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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　宮﨑　拓自

	主査	教授	近藤　英司
審査担当者	副査	准教授	舟山　恵美
	副査	教授	近藤　亨

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）

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、細胞特異的 GSL 糖鎖解析を用いて、iPS 由来軟骨細胞に混入する未分化 iPS 細胞を定量評価できるという仮説を立て、実験を遂行した。

軟骨細胞に未分化 iPS 細胞が混入した状態での GSL 糖鎖解析の結果、iPS 細胞に特異的な GSL 糖鎖を解析することにより、未分化 iPS 細胞を検出、定量評価可能であり、iPS 細胞の混入は 0.25% まで検出できることが分かった。さらに iPS 細胞から間葉系幹細胞様細胞を介して軟骨への分化誘導する過程において、残存する未分化 iPS 細胞の糖鎖解析による検出も可能であり、既存の検出法に加えて糖鎖解析による定量化法も分化細胞のモニタリングの有効な手段になり得ることを示した。

また、iPS 特異的糖鎖を認識し、iPS 細胞に対し細胞傷害性を有する抗体、R-17F を用いて、その細胞除去効果を糖鎖解析の手法を用いて明らかとし、R-17F の細胞傷害性を増強させる作用を持つ R-17F の 2 次抗体を併用することで、未分化 iPS 細胞を完全に除去できることを示した。

以上の結果より、糖鎖解析による定量評価法は iPS 由来生成物に残存する未分化 iPS 細胞の検

出に有用なだけでなく、未分化 iPS 細胞を除去する様々な方法において条件の最適化に使用できる可能性が示唆された。

審査にあたり、主査近藤教授より実際に iPS から分化させた軟骨片を移植する際にはどのように評価するのかと質問があった。申請者は、実際に移植する際には、移植する軟骨片そのものを評価することは困難であるため、移植する軟骨組織の一部を採取し、その組織に未分化 iPS 細胞の残存がないかを糖鎖解析による定量化で評価することになると回答した。副査舟山准教授からは、分化過程での未分化 iPS 細胞の検出率はどれくらいか、それは高いのかについて質問があった。申請者は、分化過程での検出感度については検討していないが、糖鎖による検出法の感度については検討しており、0.25%だった。それは既存の iPS 細胞の検出法である Flow cytometry や PCR と比較して高いものではないが、本研究では PCR では捉えることができなかった分化過程での特異的糖鎖が減少している様子をとらえることが可能であり、既存の方法と併用することでより良い分化細胞のモニタリングができる可能性があると回答した。副査近藤教授からは、分化過程で再度、分化細胞が多分化能を獲得することがあるが、その場合については検討したのか、また本研究中の R-17F 抗体はなぜ iPS 細胞に対し細胞傷害性を持っているのかについて質問があった。申請者は、分化過程で再度多分化能を獲得した場合については本研究では検討していないが、移植する直前に糖鎖解析による定量評価を施行することで、多分化能を持った細胞を検出できる可能性があると回答した。R-17F 抗体の細胞傷害性の機序については、幹細胞の細胞膜に存在する膜タンパクであるポドカリキシンを介して、細胞を壊死させることまではわかっているが、詳細なメカニズムについては未だ解明されていないと回答した。

この論文は、iPS を基板とする軟骨再生に関わる基礎研究だけでなく、一般臨床において整形外科医にも高く評価され、iPS 由来軟骨を用いた安全な再生医療の実現を可能にする新たなアプローチとして期待される。

審査員一同は、この成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。