

日本国内では、公的バンクとして理化学研究所バイオリソースセンター（理研 BRC）と医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクから iPS 細胞が提供されている。理研 BRC には、主に疾患特異的な iPS 細胞が寄託されており、JCRB 細胞バンクは品質管理法や評価法を開発しつつ、創薬研究へ応用可能な iPS 細胞のバンキングを目指している。公的バンクに登録されていない細胞株については、樹立を行っている京都大学再生科学研究所、京都大学 iPS 細胞研究所、また、国立成育医療センターから直接分与されている。

一方で、iPS 細胞を大量に作製して、医薬の評価や再生医療に応用するための研究とした巨大プロジェクトが始まっている。ハーバード大学幹細胞研究所の研究プログラムの一つである iPS Core Facility では、iPS 細胞作製を受託し、iPS 細胞の供給を行っている。カリフォルニア再生医療機構（CIRM）から 3230 万ドルの助成金を受けた Cellular Dynamics International（CDI）は、11 疾患 3000 人から 9000 株の iPS 細胞を構築する計画である。また、ヨーロッパでは、StemBANCC プロジェクトと称して、5 カ年の幹細胞の研究を推進するプロジェクトを開始しており、11 カ国 35 研究機関と 35 企業が産学連携で、500 人から 1500 株の iPS 細胞を構築し、新しい医薬や治療法の開発を目指している。

4 ヒト ES/iPS 細胞レジストリー

世界中で多くのヒト ES 細胞が樹立され、現在では 1000 種類以上とも言われ、iPS 細胞も含めると数千株以上とも言われている。細胞株の相互利用のため、データベースバンク体制の整備・登録（レジストリー）が構築されている（表）。米国では、2001 年オバマ政権となって新しくヒト ES 細胞研究のガイドラインが策定され、NIH は各ヒト ES 細胞株がガイドラインに沿うかどうか検討し、承認したヒト ES 細胞株をヒト ES 細胞登録（NIH Human Embryonic Stem Cell Registry）している。登録された細胞は NIH の研究費を使った研究で使用可能とされている。英国では Stem Cell Bank 運営委員会の管理している UK 幹細胞株登録（UK Stem Cell Line Registry）によって、英国内で使用可能な 218 種類の細胞株の情報が提供されている。EU は、バルセロナ幹細胞バンク（BLCB）とベルリン-ブランデンブルグ再生治療センター（BCRT）、UK 幹細胞バンクが連携し、ヨーロッパヒト胚性幹細胞登録（European Human Embryonic Stem Cell Registry）を作成し、hES 細胞を 690 株、hiPS 細胞を 52 株を登録している。韓国では、hES 細胞の登録が法律として整備され、現在は 60 種類以上の細胞株が登録されている。

この登録の際に浮き上がってきた問題が、細胞の命名法である。異なる研究機関で樹立された別個の細胞に全く同じ名前を命名する例や、混同しやすい名前が含まれている例が散見された。そのため、ヒト ES/iPS 細胞の国際的な相互利用に向けて、細胞登録における命名法の統一規格が求められている。日本において、国内細胞バンクが整備される 1984 年以前は、日本組織培養学会が細胞株を認定して JTC の番号を付与して登録する事業を実施していた。公的バンクが整備され、細胞の品質管理が進んできている昨今、培養細胞のクロスコンタミネーションが明らか

となってきた。樹立した細胞株は、できるだけ公的バンクに寄託し、細胞の品質が確認されたものを研究に使用することが望ましい。公的バンクに寄託されれば、各バンクで細胞登録番号が付与され、混乱は防げる。しかし、一般名で論文検索された場合にはやはり混乱が生じる。2010年の国際幹細胞学会 (ISSCR) および ISCI のワークショップで命名法について議論され、「ヒト ES/iPS 細胞株命名法および細胞登録に関する統一規格の案」として、米国科学誌「Cell Stem Cell」2011年に掲載され¹²⁾、この提案についてコメントも発表された¹³⁾。これらの状況について、著者らは2012年に概説した¹⁴⁾。相互利用するためには不可欠な細胞登録における「細胞株の命名法」に関しても標準化することが現在の重要課題であり、国内でも議論が必要である。

5 培養法の開発と標準化

Thomson らによって樹立された ES 細胞には、マイトマイシン C あるいは γ 線照射により MEF を不活性化したマウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast : MEF) をフィーダー細胞として、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), あるいは DMEM と F12 培地を 1:1 に混合した DM/F12 を基礎培地にして、20% 牛血清を加えて使用されていた¹⁾。しかし、血清成分には、ヒト ES 細胞の分化誘導や増殖阻害を行う成分が含まれていることから、近年では、KnockOut DMEM (ライフテクノロジー) の基礎培地に、代替血清 knockout-serum replacement (KSR, ライフテクノロジー) と塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を加えた条件が、世界的に標準的な使用とされている¹⁵⁾。KSR とフィーダー細胞を用いた方法は、多くのヒト ES/iPS 細胞株で安定な培養が可能であるが、KSR は動物由来成分を含んでいるため、ロット差がある。さらに、解凍後は2週間以内の品質保証しかなく、培地の管理が難しい。また、MEF のマウスの系統は樹立に使用したものをを用いることが望ましく、すべてヒト ES/iPS 細胞株について同じ系統の MEF をフィーダーとして使えるわけではない。また、MEF には多くの細胞が混在しており、品質は不安定でロットチェックが必要である。不死化線維芽細胞 STO 株は容易に増やすことができ、ロット差なく使用できるが、ヒト ES/iPS 細胞株との相性の問題や、長期間 (4日間以上) 培養できない問題点もある。

近年、ヒト ES/iPS 細胞の未分化維持機構の解明が進み、従来の MEF を用いた培養方法から変わりつつある。細胞外マトリックスとして、ビトロネクチン、ラミニン、フィブロネクチンなど精製された成分が使用されるが、マウス肉腫から単離した再構成基底膜成分マトリゲル (Becton, Dickinson and Company : BD) が用いられることも多い。

添加因子の影響を再現性高く正確に把握するためには、未知の成分を含まず、既知の成分からなる培地を使うべきであるという無血清培養法 (chemically defined serum-free culture) は1975年に Sato GH ら¹⁶⁾により提唱された。1979年に Bottenstein JE と Sato GH¹⁷⁾が神経細胞の無血清培養のためのサプリメント N2を開発した。その後、Sato GH の息子の Sato JD ら^{18, 19)}によってハイブリドーマ用の無血清培地として RPMI と DMEM が 1:1 で混合した基礎培地

(RD) に、5 因子 (インシュリン、トランスフェリン、2-メルカプトエタノール、2-エタノールアミン、セレン酸ナトリウム) を加えた培地や、6 因子 (5 因子+オレイン酸) に改良された。一方、1993 年に、ギブコ社の Price PJ らによって²⁰⁾、インシュリンを含む 20 因子から構成されている B27 サプリメントが開発された。やがて、2006 年に Ludwig TE と Thomson らが mTeSRTM1 培地を発表し²¹⁾、現在、米国内で広く使用されている。DM/F12 を基礎培地とし、FGF-2、TGF- β 、LiCl、GABA、ピペコリン酸など既知の成分を含んだ培地とマトリゲルと併用して使用する。2007 年に、Wang L ら²²⁾ は組換え型ヘレグリン-1 β 、アクチビン A、LR3-IGF1、および FGF2 などを含む既知の組成からなる StemPro[®]hESC SFM 培地を開発した。2008 年には、筆者と Andrews PW らがマウス ES 細胞用無血清培地の基礎培地 ESF 培地²³⁾ に 9 因子のみを含む低たんぱく質培地 hESF9 を発表した²⁴⁾。さらに、動物由来成分を除き、必要最低限の組成からなる ES 細胞用培地 hESF-FX (特願 2011-019109)、hESF9_{2ai}²⁵⁾ に改良し、添加因子の影響を正確に解析できる培地として使用している。Thomson らは²⁶⁾ 2011 年に BSA やメルカプトエタノールを含まない 8 因子だけを含む低タンパク質培地 TeSRTM-E8TM を発表した。このほかにもフィーダー細胞を用いない無血清培地の開発が様々報告されているが、既知の精製された成分より構成され、成分が公開されている培地は、TeSRTM-E8TM、StemPro[®]hESC SFM と筆者らの培地 hESF シリーズだけである。

このように、ヒト ES/iPS 細胞の培養用の培地は次々と開発され、研究者らはそれぞれの研究の目的にあった培地を選択して使用している。しかし、すべての細胞株をだれもが安定して培養できるようになっていないのは、まだ十分にヒト ES/iPS 細胞の未分化維持機構が解明されていないからではないだろうか。ヒト ES/iPS 細胞の培養が標準化されるには、もう少し時間がかかると思われる。

6 求められる標準化

日本では、国家戦略として iPS 細胞研究ロードマップが策定され、再生医療や疾患モデル研究、創薬開発に応用することを目指している。国民の意識調査において、再生・細胞医療に対する期待度を、20 歳代から 70 歳代の 2900 人でアンケートを行った結果、強く期待するもしくは期待すると回答した者は、全体の 75% 以上であり、再生医療への期待が大きいことが分かる。一方で、ES/iPS 細胞のゲノム不安定性や、分化誘導の再現性など、解決すべき課題も多い。そこで、まず、我々が対処できる事としては、ES/iPS 細胞の品質管理、品質評価による標準化である。機械を用いた自動化システムにより、一定の品質管理と安定な供給を実現することができれば、再現性の高い研究成果につながり、やがては臨床応用へ発展させることも可能である。さらに、国内アカデミア、官民が連携し、活発な情報交換や国際基準の提案を行い、技術だけでなく理念の定義も標準化していくことにより、幹細胞研究が加速され、臨床応用へ道が開けると期待するものである。

文 献

- 1) J. A. Thomson *et al.*, *Science*, 282, 1145-7 (1998)
- 2) H. Suemori *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345, 926-32 (2006)
- 3) K. Takahashi and S. Yamanaka, *Cell*, 126, 663-76 (2006)
- 4) K. Takahashi *et al.*, *Cell*, 131, 861-72 (2007)
- 5) J. Yu *et al.*, *Science*, 318, 1917-20 (2007)
- 6) P.W. Andrews *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 23, 795-7 (2005)
- 7) International Stem Cell, I, *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 25, 803-16 (2007)
- 8) International Stem Cell, I, *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 29, 1132-44 (2011)
- 9) B. S. Mallon *et al.*, *Stem Cell Res.*, 10, 57-66 (2013)
- 10) L. Healy *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 1981-8 (2005)
- 11) Initiative, T. I. S. C. B., *Stem Cell Rev. and Rep.*, 5, 301-314 (2009)
- 12) M. X. Luong *et al.*, *Cell Stem Cell*, 8, 357-9 (2011)
- 13) H. Higashi *et al.*, *Cell Stem Cell*, 8, 606-7 (2011)
- 14) 菅 三佳ほか, 再生医療 日本再生医療学会雑誌, 11, 2-8 (2012)
- 15) M. Amit *et al.*, *Dev. Biol.*, 227, 271-8 (2000)
- 16) G. Sato, *Academic*, 391-396 (1975)
- 17) J. E. Bottenstein and G. H. Sato, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 76, 514-7 (1979)
- 18) J. D. Sato, T. Kawamoto and T. Okamoto, *J. Exp. Med.*, 165, 1761-6 (1987)
- 19) Y. Myoken *et al.*, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 25, 477-80 (1989)
- 20) G. J. Brewer *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, 35, 567-76 (1993)
- 21) T. E. Ludwig *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 24, 185-7 (2006)
- 22) L. Wang *et al.*, *Blood*, 110, 4111-9 (2007)
- 23) M. Furue *et al.*, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 41, 19-28 (2005)
- 24) M. K. Furue *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 105, 13409-14 (2008)
- 25) M. Kinehara *et al.*, *PLoS One*, 8, e54122 (2013)
- 26) G. Chen *et al.*, *Nat. Methods*, 8, 424-9 (2011)

<発生・再生>

17. 新規iPS/ESマーカー抗体とその応用

川崎敏祐, 川崎伸子, 中尾広美, 松本尚悟, 古江-楠田美保, 豊田英尚

ヒトiPS (induced pluripotent stem) 細胞をマウスに免疫してiPS/ES (embryonic stem) 細胞表面マーカー認識抗体R-10Gを得た。既存のマーカー抗体であるTRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-4などと異なり、ヒトEC (embryonal carcinoma) 細胞 (胎児性がん細胞) には結合しないため、ヒトiPS/ES細胞の品質管理、細胞集団選別試薬として有効である。R-10Gはこれまで免疫学的に検出することができなかった低硫酸化ケラタン硫酸を認識する抗体であり、免疫沈降法、ウエスタンブロット、免疫組織染色などで、これまで見落とされていた低硫酸化ケラタン硫酸の検出に有効なツールとなることが期待される¹⁾。

はじめに

細胞表面の糖鎖は分化・発生のさまざまな段階において多様に変化する。糖鎖認識抗体はこれらの変化を鋭敏に察知するプローブである (GlycoEpitope DB)²⁾。幹細胞研究においても、ヒトiPS/ES細胞の表面マーカーとして汎用されている³⁾⁴⁾。すなわち、SSEA-3, SSEA-4のエピトープはグロボシリーズの糖脂質であり、TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM2, GCTM343のエピトープはプロテオグリカンの一種ケラタン硫酸である。しかしながら、ここで注意しなければならない

のは、これら既存の抗体のほとんどがEC (embryonal carcinoma) 細胞 (胎児性がん細胞) を免疫原として得られたものであることである。これらは、EC細胞表面マーカー検出抗体として開発されたものが、iPS/ES細胞にも陽性であることを利用しているものであり、iPS/ES細胞に特異的な成分のみを認識するものではない。このような背景のもと、われわれは、ヒトiPS細胞を免疫原としてヒトiPS細胞特異的なマーカー抗体を得ることを目的として研究を進め、以下に述べるような新規な糖鎖認識抗体を得ることができた。

■ 抗体の作製

免疫原としては、無フィーダー無血清培養したiPS細胞Tic (JCRB1331) を用い、マウスの腹腔あるいは皮下に注射した。1カ月後にリンパ節および脾臓リンパ球細胞を採取し、マウスミエローマ細胞 (P3U1) とPEG法により細胞融合した。融合細胞をHAT培地で培養し、得られたハイブリドーマの培養上清を、iPS細

[キーワード&略語]

iPS細胞, ES細胞, 糖鎖エピトープ, ケラタン硫酸, ポドカリキシン

EC細胞: embryonal carcinoma cells

ES細胞: embryonic stem cells

iPS細胞: induced pluripotent stem cells

Production and Characterization of Novel iPS/ES Marker Antibodies

Toshisuke Kawasaki¹⁾/Nobuko Kawasaki¹⁾/Hiromi Nakao¹⁾/Shogo Matsumoto¹⁾/Miho Kusuda-Furue²⁾/Hidenao Toyoda³⁾: Research Center for Glycobiotechnology, Ritsumeikan University¹⁾/Department of Disease Bioresources Research, National Institute of Biomedical Innovation²⁾/College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University³⁾ (立命館大学糖鎖工学研究センター¹⁾/医薬基盤研究所 腫瘍・疾患資源研究部²⁾/立命館大学薬学部³⁾)

表 R-10G抗体のヒトiPS/ES細胞マーカー検出試薬としての評価

	R-10G	TRA-1-60	TRA-1-81	SSEA-4	SSEA-3	SSEA-1
Tic	+++	++++	++++	+++	+++	+
KhES-3	+++	++++	++++	++++	+++	+
2102Ep	+	++++	++++	+++	+++	+

InCell Analyzer 2000™を用いてR-10Gおよび既知のマーカー抗体のiPS細胞 (Tic), ES細胞 (KhES-3), EC細胞 (2102Ep) への結合性を解析した。文献1をもとに作成

注) SSEA-1はマウスiPS/ES細胞認識抗体でありヒトiPS/ES細胞を認識しない

胞を固定化したウェルプレートに加えて反応させTic細胞に結合するハイブリドーマ29株を得た。次に、これらのハイブリドーマ上清について、EC細胞の一種である2102Ep細胞への結合性を調べた。数種のハイブリドーマ上清は、iPS細胞表面を強く染色したが、2102Ep細胞をほとんど染色しなかった。すなわち、本研究の目的としたiPSとEC細胞とを区別するiPS/ES特異的モノクローナル抗体が得られた。このうちハイブリドーマR-10Gの培養上清は、Tic細胞抽出物をSDS-PAGEした後のウエスタンブロットにおいて、高分子領域にブロードではあるが明瞭なバンドを示したので、まず、このハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体R-10Gについて性質を解析した。

2 R-10Gは新規なiPS/ES細胞の表面マーカー検出抗体である

R-10Gのヒト由来iPS細胞株 (Tic), ES細胞株 (KhES-3) およびEC細胞株 (2102Ep) に対する結合性を、従来のマーカー検出抗体 (以下、マーカー抗体と記す) であるTRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-3, SSEA-4, SSEA-1の結合性と比較した。表に示すようにR-10GはiPS細胞株 (Tic), およびES細胞株 (KhES-3) によく結合するが、EC細胞株 (2102Ep) にはわずしか結合せず、優れたiPS/ES細胞の表面マーカー検出抗体であることが示された。これに対し、従来のiPS/ES細胞の表面マーカー抗体であるTRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-3, SSEA-4はiPS細胞株, ES細胞株のみならずEC細胞株ともよく反応した¹⁾。

3 R-10Gにより明らかにされた未分化iPS細胞の多様性

R-10Gにより蛍光染色した培養iPS細胞のレーザー

共焦点像をTRA-1-60, TRA-1-81による染色像と比較して図1に示した。R-10Gは、核染色されるほとんどのiPS (TO-PRO3陽性) 細胞に、程度の差はみられるものの結合している (緑色)。TRA-1-60 (図1A, 赤色), TRA-1-81 (図1B, 赤色) も同様にほとんどのiPS細胞に結合している。しかし、R-10GとTRA-1-60あるいはR-10GとTRA-1-81の染色像をマージさせると、一部の細胞では両者のエピトープが同一場所あるいはごく近傍にほぼ等量存在し、黄色として観察されるが、ほとんどの細胞ではどちらかのエピトープが優位に発現していた。1つのiPS細胞コロニーを構成する未分化状態の細胞群が多様な表面抗原を発現していることにはいささか驚いたが、糖鎖が細胞表面の変化を鋭敏に察知するプローブであることを改めて実証したと考えている。このような糖鎖の変化がゲノムをはじめとする細胞内成分のどのような変化を表しているのか、細胞の分化の程度や方向性などの相違を示しているのかなど興味もたれる。

4 iPS細胞のR-10G抗原はポドカリキシンである

iPS細胞表面のR-10G結合抗原タンパク質は250kDa以上の高分子領域に幅広く拡散した単一バンドを示した。そこで、R-10G抗体カラムクロマトグラフィにより本抗原を精製し、ウエスタンブロットのバンドの位置に相当するタンパク質バンドを切り取り、そのトリプシン分解物をLC/MS/MSにかけ分析した (国立医薬品食品衛生研究所, 川崎ナナ博士のご協力による)。その結果、本抗原は、ポドカリキシン (podocalyxin) と同定された¹⁾。ポドカリキシンは、腎臓の糸球体上皮細胞 (足細胞) に見出された膜貫通型の糖タンパク質である⁵⁾。最近、TRA-1-60, TRA-

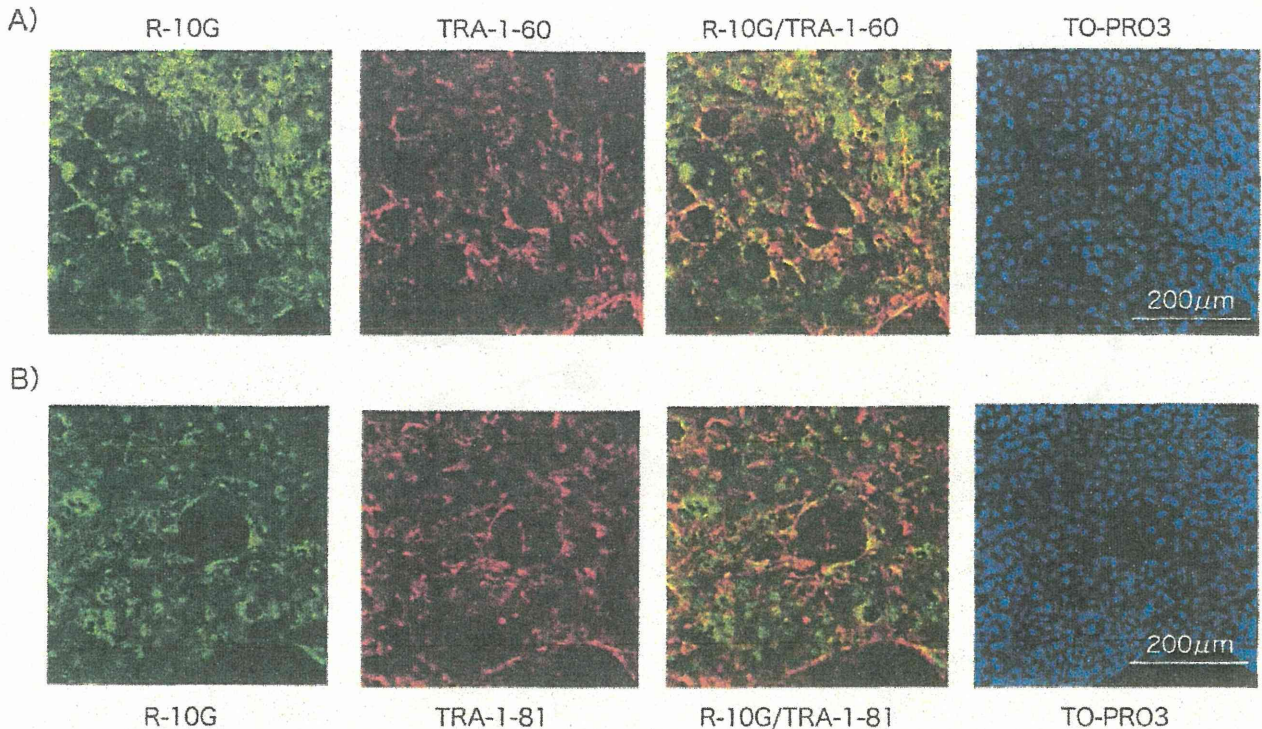


図1 R-10G エピトープのヒトiPS細胞表面での局在性

A) 培養Tic細胞をR-10G (緑) およびTRA-1-60抗体 (赤) で二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
B) R-10G (緑) およびTRA-1-81抗体 (赤) で二重染色

1-81のコアタンパク質もポドカリキシンポリペプチドであると報告されている⁶⁾。すなわち、R-10G, TRA-1-60, TRA-1-81は同一ポリペプチド上に発現している異なったエピトープを認識する抗体である(図2)。

5 R-10G エピトープは低硫酸化ケラタン硫酸である

R-10G抗原タンパク質のエピトープの解析は、まず、本抗原タンパク質を各種グリコシダーゼで消化し、消化処理前後の変化をSDS-PAGE, ウェスタンブロットにより解析する方法で行った。その結果、本抗原は、PNGase F, ノイラミニダーゼ, α 1-2および α 1-3/4フコシダーゼ, コンドロイチナーゼABC, ヘパリナーゼ, ヘパリチナーゼ消化によつては、ウェスタンブロットの位置および濃度に変化がみられないのに対して、ケラタナーゼ, ケラタナーゼII, エンド- β -ガラクトシダーゼで消化すると、R-10G陽性バンドは完全に消失した。後の3つの酵素はいずれもケラタン硫酸を分解する酵素であることから、エピトープはケラタン硫酸であると結論された。ケラタン硫酸は-3Gal β

1-4GlcNAc β 1-の2糖の繰り返し構造から構成されている。通常、GlcNAc残基の6位は硫酸化されている。Gal残基の6位は硫酸化されている場合(A)と、されていない場合(B)がある。(A)の繰り返し構造をもつ場合を高硫酸化ケラタン硫酸、(B)を低硫酸化ケラタン硫酸と便宜的に呼ぶことにする。上記の一連のケラタン硫酸分解酵素は異なる基質特異性を持ち、異なった結合部位で、ケラタン硫酸を分解することが知られているので、これらの性質を利用してケラタン硫酸の構造の概略を知ることができる(図3)。すなわち、本エピトープはエンド- β -ガラクトシダーゼにより容易に消化されたが、このことはほとんどのGal残基の6位は硫酸化されていないことを示唆している。次に、より直接的な証拠を得るために、本抗原タンパク質をケラタナーゼIIで消化し、消化物をポストカラム検出法を用いたイオンペア逆相HPLCで分析した⁷⁾。その結果、ほとんどすべての分解物がGal-GlcNAc(6S)の2糖であることが示された⁷⁾。したがって、本エピトープを構成するケラタン硫酸は、ガラクトース残基の硫酸化の度合いの低い、いわゆる低硫酸化ケラ

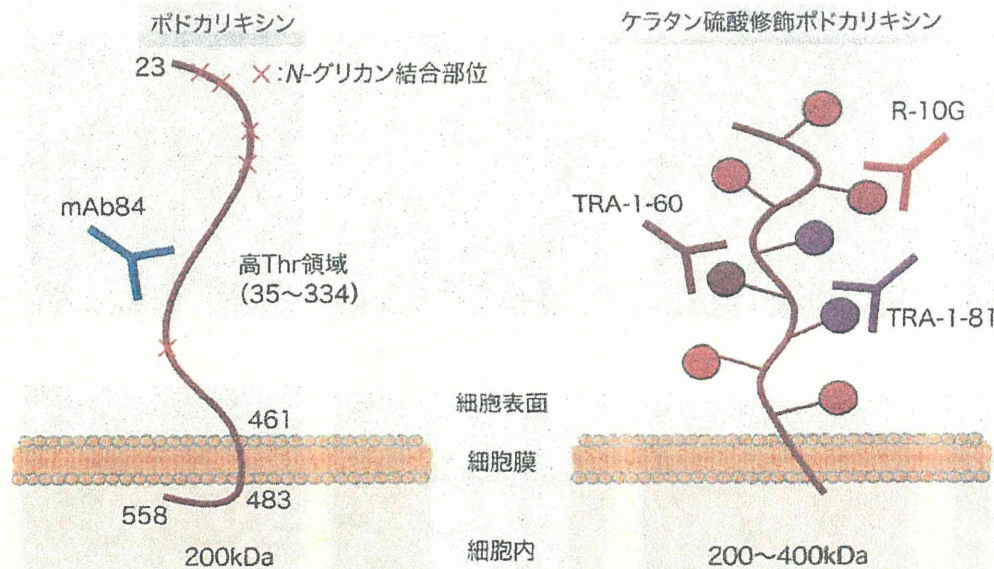


図2 ポドカリキシン分子上の多分化能細胞性エピトープ 一部は文献1をもとに作成

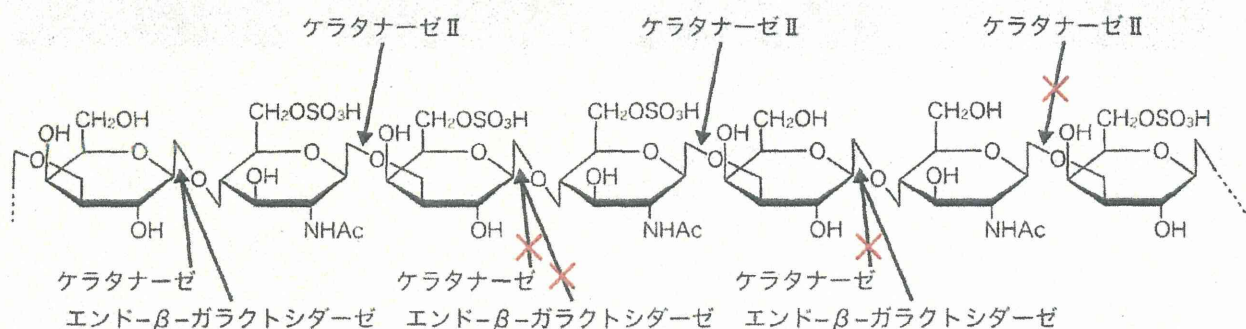


図3 ケラタン硫酸の構造と各種ケラタナーゼ分解酵素の基質特異性 図中、×印のついた矢印(基質切断部位)では酵素反応が進まないことを示す。文献1をもとに作成

タン硫酸であることが明らかとなった。

なお、ケラタン硫酸を認識する抗体はいくつかすでに市販されている。なかでも5D4抗体はケラタン硫酸の同定によく利用されている。5D4は高硫酸化ケラタン硫酸を認識するとされており⁷⁾、R-10Gとは異なる特異性をもつと予想された。実際、5D4はヒトiPS細胞に対して結合性を示さなかった。また、R-10Gおよび5D4はいずれもウシ角膜由来のケラタン硫酸と結合するが、5D4の結合はサメ軟骨由来の高硫酸化ケラタン硫酸の添加により顕著に阻害されるのに対し、R-10Gの結合はほとんど影響を受けなかった。すなわち、両者は同じケラタン硫酸認識抗体ではあるが、その性質は大きく異なっている¹⁾。

このように、R-10Gはこれまで免疫学的に検出することができなかった低硫酸化ケラタン硫酸を認識する抗体であり、免疫沈降法、ウエスタンブロット、免疫組織

染色などで、これまで見落とされていた低硫酸化ケラタン硫酸の検出に有効なツールとなることが期待される。

6 脳組織に発現するR-10G エピトープ

iPS/ES細胞の表面マーカー抗体は、必ずしもiPS/ES細胞のみを染色するというわけではない。同一の、あるいは交差反応性を示すエピトープが、胎児あるいは成体組織に検出されることもまれではない。例えば、TRA-1-81は、乳管、胃、小腸、大腸などに発現していることが知られている⁸⁾。そこで、R-10Gについてヒト組織アレイ(18組織、成人/胎児)を用いて組織染色で体内分布を調べてみた。その結果、成人の大脳・小脳にiPS/ES細胞に匹敵する染色がみられたが、その他には胎児肝臓がわずかに染色されたのみであった。すなわち、R-10Gエピトープの体内分布は既存のiPS/ES細胞マーカー抗体に比べても非常に限定されて

おり、多分化能細胞と脳組織に特徴的に発現している。なぜ、このような特徴的な分布を示すのか、多分化能細胞と脳組織でのそれぞれのエピトープ糖鎖の構造、生物学的役割の解明が期待される。

7 抗体による多分化能細胞の選択的除去

最近、ヒトES細胞を免疫原としてモノクローナル抗体が作製されている (mAb84, SSEA-5)。このうちのmAb84はポドカリキシンのポリペプチド部分をエピトープとするといわれているが (図2), R-10Gと同様に、ヒトES細胞を認識するがEC細胞を認識しない⁹⁾。mAb84 (IgM) の特色は、これが未分化ヒトES細胞に対して細胞傷害活性をもつことである。再生医療を臨床応用するための今後の課題として、細胞の均一性や安全性等の品質の確保、がん化の可能性の排除などがあげられている。これらの課題の解決のために、iPS/ES細胞マーカー抗体が役立つと期待されている。すなわち、未分化型細胞が特定の細胞系譜に分化するプロセスで、もし未分化型細胞が残存すると、これらは潜在的に、好ましくないがんを形成する可能性がある。そこで、このような試料中に残存する未分化型細胞を破壊する活性をもつ抗体はがん化の可能性の排除に有効であると考えられる。mAb84が注目されているのはこのような理由によるものである。

SSEA-5はH型血液型抗原Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β -Rを認識する抗体である¹⁰⁾。本抗体で標識し、FACS (fluorescence-activated cell sorting) にかけて分画することにより、がんの発生確率を大幅に減らすことができると報告されている。

さて、われわれは、R-10G抗体の性質がほぼ明らかになったので、現在2番目のヒトiPS/ES細胞特異的モノクローナル抗体の解析を進めている。詳細については、別の機会に紹介したいが、この2番目の特異的モノクローナル抗体はヒトiPS細胞の膜糖脂質をエピトープとし、mAb84同様に未分化多能性細胞を傷害する活性をもつ。今後の研究の展開に興味をもたれる抗体である。

おわりに

R-10Gとは異なるがよく似た認識特異性をもつTRA-1-60, TRA-1-81抗体について少し付け加えたい。iPS細胞に含まれるTRA-1-60およびTRA-1-81

エピトープは一連のケラタン硫酸分解酵素により分解を受けることから、これらの抗体もケラタン硫酸認識抗体と思われる。また、これらのエピトープが5D4エピトープを含まない多分化能細胞に発現していることから、R-10G同様に低硫酸化ケラタン硫酸を認識する抗体であると考えられる。しかし、TRA-1-60についてはシアル酸がエピトープであるとの報告がある一方^{11) 12)}、最近の糖鎖マイクロアレイを用いた実験では、TRA-1-60, TRA-1-81ともにGal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAcを最小のエピトープとすると報告されている¹³⁾。いまだ研究の余地の多い領域である。多分化能細胞の分化マーカーとして発現する一連の低硫酸化ケラタン硫酸の構造と機能の研究が、これらの糖鎖の生物学的役割の解明につながることを期待している。

文献

- 1) Kawabe, K. et al. : *Glycobiology*, 23 : 322-336, 2013
- 2) GlycoEpitope DB <http://www.glyco.is.ritsumei.ac.jp/epitope/>
- 3) Adewumi, O. et al. : *Nat. Biotechnol.*, 25 : 803-816, 2007
- 4) Wright, A. J. & Andrews, P. W. : *Stem Cell Res.*, 3 : 3-11, 2009
- 5) Kerjaschki, D. et al. : *J. Cell Biol.*, 98 : 1591-1596, 1984
- 6) Schopperle, W. M. & DeWolf, W. C. : *Stem Cells*, 25 : 723-730, 2007
- 7) Mehmet, H. et al. : *Eur. J. Biochem.*, 157 : 385-391, 1986
- 8) Andrews, P. W. et al. : *Hybridoma*, 3 : 347-361, 1984
- 9) Choo, A. B. et al. : *Stem Cells*, 26 : 1454-1463, 2008
- 10) Tang, C. et al. : *Nat. Biotechnol.*, 29 : 829-834, 2011
- 11) Andrews, P. W. et al. : *Recent Results Cancer Res.*, 123 : 63-83, 1991
- 12) Badcock, G. et al. : *Cancer Res.*, 59 : 4715-4719, 1999
- 13) Natunen, S. et al. : *Glycobiology*, 21 : 1125-1130, 2011

<筆頭著者プロフィール>

川崎敏祐：[教育歴] 京都大学薬学研究科博士課程卒業、薬学博士。[職歴] 1969年～2005年京都大学薬学研究科助手、助教授、教授。この間、米国NIH (NIAMDD) 留学 (1974～'76年)。2005年～立命館大学総合科学技術研究機構糖鎖工学研究センター。[研究領域] 糖鎖生物学、生化学。[研究内容] 内在性糖鎖認識タンパク質 (動物レクチン) の生体防御および癌細胞認識に関する研究。脳神経系特異的糖鎖抗原の構造と機能に関する研究。ヒト多分化能細胞の表面マーカー糖鎖抗原の構造と機能に関する研究。

6

GMP に準拠した細胞プロセッシング における無血清培地組成の考え方

菅 三佳, 古江-楠田美保

ヒトES・iPS細胞とその加工品（分化誘導した組織幹細胞や組織）などの安全性と品質を保証し、安定に供給していくことが今後の重要な課題である。病原体混入のリスクを低減させるため、また、再現性高い研究結果を得るため、できるだけ精製された成分や合成成分を用いた既知の組成からなる培養条件が求められている。本項では、細胞治療をめざした細胞プロセッシングの構築に向けて、ヒトES・iPS細胞培養に用いるマテリアルや培地組成の考え方について提案する。

はじめに

ヒトES¹⁾・iPS細胞²⁾³⁾とその加工品（分化誘導した組織幹細胞や組織）などの安全性と品質をいかに保証し、これらを安定に供給していくかが、臨床応用に向けての今後の重要な課題とされている。これまでに経験のない治療法であるため、さまざまなリスクが考えられる。がん化の可能性が最大の関心事ではあるが、それはすぐに解決できる問題ではないだろう。現状で解決すべき課題は、**病原体混入リスクの軽減および再現性確保**の2点に絞られるのではないだろうか。この2点は一見別の観点からの課題であるように見えるが、かなり共通している。

一般的なヒト株化細胞やマウスES細胞などの培養と比較すると、ヒトES・iPS細胞の培養は格段に難しい。そもそもヒトES・iPS細胞は不安定で変わりやすい性質を有しており、未分化状態のヒトES・iPS細胞を維持培養していく過程で、一部の細胞集団が自発的に分化したり、増殖の速い異常クローンが出現するなど、しばしば不均一な細胞集団となる。当然のことながら、不均一な細胞集団を使用すると結果の再現性は低下する。このことは、基礎研究を進めるうえでも、臨床・産業応用するうえでも大きな問題となっている。これまで、ヒトES・iPS細胞には、ウシ血清あるいは、血清代替成分、マウス由来フィーダー細胞を用いた培養条件が使われてきた⁴⁾。血清、血清代替成分およびフィーダー細胞には未知の因子が含まれ、ロット差がある。このような培養条件がヒトES・iPS細胞研究の再現性が低い原因の1つにもなっている。また、血清、血清代替成分およびフィーダー細胞にはウイルスや未知の病原体が含まれる可能性がある。病原体混入のリスクを低減させるため、また、再現性高い研究結果を得るため、できるだけ精製された成分や合成成分を用いた既知の組成からなる培養条件が求められている。

近年、フィーダーを用いない、既知の組成からなる培養条件が次々に報告されている。著者らも2008年にヒトES細胞用のフィーダーフリー・無血清培地hESF9を開発し⁵⁾、さら