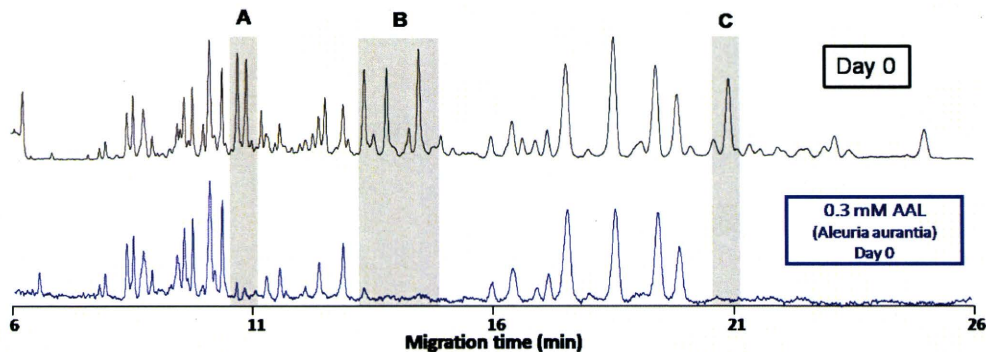
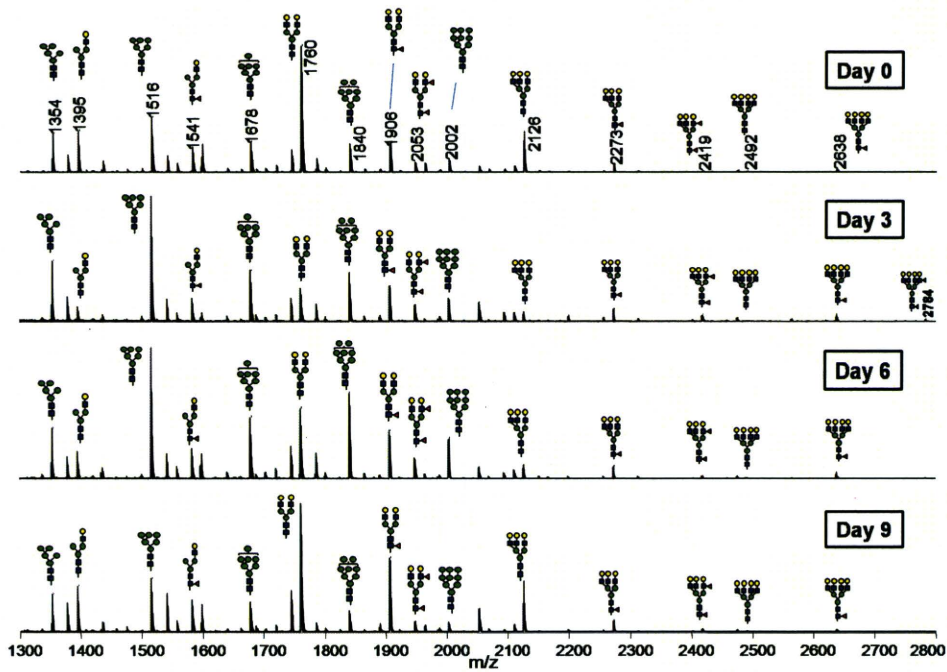


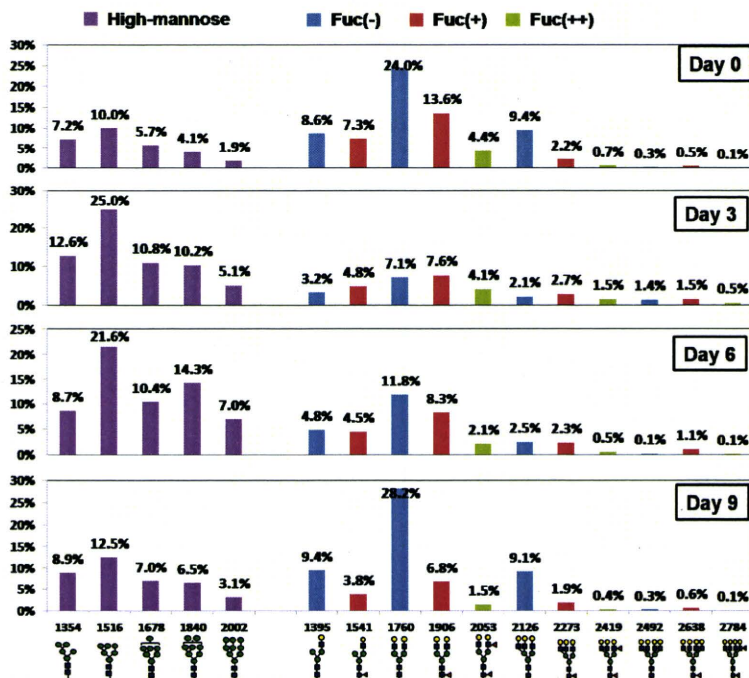
**Fig.5** Capillary electrophoresis of N-glycans in mouse P19 cells differentiated with retinoic acid. Analytical condition Capillary, DB-1 (40 cm x 100  $\mu$ m.i.d). Running buffer, 100 mM Tris-borate buffer (pH 8.3) containing 5 % polyethylene glycol (PEG 70000). Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure method (1.0 psi, 10 sec). Temperature, 25  $^{\circ}$ C. Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).



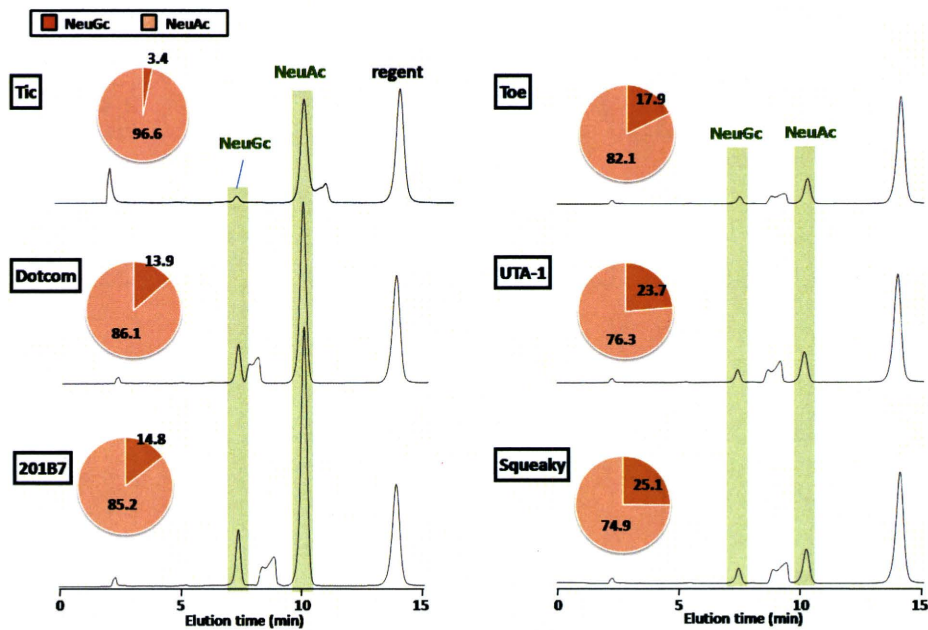
**Fig.6** Capillary affinity electrophoresis of N-glycans in ten cancer cell lines. Analytical condition Capillary, DB-1 (40 cm x 100  $\mu$ m.i.d). Running buffer, 100 mM Tris-borate buffer (pH 8.3) containing 5 % polyethylene glycol (PEG 70000) with or without 0.3 mM AAL. Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure method (1.0 psi, 10 sec). Temperature, 25  $^{\circ}$ C. Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).



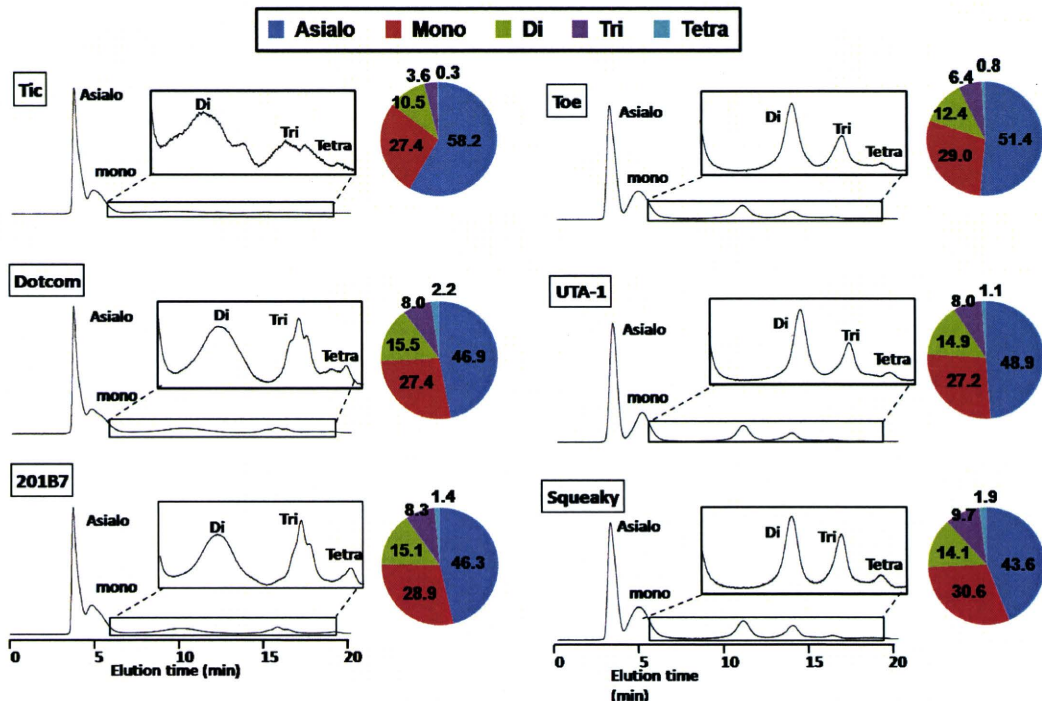
**Fig.7** MALDI-TOF MS analysis of N-glycans in P19 cell after differentiation with retinoic acid. Analytical conditions: apparatus, AXIMA resonance; polarity, negative ion mode; matrix, 2, 5-dihydroxybenzoic acid.



**Fig.8** Relative amounts of N-glycans observed in P19 cells.

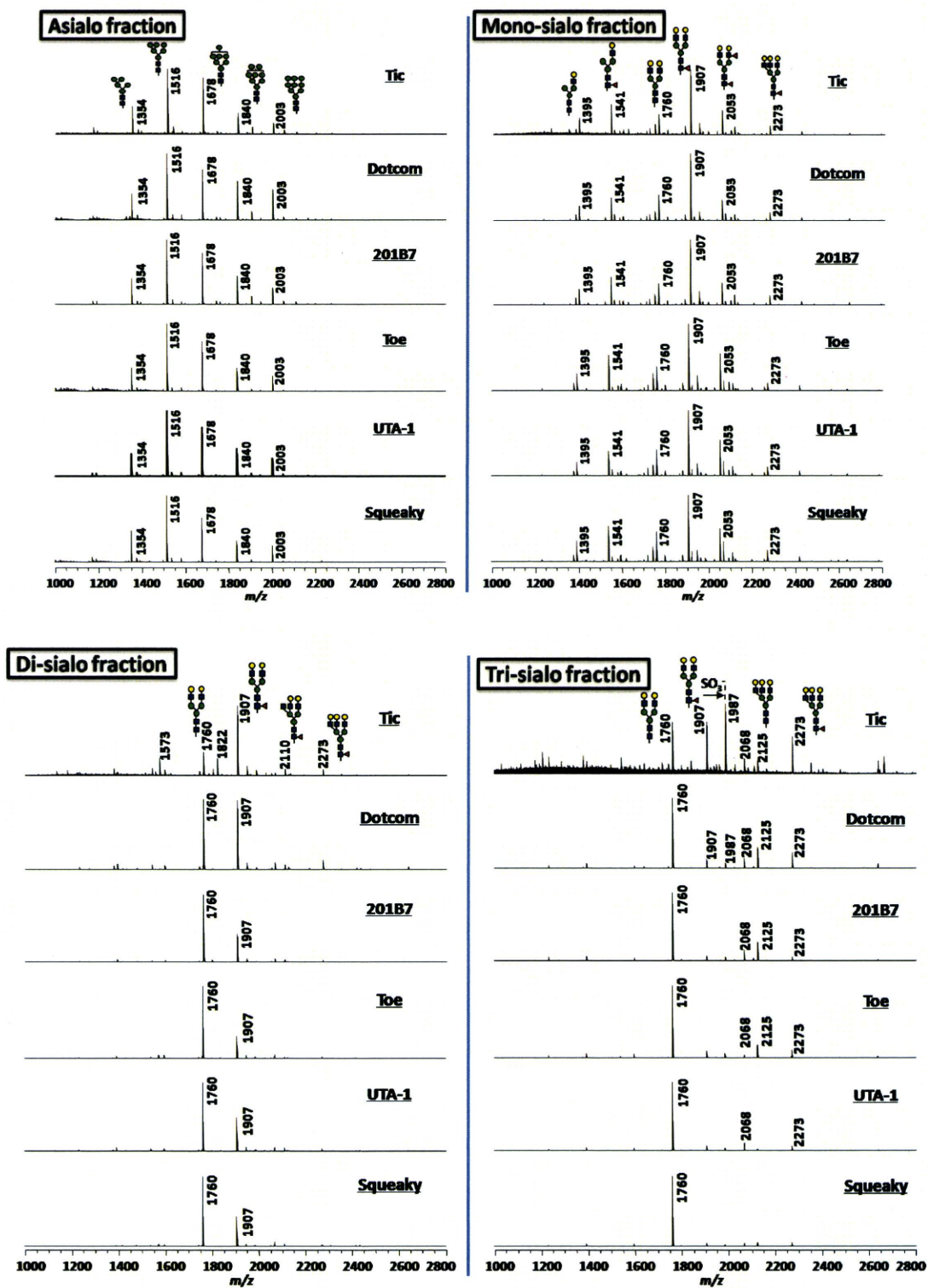


**Fig.9** Analysis of Sialic Acids in six iPS cells. Analytical condition: column, COSMOSIL 5C18-II (4.6 x 250 mm); flow rate, 0.9 mL/min; eluent, 2% Acetonitrile/14% Methanol in water; elution conditions: isocratic elution.



**Fig.10** Serotonin-affinity chromatography of N-glycans in six iPS cells. Analytical conditions; column, LA-serotonin (4.6 x 150 mm). flow rate, 0.5 mL/min. eluent; solvent A, water. solvent B, 50 mM Ammonium acetate in water. gradient conditions, a linear gradient (5-40 % solvent B) from

2 to 20 min and 1 M NaCl from 20 to 45 min.



**Fig.11** MALDI-TOF MS analysis of N-glycans in six iPS cells. Analytical conditions were the same as in Fig. 3.

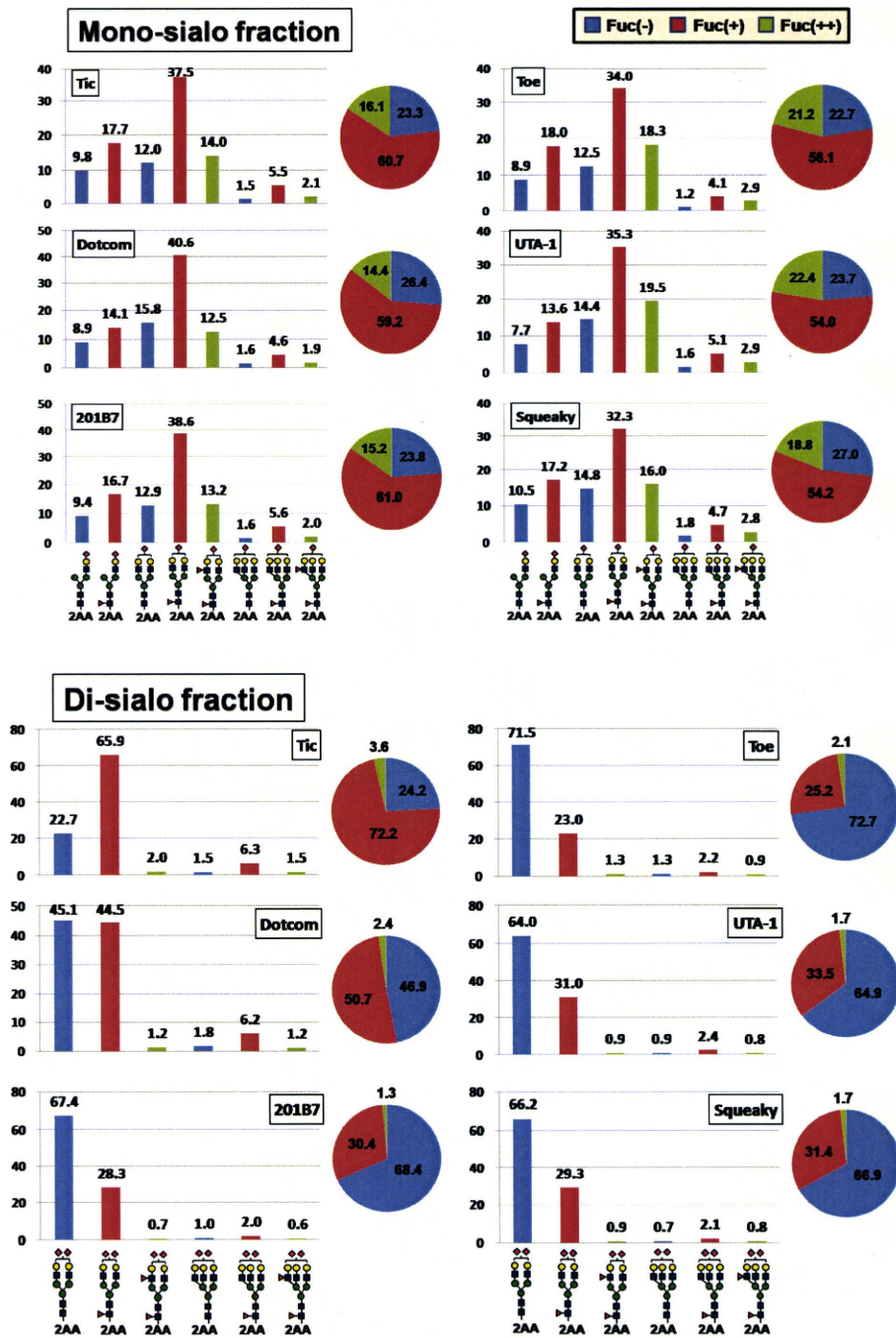


Fig.12 Relative amounts of N-glycans observed in Mono-sialo and Di-sialo fractions in six iPS cells.

Table.1

相対的リスクと特徴及び合理性から必要な試験の内容と程度を考える

患者のリスク(疾患というリスク及び時間経過に伴い増大するリスク)

VS

製品及び適用技術のリスク

[下記の各要素、特にリスク軽減要素・対策を総合的に勘案:リスクを相対化]

- 対象疾患(重篤度、緊急度、希少性、QOL 損失度等)
- 患者数(限定的であれば直接顔が見える治療となる。臨床研究・試験がそのまま治療)
- ウイルス等感染性物質(原材料細胞は可及的上流で制御、脱動物資材の使用)
- 原材料たる細胞の種類・特性(自己/同種、分化細胞/複機能性/多機能性)
- 製品の種類・特性(自己/同種、未分化細胞の残存、生理活性物質分泌能、安定性)
- 適用法、適用量、適用部位(局所/全身、細胞数、シート/構造物、腫瘍形成環境)
- 採取・移植・治療施設と従事者の専門性(高度であるほどリスク軽減効果大)
- 適用後の適切な安全性対策(副作用や健康被害への適切な対応策を前提に適用)
- 有効性(顕著な有効性が大きくリスクを上回ることによる有用性)
- ベネフィット(重篤・緊急・QOL 損失の進行停止、治療の選択肢増大も臨床的意義あり)

評価試験等にかかる時間、労力、コスト、科学的意義からみた合理性も勘案

Table.2

iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の臨床応用における MCP+ケース別  
 (細胞種・特性、製品の種類、適用法、適用疾患、開発段階別) 上乘せ例

	一般MCP	臨床研究	治験	備考
<b>製造・品質</b>				
原材料の細胞特性・品質(ヒト自己由来線維芽細胞)	△/○	○	○/◎	自己か同種により異なる
iPS樹立法		○	○	
製品加工法(RPE:網膜色素上皮細胞誘導)	○	○	○	
製品規格	中間体・最終製品	○	◎	製品の特性により項目異なる
製品の安定性	△	△	○	保存期間・運搬の有無による
	製造バリデーション		△	自己の場合:製法の頑健性
<b>非臨床安全性試験</b>				
長期培養	△		△	目的外形質転換能、未分化細胞残存
生理活性物質産生試験	(安全性薬理試験)	△(○)	△	細胞の種類・特性を勘案
免疫原性	(免疫細胞による反応)	△		可能性を考察:同種/異種由来
造腫瘍性試験				
	最終製品・中間体	△	△	多能性幹細胞;適用細胞数;部位
	未分化細胞混入	△	○	多能性幹細胞
	異所性腫瘍形成	△		多能性幹細胞;適用法;部位
軟寒天コロニー形成試験	△			in vivo試験を行うなら不要
核型分析	△	△	△	
細胞毒性				
遺伝毒性				
体内動態	○			
フィーダー細胞のバリデーション				使用しない場合不要
	セルバンク作成			
	ウイルス検査			
ベクター安全性				除去効率・残存しない場合不要
薬力学試験 non-clinical POC	○	○	○	
<b>書類整備</b>				
GPC書類(GMP図書)			○	
	製品標準書	○	○	
	三管理基準書		○	
	共通の手順書		○	
	製造SOP等	○	○	
	施設関連書類		○	
試験物概要書		○	○	
臨床プロトコール	○	○	○	
	同意説明文書	○	○	
	症例報告書		○	
対象疾患	老人性黄斑変性症			

## II. 分担研究報告書

1. 多能性幹細胞ミニマム・コンセンサス・パッケージ策定にかかる検討

末盛 博文

2. 再生医療実用化加速に資する評価基準

ミニマム・コンセンサス・パッケージ策定に関する研究

阿久津 英憲

3. 糖鎖を用いるミニマム・コンセンサス・パッケージ策定にかかる検討

掛樋 一晃

4. 海外におけるヒト細胞・組織加工製品の規制の原則に関する研究

佐藤 陽治



## 要旨

ヒト ES 細胞を中心に、その樹立培養技術の現状をふまえて、その臨床利用において問題となりうる部分を抽出し検討を行った。培養技術に関しては多くは問題は解決されつつある。一方、基礎研究から臨床研究へスムーズに展開するための指針・規則等のさらなる検討が必要である。

### A. 研究目的

ヒト ES/iPS 細胞を中心とした、多能性幹細胞の臨床研究や企業における製造承認を目指した開発を行う上で細胞由来製品の評価を効率的かつ合理的に行うために必要となる共通の施設、行程、評価や管理に関わる留意事項について、最新の科学的、技術的な知見を踏まえた整理/分析を行う。これにより、行程や管理基準についての標準化を目指して、必要に応じて各種技術の検証や改良を試みる。最終的に、産学官が共通に参照可能な、各要素に関する評価基準のミニマム・コンセンサス・パッケージの基盤とすることを目的とする。

### B. 研究方法

再生医科学研究所では、ヒト胚の提供を受けてヒト ES 細胞の作成から培養、研究者への細胞株の分配を行うバンク事業に至るまでの行程を一貫して行っている。これらの確立されたプロセスについて、ヒト ES 細胞を中心に、まず臨床応用の初期段階において必要となるその品質や安全性の確保のための要件を、関連する法規・指針、最新の科学技術、国際的動向などをふまえて、標準化を目指した分析を行うと同時のその妥当性について検証を行い、必要であれば

改良を行う。

臨床利用を目的としたヒト ES 細胞の Master Cell Bank (MCB)の構築を想定した場合、その評価基準策定は以下の様なステップに分割することができる。

1. ヒト胚の提供
2. ES 細胞株の樹立
3. 増殖と凍結保存、融解

およびこれらに加え適当な段階で細胞の品質評価を行うことになる。

それぞれの段階について、関連する指針等や技術的要件を分析・評価する

(倫理面への配慮)

京都大学再生医科学研究所におけるヒト ES 細胞株の樹立研究と使用研究は、政府指針に沿った文部科学大臣からの確認をすでに受けている。本研究はこれらの研究に含まれるものである。

### C. 研究結果

1. ヒト胚の提供に関わる問題点

ヒト胚の提供に関わる諸問題については、昨年度の報告の通り、ES 細胞作成の「原材料」となるヒト胚に関してはヒト由来組織の利用という観点からの倫理的問題と、安全性確保にかんする技術上の問題の二つについて適切な基準を設定する必要がある。

このような観点から昨年度は

- ・指針上の問題点
- ・インフォームド・コンセント (IC)に関する問題
- ・凍結胚の安全性に関する問題
- ・匿名化に関する問題

の、4つの問題について分析を行い、結果をまとめている。

平成22年11月に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(以下、ヒト幹指針)」が改正され、ES/iPS細胞の臨床研究への道筋がつけられたことになる。しかしながら、ES細胞の樹立・利用に関しては別途定めることとされている。

主な問題点はすでに分析のとおりであるが、匿名化に関しては、臨床研究に用いられる試料については連結可能匿名化が原則とされており、文科省指針との整合性をとることが困難である。

連結情報が必要とされる局面はES細胞の臨床利用においてはほとんど考えられないことは昨年度の報告に記載したとおりであるが、連結可能匿名化とする場合においては提供者の不安の軽減などについて適切な対応がとられる必要がある。

## 2 ES細胞株の樹立と培養に関する問題

### 2.1 胚培養と細胞株樹立

ES細胞株の樹立、培養に関してはすでに様々な検討がなされており、選択可能な手技は比較的整備されてきている。

培養液に関しては、完全合成培地によるヒトES細胞の培養技術の進歩により、医療応用可能と考えられるレベルのものが市販品を含めて利用可能となっている。これらの報告のある培養液について、

International Stem Cell Initiativeによる国際的な性能の比較研究が行われた。この研究では、世界的な研究をリードしている4箇所の研究機関が共同して合成系培養液の性能の比較を、同一の細胞株と各研究機関で樹立された細胞株を並行して培養することで、同一条件でどの培養液が幅広い細胞株に適用可能かどうかを比較検討した。すべての研究機関でH9細胞を対照細胞として使い、5種類の合成系培地hESF9(Cell Science & Technology Institute)、mTeSR1(Stemcell Technologies)、StemPro hESC SFM(Invitrogen)、HESc-GRO(Millipore)の比較検討が行われた。10継代後に細胞表面抗原の発現を指標に未分化状態の維持を解析した。この共同研究には我々が樹立したヒトES細胞KhES-1、KhES-3が用いられている。結果は、いずれの研究機関に置いてもmTeSR1とStemProが比較的良好な結果を示しており、従来の我々の結果を支持するものとなっている。

これらの培養液が実際に臨床研究などのヒトへのES細胞の利用に適合するかどうかについては、さらなる検討が必要である。上記の2培養液には、BSAなど動物由来の成分が含まれており、市販品についてはこれらが必ずしもBSE非汚染国由来とは限定されていない。また動物由来成分をヒト由来蛋白質に置き換える試みもなされているが、日本においてヒト化培養液の利用は困難であると考えられる。いずれの場合においても品質管理上の観点からは、化学合成品やリコンビナントタンパクへの置き換えが好ましいと考えられ、さらなる研究開発が必要である。

培養液と異なり培養基質については、ヒト細胞を用いるものの他、多くでマウスガン細胞由来のマトリックスが使用されており、これらを原材料としての適合性の検討、代替物の開発などが必要である。我々はすでにリコンビナント ヒト ラミニン蛋白質を接着基質として利用可能であることを示しているが、ラミニンは巨大な蛋白質であるため生産・精製が困難で結果として一般的には非常に高価である。これに変わりうるものとして化学合成ポリマーやポリマーとペプチドの複合体をES細胞の接着基質として利用出来ることが報告されてきている。現状ではどれぐらい幅広い細胞株で利用できるか明らかでないが、今後はこれらの合成基質の利用が進むものと期待されている。

### 2. 3 感染性物質の混入の可能性

先に述べたように、培養環境を合成系にする努力は重ねられており、短期間の維持培養に関しては受容可能な性能を持つと考えられるものもある。しかし、細胞株の樹立や良好な維持培養には以前として、マウス繊維芽細胞のフィーダーの使用が好ましいと考えるものも多い。ES細胞の培養経歴のなかにマウスなどの異種細胞の接触や、動物由来成分に接した可能性が否定できない細胞株も多いと考えられる。したがって、このような細胞の利用を想定して、検査すべき項目を明瞭にすることが必要である。

## D. 考察

ES/iPS細胞のいずれの場合にも、比較的長期間にわたる培養増殖が想定されるため、培養期間を通じて感染性物質の混入などを排除するシステムの構築が必要で

あるが、過去に作製されたなど感染可能性のある環境で培養された細胞株の利用も否定されるべきではない。したがって、たとえば、マウス由来のウイルスの否定試験については検査項目と検査法に関する基準を策定することが望まれる。

## E. 結論

ES/iPS細胞の臨床利用がもう遠い将来の話では無くなっている以上、一定の科学的合理性をもって安全性の評価基準を設定することが必要となっている。特に、ウイルス感染の可能性排除などの技法に関しては早急な基準作りが求められている。

## F.

## G.

### 1. 論文発表

Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, Aramaki T, Nishiyama A, Muguruma K, Nakano T, Suga H, Ueno M, Ishizaki T, Suemori H, Narumiya S, Niwa H, Sasai Y.

Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells.

Cell Stem Cell. 2010 Aug 6;7(2):225-39.

Adachi K, Suemori H, Yasuda SY, Nakatsuji N, Kawase E.

Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. Genes Cells. 2010 May;15(5):455-70. Epub 2010 Apr 9. PubMed PMID: 20384793

International Stem Cell Initiative Consortium, Akopian V, Andrews PW, Beil S, Benvenisty N, Brehm J, Christie M, Ford A, Fox V, Gokhale PJ, Healy L, Holm F, Hovatta O, Knowles BB, Ludwig TE, McKay RD, Miyazaki T, Nakatsuji N, Oh SK, Pera MF, Rossant J, Stacey GN, Suemori H.

Comparison of defined culture systems for feeder cell free propagation of human embryonic stem cells. In *Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010 Apr;46(3-4):247-58.

## 2. 学会発表

「ヒトES/iPS細胞の特性から見たその医療応用での問題点」

末盛博文

第6回 Chiba Neuroresearch Meeting 特別講演 (7/24 千葉)

High content analysis (HCA) によるヒトES細胞の未分化維持因子の探索  
熊谷英明、末盛博文、上杉志成、中辻憲夫、川瀬栄八郎 第33回日本分子生物学会年会 (12/7-10 神戸)

ヒトES細胞からの原条形成過程におけるクロマチン修飾因子の発現解析  
末盛博文 第33回日本分子生物学会年会ワークショップ (12/7-10 神戸)

H.

該当なし

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金  
「再生医療実用化加速に資する評価基準ミニマム・コンセンサス・パッケージ策定  
に関する研究」

分担研究者 阿久津英憲 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所生殖・細胞医療  
研究部 室長

**研究要旨：**2010 年 10 月にヒト ES 細胞を用いた第 1 相臨床試験が始まった。国立成育医療  
研究センターでは、2010 年 11 月にヒト ES 細胞樹立を報告し、再生医療応用へ向け細胞製  
造工程での課題が明白になりつつある。難治疾患に対してヒト ES 細胞を用いた細胞治療実  
現に向け、細胞治療に用いる最終産物を作成するのに必要なヒト ES 細胞を確保するのに最  
小限必要な要件、を中心に報告する。

#### A. 研究目的

1998 年にウィスコンシン大学の Thomson  
らによって多能性幹細胞であるヒト ES 細  
胞の樹立が報告されて以来、細胞治療など  
再生医療への応用の期待が世界的に高まる  
中、2010 年 10 月ついにヒト ES 細胞を用い  
た第 1 相臨床試験が急性脊髄損傷に対して  
始まった。これは、米国 Geron 社を中心と  
したグループが、ヒト ES 細胞 H1 細胞株を  
原材料としたオリゴデンドロサイト前駆細  
胞株 (GRNOPC1) を対象に亜急性期の胸部脊  
髄損傷患者の病辺部に移植する試験である  
([http://www.geron.com/patients/clinic  
al-trials/hESC.aspx](http://www.geron.com/patients/clinical-trials/hESC.aspx))。さらに、米国  
Advanced Cell Technology (ACT) 社は、ヒ  
ト ES 細胞由来網膜色素上皮 (RPE) 細胞を  
若年性遺伝性黄斑ジストロフィー症 (シュ  
タルガルト病) と萎縮型加齢黄斑変性症の  
2 疾患に対して第 1/2 相臨床試験の IND が  
FDA により承認された

([http://advancedcell.com/act-stem-cel  
l-related-research-pipeline/retinal-pi  
gment-epithelial-cell-program/](http://advancedcell.com/act-stem-cell-related-research-pipeline/retinal-pigment-epithelial-cell-program/))。国立成  
育医療研究センターでは、2010 年 11 月に  
ヒト ES 細胞樹立を報告した。難治疾患への

細胞治療応用を見据え、ヒト ES 細胞を細胞  
治療へ応用するための現状と課題をミニマ  
ム・コンセンサス・パッケージ策定へ向け  
た基盤となるべく検討していく。

#### B. 研究方法及び研究結果

##### 1. 細胞治療に用いるヒト ES 細胞

ヒト ES 細胞は生殖補助医療の過程で治  
療に用いられなくなった胚 (余剰胚) から  
樹立される。現在、本邦においては、ヒト  
ES 細胞樹立は、「ヒト ES 細胞の樹立及び分  
配に関する指針 (文部科学省告示第八十六  
号)」

に則って行われる。臨床研究に用いること  
を考慮した場合のインフォームド・コンセ  
ントを含めた倫理的手続きと安全性確保に  
関する技術的課題に関しては、「再生医療実  
用化加速に資する評価基準ミニマム・コン  
センサス・パッケージ策定に関する研究」  
の平成 21 年度分担報告書 (末盛博文:P70-)  
に詳しい。本研究報告では、胚盤胞から ES  
細胞を樹立する過程を初期の細胞株化過程  
と拡大培養過程に分け、臨床研究応用を見  
据えた場合考慮しなければならない項目を  
明確していく。当センターでは、ヒト ES 細

胞樹立研究を行っているが、初期の細胞株化過程とは、胚盤胞の内部細胞塊から増殖を認めた細胞塊を非酵素的に分離・継代していく過程である。非酵素的に細胞継代を行うため、細胞を増やすことの確実性はあるが十分な細胞数を得ることはできない。細胞が一定数得られ、酵素的細胞継代によっても培養維持できるようになることを拡大培養過程としている。この過程で、出発原料としての各種検査を行い、細胞を増やし保存するマスターセルバンク化を行う。出発原料として特性解析は、未分化性や分化多能性の ES 細胞性質に関わる解析と染色体核型解析、細胞増殖性、細胞形態、そして細菌、真菌、ウイルス及びマイコプラズマ否定試験が行われる（図 1）。フィーダー細胞を使用する場合はガイドラインを参考にして、その特性と微生物学的安全性を担保する必要がある。

## 2. ヒト ES 細胞の再生医療応用に必要な技術的要件

主に以下の 4 つが上げられる。①均一な細胞性質を保つ培養工程を確立することが必要で、培養過程で未分化状態が維持されている性質の保証が必要である。基本的な ES 細胞の特性解析に加え、それぞれが目的とする細胞または組織が十分に得られる分化誘導が可能であることを検定する必要がある。②細胞の品質基準と管理体制を整備する。細胞の品質検査としては、図 2 のような項目が検討される。ES 細胞は多能性幹細胞であり、細胞が無尽蔵に得られる利点は同時に長期間の培養が必要である。③長期培養工程における細胞品質の管理と評価法の確立と④感染性因子混入リスクの管理である。

ES 細胞の内在する特性として分化多能性があるが、細胞移植の際に懸念される腫瘍化の試験を出発原料の段階で行う意義があるか検討が必要である。分化誘導して得られる最終産物内に奇形腫形成能を有する細胞の混入の有無を確認することは重要であるが、出発原料としての段階で内在特性である造腫瘍性確認試験に意義を見出すことは難しい。ただし、ES 細胞が移植対象になるような条件であれば、造腫瘍性試験として形成した奇形腫内に明らかな悪性組織の有無や移植したレシピエント免疫不全マウスの移植以外の組織や臓器に転移性を示す所見の有無等を行う必要がある。

## 3. ヒト ES 細胞を用いる臨床研究の課題

出発原料として特性解析した細胞株をマスターセルとし次の各段階へ応用する。細胞治療に用いる最終産物の有効性評価を含めた品質評価は各治療条件に対応した評価を行うが、この場合造腫瘍性試験は重要な項目となる。臨床研究を見据えたヒト ES 細胞の出発原料は、初期の細胞株化段階において既存の細胞株をゼノフリー培養環境、フィーダーフリー培地や無血清培地などの特定の条件に適応化させた細胞株を特性解析しマスターセルバンク化することが可能と考えられる。

十分な治療効果と安全性を担保した細胞治療にとって重要な課題は、治療に足る十分な細胞数を得ることであり、その細胞と細胞由来製品調整工程では品質管理と追跡可能性が確保され、各種の汚染を防いで良質な細胞を提供しなければならない。通常自己移植利用が多く保存を必要とするケースが極めて少ない組織幹細胞とは異なり、

ヒト ES 細胞は基本的に特性解析により品質と各種感染性が否定された安全な未分化幹細胞のマスターセルバンク構築が重要である。バンク化する幹細胞は規格化された明確な基準に則って、目的の機能をもつ十分量の細胞を創出することも保障しなければならない。

### C. 考察および結論

ヒト ES 細胞を用いた細胞治療における細胞及び細胞調整工程で考慮すべき点としては大きく 2 つに分けられる。一つは、他の組織幹細胞を用いる場合のように細胞の調整・加工工程や移植・投与工程等に係る多くの細胞治療が含有するリスクであり、もう一つはこの ES 細胞の性質に起因する事象である。前者については、組織幹細胞を用いた臨床研究において細胞・組織を製品化する際の取扱いに関する基準として細胞組織由来製品の採取、調整、出荷において、感染、試料取違えや異物混入等の予防策をまとめた GTP が整備される。細胞の調整・加工工程や移植・投与工程等に係る安全性を担保するために、ヒト幹細胞や調整工程に由来する感染症の伝播の危険性が懸念されるため、細菌、真菌、ウイルス等に汚染されていない原料の使用、調整工程中における汚染の防止等を図ることは当然ながらヒト ES 細胞を用いた細胞治療にも必須である。ヒト ES 細胞は樹立の段階から考慮されるべきであるが、初期の細胞株化段階での各種条件への適応化をした細胞株を出発原料として特性解析し品質と安全性を確保することが有用であると思われる。出発原料としての特性解析として造腫瘍性試験は必須でないと考えられるが、分化誘導

した最終産物となる細胞の造腫瘍性を否定する品質評価試験は必須である。ES 細胞株由来細胞の製造工程や工程管理を先端の知見と技術を応用しより安全性の高い最終製造物を提供することが重要である。

### D. 研究発表

#### 1. 著書

- 1) Chowdhury MM, Katsuda T, Montagne K, Kimura H, Kojima N, **Akutsu H**, Ochiya T, Fujii T, Sakai Y. Enhanced effects of secreted soluble factor preserve better pluripotent state of embryonic stem cell culture in a membrane-based compartmentalized micro-bioreactor. *Biomed Microdevices*. 2010; 12(6):1097-1105.
- 2) Sasaki N, Hirano T, Kobayashi K, Toyoda M, Miyakawa Y, Okita H, Kiyokawa N, **Akutsu H**, Umezawa A, Nishihara S. Chemical inhibition of sulfation accelerates neural differentiation of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 401(3):480-486.
- 3) Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, Takahashi Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, **Akutsu H**, Umezawa A. Defining hypo-methylated

- regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. *PLoS One*. 2010; 5(9):e13017.
- 4) Adachi T, Wang X, Murata T, Obara M, **Akutsu H**, Machida M, Umezawa A, Tomita M. Production of a non-triple helical collagen alpha chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. *Biotechnol Bioeng*. 2010; 106(6):860-870.
  - 5) Stadtfeld M, Apostolou E, **Akutsu H**, Fukuda A, Follett P, Natesan S, Kono T, Shioda T, Hochedlinger K. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010; 465(7295):175-181.
3. 学会発表
- 1) **H Akutsu**. “Xeno-Free Growth and Expansion of Human Pluripotent Stem Cells”, Commercial Tutorial Directory; ISSCR 8<sup>th</sup> annual meeting, San Francisco, CA USA. 18<sup>th</sup> Jun, 2010
  - 2) 阿久津英憲：「臨床グレード幹細胞樹立の試み」第28回日本ヒト細胞学会学術集会シンポジウム，つくば市，8月23日，2010年.
  - 3) **H Akutsu**. “xeno-free growth and expansion of human pluripotent stem cells”, Symposium 7; The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Sapporo, 1<sup>st</sup>-4<sup>th</sup> Sep, 2010.
- E. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) 特許取得  
なし
  - 2) 実用新案登録  
なし
  - 3) その他  
なし



図 1

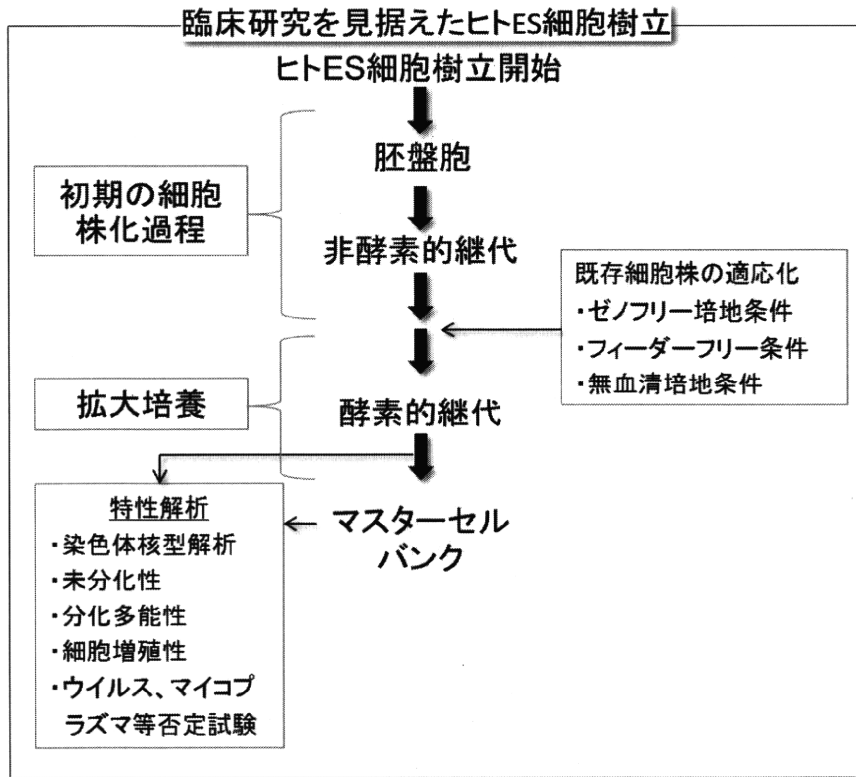


図 2

Features	Criteria
Population doubling time	36 h
FGF dependence	Yes
Ability to differentiate	Yes
Stable Karyotype	Yes
SSEA-1	Absent
SSEA-4	Present
TRA-1-60	Present
TRA-1-B1	Present
Oct 4	Present
Nanog	Present
Sox2	Present
Brachyury	Absent
Pax6	Absent
AFP	Absent

Carpenter et al (2009) Nature Biotech 27(7): 606-613.

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化加速に資する評価基準ミニマム・コンセンサス・  
パッケージ策定に関する研究  
糖鎖を用いるミニマム・コンセンサス・パッケージ策定にかかる検討

研究代表者 早川堯夫 近畿大学薬学総合研究所  
分担研究者 掛樋一晃 近畿大学薬学部・薬学総合研究所

## 研究要旨

再生医療において多種多様で固有の特性を有するヒト幹細胞や人工多能性幹細胞を取り扱う場合、原材料としての細胞、中間製品としての細胞、最終製品としての特定の細胞、混在する可能性のある細胞などの様々な特性を把握し、細胞を確認・同定、識別し、細胞の品質を管理するための方法論を確立する必要がある。すなわち、様々な特性を持つ細胞のタンパク質や糖鎖を迅速、簡便、かつ特異的・定量的に解析、識別する方法を開発することと、産・学・官が共通に参照でき、活用できる評価基準を策定することは、再生医療実用化を加速するうえで不可欠である。本研究では、細胞の糖タンパク質糖鎖解析技術を再生医療実用化のための細胞特性解析技術として応用を目指した。本年度は、初年度開発項目として取り組んだアスパラギン結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリング法について、糖鎖を指標とする細胞特性解析技術としての適用可能性について検証するとともに、幾つかの人工多能性細胞（iPS細胞）の糖鎖プロファイリングへと適用した結果について報告する。

### A. 研究目的

治療効果を有する細胞を直接あるいは増殖、薬剤処理、遺伝子改変、分化などの加工を行い治療目的のための細胞を作製し体内に移植すること、増殖・分化能を有する細胞をヒト体内に移植する「再生医療」分野で、その技術の実用化に向けた研究が活発となっている。また、「再生医療」の実用化に向けては、製品の品質や安全性等を確保する上で、原材料としての細胞、中間製品としての細胞、最終製品としての特定の細胞、あるいは混在する可能性がある細胞の特性を把握し、細胞を確認・同定、識別し、細胞の品質を管理する方法論の確立は再生医療実用化に向けた急務である。

再生医療における細胞の特性・品質の管理では、細胞表面上のタンパク質が分化あるいは未分化マーカーとして専ら利用され

ている。一方、細胞表面の糖タンパク質糖鎖は糖鎖遺伝子の発現パターンの変動から、糖鎖構造が変化し、さらに細胞の分化度によっても変化することから分化あるいは未分化マーカーの策定の有力な標的として期待できる。しかしながら、細胞表面に発現する糖鎖は多種多様であり、糖鎖を分化あるいは未分化マーカーとして応用していくためには、細胞表面糖鎖の網羅解析から発現糖鎖プロファイルを明らかにし、未分化あるいは分化による発現糖鎖プロファイルの変動を明らかにしなければならない。

以上のような背景の下、本研究では平成21年度、本研究課題において開発したアスパラギン結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリング法について、細胞特性解析技術としての適用可能性について、薬剤による細胞の分化誘導の評価法として実行可能性を検

証するとともに、幾つかの人工多能性細胞 (iPS 細胞) の糖鎖プロファイリングへと適用した結果について報告する。

## B. 研究方法

### B.1 マウス P19 細胞の培養と分化誘導

マウス胚性腫瘍細胞 (P19) を 500 nM レチノイン酸を含む  $\alpha$ MEM 培地を用いて 3 日間培養し凝集塊を形成させた。凝集塊を 0.25 % -Trypsin/1 mM-EDTA にて処理後回収し、5 分間遠心(800 rpm)し、PBS で細胞を洗浄後レチノイン酸を含まない  $\alpha$ MEM 培地によりポリ-L-リジンコートディッシュ上に播種し、神経細胞へと分化誘導させた。

### B.2 iPS 細胞の培養と回収

6 種類の iPS 細胞はマウスフィダー細胞 (MEF, Reprocell) を播種した培養ディッシュ上で培養した。サブコンフルエント状態の細胞を PBS で数回洗浄後、PBS/1 mM-EDTA を加え 37°C で 5 分間静置後、培養ディッシュ全体を水平方向に叩きながら、細胞が剥がれていることを確認し、細胞を 15mL チューブに回収した。5 分間遠心(800 rpm)し、細胞を回収した。

### B.3. 細胞糖タンパク質分画の調製

マウス培養癌細胞 (P19) および 6 種類の iPS 細胞は 1 M EDTA を含む PBS (50  $\mu$ L) 中に懸濁し、2 M Thiourea および 5 M Urea 水溶液 (267  $\mu$ L)、1 M DTT (16.7  $\mu$ L) および Benzonase 溶液 (125 units) を加え室温で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、12000 g、15 分間遠心分離後の上清を回収した。回収した上清に 5% 酢酸、5% 水、5% トリエチルアミンを含むアセトン溶液を加え、-20°C で 30 分間タンパク質を沈殿させたのち、12000 g、15 分間遠心分離した。

得られた沈殿に 75% EtOH を加え、12000 g、15 分間遠心分離後の沈殿を細胞総タンパク質として糖鎖分析に用いた。

### B.4. N-結合型糖鎖の遊離と蛍光標識

総タンパク質分画を SDS、2-ME、NP-40 を 1% ずつ含むリン酸緩衝液 (pH 7.5、50  $\mu$ l) で懸濁した後、N-glycanase F (2 unit) を加え、37°C で 12 時間酵素反応を行った。反応後、冷 EtOH (50  $\mu$ l) を加え 12000 g で 15 分間遠心分離し上清を濃縮乾固した。回収した試料に 2 アミノ安息香酸および NaBH<sub>3</sub>CN をそれぞれ 3% 含む 2% ホウ酸 /4% 酢酸ナトリウム/MeOH 溶液を 100  $\mu$ l 加えて 80°C で 1 時間加温した。反応後 Sephadex LH-20 のゲルろ過クロマトグラフィーにより最初に溶出される蛍光性画分を回収し細胞膜タンパク質由来 N 結合型糖鎖とした。

### B.5 セロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる糖タンパク質糖鎖の分画

ポンプには JASCO PU-980 型、検出器には JASCO FP-920 型蛍光検出器を使用し、流速 0.5 mL/ min で分析した。カラムは LA-Serotonin (Japan Oil Mills, 4.6 x 150 mm) を用い、カラム温度は 25 °C とした。検出は励起波長(Ex) 350 nm、蛍光波長(Em) 425 nm により行った。移動相の溶液 A には水、溶液 B には 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液を用いた。グラジエント条件は、試料注入後 2 分間溶出液 B 5% とし、溶出液 B が 37 分後に 75% となるように直線グラジエント溶出を行い、その後 10 分間で溶出液 B が 100% となるようにした。

### B.6 キャピラリー電気泳動による N-結合型糖鎖の分析

装置には Beckman MDQ (Beckman Coulter) を用い、キャピラリーは DB-1 キャピラリー (内径 100  $\mu\text{m}$ 、全長 40 cm)、緩衝液は 10%PEG70000 を含む 0.1 M トリスホウ酸緩衝液 (pH 8.3) を用いた。印加電圧は 25 kV、カラム温度は 25 $^{\circ}\text{C}$ 、試料注入は加圧法 (1 psi) により 5 秒間とした。また、検出は He-Cd レーザー励起蛍光検出 (励起 325 nm、蛍光 405 nm) で行った。

### B.7. MALDI-TOF MS

装置には AXIMA-Resonance (Shimadzu 製) を用い、リニアール/ポジティブイオンモードにより測定した。試料は 10 mg/mL DHB/MeOH 溶液と等量混合し試料プレート上で風乾させた。

### B.8. iPS 細胞のシアル酸分析

細胞より回収したアスパラギン結合型糖鎖混合物の凍結乾燥物に水に 10  $\mu\text{L}$  と 0.2 M HCl (10  $\mu\text{L}$ ) を加え、80  $^{\circ}\text{C}$  で 40 分間加水分解を行った。加水分解後、室温まで冷却後、0.7 M DMB 試薬 (80  $\mu\text{L}$ ) 加え、50  $^{\circ}\text{C}$  で 150 分間誘導体化反応を行った。反応後、10  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入し、シアル酸分析を行った。ポンプには JASCO PU-980 型、検出器には JASCO FP-920 型蛍光検出器を使用し、流速は 0.9 ml/min とした。カラムは逆相分配 (ODS) カラム (COSMOSIL 5C18-AR-II; 4.6 x 150 mm) を用い、検出波長は励起波長 375 nm、蛍光波長 448 nm とした。溶出は 2%MeCN/14%MeOH 溶液を用い、アイソクラティック溶出にて行った。

## C. 研究成果

### C.1 マウス P19 細胞の分化誘導に伴う糖鎖の変化の解析

幹細胞の分化誘導に伴う糖鎖構造の変化

については、血液型抗原糖鎖である LewisX がマウス ES 細胞に高発現し、胚体外内胚葉細胞や筋原細胞への分化に従い発現が抑えられること、また、糖脂質糖鎖である SSEA-3,4 は幹細胞の分化の進行に伴い急速に減少することなどが報告されている。このことから幹細胞の選別や分化度を評価する上で細胞の糖鎖は有効な指標となりうると考えられる。そこで、糖鎖を指標とした細胞評価技術について、分化誘導評価技術としての実行可能性について検証した。モデルとして、神経細胞へと分化するマウス胚性腫瘍細胞 P19 を用い、分化に伴う糖鎖の変化を追跡した。

マウス胚性腫瘍細胞 P19 を、レチノイン酸 (500 nM) を含む培養液中で分化誘導させた。3 日後、形成した細胞凝集塊を回収し、細胞を分散させ、ポリ-L-リジンコートした細胞培養用ディッシュに播種した後、レチノイン酸を含まない培養液を中で 9 日間培養し神経細胞へと分化誘導させた。分析に用いる細胞は分化誘導開始後、0 日目 (初日)、3 日目、6 日目、9 日目の細胞を用いた。糖鎖試料は各細胞から総タンパク質分画を抽出後、糖鎖を切り離し、2AA にて蛍光標識したものを分析用試料とし、キャピラリー電気泳動にて分析した。結果を Fig.1 に示す。

分析の結果、8~15 分にシアロ糖鎖、15 分以降にハイマンノース/アシアロ糖鎖によるピーク群が観察され、分化誘導後 0~9 日目でそれぞれ固有の糖鎖プロファイルを示すことが分かる。Day0 で示す細胞 (初日) では 30 種類以上の多様なシアロ糖鎖に由来するピーク群が観察された。一方、3 日目、6 日目の細胞では 8~15 分に観察されるシアロ糖鎖のピーク群が著しく減少し、分化過程ではシアリル化が減少する傾向が見られた。また、神経細胞に分化した 9 日