E	T					1996	0,12	0,12	-1,06	-0,01
H3N2	L								933	1,92	2,04	-1,06	-0,11
H4N2	L								1095	2,07	2,22	-1,07	-0,15
H4N4F2	C		E	Q					1793	0,19	0,23	-1,19	-0,04
H3N4	C			T					1339	0,04	0,05	-1,21	-0,01
H5N2	M								1257	7,18	8,76	-1,22	-1,58
H3N3	H	N							1136	0,55	0,67	-1,23	-0,12
H7N3	H								1784	0,19	0,27	-1,44	-0,08
H5N4F3	C	B	E						2101	0,23	0,33	-1,46	-0,11
H3N3F1	H	N	F						1282	0,53	0,78	-1,47	-0,25
H4N2F1	L		F						1241	0,37	0,55	-1,49	-0,18
OBにおいて1.5倍超過剰発現する:													
H5N2F1	M		F						1403	0,32	0,51	-1,59	-0,19
H4N3	H								1298	1,06	1,81	-1,71	-0,75
H6N5F4	C	R	E						2612	0,02	0,03	-1,72	-0,01
H5N5F3	C		E	Q					2304	0,02	0,03	-1,76	-0,01
H5N5	C			Q					1866	0,03	0,05	-1,77	-0,02

表3は次頁につづく

【０８０４】

【表３－２】

H2N2F1	L		F					917	1,08	2,00	-1,85	-0,92
H5N3F1	H		F					1606	0,92	1,76	-1,91	-0,84
H2N3F1	H	N	F	T				1120	0,01	0,02	-1,93	-0,01
OBにおいて2倍超過剰発現する:												
H5N4	C	B						1663	3,72	7,72	-2,07	-4,00
H4N4F1	C		F	Q				1647	0,28	0,60	-2,13	-0,32
H4N3F1	H		F					1444	0,65	1,42	-2,18	-0,77
H5N5F1	C		F	Q				2012	0,06	0,13	-2,19	-0,07
H7N6F1	C	R	F					2539	0,04	0,10	-2,40	-0,06
H6N3F1	H		F					1768	0,31	0,75	-2,41	-0,44
H6N3	H							1622	1,73	4,35	-2,51	-2,62
H5N3	H							1460	1,07	2,69	-2,52	-1,62
H6N5	C	R						2028	0,61	1,66	-2,72	-1,05
H7N4	C			X				1987	0,04	0,11	-2,81	-0,07
H7N6	C	R						2393	0,08	0,24	-2,94	-0,16
H8N7	C	R						2758	0,01	0,03	-2,99	-0,02
H5N4F1	C	B	F					1809	2,31	7,12	-3,08	-4,81
H5N4F2	C	B	E					1955	0,33	1,02	-3,14	-0,70
H6N5F1	C	R	F					2174	0,65	2,09	-3,21	-1,44
H6N4F2	C		E	X				2117	0,01	0,03	-3,32	-0,02
H4N4	C			Q				1501	0,20	0,85	-4,32	-0,66
H6N5F3	C	R	E					2466	0,01	0,02	-4,33	-0,02
H6N4F1	C		F	X				1971	0,06	0,26	-4,64	-0,21
H4N3F2	H		E					1590	0,05	0,25	-4,84	-0,20
H6N4	C			X				1825	0,05	0,25	-5,30	-0,20
H6N5F2	C	R	E					2320	0,01	0,08	-8,70	-0,07
H5N3F2	H		E					1752	0,02	0,17	-11,19	-0,16
MSCにおいて検出されない:												
H8N4	C			X				2149	0,00	0,01	-∞	-0,01
H6N6	C	R		Q				2231	0,00	0,01	-∞	-0,01
H2N3	H	N		T				974	0,00	0,01	-∞	-0,01
H5N5F2	C		E	Q				2158	0,00	0,01	-∞	-0,01
H4N5	C			T				1704	0,00	0,02	-∞	-0,02
H3N3F2	H	N	E					1428	0,00	0,02	-∞	-0,02
H8N2F1	M		F					1889	0,00	0,03	-∞	-0,03
H7N4F1	C		F	X				2133	0,00	0,03	-∞	-0,03
H3N6F1	C		F	T				1891	0,00	0,03	-∞	-0,03
H1N2	L							609	0,00	0,05	-∞	-0,05
H1N6	O							1421	0,00	0,10	-∞	-0,10

【０８０５】

［表４］

グリカンシグナルと関連する中性Ｎ－グリカンの相違。データは５つの細胞株および分化した細胞からのものである。ＭＳＣ：骨髄間葉系細胞株；ＯＢ：分化した骨芽細胞。

【０８０６】

【表４】

組成	m/z	MSC	OB
MSCにおける大きな差異:			
H3N4	1339	2,45	1,23
H2N3F1	1120	2,45	1,49
H4N5F3	1850	2,45	0,00
H4N5F3	2142	2,45	2,04
H5N3F2	1752	2,45	0,25
H6N4F2	2117	2,40	0,67
H8N7	2758	1,75	0,80
H6N4	1825	1,59	0,65
H6N5F2	2320	1,59	0,40
H3N2F4	1517	1,57	0,00
H5N5	1866	1,55	1,30
H6N5F3	2466	1,55	0,58
H4N3F2	1590	1,55	0,57
H5N5F3	2304	1,55	0,89
MSCにおける中程度の差異:			
H2N2F3	1209	1,25	1,56
H2N1	568	1,25	1,20
H6N5F4	2612	1,19	0,56
H7N4	1987	1,18	0,41
H12N2	2391	1,13	1,10
H7N6F1	2539	0,79	0,48
H5N5F1	2012	0,65	0,38
H4N1	892	0,65	0,94
H6N4F1	1971	0,61	0,28
H4N4	1501	0,58	0,45
H5N1	1054	0,55	0,83
H7N1	1378	0,53	1,42
H9N1	1702	0,52	0,00
H3N1	730	0,51	0,96
MSCにおけるわずかな差異:			
H6N1	1216	0,47	0,74
H6N3F1	1768	0,42	0,27
H6N5	2028	0,41	0,52
H6N5F1	2174	0,40	0,49
H5N4F1	1809	0,40	0,14
H2N2	771	0,37	0,13
H4N4F1	1647	0,37	0,33
H10N2	2067	0,36	0,19
H11N2	2229	0,35	0,69
H6N3	1622	0,35	0,21
H7N6	2393	0,33	0,62
H7N3	1784	0,30	0,30
H5N3F1	1606	0,28	0,17
H5N2F1	1403	0,27	0,28
H5N4	1663	0,27	0,11
H4N2F1	1241	0,26	0,30
H8N1	1540	0,26	0,16
H4N5F2	1996	0,26	0,65
H3N5F1	1688	0,25	0,35
H6N2F1	1565	0,24	0,54
H4N4F2	1793	0,23	0,35
H5N4F3	2101	0,23	0,23
H3N2F1	1079	0,21	0,21
H5N3	1460	0,20	0,20
H5N4F2	1955	0,19	0,23
H3N4F1	1485	0,18	0,25
H3N3F1	1282	0,18	0,28
H4N3F1	1444	0,18	0,26
H9N2	1905	0,17	0,13
H8N2	1743	0,16	0,10
H5N2	1257	0,15	0,15
H3N2	933	0,15	0,22
H6N2	1419	0,14	0,13
H2N2F1	917	0,14	0,16
H3N3	1136	0,14	0,23
H4N3	1298	0,13	0,24
H7N2	1581	0,12	0,10
H4N2	1095	0,10	0,17
MSCにおいて検出されない:			
H8N4	2149	0,00	2,04
H6N6	2231	0,00	2,04
H2N3	974	0,00	2,04
H5N5F2	2158	0,00	1,78
H4N5	1704	0,00	2,04
H3N3F2	1428	0,00	2,04
H8N2F1	1889	0,00	2,04
H7N4F1	2133	0,00	0,85
H3N6F1	1891	0,00	1,30
H1N2	609	0,00	1,08
H1N6	1421	0,00	2,04

【０８０７】

［表５］

ＢＭ　ＭＳＣ酸性Ｎ－グリカンの構造的割当て

【０８０８】

【表５－１】

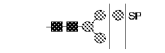
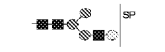
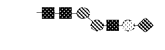
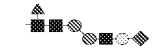
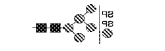
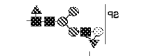
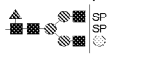
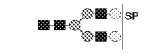
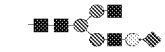
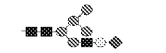
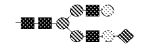
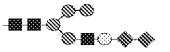
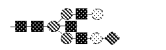
m/z	構造
989	
1151	
1297	
1338	
1354	
1395	
1403	
1500	
1549	
1555	
1557	
1565	
1581	
1646	
1703	
1709	
1711	
1719	
1727	
1744	
1758	
1768	
1791	
1808	
1840	
1856	
1865	
1873	
1889	
1914	
1930	
1946	
2002	
2003	
2010	
2011	
2018	
2019	
2035	
2059	
2060	
2076	
2082	
2092	
2133	

表5は次頁につづく

【０８０９】

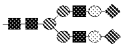
【表５－２】

2156

2157

2164

2178

2221 

2222

2230

2237

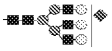
2238

2254

2262

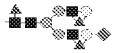
2279

2280

2295 

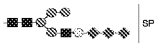
2349

2367

2368 

2382

2383

2389 

2390

2406

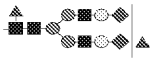
2424

2425

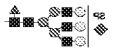
2441

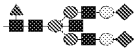
2447

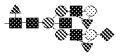
2457

2513 

2514

2521 

2570 

2571 

2586

2587

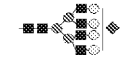
2595

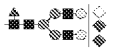
2603

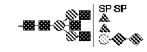
2644

2645

2659

2660 

2674 

2714 

2732

2733

2807

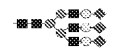
2878 

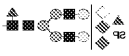
表5は次頁につづく

【０８１０】

【表５－３】

2879

2880

2900 

2952

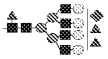
2953

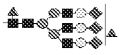
3024

3025

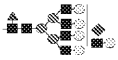
3026

3098

3099 

3170 

3171

3172 

3243

3245

3389

3390

3391

3463

3536

3537

3609

3680

3681

3683

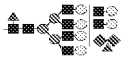
3754

3756

3827

3828

3901

3974 

4046

4121

【０８１１】

［表６］

ＢＭ　ＭＳＣ中性Ｎ－グリカンの構造的割当て

【０８１２】

【表６－１】

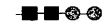
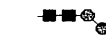
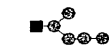
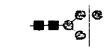
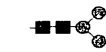
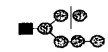
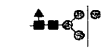
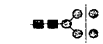
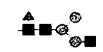
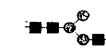
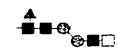
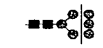
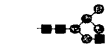
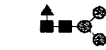
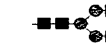
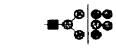
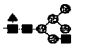
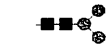
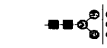
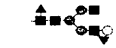
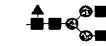
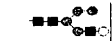
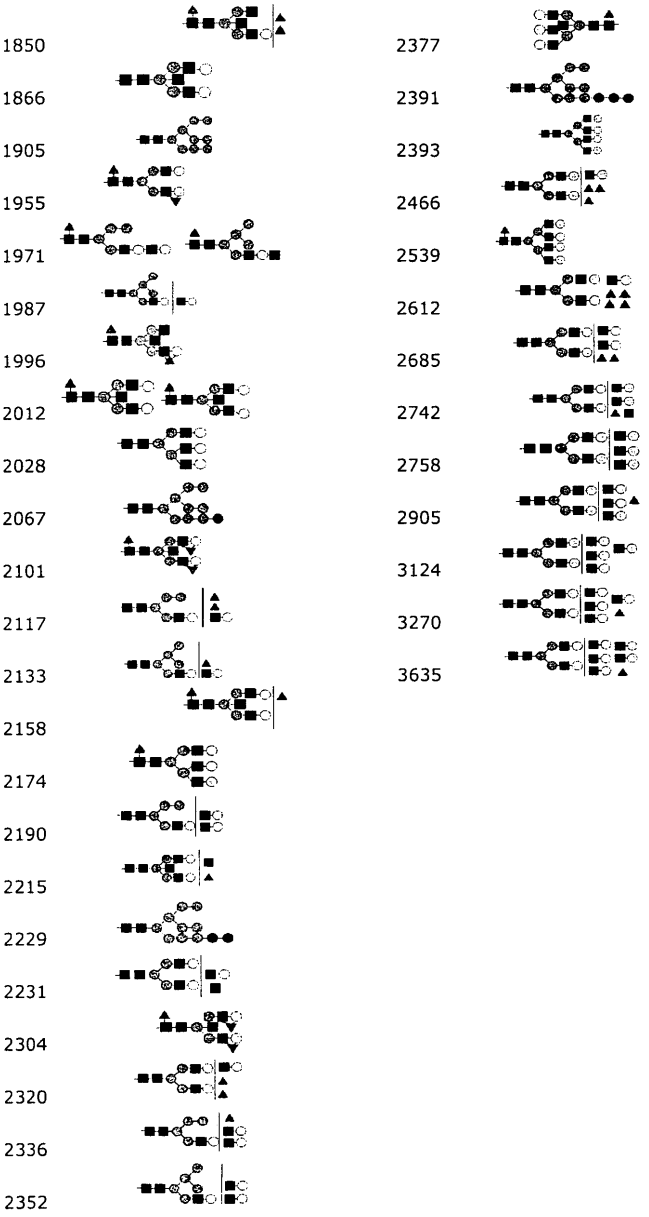
m/z	構造
568	
609	
730	
755	
771	
892	
917	
933	
974	
1054	
1079	
1095	
1120	
1136	
1216	
1241	
1257	
1282	
1298	
1323	
1339	
1378	
1403	
1419	
1444	
1460	
1485	
1501	
1540	
1542	
1565	
1581	
1590	
1606	
1622	
1647	
1663	
1688	
1702	
1704	
1743	
1752	
1768	
1793	
1809	
1825	

表6は次頁につづく

【０８１３】

【表６－２】



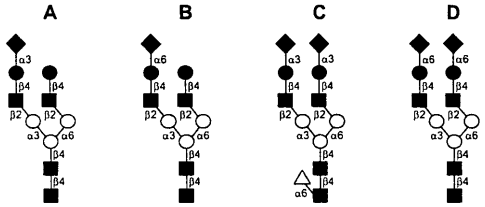
【０８１４】

［表７］

ＢＭ　ＭＳＣの主要なシアル化Ｎ－グリカンコア構造のＮＭＲ分析。同定されたシグナルは単糖組成$S_{1-2}H_5N_4F_{0-1}$を有する構造Ａないし Ｄ等のシアル化二分岐複合型Ｎ－グリカン構造と一致していた。基準データはＨａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．（Ｈａｒｄ，Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．，１９９２，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０９，８９５－９１５）および Ｈｅｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｈｅｌｉｎ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，１９９５，Ｃａｒｂｏｈｙｄｒ．Ｒｅｓ．２６６，１９１－２０９）に従うものである。得られたＮＭＲスペクトル中の主要なシグナルは、他のＮ－グリカン主鎖および分岐構造においても生じ得るこれらの基準構造の構造成分により説明することができる。スペクトルは、特徴的シアル酸シグナル（データ不掲載）により、Ｎ－グリカンにおいてα２，３－結合シアル酸がα２，６－結合シアル酸よりも一般的であることも明らかにした。単糖記号は：白丸、Ｄ－マンノース；黒い四角、Ｎ－アセチル－Ｄ－グルコサミン；黒丸、Ｄ－ガラクトース；黒い菱形、Ｎ－アセチルノイラミン酸；白い三角、Ｌ－フコースである。

【０８１５】

【表７】



グリカン残基			^{1}H-NMR 化学シフト (ppm)				
残基	結合	プロトン	A	B	C	D	MSC [1)]
D-GlcNAc		H-1α	5.188	5.189	5.181	5.189	5.185
		NAc	2.038	2.038	2.039	2.038	2.039
α-L-Fuc	6	H-1α	-	-	4.892	-	4.9
		H-1β	-	-	4.900	-	4.9
		CH_3α	-	-	1.211	-	1.206
		CH_3β	-	-	1.223	-	1.216
β-D-GlcNAc	4	H-1β	4.604	4.606	n.a.	4.604	-
		NAc	2.081	2.081	2.096	2.084	2.077 / 2.097
β-D-Man	4,4	H-1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
		H-2	4.246	4.253	4.248	4.258	4.255
α-D-Man	6,4,4	H-1	4.928	4.930	4.922	4.948	4.929
		H-2	4.11	4.112	4.11	4.117	n.a.
β-D-GlcNAc	2,6,4,4	H-1	4.581	4.582	4.573	4.604	n.a.
		NAc	2.047	2.047	2.043	2.066	2.039 / n.a.
β-D-Gal	4,2,6,4,4	H-1	4.473	4.473	4.550	4.447	4.477 / 4.554
		H-4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-
α-D-Man	3,4,4	H-1	5.118	5.135	5.116	5.133	5.120 / n.a.
		H-2	4.190	4.196	4.189	4.197	4.2 / 4.218
β-D-GlcNAc	2,3,4,4	H-1	4.573	4.606	4.573	4.604	-
		NAc	2.047	2.069	2.048	2.070	n.a. / 2.077
β-D-Gal	4,2,3,4,4	H-1	4.545	4.445	4.544	4.443	4.554
		H-3	4.113	n.a.	4.113	n.a.	4.110

１）シグナルの中央から決定された化学シフト。
ｎ．ａ．：特定されない。

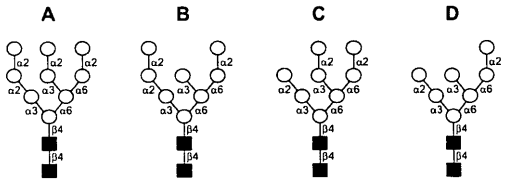
【０８１６】

［表８］

ＢＭ ＭＳＣの主要な中性Ｎ－グリカンのＮＭＲ分析。同定されたシグナルは単糖組成$H_{7-9}N_2$を有する構造ＡないしＤ等の高マンノース型Ｎ－グリカン構造と一致していた。ＮＭＲスペクトル中の主要なシグナルは、他のＮ－グリカン主鎖および分岐構造においても生じ得るこれらの基準構造の構造成分により説明することができる。基準データはＦｕ ｅｔ ａｌ．（Ｆｕ，Ｄ．，ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｃａｒｂｏｈｙｄｒ．Ｒｅｓ．２６１，１７３－１８６）およびＨａｒｄ ｅｔ ａｌ．（Ｈａｒｄ，Ｋ．，ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｇｌｙｃｏｃｏｎｊ．Ｊ．８，１７－２８）に従うものである。単糖記号は：白丸、Ｄ－マンノース；黒い四角、Ｎ－アセチル－Ｄ－グルコサミンである。

【０８１７】

【表８】



グリカン残基			^{1}H-NMR 化学シフト (ppm)				
残基	結合	プロトン	A	B	C	D	MSC [1)]
D-GlcNAc		H-1α	5.191	5.187	5.187	5.188	5.190
		H-1β	4.690	4.693	4.693	4.695	-
		NAc	2.042	2.037	2.037	2.038	2.039
β-D-GlcNAc	4	H-1	4.596	4.586	4.586	4.600	4.591
		NAc	2.072	2.063	2.063	2.064	2.065
β-D-Man	4,4	H-1	4.775	4.771	4.771	4.780	2)
		H-2	4.238	4.234	4.234	4.240	4.236
α-D-Man	6,4,4	H-1	4.869	4.870	4.870	4.870	4.869
		H-2	4.149	4.149	4.149	4.150	4.152
α-D-Man	6,6,4,4	H-1	5.153	5.151	5.151	5.143	5.148
		H-2	4.025	4.021	4.021	4.020	n.d.
α-D-Man	2,6,6,4,4	H-1	5.047	5.042	5.042	5.041	5.042
		H-2	4.074	4.069	4.069	4.070	4.071
α-D-Man	3,6,4,4	H-1	5.414	5.085	5.415	5.092	5.408 / 5.090
		H-2	4.108	4.069	4.099	4.070	4.109 / 4.071
α-D-Man	2,3,6,4,4	H-1	5.047	-	5.042	-	5.042
		H-2	4.074	-	4.069	-	4.071
α-D-Man	3,4,4	H-1	5.343	5.341	5.341	5.345	5.342
		H-2	4.108	4.099	4.099	4.120	4.109
α-D-Man	2,3,4,4	H-1	5.317	5.309	5.050	5.055	5.310 / 5.06
		H-2	4.108	4.099	4.069	4.070	4.109 / 4.071
α-D-Man	2,2,3,4,4	H-1	5.047	5.042	-	-	5.042
		H-2	4.074	4.069	-	-	4.071

１）シグナルの中央から決定された化学シフト。
２）ＨＤＯを下回るシグナル。
ｎ．ｄ．：測定されない。

【０８１８】

［表９］

本発明で分析された中性およびシアル化Ｎ－グリカン成分内に存在する提案された非還元末端構造を示す、ＢＭ　ＭＳＣのエキソグリコシダーゼ分析の結果。表中の数字は検出された各末端構造の量または検出されたそれらの量の範囲を表す。一グリカンシグナル内の異性体構造の混合物の場合、範囲は検出された複数の構造における差異を示す。記号の説明は表の下端を参照のこと。

【０８１９】

【表９－１】

		α-Man	β-Gn	β1,3-Gal	β1,4-Gal	α1,2-Fuc	α1,3/4-Fuc	poly-LN	シアリル型
H2N1	568	0-1	1						
H1N2	609								
H2N1F1	714								
H3N1	730	0-2	1						
H1N2F1	755								
H2N2	771	0-1							
H2N1F2	860								
H3N1F1	876								
H4N1	892	1-3							
H1N2F2	901								
H2N2F1	917	0-1				0-1	0-1		
H3N2	933	0-2							
H1N3F1	958								
H2N3	974								
H3N1F2	1022								
H5N1	1054	2-4							
H3N2F1	1079	0-2				0-1	0-1		
H4N2	1095	0-3							
H2N3F1	1120		1						
H3N3	1136		0-1						+
H2N4	1177								
H2N2F3	1209	1	1						
H6N1	1216	2-5	0-1						
H3N2F2	1225								
H4N2F1	1241	1-3				0-1	0-1		
H5N2	1257	0-4							
H2N3F2	1266								
H3N3F1	1282		0-1			0-1	0-1		+
H4N3	1298		0-1		0-1				+
H2N4F1	1323								
H3N4	1339							1	
H2N2F4	1355								
H3N2F3	1371								
H7N1	1378	2-6							
H5N2F1	1403	2-4	0-2			0-1	0-1		
H6N2	1419	0-5							
H1N6	1421								
H3N3F2	1428								
H4N3F1	1444		0-1			0-1	0-1		+
H5N3	1460	0-1	0-1		0-2				+

表9は次頁につづく

【０８２０】

【表９－２】

H3N4F1	1485	0-1	0-2			0-1	0-1	0-1	+
H4N4	1501							0-1	+
H3N2F4	1517								
H4N2F3	1533								
H8N1	1540	2-7	0-1						
H3N5	1542								
H5N2F2	1549								
H6N2F1	1565	3-5	0-1	1	1	0-1			
H7N2	1581	0-6	0-1						
H2N6	1583								
H4N3F2	1590	1				0-2	0-2		
H5N3F1	1606	0-1	0-1		0-1	0-1	0-1		+
H6N3	1622	0-2	0-1		0-3				+
H3N4F2	1631								
H4N4F1	1647		1-2			0-1			+
H5N4	1663		0-2		2			0-1	+
H3N5F1	1688		1			0-1	0-1		+
H9N1	1702	3-8	1						
H4N5	1704								+
H3N3F4	1720								
H8N2	1743	1-7							
H3N6	1745								
H5N3F2	1752					0-2	0-2		
H6N3F1	1768	0-2			1-2	0-1	0-1		+
H7N3	1784	1-3	1-2		1-4				+
H4N4F2	1793		1			0-2	1		+
H5N4F1	1809		0-2		1-2	0-1	0-1		+
H6N4	1825							1	+
H4N5F3	1850								
H10N1	1864								
H5N5	1866								+
H4N3F4	1882								
H8N2F1	1889								
H3N6F1	1891								
H9N2	1905	2-8	0-2						
H6N3F2	1914								
H7N3F1	1930								
H8N3	1946								
H5N4F2	1955		0-1		1	0-2	0-2		+
H6N4F1	1971	0-1	1		2-3	0-1	0-1		+
H3N5F3	1980								
H7N4	1987							1	
H4N5F2	1996		2			0-2			
H5N5F1	2012		1-2	1	2				+
H7N2F3	2019								
H2N6F3	2021								
H11N1	2026								
H6N5	2028	0-1	0-1		3			0-1	+
H3N6F2	2037								
H5N3F4	2044								
H4N6F1	2053								
H10N2	2067	3-8	0-1						

表9は次頁につづく

【０８２１】

【表９－３】

H5N4F3	2101	0-1	1			0-3			+
H6N4F2	2117								
H3N5F4	2126								
H7N4F1	2133								
H4N5F3	2142			1	0-1				
H8N4	2149								
H5N5F2	2158								
H6N5F1	2174	0-1	1-2		3	0-1	0-1		+
H3N6F3	2183								
H7N5	2190								
H4N6F2	2199								
H5N6F1	2215								
H11N2	2229	4-8	1		1				
H6N6	2231								
H5N4F4	2247								
H4N7F1	2256								
H6N4F3	2263								
H5N7	2272								
H5N5F3	2304	1	2			0-3	0-3		
H9N4	2311								
H6N5F2	2320	1	1			0-2	0-2		+
H7N5F1	2336								
H8N5	2352								
H5N6F2	2361								
H6N6F1	2377								+
H12N2	2391								
H7N6	2393	0-1	0-1		1-4			0-1	+
H6N4F4	2409								
H6N5F3	2466	1	1						
H8N5F1	2498								
H9N5	2514								
H6N6F2	2523								
H7N6F1	2539	1	1		4				+
H8N6	2555								
H6N5F4	2612	1	1			0-4	0-4		
H7N6F2	2685								
H7N7F1	2742								
H8N7	2758								+
H7N6F3	2832								
H8N7F1	2905								+
H7N6F4	2978								
H9N8	3124								
H8N6F4	3140								
H9N8F1	3270								+
H10N9F1	3635								

α－Ｍａｎ、β－Ｇｎ、β１，３－Ｇａｌ、β１，４－Ｇａｌ、α１，２－Ｆｕｃ、α１，３／４－Ｆｕｃ、およびポリ－ＬＮ：実施例に記載される特異的グリコシダーゼ酵素によって検出された非還元α－Ｍａｎ、β－ＧｌｃＮＡｃ、β１，３－結合Ｇａｌ、β１，４－結合Ｇａｌ、α１，２－結合Ｆｕｃ、α１，３／４－結合Ｆｕｃ、およびポリ－ＬａｃＮＡｃ残基の数。

シアリル型：シアリダーゼ酵素による消化後に中性Ｎ－グリカンとして分析されたシアル化ハイブリッド型および複合型Ｎ－グリカンを「＋」でマークする。ＢＭ　ＭＳＣに存在する構造は、実施例に記載されるように、示された構造のシアル化誘導体である。

【０８２２】

【表１０】

提案された組成	m/z	α-Man	β-GlcNAc	β4-Gal	β3-Gal
Hex2HexNAc	568		---		
HexHexNAc2	609	+++			
Hex2HexNAcdHex	714	+++			
Hex3HexNAc	730	--	---		
HexHexNAc2dHex	755	+++			
Hex2HexNAc2	771	++	++		
Hex4HexNAc	892	---	+		
Hex2HexNAc2dHex	917		+		
Hex3HexNAc2	933	++	++		
Hex2HexNAc3	974	+++			
Hex5HexNAc	1054	--			
Hex3HexNAc2dHex	1079	--	+		
Hex4HexNAc2	1095	-	+		
Hex2HexNAc3dHex	1120	+++	---		
Hex3HexNAc3	1136	++	--	+	
Hex2HexNAc2dHex3	1209	---	---		
Hex6HexNAc	1216	--			
Hex4HexNAc2dHex	1241	---			
Hex5HexNAc2	1257	--			
Hex2HexNAc3dHex2	1266				
Hex3HexNAc3dHex	1282	++	--	+	
Hex4HexNAc3	1298	++	-		
Hex3HexNAc4	1339	+++		+++	
Hex7HexNAc	1378	--			
Hex5HexNAc2dHex	1403	---			
Hex6HexNAc2	1419	--	+		
Hex3HexNAc3dHex2	1428	+++			
Hex4HexNAc3dHex	1444	+	-	+	
Hex5HexNAc3	1460	+	-	++	
Hex3HexNAc4dHex	1485		--	++	
Hex4HexNAc4	1501	++			
Hex8HexNAc	1540	-			
Hex3HexNAc5	1542			+++	
Hex6HexNAc2dHex	1565	---		---	---
Hex7HexNAc2	1581	--			
Hex4HexNAc3dHex2	1590				
Hex5HexNAc3dHex	1606		--	--	
Hex6HexNAc3	1622	--	-	--	
Hex4HexNAc4dHex	1647		---		
Hex5HexNAc4	1663		--	---	
Hex3HexNAc5dHex	1688		---	++	
Hex9HexNAc	1702	---	---		
Hex8HexNAc2	1743	--	+		
Hex6HexNAc3dHex	1768			---	
Hex7HexNAc3	1784	---	---	---	
Hex4HexNAc4dHex2	1793		---	++	
Hex5HexNAc4dHex	1809		--	---	
Hex3HexNAc6dHex	1891			+++	
Hex9HexNAc2	1905	---	-		
Hex5HexNAc4dHex2	1955		-	---	
Hex6HexNAc4dHex	1971		---	---	
Hex4HexNAc5dHex2	1996		---		
Hex5HexNAc5dHex	2012		---	---	---
Hex6HexNAc5	2028		-	---	
Hex10HexNAc2	2067	---	-		
Hex5HexNAc4dHex3	2101		---		
Hex4HexNAc5dHex3	2142			--	---
Hex6HexNAc5dHex	2174		--	---	
Hex11HexNAc2	2229				
Hex5HexNAc5dHex3	2304		---		
Hex6HexNAc5dHex2	2320		---		
Hex7HexNAc6	2393			---	
Hex6HexNAc5dHex3	2466		---		
Hex7HexNAc6dHex	2539		---	---	

【０８２３】

【表１１－１】

m/z*	好ましい単糖組成	末端エピトープ	本発明によるグリカンシグナルに含まれる実験に基づく構造§	群#
568	Hex2HexNAc	Manα	Manα→$Hex_1HexNAc_1$	S
730	Hex3HexNAc	Manα GlcNAc	$(Manα→)_2Hex_1HexNAc_1$ GlcNAc→Hex_3	S
771	Hex2HexNAc2	Manα	Manα→$Hex_1HexNAc_2$	LO
892	Hex4HexNAc	Manα	$(Manα→)_3Hex_1HexNAc_1$	S
917	Hex2HexNAc2dHex	Manα	Manα→$Hex_1HexNAc_2dHex_1$	LO, F
933	Hex3HexNAc2	Manα	$(Manα→)_2Hex_1HexNAc_2$	LO
1054	Hex5HexNAc	Manα	$(Manα→)_4Hex_1HexNAc_1$	S
1079	Hex3HexNAc2dHex	Manα	$(Manα→)_2Hex_1HexNAc_2dHex_1$	LO, F
1095	Hex4HexNAc2	Manα	$(Manα→)_3Hex_1HexNAc_2$	LO
1120	Hex2HexNAc3dHex	GlcNAcβ	GlcNAcβ→$Hex_2HexNAc_2dHex_1$	HY, F, N>H
1136	Hex3HexNAc3	GlcNAcβ	GlcNAcβ→$Hex_3HexNAc_2$	HY, N=H
1209	Hex2HexNAc2dHex3	Manα GlcNAc	Manα→$Hex_1HexNAc_2dHex_3$ GlcNAc→$Hex_2HexNAc_1dHex_3$	FC, N=H
1216	Hex6HexNAc	Manα	$(Manα→)_5Hex_1HexNAc_1$	S
1241	Hex4HexNAc2dHex	Manα	$(Manα)_3Hex_1HexNAc_2dHex_1$	LO, F
1257	Hex5HexNAc2	Manα	$(Manα→)_4Hex_1HexNAc_2$	HI
1266	Hex2HexNAc3dHex2	Fuc	Fuc→$Hex_2HexNAc_3dHex_1$	HY, FC
1282	Hex3HexNAc3dHex	GlcNAcβ	GlcNAcβ→$Hex_3HexNAc_2dHex_1$	HY, F, N=H
1298	Hex4HexNAc3			HY
1378	Hex7HexNAc	Manα	$(Manα→)_6Hex_1HexNAc_1$	S
1403	Hex5HexNAc2dHex	Manα	$(Manα)_4Hex_1HexNAc_2dHex_1$	HF
1419	Hex6HexNAc2	Manα	$(Manα→)_5Hex_1HexNAc_2$	HI
1444	Hex4HexNAc3dHex	GlcNAcβ	GlcNAcβ→$Hex_4HexNAc_2dHex_1$	HY, F
1460	Hex5HexNAc3	GlcNAcβ	GlcNAcβ→$Hex_5HexNAc_2$	HY
1485	Hex3HexNAc4dHex	2×GlcNAcβ	$(GlcNAcβ→)_2Hex_3HexNAc_2dHex_1$	CO, F, N>H
1501	Hex4HexNAc4			CO, N=H
1540	Hex8HexNAc	Manα	$(Manα→)_7Hex_1HexNAc_1$	S
1565	Hex6HexNAc2dHex	Manα	$(Manα)_5Hex_1HexNAc_2dHex_1$	HF
1581	Hex7HexNAc2	Manα	$(Manα→)_6Hex_1HexNAc_2$	HI
1590	Hex4HexNAc3dHex2	Fucα	Fucα→$Hex_4HexNAc_3dHex_1$	HY, FC
1606	Hex5HexNAc3dHex	GlcNAcβ Galβ4	GlcNAcβ→$Hex_5HexNAc_2dHex_1$ Galβ4GlcNAc→$Hex_4HexNAc_2dHex_1$	HY, F
1622	Hex6HexNAc3	Manα GlcNAcβ Galβ4	Manα→$Hex_5HexNAc_3$ GlcNAcβ→$Hex_6HexNAc_2$ Galβ4GlcNAc→$Hex_5HexNAc_2$ Manα→[GlcNAcβ→]$Hex_5HexNAc_2$ Manα→[Galβ4GlcNAc→]$Hex_4HexNAc_2$	HY
1647	Hex4HexNAc4dHex	GlcNAcβ	GlcNAcβ→$Hex_4HexNAc_3dHex_1$	CO, F, N=H
1663	Hex5HexNAc4	2×Galβ4 GlcNAcβ	$(Galβ4GlcNAc→)_2Hex_3HexNAc_2$ GlcNAcβ→$Hex_5HexNAc_3$	CO
1688	Hex3HexNAc5dHex	3×GlcNAcβ	$(GlcNAcβ→)_3Hex_3HexNAc_2dHex_1$	CO, F, N>H
1702	Hex9HexNAc	Manα	$(Manα→)_8Hex_1HexNAc_1$	S
1743	Hex8HexNAc2	Manα	$(Manα→)_7Hex_1HexNAc_2$	HI
1768	Hex6HexNAc3dHex	Galβ4	Galβ4GlcNAc→$Hex_5HexNAc_2dHex_1$	HY, F

表11は次頁につづく

＊［Ｍ＋Ｎａ］$^+$イオン、第１同位体（ｆｉｒｓｔ　ｉｓｏｔｏｐｅ）。
§“→”は構造の残りの部分内の単糖への結合を表す；“［］”は構造内の分岐を表す。
#本発明の単糖組成に基づく好ましい構造群。ＨＩ、高マンノース；ＬＯ、低マンノース；Ｓ、可溶性マンノシル化；ＨＦ、フコシル化高マンノース；Ｇ、グルコシル化高マンノース；ＨＹ、ハイブリッド型または単分岐；ＣＯ、複合型；Ｆ、フコシル化；ＦＣ、複合フコシル化；Ｎ＝Ｈ、末端ＨｅｘＮＡｃ（ＨｅｘＮＡｃ＝Ｈｅｘ）；Ｎ＞Ｈ、末端ＨｅｘＮＡｃ（ＨｅｘＮＡｃ＞Ｈｅｘ）。

【０８２４】

【表１２】

提案された組成	m/z	α-Man	β-GlcNAc	β4-Gal	β3-Gal
Hex2HexNAc	568	---	---		
HexHexNAc2	609	+++			---
Hex2HexNAcdHex	714	+++			
Hex3HexNAc	730	-			
HexHexNAc2dHex	755	+++			
Hex2HexNAc2	771	++	++	-	-
Hex4HexNAc	892	---	---		
Hex2HexNAc2dHex	917	-	++	-	-
Hex3HexNAc2	933	++	++	-	-
HexHexNAc3dHex	958				
Hex2HexNAc3	974	+++		++	---
Hex5HexNAc	1054	---			
Hex3HexNAc2dHex	1079	--	++	-	-
Hex4HexNAc2	1095	--	+	-	-
Hex2HexNAc3dHex	1120	+++		+	---
Hex3HexNAc3	1136	++	---	++	--
Hex2HexNAc2dHex3	1209	---	---		
Hex6HexNAc	1216	---		+++	+++
Hex4HexNAc2dHex	1241	---			-
Hex5HexNAc2	1257	--			
Hex3HexNAc3dHex	1282	++	---	+	-
Hex4HexNAc3	1298	+++	+	-	-
Hex3HexNAc4	1339			+++	---
Hex7HexNAc	1378		+++	+++	
Hex5HexNAc2dHex	1403	---			-
Hex6HexNAc2	1419	--	+		
Hex3HexNAc3dHex2	1428	+++			
Hex4HexNAc3dHex	1444	++		-	-
Hex5HexNAc3	1460	+	--	+	-
Hex3HexNAc4dHex	1485		---	++	-
Hex4HexNAc4	1501	+	---	--	-
Hex8HexNAc	1540			---	-
Hex3HexNAc5	1542			+++	
Hex6HexNAc2dHex	1565	---			---
Hex7HexNAc2	1581	--			
Hex4HexNAc3dHex2	1590				
Hex5HexNAc3dHex	1606		--	--	-
Hex6HexNAc3	1622	--	--	--	-
Hex4HexNAc4dHex	1647		---		-
Hex5HexNAc4	1663		-	--	
Hex3HexNAc5dHex	1688		---	++	---
Hex4HexNAc5	1704			+++	
Hex8HexNAc2	1743	--			
Hex5HexNAc3dHex2	1752		---	---	
Hex6HexNAc3dHex	1768	--	--	--	
Hex7HexNAc3	1784	-		---	
Hex4HexNAc4dHex2	1793		---	++	---
Hex5HexNAc4dHex	1809		--	---	
Hex6HexNAc4	1825	+++	+++	--	
Hex4HexNAc5dHex	1850			+++	
Hex5HexNAc5	1866			---	---
Hex3HexNAc6dHex	1891			++	---
Hex9HexNAc2	1905	---			
Hex5HexNAc4dHex2	1955		---	--	-
Hex6HexNAc4dHex	1971		---	---	
Hex7HexNAc4	1987		---		---
Hex4HexNAc5dHex2	1996		---	+++	
Hex5HexNAc5dHex	2012		---	--	
Hex6HexNAc5	2028		-	---	-
Hex10HexNAc2	2067	---			-
Hex5HexNAc4dHex3	2101		-		
Hex6HexNAc4dHex2	2117			---	---
Hex7HexNAc4dHex	2133		---		---
Hex4HexNAc5dHex3	2142			---	---
Hex6HexNAc5dHex	2174		--	---	-
Hex5HexNAc7	2272			+++	
Hex5HexNAc5dHex3	2304		---	+++	
Hex6HexNAc5dHex2	2320		---	---	
Hex7HexNAc6	2393		--	---	
Hex6HexNAc5dHex3	2466			---	---
Hex7HexNAc6dHex	2539		---	---	
Hex8HexNAc7	2758			---	---

【０８２５】

【表１３】

提案された組成	m/z	β4-Gal	β-GlcNAc
Hex2HexNAc	568	-	---
HexHexNAc2	609	+++	
Hex3HexNAc	730		
Hex2HexNAc2	771		--
Hex4HexNAc	892		---
Hex2HexNAc2dHex	917		-
Hex3HexNAc2	933		-
Hex2HexNAc3	974	+++	
Hex5HexNAc	1054		
Hex3HexNAc2dHex	1079		
Hex4HexNAc2	1095		
Hex2HexNAc3dHex	1120	+++	
Hex3HexNAc3	1136	++	---
Hex2HexNAc2dHex3	1209	---	---
Hex6HexNAc	1216		
Hex4HexNAc2dHex	1241		
Hex5HexNAc2	1257		
Hex3HexNAc3dHex	1282	+	--
Hex4HexNAc3	1298		
Hex3HexNAc4	1339	+++	
Hex2HexNac2dHex4	1355	+++	
Hex7HexNAc	1378		
Hex5HexNAc2dHex	1403		
Hex6HexNAc2	1419		
Hex4HexNAc3dHex	1444	+	
Hex5HexNAc3	1460	++	-
Hex3HexNAc4dHex	1485	++	---
Hex4HexNAc4	1501	--	---
Hex8HexNAc	1540		
Hex3HexNAc5	1542	+++	
Hex6HexNAc2dHex	1565		
Hex7HexNAc2	1581		
Hex4HexNAc3dHex2	1590	+++	+++
Hex5HexNAc3dHex	1606	-	
Hex6HexNAc3	1622	--	-
Hex4HexNAc4dHex	1647		---
Hex5HexNAc4	1663	---	++
Hex3HexNAc5dHex	1688	++	---
Hex9HexNAc	1702	---	---
Hex4HexNAc5	1704	+++	---
Hex8HexNAc2	1743		
Hex5HexNAc3dHex2	1752	+++	
Hex6HexNAc3dHex	1768	-	
Hex7HexNAc3	1784	---	---
Hex4HexNAc4dHex2	1793	+++	
Hex5HexNAc4dHex	1809	---	+
Hex4HexNAc5dHex	1850		---
Hex3HexNAc6dHex	1891	++	---
Hex9HexNAc2	1905		
Hex5HexNAc4dHex2	1955	---	
Hex4HexNAc5dHex2	1996		---
Hex5HexNAc5dHex	2012	---	---
Hex6HexNAc5	2028	---	
Hex10HexNAc2	2067		
Hex5HexNAc4dHex3	2101		+
Hex6HexNAc5dHex	2174	---	
Hex7HexNAc6	2393	---	---
Hex7HexNAc6dHex	2539	---	---

【０８２６】

【表１４】

提案された組成	m/z	α-Man	β4-Gal	β-GlcNAc
Hex2HexNAc	568	---	-	---
HexHexNAc2	609	+++	-	---
Hex3HexNAc	730	--	-	
HexHexNAc2dHex	755	+++		---
Hex2HexNAc2	771	++	-	--
Hex4HexNAc	892	---	-	---
Hex2HexNAc2dHex	917	--	-	--
Hex3HexNAc2	933	-	-	--
Hex2HexNAc3	974	++	+	---
Hex5HexNAc	1054	---		
Hex3HexNAc2dHex	1079	---	-	--
Hex4HexNAc2	1095	--	-	-
Hex2HexNAc3dHex	1120	++	+	---
Hex3HexNAc3	1136	+	++	--
Hex6HexNAc	1216	--		
Hex4HexNAc2dHex	1241	---		
Hex5HexNAc2	1257	---		
Hex3HexNAc3dHex	1282		+	--
Hex4HexNAc3	1298	+		
Hex3HexNAc4	1339		++	---
Hex7HexNAc	1378	---		
Hex5HexNAc2dHex	1403	---		
Hex6HexNAc2	1419	--		
Hex3HexNAc3dHex2	1428	+++		
Hex4HexNAc3dHex	1444			
Hex5HexNAc3	1460		+	
Hex3HexNAc4dHex	1485		++	---
Hex4HexNAc4	1501		--	---
Hex8HexNAc	1540	---		---
Hex3HexNAc5	1542	+	++	---
Hex6HexNAc2dHex	1565	---		-
Hex7HexNAc2	1581	--		
Hex4HexNAc3dHex2	1590	---		++
Hex5HexNAc3dHex	1606	-	--	+
Hex6HexNAc3	1622	--	--	++
Hex4HexNAc4dHex	1647		--	---
Hex5HexNAc4	1663		---	+
Hex3HexNAc5dHex	1688		++	---
Hex4HexNAc5	1704		+++	
Hex8HexNAc2	1743	--		
Hex5HexNAc3dHex2	1752			+++
Hex6HexNAc3dHex	1768	-	--	+
Hex7HexNAc3	1784	---	--	
Hex4HexNAc4dHex2	1793		+	---
Hex5HexNAc4dHex	1809		---	
Hex6HexNAc4	1825	---	-	+
Hex4HexNAc5dHex	1850	---		---
Hex5HexNAc5	1866		---	---
Hex3HexNAc6dHex	1891	---	++	---
Hex9HexNAc2	1905	---		
Hex5HexNAc4dHex2	1955			++
Hex6HexNAc4dHex	1971		---	+
Hex7HexNAc4	1987		+++	
Hex4HexNAc5dHex2	1996			---
Hex5HexNAc5dHex	2012		---	---
Hex6HexNAc5	2028		---	
Hex10HexNAc2	2067	---		
Hex5HexNAc4dHex3	2101			+
Hex6HexNAc5dHex	2174		---	
Hex6HexNAc6	2231		---	---
Hex5HexNAc5dHex3	2304			---
Hex6HexNAc5dHex2	2320		---	---
Hex6HexNAc6dHex	2377		---	---
Hex7HexNAc6	2393		---	--
Hex6HexNAc5dHex3	2466			
Hex7HexNAc6dHex	2539		---	---
Hex8HexNAc6dHex4	3140		---	---

【０８２７】

［表１５］

実施例８も参照のこと。

骨髄由来間葉系幹細胞およびそれらに由来する骨原性細胞の抗体染色およびＦＡＣＳ分析のまとめ。

【０８２８】

【表１５】

記号	抗原	BM-MSC	陽性(%)	骨原性	陽性(%)	変化
GF274	L-セレクチン(CD34, GlyCAM-1, MAdCAM-1), スルホムチンと密接に関連するPNAd（末梢リンパ節アドレシン；CD62Lリガンド）	-	0%	-	0%	
GF275	CA15-3（癌抗原 15-3; MUC-1 糖タンパク質のシアル化炭水化物エピトープ）	+*	~50%	+	100%	
GF276	腫瘍胎児抗原、腫瘍関連糖タンパク質(TAG-72) または CA 72-4	-*	0%	+	~90%	↑↑
GF277	ヒトシアロシル-Tn 抗原(STn, sCD175)	(+)*	>50%	+	~90%	↑
GF278	ヒトTn抗原(Tn, CD175 BI.1)	(+)*	>50%	+	~80%	↑
GF295	血液型抗原前駆体 (BG1), Lewis c Gb3GN (pLN)	-	0%	-	0%	
GF280	TF-抗原アイソフォーム (Nemod TF2)	-*	0%	-	0%	
GF281	TF-抗原アイソフォーム (A68-E/E3)	-*	0%	-	0%	
GF296	アシアロガングリオシド GM1	-	0%	-	0%**	
GF297	グロボシドGL4	+	100%	+	~75%	
GF298	ヒトCD77 (= 血液型物質 pk), GB3	+	80-90%	+	~50%	
GF299	フォルスマン抗原、スフィンゴ糖脂質 (FO GSL) 分化抗原	-	0%	-	0%	
GF300	アシアロ GM2	-	0%	-	0%**	
GF301	Lewis b 血液型抗原	-*	0%	-	0%	
GF302	H 2 型血液型抗原	+*	~50%	+	<50%	
GF303	血液型H1(O) 抗原(BG4)	-*	0%	+	>50%	↑↑
GF288	グロボ-H	-*	0%	NT		
GF304	Lewis a	-	0%	-	**	
GF305	Lewis x, CD15, 3-FAL, SSEA-1, 3-フコシル-N-アセチルラクトサミン	(+/-)	<5%	-	0%	↓
GF306	シアリル Lewis a	-	0%	-	0%	
GF307	シアリルLewis x	+	~20%	(+/-)	<10%**	↓
GF353	SSEA-3 (段階特異的胚抗原-3)	+	~50%	(+/-)	~10%	↓↓
GF354	SSEA-4 (段階特異的胚抗原-4)	+*	~75%	-	<5%	↓↓
GF365	Nemod TF1, DC176, GalB1-3GalNAc	-	0%	-	0%	
GF374	グリコデリン A, GdA, PP14 (A87-D/F4)	(+/-)	<5%	-	0%	
GF375	グリコデリン A, GdA, PP14 (A87-D/C5)	-	0%	-	0%	
GF376	グリコデリン A, GdA, PP14 (A87-B/D2)	-	0%	-	0%	

＋　＝　陽性、（＋）＝　弱陽性、（＋／－）＝　単一陽性細胞、－　＝　陰性；ＮＴ＝試験されず；＊＝結果がＦＡＣＳ分析により確認された、＊＊＝特定の細胞バッチにおいてより高度な結合または結合細胞が観察され、本発明においてはこれらのマーカに関する。

【０８２９】

【表１６】

レクチン	標的	陽性細胞の％
FITC-GNA	α-Man	27.8
FITC-HHA	α-Man	95.3
FITC-PSA	α-Man	95.5
FITC-RCA	β-Gal (Galβ4GlcNAc)	94.8
FITC-PNA	β-Gal (Galβ3GalNAc)	31.1
FITC-MAA	α2,3-シアル化	89.9
FITC-SNA	α2,6-シアル化	14.3
FITC-PWA	I-抗原	1.9
FITC-STA	i-抗原	11.9
FITC-LTA	α-Fuc	2.8
FITC-UEA	α-Fuc	8.0

【０８３０】

【表１７】

		BM MSC							
		レクチン濃度 , μg/ml							
レクチン	標的	0,25	0,5	1	2,5	5	10	20	40
FITC-GNA	α-Man	-[1)]	-	++	++	++	++	++	++
FITC-HHA	α-Man	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
FITC-PSA	α-Man	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
FITC-RCA	β-Gal (Galβ4GlcNAc)	-	-	+/-	+/-	+	+	++	++
FITC-PNA	β-Gal (Galβ3GalNAc)	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+
FITC-MAA	α2,3-シアル化	-	-	-	+/-	+	++	++	++
FITC-SNA	α2,6-シアル化	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+
FITC-PWA	I-抗原	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-
FITC-STA	i-抗原	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-
FITC-LTA	α-Fuc	-	-	-	-	-	-	-	-
FITC-UEA	α-Fuc	-	-	-	+/-	+/-	+	++	++
FITC-MBL	α-Man/β-GlcNAc	-	-	-	-	-	-	+/-	+

[1)] 染色／標識の評価：＋＋＋　非常に強い、＋＋　強い、＋　弱い、＋／－　わずかに検出される、－　標識されない。

【０８３１】

［表１８］

各種固定化レクチン表面上で増殖させたＢＭ　ＭＳＣの結果のまとめ。増殖率＝３日目の細胞の数／１日目の細胞の数。３回の反復実験を計算に用いた。効果ｖｓ．プラスチック：「ｎ．ｇ．」＝増殖せず；「－」遅い増殖速度；「＋」＝プラスチック上よりも速い増殖速度；「（）」ほぼプラスチックと同等。

【０８３２】

【表１８】

被覆	増殖率	効果 vs. プラスチック
プラスチック	3.8	
RCA	1.0	n.g.
PSA	3.9	(+)
LTA	4.0	+
SNA	3.7	(-)
GS II	4.9	+
UEA	2.1	-
ECA	4.4	+
MAA	3.7	(-)
STA	3.1	-
PWA	4.2	+
WFA	2.9	-
NPA	3.6	(-)

【０８３３】

【表１９】

慣用名	末端エピトープ	hESC 1)	EB	st.3	CB CD34+ & CD133+	CB MNC	BM & CB MSC	脂肪／骨
LN I 型 , Le^c	Galβ3GlcNAc	N+ O+ L++	2) +/-	+/-	q	N+/- O+/- L+	q	
Lea	Galβ3(Fucα4)GlcNAc	L+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
H I 型	Fucα2Galβ3GlcNAc	L++	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Leb	Fucα2Galβ3(Fucα4)GlcNAc	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
シアリル Le^a	SAα3Galβ3(Fucα4)GlcNAc		+/-	+/-				
α3'-シアリル Le^c	SAα3Galβ3GlcNAc				+/-	+/-	+/-	+/-
LN 2 型	Galβ4GlcNAc	N++ O++ L+/-	+	+	N+ O+	N+ O+ L+	N++ O+ L++	N++
Le^x	Galβ4(Fucα3)GlcNAc	N++ O+/- L+/-	+/-	+/-	N+ O+	N+/- O+ L+/-	+/-	+/-
H 2 型	Fucα2Galβ4GlcNAc	N+ O+/- L+/-	+/-	+/-	N+	+/-	+/-	+/-
Le^y	Fucα2Galβ4(Fucα3)GlcNAc	+	+/-	+/-				
シアリル Le^x	SAα3Galβ4(Fucα3)GlcNAc	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
α3'-シアリルLN	SAα3Galβ4GlcNAc	N++ O+	N+	N+	N++ O+	N+ O+	N++ O+	N++
α6'-シアリルLN	SAα6Galβ4GlcNAc	N+	N++	N++	N+	N++	+/-	
コア 1	Galβ3GalNAcα	O+	+/-	+/-	O+	O+	O+	
H 3 型	Fucα2Galβ3GalNAcα	O+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
シアリルコア1	SAα3Galβ3GalNAcα	O+			O+	O+	O+	
ジシアリルコア1	SAα3Galβ3Saα6GalNAcα	O+			O+	O+	O+	
4 型鎖	Galβ3GalNAcβ	L+	+/-	+/-	+/-	L+	L+	
H 4 型	Fucα2Galβ3GalNAcβ	L+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
α3'-シアリル4型	SAα3Galβ3GalNAcβ	L++	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
LacdiNAc	GalNAcβ4GlcNAc	N+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Lac	Galβ4Glc	L+	q	q	q	L+	L+	
GlcNAcβ	GlcNAcβ	N+/- L+	q	q	N+	+/-	+/-	q
Tn	GalNAcα	q			q	q	O+	
シアリル Tn	SAα6GalNAcα						O+	
GalNAcβ	GalNAcβ	L+ N+	q	q	+/-	+/-	N+/- L+	
ポリ-LN, i	repeats of Galβ4GlcNAcβ3	+	q	q	+	+	++	q
ポリ-LN, I	Galβ4GlcNAcβ3(Galβ4GlcNAcβ6)Gal	L+	+/-	+/-	+/-	L+	L+	q

１）幹細胞および分化した細胞型は本文書の他の部分におけるものと同様に省略して示される；ｓｔ．３はステージ３に分化した、優先的にはニューロン型に分化した細胞を示す；ａｄｉｐｏ／ｏｓｔｅｏは、脂肪細胞または骨芽細胞方向にＭＳＣから分化した細胞を示す。

２）複合糖質における、ならびに／または特異的にＮ－グリカン（Ｎ）、Ｏ－グリカン（Ｏ）、および／もしくはスフィンゴ糖脂質（Ｌ）における、末端エピトープの生成。記号：ｑ、定量的データ；＋／－、低発現；＋、一般的；＋＋、多量。

【０８３４】

【表２０】

スフィンゴ糖脂質グリカン分類の例		中性グリカン			シアル化グリカン		
クラス	定義	hESC	MSC	CB MNC	hESC	MSC	CB MNC
Lac	$n_{Hex} = 2$	1	1	2	1		
Ltri	$n_{Hex} = 2$ および $n_{HexNAc} = 1$	18	33	12	25		
L1	$n_{Hex} = 3$ および $n_{HexNAc} = 1$	46	32	46	56		
L2	$3 \leq n_{Hex} \leq 4$ および $n_{HexNAc} = 2$	11	15	4	<1		
L3+	$i + 1 \leq n_{Hex} \leq i + 2$ および $n_{HexNAc} = i \geq 3$	1	7	3	1		
Gb	$n_{Hex} = 4$ および $n_{HexNAc} = 1$	20	1	1	16		
O	他の型	23	11	34	1	a)	
F	フコシル化, $n_{dHex} \geq 1$	43	12	7	1		
T	非還元末端 HexNAc, $n_{Hex} \leq n_{HexNAc} + 1$	27	47	12	26		
SA1	モノシアル化, $n_{Neu5Ac} = 1$				86		
SA2	ジシアル化, $n_{Neu5Ac} = 2$				14		
SP	硫酸化またはリン酸化, +80 Da				<1		

O-結合グリカン分類の例		中性グリカン			シアル化グリカン		
クラス	定義	hESC	MSC	CB MNC	hESC	MSC	CB MNC
O1	$n_{Hex} = 1$ および $n_{HexNAc} = 1$	a)			43		
O2	$n_{Hex} = 2$ および $n_{HexNAc} = 2$	53	a)		35	a)	
O3+	$n_{Hex} = i$ an および $n_{HexNAc} = i \geq 3$	13			13		
O	他の型	34			9		
F	フコシル化, $n_{dHex} \geq 1$	1	47	64	5	15	15
T	非還元末端 HexNAc, $n_{Hex} \leq n_{HexNAc} + 1$	12	a)		<1	a)	
SA1	モノシアル化, $n_{Neu5Ac} = 1$				39		
SA2	ジシアル化, $n_{Neu5Ac} = 2$				52		
SP	硫酸化またはリン酸化, +80 Da				8	21	

a）本定量的分析には含まれない

【０８３５】

【表２１】

中性スフィンゴ糖脂質グリカン#	CB MNC	CB MSC	hESC
L1	1§	2	1
L2	49	74	64
L3	7	10	12
L4	4	6	1
L5+	2	0.5	0.5
Gb	0.5	0.5	20
O	37	8	2
フコシル化	11	8	43
α1,2-Fuc	11	6	39
α1,3/4-Fuc	6	2	3
β1,4-Gal	89	72	4
β1,3-Gal	48	68	50
末端 HexNAc	10	27	27
酸性スフィンゴ糖脂質グリカン#	**CB MNC**	**CB MSC**	**hESC**
L1	1§	10	n.d.
L2	62	77	81
L3	26	6	0.5
L4	11	4	0.5
L5+	<0.5	0.5	0.5
Gb	-	0.5	16
O	-	2	<0.5
α-NeuAc	100	100	100
α2,3-NeuAc	97	86	81
フコシル化	4	2	1
β1,4-Gal	97	32	n.d.

略号：Ｌ１ないし６、スフィンゴ糖脂質グリカン型Ｌｉ、ここで、$n_{HexNAc}+1 \leqq n_{Hex} \leqq n_{HexNAc}+2$、および$i = n_{HexNAc}+1$；Ｇｂ，（イソ）グロ

ボペンタオース、ここで、n_{Hex}＝４およびn_{HexNAc}＝１；末端ＨｅｘＮＡｃ、Ｌ１ないし６における末端ＨｅｘＮＡｃ、ここで$n_{HexNAc}+1=n_{Hex}$；Ｏ、他の型；ｎ．ｄ．、決定されず。

§数値は検出された全グリカンシグナルの百分率を示す。

【０８３６】

［表２２］

ＢＭ　ＭＳＣおよびＯＢにおける、酸性Ｏ－グリカン成分の相対発現量。

【０８３７】

【表２２】

	BM MSC			OB
提案された組成	m/z	%	比較 MSC : OB	%
S2H2N3F1	1678	3,20	∞	0,00
S1H3N3	1403	1,96	∞	0,00
H7N2P2	1717	1,72	∞	0,00
H5N4P2	1799	1,04	∞	0,00
H6N2F1P1	1621	1,02	∞	0,00
H6N4P2	1961	0,99	∞	0,00
H3N3P1	1192	0,95	∞	0,00
S1H2N2F1	1184	0,90	∞	0,00
S1H3N2	1200	0,89	∞	0,00
H5N4F1P1	1865	0,86	∞	0,00
S2H3N3	1694	0,80	∞	0,00
H6N2P2	1555	0,78	∞	0,00
S1H6N3	1889	0,75	∞	0,00
H4N3P1	1354	0,73	∞	0,00
S1H4N2	1362	0,66	∞	0,00
S1H5N3	1727	0,64	∞	0,00
H5N4F1P1	1719	0,63	∞	0,00
S1H4N4	1768	0,58	∞	0,00
H4N3F1P1	1500	0,50	∞	0,00
S1H5N3F1	1873	0,13	∞	0,00
S1H4N3	1565	0,05	∞	0,00
S2H2N1F1	1475	6,62	23,4	0,28
S2H3N2F1	1637	4,81	4,15	1,16
H2N2P1	827	32,36	1,31	24,78
H2N2F1P1	973	1,59	0,80	1,99
S2H2N2	1329	9,40	0,56	16,73
S1H2N2	1038	19,28	0,49	39,67
S2H1N1	964	4,01	0,42	9,46
S1H2N2P1	1118	2,17	0,39	5,62
S1H3N3F1	1549	0,00	0	0,32

組成：Ｓ＝ＮｅｕＡｃ、Ｈ＝Ｈｅｘ、Ｎ＝ＨｅｘＮＡｃ、Ｆ＝ｄＨｅｘ（Ｆｕｃ）、Ｐ＝硫酸またはリン酸エステル

ｍ／ｚ：［Ｍ－Ｈ］－シグナルの質量－電荷比

比較：ＢＭ　ＭＳＣにおける％の、ＯＢにおける％に対する比率；１を超える値はＢＭ　ＭＳＣにおける過剰発現を示し、１未満の値はＯＢにおける過剰発現を示す；∞はＯＢにおいて発現が検出限界未満であったことを示す；０はＢＭ　ＭＳＣにおいて発現が検出限界未満だったことを示す。

【０８３８】

［表２３］

骨髄由来間葉系幹細胞（ＢＭ－ＭＳＣ）およびそれに由来する骨原性細胞（骨原性）の免疫組織化学染色（ＩＨＣ）およびＦＡＣＳ分析のまとめ。ＦＡＣＳの結果は細胞集団（ｎ＝１ないし３の個別の実験）内の陽性細胞の平均百分率として示す。トリプシンＦＡＣＳの結果は単一の実験からのものである。

【０８３９】

【表２３】

記号	抗原	BM-MSC IHC	BM-MSC FACS (%)	トリプシン FACS (%)	抗原性 IHC	抗原性 FACS (%)	トリプシン FACS (%)
GF274	L-セレクチン(CD34, GlyCAM-1, MAdCAM-1), スルホムチンと密接に関連するPNAd (末梢リンパ節アドレシン；CD62Lリガンド)	-	0,9	0,4	-	1,8	0,5
GF275	CA15-3 (癌抗原 15-3; MUC-1 糖タンパク質のシアル化炭水化物エピトープ)	+	46,5	57,9	+	79,1	14,1
GF276	腫瘍胎児抗原、腫瘍関連糖タンパク質(TAG-72) または CA 72-4	-	0,8	0,5	+	0,8	
GF277	ヒトシアロシル -Tn 抗原 (STn, sCD175)	(+)	7,3	0,4	+	1,0	0,7
GF278	ヒトTn 抗原(Tn, CD175 B1.1)	(+)	5,9	0,5	+	3,0	0,9
GF295	血液型抗抗原駆体(BG1), Lewis c Gb3GN (pLN)	-	9,6	0,7	-	2,7	1,0
GF280	TF-抗体アイソフォーム (Nemod TF2)	-	NT		-	NT	
GF281	TF-抗体アイソフォーム(A68-E/E3)	-	NT		-	NT	
GF296	アシアロガングリオシド GM1	-	22	1,1	-	48,2	1,1
GF297	グロボシド GL4	+	16,9	14,2	+	28,4	4,9
GF298	ヒトCD77 (= 血液型物質 pk), GB3	+	21,8	27,2	+	52,7	4,9
GF299	フォルスマン抗原、スフィンゴ糖脂質(FO GSL)分化抗原	-	4,1	0,4	-	5,5	0,4
GF300	アシアロGM2	-	17,1	0,9	-	53,8	1,7
GF301	Lewis b 血液型抗原	-	1,2		-	1,3	0,7
GF302	H 2 型血液型抗原	+	14,7	0,7	+	26,2	2,4
GF303	血液型 H1(O) 抗原 (BG4)	-	1,4	0,3	+	0,7	0,6
GF288	グロボ-H	-	NT		NT	NT	
GF304	Lewis a	-	13	1,7	-	23,4	1,4
GF305	Lewis x,CD15,3-FAL,SSEA-1,3-フコシル-N-アセチルラクトサミン	(+/-)	1	0,5	-	1,1	0,7
GF306	シアリルLewis a	-	4,9	0,8	-	2,7	0,7
GF307	シアリル Lewis x	+	82,1	70,4	(+/-)	55,7	33
GF353	SSEA-3 (段階特異的胚抗原-3)	+	33,8	6,8	(+/-)	6,2	0,8
GF354	SSEA-4 (段階特異的胚抗原-4)	+	77,2	53,7	-	34,0	2,4
GF365	Nemod TF1, DC176, GalB1-3GalNAc	-	3,8		-	1,1	0,8
GF374	グリコデリン A, GdA, PP14 (A87-D/F4)	(+/-)	0,9		-	0,3	0,6
GF375	グリコデリン A, GdA, PP14 (A87-D/C5)	-	2,4		-	0,6	0,8
GF376	グリコデリン A, GdA, PP14 (A87-B/D2)	-	3,4		-	0,6	0,6
GF393	Lewis y	-	NT		-	0,6	0,5
GF394	H 二糖	-	NT		-	0,5	1,2

＋　＝　陽性、（＋）＝　弱陽性、（＋／－）＝単一陽性細胞、－　＝　陰性；ＮＴ　＝　試験されず

【０８４０】

［表２４］

ＢＭ－ＭＳＣおよびそれに由来する骨原性細胞の細胞表面上のプロテアーゼ感受性グリカンエピトープ。結果は、ＦＡＣＳ分析における陽性細胞の百分率として示す。抗体に対する記号は表２５に記載の通りである。

【０８４１】

【表２４】

記号	抗原	BM-MSC ヴェルセン(%)	BM-MSC トリプシン(%)	骨原性 ヴェルセン(%)	骨原性 トリプシン(%)
GF275	CA15-3 (癌抗原15-3; MUC-1糖タンパク質のシアル化炭水化物エピトープ)			96,9	14,1
GF277	ヒトシアロシル -Tn抗原 (STn, sCD175)	4,0	0,4		
GF278	ヒトTn抗原(Tn, CD175 B1.1)	4,7	0,5		
GF295	血液型抗原前駆体 (BG1), Lewis c Gβ3GN (pLN)	4,4	0,7		
GF296	アシアロガングリオシド GM1	34,3	1,1	35,5	1,1
GF299	フォルスマン抗原 ,スフィンゴ糖脂質 (FO GSL) 分化抗原	4,1	0,4	6,7	0,4
GF300	アシアロガングリオシド GM2	19,4	0,9	55,3	1,7
GF302	H 2 型血液型抗原	6,0	0,7	23,3	2,4
GF304	Lewis a	14,3	1,7	10,4	1,4
GF306	シアリル Lewis a	5,9	0,8	1,3	0,7
GF307	シアリル Lewis x	82,1	70,4	62,3	33,0
GF354	SSEA-4 (段階特異的胚抗原 - 4)	77,2	53,7	21,4	2,4

【０８４２】

［表２５］
これらの実施例において用いられた一次抗グリカン抗体の詳細な情報。別の抗体クローンをイタリックで示す。
【０８４３】
【表２５－１】

記号	エピトープ	末端構造	会社	カタログ番号	クローン	宿主/クラス
GF 274	スルホ-ムチン, PNAD, MECA-79, CD62L, 伸長コア１	スルホ-ムチン	BD Pharmingen	553863	MECA-79	ラット/IgM
GF 275 GF 553	Ca15-3シアリル化エピトープ	SAα-ムチン	Acris	BM3359	695	マウス/IgG1
GF 276	TAG-72, CA 72-4, 癌糖タンパク質		Acris	DM288	B72.3	マウス/IgG1
GF 277 GF 372	シアロシル-Tn, sCD175	SA(α6)GalNAcαS/T	Acris	DM3197	B35.1	マウス/IgG1
GF 278 VPU008	Tn, CD175	GalNAcαS/T	Acris	DM3218	B1.1	マウス/IgM
GF 280	TF-抗原アイソフォーム, CD176	Gal(β3)GalNAc(α/β) (α 40x > β)	Glycotope	MAB-S301	Nemod TF2	マウス/IgM
GF 281	TF- 抗原アイソフォーム, CD176	Gal(β3)GalNAcβ	Glycotope	MAB-S305	A68-E/E3	マウス/IgG1
GF 285	H 2 型, Lewis b, Lewis y	Fuc(α2)Gal, Fuc(a2)Gal([β4)GlcNAc, Fuc(α2)Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	Acris	DM3014	B389	マウス/IgG1
GF 286	H 2 型, CD173	Fuc(α2)Gal(β4)GlcNAc	Acris	BM258P	BRIC 231	マウス/IgG1
GF 288 GF 403	グロボ -H	Fuc(α2)Gal(β3)GalNAc(β3)Gal(α4)Gal(β4)GlcβCer	Glycotope	MAB-S206	A69-A/E8	マウス/IgM
GF 295, GF 279 GF 555	Lewis c, pLN, Gal(β3)GlcNAc	Gal(β3)GlcNAcβ(3Lac)	Abcam	ab3352	K21	マウス/IgM
GF 296, GF 282 GF 427	アシアロGM1	Gal(β3)GalNAc(β4)Gal(β4)GlcβCer	Acris	BP282	ポリクローナル	ウサギ
GF 297, GF 366 VPU001	グロボシド Gb4, GL4, グロボトラオース	GalNAc(β3)Gal(α4)Gal(β4)GlcβCer	Abcam	ab23949	ポリクローナル	ウサギ/IgG
GF 298 GF 367	グロボシド Gb3, グロボトリオース, CD77, 血液型 pk	Gal(α4)Gal(β4)GlcβCer	Acris	SM1160P	38-13	ラット/IgM
GF 299, GF 401 GF 554	フォルスマン抗原, スフィンゴ糖脂質	GalNAc(α3)GalNAc(β4)Gal(α4)Gal(β4)GlcβCer, GalNAc(α3)GalNAcβ-R	Acris	BM4091	FOM-1	ラット/IgM
GF 300 GF 428	アシアロ GM2	GalNAc(β4)Gal(β4)GlcβCer	Acris	BP283	ポリクローナル	ウサギ
GF 301, GF 283 VPU004	Lewis b	Fuc(α2)Gal(β3)[Fuc(α4)]GlcNAc	Acris	SM3092P DM3122	2-25LE	マウス/IgG1

表25は次頁につづく

【０８４４】

【表２５－２】

			Acris	DM3015	B393	マウス/IgM
GF 302 GF 284	H２型	Fuc(α2)Gal(β4)GlcNAc				
GF 303 GF 287	H１型，血液型抗原 H1	Fuc(α2)Gal(β3)GlcNAc	Abcam	ab3355	17-206	マウス/IgG3
GF 304 GF 429	Lewis a	Gal(β3)[Fuc(α4)]GlcNAc	Chemicon *Abcam* *Genetex*	CBL205 *Ab3967* *Ab3356* *GTX28602*	PR5C5 *7LE* *1174* *B369*	マウス/IgG1
GF 305	Lewis x, CD15, SSEA-1	Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	Chemicon	CBL144	28	マウス/IgM
GF 306, GF 430 VPU002	シアリル Lewis a	SA(α3)Gal(β3)[Fuc(α4)]GlcNAc	Chemicon *Invitrogen* *BioGenex*	MAB2095 *18-7240* *MU424-UC*	KM231 *116-NS-19-9* *C241.5.1.4*	マウス/IgG1
	シアリル *Lewis a, c*		*Seikagaku*	*270443*	*2D3*	マウス/*IgM*
GF 307	シアリル Lewis x	SA(α3)Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	Chemicon	MAB2096	KM93	マウス/IgM
GF 353 GF 431	SSEA-3, ガラクトシルグロボシド	Gal(β3)GalNAc(β3)Gal	Chemicon	MAB4303	MC-631	ラット/IgM
GF 354， GF 432 VPU003	SSEA-4, シアリルガラクトシルグロボシド	SA(α3)Gal(β3)GalNAc(β3)Gal	Chemicon	MAB4304	MC-813-70	マウス /IgG3
GF 355	Gal(α3)Gal	Gal(α3)Gal	Chemicon	AB2052		ヒト
GF 365	TF-アイソフォーム抗原, CD176	Gal(β3)GalNAc(α/β) (α 10x > β)	Glycotope	MAB-S302	Nemod TF1	マウス/IgM
GF 368	LacdiNAc	GalNAc(β4)GlcNAc	LUMC (Leiden Univ Medical Center)	anti-LDN mAb	259-2A1	IgG3
GF 369	LacdiNAc	GalNAc(β4)GlcNAc	LUMC (Leiden Univ Medical Center)	anti-LDN mAb	273-3F2	IgM
GF 370	α3-Fuc-LacdiNAc	GalNAc(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	LUMC (Leiden Univ Medical Center)	anti LDN-F mAb	290-2E6	IgM
GF 371	α3-Fuc-LacdiNAc	GalNAc(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	LUMC (Leiden Univ	anti LDN-F mAb	291-3E9	IgM

表25は次頁につづく

【０８４５】

【表２５－３】

			Medical Center)			
GF 374	グリコデリンA, アイソフォーム	LacdiNAc	Glycotope	MAB-S901	A87-D/C5	マウス/IgG1, IgG2b,IgM
GF 375	グリコデリンA, アイソフォーム	LacdiNAc	Glycotope	MAB-S902	A87-D/F4	マウス/IgG1
GF 376	グリコデリンA, アイソフォーム	LacdiNAc	Glycotope	MAB-S903	A87-B/D2	マウス/IgG1
GF 377 GF 373	PN-15 腎 gp200, 癌糖タンパク質		Acris	DM3184P	PN-15	マウス/IgG1
GF 393 GF 289	Lewis y, CD174	Fuc(α2)Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAcβ	Glycotope	MAB-S201	A70-C/C8	マウス/IgM
GF 394 GF 290	H二糖	Fuc(α2)Galβ	Glycotope	MAB-S204	A51-B/A6	マウス/IgA
GF 406 GF 558	GD2	GalNAc(β4)(SA(α8)SA)(α3)Gal(β4)Glc	Chemicon	MAB4309	VIN-2PB-22	マウス/IgM
GF 407 GF 559	GD3	SA(α8)SA(α3)Gal(β4)Glc	Chemicon	MAB4308	VIN-IS-56	マウス/IgM
GF 408	血液型抗原 A-b45.1 (A1, A2)	GalNAc(α3)Fuc(α2)Galβ	Acris	DM3108	B480	マウス/IgG1
GF 409	血液型 A (A3,Ax,A3B,AxB)		Acris	BM255	HE-195	マウス/IgM
GF 410	血液型 ABH		Acris	SM3004	HE-10	マウス/IgM
GF 411	血液型 B (分泌型)		Acris	BM256	HEB-29	マウス/IgM
GF 412	血液型抗原 B (一般)		Acris	DM3012	B460	マウス/IgM
GF 413	Gal(α3)Gal	Gal(α3)Gal(β4)GlcNAc-R	Alexis Biochemicals	ALX-801-090	M86	マウス/IgM
GF 414 GF 556	TRA-1-81 抗原		Chemicon	MAB4381	TRA-1-81	マウス/IgM
GF 415 GF 557	TRA-1-60 抗原		Chemicon	MAB4360	TRA-1-60	マウス/IgM
GF 416	マンノース	Man				マウス/IgM
GF 418	グロボ-H	Fuc(α2)Gal(β3)GalNAc(β3)Gal(α4)Gal(β4)GlcβCer	Alexis biochemicals	ALX-804-550-C050	MBr1	マウス/IgM
GF 515	CD15, Lewis x	Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	BD Pharmingen	557895	W6D3	マウス/IgG1, κ

表25は次頁につづく

【０８４６】

【表２５－４】

GF 516	sCD15, シアリル Lewis x	SA(α3)Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	BD Pharmingen	551344	CSLEX1	マウス /IgM, κ
GF 517	CD15, Lewis x	Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	Abcam	ab34200	TG-1	マウス /IgM
GF 518	SSEA-1	Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	Abcam	ab16285	MC480	マウス /IgM
GF 525	CD15, 220 kD タンパク質と反応する	Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	Abcam	ab17080	MMA	マウス /IgM
GF 526	PSGL-1, コア 2 O-グリカン上の sLex	SA(α3)Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	R&D Systems	MAB996	CHO131	マウス /IgM
GF 621	GD3	SA(α8)SA(α3)Gal(β4)Glc	BD Pharmingen	554274	MB3.6	マウス /IgG3
GF 622	GD2	GalNAc(β4)(SA(α8)SA)(α3)Gal(β4)Glc	BD Pharmingen	554272	14.G2a	マウス /IgG2
GF 623	GT1b		US Biological	G2006-90A	3C96	マウス /IgM
GF 624	GD1b		US Biological	G2004-90B	2S1	マウス /IgG3
GF 625	GD2	GalNAc(β4)(SA(α8)SA)(α3)Gal(β4)Glc	US Biological	G2205-02	2Q549	マウス /IgG2
GF 626	GD3	SA(α8)SA(α3)Gal(β4)Glc	Covalab	mab0014	4F6	マウス /IgG3
GF 627	OAcGD3		US Biological	G2005-67	4i283	マウス /IgG3
GF 628	A2B5		Chemicon	MAB312R	A2B5-105	マウス /IgM
VPU005	GD3	SA(α8)SA(α3)Gal	Seikagaku	270554	S2-566	マウス /IgM
VPU006	Tn 抗原, CD175	GalNAcαS/T	Abcam	ab31775	0.BG.12	マウス /IgG
VPU007	シアリル Tn, sCD175	SA(α6)GalNAcαS/T	Abcam	ab24005	BRIC111	マウス /IgG
VPU009	SSEA-3, ガラクトシルグロボシド	Gal(β3)GalNAc(β3)Gal	R&D Systems	MAB1434	MC-631	ラット/IgM
	GlcNAcβ1-6R		*Jeffersson medical college*	*FE-J1*		マウス/*IgM*
	Galβ1-4GlcNAcβ1-3R		*Jeffersson medical college*	*FE-A5*		マウス/*IgM*
	Galβ1-4GlcNAcβ1-6R		*Jeffersson medical college*	*FE-A6*		マウス/*IgM*

【０８４７】

［表２６］

間葉系幹細胞（ＭＳＣ）ならびに骨原性（ＯＧ）および脂質生成（ａｄｉｐｏ）系統に分化した細胞のフローサイトメトリ（ＦＡＣＳ）および免疫組織化学（ＩＨＣ）分析

【０８４８】

【表２６－１】

記号	慣用名	構造	末端エピトープ	BM-MSC[1] FACS(%±SD) IHC[1]	BM-OG FACS(%±SD) IHC	CB-MSC FACS(%±SD)	CB-OG FACS(%)	CB-Adipo FACS(%)
GF416	マンノース		Man	0,8±0,42	13,2	2,90±2,8	8.60	34,9
GF278 VPU008	Tn	S/T	GalNAcαS/T	5,9±1,7 +	2,95±2,6 ++	2,43±2,75	0,70	1,8
VPU006	Tn抗原, CD175	S/T	GalNAcαS/T	0,9±0,35	ND	0,6±0,17	0,5	0,6
VPU007	シアリルTn, sCD175	S/T	SAα6GalNAcαS/T	1,3±0,28	ND	0,5±0,17	0,8	1
GF277	シアロシル-Tn	S/T	SAα6GalNAcαS/T	7,3±4,67 +	0,95±0,21 ++	2,63±1,6	0,8	5,7
GF276	TAG-72, CA 72-4	S/T	シアリル-Tnを有したTAG-72、癌糖タンパク質	0,75±0,36 -	0,75±0,64 ++	0,90±0,28	0,6	0,6
GF280	TF-抗原		Galβ3GalNAcα/β (α 40x > β)	5 -	ND -	1,97±1,65	0,7	0,8
GF281	TF-抗原		Galβ3GalNAcβ	1,3 -	ND -	6,2±7,3	0,9	2,5
GF365	TF-抗原		Galβ3GalNAcα/β (α 10x > β)	2,95±1,2 -	1,1 -	4,25±4,2	1,4	11,6
GF274	MECA-79,スルホ-ムチン, PNAD	SO3	Sulfo-ムチン	0,9 -	1,8±0,14 -	2,4±2,3	1,1	1,7
GF275 GF553	Ca15-3シアル化エピトープ		SAα-ムチン	46,5±38,0 ++	79,1±25,2 +++	2,0±0,0	6,9	30,8
GF374	グリコデリン A		N-グリカン/LacdiNAc	0,9±0,0 +/-	0,3 -	1,80±1,3	0,9	0,9
GF375	グリコデリン A		N-グリカン/LacdiNAc	1,9±0,71 -	0,6 -	5,85±6,9	0,8	1,0
GF376	グリコデリン A		N-グリカン/LacdiNAc	3,4 -	0,6 -	2,2±0,85	1,8	1,4
GF413	Galα3Gal		Galα3Galβ4GlcNAc	0,9±0,42	0,8	7,45±3,9	0,7	1,7
GF295 GF555	Lewis c		pLN, Galβ3GlcNAc	9,6±7,4 -	2,7±2,5 -	7,15±2,8	1,9	17,2

表26は次頁につづく

【０８４９】

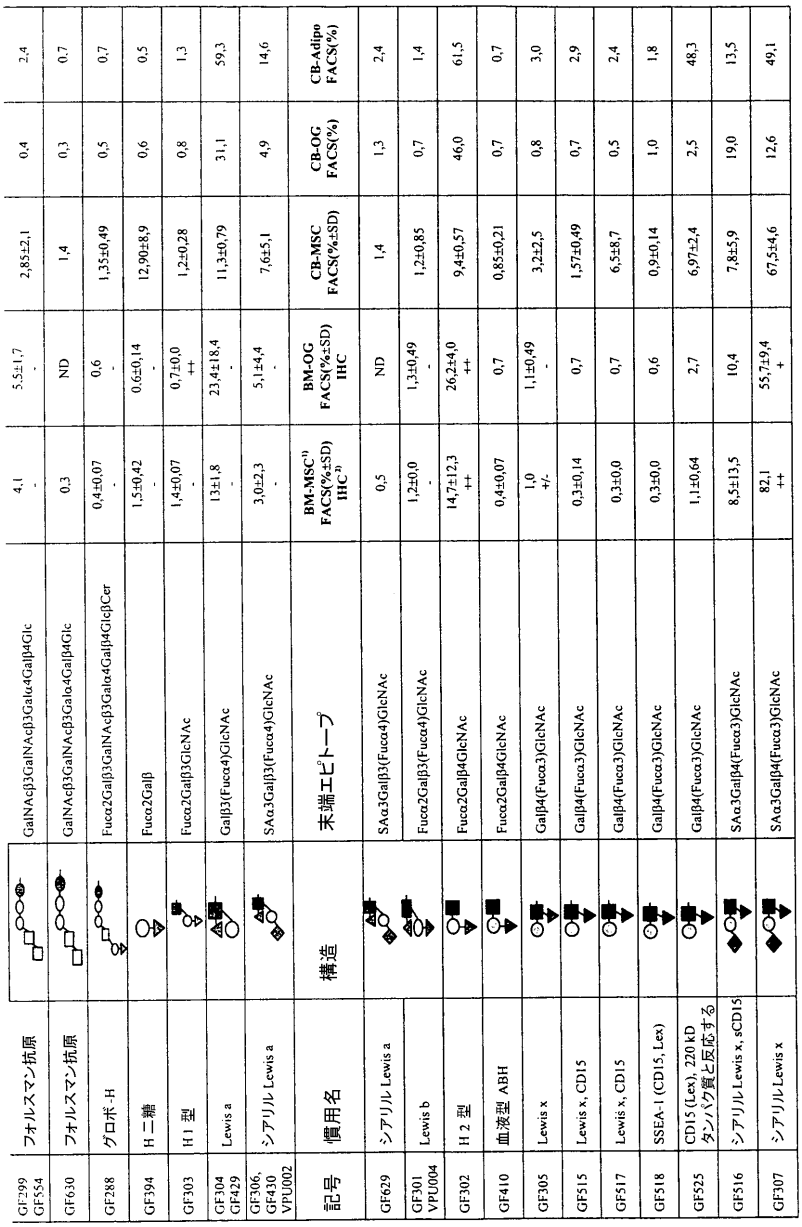
【表２６－２】

記号	慣用名	構造							
GF300 GF428	アシアロGM2		GalNAcβ4Galβ4GlcβCer	17,1±3,3 -	53,8±2,1 -	7,40±3,4	47,9	63,4
GF296 GF427	アシアロGM1		Galβ3GalNAcβ4Galβ4GlcβCer	22±17,4 -	48,2±18,0 -	10,30±6,8	44,5	66,1
GF624	GD1b			3,5±0,35	ND	7,4±8,3	10,7	22,2
GF623	GT1b			30,7±10,5	ND	20,85±15,9	72,7	74,3
記号	慣用名	構造		BM-MSC[1] FACS(%±SD) IHC[2]	BM-OG FACS(%±SD) IHC	CB-MSC FACS(%±SD)	CB-OG FACS(%)	CB-Adipo FACS(%)
GF406 GF558	GD2		GalNAcβ4(SAα8SAα3)Galβ4Glc	0,9±0,71	1,2	7,45±7,6	1,4	20,6
GF622	GD2		GalNAcβ4(SAα8SAα3)Galβ4Glc	50,8±4,45	ND	5,25±0,64	91,5	97,3
GF625	GD2		GalNAcβ4(SAα8SAα3)Galβ4Glc	44,2±0,42	ND	7,2±0,57	92,1	95,7
GF407 GF559	GD3		SAα8SAα3Galβ4Glc	0,8	ND	4,75±0,92	1,4	58,3
GF621	GD3		SAα8SAα3Galβ4Glc	18,4±7,2	ND	2,8±2,1	89,4	99
GF626	GD3		SAα8SAα3Galβ4Glc	2,9±0,64	ND	1,95±0,6	4,1	41,5
VPU005	GD3		SAα8SAα3Gal	27,5±4,45	29,9	10,1±1,84	98,0	99,8
GF627	OAcGD3	Ac	アセチル-SAα8SAα3Galβ4Glc	0,6±0,14	ND	1,35±0,78	0,8	0,7
GF628	A2B5			27,6±11,0	ND	37,2±15,0	58	81
GF298	Gb3		Galα4Galβ4GlcβCer	21,8 +++	52,7±2,3 ++	6,15±0,92	5,8	6,1
GF297 VPU001	グロボシドGL4		GalNAcβ3Galα4Galβ4GlcβCer	16,9 +++	28,4 ++	9,75±4,2	30,1	61,2
GF353 GF431	SSEA-3		Galβ3GalNAcβ3Gal	3,4±2,26 ++	6,2±3,3 +	1,95±1,5	0,9	1,2
VPU009	SSEA-3		Galβ3GalNAcβ3Gal	11,9±8,5	ND	75,75±2,8	38,3	71,7
GF354, GF432 VPU003	SSEA-4		SAα3Galβ3GalNAcβ3Galα4Galβ4Glc	58,3±23,6 +++	26,5±18,0 +/-	59,8±0,57	32,6	80,5

表26は次頁につづく

【０８５０】

【表２６－３】



GF299 GF554	フォルスマン抗原		GalNAcβ3GalNAcβ3Galα4Galβ4Glc	4,1 -	5,5±1,7 -	2,85±2,1	0,4	2,4
GF630	フォルスマン抗原		GalNAcβ3GalNAcβ3Galα4Galβ4Glc	0,3	ND	1,4	0,3	0,7
GF288	グロボ-H		Fucα2Galβ3GalNAcβ3Galα4Galβ4GlcβCer	0,4±0,07 -	0,6 -	1,35±0,49	0,5	0,7
GF394	H ニ糖		Fucα2Galβ	1,5±0,42 -	0,6±0,14 -	12,90±8,9	0,6	0,5
GF303	H1 型		Fucα2Galβ3GlcNAc	1,4±0,07 -	0,7±0,0 ++	1,2±0,28	0,8	1,3
GF304 GF429	Lewis a		Galβ3(Fucα4)GlcNAc	13±1,8 -	23,4±18,4 -	11,3±0,79	31,1	59,3
GF306, GF430 VPU002	シアリル Lewis a		SAα3Galβ3(Fucα4)GlcNAc	3,0±2,3 -	5,1±4,4 -	7,6±5,1	4,9	14,6
記号	慣用名	構造	末端エピトープ	BM-MSC[1] FACS(%±SD) IHC[2]	BM-OG FACS(%±SD) IHC	CB-MSC FACS(%±SD)	CB-OG FACS(%)	CB-Adipo FACS(%)
GF629	シアリル Lewis a		SAα3Galβ3(Fucα4)GlcNAc	0,5	ND	1,4	1,3	2,4
GF301 VPU004	Lewis b		Fucα2Galβ3(Fucα4)GlcNAc	1,2±0,0 -	1,3±0,49 -	1,2±0,85	0,7	1,4
GF302	H2 型		Fucα2Galβ4GlcNAc	14,7±12,3 ++	26,2±4,0 ++	9,4±0,57	46,0	61,5
GF410	血液型 ABH		Fucα2Galβ4GlcNAc	0,4±0,07 -	0,7	0,85±0,21	0,7	0,7
GF305	Lewis x		Galβ4(Fucα3)GlcNAc	1,0 +/-	1,1±0,49 -	3,2±2,5	0,8	3,0
GF515	Lewis x, CD15		Galβ4(Fucα3)GlcNAc	0,3±0,14	0,7	1,57±0,49	0,7	2,9
GF517	Lewis x, CD15		Galβ4(Fucα3)GlcNAc	0,3±0,0	0,7	6,5±8,7	0,5	2,4
GF518	SSEA-1 (CD15, Lex)		Galβ4(Fucα3)GlcNAc	0,3±0,0	0,6	0,9±0,14	1,0	1,8
GF525	CD15 (Lex), 220 kD タンパク質と反応する		Galβ4(Fucα3)GlcNAc	1,1±0,64	2,7	6,97±2,4	2,5	48,3
GF516	シアリル Lewis x, sCD15		SAα3Galβ4(Fucα3)GlcNAc	8,5±13,5	10,4	7,8±5,9	19,0	13,5
GF307	シアリル Lewis x		SAα3Galβ4(Fucα3)GlcNAc	82,1 ++	55,7±9,4 +	67,5±4,6	12,6	49,1

表26は次頁につづく

【０８５１】

【表２６－４】

GF526	PSGL-1, コア２ O-グリカン上の sLex		SAα3Galβ4(Fucα3)GlcNAc	90,8±1,5	97,5	99,7±0,12	98,6	99,9
GF393	Lewis y		Fucα2Galβ4(Fucα3)GlcNAcβ	0,3±0,0	0,6±0,0	1,15±0,92	1,0	0,8
GF408	血液型抗原 A:(A1,A2)		GalNAcα3(Fucα2)Galβ3GlcNAc	0,4±0,21	0,6	1,40±0,85	0,7	3,0
GF409	血液型A: (A3,Ax,A3B,AxB)		GalNAcα3(Fucα2)Galβ3GlcNAc	0,3±0,0	0,5	0,95±0,07	0,6	1,4
GF411	血液型B(分泌型)		Galα3(Fucα2)Galβ3GlcNAc	0,8±0,57	0,8	5,0±2,7	2,1	13,5
GF412	血液型B(一般)		Galα3(Fucα2)Galβ3GlcNAc	3,3±2,6	3,0	7,95±0,07	18,2	58,9
GF414 GF556	TRA-1-81抗原		ボドカリキシン中のケラタン硫酸	11,6±13,8	ND	12,0±0,71	10,4	69,7
GF415 GF557	TRA-1-60抗原		ボドカリキシン中のシアル化ケラタン硫酸	8,2±10,6	2,6	10,9±5,8	2,0	25,2
GF377	PN-15 腎 gp200			ND	ND	5,35±3,0	2,8	40,4

１）骨髄／臍帯血由来間葉系幹細胞（ＢＭ／ＣＢ－ＭＳＣ）、ＭＳＣから分化した骨原性または脂質生成細胞（ＯＧ／ａｄｉｐｏ）；
２）ＩＨＣに対する記号：－、陰性；＋／－、時々の低発現；＋、低発現；＋＋、一般的；＋＋＋多量。

【０８５２】
［表２７］
構造分析および結合剤特異性に基づくＭＳＣ結合剤標的表。用語の説明は脚注１）および２）を参照のこと。
【０８５３】

【表２７－１】

慣用名	末端エピトープ	CB MSC	BM MSC	adipo diff.	osteo diff.	chondro diff.
LN 1 型 , Lec	Galβ3GlcNAcβ	+ L+	+ L+	+ Lq	+/- L+	q Lq
	Lecβ3Galβ4Glc[NAc]β	+/-	+/-	q	+/-	q
Lea	Galβ3(Fucα4)GlcNAcβ	+ L+/-	+ L+/-	++	+ L+/-	
	Leaβ3Galβ4Glc[NAc]β	+/-	+/-		+/-	
H 1 型 , H1	Fucα2Galβ3GlcNAcβ	+/- L+	+/- L+	+/-	+/- L+	
	H1β3Galβ4Glc[NAc]β	+/-	+/-		+/-	
Leb	Fucα2Galβ3(Fucα4)GlcNAcβ	+/-	+/-	+/-	+/-	
シアリル Lea, sLea	SAα3Galβ3(Fucα4)GlcNAcβ	+/- L+	+/- L+	++	+ L+	
	sLeaβ3Galβ4Glc[NAc]β	+/-	+/-		+/-	
α3'-シアリル Lec	SAα3Galβ3GlcNAcβ	+/- Lq	+/- Lq	++ Lq	+ Lq	q
LN 2 型 , LN	Galβ4GlcNAcβ	+ N+ O+ Lq	++ N++ O+ Lq	+ N+ O+ Lq	++ N++ O+ Lq	+ N+ O+ Lq
	LNβ2Manα3/6	+	++	+	++	+
	LNβ4Manα3	+/-	+/-	+	++	+
	LNβ2Manα3(LNβ2Manα6)Man	+	+	+	+	+
	LNβ2(LNβ4)Manα3(LNβ2Manα6)Man	q	q	q	++	q
	LNβ6(R-Galβ3)GalNAc	+	+	+	+	+
	LNβ3Galβ4Glc[NAc]β	q	q	q	q	q
	LNβ6(R-GlcNAcβ3)Galβ4Glc[NAc]β	q	q		q	
	LNβ3(R-GlcNAcβ6)Galβ4Glc[NAc]β	q	q		q	
	LNβ3(LNβ6)Galβ4Glc[NAc]β	q	q		q	
Lex	Galβ4(Fucα3)GlcNAcβ	+/- L-	+ L-	+	+/- L-	q
	Lexβ2Manα3/6	q	q	q	q	q
	Lexβ6(R-Galβ3)GalNAc	q	q	q	q	
	Lexβ3Galβ4Glc[NAc]β	q	q	++	q	
	Lexβ2Manα3(Lexβ2Manα6)Man	q	q	q	q	
H 2 型 , H2	Fucα2Galβ4GlcNAcβ	+ L+ Nq	+/- L+ Nq	++ Nq	+ L+ Nq	q
	H2β2Manα3/6	q	q	q	q	
	H2β3Galβ4Glc[NAc]β	+	+		+	
Ley	Fucα2Galβ4(Fucα3)GlcNAcβ	+/- L+	+/- L+	+/-	+/- L+	
	Leyβ3Galβ4Glc[NAc]β	q	q		q	
シアリル Lex, sLex	SAα3Galβ4(Fucα3)GlcNAcβ	++ O++ L-	++ O++ L-	++ O++	++ O++ L-	q
	sLexβ2Manα3/6	q	q	q	q	
	sLexβ6(R-Galβ3)GalNAc	++	++	++	++	
	sLexβ3Galβ4Glc[NAc]β	+	+	+	+/-	
α3'-シアリル LN, s3LN	SAα3Galβ4GlcNAcβ	+ N+ O+ Lq	+ N+ O+ Lq	+ N+ O+ Lq	+ N+ O+ Lq	+ N+ O+ Lq
	s3LNβ2Manα3/6	+	+	+	+	+
	s3LNβ4Manα3	+/-	+/-	+	++	+

表27は次頁につづく

【０８５４】

【表２７－２】

	s3LNβ2Manα3(s3LNβ2Manα6)Man	+	+	+	+	+
	s3LNβ6(R-Galβ3)GalNAc	+	+	+	+	+
	s3LNβ3Galβ4Glc[NAc]β	+	+	+	+	+
	s3LNβ6(R-GlcNAcβ3)Galβ4Glc[NAc]β	q	q		q	
	s3LNβ3(R-GlcNAcβ6)Galβ4Glc[NAc]β	q	q		q	
α6'-シアリル LN, s6LN	SAα3Galβ4GlcNAcβ	q Nq	q Nq	q Nq	q Nq	q Nq
	s6LNβ2Manα3/6	q	q	q	q	q
	s6LNβ4Manα3	q	q	q	q	q
	s6LNβ2Manα3(s6LNβ2Manα6)Man	q	q	q	q	q
	s6LNβ3Galβ4Glc[NAc]β	-	-	-	-	-
コア 1	Galβ3GalNAcα	+/-	+/-	+/-	+/-	q
H3 型	Fucα2Galβ3GalNAcα	-	-	-	-	-
シアリルコア1	SAα3Galβ3GalNAcα	+	+	+	q	q
ジシアリルコア1	SAα3Galβ3Saα6GalNAcα	+	+	+	q	q
4 型鎖	Galβ3GalNAcβ	+/- L+	+/- L+	++	+/- L+	q
アシアロ-GM1	Galβ3GalNAcβ4Galβ4Glc	+/-	+	++	++	
Gb5, "SSEA-3"	Galβ3GalNAcβ3Galα4Galβ4Glc	+	+/-	+	+/-	
H4 型 ,"グロボH"	Fucα2Galβ3GalNAcβ	q L+/-	q L+/-	+/-	q L+/-	
α3'-シアリル 4 型	SAα3Galβ3GalNAcβ	++ L+	++ L+	q	+ L+	q
"SSEA-4"	SAα3Galβ3GalNAcβ3Galα4Galβ4Glc	++	++	++	+	q
GalNAcβ	GalNAcβ	+/-	+	++	++	q
アシアロ -GM2	GalNAcβ4Galβ4Glc	+/-	+	++	++	
Gb4	GalNAcβ3Galα4Galβ4Glc	+	+		++	
LacdiNAc	GalNAcβ4GlcNAcβ					
Galα	Galβ4Glc	+/-	+/-	+/-	+/-	q
Gb3	Galα4Galβ4Glc	+	+	+	++	q
Lac	Galβ4Glc	q	q	q	q	q
GalNAcα, "Tn"	GalNAcα	+/-	+/-	+	q	q
フォルスマン	GalNAcα3GalNAcβ	+/-	q	q	q	
シアリル Tn	SAα6GalNAcα	+/-	q	+	q	q
オリゴシアル酸	NeuAcα8NeuAcα	+ L+	+ L+	++ L++	++ L++	q
GD3	NeuAcα8NeuAcα2Galβ4Glc	+	+	++	++	
GD2	NeuAcα8NeuAcα2(GalNAcβ4)Galβ4Glc	++	+	++	++	
GD1b	NeuAcα8NeuAcα2(Galβ3GalNAcβ4)Galβ4Glc	+/-	q	++	+/-	
GT1b	SAα8SAα2(Saα3Galβ3GalNAcβ4)Galβ4Glc	+	+	++	++	
Manα	Manα	++	++	++	++	++
	Manα2Manα	++	++	+	+	+
	Manα3Manα6/β4	+	+	++	+	++
	Manα6Manα6/β4	+	+	++	+	++
	Manα3(Manα6)Manα6/β4	+	+	++	+	++
	Manα3(Manα6)Manβ4GlcNAc[β4GlcNAc]	N+/-	N+/-	N++	N+	Nq
Manβ	Manβ	+/-	+/-	+	+/-	+
	Manβ4GlcNAc	+/-	+/-	+	+/-	+
Glcα	Glcα	+	+	+/-	+/	+/
	Glcα3Manα	+	+	+/	+/	+/
	Glcα2Glcα3[Glcα3Manα]	+/-	+/-	+/	+/	+/
コア-Fuc	Fucα6GlcNAc	N+	N+	N+	N+/-	N+
	Fucα6(R-GlcNAcβ4)GlcNAc	+	+	+	+/-	+
GlcNAcβ, Gn	GlcNAcβ	+ N+	+ N+	+ N+	+/- Nq	+/- Nq
	Gnβ2Manα3/6	+	+	+	q	q
	Gnβ4Manα3	+	+	q		
	Gnβ2Manα3(Gnβ2Manα6)Man	+	+	q	q	q
	Gnβ4Gn	q	q	q	q	q
	Gnβ4(Fucα6)Gn	q	q	q	q	q
	Gnβ6(R-Galβ3)GalNAc	-	-	-	-	-
	Gnβ3Galβ4Glc[NAc]β	q	q	q	q	q
	Gnβ6(R-GlcNAcβ3)Galβ4Glc[NAc]β	q	q		q	
	Gnβ3(R-GlcNAcβ6)Galβ4Glc[NAc]β	q	q		q	

１）幹細胞および分化した細胞型は本文書の他の部分におけるものと同様に省略して示される；ＣＢ／ＢＭは臍帯血または骨髄由来のＭＳＣを示す；ａｄｉｐｏ／ｏｓｔｅｏ／ｃｈｏｎｄｒｏ　ｄｉｆｆ．は、ＭＳＣから脂肪細胞、骨芽細胞、または軟骨細胞方向に分化した細胞を示す。

２）複合糖質における、ならびに／または特異的にＮ－グリカン（Ｎ）、Ｏ－グリカン（Ｏ）、および／もしくはスフィンゴ糖脂質（Ｌ）における、末端エピトープの生成。記号：ｑ、定量的データ；＋／－、低発現；＋、一般的；＋＋、多量。

【０８５５】

［表２８］

脂肪細胞分化細胞および臍帯血ＭＳＣの中性Ｎ－グリカンプロファイルの比較；ｒｅｌａｔ．＝脂肪細胞分化細胞グリカンシグナルの、ＭＳＣグリカンシグナルに対する比率であって、大きな数字は分化との関連を示し、逆もまた同様である；構造は本発明によるＮ－グリカン構造の分類を示す。

【０８５６】

【表２８】

AD relat.	組成	構造				m/z
新規	H3N1	S				730
新規	H2N1	S				568
新規	H4N4F1	C		F	Q	1647
新規	H6N3F1	H		F		1768
新規	H4N4F2	C		E	Q	1793
新規	H3N5	C			T	1542
新規	H3N4	C			T	1339
新規	H8N2F1	M		F		1889
新規	H1N2F2	O		E		901
新規	H7N3	H				1784
新規	H2N2F4	O		E		1355
新規	H4N5F2	C		E	T	1996
新規	H7N4	C			X	1987
3,15	H5N2F1	M		F		1403
2,47	H3N3	H	N			1136
1,94	H5N4	C	B			1663
1,68	H6N4	C			X	1825
1,54	H4N2F1	L		F		1241
1,45	H5N2	M				1257
1,13	H2N2F1	L		F		917
1,10						1555
1,03	H5N3	H				1460
0,94	H3N3F1	H	N	F		1282
0,90	H3N2	L				933
0,84	H6N3	H				1622
0,79	H4N2	L				1095
0,69	H5N4F1	C	B	F		1809
0,67	H3N2F1	L		F		1079
0,55	H4N4	C			Q	1501
0,46	H4N3F1	H		F		1444
0,41	H4N3	H				1298
0,15	H6N2F1	M		F		1565
0,08	H2N2	L				771
0,06	H6N2	M				1419
0,01	H7N2	M				1581
-0,16	H8N2	M				1743
-0,16	H5N3F1	H		F		1606
-0,24	H4N1	S				892
-0,27						1717
-0,28	H3N4F1	C		F	T	1485
-0,30	H5N4F3	C	B	E		2101
-0,37	H6N5	C	R			2028
-0,43	H9N2	M				1905
-0,49						2041
-0,54	H1N2F1	L		F		755
-0,65	H5N4F2	C	B	E		1955
-0,66	H8N1	S				1540
-0,70	H6N5F1	C	R	F		2174
-0,71	H6N4F1	C		F	X	1971
-0,73	H5N1	S				1054
-0,74						1031
-0,74	H10N2	M	G			2067
-0,80	H6N1	S				1216
-0,84	H3N5F1	C		F	T	1688
-0,87	H9N1	S				1702
喪失	H2N4F1	O		F	T	1323
喪失	H1N3F1	O		F	T	958
喪失	H7N1	S				1378

【０８５７】

［表２９］

骨芽細胞分化細胞および臍帯血ＭＳＣの中性Ｎ－グリカンプロファイルの比較；ｒｅｌａｔ．＝脂肪細胞分化細胞グリカンシグナルの、ＭＳＣグリカンシグナルに対する比率であって、大きな数字は分化との関連を示し、逆もまた同様である；構造は本発明によるＮ－グリカン構造の分類を示す。

【０８５８】

【表２９】

OG relat.	組成	構造				m/z
新規	H3N1	S				730
新規	H7N3	H				1784
新規	H6N3F1	H		F		1768
3,59						1555
2,40	H5N3	H				1460
2,22	H6N3	H				1622
1,91	H5N2	M				1257
1,75	H3N3	H	N			1136
1,28	H3N2	L				933
1,15	H4N1	S				892
1,12	H4N2	L				1095
0,80	H2N2	L				771
0,79	H4N4	C			Q	1501
0,34						1717
0,12	H6N2	M				1419
0,11	H4N3	H				1298
0,10	H7N2	M				1581
0,09	H4N3F1	H		F		1444
0,03						1031
-0,08						2041
-0,25	H9N2	M				1905
-0,28	H5N1	S				1054
-0,28	H8N2	M				1743
-0,28	H5N4	C	B			1663
-0,39	H10N2	M	G			2067
-0,39	H5N4F1	C	B	F		1809
-0,41	H6N2F1	M		F		1565
-0,47	H6N1	S				1216
-0,48	H5N3F1	H		F		1606
-0,51	H6N5	C	R			2028
-0,57	H8N1	S				1540
-0,81	H7N1	S				1378
-0,81	H3N2F1	L		F		1079
喪失	H5N2F1	M		F		1403
喪失	H6N4	C			X	1825
喪失	H2N4F1	O		F	T	1323
喪失	H4N2F1	L		F		1241
喪失	H6N4F1	C		F	X	1971
喪失	H5N4F3	C	B	E		2101
喪失	H1N3F1	O		F	T	958
喪失	H3N3F1	H	N	F		1282
喪失	H6N5F1	C	R	F		2174
喪失	H1N2F1	L		F		755
喪失	H3N5F1	C		F	T	1688
喪失	H5N4F2	C	B	E		1955
喪失	H3N4F1	C		F	T	1485
喪失	H9N1	S				1702
喪失	H2N2F1	L		F		917

【０８５９】

［表３０］

軟骨細胞分化細胞および臍帯血ＭＳＣの中性Ｎ－グリカンプロファイルの比較；ｒｅｌａｔ．＝脂肪細胞分化細胞グリカンシグナルの、ＭＳＣグリカンシグナルに対する比率であって、大きな数字は分化との関連を示し、逆もまた同様である；構造は本発明によるＮ－グリカン構造の分類を示す。

【０８６０】

【表３０】

CH relat.	組成	構造				m/z
新規	H3N1	S				730
新規	H4N4F1	C		F	Q	1647
新規	H1N2F2	O		E		901
新規	H7N3	H				1784
新規	H6N3F1	H		F		1768
新規						1393
新規	H4N4F2	C		E	Q	1793
新規	H11N2	M	G			2229
新規	H9N8	C	R			3124
新規	H6N6	C	R		Q	2231
4,01	H5N2F1	M		F		1403
2,97	H5N4	C	B			1663
2,53	H5N4F1	C	B	F		1809
2,51	H3N3	H	N			1136
2,39						1555
2,23	H3N2F1	L		F		1079
2,09	H4N2F1	L		F		1241
1,80	H5N2	M				1257
1,50	H5N3	H				1460
1 31	H4N1	S				892
1,21	H4N3F1	H		F		1444
0,96	H3N2	L				933
0,86	H4N3	H				1298
0,80	H2N2F1	L		F		917
0,78	H3N3F1	H	N	F		1282
0,77	H6N3	H				1622
0,62	H4N2	L				1095
0,28	H5N4F3	C	B	E		2101
0,17	H6N4	C			X	1825
0,10	H5N1	S				1054
0,08	H6N2	M				1419

-0,08	H7N2	M				1581
-0,11	H5N4F2	C	B	E		1955
-0,22	H6N2F1	M		F		1565
-0,24	H6N1	S				1216
-0,25	H3N4F1	C		F	T	1485
-0,30	H6N5F1	C	R	F		2174
-0,31	H6N5	C	R			2028
-0,32	H1N2F1	L		F		755
-0,35	H8N2	M				1743
-0,36						1031
-0,44	H4N4	C			Q	1501
-0,47	H10N2	M	G			2067
-0,48	H8N1	S				1540
-0,49						1717
-0,52	H9N2	M				1905
-0,55	H2N2	L				771
-0,58	H9N1	S				1702
-0,63	H7N1	S				1378
-0,64	H5N3F1	H		F		1606
-0,77						2041
喪失	H2N4F1	O		F	T	1323
喪失	H6N4F1	C		F	X	1971
喪失	H1N3F1	O		F	T	958
喪失	H3N5F1	C		F	T	1688

【０８６１】

［参考文献］

Altmann, F., et al. (1999) Glycoconj. J. 16: 109−23

Harvey, D. J., et al. (1993) Rapid Commun. Mass Spectrom. 7(7):614−9

Hirabayashi, J., et al. (2002) Biochim. Biophys. Acta. 1572:232−54.

Jaatinen, T., et al. (2006) Stem cells. 24:631−41.

Karlsson, H., et al. (2000) Glycobiology 10(12): 1291−309

Kretzchmar, E., et al. (1994) Biol. Chem. Hoppe Seyler 375(5):23−7

Kubelka, V., et al. (1994) Arch. Biochem. Biophys. 308(l):148−57

Leskela, H., et al. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 311: 1008−13

Miller−Podraza, H., et al. (2000) Glycobiologvy. 10:975−982

Moore (1999) Trends Cell Biol. 9:441−6

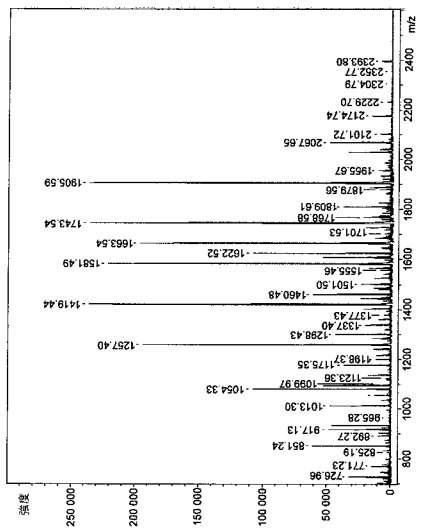
Naven, T. J. & Harvey, DJ. (1996) Rapid Commun. Mass Spectrom. 10(11): 1361−6

Nyman, T. A., et al. (1998) Eur. J. Biochem. 253(2):485−93

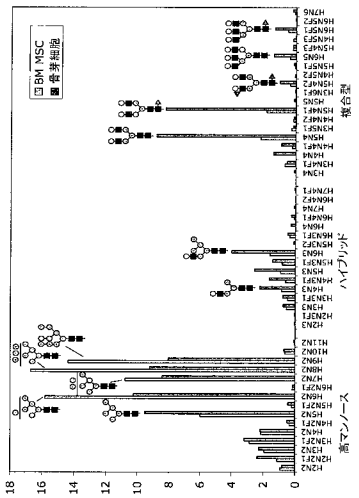
Papac, D., et al. (1996) Anal. Chem. 68(18):3215−23

Saarinen, J., et al. (1999) Eur. J. Biochem. 259(3):829-40
Skottman, H. et al. (2005) Stem cells
Staudacher, E., et al. (1992) Eur. J. Biochem. 207(3):987-93
Thomson, J. A., et al. (1998) Science 282:1145-7
Venable et al. (2005) BMC Developmental biology.

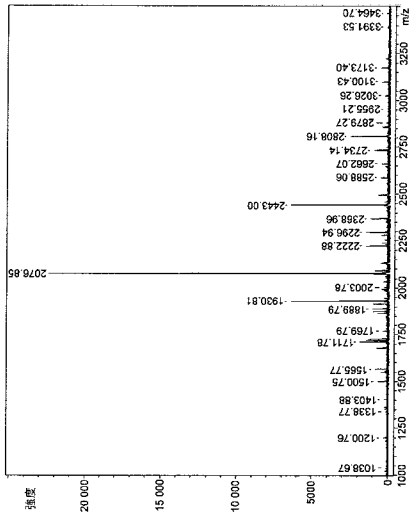
【図１Ａ】



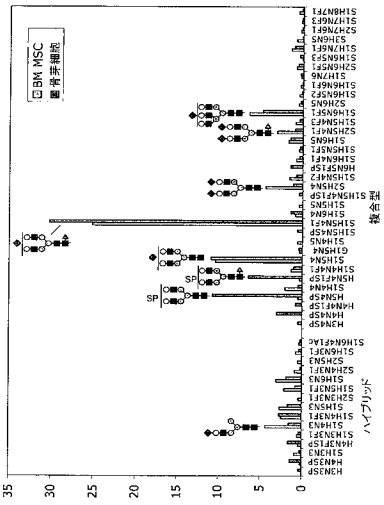
【図１Ｂ】



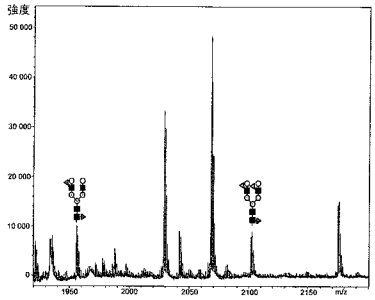
【図１Ｃ】



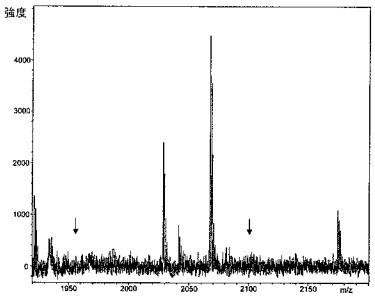
【図１Ｄ】



【図２Ａ】

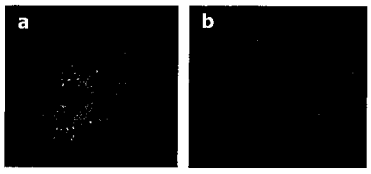


【図２Ｂ】

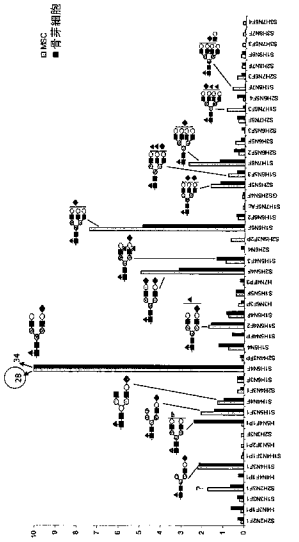


【図２Ｃ】

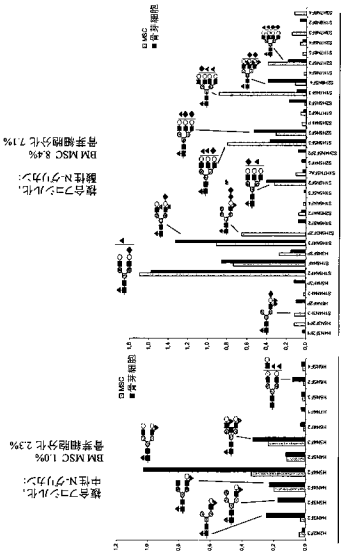
【図３】



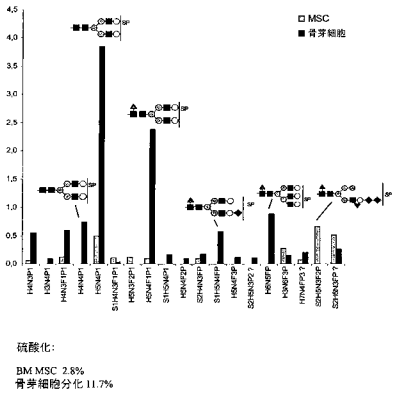
【図４】



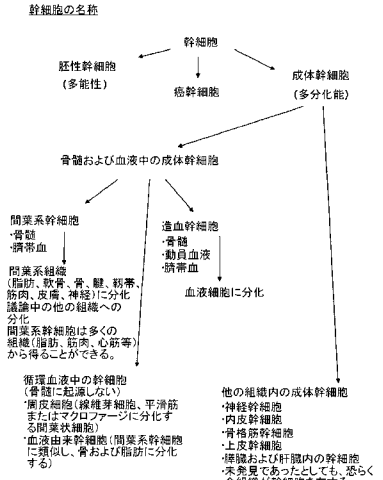
【図５】


BM MSC 8.4%
骨芽細胞分化 7.1%
BM MSC 1.0%
骨芽細胞分化 2.3%

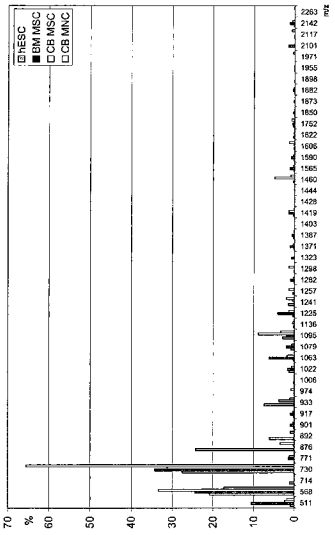
【図６】


MSC
骨芽細胞
硫酸化:
BM MSC 2.8%
骨芽細胞分化 11.7%

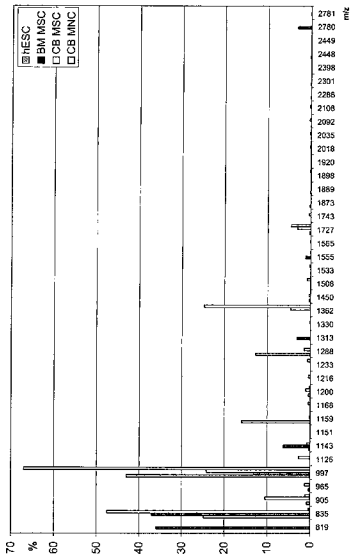
【図７】


幹細胞の名称
幹細胞
胚性幹細胞
(多能性)
癌幹細胞
成体幹細胞
(多分化能)
骨髄および血液中の成体幹細胞
間葉系幹細胞
・骨髄
・臍帯血
間葉系組織
(脂肪、軟骨、骨、腱、靭帯、筋肉、皮膚、神経)に分化
議論中の他の組織への分化
間葉系幹細胞は多くの組織(脂肪、筋肉、心筋等)から得ることができる。
造血幹細胞
・骨髄
・動員血液
・臍帯血
血液細胞に分化
循環血液中の幹細胞
(骨髄に起源しない)
・胸腺細胞(線維芽細胞、平滑筋またはマクロファージに分化する間葉状細胞)
・血液由来幹細胞(間葉系幹細胞に類似し、骨および脂肪に分化する)
他の組織内の成体幹細胞
・神経幹細胞
・内皮幹細胞
・骨格筋幹細胞
・上皮幹細胞
・膵臓および肝臓内の幹細胞
・未発見であったとしても、恐らく全組織が幹細胞を有する

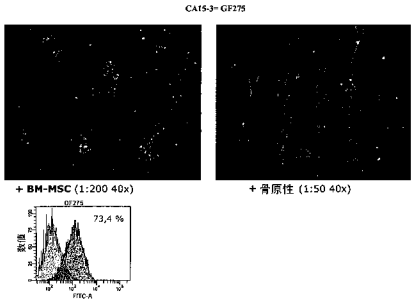
【図８】


hESC
BM MSC
CB MSC
CB MNC
%

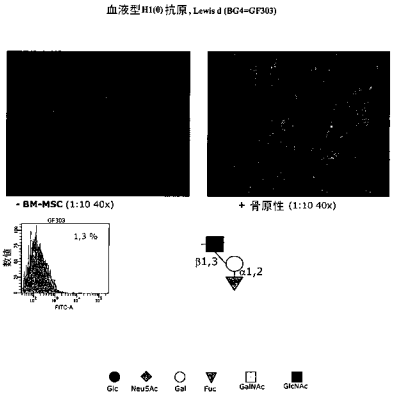
【図９】



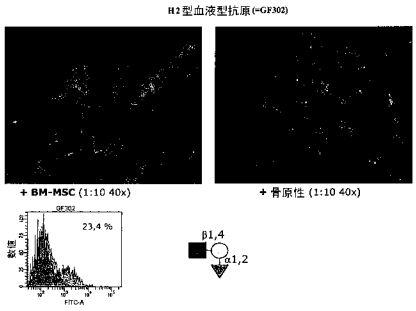
【図１０】



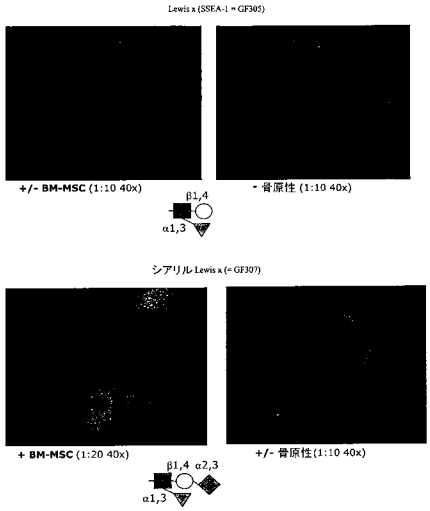
【図１１】



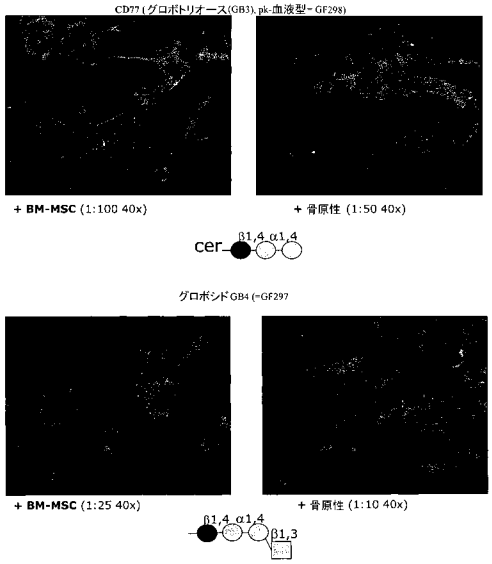
【図１２】



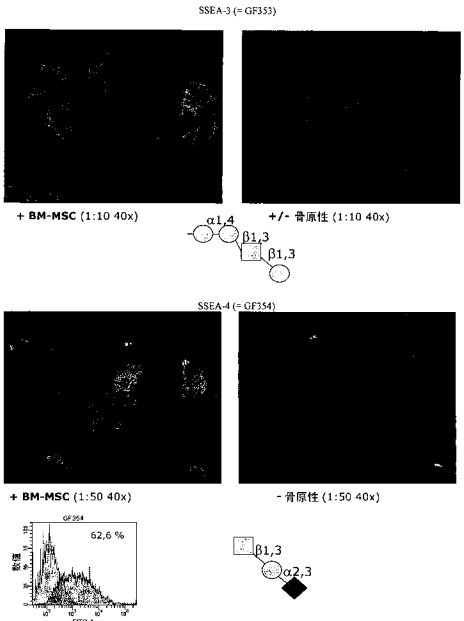
【図１３】



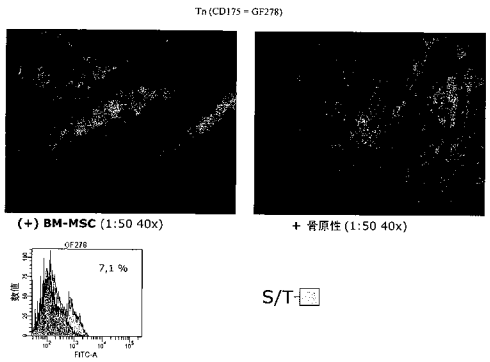
【図１４】



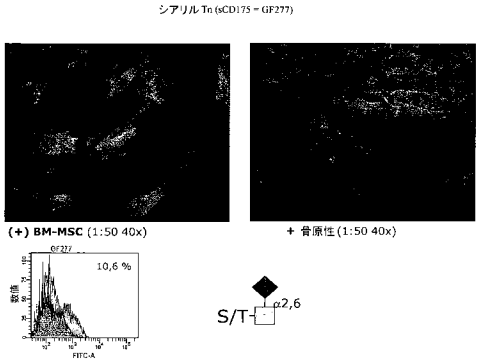
【図１５】



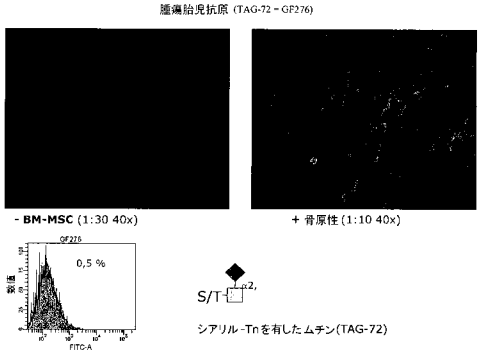
【図１６】



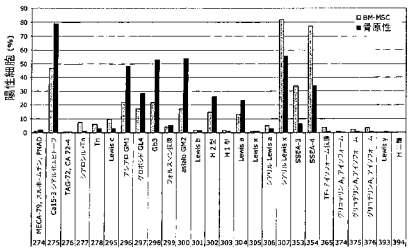
【図１７】



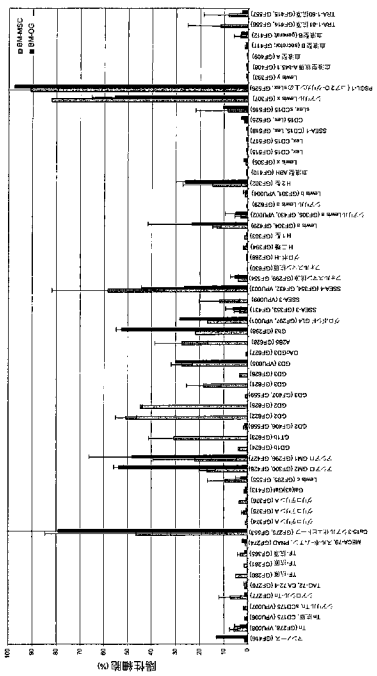
【図１８】



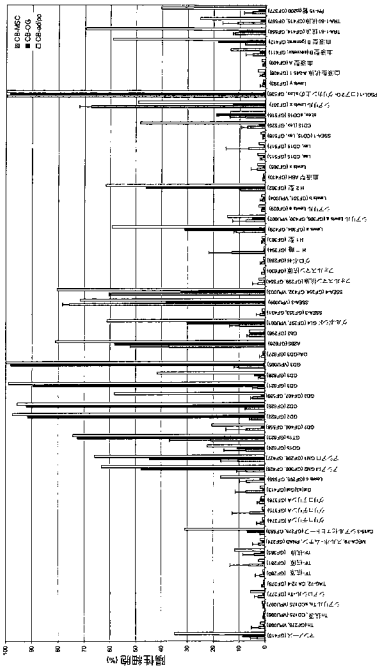
【図１９】



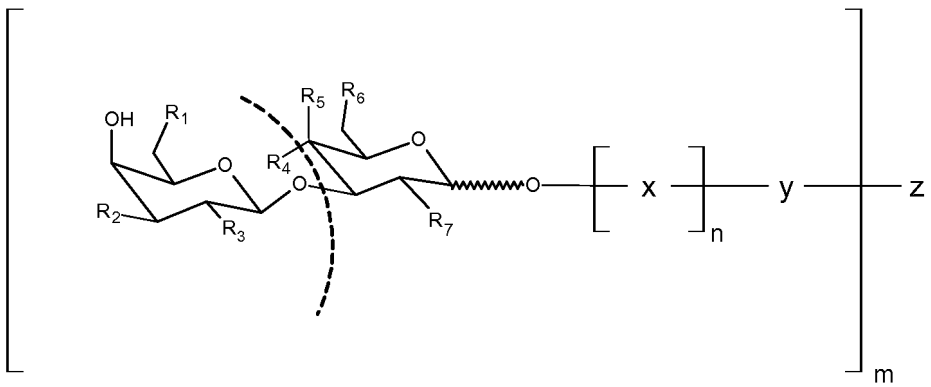
【図２０】



【図２１】



【手続補正書】
【提出日】平成21年4月22日(2009.4.22)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
間葉系細胞調製物の状態を評価する方法であって、前記調製物中の伸長グリカン構造、または、少なくとも２つの、グリカン構造の群の存在を検出するステップを含み、前記グリカン構造またはグリカン構造の群は、式Ｔ１



であり、
R_1、R_2、およびR_6はＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基シアル酸、好ましくはＮｅｕ５Ａｃα２またはＮｅｕ５Ｇｃα２、最も好ましくはＮｅｕ５Ａｃα２であり；
R_3はＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基Ｆｕｃα１（Ｌ－フコース）またはＮ－アセチル（Ｎ－アセトアミド、$NCOCH_3$）であり；
R_4はＨ、ＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基Ｆｕｃα１（Ｌ－フコース）であり、R_4がＨである場合、R_5はＯＨであり、R_4がＨではない場合、R_5はＨであり；
Ｒ７はＮ－アセチルまたはＯＨであり；
Ｘは前記細胞由来の天然オリゴ糖主鎖構造、好ましくはＮ－グリカン、Ｏ－グリカンもしくは糖脂質構造であり、またはｎが０である場合、Ｘは無であり；
Ｙはリンカ基、好ましくはＯ－グリカンおよびＯ－結合末端オリゴ糖および糖脂質のための酸素、ならびにＮ－グリカンのためのＮ、またはｎが０である場合、無であり；
Ｚは担体構造、好ましくは細胞により産生された天然担体であり、例えばタンパク質または脂質であって、好ましくは担体上のセラミドもしくは分岐グリカンコア構造、またはＨであり；
アーチはガラクトピラノシルからの結合が左側の残基の３位または４位いずれかに対するものであること、およびＲ４構造が他の４または３位にあることを表し；
ｎは０または１の整数であり、ｍは１ないし１０００、好ましくは１ないし１００、および最も好ましくは１ないし１０の整数（担体上のグリカンの数）であり、
ただし、
Ｒ２およびＲ３のうち１つはＯＨまたはＲ３はＮ－アセチルであり、
左側の第１の残基が右側の残基の４位に結合する場合、Ｒ６はＯＨであり、
かつ、
前記グリカン構造は伸長構造であって、前記結合剤は前記構造およびさらに少なくとも１つの還元末端伸長エピトープに結合し、これはＸを置換する、またはＸの一部の、単糖エピトープであり、前記単糖エピトープは、式Ｅ１：
$AxHex(NAc)_n$であり、Ａはアノマー構造アルファまたはベータであり、ｘは結合位置２、３または６であり；およびＨｅｘはヘキソピラノシル残基Ｇａｌ、またはＭａｎであり、ｎは０または１の整数であり、
ｎが１である場合、ＡｘＨｅｘＮＡｃはβ４ＧａｌＮＡｃまたはβ６ＧａｌＮＡｃであり、
ただし、
ＨｅｘがＭａｎである場合、ＡｘＨｅｘはβ２Ｍａｎであり、
ＨｅｘがＧａｌである場合、ＡｘＨｅｘはβ３Ｇａｌまたはβ６Ｇａｌまたはα３Ｇａｌまたはα４Ｇａｌであり、
または、
前記伸長構造は式ＭＵＣ、$(R)_n$ＧａｌＮＡｃα（Ｓｅｒ／Ｔｈｒ）$_m$であり、独立に、ｎは０または１、ｍは１、ＲはＳＡα６またはＧａｌβ３であり、ＳＡはシアル酸であり、ＲがＧａｌβ３である場合、ｎは１であり、または、前記伸長構造はＧａｌβ４ＧｌｃβＣｅｒであり、ならびに、前記グリカン構造は幹細胞集団関連構造であり、任意に前記細胞調製物が混入構造に関して評価されることを特徴とする方法。
【請求項２】
請求項１に記載の方法において、前記グリカン構造が、
Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃ、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ、Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ／α、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ、ＧａｌＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ、ＳＡα３Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ／α、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ、ＳＡα６Ｇａｌβ４Ｇｌｃ、ＳＡα６Ｇａｌβ４Ｇｌｃ

β、ＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、ＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ、Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃ（Ｌｅｗｉｓ　ａ）、ＳＡα３Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃ（シアリル－Ｌｅｗｉｓ　ａ）、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ（Ｈ－１型）、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃ（Ｌｅｗｉｓ　ｂ）、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ（２型ラクトサミン基盤）、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ（Ｌｅｗｉｓ　ｘ）、ＳＡα３Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃ（シアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘ）、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ（Ｈ－２型）およびＦｕｃα２Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ（Ｌｅｗｉｓ　ｙ）
からなる群より選択され、
式Ｅ１：
ＡｘＨｅｘ（ＮＡｃ）$_n$の伸長構造に結合し、Ａはアノマー構造アルファまたはベータであり、ｘは結合位置２、３、または６であり、Ｈｅｘはヘキソピラノシル残基Ｇａｌ、またはＭａｎであり、およびｎは０または１の整数であり、
ただし、
ｎが１である場合、ＡｘＨｅｘＮＡｃはβ６ＧａｌＮａｃであり、
ＨｅｘがＭａｎである場合、ＡｘＨｅｘはβ２Ｍａｎであり、
ＨｅｘがＧａｌである場合、ＡｘＨｅｘはβ３Ｇａｌまたはβ６Ｇａｌであることを特徴とする方法。
【請求項３】
請求項１に記載の方法において、前記結合物質が式Ｔ８Ｅベータ
［Ｍα］$_m$Ｇａｌβ１－３／４［Ｎα］$_n$ＧｌｃＮＡｃβｘＨｅｘ（ＮＡｃ）$_p$
の構造を認識し、
ｘは結合位置２、３、または６であり、
ｍ、ｎおよびｐは独立に０または１の整数であり、
ＭおよびＮは単糖残基であって
ｉ）独立に無（その位置における遊離水酸基）
および／または
ｉｉ）Ｇａｌの３位または／およびＧｌｃＮＡｃの６位に結合するシアル酸であるＳＡ
および／または
ｉｉｉ）ＧａｌがＧｌｃＮＡｃの他の位置（４または３）に結合する場合に、Ｇａｌの２位および／またはＧｌｃＮＡｃの３もしくは４位に結合するＦｕｃ（Ｌ－フコース）残基であり、
ただし、ｍ、ｎおよびｐは独立に０または１であり、
Ｈｅｘはヘキソピラノシル残基ＧａｌまたはＭａｎであり、
ただし、
ｐが１の場合、βｘＨｅｘＮＡｃはβ６ＧａｌＮＡｃであり、
ｐが０の場合、ＨｅｘはＭａｎであり、かつβｘＨｅｘはβ２Ｍａｎであり、またはＨｅｘはＧａｌであり、かつβｘＨｅｘはβ３Ｇａｌもしくはβ６Ｇａｌであることを特徴とする方法。
【請求項４】
請求項３に記載の方法において、前記結合物質が
式Ｔ１０Ｅ
［Ｍα］$_m$Ｇａｌβ１－４［Ｎα］$_n$ＧｌｃＮＡｃβｘＨｅｘ（ＮＡｃ）$_p$のＩＩ型ラクトサミンを基盤とする構造を認識し、
ただし、
ｐが１である場合、βｘＨｅｘＮＡｃはβ６ＧａｌＮＡｃであり、
ｐが０である場合、ＨｅｘはＭａｎであり、かつβｘＨｅｘはβ２Ｍａｎであり、または、ＨｅｘはＧａｌであり、かつβｘＨｅｘはβ６Ｇａｌであることを特徴とする方法。
【請求項５】

請求項４に記載の方法において、前記結合物質が式Ｔ１０ＥＭａｎ：
［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１－４［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ
のＩＩ型ラクトサミンを基盤とする構造を認識し、変数は請求項２の式Ｔ８Ｅベータに対して記載されるものと同様であることを特徴とする方法。
【請求項６】
請求項５に記載の方法において、前記構造がＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、ＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎからなる群より選択されることを特徴とする方法。
【請求項７】
請求項５に記載の方法において、前記構造がＨＩＩ型構造Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎであることを特徴とする方法。
【請求項８】
請求項５に記載の方法において、前記構造がＬｅｗｉｓ　ｘ構造Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎであることを特徴とする方法。
【請求項９】
請求項４に記載の方法において、前記結合物質が
式Ｔ１０ＥＧａｌ（ＮＡｃ）：
［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１－４［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβ６Ｇａｌ（ＮＡｃ）$_{p}$
のＩＩ型ラクトサミンを認識し、変数は請求項２の式Ｔ８Ｅベータに対して記載されるものと同様であることを特徴とする方法。
【請求項１０】
請求項９に記載の方法において、前記構造が、
Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃａ３）ＧｌｃＮＡｃβ６（ＲＧａｌβ３）ＧａｌＮＡｃからなる群より選択され、ＲはＳＡα３または無であることを特徴とする方法。
【請求項１１】
請求項１０に記載の方法において、前記構造が、Ｏ－グリカンコアＩＩシアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘ構造ＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ６（ＲＧａｌβ３）ＧａｌＮＡｃであり、抗体ＣＨＯ１３１により認識されることを特徴とする方法。
【請求項１２】
請求項１１に記載の方法において、前記抗体が前記間葉系細胞の５０％超で認識されることを特徴とする方法。
【請求項１３】
間葉系細胞の状態を、抗体抗体ＫＭ９３またはＣＳＬＥＸを用いて分析するための方法。
【請求項１４】
請求項３に記載の方法において、前記結合物質が、
式Ｔ９Ｅ
［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１－３［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ
のＩ型ラクトサミンを基盤とした構造を認識することを特徴とする方法。
【請求項１５】
請求項１４に記載の方法において、前記構造が、
Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）βＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、ＳＡα３Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌからなる群より選択されることを特徴とする方法。

【請求項１６】
請求項１２に記載の方法において、前記構造がＨＩ型構造Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３ＧａｌまたはＩ型ＬＡｃＮＡｃ－構造Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌであることを特徴とする方法。
【請求項１７】
請求項１に記載の方法において、結合試薬の以下の組み合わせの１つが用いられ、前記試薬はＩ型およびＩＩ型アセチルラクトサミンならびにそのフコシル化バリアントもしくは非シアル化フコシル化バリアント；または好ましくはＦｕｃα２－末端および／もしくはＦｕｃα３／４－分岐構造を含むフコシル化Ｉ型およびＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造；または好ましくはＦｕｃα２－末端を含むフコシル化Ｉ型およびＩＩ型Ｎ－アセチルラクトサミン構造を認識することを特徴とする方法。
【請求項１８】
請求項１ないし１６のいずれか１項に記載の方法において、前記検出が、前記調製物における少なくとも１種のグリカン構造の量または存在を特異的結合物質または管理された結合剤により分析することによって行われることを特徴とする方法。
【請求項１９】
請求項１ないし１６のいずれか１項に記載の方法において、前記構造が少なくとも１個のＦｕｃα残基を有することを特徴とする方法。
【請求項２０】
請求項２に記載の方法において、前記結合物質が、
式
［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１－４［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ
のＩ型ラクトサミンを基盤とする構造を認識することを特徴とする方法。
【請求項２１】
請求項２に記載の方法において、前記伸長オリゴ糖構造が、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、ＳＡα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、ＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌからなる群より選択されることを特徴とする方法。
【請求項２２】
請求項１ないし２１のいずれか１項に記載の方法において、当該方法がさらに少なくとも１つの末端ＭａｎαＭａｎ－構造の検出に関するものであることを特徴とする方法。
【請求項２３】
請求項１ないし２２のいずれか１項に記載の方法において、前記検出がモノクローナル抗体、グリコシダーゼ、グリコシル転移酵素、植物レクチン、動物レクチンおよびそれらのペプチド模倣物からなる群より選択される組み替えタンパク質である結合剤により行われることを特徴とする方法。
【請求項２４】
請求項２１に記載の方法において、前記組み替えタンパク質が少なくとも部分的に２つの単糖構造および前記単糖残基間の結合構造を認識する高特異性結合剤であることを特徴とする方法。
【請求項２５】
請求項２１に記載の方法において、前記結合剤が、生体材料または他の細胞型を含む細胞材料を含む試料からヒト幹細胞を選別または選択するために用いられることを特徴とする方法。
【請求項２６】
請求項２１に記載の方法において、前記結合剤が、異なるヒト幹細胞型間の選別または選択のために用いられることを特徴とする方法。
【請求項２７】
請求項２１に記載の方法において、選別または選択ステップがＦＡＣＳまたは細胞集団

を濃縮するための任意の他の手段により行われることを特徴とする方法。

【請求項２８】

請求項２７に記載の方法により得られた細胞集団。

【請求項２９】

請求項２６に記載の方法において、前記細胞調製物が血液関連細胞集団からなる群より選択されることを特徴とする方法。

【請求項３０】

請求項１に記載の方法において、分析されるべき細胞の量が10^3ないし10^6の細胞であることを特徴とする方法。

【請求項３１】

請求項１ないし３のいずれか１項に記載の方法において、前記グリカン構造がＮ－グリカンコア構造を有するＮ－グリカンを含むＮ－グリカンサブグライコーム中に存在し、前記Ｎ－グリカンがＮ－グリコシダーゼにより細胞から遊離できることを特徴とする方法。

【請求項３２】

請求項３１に記載の方法において、前記Ｎ－グリカンコア構造がＭａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４（Ｆｕｃα６）$_n$ＧｌｃＮＡｃであり、ｎが０または１であることを特徴とする方法。

【請求項３３】

請求項１ないし３のいずれか１項に記載の方法において、前記グリカン構造が、Ｏ－グリカンコア構造を有するＯ－グリカンを含むＯ－グリカンサブグライコーム中に存在し、または前記グリカン構造が、糖脂質コア構造を有する糖脂質を含む糖脂質サブグライコーム中に存在し、前記グリカンがグリコシルセラミダーゼにより遊離できることを特徴とする方法。

【請求項３４】

請求項１ないし３３のいずれか１項に記載の方法において、前記細胞調製物の細胞表面グライコームの存在または非存在が検出されることを特徴とする方法。

【請求項３５】

請求項１ないし３４のいずれか１項に記載の方法において、前記細胞調製物が前記細胞調製物の細胞集団内の混入する構造、時間依存的変化または細胞集団の状態の変化に関して、前記細胞調製物内のグリカンの質量分析を用いたグリコシル化分析により、評価／検出されることを特徴とする方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2008/050019

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC8: G01N, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

FI, SE, NO, DK

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-INTERNAL; BIOSIS;MEDLINE; STN CAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X, L	WO 2007054620 A1 (SUOMEN PUNAINEN RISTI VERIPALV et al.) 18 May 2007 (18.05.2007), L:priority, see the extra sheet.	1-82
P,X	WO 2007054622 A1 (SUOMEN PUNAINEN RISTI VERIPALV et al.) 18 May 2007 (18.05.2007)	1-82
P,X	WO 2007006870 A2 (SUOMEN PUNAINEN RISTI VERIPALV et al.) 18 January 2007 (18.01.2007)	1-82
P,X	WO 2008000918 A1 (SUOMEN PUNAINEN RISTI VERIPALV et al.) 03 January 2008 (03.01.2008)	1-82

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 April 2008 (22.04.2008)	30 April 2008 (30.04.2008)

Name and mailing address of the ISA/FI	Authorized officer
National Board of Patents and Registration of Finland P.O. Box 1160, FI-00101 HELSINKI, Finland	Liisa Helle
Facsimile No. +358 9 6939 5328	Telephone No. +358 9 6939 500

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/FI2008/050019

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members(s)	Publication date
WO 2007054620 A1	18/05/2007	EP 1904532 A2	02/04/2008
		WO 2008000918 A1	03/01/2008
		WO 2007054622 A1	18/05/2007
		FI 20060630 A	12/01/2007
		WO 2007006870 A2	18/01/2007
WO 2007054622 A1	18/05/2007	EP 1904532 A2	02/04/2008
		WO 2008000918 A1	03/01/2008
		WO 2007054620 A1	18/05/2007
		FI 20060630 A	12/01/2007
		WO 2007006870 A2	18/01/2007
WO 2007006870 A2	18/01/2007	EP 1904532 A2	02/04/2008
		WO 2008000918 A1	03/01/2008
		WO 2007054622 A1	18/05/2007
		WO 2007054620 A1	18/05/2007
		FI 20060630 A	12/01/2007
WO 2008000918 A1	03/01/2008	AU 2006268559 A1	18/01/2007
		EP 1904532 A2	02/04/2008
		WO 2007054622 A1	18/05/2007
		WO 2007054620 A1	18/05/2007
		FI 20060630 A	12/01/2007
		WO 2007006870 A2	18/01/2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2008/050019

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
C12N 5/08 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2008/050019

Document WO 2007054620, which has a filing date of 08.11.2006, has been filed by the applicants of the present application, thereby implying that the priority dates of the present application are not valid in the sense of Article 8.2(a) PCT for the subject-matter disclosed in claims 1-82 of the present application. See the Written Opinion for details.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード（参考）
G01N 27/62 (2006.01)	G01N 27/62 V	

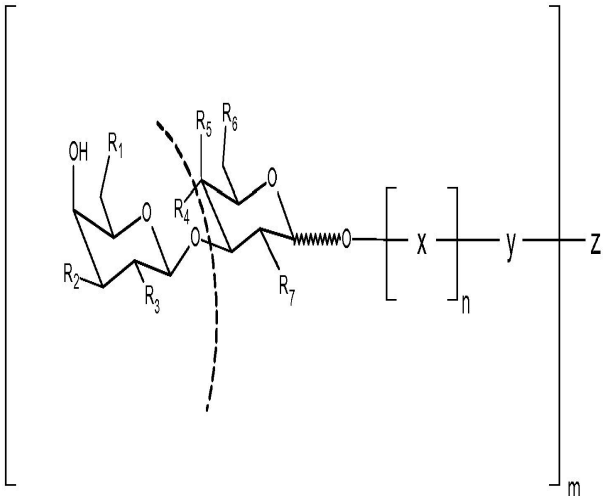
(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100156339
弁理士 米村 道子
(72)発明者 ライネ，ヤルモ
フィンランド共和国 ヘルシンキ エフアイ－００９３０，トゥリスオンクヤ １エイ２
(72)発明者 サトマー，テロ
フィンランド共和国 ヘルシンキ エフアイ－００７００，ラエティ １０ケイ
(72)発明者 ナトゥーネン，ヤリ
フィンランド共和国 ヴァンター エフアイ－０１５２０，オーラニンティ １０イー１８
(72)発明者 ヒスカネン，アンナマリ
フィンランド共和国 ヘルシンキ エフアイ－００３７０，エルヤクセンティ ３
(72)発明者 ブロムクイスト，マリア
フィンランド共和国 イタサルミ エフアイ－０１１００，ラヤティ ４
(72)発明者 オローネン，アン
フィンランド共和国 ラハティ エフアイ－１５７００，ヘルカランティ ７１
(72)発明者 サーリネン，ユハニ
フィンランド共和国 ヘルシンキ エフアイ－００３７０，エルヤクセンティ ３
(72)発明者 ティーティネン，サリ
フィンランド共和国 ヴァンター エフアイ－０１６９０，タッティポルク ４ビィ
(72)発明者 インポラ，ウラ
フィンランド共和国 ヘルシンキ エフアイ－００５３０，キャストゥレニンカトゥ ６エイ１３
(72)発明者 アイティオ，オッリ
フィンランド共和国 ヘルシンキ エフアイ－００３３０，ドゥセンティンティ ５エイ１７
(72)発明者 ヴァルム，レーナ
フィンランド共和国 ヘルシンキ エフアイ－００６３０，スールスオンティ １９
(72)発明者 ナトゥーネン，スヴィ
フィンランド共和国 ヴァンター エフアイ－０１５２０，オーラニンティ １０イー１８
(72)発明者 サロ，ハンナ
フィンランド共和国 ヘルシンキ エフアイ－００８１０，スオラキヴェンカトゥ ２０シー２７

Ｆターム(参考) 2G041 CA01 DA04 EA01 FA10 GA06 JA02 JA06 LA07
4B063 QA01 QA18 QQ08 QR06 QR10 QR43 QR48 QS12 QS40 QX01
4B065 AA90X AC20 BD39 BD44 BD45 CA44 CA46

专利名称(译)	新型特异性细胞结合剂		
公开(公告)号	JP2010516241A	公开(公告)日	2010-05-20
申请号	JP2009545967	申请日	2008-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	扫描Homet放大器奈嫩江启发式帆帕尔贝尔 格力高扫描芬兰有限公司		
申请(专利权)人(译)	锁门Punainen启发式，Veriparuberu Grikos芬兰有限公司		
[标]发明人	ライネヤルモ サトマーテロ ナトゥーネンヤリ ヒスカネンアンナマリ ブロムクイストマリア オローネンアン サーリネンユハニ ティーティネンサリ インポラウラ アイティオオッリ ヴァルムレーナ ナトゥーネンスヴィ サロハンナ		
发明人	ライネ,ヤルモ サトマー,テロ ナトゥーネン,ヤリ ヒスカネン,アンナマリ ブロムクイスト,マリア オローネン,アン サーリネン,ユハニ ティーティネン,サリ インポラ,ウラ アイティオ,オッリ ヴァルム,レーナ ナトゥーネン,スヴィ サロ,ハンナ		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/34 C12Q1/48 C12N5/071 G01N33/53 G01N27/62		
CPC分类号	C07K16/28 C07K16/2896 C07K16/44 G01N33/56966 G01N2400/38		
FI分类号	C12Q1/02 C12Q1/34 C12Q1/48 C12N5/00.202.A G01N33/53.S G01N27/62.V		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA04 2G041/EA01 2G041/FA10 2G041/GA06 2G041/JA02 2G041/JA06 2G041/LA07 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR06 4B063/QR10 4B063/QR43 4B063/QR48 4B063/QS12 4B063/QS40 4B063/QX01 4B065/AA90X 4B065/AC20 4B065/BD39 4B065/BD44 4B065/BD45 4B065/CA44 4B065/CA46		
代理人(译)	Goichi高桥 美智子米村		
优先权	2007005033 2007-01-18 FI 2007000368 2007-05-10 FI 2007000650 2007-08-28 FI		

其他公开文献	JP2010516241A5
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明描述了用于干细胞的聚糖结构的特异性结合物的试剂和方法。此外，本发明涉及筛选针对干细胞表面上的特定聚糖表位的另外的结合试剂。聚糖结构的优选结合物包括蛋白质，例如酶，凝集素和抗体。