

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業） （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 川崎 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变化する。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的一种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リ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 (P 3 U1) 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エ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ーマと融合させ、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と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っては、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-3Gal 1-4GlcNAc 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

特になし。

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、川崎敏祐 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) 川崎敏祐、川崎伸子、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) 川崎敏祐、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

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
なし

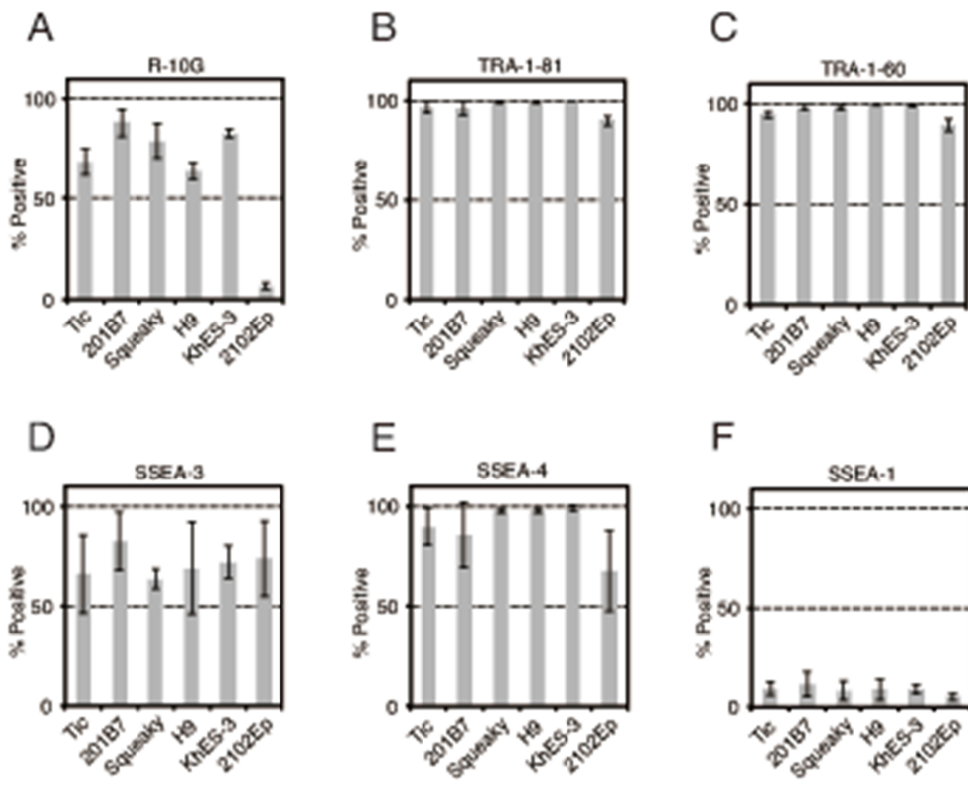


図 1. R-10G と従来の iPS/ES 細胞マーカー抗体との比較 (原著論文(3)より引用)

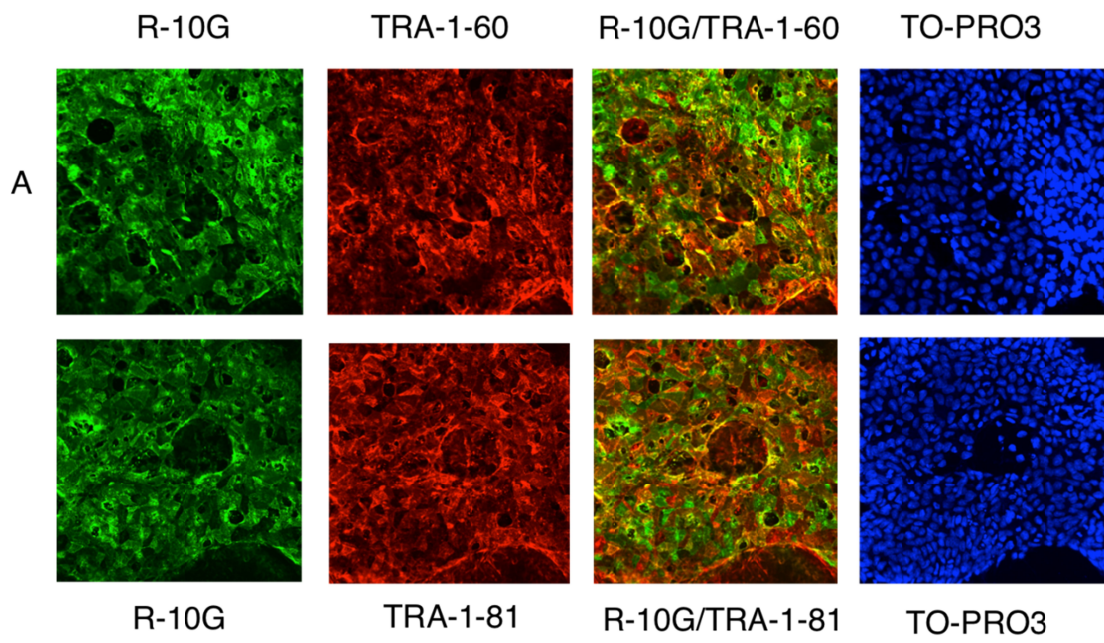


図2. R-10G によるヒト iPS 細胞表面染色
(原著論文(3)より引用)

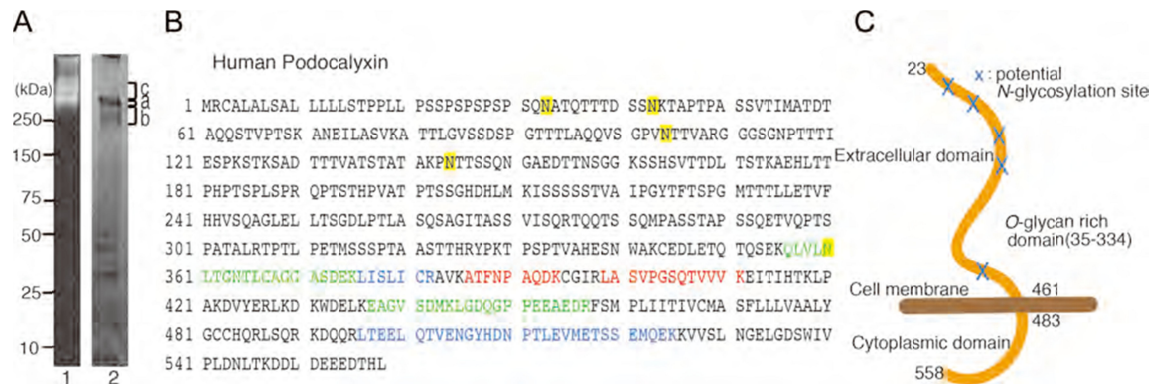


図3 R-10G エピトープのキャリアータンパク質の同定

(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)

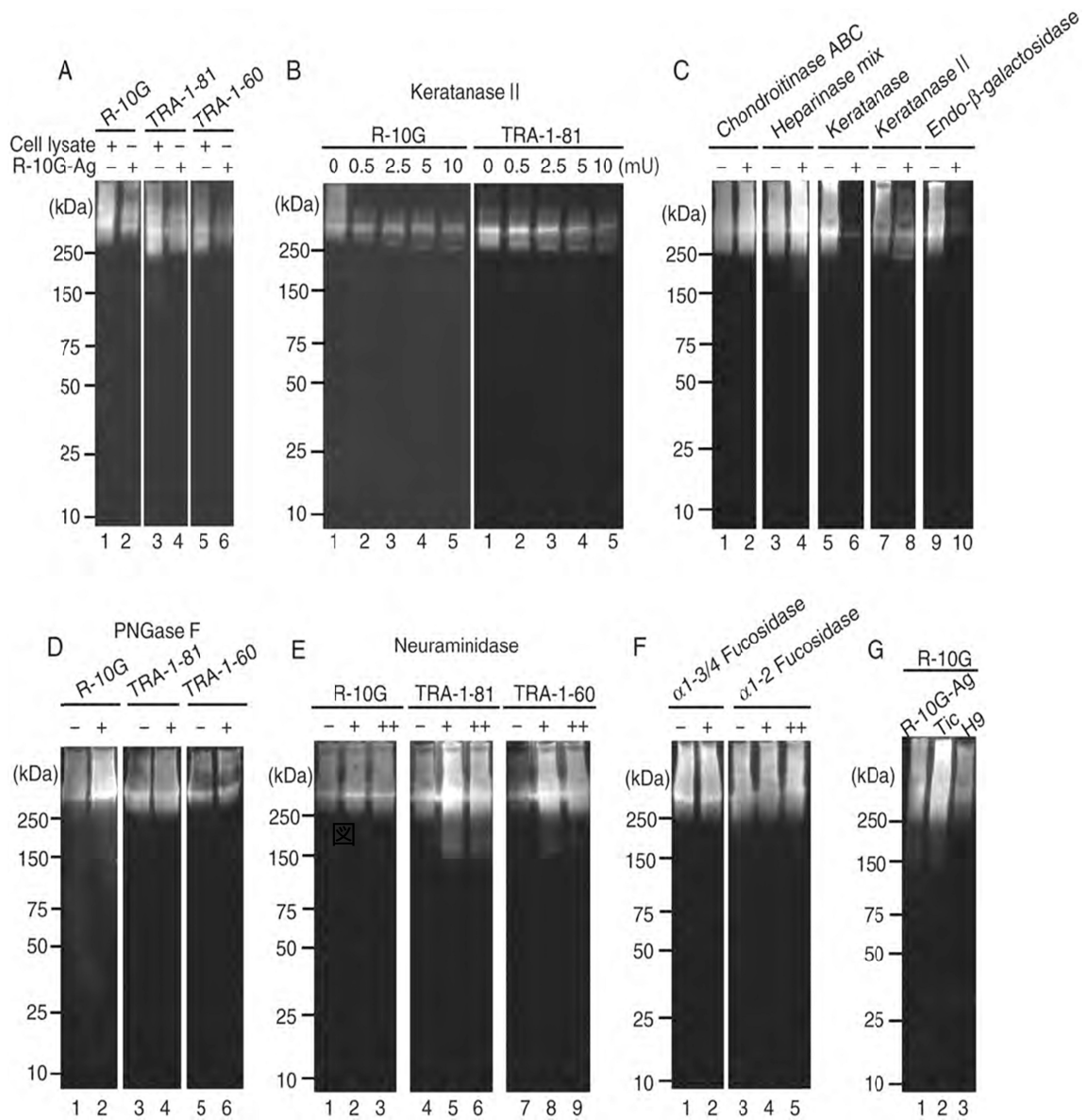


図4 グリコシダーゼ消化物のウェスタンブロットによる R-10G エピトープの解析 (原著論文(3)より引用)

- A, R-10G 抗体と TRA-1-81, TRA-1-60 抗体の比較
- B, R-10G 抗体エピトープは TRA-1-81 エピトープに比べケラタナーゼ II 感受性が高い
- C, R-10G エピトープはコンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸ではなく、ケラタン硫酸である
- D, R-10G, TRA-1-81, TRA-1-60 のエピトープはいずれも PNGase 処理により消失しない (N-結合型糖鎖ではない)
- E, R-10G, TRA-1-81, TRA-1-60 のエピトープはシアル酸を含まない
- F, R-10G エピトープはフコースを含まない
- G, R-10G エピトープは iPES 細胞にも存在する

