

図9 各細胞株を特徴付ける遺伝子発現パターンの比較

まず8つの各細胞株毎に、各遺伝子の発現量の分布を計算した。次に、各細胞株と各遺伝子に対して、発現量分布の25%-75%の範囲が別の細胞株の対応する範囲と重なる場合には1を重ならない場合には0を与えた。最後に、他の全ての細胞株との比較でこの数を足し合わせたものを元の細胞株と遺伝子に割り当てた(最小が0で最大が7。この数を「細胞株非特異的発現量」と呼ぶ)。ヒートマップは、細胞株非特異的発現量を示したもので、遺伝子と細胞株のそれぞれについて、階層的クラスタリングを実行している。

D. 考察

上述したように、幹細胞テクノロジーへの関心が高まっており、多くのヒト ES/iPS 細胞株が樹立されている。また、患者の個々の遺伝子型を踏まえながら、研究に使用されようとしている。我々の研究はその方向へのステップであり、細胞株を標準化し、それらの特定の表現パターンを探求するのが狙いである。過去に世界中のヒト ES/iPS 細胞株を用いて蓄積された研究結果を確認するとともに新たな表現法によりヒト幹細胞の細胞特性評価に新しい知見をもたらすものと期待される。

各細胞株を特徴付ける遺伝子発現パターンの比較解析 (図 9) から、限られた少数の遺伝子のみが、細胞株に特異的な発現分布を示すことがわかった。特に、UTA は他の細胞株に比べて、より多くの特異的な遺伝子を持っている。また、Dotcom と Tic は、この解析による遺伝子発現パターンの観点からは極めて類似していることが示された。(但し、分化マーカーとして知られている GCM1、LAMB1、NES の発現量分布は、Tic に特異的である。) さらに、KhES4 と KhES5 は同じクラスタに入ることが示された。

本報告には示していないが、同様の解析を特定のマーカー遺伝子のみについて行なったところ、各細胞株 (特

に UTA) を特徴付ける遺伝子のほとんどは、分化マーカーであることが分かった。

本研究で新たに定義した「細胞株非特異的発現量」は、各遺伝子の発現量分布がどの程度、細胞株に固有かを定量化した点がユニークだと考えられる。これまでに報告された類似の解析のほとんどが、細胞株ペアの比較にとどまるのに対して、この量を用いることで、3 つ以上の細胞株についての特徴を解析することが可能になった。

但し、ここで定義した「細胞株非特異的発現量」は、その遺伝子の発現量の大小を示しているわけではない点に注意する必要がある。特異的な遺伝子として同定されたものが、各細胞株でどのような発現量を示すかは元のデータに戻って調べねばいけない。

本研究では、遺伝子の数に比べてサンプル数は比較的少ない (各細胞株に 3-5 サンプル) ため、発見された遺伝子発現パターンが細胞株の典型的な特性を示しているかどうかについては、今後の実験で検証していく必要があるだろう。そのためにも、本研究で得られた網羅的な遺伝子発現情報などのデータを蓄積し、将来の解析と組み合わせられる形で整理しておくことが重要である。

E. 結論

網羅的遺伝子発現測定とバイオインフォマティクス解析を組み合わせ、ヒト ES/iPS 細胞の株間の差異や細胞の培養の状態の微妙な差異をより正確に的確に検出できることが確認された。ヒト iPS 細胞としての幹細胞特性検査の結果を効率的に解析していくためには、バイオインフォマティクス解析が不可欠である。その際に、遺伝子発現プロフィールだけでなく、培養工程、培養に使用したマテリアル、染色体数や免疫染色・FCM 解析結果等の品質評価の情報をトレースできるようセットで情報を管理していくことが、より発展した品質管理につながり、より詳細な細胞特性解析を可能にするだろう。今後は、このような膨大な情報を適切に管理し、解析に役立てていくことがより一層重要になってくる。

参考文献

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

[1] 日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化：その 3 品質管理 平田みつひ、シャンダー・アハマト、菅三佳、藤木 彩加、松村 紘子、若林真理、上田 直子、劉 克紅、林田みどり、平山 知子、小原 有弘、柳原 佳奈、水口 賢司、古江一楠田美保 *Tiss. Cult. Res. Commun.* 30: 137-149 (2011)

[2] Ihara S., Kida H., Arase H., Tripathi L., Chen Y. A., Kimura T., Yoshida M., Kashiwa Y., Hirata H., Fukamizu R., Inoue R., Hasegawa K., Goya S., Takahashi R., Minami T., Tsujino K., Suzuki M., Kohmo S., Inoue K., Nagatomo I., Takeda Y., Kijima T., Mizuguchi K., Tachibana I., Kumanogoh A., Inhibitory roles of signal transducer and activator of transcription 3 in antitumor immunity during carcinogen-induced lung tumorigenesis, *Cancer Research*, 72(12); 2990–9, 2012

[3] Blower T. R., Short F. L., Rao F., Mori T., Mizuguchi K., Pei X. Y., Fineran P. C., Luisi B. F., Salmond G. P., Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes, *Nucleic Acids Research*, 40(13):6158-73, 2012

[4] Nagao C., Izako N., Soga S., Khan S. H., Kawabata S., Shirai H., Mizuguchi K., Computational design,

construction, and characterization of a set of specificity determining residues in protein-protein interactions, *Proteins*, 80(10):2426-36, 2012

[5] Keeble G., Nystrom J., Bellgard M., Mizuguchi K., An Open Framework for Extensible Multi-Stage Bioinformatics Software, (proceedings of the 7th International Conference on Pattern Recognition in Bioinformatics (PRIB) 2012) Lecture Notes in Bioinformatics (LNBI) 7632: 106-117, 2012

[6] Morita M., Igarashi Y., Ito M., Chen Y. A., Nagao C., Sakaguchi Y., Sakate R., Masui T., Mizuguchi K., Sagace: A web-based search engine for biomedical databases in Japan, *BMC Research Notes*, 31;5(1):604, 2012

[7] Tang C. K., Aoshi T., Jounai N., Ito J., Ohata K., Kobiyama K., Dessailly B., Kuroda E., Akira S., Mizuguchi K., Coban C., Ishii K., The chemotherapeutic agent DMXAA is a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant, *PLOS ONE*, 8(3):e60038, 2013

[8] Dessailly B. H., Dawson N. L., Mizuguchi K., Orenge C. A.,

Functional Site Plasticity in Domain Superfamilies, *BBA - Proteins and Proteomics*, 1834(5):874-89(in press), 2013(May)

[9] Tiwari P., Tripathi L., Nishikawa-Matsumura T., Ahmad S., Isobe T., Soken-Nakazawa J. S., Mizuguchi K., Yoshizaki K., Prediction and experimental validation of a putative non-consensus binding site for transcription factor STAT3 in Serum amyloid A gene promoter, *BBA - General Subjects*, 1830(6):3650-55(in press), 2013(June)

[10] Tripathi L., Mizuguchi K., A combined proteomics and computational approach provides a better understanding of Hepatitis C virus-induced liver disease, *Expert Reviews of Proteomics*, 9(5):493-496, 2012

[11] Tang C. K., Aoshi T., Jounai N., Ito J., Ohata K., Kobiyama K., Aoshi T., Jounai N., Ito J., Ohata K., Kobiyama K., Dessailly B.H., Kuroda E., Akira S., Mizuguchi K., Coban C., Ishii K., The chemotherapeutic agent DMXAA as a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant, *PLoS One*, 8(3):e60038. 2013

- [12] Dessailly BH, Dawson NL, Mizuguchi K, Orengo CA, Functional site plasticity in domain superfamilies, *Biochim Biophys Acta*, 1834(5):874-89, 2013
- [13] Tripathi L., Kambara, H., Chen Y. A. , Nishimura Y., Moriishi, K., Okamoto T., Morita, E., Abe, T., Mori, Y., Matsuura, Y., Mizuguchi K., Understanding the Biological Context of NS5A-Host Interactions in HCV Infection: A Network-Based Approach, *Journal of Proteome Research*, 12(6):2537-51, 2013
- [14] Fujita J., Miyazaki Y., Hirose M., Nagao C., Mizohata E., Matsumoto Y., Mizuguchi K., Inoue T., Matsumura H., Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic study of FtsA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 69(Pt 8):895-8, 2013
- [15] Nystrom J., Igarashi Y., Ito M., Morita M., Nakatsu N., Yamada H., Mizuguchi K., Toxygates: interactive toxicity analysis on a hybrid microarray and linked data platform, *Bioinformatics*, 1:29(23):3080-6, 2013
- [16] Yoshimaru T., Komatsu M., Matsuo T., Chen Y. A., Murakami Y., Mizuguchi K., Mizohata E., Inoue T., Akiyama M., Yamaguchi R., Imoto S., Miyano S., Miyoshi Y., Sasa M., Nakamura Y., Katagiri T., Targeting BIG3-PHB2 interaction to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells, *Nat Commun*, 4:2443, 2013
- [17] Andrabi M., Mizuguchi K., Ahmad S., Conformational changes in DNA-binding proteins: Relationships with precomplex features and contributions to specificity and stability, *Proteins*, in press
- [18] Hobro A. J., Standley D.M., Ahmad S., Smith N.I., Deconstructing RNA: optical measurement of composition and structure., *Phys Chem Chem Phys*, 15(31):13199-208, 2013
- [19] Takemura N., Kawasaki T., Kunisawa J., Sato S., Aayam L., Kobiyama K., Aoshi T., Ito J., Mizuguchi K., Karuppuchamy T., Matsunaga K., Miyatake S., Mori N., Tsujimura T., Satoh T., Kumagai Y., Kawai T., Standley D., Ishii K., Kiyono H., Akira S., Uematsu S., Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome, *Nature*

Communications, in press

[20] 水口賢司, 創薬支援のデータベースとバイオインフォマティクスによるデータ統合, SAR News, 24:2-6, 2013

G. 研究発表

1. 学術論文発表

[1] Tripathi L., Kambara H., Moriishi K., Morita E., Abe T., Mori Y., Chen Y. A., Matsuura Y., Mizuguchi K., Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator PA28gamma Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study, Journal of Proteome Research, 11(7):3664-79, 2012

[2] Nagao C., Nagano N., Mizuguchi K., Prediction of detailed enzyme functions and identification of specificity determining residues by random forests, PLoS One, 9(1):e84623. 2014

2. 学会発表

【国内学会：招待講演】

[1] 水口賢司, 創薬支援とバイオインフォマティクス, 第14回大阪大学医工情報連携シンポジウム, 大阪, 2012.7.25

[2] 水口賢司, 創薬・疾患研究のためのデータベース開発と統合: 医薬基盤研究所における取り組み, トーゴの日シンポジウム 2012, 東京, 2012.10.5

[3] 水口賢司, 生体膜周辺のネットワークと創薬支援バイオインフォマティクス, 第34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 京都, 2012.11.15

[4] 水口賢司, 創薬につながるバイオインフォマティクス, 統合データベース講習会: AJACS駿河, 静岡, 2013.1.13

【国内学会：一般講演】

[5] 長尾知生子, 長野希美, 水口賢司, 活性部位とリガンド結合部位の情報を用いた酵素の機能予測法の開発, 第12回日本蛋白質科学会, 名古屋, 2012.6.21

[6] 長尾知生子, 水口賢司, 酵素の多機能性に関する解析, 第50回日本

生物物理学会年会, 名古屋, 2012.9.22

[7] 陳怡安, Tripathi L., 水口賢司, TargetMine, a data warehouse system for target discovery, トーゴ-の日シンポジウム 2012, 東京, 2012.10.5

[8] 伊藤真和吏, 森田瑞樹, 五十嵐芳暢, 陳怡安, 長尾知生子, 坂口由希, 坂手龍一, 増井徹, 水口賢司, 創薬・疾患研究のための生命科学分野のデータベース一括横断検索 Sagace, トーゴ-の日シンポジウム 2012, 東京, 2012.10.5

[9] 五十嵐芳暢, Nystrom J., 森田瑞樹, 伊藤真和吏, 山田弘, 水口賢司, Open TG-GATEs の RDF 化によるデータ統合, トーゴ-の日シンポジウム 2012, 東京, 2012.10.5

[10] 水口賢司, 増井徹, 坂手龍一, 坂口由希, 五十嵐芳暢, 長尾知生子, 陳怡安, 伊藤真和吏, 医薬基盤研究所のデータベースと横断探索システム 'Sagace', 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012.12.11-14

[11] 岡村美菜子, 柳原佳奈, Ahmad S., 劉有容, 平田みつひ, 二川浩樹, 水口賢司, 古江一楠田美保, ヒト多能性幹細胞から肝細胞に優れた細胞株を予測するための評価方法の開発, 第86回日本組織培養学会年会, 大阪, 2013.5.30

[12] 木田博, 濱野芳匡, 井上義一, 水口賢司, Tripathi L., 広瀬雅樹, 矢野幸洋, 多田康子, 西川博嘉, 坂口志文, 熊ノ郷淳, 特発性非特異的間質性肺炎における疾患特異的自己抗体の検索, 第16回間質性肺炎細胞分子病態研究会, 東京, 2013.8.24

[13] 五十嵐芳暢, Nystrom J., 森田瑞樹, 伊藤真和吏, 中津則之, 山田弘, 水口賢司, Toxygates, トキシコゲノミクスデータと linked data の統合解析プラットフォーム, トーゴ-の日シンポジウム 2013, 東京, 2013.10.4

[14] 伊藤真和吏, 森田瑞樹, 五十嵐芳暢, 陳怡安, 長尾知生子, 坂手龍一, 増井徹, 水口賢司, 創薬・疾患研究のための生命科学分野のデータベース横断検索 システム Sagace, トーゴ-の日シンポジウム 2013, 東京, 2013.10.5

[15] 陳怡安, Tripathi L., 水口賢司, TargetMine, a data warehouse system for target discovery, トーゴ-の日シンポジウム 2013, 東京, 2013.10.5

[16] 藤田純三, 宮崎祐満, 廣瀬未果, 長尾知生子, 溝端栄一, 松本佳巳, 水口賢司, 井上 豪, 松村浩由, メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)由来 FtsA の結晶化, 平成 25 年度日本結晶学会年会及び総会, 熊本,

2013.10.12

[17] Andrabi M., Mizuguchi K., Ahmad S., DNA-binding-induced conformational changes in protein, 第51回日本生物物理学会年会, 京都, 2013.10.28

[18] 池田和由, 伊東純一, 水口賢司, 富井健太郎, PoSSuM Updates and Integration With ChEMBL For Application of Drug Reuse, CBI学会 2013大会, 東京, 2013.10.28

[19] Ahmad S., Mizuguchi K., Sequence-based prediction of interacting residue-pairs in proteins to integrate prediction of partners and binding sites, 日本バイオインフォマティクス学会2013年年会 (JSBi2013), 東京, 2013.10.29

[20] 土屋裕子, 水口賢司, Analysis of antibody-antigen interactions and prediction of their complex structures, CBI学会2013大会, 東京, 2013.10.29-30

[21] 長尾知生子, 長野希美, 水口賢司, A random-forest based method that can predict detailed enzyme functions and also identify specificity determining residues, CBI学会2013大会, 東京, 2013.10.29

[22] 陳怡安, Tripathi L., 水口賢司,

Applications of an integrated data warehouse system in to investigate complex biological systems, CBI学会 2013大会, 東京, 2013.10.29

[23] 田端桂介, 有本大, Tripathi L., 水口賢司, 森田英嗣, フラビウウイルスタンパク質と宿主因子の相互作用ネットワーク解析, 第20回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 神戸, 2013.11.9

[24] 岡村美菜子, 柳原佳奈, Ahmad S., 劉有容, 平田みつひ, 水口賢司, 二川浩樹, 古江-楠田美保, ヒト多能性幹細胞から肝細胞内胚葉分化誘導効率に優れた細胞株, 日本口腔組織培養学会, 日本歯科大学 東京, 2013.11.23

[25] 伊藤真和吏, 五十嵐芳暢, 陳怡安, 長尾知生子, 坂手龍一, 水口賢司, 生命科学分野の横断検索サービスとセマンティック・ウェブ, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013.12.6

【国際学会：招待講演】

[26] 水口賢司, Data integration and protein network analysis for early stage drug discovery, Structural Life Science 7th International Conference on Structural Genomics (ICSG2013-SLS), 札幌, 2013.7.31

【国際学会：一般講演】

[27] Keeble G., Nystrom J., Bellgard M., Mizuguchi K., An Open Framework for Extensible Multi-Stage Bioinformatics Software, The 7th International Conference on Pattern Recognition in Bioinformatics (PRIB) 2012, Tokyo, Japan, 2012.11.9

[28] Yoshizaki K., Tiwari P., Tripathi L., Ahmad S., Mizuguchi K., Nishikawa-Matsumura T, Isobe T, Soken-Nakazawa J. S., Basic and Clinical Significance of Interleukin 6 (IL-6) in AA Amyloidosis with RA, the 2012 ACR/ARHP Annual Meeting, Washington, D.C, USA, 2012.11.11

[29] Ahmad S., Mizuguchi K., A sliding-probe model for predicting partner aware protein-protein interaction sites, The 23rd International Conference on Genome Informatics (GIW 2012), Tainan, Taiwan, 2012.12.13

[30] Ahmad S., Mizuguchi K., Global gene co-expression patterns improve consistency between experimentally detected host factors crucial for influenza virus life cycle,

Keystone Symposium on Advancing Vaccines in the Genomics Era, Rio de Janeiro, Brazil, 2013.11.1

[31] Ito J., Ahmad S., Ishii K., Mizuguchi K., A Comprehensive Analysis of miRNA Expression Profile in Human Serum Collected from Type-A Influenza Vaccine Clinical Trial, Keystone Symposium on Advancing Vaccines in the Genomics Era, Rio de Janeiro, Brazil, 2013.11.2

[32] Shirai H., Ikeda K., Yamashita K., Tsuchiya Y., Sarmiento J., Liang S., Mizuguchi K., Morokata T., Higo J., Standley D.M., Nakamura H., High-resolution modeling of antibody structures by a combination of bioinformatics, expert knowledge, and molecular simulations., Antibody Engineering and Therapeutics Conference, Huntington Beach, CA, USA, 2013.12.8

【学会以外のセミナー、講演会等】

[33] 水口賢司, 医薬基盤研究所のデータベースと創薬研究: Open TG-GATEs と TargetMine を中心として, 平成 24 年度第 3 回データベース講習会@大阪「創薬研究における統合データベースの活用」, 大阪,

2012.12.26

[34] Ahmad S., Mizuguchi K., Expression profiles of stress-response genes and related miRNAs: implications for Adverse Effects Following Immunization (AEFI), 第6回次世代アジュバント研究会, 大阪, 2013.1.16

[35] 伊東純一, 水口賢司, インフルエンザワクチン治験から得られた血清中 miRNA の発現解析, 第6回次世代アジュバント研究会, 大阪, 2013.1.16

[36] 水口賢司, 創薬に向けたバイオインフォマティクス研究について, 製薬協の研究開発委員会メンバーとの意見交換会, 東京, 2013.1.31

[37] 水口賢司, 医薬基盤研における創薬支援データベースの開発, シリーズ研究講演会「薬づくりの新しいR&Dモデルを探る」第1回, 東京, 2013.6.20

[38] 水口賢司, 創薬支援のためのデータ統合とデータベース開発, 東北大学大学院情報科学研究科, 仙台, 2013.7.10

[39] 水口賢司, Computational and systems approaches to early stage drug discovery, 九州大学 生体防御医学研究所附属生体多階層システム研究センター, 福岡, 2013.9.25

[40] 水口賢司, データ統合とネットワーク解析による創薬初期研究の支援, 第3回シスメックスプロテインカンファレンス, 東京, 2013.10.18

[41] 水口賢司, データ統合とネットワーク解析による創薬支援, 第9回霊長類医科学フォーラム, つくば, 2013.11.14

[42] 水口賢司, 創薬の初期研究におけるデータ統合: ターゲットと安全性の評価, 第345回CBI学会研究講演会, 東京, 2014.1.9

[43] 水口賢司, ‘アジュバントゲノミクス’に向けた統合データベースの現状, 第7回次世代アジュバント研究会, 大阪, 2014.1.21

[44] Ahmad S., Ito J., Mizuguchi K., An integrated map of influenza-virus life-cycle host factors and their predicted micro-RNA regulators for bottom-up bio-marker discovery, 第7回次世代アジュバント研究会, 大阪, 2014.1.21

[45] 伊東純一, Ahmad S., Tripathi L., 石井健, 水口賢司, インフルエンザワクチンが誘発する発熱の予測へ向けた血清中マイクロRNA マーカーの探索, 第7回次世代アジュバント研究会, 大阪, 2014.1.21

[46] 水口賢司, データベースは、創

薬初期でのターゲット評価と安全性の予測に役立つか?、「創薬研究におけるバイオデータベース講習会」(第三回データベース講習会@大阪(池田)),大阪,2014.1.24

[47] 水口賢司, 計算生物学によるシステムの理解から創薬へ, 京都大学理学部, 京都, 2014.2.18

※一般紙・業界紙・一般向け雑誌等への掲載

[48] 日刊薬業 第 13497 号, 産学官研究会 ワクチンアジュバントの DB, 14 年度にも公開へ, 2012.6.25

[49] 日経産業新聞 1 面&3 面, テキストマイニングーつかめ 未来の手掛かり~つぶやき分析 インフル予測, 2012.11.21

[50] 日経バイオテク RNA メール, Vol.97, Wm の憂鬱、ワクチンの副反応を miRNA で事前鑑別できるか? 2013.1.21

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
ヒト ES/iPS 細胞の実用化における幹細胞バンクの
基盤整備についての研究

分担研究報告書

iPS 細胞を認識する新規抗体を用いた評価技術の策定

研究分担者 川寄 敏祐

立命館大学総合理工学研究機構教授

研究要旨：細胞表面の糖鎖は分化・発生の様々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り、iPS (induced pluripotent stem cell) /ES (embryonic stem cell) のマーカーとしても常用されている。しかしながら、これら既存の抗体のほとんどが EC (embryonal carcinoma cell) を免疫原として得られたものであり、iPS/ES/EC に共通の成分を認識するものである。本研究では、iPS/ES に特異的な糖鎖認識単クローン抗体を作成する。そして、これら抗体をプローブとして iPS 細胞など多分化能細胞の品質管理、良質な細胞集団選別におけるこれら抗体の有効性を検討することを目的とした。

A. 研究目的

ヒト iPS/ES 細胞の表面マーカーとして汎用されている SSEA3, SSEA4 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 (Wright A. J. & Andrews P. W., 2009)。しかしながら、これら既存の抗体のほとんどが EC 細胞 (embryonal carcinoma, 胎児性がん細胞) を免疫原として得られたものである。すなわち、これらの抗体は EC 細胞表面マーカーとして開発されたものが iPS 細胞/ES 細胞にも陽性であることが判明し、利用されているのであり、iPS 細胞/ES 細胞に特異的な成分を認識するものではない。このような背景の下、申請者らは、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

ことができれば、細胞の未分化性と多分化能性の維持および各分化ステージにおける糖鎖の役割の解明に大きな学術的貢献が期待でき、あわせて、多分化能細胞の品質管理、良質な細胞集団選別においてきわめて有効なツールとなると考えた。

B. 研究方法

免疫原としては、医薬基盤研究所より分譲されている、iPS 細胞 Tic (JCRB1331) を用いた。免疫原細胞をフロインドコンプライートアジュバントでエマルジョン化した後、マウスの腹腔あるいは皮下に注射した。1ヶ月後にマウスの腸骨リンパ節細胞を採取し、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 96 ウェルプレート 10 枚に分注し HAT 培地で培養後、ハイブリドーマを得た。次に、ハイブリドーマ培養上清を、抗原 iPS 細胞を固定化したウェルプレートに加えて反応させたのち、2次抗体として HRP 標識-Anti Mouse IgG

を加え、DAB で発色させる方法で、細胞スクリーニングを行った。まず一次スクリーニングとして、iPS 細胞陽性のハイブリドーマを選択する。つぎに、二次スクリーニングとして、iPS 細胞に対するコントロール細胞として、iPS を樹立したときの元株であるヒト胎児繊維芽細胞株 (MRC-5 細胞)、EC 細胞の一種である 2102Ep 細胞を用い、これらの細胞への結合性を比較した。また、平行して、Tic 細胞抽出物を SDS-PAGE にかけて、Tic 細胞陽性ハイブリドーマの培養上清によるウェスタンブロットを行い、抗原タンパク質の分子サイズを推定した。これらの解析により、iPS 細胞にのみに結合するハイブリドーマを選別した。

C. 研究結果

ヒト iPS/ES 細胞と EC 細胞を識別するマーカー抗体の開発

iPS 細胞 Tic (JCRB1331) をマウスの腹腔および皮下に免疫し、得られたリンパ球細胞をマウスミエロマと融合させ、iPS 細胞を固定化したウェルプレートを用いて細胞スクリーニングを行い、Tic 細胞に結合するハイブリドーマ 29 株を得た。これらのハイブリドーマの産生する抗体のほとんどはヒト EC 細胞 (2102Ep) 表面に結合したが、幸運にも、2 種の抗体は、iPS 細胞表面を強く染色し、EC 細胞をほとんど染色しなかった。すなわち、本研究の目的とする iPS/ES 特異的単クローン抗体が得られた。ここでは、このうち、R-10G と名付けた抗体について記す。R-10G と従来の iPS/ES 細胞の表面マーカー抗体との比較

ヒト iPS 細胞株 (Tic)、ヒト ES 細胞株 (KhES-3) およびヒト EC 細胞株 (2102Ep、NCR-G3) に対する、R-10G および TRA-1-60、TRA-1-81、SSEA-3、SSEA-4、SSEA-1、mAb84 の結合性を調べた結果を図 1 に示した。

R-10G はヒト iPS 細胞株 (Tic)、およびヒト ES 細胞株 (KhES-3) に良く結合するが、ヒト EC 細胞株 (2102Ep、NCR-G3) には僅かしか結合しないことが判明した。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 はヒト iPS 細胞株、ヒト ES 細胞株、およびヒト EC 細胞にいずれも良く反応した。

R-10G 抗体により明らかにされた iPS 細胞表面マーカー分子の特徴

培養 Tic 細胞を R-10G により蛍光染色し、TRA-1-60、TRA-1-81 による染色結果と比較した。図 1 に示すように、R-10G は、TRA-1-60 (A)、TRA-1-81 (B) と同様にほとんどの Tic 細胞に結合した。しかしながら、R-10G と TRA-1-60 あるいは TRA-1-81 の染色像をマージさせると、意外にも、一部の細胞では両者のエピトープが共発現するが、ほとんどの細胞ではどちらか一方のエピトープが優位に発現していた。すなわち、未分化状態の iPS 細胞コロニーを構成する細胞は単クローンとしての均一な細胞集団ではなく、不均一な糖鎖抗原を発現している細胞の集合体であることが明らかになった。この未分化 iPS 細胞の不均一性は、iPS 細胞からの分化・組織再生を考える場合の基本的なコンセプトとして重要な知見である。細胞表面糖鎖の変化がゲノムをはじめとする細胞内構造のどのような変化を反映しているのか、あるいは細胞の分化の程度や方向性などに関連しているのかなど興味ある問題を提起している。

ヒト iPS 細胞より R-10G 抗原の単離とその性質の解析

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ー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。その結果、本抗原は、ポドカリキシン (podocalyxin) と同定された (図 3)。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。最近、TRA-1-60、TRA-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。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。

R-10G の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、ウエスタンブロットにより解析する方法で行った (図 4)。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、ウエスタンブロットの位置および濃度に変化が見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。後者の 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 $-3\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-$ 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) の繰り返し構造を持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。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、消化物を豊田らにより開発された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。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。従つて、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、R-10G とは異なる特異性を持つと予想された。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。このように、R-10Gはこれまで免疫学的に検出することが出来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

D. 考察

今回開発に成功した iPS/ES マーカー抗体 R-10G は、既知の iPS/ES マーカー抗体である TRA-1-60、TRA-1-81、GCTM2、GCTM343、SSEA3、SSEA4、などと同様に、糖鎖認識抗体であったが、その細胞結合性は異なり、ヒト iPS/ES 細胞に結合するがヒト EC 細胞には結合しない。一方、これらの抗体はいずれも大多数の iPS 細胞を染色するが、それぞれの染色性は細胞により均一ではない。すなわち、個々の iPS 細胞表面に発現する糖鎖エピトープはきわめて多様、不均一であることを示している。このような表面糖鎖構造の相違が、細胞の未分化性と多分化能性の維持および各分化ステージとどのように関係しているのか、興味ある問題である。

E. 結論

筆者らが開発した R-10G 抗体は、ヒト iPS/ES 細胞に結合するがヒト EC 細胞には結合しない。このため、R-10G 抗体はヒト ES/iPS 細胞実用化における幹細胞バンクの

基盤整備において、多分化能細胞の品質管理、良質な細胞集団選別試薬としてきわめて有効である。

引用文献

Wright A.J. & Andrews P.W. (2009) *Stem Cell Res.*, doi: 10.1016/j.scr.2009.04.001

Choo A.B., *et al.* (2008) *Stem Cells* 26 : 1454-1463.

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 原著論文

- (1) Nonaka M, Ma BY, Imaeda H, Kawabe K, Kawasaki N, Hodohara K, Kawasaki N, Andoh A, Fujiyama Y, & Kawasaki T. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) recognizes a novel ligand, Mac-2-binding protein, characteristically expressed on human colorectal carcinomas. *J. Biol. Chem.* 286(25), 22403-22413 (2011)
- (2) Hirano M, Ma BY, Kawasaki N, Oka S, & Kawasaki T. Role of interaction of mannan-binding protein with meprins at the initial step of complement activation in ischemia/reperfusion injury to mouse kidney. *Glycobiology* 22(1), 84-95 (2011)
- (3) Kawabe K, Tateyama D, Toyoda H, Kawasaki N, Hashii N, Nakao H, S Matsumoto S, Nonaka M, Matsumura H, Hirose Y, Morita A, Katayama M, Sakuma M, Kawasaki N, Kusuda Furue M, and Kawasaki T. A Novel antibody for human induced pluripotent stem (hiPS) cells and

embryonic stem (ES) cells recognizes a type of keratan sulfate lacking oversulfated structures. *Glycobiology*, 23(3), 322-336 (2012)

- (4) Aoki-Kinoshita KF, Sawaki H, An HJ, Campbell M, Cao Q, Cummings R, Hsu DK, Kato M, Kawasaki T, Khoo KH, Kim J, Kolarich D, Li X, Liu M, Matsubara M, Okuda S, Packer NH, Ranzinger R, Shen H, Shikanai T, Shinmachi D, Toukach P, Yamada I, Yamaguchi Y, Yang P, Ying W, Yoo JS, Zhang Y, Zhang Y, and Narimatsu H. The fifth ACGG-DB meeting report: Towards an international glycan structure repository, *Glycobiology*, 23 (12), 1422-1424 (2013)
- (5) Nonaka M, Imaeda H, Matsumoto S, Ma BY, Kawasaki N, Mekata E, Andoh A, Saito Y, Tani T, Fujiyama Y, Kawasaki T. Mannan-binding protein, a C-type serum lectin, recognizes primary colorectal carcinomas through tumor-associated Lewis glycans. *J Immunol* 192, 1294-1301 (2014)

総説

- (1) 岡昌吾、川寄敏祐 糖鎖関連遺伝子ノックアウトマウス HNK-1 糖鎖合成酵素 (グルクロン酸転移酵素) 生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール 321-327、エル・アイ・シー (2011)
- (2) 川寄敏祐、川寄伸子、中尾宏美、松本尚悟、古江-楠田美保、豊田英尚、新規 iPS/ES マーカー抗体とその応用、実験医学 31, (10)129-133、羊土社 (2113)

- (3) 川寄敏祐、iPS/ES 細胞と EC 細胞 (胎児生癌細胞) を識別する iPS/ES 細胞マーカー抗体、THE LUNG perspective, 21(4) 373-376 メディカルレビュー社 (2013)

2. 学会発表

【国際学会】

- (1) Kawasaki T. Outline of Japan Consortium for Glycobiology and Glycotechnology (JCGG). The 2nd ACGG Conference 2011 年 6 月 Soul, Korea 【招待講演】
- (2) Kawasaki T, Nonaka M, Kawasaki N, Kawabe K, Nakao H, Ma BY, Imaeda H, Fujiyama Y, and Andoh A. Specific interaction of the serum mannan-binding protein with tumor-associated oligosaccharides and tumor tissues. 16th European Carbohydrate Symposium, 【口頭発表】 2011 年 7 月 Sorrento - Naples, Italy
- (3) Kawasaki T. Novel monoclonal antibodies recognizing human induced pluripotent stem (iPS) cell carbohydrate epitopes. The 31st Naito Conference 2011 年 9 月 札幌 【ポスター発表】
- (4) Kawasaki T. Carbohydrate-protein-hosts. *Glycobiology* Japan-Netherlands Joint Seminar 【招待講演】 2011 年 10 月 名古屋
- (5) Kawasaki T. Recognition of endogenous ligands by C-Type animal lectins. The 71st Okazaki Conference 【招待講演】 2011 年 10 月 岡崎
- (6) Kawasaki T, Kawabe K, Kusuda Furue M, Nakao H, Matsumoto S, Nonaka M, Toyoda

H, Hirose Y, Kawasaki N, and Kawasaki N.
A novel marker antibody of human induced
Pluripotent Stems (iPS) cells, which
recognizes a new type of keratan sulfate,
International Carbohydrate Symposium
2012, Madrid, 【口頭発表】2012年7
月

- (7) Kawasaki T. Nakao H. Matsumoto S.
Toyoda H. Kusuda-Furue M. and Kawasaki N.
Novel Marker Antibodies for Human
iPS/ES Cells and their Application, 22nd
International Symposium on
Glycoconjugates, Dalian, China, 【口頭発
表】2013年6月

【国内学会】

- (1) 野中元裕、今枝広丞、河邊圭子、川寄伸
子、安藤朗、藤山佳秀、谷 徹、川寄敏
祐 ヒト大腸がん組織におけるマンナ
ン結合タンパク質リガンドの発現 第
30回日本糖質学会年会【口頭発表】2012
年7月 長岡
- (2) 中尾 広美、山内 拓也、滝島 佑人、松
本 尚悟、川崎 ナナ、川寄 伸子、豊田 英
尚、川寄 敏祐 単クローナル抗体
R-10G を用いた脳ケラタン硫酸プロテ
オグリカンの研究 第32回 日本糖質
学会年会 【ポスター発表】2013年8
月 大阪
- (3) 松本 尚悟、中尾 広美、野中 元裕、川
端 健二、古江-楠田 美保、滝島 佑人、
豊田 英尚、川寄 伸子、川寄 敏祐 ヒ
ト iPS/ES マーカーとしての新規糖鎖認
識抗体 第86回 日本生化学会大会【口
頭発表】2013年9月 横浜
- (4) 川寄敏祐 C型-レクチンと免疫 糖鎖

免疫研究会 Glyco-Immunology 2014
【特別講演】、2014年2月 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含
む）

1. 特許出願
- (1) マンナン結合タンパク質のがん組織
診断及び治療用途, 川寄敏祐, 特許願
2011-141255, 日本
- (2) 標的細胞障害活性を有する iPS/ES 細
胞特異的抗体及びその用途 特許願,
2012年12月、日本
- (2) 実用新案登録
- (3) その他

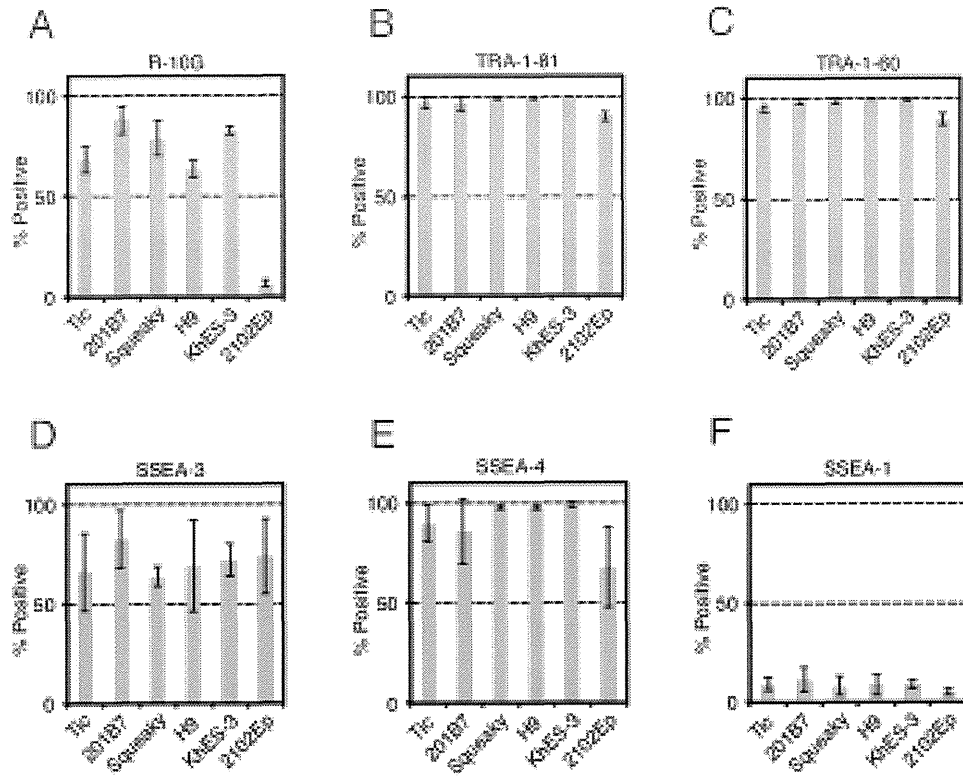


図 1. R-10G と従来の iPS/ES 細胞マーカー抗体との比較
(原著論文(3)より引用)

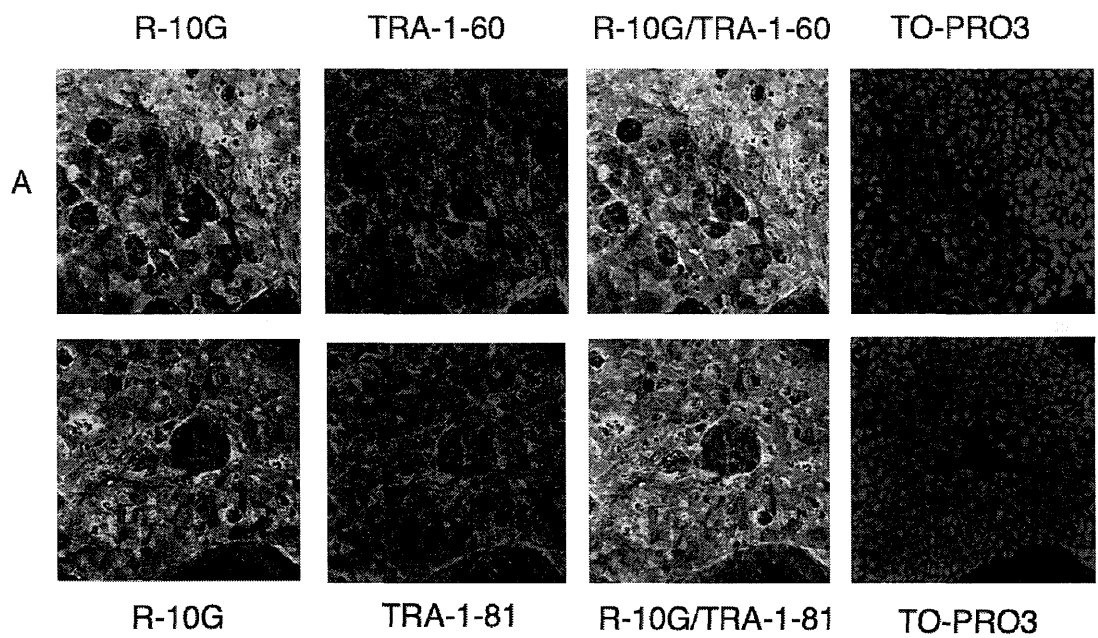


図2. R-10G によるヒト iPS 細胞表面染色
 (原著論文(3)より引用)

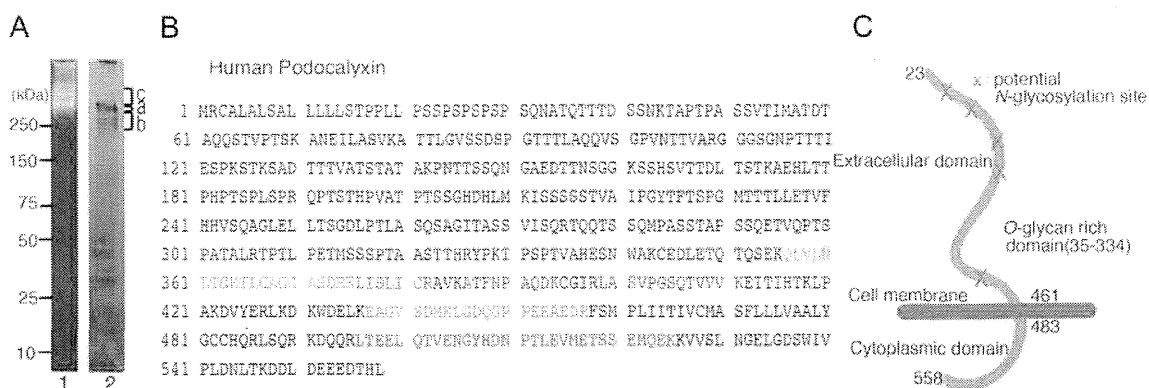


図3 R-10G エピトープのキャリアータンパク質の同定

(原著論文(3)より引用)

A, 精製 R-10G タンパク質の R-10G によるウエスタンブロット

精製 R-10G タンパク質のタンパク質染色 (バンド a,b,c)

B, LC/MS/MS により R-10G エピトープキャリアータンパク質はポドカリキシンと

同定された

C, ポドカリキシンの模式図 (I型の膜結合タンパク質)