

## ヒト多能性幹細胞検出・除去技術の開発

舘野 浩章

レクチンアレイを用いてヒト多能性幹細胞に発現する糖鎖を精密分析した結果、ヒト多能性幹細胞の糖鎖の特徴を明らかにするとともに、特異的に反応するレクチンを発見した。さらに本レクチンを用いて、ヒト多能性幹細胞を検出・除去する技術を開発した。本稿ではヒト多能性幹細胞糖鎖の構造、特異的レクチンの発見、レクチンを用いたヒト多能性幹細胞検出・除去技術について紹介する。

## ヒト多能性幹細胞を用いた再生医療の課題

ヒト胚性幹細胞（ES細胞）やヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）は、無限に増殖できる能力（自己複製能）や、心筋細胞や神経細胞などあらゆる細胞に分化する能力（多能性）を持つことから、再生医療のための細胞源として大きな期待が寄せられている。特にヒトiPS細胞は4種の遺伝子を導入するだけでさまざまな体細胞から作製できることから、再生医療のみならず、病態モデルや創薬開発などへの応用が期待されている。現在、ヒトES/iPS細胞を用いた再生医療を実現化するために多くの研究が進められている。2014年9月には、加齢黄斑変性の治療を目的として自己由来のiPS細胞から作製した網膜色素上皮細胞の移植が世界で初めて実施された。その後、他人由来のiPS細胞から作製した網膜色素上皮細胞の移植も実施されている。このように、ヒトES/iPS細胞の臨床応用が現実的になりつつある一方で、造腫瘍性という安全性における大きな課題が存在している。『ヒト（自己）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（薬食発0907第3号 2012年9月7日）』においても、「ヒトiPS（様）細胞加工医薬品等においては目的細胞以外の未分化細胞の混入を否定するための方策が最も重要な要件である。可能な限り中間製品の段階で目的細胞以外の未分化細胞の混入を否定することが望ましい」と記載されており、ヒトiPS（様）細胞加工医薬品を医療に用いる際には、残存する未分化細胞の造腫瘍性が大きな関心事になっていることがわかる。それ故、ヒトES/iPS細胞を用いた再生医療を実現化するためには、ヒトES/iPS細胞から作製した移植用細胞に残存する未分化なヒトES/iPS細胞を検出して、除くための技術が必要不可欠である。

## ヒト多能性幹細胞の顔「糖鎖」の精密解析

糖鎖はすべての細胞の最外層を覆い、その構造は細胞の種類や状態に応じて変化することから「細胞の顔」と呼ばれ、古くからさまざまな細胞の同定や選別に利用されてきた。たとえば、多能性幹細胞マーカーであるSSEA1/3/4やTra-1-60/81は糖鎖である。しかし、多能性幹細胞に発現する糖鎖構造の詳細については理解されていなかった。こうした中、2007年、京都大学の山中教授らによりヒトiPS細胞が報告された。そこで筆者らはレクチンアレイを用いて114種類のヒト胎児肺、羊膜、子宮内膜、胎盤動脈、皮膚などさまざまな組織から調製したヒトiPS細胞の糖鎖プロファイル、ヒトiPS細胞の元となる体細胞やヒトES細胞と比較した<sup>1)</sup>。その結果、1) 親細胞として使用したヒト胎児肺、羊膜、子宮内膜、胎盤動脈、皮膚はそれぞれ別のクラスターに分類、2) 114種のiPS細胞は由来によらず一つの大きなクラスターに分類、3) iPS細胞とES細胞のプロファイルは互いに類似し、体細胞と明確に区別可能な共通のクラスターに分類されることがわかった(図1)。「糖鎖リプログラミング」を初めて明確に証明するとともに、未分化細胞には独自の「顔」が存在することを示した。

それでは、ヒトiPS細胞はどのような顔をしているのか？得られたレクチンアレイのデータと関連する糖転移酵素の発現解析の結果から、 $\alpha$ -2-6シアル酸、1型ラクト

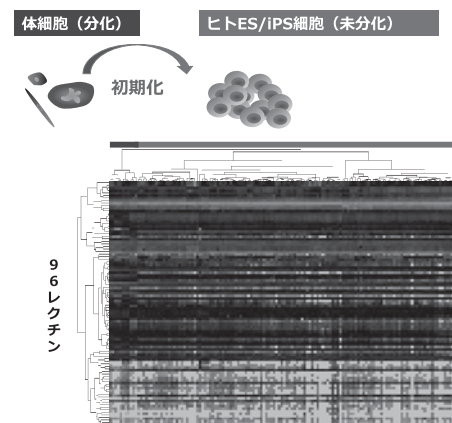


図1. ヒトES/iPS細胞の糖鎖プロファイリングのクラスター解析

サミン構造 (Galβ1-3GlcNAc), α1-2フコース, という三つの特徴的な糖鎖エピトープを発現していることがわかった(図2)。これらの結果をさらに検証するために定量的糖鎖構造解析を行った。代表的なヒトiPS細胞(201B7)と、対応するヒト皮膚繊維芽細胞の2種について、グリコシダーゼ消化と質量分析を組み合わせた液体クロマトグラフィーによる定量解析法によってNグリカンおよびOグリカンの比較解析を行った<sup>2)</sup>。その結果、ヒト皮膚繊維芽細胞からNグリカン20種、Oグリカン7種、ヒトiPS細胞からNグリカン37種、Oグリカン10種が同定された。2種の細胞間で糖鎖構造に劇的な違いが認められ、レクチンアレイによる糖鎖プロファイリングの結果とほぼ一致していた。すなわち、ヒトiPS細胞のNグリカンにおいて、1) Nグリカンのシアル酸結合様式はすべてα2-6型、2) 1型ラクトサミン構造の発現、3) H-構造 (Fucα1-2Gal) の発現、が認められた。これに対してOグリカンではNグリカンほどシアル酸結合様式の大きな変化は認められなかったが、1型ラクトサミンとH-構造の出現は顕著であった。特筆すべきことに、次節で述べる新規未分化マーカー、Hタイプ3構造 (Fucα1-2Galβ1-3GalNAcα) はOグリカンの中に見いだされた。

### ヒト多能性幹細胞特異的レクチンの発見

レクチンアレイに用いた96種類のレクチンのうち、グラム陰性菌 *Burkholderia cenocepacia* 由来のレクチン BC2L-CのN末端ドメインのリコンビナント体である rBC2LCNは、未分化なヒトES/iPS細胞のすべてと反応するものの、分化した体細胞やマウスフィーダー細胞とはまったく反応しないことを見いだした(図3)<sup>3)</sup>。rBC2LCNの糖結合特異性を糖鎖複合体アレイ、およびフロンタル・アフィニティークロマトグラフィーで解析した結果、前節に記載した三つのヒトES/iPS細胞の糖鎖構造の特徴のうち二つ(α1-2Fuc, Galβ1-3GlcNAc)が関係する Fucα1-2Galβ1-3GlcNAc/GalNAc に特異的に結合することがわかった。この糖鎖エピトープは、ヒ

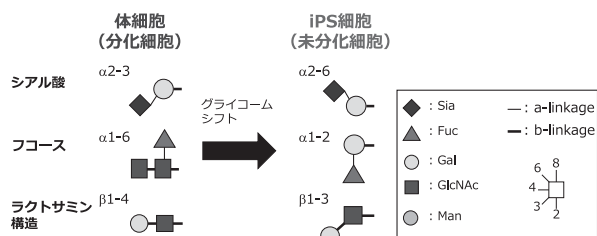


図2. ヒトiPS細胞誘導による糖鎖構造変化

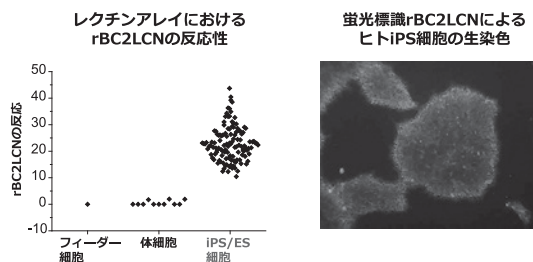


図3. ヒトES/iPS細胞特異的レクチンrBC2LCNの反応性

トES/iPS細胞で発現が顕著に増加している *FUT1/2* と *B3GalT5* という2種の糖転移酵素遺伝子で合成される。実はこれら糖転移酵素は既知の未分化マーカーである SSEA3/4, Tra-1-60/-81, Globo H, また最近報告された SSEA5 の合成にも関与している。したがって、rBC2LCNが認識する糖鎖構造は既知の未分化マーカーと密接に関係しているといえる。rBC2LCNのヒトES/iPS細胞への結合機構を解析したところ、rBC2LCNはポドカリキシンという1型膜タンパク質上のO型糖鎖の一種であるHタイプ3構造に結合すると考えられる<sup>4)</sup>。rBC2LCNはイメージングのための試薬として有効であり、蛍光標識したrBC2LCNを用いると、培地に添加するだけでさまざまな種類のヒトES/iPS細胞を、生きたまま染色できる(図3)<sup>5)</sup>。rBC2LCNはたとえ100 μg/mLという高濃度であっても、ヒトES/iPS細胞に毒性を示さない。もちろんフローサイトメトリーへの適用も可能であり、ヒトES/iPS細胞の選択的な分離にも応用できる。

### ヒト多能性幹細胞検出技術の開発

面白いことに、このrBC2LCNが反応性を示すポドカリキシン(以後、rBC2LCN陽性ポドカリキシン)が、さまざまな種類のヒトES/iPS細胞から培養液中に分泌されていた。一方、ポドカリキシンは腎臓など他の組織にも存在するが、ヒトES/iPS細胞に特徴的なrBC2LCN陽性ポドカリキシンは調べた限り通常の体細胞からは分泌されていない。すなわち、培養液中のrBC2LCN陽性ポドカリキシンを調べることで、細胞自体を使わずに培養液を用いてヒトES/iPS細胞を検出できることになる。そこで、rBC2LCNをELISAプレートに固相化することにより培養液中のrBC2LCN陽性ポドカリキシンを捕捉して、それを検出するためのプローブとして、ポドカリキシンに提示された低硫酸化ケラタン硫酸に反応するR-10G抗体を使用したサンドイッチアッセイ系(GlycoStem-HP法)を構築した<sup>6,7)</sup>。図4に本サンドイッチアッセイの概要を示す。GlycoStem-HPは各種培養液

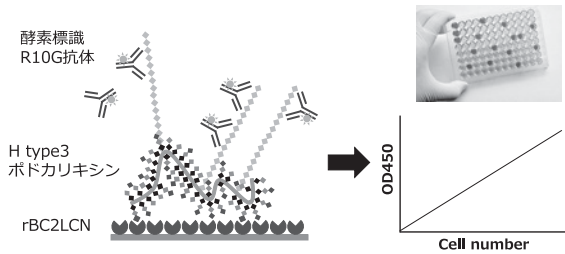


図4. GlycoStem-HP法の概要

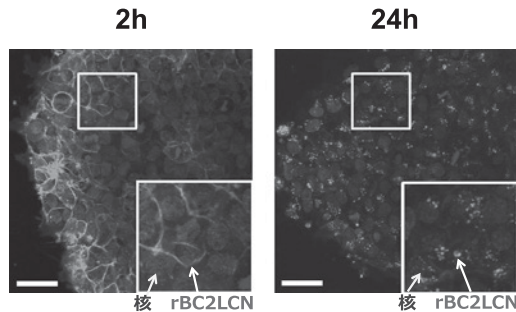


図5. ヒトiPS細胞におけるrBC2LCNの局在  
Scale bar: 50 μm

で培養したヒトES/iPS細胞の検出に適用可能であり、その検出下限値は0.0006–0.03%であった。さらに、GlycoStem-HP法が実際のヒトiPS細胞由来の移植用細胞に適用できるかどうかについて検証した。その結果、ヒトiPS細胞から作製した心筋細胞やヒト神経幹細胞中に混在するヒトiPS細胞の検出に適用可能であることがわかった。再生医療・細胞治療用の細胞加工品中に残存する未分化細胞の非破壊試験法としての活用が期待される。

### ヒト多能性幹細胞除去技術の開発

面白いことにrBC2LCNは、ヒトES/iPS細胞に結合した後に、細胞内に効率的に取り込まれることがわかった<sup>8)</sup> (図5)。rBC2LCNを薬剤キャリアとして利用すればヒトES/iPS細胞の中に薬剤を送り込むことができると着想した。細胞内に取り込まれるとタンパク質合成を阻害して細胞死を引き起こす緑膿菌由来外毒素の触媒ドメイン (domain III, 23 kDa) をrBC2LCNのC末端部分に融合させた組換えタンパク質 (rBC2LCN-PE23) を創出した<sup>8)</sup> (図6)。

rBC2LCN-PE23をヒトiPS細胞 (201B7細胞) に異なる濃度で添加して、24時間反応させた後の顕微鏡写真像を図7に示す。生きた細胞の細胞質を緑色蛍光、死んだ細胞の核を赤色蛍光で染色処理して観察した。すると、

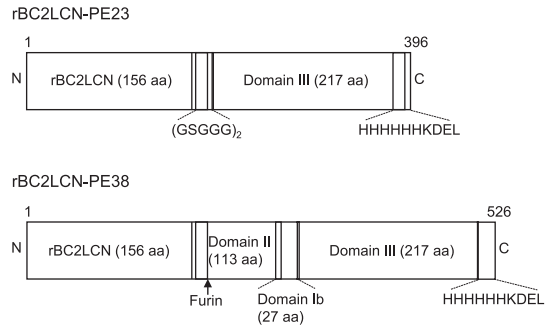


図6. rBC2LCN-PE23/-PE38のドメイン構造

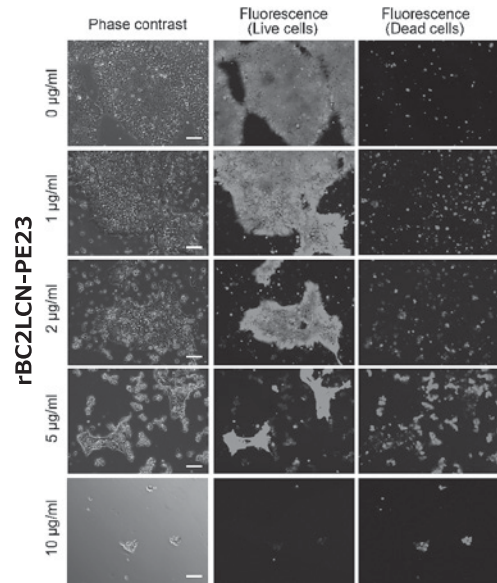


図7. ヒトiPS細胞に対するrBC2LCN-PE23の殺傷効果  
Scale bar: 100 μm

rBC2LCN-PE23を培養液に添加していない (0 μg/mL) 場合は、多くのヒトiPS細胞は培養皿に接着し、緑色蛍光で染色されたものの、赤色蛍光ではほとんど染色されなかった。つまりほとんどのヒトiPS細胞が生きていることが示された。一方、10 μg/mLのrBC2LCN-PE23を培養液に添加して24時間後、ほとんどの細胞が培養皿への接着能力を失い、培養液中に浮遊した。つまり、ほとんどのヒトiPS細胞が死んだことが示された。rBC2LCN-PE23はヒトES細胞に対しても同様の効果を示した。一方、ヒト皮膚線維芽細胞やヒト間葉系幹細胞の生存や増殖には影響を与えなかった。

最近、rBC2LCNのC末端部分に緑膿菌由来外毒素のdomain IIIに加えてdomain Ibとdomain IIを融合させたrBC2LCN-PE38を開発した<sup>9)</sup> (図6)。rBC2LCN-PE38のヒトiPS細胞201B7に対するLD50は0.003 μg/mLであり、rBC2LCN-PE23と比べると556倍高い活性を示す

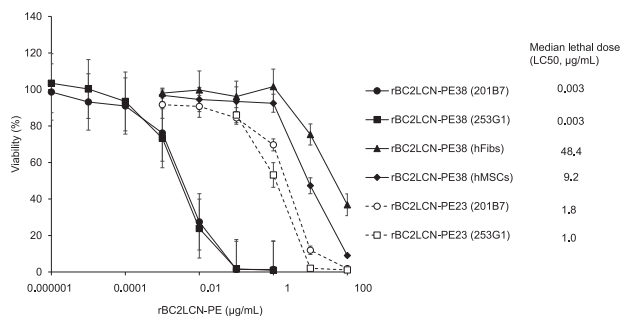


図8. rBC2LCN-PE23/-PE38のヒトiPS細胞 (201B7, 253G1), ヒト皮膚線維芽細胞 (hFibs), ヒト間葉系幹細胞 (hMSCs) への殺傷効果

ことがわかった(図8). さらに, ヒトiPS細胞由来肝細胞とヒトiPS細胞の混合培養系におけるrBC2LCN-PE38の殺傷効果について調べた. あらかじめ蛍光を導入しておいたヒトiPS細胞とヒトiPS細胞由来肝細胞を混合培養し, 0.1 µg/mLの濃度でrBC2LCN-PE38を添加して24時間反応させて, フローサイトメーターで解析した. その結果, 蛍光標識されたヒトiPS細胞だけが選択的に殺傷除去されることがわかった(図9). 以上の結果から, rBC2LCN-PE38を用いるとことで, ヒトiPS細胞由来肝細胞中に残存しているヒトiPS細胞を選択的に殺傷除去できることがわかった.

### まとめ

本稿ではヒト多能性幹細胞糖鎖の構造解析から, ヒト多能性幹細胞に特異的に結合するレクチンを用いたヒトES/iPS細胞検出・除去技術について紹介した. これら

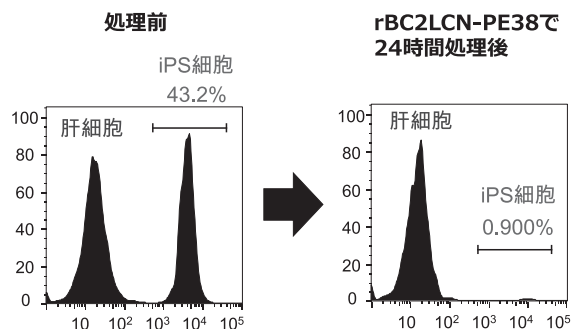


図9. ヒトiPS細胞由来肝細胞と緑色蛍光染色したヒトiPS細胞の混合培養系におけるrBC2LCN-PE38 (0.1 µg/mL) の殺傷効果

技術は富士フィルム和光純薬から実用化されており, 再生医療を目的とした研究に幅広く利用されている. 更なる検証を進め, ヒトES/iPS細胞を用いた再生医療の普及に貢献できれば幸いである.

### 文 献

- 1) Tateno, H. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **286**, 20345 (2011).
- 2) Hasehira, K. *et al.*: *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, 1913 (2012).
- 3) Tateno, H. *et al.*: *Stem Cells Transl. Med.*, **2**, 265 (2013).
- 4) Tateno, H. *et al.*: *Stem Cell Rep.*, **4**, 811 (2015).
- 5) Onuma, Y. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **431**, 524 (2013).
- 6) Tateno, H. *et al.*: *Sci. Rep.*, **4**, 4069 (2014).
- 7) Tateno, H. *et al.*: *Regen. Ther.*, **6**, 1 (2016).
- 8) Tateno, H. *et al.*: *Stem Cell Rep.*, **4**, 811 (2015).
- 9) Tateno, H. *et al.*: *Molecules*, **22**, 1151 (2017).