

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用い、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。現状ではどれくらい幅広い細胞株で利用できるかわらかでないが、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 (図 1)。

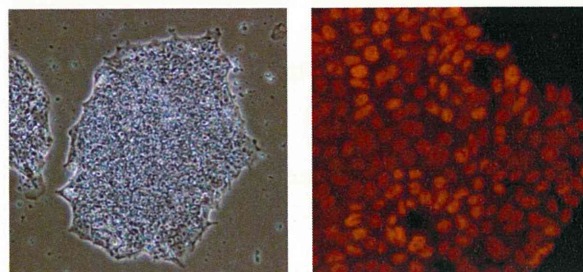


図 1 : 合成基質上で合成培養液を用いて培養されたヒト ES 細胞

長期培養後も未分化細胞としての形態を保ち (左)、NANOG など未分化マーカーを発現している (右)

### 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。これまでに樹立され様々な研究に利用されている細胞株の多くでは、原材料レベルであるいは樹立培養過程で用いられた原材料が規定を満足していることを示せない場合や、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可能性が考えられる。またマウスなど異種細胞をフィーダーに使用した履歴がある場合も考えられる。しかしながら、その後十分な品質管理下で一定期間

培養後に、ウイルス検査をおこなう、またマウスゲノムの混入について否定試験で示されたならば、マウス細胞をフィーダーとして培養した履歴があっても問題はないと考えられる。

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。

## 2. 4 ゲノム・エピゲノム安定性

ES/iPS 細胞の臨床利用においてはその増殖過程で生じるゲノム・エピゲノム変化がどのような影響を及ぼすかを考慮する必要がある。細胞が分裂・増殖する過程でゲノムに何らかの変化が生じることは不可避であり、それ自体は人の体内でも起こる自然な現象である。実際大半の変化は中立的であり細胞の機能や生存・増殖には影響を及ぼすことはないと考えられるが、きわめてまれに発がんなどに至ることがあるのも事実である。よって、培養過程で起こるゲノム・エピゲノム変異のモニタリングとその評価をいかに行うかは重要な問題である。

この問題への一つのアプローチとして、ISCI による国際共同研究として多数のヒト ES 細胞株について培養初期と長期継代後の細胞のゲノム解析が行われ、我々の ES 細胞についてのデータを含めその結果が論文発表された (Nature Biotechnology 2011 Nov 27;29(12):1132-1144)。その結果、核型のような巨視的なレベルにおいても高頻度に変異が認められる染色体や染色体領域が明らかにされた。この中には従来から知られている 12 番、17 番染色体のトリソミーも含まれていた (図 2)。このほか 1 番、2 番染色体においても増幅が見られるなど、全体的には遺伝子増幅が主な変異であることが明らかにされている。また 20 番染色体のごく微少な領域の増幅も検出され、関与す

る遺伝子についても推定されている。これらの変異は、未分化細胞の増殖や生存に何らかのアドバンテージがある細胞が培養過程で濃縮されていったものと考えられている。その意味では、癌化などが懸念される変異である可能性も考えられるが、一方で分化誘導後の移植に用いられる細胞の安全性に及ぼす影響に関しては情報は得られない。

エピゲノム変異に関してはこれまでのところこのような大規模な比較研究は行われておらず、どのような傾向が見られるかは明らかでない。そのため当面は品質管理項目として取り扱うことは適切とは言えない。

いずれについても、未分化維持培養下で顕在化する変化が医療上の有効性安全性に及ぼす影響は予測が困難であり、当面は移植組織を用いた前臨床研究による安全性有効性の評価が最も重要である状況には変化は無いと考えられる。

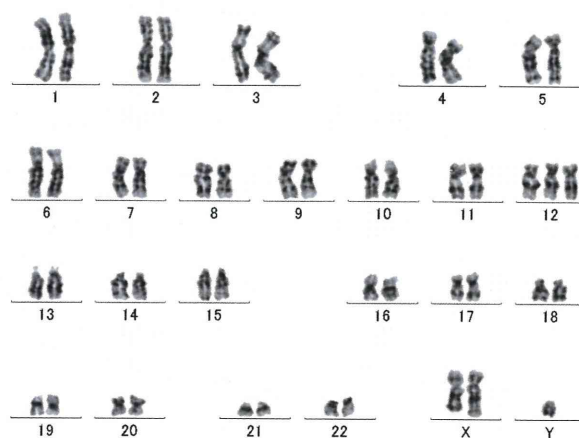


図 2：ES 細胞で観察された染色体変異の一例。

12 番染色体トリソミーと X 染色体の重複が認められる。これらは比較的高頻度で観察される変異である。このほか 17 番染色体のトリソミーも観察されることの多い変異である。染色体変異のようなゲノム異常は細胞にとって最適化

されていない培養条件で維持された場合により高頻度で観察される傾向があるようである。しかしながらこれらの変化が分化細胞にどのような影響があるか明らかでない。

#### 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。その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不可欠である。一方品質管理水準の高い培養液を用いた場合に、若干の細胞の性質の変化も認められる。このことは、通常用いられる培地成分を、より品質管理されたものに置き換えることによりES細胞に何らかの影響を及ぼす可能性を示唆するものと考えられる。性質の変化が細胞の安全性とどの程度関連しているかは今後の研究の進展を待つことになるが、厳格な品質管理を要求することで、逆に安全性を損ねる可能性もあることを認識する必要があるだろう。

安全性の過剰な追求は患者の治療を受ける機会の損失にもなりかねない。ES/iPS医療は少なくともその初期過程においてはハイリスクなものにならざるを得ないことを考慮したうえで、被験者への同意を前提として、速やかな臨床応用が可能になる制度構築が望まれている。

#### E. 結論

ES/iPS細胞の臨床利用における技術上の諸問題の多くは解決されつつあるといえ、一定の科学的合理性をもって評価基準を設定することが可能と考えられる。感染性因子の混入についてはドナースクリーニングが一定の役割を果たすが、特にES細胞においてはヒト胚への感染可能性がきわめて低いこと、未分化細胞

での維持感染はほとんど考えられないことから、現実的なリスクとはならないだろう。ES/iPS細胞のバンキング時に、既知のウイルスについて否定試験を行うことで、ドナースクリーニングに変えることが可能である。未知のウイルス等の可能性は排除できないが、臓器移植や輸血と比較し著しく危険性が高いとは考えられないことから、ES/iPS医療に付随する不可避のしかしきわめて微少なリスクと位置づけられる。樹立培養過程で懸念される異種動物由来の因子についても、defineされた条件下で一定期間培養する、クリーニングを行うことで現実的には排除されると考えられ、リスクを過剰で評価する必要性ははばないとはいえる。

どのように行われるにしても、ES/iPS細胞の臨床応用はその初期段階では本質的にリスクの高いものと言わざるを得ない。その中で、ドナー由来や培養過程で混入しうる感染性因子によるリスクは相対的に低いと考えて良い。安全性についての過剰な要求は患者が治療を受ける機会を失することにもつながることから、リスク・ベネフィットについてバランスのとれた判断が求められる。当然のことではあるが、可能性のあるものだけでなく未知のものも含めてリスクについて患者への十分な説明を行うことが前提となることは言うまでもない。

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. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 高田圭、[末盛博文](#) 医療応用に適したES細胞

胞培養システム. 実験医学  
2010;28:204-208.

2. 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.
3. 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
4. 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.
5. 宮崎隆道、末盛博文 ヒトES細胞の維持培養方法 細胞工学別冊「細胞培養プロトコール」学研メディカル秀潤社編, 学研メディカル秀潤社 2012 (印刷中)
6. Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, Fujita T, Yamamoto S, Tsutsumi S, Nonaka A, Yoshida S, Matsusaka K, Midorikawa Y, Ishikawa S, Soejima H, Fukayama M, Suemori H, Nakatsuji N, Kume S, Aburatani H. Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation. *Hum Mol Genet*. 2011 Jul 15;20(14):2710-21.
7. International Stem Cell Initiative, Suemori H. et al., Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol*. 2011 Nov 27;29(12):1132-1144.
8. Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, Nakahata T,

Saito MK. A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS One*. 2011;6(7):e22261

## 2. 学会発表

1. 「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)
2. 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)
3. 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)
4. Fluorescent chemical probes for human stem cells Nao Hirata, Masato Nakagawa, Yuto Fujibayashi, Kaori Yamauchi, Asako Murata, Eihachiro Kawase, Shin-ichi Sato, Shin Ando, Young-Tae Chang, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Kazumitsu Ueda, Shinya Yamanaka, Motonari Uesugi. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (11/29-12/2 Tokyo)
5. SnoN represses mesendodermal genes in human ES cells. Norihiro Tsuneyoshi, Tomoyuki Sumi, Akila Sadasivam, Jennica Tan Ee Kim, Norio Nakatsuji, Hirofumi Suemori, Norris Ray Dunn. Stem Cell Society Singapore (SCSS) Symposium 2011 (11/17 - 18, Singapore)
6. ヒトES細胞の未分化性維持因子の探索を目的とした high content analysis(HCA). 熊谷英明、末盛博文、上杉志成、中辻憲夫、川瀬栄八郎. 第34回日本分子生物学会年会 (12/13-16、横浜)
7. ヒトES細胞から definitive endoderm への高率な誘導方法の構築. 武内大輝、中辻憲夫、末盛博文. 第34回日本分子生物学会年会 (12/13-16、横浜)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### G-1. 特許取得

なし

**G-2. 実用新案登録**

なし

**G-3.その他**

特記事項なし

総括 (H21-23 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  
再生医療センター 生殖・細胞医療研究部幹細胞・生殖学研究室 室長

研究要旨：ヒト多能性幹細胞である ES 細胞や iPS 細胞は細胞治療などの再生医療応用へ向け社会の期待は非常に高い。多能性幹細胞を用いた細胞治療応用に際して、これまで先導している組織幹細胞に対して ES/iPS 細胞自身の持つ特性に起因した考慮点が存在する。細胞作成から応用の過程で最小限必要な細胞解析要件、加工段階での要件、安全性・有効性評価段階での要件についてヒト ES 細胞を中心にまとめる。2010 年 10 月にヒト ES 細胞を用いた臨床試験が始まり、網膜変性疾患に対しては治験例が漸増している。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た細胞製造工程を検証してきた。ヒト ES 細胞樹立の実績を踏まえ、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、ヒト多能性幹細胞を用いた細胞治療など再生医療応用への期待が世界的に高まってきた。本プロジェクトが開始した 2009 年では、米国 FDA が Geron 社によるヒト ES 細胞を用いた脊髄損傷患者に対する第 1 相臨床試験を承認して世界で初めての細胞治療がまさに始まろうとしている時であった。そして、翌 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。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った。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 (シユタルガルト病) と萎縮型加齢黄斑変性症の 2 疾患に対して第 1/2 相臨床試験を開始した。現時点 (2012 年 3 月) において、Geron 社臨床試験は 4 例 (注：2011 年 11 月に Geron 社は経済的理由により、ヒト ES 細胞による臨床開発から撤退) そして、ACT 社臨床試験は 5 例 (米国 4 例、英国 1 例) が実施されている。

・シュタルガルト病

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NC T01469832?term=MA09hRPE&rank=3>

・萎縮型加齢黄斑変性症

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NC T01344993?term=DRy+AMD&rank=1>

ACT 社臨床試験の経過は、プレリミナリーレポートとして Lancet 誌で、安全性と若干の有効性が確認されたと報告されている（参考文献 1）。

わが国で多能性幹細胞を用いた細胞治療応用に際して、最小限必要な細胞解析要件、加工段階での要件、安全性・有効性評価段階での要件等現状と展望を検討した。

## B. 研究方法及び研究結果

### 1. 多能性幹細胞について

「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」はヒト幹細胞を用いた臨床研究を対象としており、この適応となるヒト幹細胞は、ヒトから採取された細胞又はそれより由来する細胞で多分化能と自己複製能力を有する細胞である。造血系幹細胞や間葉系幹細胞などの組織幹細胞及びそれらを含む細胞集団が主な対象となる。分化能力の観点から組織幹細胞は外胚葉、中胚葉、内胚葉の三胚葉系組織全てに分化する能力を持つとする報告は無いものの、胚葉をお越えて様々な細胞へ分化することができ可塑性も示すものが存在することが報告されている。組織幹細胞は多分化能性 (Multipotency) 幹細胞である。一方、ES 細胞や iPS 細胞は三胚葉系組織全てに分化する能力を持ち、組織幹細胞より高度な多分化能性 (Pluripotency) を持つ幹細胞である。更に、ES/iPS 細胞は適切な培養

環境下では無限に増殖可能な自己複製能を持つ。細胞治療を主とした再生医療の確実な成功には、大量の正常な細胞を獲得することが要求され増殖能の高い ES/iPS 細胞は大いに期待される。多分化能性 (Pluripotency) を保持したまま無限に増殖可能な ES/iPS 細胞は生物学的性質としては非常に興味深く、より臨床に根ざした医科学研究領域でも非常に有用なツールであると考えられるが、細胞治療などの再生医療へ応用する場合 ES/iPS 細胞が高い多分化能性及び自己複製能を持つが故に含有する腫瘍化などの問題を考慮し臨床研究 (First in Man; FIM) の際には、組織幹細胞とは若干異なる評価が必要である。

### 2. ES 細胞を用いる臨床応用の流れ

ヒト幹細胞を用いた細胞治療を日本で行う場合、実用化への出口に向けては、主に以下の 2 つの方法がある。1 つは薬事法に基づき、FIM となる臨床試験から治験 (医師主導型治験または企業治験) を行い製造販売承認を申請し臨床利用を目指すラインがあり、もう 1 つは、医師法に基づき治療法に関する臨床研究を行い、治療施設が限定される高度医療・先進医療として細胞治療を行うラインとがある。これまで、医師法に基づく既存のヒト幹細胞による臨床研究は、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(厚生労働省、平成 18 年 9 月 1 日施行) に則って行われてきたが、新たな幹細胞技術の成果としてヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞等が開発され、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の改訂版が施行された (平成 22 年 11 月 1 日) (新ヒト幹指針と略す)。ヒト幹細胞によ

る再生医療では、医師法下で行われる臨床研究と薬事法下での臨床試験・治験という異なる規制環境が存在するものの双方で取り扱われる幹細胞製品は、そもそも、ヒトに初めて適用する FIM という観点から制度によらない適切な取扱い基準、つまり必要最低限の要件は共通するはずである。薬事法下での細胞・組織加工医薬品等の治験における GTP (Good Tissue Practice) については「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」(厚生省医薬安全局長通知 医薬発第 1314 号別添 1, 平成 12 年 12 月 26 日) (<別添 1>) に含まれるとされる。医師法下での新ヒト幹指針では、治験薬 GMP と GTP に準拠したもので治験開始時と同じレベルの品質管理と安全性確保を求める基準が整備され、厚生労働大臣の確認を受けた臨床研究の実施計画書と同一の内容で治験開始ラインへ移行が可能となった。さらに、再生医療の進展とともに、自己及び同種細胞由来の細胞製品に関する技術要件をより明確にするために、医薬発第 1314 号が改正され「ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(薬食発第 0208003 号)」(自己指針)及び「ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(薬食発第 0912006 号)」(同種指針)が発せられた。近年、ヒト間葉系幹細胞、ヒト ES 細胞、さらにヒト iPS 細胞による臨床応用を目指した研究の進展はめざましく、これらに特化した留意事項について検討しそれぞれの品質と安全性に根ざした指針整備が必要となる状況になっている。ヒト ES 細胞に関する指針は、ヒト ES

細胞はいずれに対しても同種移植となることからヒト同種由来細胞の系譜として細胞治療の品質及び安全性に関する基本的な技術要件について「ヒト ES 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(案)―総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について―」が提示され、ヒト ES 細胞に対する具体的な指針が示されてきた。

### 3. ヒト ES 細胞を用いる臨床研究の現状(応用)

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。ここでは、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について述べる。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。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。

マスターセルバンク化する細胞の品質管理では規格試験と特性解析試験が行われる。セルバンクの安全性と品質に係る試験をすることで最終製品までの製造工程における安全性を担保することを本質的な目的としている。規格試験項目については、ACT 社臨床試験でヒト ES 細胞由来網膜色素上皮細胞を作製し治験を行った報告を参考にすると、核型試験、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、各種ウイルス試験（参考文献 2）が上げられる。特性解析試験としては、未分化度試験（マーカー；OCT4, SOX2, NANOG, REX1 等の定量解析）と形態観察（ヒト ES 細胞に特徴的な扁平円形コロニー集団を維持している）による細胞純度試験が考えられる。

ヒト ES 細胞の培養にはフィーダー細胞が必要となる。我々の培養工程においては、フィーダー細胞としてマウス 13 日齢胎児由来の線維芽細胞 (MEF 細胞) を使用した。MEF 細胞のバンク化の必要性も想定され、生物由来原料基準：動物由来細胞組織製品原料基準への適合が求められる。

ヒト ES 細胞およびフィーダー細胞の培養に使用する製品の品質証明の確保は必須であり、特に牛由来製品の場合原産地証明も必要である。細胞外基質成分、細胞継代時に使用する酵素や凍結保存液につい

ても品質証明が求められる。

#### 4. ヒト ES 細胞の再生医療応用に必要な技術的要件

ヒト ES 細胞を臨床応用に用いるために必要な技術的要件として主に以下の 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。通常、基本的な技術として十分に備わっているはずである。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、規格試験とミニマムな特性解析試験が行われる。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製品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はあるかもしれない。

#### 5. ヒト ES 細胞を用いる臨床応用の課題

臨床応用を見据えたヒト ES 細胞の出発原料は、初期の細胞株化段階におくことで

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規格試験と特性解析を行いマスターセルバンク化することが可能と考えられる。

我々は、上記④感染性因子混入リスクの管理として、品質・安全性向上のため、次世代の培養システムであるヒト ES 細胞樹立と培養維持工程全てにおいて異種成分にふれることがない培養システムを構築し、樹立した ES 細胞 (SEES4) の特性解析では非ヒト型のシアル酸 (Neu5Gc) の発現も検出できない品質であることを示した。次世代の製造工程と細胞品質評価へ発展していく基盤が整備されている。

### 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、もう一つはこのヒト 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、試料取違い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 細胞は臨床応用に用いるマスター ES 細胞株が整備される必要がある。次に、臨床応用に際し考慮する事項として ES 細胞の性質がある。ヒト ES 細胞は正常染色体核型をもつ多能性幹細胞であり、適切な培養条件の下、高度な多分化能性を保持したまま無限に増殖できる細胞である。しかし、通常の細胞治療では多能性を保持した細胞状態で投与することはなく、目的とする機能を有する細胞への分化を行い治療に用いることになる。1) 異所性の分化や目的としない細胞への分化、2) 腫瘍化 (奇形種)、3) 他家移植になるため GVHD、4) 免疫抑制剤等の服用による影響などが考えられる。ヒト ES 細胞は分化誘導処置をして移植することになり、具体的には ES 細胞そのものではなく標的分化途上の幹細胞あるいは前駆細胞が評価・移植の対象となる。腫瘍化の危険性に関しては、これまでのマウスやヒト ES 細胞研究において癌化した報告は一例もない。細胞治療における腫瘍化のリスクは奇形種 (良性腫瘍) の形成であり、万が一奇形種が形成されたら移植する場所により解剖学的、組織学的、機能的な障害を引き起こす可能性がある。分化誘導した細胞の現在の腫瘍化形成能を否定する可能な品質評価解析をおこないつつ、完全にその可能性を排除できない点も考慮し 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り、当然ながら移植後の被投与患者のフォローアップは一定年数行うべきである。Geron 社の治験では、移植後

1 年のフォローアップ検査で細胞移植による合併症、移植部位の変化、移植免疫反応や移植による想定外の神経学的症状は無く、安全性に関する問題は認められていないと報告されている。

ヒト ES 細胞のように新しい幹細胞技術を用いた臨床応用は、人体への影響について未知の部分もあるため、その安全性及び倫理性の確保に対して盤石な体制をとらなければならない。一方で、これまでに治療すらなかった疾患にも効果が期待できる治療法となりうる。対象疾患毎で様々なケースが考えられ、欧米におけるヒト細胞・組織加工製品の規制原則とされる Risk-Based Approach の考え方も本邦におけるヒト ES 細胞の臨床試験の申請と施行に重要であると考えられる。

#### 参考文献

1. Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*. 2012; 379(9817):713-720.

2. 『ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価』について (平成 12 年 2 月 22 日医薬審第 329 号)

#### D. 研究発表

##### 1. 著書

1) Mhendra Rao、(訳) 三浦巧、阿久津英憲: 「アメリカにおける細胞治療システムの課題」医学のあゆみ, 229(9):679-680, 2009.

2) 阿久津英憲、梅澤明弘: 第 5 章 細胞周辺環境のための培養技術 6. フィーダーレイヤー, 遺伝子医学 MOOK 別冊 ますます重要になる細胞周辺環境 (細胞ニッチ) の最新科学技術, 田畑泰彦 (編集)

メディカルドゥ, 354-357, 2009.

3) 阿久津英憲、梅澤明弘: 第 3 章 病態解明 1. ES 細胞の病態解明への応用, 幹細胞の分化誘導と応用-ES 細胞・iPS 細胞・体性幹細胞研究最前線-, エヌ・ティイー・エス, 413-423, 2009.

4) 阿久津英憲、梅澤明弘: 「ヒト由来フィーダー細胞の確立」再生医療 日本再生医療学会雑誌, 8(2):57-62, 2009.

5) 阿久津英憲、草川森士、梅澤明弘: 「ヒト ES 細胞を用いた臨床試験」感染・炎症・免疫, 41(4):68-72, 2011.

6) 阿久津英憲、佐藤星子: 「ヒト ES 細胞, iPS 細胞」生命の誕生に向けて (第二版) 編集; 日本哺乳類動物卵子学会: 268-272, 2011.

7) 三浦巧、阿久津英憲: 「目で見る生殖と再生 iPS 細胞 (図説)」HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY, 18(3):232-236, 2011.

#### 2. 論文発表

1) Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, **Akutsu H**, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A. Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS. *Exp Cell Res*. 2009; 315(16):2727-2740.

2) Yamada M, Hamatani T, **Akutsu H**, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Hum Mol Genet*. 2009; 19(3):480-493.

3) Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, **Akutsu H**, Umezawa A, Tada T. Efficient reprogramming of human and mouse

- primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. *Genes Cells*. 2009; 14(12):1395-404.
- 4) Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, **Akutsu H**, Liu DR, Rubin LL, Eggan K. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell*. 2009; 5(5):491-503.
  - 5) **Akutsu H**, Miura T, Machida M, Birumachi J, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation*. 2009; 78(2-3):137-42.
  - 6) 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.
  - 7) 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.
  - 8) 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.
  - 9) 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.
  - 10) 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.
  - 11) Egli D, **Akutsu H**. Aging of the Female Reproductive System. *J Mamm Ova Res* 2011; 28: 118-125.
  - 12) Takezawa Y, Yoshida K, Miyado K, Sato M, Nakamura A, Kawano N, Sakakibara K, Kondo T, Harada Y, Ohnami N, Kanai S, Miyado M, Saito H, Takahashi Y, **Akutsu H**, Umezawa A. Beta-catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Scientific Reports* 2011; Article number: 68.
  - 13) Gokoh M, Nishio M, Nakamura N, Matsuyama S, Nakahara M, Suzuki S, Mitsumoto M, **Akutsu H**, Umezawa A, Yasuda K, Yuo A, Saeki K. Early senescence is not an inevitable fate of human-induced pluripotent stem-derived cells. *Cell Reprogram*. 2011;13(4):361-370.
  - 14) Tateno H, Toyota M, Saito S, Onuma Y, Ito Y, Hiemori K, Fukumura M, Matsushima A,

- Nakanishi M, Ohnuma K, Akutsu H, Umezawa A, Horimoto K, Hirabayashi J, Asashima M. Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem*. 2011; 286(23):20345-20353.
- 15) Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet*. 2011; 7(5):e1002085.
- 16) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol*. 2011;11:22.
- 17) Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem*. 2011; 286(13):11593-11603.
- 18) Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, Akutsu H. Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2012 Mar 8;3(2):8.
3. 学会発表
- 1) 阿久津英憲 : 「ヒト iPS 細胞遺伝子発現動態の多様性」第 8 回日本再生医療学会総会シンポジウム 3 月 5-6 日, 2009 年
- 2) 阿久津英憲 : 「難治性疾患克服に向けたヒト iPS 細胞の可能性」日本人類遺伝学会第 54 回大会 ワークショップ 4, 9 月 23~26 日, 2009.
- 3) 阿久津英憲 : 「Human Embryonic stem cells and iPS Cells: Potential tool for Low temperature medical experiments」第 36 回日本低温医学会総会・学術集会シンポジウム 2, 11 月 27~29 日, 2009.
- 4) H Akutsu. “Xeno-Free Growth and Expansion of Human Pluripotent Stem Cells”, Commercial Tutorial Directory; ISSCR 8th annual meeting, San Francisco, CA USA. 18th Jun, 2010.
- 5) 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.
- 6) 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, 1st-4th Sep, 2010.
- 7) H Akutsu. “Development of xeno-free culture systems of human embryonic stem cells for cell therapy”, JST/CIRM Workshop “Early translational research on stem cells”, Kobe, 16th May, 2011.
- 8) 阿久津英憲 : 「特別講演 再生医療を見すえたヒト ES 細胞の樹立」日本組織培養学会 第 84 回大会, 東京, 5 月 28 日, 2011 年
- 9) H Akutsu. “Human ES cell and iPS cell derivation: Clinical application and biological characterization”, 16th World Congress on In Vitro Fertilization, Tokyo, 13th Sep, 2011.
- 10) 阿久津英憲 : 「臨床グレード ES 細胞

の作製を目指して」理化学研究所筑波研究所, つくば, 11月7日, 2011年

- 11) 阿久津英憲: 「新たなヒト胚作製技術の報告(米国)について」第64回生命倫理専門調査会, 中央合同庁舎第4号館第2特別会議室, 1月17日, 2012年
- 12) 阿久津英憲: 「臨床応用を目指すヒトES細胞研究の現状」第15回ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会, 厚生労働省17階 専用第18-20会議室, 1月25日, 2012年
- 13) 阿久津英憲: 「新たなヒト胚作成技術について～SCNT法による3倍体ES細胞論文の背景～」科学技術・学術審議会生命倫理・安全部会 特定胚及びヒト

ES細胞等研究専門委員会(第80回), 文部科学省16階 特別会議室, 1月25日, 2012年

- 14) 阿久津英憲: 「ヒトES細胞の臨床応用へ向けた取り組み」バイオリジクスフォーラム第9回学術集会, 東京 タワーホール船堀, 2月22日, 2012年

#### 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

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  
総合研究報告書  
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し、産・学・官が共通に参照でき活用できる評価指標と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、糖タンパク質糖鎖を一斉に比較解析する糖鎖プロファイリング技術を開発し、これをヒト培養細胞に適用し、細胞特性解析技術としての適用可能性について検証した。また、開発した細胞特性解析技術を用いて、糖鎖を指標とする細胞分化の評価ならびに各種 iPS 細胞の細胞特性評価へと応用し、糖鎖を指標とする細胞特性解析技術の有用性について検証した。

### A. 研究目的

治療効果を有する細胞を直接、あるいは原料となる細胞から増殖、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得て体内に移植したり、増殖・分化能を有する細胞をヒト体内に移植するなどの「再生医療」分野で、その技術の実用化に向けた研究が盛んに行われている。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等の様々な特性を把握し、これらの細胞を確認・同定、識別したり、細胞の品質を管理する方法論の確立が急務となっている。

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変動から、細胞表面における糖鎖構造が変化し、さらに細胞の分化度等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としても期待できる。

一方、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ける課題として、その細胞治療材料としての有用性だけでなく、細胞への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もいくつかの問題が残されている。このような各種幹細胞の安全面での対策においても糖鎖を指標とする評価技術の有用性に期待が寄せられるが、これまでに糖鎖を指標とした幹細胞

胞の安全性評価基準策定に関する検討は殆どされていない。

以上のような背景の下、本研究では糖鎖を指標とする細胞特性解析技術の開発を行うとともに、各種幹細胞の特性解析法としての有用性と適用可能性について検証した。また、幹細胞の安全性確保のための基礎的検討項目として、iPS 細胞への異種動物由来成分混入ならびにその原因について調査した結果について報告する。

## B. 研究方法

### B.1. ヒト培養細胞の培養

ヒト培養癌細胞は 10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培養液を用いて培養した。

### B.2 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 で細胞を洗浄し、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.3 iPS 細胞の培養

iPS 細胞はマイトマイシン 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 Replacement: KSR) を含む培養液を用いて培養した。

### B.4 細胞総タンパク質分画の調製

培養細胞を 1 M EDTA を含む PBS 中に懸濁し、2 M Thiourea および 5 M Urea 水溶液、1 M DTT および Benzonase 溶液を加え室温

でインキュベート後、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、沈殿したタンパク質を遠心分離し回収した。得られた沈殿は 75%エタノールにて洗浄し細胞総タンパク質とした。

### B.5 O-結合型糖ペプチド分画の調製

細胞総タンパク質の凍結乾燥物を 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)に懸濁し、プロナーゼ (50  $\mu$ g) を加え 37 °C で 24 時間反応した。反応後、反応液を沸騰水浴中で 10 分間煮沸し、遠心分離後の上清に 2M NaBH<sub>4</sub> (500  $\mu$ L) を加え、室温で 30 分間インキュベートした。反応液に氷酢酸を注意深く滴下し限外ろ過フィルター (MWCO 5000) を用いて脱塩し、フィルター上部をムチン型糖ペプチド分画として回収した。

### B.6 O-結合型糖鎖の遊離

研究室で開発した O-結合型糖鎖自動切り離し装置 (AutoGlycoCutter-2 (AGC-2) : 島津製作所) を使用した。糖鎖切り離しのためのアルカリ溶液として 0.5 M 水酸化リチウム水溶液を用い、糖鎖遊離反応温度は 45°C とし、反応時間は 3 分で行った。細胞から得られた糖ペプチド分画の水溶液を AGC-2 に導入し、得られたムチン型糖鎖を回収し凍結乾燥した。

### B.7 N-結合型糖鎖の遊離

総タンパク質分画を SDS、2-メルカプトエタノール、NP-40 を 1%ずつ含むリン酸緩衝液 (pH 7.5) 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、冷エタノールを加え 12000 g で 15 分間遠心分離し上清を濃縮乾



固し、N-結合型糖鎖として回収した。

#### B.8. 糖タンパク質糖鎖の蛍光標識

糖タンパク質糖鎖を含む試料に 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/メタノール溶液を 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タンパク質由来糖鎖とした。

#### B.9. 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) を使い、キャピラリーは DB-1 キャピラリー (内径 100  $\mu$ 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°C、試料注入は加圧法 (1 psi) により 5 秒間とした。また、検出はヘリウムカドミウムレーザー励起蛍光検出 (励起 325 nm、蛍光 405 nm) で行った。

#### B.10. 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析

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) を使い、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.11. 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) を使い、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。

#### B.12. MALDI-TOF MS

装置には AXIMA-Resonance (Shimadzu 製) を使い、リニア-ネガティブイオンモードにより測定した。試料は DHB/メタノール溶液と等量混合し試料プレート上で風乾させた。

#### B.13. 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) を使い、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 細胞 O-結合型糖鎖の解析技術開発 (平成 21 年度)

糖タンパク質糖鎖のうちタンパク質のアスパラギン残基に結合する N 結合型糖鎖の解析については、コアタンパク質より糖鎖を切断し、蛍光標識化し HPLC や MS を解析する手法が広く浸透している。一方、O-結合型糖鎖の解析は、アルカリ還元法により O-結合型糖鎖を遊離し、HPLC や MS により解析する方法が一般的である。しかしながら同じ O 結合型糖鎖でも、GalNAc を介しコアタンパク質に結合するムチン型糖鎖と Xyl を介しコアタンパク質に結合する GAG 型糖鎖は、糖鎖の物理化学的な特性の違いから、分離分析については異なる手法を用いて行われてきた。本項では研究室で開発した高速糖鎖自動切断装置“AutoGlycoCutter (AGC)”とセロトニンアフィニティークロマトグラフィーを組合わせたムチン型糖鎖の比較糖鎖プロファイリング技術を PG 型糖鎖解析へ応用を図った。

#### C.1.1 培養細胞の O-結合型糖鎖の解析

ヒト大腸癌細胞 HCT116 の O-結合型糖鎖混合物についてセロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる分画を試みた。結果を Fig.1 に示す。その結果、3 分～16 分間にシアル酸残基数の異なるムチン型糖鎖と考えられる 6 つのピークが観察された。一方、1M NaCl の溶出により 22 分～26 分に GAG 型糖鎖と考えられるピークが観察された。観察された各ピークを分画し、順相 HPLC とキャピラリー電気泳動により分析した。

順相 HPLC では、M1～M6 の全ての分画においてムチン型糖鎖が観察された (Fig.2,

Table 1)。M1 分画ではムチン型 Core2 構造を持つ 4 糖 ( $\text{Gal}\beta 1-3[\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-6]\text{GalNAc}$ ) を主とし、さらにラクトサミンユニット ( $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ ) が 1~2 ユニット付加したオリゴ糖が観察された。M2 分画では Core2 骨格を持つ 4 糖に N-アセチルノイラミン酸が付加したモノシアロオリゴ糖を主とし、さらにラクトサミンユニットが 1~2 ユニット付加したオリゴ糖が観察された (Fig.2, Table 1)。M3 分画ではシアリル T 抗原糖鎖が観察され、シアリル T 抗原糖鎖に N-acetylglucosamine が付加したオリゴ糖の含量が最も高かった。M4～M6 のうち、M4 分画は、N-アセチルノイラミン酸と Galactose から構成されるオリゴ糖であり、AGC においてピーリング反応により生じた分解物であった (Fig.2, Table 1)。一方、M5 と M6 分画のオリゴ糖はいずれも N-アセチルノイラミン酸を 2 残基持つジシアロオリゴ糖であり、M5 は Core2 骨格を持つ 4 糖およびさらにラクトサミンユニット 2 ユニットが付加した 6 糖の非還元末端に N-アセチルノイラミン酸を 2 残基持つオリゴ糖であった (Fig.2, Table 1)。一方、M6 はジシアリル T 抗原糖鎖が主要なオリゴ糖であった。なお、1MNaCl によって溶出される 20 分以降の分画にはムチン型糖鎖は全く観察されなかった。

1MNaCl によって溶出される分画は、脱塩濃縮後、3 種類の GAG 型糖鎖加水分解酵素を組合わせて不飽和二糖とし蛍光標識化して、キャピラリー電気泳動法による 2 糖組成分析を実施した。Fig.3a に HCT116 細胞由来の 1M NaCl 溶出分画を Chondroitinase ABC により消化し、蛍光標識後 CE により分析した結果を示す。また、フェログラム上で観察された各不飽和二糖

の構造を Fig.4 に示す。不飽和二糖標準品の分析結果との比較、および標準品の添加実験により各ピークを同定した結果、12 分付近のピークは硫酸基を持たない $\Delta$ di-HA および $\Delta$ diCS-0S、7 分付近のピークは硫酸基を 1 残基有する $\Delta$ diCS-4S および $\Delta$ diCS-6S、そして 5 分付近のピークは硫酸基を 2 残基有する  $\Delta$ diCS-SE であった。また、Heparitinase 1 および Heparitinase 2 の同時消化で得られた HS 由来の不飽和 2 糖を CE により分析した結果(Fig.3b)、15 分に硫酸基を持たない $\Delta$ diHS-0S が、7 分に硫酸基を 1 残基有する  $\Delta$ diHS-NS、 $\Delta$ diHS-6S、 $\Delta$ diHS-2S が、4.5 分に硫酸基を 2 残基有する $\Delta$ diHS-S1、 $\Delta$ diHS-S2、 $\Delta$ diHS-S3 が、そして 3.7 分に  $\Delta$ diHS-TriS が観察された。以上の結果、HCT116 では硫酸基を持たない $\Delta$ diCS-0S や  $\Delta$ diHS-0S により構成される GAG 鎖を多く含むと考えられた。培養癌細胞をはじめとする生体試料から抽出したサンプルを解析する際、試料由来と考えられる不純物のピークなどが観察され、ピークの同定や定量が困難となることが多い。しかし、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーにより分画された GAG 糖鎖分画では培養癌細胞由来の GAGs 不飽和 2 糖を高精度に解析できた。なお、ムチン型糖鎖分画(M1~M6)を酵素消化し 2 糖組成分析した結果、GAGs 由来不飽和 2 糖のピークは観察されなかったことから、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーを用いることで、培養癌細胞由来の O-結合型糖鎖群からムチン型糖鎖と GAGs を簡便に分画できることがわかった。また得られた各分画について NP-HPLC、MALDI-TOF MS、CE および各種酵素消化を組み合わせて解析することで培養癌細胞中のムチン型糖鎖と GAG の両方を含む O-結合型糖鎖混合物を一挙に定量

的かつ網羅的に解析できる手法を開発することができた。O-結合型糖鎖は N-結合型糖鎖に比べ、不均一性が高く種々の 2 次修飾等を受け易く、細胞の生物学的特性を把握しやすいため、細胞特性解析のための指標として有用であることがわかった。

## C.2.糖タンパク質糖鎖解析技術の細胞特性解析への適用可能性の検証（平成 21 年度）

糖鎖を指標としてヒト幹細胞や人工多能性幹細胞の評価基準を策定するためには、広く一般的に用いられる糖鎖解析技術を利用して、細胞の糖タンパク質糖鎖を解析し、評価法としての実行可能性を明らかにしておかなければならない。本項では開発済みの糖鎖解析技術の細胞評価法としての実行可能性を評価するとともに、10 種類のヒト培養癌細胞をモデルとして N-結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリングを行い、糖鎖を指標とする細胞特性解析技術としての有用性を検証した。

### C.2.1 細胞特性解析の指標としての糖鎖の適用可能性の検証

糖鎖を指標とする細胞の評価法としての実行可能性を評価するため、ヒト胃腺癌細胞 MKN45 を 3 ロット培養し、各ロットから N-結合型糖鎖分画を調製し、各分画をキャピラリー電気泳動法により分析した。結果を Fig.5 に示す。観察されたピークのうち、細胞の種類に係わらず発現が認められるピーク a のモノシアロ糖鎖、ピーク c~e のハイマンノース型の M6、M7、M8 糖鎖と MKN45 に特徴的に発現するピーク b のフコシル化糖鎖の相対ピーク面積比を算出した。なお、相対ピーク面積比はピーク a~e の総ピーク面積に対する各ピーク面積値とした。

Table2 に示すように、各ピークの相対面積比の相対標準偏差 (RSD) は何れも 8%以下であり、各糖鎖の発現量は細胞ロットの違いによって著しく変動せず、細胞特性解析の指標となりうることがわかった。

### C.2.2 細胞特性解析の指標としての糖鎖の有用性の検証

糖鎖解析技術を細胞特性解析技術として適用するためには、細胞の発現糖鎖パターンの比較から細胞を識別できるか否かを明らかにしなければならない。そこで、由来組織、分化度の異なる 10 種類のヒト癌細胞の N-結合型糖鎖の発現糖鎖パターンを比較した。結果を Fig.6 に示す。Panc1 と BxPC3 については 15~20 分に観察されるハイマンノース型糖鎖が同様のパターンを示したが、BxPC3 では 20 分前後に特徴的なアシアロ複合型糖鎖が観察された。また、Panc1 は BxPC3 に比べ、10 分前後のシアロ糖鎖が複雑なパターンを示した。大腸癌細胞である LS174T と HCT15 については 7 分から 13 分付近に観察されるシアロ糖鎖のパターンが大きく異なり、また LS174T は 20 分以降のアシアロ複合型糖鎖の含量が高いことが特徴的であった。分化度の異なる 2 種類の胃腺癌細胞である MKN45 と MKN7 ではアシアロ複合型糖鎖以外のハイマンノース型糖鎖とシアロ複合型糖鎖のパターンが著しく異なっていた。特に、MKN7 では 5~10 分までのシアル酸含量の高い高分岐のトリシアロ、テトラシアロ糖鎖の含量が高かった。一方、4 種類の血球系細胞については、7 分~14 分までのシアロ糖鎖のパターンが大きく異なり、HL-60 ではシアロ糖鎖含量が最も低いのにに対し、U937 と Jurkat では多様なシアロ糖鎖の存在が伺えた。このように、細胞に発現する糖タンパク質糖鎖は、

細胞種によって異なるだけでなく、同じ起源の癌細胞であっても、悪性度や分化度の違いなどにより発現する糖鎖パターンは大きく異なることがわかった。

次に 10 種類の細胞由来の N-結合型糖鎖を MALDI-TOFMS を用いて解析し、バイセクティング GlcNAc を持つ糖鎖、Gal-GlcNAc の繰り返し構造を持つポリラクトサミン型糖鎖、硫酸基を有する糖鎖の発現の有無を 10 種類の細胞で比較した (Table3)。バイセクティング GlcNAc は Jurkat を除くすべての細胞で観察され、癌細胞に恒常的に発現していることがわかった。ポリラクトサミン型糖鎖は MKN7 を除くすべての細胞で観察され、特に HL-60 では発現量が高いことが特徴であった。一方、硫酸基を持つ糖鎖は HCT-15 と LS174T の 2 種類のみで観察された。以上のように、細胞の糖鎖として特異的なレクチンや糖鎖認識抗体などによって認識できる特徴的な糖鎖についても、細胞の種類や分化度の違いにより特徴的なパターンを示すことがわかった。

以上の結果から、細胞の糖タンパク質糖鎖は、細胞の種類だけでなく、分化度の違いによって特有のパターンを示すことから、細胞特性解析のための指標として有用であることがわかった。

### C.3.糖鎖解析技術の細胞分化評価への適用可能性 (平成 22 年度)

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