(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2010-516240
(P2010-516240A)
(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		4B063
C12N	5/074	(2010.01)	C12N	5/00	202D	4B065
C12N	5/0775	(2010.01)	C12N	5/00	202H	
C12N	5/0789	(2010.01)	C12N	5/00	202Q	
G01N	33/53	(2006.01)	G01N	33/53	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 204 頁）

(21)出願番号　特願2009-545966 (P2009-545966)
(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/FI2008/050017
(87)国際公開番号　WO2008/087258
(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　20070205
(32)優先日　平成19年3月13日 (2007.3.13)
(33)優先権主張国　フィンランド(FI)

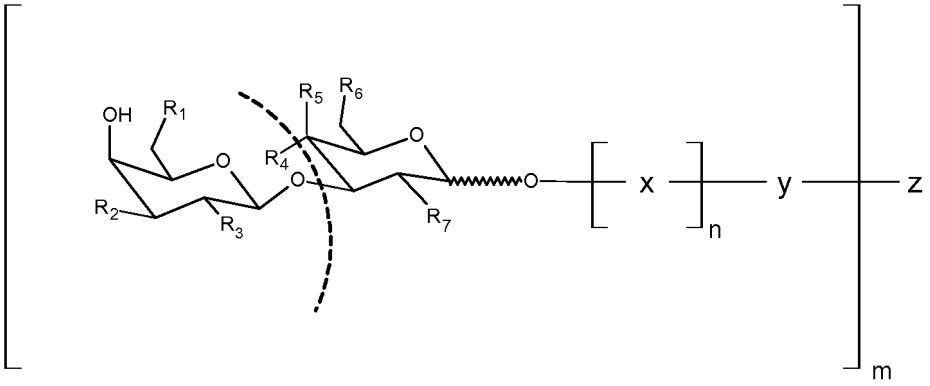
(71)出願人　509205250
スオメン　プナイネン　リスティ，ヴェリパルベル
フィンランド共和国　ヘルシンキ　エフアイ－００３１０，キビハーンティ　７
(71)出願人　509205261
グリコス　フィンランド　リミテッド
フィンランド共和国　ヘルシンキ　エフアイ－００７９０，ヴィッキンカーリ　６
(74)代理人　100096024
弁理士　柏原　三枝子
(74)代理人　100125520
弁理士　高橋　剛一
(74)代理人　100155310
弁理士　柴田　雅仁

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト細胞からの新規の炭水化物、ならびにその分析および修飾のための方法

(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ものである。さらに本発明は、幹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が挙げられる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒト血液関連、好ましくは造血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工程を含み、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



［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はリンカー基、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１～１０００、好ましくは１～１００、および最も好ましくは１～１０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はフコシルである］
であり、ここで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：
$AxHex(NAc)_n$、［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工程を含み、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）$_{n1}$Ｇａｌβ３（ＳＡα６）$_{n2}$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
Ｇａｌβ３（ＧｌｃＮＡｃβ６）ＧａｌＮＡｃまたは
Ｒ$_1$Ｇａｌβ４（Ｒ$_3$）ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｒ$_2$Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃ、
［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［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、該構造は、Ｎ‐アセチルラクトサミンを含む場合は、フコシル化された特異的な伸長構造であるか、またはＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ構造ではない］
からなる群より選択される方法。

【請求項３】

請求項１記載の方法であって、前記結合物質が式Ｔ８Ｅベータ
［Ｍα］$_m$Ｇａｌβ１‐３／４［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Ｆｕ

ｃ（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、
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］
の構造を認識する方法。

【請求項４】
請求項１～３のいずれかに記載の方法であって、前記結合物質が
式Ｔ１０Ｅ
［Ｍα］$_{m}$ＧａｌΒ１‐４［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認識する方法。

【請求項５】
請求項４記載の方法であって、前記結合物質が式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認識する方法。

【請求項６】
前記構造がＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、ＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎからなる群より選択される、請求項５記載の方法

【請求項７】
前記構造がＨＩＩ型構造Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎである、請求項５記載の方法。

【請求項８】
前記構造がＬｅｗｉｓ　ｘ構造Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎである、請求項５記載の方法。

【請求項９】
請求項４記載の方法であって、前記結合物質が
式Ｔ１０ＥＧａｌ（ＮＡｃ）：
［Ｍα］$_{m}$ＧａｌΒ１‐４［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβ６Ｇａｌ（ＮＡｃ）$_{p}$
［式中、変数は請求項２の式Ｔ８Ｅベータに対して記載される通りである］
のＩＩ型ラクトサミンを認識する方法。

【請求項１０】
請求項９記載の方法であって、前記構造が
Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６Ｇａｌ、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、およびＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃａ３）ＧｌｃＮＡｃβ６（ＲＧａｌβ３）ＧａｌＮＡｃ［式中、ＲはＳＡα３または無である］
からなる群より選択される方法。

【請求項１１】

請求項１～３のいずれかに記載の方法であって、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する構造を認識する方法。
【請求項１２】
請求項１１記載の方法であって、前記構造が
Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）βＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、およびＦｕｃα２Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、およびＦｕｃα２Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ
からなる群より選択される方法。
【請求項１３】
前記構造がＨＩ型構造Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３ＧａｌまたはＩ型ＬＡｃＮＡｃ‐構造Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌである、請求項１１記載の方法。
【請求項１４】
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、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
前記構造が少なくとも１個のＦｕｃα残基を有する、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記の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、請求項２記載の方法。
【請求項１７】
請求項２のいずれかに記載の方法であって、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方法。
【請求項１８】
前記構造が少なくとも１つの末端ＭａｎαＭａｎ‐構造とともに用いられる場合の、請求項１～１７のいずれかに記載の方法。
【請求項１９】
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、請求項１～１８のいずれかに記載の方法。
【請求項２０】
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、請求項１９記載の方法。

【請求項２１】

前記結合物質がＧＦ２８７、ＧＦ２７９、ＧＦ２８８、ＧＦ２８４、ＧＦ２８３、ＧＦ２８６、ＧＦ２９０、および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、請求項１９記載の方法。

【請求項２２】

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、請求項１９記載の方法。

【請求項２３】

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等の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、請求項１９記載の方法。

【請求項２４】

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、請求項１９記載の方法。

【請求項２５】

選別または選択が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、請求項１９記載の方法。

【請求項２６】

請求項２５記載の方法により得られた細胞集団。

【請求項２７】

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、請求項２４記載の方法。

【請求項２８】

分析されるべき細胞の量が10^3および10^6細胞の間である、請求項１記載の方法。

【請求項２９】

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され得る、請求項１～３のいずれかに記載の方法。

【請求項３０】

前記Ｎ‐グリカンコア構造が$Man\beta4GlcNAc\beta4(Fuc\alpha6)_nGlcNAc$［式中、ｎは０または１である］である、請求項２９記載の方法。

【請求項３１】

請求項１～３のいずれかに記載の方法であって、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され得る方法。

【請求項３２】

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、請求項１～３のいずれかに記載の方法。

【請求項３３】

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、請求項１～３２のいずれかに記載の方法。

【請求項３４】

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、請求項１～３３のいずれかに記載の方法。

【請求項３５】
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、請求項３４記載の方法。
【請求項３６】
細胞状態の時間依存的変化が、細胞の栄養状態、細胞培養の密集度（ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｙ）、細胞の密度、細胞の遺伝的安定性の変化、細胞構造の完全性もしくは細胞齢、または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、請求項３４記載の方法。
【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１～１８のいずれか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、およびフィーダー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す；
（ｉｉ）幹細胞における発現の非存在または低発現、およびフィーダー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す；
（ｉｉｉ）幹細胞の亜集団における発現を示す；または（ｉｖ）分化した幹細胞の亜集団における発現を示す；
方法。
【請求項３８】
前記幹細胞が全能性、多能性または多分化能である、請求項３７記載の方法。
【請求項３９】
前記胚幹細胞結合剤が多能性または多分化能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ことを含む、請求項３８記載の方法。
【請求項４０】
前記の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ことをさらに含む、請求項３９記載の方法。
【請求項４１】
前記の分離された多能性または多分化能幹細胞を単離することをさらに含む、請求項４０記載の方法。
【請求項４２】
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、細胞株および非造血成体起源の細胞培養物より選択される、請求項４０記載の方法。
【請求項４３】
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、請求項４０記載の方法。
【請求項４４】
前記幹細胞が脱分化した体細胞である、請求項４０記載の方法。
【請求項４５】
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、請求項１記載の方法。
【請求項４６】
前記結合剤が管理された結合剤である、請求項１のいずれかに記載の方法。
【請求項４７】
前記結合剤が、請求項１～１８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、少なくともグリカン構造結合部位を含み、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、請求項１のいずれかに記載の方法。

【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１～１８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こと、および、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／または分析することを含む方法。
【請求項４９】
請求項４８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１～１８のいずれか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であって：
幹細胞内／上の特異的発現ならびにフィーダー細胞および／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し；そして幹細胞内／上のグリカン構造への前記結合剤の結合を確認すること
を含む方法。
【請求項５１】
請求項１～１８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；および前記試薬を用いて幹細胞の濃縮を行うための説明書を含み、任意に幹細胞の濃縮を行うための手段を含む、試料内の幹細胞の濃縮および検出のためのキット。
【請求項５２】
前記試薬が検出可能なトレーサーで標識される、請求項５１記載のキット。
【請求項５３】
幹細胞、および幹細胞上の請求項１～１８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１～１８のいずれかに記載のグリカン構造を含んだ組成物。
【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工程を含み、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）$_{p}$
［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］
によるものである方法。
【請求項５５】

請求項５４記載の方法であって、前記構造が式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）］
によるものである方法。
【請求項５６】
前記構造がグロボトリオース（Ｇｂ３）非還元末端の末端構造Ｇａｌα４Ｇａｌを含む、請求項５４または５５に記載の方法。
【請求項５７】
新規標的／マーカー構造を含む幹細胞からの細胞成分の単離のための、上記請求項のうちいずれかに記載の結合剤分子の使用。
【請求項５８】
前記の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、請求項５７記載の使用。
【請求項５９】
５７～５８に記載の結合剤分子を用いる次の工程を含む、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こと。
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こと。
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こと。
である工程を含む方法。
【請求項６０】
請求項５９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記載の方法で産生される標的構造組成物。
【請求項６１】
式
ＮｅｕＡｃ$_{m}$ＮｅｕＧｃ$_{n}$Ｈｅｘ$_{o}$ＨｅｘＮＡｃ$_{p}$ｄＨｅｘ$_{q}$ＨｅｘＡ$_{r}$Ｐｅｎ$_{s}$Ａｃ$_{t}$ＭｏｄＸ$_{x}$　（Ｉ）
［式中、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、そして
式中、Ｈｅｘはヘキソースを表し、Ｐｅｎはペントースを表し、ＭｏｄＸは修飾を表す］の単糖組成を含む、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、前記方法は
ａ）単離されたヒト幹細胞試料を提供すること；
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こと、または前記幹細胞試料から遊離グリカンを抽出すること；
ｃ）前記試料からグライコームを単離すること
ｄ）質量分析プロファイリングにより組成を分析すること
である工程を含む方法。
【請求項６２】
請求項６１または１に記載の方法であって、前記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

ためのマーカーの選択に用いられる方法。
【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こと；
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こと；
ｃ）結合した結合分子の量を分析すること
である工程を含む方法。
【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）好ましくは混入細胞の表面上にある、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
ｂ）好ましくは造血型幹細胞の識別のための、ＭＡＡ‐レクチンによるものと類似の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必要とする方法。
【請求項６５】
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、請求項６２または６３に記載の方法。
【請求項６６】
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、請求項６２または６３に記載の方法。
【請求項６７】
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、請求項６２または６３に記載の方法。
【請求項６８】
前記結合剤が、胚性幹細胞およびフィーダー細胞集団の選別または選択のために用いられる、請求項６２または６３に記載の方法。
【請求項６９】
請求項６１または６２に記載の方法であって、前記方法が：
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こと；
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こと、または前記幹細胞試料から遊離グリカンを抽出すること；
ｃ）任意にグリカンを修飾すること；
ｄ）前記試料の生体材料からグリカン画分／画分群を精製すること；
ｅ）任意にグリカンを修飾すること；
ｆ）遊離されたグリカンの組成を質量分析により分析すること；
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こと；
ｈ）前記の遊離したグリカンに関するデータを定量的に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こと；
である工程を含む方法。
【請求項７０】
前記二糖エピトープが
式ＣＧＮ：
［Ｍａｎα３］$_{n1}$（Ｍａｎα６）$_{n2}$Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４（Ｆｕｃα６）$_{n3}$

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表し、そして
式中、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、式中、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］
のＮ‐結合グリカンのコア構造におけるＭａｎβ４ＧｌｃＮＡｃ構造である、Ｎ‐グリカンコアマーカー構造。
【請求項７１】
請求項７０記載のマーカー構造を含む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］$_{n8}$}ＭβＧＮβ４［{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；
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］
のマンノース型グリカンであるＮ‐グリカンコア。
【請求項７２】
請求項７１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$_{n}$Ｎ$_{2}$Ｆ$_{m}$組成Ｈ　［式中、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１～１１の整数であり、ｍは０または１である］
に対応する方法。
【請求項７３】
それに由来する分化した細胞よりも、前記構造は造血幹細胞と関連している、請求項７２記載の方法。
【請求項７４】
前記構造の量が、造血幹細胞において、その分化したバリアントにおけるよりも増加する、請求項７２または７３に記載の方法。
【請求項７５】
前記構造が、造血幹細胞に特異的な単糖組成を表す表に示される、請求項７４に記載の方法
【請求項７６】
前記構造の量が造血幹細胞において、その分化したバリアントにおけるよりも減少する、請求項７２または７３に記載の方法。

【請求項７７】
表中に示されるものが造血幹細胞に特異的な単糖組成を示す、請求項７６記載の方法
【請求項７８】
請求項７０記載の方法であって、前記構造が式ＧＮβ２：
［R_1ＧＮβ２］$_{n1}$［Ｍα３］$_{n2}$｛［R_3］$_{n3}$［ＧＮβ２］$_{n4}$Ｍα６｝$_{n5}$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_xＧＮβｚ］$_{nx}$のさらなる分岐を有し、R_x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、そして
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、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。｛｝もまた存在しても存在しなくてもよい分岐を表す］
の複合型Ｎ－グリカンである方法。
【請求項７９】
それに由来する分化した細胞よりも、前記構造は胚性幹細胞と関連している、請求項７８記載の方法。
【請求項８０】
請求項７９記載の方法であって、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の群に属する。
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の群に属する。
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の群に属する。
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の群に属する。
または、構造が、Ｈ４Ｎ５Ｆ３等の末端ＨｅｘＮＡｃ　Ｎ－グリカンであるｈＥＳＣ－ｖｉｉｉの群に属する。
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。
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の群に属する。
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の群に属する。
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の群に属する。
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の群に属する。

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‐グリカンである。
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の群に属する。
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。
方法。
【請求項８１】
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、請求項７０記載のＮ‐グリカンコアマーカー構造。
【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工程を含み、ここで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
$(R)_n GalNAc\alpha(Ser/Thr)_m$
［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：
$(SA\alpha 6)_n GalNAc\alpha(Ser/Thr)_m$、
［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
$Gal\beta 3GalNAc\alpha(Ser/Thr)_m$
によるものである方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
要約
本発明は、各種ヒト細胞集団の分析に有用である新規な特徴的グリカンを明らかにした。本発明は、この特徴的グリカンの存在に基づく細胞分析の種々の方法に関する。
【０００２】
発明の分野
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ものである。さらに本発明は、幹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が挙げられる。
【０００３】
本発明は、血液中の幹細胞、特に臍帯血（ＣＢ）由来の幹細胞（最も好ましくは、ＣＤ１３３＋細胞）からのグリカン、グライコームの新規組成、特には、特定の単糖組成およびグリカン構造を有するグライコームの新規サブ組成（ｓｕｂｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ）を記載するものである。本発明は、さらに、グライコームを修飾する方法、ならびにグライコームおよび修飾されたグライコームを分析する方法に関する。さらに、本発明は、その表面に修飾されたグライコームを持つ幹細胞に関する。グライコームは、同時に数多くの別々のグリカンを、再現性良く、定量的に検出することが可能であるプロファイリング法で分析することが好ましい。最も好ましいプロファイルの種類は質量分析プロファイルである。本発明は、新規標的構造を具体的に明らかにしたものであり、特に、その構造を認識する試薬の開発に関する。
【背景技術】

【０００４】
発明の背景
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。
【０００５】
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。
【０００６】
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。
【０００７】
本発明は、特に胚性および成体幹細胞のためであって、これらの細胞が造血幹細胞ではない場合の、新規マーカーおよび標的構造、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等の特定の末端構造が提案されており、低発現Ｓｌｅｘ型構造ＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ（Ｘｉａ Ｌ ｅｔ ａｌ Ｂｌｏｏｄ（２００４）１０４（１０）３０９１‐６）が示唆されている。本発明は、特定の特徴的なＯ‐グリカンおよびＮ‐グリカンとは別に、ＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ非ポリラクトサミンバリアントにも関する。本発明は、さらに、本発明によるＣＤ１３３＋細胞に対する新規マーカーおよび新規造血幹細胞マーカーを、特にその構造がＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）$_{0-1}$ＧｌｃＮＡｃを含まない場合に、提供する。造血幹細胞構造は、本発明による非シアル化フコシル化構造Ｇａｌβ１‐３‐構造であることが好ましく、さらにより好ましくは、１型Ｎ‐アセチルラクトサミン構造Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ、またはこれとは別に好ましいＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃを主体とする構造である。
【０００８】
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ー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。
【０００９】

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。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 ａｌＣａｎｃｅｒ 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。本発明はヒト幹細胞を対象とする。

【００１０】

当業者は、Ｖｅｎａｂｌｅ ｅｔ ａｌの結果を、抗ＳＳＥＡ‐４抗体にレクチンが結合することによる、非常に都合の良いＳＳＥＡ‐４とレクチン結合との共存であると考えるであろうと思われる。結合がより稀であれば、それは抗体１分子あたりの末端エピトープのより低い割合に反映し、このことによって標識可能抗体の密度がより低くなると思われる。動物由来物質を用いた非制御（ｎｏｎ‐ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ）細胞培養プロセスは、Ｎ‐グリコリル‐ノイラミン酸による細胞の汚染を引き起こし、これは、精製および純度分析に用いられる二次抗体として用いられる抗マウス抗体（抗マウスの種類は限定しない）によって識別することができ、これによって都合の良い高い細胞純度が得られるということも認識されている。

この研究は、ＳＳＥＡ‐４標識に関連する「多能性」胚幹細胞のみを対象としたものであり、本発明のようにその分化したバリアントを対象にしたものではない。この結果は、ＲＣＡ（リシン、Ｇａｌまたはラクトースによって阻害可能）に対してはＧａｌおよびガラクトサミン、ＴＬ（トマトレクチン）に対してはＧｌｃＮＡｃ、ＣｏｎＡに対してはＭａｎまたはＧｌｃ、ＳＮＡに対してはシアル酸／シアル酸α６ＧａｌＮＡｃ、ＨＨＬに対してはＭａｎα等の、特定の潜在的な単糖エピトープ（ページ６、表１０、第２列）に対する結合（恐らくは抗体上）の可能性を示唆したものであり；ＳＳＥＡ‐４と相関しない部分的に結合したレクチン：ＧａｌＮＡｃ／ＧａｌＮＡｃβ４Ｇａｌ（本文中）ＷＦＡ、ＰＮＡに対してはＧａｌ、およびＳＮＡに対してはシアル酸／シアル酸α６ＧａｌＮＡｃ；ならびに、ＳＳＥＡ‐４細胞と部分的に関連するレクチンは、ＰＨＡ‐ＬおよびＰＨＡ‐ＥによりＧａｌと、ＶＶＡによってＧａｌＮＡｃと、ＵＥＡによってＦｕｃと、およびＭＡＡ（ラクトースによって阻害される）によってＧａｌと結合することが示唆された。ＵＥＡの結合は、内皮細胞マーカーおよびタンパク質のＳｅｒ（Ｔｈｒ）に直接結合するＯ‐結合フコースに関連して検討された。この背景は、内皮細胞ＵＥＡ受容体に対するＨ２型特異性（Ｈ ｔｙｐｅ ２ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ）を示唆している。このレクチンの特異性は、比較的珍しいものであるが、このレクチンの産物コードまたはイソレクチンの数／名称は示されておらず（ＰＨＡ‐ＥおよびＰＨＡ‐Ｌを除く）、植物が特異性を異にする数多くのイソレクチンを有することは知られている。

【００１１】

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、非制御マーカー（ｕｎｃ

ｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　ｍａｒｋｅｒ）に対する選択および／または異なる種からの１若しくは２種類の抗体によるコーティングを行うことなく天然胚幹細胞の分析を行うのに有用な特定の特異性を有するレクチン試薬も明らかにした。ほとんどの細胞がＭＡＡと結合することは明らかであり、ＲＣＡ、ＬＴＡ、およびＵＥＡは明らかにＨＥＳＣ細胞株と結合するが、別の細胞株とは結合しなかったように、細胞株間で違いが存在したため、明らかに、天然胚幹細胞への結合は異なっている。

【００１２】

幹細胞の分離および使用の方法は、当該分野で公知である。

【００１３】

造血幹細胞の分析および単離は、米国特許第５，０６１，６２０号に報告されている。造血ＣＤ３４マーカーは、血液幹細胞を特異的に識別することで知られる最も一般的なマーカーであり、ＣＤ３４抗体を用いて、移植の目的で、血液から幹細胞が単離される。米国特許第５，６７７，１３６号は、ＣＤ５９幹細胞マーカーに対して特異的な抗体を用いて幹細胞を濃縮することによりヒト造血幹細胞を得る方法を開示している。ＣＤ５９エピトープは、幹細胞上では非常に接触しやすいが、成熟細胞上では接触しやすさが劣るか、または存在しない。米国特許第６，１２７，１３５号は、幹細胞上で発現される独特の細胞マーカー（ＥＭ１０）に特異的な抗体、および造血細胞サンプル中の造血幹細胞濃度を測定する方法を提供している。

【００１４】

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。

【００１５】

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。

【００１６】

本発明は、診断、治療および組織工学のための、胚性幹（ＥＳ）細胞の特徴を有する幹細胞を、同定、分析および分離する方法を提供する。特に、本発明は、胚幹細胞または母体血由来の胎児細胞を同定、選択および分離する方法、ならびに出生前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ー／結合剤（ｂｉｎｄｅｒ）／結合物質（ｂｉｎｄｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）を初めて提供し、胚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

。

【００１７】

本発明は、分化した母体体細胞型（ｓｏｍａｔｉｃ ｍａｔｅｒｎａｌ ｃｅｌｌ ｔｙｐｅｓ）と反応しない非常に特異的な種類のマーカー／結合剤を開示することにより、胚幹細胞または胎児幹細胞の同定および分離のための公知の結合剤／マーカーの限界を克服する。本発明の他の局面においては、フィーダー細胞上では反応しない（すなわち発現しない）特異的な結合剤／マーカー／結合物質が提供され、それによりフィーダー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。

【００１８】

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幹細胞を含む多能性造血幹細胞または多分化能造血幹細胞の同定、選択、および単離に対して有用なものとして開示される。

【００１９】

本発明の一局面により、末梢血および他の器官における多能性造血幹細胞または多分化能造血幹細胞を同定するための新規方法が開示される。この局面により、造血幹細胞結合剤／マーカーが、幹細胞におけるその選択的発現、ならびに分化した体細胞および／またはフィーダー／関連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造血幹細胞の単離のための選択的結合剤／マーカーとして用いられる。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。

【００２０】

特定の一態様によると、本発明は：

ｉ．幹細胞内／上で特異的発現を示し、フィーダー細胞内／上および／または分化した体細胞では発現を示さないグリカン構造を選択すること；

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こと；

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：の工程を含む、選択的造血幹細胞結合剤／マーカーを同定するための方法を提供する。

【００２１】

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ー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】

【００２２】

【図１】プロトンＮＭＲ分光分析によって得られた、臍帯血由来白血球中の主要なＮ‐グリカン構造。Ａ）中性Ｎ‐グリカン画分中において、高マンノース型Ｎ‐グリカンが最も多い構造であった。Ｂ）二分岐複合型Ｎ‐グリカンが、シアル化Ｎ‐グリカンの最も多い構造である。単糖の符号：Ｎ‐アセチルヘキソサミン（Ｎ）：■、Ｎ‐アセチル‐Ｄ‐グルコサミン、ＧｌｃＮＡｃ；ヘキソース（Ｈ）：○、Ｄ‐マンノース、Ｍａｎ；網掛け○印、Ｄ‐ガラクトース、Ｇａｌ；●、Ｄ‐グルコース、Ｇｌｃ；およびデオキシヘキソース（Ｆ）：△、Ｌ‐フコース、Ｆｕｃ。シアル酸（Ｓ）：◆、Ｎ‐アセチルノイラミン酸、Ｎｅｕ５Ａｃ；ならびに硫酸エステルまたはリン酸エステル（Ｐ）。グリコシド結合は、単糖を繋ぐ線で示す。

【図２】中性Ｎ‐グリカンの質量分析プロファイリング分析。Ａ）ＣＤ１３３＋中性Ｎ‐グリカン画分の陽イオンＭＡＬＤＩ‐ＴＯＦ質量スペクトルであり、ここで、主要なグリカンシグナルは、［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$のナトリウム付加イオンから生ずる。Ｂ）ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞の処理された中性Ｎ‐グリカンプロファイルの比較を示す図であ

り、ここで、各グリカンシグナルの相対的存在量は、総全プロファイルのパーセントとして表され、それにより、細胞型同士の直接比較が可能である。元の質量スペクトルに存在する既知の干渉シグナル、付加イオンシグナル、および同位体パターンのオーバーラップの影響は除去してある（材料および方法の項を参照）。各グリカンシグナルには、検出イオンのｍ／ｚに基づき、提案された単糖組成を割り当てた。Ｃ）図に示すように、提案された単糖組成中のＨおよびＮ残基の量に対する生合成分類規則（ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｒｕｌｅｓ）に基づいて、プロファイルデータを再構成して分析した図である。各々の提案された生合成分類内において、グリカンシグナルは、ＣＤ１３３＋細胞での相対的存在量の順に整列されている。提案されたグリカン構造群の相対的存在量は、全プロファイルのパーセントとして表す。単糖の符号は図１と同様である。略語：Ｆ；フコース、Ｈ；ヘキソース、およびＮ；Ｎ‐アセチルヘキソアミン。

【図３】シアル化Ｎ‐グリカンの質量分析プロファイリング分析。Ａ）ＣＤ１３３＋酸性Ｎ‐グリカン画分の陰イオンＭＡＬＤＩ‐ＴＯＦ質量スペクトルであり、ここで、主要なグリカンシグナルは、［Ｍ－Ｈ］$^{-}$の脱プロトン化イオンから生ずる。星印は、ＢおよびＣからは除去された既知の混入ポリヘキソース群を示す。Ｂ）ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞のシアル化Ｎ‐グリカンプロファイルの比較を示す図である。Ｃ）図２と同様に実施された、プロファイルデータを分析して再構成した図である。ＣＤ１３３＋またはＣＤ１３３－細胞のいずれかに関連するさらなる単糖組成の特徴（Ｈｅｘ５ＨｅｘＮＡｃ３およびＨｅｘ６ＨｅｘＮＡｃ３）は、追加のグリカンシグナル構造群として扱い、その解釈を示す。単糖の符号は図１と同様である。略語：Ｆ；フコース、Ｈ；ヘキソース、Ｎ；Ｎ‐アセチルヘキソアミン、およびＳ；シアル酸。

【図４】シアル化ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞Ｎ‐グリカンにおける、α２，３シアリダーゼによるエキソグリコシダーゼ消化。シアル化Ｎ‐グリカン試料をα２，３シアリダーゼで処理し、質量スペクトルを処理の前（点線棒グラフ）および後（実線棒グラフ）に記録した。データは、図２および図３と同様に処理し、規準化したグリカンプロファイルとした。明確にするために、ここでは、Ｈ５Ｎ４コア組成を有する主要なシアル化Ｎ‐グリカンシグナルのみを示す。グリカンの相対的存在量の変化を矢印で示す。対応するジシアル化（Ｓ２）グリカン種に対するモノシアル化（Ｓ１）の合計は、ＣＤ１３３＋細胞で増加し、一方、ＣＤ１３３－細胞では、同様のプロファイルの変化は見られなかった。略語：Ｆ；フコース、Ｈ；ヘキソース、Ｎ；Ｎ‐アセチルヘキソアミン、およびＳ；シアル酸。

【図５】その生合成要素によるＮ‐結合グリカン構造の模式図。Ｎ‐結合グリカンは、異なる糖転移酵素およびグリコシダーゼファミリーによって合成されるＮ‐グリカンコア、主鎖、および末端エピトープという別々の領域から成る。本研究で分析されたこれらの酵素をコードする遺伝子ファミリーを括弧内に示す。単糖符号および模式的なＮ‐グリカン構造は、図１の凡例で表したものと同様である。

【図６】ＣＤ１３３＋細胞の有利であるＮ‐グリカン構造の模式図。ＣＤ１３３＋細胞の有利であるＮ‐グリカン構造を暗色地に示す。過剰発現、および過小発現した遺伝子は、上向きおよび下向きの黒色矢印で表示し、ＣＤ１３３－細胞と比較した遺伝子発現の違いを示す。Ａ．ＣＤ１３３＋細胞のＮ‐グリカンコア構造は高マンノース型Ｎ‐グリカンおよび二分岐Ｎ‐グリカン構造の両方に偏っており、Ｎ‐グリカンプロセシング酵素の発現の違いと相関している。Ｂ．α２，３‐およびα２，６‐シアル酸転移酵素が同一のＮ‐グリカン基質に対して競合する。ＳＴ３ＧＡＬ６の過剰発現には、ＣＤ１３３＋細胞でのα２，３‐シアル化の上昇が付随する。単糖符号および模式的なＮ‐グリカン構造は、図１の凡例で表したものと同様である。

【図７】連続する広範なシアリダーゼ反応およびα２，３‐シアル酸転移酵素反応の前（淡青色柱（ｃｏｌｕｍｎ））および後（暗赤色柱）における、臍帯血単核球シアル化Ｎ‐グリカンのプロファイル。ｍ／ｚ値は表７を参照のこと。

【図８】連続するα２，３‐シアル酸転移酵素反応およびα１，３‐フコシルトランスフェラーゼ反応の前（淡青色柱）および後（暗赤色柱）における、臍帯血単核球シアル化Ｎ

－グリカンのプロファイル。ｍ／ｚ値は表７を参照のこと。
【図９】Ａ．臍帯血ＣＤ１３３$^{+}$細胞から、およびＢ．ＣＤ１３３$^{-}$細胞から単離されたシアル化Ｎ－グリカンのα２，３－シアリダーゼ分析。柱は、本文中に記載のように、ｍ／ｚ２０７６におけるモノシアル化グリカンシグナル（SA_1）および対応するｍ／ｚ２３６７におけるジシアル化グリカンシグナル（SA_2）の相対比率を表す。臍帯血ＣＤ１３３$^{-}$細胞では、SA_1およびSA_2グリカンの相対比率は、α２，３－シアリダーゼ処理による大きな変化はないが（Ｂ）、一方、ＣＤ１３３$^{+}$細胞では、α２，３－シアリダーゼ耐性SA_2グリカンの比率が、α２，３－シアリダーゼ耐性SA_1グリカンよりも著しく小さい（Ａ）。
【図１０】骨髄および血液中の好ましい成体幹細胞、およびそれらから誘導することができる細胞の模式図であり、これらは、本明細書において、血液由来幹細胞とも称される。
【図１１】ＦＩＴＣ標識レクチンによる、７種類の臍帯血単核球試料（並列された柱）のＦＡＣＳ分析。パーセントは、レクチンと結合した細胞の割合を示す。ＦＩＴＣ標識レクチンの略号については、本文を参照されたい。
【図１２】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的モル存在量。ｈＥＳＣ、ＢＭ　ＭＳＣ、ＣＢ　ＭＳＣ、ＣＢ　ＭＮＣ：本文中に記載された幹細胞試料。
【図１３】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的モル存在量。ｈＥＳＣ、ＢＭ　ＭＳＣ、ＣＢ　ＭＳＣ、ＣＢ　ＭＮＣ：本文中に記載された幹細胞試料。
【図１４】ＣＢ－ＭＮＣ細胞のレクチン標識。
【図１５】特異的結合剤によるＣＢ－ＭＮＣ細胞ＦＡＣＳ分析。
【図１６】選択され、Ａ）ＰＮＡレクチンＧＦ７０７により、およびＢ）ＬＴＡレクチンＧＦ７０９によりコーティングされたビーズを用いて増殖させた臍帯血単核球（ＣＢ　ＭＮＣ）。
【図１７】Ａ）臍帯血単核球および磁性ビーズ上の結合剤ＮＰＡ　ＧＦ７１１。Ｂ）選択された系統陰性（ｌｉｎｅａｇｅ　ｎｅｇａｔｉｖｅ）細胞およびＧＦ７１０によりコーティングされた磁性ビーズ。
【発明の概要】
【００２３】
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。
【００２４】
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１～４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、本発明の幹細胞のグライコームに関する。

【００２５】
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。

【００２６】
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、癌および癌の臨床状態の診断、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。

【００２７】
本発明はさらに幹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。

【発明を実施するための形態】

【００２８】
発明の説明
関連するデータおよび明細はＰＣＴ　ＦＩ　２００６／０５０３３６に示された。

【００２９】
本発明は固有の単糖組成を有する新規の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）血液由来幹細胞、特には臍帯血由来幹細胞、
ｉｉ）分化した単核血液細胞、
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】
好ましい血液幹細胞は、造血幹細胞であり、より好ましくは、ＣＤ１３３またはＣＤ３４陽性幹細胞であり、最も好ましくは、臍帯血由来ＣＤ１３３またはＣＤ３４陽性幹細胞である。分化した単核血液細胞は、好ましくは、ＣＤ１３３またはＣＤ３４陰性幹細胞であり、最も好ましくは、臍帯血由来ＣＤ１３３またはＣＤ３４陰性幹細胞である。ＣＤ３４＋細胞は、ＣＤ１３３＋細胞と類似していると考えられ、本発明は、ＣＤ３４＋細胞のトランスフェラーゼ発現が、ＣＤ１３３＋細胞のトランスフェラーゼ発現と類似していることも明らかにした。好ましい一態様において、本発明は、本発明による好ましいｍＲＮＡマーカーを、ＣＤ３４＋細胞の分析のために用いることに関する。

【００３２】
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。本発明は該構造を血液由来幹細胞の分化のマーカー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ーとして、特定の分化段階の細胞の分析に用いることに関する。

【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特定の分化段階の血液由来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。このような個々に変化するグリカンは個々の幹細胞株／試料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、実施例３で述べるように、高度および中程度の変化を示すグリカンの分析に関する。本発明は、特に、フコシル化および／もしくはシアル化のレベル、またはマンノシル化のレベルが異なる場合における、個々の特定の違いの分析に関する。

【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。

【００３６】

本発明の好ましい一態様は、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、Ｍａｎα分岐を含むまたはＭａｎα分岐を含まない単分岐構造等、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に対するものである。好ましい結合剤は、抗体であり、より好ましくはモノクローナル抗体である。

【００３８】

本発明の好ましい一態様は、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。

【００３９】

Ｎ‐グリカン発現に関連するｍＲＮＡ発現によるグリコシル化の分析

本発明は、特定の糖転移酵素ｍＲＮＡの発現が、発現されたグリカン構造と関連する、または相関することを明らかにした。本発明は、実施例１に示すように、発現ｍＲＮＡを、グリコシル化状態の造血幹細胞のｍＲＮＡレベルでの分析に用いることに関する。

【００４０】

ｍＲＮＡ分析のための好ましい糖転移酵素

ｍＲＮＡ分析のための好ましい酵素は、本発明による好ましい複合型Ｎ‐グリカンの合成に関与する、シアル酸転移酵素、フコシルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、Ｎ‐アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、およびマンノシダーゼが挙げられる。

【００４１】

Ｎ‐アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ

ｍＲＮＡレベルのグリコシル化分析という分析に関連して、分析されるべき好ましいＮ‐アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼを表１に示す。ｍＲＮＡ分析のための好ましいＮ‐アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼとしては、ＭＧＡＴ２およびＭＧＡＴ４が挙げられる。実施例１に示すように、二分岐型構造がＣＤ１３３＋細胞上で増加しており、ＭＧＡＴ２およびＭＧＡＴ４等の酵素のｍＲＮＡ発現がこのことと関連していた。

【００４２】

マンノシダーゼ

ｍＲＮＡレベルのグリコシル化分析という分析に関連して、分析されるべき好ましいマンノシダーゼを表１に示す。ヒト血液由来幹細胞、特に臍帯血細胞の分析のための最も好

ましい変化するマンノシダーゼは、Ｍａｎ１Ｃ１である。α２‐マンノシダーゼ（Ｉ型マンノシダーゼ）のｍＲＮＡは、ＣＤ１３３＋細胞には存在しなかったが、分化した細胞には存在した。マンノシダーゼの発現は、血液幹細胞中の大型高マンノースＮ‐グリカンおよび分化した細胞中のよりサイズの小さいグリカンの発現に反映している。

【００４３】

ガラクトシルトランスフェラーゼ

ｍＲＮＡレベルのグリコシル化分析という分析に関連して、分析されるべき好ましいガラクトシルトランスフェラーゼ、特にβ４‐ガラクトシルトランスフェラーゼ、β４ＧＡＬＴ２およびβ４ＧＡＬＴ３、を表１に示す。実施例１に示すように、末端Ｇａｌβ４Ｇｌｃ ＮＡｃ構造は、ＣＤ１３３＋細胞上で突出しており、この酵素のｍＲＮＡ発現がこれと関連していた。

【００４４】

シアル酸転移酵素

ｍＲＮＡレベルのグリコシル化分析という分析に関連して、分析されるべき好ましいシアル酸転移酵素、特にα３‐およびα６‐シアル酸転移酵素、ＳＴ３ＧＡＬ５およびＳＴ６ＧＡＬ１、を表１に示す。さらに、本発明は、特に、ＳＴ３ＧＡＬ６の発現の増加の分析に関し、これは、血液幹細胞と関連することが観察された。

【００４５】

フコシルトランスフェラーゼ

ｍＲＮＡレベルのグリコシル化分析という分析に関連して、分析されるべき好ましいフコシルトランスフェラーゼ、特にα８‐フコシルトランスフェラーゼ、ＦＵＴ８、を表１に示す。ＦＵＴ８の存在は、血液由来幹細胞において特に特徴的であった。ＦＵＴ４の存在およびＦＵＴ７の非存在（低発現）は、ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞の両方に対して特徴的であると考えられた。

【００４６】

本発明は、本発明による、血液幹細胞での分化に関連するグリカン発現を分析する方法に関し、ここで、ｍＲＮＡ発現、またはグリカンの生合成に関連することが示された糖転移酵素もしくはグリコシダーゼであるグリコシル化酵素が測定され、任意に、この分析は、グリカン構造の分析と合わせて実施される。

【００４７】

本発明は、ｍＲＮＡを分析する方法に関し、ここで、Ｎ‐グリカンコアを合成するグリコシル化酵素の発現が測定され、好ましくは、ＭＧＡＴファミリーのマンノシダーゼおよび／またはＮ‐アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼである。好ましくは、ＭＧＡＴ２、ＭＧＡＴ４、およびＭＡＮ１Ｃ１の群より選択される少なくとも１種類の酵素の発現が測定される。

【００４８】

本発明は、さらに、ｍＲＮＡを分析する方法に関し、ここで、Ｎ‐グリカンの修飾の合成を行う酵素の発現が用いられ、酵素は、シアル酸転移酵素、好ましくはα３‐および／またはα６‐シアル酸転移酵素；フコシルトランスフェラーゼ、好ましくはα３／４‐および／またはα８‐フコシルトランスフェラーゼ；ならびにガラクトシルトランスフェラーゼ、好ましくはβ４‐ガラクトシルトランスフェラーゼの群より選択される。好ましくは、この方法は、ＦＵＴ８、ＦＵＴ４、もしくはＦＵＴ７；またはＳＴ６ＧＡＬ１、ＳＴ３ＧＡＬ６、もしくはＳＴ３ＧＡＬ５；またはＢ４ＧＡＬＴ１、Ｂ４ＧＡＬＴ２、もしくはＢ４ＧＡＬＴ３、より好ましくは、Ｂ４ＧＡＬＴ２もしくはＢ４ＧＡＬＴ３の群より選択される少なくとも１種類の酵素遺伝子の発現を対象とする。より好ましくは、異なる単糖残基を転移する少なくとも２種類の酵素が測定され、最も好ましくは、シアル酸転移酵素、フコシルトランスフェラーゼ、およびガラクトシルトランスフェラーゼの群から少なくとも２種類の酵素が、最も好ましくは、これらの群すべてから少なくとも１種類の酵素が、さらにより好ましくは、各群から２種類の酵素が分析される。

【００４９】

幹細胞のグリコシル化の調節

本発明は、さらに、幹細胞と分化した細胞とを比較して変化しているグリコシル化の変化により、幹細胞の分化状態またはプロセスを調節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、細胞のα３‐および／またはα６‐シアル化の変化に関し、これは、幹細胞に大きな影響を与えることが示された。本発明は、さらに、図９に示すように、α３‐およびα６‐シアル化レベルおよび対応するシアル酸転移酵素のｍＲＮＡ発現において、分化に関連する変化が存在することを明らかにした。

【００５０】

酵素によるグリコシル化の変化

本願発明者らは、細胞表面上でのグリコシル化を酵素によって変化させることにより、幹細胞の分化に影響を与えることが可能であることを明らかにした。好ましい一態様では、本発明は、好ましくはシアリダーゼまたはシアル酸転移酵素処理による、より好ましくはシアリダーゼによる血液幹細胞のシアル化レベルの変化、およびそれによる細胞の修飾に関する。本発明は、実施例４および５で述べるように、シアル化の変化が、血液幹細胞の分化に対して大きな影響を与えることを明らかにした。本発明は、α３特異的シアリダーゼおよび／またはα６特異的シアリダーゼによるシアル化の変化に関する。

【００５１】

グリコシル化を変化させるその他の方法

ｍＲＮＡレベルでのグリコシル化の変化による幹細胞の調節

本発明は、さらに、ｍＲＮＡレベルでのグリコシル化の変化による、好ましくはＲＮＡｉ法による、幹細胞の調節に関する。ｍＲＮＡ発現を修飾する方法は、幹細胞に関してＺｈｅｎｇ　ＧＤ　ｅｔ　ａｌ　（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ　（２００５）　２３　（８）　１０２８‐３４）に、および例えば、Ｂｊｏｒｋｌｕｎｄ　Ｍ　ｅｔ　ａｌ　（Ｎａｔｕｒｅ　（２００６）　４３９　（７０７９）　１００９‐１３）に記載のように、当該分野で公知である。ヒトトランスフェラーゼおよびマンノシダーゼに対するＲＮＡｉ試薬は、例えば、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのｉＧｅｎｅサービス（ｗｗｗ．ｉｇｅｎｅ．ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ．ｃｏｍ／ｉｇｅｎｅ）またはＯｒｉｇｅｎｅ（ｓｈＲＮＡ，ｗｗｗ．ｏｒｉｇｅｎｅ．ｃｏｍ）より、通常のヌクレオチド合成サービスによって入手可能である。

【００５２】

本発明は、さらに、その他のレベルでグリカンの生合成に影響を与える等、グリコシル化を変化させるその他の方法に関する。

【００５３】

本発明は、本発明で述べるように血液幹細胞中での分化に関連するグリカン発現の変化または調節により、幹細胞、好ましくは血液幹細胞の分化状態に対して影響を与える方法に関する。

【００５４】

本発明は、特に、分化に関連するグリカン構造の量が減少または増加する前記の方法に関する。好ましい方法では、グリカンの量は、グリコシル化を変化させることが可能である糖転移酵素またはグリコシダーゼによって変化する。好ましい一態様では、グリカンの量は、グリコシル化を変化させることが可能である糖転移酵素またはグリコシダーゼによって、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにて変化する。より好ましくは、シアル化グリカンの量が変化し、好ましくは、α３‐および　またはα６‐シアル化グリカンの量が、細胞表面上の末端Ｇａｌβ‐エピトープと比較して、より好ましくは、細胞表面上のＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃと比較して変化する。さらにより好ましくは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにて、細胞表面上のシアル化を変化させることが可能であるシアル酸転移酵素またはシアリダーゼによる。

【００５５】

本発明は、さらに、ｉｎ　ｖｉｖｏでの方法に関し、ここで、グリコシル化を変化させることが可能である糖転移酵素またはグリコシダーゼであるグリコシル化酵素の活性をｉｎ　ｖｉｖｏで変化させることによってグリカンの量が変化する。好ましくは、グリコシ

ル化酵素は、Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、マンノシダーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼ、またはシアル酸転移酵素遺伝子に対応し、好ましくは、ＦＵＴ８、ＦＵＴ４、もしくはＦＵＴ７；またはＳＴ６ＧＡＬ１、ＳＴ３ＧＡＬ６、もしくはＳＴ３ＧＡＬ５；またはＢ４ＧＡＬＴ１、Ｂ４ＧＡＬＴ２、もしくはＢ４ＧＡＬＴ３、より好ましくは、Ｂ４ＧＡＬＴ２もしくはＢ４ＧＡＬＴ３、またはＭＧＡＴ２、ＭＧＡＴ４、およびＭＡＮ１Ｃ１である。好ましい一態様では、シアル化を変化させることが可能であるシアル酸転移酵素またはシアリダーゼのｉｎ ｖｉｖｏでの活性を変化させることによって、グリカンの量が変化する。好ましくは、この変化は、ＲＮＡｉ法により、細胞への酵素のトランスフェクションにより、および／または酵素の阻害剤による代謝阻害により実施される。

【００５６】

本発明は、特に、実施例４および５に示すように、シアル酸転移酵素またはシアリダーゼにより血液幹細胞の分化に影響を与えることに関する。

【００５７】

好ましいＮ－グリカン構造型

本発明は、分化により、および／または個々の特定の相違により変化する、Ｎ－グリカンの共通のコア構造を有するＮ－グリカンを明らかにした。

【００５８】

幹細胞のＮ－グリカンは、式ＣＧＮ：

［Ｍａｎα３］$_{n1}$（Ｍａｎα６）$_{n2}$Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４（Ｆｕｃα６）$_{n3}$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内にＭａｎβ４ＧｌｃＮＡｃ構造を有するコア構造を有する。

【００５９】

マンノース型グリカン

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。
【００６０】
低Ｍａｎグリカン
上記のいくつかの好ましい低マンノース、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。
【００６１】
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。
【００６２】
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、特定の態様において、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。
【００６３】
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$_{2}$、より好ましくは、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、特定の態様において好ましい。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。

【００６４】

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、および、好ましくは、ｎ２、ｎ４、またはｎ８の少なくとも１つが０であり、より好ましくは、ｎ２またはｎ４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。

【００６５】

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、ならびに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、特定の態様において、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。

【００６６】

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、特定の態様において好ましい。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。

【００６７】

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。

【００６８】

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ー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。抗体ライブラリー手法と同様、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ー分子の合成のために存在する。

【００６９】

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、ｍ１～５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。

【００７０】

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。

【００７１】

本発明はさらに、好ましい一態様において、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。

【００７２】

好ましい末端エピトープは典型的には２～５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２～４個の単糖ユニット、より好ましくは２～３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。

【００７３】

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。

【００７４】

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。

【００７５】

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。

【００７６】

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；

【００７７】

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。

【００７８】
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。
【００７９】
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態様においては、４≦ＨｅｘＮＡｃ≦２０および３≦Ｈｅｘ≦２１、および本発明のさらに好ましい態様においては、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。
【００８０】
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。
【００８１】
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。
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。
【００８２】
本発明は、複合型グリカンに対する一般式（ＣＯ１）に示す共通のコア構造を有する特徴的な複合型グリカンを明らかにしたものであり、この式は、エピトープの存在のため、ＧＮβ２とも呼ばれる。
本発明は、式ＣＯ１（式ＧＮβ２とも呼ばれる）：
［R_1ＧＮβ２］$_{n1}$［Ｍα３］$_{n2}$｛［R_3］$_{n3}$［ＧＮβ２］$_{n4}$Ｍα６｝$_{n5}$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_xＧＮβｚ］$_{nx}$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、ｎ１またはｎ４またはｎｘまたはｎ３の少なくとも１つが１であり、好ましくは、ｎ１またはｎ４またはｎｘの少なくとも１つが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。
【００８３】
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。
【００８４】
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－ａｃｅｔｙｌｌａｃｔｏｓｄｉａｍｉｎｙｌ）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、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。
【００８５】
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。別々に好ましい態様において、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。
【００８６】
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。
【００８７】
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。
【００８８】
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_1ＧＮβ２Ｍα３β４ＧＮＸｙR_2
R_3ＧＮβ２Ｍα６Ｍβ４ＧＮＸｙR_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。

【００８９】

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。

【００９０】

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。

【００９１】

伸長構造

本発明は、Ｇａｌおよび／または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：
$[R_1Gal[NAc]_{O2}\beta z2]_{o1}GN\beta2M\alpha3\{[R_1Gal[NAc]_{o4}\beta z2]_{o3}GN\beta2M\alpha6\}M\beta4GNXyR_2$
［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$[R_xGN\beta z1]_{nx}$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、好ましい一態様においては両者が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、好ましい一態様においては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。

【００９２】

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
$Gal\beta zGN\beta2M\alpha3\{Gal\beta zGN\beta2M\alpha6\}M\beta4GNXyR_2$

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$_1$ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα３｛Ｒ$_3$ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$
Ｒ$_1$ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα３｛ＧＮβ２Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$、および
ＧＮβ２Ｍα３｛Ｒ$_3$ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα６｝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。

【００９３】

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。

【００９４】

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。

【００９５】

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。

【００９６】

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。別の好ましい態様において、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。好ましい一態様において、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。

【００９７】

各種置換基を有するＬＮユニットは、好ましい一般的一態様において、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。

【００９８】

ＬＮユニットは好ましくはＧａｌβ４ＧＮおよび／またはＧａｌβ３ＧＮである。本願発明者らは幹細胞が両方の型の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が、ＩＩ型が特に、血液幹細胞中で一般的であった。さらに本発明は、２型Ｎ‐アセチルラクトサミン、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、血液幹細胞の新規分析マーカーに関する。

【００９９】

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態様において、２≦Ｈｅｘ≦１１であり、本発明のさらに好ましい一態様において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。

【０１００】

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。

【０１０１】

本発明はさらに、Ｎ‐グリカンが式ＨＹ１：

$Ｒ_{1}ＧＮβ２Ｍα３｛［Ｒ_{3}］_{ｎ３}Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ_{2}$

［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（$Ｆｕｃα６）_{n}$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

$Ｒ_{1}$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。

【０１０２】

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

$Ｒ_{1}ＧＮβ２Ｍα３｛［Ｍα３］_{ｍ１}（［Ｍα６］）_{ｍ２}Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ_{2}$

［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。］

【０１０３】

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。

【０１０４】
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
ＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα３Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$、
ＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα６Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$、
ＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα３（Ｍα６）Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$、
および／またはその伸長バリアント
Ｒ１ＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα３Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$、
Ｒ１ＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα６Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$、
Ｒ１ＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα３（Ｍα６）Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$、
式ＨＹ３
［Ｒ$_1$Ｇａｌ［ＮＡｃ］$_{o2}$βｚ］$_{o1}$ＧＮβ２Ｍα３｛［Ｍα３］$_{m1}$［（Ｍα６）］$_{m2}$Ｍα６｝$_{n5}$Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$、
［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、好ましい一態様においては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。

【０１０５】
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
Ｒ１ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα３Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$、
Ｒ１ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα６Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙＲ$_2$、
Ｒ１ＧａｌβｚＧＮβ２Ｍα３｛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。

【０１０６】
血液由来幹細胞に関連する構造
表３および４は、血液由来単核球と比較した、ヒト血液由来幹細胞の分化状態に関連する特定の単糖組成を有する特定の構造群を示す。

【０１０７】
血液幹細胞中に存在し、豊富である構造
本発明は、対応する分化した細胞中よりも血液幹細胞中での存在量が多い新規構造を明らかにした。

【０１０８】
特定のＣＤ１３３で選択された血液幹細胞集団における構造
ＣＤ１３３は、造血幹細胞およびその他の幹細胞に対して一般的に用いられるマーカーである。本発明は、ＣＤ１３３－細胞と比較して、ＣＤ１３３＋細胞での変異を特に明らかにした。

【０１０９】
ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞中の主要なＮ‐グリカンは、高マンノースおよび

二分岐複合型構造である。ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞は、単分岐、ハイブリッド、低マンノース、および大型の複合型Ｎ－グリカンも有しており（図２および３）、詳細については実施例１を参照されたいが、高マンノース型Ｎ－グリカン（図２Ｃ）、コア組成が５－ヘキソース４－Ｎ－アセチルヘキソサミンである二分岐複合型Ｎ－グリカン、およびシアル化単分岐Ｎ－グリカン（図３Ｃ）に対して偏りを示した。対照的に、ＣＤ１３３－細胞は、コア組成が６－ヘキソース５－Ｎ－アセチルヘキソサミンである大型の複合型Ｎ－グリカン、またはより大型のシアル化ハイブリッド型Ｎ－グリカンおよび低マンノース型Ｎ－グリカンの量が多かった。

【０１１０】

ＣＤ１３３＋関連Ｎ－グリカン群、ＣＤ１３３＋ｉ）～ＣＤ１３３＋ｉｉｉ）：

本発明は、ＣＤ１３３＋ｉ）～ＣＤ１３３＋ｉｉｉと名付けられるグリカン組成およびグリカンの３種類の群を明らかにしたものであり、これらは、ＣＤ１３３陽性細胞に特に特徴的である。これらの群はすべて、式ＣＣＮによる共通のＮ－グリカンコア構造を共有しており、このグリカン群は、さらに、特定の複合型およびマンノース型構造に分けられる。発現における相違を表３および４に示す。

【０１１１】

ＣＤ１３３＋細胞に関連する複合型グリカン組成および構造

Ｎ－グリカン群　ＣＤ１３３＋ｉ）

Ｈ５Ｎ４をコアとする二分岐サイズ（ｂｉａｎｔｅｎｎａｒｙ－ｓｉｚｅ）複合型シアル化Ｎ－グリカン

血液由来幹細胞、特にＣＤ１３３＋細胞の特異的発現の好ましい群は、組成の特徴をＨ５Ｎ４とし、好ましくは、Ｓ１Ｈ５Ｎ４Ｆ１、Ｓ１Ｈ５Ｎ４、Ｓ２Ｈ５Ｎ４Ｆ１、Ｓ１Ｈ５Ｎ４Ｆ２、Ｓ２Ｈ５Ｎ４、およびＳ１Ｈ５Ｎ４Ｆ３等である、二分岐サイズ複合型シアル化Ｎ－グリカンの特定の群であることが明らかとなった。シアル化構造の好ましい亜群は、低フコシル化（無しまたは１つ）であるモノ－およびジシアル化－構造、Ｓ１Ｈ５Ｎ４Ｆ１、Ｓ１Ｈ５Ｎ４、Ｓ２Ｈ５Ｎ４Ｆ１、Ｓ２Ｈ５Ｎ４、ならびに高フコシル化であるモノシアル化構造、Ｓ１Ｈ５Ｎ４Ｆ２およびＳ１Ｈ５Ｎ４Ｆ３が挙げられる。

【０１１２】

好ましい構造は、式：

$S_kH_5N_4F_q$

［式中、ｋは、１または２の整数であり、好ましくは、高フコシル化群に対しては１であり、

ｑは、０～３の整数であり、好ましくは、低フコシル化群に対しては０または１、高フコシル化群に対しては２または３である］

によるものである。

【０１１３】

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としては、式：

$[NeuAc\alpha]_{0-1}Gal\beta GN\beta 2Man\alpha 3([NeuAc\alpha]_{0-1}Gal\beta GN\beta 2Man\alpha 6)Man\beta 4GN\beta 4(Fuc\alpha 6)_{0-1}GN$

の構造が挙げられる。

【０１１４】

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。

【０１１５】

好ましい一態様では、シアル酸は、ＮｅｕＡｃα６－であり、グリカンは、この分子のＭａｎα３－腕と結合したＮｅｕＡｃを含む。この帰属は、特異的なシアリダーゼによる消化、およびα６－シアル酸転移酵素（ＳＴ６ＧａｌＩ）の公知の分岐鎖特異性によって明らかとなったα６－結合シアル酸の存在に基づくものである。

ＮｅｕＡｃα６ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα３（［ＮｅｕＡｃα］$_{0-1}$ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα６）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）$_{0-1}$ＧＮ、より好ましくは、ＩＩ型構造：ＮｅｕＡｃα６Ｇａｌβ４ＧＮβ２Ｍａｎα３（［ＮｅｕＡｃα］$_{0-1}$Ｇａｌβ４ＧＮβ２Ｍａｎα６）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）$_{0-1}$ＧＮである。

【０１１６】

本発明は、このように、特異的な結合剤分子によって認識される好ましい末端エピトープ、ＮｅｕＡｃα６ＧａｌβＧＮ、ＮｅｕＡｃα６ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎ、ＮｅｕＡｃα６ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα３を明らかにした。構造が類似しているという状況での用途において好ましいより高い特異性は、より長いエピトープを認識し、それによって、例えば、Ｎ－グリカンとその他のグリカン型を、末端エピトープという点で区別する結合剤を使用することによって得ることができると考えられる。

【０１１７】

高フコシル化である好ましい二分岐構造

本発明は、好ましくは、高フコシル化である二分岐構造、好ましくは、フコースが２個（ジフコシル化）またはフコースが３個（トリフコシル化）の構造に関する。

【０１１８】

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挙げられる構造は、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：
Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧＮβ２Ｍａｎα３／６（ＮｅｕＮＡｃαＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα６／３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ、
および／または
Ｆｕｃα２ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα３／６（ＮｅｕＮＡｃαＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα６／３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ
であり、シアル酸がα６－結合の場合、好ましい分岐構造は、好ましくは、この分子のα３－結合した腕上にシアリル－ラクトサミンを含み、式：
Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧＮβ２Ｍａｎα６（ＮｅｕＮＡｃα６Ｇａｌβ４ＧＮβ２Ｍａｎα３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ、
および／または
Ｆｕｃα２ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα６（ＮｅｕＮＡｃα６Ｇａｌβ４ＧＮβ２Ｍａｎα３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ
による構造となる。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構造は、特徴的な特異的エピトープによって認識されうると考えられる。

ｂ）フコースおよびＮｅｕＡｃは、構造：
ＮｅｕＮＡＣα３Ｇａｌβ３／４（Ｆｕｃα４／３）ＧＮβ２Ｍａｎα３／６（ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα６／３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ
において、同一の腕上に存在し、より好ましくは、シアル化およびフコシル化シアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘ構造が、特徴的で生理活性である構造：
ＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧＮβ２Ｍａｎα３／６（Ｇａｌβ４ＧＮβ２Ｍａｎα６／３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ
として好ましい。

【０１１９】

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型ラクトサミンの存在量が比較的多いことからシアリル－Ｌｅｗｉｓ　ｘ、またはＬｅｗｉｓ　ｙを二分岐Ｎ－グリカンのいずれかの腕上に含み、式：
ＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧＮβ２Ｍａｎα３／６（［Ｆｕｃα］Ｇａ

ｌβＧＮβ２Ｍａｎα６／３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ、
および／または
Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧＮβ２Ｍａｎα３／６（ＮｅｕＮＡｃα３／６ＧａｌβＧＮβ２Ｍａｎα６／３）Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮ
による構造が挙げられる。ＮｅｕＮＡｃは、公知の生合成の優先度により、フコースと同じ腕上にα‐結合していることが好ましい。構造がＮｅｕＮＡｃα６を含む場合、これは、分子のＮｅｕＮＡｃα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３‐腕を形成するように結合することが好ましい。Ｇａｌβ群は、血液幹細胞に対しては、ＩＩ型Ｎ‐アセチルラクトサミン構造のＧａｌβ４群が好ましい。

【０１２０】

Ｎ‐グリカン群　ＣＤ１３３＋ｉｉ）
単分岐サイズシアル化Ｎ‐グリカン

本発明は、さらに、単分岐型グリカン組成を有する特徴的で独特のグリカンを明らかにした。

【０１２１】

この好ましい群は、ＣＤ１３３＋細胞関連構造を含み：
組成の特徴が３≦Ｈ≦４である単分岐サイズシアル化Ｎ‐グリカンが挙げられ、好ましくは、Ｓ１Ｈ３Ｎ３Ｆ１、Ｓ１Ｈ３Ｎ３、Ｓ３Ｈ４Ｎ３Ｆ１、Ｓ１Ｈ４Ｎ３Ｆ１ＳＰ、Ｓ２Ｈ４Ｎ３、ならびに、任意に、さらに、Ｓ１Ｈ４Ｎ３Ｆ１および／またはＳ１Ｈ４Ｎ３等である。直鎖単分岐グリカン、Ｓ１Ｈ３Ｎ３Ｆ１およびＳ１Ｈ３Ｎ３、ならびに、好ましくは、複数の電荷を有する分岐鎖単分岐／ハイブリッド型、Ｓ３Ｈ４Ｎ３Ｆ１、Ｓ１Ｈ４Ｎ３Ｆ１ＳＰ、Ｓ２Ｈ４Ｎ３、ならびに、任意に、さらに、Ｓ１Ｈ４Ｎ３Ｆ１および／またはＳ１Ｈ４Ｎ３等である。

【０１２２】

好ましい構造は、式：
$S_kH_mN_4F_q$
［式中、ｋは、１、２、または３の整数、
ｍは、３または４の整数、
ｑは、０または１の整数である］
の単糖組成を有する。

【０１２３】

好ましい構造は、式：
$(NeuAc)_n$ＮｅｕＡｃα３／６ＧａｌβＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３$(Manα6)_{0-1}$Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４$(Fucα6)_{0-1}$ＧｌｃＮＡｃ
によるものであり、ここで、ｎは、１または２であり、および末端シアル酸は、好ましくは、α８‐またはα９‐結合であり、より好ましくは、より優先的にＩＩ型Ｎ‐アセチルラクトサミン分岐とのα８‐結合であり、ここで、ガラクトース残基はβ１，４‐結合であり、
$(NeuAc)_n$ＮｅｕＡｃα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３$(Manα6)_{0-1}$Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４$(Fucα6)_{0-1}$ＧｌｃＮＡｃ
である。好ましい分岐鎖構造は、式、
$(NeuAc)_n$ＮｅｕＡｃα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３（Ｍａｎα６）Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４$(Fucα6)_{0-1}$ＧｌｃＮＡｃ
によるものであり、好ましい直鎖構造は、式、
$(SP)_{0-1}(NeuAc)_n$ＮｅｕＡｃα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４$(Fucα6)_{0-1}$ＧｌｃＮＡｃ
によるものであり、任意に、特定の一態様では、ＳＰ‐構造（硫酸エステルまたはリン酸エステル構造）を含む。

【０１２４】

ＣＤ１３３＋細胞に関連するマンノース型グリカン組成および構造

Ｎ‐グリカン群　ＣＤ１３３＋ｉｉｉ）
高マンノース型中性Ｎ‐グリカン
　組成の特徴がＮ＝２および５≦Ｈ≦９である好ましい高マンノース型中性Ｎ‐グリカンは、好ましくは、Ｈ５Ｎ２、Ｈ９Ｎ２、およびＨ８Ｎ２を含む。
【０１２５】
　好ましい構造は、式：
［Ｍα２］$_{n1}$Ｍα３｛［Ｍα２］$_{n3}$Ｍα６｝Ｍα６｛［Ｍα２］$_{n6}$［Ｍα２］$_{n7}$Ｍα３｝Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_{2}$
［式中、ｎ１、ｎ３、ｎ６、およびｎ７は独立に０または１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‐タからＡｓｎである。
　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る。］
によるものである。
【０１２６】
　好ましくは、本発明は、前記の式による高マンノース型中性グリカンに関するが、ただし、
ｎ１、ｎ３、ｎ６、およびｎ７のすべてが１であるか（組成はＨ９Ｎ２）、または、
ｎ１、ｎ３、ｎ６、およびｎ７のすべてが０であるか（組成はＨ５Ｎ２）、または、
ｎ１、ｎ３、ｎ６のうちの１つが０であり、残りが１であり、およびｎ７が１であり、より好ましくは、ｎ３が０である（組成はＨ８Ｎ５）。
【０１２７】
　この群の好ましい構造としては：
Ｍａｎα２Ｍａｎα６（Ｍａｎα２Ｍａｎα３）Ｍａｎα６（Ｍａｎα２Ｍａｎα２Ｍａｎα３）Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃ、または
Ｍａｎα２Ｍａｎα６（Ｍａｎα３）Ｍａｎα６（Ｍａｎα２Ｍａｎα２Ｍａｎα３）Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃ、
Ｍａｎα６（Ｍａｎα３）Ｍａｎα６（Ｍａｎα３）Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃ、が挙げられる。
【０１２８】
血液由来の分化した単核球型に関連する構造および組成
　本発明は、対応する血液由来の幹細胞中よりも、分化した単核球中での存在量が多い新規構造を明らかにした。
【０１２９】
ＣＤ１３３－関連Ｎ‐グリカン群、ＣＤ１３３－ｉ）～ＣＤ１３３－ｉｉｉ）：
　本発明は、ＣＤ１３３－ｉ）～ＣＤ１３３－ｉｉｉと名付けられる、グリカン組成およびグリカンの３種類の群を明らかにし、これらは、ＣＤ１３３陰性細胞に特に特徴的である。これらの群はすべて、式ＣＣＮによる共通のＮ‐グリカンコア構造を共有しており、このグリカン群は、さらに、特定の複合型およびマンノース型構造に分けられる。発現における相違を表３および４に示す。
【０１３０】

ＣＤ１３３－細胞に関連する複合型グリカン組成および構造
Ｎ－グリカン群　ＣＤ１３３－ｉ）
大型複合型シアル化Ｎ－グリカン
　この組成は、ＣＤ１３３＋細胞中で豊富となった二分岐Ｎ－グリカンと比較して、Ｎ－アセチルラクトサミンユニットが追加されていることを示している。
【０１３１】
　本発明は、特に、組成の特徴がＮ≧５およびＨ≧６である大型複合型シアル化Ｎ－グリカンに関し、好ましくは、Ｓ１Ｈ６Ｎ５Ｆ１、Ｓ２Ｈ６Ｎ５Ｆ１、Ｓ１Ｈ７Ｎ６Ｆ３、Ｓ１Ｈ７Ｎ６Ｆ１、Ｓ１Ｈ６Ｎ５、Ｓ３Ｈ６Ｎ５Ｆ１、Ｓ２Ｈ７Ｎ６Ｆ３、Ｓ１Ｈ６Ｎ５Ｆ３、Ｓ２Ｈ６Ｎ５Ｆ２、およびＳ２Ｈ７Ｎ６Ｆ１等である。このグリカンは、さらに、コア組成がＨ６Ｎ５である三分岐グリカンを含むトリ－ＬａｃＮＡｃ－グリカン、およびコア組成がＨ７Ｎ６である四分岐グリカンを任意に含むより大型のテトラ－ＬａｃＮＡｃグリカンの群に分けられる。
【０１３２】
　好ましい単糖組成は、式
$S_kH_nN_pF_q$
［式中、
ｋは１～３の整数であり、
ｎは６～７の整数であり、
ｐは５～６の整数であり、
ｑは０～３の整数であり、
ＳはＮｅｕ５Ａｃであり、ＧはＮｅｕ５Ｇｃであり、ＨはＤ－ＭａｎまたはＤ－Ｇａｌの群より選択されるヘキソースであり、ＮはＮ－Ｄ－アセチルヘキソサミンであって、好ましくは、ＧｌｃＮＡｃまたはＧａｌＮＡｃ、より好ましくは、ＧｌｃＮＡｃであり、ＦはＬ－フコースである］
である。本発明は、トリＬａｃＮＡｃ－構造に対する、ｎが６であり、ｐが５である組成、およびテトラ－ＬａｃＮＡｃ－構造に対する、ｎが７であり、ｐが６である組成に関する。
【０１３３】
　好ましい三分岐または四分岐構造は、式：
$\{SA\alpha3/6\}_{s3}LN\beta$　（ＩＩｂ）
による１もしくは２個の追加の分岐を有する、式：
$\{SA\alpha3/6\}_{s1}LN\beta2M\alpha3\{\{SA\alpha3/6\}_{s2}LN\beta2M\alpha6\}M\beta4GN\beta4\{Fuc\alpha6\}GN$　（Ｉ）
［式中、ｓ１、ｓ２、およびｓ３は独立に０または１であり、
ただし、ｓ１、ｓ２、またはｓ３のうちの少なくとも１つは１である。
ＬＮはＧａｌβＧＮとしても表記されるＮ－アセチルラクトサミニルであり、ＧＮはＧｌｃＮＡｃであり、Ｍはマンノシル－であるが、ただし、ＬＮβ２Ｍは、ガラクトース、フコース、ＳＡ、またはＬＮ－ユニット等の１個もしくはいくつかの他の単糖残基によってさらに伸長、および／または分岐されていてもよく、これらは、ＳＡα－構造でさらに置換されていてもよく、式ＩＩｂによる１もしくは２個のβ６－および／またはβ４－結合した追加の分岐でさらに置換されており、
｛｝は直鎖配列で存在する基を表し、｛｝は分岐を表す］
による。ＳＡα－基は、隣接するＧａｌ残基の３もしくは６位に、またはＧｌｃＮＡｃの６位に、好ましくは、隣接するＧａｌ残基の３もしくは６位に結合している。
【０１３４】
好ましいトリ－ＬａｃＮＡｃおよび三分岐グリカン
　本発明は、特に、Ｓ１Ｈ６Ｎ５Ｆ１、Ｓ２Ｈ６Ｎ５Ｆ１、Ｓ１Ｈ６Ｎ５、Ｓ３Ｈ６Ｎ５Ｆ１、Ｓ１Ｈ６Ｎ５Ｆ３、およびＳ２Ｈ６Ｎ５Ｆ２の組成を有するトリ－ＬａｃＮＡｃ、好ましくは、三分岐Ｎ－グリカンに関する。三分岐構造の存在は、特異的なガラクトシダ

ーゼ消化によって明らかにされた。三分岐Ｎ‐グリカンの好ましい型としては、ＭＧＡＴ４によって合成されるものが挙げられる。三分岐Ｎ‐グリカンは、好ましい一態様では、コアフコース残基を持つ。好ましい末端エピトープとしては、Ｌｅｗｉｓ　ｘ、シアリル‐Ｌｅｗｉｓ　ｘ、Ｈ‐およびＬｅｗｉｓ　ｙ抗原が挙げられる。

【０１３５】

好ましい三分岐構造は、式Ｔｒｉ１

｛ＳＡα３／６｝ｓ１ＬＮβ２Ｍα３｛｛ＳＡα３／６｝ｓ２ＬＮβ２（｛ＳＡα３／６｝ｓ３ＬＮβ４）Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮβ４｛Ｆｕｃα６｝ＧＮ

［式中、（）は分岐を表し、他の変数は式Ｉにおいて上記で記載される通りである］

による。

【０１３６】

本発明は、特に、ＣＤ１３３陰性細胞に特異的である三分岐構造を明らかにした。

【０１３７】

好ましいテトラ‐ＬａｃＮＡｃおよび四分岐グリカン

本発明は、特に、トリ‐ＬａｃＮＡｃ、好ましくは、Ｓ１Ｈ７Ｎ６Ｆ３、Ｓ１Ｈ７Ｎ６Ｆ１、Ｓ２Ｈ７Ｎ６Ｆ３、およびＳ２Ｈ７Ｎ６Ｆ１の組成を有する三分岐Ｎ‐グリカンに関する。

【０１３８】

四分岐および／またはポリラクトサミン構造を含む好ましいテトラ‐ＬａｃＮａｃ

本発明は、さらに、単糖組成、ならびに単糖組成Ｓ１Ｈ７Ｎ６Ｆ２およびＳ１Ｈ７Ｎ６Ｆ３に対応するグリカンに関し、これらは、末端ＧａｌβＧｌｃＮＡｃβ３ＧａｌβＧｌｃＮＡｃβ‐、より好ましくは、２型構造、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ‐を有するもの等の、Ｎ‐グリカンを含む四分岐および／またはポリ‐Ｎ‐アセチルラクトサミンエピトープに対応すると帰属された。

【０１３９】

好ましい四分岐構造は、式Ｔｅｔ１

｛ＳＡα３／６｝$_{s1}$ＬＮβ２（｛ＳＡα３／６｝$_{s4}$ＬＮβ４／６）Ｍα３｛｛ＳＡα３／６｝$_{s2}$ＬＮβ２（｛ＳＡα３／６｝$_{s3}$ＬＮβ４）Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮβ４｛Ｆｕｃα６｝ＧＮ

［式中、（）は分岐を表し、ｓ４は０または１であり、他の変数は上記の式Ｉにおいて記載される通りである］

による。

【０１４０】

Ｎ‐グリカン群　ＣＤ１３３－ｉｉ）

ハイブリッド型シアル化Ｎ‐グリカン

本発明は、特に、組成の特徴が５≦Ｈ≦６である、ハイブリッド型シアル化Ｎ‐グリカンに関し、好ましくは、Ｓ１Ｈ６Ｎ３、Ｓ１Ｈ５Ｎ３、およびＳ１Ｈ６Ｎ３Ｆ１等である。

【０１４１】

好ましい単糖組成は、式

$S_1H_nN_3F_q$

［式中、

ｎは５または６の整数であり、

ｑは０または１の整数である］

である。

【０１４２】

好ましい構造は、式：

ＮｅｕＮＡｃα３／６Ｇａβ４ＧＮβ２Ｍα３｛［Ｍα３］$_{m1}$［（Ｍα６）］$_{m2}$Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙR_2

［式中、ｍ１、ｍ２は独立に０または１であり、

ｚはＧＮへの結合位置であって、３または４であり、好ましい一態様では４であり、
R_1は１もしくは２個のＮ‐アセチルラクトサミン型伸長基；ＮｅｕＡｃα３／６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］
による。

【０１４３】

より好ましくは、前記の構造は、
ＮｅｕＮＡｃα３／６Ｇａβ４ＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα３（Ｍα６）Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙR_2、
ならびに、ｈｅｘ５構造、
ＮｅｕＮＡｃα３／６Ｇａβ４ＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα３Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙR_2、および
ＮｅｕＮＡＣα３／６Ｇａβ４ＧＮβ２Ｍα３｛Ｍα６Ｍα６｝Ｍβ４ＧＮＸｙR_2である。

【０１４４】

Ｎ‐グリカン群　ＣＤ１３３－ｉｖ）

表４および図２は、組成がＳＨ５Ｎ５およびＳＨ５Ｎ５Ｆである末端ＨｅｘＮＡｃ基の構造が、分化した血液細胞に対して、好ましくは、ＣＤ１３３－細胞に対して特に特異的であることを示す。本発明は、２個のラクトサミン、およびＮ‐グリカンコアＭａｎβ４ＧｌｃＮＡｃエピトープのバイセクティング（ｂｉｓｅｃｔｉｎｇ）ＧｌｃＮＡｃ等ＧｌｃＮＡｃ置換を含む末端ＧｌｃＮＡｃ構造を有する、対応する二分岐Ｎ‐グリカンに関する。

【０１４５】

ＣＤ１３３－細胞に関連するマンノース型グリカン組成および構造
Ｎ‐グリカン群　ＣＤ１３３－ｉｉｉ）
低マンノース型中性Ｎ‐グリカン

本発明は、特に、組成の特徴がＮ＝２および１≦Ｈ≦４である低マンノース型中性Ｎ‐グリカンに関し、好ましくは、Ｈ３Ｎ２Ｆ１、Ｈ３Ｎ２、Ｈ２Ｎ２Ｆ１、Ｈ２Ｎ２、Ｈ１Ｎ２、およびＨ４Ｎ２等である。

【０１４６】

好ましい単糖組成は、式
$H_nN_2F_q$
［式中、
ｎは１～３の整数であり、
ｑは０または１の整数である］
である。

【０１４７】

好ましい構造は、式：
$[Mα3]_{n2}\{[Mα6)]_{n4}\}[Mα6]_{n5}\{[Mα3]_{n8}\}Mβ4GNβ4[\{Fucα6\}]_mGNyR_2$
［式中、ｎ２、ｎ４、ｎ５、ｎ８、およびｍは独立に０または１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、｛｝は前記構造中の分岐を表し；
ｙおよびＲ２は式Ｍ２において表される通りであり、
ただし、ｎ２、ｎ４、およびｎ８の少なくとも１つが０である］
による。

【０１４８】

好ましい非フコシル化低マンノースＮ‐グリカンは、式：
Ｍα６Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙR_2、

Ｍα３Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_2$、および
Ｍα６｛Ｍα３｝Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_2$、
Ｍα６Ｍα６｛Ｍα３｝Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_2$
Ｍα３Ｍα６｛Ｍα３｝Ｍβ４ＧＮβ４ＧＮｙＲ$_2$
による。

【０１４９】

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、本発明による方法、特に本発明による細胞の分析および／または分離にとって有用である特徴的な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$_2$、
Ｍα６Ｍα６｛Ｍα３｝Ｍβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮｙＲ$_2$、および
Ｍα３Ｍα６｛Ｍα３｝Ｍβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）ＧＮｙＲ$_2$
が挙げられる。

【０１５０】

特定の一態様では、低マンノースグリカンは、通常とは異なるマンノシダーゼ分解に基づく稀な構造、
Ｍａｎα２Ｍａｎα２Ｍａｎα３Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）$_{0-1}$ＧＮ、および
Ｍａｎα２Ｍａｎα３Ｍａｎβ４ＧＮβ４（Ｆｕｃα６）$_{0-1}$ＧＮ
を含む。

【０１５１】

幹細胞からの新規末端ＨｅｘＮＡｃ　Ｎ‐グリカン組成

本願発明者らは、ヒト幹細胞を研究した。データより、末端ＨｅｘＮＡｃと称する変化するグリカン構造の特定の群が明らかとなった。このデータは、分化という点で好ましいシグナルの変化を明らかにするものである。末端ＨｅｘＮＡｃ構造は、Ｎ‐アセチルグルコサミダーゼ酵素を用いた開裂により、末端Ｎ‐アセチルグルコサミン構造を含むと帰属された。

【０１５２】

末端ＨｅｘＮＡｃを持つ構造的亜群による好ましいＮ‐グリカン

本願発明者らは、式：$n_{HexNAc}=n_{Hex}\geqq5$および$n_{dHex}\geqq1$（Ｉ群）、または：$n_{HexNAc}=n_{Hex}\geqq5$および$n_{dHex}=0$（ＩＩ群）によって特徴付けられる末端ＨｅｘＮＡｃ含有Ｎ‐グリカンに関して、分化段階に特異的な相違点が存在することを見出した。本データにより、これらのグリカンが、１）臍帯血および骨髄造血幹細胞（ＣＢおよびＢＭ　ＨＳＣ）等であり、さらにＣＢ　ＨＳＣがＣＤ３４＋、ＣＤ１３３＋、およびｌｉｎ－（系統陰性）細胞等である幹細胞と、これらの細胞型から直接にまたは間接的に分化した細胞との両方から単離された種々のＮ‐グリカン試料で検出されたこと；および２）対応する幹細胞と比較して、分析された分化した細胞中で過剰発現されたこと、が示された。Ｉ群とＩＩ群の間では独立した発現が存在し、従って、式$n_{HexNAc}=n_{Hex}\geqq5$によって決定されるＮ‐グリカン構造群は、上述のように、独立して発現した２個の亜群ＩおよびＩＩに分けられる。

【０１５３】

本願発明者らは、上記のＩＩ群およびＩ群それぞれと同じ組成の特徴を有するＮ‐グリカン、$Hex_3HexNAc_5$および$Hex_3HexNAc_5dHex_1$に対応するグリカンシグナルの発現の差異をも見出した。具体的には、種々の供給源から単離されたＨＳＣの分析において、$Hex_3HexNAc_5dHex_1$は、ＣＤ１３３＋およびｌｉｎ－細胞中で高い発現を、ＣＤ３４＋およびＣＤ３４－細胞等の他のすべてのＣＢ　ＭＮＣ画分では中程度の発現を示し、成体末梢血から単離されたＣＤ３４＋中では発現が検出されないことが見出された。

【０１５４】
Ｎ－グリカンコアα１，６－結合フコースおよびβ１，４結合バイセクティングＧｌｃＮＡｃを合成する生合成酵素の公知の特異性に基づくと、ＩＩ群は、好ましくは、バイセクティングＧｌｃＮＡｃ型Ｎ－グリカンに対応し、一方、Ｉ群は、優先的には、他の末端ＨｅｘＮＡｃ含有Ｎ－グリカンに対応し、優先的には、Ｎ－グリカンコア構造に分岐ＨｅｘＮＡｃを持ち、より優先的には、Ｎ－グリカンコア構造に分岐ＧｌｃＮＡｃを持つ構造を含む。特定の一態様では、この群のグリカン構造は、コアフコシル化バイセクティングＧｌｃＮＡｃ含有Ｎ－グリカンを含み、ここで、追加のＧｌｃＮＡｃは、Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃエピトープへＧｌｃＮＡｃβ４結合して、エピトープ構造、ＧｌｃＮＡｃβ４Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃを、好ましくは複合型Ｎ－グリカン分岐の間に形成する。

【０１５５】
本発明の好ましい一態様では、そのような構造としては、β１，４－結合マンノースの２位へ結合したＧｌｃＮＡｃが挙げられる。本発明のさらに好ましい一態様では、そのような構造としては、ＬＥＣ１４構造に対して記載されたように（Ｒａｊｕ ａｎｄ Ｓｔａｎｌｅｙ Ｊ．Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ （１９９６） ２７１，７４８４－９３）、β１，４－結合マンノースの２位へ結合したＧｌｃＮＡｃが挙げられ、これは、遺伝子発現データおよび糖転移酵素特異性の分析によって裏づけられた、特に好ましい態様である。本発明のさらに好ましい一態様では、そのような構造としては、ＬＥＣ１４構造に対して記載されたように（Ｒａｊｕ，Ｒａｙ ａｎｄ Ｓｔａｎｌｅｙ Ｊ．Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ （１９９５） ２７０，３０２９４－３０２）、Ｎ－グリカンコアのβ１，４－結合ＧｌｃＮＡｃの６位へ結合したＧｌｃＮＡｃが挙げられる。

【０１５６】
本発明は、特に、Ｉ群による構造を含むＩ群グリカンの亜型のさらなる分析に関する。本発明は、さらに、Ｎ－グリカンのコアマーカー構造に対する特異的結合試薬の作製、およびこれらを好ましい癌マーカー構造の分析に用いることに関する。本発明は、さらに、その結合がＧｌｃＮＡｃｓによって阻害されるレクチンＰＳＡ（ｐｉｓｕｍ ｓａｔｉｖｕｍ）またはレンチル（ｌｎｔｉｌ）（Ｌｅｎｓ ｃｕｌｉｎａｒｉｓ）レクチンまたはコアＦｕｃ特異的モノクローナル抗体を用いたネガティブ識別（ｎｅｇａｔｉｖｅ ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ）によるＬＥＣ１４および／または１８構造の分析に関する。

【０１５７】
本発明は、特に、Ｎ－グリカンコアマーカー構造に関し、ここで、二糖エピトープは、式ＣＧＮによるＮ－結合グリカンのコア構造内のＭａｎβ４ＧｌｃＮＡｃ構造である。

【０１５８】
本発明は、さらに、式ＣＧＮの構造を含むＮ－グリカンコアマーカー構造およびマーカーグリカン組成に関し、ここで、Ｍａｎα３／Ｍａｎα６－残基が、複合型、特に、二分岐構造まで伸長され、ｎ３が１であり、および、ここで、Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃ－エピトープがＧｌｃＮＡｃ置換を含む。

【０１５９】
本発明は、さらに、式ＣＧＮの構造を含むＮ－グリカンコアマーカー構造およびマーカーグリカン組成に関し、ここで、Ｍａｎα３／Ｍａｎα６－残基が、複合型、特に、二分岐構造まで伸長され、ｎ３が１であり、および、ここで、Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃ－エピトープが１～８％の間のＧｌｃＮＡｃ置換を含む。

【０１６０】
本発明は、さらに、式ＣＧＮの構造を含むＮ－グリカンコアマーカー構造およびマーカーグリカン組成に関し、ここで、この構造は群：
［ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３］（ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα６）Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４（Ｆｕｃα６）$_{n\ 3}$ＧｌｃＮＡｃｘＲ、
［Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα３］（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎα６）Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４（Ｆｕｃα６）$_{n\ 3}$ＧｌｃＮＡｃｘＲ、および
ＳＡが１もしくは２個のＧａｌ残基へα３および またはα６－結合しており、Ｍａｎβ

４またはＧｌｃＮＡｃβ４がＧｌｃＮＡｃで置換されている場合、それらのシアル化バリアント、
より選択される。
【０１６１】
本発明は、さらに、式ＣＧＮを含むＮ‐グリカンコアマーカー構造およびマーカーグリカン組成に関し、ここで、Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃ‐エピトープが含み、ＧｌｃＮＡｃ残基がＭａｎβ４へβ２‐結合してエピトープＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎβ４を形成する。
【０１６２】
本発明は、さらに、式ＣＧＮを含むＮ‐グリカンコアマーカー構造およびマーカーグリカン組成に関し、ここで、Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃ‐エピトープが含み、ＧｌｃＮＡｃ残基がエピトープのＧｌｃＮＡｃへ６‐結合してエピトープＭａｎβ４（ＧｌｃＮＡｃ６）ＧｌｃＮＡｃを形成する。
【０１６３】
本発明は、さらに、式ＣＧＮを含むＮ‐グリカンコアマーカー構造およびマーカーグリカン組成に関し、ここで、Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃ‐エピトープが含み、ＧｌｃＮＡｃ残基がエピトープのＧｌｃＮＡｃへ４‐結合してエピトープＧｌｃＮＡｃβ４Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃを形成する。
【０１６４】
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。
【０１６５】
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「レポーター構造」を有していることが明らかになった。
【０１６６】
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、ヒト幹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。
【０１６７】
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
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ー由来類似体
ｃ）ペプチド材料を模倣する他のポリマーまたは有機骨格分子（ｏｒｇａｎｉｃ　ｓｃａｆｆｏｌｄ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ）
等が挙げられる
に関する。
【０１６８】

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。

【０１６９】

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．Ｇｌｙｃｏ ｃｏｎｊｕｇａｔｅ 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）。

【０１７０】

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。

【０１７１】

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．ｅｔ ａｌ （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。

【０１７２】

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ーとしてのオン・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。

【０１７３】

末端構造エピトープ

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、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。

【０１７４】

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。

【０１７５】

本発明は、これらが好ましくは間葉系幹細胞である造血幹細胞でない場合の、ヒト幹細胞、好ましくはヒト胚幹細胞または成体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。

【０１７６】

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ー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１５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を明らかにしており、例えば、ｈＥＳＣ‐細胞上の全般的に多いＦｕｃα‐構造の発現、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、および特定の型の糖脂質上に存在する４型構造等、ならびにα３‐フコシル化構造の発現であり、一方、ＩＩ型Ｎ‐アセチルラクトサミン上のα６‐シアル（α６‐ｓｉａｌｉｃ）は、胚様体およびｓｔ３胚幹細胞のＮ‐グリカン上に出現する。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Ｇａｌｂ‐情報は、好ましくは、情報と組み合わせられる。

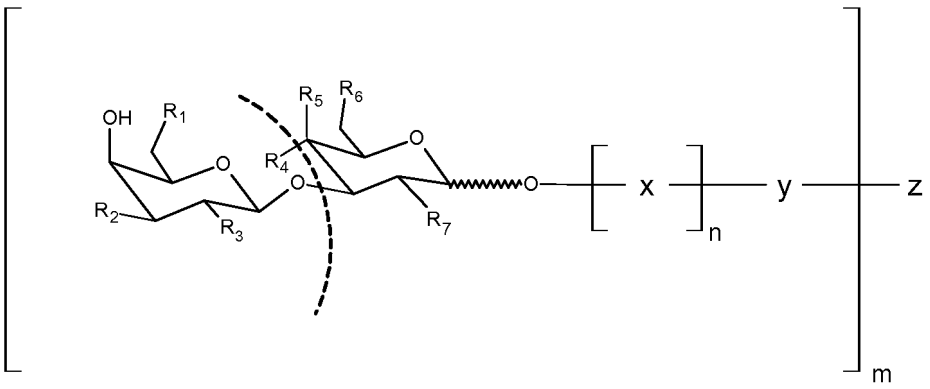
【０１７７】

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。

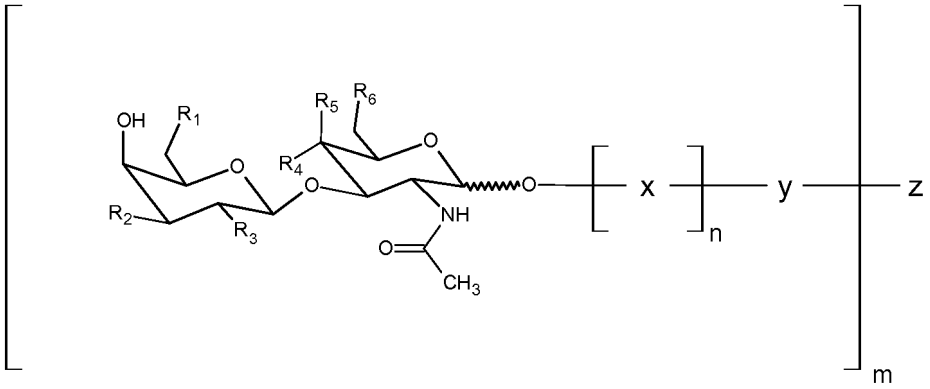
本発明は、胚性細胞から明らかになった新規な末端エピトープＦｕｃα２ＧａｌΒ３ＧａｌＮＡｃβまたはＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃβＧａｌα３含有イソグロボ構造として明らかになった末端Ｆｕｃα２‐を含むガラクトシル‐グロボシド型構造に関する。

式Ｔ１：

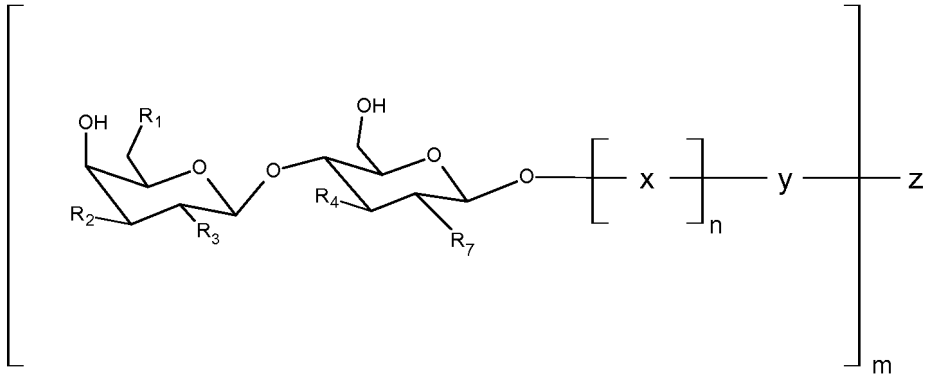


［式中、
Ｘは結合位置であり、
Ｒ$_1$、Ｒ$_2$およびＲ$_6$はＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基シアル酸、好ましくはＮｅｕ５Ａｃα２またはＮｅｕ５Ｇｃα２、最も好ましくはＮｅｕ５Ａｃα２であり、または
Ｒ$_3$はＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基Ｆｕｃα１（Ｌ‐フコース）またはＮ‐アセチル（Ｎ‐アセトアミド、ＮＣＯＣＨ$_3$）であり；
Ｒ$_4$はＨ、ＯＨまたはグリコシド結合した単糖残基Ｆｕｃα１（Ｌ‐フコース）であり、Ｒ$_4$がＨである場合、Ｒ$_5$はＯＨであり、Ｒ$_4$がＨでない場合、Ｒ$_5$はＨであり；
Ｒ７はＮ‐アセチルまたはＯＨであり
Ｘは細胞由来の天然オリゴ糖主鎖構造、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はリンカー基（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１～１０００、好ましくは１～１００、および最も好ましくは１～１０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。］

【０１７８】
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、Ｒ１～Ｒ７等の変数はＴ１に対して記載される通りである］
【０１７９】
好ましい末端β４結合亜群は式３により表される。



式Ｔ３
［式中、Ｒ１～Ｒ４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Ｒ４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］
【０１８０】
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：
Ｇａｌβ１－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は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。］
【０１８１】
式Ｔ５
［Ｍα］ｍＧａｌβ１－ｘ［Ｎα］ｎＨｅｘ（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。］

【０１８２】

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
Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ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）。

【０１８３】

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。］

【０１８４】

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。］
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、好ましい一態様において、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。本発明はこれらが幹細胞、好ましくは間葉系幹細胞、または胚性幹細胞、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または胚幹細胞の種々の段階）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。

【０１８５】

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。］

【０１８６】

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。］
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、好ましくは幹細胞、または胚性幹細胞、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または胚幹細胞の種々の段階）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。
【０１８７】
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。］
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、または胚性幹細胞、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または胚幹細胞の種々の段階）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。
【０１８８】
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。
【０１８９】
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、特に胚および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態様において
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。
【０１９０】
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。
【０１９１】
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。
【０１９２】
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。
【０１９３】
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。

【０１９４】
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。
【０１９５】
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態様において、好ましくはグロボ‐またはイソグロボ型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。
【０１９６】
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。
【０１９７】
本発明はさらに、式
式Ｔ１２
［Ｍ］［ＳＡα３］ｎＧａｌβ１‐４Ｇｌｃ（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。
【０１９８】
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。

【０１９９】

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、前記結合剤が未分化の胚性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。

【０２００】

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有する。

【０２０１】

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、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ３、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。

【０２０２】

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。

【０２０３】
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。
【０２０４】
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。
【０２０５】
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。
【０２０６】
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～Ｔ３のＲ基または式Ｔ４～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態様において、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（Ｆｕｃα４／３）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フコシル化マーカーなどが挙げられる。
【０２０７】
末端Ｆｕｃα１－２を有する構造の中で、本発明はＦｕｃα２Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃα／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ー構造を明らかにし、これらは胚幹細胞の研究に有用であることが見出された。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、特に興味深い構造は、初期に推定された幹細胞マーカーに対する興味深い生合成という観点を持つことが好ましい、グロボ－Ｈ型構造および末端Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβを有する糖脂である。
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実施例１３に示す胚幹細胞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１５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。別の一態様において、非結合クローンの抗体はフィーダー細胞の認識を対象とする。

【０２０８】

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に特徴的な好ましい新規コアマーカーである。構造Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃは、ｈＥＳＣ細胞内で観察可能である新規マーカーとして特に好ましい。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。非修飾マーカーは、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。

【０２０９】

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等が挙げられる。

【０２１０】

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

これらは各種幹細胞に対して特徴的な好ましい新規調節マーカー（ｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｍａｒｋｅｒ）である。

【０２１１】

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態様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。

【０２１２】

造血幹細胞の好ましい構造群

本発明は、特に胚性および成体幹細胞に対する新規マーカーおよび標的構造ならびにこれらへの結合剤を提供し、この場合、これらの細胞は造血幹細胞ではない。造血ＣＤ３４＋細胞から、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等の特定の末端構造が提案されており、Ｓｌｅｘ型構造、ＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃの低発現が示唆されている（Ｘｉａ Ｌ ｅｔ ａｌ Ｂｌｏｏｄ（２００４）１０４（１０）３０９１‐６）。本発明は、特定の特徴的なＯ‐グリカンおよびＮ‐グリカンとは別に、ＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、非ポリラクトサミンバリアントにも関する。本発明は、さらに、特に構造がＮｅｕＮＡｃα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）$_{0-1}$ＧｌｃＮＡｃを含まない場合に、本発明によるＣＤ１３３＋細胞に対する新規マーカー、および新規造血幹細胞マーカーを提供する。好ましくは、造血幹細胞構造は、本発明による非シアル化、フコシル化構造、Ｇａｌβ１‐３‐構造であり、さらにより好ましくは、１型Ｎ‐アセチルラクトサミン構造Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ、または、これとは別に好ましいＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃを主体とする構造である。

【０２１３】

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。

【０２１４】

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１５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。

【０２１５】

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。好ましい一態様において、伸長したエピトープに対する前記抗体が胚性幹細胞の効果的な分析のために選択される。

【０２１６】

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ー等の抗体ライブラリー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１５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。

【０２１７】

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。

【０２１８】

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。

【０２１９】

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。

【０２２０】

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。］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り、Ｒ１がより好ましい］

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］

等が挙げられる。

【０２２１】

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。

【０２２２】

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β４Ｇａｌβ４Ｇｌｃが挙げられる
等が挙げられる。

【０２２３】

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 Ｓｅｔ 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。

【０２２４】

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

【０２２５】

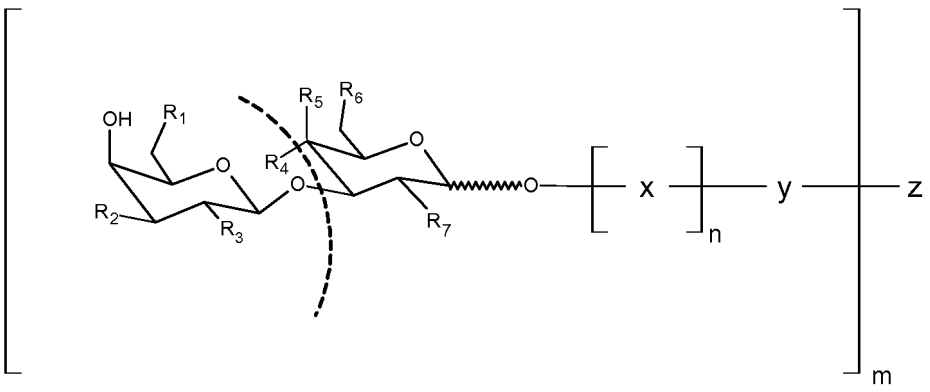
数多くの抗体が直鎖（ｉ‐抗原）および分岐ポリ‐Ｎ‐アセチルラクトサミン（Ｉ‐抗原）に対して知られており、本発明はさらに、Ｉ‐抗原の識別のためのレクチンＰＷＡの使用に関する。本願発明者らは、ポリ‐Ｎ‐アセチルラクトサミンが特定の型のヒト幹細胞に対して特徴的な構造であることを明らかにした。他の好ましい結合試薬、酵素エンド‐ベータ‐ガラクトシダーゼを用いて幹細胞の糖脂質上および糖タンパク質上のポリ‐Ｎ‐アセチルラクトサミンの分析を行った。この酵素はさらに、特定の型の幹細胞上の、本発明のフコシル化および／またはシアル化等の特異的末端修飾を有する直鎖および分岐鎖両者のポリ‐Ｎ‐アセチルラクトサミンの特徴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

【０２２６】

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。

【０２２７】
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。
【０２２８】
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Ｅ１
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。式の伸長末端エピトープは、以下に示す式の式Ｔ１末端の還元末端にＥ１を付加することで得られる。
【０２２９】
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。前記の群は、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。
【０２３０】
本発明は、ヒト血液関連、好ましくは造血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工程を含み、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はリンカー基、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１～１０００、好ましくは１～１００、および最も好ましくは１～１０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胚性幹細胞調製物である。
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：
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。

【０２３１】

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工程を含み、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）$_{n1}$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
ＧａｌＧａｌβ３（ＧｌｃＮＡｃβ６）ＧａｌＮＡｃまたは
R_1ＧａｌＧａｌβ４（R_3）ＧｌｃＮＡｃβ６（R_2ＧａｌＧａｌβ３）ＧａｌＮＡｃ、
［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
ＦｕｃＧａｌα３である］；または
Ｎ－結合グリカンのコア構造中のＭａｎＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ構造；またはエピトープＧａｌ
ＧａｌβＧａｌ４Ｇｌｃ、
または末端マンノース
または末端ＳＡＧａｌα３構造ＧａｌＧａｌα３／６Ｇａｌ［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ＳＡＧａｌα３ＧａｌＧａｌβ４Ｇｌ
ｃＮＡｃβ３Ｇａｌ構造ではない］
からなる群より選択される。

【０２３２】

本発明は、式Ｔ８Ｅベータ
［Ｍα］$_m$ＧａｌＧａｌβ１－３／４［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。

【０２３３】

本発明は式Ｔ１０Ｅ
［Ｍα］$_m$ＧａｌＧａｌβ１－４［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。

【０２３４】

本発明は式Ｔ１０ＥＭａｎ：
［Ｍα］$_m$ＧａｌＧａｌβ１－４［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。

【０２３５】

本発明の一態様は、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工程を含み、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。

【０２３６】

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。

【０２３７】

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。

【０２３８】

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。

【０２３９】

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結合剤と称される、

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結合剤と称される、

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する。

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。

【０２４０】

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。

【０２４１】

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。好ましい一態様においては、（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ーレセプター（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。

【０２４２】

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。好ましい一態様において、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。好ましい一態様において、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。他の態様において、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。

【０２４３】

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。

【０２４４】

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。

【０２４５】

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を含んでいない、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。

【０２４６】

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。

【０２４７】

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、好ましい一態様において、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ーを、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。

【０２４８】

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および追加の支持のためにさらに用いたが、ただしそれは、Ｓｋｏｔｔｍａｎ，　Ｈ．　ｅｔ　ａｌ．　（２００５）　Ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌｓの遺伝子発現プロファイリングデータ、および臍帯血細胞に対するｍＲＮＡプロファイリングから得られた類似のデータから得られ、Ｊａａｔｉｎｅｎ　Ｔ　ｅｔ　ａｌ．　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ　（２００６）　２４　（３）　６３１‐４１のデータを用いた生合成分析の支持に用いたことから、ｍＲＮＡ後の種々の制御レベルのために直接的な証拠ではない。

【０２４９】

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。

【０２５０】

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
Ｍａｎαｘ（Ｍａｎαｙ）$_{z}$Ｍａｎα／β
［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；
【０２５１】
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幹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。
【０２５２】
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し、より好ましくは分化した胚性細胞から、より好ましくは段階３の分化した細胞等胚様体を過ぎた分化した細胞からであり、最も好ましくは該構造は段階３の分化した細胞から識別される。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、および別の態様においては血液由来幹細胞、また別の好ましい群として臍帯血および骨髄幹細胞からの、構造の検出に関する。好ましい一態様において、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。
【０２５３】
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。本発明は好ましい態様において、胚性幹細胞等の幹細胞の、レクチンＰＳＡ等のＭａｎα認識レクチンによる識別に関する。好ましい一態様において、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。他の一態様において、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ー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。
【０２５４】
好ましい高度に特異的な高特異性結合剤
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。

【０２５５】

中性Ｎ‐グリカンのマンノシダーゼ分析

実施例におけるα‐マンノシダーゼ結合剤によるマンノシル化の検出、ならびに臍帯血および末梢血間葉系細胞のグリカンの質量分析プロファイリングの例；実施例１４の臍帯血細胞に対しては、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。

【０２５６】

レクチン結合

α結合マンノースは実施例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）レクチンにより示され、このことは、これらが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。臍帯血のレクチン結合は、実施例８に示す。ＰＳＡはコアＦｕｃａ６‐エピトープを有する複合型Ｎ‐グリカンに対して特異性を持つ。

【０２５７】

マンノース結合レクチン標識

実施例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ｉｎｖｉｔｒｏ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。

【０２５８】

好ましい一態様において、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。

【０２５９】

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。

【０２６０】

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。

【０２６１】

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。

【０２６２】

好ましい高度に特異的な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。

【０２６３】

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。

【０２６４】

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および糖転移酵素分析が、胚幹細胞および分化した細胞に対して実施例に含まれ；臍帯血細胞に対しては、細胞表面上および糖転移酵素を含めて実施例１４および実施例４であり、ならびに糖脂質に対しては実施例１０である。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９に含まれる。

【０２６５】

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換え体、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、ＵＳＡ）、β１，３‐ガラクトシダーゼ（大腸菌における組み換え体、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、等）；糖転移酵素：α２，３‐（Ｎ）‐シアル酸転移酵素（ラット、Ｓ．　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａにおける組み換え体、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における組み換え体、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ｈＥＳＣに対しては実施例に、ＭＳＣに対しては実施例に、臍帯血に対しては実施例８に、細胞増殖のためのレクチン結合剤の効果は実施例に、臍帯血細胞選択は実施例１１に示す。臍帯血および胚細胞からの各種ガレクチン発現によるヒトレクチン分析は実施例１２である。実施例１３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。

【０２６６】

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）レクチンによる細胞の標識およびＳｏｌａｎｕｍ　ｔｕｂｅｒｏｓｕｍ（ＳＴＡ）レクチンによる強度のより低い標識は、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示唆している。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。

【０２６７】

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。

【０２６８】

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。

【０２６９】

β‐結合Ｎ‐アセチルガラクトサミン

Ｗｉｓｔｅｒｉａ　ｆｌｏｒｉｂｕｎｄａレクチン（ＷＦＡ）によりｈＥＳＣが大量に標識されることは、ｈＥＳＣが、Ｎ‐および／またはＯ‐グリカン等のそれらの表面複合糖質上に、β‐結合非還元末端Ｎ‐アセチルガラクトサミン残基を発現することを示唆している。ＷＦＡのｍＥＦへの特異的な結合が存在しないことから、ｍＥＦ中のレクチンリガンドエピトープの量はより少ないことが示唆される。

【０２７０】

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。

【０２７１】

好ましい一態様において、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。

【０２７２】

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。

【０２７３】

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。

本発明の好ましいＧａｌＮＡｃβ４、より好ましくはＧａｌＮＡｃβ４ＧｌｃＮＡｃ、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等が挙げられる。

【０２７４】

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。

【０２７５】

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。

【０２７６】

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。

【０２７７】

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。

【０２７８】

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。

【０２７９】

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。

【０２８０】

特異的結合剤実験および末端ＨｅｘＮＡｃ（ＧａｌＮＡｃ／ＧｌｃＮＡｃおよびＧｌｃＮ

Ａｃ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臍帯血細胞に対しては実施例１４に、および糖脂質に対しては実施例１０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、ｈＥＳＣに対しては実施例に、ＭＳＣに対しては実施例に、臍帯血に対しては実施例８に示し、該レクチン結合剤の細胞増殖に対する効果を実施例に示し、臍帯血細胞選択を実施例１１に示す。
【０２８１】
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換え体、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。
【０２８２】
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。
【０２８３】
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。
【０２８４】
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。
【０２８５】
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。データを臍帯血に対する実施例８に、細胞増殖に対するレクチン結合剤の効果を、臍帯血細胞選択に対しては実施例１１に示す。
【０２８６】
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。
【０２８７】
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、臍帯血細胞については実施例

１４および実施例４に、細胞表面上の糖脂質に対しては実施例１０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，

【０２８８】

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。

【０２８９】

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。

【０２９０】

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。

【０２９１】

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。

【０２９２】

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。

【０２９３】

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。

【０２９４】

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。好ましい一態様において、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。

【０２９５】

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、臍帯血細胞に対しては、細胞表面上および糖転移酵素を含めて実施例１４および実施例４に含まれ、ならびに糖脂質に対しては実施例１０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９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ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃを有するＦｕｃ‐ＴＶＩ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における組み換え体、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）。

ＭＡＡおよびＳＮＡ等の植物低特異性レクチン、およびデータは、ｈＥＳＣに対しては実施例に、ＭＳＣに対しては実施例に、臍帯血に対しては実施例８に、細胞増殖に対するレクチン結合剤の効果は実施例８、臍帯血細胞選択は実施例１１に示す。実施例１３においては、シアリル構造の抗体標識を示す。

【０２９６】

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。さらに好ましい一態様において、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。好ましいガレクチンを実施例１２に列挙する。

【０２９７】

本発明は好ましい一態様において、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：この結果は、ＣＢ　ＣＤ３４＋／ＣＤ１３３＋幹細胞集団およびｈＥＳＣの両方が、興味深く独特のガレクチン発現プロファイルを有することを示唆しており、このことによって、ガレクチンリガンド親和性プロファイルが異なったものとなる（Ｈｉｒａｂａｙａｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，　２００２）。この結果はさらに、これらの幹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。

【０２９８】
幹細胞グライコーム分析の特定の技術的局面
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工程からなる：
１° グリカン含有画分を試料から単離し、
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。
【０２９９】
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。
【０３００】
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ー（ｇｒａｐｈｉｔｅ ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ）により達成される。
【０３０１】
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。
【０３０２】
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‐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。

【０３０３】

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

最も広い態様において、本発明は全ての型のヒト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幹細胞を意味する。本発明の幹細胞は、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。幹細胞には、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。

【０３０４】

ヒト幹細胞に対する最も広い態様において、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。

【０３０５】

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。

【０３０６】

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、初期ヒト細胞の特異的な型に関する。

【０３０７】

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、より優先的には間葉系幹細胞に分化し得る細胞を含む。

【０３０８】

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。

【０３０９】

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、初期ヒト細胞集団、すなわち多分化能細胞およびそれに由来する細胞集団に関する。

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。

【０３１０】

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、好ましい一態様の下で、「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。

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。

【０３１１】

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、および胚性細胞等が挙げられる。より具体的な一態様において、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。

【０３１２】

具体的一態様の下で、臍帯血のさらなる造血幹細胞型としてのＣＤ３４＋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。

【０３１３】

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。好ましい一態様において、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。

【０３１４】

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。好ましい一態様において、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。

【０３１５】

初期ヒト血液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。好ましい一態様において、該亜集団は抗体による選択によって産生され、他の態様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。好ましい一態様において、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である。

【０３１６】
ＣＤ３４陽性細胞集団は比較的大きく、異質（ｈｅｔｅｒｏｇｅｎｏｕｓ）である。特定の細胞産物を産生させることを目的としたいくつかの用途に対しては最適とは言えない。本発明は、好ましくは、特異的に選択された非ＣＤ３４集団に関し、すなわちＣＤ３４マーカーと結合しないという点で選択された細胞であり、均質な細胞集団と呼ばれる。均質な細胞集団は、サイズのより小さい単核球集団であってよく、例えば、ＣＤ１３３＋細胞集団に対応し、特異的に選択されたＣＤ３４＋細胞集団よりも小さいサイズである。さらに、初期ヒト細胞の好ましい均質な亜集団は、ＣＤ３４＋細胞集団より大きくてもよいと考えられる。
均質な細胞集団は、ＣＤ３４＋細胞集団の亜集団であってよく、好ましい態様では、具体的には、ＣＤ１３３＋細胞集団またはＣＤ１３３型細胞集団である。本発明による「ＣＤ１３３型細胞集団」は、ＣＤ１３３＋細胞集団と類似しているが、ＣＤ１３３ではない別のマーカーに関して選択されたものであることが好ましい。このマーカーは、好ましくは、ＣＤ１３３共発現マーカーである。好ましい一態様では、本発明は、ＣＤ１３３型細胞集団としてのＣＤ１３３＋細胞集団またはＣＤ１３３＋亜集団に関する。好ましい均質な細胞集団は、特別のＣＤ１３３型細胞として定めることができるもの以外のその他の細胞集団をさらに含むと考えられる。
【０３１７】
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ーに対する特異的結合剤の結合により選択される。好ましい一態様において、前記の均質な細胞は、ＣＤ３４マーカーと低い相関を有し、細胞表面上のＣＤ１３３と高い相関を有する細胞表面マーカーにより選択される。好ましい細胞表面マーカーとしては、ＣＤ１３３型細胞中で豊富となった本発明によるα３‐シアル化構造が挙げられる。純粋な、好ましくは完全なＣＤ１３３＋細胞集団が、本発明による分析にとって好ましい。
【０３１８】
本発明は、極めて重要なｍＲＮＡ発現マーカーに関し、これにより純粋な臍帯血由来材料からの細胞集団の分析または識別が可能となるであろう。本発明は、特に、初期ヒト臍帯血細胞上で特異的に発現されたマーカーに関する。
【０３１９】
本発明は、好ましい一態様において、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、好ましい一態様において、新鮮な非培養細胞に関する。
【０３２０】
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細胞である細胞の分析のためのマーカーの使用に関する。
【０３２１】
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。最も広い態様において、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ーを有し、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ー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。
【０３２２】
好ましい骨髄細胞
本発明は多分化能細胞集団またはヒト骨髄由来の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。好ましい一態様において、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。

【０３２３】

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、Ａｒｃｈ　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。

【０３２４】

胚性細胞集団

本発明は特に、胚性細胞集団を対象とする方法に関するものであり、その場合、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ことが好ましい。本発明は特定の一態様の下で、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。

【０３２５】

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。さらに他の態様において、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。

【０３２６】

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。

【０３２７】

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。

【０３２８】

間葉系多分化能細胞

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。好ましい一態様において、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。

【０３２９】

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。

【０３３０】

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。好ましい一態様においては、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。好ましい一態様においては、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球集団中に存在する。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。

３）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り、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である。

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。

【０３３１】

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。

【０３３２】

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。

【０３３３】

本発明は好ましい一態様において、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。

【０３３４】

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。

【０３３５】

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。好ましい一態様において、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。

【０３３６】

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。

【０３３７】

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。

【０３３８】
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／または本発明による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。
【０３３９】
支持／フィーダー細胞株の分析
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／フィーダー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／フィーダー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。好ましい一態様において、本発明はこれらの支持／フィーダー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。
【０３４０】
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。
【０３４１】
好ましい一態様において、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。
【０３４２】
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ー分子の効果に注目する。エフェクターは典型的には、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。
前記エフェクター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ー等が挙げられる。エフェクター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。
【０３４３】
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。
【０３４４】
細胞操作工程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工程は、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。

【０３４５】

細胞操作工程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。

【０３４６】

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工程および／または細胞操作工程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。

【０３４７】

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工程を分析した。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。

【０３４８】

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、該過程の各種工程における、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。

【０３４９】

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。

【０３５０】

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。

【０３５１】

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。

【０３５２】

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。

【０３５３】

本発明は特に、１または複数の以下の工程を含む、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工程においては、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、該方法の工程内における使用に関する。

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工程を含み、より好ましくは少なくとも２つの工程が含まれ、より好ましくは少なくとも３つの工程、および最も好ましくは少なくとも工程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。

２．抗体を基盤とした方法が用いられる場合、細胞材料は、好ましい一態様において、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。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、より好ましい一態様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。より好ましい一態様において、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。好ましい一態様において、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。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。

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。

好ましい一態様において、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。

【０３５４】

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。

【０３５５】

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。

【０３５６】

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。

【０３５７】

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。

【０３５８】

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。

【０３５９】

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。

【０３６０】

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ー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。

【０３６１】

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Ｒ３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。
【０３６２】
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、別の一態様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。
【０３６３】
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。好ましい一態様において、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。本発明は特定の態様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。
【０３６４】
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：
（Ｆｕｃα２）$_{n1}$Ｇａｌβ３／４（Ｆｕｃα４／３）$_{n2}$ＧｌｃＮＡｃβ‐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。
【０３６５】
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。
【０３６６】
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。
【０３６７】
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。

【０３６８】

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‐（ＧａｌＧｌｃＮＡｃ）、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（ＧａｌＧｌｃＮＡｃ）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）、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ　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

$(Sac\alpha 3/6)_{n5}(Fuc\alpha 2)_{n1}Gal\beta 4(Fuc\alpha 3)_{n3}GlcNAc\beta 3[Gal\beta 4(Fuc\alpha 3)_{n2}GlcNAc\beta 3]_{n4}Gal\beta 4Glc\beta Cer$

［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。

【０３６９】
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、およびマーカー構造
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。
【０３７０】
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。好ましい一態様において、優先的には８７６および８９２等のｈＥＳＣに典型的であるグリカンシグナルがそれらの分析に用いられ、より優先的にはＦｕｃＨｅｘＨｅｘＮＡｃＬａｃであり、ここではα１，２－Ｆｕｃがα１，３／４－Ｆｕｃに対して優先的であり、およびＨｅｘ$_2$ＨｅｘＮＡｃ$_1$Ｌａｃ、および、より優先的には、Ｇａｌβ３［Ｈｅｘ$_1$ＨｅｘＮＡｃ$_1$］Ｌａｃである。好ましい他の一態様において、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。
【０３７１】
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（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、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。
【０３７２】
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。さらなる一態様において、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。
【０３７３】
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ー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。

【０３７４】

特には胚幹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

胚幹細胞による抗体標識実験の表から、特異的な１型Ｎ‐アセチルラクトサミン抗原認識抗体が、非修飾二糖Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ（Ｌｅ　ｃ、Ｌｅｗｉｓ　ｃ）ならびにフコシル化誘導体Ｈ型およびＬｅｗｉｓ　ｂを認識することが明らかになった。この抗体は、幹細胞の培養に用いたマウスフィーダー細胞ｍＥＦと比べてｈＥＳＣ細胞集団の識別に効果的であった。

特異的な異なるＨ２型を認識する抗体は、胚幹細胞の異なる亜集団を認識し、それによりこの細胞の亜集団の決定に有用であることが明らかになった。本発明は、さらに、胚幹細胞上の特定のＬｅｗｉｓ　ｘおよびシアリル‐Ｌｅｗｉｓ　ｘ構造を明らかにした。

【０３７５】

他の好ましい結合剤および／または抗体は、ＧＦ２８７（Ｈ１型）と同じエピトープと結合する結合剤を含む。好ましい一態様では、抗体は、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃエピトープと結合する。より好ましい抗体は、Ａｂｃａｍによるクローン１７‐２０６（ａｂ３３５５）の抗体を含む。このエピトープは適切であり、幹細胞、好ましくはヒト胚幹細胞の検出、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。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。この抗体を用いて、フィーダー細胞と幹細胞とを含む細胞混合物から、幹細胞、好ましくはヒト胚幹細胞をポジティブに単離および／または分離および／または濃縮することができる。

【０３７６】

他の好ましい結合剤および／または抗体は、ＧＦ２７９（Ｌｅｗｉｓ　ｃ、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ）と同じエピトープと結合する結合剤を含む。好ましい一態様では、抗体は、複合糖質の、より好ましくは糖タンパク質およびラクトテトラオシルセラミド等の糖脂質のＧａｌβ３ＧｌｃＮＡｃエピトープと結合する。より好ましい抗体は、Ａｂｃａｍによるクローン Ｋ２１（ａｂ３３５２）の抗体を含む。このエピトープは、幹細胞、好ましくはヒト胚幹細胞の分化段階および／または多能性の検出、単離、および評価に適しており、これらに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。この抗体を用いて、幹細胞、好ましくはヒト胚幹細胞を、フィーダー細胞と幹細胞とを含む細胞混合物からポジティブに単離および／または分離および／または濃縮することができる。

【０３７７】

他の好ましい結合剤および／または抗体は、ＧＦ２８８（グロボ　Ｈ）と同じエピトープと結合する結合剤を含む。好ましい一態様では、抗体は、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβエピトープと、より好ましくはＦｕｃα２Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ３ＧａｌαＬａｃＣｅｒエピトープと結合する。より好ましい抗体は、Ｇｌｙｃｏｔｏｐｅによるクローン Ａ６９‐Ａ／Ｅ８（ＭＡＢ‐Ｓ２０６）の抗体を含む。このエピトープは、幹細胞、好ましくはヒト胚幹細胞の分化段階および／または多能性の検出、単離、および評価に適しており、これらに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。この抗体を用いて、幹細胞、好ましくはヒト胚幹細胞を、フィーダー細胞と幹細胞とを含む細胞混合物からポジティブに単離および／または分離および／または濃縮することができる。

【０３７８】

他の好ましい結合剤および／または抗体は、ＧＦ２８４（Ｈ２型）と同じエピトープと結合する結合剤を含む。好ましい一態様では、抗体は、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃエピトープと結合する。より好ましい抗体は、Ａｃｒｉｓによるクローン Ｂ３９３（ＤＭ３０１５）の抗体を含む。このエピトープは、幹細胞、好ましくはヒト胚幹細胞の分化

段階および／または多能性の検出、単離、および評価に適しており、これらに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。この抗体を用いて、幹細胞、好ましくはヒト胚幹細胞を、フィーダー細胞と幹細胞とを含む細胞混合物からポジティブに単離および／または分離および／または濃縮することができる。

【０３７９】

他の好ましい結合剤および／または抗体は、ＧＦ２８３（Ｌｅｗｉｓ　ｂ）と同じエピトープと結合する結合剤を含む。好ましい一態様では、抗体は、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃエピトープと結合する。より好ましい抗体は、Ａｃｒｉｓによるクローン２‐２５ＬＥ（ＤＭ３１２２）の抗体を含む。このエピトープは、幹細胞、好ましくはヒト胚幹細胞の分化段階および／または多能性の検出、単離、および評価に適しており、これらに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。この抗体を用いて、幹細胞、好ましくはヒト胚幹細胞を、フィーダー細胞と幹細胞とを含む細胞混合物からポジティブに単離および／または分離および／または濃縮することができる。

【０３８０】

他の好ましい結合剤および／または抗体は、ＧＦ２８６（Ｈ２型）と同じエピトープと結合する結合剤を含む。好ましい一態様では、抗体は、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃエピトープと結合する。より好ましい抗体は、ＡｃｒｉｓによるクローンＢ３９３（ＢＭ２５８Ｐ）の抗体を含む。このエピトープは、幹細胞、好ましくはヒト胚幹細胞の分化段階および／または多能性の検出、単離、および評価に適しており、これらに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。この抗体を用いて、幹細胞、好ましくはヒト胚幹細胞を、フィーダー細胞と幹細胞とを含む細胞混合物からポジティブに単離および／または分離および／または濃縮することができる。

【０３８１】

他の好ましい結合剤および／または抗体は、ＧＦ２９０（Ｈ２型）と同じエピトープと結合する結合剤を含む。好ましい一態様では、抗体は、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃエピトープと結合する。より好ましい抗体は、ＧｌｙｃｏｔｏｐｅによるクローンＡ５１‐Ｂ／Ａ６（ＭＡＢ‐Ｓ２０４）の抗体を含む。このエピトープは、幹細胞、好ましくはヒト胚幹細胞の分化段階および／または多能性の検出、単離、および評価に適しており、これらに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。この抗体を用いて、幹細胞、好ましくはヒト胚幹細胞を、フィーダー細胞と幹細胞とを含む細胞混合物からポジティブに単離および／または分離および／または濃縮することができる。

【０３８２】

フィーダー細胞、好ましくはマウスフィーダー細胞と結合する他の結合剤は、ＧＦ２８５（Ｈ２型）と同じエピトープと結合する結合剤を含む。好ましい一態様では、抗体は、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃエピトープと結合する。より好ましい抗体は、ＡｃｒｉｓによるクローンＢ３８９（ＤＭ３０１４）の抗体を含む。このエピトープは、フィーダー細胞、好ましくはヒト胚幹細胞との培養物中のマウスフィーダー細胞の検出、単離、および評価に適しており、これらに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。この抗体を用いて、フィーダー細胞、好ましくはマウス胚性フィーダー細胞を、フィーダー細胞と幹細胞とを含む細胞混合物からポジティブに単離および／または分離および／または濃縮（ネガティブに幹細胞を選択）することができる。

【０３８３】

幹細胞、好ましくはヒト幹細胞と結合する他の結合剤は、ＧＦ２８９（Ｌｅｗｉｓ　ｙ）と同じエピトープと結合する結合剤を含む。好ましい一態様では、抗体は、Ｆｕｃα２

Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃエピトープと結合する。より好ましい抗体は、Ｇｌｙｃｏｔｏｐｅによるクローン Ａ７０‐Ｃ／Ｃ８（ＭＡＢ‐Ｓ２０１）の抗体を含む。このエピトープは、幹細胞、好ましくはフィーダー細胞との培養物中のヒト幹細胞の検出、単離、および評価に適しており、これらに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。この抗体を用いて、幹細胞、好ましくはヒト幹細胞を、フィーダー細胞と幹細胞とを含む細胞混合物からポジティブに単離および／または分離および／または濃縮（ネガティブにフィーダー細胞を選択）することができる。

【０３８４】

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ー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、およびそのコロニーから選択／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１～１０％、１０％～２０％、１５～２５％、２０～４０％、２５～３５％、または３５～５０％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。

【０３８５】

グリカン発現細胞の数が多いことは、多能性／多分化能マーカーにおける有用性、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５０～６０、５５％～６５％、６０～７０％、７０～８０、８０～９０％、９０～１００、または９５～１００％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。

【０３８６】

結合剤ＧＦ２７９、ＧＦ２８７、およびＧＦ２８９によって認識されるエピトープならびにこれらの結合剤は、培養物中の幹細胞の多能性および多分化能の分析に特に有用である。結合剤ＧＦ２８３、ＧＦ２８４、ＧＦ２８６、ＧＦ２８８、およびＧＦ２９０によって認識されるエピトープならびにこれらの結合剤は、幹細胞のサブセットの選択または単離に特に有用である。このようなサブセットまたは亜集団は、さらに増殖させ、その分化する能力について、および特定の分化経路に関与する分化した細胞群または細胞についてｉｎ ｖｉｔｒｏで研究することができる。

【０３８７】

本明細書で用いられるパーセントは、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、幹細胞コロニー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。

【０３８８】

コロニーでは、グリカン構造を有する細胞は、特定の領域内に分布される場合があり、または小パッチ状のコロニーに分散される場合がある。パッチ状に観察される幹細胞は、細胞系統に特異的な研究、単離および分離に有用である。パッチ状の特徴は、ＧＦ２８３、ＧＦ２８４、ＧＦ２８６、ＧＦ２８８、およびＧＦ２９０で観察された。

【０３８９】

フィーダー細胞、好ましくはマウスフィーダー細胞、最も好ましくは胚性線維芽細胞のポジティブセレクションに対しては、ＧＦ２８５が有用である。この抗体は特異性が低く、例えばＬｅｗｉｓ ｙと結合する場合があり、これは、ｍＥＦ細胞中でも観察されている。これはほとんどすべてのフィーダー細胞を染色するが、幹細胞の染色はあったとして

もほとんどない。しかしこの抗体は、最適化された条件下では、胚性体（ｅｍｂｒｙｏｎａｌ　ｂｏｄｉｅｓ）の薄い表面と結合することが明らかになり、このことは、Ｌｅｗｉｓ　ｙ抗体が胚様体のコアと結合することと補完的であった。発現のすべてのパーセントについては表を参照されたい。

【０３９０】

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。

【０３９１】

実施例１３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。

【０３９２】

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。

【０３９３】

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１３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。

【０３９４】

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。

【０３９５】

本発明の好ましい一態様において、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１３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。

【０３９６】
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。
【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、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。
【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、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。
【０３９９】
好ましい一態様において、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１３に列挙する）。
【０４００】
本発明の他の好ましい態様において、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１３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。
【０４０１】
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。

【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、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。

【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、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。好ましい一態様において、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。

【０４０４】

本発明の好ましい一態様において、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１３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。

【０４０５】

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１３に列挙する）。

【０４０６】

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。

【０４０７】

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。

【０４０８】

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。

【０４０９】

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。好ましい一態様において、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。

【０４１０】

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１３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。

【０４１１】

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ー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。
【０４１２】
「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。
【０４１３】
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態様において新規標的／マーカー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。
【０４１４】
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。
【０４１５】
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工程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。
【０４１６】
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。
【０４１７】
細胞成分を単離するための好ましい方法は次の工程
１）幹細胞試料を提供すること。
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こと。
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こと。
を含む。
【０４１８】
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。
好ましい一態様において、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。
【０４１９】
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。

【０４２０】

より好ましくは、本発明は、前記単離工程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態様において、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。

【０４２１】

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。

【０４２２】

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。

【０４２３】

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工程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。

【０４２４】

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、アフィニティークロマトグラフィー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。アフィニティークロマトグラフィーは、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工程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ークロマトグラフィーも、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ークロマトグラフィーおよび／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。

【０４２５】

前記方法は常圧またはＨＰＬＣクロマトグラフィーを用い、従来のクロマトグラフィー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工程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）クロマトグラフィーである。

【０４２６】

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。

【０４２７】

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。

【０４２８】

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

【０４２９】

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。

【０４３０】

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。

【０４３１】

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。組み換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。

【０４３２】

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‐Ａｇｌ４、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。

【０４３３】

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。

【０４３４】

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。

【０４３５】

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。

【０４３６】

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。

【０４３７】

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、（１

９８３）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２８～３５、残基４９～５９、および残基９２～１０３にあると定義される（Ｊａｎｅｗａｙ ａｎｄ Ｔｒａｖｅｒｓ，Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ，２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，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。

【０４３８】

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。

【０４３９】

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、天然または組み換えの、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。

【０４４０】

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、クロマトグラフィー樹脂、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‐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。

【０４４１】

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。

【０４４２】

ＨＳＣ

本明細書で概説する方法は、ＨＳＣまたはその子孫の細胞集団からの同定に特に有用である。しかし、さらなるマーカーを用いて、全ＨＳＣまたは幹細胞集団内の亜集団をさらに区別することもできる。

ＨＳＣｓ

【０４４３】

幹細胞上の式（Ｉ）のグリカン構造に対する結合剤のレベルによって、各種亜集団を区別することができる。これは、幹細胞表面上（またはフィーダー細胞特異的結合剤を用いる場合はフィーダー細胞上）に出現する場合があり、これを本明細書で概説する方法によって検出することができる。しかし、本発明を用いて、ＣＤ３４．ｓｕｐ．＋、ＣＤ３８．ｓｕｐ．－、ＣＤ９０．ｓｕｐ．＋（ｔｈｙ１）、およびＬｉｎ．ｓｕｐ．－細胞等であるがこれらに限定されない幹細胞またはＨＳＣ集団の各種表現型間で区別することができる。好ましくは、同定される細胞は、これらに限定されないが、ＣＤ３４．ｓｕｐ．＋、ＣＤ３８．ｓｕｐ．－、ＣＤ９０．ｓｕｐ．＋（ｔｈｙ１）、またはＬｉｎ．ｓｕｐ．－を含む群から選択される。

【０４４４】

本発明は、従って、幹細胞および／もしくはＨＳＣまたはその子孫に対して集団を濃縮する方法を包含する。この方法は、ＨＳＣまたはその子孫の混合物を、幹細胞上の式（Ｉ）によるグリカン構造を認識してこれと結合する抗体またはマーカーまたは結合タンパク質／結合物質または結合剤と、この抗体またはマーカーまたは結合剤の幹細胞上の式（Ｉ）によるグリカン構造への結合を可能とする条件下にて組み合わせること、ならびにその抗体またはマーカーによって認識された細胞を分離して幹細胞またはその子孫に対して著しく濃縮された集団を得ることを含む。この方法は、試料中のＨＳＣまたはその子孫の数に対する診断アッセイとして用いることができる。細胞と抗体またはマーカーとは、続いて定量される幹細胞上の式（Ｉ）によるグリカン構造に対するこの抗体またはマーカーの特異的結合を可能とするのに十分な条件下にて組み合わされる。ＨＳＣもしくは幹細胞もしくはその子孫を単離することができ、またはさらに精製することができる。

【０４４５】

上記で考察したように、細胞集団は、上記で考察した試料等の幹細胞またはＨＳＣまたはその子孫の任意の供給源から得ることができる。

【０４４６】

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ー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／マーカーは上記で議論されるマーカー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ーとして有用である。

【０４４７】
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。

【０４４８】
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；アフィニティークロマトグラフィー；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。

【０４４９】
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。

【０４５０】
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。

【０４５１】
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工程で分離することができるが、望ましくはこれらの系統は、幹細胞マーカー上の式（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。

【０４５２】
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ー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ーを用いて、これらの細胞を濃縮し、または減らすことができる。これらのマーカーは、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。

【０４５３】
上記方法はさらに、他の幹細胞特異的マーカー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工程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ーとしては、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。個々の要素による適当な選択、ＨＳＣ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ＨＳＣまたはその子孫のそのマーカーに関するスクリーニン

グにより、生存能力のあるＨＳＣ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。

【０４５４】

幹細胞またはＨＳＣ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ＨＳＣ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ーを用いて、各種細胞系統を同定および単離することができる。

【０４５５】

本発明のさらに他の局面において、幹細胞またはＨＳＣ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を含んだ細胞集団を得ること；

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こと；

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こと；および

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こと；

を含む。

【０４５６】

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。

【０４５７】

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、末梢血、および胚幹細胞、ならびに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。他の態様において、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ー細胞、例えば胚幹細胞についてはヒトまたはマウスフィーダー細胞等の対応するフィーダー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。

【０４５８】

固定化した結合剤構造の使用

好ましい一態様において、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工程を含むことができる。

【０４５９】

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。
【０４６０】
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、フィーダー細胞等の分化した細胞、好ましくは動物フィーダー細胞およびより好ましくはマウスフィーダー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。
【０４６１】
好ましい分別法としては、蛍光活性化細胞選別法（ＦＡＣＳ）、アフィニティークロマトグラフィー法、および磁性ビーズ法等のビーズ法などが挙げられる。
【０４６２】
好ましい細胞、好ましくは胚性細胞と、フィーダー細胞等の混入細胞、最も好ましくはマウスフィーダー細胞との間の識別のための好ましい試薬としては、表の試薬が挙げられ、より好ましくはレクチンＰＳＡ、ＭＡＡ、およびＰＮＡと類似の特異性を持つタンパク質である。
【０４６３】
本発明はさらに、幹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幹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。幹細胞の識別のさらに他の態様においては、幹細胞集団はフィーダー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、本発明における幹細胞に結合し、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。
【０４６４】
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。好ましい一態様において、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。
【０４６５】
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１０に記す。本発明の別の命名基準は、図１０に示すように、好ましい一態様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。
【０４６６】
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。
【０４６７】
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。

【０４６８】
本発明は、好ましい一態様において、細胞表面からの本発明の特異的グリカンマーカー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、好ましい一態様において、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。本発明は、特に、胚性幹細胞の増殖率の操作について、ならびに、骨髄および血液中の成体幹細胞ならびにその分化する誘導体について、これらのレクチンを試験する方法に関する。
【０４６９】
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特異的レクチン型の使用を明らかにし、選別される最も好ましい細胞型としては、血液および骨髄中の成体幹細胞、特に臍帯血細胞が挙げられる。臍帯血細胞の選別のための好ましいレクチンとしては、実施例１１に示すようにＧＮＡ、ＳＴＡ、ＧＳ‐ＩＩ、ＰＷＡ、ＨＨＡ、ＰＳＡ、ＲＣＡ、およびその他のものが挙げられる。特定の幹細胞集団を単離するためのこれらレクチンの妥当性は、実施例１１で述べるように、公知の幹細胞マーカーによる二重標識によって示された。
【０４７０】
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‐グリカンマーカー構造に関する：
マーカー組成$NeuAc_2Hex_1HexNAc_1$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を含む；
ならびに、マーカー組成$NeuAc_{0-2}Hex_2HexNAc_2dHex_{0-1}$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］を含む；
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１～３、最も好ましくは１～２、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。
【０４７１】
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。
【０４７２】
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

実施例に記載されるように、本願発明者らは、特にマンノース特異的および特にα１，３‐結合マンノース結合レクチンＧＮＡが、ＣＢ　ＭＮＣからのＣＤ３４＋幹細胞のネガティブセレクションによる濃縮に適していることを見出した。さらに、ポリ‐ＬａｃＮＡｃ特異的レクチンＳＴＡならびにフコース特異的および特にα１，２‐結合フコース特異的レクチンＵＥＡが、ＣＢ　ＭＮＣからのＣＤ３４＋幹細胞のポジティブセレクションによる濃縮に適していた。

【０４７３】

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‐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；好ましい一態様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、さらに好ましい一態様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。

【０４７４】

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。

【０４７５】

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、ＣＢ　ＭＮＣは直鎖２型ポリ‐ＬａｃＮＡｃにより特徴付けられ；ＭＳＣ、特にＣＢ　ＭＳＣは、分岐２型ポリ‐ＬａｃＮＡｃにより特徴付けられ；およびｈＥＳＣは１型末端ポリ‐ＬａｃＮＡｃで特徴付けられる。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。

【０４７６】

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た；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。

【０４７７】

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、本発明で分析された他の細胞型と比較して、ｈＥＳＣは、ｍ／ｚ　９１７における中性Ｏ‐グリカンシグナルの相対存在量が７７１と比べて低く、このことは、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していることを見出した。もう１つの違いとしては、ｈＥＳＣにおける、α１，２‐フコシル化コア１　Ｏ‐グリカン配列を含む$Hex_1HexNAc_1dHex_1$に対応するｍ／ｚ　５５２における豊富なシグナルの発生であった。対照的に、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他の細胞型も、これら２種類の細胞型の間の特徴的なフコシル化度を有していた。

【０４７８】

特に、本発明は幹細胞のポリ‐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。

【０４７９】

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する；より好ましくは３種全てのクラスが分析される；ならびに、本発明によるこの情報の使用に関する。好ましい一態様において、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る；およびさらに好ましい一態様において、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。

【０４８０】

一般事項

従来のＣＤ３４＋集団と全く同様に、ＨＳＣの１つの集団全体だけに完全に特異的であると分析される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が、例えば抗ＳＬｅｘ抗体による等の標識は非常に類似している。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。

【０４８１】

本発明は造血細胞集団全般に共通の、または造血細胞の特定の分化段階のための試薬を提供する。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造血幹細胞のための特異的マーカー構造を明らかにする。

【０４８２】

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ーからの構造の探索に関する。

【０４８３】

さらに、大部分の細胞で認められる個々のマーカーは、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。これらのマーカーは例えば、該マーカー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ー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。好ましい一態様において、本発明は、本発明の結合剤、好ましくはＳＴＡ等のポリ‐ラクトサミン認識結合剤または好ましくは本発明のグリカンエピトープ（表２３）を認識するモノクローナル抗体等のシアリル‐Ｌｅｗｉｓ　ｘ認識タンパク質等により、ＣＤ３４－型細胞から臍帯血からの造血幹細胞を選択することに関する。別の一態様において、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。

【０４８４】

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。

【０４８５】

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。

【０４８６】

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。好ましい一態様において、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０．２～１０％、より好ましくは細胞の０．２～５％、さらに好ましくは０．５～２％、または最も好ましくは０．５％～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。さらに他の態様において、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５～５０％、より好ましくは７％～４０％、および最も好ましくは１０～３５％を認識する。

【０４８７】

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

【０４８８】

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。

【０４８９】

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

【０４９０】

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と理解された。

【０４９１】

特異的標的

細胞培養に関連する使用に対する結合剤の選択のための好ましい結合剤構造

本発明は、タンパク質結合Ｎ‐グリカンおよびＯ‐グリカンおよび糖脂質と結合したＮ‐アセチルラクトサミン構造等のいくつかの血液由来幹細胞関連構造を明らかにした。

【０４９２】

好ましい末端エピトープは本発明による式で表され、実施例の広範な構造データから誘導されたものを具体的に表２３に列挙する。本発明は、好ましくは結合剤によって認識される、好ましくは他の担体構造上の同一の末端構造は実質的に認識しない高特異性結合剤によって認識される新規の伸長結合剤標的エピトープを明らかにした。本発明は特に、血液由来ＣＤ３４＋またはＣＤ１３３＋（またはＬＩＮ－）細胞等の造血幹細胞の濃縮および／または培養のための特異的結合剤の使用に関し、このための好ましい構造は、表２３の構造の後の左側の列で示し、より濃縮された構造および血液由来単核ＣＤ３４－、ＣＤ１３３－（またはＬＩＮ＋細胞）等の非造血関連細胞による濃縮は、造血幹細胞を濃縮および／または培養するためのネガティブセレクションとして表２３の右側の列で示す。本発明は、さらに、末端エピトープの識別に関し、ここで末端Ｎ‐グリカンエピトープはマンノースとβ２‐結合しており、Ｏ‐グリカンのアセチルラクトサミンを主体とするエピトープはＧａｌＮＡｃとβ６‐結合しており、糖脂質のＮ‐アセチルラクトサミンを主体とするエピトープはＧａｌとβ３‐結合している。

【０４９３】

造血幹細胞、特にＣＤ３４＋等の臍帯血造血細胞の培養という点で、細胞の結合およびポジティブセレクションにとって好ましい構造として、特定の構造が挙げられる。

【０４９４】

フコシル化構造

ｉ）α３‐フコシル化構造

好ましいα３‐フコシル化構造としては、特にＬｅｗｉｓ　ｘおよびシアリル‐Ｌｅｗｉｓ　ｘが挙げられる。好ましい一態様では、本発明は、細胞表面上のα３‐フコシル化

構造への特異的結合試薬による結合によって濃縮された血液由来幹細胞集団に関する。
本発明はさらに、特に細胞培養用途のためのα３‐フコース特異的結合試薬および血液由来幹細胞の複合体に関する。
【０４９５】
特異的なシアリル‐Ｌｅｗｉｓ　ｘ構造は、実質的に臍帯血ＣＤ３４＋細胞に特異的であり、この細胞の結合および操作に有用であることが明らかにされた。
ｓＬｅｘに対する好ましい結合試薬としては、ＧＦ５２６およびＧＦ３０７が挙げられ、特に臍帯血からの大部分のまたは実質的にすべてのＣＤ３４＋細胞を認識し、ならびにこの細胞の約４０％である大きな亜集団を認識するＧＦ５１６が挙げられる。
好ましい一態様では、シアリル　Ｌｅｗｉｓ　ｘ特異的試薬は、抗体ＧＦ５２６のように特にコアＩＩ　ｓＬｅｘ［ＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｒ１Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃαＳｅｒ／Ｔｈｒ、式中、Ｒ１はシアル酸（ＳＡα３）または無である］と結合する。本発明は特に、臍帯血または骨髄、最も好ましくは臍帯血等の血液由来幹細胞を含む材料からの、特に幹細胞の培養のための、特異的結合試薬によるｓＬｅｘおよびコアＩＩ　ｓＬＥｘ陽性細胞の選択に関する。好ましい一態様では、細胞選別システムはＦＡＣＳまたは結合剤を含む固相である。
【０４９６】
臍帯血造血細胞（特にＣＤ３４＋細胞）には、特にＬｅｗｉｓ　ｘ発現に個々の特異的な変異が存在し、Ｌｅｗｉｓ　ｘ抗体結合剤の一部は、非造血ＣＤ３４－細胞も認識するが（例：抗体ＧＦ５１５およびＧＦ５２５（ＣＤ１５抗体））、特にＧＦ３０５およびＧＦ５１７およびＧＦ５１８が、ＣＤ３４＋細胞調製物中の特定の個体上のＬｅｗｉｓ　ｘを効果的に認識すると考えられる。
本発明は特に、特定のＬｅｗｉｓ　ｘおよびその好ましい亜型にポジティブな細胞を、臍帯血または骨髄等の血液、最も好ましくは臍帯血由来の幹細胞を含む材料から、特に幹細胞の培養のために、特異的な結合試薬によって選択することに関する。好ましい一態様では、細胞選別システムはＦＡＣＳまたはこの結合剤を含む固相である。
【０４９７】
Ｌｏｔｕｓ　ｔｅｔｒａｇｏｎｏｌｏｂｕｓ凝集素ＬＴＡは、二価またはオリゴバレント（ｏｌｉｇｏｖａｌｅｎｔ）であるＬｅｗｉｓ　ｘと強く結合する低特異性の試薬の例であり、このため、より複雑度の高いα３‐フコシル化を有する細胞の選択に有用である。
ＬＴＡレクチンでコーティングされた磁性ビーズでヒト臍帯血単核球を処理することにより、幹細胞マーカーＣＤ３４が高濃縮された新規細胞集団が作製された。
【０４９８】
ｉｉ）α２‐フコシル化構造
好ましいα２‐フコシル化構造としては、多くの臍帯血ＣＤ３４＋細胞集団を認識する抗体、ＧＦ２８８およびＧＦ３９４によって認識可能なＨ型構造が特に挙げられる（グロボＨ）。本発明は、好ましい一態様では、特異的な結合試薬によって細胞表面のα２‐フコシル化構造と結合することによって濃縮された血液由来幹細胞集団に関する。本発明はさらに、特に細胞培養用途のための、α２‐フコース特異的結合試薬および血液由来幹細胞の複合体に関する。
本発明はさらに、血液由来幹細胞のＨ‐エピトープを効果的に認識する特定の低特異性試薬に関し、好ましい試薬はレクチンＵＥＡであり、好ましい一態様では、このレクチンは、細胞培養および血液由来幹細胞の選択または操作という点でのレクチンの使用を目的とする。
【０４９９】
ｉｉｉ）非フコシル化シアリル‐ラクトサミン
本発明は、幹細胞の単離、特にヒト臍帯血からのネガティブ単離のための有用な試薬として、レクチンＭＡＡ（Ｍａａｃｋｉａ　ａｍｕｒｉｅｎｓｉｓ凝集素）を認識するシアル化Ｎ‐アセチルラクトサミン構造（ＳＡα３ＧａｌＢ４ＧｌｃＮＡｃβ）を明らかにし

た。このレクチンはほとんどの臍帯血細胞と結合するが、ＣＤ３４＋細胞に対する結合はそれほど効果的ではない。

【０５００】

Ｇａｌ／ＧａｌＮＡｃ／ＧａｌＮＡｃα含有構造

ｉｖ）Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃ構造

本発明は、血液由来幹細胞、特にＣＤ３４＋が、ＴＦ（Ｔｈｏｍｓｓｅｎ‐Ｆｒｉｅｄｅｎｒｅｉｃｈ）Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃα、より好ましくは特にＯ‐グリカンとしてムチン型構造上に発現されるＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃαＳｅｒ／Ｔｈｒを高いレベルで発現することを明らかにした。本発明はさらに、アシアロ‐ＧＭ１を認識しＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃβを含むアシアロＧＭ１抗体が、血液由来幹細胞を効果的に認識するわけではないことを明らかにした。

本発明は、好ましい一態様では、特異的な結合試薬が細胞表面のＧａｌβ３ＧａｌＮＡｃα構造と結合することによって濃縮された、特に細胞培養の用途のための、血液由来幹細胞集団に関する。

本発明はさらに、特に細胞培養の用途のための、Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃα特異的結合試薬および血液由来幹細胞の複合体に関する。

【０５０１】

この構造に対する好ましい結合試薬としては、ＧＦ２８０、ＧＦ２８１、およびＧＦ３６５が挙げられ、これらはモノクローナル抗体であり、臍帯血ＣＤ３４＋細胞の約４０％の認識に対しては特にＧＦ２８０が好ましい。好ましい別の一態様では、低特異性Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃα特異的結合試薬はＰＮＡ（ピーナッツ凝集素）である。

Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃα特異的結合試薬は、臍帯血からの亜集団の分離に対して特に好ましい。

【０５０２】

ｖ）ＧａｌＮＡｃα構造

本発明は、血液由来幹細胞、特にＣＤ３４＋が、ＴＮ　ＧａｌＮＡｃα、より好ましくは特にＯ‐グリカンとしてムチン型構造上に発現されるＧａｌＮＡｃαＳｅｒ／Ｔｈｒを高いレベルで発現することを明らかにした。

本発明は、好ましい一態様では、特異的な結合試薬が細胞表面のＧａｌＮＡｃα構造と結合することによって濃縮された、特に細胞培養の用途のための、血液由来幹細胞集団に関する。

本発明はさらに、特に細胞培養の用途のための、ＧａｌＮＡｃα特異的結合試薬および血液由来幹細胞の複合体に関する。

【０５０３】

この構造に対する好ましい結合試薬としては、ＧＦ２７８およびＶＰＵ００６が挙げられ、これらはモノクローナル抗体であり、臍帯血ＣＤ３４＋細胞の約４０％の認識に対して好ましい。好ましい別の一態様では、低特異性ＧａｌＮＡｃα特異的結合試薬は、ＧａｌＮＡｃ特異的レクチン、例えばＤＢＡ（Ｄｏｌｉｃｈｏｓ　ｂｉｆｌｏｒｕｓ凝集素）であり、特にＴｎ構造を認識することが既知であるものが好ましい。

ＧａｌＮＡｃα特異的結合試薬は、臍帯血からの幹細胞亜集団の分離および濃縮に対して特に好ましい。

【０５０４】

ｖｉ）ポリ‐Ｎ‐アセチルラクトサミン構造

本発明は、特にヒト臍帯血からの幹細胞の単離および濃縮のための有用な試薬として、ポリ‐Ｎ‐アセチルラクトサミン構造（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３）$_{n}$を認識するレクチンＳＴＡ（Ｓｏｌａｎｕｍ　ｔｕｂｅｒｏｓｕｍ凝集素、ジャガイモレクチン）を明らかにした

【０５０５】

ｖｉｉ）特異的マンノース構造

本発明は、特にヒト臍帯血からの幹細胞の単離および濃縮のための有用な試薬として、

マンノース構造（Ｍａｎα）を認識するレクチンＮＰＡを明らかにした。
【０５０６】
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、好ましい一態様において、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
【０５０７】
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～５００ｍＭ、より好ましくは１０ｍＭ～２５０ｍＭ、およびさらに好ましくは１０～１００ｍＭ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。
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、Ｇａｌβ Ｒ、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。
【０５０８】
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。
【０５０９】
固定化結合剤、好ましくは結合剤タンパク質タンパク質
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。
【０５１０】
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～３日間、より好ましくは１時間～１日間、および最も好ましくは約８～２０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。固定化の洗浄工程は、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。

【０５１１】

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。

【０５１２】

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。さらに好ましい化学としてはＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎにより販売される「ｃｌｉｃｋ」化学ならびに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。

【０５１３】

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。。

好ましい合成工程は

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。

【０５１４】

高特異性化学タグを含む複合体

好ましい一態様において、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。

【０５１５】

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１～１０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。

【０５１６】

結合剤の複合体

本発明はさらに、固相、またはポリマー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。

【０５１７】

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１～１０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］

の構造を有する複合体。

【０５１８】

好ましい伸長エピトープ

【０５１９】

伸長グリカンエピトープは本発明の胚性幹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ロンゲスグリカン型（ｌｏｎｇｅｓｇｌｙｃａｎ　ｔｙｐｅｓ）を、グリカン型の構造分析に基づき表２３に列挙する。以下の好ましい伸長構造エピトープは、胚性幹細胞のためのおよび本発明の使用のための新規マーカーとして好ましい。

【０５２０】

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、好ましい一態様において、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、未分化の胚性幹細胞（段階Ｉ）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。

【０５２１】

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。

【０５２２】

本発明はさらに、胚性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。

【０５２３】

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ーは、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ーである。

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。好ましい一態様において、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。

【０５２４】

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。

【０５２５】

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。

【０５２６】

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

【０５２７】

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。

【０５２８】

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。

【０５２９】

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

【０５３０】

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。

【０５３１】

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。

【０５３２】

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、好ましい一態様において、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。

【０５３３】

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。

【０５３４】

未分化段階Ｉの胚性細胞の分析にはＳＡα３‐Ｎ‐グリカンエピトープが好ましい。段階ＩＩおよび段階ＩＩＩ胚性細胞等の分化したまたは分化中の胚性細胞の分析にはＳＡα６‐Ｎ‐グリカンエピトープが好ましい。両型のＮ‐グリカンを組み合わせての分析が胚性幹細胞の分析に有用であると考えられる。

【０５３５】

本発明はさらに、胚性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。

【０５３６】

特異的な好ましい四糖ＩＩ型ラクトサミンエピトープ

好ましい一態様において、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。

【０５３７】

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。

【０５３８】

ＬａｃｄｉＮＡｃ構造

ＬａｃｄｉＮａｃが比較的稀で特徴的なグリカン構造であり、このことが胚性細胞の分析にとって特に好ましいと考えられる。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、ＧａｌＮＡ

ｃβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、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。

【０５３９】

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態様において、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。

【０５４０】

本発明は特に、未分化胚性幹細胞（段階Ｉ）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Ｉ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。

【０５４１】

本発明はさらに、胚性細胞に効果的に発現する、末端Ｉ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ＩＩ型ラクトサミン上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Ｉ型Ｎ‐アセチルラクトサミンとしては、従って、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃα、Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３ＧａｌＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃ、およびＧａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６（Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃαが挙げられる。

【０５４２】

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ーは、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ーである。

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態様において、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。

【０５４３】

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。

【０５４４】

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。

【０５４５】

効果的なポジティブおよび／またはネガティブ結合剤ならびにその組み合わせを選択するためのＨＳＣ結合剤標的の表

表２３は、ＨＳＣおよび分化した細胞に特異的なグリコシル化（本発明の実施例で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について記載）に対する本願発明者らによる構造の帰属、生合成経路およびグリコシル化遺伝子発現に関する知見を含む生合成情報、ならびに本発明で述べる結合剤特異性（本発明の実施例で特定の細胞型および分子クラスと結合するレクチン、抗体、および他の結合剤分子について記載）の結果を組み合わせて記載するものである。

【０５４６】

表２３は、特定の細胞型における適切な結合剤標的を、ｑ、＋／－、＋、および＋＋の記号で示し、特に好ましくは＋および＋＋の記号によるものであり；ならびに有用な非存在または低発現を－、ｑ、および＋／－の記号で示し、特に好ましくは－および＋／－の記号によるものである。本願発明者らは、そのようなデータを用いて特異的に選択された細胞型を識別することができると考えた。本発明は、本発明の特定の態様としての各種の異なる原理によるそのような使用に関し：特定の細胞型に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、特定の細胞上での存在量が少ない標的を用いた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、本発明による特異性および／もしくは効率を高めるための２種類以上のポジティブおよび／もしくはネガティブ標的を組み合わせたさらなる使用である。

【０５４７】

以下に本発明の結合剤の特に好ましい標的を記載する。

【０５４８】

１）ＨＳＣ（ＣＤ３４＋および／またはＣＤ１３３＋細胞等）結合剤構造：

本発明は、表２３に示した末端グリカンエピトープに基づいたＨＳＣの識別に関し、好ましくは：

Ｌｅｘ、より優先的にはＯ‐グリカン構造ＬｅｘＢβ６（Ｒ‐Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃ中、

ｓＬｅｘ、より優先的にはＯ‐グリカン構造ｓＬｅｘβ６（Ｒ‐Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃ中、

ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、より優先的にはＮ‐グリカン構造ｓ３ＬＮβ２Ｍａｎα３／６中、より優先的にはＮ‐グリカン構造ｓ３ＬＮβ２Ｍａｎα３（ｓ３ＬＮβ２Ｍａｎα６）Ｍａｎ中、

Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃα、

Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧａｌＮＡｃβ、より優先的には本発明による糖脂質主鎖中、

ＧａｌＮＡｃα、より優先的にはＴｎ抗原中、

大型高マンノース型Ｎ‐グリカン、より具体的には、Ｍａｎα２Ｍａｎ末端エピトープ含有、

グルコシル化Ｎ‐グリカン、より具体的にはＧｌｃα、好ましくは末端Ｇｌｃα３Ｍａｎα含有、

コア‐フコシル化Ｎ‐グリカン、ならびに／または

好ましくは、Ｎ‐グリカン構造中、より好ましくはＧｎβ２Ｍａｎα３（Ｇｎβ２Ｍａｎα６）Ｍａｎ　Ｎ‐グリカン構造中の、Ｇｎβ２Ｍａｎα３／６および／もしくはＧｎβ４Ｍａｎα３としての、非還元末端ＧｌｃＮＡｃβ；

から選択され、

特に好ましい結合剤構造は、ｓＬｅｘ、より具体的にはＯ‐グリカン構造ｓＬｅｘβ６（

Ｒ‐Ｇａｌβ３）ＧａｌＮＡｃであり、任意に１もしくは２種類以上の上記のリストからの他のエピトープと共存していてもよい。

【０５４９】

２）ＨＳＣ（ＣＤ３４－および／またはＣＤ１３３－細胞等）から分化した細胞を対象とする結合剤構造

本発明は、表２３に示した末端グリカンエピトープに基づくＨＳＣから分化した細胞の特異的な識別に関し、好ましくは：

ＬＮβ４Ｍａｎα３／６、より好ましくは分岐鎖Ｎ‐グリカン構造ＬＮβ２（ＬＮβ４）Ｍａｎα３（ＬＮβ２Ｍａｎα６）Ｍａｎ中、

ｓ３ＬＮβ４Ｍａｎα３、

ＧａｌＮＡｃβ、より好ましくはアシアロ‐ＧＭ１および／もしくはＧｂ５（ＳＳＥＡ‐３）中、

ＳＡα３ＧａｌＮＡｃβ３Ｇａｌα４Ｇａｌβ４Ｇｌｃ（ＳＳＥＡ‐５）、

ＧａｌＮＡｃβ、より好ましくはアシアロ‐ＧＭ２および／もしくはＧｂ４、

ＧａｌＮＡｃα３ＧａｌＮＡｃβ、

ＳＡα６ＧａｌＮＡｃα、より好ましくはシアリル‐Ｔｎエピトープ中、ならびに／または

低マンノース、小型高マンノース、もしくはハイブリッド型Ｎ‐グリカン、好ましくは末端Ｍａｎα３Ｍａｎおよび／もしくはＭａｎα６Ｍａｎ含有、

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、および／もしくはシアリル‐Ｔｎの１種類以上であり；

任意に１種類以上の上記の全リストからの他のエピトープと共存していてもよい。

【０５５０】

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。

【０５５１】

コード	製造元コード	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
	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 2 O-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

【０５５２】

実施例

実施例１

ヒト臍帯血由来幹細胞のＮ－グリコシル化

要約

細胞表面グリカンは細胞の接着能に寄与しており、細胞シグナル伝達に不可欠である。しかし、ＣＤ１３３＋細胞等の造血幹細胞のグリコシル化はあまり研究されていない。本研究において、本願発明者らはＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞のＮ－グリカン構造を質量分析プロファイリングおよびエキソグリコシダーゼ消化により；細胞表面グリカンエピトープをレクチン結合アッセイにより；ならびにＮ－グリカン生合成関連遺伝子の発現をマイクロアレイにより分析した。ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞のＮ－グリカンプロファイルにおいて、１０％を超える違いが示された。二分岐複合型Ｎ－グリカンは、ＣＤ１３３＋細胞中で豊富となった。これらの構造の合成を制御する遺伝子の中で、Ｃ

Ｄ１３３＋細胞は、ＭＧＡＴ２を過剰発現し、ＭＧＡＴ４を過小発現した。さらに、高マンノース型Ｎ‐グリカンおよび末端α２，３‐シアル化の量がＣＤ１３３＋細胞中で増加した。α２，３‐シアル化の増加は、ＳＴ３ＧＡＬ６の過剰発現によって支持された。造血幹細胞特異的Ｎ‐グリコシル化の新規な知見により、その同定が向上し、幹細胞のホーミングおよび動員、または特定の組織に対する標的化を促進するツールが提供される。

【０５５３】

序論

半分を超えるヒトタンパク質がグリコシル化されていると推定される。すなわち、グリコシル化はリン酸化よりも一般的な翻訳後修飾である（１）。グリカンは多糖外被として細胞表面全体を覆っており、構造の構成成分およびシグナルトランスデューサーとして機能する。グリカンは、細胞の酸化ストレスに対する反応、自然免疫に対する耐性、および細胞間または細胞‐マトリックス間情報交換等（２、３）多くの生物学的プロセスにとって不可欠である。ＣＤ１３３＋等の造血幹細胞では、細胞型特異的グリコシル化が維持、分化、ホーミング、および動員に寄与する場合がある。

【０５５４】

臍帯血は、幹細胞源として都合が良く；採取が容易であり、他の供給源からの幹細胞移植片よりも組織適合性のミスマッチに対する許容度が優れている。臍帯血移植は、完全なＨＬＡ適合ドナーが見つからない場合に用いられることが多い。１ユニットの臍帯血中の利用可能な細胞の数は小児科の患者に対してのみ十分であると考えられる場合が多く、幹細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏで増殖させるために数多くの方法が試みられてきた。治療に不可欠である造血幹細胞は、多くの場合細胞表面の糖タンパク質ＣＤ３４およびＣＤ１３３の発現に基づいて特徴づけられる。ＣＤ１３３＋細胞のほとんどすべて（９９．８％）がＣＤ３４陽性でもある（４）。分化の間に、ＣＤ１３３分子はＣＤ３４よりも早い段階で細胞表面から失われる。

【０５５５】

造血幹細胞の糖鎖生物学を理解することにより、幹細胞のより良好な生着、ｅｘ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏでの増殖、および特定の組織に対する標的化のための新規技術が提供される（５～７）。ＣＤ１３３＋細胞Ｎ‐グライコームの分析も、造血幹細胞の同定を改善するであろう。しかし、Ｎ‐グリコシル化は複雑な事象であり、今までのところヒト幹細胞グライコームの分析には、限られた数の細胞を含む試料を分析するための適切な技術が欠けている。Ｎ‐グリカン生合成は、同一のグリカン基質に対して競合する糖転移酵素およびグリコシダーゼ酵素、ならびにイソ酵素の発現によって制御される。さらに、グリカン分子の形成、その前駆体の生合成、輸送、および局在化のメカニズムは、他の生合成経路と絡み合っている（８、９）。単一のグリカン生合成酵素の活性の変化が、細胞の外観および機能に大きな影響を与え得る。しかし、特定のグリコシル化プロセスに関与する特定の遺伝子の同定には、グリコシル化関連遺伝子の発現レベルとグリカン構造との比較が必要である。最近、活性化マウスＴ細胞中におけるわずかに数個の遺伝子の発現差異に伴う劇的なＮ‐グライコームの変化が報告された（１０～１２）。シアル酸転移酵素をコードする遺伝子の発現差異は、免疫シグナル伝達に対するＢリンパ球の反応に異なった形で寄与することが示された（１３）。

【０５５６】

本研究では、本願発明者らは、Ｎ‐グリカン構造分析、ならびに糖転移酵素およびグリコシダーゼをコードする遺伝子の発現プロファイリングからのデータを組み合わせることにより、ＣＤ１３３＋細胞に典型的であるＮ‐グリコシル化事象の分析を行った。ＣＤ１３３＋細胞の結果を成熟白血球（ＣＤ１３３－）と比較し、ＣＤ１３３＋細胞に特異的なＮ‐グリコシル化を識別した。本願発明者らの研究は、幹細胞の特性に関する新規情報を提供する。結果は、治療用途でのその使用の開発の手助けとなり得る。細胞のグリコシル化の操作を用いれば、幹細胞のホーミングおよび動員の向上、または特定の組織を標的とする細胞産物の設計が可能となるであろう。

【０５５７】

材料および方法
細胞
臍帯血はHelsinki University Central Hospital, Department of Obstetrics and Gynaecology、およびHelsinki Maternity Hospitalより入手した。ドナーすべてからインフォームドコンセントを得ており、この研究はHelsinki University Central Hospitalおよびフィンランド赤十字血液サービス（Finnish Red Cross Blood Service）の倫理審査委員会からの承認を受けた。新鮮な臍帯血の採取および処理は過去の報告（１４）に従って実施した。Ficoll‐Hypaque密度勾配（Amersham Biosciences, New Jersey, USA, www1.amershambiosciences.com）を用いて単核球である白血球を単離した。白血球は、NMR分析に十分な量で入手することができる。さらに、白血球をレクチン標識アッセイに用いた。抗ＣＤ１３３マイクロビーズを磁気親和性細胞選別法（Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany, www.miltenyibiotec.com）に用いることで、幹細胞画分を白血球画分から選別した（１５）。成熟白血球（ＣＤ１３３－細胞）をコントロールの目的で回収した。すべて合わせて１１ユニットの臍帯血を用いた。質量分析用の試料調製では、オリゴ糖の混入を避けるために超高純度ウシ血清アルブミン（少なくとも９９％の純度、Sigma‐Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany, www.sigmaaldrich.com）を用いた。
【０５５８】
N‐グリカンの単離
N‐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。混入細胞の除去は、８０～９０％（ｖ／ｖ）のアセトン水溶液による－２０℃でのグリカンの沈殿および６０％（ｖ／ｖ）氷冷メタノールによるその抽出によって実施した（Verostek et al., ２０００）。次に、グリカンを水中でＣ１８シリカ樹脂（BondElut, Varian, USA）に通し、多孔性グラファイトカーボン（Carbograph, Alltech, USA）に吸着させた。この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Ｃ１８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。上記の全ての工程は小型クロマトグラフィーカラム上で行い、少ない溶出および処理容量を用いた。
【０５５９】
質量分析
MALDI‐TOF質量分析を、Bruker Ultraflex TOF／TOF装置（Bruker, Germany）により実施し、その分析のための試料は実質的に文献（２２）に記載のようにして調製した。中性N‐グリカンは、陽イオン反射モード（positive ion reflector mode）にて［M＋Na］＋イオンとして検出し、シアル化N‐グリカンは、陽イオン反射モードまたは線形モード（linear mode）にて［M－H］－イオンとして検出した。中性およびシアル化グリカン成分の相対モル存在量は、中性およびシアル化N‐グリカン画分として別に分析を行った場合は、質量スペクトルの相対シグナル強度に基づいて帰属した（Saarinen, １９９９. Harvey, １９９３, Naven, １９９６, Papac

，　１９９６）。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のシグナル、還元オリゴ糖から水が失われることによる生成物、および試料中のグリカン成分から生じたものではないその他の干渉する質量分析シグナルの影響を除去することによって本グリカンプロファイルへと変換した。提供するグリカンプロファイル中の得られたグリカンシグナルは１００％に対して標準化し、試料間の比較を可能とした。２つのグリカンプロファイルの量的な相違（％）は、数式１：

$$\text{相違} = \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{n}\left|p_{i,a} - p_{i,b}\right| \qquad (1)$$

［数式中、ｐはプロファイルａまたはｂ中のグリカンシグナルｉの存在量（％）であり、ｎはグリカンシグナルの総数である］
によって算出した。
２つのグリカンプロファイル間のあるグリカンの特徴の相対的な相違は、数式２：

$$\text{相違} = x\left(\frac{P_a}{P_b}\right)^x, \qquad (2)$$

［数式中、Ｐはプロファイルａまたはｂ中のそのグリカンの特徴を有するグリカンシグナルの存在量（％）の合計であり、ｘはａ≧ｂの場合は１であり、ｘはａ＜ｂの場合は－１である］
によって算出した。

【０５６０】

ＮＭＲ分光法

単離されたグリカンは、水または５０ｍＭの炭酸水素アンモニウムを用いたゲル濾過高圧液体クロマトグラフィーによってそれぞれ中性およびシアル化グリカン画分に分離することにより、ＮＭＲ分光法のためにさらに精製を行なった。ＮＭＲ分析は、感度を高めるためにクライオプローブ（ｃｒｙｏ‐ｐｒｏｂｅ）を用い、８００ＭＨｚのＶａｒｉａｎｔ　Ｕｎｉｔｙ　ＮＭＲ分光器により過去に報告されたようにして実施した（Ｗｅｉｋｋｏｌａｉｎｅｎ　ｅｔ　ａｌ．　Ｇｌｙｃｏｃｏｎｊ．Ｊ．　２００７　ｉｎ　ｐｒｅｓｓ）。プロトンＮＭＲ分析の前に精製したグリカンを９９．９９６％の重水中に溶解し、乾燥させて水を除去し、試料のプロトン交換を行った。

【０５６１】

エキソグリコシダーゼ分析

Ｎ‐グリカン画分中に存在する非還元グリカンエピトープの分析を、特異的エキソグリコシダーゼ酵素を用いた消化によって実施した。異性体構造に対する酵素の特異性は、以下に詳述するように、明らかにされているオリゴ糖との平行反応で制御した。用いたエキソグリコシダーゼ酵素は：ラクト‐Ｎ‐ヘキサオースのβ１，４‐結合ガラクトースを消化するＳ．　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（大腸菌における組み換え体、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）からのβ１，４‐ガラクトシダーゼ、ラクト‐Ｎ‐ヘキサオースのβ１，３‐結合ガラクトースを消化するＸ．　ｍａｎｉｈｏｔｉｓ（大腸菌における組み換え体、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）からのβ１，３‐ガラクトシダーゼ、α２，３‐は消化するがα２，６‐シアリルＮ‐アセチルラクトサミンは消化しないＳ．　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（大腸菌における組み換え体、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）からのα２，３‐シアリダーゼ、α２，３‐およびα２，６‐シアリルＮ‐アセチルラクトサミンの両方を消化するＡ．　ｕｒｅａｆａｃｉｅｎｓ（大腸菌における組み換え体、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）からの広範な（ｂｒｏａｄ‐ｒａｎｇｅ）シアリダーゼ、ならびにヒト細胞から単離されたオリゴ糖混合物中に存在するＭａｎ５‐Ｍａｎ９高マンノース型Ｎ‐グリカンを消化するタチナタマメ（Ｃ．　ｅｎｓｉｆｏｒｍｉｓ；Ｓｉｇｍａ‐Ａｌｄｒｉｃｈ）からのα‐マンノシダーゼであった。反応は、５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー中、ｐＨ５．５、＋３７℃にて一晩消

化させることで実施した。消化されたグリカン画分は、黒鉛化炭素を用いた固相抽出によって分析用に精製し、上述のようにしてＭＡＬＤＩ‐ＴＯＦ質量分析を行った。

【０５６２】

マイクロアレイ

ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞より精製されたＲＮＡをＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｏｍｅ Ｕ１３３ Ｐｌｕｓ ２．０アレイ上でハイブリダイズし、データは、過去に報告されたように（１４）、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ ＧｅｎｅＣｈｉｐ Ｏｐｅｒａｔｉｎｇ Ｓｏｆｔｗａｒｅを用いて分析した。適用可能な場合は、米国機能糖鎖コンソーシアム（Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍ ｆｏｒ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｇｌｙｃｏｍｉｃｓ）の遺伝子マイクロアレイコア（Ｇｅｎｅ Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙ Ｃｏｒｅ）によって提供されるＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ グリコーゲンチップ上に提示される同一のプローブを分析に選択した。転写物は、発現の少なくとも１．５倍の増加または減少が示された場合に、差異発現されたと見なした。

【０５６３】

フローサイトメトリーによるレクチン結合分析

フローサイトメトリー分析を妨害するであろうレクチンによる赤血球前駆体の溶血または血球凝集を防ぐために、ＭＮＣは、Ｇｌｙｃｏｐｈｏｒｉｎ Ａ ＭｉｃｒｏＢｅａｄｓ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を用いたＧｌｙＡの除去を行った。この細胞をフィコエリトリン（ＰＥ）結合ＣＤ３４モノクローナル抗体（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）で標識して幹細胞集団を提示し、ならびにフルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）結合レクチン、α‐マンノースおよびグルコースに対してはＰｉｓｕｍ ｓａｔｉｖｕｍからのＰＳＡ；内部および末端α１，３‐またはα１，６‐結合マンノースに対してはＨｉｐｐｅａｓｔｒｕｍ ｈｙｂｒｉｄからのＨＨＡ、およびα１，３‐マンノース残基に対してはＧａｌａｎｔｈｕｓ ｎｉｖａｌｉｓからのＧＮＡ；大型複合型Ｎ‐グリカンに対してはＰｈａｓｅｏｌｕｓ ｖｕｌｇａｒｉｓからのＰＨＡ‐Ｌ；β‐ガラクトースに対してはＲｉｃｉｎｕｓ ｃｏｍｍｕｎｉｓからのＲＣＡ‐Ｉ；α２，６‐およびα２，３‐結合シアル酸に対してはＳａｍｂｕｃｕｓ ｎｉｇｒａからのＳＮＡならびにＭａａｃｋｉａ ａｍｕｒｅｎｓｉｓからのＭＡＡ、α‐フコースに対してはＬｏｔｕｓ ｔｅｔｒａｇｏｎｏｌｏｂｕｓからのＬＴＡおよびＵｌｅｘ ｅｕｒｏｐａｅｕｓからのＵＥＡ‐Ｉ、のうちの１種類で標識した；ＥＹ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ， Ｉｎｃ． Ｓａｎ Ｍａｔｅｏ， ＣＡ， ＵＳＡ， ｗｗｗ．ｅｙｌａｂｓ．ｃｏｍ； Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ， Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ， ＣＡ， ＵＳＡ， ｗｗｗ．ｖｅｃｔｏｒｌａｂｓ．ｃｏｍ）。フローサイトメトリーはＢｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ（商標）上で実施し、蛍光は５３０／３０ｎｍおよび５７５／２５ｎｍのバンドパスフィルターを用いて測定した。ＭＮＣの標識の結果は、特定のグリコシル化事象の全体としての頻度を示す。二重標識細胞画分は幹細胞の細胞表面上のグリカンを特定する。

【０５６４】

結果

構造分析

構造分析については、全白血球からの中性およびシアル化Ｎ‐グリカン画分をＮＭＲに掛けた。このＮＭＲ分析により、白血球中（非分離単核球）に存在する最も多いＮ‐グリカン構造についての詳細なデータが得られた（追加の図面、ＮＭＲ、ならびに追加の表、ＮＭＲ１およびＮＭＲ２）。中性Ｎ‐グリカン画分では高マンノース型Ｎ‐グリカンが検出されたが、一方、α２，６‐およびα２，３‐シアル化二分岐複合型Ｎ‐グリカンの‐グリカン主鎖が、シアル化Ｎ‐グリカン画分では主要な構造であった。さらに、スペクトルの定量的な分析により、α２，３‐シアル化よりもα２，６‐シアル化の存在量が多く、Ｎ‐グリカン分岐では２型Ｎ‐アセチルラクトサミン（Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、１００％） が１型Ｎ‐アセチルラクトサミン （Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃ、検出されず）に対して支配的であることが示された。β１，４‐分岐鎖三分岐Ｎ‐グリカンおよびα１

，６‐フコシル化Ｎ‐グリカンコアも検出された。

【０５６５】

幹細胞および成熟白血球上のＮ‐グリカンの性質ならびに存在量を比較するために、ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞をＭＡＬＤＩ‐ＴＯＦ質量分析で別々に分析した。ＮＭＲからのデータを用いて質量分析で示された構造を確認した。両方の細胞型にて、いくつかの複数の異性体構造を含む８０を超えるシグナルが検出された（図２Ａおよび３Ａ）。ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞の間の相違は、シアル化Ｎ‐グリカンのプロファイルの方が（図１Ｂ、１７％相違）中性Ｎ‐グリカンプロファイル（図１Ａ、９％相違）よりもが大きかった。ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞内の主要なＮ‐グリカンは、高マンノースおよび二分岐複合型構造であった（図）。ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞は、単分岐、ハイブリッド、低マンノース、および大型複合型Ｎ‐グリカンも有していた（図２および３）。ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞の間の相違を分析するために、各検出されたグリカンシグナルに帰属された提案された単糖組成（図２および３；ＡおよびＢ）を、主要なＮ‐グリカンの種類に分類し（図２Ｃおよび３Ｃ）、ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞の間での異なる主要なＮ‐グリカンの種類の割合を比較することによって定量的に分析した。ＣＤ１３３＋細胞のＮ‐グライコームは、高マンノース型Ｎ‐グリカン（図２Ｃ）、コア組成が５‐ヘキソース４‐Ｎ‐アセチルヘキソサミンである二分岐複合型Ｎ‐グリカン、およびシアル化単分岐Ｎ‐グリカン（図３Ｃ）に対する偏りを示した。対照的に、ＣＤ１３３－細胞では、コア組成が６‐ヘキソース５‐Ｎ‐アセチルヘキソサミンである大型複合型Ｎ‐グリカン、またはより大型であるシアル化ハイブリッド型Ｎ‐グリカンおよび低マンノース型Ｎ‐グリカンの量が多かった。

【０５６６】

ＣＤ１３３－細胞集団は、複数の細胞型の表現型の平均を示す。独立して単離された分化した細胞集団での結果を比較するために、ＣＤ８＋およびＣＤ８－細胞を分析した。ＣＤ８＋細胞は、ＣＤ１３３－細胞と類似のＮ‐グリコシル化表現型を示した。特に大型複合型Ｎ‐グリカンの割合がこれらの細胞では高かった（データは示さず）。このことは、ＣＤ１３３＋細胞内の示されたＮ‐グライコームがこの細胞型に典型的なものであることを示唆している。

【０５６７】

ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞上の末端エピトーププロファイルを分析するために、特異的なエキソグリコシダーゼ消化を質量分析と組み合わせて実施した。α‐マンノース、β１，４‐ガラクトース、およびβ‐Ｎ‐アセチルグルコサミン残基が両方の細胞型に多く存在することが分かり、一方β１，３‐結合ガラクトース残基の検出量は多くなかった。α２，３‐シアリダーゼ処理で示されたように、ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－の両細胞の大部分はα２，６‐結合シアル酸を有していた。中性、すなわち完全に脱シアル化したグリカン成分は、ＣＤ１３３＋細胞由来のすべてのシアル化Ｎ‐グリカン種から産生されたが、一方ＣＤ１３３－細胞には、α２，３‐シアリダーゼ処理に対して完全な耐性を有する少量成分が含まれていた。さらに、ＣＤ１３３＋細胞における特異的なシアリダーゼ処理の間の酸性グリカンプロファイルの変化は、ＣＤ１３３－細胞に比べて定量的に大きかった（図４）。まとめると、ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞中でα２，３‐シアリダーゼに対して影響を受けるＮ‐グリカンシグナルの割合は異なり、ＣＤ１３３＋細胞中でα２，３‐シアル化Ｎ‐グリカンが豊富であることを示している（図４）。

【０５６８】

Ｎ‐グリコシル化の生合成経路

グリカンプロファイリングの後、Ｎ‐グリカン構造を修飾する酵素をコードする遺伝子の発現についての研究を行った。Ｎ‐グリカンの生合成は、Ｎ‐グリカン鎖の異なる領域；Ｎ‐グリカンコア、主鎖、および末端領域、で作用するいくつかの糖転移酵素およびグリコシダーゼ酵素ファミリーによって制御される（図５）。Ｏ‐グリカン等の他の重要な種類のグリカンおよび糖脂質の生合成は、部分的にＮ‐グリカンの生合成と重なる部分は

あるが、酵素ファミリーの異なるメンバーは、多くの場合、特定のグリカン型の合成に特化している。遺伝子産物に対する標的グリカンの種類およびＮ－グリカン構造関連遺伝子の発現の結果を表１に示す。

【０５６９】

Ｎ－グリカンコア配列

Ｎ－グリカンコア構造は、特化したマンノシダーゼ（ＭＡＮ）およびＮ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（ＧｌｃＮＡｃＴ）酵素によって形成される（１６）（図４）。ＭＡＮは、高マンノースおよび低マンノース型Ｎ－グリカン構造を形成し、他のＮ－グリカン型に対してはその出発点を形成する（８）。ＭＡＮ１酵素は、高マンノース型からハイブリッド型および単分岐Ｎ－グリカンへの変換を制御し、ＭＡＮ２酵素は、複合型構造へのさらなる変換を制御する。ＧｌｃＮＡｃＴは、ハイブリッド、単分岐、および複合型Ｎ－グリカンの分岐鎖モードを決定する（１７）。

【０５７０】

高マンノース型Ｎ－グリカンは支配的な中性Ｎ－グリカン群であった。中性α－マンノシル化Ｎ－グリカンの相対量はＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞中で同等であった（図４）。しかし、末端α－マンノースはＣＤ１３３＋細胞中の高マンノース型グリカンで豊富であり、一方ＣＤ１３３－細胞中では、末端α－マンノースは低マンノース、ハイブリッド、および単分岐型Ｎ－グリカンに広く存在していた。細胞表面上のα－マンノースの存在は、レクチン標識によってさらに示された（表２）。α－マンノースおよびＮ－グリカンコア配列結合レクチンＰＳＡならびにＨＨＡは、９６～９９％の成熟白血球および幹細胞集団を標識した。ＧＮＡは成熟白血球の７３％を標識したが、幹細胞の標識は僅かであった。ＧＮＡは、末端α１，３－マンノース残基を持つ低マンノース型Ｎ－グリカンに対して最も高い親和性を有する。レクチン標識の結果は、構造分析での結果と同様に、幹細胞に対する差異的なα－マンノシル化を示唆している。

【０５７１】

高マンノース型Ｎ－グリカンは、グリコシダーゼファミリーのＭＡＮ１およびＭＡＮ２によって他のＮ－グリカン型へプロセッシングされる（８、１６）（表１）。ＭＡＮ１ファミリー遺伝子の既知の４種類のうちの３種類、ＭＡＮ１Ａ１、ＭＡＮ１Ａ２、およびＭＡＮ１Ｂ１、ならびにＭＡＮ２ファミリー遺伝子の既知の５種類すべて、ＭＡＮ２Ａ１、ＭＡＮ２Ａ２、ＭＡＮ２Ｂ１、ＭＡＮ２Ｂ２、およびＭＡＮ２Ｃ１は、ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞中で同様に発現された。ＭＡＮ１遺伝子ファミリーの４番目のメンバー、ＭＡＮ１Ｃ１は、ＣＤ１３３－細胞中でのみ発現された。そのＭＡＮ１ファミリー内での特定の役割は分かっていない。しかし、ＭＡＮ１Ｃ１でコードされた酵素は、ｉｎｖｉｔｒｏでは、ＧｌｃＮＡｃＴをブロックするα１，３分岐鎖中のマンノース残基の除去を優先的に行う（２１）。

【０５７２】

二分岐複合型Ｎ－グリカンより大型のＮ－グリカン構造の量は、構造分析によると、ＣＤ１３３＋細胞内で少なかった。分岐鎖複合型Ｎ－グリカンと結合するＰＨＡ－Ｌは、９８％の白血球およびほとんどの幹細胞を標識した（表２）。この標識の結果は、成熟白血球および幹細胞の間で大型複合型Ｎ－グリカンの量が異なるにも関わらず、これらの構造は両細胞型に典型的なものであることを示している。

【０５７３】

ハイブリッド型および複合型Ｎ－グリカンの生合成は、ＭＧＡＴ遺伝子によってコードされるＮ－グリカンコアＧｌｃＮＡｃＴのファミリーによって制御される（表１）。ＭＧＡＴ１、ＭＧＡＴ２、およびＭＧＡＴ４Ａ／ＭＧＡＴ４Ｂは、それぞれ、ＧｌｃＮＡｃＴ１、ＧｌｃＮＡｃＴ２、およびＧｌｃＮＡｃＴ４をコードする。これらの遺伝子は、ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞で発現されたが、その発現レベルの相違が示された。ＣＤ１３３＋細胞では、ＭＧＡＴ２が１．９倍過剰発現され、ＭＧＡＴ４Ａは２．８倍過小発現された。

【０５７４】

まとめると、ＣＤ１３３＋細胞内でのＭＡＮ１Ｃ１およびＭＧＡＴ２の両方の発現パターンは、高マンノース型および複合型Ｎ‐グリカンの生合成が多くハイブリッド型および単分岐Ｎ‐グリカンの生合成が少ないことを示している。さらに、ＭＧＡＴ４Ａの過小発現は、幹細胞中の三分岐および大型Ｎ‐グリカンが減少する結果となり得る。

【０５７５】

Ｎ‐グリカン主鎖

グリカン主鎖構造は、ガラクトシルトランスフェラーゼ（ＧａｌＴ；分岐およびポリ‐ＬａｃＮＡｃ）およびＧｌｃＮＡｃＴ（ポリ‐ＬａｃＮＡｃ）の協調した作用によって形成される短分岐および伸長ポリ‐Ｎ‐アセチルラクトサミン（ポリ‐ＬａｃＮＡｃ）鎖を含む（図５）。白血球では短分岐型構造がポリ‐ＬａｃＮＡｃに対して支配的であることから、本研究はＧａｌＴに注目した。末端ガラクトース残基はβ１，４‐結合であることが示され、一方β１，３‐結合ガラクトースは検出されなかった。２型ＬａｃＮＡｃに特異的であるレクチンＲＣＡ‐Ｉは、白血球の９１％ならびに幹細胞を標識した。

【０５７６】

２型ＬａｃＮＡｃエピトープを合成するβ１，４‐ＧａｌＴをコードする遺伝子、Ｂ４ＧＡＬＴ１、Ｂ４ＧＡＬＴ３、およびＢ４ＧＡＴＬ４等は、ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞の両方で発現された（表１）。しかし、Ｂ４ＧＡＬＴ３の発現は、ＣＤ１３３＋細胞では２．３倍少なかった。さらに、Ｂ４ＧＡＬＴ２の発現は、ＣＤ１３３＋細胞内でしか見られなかった。Ｂ３ＧＡＬＴ２およびＢ３ＧＡＬＴ５によってコードされる１型ＬａｃＮＡｃ合成β１，３‐ＧａｌＴは、潜在的なグリカン産物と同様に、ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞内に存在しなかった。

【０５７７】

Ｎ‐グリカン末端エピトープ

末端エピトープは、合成の最終段階でＮ‐グリカン構造に付加される（図５）。Ｎ‐グリカンの末端修飾で一般的なグリカンの部分としては、シアル酸およびフコース残基が挙げられる。シアル酸転移酵素ファミリー、α２，３ＳＡＴおよびα２，６ＳＡＴは、シアル酸を末端ガラクトース残基へ転移する。そのようなエピトープはＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞で見られた。さらに、すべての既知のヒトフコシルトランスフェラーゼ合成経路を分析した。

【０５７８】

α２，３‐シアリダーゼプロファイリングにより、α２，３‐シアル化Ｎ‐グリカンはＣＤ１３３－細胞よりもＣＤ１３３＋細胞でより一般的であり（図４）、一方α２，６‐シアリル‐ＬａｃＮＡｃは両細胞型で一般的であることが明らかになった。レクチンＳＮＡを用いてα２，６‐シアル化、細胞表面上でのＳＴ６ＧＡＬ１の産物を検出した。ＳＮＡリガンドは幹細胞を含め、白血球の９８％で検出された。ＭＡＡを用いた標識により、α２，３‐シアリル‐ＬａｃＮＡｃ構造が白血球の６２％にしか存在せず、幹細胞でも同様であることが示された。このことは、ＣＤ１３３＋細胞の豊富なα２，３‐シアル化がＮ‐グリカンのみと関連している可能性があることを示唆している。α２，６‐ＳＡＴをコードするＳＴ６ＧＡＬ１およびα２，３‐ＳＡＴをコードするＳＴ３ＧＡＬ６は、ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞で発現された（表１）。ＳＴ３ＧＡＬ６の３．９倍の過剰発現がＣＤ１３３＋細胞で検出された。

【０５７９】

ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞のＮ‐グリカンコア構造は、質量分析によって示されるように、α１，６‐フコシル化されているものが多かった。さらに、ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞にて、各Ｎ‐グリカン鎖上に２若しくは３個以上のフコース残基の存在が観察された（図２および３）。１型ＬａｃＮＡｃはＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞のいずれでも支配的ではなかったため、フコシル化エピトープはα１，３‐またはα１，２‐結合フコース残基を有すると考えられた。レクチンＬＴＡは、α１，３‐結合フコース、すなわちＬｅｘ抗原の一部に対する特異性を有する。これは、白血球のわずかに６％しか標識しなかった。幹細胞集団の標識はまったく見られなかった。α１，２‐

結合フコース特異性を有するレクチンＵＥＡ‐Ｉは、白血球および幹細胞の５３％を認識した。

【０５８０】

骨髄型α１，３‐ＦｕｃＴ４（１８、１９）をコードするＦＵＴ４の発現は、ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞の両方で見られた。ＦｕｃＴ４は、２型ＬａｃＮＡｃまたはα３‐シアリルＬａｃＮＡｃのフコシル化により、それぞれＬｅｘ（ＣＤ１５）またはｓＬｅｘ抗原を合成する。α１，２‐ＦｕｃＴをコードするＦＵＴ１はＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞のいずれでも発現されなかった。さらに、ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞の構造分析において多く検出されたグリコシル化であるＮ‐グリカンコアα１，６‐ＦｕｃＴをコードするＦＵＴ８は、ＣＤ１３３＋細胞だけが検出可能なレベルで発現した。ＦＵＴ８は、α１，６‐フコシル化を促進する糖転移酵素をコードする唯一の既知の遺伝子であるが、過去の報告では、α１，６‐フコシル化の増加はα１，６‐ＦｕｃＴの上方制御のみでは説明することができないことが示されている（２０）。

【０５８１】

考察

本研究は、ＣＤ１３３＋細胞の分析に新規な手法を用いるものである。ＣＤ１３３＋細胞特異的Ｎ‐グリコシル化およびグリコシル化の事象の転写制御を互いに繋ぎ合わせることで、幹細胞と成熟白血球との間で異なる重要なＮ‐グリカン要素を産生する発現遺伝子を集めた。さらに、レクチン結合アッセイにより、幹細胞と成熟白血球との間の細胞表面グリコシル化の相違を明らかにした。

【０５８２】

稀であるＮ‐グリカン構造はＭＡＬＤＩ‐ＴＯＦおよびＮＭＲ分析によって検出されない場合があるが、この方法は異なる細胞型の間のグリカン組成の定量分析を可能とする。豊富な高マンノース型グリカンは、幹細胞に象徴的であり、レクチン標識で示されるように細胞表面でも同様であった。成熟白血球はより多くの大型複合型Ｎ‐グリカンを含有しており、一方複合Ｎ‐グリカンはＣＤ１３３＋細胞中では二分岐であるものが多かった。遺伝子発現が、この細胞型に典型的なコアグリコシル化を支援していると思われる。ＭＡＮ１Ｃ１が存在しないことに対して推定される役割は、高マンノース型からハイブリッド型および単分岐グリカンへの変換を遅くするものであることが示唆される。

【０５８３】

高マンノースおよび複合型Ｎ‐グリカン等のＣＤ１３３＋細胞内に存在する構造はＣＤ１６４エピトープ上に見られる（２４）。ＣＤ１６４分子の機能は確かにＮ‐グリカンに依存しており、臍帯血由来ＣＤ１３３＋細胞のＣＸＣＬ１２媒介遊走を調節する（２４、２５）。これはさらに、幹細胞増殖をネガティブに制御する（２６、２７）。複合Ｎ‐グリカン決定因子は、ＣＤ４４分子のＣＤ３４＋細胞特異的グリコフォーム等の造血幹細胞に共通する他の接着分子の一部でもある。

【０５８４】

ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞のβ１，４‐ガラクトシル化には、異なるβ１，４‐ガラクトシル化関連遺伝子が関与していた。これらのグリカンプロファイルの変化は検出されなかった。しかし、これらの遺伝子は単一の糖タンパク質のＮ‐グリカン主鎖をガラクトシル化し得る。

【０５８５】

ＣＤ１３３＋細胞内でのみ発現されるＢ４ＧＡＬＴ２は、胎児脳、成人心臓、筋肉、および膵臓に限定される発現パターンを有するが（２８）、一方Ｂ４ＧＡＬＴ３はほとんどの組織で広く発現される（２８）。Ｂ４ＧＡＬＴ２およびＢ４ＧＡＬＴ３が発現した酵素はほとんど同一の基質特異性を有し、これらは互いに交換可能である（２９）。Ｂ４ＧＡＬＴ２およびおＢ４ＧＡＬＴ３の両方は二分岐および大型複合型Ｎ‐グリカンをガラクトシル化する。ＣＤ１３３＋細胞中でのＢ４ＧＡＬＴ２の発現は、Ｂ４ＧＡＬＴ３の過小発現で相殺され得る。しかし、存在量がより低い糖タンパク質の変化は本方法では検出されない場合があり、そのため単一の糖タンパク質上でグリコシル化の差異が存在する可能性

がある。Ｂ４ＧＡＬＴはセレクチンリガンドのグリカン主鎖を合成するが、セレクチンの接着は末端グリコシル化によって制御される。ガラクトシル化はマウスの上皮細胞の増殖および分化において重要な役割を有する（３０）。ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞の生合成経路の差異が特定の糖タンパク質のβ１，４‐ガラクトシル化に影響を与えるとすれば、β１，４‐ガラクトシル化構造の有意性は、ＣＤ１３３＋細胞の増殖および分化の制御に関与することが考えられる。この興味深い仮説には、より詳細な検討が必要である。

【０５８６】

α２，６‐シアル化は、臍帯血由来ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞と同様に、ヒト骨髄および末梢血由来ＣＤ３４＋およびＣＤ３４－細胞の細胞表面グリカンに対して支配的である（３１）。さらに、顆粒球コロニー刺激因子によって動員された末梢血のＣＤ３４＋細胞および骨髄由来ＣＤ３４＋細胞は、非誘発末梢血由来ＣＤ３４＋細胞よりも細胞表面の高いα２，６‐シアル化を伴うＳＴ６ＧＡＬ１の発現が高く、このことはＣＤ３４＋細胞のα２，６‐シアル化がその環境内での顆粒球コロニー刺激因子に依存することを示唆している（１２）。ＣＤ３４＋細胞のα２，６‐シアル化はその細胞接着の制御に関与している可能性がある。ＳＴ６ＧＡＬ１の産物であるα２，６‐結合シアル酸は、ＣＤ２２＋Ｂ細胞のホーミングプロセスにとって不可欠である（３２）。ＳＴ６ＧＡＬ１の発現は細胞へのガレクチン‐１の結合を低下させる（３３）。ガレクチン‐１は幹細胞増殖を刺激する（３４）。ガレクチン‐１は間葉系幹細胞によって大量に分泌されるが（３５）、その発現はＣＤ１３３＋細胞内では検出されない（遺伝子発現プロファイルは（１４）に）。造血幹細胞は、間葉系幹細胞と共培養すると増殖し、その長期的な再構築能をより長く維持する（３６）。間葉系および造血幹細胞の共培養における相互作用はガレクチン‐１の結合によって促進され得る。

【０５８７】

シアル化グリカンの生合成では、α２，３‐およびα２，６‐ＳＡＴが同一のＮ‐グリカン基質に対して競合し得る。本研究では、本願発明者らはＳＴ３ＧＡＬ６の過剰発現に付随するＣＤ１３３＋細胞内の豊富なα２，３‐シアル化を示す。マウスＴ細胞活性化において、Ｎ‐グリカンの低いα２，６‐シアル化とともにα２，６‐ＳＡＴ１の割合が低いことが過去に示された（１１）。この著者らは、このことがα２，６‐ＳＡＴ１と同一の基質を競合するα１，３‐ＧａｌＴの発現によるものである可能性があると提案した。しかし、α１，３‐ＧａｌＴはヒトの中には存在せず、従って類似の基質の競合は該当しない。本結果により、ヒトＣＤ１３３＋細胞中においてα２，６‐シアル化の相対存在量が低い原因は、そうではなく、高いα２，３‐シアル化であることを示す。遺伝子発現のデータは、ＳＴ３ＧＡＬ６の過剰発現がこれらの細胞内での高いα２，３‐シアル化の原因であることを強く示唆している。ＳＴ３ＧＡＬ６は、制限された基質特異性を有し、このことからシアリル‐Ｌｅｗｉｓ　Ｘ決定因子の前駆体構造であるシアリル‐パラグロボシドの合成に関与していることが示唆される（３７）。しかし、ＳＴ３ＧＡＬ６の発現はシアリル‐Ｌｅｗｉｓ　Ｘの発現と相関を示さなかった。

【０５８８】

ＣＤ３４＋細胞（ＣＤ１３３＋細胞も）は、成熟白血球とは異なり、Ｎ‐グリカンシアル化に決定的に依存しているＣＤ４４抗原のグリコフォーム、造血細胞ＬおよびＥ‐セレクチンリガンドを提示する（３８‐４０）。セレクチンリガンドの相互作用は、幹細胞のホーミングを促進し、その増殖を制御する場合もある。ＣＤ３４＋細胞上に存在するＬ‐セレクチンは、幹細胞移植の後の早い造血回復と関連付けられている（３８）。Ｎ‐グリカンのα２，３‐シアル化は、ＣＤ４４分子が細胞外基質と結合する能力をネガティブに制御する（４１）。ＣＤ４４の主要な役割はヒアルロン酸との結合であるが（４２）、骨髄中においてＣＤ４４エピトープを有するＣＤ３４＋細胞は少量がヒアルロン酸と結合するのみである（４３）。従って、α２，３‐シアル化は恐らく幹細胞のホーミングおよび増殖の両方を促進するために少なくとも必要である。

【０５８９】

Ｎ‐グリカンコアα１，６‐フコシル化に加えて、少量のα１，２‐またはα１，３‐結合フコース残基が存在した。ＦＵＴ遺伝子の発現は、骨髄型α１，３‐結合フコースの合成を示唆するものである。しかし、α１，３‐フコシル化の存在の検出は、幹細胞を含む臍帯血由来白血球上で非常に低かった。一方、α１，２‐結合フコースは、α１，２‐フコシル化をプロセッシングするＦＵＴ１の発現が存在しない場合でも細胞表面で検出された。ＦＵＴ７産物はセレクチンと結合するｓＬｅｘの合成を担う重要な酵素である（４４）。さらに、ＦＵＴ１の発現はｓＬｅｘの発現を阻害することが示された（４５）。臍帯血由来幹細胞は、α１，３‐フコシルトランスフェラーゼの発現の減少によってα１，３‐フコシル化を低下させることが示され、このことは低いセレクチン結合に寄与し、移植における臍帯血由来細胞の生着を遅延させ得る（５、７）。胚形成の間はＦＵＴ４およびＦＵＴ９のみが発現される。ＦＵＴ４の発現は、ＦＵＴ７発現が欠損している成体中でのＦＵＴ７の低発現または無発現、およびセレクチンの結合に必要であるｓＬｅｘ等の産生を補償することが示された（４６）。幹細胞のフコシル化を強化する試みが少なくとも２つ実施され（５、７）、いずれの場合もフコシル化は成功し、そのうちの１つは非肥満糖尿病マウス／重症複合免疫不全マウスの骨髄へのホーミングの改善を示し得るものであった（７）。臍帯血由来細胞中でのＦＵＴ７発現の欠損がヒト骨髄への幹細胞の生着の遅れを引き起こす場合は、細胞工学技術を用いて幹細胞のフコシル化を促進することが可能であろう。

【０５９０】

まとめると、ＣＤ１３３＋細胞の特徴的なＮ‐グリコシル化に関連する重要な遺伝子は、ＭＧＡＴ２およびＳＴ３ＧＡＬ６の過剰発現、ＭＧＡＴ４Ａの過小発現、ならびにＭＡＮ１Ｃ１の無発現であった。さらに、β１，４‐ガラクトシル化は、ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞の間で、さらなる研究の対象である未知の機能により分子レベルで異なって制御された。ＣＤ３４＋およびＣＤ１３３＋細胞は非常に類似したゲノム全体の遺伝子発現プロファイルを有する（４７）。ＣＤ１３３＋細胞中のＮ‐グリコシル化に関連する遺伝子が幹細胞Ｎ‐グライコームに対して中心的なものである場合、この遺伝子はＣＤ３４＋細胞内でも同様に発現されるはずであると考えられた。ＣＤ３４＋細胞内のＮ‐グリコシル化関連遺伝子の発現はＣＤ１３３＋細胞と類似していることが示された（遺伝子発現の結果は公開されたＣＤ３４＋発現プロファイルより収集（４７））。さらに、ＣＤ３４＋およびＣＤ３４－細胞の間での発現パターンの変化がＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞の間と同一であることが分かり、このことは臍帯血由来ＣＤ３４＋細胞のＮ‐グライコームがＣＤ１３３＋細胞のＮ‐グライコームと非常に類似しており成熟白血球とは異なっていることを示唆している。

【０５９１】

ＣＤ１３３＋細胞内の分析されたＮ‐グリカンの特徴は、ＣＤ１６４、造血幹細胞および前駆体に特異的なＣＤ４４グリコフォーム等の既知の糖タンパク質において、ならびに細胞遊走、増殖、細胞認識、およびＢＭへのホーミングに必要であるＥ‐セレクチン、Ｐ‐セレクチン、およびガレクチンリガンドの結合において重要な役割を有する。ＣＤ１３３＋細胞のＮ‐グライコームは多くの依然として未知である機能にも関与している可能性がある。ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞の間での遺伝子発現ならびにグリカン構造の違いからの情報を組み合わせることで、ＣＤ１３３＋細胞に特異的であるＮ‐グリカン生合成を制御する新規遺伝子の同定が可能となった。造血幹細胞に特異的であるＮ‐グリコシル化についての新規な知識は、新規な治療用途の設計または現存のプロトコルの改善の手助けとなる。グリコシル化のｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏでの変化を用いて、幹細胞の自然の性質の改良、または幹細胞が特定の組織を標的化するようなＮ‐グライコームの修飾が可能となる。

【０５９２】

実施例１および表１の参考文献

参考文献

１．Ａｐｗｅｉｌｅｒ Ｒ，Ｈｅｒｍｊａｋｏｂ Ｈ ａｎｄ Ｓｈａｒｏｎ Ｎ

. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. Biochim Biophys Acta 1473:4-8.
2. Varki A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. Glycobiology 3:97-130.
3. Varki A. (2006). Nothing in glycobiology makes sense, except in the light of evolution. Cell 126:841-845.
4. Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M and Bhatia M. (2000). Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. Blood 95:2813-2820.
5. Hidalgo A, Frenette PS. (2005). Enforced fucosylation of neonatal CD34+ cells generates selectin ligands that enhance the initial interactions with microvessels but not homing to bone marrow. Blood 105:567-575.
6. Sampathkumar SG, Li AV, Jones MB, Sun Z and Yarema KJ. (2006). Metabolic installation of thiols into sialic acid modulates adhesion and stem cell biology. Nat Chem Biol 2:149-152.
7. Xia L, McDaniel JM, Yago T, Doeden A and McEver RP. (2004). Surface fucosylation of human cord blood cells augments binding to P-selectin and E-selectin and enhances engraftment in bone marrow. Blood 104:3091-3096.
8. Herscovics A. (1999). Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. Biochim Biophys Acta 1473:96-107.
9. Lowe JB. (2002). Glycosylation in the control of selectin counter-receptor structure and function. Immunol Rev 186:19-36.: 19-36.
10. Le Marer N, Skacel PO. (1999). Up-regulation of alpha2,6 sialylation during myeloid maturation: a potential role in myeloid cell release from the bone marrow. J Cell Physiol 179:315-324.
11. Comelli EM, Sutton-Smith M, Yan Q, Amado M, Panico M, Gilmartin T, Whisenant T, Lanigan CM, Head SR, Goldberg D, Morris HR, Dell A and Paulson JC. (2006).

Activation of murine CD4+ and CD8+ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. J Immunol 177:2431-2440.

12. Hui N, Le Marer N. (2001). Alpha-2,6-sialylation regulation in CD34+ progenitor cells in the human bone marrow and granulocyte colony-stimulating factor mobilization. J Hematother Stem Cell Res 10:661-668.

13. Marino JH, Hoffman M, Meyer M and Miller KS. (2004). Sialyltransferase mRNA abundances in B cells are strictly controlled, correlated with cognate lectin binding, and differentially responsive to immune signaling in vitro. Glycobiology 14:1265-1274.

14. Jaatinen T, Hemmoranta H, Hautaniemi S, Niemi J, Nicorici D, Laine J, Yli-Harja O and Partanen J. (2006). Global gene expression profile of human cord blood-derived CD133+ cells. Stem Cells 24:631-641.

15. Kekarainen T, Mannelin S, Laine J and Jaatinen T. (2006). Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells. BMC Cell Biol 7:30. :30.

16. Kornfeld R, Kornfeld S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu Rev Biochem 54:631-664.

17. Schachter H. (1991). The 'yellow brick road' to branched complex N-glycans. Glycobiology 1:453-461.

18. Mollicone R, Gibaud A, Francois A, Ratcliffe M and Oriol R. (1990). Acceptor specificity and tissue distribution of three human alpha-3-fucosyltransferases. Eur J Biochem 191:169-176.

19. Mollicone R, Candelier JJ, Mennesson B, Couillin P, Venot AP and Oriol R. (1992). Five specificity patterns of (1---3)-alpha-L-fucosyltransferase activity defined by use of synthetic oligosaccharide acceptors. Differential expression of the enzymes during human embryonic development and in adult tissues. Carbohydr Res 228:265-276.

20. Miyoshi E, Noda K, Yamaguchi Y, Inoue S, Ikeda Y, Wang W, Ko JH, Uozumi N,

Li W and Taniguchi N. (1999). The alpha1-6-fucosyltransferase gene and its biological significance. Biochim Biophys Acta 1473:9-20.
21. Herscovics A. (2001). Structure and function of Class I alpha 1,2-mannosidases involved in glycoprotein synthesis and endoplasmic reticulum quality control. Biochimie 83:757-762.
22. Lal A, Pang P, Kalelkar S, Romero PA, Herscovics A and Moremen KW. (1998). Substrate specificities of recombinant murine Golgi alpha1,2-mannosidases IA and IB and comparison with endoplasmic reticulum and Golgi processing alpha1,2-mannosidases. Glycobiology 8:981-995.
23. Yoshida A, Minowa MT, Takamatsu S, Hara T, Oguri S, Ikenaga H and Takeuchi M. (1999). Tissue specific expression and chromosomal mapping of a human UDP-N-acetylglucosamine: alpha1,3-d-mannoside beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase. Glycobiology 9:303-310.
24. Forde SP, Jorgensen TB, Newey SE, Roubelakis M, Smythe J, McGuckin CP, Pettengell R and Watt SM. (2006). Endolyn (CD164) Modulates the CXCL12-Mediated Migration of Umbilical Cord Blood CD133+ Cells. Blood. :
25. Doyonnas R, Yi-Hsin CJ, Butler LH, Rappold I, Lee-Prudhoe JE, Zannettino AC, Simmons PJ, Buhring HJ, Levesque JP and Watt SM. (2000). CD164 monoclonal antibodies that block hemopoietic progenitor cell adhesion and proliferation interact with the first mucin domain of the CD164 receptor. J Immunol 165:840-851.
26. Watt SM, Buhring HJ, Rappold I, Chan JY, Lee-Prudhoe J, Jones T, Zannettino AC, Simmons PJ, Doyonnas R, Sheer D and Butler LH. (1998). CD164, a novel sialomucin on CD34(+) and erythroid subsets, is located on human chromosome 6q21. Blood 92:849-866.
27. Zannettino AC, Buhring HJ, Niutta S, Watt SM, Benton MA and Simmons PJ. (1998). The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a pote

nt negative regulator of hematopoiesis. Blood 92:2613-2628.
28. Lo NW, Shaper JH, Pevsner J and Shaper NL. (1998). The expanding beta 4-galactosyltransferase gene family: messages from the databanks. Glycobiology 8:517-526.
29. Almeida R, Amado M, David L, Levery SB, Holmes EH, Merkx G, van Kessel AG, Rygaard E, Hassan H, Bennett E and Clausen H. (1997). A family of human beta4-galactosyltransferases. Cloning and expression of two novel UDP-galactose:beta-n-acetylglucosamine beta1, 4-galactosyltransferases, beta4Gal-T2 and beta4Gal-T3. J Biol Chem 272:31979-31991.
30. Asano M, Furukawa K, Kido M, Matsumoto S, Umesaki Y, Kochibe N and Iwakura Y. (1997). Growth retardation and early death of beta-1, 4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells. EMBO J 16:1850-1857.
31. Schwartz-Albiez R, Merling A, Martin S, Haas R and Gross HJ. (2004). Cell surface sialylation and ecto-sialyltransferase activity of human CD34 progenitors from peripheral blood and bone marrow. Glycoconj J 21:451-459.
32. Ghosh S, Bandulet C and Nitschke L. (2006). Regulation of B cell development and B cell signalling by CD22 and its ligands alpha2, 6-linked sialic acids. Int Immunol 18:603-611.
33. Amano M, Galvan M, He J and Baum LG. (2003). The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death. J Biol Chem 278:7469-7475.
34. Kiss J, Kunstar A, Fajka-Boja R, Dudics V, Tovari J, Legradi A, Monostori E and Uher F. (2007). A novel anti-inflammatory function of human galectin-1: inhibition of hematopoietic progenitor cell mobilization. Exp Hematol 35:305-313.
35. Kadri T, Lataillade JJ, Doucet C, Marie A, Ernou I, Bourin P, Joubert-Caron R, Caron M and Lutomski D. (2005). Prot

eomic study of Galectin-1 expression in human mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev 14:204-212.
36. Robinson SN, Ng J, Niu T, Yang H, McMannis JD, Karandish S, Kaur I, Fu P, Del Angel M, Messinger R, Flagge F, de Lima M, Decker W, Xing D, Champlin R and Shpall EJ. (2006). Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Bone Marrow Transplant 37:359-366.
37. Okajima T, Fukumoto S, Miyazaki H, Ishida H, Kiso M, Furukawa K, Urano T and Furukawa K. (1999). Molecular cloning of a novel alpha2,3-sialyltransferase (ST3Gal VI) that sialylates type II lactosamine structures on glycoproteins and glycolipids. J Biol Chem 274:11479-11486.
38. Dercksen MW, Gerritsen WR, Rodenhuis S, Dirkson MK, Slaper-Cortenbach IC, Schaasberg WP, Pinedo HM, dem Borne AE and van der Schoot CE. (1995). Expression of adhesion molecules on CD34+ cells: CD34+ L-selectin+ cells predict a rapid platelet recovery after peripheral blood stem cell transplantation. Blood 85:3313-3319.
39. Dimitroff CJ, Lee JY, Fuhlbrigge RC and Sackstein R. (2000). A distinct glycoform of CD44 is an L-selectin ligand on human hematopoietic cells. Proc Natl Acad Sci USA 97:13841-13846.
40. Dimitroff CJ, Lee JY, Rafii S, Fuhlbrigge RC and Sackstein R. (2001). CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells. J Cell Biol 153:1277-1286.
41. Skelton TP, Zeng C, Nocks A and Stamenkovic I. (1998). Glycosylation provides both stimulatory and inhibitory effects on cell surface and soluble CD44 binding to hyaluronan. J Cell Biol 140:431-446.
42. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB and Seed B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. Cell 61:1303-1313.
43. Peled A, Grabovsky V, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Petit I, Ben Hur H, Lapidot T and Alon R. (1999).

The chemokine SDF-I stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. J Clin Invest 104:1199-1211.
44. Sasaki K, Kurata K, Funayama K, Nagata M, Watanabe E, Ohta S, Hanai N and Nishi T. (1994). Expression cloning of a novel alpha 1,3-fucosyltransferase that is involved in biosynthesis of the sialyl Lewis x carbohydrate determinants in leukocytes. J Biol Chem %20;269:14730-14737.
45. Zerfaoui M, Fukuda M, Sbarra V, Lombardo D and El Battari A. (2000). alpha(1,2)-fucosylation prevents sialyl Lewis x expression and E-selectin-mediated adhesion of fucosyltransferase VII-transfected cells. Eur J Biochem 267:53-61.
46. Bengtson P, Lundblad A, Larson G and Pahlsson P. (2002). Polymorphonuclear leukocytes from individuals carrying the G329A mutation in the alpha 1,3-fucosyltransferase VII gene (FUT7) roll on E- and P-selectins. J Immunol 169:3940-3946.
47. Hemmoranta H, Hautaniemi S, Niemi J, Nicorici D, Laine J, Yli-Harja O, Partanen J and Jaatinen T. (2006). Transcriptional profiling reflects shared and unique characters for CD34+ and CD133+ cells. Stem Cells Dev 15:839-851.
48. Bause E, Bieberich E, Rolfs A, Volker C and Schmidt B. (1993). Molecular cloning and primary structure of Man9-mannosidase from human kidney. Eur J Biochem 217:535-540.
49. Misago M, Liao YF, Kudo S, Eto S, Mattei MG, Moremen KW and Fukuda MN. (1995). Molecular cloning and expression of cDNAs encoding human alpha-mannosidase II and a previously unrecognized alpha-mannosidase IIx isozyme. Proc Natl Acad Sci USA 92:11766-11770.
50. Moremen KW, Robbins PW. (1991). Isolation, characterization, and expression of cDNAs encoding murine alpha-mannosidase II, a Golgi enzyme that controls conversion of high mannose to complex N-glycans. J Cell Biol 115:1521-1534.
51. Nebes VL, Schmidt MC. (1994). Human lysosomal alpha-mannosidase: isolation

and nucleotide sequence of the full-length cDNA. Biochem Biophys Res Commun 200: 239-245.
52. Saito S, Aoki H, Ito A, Ueno S, Wada T, Mitsuzuka K, Satoh M, Arai Y and Miyagi T. (2003). Human alpha2, 3-sialyltransferase (ST3Gal II) is a stage-specific embryonic antigen-4 synthase. J Biol Chem 278: 26474-26479.
53. Tremblay LO, Campbell DN and Herscovics A. (1998). Molecular cloning, chromosomal mapping and tissue-specific expression of a novel human alpha1, 2-mannosidase gene involved in N-glycan maturation. Glycobiology 8: 585-595.
54. Tremblay LO, Herscovics A. (1999). Cloning and expression of a specific human alpha 1, 2-mannosidase that trims Man9GlcNAc2 to Man8GlcNAc2 isomer B during N-glycan biosynthesis. Glycobiology 9: 1073-1078.
55. Amado M, Almeida R, Carneiro F, Levery SB, Holmes EH, Nomoto M, Hollingsworth MA, Hassan H, Schwientek T, Nielsen PA, Bennett EP and Clausen H. (1998). A family of human beta3-galactosyltransferases. Characterization of four members of a UDP-galactose:beta-N-acetyl-glucosamine/beta-nacetyl-galactosamine beta-1, 3-galactosyltransferase family. J Biol Chem 273: 12770-12778.
56. Bai X, Zhou D, Brown JR, Crawford BE, Hennet T and Esko JD. (2001). Biosynthesis of the linkage region of glycosaminoglycans: cloning and activity of galactosyltransferase II, the sixth member of the beta 1, 3-galactosyltransferase family (beta 3GalT6). J Biol Chem 276: 48189-48195.
57. Isshiki S, Togayachi A, Kudo T, Nishihara S, Watanabe M, Kubota T, Kitajima M, Shiraishi N, Sasaki K, Andoh T and Narimatsu H. (1999). Cloning, expression, and characterization of a novel UDP-galactose:beta-N-acetylglucosamine beta1, 3-galactosyltransferase (beta3Gal-T5) responsible for synthesis of type 1 chain in colorectal and pancreatic epithelia and tumor cells derived therefrom. J Biol Chem 274: 12499-12507.

58. Kolbinger F, Streiff MB and Katopodis AG. (1998). Cloning of a human UDP-galactose:2-acetamido-2-deoxy-D-glucose 3beta-galactosyltransferase catalyzing the formation of type 1 chains. J Biol Chem 273:433-440.

59. Okajima T, Nakamura Y, Uchikawa M, Haslam DB, Numata SI, Furukawa K, Urano T and Furukawa K. (2000). Expression cloning of human globoside synthase cDNAs. Identification of beta 3Gal-T3 as UDP-N-acetylgalactosamine:globotriaosylceramide beta 1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase. J Biol Chem 275:40498-40503.

60. Zhou D, Henion TR, Jungalwala FB, Berger EG and Hennet T. (2000). The beta 1,3-galactosyltransferase beta 3GalT-V is a stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) synthase. J Biol Chem 275:22631-22634.

61. Almeida R, Levery SB, Mandel U, Kresse H, Schwientek T, Bennett EP and Clausen H. (1999). Cloning and expression of a proteoglycan UDP-galactose:beta-xylose beta1,4-galactosyltransferase I. A seventh member of the human beta4-galactosyltransferase gene family. J Biol Chem 274:26165-26171.

62. Amado M, Almeida R, Schwientek T and Clausen H. (1999). Identification and characterization of large galactosyltransferase gene families: galactosyltransferases for all functions. Biochim Biophys Acta 1473:35-53.

63. Okajima T, Yoshida K, Kondo T and Furukawa K. (1999). Human homolog of Caenorhabditis elegans sqv-3 gene is galactosyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. J Biol Chem 274:22915-22918.

64. Schwientek T, Almeida R, Levery SB, Holmes EH, Bennett E and Clausen H. (1998). Cloning of a novel member of the UDP-galactose:beta-N-acetylglucosamine beta1,4-galactosyltransferase family, beta4Gal-T4, involved in glycosphingolipid biosynthesis. J Biol Chem 273:29331-29340.

65. van D, I, van Tetering A, Schiphorst WE, Sato T, Furukawa K and van den Eij

nden DH. (1999). The acceptor substrate specificity of human beta4-galactosyltransferase V indicates its potential function in O-glycosylation. FEBS Lett 450:52-56.

66. Grundmann U, Nerlich C, Rein T and Zettlmeissl G. (1990). Complete cDNA sequence encoding human beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase. Nucleic Acids Res 18:667.

67. Takashima S, Tsuji S and Tsujimoto M. (2002). Characterization of the second type of human beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase (ST6Gal II), which sialylates Galbeta 1,4GlcNAc structures on oligosaccharides preferentially. Genomic analysis of human sialyltransferase genes. J Biol Chem 277:45719-45728.

68. Gillespie W, Kelm S and Paulson JC. (1992). Cloning and expression of the Gal beta 1,3GalNAc alpha 2,3-sialyltransferase. J Biol Chem 267:21004-21010.

69. Kitagawa H, Paulson JC. (1994). Cloning of a novel alpha 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups. J Biol Chem 269:1394-1401.

70. Kitagawa H, Mattei MG and Paulson JC. (1996). Genomic organization and chromosomal mapping of the Gal beta 1,3GalNAc／Gal beta 1,4GlcNAc alpha 2,3-sialyltransferase. J Biol Chem 271:931-938.

71. Kono M, Takashima S, Liu H, Inoue M, Kojima N, Lee YC, Hamamoto T and Tsuji S. (1998). Molecular cloning and functional expression of a fifth-type alpha 2,3-sialyltransferase (mST3Gal V:GM3 synthase). Biochem Biophys Res Commun 253:170-175.

72. Larsen RD, Ernst LK, Nair RP and Lowe JB. (1990). Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen. Proc Natl Acad Sci USA 87:6674-6678.

73. Koda Y, Kimura H and Mekada E. (1993). Analysis of Lewis fucosyltransferase genes from the human gastric mucosa of Lewis-positive and -negative individuals

. Blood 82:2915-2919.
74. Kelly RJ, Rouquier S, Giorgi D, Lennon GG and Lowe JB. (1995). Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. J Biol Chem 270:4640-4649.
75. Couillin P, Mollicone R, Grisard MC, Gibaud A, Ravise N, Feingold J and Oriol R. (1991). Chromosome IIq localization of one of the three expected genes for the human alpha-3-fucosyltransferases, by somatic hybridization. Cytogenet Cell Genet 56:108-111.
76. Weston BW, Nair RP, Larsen RD and Lowe JB. (1992). Isolation of a novel human alpha (1,3) fucosyltransferase gene and molecular comparison to the human Lewis blood group alpha (1,3/1,4) fucosyltransferase gene. Syntenic, homologous, nonallelic genes encoding enzymes with distinct acceptor substrate specificities. J Biol Chem 267:4152-4160.
77. Koszdin KL, Bowen BR. (1992). The cloning and expression of a human alpha-1,3 fucosyltransferase capable of forming the E-selectin ligand. Biochem Biophys Res Commun 187:152-157.
78. Natsuka S, Gersten KM, Zenita K, Kannagi R and Lowe JB. (1994). Molecular cloning of a cDNA encoding a novel human leukocyte alpha-1,3-fucosyltransferase capable of synthesizing the sialyl Lewis x determinant. J Biol Chem 269:16789-16794.
79. Yamaguchi Y, Fujii J, Inoue S, Uozumi N, Yanagidani S, Ikeda Y, Egashira M, Miyoshi O, Niikawa N and Taniguchi N. (1999). Mapping of the alpha-1,6-fucosyltransferase gene, FUT8, to human chromosome 14q24.3. Cytogenet Cell Genet 84:58-60.
80. Kaneko M, Kudo T, Iwasaki H, Ikehara Y, Nishihara S, Nakagawa S, Sasaki K, Shiina T, Inoko H, Saitou N and Narimatsu H. (1999). Alpha1,3-fucosyltransferase IX (Fuc-TIX) is very highly conserved b

etween human and mouse; molecular cloning, characterization and tissue distribution of human Fuc-TIX. FEBS Lett 452:237-242.

【０５９３】

実施例２

臍帯血ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞関連Ｎ－グリカンの評価

Ｎ－グリカンプロファイルデータは、実施例１で述べたようにヒト臍帯血造血ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞から分析した。表３および４の説明文に記載のように、データは各細胞型に対する各グリカンシグナルの相対的な関係に従って評価し、それに応じてＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－に関連するグリカンシグナルに分類し、中性およびシアル化Ｎ－グリカンシグナルについてそれぞれ表３および表４に示した。この計算では、各細胞型に対して：２倍を超える相違（著しい関連性）、１．５倍から２倍の間の相違（実質的な関連性）、および１．５倍未満の相違（小さいが検出された関連性）、という３種類のグリカンシグナルの群が得られた。このデータにより、実施例１で識別されたグリカンシグナル群に加えて、他のグリカンシグナルもＣＤ１３３＋またはＣＤ１３３－細胞と関連していることが示された。

【０５９４】

実施例３

臍帯血ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞Ｎ－グリカンにおける個体差の評価

Ｎ－グリカンプロファイルデータは、実施例１で述べたようにヒト臍帯血造血ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞から分析し、表５および６に示すデータは、表５および６の説明文に記載のように、各グリカンシグナルに対して個体差を評価するためにいくつかの臍帯血ユニットから収集し、それに応じてグリカンシグナル群に分類した。この計算では：１００％を超える平均偏差（大きな個体差）、５０から１００％の間の平均偏差（実質的な個体差）、および０から５０％の間の平均偏差（小さい個体差）、という３種類のグリカンシグナル群が得られた。このデータにより、グリカンシグナルの個体差において、グリカンシグナルに関連する、およびグリカンシグナル群に関連する違いの両方が存在することが示された。

【０５９５】

実施例４

細胞表面グリカン構造の酵素修飾

実験手順

酵素修飾

シアル酸転移酵素反応：ヒト臍帯血単核球（３ｘ１０^{6}細胞）を、６０ｍＵ　α２，３－（Ｎ）－シアル酸転移酵素（ラット、Ｓ．ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａにおける組み換え体、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）、５０ｍＭ　３－モルホリノプロパンスルホン酸ナトリウム（ＭＯＰＳ）バッファー　ｐＨ７．４中の１．６μｍｏｌ　ＣＭＰ－Ｎｅｕ５Ａｃ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌにより、総容量１００μｌにて最大１２時間修飾した。フコシルトランスフェラーゼ反応：ヒト臍帯血単核球（３ｘ１０^{6}細胞）を、４ｍＵ　α１，３－フコシルトランスフェラーゼＶＩ（ヒト、Ｓ．　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａにおける組み換え体、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）、５０ｍＭ　ＭＯＰＳバッファー　ｐＨ７．２中の１μｍｏｌ　ＧＤＰ－Ｆｕｃ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌにより、総容量１００μｌにて最大３時間修飾した。広範なシアリダーゼ反応：ヒト臍帯血単核球（３ｘ１０^{6}細胞）を、５０ｍＭ　酢酸ナトリウムバッファー　ｐＨ５．５中の５ｍＵ　シアリダーゼ（Ａ．　ｕｒｅａｆａｃｉｅｎｓ，　Ｇｌｙｋｏ，　ＵＫ）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌにより、総容量１００μｌにて最大１２時間修飾した。α２，３－特異的シアリダーゼ反応：細胞を、５０ｍＭ　酢酸ナトリウムバッファー　ｐＨ５．５中のα２，３－シアリダーゼ（Ｓ．　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ、大腸菌における組み換え体）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌにより、総容量１００μｌにて修飾した。逐次酵素修飾：逐次的に実施する反応の間、細胞を遠心分離によってペレット化し

て上清を廃棄し、その後、適切なバッファー中の次の修飾酵素および基質溶液を上述のように細胞に適用した。洗浄手順：修飾後、細胞はリン酸バッファー食塩水で洗浄した。

【０５９６】

グリカン分析

細胞の洗浄後、すべての細胞糖タンパク質をＮ－グリコシダーゼ消化に掛け、シアル化および中性Ｎ－グリカンを単離し、上述のようにして質量分析を行った。Ｏ－グリカンの分析については、糖タンパク質を、実質的に過去の報告に従って（Ｎｙｍａｎ　ｅｔ　ａｌ，　１９９８）還元的アルカリβ脱離に掛け、その後シアル化および中性グリカンのアルジトール画分を単離し、上述のようにして質量分析を行った。

【０５９７】

糖転移酵素／グリコシル転移によって再構築されたグリカン

本発明はさらに、以下の工程を含むプロセスで作製された特定のグリカンを制御された試薬に関する。

１）本発明に記載のように、任意にグリカン構造を部分的に除去する工程であって、部分的に除去されたグリカン構造がグリカンを除去された試薬の２群に対して記載のように非動物構造であってもよく、または原核生物からのグリコシル化タンパク質であってもよい。

２）許容されるまたは無害のグリカンを試薬のグリカンへと転移する工程。このようなプロセスは、特定の治療用タンパク質に対する糖タンパク質再構築として知られる。本願発明者らは、細胞培養プロセス中に存在する特定の試薬のための再構築プロセスに対する要求が存在することを明らかにした。

さらに、本願発明者らは、転移反応を阻害する可能性のある数多くの因子を含む全血清に対してさえも、大量のタンパク質混合物のグリカン除去および／または再構築を示すことができた。

【０５９８】

結果

シアリダーゼ消化

生存臍帯血単核球の広範なシアリダーゼ触媒脱シアル化により、対応する中性Ｎ－グリカン構造、例えば$Hex_6HexNAc_3$、$Hex_5HexNAc_4dHex_{0-2}$、および$Hex_6HexNAc_5dHex_{0-1}$の単糖組成の相対量の増加によって示されるように、シアル化Ｎ－グリカン構造ならびにＯ－グリカン構造（データ示さず）が脱シアル化された（表９）。全体としてグリコシル化プロファイルのシアル酸残基の少ないグリカン構造へのシフトが、広範なシアリダーゼ処理に際してのシアル化Ｎ－グリカン分析で観察された。反応に際しての細胞のグリカンプロファイルのこのシフトは、反応の結果を分析する効果的な手段として機能した。得られた修飾細胞は、反応後の細胞表面においてシアル酸残基の含有量が減少し末端ガラクトース残基の含有量が増加したと結論付けられる。

【０５９９】

α２，３－特異的シアリダーゼ消化

同様にして、生存単核球のα２，３－特異的シアリダーゼ触媒脱シアル化により、対応する中性Ｎ－グリカン構造の相対量の増加によって示されるように、シアル化Ｎ－グリカン構造が脱シアル化された（データ示さず）。全体としてグリコシル化プロファイルのシアル酸残基の少ないグリカン構造へのシフトが、α２，３－特異的シアリダーゼ処理に際してのシアル化Ｎ－グリカン分析で観察された。反応に際しての細胞のグリカンプロファイルのこのシフトは、反応の結果を分析する効果的な手段として機能した。得られた修飾細胞は、反応後の細胞表面においてα２，３－結合シアル酸残基の含有量が減少し末端ガラクトース残基の含有量が増加したと結論付けられる。

【０６００】

シアル酸転移酵素反応

生存臍帯血単核球のα２，３－シアル酸転移酵素触媒シアル化により、中性Ｎ－グリカ

ン構造（表９の$Hex_5HexNAc_4dHex_{0-3}$および$Hex_6HexNAc_5dHex_{0-2}$の単糖組成）の相対量の減少および対応するシアル化構造（例えば表８の$NeuAc_2Hex_5HexNAc_4dHex_1$グリカン）の増加によって示されるように、多くの中性（表９）およびシアル化Ｎ－グリカン（表８）構造ならびにＯ－グリカン構造（データ示さず）がシアル化された。全体としてグリコシル化プロファイルのシアル酸残基の多いグリカン構造へのシフトが、Ｎ－グリカンおよびＯ－グリカン分析の両方で観察された。得られた修飾細胞は、反応後の細胞表面においてα２，３－結合シアル酸残基の含有量が増加し末端ガラクトース残基の含有量が減少したと結論付けられる。

【０６０１】

フコシルトランスフェラーゼ反応

生存臍帯血単核球のα１，３－フコシルトランスフェラーゼ触媒フコシル化により、非フコシル化グリカン構造（提案された単糖組成中のｄＨｅｘのない形）の相対量の減少および対応するフコシル化構造（提案された単糖組成中の$n_{dHex}>0$である形）の増加によって示されるように、多くの中性（表９）およびシアル化Ｎ－グリカン構造ならびにＯ－グリカン構造（下記参照）がフコシル化された。例えば、フコシル化の前は、$Hex_2HexNAc_2$アルジトールの［Ｍ＋Ｎａ］$^+$イオンに対応するＯ－グリカンアルジトールシグナルがｍ／ｚ　７７３に、および$Hex_2HexNAc_2dHex_1$アルジトールの［Ｍ＋Ｎａ］$^+$イオンに対応するｍ／ｚ　９１９に、およその相対比率それぞれ９：１で観察された（データ示さず）。フコシル化の後は、これらのシグナルのおよその相対比率は３：１であり、中性Ｏ－グリカンの相当量のフコシル化が発生したことを示している。元の細胞では観察されていなかったいくつかのフコシル化Ｎ－グリカン構造、例えば提案された構造が$Hex_6HexNAc_5dHex_1$および$Hex_6HexNAc_5dHex_2$である中性Ｎ－グリカンさえも反応の後には観察され（表９）、α１，３－フコシルトランスフェラーゼ反応において、生存細胞の細胞表面が、量の増加したまたは異常な構造型のフコシル化グリカン、特にタンパク質結合Ｎ－グリカンならびにＯ－グリカンの末端Ｌｅｗｉｓ　ｘエピトープによって修飾され得ることを示している。

【０６０２】

シアリダーゼ消化およびそれに続くシアル酸転移酵素反応

臍帯血単核球を広範なシアリダーゼ反応に掛け、その後、実験手順の項で説明したように、α２，３－シアル酸転移酵素およびＣＭＰ－Ｎｅｕ５Ａｃを同じ反応物へ添加した。細胞のＮ－グリカンプロファイルに対するこの一連の反応の影響を図７に示す。シアル化Ｎ－グリカンプロファイルを反応工程間についても分析し、その結果より、シアル酸がまずシアル化Ｎ－グリカンから除去され（例えば中性Ｎ－グリカンの量の増加が見られることによって示される）、次にα２，３－結合シアル酸残基によって置換された（例えば新規に形成された中性Ｎ－グリカンの消滅によって示される；データは示さず）ことが明らかに示された。得られた修飾細胞は、反応後により多くのα２，３－結合シアル酸残基を含有していたと結論付けられる。

【０６０３】

シアル酸転移酵素反応およびそれに続くフコシルトランスフェラーゼ反応

臍帯血単核球をα２，３－シアル酸転移酵素反応に掛け、その後、実験手順の項で説明したように、α１，３－フコシルトランスフェラーゼおよびＧＤＰ－フコースを同じ反応物へ添加した。細胞のシアル化Ｎ－グリカンプロファイルに対するこの一連の反応の影響を図８に示す。この結果より、グリカンシグナルの大部分で（詳細を表７に示す）その相対強度が変化したことが分かり、このことは細胞内に存在するシアル化Ｎ－グリカンの大部分がこの酵素の基質であったことを示している。この酵素反応工程の組み合わせから、この反応工程のいずれか一方の単独によるものとは異なった結果が得られたことも明らかであった。

【０６０４】

上述のα１，３－フコシルトランスフェラーゼ反応とは異なり、フコシル化の前のシアル化は、臍帯血単核球表面上に存在する中性フコシルトランスフェラーゼ受容体グリカン

構造をシアル化したことは明らかであり、このことにより、単独のα１，３‐フコシルトランスフェラーゼ反応の後には発生した中性フコシル化Ｎ‐グリカン構造の検出可能な形成は無かった（上記で検討；表９）。

【０６０５】

α‐マンノシダーゼ反応

全細胞のα‐マンノシダーゼ反応では、他の実施例でα‐マンノース残基を含むことが示されたものを含むグリカンシグナルが少し低下した。本発明はさらに、本発明による酵素修飾条件下において細胞が生存可能であることも明らかにした、表１８。

【０６０６】

本発明は特に、細胞が酵素反応により、好ましくは、グリカンを、好ましくは造血細胞の細胞表面グリカンを修飾する能力を有する本発明によるシアル酸転移酵素、フコシルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ（例：β４‐ＧａｌＴ）、またはグリコシダーゼ、好ましくは末端ＧｌｃＮＡｃ残基を修飾するシアリダーゼまたはマンノシダーゼにより修飾される場合に、および好ましくは細胞が、破壊された細胞との細胞間反応を避けるために細胞が生細胞である条件下で細胞表面の修飾を受ける場合に、造血細胞の分析を行うための本発明による方法に関する。抗体またはレクチン等の好ましい結合試薬は、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、シアリルα３／６Ｇａｌβ３／４ＧｌｃＮＡｃ、より好ましくはシアリルα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃまたはシアリル‐Ｌｅｗｉｓ　ｘ等の酵素によって合成された細胞表面エピトープを認識するものが選択され、あるいは、グリカンは質量分析プロファイリングによって分析される。

【０６０７】

糖転移酵素由来グリカン構造

本願発明者らは、グリコシル化糖転移酵素酵素が修飾反応において細胞を汚染し得ることを検出した。例えば、Ｓ．　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞内で産生された組み換えフコシルトランスフェラーゼまたはシアル酸転移酵素酵素とともに細胞をインキュベートしたところ、Ｎ‐グリコシダーゼならびに細胞性および／または細胞関連糖タンパク質の質量分析は、$Hex_3HexNAc_2dHex_1$グリカン成分の［Ｍ＋Ｎａ］$^+$イオン（計算値ｍ／ｚ　１０７９．３８）に対応する中性Ｎ‐グリカンの大きなシグナルをｍ／ｚ　１０７９に検出する結果となった。典型的には、組み換え糖転移酵素で処理した細胞では、このグリカンシグナルは細胞自体のグリカンシグナルよりも大きいかまたは少なくともこれと同等であり、このことは、昆虫由来複合糖質が昆虫細胞内で産生された組み換えグリカン修飾酵素に付随する非常に強い汚染物質であることを示している。さらに、このグリカン汚染は細胞の洗浄後も残存し、このことは、糖転移酵素酵素に対応するまたは付随する昆虫型複合糖質が、細胞に対する親和性を有するかまたは細胞からの洗浄に対する耐性を有する傾向にあることを示唆している。このグリカンシグナルの起源を確認するために、本願発明者らは市販の組み換えフコシルトランスフェラーゼおよびシアル酸転移酵素酵素調製物の含有グリカンを分析し、ｍ／ｚ　１０７９のグリカンシグナルがこれらの酵素に付随する主要なＮ‐グリカンシグナルであることが分かった。Ｓ．　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞内で産生された糖タンパク質由来の、例えばＭａｎα３（Ｍａｎα６）Ｍａｎβ４ＧｌｃＮＡｃ（Ｆｕｃα３／６）ＧｌｃＮＡｃ（β‐Ｎ‐Ａｓｎ）といった対応するＮ‐グリカン構造が、過去に報告されている（Ｓｔａｕｄａｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９２；Ｋｒｅｔｚｃｈｍａｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４；Ｋｕｂｅｌｋａ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４；Ａｌｔｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９）。文献に記載のように、これらのグリカン構造、ならびに組み換えまたは精製酵素、特に昆虫由来産物で処理された細胞を潜在的に汚染する他のグリカン構造は、ヒトの中では潜在的に免疫原性であり、および／または、そうでなければこの修飾細胞の使用に対して有害である。グリカン修飾酵素は、ヒト細胞の修飾、特に臨床用途の場合には、免疫原性グリカンエピトープ、非ヒトグリカン構造、および／または望ましくない生物学的影響を潜在的に有する他のグリカン構造が含まれないように注意深く選択する必要があると結論付けられる。

【０６０８】

実施例５
グリコシダーゼまたは糖転移酵素修飾細胞の安定性および培養特性の分析
前述の実施例からのノイラミニダーゼおよび糖転移酵素（シアル酸転移酵素およびフコシルトランスフェラーゼ）修飾細胞の安定性および培養特性を、（Ｋｅｋａｒａｉｎｅｎ ｅｔ ａｌ ＢＭＣ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ （２００６） ７， ３０）の記載に従ってＣＦＵ細胞培養アッセイおよび生存率アッセイによって分析した。
本発明は、定量的にシアル酸レベルが低下された修飾臍帯血単核球がＣＦＵ細胞培養アッセイにおいて高いコロニー数を示すことを明らかにした。本発明は特に、血液細胞集団の培養における、特に造血細胞の培養における脱シアル化造血細胞の使用に関する（表１８）。

【０６０９】
実施例６
幹細胞および分化細胞中の末端ＨｅｘＮＡｃを有するＮ－グリカン組成群の分析
方法
式：$n_{HexNAc}=n_{Hex}\geqq5$および$n_{dHex}\geqq1$（Ｉ群）で特徴付けられる末端ＨｅｘＮＡｃ含有Ｎ－グリカンの存在の分析のために、ならびにこの存在を式：$n_{HexNAc}=n_{Hex}\geqq5$および$n_{dHex}=0$（ＩＩ群）で特徴付けられる末端ＨｅｘＮＡｃ含有Ｎ－グリカンと比較するために、Ｎ－グリカンを単離し、精製し、前述の実施例で述べたようにしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析によって分析した。これらには単糖組成が帰属され、得られたグリカンプロファイル内の相対的な比率は、上述のようにして定量的プロファイル分析で決定した。以下のグリカンシグナルを特定のグリカン群の指標として用いた（モノアイソトピック質量）。
Ｉａ，$Hex_5HexNAc_5dHex_1$：［Ｍ＋Ｎａ］$^+$イオンに対するｍ／ｚ ２０１２．７
Ｉｂ，$NeuAc_1Hex_5HexNAc_5dHex_1$：［Ｍ－Ｈ］$^-$イオンに対するｍ／ｚ ２２７９．８
Ｉｃ，$NeuAc_2Hex_5HexNAc_5dHex_1$：［Ｍ－Ｈ］$^-$イオンに対するｍ／ｚ ２５７０．９
Ｉｄ，$NeuAc_1Hex_5HexNAc_5dHex_2$：［Ｍ－Ｈ］$^-$イオンに対するｍ／ｚ ２４２５．９
ＩＩａ，$NeuAc_1Hex_5HexNAc_5$：［Ｍ－Ｈ］$^-$イオンに対するｍ／ｚ ２１３３．８

【０６１０】
さらに、グリカンシグナル$Hex_3HexNAc_5$：［Ｍ＋Ｎａ］$^+$イオンに対するｍ／ｚ １５４２．６および$Hex_3HexNAc_5dHex_1$：［Ｍ＋Ｎａ］$^+$イオンに対するｍ／ｚ １６８８．６の相対発現についても分析を行った。

【０６１１】
結果
Ｉ群グリカンの指標として、Ｉｂが、ＣＢ ＭＳＣ、ＢＭ ＭＳＣ、およびＣＤ３４＋ＣＢ ＨＳＣ等の幹細胞試料から単離された各種Ｎ－グリカン試料中、ならびに、ＥＢおよびｓｔ．３分化細胞、分化脂肪細胞（ＣＢ ＭＳＣ由来）、分化骨芽細胞（ＢＭ ＭＳＣ由来）、ならびにＣＤ３４－ＣＢ ＭＮＣ等の分化細胞試料中で検出された。
ＣＢ ＨＳＣ：ＩｂおよびＩｃは、ＣＤ３４＋細胞と比較してＣＢ ＣＤ３４－細胞中で過剰発現され、一方Ｉｄは、ＣＤ３４＋細胞中で過剰発現された。ＩＩａは、ＣＤ３４＋およびＣＤ３４－細胞の両方で発現された。ＩａおよびＩｃは発現されなかった。$Hex_3HexNAc_5dHex_1$はＣＢ ＣＤ３４＋およびＣＢ ＣＤ３４－細胞の両方で観察されたが、成体末梢血ＣＤ３４＋細胞中では観察されなかった。$Hex_3HexNAc_5dHex_1$は、それぞれＣＤ１３３－およびｌｉｎ＋細胞と比較してＣＤ１３３＋およびｌｉｎ－細胞中で過剰発現された。
ＣＢおよびＢＭ ＭＳＣ：Ｉａ～ｄおよびＩＩａの中で、ＩｂのみがＣＢ ＭＳＣ中で

発現され、一方Ｉａ、Ｉｂ、およびＩｄは分化骨芽細胞中で過剰発現された。Ｉａ～ｄおよびＩＩａの中で、ＩａおよびＩｂのみがＢＭ　ＭＳＣ中で発現され、一方Ｉａ、Ｉｂ、およびＩｄは分化脂肪細胞中で過剰発現された。$Hex_3HexNAc_5dHex_1$はＭＳＣ中で発現された。

【０６１２】

実施例７

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。

【０６１３】

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。

【０６１４】

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。

【０６１５】

プレートをコロニーに対してスクリーニングし、コロニー中の細胞が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２０００～３０００／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、２０００～３０００細胞／cm^2の密度で再プレーティングした。

【０６１６】

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２０００～３０００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。

【０６１７】

実験手順

間葉系幹細胞表現型のフローサイトメトリー分析

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ー（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。

【０６１８】

ＵＢＣ由来細胞は造血マーカー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、ＣＤ９０、ＣＤ１０５およびＨＬＡ‐ＡＢＣに対して陽性であった。

【０６１９】

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。

【０６２０】

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。

【０６２１】

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。

【０６２２】

実施例８

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

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。

【０６２３】

臍帯血細胞の単離

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1×10^{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1×10^{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。ＣＤ３４＋およびＣＤ１３３＋細胞は、実質的にＪａａｔｉｎｅｎ Ｔ ａｎｄ Ｌａｉｎｅ Ｊ. ｉｎ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２Ａ．２．１－２Ａ．２．９の記載に従って濃縮した。

【０６２４】

結果および考察

図１１に、７つの個々の臍帯血単核球（ＣＢ ＭＮＣ）調製物に結合する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。

【０６２５】

実施例９

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前述の実施例に記載のように調製した。

【０６２６】

ＭＡＬＤＩ‐ＴＯＦ質量分析グリカンプロファイリングは、例えばＰＣＴ／ＦＩ２００７　０５０３３６に記載のように実施した。

【０６２７】

前述の実施例に記載のように、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、前述の実施例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。

【０６２８】

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）。

【０６２９】

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。

【０６３０】

実施例１０

ヒト幹細胞のスフィンゴ糖脂質グリカン

実験手順

結果および考察

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１２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$_3$ＨｅｘＮＡｃ$_1$（７３０）、Ｈｅｘ$_2$ＨｅｘＮＡｃ$_1$（５６８）、Ｈｅｘ$_3$ＨｅｘＮＡｃ$_1$ｄＨｅｘ$_1$（８７６）、Ｈｅｘ$_4$ＨｅｘＮＡｃ$_2$（１０９５）、およびＨｅｘ$_4$ＨｅｘＮＡｃ$_2$ｄＨｅｘ$_1$（１２４１）に対応した。

【０６３１】

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。

【０６３２】

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ｈＥＳＣ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）：

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

【０６３３】

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１３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。

【０６３４】

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５１１～２２６３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）。

【０６３５】

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。

【０６３６】

ヒト幹細胞型の中性糖脂質プロファイル

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。

【０６３７】

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７８６～２７８１の間のモノアイソトピックｍ／ｚ値で検出された（［Ｍ－Ｈ］‐イオンに対して）。

【０６３８】

ＣＢ　ＭＮＣの酸性スフィンゴ糖脂質グリカンは主に$NeuAc_1Hex_{n+2}HexNAc_n$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。

【０６３９】

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。

【０６４０】

実施例１１

ＣＢ　ＭＮＣ細胞集団のレクチンに基づく選択

フルオレセイン標識レクチンおよびＣＢ　ＭＮＣを用いたＦＡＣＳ実験を、実施例の記載と実質的に類似のようにして実施した。相補的な蛍光染料を有するＣＤ３４特異的モノクローナル抗体（Ｊａａｔｉｎｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２００６）による二重染色を実施した。抗グリコホリンＡ（ＧｌｙＡ）モノクローナル抗体ネガティブセレクションによってＣＤ　ＭＮＣ画分からの赤芽球の除去を実施した。

【０６４１】

結果および考察

ＣＢ　ＭＮＣ画分と比較して、ＧｌｙＡ除去ＣＢ　ＭＮＣは以下のレクチンによるＦＡＣＳにおいて染色の低下を示し（減少率を括弧内の％で示す）：ＰＷＡ（４８％）、ＬＴＡ（５９％）、ＵＥＡ（３４％）、ＳＴＡ、ＭＡＡ、およびＰＮＡ（最後の３つはすべて２３％未満）；このことは、ＧｌｙＡの除去が細胞選別におけるレクチンの分解能を上昇させたことを示す。

【０６４２】

フルオレセイン標識レクチンおよび抗ＣＤ３４抗体の両方によるＦＡＣＳの二重染色において、以下のレクチンがＣＤ３４＋細胞と共存した：ＳＴＡ（３／３試料）、ＨＨＡ（３／３試料）、ＰＳＡ（３／３試料）、ＲＣＡ（３／３試料）、およびさらに部分的にＮ

ＰＡ（２／３試料）。対照的に、以下のレクチンはＣＤ３４＋細胞と共存しなかった：ＧＮＡ（３／３試料）およびＰＷＡ（３／３試料）、ならびにさらに部分的にＬＴＡ（２／３試料）、ＷＦＡ（２／３試料）、およびＧＳ‐ＩＩ（２／３試料）。

【０６４３】

実施例８の結果と合わせて考えると、本結果は、レクチンがネガティブおよびポジティブセレクションの両方によってＣＢ　ＭＮＣからＣＤ３４＋細胞を濃縮可能であることを示しており、例えば：

１）ＧＮＡはＣＢ　ＭＮＣの約７０％と結合するがＣＤ３４＋細胞とは結合せず、これによりＣＤ３４＋細胞の単離におけるＣＢ　ＭＮＣのネガティブセレクションにて約３Ｘの濃縮が可能となる。

２）ＳＴＡはＣＢ　ＭＮＣの約５０％と結合しＣＤ３４＋細胞とも結合し、これによりＣＤ３４＋細胞の単離におけるＣＢ　ＭＮＣのポジティブセレクションにて約２Ｘの濃縮が可能となる。

３）ＵＥＡはＣＢ　ＭＮＣの約５０％と結合しＣＤ３４＋細胞とも結合し、これによりＣＤ３４＋細胞の単離におけるＣＢ　ＭＮＣのポジティブセレクションにて約２Ｘの濃縮が可能となる。

【０６４４】

実施例１２

幹細胞のガレクチン遺伝子発現プロファイル

実験手順

ＣＢ　ＣＤ１３３＋細胞の遺伝子発現分析は報告されており（Ｊａａｔｉｎｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２００６）、本分析は実施的にそれに類似して実施した。その遺伝子発現プロファイルを分析したガレクチンは（括弧内は対応するＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘコード）：ガレクチン‐１（２０１１０５＿ａｔ）、ガレクチン‐２（２０８４５０＿ａｔ）、ガレクチン‐３（２０８９４９＿ｓ＿ａｔ）、ガレクチン‐４（２０４２７２＿ａｔ）、ガレクチン‐６（２００９２３＿ａｔ）、ガレクチン‐７（２０６４００＿ａｔ）、ガレクチン‐８（２０８９３３＿ｓ＿ａｔ）、ガレクチン‐９（２０３２３６＿ｓ＿ａｔ）、ガレクチン‐１０（２０６２０７＿ａｔ）、ガレクチン‐１３（２２０１５８＿ａｔ）等であった。

【０６４５】

結果および考察

ＣＢ　ＣＤ１３３＋対ＣＤ１３３－、ならびにＣＤ３４＋対ＣＤ３４－ＣＢ　ＭＮＣ細胞において、ガレクチン遺伝子発現プロファイルは以下の通りであった：全体として、ガレクチン１、２、３、６、８、９、および１０が、ＣＤ３４＋／ＣＤ１３３＋細胞の両方で遺伝子発現を示した。ガレクチン１、２、および３は、ＣＤ３４－／ＣＤ１３３－細胞に対してＣＤ３４＋／ＣＤ１３３＋細胞の両方で下方制御され、さらにガレクチン１０はＣＤ１３３－細胞に対してＣＤ１３３＋細胞で下方制御された。対照的にガレクチン８は、ＣＤ３４－／ＣＤ１３３－細胞に対してＣＤ３４＋／ＣＤ１３３＋細胞の両方で上方制御された。

【０６４６】

ｈＥＳＣ対ＥＢ試料において、ガレクチン遺伝子発現プロファイルは以下の通りであった：全体として、ガレクチン１、３、６、８、および１３がｈＥＳＣで遺伝子発現を示した。ガレクチン３はＥＢに対して明らかに下方制御され、さらにガレクチン１３は４種類のｈＥＳＣ細胞株のうち２種類で下方制御された。対照的に、ガレクチン１はすべてのｈＥＳＣ細胞株で明らかに上方制御された。

【０６４７】

この結果は、ＣＢ　ＣＤ３４＋／ＣＤ１３３＋幹細胞集団およびｈＥＳＣがいずれも興味深く独特のガレクチン発現プロファイルを有し、そのためガレクチンリガンド親和性プロファイルが異なることを示している（Ｈｉｒａｂａｙａｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，　２００２）。この結果はさらに、これらの幹細胞中での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。

【０６４８】

実施例１３

幹細胞の免疫組織化学的染色

ＰＢＳでの洗浄の後、幹細胞培養物／セクションをＰＢＳ中の３％高純度ＢＳＡ中にて室温で３０分間インキュベートして非特異的結合部位をブロックした。一次抗体（ＧＦ２７９、２８８、２８７、２８４、２８５、２８３、２８６、２９０、および２８９）を１％ＢＳＡ‐ＰＢＳ含有ＰＢＳ中に希釈し（１：１０）、室温で1時間インキュベートした。ＰＢＳで3回洗浄した後、セクションをビオチン化ラビット抗マウス二次抗体（Ｚｙｍｅｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）とともにＰＢＳ中、室温で３０分間インキュベートし、ＰＢＳ中で洗浄し、ＰＢＳ中に希釈したペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン（Ｚｙｍｅｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）とともにインキュベートした。このセクションは最終的にはＡＥＣ基質（３‐アミノ‐９‐エチルカルバゾール；Ｌａｂ Ｖｉｓｉｏｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｆｒｅｍｏｎｔ，ＣＡ，ＵＳＡ）で発色される。水での洗浄の後、マイヤーヘマトキシリン溶液で対比染色を実施する。

【０６４９】

免疫染色のための抗体、その抗原／エピトープ、およびコード

製造元コード	製造者	クローン	特異性	コード	標的構造	ホスト/アイソタイプ
MAB-S206 (グロボ-H)	Glycotope	A69-A/E8	グロボ-H	GF288	Fucα2Galβ3GalNAcβ3GalαLacCer	マウス/IgM
MAB-S201 CD174 (Lewis y)	Glycotope	A70-C/C8	CD174 (Lewis y)	GF289	Fucα2Galβ4(Fucα3)GlcNAc	マウス/IgM
MAB-S204 Ｈ２型	Glycotope	A51-B/A6	Ｈ２型	GF290	Fucα2Galβ4GlcNAc	マウス/IgA
DM3122: 0.1 mg (Lewis b)	Acris	2-25LE	Lewis b	GF283	Fucα2Galβ3(Fucα4)GlcNAc	マウス/IgG
DM3015: 0.15 mg	Acris	B393	Ｈ２型	GF284	Fucα2Galβ4GlcNAc	マウス/IgM
DM3014: 0.15 mg	Acris	B389	Ｈ２型，Le b, Ley	GF285	Fucα2Galβ4GlcNAc, Fucα2Galβ3(Fucα4)GlcNAc, Fucα2Galβ4(Fucα3)GLcNAc	マウス/IgG1
BM258P: 0.2 mg	Acris	BRIC 231	Ｈ２型	GF286	Fucα2Galβ4GlcNAc	マウス/IgG1
ab3355 (血液型抗原 H1)	Abcam	17-206	Ｈ１型	GF287	Fucα2Galβ3GlcNAc	マウス/IgG3
ab3352 (pLN)	Abcam	K21	Lewis c Gb3GN	GF279	Galβ3GlcNAcβ(3Lac)	マウス/IgM

【０６５０】

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

抗体

免疫染色

通常の造血細胞を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１０～１５分間固定し、次いでＰＢＳで３回５分間洗浄する。非特異的結合部位を３％ ＨＳＡ‐ＰＢＳ（ＦＲＣ Ｂｌｏｏｄ Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｆｉｎｌａｎｄ）で３０分間、ＲＴでブロックする。一次抗体を１％ ＨＳＡ‐ＰＢＳ（１：１０～１：２００）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分間洗浄する。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する。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）に封入する。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フィルターとともに観察した。像をＺｅｉｓｓ ＡｘｉｏＣａｍ ＭＲ

ｃ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。

【０６５１】

蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）分析

継代１２における増殖中ＳＣ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る。抗体標識の前に、細胞を２回、０．３％ ＨＳＡ‐ＰＢＳ溶液で洗浄する。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による洗浄の後、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う。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する。細胞をＢＤ ＦＡＣＳＡｒｉａ（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）により、波長４８８のＦＩＴＣ検出器を用いて分析する。結果をＢＤ ＦＡＣＳＤｉｖａソフトウェア バージョン５．０．１（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）により分析する。

【０６５２】

免疫染色に用いた抗体、その抗原／エピトープ、およびコードの例

コード	抗原	ホスト	稀釈 IHC	分類	製造者	カタログ番号
GF274	L-セレクチン(CD34, GlyCAM-1, MAdCAM-1), と関連性の高いPNAd(末梢リンパ節アドレシン; CD62Lリガンド)、スルホムチン	ラット抗マウス	5-20 µg/ml	IgM, κ	BD Pharmingen	553863
GF275	CA15-3 (癌抗原15-3; MUC-1糖タンパク質シアル化炭水化物エピトープ)	マウス抗ヒト		IgG1	Acris Antibodies	BM3359
GF276	癌胎児性抗原、腫瘍関連糖タンパク質 (TAG-72)またはCA 72-4	マウス抗ヒト	1:20-1:50	IgG1	Acris Antibodies	DM288
GF277	ヒト シアロシル-Tn抗原 (STn, sCD175)	マウス抗ヒト	1:50-1:100 (4-8 µg/ml)	IgG1	Acris Antibodies	DM3197
GF278	ヒト Tn 抗原 (Tn, CD175 B1.1)	マウス抗ヒト	1:50 (4 µg/ml)	IgM	Acris Antibodies	DM3218

コード	抗原	ホスト	稀釈 IHC	分類	製造者	カタログ番号
GF295	血液型抗体前駆体(BG1), Lewis c Gb3GN (pLN)	マウス抗ヒト	01:40	IgM	Abcam	ab3352
GF280	TF-抗原アイソフォーム (Nemod TF2)	マウス抗-?		IgM		MAB-S301
GF281	TF-抗原アイソフォーム (A68-E/E3)	マウス抗-?		IgG1		MAB-S305
GF296	アシアロガングリオシド GM1	ラビット抗ウシ	1:100-1:400 ELISA	ポリクローナル	Acris Antibodies	BP282
GF297	グロボシド GL4	ラビット抗複数種	1:50-1:100 ELISA	ポリクローナル IgG	Abcam	ab23949
GF298	ヒトCD77(=血液型物質pk), GB3	ラット抗ヒト		IgM	Acris Antibodies	SM1160P
GF299	フォルスマン抗原,スフィンゴ糖脂質(FO GSL)分化ag	ラット抗マウス(ヒト??)	1:100-1:1000	IgG	Acris Antibodies	BM4091
GF300	アシアロGM2	ラビット抗ウシ	1:100-1:400 ELISA	ポリクローナル	Acris Antibodies	BP283

コード	抗原	ホスト	稀釈 IHC	分類	製造者	カタログ番号
GF301	Lewis b 血液型抗原	マウス抗ヒト		IgG1	Acris Antibodies	SM3092P
GF302	H 2型血液型抗原	マウス抗ヒト		IgM	Acris Antibodies	DM3015
GF303	血液型H1(O) 抗原(BG4)	マウス抗ヒト		IgG3	Abcam	ab3355
GF288	グロボ-H	マウス抗-?		IgM		MAB-S206

コード	抗原	ホスト	稀釈 IHC	分類	製造者	カタログ番号
GF304	Lewis a	マウス抗ヒト		IgG1	Chemicon int.	CBL205
GF305	Lewis x, CD15, 3-FAL, SSEA-1, 3-フコシル-N-アセチルラクトサミン	マウス抗ヒト		IgM	Chemicon int.	CBL144
GF306	シアリル Lewis a	マウス抗ヒト	01:40	IgG1	Chemicon int.	MAB2095
GF307	シアリル Lewis x	マウス抗ヒト	01:40	IgM	Chemicon int.	MAB2096

コード	抗原	ホスト	稀釈 IHC	分類	製造者	カタログ番号
GF353	SSEA-3 (ステージ特異的胎児抗原-3)	ラット抗マウス／ヒト	10-20 µg/ml	IgM	Chemicon int.	MAB4303
GF354	SSEA-4 (ステージ特異的胎児抗原-4)	マウス抗ヒト	10-20 µg/ml	IgG3	Chemicon int.	MAB4304
GF355	ガラクトース-a(1,3)ガラクトース	ヒヒ抗ブタ／ラット	1:500	血清	Chemicon int.	AB2052
GF365	Nemod TF1, DC176, GalB1-3GalNAc	マウス抗ヒト		IgM, k	Glycotope	Lot 31-2006

【０６５３】

実施例１４

臍帯血単核球Ｎ－グリカンのグリコシダーゼプロファイリング

実験手順

エキソグリコシダーゼ消化

中性Ｎ－グリカン画分を臍帯血単核球集団から上述のようにして単離した。エキソグリコシダーゼ反応は、実質的に製造元の説明書および（Ｓａａｒｉｎｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，

１９９９）の記載に従って実施した。各種反応物は；α‐Ｍａｎ：タチナタマメ（Ｃ．ｅｎｓｉｆｏｒｍｉｓ；Ｓｉｇｍａ，　ＵＳＡ）からのα‐マンノシダーゼ；β１，４‐Ｇａｌ：Ｓ．　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（大腸菌における組み換え体；Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ，　ＵＳＡ）からのβ１，４‐ガラクトシダーゼ；β１，３‐Ｇａｌ：組み換えβ１，３‐ガラクトシダーゼ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ，　ＵＳＡ）；β‐ＧｌｃＮＡｃ：Ｓ．　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ，　ＵＳＡ）からのβ‐グルコサミニダーゼ；α２，３‐ＳＡ：Ｓ．　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ，　ＵＳＡ）からのα２，３‐シアリダーゼであった。分析反応は合成オリゴ糖を平行コントロール反応に用いて特異性を注意深く制御し、ＭＡＬＤＩ‐ＴＯＦ質量分析により分析した。α２，３‐ＳＡのシアル酸結合特異性は、合成オリゴ糖を平行コントロール反応に用いて制御し、この反応条件では酵素はα２，３‐結合シアル酸は加水分解するがα２，６‐結合シアル酸は加水分解しないことが確認された。分析は前述の実施例に記載のようにＭＡＬＤＩ‐ＴＯＦ質量分析によって実施した。消化の結果は、反応前後のグリカンプロファイルを比較することによって分析した。

【０６５４】

結果

中性Ｎ‐グリカンのグリコシダーゼプロファイリング

臍帯血単核球由来のアフィニティ精製されたＣＤ３４＋、ＣＤ３４－、ＣＤ１３３＋、ＣＤ１３３－、Ｌｉｎ＋、およびＬｉｎ－細胞試料からの中性Ｎ‐グリカン画分を上述のようにして単離した。このグリカン試料を実験手順の項で述べた平行グリコシダーゼ消化に掛けた。プロファイリングの結果を表１１（ＣＤ３４＋およびＣＤ３４－細胞）、表１２（ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞）、および表１３（Ｌｉｎ－およびＬｉｎ＋細胞）にまとめる。本結果は、いくつかの中性Ｎ‐グリカンシグナルがすべてのエキソグリコシダーゼに対して個々に感受性を有することを示しており、このことは、すべての細胞型においていくつかの中性Ｎ‐グリカンがその非還元末端に特異的な基質グリカン構造を含むことを示唆している。この結果はさらに、上記に挙げた表に詳細に示すように、各酵素に対する個々のグリカンシグナルの感受性およびプロファイル全体の両方が細胞型間で明らかに相違していることも示している。

【０６５５】

シアル化Ｎ‐グリカンのグリコシダーゼプロファイリング

臍帯血単核球由来のアフィニティ精製されたＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞試料からのシアル化Ｎ‐グリカン画分を上述のようにして単離した。このグリカン試料を実験手順の項で述べた平行グリコシダーゼ消化に掛けた。α２，３‐シアリダーゼによるプロファイリングの結果を表１４に示す。結果は、反応の結果得られたシアル化および中性グリカン画分において、分析した細胞型のグリカンプロファイルの間で著しい相違が存在することを示している。本結果は、相違が複数のシグナルでプロファイル全体にわたって見られることを示している。さらに、以下で考察するように、個々のシグナルは細胞型間で異なっている。

【０６５６】

臍帯血ＣＤ１３３$^{+}$およびＣＤ１３３$^{-}$細胞Ｎ‐グリカンが差異的にα２，３‐シアル化される。実験手順の項で述べたように、臍帯血ＣＤ１３３$^{+}$およびＣＤ１３３$^{-}$細胞からのシアル化Ｎ‐グリカンをα２，３‐シアリダーゼで処理し、その後得られたグリカンをシアル化および非シアル化画分に分離した。α２，３‐シアリダーゼ耐性および感受性シアル化Ｎ‐グリカンの両方が観察され、すなわち、シアリダーゼ処理の後、シアル化グリカンがシアル化Ｎ‐グリカン画分中に、脱シアル化グリカンが中性Ｎ‐グリカン画分中に観察された。この結果は、臍帯血ＣＤ１３３$^{+}$およびＣＤ１３３$^{-}$細胞が差異的にα２，３‐シアル化されることを示している。例えば、α２，３‐シアリダーゼ処理の後、ＮｅｕＡｃ$_{1}$Ｈｅｘ$_{5}$ＨｅｘＮＡｃ$_{4}$ｄＨｅｘ$_{1}$の［Ｍ－Ｈ］$^{-}$イオンに対応するｍ／ｚ　２０７６におけるモノシアル化（ＳＡ$_{1}$）グリカンシグナルおよびＮｅｕＡｃ$_{2}$Ｈｅｘ$_{5}$ＨｅｘＮＡｃ$_{4}$ｄＨｅｘ$_{1}$の［Ｍ－Ｈ］$^{-}$イオンに対応するｍ／ｚ　２３６７におけるジ

シアル化（SA_2）グリカンシグナルの相対比率は、α２，３‐シアリダーゼ耐性モノシアル化Ｎ‐グリカンと比較した場合、α２，３‐シアリダーゼ耐性ジシアル化Ｎ‐グリカンがＣＤ１３３$^+$よりもＣＤ１３３$^-$細胞中で相対的に豊富であることを示している。特にα２，６‐シアル化等の他のシアル酸結合に対してＮ‐グリカンα２，３‐シアル化は、臍帯血ＣＤ１３３$^-$細胞よりもＣＤ１３３$^+$細胞中に豊富であると結論付けられる。

【０６５７】

臍帯血ＣＤ１３３$^-$細胞中において、α２，３‐シアリダーゼ処理に対して耐性を示すいくつかのシアル化Ｎ‐グリカンが観察され、すなわち、元のシアル化グリカンの脱シアル化された形態に対応する中性グリカンは観察されなかった。臍帯血ＣＤ１３３$^+$およびＣＤ１３３$^-$細胞の間で個々のＮ‐グリカン構造が差異的にα２，３‐シアル化されることを明らかにした結果を表１４に示す。本結果は、他のシアル酸結合に対してＮ‐グリカンα２，３‐シアル化は、臍帯血ＣＤ１３３$^-$細胞よりもＣＤ１３３$^+$細胞中に豊富であることを示している。

【０６５８】

シアリダーゼ分析

臍帯血単核球集団（ＣＢ　ＭＮＣ）から単離されたシアル化Ｎ‐グリカン画分を前述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。ＣＢ　ＭＮＣ集団の中性および脱シアル化（元シアル化）Ｎ‐グリカン画分のグリカンプロファイルを組み合わせたものを作製した。このプロファイルは、（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。およそ２５％のＮ‐グリカンシグナルが高マンノース型Ｎ‐グリカン単糖組成に、２８％が低マンノース型Ｎ‐グリカンに、３４％が複合型Ｎ‐グリカンに、および１３％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。

【０６５９】

結論

本結果により、１）グリコシダーゼプロファイリング法を用いて個々のグリカンシグナルの構造的特徴ならびに細胞型間の個々のグリカンの相違を分析することができること、２）異なる細胞型は、個々のグリカンシグナルおよびグリカンプロファイルの両方のグリコシダーゼに対する感受性に関して互いに異なること、ならびに、３）グリコシダーゼプロファイリングを異なる細胞型を区別するさらなる方法として用いることができ、その場合の比較のためのパラメータは個々のシグナルおよびプロファイル全体の相違の両方であること、が示される。

【０６６０】

実施例１５

式（Ｉ）のグリカン構造を発現する幹細胞の濃縮

ＦＡＣＳ分析を実質的にＶｅｎａｂｌｅ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）に記載のようにして実施するが、代わりに生存細胞を用い、ＦＡＳＣＡｒｉａ（商標）セルソーター（ＢＤ）を用いる。

【０６６１】

ヒトＨＳＣを、コラゲナーゼ、および細胞剥離液（ｃｅｌｌ　ｄｉｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ）（Ｓｉｇｍａ）または細胞の機械的な遊離またはＶｅｒｓｅｎｅを用いて採取し、単細胞懸濁液とする。次に細胞を10^6細胞ずつに小分けにして滅菌チューブに入れ、１：１００溶液中のＧＦ抗体の１つで染色する。細胞をＰＢＳで３回洗浄し、次に二次抗体（抗ヤギマウスＩｇＧまたはＩｇＭ　ＦＩＴＣ結合）で染色する。未染色ＨＳＣをコントロールとして用いる。ＦＩＴＣ陽性細胞を細胞培地へ回収する（＋４℃にて）（ＢＤの説明書に従う）。

【０６６２】

次に、細胞をＣＦＵアッセイまたは他の細胞培地上へ配置し、クローンまたは細胞系列のモニタリングを行う。未分化段階の確認のため、ソートした細胞の遺伝子発現をリアルタイムＰＣＲで分析する。

【０６６３】

あるいは、ＦＡＣＳで濃縮した細胞をゼラチン上で自然発生的に分化させる。免疫組織化学的分析を各種組織特異的抗体を用いてＭｉｋｋｏｌａ ｅｔ ａｌ．（２００６）に記載のようにして実施するか、またはＰＣＲで分析する。

【０６６４】

実施例１６

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ーを使用し、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、クロマトグラフィー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）の造血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、本発明によるものであり前記の細胞と結合する抗体またはレクチン等の他の結合剤が挙げられる。

【０６６５】

次に、単離された糖ペプチドを固定化抗体（例えばＡｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ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１００～１０００ｍＭ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５００～１０００ｍＭ 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。

【０６６６】

別の方法においては、糖ペプチドを結合剤アフィニティークロマトグラフィーによる単一のアフィニティークロマトグラフィー工程により単離し、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ークロマトグラフィーは、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ークロマトグラフィーで置き換えられる。

【０６６７】

実施例１７

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１７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。

【０６６８】

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。

【０６６９】

実施例１８

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‐酢酸バッファー、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ー法を用いて精製し、先の実施例に記載のようにＭＡＬＤＩ‐ＴＯＦ質量分析で分析した。

【０６７０】

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。

【０６７１】

細胞グリカン型による結果

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。

【０６７２】

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。

【０６７３】
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。
【０６７４】
ｈＥＳＣスフィンゴ糖脂質グリカン
　ｈＥＳＣ中性スフィンゴ糖脂質グリカンの主要な消化産物はｍ／ｚ　５６８（$Hex_2HexNAc_1$）および７１４（$Hex_2HexNAc_1dHex_1$）のシグナルであり、非フコシル化およびフコシル化ポリ‐ＬａｃＮＡｃ配列の存在を示している。さらに、ｍ／ｚ　１４２８（$Hex_3HexNAc_3dHex_2$）および１２８２（$Hex_3HexNAc_3dHex_1$）のシグナルが産物であり、上述の細胞型とは異なる非還元末端ＨｅｘＮＡｃを有するグリカン末端配列の存在を示している。主要な感受性シグナルは、ｍ／ｚ　７３０、８７６、９３３、１０９５、および１２４１のシグナルであり、上記のＣＢ　ＭＮＣと類似に解釈される。
【０６７５】
　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。
【０６７６】
実施例１９
固定化結合剤による臍帯血単核球の選択および結合剤と合わせてのその細胞の培養
材料および方法
レクチンをコーティングしたダイナビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ）の作製
　レクチンをコーティングした微粒子が造血幹細胞（ＨＳＣ）と結合する能力を研究するために、本願発明者らはダイナビーズ（登録商標）Ｍ‐２８０ストレプトアビジンダイナビーズ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，　Ｄｙｎａｌ）を用い、これをビオチン化レクチン分子でコーティングした。ビーズを製造元の説明書に従ってＰＢＳ‐０．１％ＢＳＡで洗浄した。ビオチン化レクチン１０μｇを１ｍｇのダイナビーズ粒子とともに室温にて３０分間ゆっくり回転させながらインキュベートした。コーティングしたビーズを次に０．１％ＢＳＡ‐ＰＢＳで３回洗浄し、細胞結合アッセイに用いた。
　Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ型マイクロチューブ用Ｄｙｎａｌ　ＭＰＣ‐Ｅ磁気粒子濃縮機（Ｍａｇｎｅｔｉｃ　Ｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ）（Ｄｙｎａｌ　ＡＳ，Ｎｏｒｗａｙ）を用いて回収した。
【０６７７】
ＭＮＣのＬｉｎ－集団の分離
　ＳｔｅｍＳｅｐヒト前駆細胞濃縮カクテル（Ｈｕｍａｎ　Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ　Ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ　ｃｏｃｔａｉｌ）（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いてＬｉｎ陰性細胞集団をＣＢ単核球から分離した。７５０００００細胞／ｍｌを０．５％ＢＳＡ‐ＰＢＳで懸濁させた。Ｌｉｎヒト前駆細胞濃縮カクテルをこの懸濁液に添加し、室温で１５分間インキュベートした。インキュベーションの後、磁性ビーズを細

胞懸濁液と混合し、室温でさらに１５分間インキュベートした。
【０６７８】
Ｍｉｌｔｅｎｙｉ ＬＤ磁気カラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を用い、製造元の説明書に従ってＬｉｎ－細胞を分離した。
【０６７９】
培養用にＬｉｎ－細胞を１００００細胞／１０μｇダイナビーズの希釈率でレクチンコーティング粒子により懸濁させた。
【０６８０】
臍帯血由来単核球のレクチンコーティングダイナビーズへの結合
Ｆｉｃｏｌｌ‐Ｈｙｐａｑｕｅ液を用いた密度勾配遠心分離によって過去に単離された凍結臍帯血（ＣＢ）単核球（ＭＮＣ）画分を用いてレクチンコーティング微粒子の結合能を調べた。解凍したＣＢ ＭＮＣ細胞を０．１％ＢＳＡ‐ＰＢＳ‐２ｍＭ ＥＤＴＡで希釈し、レクチンコーティングビーズ（ダイナビーズ（登録商標）Ｍ‐２８０ストレプトアビジンダイナビーズ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ビオチン化レクチンでコーティング、ＥＹ ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ， Ｉｎｃ． Ｓａｎ Ｍａｔｅｏ， ＣＡ， ＵＳＡ，ｗｗｗ．ｅｙｌａｂｓ．ｃｏｍ）により、６．３ｘ１０^{6}単核球／１００μｇレクチンコーティングビーズの希釈率で懸濁させた。未コーティングビーズをコントロールとして用いた。細胞を磁性ビーズとともに＋６℃でゆっくり回転しながら１時間インキュベートした。インキュベーションの後、未結合細胞を上清として回収し、ダイナビーズを０．１％ＢＳＡ‐ＰＢＳで２回洗浄した。細胞が結合したダイナビーズをＤｙｎａｌ ＭＰＣ‐Ｅ磁気粒子濃縮機を用いて回収した。未結合およびダイナビーズ結合細胞の両方の数をＢｕｒｋｅｒ Ｃｈａｍｂｅｒにて算出した。
【０６８１】

表．結合アッセイに用いたビーズ上に固定化されたレクチン

GF 707 PNA, ピーナッツ凝集素	GF 711 NPA,
GF 708 DBA, Dolichos biflorus 凝集素	GF 712 STA, Solanum tuberosum 凝集素
GF 709 LTA, Lotus tetragonolobus 凝集素	GF 713 UEA, Ulex europaeus 凝集素
GF 710 MAA, Maackia amuriensis 凝集素	対照、ビーズ上にレクチンなし

【０６８２】
フローサイトメトリー分析
レクチンコーティングビーズまたはコントロールビーズに結合したＭＮＣ細胞をＰＢＳで洗浄し、室温にて５分間６００ｘｇで遠心分離に掛けた。細胞のペレットを０．３％ＢＳＡ‐ＰＢＳで２回洗浄し、６００ｘｇで遠心分離に掛け、０．３％ＢＳＡ‐ＰＢＳ中に再懸濁させた。細胞を、コニカルチューブ中に１０００００細胞ずつに小分けにして入れた。小分けした細胞を抗体（下記表）とともに、２μｌ／１０^{5}細胞の希釈率にて＋４℃で３０分間暗所でインキュベートした。インキュベーションの後、細胞を０．３％ＢＳＡ‐ＰＢＳで洗浄し、遠心分離に掛け、０．３％ＢＳＡ‐ＰＢＳ中に再懸濁させた。
非標識細胞、レクチンコーティングビーズに結合しなかった細胞、およびビーズなしの細胞も分析した。抗体の結合はフローサイトメトリー（ＦＡＣＳＡｒｉａ，Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）で検出した。データ分析はＦＡＣＳＤｉｖａ（商標）フローサイトメトリーソフトウェア バージョン５．０２によって行った。
【０６８３】

表．MNC画分の分析に用いた抗体

CD 34	FITC
CD 133	PE
CD 90	PE-Cy5
CD 3	FITC
CD 14	FITC

【０６８４】

表．結合アッセイに用いたビーズ上に固定化されたレクチン

GF 707 PNA, ピーナッツ凝集素	GF 711 NPA,
GF 708 DBA, Dolichos biflorus 凝集素	GF 712 STA, Solanum tuberosum 凝集素
GF 709 LTA, Lotus tetragonolobus 凝集素	GF 713 UEA, Ulex europaeus 凝集素
GF 710 MAA, Maackia amuriensis 凝集素	対照、ビーズ上にレクチンなし

【０６８５】

結果

種々の量のＭＮ細胞がレクチンコーティングビーズに結合し、ＧＦ７１０には細胞の９０％、ＧＦ７１１には約１１％が結合し、他の分子には実質的な量が結合したが細胞の５％未満であった、表１９。レクチンコーティングのないダイナビーズは単核球とは結合しなかった。

レクチンコーティングダイナビーズと結合したＭＮＣは、ＣＤ３４、ＣＤ９０、ＣＤ１３３、ＣＤ３、およびＣＤ１４に対する抗体で染色し、ＦＡＣＳＡｒｉａで分析した。これらの結果に基づいて、本願発明者らはレクチンコーティング粒子が特定の均質な細胞集団を濃縮するとは言えないが、レクチンコーティング粒子と結合した細胞集団はコントロール集団（天然細胞およびビーズと結合しなかった細胞）よりもＣＤ３４およびＣＤ１３３に対してよりポジティブであると思われる。

【０６８６】

ＧＦ７１１でコーティングされたビーズとともにＭＮＣを図１７のパネルＡに示す。他の実施例のように標準的な方法によってＣＢ　ＭＮＣから選択された系列陰性細胞は、レクチンコーティングビーズ、例えばＧＦ７１０、と結合した、図１７Ｂ。実施例で述べるように標準的な方法によってＣＢ　ＭＮＣ細胞から作製されたＬｉｎ陰性細胞。

【０６８７】

実施例２０

実験手順

臍帯血からの単核球（ＭＮＣ）の抽出

ヒト出産臍帯血（ＣＢ）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ＣＢを採取後２４時間以内に処理した。該ＣＢ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（４００ｘｇ／４０分間）を行って、単核球（ＭＮＣ）を各ＣＢ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。

【０６８８】

抗グリコホリンＡ（抗ＣＤ２３５ａ）結合磁性マイクロビーズによる赤血球前駆体の除去

ＭＮＣ（10^7）を８０μｌの０．５％超高純度ＢＳＡ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ‐ＰＢＳバッファー中に懸濁させた。抗ＣＤ２３５ａ（グリコホリンａ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）結合磁性マイクロビーズを用い、10^7細胞あたり２０μｌの磁性マイクロビーズ懸濁液を添加して４℃で１５分間インキュベートすることにより、赤血球前駆体を除去

した。細胞懸濁液を10^7細胞あたり1～2mlのバッファーで洗浄し、続いて300xgで10分間遠心分離に掛けた。細胞を1.25x10^8細胞／500μlのバッファーで再懸濁させた。MACS LDカラム（Miltenyi Biotec）を磁場に配置し、2mlのバッファーで洗浄した。細胞懸濁液をカラムに適用し、通過した細胞を回収した。カラムを1mlのバッファーで2回洗浄し、すべての流出液を回収した。細胞を300xgで10分間遠心分離に掛け、10mlのバッファーに再懸濁させた。合計で8ユニットのCBを次の抗体染色に用いた。

【0689】

抗グリカン抗体による染色

MNCをFACSチューブへ小容量、すなわち0.5x10^6細胞／500μl 0.3%超高純度BSA（Sigma）、2mM EDTA-PBSバッファーで分注した。10マイクロリットルの一次抗体（一次抗体のリストを表22に示す）を細胞懸濁液に添加し、ボルテックスし、細胞を30分間室温でインキュベートした。細胞を2mlのバッファーで洗浄し、5分間500xgで遠心分離した。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）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バッファー中に希釈し、200μl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のバッファーで洗浄し、5分間500xgで遠心分離した。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。

【0690】

PE-結合抗CD34抗体による二重染色

抗グリカン抗体での染色の後、PE-結合抗CD34抗体（BD Biosciences）による二重染色を実施した。細胞を500μlのバッファー中に懸濁させ、10μlの抗CD34抗体を添加し、暗所にて＋4℃で30分間インキュベートした。インキュベーションの後、細胞を2mlのバッファーで洗浄し、500xgにて5分間遠心分離した。上清を除去して細胞を300μlのバッファーに懸濁させ、暗所にて4℃で一晩保存した。

【0691】

フローサイトメトリー分析

翌日、細胞をフローサイトメーターBD FACSAria（BD Biosciences）により、FITCおよびPE検出器を用いて分析した。各抗グリカン抗体に対しておよそ250000～3000000個の細胞が計数された。データをBD FACSDivaソフトウェア バージョン5.0.2（BD Biosciences）により分析した。

【0692】

結果および考察

CB-HSCのFACS分析の結果を図15および表21に示し、抗体を表22に示す。いくつかのグリカン構造、例えばTn、TF、Lewis x、およびシアリルLewis xは、成熟赤血球（CD34－）と比較してHSC（CD34＋）の方が豊富である。このことは同一のエピトープに対するいくつかの抗グリカン抗体で見られ、異なるCBユニット間でも見られた。別々のCBユニット間での抗Lex抗体での変動が最も大きかった。成熟赤血球（CD34－）で豊富であったグリカン構造はアシアロGM1、アシアロGM2、グロボシドGL4、およびLewis aであった。

【0693】

実施例21

実験手順

臍帯血からの単核球（MNC）の抽出

ヒト出産臍帯血（CB）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ＣＢを採取後２４時間以内に処理した。該ＣＢ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（４００ｘｇ／４０分間）を行って、単核球（ＭＮＣ）を各ＣＢ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。

【０６９４】

フルオレセリン（ＦＩＴＣ）‐結合レクチンによる染色

ＭＮＣをＦＡＣＳチューブへ小容量、すなわち０．５ｘ１０^{6}細胞／５００μｌ ０．３％超高純度ＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ）、２ｍＭ ＥＤＴＡ‐ＰＢＳバッファーで分注した。１０マイクロリットルのＦＩＴＣ‐結合レクチン（表２０）を細胞懸濁液に添加し、ボルテックスし、細胞を３０分間室温でインキュベートした。細胞を２ｍｌのバッファーで洗浄し、５分間５００ｘｇで遠心分離した。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。

【０６９５】

ＰＥ‐結合抗ＣＤ３４抗体による二重染色

ＦＩＴＣ‐結合レクチンでの染色の後、ＰＥ‐結合抗ＣＤ３４抗体（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）による二重染色を実施した。細胞を５００μｌのバッファー中に懸濁させ、１０μｌの抗ＣＤ３４抗体を添加し、暗所にて＋４℃で３０分間インキュベートした。インキュベーションの後、細胞を２ｍｌのバッファーで洗浄し、５００ｘｇにて５分間遠心分離した。上清を除去して細胞を３００μｌのバッファーに懸濁させ、暗所にて４℃で一晩保存した。

【０６９６】

フローサイトメトリー分析

翌日、細胞をフローサイトメーターＢＤ ＦＡＣＳＡｒｉａ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）により、ＦＩＴＣおよびＰＥ検出器を用いて分析した。各抗グリカン抗体に対しておよそ２５００００～３０００００個の細胞が計数された。データをＢＤ ＦＡＣＳＤｉｖａソフトウェア バージョン５．０．２（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）により分析した。

【０６９７】

結果および考察

ＣＢ‐ＨＳＣ（ＣＤ３４＋／－）レクチン染色の結果を表２０および図１４に示す。このデータより、一部の結合剤が造血ＣＤ３４＋幹細胞の濃縮または単離に特に有用であることが明らかになった。

【０６９８】

実施例２２

パーメチル化グリカン構造のフラグメンテーション分析

臍帯血ＣＤ１３３＋およびＣＤ１３３－細胞を回収し、その細胞Ｎ‐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。

【０６９９】

臍帯血ＣＤ１３３＋細胞酸性Ｎ‐グリカンを分析すると、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）。

【０７００】

ｍ／ｚ １５３２．７８（ＮｅｕＡｃＨｅｘ３ＨｅｘＮＡｃ２）から得られたフラグメントは：Ｂ$_{1}$（Ｈ$^{+}$付加イオンによるｍ／ｚ ３７５．６９）、Ｂ$_{3}$／Ｙ$_{5}$またはＢ$_{4}$／Ｙ$_{4}$（Ｎａ$^{+}$付加イオンによるｍ／ｚ ４７１．７９）、Ｙ$_{2}$（ｍ／ｚ ５０３．８８）、Ｙ$_{3}$（ｍ／ｚ ７０７．９９）、Ｂ$_{3}$（ｍ／ｚ ８４７．００）、およびＹ$_{5}$（ｍ／ｚ １１５７．５１）であり、直鎖構造Ｎｅｕａｃ‐［Ｈｅｘ‐ＨｅｘＮＡｃ］‐Ｈｅｘ‐

［Ｈｅｘ‐ＨｅｘＮＡｃ］に対応し、直鎖構造Ｎｅｕａｃ‐Ｈｅｘ‐ＨｅｘＮＡｃ‐Ｈｅｘ‐Ｈｅｘ‐ＨｅｘＮＡｃに相当する可能性があり、より優先的にはＮ‐グリカン構造ＮｅｕＡｃα２‐３／６Ｇａｌβ１‐３／４ＧｌｃＮＡｃβ１‐２Ｍａｎα１‐３／６Ｍａｎβ１‐４ＧｌｃＮＡｃに対応し、ここで、下線部の結合は優先的にはα１‐３である。

【０７０１】

ｍ／ｚ ２１５６．０３（ＮｅｕＡｃＨｅｘ４ＨｅｘＮＡｃ３ｄＨｅｘ）から得られたフラグメントは：$B_{1\alpha}$（H^+付加イオンによるｍ／ｚ ３７５．８６）、$B_{3\alpha}$／$Y_{6\alpha}$（Na^+付加イオンによるｍ／ｚ ４７１．９０）、$B_{3\alpha}$（ｍ／ｚ ８４６．９０）、$Y_{4\alpha}$（ｍ／ｚ １３３１．７１）、および$Y_{6\alpha}$（ｍ／ｚ １７８１．６２）であり、構造ＮｅｕＡｃα２‐３／６Ｇａｌβ１‐３／４ＧｌｃＮＡｃβ１‐２Ｍａｎα１‐３／６（Ｍａｎα１‐６／３）Ｍａｎβ１‐４ＧｌｃＮＡｃβ１‐４（Ｆｕｃα１‐６）ＧｌｃＮＡｃと同一の単糖配列を有する構造に相当し、ここで、下線部の結合は優先的にはα１‐３である。

【０７０２】

ｍ／ｚ ２４３１．１４（ＮｅｕＡｃＨｅｘ５ＨｅｘＮＡｃ４）から得られたフラグメントは：$B_{3\alpha}$／$Y_{6\alpha}$（Na^+付加イオンによるｍ／ｚ ４７１．８７）、$B_{3\alpha}$（ｍ／ｚ ８４６．６５）、$Y_{4\alpha}$／$Y_{3\beta}$（ｍ／ｚ ９３９．０９）、$Y_{6\alpha}$／$Y_{4\beta}$（ｍ／ｚ １５９１．６１）、および$Y_{4\alpha}$／$Y_{6\beta}$（ｍ／ｚ １６０６）であり、構造ＮｅｕＡｃα２‐３／６Ｇａｌβ１‐３／４ＧｌｃＮＡｃβ１‐２Ｍａｎα１‐３／６（Ｇａｌβ１‐３／４ＧｌｃＮＡｃβ１‐２Ｍａｎα１‐３／６）Ｍａｎβ１‐４ＧｌｃＮＡｃβ１‐４ＧｌｃＮＡｃに相当する可能性がある。

【０７０３】

ｍ／ｚ ２６０５．２２（ＮｅｕＡｃＨｅｘ５ＨｅｘＮＡｃ４ｄＨｅｘ）から得られたフラグメントは：$B_{3\alpha}$（Na^+付加イオンによるｍ／ｚ ８４７．４２）および$Y_{4\alpha}$／$Y_{6\beta}$（ｍ／ｚ １７８２．０６）であり、構造ＮｅｕＡｃα２‐３／６Ｇａｌβ１‐３／４ＧｌｃＮＡｃβ１‐２Ｍａｎα１‐３／６（Ｇａｌβ１‐３／４ＧｌｃＮＡｃβ１‐２Ｍａｎα１‐３／６）Ｍａｎβ１‐４ＧｌｃＮＡｃβ１‐４（Ｆｕｃα１‐６）ＧｌｃＮＡｃと同一の単糖配列を有する構造に相当する。

【０７０４】

ｍ／ｚ ２７７９．３（ＮｅｕＡｃＨｅｘ５ＨｅｘＮＡｃ４ｄＨｅｘ２）から得られたフラグメントは：$B_{3\alpha}$（Na^+付加イオンによるｍ／ｚ ８４７．７９）および$B_{6\alpha}$／$Y_{6\alpha}$（ｍ／ｚ １９７０．２１）であり、構造ＮｅｕＡｃα２‐３／６Ｇａｌβ１‐３／４ＧｌｃＮＡｃβ１‐２Ｍａｎα１‐３／６（［Ｆｕｃα１‐２’／３／４］［Ｇａｌβ１‐３／４ＧｌｃＮＡｃβ１‐２］Ｍａｎα１‐３／６）Ｍａｎβ１‐４ＧｌｃＮＡｃβ１‐４（Ｆｕｃα１‐６）ＧｌｃＮＡｃと同一の単糖配列を有する構造に相当する。

【０７０５】

まとめると、本結果は特に、ＣＤ１３３＋細胞Ｎ‐グリカンの次の特異的構造：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、およびシアル化二分岐Ｎ‐グリカンの非シアル化分岐上の非還元末端Ｌｅｘ、に対する直接的な証拠が得られ、本発明による構造的割り当てがさらに確認された。

【０７０６】

臍帯血ＣＤ１３３＋細胞酸性Ｎ‐グリカンを分析すると、以下のグリカンは構造を示唆するシグナルを生成した。

【０７０７】

ｍ／ｚ １５３２．７７（ＮｅｕＡｃＨｅｘ３ＨｅｘＮＡｃ２）から得られたフラグメントは：B_1（H^+付加イオンによるｍ／ｚ ３７５．９５）、B_3／Y_5またはB_4／Y_4（Na^+付加イオンによるｍ／ｚ ４７１．９１）、Y_2（ｍ／ｚ ５０３．８９）、Y_3（ｍ／ｚ ７０８．１３）、B_3（ｍ／ｚ ８４７．１５）、およびY_5（ｍ／ｚ １１５７．５２）であり、構造ＮｅｕＡｃα２‐３／６Ｇａｌβ１‐３／４ＧｌｃＮＡｃβ１‐２Ｍａｎα１‐３／６Ｍａｎβ１‐４ＧｌｃＮＡｃと同一の単糖配列を有する構

造に相当する。

【０７０８】

ｍ／ｚ　２１５６．０１（ＮｅｕＡｃＨｅｘ４ＨｅｘＮＡｃ３ｄＨｅｘ）から得られたフラグメントは：$Ｂ_{3\alpha}$（$Ｎａ^{+}$付加イオンによるｍ／ｚ　８４６．９７）、$Ｙ_{4\alpha}$（ｍ／ｚ　１３３１．２９）、および$Ｙ_{6\alpha}$（ｍ／ｚ　１７８１．９２）であり、構造ＮｅｕＡｃα２‐３／６Ｇａｌβ１‐３／４ＧｌｃＮＡｃβ１‐２Ｍａｎα１‐３／６（Ｍａｎα１‐３／６）Ｍａｎβ１‐４ＧｌｃＮＡｃβ１‐４（Ｆｕｃα１‐６）ＧｌｃＮＡｃと同一の単糖配列を有する構造に相当する。

【０７０９】

ｍ／ｚ　２６０５．３０（ＮｅｕＡｃＨｅｘ５ＨｅｘＮＡｃ４ｄＨｅｘ）から得られたフラグメントは：$Ｂ_{3\alpha}$／$Ｙ_{6\alpha}$（$Ｎａ^{+}$付加イオンによるｍ／ｚ　４７２．２３）および$Ｙ_{4\alpha}$／$Ｙ_{6\beta}$（ｍ／ｚ　１７８０．６０）であり、構造ＮｅｕＡｃα２‐３／６Ｇａｌβ１‐３／４ＧｌｃＮＡｃβ１‐２Ｍａｎα１‐３／６（Ｇａｌβ１‐３／４ＧｌｃＮＡｃβ１‐２Ｍａｎα１‐３／６）Ｍａｎβ１‐４ＧｌｃＮＡｃβ１‐４（Ｆｕｃα１‐６）ＧｌｃＮＡｃと同一の単糖配列を有する構造に相当する。

【０７１０】

ｍ／ｚ　３０５４．５２（ＮｅｕＡｃＨｅｘ６ＨｅｘＮＡｃ５ｄＨｅｘ）から得られたフラグメントは：$Ｂ_{1\alpha}$（$Ｈ^{+}$付加イオンによるｍ／ｚ　３７５．８２）、$Ｂ_{3\alpha}$／$Ｙ_{6\alpha}$（$Ｎａ^{+}$付加イオンによるｍ／ｚ　４７１．９９）、$Ｂ_{3\alpha}$（ｍ／ｚ　８４６．５８）であり、構造ＮｅｕＡｃα２‐３／６｛Ｇａｌβ１‐３／４ＧｌｃＮＡｃβ１‐２Ｍａｎα１‐３／６［Ｇａｌβ１‐３／４ＧｌｃＮＡｃβ１‐２（Ｇａｌβ１‐３／４ＧｌｃＮＡｃβ１‐４）Ｍａｎα１‐３／６］Ｍａｎβ１‐４ＧｌｃＮＡｃβ１‐４（Ｆｕｃα１‐６）ＧｌｃＮＡｃ｝と同一の単糖配列を有する構造に相当する。

【０７１１】

まとめると、本結果から特に、臍帯血細胞Ｎ‐グリカンの次の特異的構造：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、およびシアル化三分岐Ｎ‐グリカンの非シアル化分岐上の非還元末端ＬａｃＮＡｃ、に対する直接的な証拠が得られ、本発明による構造的割り当てがさらに確認された。

【０７１２】

表1. CD133+およびCD133-細胞中のN-グリカンの生合成に関与するグリコシルトランスフェラーゼおよびグリコシダーゼをコードする遺伝子の発現。さらに同一ファミリーのグリコシルトランスフェラーゼおよびグリコシダーゼをコードする遺伝子の名称をそのグリカン型および構造特異性と合わせて示す。

遺伝子発現		遺伝子名	グリカン型	構造特異性
CD133+	**CD133-**			
α-マンノシダーゼ (MAN) ファミリーIおよびII (21,48-54)				
P	P	MAN1A1	N	MANファミリーIに属するα2MAN
P	P	MAN1A2	N	
P	P	MAN1B1	N	
A	**P**	MAN1C1	N	
P	P	MAN2A1	N	MANファミリーIIに属するα3/6MAN
P	P	MAN2A2	N	
P	P	MAN2B1	N	
P	P	MAN2B2	N	
P	P	MAN2C1	N	
N-グリカン分岐β-N-アセチルグルコサミニルトランスファーゼ (MGAT) (17)				
P	P	MGAT1	N	N-グリカン分岐酵素; 図4も参照
P,I	**P**	MGAT2	N	
A	A	MGAT3	N	
P,D	**P**	MGAT4A	N	
P	P	MGAT4B	N	
A	A	MGAT5	N	
*NP	*NP	MGAT6	N	
β1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ (β3GalT) (55-60)				
A	P	B3GALT1	N, O, L	
A	A	B3GALT2	N, O, L	
		B3GALT3	L	グロボシドシンターゼ
		B3GALT4	L	GM1シンターゼ
A	A	B3GALT5	N, O, L	O-グリカンコア3伸長
		B3GALT6	G	GAG GalT2
		B3GALT7	(1	
β1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (β4GalT) (29,61-65)				
P,I	**P**	B4GALT1	N, O, L	ラクトース/N-アセチルラクトサミンシンターゼ
P	**A**	B4GALT2	N, O, L	ラクトース/N-アセチルラクトサミンシンターゼ
P,D	**P**	B4GALT3	N, O, L	
P	P	B4GALT4	N, O, L	6-スルホ-GlcNAc GalT
A	A	B4GALT5	O > N, L	O-グリカンコア2伸長
		B4GALT6	L	ラクトシルセラミドシンターゼ
		B4GALT7	G	GAG GalT1
α2,3-シアリルトランスフェラーゼ (α3SAT) (33,66,67)				
		ST3GAL1	O	O-グリカンコア1シアル化
A	A	ST3GAL2	N, O, L	
A	A	ST3GAL3	N, O, L	1型LacNAcシアル化
A	A	ST3GAL4	N, O, L	2型LacNAcシアル化
		ST3GAL5	L	GM3シンターゼ
P, I	**P**	ST3GAL6	N, O, L	2型LacNAcシアル化
α2,6-シアリルトランスフェラーゼ (α6SAT) 37,52,68-71				
P	P	ST6GAL1	N, O, L	2型LacNAcシアル化
A	A	ST6GAL2	N, O, L	2型LacNAcシアル化
α1,2-/ α1,3-/ α1,4-/ α1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FucT) (18,19,44,72,73,73-80)				
A	A	FUT1	N, O, L	α1,2-FucT (H-2合成)
*NP	*NP	FUT2	N, O, L	α1,2-FucT (分泌型, H-1合成)
A	A	FUT3	N, O, L	α1,3/4-FucT
P	P	FUT4	N, O, L	α1,3-FucT (Lex/sLex合成)
A	A	FUT5	N, O, L	α1,3-FucT (Lex/sLex合成)
A	A	FUT6	N, O, L	α1,3-FucT (Lex/sLex合成)
A	A	FUT7	N, O, L	α1,3-FucT (Lex/sLex合成)
P	**A**	FUT8	N	α1,6-FucT (N-グリカンコアフコシル化)
A	A	FUT9	N, O, L	α1,3-FucT (Lex/sLex合成)

1) 誤ったアノテーションの可能性あり、正しくはB3GNT1のはずである。

略語: A; 発現しなかった遺伝子, P; 遺伝子発現 ; I; CD133+細胞中での発現が増加,

D; CD133+細胞中での発現が減少, *NP; 使用可能なグループなし, N; N-グリカン, O; O-グリカン,

L; スフィンゴ糖脂質 ; G, グリコサミノグリカン

【０７１３】

表2. レクチンを用いた細胞表面グリカンエピトープアッセイ

レクチン	特異性	白血球	幹細胞
PSA	α-マンノース, N-グリカンコア構造	96%	+++
HHA	α-マンノース	99%	+++
GNA	α-マンノース, α1,3-結合マンノース残基に対しては低い	73%	+
PHA-L	β1,6-分岐鎖を有する大型複合型N-グリカン	98%	++
RCA-I	β1,4-結合ガラクトース, 2型LacNAc	91%	+++
SNA	α2,6-結合シアル酸	98%	+++
MAA	2型LacNAc中のα2,3-結合シアル酸	62%	++
LTA	α1,3-結合フコース (Lex)	6%	-
UEA-I	2型LacNAc中のα1,2-結合フコース(H-2)	53%	+++

【０７１４】

表3. 中性N-グリカンの違いに関する分析

組成[1]	m/z[2]	型[3]	倍数[4]
+++ CD133+[5]			
H2N3	974	H	+∞
H4N5	1704	CT	+∞
++ CD133+			
H3N5	1542	CT	1,91
H5N4F3	2101	CE	1,91
H4N4F1	1647	CF	1,76
H3N5F1	1688	CFT	1,55
H1N2F1	755	LF	1,50
+ CD133+			
H3N3F2	1428	HE	1,49
H2N3F1	1120	HF	1,46
H5N4F2	1955	CE	1,36
H4N4F2	1793	CE	1,34
H5N3F2	1752	HE	1,33
H5N2	1257	M	1,30
H4N3F2	1590	HE	1,27
H5N4F1	1809	CF	1,22
H5N3F1	1606	HF	1,21
H4N3F1	1444	HF	1,21
H6N2F1	1565	MF	1,19
H9N2	1905	M	1,18
H8N2	1743	M	1,12
H3N3F1	1282	HF	1,08
H6N3F1	1768	HF	1,05
H5N2F1	1403	MF	1,03
H4N5F3	2142	CET	1,03
H6N5	2028	CR	1,02
H6N5F1	2174	CFR	1,01

組成	m/z	型	倍数
+ CD133-			
H3N4F1	1485	CFT	-1,02
H4N2	1095	L	-1,03
H10N2	2067	MG	-1,03
H7N2	1581	M	-1,05
H6N2	1419	M	-1,07
H2N2F1	917	LF	-1,10
H6N3	1622	H	-1,18
H4N2F1	1241	LF	-1,19
H5N4	1663	C	-1,40
H5N3	1460	H	-1,41
++ CD133-			
H3N2F1	1079	LF	-1,53
H2N2	771	L	-1,54
H3N2	933	L	-1,56
H3N3	1136	H	-1,63
H4N3	1298	H	-1,67
H1N2	609	L	-1,77
+++ CD133-			
H5N5	1866	CT	-∞

[1] 提案された組成であり、ここで単糖を表す記号は: H, Hex; N, HexNAc; F, dHex。
[2] [M+Na]+に対するm/zの算出値であり、端数を切り捨てて次の整数へ丸めた値。
[3] N-グリカン型を表す記号は: M, 高マンノース型; L, 低マンノース型; H, ハイブリッド型または単分岐; C, 複合型; O, その他の型; F, フコシル化; E, 複合フコシル化、ここで少なくとも1つのフコース残基がα1,2-, α1,3-またはα1,4-結合; R, 大型複合型; G, グルコシル化; T, 非還元末端HexNAc。
[4] 「倍数」は式: 倍数 $= x\left(\frac{P_a}{P_b}\right)^x$, [式中Pはプロファイルaまたはb中のグリカンシグナルの相対存在量(%)であり、xは$P_a \geq P_b$, の場合に1であり、およびxは$a < b$の場合に-1である] により算出される; +∞, CD133+細胞中でのみ検出; -∞, CD133+細胞中では検出されず。
[5] 倍数の算出に基づいたヒト臍帯血単核細胞型との関連性: + 低い関連性, ++ 実質的な関連性, +++ 高い関連性。

【０７１５】

表4. シアル化 N-グリカンの違いに関する分析

組成[1]	m/z[2]	型[3]	倍数[4]
+++ CD133+[5]			
S1H3N3	1403	H	+∞
S1H4N3F1P	1791	HFP	+∞
S4H3N3	1856	H	+∞
S3H4N3F1	2293	HF	+∞
S1H7N6F2	2953	CER	+∞
++ CD133+			
S2H5N4	2221	C	1,55
S2H5N4F1	2367	CF	1,53
S1H3N3F1	1549	HF	1,51
+ CD133+			
S1H3N2	1200		1,39
S1H5N4F3	2368	CE	1,35
S1H5N4F2	2222	CE	1,26
S1H5N4	1930	C	1,20
S1H4N4F1	1914	CF	1,13
S1H4N4	1768	C	1,08

組成	m/z	型	倍数
+ CD133-			
S1H5N4F1	2076	CF	-1,02
S1H4N3F1	1711	HF	-1,02
S1H5N3F1	1873	HF	-1,11
S1H4N3	1565	H	-1,20
S2H6N5F1	2732	CFR	-1,22
S2H5N4F4	2806	CE	-1,32
S1H7N6F3	3099	CER	-1,36
S1H5N3	1727	H	-1,43
++ CD133-			
S1H5N5F1	2279	CFT	-1,60
S1H6N3	1889	H	-1,61
S1H6N5F1	2441	CFR	-1,82
+++ CD133-			
S1H7N6F1	2807	CFR	-7,60
S1H5N5	2133	CT	-∞
S1H6N5	2295	CR	-∞
S1H6N5F2	2587	CER	-∞
S1H6N5F3	2733	CER	-∞
S3H6N5F1	3024	CFR	-∞
S2H7N6F1	3098	CFR	-∞
S2H7N6F3	3390	CER	-∞

[1] 提案された組成であり、ここで単糖を表す記号は: S, NeuAc; H, Hex; N, HexNAc; F, dHex; P, SP =硫酸またはリン酸エステル。
[2] [M-H]-イオンに対する m/z の算出値であり、端数を切り捨てて次の整数へ丸めた値。
[3] N-グリカン型を表す記号は: H, ハイブリッド型または単分岐 ; C, 複合型 ; O, その他の型; F,フコシル化; E,複合フコシル化、ここで少なくとも1つのフコース残基が α1,2-, α1,3-または α1,4-結合 ; R, 大型複合型; T,非還元末端 HexNAc 。
[4] 「倍数」は式: 倍数 $= x\left(\frac{P_a}{P_b}\right)^x$, [式中 P はプロファイル a または b 中のグリカンシグナルの相対存在量(%)であり、x は $P_a \geq P_b$, の場合に1であり、および x は $a < b$ の場合に -1 である] により算出される ; +∞, CD133+ 細胞中でのみ検出 ; -∞, CD133+細胞中では検出されず。
[5] 倍数の算出に基づいたヒト臍帯血単核細胞型との関連性 : + 低い関連性 , ++ 実質的な関連性, +++ 高い関連性。

【０７１６】

表5. ヒト臍帯血CD133+細胞中 N-グリカンプロファイルの個別の変動

大きな個別の変動:*
H3N3, H5N3F1, H4N5, H1N2, H1N2F1, H5N5, H5N4F3

実質的な個別の変動:
H4N4F1, H4N2F1

小さい個別の変動:
H3N5F1, H5N4F1, H3N4F1, H10N2, H3N3F1, H2N2, H5N3, H2N2F1, H5N2, H3N2, H3N2F1, H5N2F1, H6N3, H6N2, H4N2, H7N2, H9N2, H8N2, H2N3F1, H3N3F2, H4N3F1, H3N5, H6N2F1, H4N3F2, H5N4, H4N4F2, H5N4F2, H6N5

* 変動の評価は、いくつかの臍帯血ユニットからの一連の個別の CD133+ N-グリカン分析における各グリカンシグナルの平均値からの標準偏差の割合を算出し、その割合を以下のように分類することによって行った: 大、>100%;実質的、50-100%; 小、0-50% 。

【０７１７】

表6. ヒト臍帯血CD133+細胞シアル化N-グリカンプロファイルの個別の変動

大きな個別の変動:*
S2H8N7F3, S1H3N3, S3H7N6F3, S1H3N2 (m/z 1200), S1H3N3F1, S2H6N5F3, S1H8N7F3

実質的な個別の変動:
S1H5N3, S2H6N5F2, S2H7N6F1, S1H6N5, S1H5N4F3, S3H7N6F1, S3H6N5F1

小さい個別の変動:
S1H6N5F2, S1H6N5F3, S1H6N3, S1H5N5F1, S1H4N3F1, S1H4N4F1, S1H4N3, S2H6N5F1, S1H7N6F1, S2H5N4F1, S1H5N4F2, S1H5N3F1, S1H6N5F1, S2H5N4, S1H5N4, S1H4N4, S1H5N4F1, S3H6N5F1P1, S2H7N6F3

10

* 変動の評価は、いくつかの臍帯血ユニットからの一連の個別のCD133+ N-グリカン分析における各グリカンシグナルの平均値からの標準偏差の割合を算出し、その割合を以下のように分類することによって行った：大、>100%;実質的、50-100%;小、0-50%。

【０７１８】

表7. 臍帯血単核細胞シアル化 N-グリカンシグナル。m/z 値は $[M-H]^-$ イオンのモノアイソトピック質量を表す。

提案された単糖組成	m/z (calculated)	
NeuAcHex3HexNAc3dHex	1549,55	1549
NeuAcHex4HexNAc3	1565,55	1565
NeuAc2Hex3HexNAc2dHex	1637,57	1637
NeuAc2Hex2HexNAc3dHex	1678,60	1678
NeuAcHex4HexNAc3dHex	1711,61	1711
NeuAcHex5HexNAc3	1727,60	1727
NeuAcHex3HexNAc4dHex	1752,63	1752
NeuAcHex4HexNAc4	1768,57	1768
NeuAcHex4HexNAc3dHexSO3	1791,56	1791
NeuAc2Hex3HexNAc3dHex	1840,65	1840
NeuAcHex4HexNAc3dHex2	1857,66	1857
Hex5HexNAc4dHexSO3	1865,60	1865
NeuAcHex5HexNAc3dHex	1873,66	1873
NeuAcHex6HexNAc3	1889,65	1889
NeuAcHex3HexNAc4dHex2	1898,69	1898
NeuAcHex4HexNAc4dHex	1914,68	1914
NeuAcHex5HexNAc4	1930,68	1930
NeuAc2Hex4HexNAc3dHex / Hex8HexNAc3SO3	2002,70	2002
NeuAc2Hex5HexNAc3	2018,70	2018
NeuAcHex6HexNAc3dHex	2035,71	2035
NeuAcHex7HexNAc3	2051,71	2051
Hex4HexNAc5dHex2SO3	2052,68	2052
NeuAc2Hex4HexNAc4	2059,72	2059
NeuAcHex4HexNAc4dHex2	2060,74	2060
NeuAcHex5HexNAc4dHex	2076,74	2076
NeuAcHex6HexNAc4	2092,73	2092
NeuAcHex4HexNAc5dHex	2117,76	2117
NeuAcHex5HexNAc5	2133,76	2133
NeuAcHex8HexNAc2dHex / NeuAcHex5HexNAc4dHexSO3	2156,74/ 2156,69	2156
NeuAc2Hex5HexNAc4	2221,78	2221
NeuAcHex5HexNAc4dHex2	2222,80	2222
Hex6HexNAc5dHexSO3	2230,73	2230
NeuAcHex6HexNAc4dHex / NeuGcHex5HexNAc4dHex2	2238,79	2238
NeuAcHex7HexNAc4 / NeuGcHex6HexNAc4dHex	2254,79	2254
NeuAcHex5HexNAc5dHex	2279,82	2279
NeuAc2Hex4HexNAc3dHex3	2294,82	2294
NeuAcHex6HexNAc5	2295,81	2295
NeuAc2Hex5HexNAc4dHex	2367,83	2367
NeuAcHex5HexNAc4dHex3	2368,85	2368
NeuAc2Hex6HexNAc4	2383,83	2383
NeuAcHex6HexNAc4dHex2	2384,85	2384
NeuAc2Hex5HexNAc3dHexSO3	2390,77	2390
NeuAc2Hex3HexNAc5dHex2	2392,86	2392
NeuAcHex5HexNAc5dHex2	2425,87	2425
NeuAcHex6HexNAc5dHex	2441,87	2441
NeuAc2Hex8HexNAc2dHex / NeuAc2Hex5HexNAc4dHexSO3	2447,83 / 2447,79	2447
NeuAcHex7HexNAc5	2457,86	2457
NeuAc2Hex5HexNAc4dHex2	2513,89	2513
NeuAcHex6HexNAc5dHexSO3	2521,83	2521
NeuAcHex6HexNAc4dHex3	2530,91	2530
NeuAc3Hex4HexNAc5	2553,90	2553
NeuAc2Hex5HexNAc5dHex	2570,91	2570
NeuAcHex5HexNAc5dHex3	2571,93	2571
NeuAc2Hex6HexNAc5	2586,91	2586
NeuAcHex6HexNAc5dHex2	2587,93	2587
Hex7HexNAc6dHexSO3	2595,86	2595
NeuAcHex7HexNAc5dHex	2603,92	2603
NeuAcHex6HexNAc6dHex	2644,95	2644
NeuAcHex7HexNAc6	2660,94	2660
NeuAc2Hex4HexNAc5dHex2(SO3)2	2714,83	2714
NeuAc2Hex6HexNAc5dHex	2732,97	2732
NeuAcHex6HexNAc5dHex3	2733,99	2733
NeuAcHex7HexNAc6dHex	2807,00	2807
NeuAcHex6HexNAc5dHex3SO3	2813,94	2813
NeuAc3Hex6HexNAc5	2878,00	2878
NeuAc2Hex6HexNAc5dHex2	2879,02	2879
NeuAcHex6HexNAc5dHex4	2880,04	2880
NeuAc2Hex5HexNAc6dHex2	2920,05	2920
NeuAc2Hex7HexNAc6	2952,04	2952
NeuAcHex7HexNAc6dHex2	2953,06	2953
NeuAcHex7HexNac7dHex	3010,08	3010
NeuAc3Hex6HexNAc5dHex	3024,06	3024
NeuAc2Hex6HexNAc5dHex3	3025,09	3025
NeuAcHex8HexNAc7	3026,08	3026
NeuAc2Hex7HexNAc6dHex	3098,10	3098
NeuAcHex7HexNAc6dHex3	3099,12	3099
NeuAc2Hex6HexNAc5dHex4	3171,14	3171
NeuAcHex8HexNAc7dHex	3172,13	3172

【０７１９】

表8. ヒト臍帯血単核細胞の逐次酵素修飾工程における単糖組成 $NeuAc_{1-2}Hex_5HexNAc_4dHex_{0-3}$ を有するシアル化 N-グリカンの質量分析結果。列は、修飾反応前 (**MNC**)、ならびに α2,3-シアリルトランスフェラーゼ反応後(**α2,3SAT**) 、ならびに α2,3- シアリルトランスフェラーゼ および α1,3-フコシルトランスフェラーゼによる逐次反応後 (**α2,3SAT+α1,3FucT**) の相対グリカンシグナル強度（表に示したシグナルに対する%）を示す。列ごとのグリカンシグナル強度の合計は明確化のために100 %に基準化した。

提案された単糖組成	calc m/z $[M-H]^-$	MNC	α2,3SAT	α2,3SAT+ α1,3FucT
NeuAcHex5HexNAc4	1930,68	24,64	12,80	13,04
NeuAcHex5HexNAc4dHex	2076,74	39,37	30,11	29,40
NeuAcHex5HexNAc4dHex2	2222,8	4,51	8,60	6,83
NeuAcHex5HexNAc4dHex3	2368,85	3,77	6,34	6,45
NeuAc2Hex5HexNAc4	2221,78	13,20	12,86	17,63
NeuAc2Hex5HexNAc4dHex	2367,83	14,04	29,28	20,71
NeuAc2Hex5HexNAc4dHex2	2513,89	0,47	n.d.	5,94

【０７２０】

表9. ヒト臍帯血単核細胞の酵素修飾工程における代表的な中性N-グリカンの質量分析結果。列は、修飾反応前(**MNC**)、広範なシアリダーゼ反応後(**SA'se**)、α2,3-シアリルトランスフェラーゼ反応後(**α2,3SAT**)α1,3-フコシルトランスフェラーゼ反応後(**α1,3FucT**)ならびにα2,3-シアリルトランスフェラーゼおよびα1,3-フコシルトランスフェラーゼによる逐次反応後(**α2,3SAT+α1,3FucT**)の相対グリカンシグナル強度(全グリカンシグナルに対する%)を示す。

提案された単糖組成	calc m/z $[M+H]^+$	MNC	SA'ase	α2,3SAT	α1,3FucT	α2,3SAT+ α1,3FucT
Hex5HexNAc2	1257,42	11,94	14,11	14,16	13,54	9,75
Hex3HexNAc4dHex	1485,53	0,76	0,63	0,78	0,90	0,78
Hex6HexNAc3	1622,56	0,61	1,99	0,62	0,51	0,40
Hex5HexNAc4	1663,58	0,44	4,81	0,00	0,06	0,03
Hex5HexNac4dHex	1809,64	0,19	1,43	0,00	0,25	0,00
Hex5HexNac4dHex2	1955,7	0,13	0,22	0,00	0,22	0,00
Hex6HexNAc5	2028,71	0,07	1,14	0,00	0,00	0,00
Hex5HexNAc4dHex3	2101,76	0,12	0,09	0,00	0,22	0,00
Hex6HexNAc5dHex	2174,77	0,00	0,51	0,00	0,14	0,00
Hex6HexNAc5dHex2	2320,83	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00

【０７２１】

表10. 臍帯血細胞集団、臍帯血単核細胞(CB MNC)、および末梢血単核細胞(PB MNC)の中性N-グリカン分類。

中性N-グリカン分類:									
組成	グリカン分類	**CD 34+**	**CD 34-**	**CD 133+**	**CD 133-**	**LIN-**	**LIN+**	**CB MNC**	**PB MNC**
全体的なN-グリカン分類:									
$Hex_{5-12}HexNAc_2$	高マンノース	56,3	52,9	67,0	55,1	58,9	61,2	65,4	62,7
$Hex_{1-4}HexNAc_2dHex_{0-1}$	低マンノース	33,1	35,5	25,6	32,8	21,1	24,5	26,5	29,6
$n_{HexNAc} = 3$ および $n_{Hex} \geq 2$	ハイブリッド/単分岐	5,5	6,4	2,4	5,6	8,6	5,5	4,3	3,7
$n_{HexNAc} \geq 4$ および $n_{Hex} \geq 2$	複合	4,3	4,8	4,5	5,9	11,0	8,0	3,1	3,3
その他の型	-	0,8	0,4	0,6	0,7	0,5	0,7	0,7	0,7
複合/ハイブリッド/単分岐N-グリカン分類:									
$n_{dHex} \geq 1$	フコシル化	67,8	70,6	81,2	66,4	49,0	66,8	58,8	56,4
$n_{dHex} \geq 2$	α2/3/4-結合 Fuc	18,8	21,3	0,5	11,5	0	5,4	12,2	4,9
$n_{HexNAc} > n_{Hex} \geq 2$	末端 HexNAc	21,3	18,3	50,8	32,1	38,7	34,2	22,7	26,9
$n_{HexNAc} = n_{Hex} \geq 5$	バイセクティング GlcNAc	0	0	0,8	0,8	0,4	2,0	0,4	0
複合N-グリカン分類:									
$n_{HexNAc} \geq 5$ および $n_{Hex} \geq 6$	大型N-グリカン	1,8	6,0	0	2,5	0	4,0	3,8	2,4

【０７２２】

表11. 臍帯血 CD34+ および CD34- 細胞中性N-グリカン画分のエキソグリコシダーゼプロファイリング。
α-Man, β1,4-Gal, β1,3-Gal, およびβ-GlcNAc は、本文中に記載のように特定のエキソグリコシダーゼ酵素を意味する。プロファイリングの結果に対する記号は、反応前のプロファイルとの比較;
+++:新たなシグナルが出現; ++:シグナルが著しく上昇 ; +: シグナルが上昇 ; −: シグナルが低下;
−−: シグナルが著しく低下 ; −−−: シグナル消滅 ; 空白: 変化なし。

提案された組成	m/z	α-Man CD 34+	α-Man CD 34-	β1,4-Gal CD 34+	β1,4-Gal CD 34-	β1,3-Gal CD 34+	β1,3-Gal CD 34-	β-GlcNAc CD 34+	β-GlcNAc CD 34-
Hex2HexNAc	568		−−	+++	+++	+++	+++		
HexHexNAc2	609	+++	+++		+++		+++		
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	−−−					−	−−−	
Hex6HexNAc	1216	−−−	−−		−		−	−	
Hex4HexNAc2dHex	1241		−−−		−	−	−	−	
Hex5HexNAc2	1257	−−−	−−	+	+	+	+		
Hex3HexNAc3dHex	1282	−−−	+			−	−	−−	
Hex4HexNAc3	1298	−−−		−−−			−		
Hex2HexNAc4dHex	1323			+++					
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	−−−	−−−		+++	+++	+++		
Hex4HexNAc5	1704		+++						
Hex8HexNAc2	1743	−−−	−−−	+++	+	+++	++	++	
Hex5HexNAc3dHex2	1752		−−−		+++		+++	+++	
Hex6HexNAc3dHex	1768					+++		+++	
Hex7HexNAc3	1784	−−−						−−−	
Hex4HexNAc4dHex2	1793			−−	+++	−−	+++		
Hex5HexNAc4dHex	1809	−−−			−−−	+++	−		
Hex6HexNAc4	1825		+++						
Hex3HexNAc6dHex	1891		+++						
Hex9HexNAc2	1905	−−−	−−−	−		+	++	++	
Hex5HexNAc4dHex2	1955	−−−		−−−	−−		−−		
Hex10HexNAc2	2067		−−−	−				+++	
Hex5HexNAc4dHex3	2101			−	−		−	+++	
Hex5HexNAc5dHex2	2158	+++			+++				
Hex6HexNAc5dHex	2174						+++		
Hex6HexNAc5dHex3	2466				+++				

【０７２３】

表12. 臍帯血CD133+およびCD133-細胞中性N-グリカン画分のエキソグリコシダーゼプロファイリング。
α-Man, β1,4-Gal, β1,3-Gal, およびβ-GlcNAcは、本文中に記載のように特定のエキソグリコシダーゼ酵素を意味する。プロファイリングの結果に対する記号は、反応前のプロファイルとの比較;
+++:新たなシグナルが出現; ++:シグナルが著しく上昇 ; +: シグナルが上昇 ; −:シグナルが低下;
−−: シグナルが著しく低下 ; −−−:シグナル消滅 ; 空白: 変化なし。

提案された組成	m/z	α-Man		β1,4-Gal		β1,3-Gal		β-GlcNAc	
		CD 133+	CD 133-	CD 133+	CD 133-	CD 133+	CD 133-	CD 133+	CD 133-
Hex2HexNAc	568				+		+		+++
HexHexNAc2	609	+++	++						−−−
Hex3HexNAc	730	−−−	−−−	+++	++	+++	++		++
HexHexNAc2dHex	755	+++	++	−−−		−−−			
Hex2HexNAc2	771	+	−−	++	++	+	+		+
Hex4HexNAc	892	−−−	−−−	+	++		++		+
Hex2HexNAc2dHex	917	−−−	−−	++	++	++	+		
Hex3HexNAc2	933		−−	+	+	−			+
Hex2HexNAc3	974				+++				
Hex5HexNAc	1054	−−−	−−	+	++	+	++		+
Hex3HexNAc2dHex	1079	−−−	−−	++	+	+			++
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	−−−	+				−−−		−−−
Hex9HexNAc	1702								+
Hex4HexNAc5	1704	−−−			−−−				
Hex8HexNAc2	1743	−−−	−−−	−−	−−	−	−−		
Hex5HexNAc3dHex2	1752				−				+++
Hex6HexNAc3dHex	1768								
Hex4HexNAc4dHex2	1793								
Hex5HexNAc4dHex	1809	−−−		−−−	−−−		−		−
Hex6HexNAc4	1825				−				−−−
Hex5HexNAc5	1866	−−−	−−−		−−−				−−−
Hex3HexNAc6dHex	1891								−−−
Hex9HexNAc2	1905	−−−	−−−	−−	−−	−	−−		
Hex6HexNAc3dHex2	1914				−−−		−−−		
Hex5HexNAc4dHex2	1955				−−		−		−−−
Hex6HexNAc4dHex	1971		−−−		−−−				−−−
Hex7HexNAc4	1987				−−−				−−−
Hex5HexNAc5dHex	2012						+++		
Hex6HexNAc5	2028		−−−		−−−				−−−
Hex10HexNAc2	2067	−−−	−−−	−	−				
Hex5HexNAc4dHex3	2101			−	−		−		
Hex6HexNAc4dHex2	2117		−−−		−−−	−−−			−−−
Hex7HexNAc4dHex	2133				−−−				
Hex6HexNAc5dHex	2174		−−−		−−−				−−−
Hex5HexNAc6dHex	2215				−−−				
Hex6HexNAc4dHex3	2263				−−−		−−−		
Hex6HexNAc5dHex2	2320				−−−				
Hex6HexNAc5dHex3	2466				−−−				

【０７２４】

表13. 臍帯血LinおよびLin−細胞中性N−グリカン画分のエキソグリコシダーゼプロファイリング。

提案された組成	m/z	α-Man LIN+	α-Man LIN-	β1,4-Gal LIN+	β1,4-Gal LIN-	β1,3-Gal LIN+	β1,3-Gal LIN-	β-GlcNAc LIN+	β-GlcNAc LIN-
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	+++	+	+	+		−	+++	− − −
Hex6HexNAc	1216	−	− − −	+		+	+		+
Hex4HexNAc2dHex	1241	− − −	− − −		+		+		− − −
Hex5HexNAc2	1257	− −	− − −		++	−	−	−	+
Hex3HexNAc3dHex	1282	+						− −	− − −
Hex4HexNAc3	1298	+							
Hex2HexNAc4dHex	1323				+++		+++		
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	− − −	− − −	−	− − −		− − −		− − −
Hex2HexNAc4dHex3	1615						+++		
Hex6HexNAc3	1622	− − −	− − −	− − −	− − −				
Hex4HexNAc4dHex	1647		− − −	− −	− − −			− − −	− − −
Hex5HexNAc4	1663		− − −	− −	− −		−	−	− −
Hex3HexNAc5dHex	1688			−				− − −	− − −
Hex9HexNAc	1702	− − −	− − −						
Hex4HexNAc5	1704	+++			− − −				
Hex8HexNAc2	1743	− −	− − −	− −	− −		−		
Hex5HexNAc3dHex2	1752			− − −				+++	
Hex6HexNAc3dHex	1768			− − −					
Hex3HexNAc4dHex3	1777						+++		
Hex7HexNAc3	1784			− − −					
Hex4HexNAc4dHex2	1793	+++							
Hex5HexNAc4dHex	1809	+	− − −	− −	− − −				− −
Hex6HexNAc4	1825	+++		−	− − −		− −	+++	
Hex4HexNAc5dHex	1850			+++		+++			
Hex5HexNAc5	1866	+++		− − −					
Hex3HexNAc6dHex	1891		− − −	−					
Hex9HexNAc2	1905	− − −	− − −	− −	− −		−		
Hex4HexNAc4dHex3	1939						+++		
Hex5HexNAc4dHex2	1955			− − −				+++	
Hex6HexNAc4dHex	1971			− − −					
Hex7HexNAc4	1987			− − −				+++	
Hex5HexNAc5dHex	2012	+++		− − −					
Hex6HexNAc5	2028			− − −					
Hex10HexNAc2	2067	− − −	− − −	−			++	+	
Hex5HexNAc4dHex3	2101							+++	
Hex8HexNAc4	2149		− − −						
Hex6HexNAc5dHex	2174			− − −				−	
Hex5HexNAc6dHex	2215			− − −		− − −			
Hex11HexNAc2	2229						+++		
Hex6HexNAc6	2231			− − −		− − −			
Hex6HexNAc5dHex2	2320			− − −		− − −			
Hex12HexNAc2	2391			+++		+++	+++		
Hex7HexNAc6	2393			− − −		− − −			
Hex6HexNAc5dHex3	2466			− − −		− − −			
Hex7HexNAc6dHex	2539	+++							

【０７２５】

表14．α2,3-シアリダーゼ処理による、臍帯血 $CD133^+$ および $CD133^-$ 細胞から単離されたシアル化N-グリカンに対する差異的な影響。中性N-グリカンの列は、列挙したシアル化N-グリカンに対応する中性N-グリカンが、$CD133^+$ 細胞N-グリカンの分析では現れるが $CD133^-$ 細胞N-グリカンの分析では現れないことを示す。提案されたグリカン組成の括弧外のものは $CD133^+$ 細胞シアル化N-グリカンのα2,3-シアリダーゼ消化の後、中性N-グリカン画分中に見られるものである。

m/z	提案された単糖組成	シアル化N-グリカン		中性N-グリカン	
		$CD133^+$	$CD133^-$	$CD133^+$	$CD133^-$
1768	$(NeuAc_1)Hex_4HexNAc_4$	+	+	+	–
2156	$(NeuAc_1)Hex_8HexNAc_2dHex_1$ / $(NeuAc_1Hex_5HexNAc_4dHex_1SO_3)$	+	+	+	–
2222	$(NeuAc_1)Hex_5HexNAc_4dHex_2$	+	+	+	–
2238	$(NeuAc_1Hex_6HexNAc_4dHex_1$ / $(NeuGc_1)Hex_5HexNAc_4dHex_2$	+	+	+	–
2254	$(NeuAc_1)Hex_7HexNAc_4$ / $(NeuGc_1)Hex_6HexNAc_4dHex_1$	+	+	+	–
2368	$(NeuAc_1)Hex_5HexNAc_4dHex_3$	+	+	+	–
2447	$(NeuAc_2)Hex_8HexNAc_2dHex_1$ / $(NeuAc_2Hex_5HexNAc_4dHex_1SO_3)$	+	+	+	–
2448	$(NeuAc_1)Hex_9HexNAc_2dHex_3$ / $(NeuAc_1Hex_5HexNAc_4dHex_3SO_3)$	+	+	+	–
2513	$(NeuAc_2)Hex_5HexNAc_4dHex_2$	+	+	+	–
2733	$(NeuAc_1)Hex_6HexNAc_5dHex_3$	+	+	+	–
2953	$(NeuAc_1)Hex7HexNAc_6dHex_2$	+	+	+	–

【０７２６】

表15.

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 1 型 , Le^c	Galβ3GlcNAc	N+ O+ L++	2) +/-	+/-	q	N+/- O+/- L+	q	
Lea	Galβ3(Fucα4)GlcNAc	L+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
H 1 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／または特異性に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。

【０７２７】

表16.

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	a)	
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		
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)	a)		43	a)	
O2	$n_{Hex} = 2$ および $n_{HexNAc} = 2$	53			35		
O3+	$n_{Hex} = i$ 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

【０７２８】

表17.

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 : L1-6, スフィンゴ糖脂質グリカン型 L*i*, ここで $n_{HexNAc} + 1 \leq n_{Hex} \leq n_{HexNAc} + 2$, 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, L1-6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。

【０７２９】

表18. シアル化、脱シアル化、およびフコシル化による血液幹細胞の生存率および分化に対する影響

条件	バッファー	細胞数	インキュベーション時間	EXP 1 生存率 (%)	EXP 2 生存率 (%)
元の細胞懸濁液	-	-	-	92.7	86.5
コントロール（バッファー）	HBSS - 1% HSA - 10mM	10 x 10^6	60 分	95.7	95.2
フコシルトランスフェラーゼ処理	HBSS - 1% HSA - 10mM	10 x 10^6	60 分	97.1	92.5
シアル化処理	HBSS - 1% HSA - 10mM	10 x 10^6	60 分	96.3	92.3
ノイラミニダーゼ処理	HBSS - 1% HSA - 10mM	10 x 10^6	60 分	96.9	95.7

条件	EXP 1 CFU 全体平均
コントロール（バッファー）	82
フコシルトランスフェラーゼ	137.5
シアル化	58.5
ノイラミニダーゼ	138
	75.5
	110
	109.5
	196.5

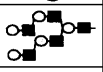
【０７３０】

表19. 結合剤コーティング磁気粒子による細胞の濃縮

レクチン	結合した細胞	CD 34 %	CD 133	CD90	CD3+CD14
GF707 PNA	280,000	54.4	56.1	50.2	
GF708 DBA	255,000	60.2	71.6	59.1	59.6
GF709 LTA	85,000	60.4	75.0	58.8	
GF710 MAA	5,860,000				
GF711 NPA	685,000	53.7			
GF712 STA	125,000	58.9			
GF713 UEA	227,500	46.2			
対照、結合剤なし	425				
対照、ビーズなし		13.5	3.4	9.1	63.7

【０７３１】

表20. 臍帯血造血幹細胞 (CB-HSCs, CD34+) および成熟血液細胞 (CD34-) のレクチン染色

レクチン	エピトープ	構造	CB-HSC CD34+ (陽性%)	CD34- (陽性%)
GNA	α-マンノース		6,0	17,5
HHA	α-マンノース (内部＋末端)		99,4	88,0
NPA	α マンノース		4,4	19,7
PSA	末端 α-D-マンノシル		100,0	96,6
PNA	Gal(β3)GalNAc		7,7	4,3
MAA	SAα(2,3)Gal		84,4	46,4
SNA	SAα(2,6)Gal/GalNAc		99,4	83,4
PWA	分岐鎖 Gal(β4)GlcNAc オリゴマー , polyLN (I)		2,9	1,5
STA	直鎖 Gal(β4)GlcNAc オリゴマー , polyLN (i)		66,3	4,8
LTA	Lewis x		0,3	0,1
UEA	H 2 型		9,2	17,7
CCA	O-アセチルシアリル酸		3,8	0,7

【０７３２】

表21. 臍帯血造血幹細胞 (CB-HSCs, CD34+) および成熟血液細胞 (CD34-) の
フローサイトメトリー (FACS) 分析

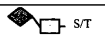
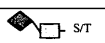
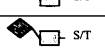
コード	慣用名	構造	末端エピトープ	CB-HSC CD34+	SD	CB-HSC CD34-	SD
GF 416	マンノース		Man	6,0	1,1	7,7	2,3
GF 278	Tn		GalNAcαS/T	36,6	11,0	12,8	0,5
VPU 006	Tn 抗原 , CD175		GalNAcαS/T	36,5		12,6	
VPU 007	シアリル Tn, sCD175		SA(α6)GalNAcαS/T	3,8		3,2	
GF 277	シアロシル-Tn		SA(α6)GalNAcαS/T	4,7	1,9	10,7	1,8
GF 276	TAG-72, CA 72-4			11,7	4,4	7,6	2,8
GF 280	TF-抗原		Gal(β3)GalNAc(α/β)	19,1	12,1	7,0	1,0
GF 281	TF-抗原		Gal(β3)GalNAc(α/β)	40,2	6,8	11,1	1,9
GF 365	TF-抗原		Gal(β3)GalNAc(α/β)	18,6	12,4	7,2	0,5
GF 274	MECA-79, スルホムチン , PNAD		Sulfo-mucin	14,6	14,0	18,4	0,1
GF 374	グリコデリン A		LacdiNAc	9,0	3,9	14,2	1,6
GF 375	グリコデリン A		LacdiNAc	18,3	15,5	15,4	3,2
GF 376	グリコデリン A		LacdiNAc	18,5	11,0	11,5	0,8
GF 413	Gal(α3)Gal		Gal(α3)Gal	7,3	2,8	4,1	1,5
GF 295	Lewis c		Gal(β3)GlcNAcβ(3Lac)	13,2	1,4	19,6	8,2
GF 300 GF 428	アシアロ GM2		GalNAc(β4)Gal(β4)GlcβCer	10,0	10,1	32,4	11,2
GF 296 GF 427	アシアロ GM1		Gal(β3)GalNAc(β4)Gal(β4)GlcβCer	11,1	12,5	30,8	7,7
GF 406	GD2			4,5		5,0	
GF 298	Gb3		Gal(α4)Gal(β4)GlcβCer	11,3	4,7	18,5	0,7
GF 297 VPU001	グルボシド GL4		GalNAc(β3)Gal(α4)Gal(β4)GlcβCer	6,0	2,4	23,2	6,5
GF 353	SSEA-3		Gal(β3)GalNAc(β3)Gal	5,9	1,2	20,1	0,7
GF 354	SSEA-4		SA(α3)Gal(β3)GalNAc(β3)Gal	4,9	1,6	15,1	7,0
GF 299	フォルスマン ag		GalNAc(α3)GalNAc(β4)Gal(α4)Gal(β4)GlcβCer, GalNAc(α3)GalNAcβ-R	9,1	6,4	20,2	3,2
GF 288	グロボ -H		Fuc(α2)Gal(β3)GalNAc(β3)Gal(α4)Gal(β4)GlcβCer	10,6	2,8	5,4	1,5
GF 394	H 二糖		Fuc(α2)Galβ	10,1	4,8	5,7	1,6
GF 303	H 1 型		Fuc(α2)Gal(β3)GlcNAc	4,7	1,3	13,7	2,0
GF 304	Lewis a		Gal(β3)[Fuc(α4)]GlcNAc	11,2	3,8	18,1	4,3
GF 306	シアリル Lewis a		SA(α3)Gal(β3)[Fuc(α4)]GlcNAc	6,4	2,9	18,1	7,3

表21は次頁につづく

コード	慣用名	構造	末端エピトープ	CB-HSC CD34+	SD	CB-HSC CD34-	SD
GF 301	Lewis b		Fuc(α2)Gal(β3)[Fuc(α4)]GlcNAc	7,3		19,3	
GF 302	H 2 型		Fuc(α2)Gal(β4)GlcNAc	6,2	3,5	19,1	2,6
GF 410	血液型 ABH			8,9	5,4	7,8	1,1
GF 305	Lewis x		Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	26,9	21,7	6,9	3,9
GF 515	Lex, CD15		Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	8,8	11,4	13,2	7,6
GF 517	Lex, CD15		Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	28,7	31,5	4,2	2,1
GF 518	SSEA-1 (CD15, Lex)		Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	22,7	29,2	6,7	3,0
GF 525	CD15 (Lex)		Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	14,3	16,1	13,8	3,1
GF 516	sLex, sCD15		SA(α3)Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	43,4	15,1	5,9	3,6
GF 307	シアリルLewis x		SA(α3)Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	85,5	6,3	13,7	3,4
GF 526	PSGL-1 (コア2 O-グリカン上の sLex)		SA(α3)Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	97,6	0,4	33,7	11,1
GF 393	Lewis y		Fuc(α2)Gal(β4){Fuc(α3)}GlcNAcβ	5,5	1,3	7,1	1,9
GF 408	血液型 Ag A-b45.1		GalNAc(α3)Fuc(α2)Galβ	5,1	2,3	17,1	4,6
GF 409	血液型 A			6,8	3,0	8,0	1,0
GF 411	血液型 B (分泌型)			5,9	1,9	8,7	2,3
GF 412	血液型 B (一般)			8,0	5,8	6,9	1,0
GF 414	TRA-1-81 Ag			6,1		9,7	
GF 415	TRA-1-60 Ag			11,2		5,6	

【０７３３】

表22. 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。

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	Sulfo-ムチン	BD Pharmingen	553863	MECA-79	ラット/IgM
GF 275 GF 553	Ca15-3 シアル化エピトープ	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, グロボテトラオース	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22は次頁につづく

GF 302 GF 284	H 2 型	Fuc(α2)Gal(β4)GlcNAc	Acris	DM3015	B393	マウス/IgM
GF 303 GF 287	H 1 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* *T174* *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22は次頁につづく

				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, k

表22は次頁につづく

GF 516	sCD15, シアリル Lewis x	SA(α3)Gal(β4)[Fuc(α3)]GlcNAc	BD Pharmingen	551344	CSLEX1	マウス /IgM, k
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	4i2B3	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

【０７３４】

表23. 構造分析および結合剤特異性に基づくHSC結合剤標的の表。用語の説明は脚注1)および2)を参照。

慣用名	末端エピトープ	CD34+, CD133+	CD34-, CD133-
LN 1 型 , Lec	Galβ3GlcNAcβ	+/- L+	+/- L+
	Lecβ3Galβ4Glc[NAc]β	+/-	+/-
Lea	Galβ3(Fucα4)GlcNAcβ	+/- L+	+/- L+
	Leaβ3Galβ4Glc[NAc]β	+/-	+/-
H 1 型 , H1	Fucα2Galβ3GlcNAc		
	H1β3Galβ4Glc[NAc]β		
Leb	Fucα2Galβ3(Fucα4)GlcNAcβ	q	q
シアリル Lea, sLea	SAα3Galβ3(Fucα4)GlcNAcβ	+/- Lq	+ Lq
α3'-シアリル Lec	SAα3Galβ3GlcNAcβ	q	q
LN 2 型 , LN	Galβ4GlcNAc	+ N+ O+ Lq	+ N+ O+ Lq
	LNβ2Manα3/6	+	+
	LNβ4Manα3	+/-	+
	LNβ2Manα3(LNβ2Manα6)Man	+	+
	LNβ2(LNβ4)Manα3(LNβ2Manα6)Man	q	+/-
	LNβ6(R-Galβ3)GalNAc	+	+
	LNβ3Galβ4Glc[NAc]β	q	q
	LNβ6(R-GlcNAcβ3)Galβ4Glc[NAc]β	q	q
	LNβ3(R-GlcNAcβ6)Galβ4Glc[NAc]β	q	q
	LNβ3(LNβ6)Galβ4Glc[NAc]β	q	q
Lex	Galβ4(Fucα3)GlcNAc	+ Nq Oq Lq	+ Nq Oq Lq
	Lexβ2Manα3/6	+/-	+/-
	Lexβ6(R-Galβ3)GalNAc	+	q
	Lexβ3Galβ4Glc[NAc]β	q	q
	Lexβ2Manα3(Lexβ2Manα6)Man	q	q

H 2 型, H2	Fucα2Galβ4GlcNAc	+/- Nq	+ Nq
	H2β2Manα3/6	q	q
	H2β3Galβ4Glc[NAc]β	q	q
Ley	Fucα2Galβ4(Fucα3)GlcNAc	+/- Lq	+/- Lq
	Leyβ3Galβ4Glc[NAc]β	q	q
シアリル Lex, sLex	SAα3Galβ4(Fucα3)GlcNAc	++ Nq O++ Lq	+ Nq O+ Lq
	sLexβ2Manα3/6	q	q
	sLexβ6(R-Galβ3)GalNAc	++	+
	sLexβ3Galβ4Glc[NAc]β	q	q
α3'-シアリル LN, s3LN	SAα3Galβ4GlcNAc	++ N++ O+ Lq	+ N+ O+ Lq
	s3LNβ2Manα3/6	++	+
	s3LNβ4Manα3	+/-	+
	s3LNβ2Manα3(s3LNβ2Manα6)Man	++	+
	s3LNβ6(R-Galβ3)GalNAc	+	+
	s3LNβ3Galβ4Glc[NAc]β	q	q
	s3LNβ6(R-GlcNAcβ3)Galβ4Glc[NAc]β	q	q
	s3LNβ3(R-GlcNAcβ6)Galβ4Glc[NAc]β	q	q
α6'-シアリル LN, s6LN	SAα3Galβ4GlcNAc	q Nq	q Nq
	s6LNβ2Manα3/6	q	q
	s6LNβ4Manα3	q	q
	s6LNβ2Manα3(s6LNβ2Manα6)Man	q	q
	s6LNβ3Galβ4Glc[NAc]β	q	q
コア 1	Galβ3GalNAcα	+	+/-
H 3 型	Fucα2Galβ3GalNAcα	-	-
シアリルコア 1	SAα3Galβ3GalNAcα	+	+
ジシアリルコア 1	SAα3Galβ3Saα6GalNAcα	+	+
4 型 鎖	Galβ3GalNAcβ	+/- L+	+ L+
アシアロ -GM1	Galβ3GalNAcβ4Galβ4Glc	+/-	+
Gb5, "SSEA-3"	Galβ3GalNAcβ3Galα4Galβ4Glc	+/-	+
H4 型, "グロボ H"	Fucα2Galβ3GalNAcβ	+/-	q
α3'-シアリル 4 型	SAα3Galβ3GalNAcβ	q L+	q L+

表23は次頁につづく

"SSEA-4"	SAα3Galβ3GalNAcβ3Galα4Galβ4Glc	+/-	+
GalNAcβ	GalNAcβ	+/-	+
アシアロ-GM2	GalNAcβ4Galβ4Glc	+/-	+
Gb4	GalNAcβ3Galα4Galβ4Glc	+/-	+
LacdiNAc	GalNAcβ4GlcNAc		
Galα	Galβ4Glc	+/-	+
Gb3	Galα4Galβ4Glc	+/-	+
Lac	Galβ4Glc	q	q
GalNAcα, "Tn"	GalNAcα	+/-	q
フォルスマン	GalNAcα3GalNAcβ	+/-	+
シアリル Tn	SAα6GalNAcα	q	+/-
oligosialic acid	NeuAcα8NeuAcα	q Lq	q Lq
GD3	NeuAcα8NeuAcα2Galβ4Glc		
GD2	NeuAcα8NeuAcα2(GalNAcβ4)Galβ4Glc	q	q
GD1b	NeuAcα8NeuAcα2(Galβ3GalNAcβ4)Galβ4Glc		
GT1b	SAα8SAα2(Saα3Galβ3GalNAcβ4)Galβ4Glc		
Manα	Manα	++	++
	Manα2Manα	++	+
	Manα3Manα6/β4	+	++
	Manα6Manα6/β4	+	++
	Manα3(Manα6)Manα6/β6	+	++
	Manα3(Manα6)Manβ4GlcNAc[β4GlcNAc]	+/-	+/-
Manβ	Manβ	+/-	+/-
	Manβ4GlcNAc	+/-	+/-
Glcα	Glcα	+	+/-
	Glcα3Manα	+	+/-
	Glcα2Glcα3[Glcα3Manα]	+/-	+/-
core-Fuc	Fucα6GlcNAc	N+	N+/-
	Fucα6(R-GlcNAcβ4)GlcNAc	+	+/-
GlcNAcβ, Gn	GlcNAcβ	+	+/-
	Gnβ2Manα3/6	N+	Nq
	Gnβ4Manα3	+	q
	Gnβ2Manα3(Gnβ2Manα6)Man	+	q
	Gnβ4Gn	q	q
	Gnβ4(Fucα6)Gn	q	q
	Gnβ3Galβ4Glc[NAc]β	q	q
	Gnβ6(R-GlcNAcβ3)Galβ4Glc[NAc]β	q	q
	Gnβ3(R-GlcNAcβ6)Galβ4Glc[NAc]β	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；CD34+/CD133+は臍帯血、末梢血、または骨髄由来HSCを示す；CD34-/CD133-は同一源のMNC画分からの分化した細胞を示す。
2)複合糖質における、ならびに／またはは特異的にN-グリカン(N)、O-グリカン(O)、および／もしくは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，定性的データ；+/-，低発現；+，一般的；++，多量。

【0735】

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.

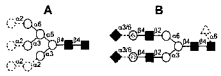
Karlsson, H., et al. (2000) Glycobiology 10(12):1291-309

Kretzchmar, E., et al. (1994) Biol. Chem. Hoppe Seyler 375(5):23-7

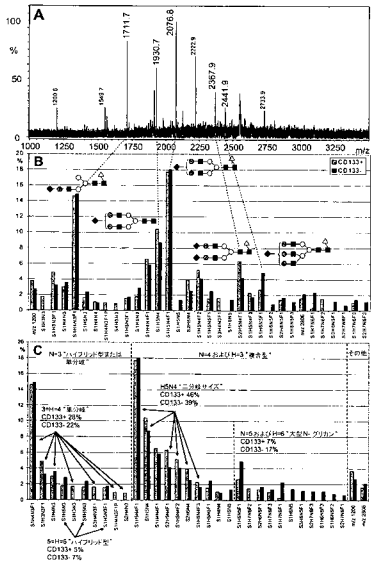
Kubelka, V., et al. (1994) Arch. Biochem. Biophys. 308(1):148-57

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, TJ. & Harvey, D.J. (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.

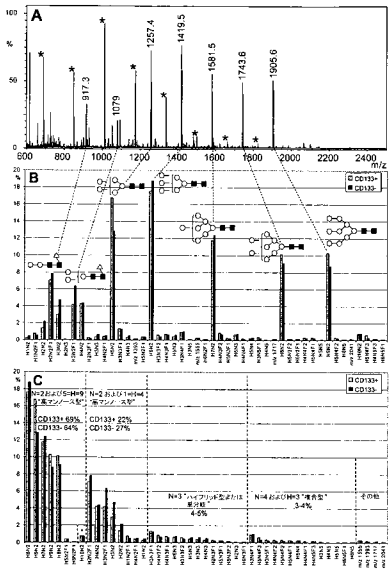
【図１】



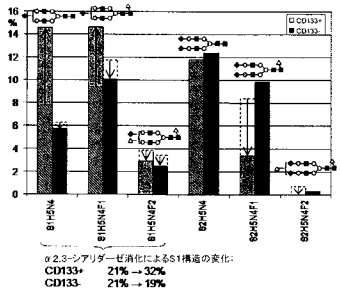
【図２】



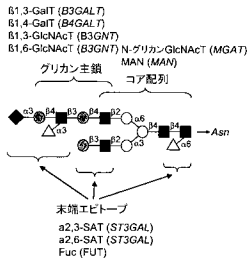
【図３】



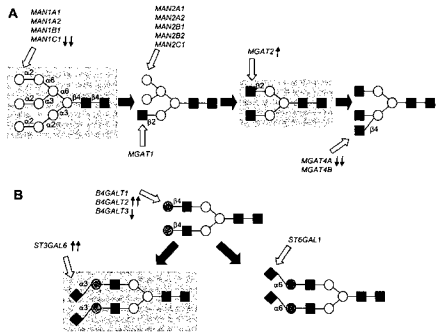
【図４】


CD133+
CD133-
%
α2,3-シアリダーゼ消化によるS1構造の変化:
CD133+ 21% → 32%
CD133- 21% → 19%

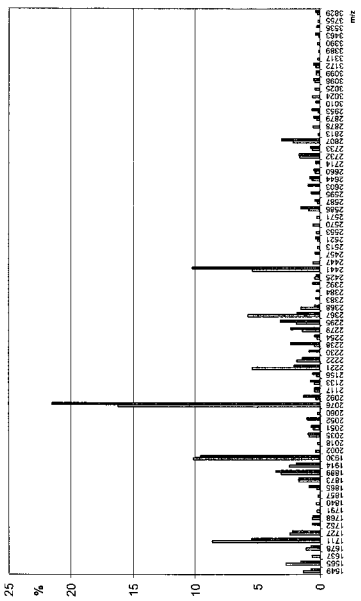
【図５】


β1,3-GalT (B3GALT)
β1,4-GalT (B4GALT)
β1,3-GlcNAcT (B3GNT)
β1,6-GlcNAcT (B3GNT) N-グリカンGlcNAcT (MGAT)
MAN (MAN)
グリカン主鎖
コア配列
Asn
末端エピトープ
α2,3-SAT (ST3GAL)
α2,6-SAT (ST3GAL)
Fuc (FUT)

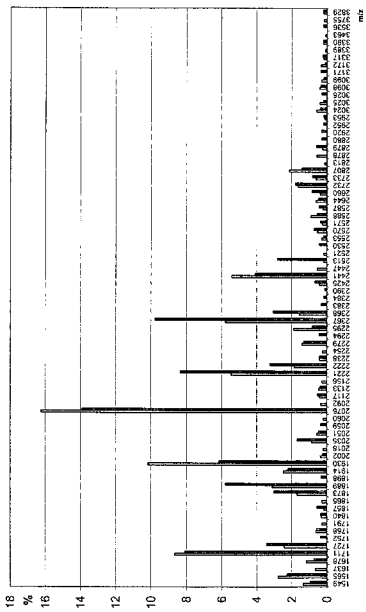
【図６】


A
MAN1A1
MAN1A2
MAN1B1
MAN1C1
MAN2A1
MAN2A2
MAN2B1
MAN2B2
MAN2C1
MGAT2
MGAT1
MGAT4A
MGAT4B
B
B4GALT1
B4GALT2
B4GALT3
ST3GAL6
ST6GAL1

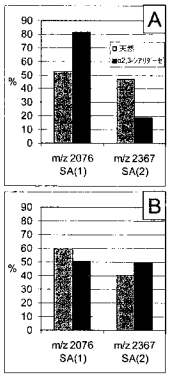
【図７】


%
m/z

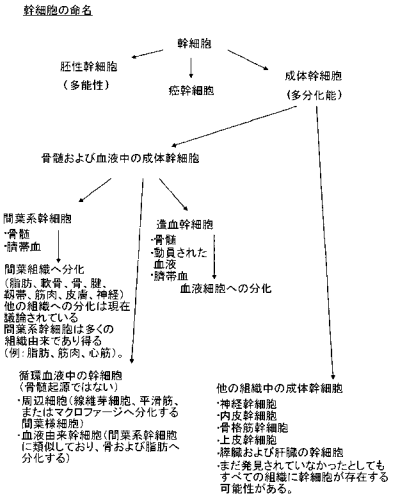
【図８】


%
m/z

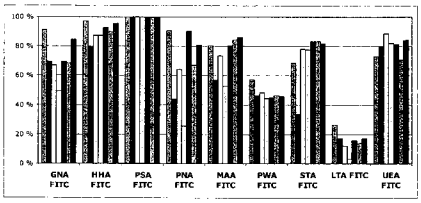
【図９】



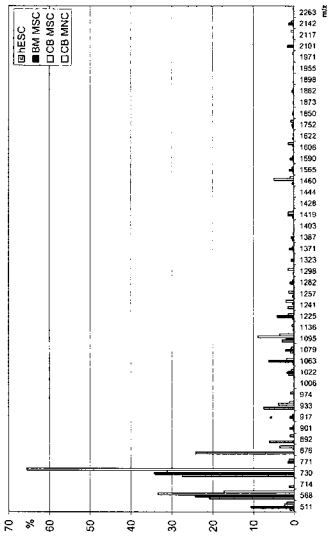
【図１０】



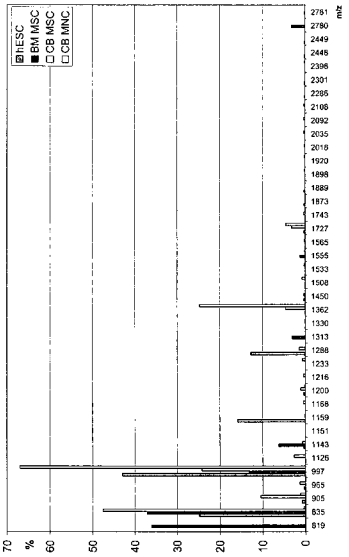
【図１１】



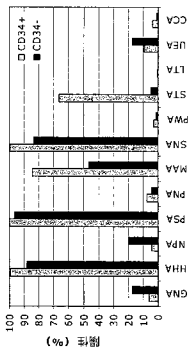
【図１２】



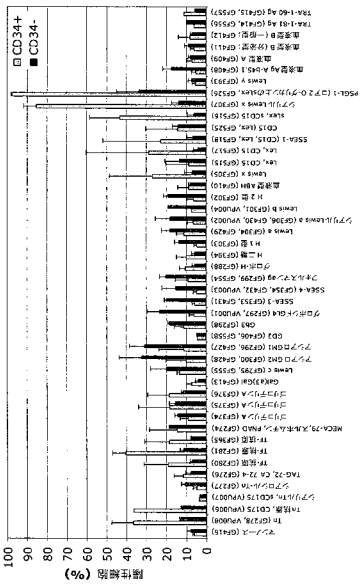
【図１３】



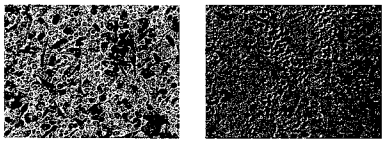
【図１４】



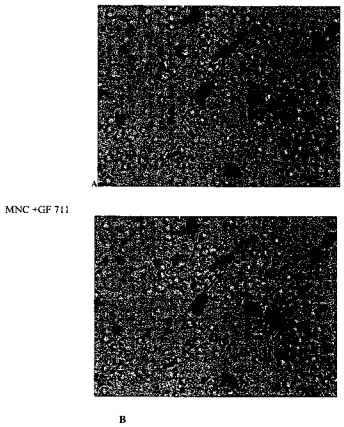
【図１５】



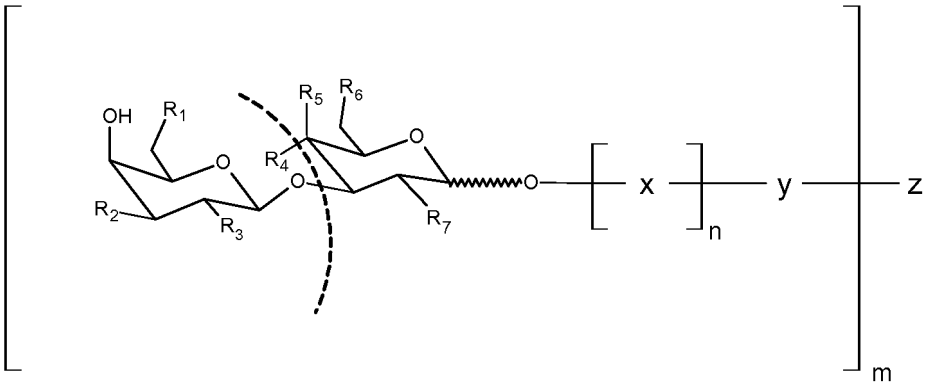
【図１６】



【図１７】



【手続補正書】
【提出日】平成21年4月20日(2009.4.20)
【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】
造血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工程を含み、前記グリカン構造またはグリカン構造の群は、式Ｔ１



［式中、
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はリンカー基、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；そして
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１～１０００、好ましくは１～１００、および最も好ましくは１～１０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である］によるものであり：
ならびに、
前記グリカン構造は伸長構造であって、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）$_{n}$、［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］；
によるものであり、
または
前記伸長構造は式ＭＵＣ、［式中、ｍは１である］によるものであり、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方法。
【請求項２】
請求項１に記載の方法であって、造血幹細胞の試料から伸長グリカン構造を検出する工程を含み、ここで前記結合剤は、
式Ｅ１：
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、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、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β４ＧａｌＮＡｃまたはβ６ＧａｌＮＡｃであり、
ＨｅｘがＭａｎである場合、ＡｘＨｅｘはβ２Ｍａｎであり、そして
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］
の少なくとも１つの還元末端伸長単糖エピトープにさらに結合し、
ただし
ｉ）造血幹細胞は癌細胞株の細胞ではなく、そして
ｉｉ）細胞が造血ＣＤ３４$^{+}$細胞であり、前記構造がＮ‐アセチルラクトサミンを含む場合は、前記構造はフコシル化された特異的な伸長構造であるか、またはＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ構造ではない方法。
【請求項３】
請求項２に記載の方法であって、Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、ＳＡα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、およびＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃの群より選択される末端エピトープが、
式Ｅ１：
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、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、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、そして
ＨｅｘがＧａｌである場合、ＡｘＨｅｘはβ３Ｇａｌまたはβ６Ｇａｌであり、ただし、

ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃはβ３Ｇａｌと結合しない］
の伸長単糖エピトープに結合する方法。
【請求項４】
請求項２に記載の方法であって、ここで前記結合物質が式Ｔ８Ｅベータ
［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１‐３／４［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、
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］
の構造を認識する方法。
【請求項５】
請求項４に記載の方法であって、前記結合物質が
式Ｔ１０Ｅ
［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１‐４［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認識する方法。
【請求項６】
請求項５に記載の方法であって、前記結合物質が式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認識する方法。
【請求項７】
前記構造がＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、ＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎ、ＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎからなる群より選択される、請求項６に記載の方法
【請求項８】
前記構造がＨＩＩ型構造Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎである、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記構造がＬｅｗｉｓ　ｘ構造Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ２Ｍａｎである、請求項６に記載の方法。
【請求項１０】

請求項５に記載の方法であって、前記結合物質が
式Ｔ１０ＥＧａｌ（ＮＡｃ）：
［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１‐４［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβ６Ｇａｌ（ＮＡｃ）$_{p}$
［式中、変数は請求項２の式Ｔ８Ｅベータに対して記載される通りである］
のＩＩ型ラクトサミンを認識する方法。
【請求項１１】
請求項１０に記載の方法であって、前記構造が
ＧａｌＢ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３／６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、およびＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ６ＧａｌＮＡｃ、ＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃａ３）ＧｌｃＮＡｃβ６（ＲＧａｌβ３）ＧａｌＮＡｃ［式中、ＲはＳＡα３または無である］
からなる群より選択される方法。
【請求項１２】
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、それが抗体ＣＨＯ１３１によって認識される、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記抗体が造血幹細胞の５０％超を認識した、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
造血幹細胞の状態を、抗体抗体ＫＭ９３を用いて分析するための方法。
【請求項１５】
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する構造を認識する、請求項１乃至４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
請求項１５に記載の方法であって、前記構造が
Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）βＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、およびＦｕｃα２Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、およびＦｕｃα２Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、およびＳＡα３Ｇａｌβ３（Ｆｕｃα４）ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ
からなる群より選択される方法。
【請求項１７】
前記構造がＨＩ型構造Ｆｕｃα２Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３ＧａｌまたはＩ型ＬＡｃＮＡｃ‐構造Ｇａｌβ３ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌである、請求項１２に記載の方法。
【請求項１８】
請求項２に記載の方法であって、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その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；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、方法。
【請求項１９】
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、請求項２乃至１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
前記構造が少なくとも１個のＦｕｃα残基を有する、請求項２乃至１７のいずれか１項

に記載の方法。
【請求項２１】
前記結合物質が、
式
［Ｍα］$_{m}$Ｇａｌβ１‐４［Ｎα］$_{n}$ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ
［ただし、構造がＳＡα３Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌではない］
のＩ型ラクトサミンを基盤とする構造を認識する、請求項２に記載の方法。
【請求項２２】
前記の伸長オリゴ糖構造がＧａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、Ｆｕｃα２Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、ＳＡα６Ｇａｌβ４ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌ、およびＳＡα３Ｇａｌβ４（Ｆｕｃα３）ＧｌｃＮＡｃβ３Ｇａｌからなる群より選択される、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
請求項２に記載の方法であって、前記の伸長オリゴ糖の末端エピトープが、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方法。
【請求項２４】
前記構造が少なくとも１つの末端ＭａｎαＭａｎ‐構造とともに用いられる場合の、請求項１乃至１９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２５】
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、請求項１乃至２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２６】
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、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
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等の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、請求項２５に記載の方法。
【請求項２８】
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、請求項２５に記載の方法。
【請求項２９】
選別または選択が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、請求項２５に記載の方法。
【請求項３０】
請求項２９に記載の方法により得られた細胞集団。
【請求項３１】

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、請求項２７に記載の方法。

【請求項３２】

分析されるべき細胞の量が10^3および10^6細胞の間である、請求項２に記載の方法。

【請求項３３】

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され得る、請求項２または３に記載の方法。

【請求項３４】

前記Ｎ‐グリカンコア構造がＭａｎβ４ＧｌｃＮＡｃβ４（Ｆｕｃα６）$_n$ＧｌｃＮＡｃ［式中、ｎは０または１である］である、請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

請求項２または３に記載の方法であって、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され得る方法。

【請求項３６】

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、請求項２または３に記載の方法。

【請求項３７】

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、請求項２乃至３５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３８】

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、請求項２乃至３６のいずれか１項に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2008/050017

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

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, WPI, BIOSIS, Medline

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
21 April 2008 (21.04.2008)	06 May 2008 (06.05.2008)

Name and mailing address of the ISA/FI
National Board of Patents and Registration of Finland
P.O. Box 1160, FI-00101 HELSINKI, Finland
Facsimile No. +358 9 6939 5328

Authorized officer
Antti Hoikkala
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/FI2008/050017

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members(s)	Publication date
WO 2007054620 A1	18/05/2007	AU 2006268559 A1	18/01/2007
		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	AU 2006268559 A1	18/01/2007
		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	AU 2006268559 A1	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

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2008/050017

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)
C12N 5/08 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2008/050017

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

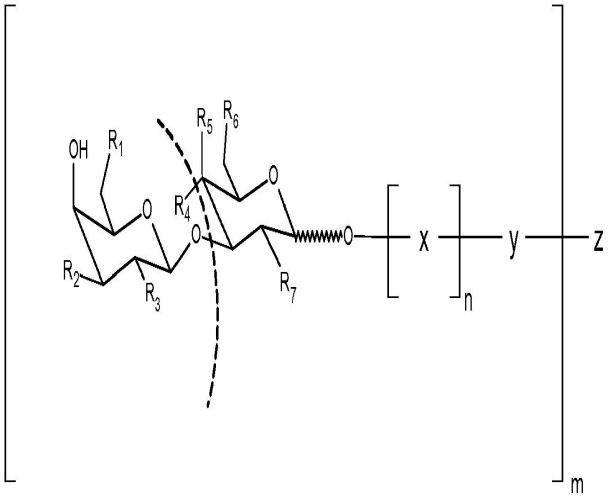
(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,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 アンダーソン，ヘイディ
フィンランド共和国 ヘルシンキ エフアイ－００１２０，フレデリキンカトゥ ４３ビィ１７
(72)発明者 ピッカネン，ヴィルヴェ
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，シー／オー スオメン プナイネン リスティ，ヴェリパルベル
(72)発明者 パルタネン，ジュッカ
フィンランド共和国 ヘルシンキ エフアイ－００７５０，ペルトユランティ １５
(72)発明者 ヤーティネン，タイナ
フィンランド共和国 ヘルシンキ エフアイ－００３２０，カウッパランティ ７エイ４

Ｆターム(参考) 4B063 QA18 QQ08 QQ26 QQ35 QQ67 QQ79 QR06 QR15 QR43 QR48
QR77 QS02 QS33 QX01
4B065 AA93X AC20 CA44 CA46

专利名称(译)	来自人细胞的新型碳水化合物及其分析和修饰方法		
公开(公告)号	JP2010516240A	公开(公告)日	2010-05-20
申请号	JP2009545966	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 アンダーソンヘイディ ピッカネンヴィルヴェ パルタネンジュッカ ヤーティネンタイナ		
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 アンダーソン,ヘイディ ピッカネン,ヴィルヴェ パルタネン,ジュッカ ヤーティネン,タイナ		
IPC分类号	C12Q1/02 C12N5/074 C12N5/0775 C12N5/0789 G01N33/53 C12N5/0735		
CPC分类号	G01N33/5308 C12N5/0606 C12N5/0647 C12N2500/34 G01N2400/38		
FI分类号	C12Q1/02 C12N5/00.202.D C12N5/00.202.H C12N5/00.202.Q G01N33/53.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ26 4B063/QQ35 4B063/QQ67 4B063/QQ79 4B063/QR06 4B063/QR15 4B063/QR43 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS33 4B063/QX01 4B065/AA93X 4B065/AC20 4B065/CA44 4B065/CA46		
代理人(译)	Goichi高桥 美智子米村		

优先权	2007005033 2007-01-18 FI 2007000205 2007-03-13 FI
其他公开文献	JP2010516240A5
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。