HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Aminolysis-SALSA 法を応用した細胞特異的糖鎖解析による軟骨細胞中の残存未分化iPS細胞の定量的評価法の確立［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	宮﨑, 拓自
Description	配架番号：2631
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14508号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81566
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takuji_Miyazaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　宮﨑　拓自

学 位 論 文 題 名

Aminolysis-SALSA 法を応用した細胞特異的糖鎖解析による軟骨細胞中の
残存未分化 iPS 細胞の定量的評価法の確立
（Evaluation of Residual Human-Induced Pluripotent Stem Cells in Human Chondrocytes by Cell Type-Specific Glycosphingolipid Glycome Analysis Based on the Aminolysis-SALSA Technique）

【背景と目的】

近年、induced Pluripotent Stem Cell（以下、iPS 細胞）由来軟骨を用いた再生医療が実現可能となりつつあるが、未分化細胞の残存による造腫瘍性のリスクは大きな問題であり、残存する未分化 iPS 細胞を正確に検出する方法が求められている。検出法として、iPS 細胞を蛍光標識して蛍光顕微鏡で観察する方法や、フローサイトメトリー等が一般的であるが、すべての細胞が蛍光標識されていることを確認することは困難である。

細胞表面は、スフィンゴ糖脂質（glycosphingolipid、以下 GSL）や糖タンパク質などの糖質複合体で構成される緻密な複合糖脂質で被覆されている。未分化 iPS 細胞もまた、幹細胞マーカーとして知られている SSEA-3、SSEA-4、Globo H、H type 1 antigen などの糖質複合体や GSL によって被覆されている。我々は糖鎖解析の手法を用いれば、 細胞表面の糖鎖構造を直接検出することができるため、あらかじめ標識する必要がなく、より細胞特異的な検出法といえるのではないかと着想した。本研究の目的は、Glycoblotting 技術を用いてヒト iPS 細胞に特異的な GSL 糖鎖を解析することにより、iPS 由来軟骨細胞中に残存する未分化 iPS 細胞の定量的評価方法を確立することである。

【方法】

iPS 細胞固有の GSL 糖鎖が軟骨細胞と共存した場合に定量的に検出できるかどうかを検討した。まず培養細胞、ヒト iPS 細胞株（606A1）、ヒト軟骨細胞株（C28/I2）それぞれの GSL 糖鎖を解析した。次に iPS 細胞が様々な比率で軟骨細胞に混入（iPS content = 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.1%）した状態での GSL 糖鎖を解析した。続いて、iPS 細胞に傷害性をもつ抗体で処理した後に、残余 iPS 細胞を糖鎖解析により定量可能かを検証した。抗体は iPS 特異的糖鎖構造（LNFP-1）を認識する抗体で、濃度依存性に細胞傷害性を持つ抗体 R-17F を用いた。まず R-17F の iPS 細胞、軟骨細胞それぞれに対する細胞傷害性について検証した。iPS 細胞、軟骨細胞に R-17F を添加（100 μg/mL）し、45 分反応させた後に Propidium iodide（PI）で死細胞を染色し、Flow cytometry で定量化した。次に iPS 細胞、軟骨細胞を共培養（iPS 播種濃度=10%）し、培養 3 日目に R-17F を添加（200-500 μg/mL）した。R-17F を加えて 36 時間後に GSL 糖鎖解析を実行した。 さらに、併用により R-17F の細胞傷害性を増強させると報告のある 2

次抗体の効果について検証した。iPS 細胞、軟骨細胞を共培養し（iPS 播種濃度=5%）、培養 1 日目に R-17F を 100μg/mL の濃度で添加、24 時間後に 2 次抗体を 0-100μg/mL の濃度で添加した。培養 4 日目に共培養細胞を回収し GSL 糖鎖解析を行った。

【結果】

軟骨細胞の GSL 糖鎖解析の結果、軟骨細胞由来糖鎖の多くはα2、3 結合シアル酸残基を含んでいた一方、iPS 由来糖鎖のほとんどが中性であった。軟骨細胞に iPS 細胞を混入させた状態での Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of- Flight Mass（MALDI-TOF MS）では、iPS 特異的糖鎖であり R-17F が認識する LNFP-1 糖鎖が、軟骨由来糖鎖で最も有意に発現していた GM 2 糖鎖と質量が極めて近く、検出することができなかった。そこで我々は aminolysis-sialic acid linkage-specific alkylamidation（aminolysis-SALSA）法を応用することにした。 Aminolysis-SALSA 法は質量分析において、シアル酸基を持つ GSL 糖鎖の構造異性体をアミド化することで質量を変化させ、識別する方法である。我々は SALSA 法を用いることで、シアル酸基をもつ軟骨細胞由来 GSL 糖鎖の質量のみを変化させ、軟骨細胞中の LNFP-1 糖鎖を検出することが可能となった。iPS 特異的糖鎖は 5×10^4 個の細胞から検出可能であり、検出限界は 0.25%だった。また、R-17F が認識する LNFP-1 をはじめ、iPS 特異的 GSL 糖鎖として知られる Gb 3、Gb 5、SSEA-4 の糖鎖量は、iPS 細胞混入量と強い相関（$R^2 > 0.97$）を示した。R-17F 抗体の細胞傷害性の評価では、抗体処理後の死細胞は iPS 細胞で約 70%（vs control 38%）であったのに対し、 軟骨細胞は 15%（vs control 13%）であり、 軟骨細胞に対する細胞傷害性は認めなかった。共培養条件下に R-17F を加えた経時的顕微鏡評価では、抗体を加えて 36 時間後にほぼすべての iPS colony の壊死を確認したが、糖鎖解析では iPS 細胞は約 4%残存していた。R-17F の 2 次抗体併用における評価では、2 次抗体の濃度依存性に R-17F の細胞傷害性の増強を認め、R-17F（100μg/mL）に 100μg/mL の 2 次抗体を併用することで、完全に未分化 iPS 細胞を除去可能であることがわかった。

【考察】

本研究では、GSL 糖鎖解析により、軟骨細胞に混入した未分化 iPS 細胞を検出することができた。未分化マーカーとして知られるいくつかの iPS 特異的糖鎖は、 iPS 含有量と強い相関を示し、このことは糖鎖解析の手法を用いれば、事前の標識等の処理を必要とせずに、軟骨等の iPS 由来生成物から未分化 iPS 細胞を検出可能であることを示唆している。また、一般的な検出法であるフローサイトメトリーは、iPS 細胞 から分化誘導した軟骨片や心筋細胞等の組織の場合、酵素による細胞解離の前処理が必要であるため、評価困難であったが、糖鎖解析による定量的評価法は組織であっても評価可能である。

我々は R-17F 抗体処理後の残存する iPS 細胞を共培養下で定量することにも成功した。R-17F は iPS 特異的な LNFP-1 糖鎖を認識する細胞傷害性抗体であるため、GSL 糖鎖解析による残存未分化 iPS 細胞の評価法は理にかなった方法である。未分化 iPS 細胞の主要な除去方法の一つは、特異的な抗体を用いた cell sorting であるが、cell sorting は iPS 由来最終生成物の viability を低下させる可能性がある。本研究では、R-17F を添加するだけで未分化 iPS 細胞を除去することが可能であり、cell sorting によって起こりうるリスクを回避することができた。

【結論】

GSL 糖鎖解析による新規の未分化 iPS 細胞の定量化法を確立した。R-17F を用いた除去法と細胞特異的糖鎖解析による定量化法を併用することで、より安全な iPS 細胞を基板とした再生医療を実現に寄与することができる可能性がある。