

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。このような背景の下、本研究課題では再生医療実用化加速のための細胞特性解析技術として糖タンパク質糖鎖を指標とする解析技術の開発ならびにそれらの有用性と実行可能性を評価してきた。本年度は、前年度までに開発してきた糖鎖プロファイリング技術を活用し、各種幹細胞の培養工程からの異種動物由来糖鎖の混入の有無を調査するとともに、その混入原因を調査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。一方、「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や成分の特性を把握し、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となりつつある。

iPS 細胞などの各種幹細胞を利用する

再生医療実用化において、その臨床応用に向けては細胞治療材料としての有用性だけでなく、異種動物由来成分の混入による抗原性などの安全性の面においてのいくつかの問題も残されている。一般に各種幹細胞の培養では、細胞の樹立段階さらに未分化能を維持するために、異種動物由来成分を含む材料を用いて培養されるが、それらの成分が iPS 細胞等に混入し、抗原性を示す可能性は否定できない。再生医療に用いる各種幹細胞の特性・品質の管理では、細胞の分化・未分化の程度、移植に用いる細胞集団としての均一性などだけに留まらず、生物由来製品としての安全性にも十分に留意しなければならない。

以上のような背景の下、本年度は各種

幹細胞の培養工程で混入しうる異種動物由来成分に着目し、前年度までに開発した糖鎖プロファイリング技術を活用し、異種動物由来成分を含む材料を用いて培養された iPS 細胞における異種動物由来糖鎖の混入の有無を調査した結果について報告する。また、iPS 細胞中に観察された異種動物由来糖鎖の混入原因を調べた結果についても報告する。

## B. 研究方法

### B.1 iPS 細胞の培養

2 種類の iPS 細胞 (Toe、UTA-1) はマイトマイシン C 処理した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血清代替物 (Knockout Serum Replacment: KSR) を含む培養液を用いて培養した。細胞は PBS (-) で 3 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、コロニーを形成する細胞のみを剥離させた。剥離させた細胞は 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。上清を捨て新たに PBS (-) 10mL を加えて細胞を分散させながら洗浄し、5 分間遠心(800 rpm)した。遠心分離後、上清の PBS を捨て細胞を回収した。

### B.2. 細胞糖タンパク質分画の調製

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.3. 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 時間加熱した。反応後 SephadexLH-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.4 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 Shimadzu LC10-ADVP、検出器には Waters 2475 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.5 順相分配型 HPLC による N-結合型糖鎖の分析

カラムには TOSOH Amide80 (4.6 mm x 250 mm、東ソー) を用い、溶離液 A を 2% CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>CN、溶離液 B に 5% CH<sub>3</sub>COOH, 3% Triethylamine/H<sub>2</sub>O を用いた。溶出は 70% の溶離液 A によりあらかじめ平衡化した後、80 分で溶離液 B が 95% となるように直線グラジエント溶出を行った。また、検出は励起波長 350 nm、蛍光波長 425 nm で蛍光検出した。分離された糖鎖は AXIMA-Resonance (Shimadzu) を用い、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) を試料マトリックスとしてリニア/ネガティブイオンモードにより測定した。

### B.6. MALDI-TOF MS

装置には AXIMA-Resonance (Shimadzu) を用い、リニア/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.7. iPS 細胞のシアル酸分析

細胞より回収した N-結合型糖鎖混合物の凍結乾燥物に水に 10  $\mu$ L と 0.2 M HCl (10  $\mu$ L) を加え、80 °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  $\mu$ L) 加え、50 °C で 150 分間誘導体化反応を行った。反応後、10  $\mu$ L を HPLC に注入し、シアル酸分析を行った。ポンプには Shimadzu LC10-ADVP、検出器には Waters 2475 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 iPS 細胞の N-結合型糖鎖解析

iPS 細胞をはじめとする各種幹細胞を再生医療実用化に応用するためには安全性の面で解決すべき問題点が残されている。例えば、培養の際に使用するフィーダー細胞の混入や血清などの異種動物由来成分の混入については、それらが免疫原性を示しうることに留意しておかなければならない。iPS 細胞は、最終製品に至るまでの工程において、マウス胎児組織由来のフィーダー細胞

(MEF)、動物血清あるいは血清代替物 (KSR)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) 等の異種動物由来成分を添加した培養液を用いて培養される。そのため、異種動物由来成分の混入は不可避免であるが、それらが免疫原性を示す可能性があることを考えた場合、混入しうる異種動物由来成分を明らかにし、それらの混入を防ぐ方策を講じなければならない。ここでは培養過程で異種動物由来成分を含む材料を用いて培養されたヒト iPS 細胞 (Toe、UTA-1) の N-結合型糖鎖の網羅的解析を行い、異種動物由来糖鎖混入の有無について調査した。

Toe と UTA-1 の 2 種類の iPS 細胞から N-結合型糖鎖を調製し、2-アミノ安息香酸 (2-AA) により蛍光標識化後、シアル酸残基数に基づきセロトニンアフィニティークロマトグラフィーで分画した結果を Fig. 1 に示す。Toe と UTA-1 のアシアロ/ハイマンノース型糖鎖分画をそれぞれ 73.0、74.7% 含み、MALDI-TOF MS による分析から、マンノース 5、6、7、8、

9 残基からなるハイマンノース型糖鎖が主要な糖鎖であった。モノシアロ糖鎖分画については Toe と UTA-1 にそれぞれ 20.0、17.2% 含み、MALDI-TOF MS による分析から、いずれの細胞でも複合型 2 本鎖糖鎖にフコースが 1 あるいは 2 残基修飾した糖鎖が高い含量を示した。なお、いずれの細胞でもアシアロ/ハイマンノース型糖鎖分画とモノシアロ糖鎖分画を合わせて N-結合型糖鎖の 90% 以上を占め、ジシアロ分画、トリシアロ分画、テトラシアロ分画の含量は低かった。次に、各シアロ糖鎖分画を MALDI-TOF MS にて解析すると、N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) により修飾されたと考えられる糖鎖より  $m/z$  16 大きなイオンシグナルが観察されたことから、各シアロ糖鎖分画には、N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) により修飾を受けた糖鎖が含まれることがわかった。

次に、テトラシアロ分画を除く 4 分画について、シアリダーゼ処理を行いアシアロ糖鎖としたものについて、順相分配モードの HPLC により分離し、分離された各ピークを分取し、MALDI-TOFMS にて分析した。結果を Fig. 2 と Table 1 に示す。アシアロ/ハイマンノース型糖鎖分画ではピーク 4、5、6、10 のハイマンノース型糖鎖の他、ピーク 7 と 9 のフコースによる修飾を受けた複合型 2 本鎖糖鎖が共通して観察された。モノシアロ分画ではピーク 15、16、18 のフコースが 0~2 残基付加した複合型 2 本鎖糖鎖が共通して観察された他、フコースを 1 残基持つ複合型 3 本鎖糖鎖であるピーク 18 も両方の細胞に観察された。ジシアロ分画では Toe 細胞でフコースを持たない複合型 2 本鎖糖鎖であるピーク 19 とフコースを 1 残基持つ複合型 2 本鎖糖鎖であるピーク

20 の糖鎖が主要な糖鎖として観察された。一方、UTA-1 細胞では、複合型 2 本鎖糖鎖にさらにヘキソースが 1 あるいは 2 残基付加した分子量に相当する 2068 (ピーク 21) と 2085 (ピーク 22) に相当する糖鎖が観察された。これらの糖鎖は複合型 2 本鎖糖鎖の非還元末端 Gal にさらに  $\alpha$  1-3 結合した Gal を有する  $\alpha$  Gal エピトープを持つと考えられる糖鎖であると考えられた。

トリシアロ分画ではいずれの細胞からも複合型 2 本鎖糖鎖 (ピーク 23、24、26) と複合型 3 本鎖糖鎖 (ピーク 25) が観察された。一般にヒト細胞では複合型 2 本鎖糖鎖にシアル酸が 3 残基付加した糖鎖は生合成されないため観察されない。一方、マウスやラットなどのげっ歯類では複合型 2 本鎖糖鎖にシアル酸が 3 残基付加した糖鎖を生合成しうることから、ピーク 23、24、26 のトリシアロ 2 本鎖糖鎖は異種動物由来成分に由来すると考えられた。

## C.2 iPS 細胞中に観察される異種動物由来 N-結合型糖鎖の MSMS による解析

前項のヒト iPS 細胞 (Toe、UTA-1) の N-結合型糖鎖の網羅的解析の結果、N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) により修飾を受けた糖鎖や  $\alpha$  Gal エピトープを持つと考えられる糖鎖が観察された。そこで、これらヒト以外の異種動物に特有の糖鎖についてイオントラップ型質量分析計を用いた MSMS 解析を行い、構造解析を行った。

最初に複合型 2 本鎖糖鎖末端に N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) を 1 残基持つと考えられる  $m/z$  2067 のイオンをプレカーサーイオンとして MSMS 解析した結果を Fig. 3 に示す。 $m/z$  2067 をプレカ

ーサーイオンとして MSMS 解析すると、 $m/z307$  (NeuGc- $H_2O$ ) 小さな  $m/z1760$  のイオン ( $Y_{7c}$ ) が観察されたことから、 $m/z2067$  は非還元末端に N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) を 1 残基持つ糖鎖であることがわかった。さらに、 $MS^2$  により生じた  $m/z1760$  のイオンをプレカーサーイオンとして  $MS^3$  解析した結果、Gal-GlcNAc が順次脱離した  $m/z1395$  ( $Y_{5a}$  or  $Y_{5b}$ ) と  $m/z1030$  ( $Y_{5c}/Y_{5d}$ ) のフラグメントイオンが観察され、還元末端側に GlcNAc-GlcNAc-2AA ( $m/z544$ ,  $Y_3$ ) を持つフラグメントも観察されたことから、複合型 2 本鎖糖鎖を基本骨格とする糖鎖であることがわかった。以上の結果から、 $m/z2067$  を示すモノシアロ糖鎖は非還元末端に N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) を 1 残基持つ複合型 2 本鎖糖鎖であることがわかった。

次に、 $\alpha$  Gal エピトープを持つと考えられる  $m/z2068$  のイオンをプレカーサーイオンとして MSMS 解析した結果を Fig.4 に示す。 $m/z2068$  をプレカーサーイオンとして MSMS 解析すると、 $m/z544$  質量の小さな Gal-Gal-GlcNAc が脱離した  $m/z1541$  のイオン ( $Y_{5a}$ ) が観察されたことから、 $m/z2068$  は非還元末端に  $\alpha$  Gal エピトープを持つ糖鎖であることがわかった。また、還元末端側にフコースを持つ GlcNAc-GlcNAc-2AA ( $m/z690$ ,  $Y_3$ ) を持つフラグメントも観察された。以上の結果から、 $m/z2068$  の糖鎖はコアフコースを持つ複合型 2 本鎖糖鎖を基本骨格とし、非還元末端に  $\alpha$  Gal エピトープを持つ糖鎖であることがわかった。

以上、異種動物由来成分を含む材料を用いて培養されたヒト iPS 細胞 (Toe、UTA-1) の N-結合型糖鎖の網羅的解析の結果、 $\alpha$  Gal エピトープや N-グリコリル

ノイラミン酸 (NeuGc) を持つ糖鎖などのヒトでは生合成されない糖鎖が観察された。このことから、異種動物由来成分を含む材料を用いて iPS 細胞を培養した場合、異種動物由来糖鎖が混入しうることがわかった。

### C.3 iPS 細胞培養過程で用いる異種動物由来成分の N-結合型糖鎖解析

iPS 細胞をはじめとする各種幹細胞の培養の際に使用するフィーダー細胞の混入や血清代替物などの異種動物に由来する成分の混入については、培養方法の完全ヒト化への移行に伴い、マスターセルバンク、ワーキングセルバンクの構築においては回避されつつある。しかしながら、細胞樹立時や未分化能維持の目的で異種動物由来成分を使用する場合には、最終製品においても異種動物由来成分混入の有無を確認することと、混入しうる異種動物由来成分とその原因を明らかにしておくことが必要である。iPS 細胞等の各種幹細胞の培養では、フィーダーレイヤーとして、マウス胎児繊維芽細胞 (MEF) や細胞外マトリックス構成成分であるマトリジェル、フィブロネクチン、培養液には血清代替物 (KSR) の他、各種細胞増殖因子等を添加した培養液を用いて培養される。すなわち、これら材料中に異種動物由来成分が含まれるか否かを調査し、幹細胞への異種動物由来糖鎖混入の原因としての可能性を明らかにしておくことは重要であると言える。本項では Toe ならびに UTA-1 の N-結合型糖鎖中に観察された異種動物由来糖鎖の混入原因として、血清代替物 (KSR) とマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) の着目し、前述した N-結合型糖鎖の網羅的解析法を用いて  $\alpha$  Gal エピトープや N-グリコ

リルノイラミン酸 (NeuGc) を持つ糖鎖の有無について調べた。

iPS 細胞の解析と同様に、MEF と KSR から N-結合型糖鎖を調製し、2-アミノ安息香酸 (2-AA) により蛍光標識化後、シアル酸残基数に基づきセロトニンアフィニティークロマトグラフィーで分画した結果を Fig. 5 に示す。MEF ではアシアロ/ハイマンノース型糖鎖分画が最も含量が高く 57.8% 含み、続いてモノシアロ、ジシアロ、トリシアロ、テトラシアロ分画がそれぞれ 18.3、12.5、9.2、2.2% 含まれていた。一方、KSR はシアル酸を含有する糖鎖量が高く、モノシアロ糖鎖が 4.8%、ジシアロ糖鎖が 37.2%、トリシアロ糖鎖が 38.9%、テトラシアロ糖鎖が 10.8% であり、全糖鎖の 90% 以上がシアル酸を含有する糖鎖であった。また、各シアロ糖鎖分画を MALDI-TOF MS にて解析すると、N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) により修飾されたと考えられる糖鎖より  $m/z$  16 大きなイオンシグナルが観察されたことから、各シアロ糖鎖分画には、N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) により修飾を受けた糖鎖が含まれることがわかった。

次に、全ての分画について、シアリダーゼ処理を行いアシアロ糖鎖としたものについて、順相分配モードの HPLC により分離し、分離された各ピークを分取し、MALDI-TOFMS にて分析した。結果を Fig. 6 に示す。MEF のアシアロ/ハイマンノース型糖鎖分画ではマンノース残基 5~9 残基からなるピーク 1~5 のハイマンノース型糖鎖が主要な糖鎖として観察された。KSR ではマンノース残基 5、6、8、9 残基からなるハイマンノース型糖鎖 (ピーク 1、2、4、5) の他、コアフコースを持つ複合型 2 本鎖糖鎖も観察された。モ

ノシアロ分画でいずれにも複合型 2 本鎖糖鎖 (ピーク 7) とコアフコースを持つ複合型 2 本鎖糖鎖 (ピーク 8) が共通して観察された他、MEF では複合型 3 本鎖 (ピーク 9) と 4 本鎖糖鎖 (ピーク 10) も観察された。一方、KSR には  $m/z$  2068 を示す  $\alpha$  Gal エピトープを持つ糖鎖 (ピーク 11) が観察された。

ジシアロ分画については、MEF では複合型 3 本鎖 (ピーク 12)、KSR では MEF では複合型 2 本鎖 (ピーク 14) が主要な糖鎖として観察された。一方、トリシアロ分画について、MEF では複合型 3 本鎖 (ピーク 17)、KSR では MEF では複合型 2 本鎖 (ピーク 16) が主要な糖鎖として観察された。テトラシアロ分画については、MEF では複合型 3 本鎖 (ピーク 19)、KSR では複合型 2 本鎖 (ピーク 21、22) が主要な糖鎖として観察された。

以上、KSR には  $\alpha$  Gal エピトープを持つ糖鎖 (ピーク 11)、複合型 2 本鎖糖鎖にシアル酸が 3 あるいは 4 残基結合したと考えられる糖鎖 (ピーク 16、22) などのヒトでは生合成されない糖鎖が観察された。このことから、KSR は Toe と UTA-1 の 2 種の iPS 細胞で観察された異種動物由来と考えられる糖鎖の混入原因となりうるということがわかった。

#### D. まとめ

本年度研究では各種幹細胞の培養工程で混入しうる異種動物由来糖鎖に着目し、前年度までに開発した糖鎖プロファイリング技術を活用し、異種動物由来成分を含む材料を用いて得られた iPS 細胞における異種動物由来糖鎖の混入の有無を調査した。また、iPS 細胞中に観察された異種動物由来糖鎖の混入原因としてマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) と血清代替物 (KSR)

の糖鎖解析を行った。

本研究により、KSR や MEF を用いて培養した iPS 細胞の N-型糖鎖解析の結果から、iPS 細胞中には異種動物由来と考えられる  $\alpha$  Gal エピトープや NeuGc を持つ糖鎖、複合型 2 本鎖糖鎖にシアル酸が 3 あるいは 4 残基修飾した糖鎖が観察された。一方、iPS 細胞の培養で使用する KSR 中に  $\alpha$  Gal エピトープや NeuGc が観察され、iPS 細胞中に観察された異種動物由来糖鎖混入の原因の一つとして考えられた。外来からの異種動物由来糖鎖の混入については、例えば NeuGc については単糖のサルベージ経路での混入の他、 $\alpha$  Gal エピトープについては細胞表面への非特異的吸着なども考えられ、今後各種幹細胞の再生医療への応用に向けては、細胞培養法の完全ヒト化への移行に加え、培養過程で混入した異種動物由来成分を取り除くためのクリーニング方法などについても検討が必要であると言える。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

Yamada K, Mitsui Y, Kakoi N, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K.

One-pot characterization of cancer cells by the analysis of mucin-type glycans and glycosaminoglycans. *Anal Biochem.* 2011 in press

Oyama T, Yodohsi M, Yamane A, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Rapid and sensitive analyses of glycoprotein-derived oligosaccharides by liquid chromatography and laser-induced fluorometric detection capillary electrophoresis. *J Chromatogr B* 2011 879(27):2928-

Yamamoto S, Shinohara C, Fukushima E, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S.  
Partial-filling affinity capillary

electrophoresis of glycoprotein oligosaccharides derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid. *J Chromatogr A.* 2011 1218(29):4772

Yodoshi M, Oyama T, Masaki K, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S.

Affinity entrapment of oligosaccharides and glycopeptides using free lectin solution. *Anal Sci.* 2011 27(4):395.

Yamada K, Hyodo S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K.

Hyphenated technique for releasing and MALDI MS analysis of O-glycans in mucin-type glycoprotein samples. *Anal Chem.* 2010 82(17):7436

Kinoshita M, Kakoi N, Matsuno YK, Hayakawa T, Kakehi K.

Determination of sulfate ester content in sulfated oligo- and poly-saccharides by capillary electrophoresis with indirect UV detection.

*Biomed Chromatogr.* 2011 25(5):588

### 2. 学会発表

木下充弘、能登啓介、奥田茜、小南有加、早川堯夫、掛樋一晃  
エイジングマーカーとしての糖鎖の可能性  
第 30 回日本糖質学会年会、平成 23 年 7 月 11 日、長岡

橋本浩志、仲西暁良、木下充弘、鈴木匡、早川堯夫、掛樋一晃  
細胞外遊離 N-グリコシルノイラミン酸のヒト培養癌細胞への取り込み  
第 30 回日本糖質学会年会、平成 23 年 7 月 11 日、長岡

原沙弥香、山田佳太、三ツ井洋輔、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃  
ヒト胃癌細胞中高フコシル化糖タンパク質のグライコプロテオーム解析  
第 30 回日本糖質学会年会、平成 23 年 7 月 11 日、長岡

神末和哉、大河原周平、山田佳太、岩塚  
欣也、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃  
ヒト胃癌細胞 MKN45 細胞は糖タンパク  
質由来の遊離糖鎖を細胞外へ分泌する  
第 30 回日本糖質学会年会、平成 23 年 7  
月 11 日、長岡

原沙弥香、山田佳太、三ツ井洋輔、木下  
充弘、早川堯夫、掛樋一晃  
ヒト胃癌細胞中の高フコシル化糖タンパ  
ク質の探索  
第 61 回日本薬学会近畿支部、平成 23 年  
10 月 22 日、神戸

神末和哉、大河原周平、山田佳太、岩塚  
欣也、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃  
ヒト胃癌細胞 MKN45 による糖タンパク  
質由来遊離糖鎖の細胞外分泌  
第 61 回日本薬学会近畿支部、平成 23 年  
10 月 22 日、神戸

中辻佑強、岸本昌太、木下充弘、早川堯  
夫、荒井昭博、中村伸、掛樋一晃  
マイクチップ等電気泳動法によるタンパ  
ク質製剤の迅速解析技術の開発  
第 61 回日本薬学会近畿支部、平成 23 年  
10 月 22 日、神戸

神末和哉、木下充弘、掛樋一晃  
CESI-MS によるペプチド・タンパク質  
分析  
第 31 回キャピラリー電気泳動シンポジ  
ウム、平成 23 年 11 月 11 日、鶴岡

#### 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



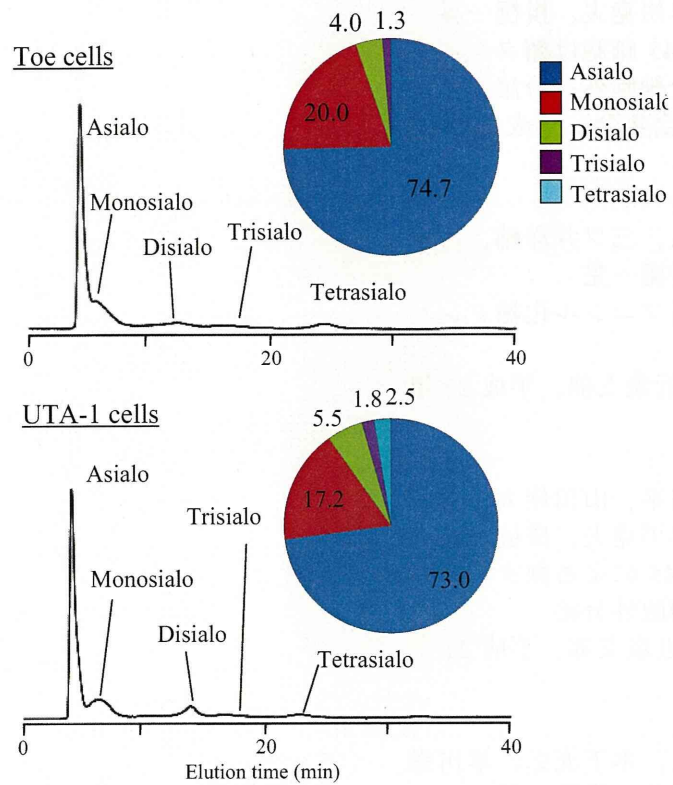


Fig. 1. Serotonin-affinity chromatography of N-glycans in Toe and UTA-1 cells. Analytical conditions; column, LA-serotonin (4.6 x 150 mm). flow rate, 0.5 mL/min. eluent; solvent A, water. solvent B, 50 mM Ammonium acetate in water. gradient conditions, a linear gradient (5-40 % solvent B) from 2 to 20 min and 1 M NaCl from 20 to 45 min.

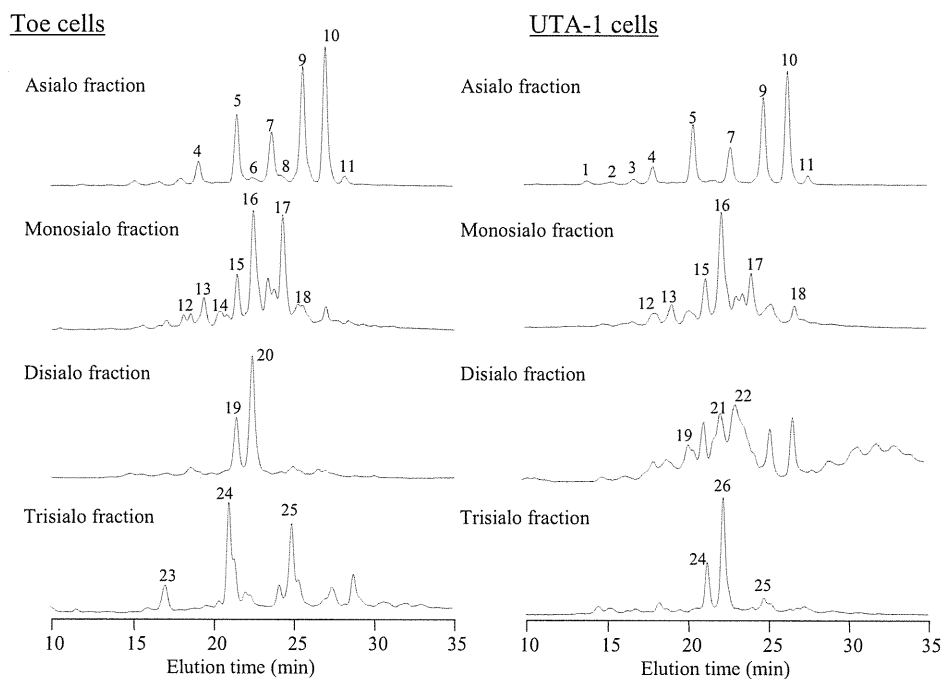


Fig. 2. NP-HPLC analysis of N-glycans fractionated by serotonin affinity chromatography. Analytical conditions: column, TSK-GEL Amide-80 (4.6 x 250 mm). flow rate, 0.8 mL/min. eluent, solvent A, 0.1% CH<sub>3</sub>COOH in MeCN. solvent B, 0.2% CH<sub>3</sub>COOH/0.2% triethylamine in water. gradient conditions: a linear gradient (15-50 % solvent B) from 5 to 85 min.

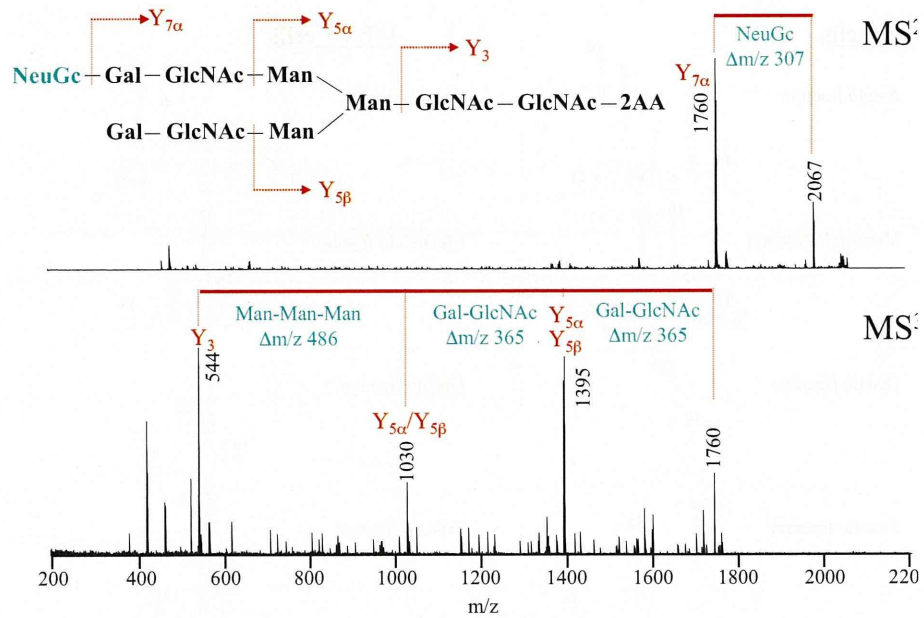


Fig. 3. MSMS analysis of monosialo N-glycans ( $m/z$  2067) in iPS cell. Analytical conditions: apparatus, AXIMA resonance; polarity, negative ion mode; matrix, 2, 5-dihydroxybenzoic acid.

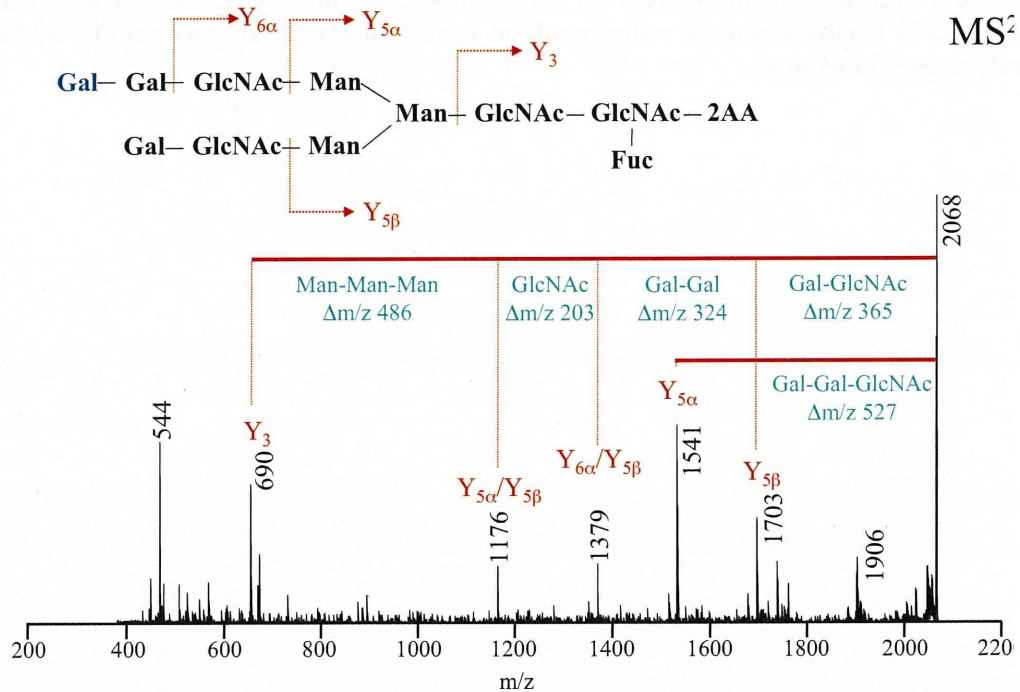


Fig. 4. MSMS analysis of N-glycans ( $m/z$  2068) in iPS cell. Analytical conditions: apparatus, AXIMA resonance; polarity, negative ion mode; matrix, 2, 5-dihydroxybenzoic acid.

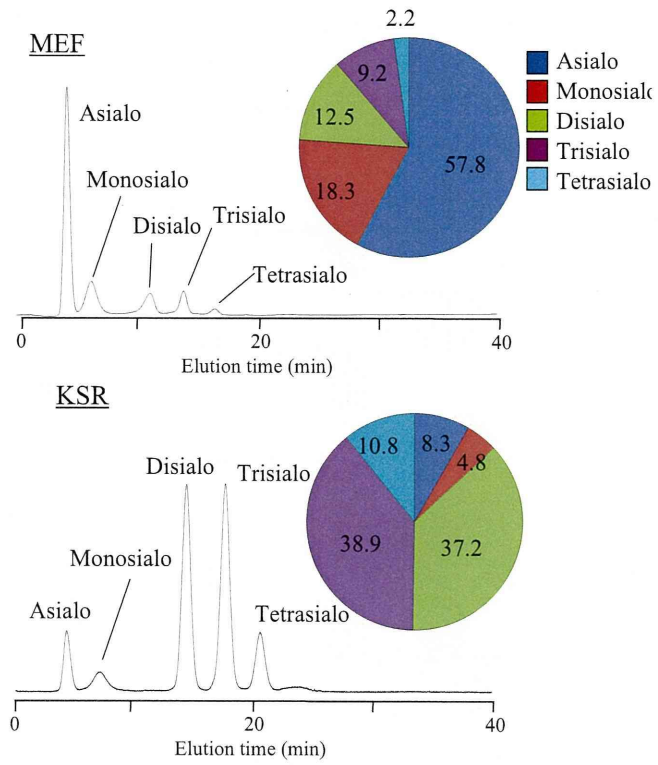


Fig. 5. Serotonin-affinity chromatography of N-glycans in Toe and UTA-1 cells. Analytical conditions; column, LA-serotonin (4.6 x 150 mm). flow rate, 0.5 mL/min. eluent; solvent A, water. solvent B, 50 mM Ammonium acetate in water. gradient conditions, a linear gradient (5-40 % solvent B) from 2 to 20 min and 1 M NaCl from 20 to 45 min.

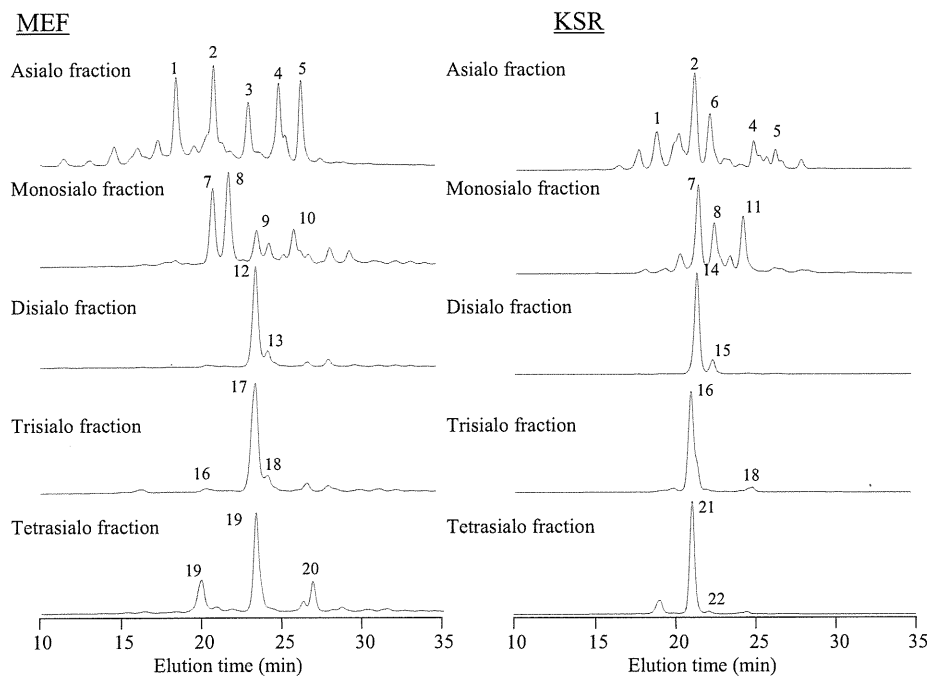


Fig. 6. NP-HPLC analysis of N-glycans fractionated by serotonin affinity chromatography. Analytical conditions: column, TSK-GEL Amide-80 (4.6 x 250 mm). flow rate, 0.8 mL/min. eluent, solvent A, 0.1% CH<sub>3</sub>COOH in MeCN. solvent B, 0.2% CH<sub>3</sub>COOH/0.2% triethylamine in water. gradient conditions: a linear gradient (15-50 % solvent B) from 5 to 85 min.

Table1 Proposed structure of N-glycans observed in Toe and UTA-1 cell

Peak No.	Observed m/z	Proposed Structure	Peak No.	Observed m/z	Proposed Structure
1	1176		14	1744	
2	1379		15	1760	
3	1582		16	1906	
4	1354		17	2052	
5	1516		18	2272	
6	1678		19	1760	2x
7	1906		20	1906	2x
8	1840	2x	21	2068	2x
9	2053		22	2085	2x
10	2002		23	1986	SO <sup>+</sup> + 3x
11	2166	2x	24	1760	3x
12	1395		25	2272	3x
13	1541		26	1906	3x

Table2 Proposed structure of N-glycans observed in MEF and KSR

Peak No.	Observed m/z	Proposed Structure	Peak No.	Observed m/z	Proposed Structure
1	1354		12	2125	2x
2	1516		13	2272	2x
3	1678		14	1760	2x
4	1840	2x	15	1906	2x
5	2002		16	1760	3x
6	1906		17	2125	3x
7	1760		18	2272	3x
8	1906		19	2125	4x
9	2272		20	2637	4x
10	2637		21	1760	4x
11	2068		22	1906	4x

## 厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

「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」

### 分担研究報告書

#### ヒト細胞・組織加工製品の造腫瘍性試験の現状に関する調査研究

研究分担者：佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部・第2室・室長

#### 研究要旨

ヒト胚性幹細胞(ES 細胞)やヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) などの、いわゆるヒト多能性幹細胞を原材料として細胞・組織加工製品を製造し、再生医療・細胞治療へ応用しようとする試みが、現在、国内外で非常に活発に進んでいる。ヒト多能性幹細胞は動物体内に移植された際に腫瘍を形成する能力、いわゆる「造腫瘍性」を元来の特性として保持しており、ヒト多能性幹細胞を原材料とした医薬品・医療機器においては、未分化細胞の混入・残留による異所性組織形成や腫瘍形成・がん化を防止すること、すなわち最終製品の造腫瘍性の評価と管理が重要な課題となる。しかしながら、患者に投与する動物又はヒト由来の生細胞を対象にした造腫瘍性試験のガイドラインは今のところ存在しない。ヒト多能性幹細胞加工製品を含むヒト細胞・組織加工製品の開発が精力的に進む中、本研究では、その造腫瘍性の評価法の現状と課題について調査した。

#### A. 研究目的

ヒト胚性幹細胞(ES 細胞)やヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) などの「多能性幹細胞」は、その幅広い多能性ゆえに、いままで入手が困難であった各種細胞を作製することのできる素材となることが期待され、またその無限の自己複製能ゆえに、ひとたび目的細胞への効率的分化誘導方法が確立すれば、細胞・組織加工医薬品などの原材料として再生医療・細胞治療に利用できる細胞を大量に、安定に供給することが可能となることが期待されている。既に 2011 年 1 月に米国では、ヒト ES 細胞を加工した医薬品の再生医療における活用例として、

世界初の治験(脊髄損傷治療)が開始され、2011 年 7 月には同じく米国で網膜疾患治療を目的としたヒト ES 細胞加工製品の治験が開始されている(ただし、前者の治験は 2011 年 11 月に経済的理由により中断)。また、2007 年に山中らによって世界初のヒト iPS 細胞が樹立されたことを契機に、細胞のプログラミングを人為的に操作、制御できる時代が到来し、新規細胞基材、新規製造関連資材、新規製造方法、新規適用法等、新たなイノベーションを推進し、再生医療・細胞治療へ応用しようとする研究展開が国内外できわめて活発化している。この中に実用化に有望と考えられるシーズも数



多くあり、例えば、近年中にはわが国において iPS 細胞を加工して作製した網膜色素上皮細胞を加齢黄斑変性の患者らに対して臨床応用することが開始されると期待されている。このような、一昔前には実現が想定されていなかった製品（多能性幹細胞加工製品）の開発には、多能性幹細胞に関するイノベーションの進展と共に登場してくるリスクの評価法や、多能性幹細胞加工製品に特有の品質・安全性確保のための基盤技術が必須である。本分担研究では、多能性幹細胞加工製品を中心に、細胞・組織加工製品において重要な安全性上の関心事として、特に造腫瘍性の評価の現状と課題について調査を行った。

## B. 研究方法

米国のヒト細胞、組織または細胞・組織利用製品（HCT/P）に関しては米国食品医薬品局（FDA）の生物製剤評価研究センター（CBER）の Steven Bauer 博士、EU の先端医療製品（ATMP）に関しては欧州医薬品庁（EMA）の先端医療委員会（CAT）／独国ポールエールリッヒ研究所（PEI）の Egbert Flory 博士・Bettina Klug 博士ら、ならびに国際生物製剤標準化連合（IABS）／WHO 細胞基材研究班 John C Petricciani 博士らに聞き取り調査を行った。これと同時に各種メディア中の公開情報の収集を行った。

### （倫理面への配慮）

本研究は動物・ヒト試料等を用いない調査型研究のため、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験指針、研究倫理審査委員会規程等にある倫理面の審査・承認が必要とは

ならなかった。

## C. 研究結果

### C-1 多能性幹細胞の造腫瘍性

「造腫瘍性」(tumorigenicity)とは、動物に移植された細胞集団が増殖することにより悪性または良性の腫瘍を形成する能力を言う。ヒト ES 細胞株やヒト iPS 細胞株を樹立した際には、どのくらい初期胚内の多能性幹細胞の性質を保っているかを確認する必要があるが、その際、細胞の多能性の証明は通常、免疫不全動物に細胞を移植して動物体内でのテラトーマ (teratoma, 奇形腫) の形成を確認し、移植した細胞が内・中・外胚葉系の様々な細胞種に分化することを示すことによってなされている。つまり、ヒト多能性幹細胞は造腫瘍性を元来の特性として保持しており、この点がヒト体細胞・体性幹細胞とは大きく異なる。したがって、ヒト多能性幹細胞を原材料とした医薬品・医療機器においては、未分化細胞の混入・残留により異所性組織形成や腫瘍形成・がん化が惹起される可能性があり、最終製品の造腫瘍性の評価と管理が重要な課題となる。

### C-2 造腫瘍性試験の国際ガイドライン

現在、細胞の造腫瘍性試験に関する国際的なガイドラインとして唯一存在するのは、世界保健機関 (WHO) の生物製品標準化専門委員会第 47 次報告 (1998) (Technical Report Series No. 878, TRS 878)にある Annex I「生物製品製造用の *in vitro* 基材としての動物細胞の使用の要件」である。日米欧医薬品規制調和国際会議 (ICH) のガイドライン「生物製品 (バイオテクノロジー

応用医薬品／生物起源由来医薬品）製造用細胞基材の由来，調製及び特性解析」（ICH Q5D，医薬審 873 号，平成 12 年 7 月 14 日）も，このガイドラインに記載された方法を援用している。

注：WHO TRS 878 Annex I の細胞基材に関する部分は最近改訂作業が行われており，平成 24 年 3 月現在の段階での最新のもの，平成 22 年（2010 年）10 月に公表された WHO 生物製剤標準化委員会最終案である。この最終案はまだ公式な TRS にはなっていないものの，TRS として発出されるまでに内容の変更が加わることはないと言われている。従って本稿においては，上記最終案の内容を最新の WHO TRS 878 の内容として説明する。

WHO TRS 878 にある造腫瘍性試験の内容は，極めて大雑把に言えば「ヌードマウス等の動物 10 匹に  $10^7$  個の細胞を投与して 16 週間観察する。陽性対照としては Hela 細胞などを用いる。」というものであるが，注意しなければならないのはその適用対象と目的である。

WHO TRS 878 の造腫瘍性試験の適用対象は，あくまでワクチンやタンパク質製剤など，ヒトを対象に *in vivo* 又は *ex vivo* で投与される生物製剤を製造する際に *in vitro* 基材として用いられるヒト又は動物由来の細胞株である。細胞種別に見た場合には，対象となる細胞種としては①正常 2 倍体細胞株，②幹細胞株，③連続継代性細胞株が挙げられている。また，セル・バンク別に見た場合には，①製品製造終了時（終了後）の細胞，②所定の継代数以上にわたって培養したマスター・セル・バンク，③最初に樹立したワーキング・セル・バンク

が対象とされている。注意すべきは，「患者に移植する細胞」および「治療を目的に患者に移植する細胞株の原料となる細胞」は WHO TRS 878 の対象外とされていることで，その特性解析においては規制当局等との議論が必要とされている。

WHO TRS 878 における造腫瘍性試験の目的は，生物製剤用細胞基材となるセル・バンクの造腫瘍性の程度又は有無を正確に把握することにある。造腫瘍性の程度的大幅な変化又はその有無に変化が生じた場合，細胞特性に何らかの異常が起こったという指標となる。つまり，既知あるいは未知のウイルス感染，変異原性物質やストレスによる遺伝子変異・発がん遺伝子活性化など，原因はいずれにせよ，セル・バンクの安定性上の異常が発生したことを検出するための方策として，セル・バンクの造腫瘍性を細胞特性指標の一つとして評価し，品質管理に活用することが必要とされるわけである。生物製剤の製造には通常，二段式の細胞基材のセル・バンキングシステム，すなわちマスター・セル・バンクおよびワーキング・セル・バンクの確立が必要であるが，WHO TRS 878 では上で述べた目的に則した形で，造腫瘍性試験は製品製造終了時やマスター・セル・バンクの細胞を所定の継代数以上にわたって培養した時，あるいはワーキング・セル・バンクを樹立した時に実施しすることが求められている。翻ってみれば，WHO TRS 878 は患者に移植するヒト又は動物に由来する生細胞，すなわち再生医療や細胞治療においてヒトに投与される細胞・組織加工製品は対象とはしていない。また，WHO TRS 878 における「造腫瘍性」とは，具体的に言えば「動

物モデルに移植された細胞集団が、移植部位および（または）離れた転移部位で増殖することにより腫瘍を形成する能力」のことであって、ヒトにおけるリスクの直接的指標、すなわち「ヒトに移植された細胞集団が腫瘍を形成する能力」ではない。

### **C-3 ヒト多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性試験**

#### **C-3-1 目的別の3種の造腫瘍性試験**

ヒト細胞・組織加工製品は、原材料の造腫瘍性というリスク・ファクターの観点から、大きく2つに分類される。即ち、原材料の細胞に造腫瘍性があるヒト多能性幹細胞加工製品と、原材料の細胞に造腫瘍性がないと一般的に考えられているヒト体細胞・体性幹細胞加工製品とに分けられる。

また、ヒト多能性幹細胞加工製品についての造腫瘍性試験には、目的別に以下の3種類があり得る。

- |  |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"><li>① 原材料の品質管理のための造腫瘍性試験</li><li>② 製造工程管理のための造腫瘍性試験</li><li>③ 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験</li></ol> |
|--|

以下にこれら3種造腫瘍性試験の特徴と方法について述べる。

#### **C-3-2 原材料（細胞基材）の品質管理のための造腫瘍性試験**

ヒト多能性幹細胞加工製品の原材料は、文字通り、ヒト ES 細胞株やヒト iPS 細胞株等であり、その実体としてヒト ES 細胞バンクやヒト iPS 細胞バンク等が作成される。これらはヒト多能性幹細胞加工製品というバイオロジクス（生物製剤）の一種を

製造するための細胞基材であり、連続継代性細胞株のセル・バンクでもある。従って、これらにおける「造腫瘍性」とは、すなわちバイオロジクスの原材料としてのヒト多能性幹細胞バンクの造腫瘍性であり、細胞基材の品質特性のひとつと捉えることが出来る。

ヒト多能性幹細胞加工製品の原材料としてのヒト ES/iPS 細胞バンクの造腫瘍性における懸念事項は、WHO TRS 878 におけるセル・バンクの品質管理の考え方と同様に、「セル・バンクの造腫瘍性が既定の範囲内にあるか？」ということになる。すなわち、ヒト ES/iPS 細胞バンクの造腫瘍性の程度的大幅な変化に変化が生じた場合、細胞特性に何らかの異常が起こったということが示唆される。つまり、既知あるいは未知のウイルス感染、変異原性物質やストレスによる遺伝子変異・発がん遺伝子活性化など、原因はいずれにせよ、ヒト ES/iPS 細胞バンクの安定性上の異常が発生したことを検出するための方策として、ヒト ES/iPS 細胞バンクの造腫瘍性を細胞特性指標の一つとして評価すれば、品質管理に活用できることになる。

ヒト多能性幹細胞加工製品の原材料としてのヒト ES 細胞バンクやヒト iPS 細胞バンク等の造腫瘍性の意味づけは WHO TRS 878 における細胞基材の造腫瘍性の意味づけとほぼ同じであることから、その評価方法についても、WHO TRS 878 の方法を準用することが可能であると考えられる。

#### **C-3-3 製造工程（中間製品）管理のための造腫瘍性試験**

ヒト多能性幹細胞加工製品の中間製品と

なる細胞集団には、目的細胞ないしその前駆細胞に加え残存多能性幹細胞およびその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。中間製品の造腫瘍性試験における「造腫瘍性」とは、製造工程管理のための指標としての意味合いがある。製造工程管理における造腫瘍性関連の懸念事項には、「どのくらいヒト多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）が残存しているか」ということと「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」という2点がある。

中間製品の中に「どのくらいヒト多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）が残存しているか」ということに関しては、多能性幹細胞のマーカー遺伝子／マーカータンパク質を利用した方法により評価することが可能である。手技としては定量性 RT-PCR やフローサイトメトリーなどが挙げられる。これらは一種の純度試験でもある。

中間製品の中に「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということに関しては、細胞増殖特性の評価（不死化細胞の検出）や軟寒天コロニー形成試験（足場非依存性増殖細胞の検出）などで評価が可能である。なお、軟寒天コロニー形成試験は残存するヒト多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）の検出には不向きと考えられる。その理由は、ヒト多能性幹細胞はトリプシン処理等の分散によりアポトーシスを起こす特異な性質を持つからである。すなわち、製品中にヒト多能性幹細胞が混入していたとしても軟寒天に細胞を分散して封入する際にアポトーシスを起こしてしまうと予想され、結果が偽陰性となるおそれが高い。

ある条件が満たされれば、中間製品の中

に「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということを検証するために *in vivo* の方法を活用することも可能である。その条件とは「十分に低い検出限界を持つ系ならば」という条件である。なぜならば、多くの場合、最終製品（ないし中間製品）の主成分は分化細胞（ないし前駆細胞）と予想され、その場合、製品中に含まれるごく僅かな造腫瘍性細胞を検出する必要があり、均一な細胞集団を対象にした WHO TRS 878 の方法（ヌードマウス等の動物 10 匹に  $10^7$  個の細胞を投与して 16 週間観察する。陽性対照としては Hela 細胞などを用いるという方法）よりも低い検出限界が必要になるからである。

十分に低い検出限界を持つことが明らかであれば、*in vivo* の造腫瘍性試験における細胞の投与部位はどこでも構わない。ただし、検出限界・感度・精度等について分析学的評価を予め実施する必要がある。また、投与細胞数については当該 *in vivo* 造腫瘍性試験の性能次第である。

#### **C-3-4 WHO TRS 878 の造腫瘍性試験における検出限界**

ヒト多能性幹細胞加工製品を含む細胞・組織加工製品のリスクとしては「最終製品をヒトに投与した際に製品中の細胞が腫瘍を形成する可能性」がある。すなわち、ヒト多能性幹細胞を分化誘導せずにそのまま患者に投与するような特殊なケースを除いた多くの場合、最終製品に存在する僅かな未分化細胞・異常細胞に起因する造腫瘍性を評価しなければならない。その場合には「造腫瘍性」とは言っても、WHO TRS 878 にあるようなセル・バンク（均一集団）の