



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
Author(s)	宮崎, 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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14508
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/84592
Type	doctoral thesis
File Information	Takuji_Miyazaki.pdf



学 位 論 文

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)

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

宮 崎 拓 自
Takuji Miyazaki

学 位 論 文

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)

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

宮 崎 拓 自
Takuji Miyazaki

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	6 頁
実験方法	7 頁
実験結果	15 頁
考察	36 頁
総括および結論	39 頁
謝辞	40 頁
引用文献	41 頁

発表論文目録および学会発表目録

1. 本研究の一部は以下の論文に発表した。

Takuji Miyazaki., Hisatoshi Hanamatsu., Liang Xu., Tomohiro Onodera.,
Jun-ichi Furukawa., Kentaro Homan., Rikiya Baba., Toshiyuki Kawasaki.,
Norimasa Iwasaki

Evaluation of Residual Human-Induced Pluripotent Stem Cells in Human Chondrocytes by Cell Type-Specific Glycosphingolipid Glycome Analysis Based on the Aminolysis-SALSA Technique

International Journal of Molecular Science. 2020, 21 (1) , 231; doi: 10.3390/ijms21010231

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Miyazaki T, Onodera T, Furukawa J, Hanamatsu H, Xu L, Homan K, Kawasaki T, Iwasaki N

The selective removal method of undifferentiated iPS cells using specific antibody for cartilage regenerative medicine.

Poster session, 15th World Congress of ICRS, Oct 5–8, 2019, Vancouver, Canada

2. 宮崎拓自 小野寺智洋 徐亮 花松久寿 古川潤一 宝満健太郎 川崎敏祐 岩崎倫政

軟骨再生医療への応用を標的とした未分化 iPS 細胞特異的除去法の検討

第 38 回日本運動器移植・再生医学研究会, 9/28, 2019, 東京

3. 宮崎拓自 小野寺智洋 徐亮 花松久寿 古川潤一 宝満健太郎 濱崎雅成 菱村亮介
川崎敏祐 岩崎倫政

軟骨再生医療への応用を標的とした未分化 iPS 細胞特異的除去法の検討

第 34 回日本整形外科基礎学術集会, 10/17-18, 2019, 横浜

4. Takuji Miyazaki, Tomohiro Onodera, Jun-ichi Furukawa, Hisatoshi Hanamatsu, Liang Xu, Kentaro Homan, Toshisuke Kawasaki, Norimasa Iwasaki

Elimination of residual iPSCs from derived chondrocytes by using a cytotoxic antibody specifically bound to iPS may reduce the risk of tumorigenicity.

Poster session, ORS Annual Meeting, February 8-11, 2020, Phenix, USA

5. 宮崎 拓自, 花松 久寿, 小野寺 智洋, 徐 亮, 古川 潤一, 宝満 健太郎, 川崎 敏祐, 岩崎 倫政

細胞特異的糖鎖解析による残存未分化 iPS 細胞の定量的評価法の確立

第 35 回 日本整形外科基礎学術集会, 10/16, 2020, web conference

緒言

関節軟骨は組織学的には硝子軟骨と呼ばれ、細胞密度が低く、血管・神経・リンパを欠き、特有の細胞外マトリックス構造に富んでいる。その特異的構造から自己修復能力に極めて乏しく、損傷した軟骨は最終的に変形性関節症に至る。軟骨修復の再生医療として自家培養軟骨細胞移植 (ACI) が報告されている (Brittberg et al., 1994)。ACI は、損傷部が硝子軟骨で修復される点で既存の方法に比べて利点があるが、健全な軟骨を犠牲にすること、2 回の手術が必要であること、軟骨細胞の増殖能力が低いため十分な数の細胞を獲得することが困難であることなどの問題点がある。また、Roberts らは、ACI で修復された軟骨組織の半数以上が、II 型コラーゲンと IIA プロコラーゲンからなる正常な硝子軟骨とは異なり I 型コラーゲンと IIA プロコラーゲンからなる線維性軟骨が優位であったことを報告している (Roberts et al., 2009)。

ヒト誘導多能性幹細胞 (iPS 細胞) は未分化の状態で無期限に増殖し、人体のあらゆる組織に分化することができる多分化能を持つ (Takahashi and Yamanaka, 2006)。それゆえに、iPS 由来細胞を用いた再生医療は、欠損した軟骨の修復においても可能性を秘めている。過去に iPS 細胞から軟骨への分化誘導法が報告されており (Yamashita et al., 2015)、iPS 細胞由来の軟骨片を用いることでミニブタの関節軟骨欠損を修復できたとの報告もある。しかし、iPS 細胞を基板とした再生医療を実現するためには克服しなければならない重要な障壁がある。それは iPS 細胞の持つ腫瘍性と脱分化である。未分化の iPS 細胞が少数でもが残存していれば、奇形腫を形成する可能性があり (Kawamata et al., 2015)、臨床応用するためには最終生成物である標的細胞に未分化 iPS 細胞が含まれていないことが必須である。iPS 細胞が含まれているかどうかを評価するためには、蛍光標識して蛍光顕微鏡で観察するか (Nagashima et al., 2018)、標識された細胞をフローサイトメトリーで定量評価する方法等があるが (Tateno et al., 2015)、すべての iPS 細胞が本当に標識されているかを確認することは非常に困難である。また iPS 固有の糖鎖を標的として未分化 iPS 細胞を除去する方法も報告されている。例えば SSEA-5 を認識する抗体を用いた cell sorting による除去法 (Tang et al., 2011) や、iPS 特異的レクチン糖鎖を認識する、緑膿菌毒素を導入した融合タンパク質による除去法 (Tateno et al., 2015) が報告されている。近年、松本らは iPS 細胞を免疫源として得られた R-17F 抗体が、iPS 細胞に特異的に発現している表面抗原糖鎖 Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) を認識し、さらに興味深いことに iPS 細胞特異的な傷害活性を持つことを報告されている (Matsumoto et al., 2015)。このような手法を

用いる場合においても、分化誘導中に残存する未分化 iPS 細胞がすべて除去されているかを評価することは非常に困難であり、これらの問題点を克服できる新規の検出法の開発が求められている。

細胞表面は、スフィンゴ糖脂質 (GSLs) や糖タンパク質などの糖質複合体で構成される緻密なグリコカリックスで被覆されており、細胞の種類や状態によって構造が劇的に変化することから、糖鎖はしばしば“細胞の顔”と呼ばれている。このように細胞特異的であり鋭敏に変化する糖鎖が詳細に解析され、診断マーカーや細胞マーカーが見出されてきた。未分化 iPS 細胞もまた、幹細胞マーカーとして知られる SSEA-3、SSEA-4、SSEA-5、Globo H や H type 1 抗原などの特異的な糖質複合体によって被覆されている (Furukawa et al., 2017)。スフィンゴ糖脂質に焦点を置くと、幹細胞ではグロボおよび (n) ラクト系列の GSLs が高発現しており、分化に伴い急速に減少し GM3、GM2、GD3 などのガングリオシド系列の GSLs の発現が増加していく

(Liang et al., 2010)。さらに近年、このような細胞の GSL 糖鎖を定性・定量解析するために、*rhodococcal endoglycosylceramidase* (EGCase) を用いた糖鎖解析法が開発された。EGCase は、GSLs より糖鎖を切断する酵素であり、ケモセレクトィブに糖鎖を精製する glycoblotting 法と併用することで、細胞中に含まれる GSL 糖鎖を網羅的に定量解析できることが報告されている (Fujitani et al., 2011)。我々も上述した方法により、軟骨細胞の肥大化の過程での GSL 糖鎖解析を行い、軟骨細胞に最も多く存在していたガングリオシド GM3 が、肥大化の過程で徐々に低下することを見出し報告している (Homan et al., 2019)。このように細胞表面の GSL 糖鎖は、細胞の種類に高度に特異的であり、さらに細胞の運命を決定づけているかのように分化や肥大化と関連して構造や発現が大きく変化する。

私は、このような細胞固有の GSL 糖鎖を解析することで、細胞集団から残存する未分化 iPS 細胞を定量でき、未分化 iPS 細胞の除去を評価できるのではないかと考え本着想に至った。本研究では、まず iPS 細胞および軟骨細胞に発現する GSL 糖鎖を種々の糖鎖修飾法を用いて解析し、細胞に特異的に発現している GSL 糖鎖を同定した。次に同定した細胞特異的糖鎖の定量解析により、ヘテロな細胞集団中に残存する未分化 iPS 細胞の評価法を構築した。さらに iPS 細胞から間葉系幹細胞様細胞 (iPS-MSC) を介して軟骨への分化誘導する過程において、本手法を用いて iPS-MSC 中に含まれる未分化 iPS 細胞の検出について検証した。

次に iPS 細胞表面に特異的に発現している GSL 糖鎖の一つである Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) に特異的に結合し、細胞傷害性を示す抗体 R-17F (Matsumoto et al., 2015)を用いた未分化 iPS 細胞の除去法について検討した。構築した GSL 糖鎖解析法によって残存する iPS 細胞を評価した結果、R-17F の持つ細胞傷害性は 2 次抗体を添加するタイミングや至適濃度を検討することで、iPS 細胞がコロニーの状態でも

完全に除去できていることが確認できた。さらに iPS 細胞の除去が確認された軟骨細胞をマウスの精巣に移植しても teratoma の形成は認められなかった。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

ACI	Autologous chondrocyte implantation
iPSC	Human-induced pluripotent stem cell
SSEA	Stage-specific embryonic antigen
LNFP I	Lacto-N-fucopentaose I
GSL	glycosphingolipid
ECGase	rhodococcal endoglycosylceramidase
SALSA	aminolysis-sialic acid linkage-specific alkylamidation
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
PI	Propidium iodide
FBS	Fetal Bovine Serum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass
aoWR	N α - ((aminooxy) acetyl) tryptophanylarginine methyl ester
PFA	Paraformaldehyde
HEPES	4- (2-Hydroxyethyl) piperazine) -1-ethanesulfonic acid
MSC	mesenchymal stem cell
bFGF	human recombinant basic fibroblast growth factor
hBMSC	Human bone marrow-derived stem cells
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic Acid
SD	Standard Deviation
EC	Embryonal Carcinoma

実験方法

実験材料

Human-induced pluripotent stem (iPS) 細胞株 (201B7 および 606A1) は、理化学研究所 (Ibaraki, Japan) から購入した。ヒト軟骨細胞株 (C28/I2) は Merck (Darmstadt, Germany) から購入した。R-17F 抗体は、立命館大学から提供された。4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) と Propidium iodide (PI) は、DOJINDO (Kumamoto, Japan) から購入した。Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse IgG 抗体は Invitrogen (Tokyo, Japan) から購入した。BlotGlyco ビーズは住友ベークライト社 (Tokyo, Japan) から購入した。その他の溶媒および試薬は、市販されている最高グレードのものを使用した。

維持培養

201B7 および 606A1 細胞を、ビトロネクチン (Invitrogen) でコーティングされた細胞培養プレート上で、50 U/mL ペニシリンおよび 50 mg/mL ストレプトマイシンを含む Essential 8 (Invitrogen) を含むフィーダーフリー培地で培養した。未分化 iPS コロニーは、Versene 溶液 (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) を用いて 3~4 日ごとに継代した。C28/I2 細胞は、10% fetal bovine serum (FBS)、50 U/mL ペニシリン、50 mg/mL ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Wako, Osaka, Japan) で培養した。C28/I2 細胞は、trypsin- ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液を用いて 4 日ごとに継代した。

1. GSL 糖鎖解析によるヒト軟骨細胞に混入した未分化 iPS 細胞の検出

1.1 iPS 細胞株 (606A1, 201B7) の GSL 糖鎖解析

我々はまず始めに、iPS 細胞株間の Glycosphingolipid (GSL) 糖鎖プロファイルを比較することを目的とし、2 つの iPS 細胞株 (201B7 と 606A1) を用いて GSL 糖鎖解析を行った。201B7、606A1 細胞株をフィーダーフリー培地でそれぞれ 80%コンフルエントになるまで培養し、Phosphate-buffered Saline (PBS) で洗浄後、セルスクレーパーで

細胞を剥離し回収した。800 g で 5 min 遠心後、上澄みを除去し得られた細胞を GSL 糖鎖解析に使用した。PBS を 100 μ L 加えて BIORUPTOR II 装置 (CosmoBio, Tokyo, Japan) を用いて 4 $^{\circ}$ C で超音波破碎後、400 μ L のエタノールを添加し -20 $^{\circ}$ C で 3 時間静置した。エタノール沈殿後、14,000 g で 20 分間遠心分離を行い、スフィンゴ糖脂質 (GSL) を含む上清を回収し、遠心エバポレーターで乾固した。乾固した脂質画分に 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) を含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH5.5) を 48 μ L を加え懸濁後、2 μ L endoglycosylceramidase (EGCase) I (25 mU) を添加し、37 $^{\circ}$ C で 16 時間の静置を行い、GSL 糖鎖を調製した (Fujitani et al., 2011; Furukawa et al., 2015)。GSL 糖鎖は、glycoblotting および aminolysis-SALSA 法 (Hanamatsu et al., 2018) により解析した。調製した GSL 糖鎖サンプルに内部標準として (Neu5Ac)₂(Gal)₂(GlcNAc)₂+(Man)₃(GlcNAc)₁ (A2GN1) を加え、5 mg の BlotGlyco ビーズ (Sumitomo Bakelite Company Ltd., Tokyo, Japan) で糖鎖を捕捉した。ビーズ上の未反応 hydrazide 基は、10%無水酢酸を含むメタノール溶液でアセチル化することによりキャップ (不活化) した。次に、糖鎖を捕捉したビーズを一段階目のイソプロピルアミド化試薬 (500 mM EDC-HCl, 500 mM HOBt, 2 M iPA-HCl in DMSO) を添加し、マイクロプレートミキサー (TOMY, Tokyo, Japan) で振とうしながら室温で 1 時間反応した。過剰なアミド化試薬を除去するために 200 μ L のメタノールでビーズを洗浄後、二段階目のアミド化 (ラクトン環開裂アミノリシス) を行うため、ビーズを 200 μ L の 2.9 M アミン試薬 (メチルアミン水溶液) で 3 回洗浄し、続いて MeOH、および H₂O で 3 回洗浄した。次に、aoWR 試薬を加え、イミン交換反応により GSL 糖鎖を標識および回収を行なった。回収した糖鎖溶液を親水性相互作用固相抽出プレート (Waters, Milford, MA, USA) へ供することで過剰の aoWR 試薬を除去した。精製した GSL 糖鎖溶液を 10 mg/mL 2,5-ジヒドロ安息香酸溶液 (30%アセトニトリル aq) と混合し、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化-飛行時間質量分析装置 (MALDI-TOF MS: Ultraflex II TOF/TOF-MS) により分析を行なった (Homan et al., 2019)。MALDI-TOF MS による測定はリフレクトロンモード、加速電圧 25 kV、リフレクタ電圧 26.3 kV、正イオンモードで 160 ns のパルスイオン抽出により行なった。GSL 糖鎖構造の帰属は FlexAnalysis 3.0 ソフトウェア (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) および SphinGOMAP (<http://www.sphingomap.org/>) オンラインデータベースを使用した。

1.2 iPS 細胞および軟骨細胞の GSL 糖鎖解析

次に異なる継代間で糖鎖構造が変化するかを検証した。軟骨細胞 (C28/I2)、iPS 細胞 (606A1) それぞれの GSL 糖鎖を 3 つの異なる実験で比較し、細胞株の継代が糖鎖プロファイルに影響するかを検証した。C28/I2 P4、7、8、606A1 P8、15、18 をそれぞれ

れ 80%コンフルエントになるまで培養し、前述のように細胞を回収、エタノール沈殿後、glycoblotting およびエチルアミン、メチルアミンを用いた aminolysis-SALSA 法 (Hanamatsu et al., 2018) を用いて解析した。

1.3 iPS 細胞、軟骨細胞の共存条件下での糖鎖解析

iPS 細胞、軟骨細胞を 4 日間培養後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄し、iPS 細胞を Versene solution (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan)、軟骨細胞を trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution を用いて剥離し、それぞれ遠心管に回収した。細胞をトリパンブルー (Invitrogen) で染色し、Countess Automated Cell Counter (Invitrogen) を用いて細胞数を計算した。軟骨細胞に 10 %の比率で iPS 細胞を混入し、200 g、3 分遠心後、上澄みを吸引した。得られた細胞を GSL 糖鎖は、glycoblotting 法によって精製し、シアル酸残基は aminolysis-SALSA 法によりアミン試薬 (メチルアミン、エチルアミン、またはプロピルアミン) を用いて種々のアミド体へと誘導した (Hanamatsu et al., 2018)。

1.4 細胞型特異的 GSL 糖鎖解析によるヒト軟骨細胞中の残存 iPS 細胞の評価

様々な比率で iPS 細胞が混入した軟骨細胞から、iPS 細胞特異的な GSL 糖鎖を用いることで残存 iPS 細胞を定量的に検出できるかどうかを調べた。iPS 細胞 (606A1)、軟骨細胞 (C28/I2)、(約 5×10^4 個) から調製した GSL 糖鎖は、前述のように glycoblotting 法により還元末端を N α -((aminooxy) acetyl) tryptophanylarginine methyl ester (aoWR) で標識し、 α ,2,3 結合シアル酸を持つ GSL 糖鎖は ethylaminolysis -SALSA 法によりエチルアミド体へと誘導化した。軟骨細胞 GSL 糖鎖に様々な比率で iPS 細胞由来の GSL 糖鎖 (iPS 含有量=20%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%、0.25%、0.1%) を混合し、1000 個細胞相当の GSL 糖鎖を MALDI ターゲットプレート上にスポットティングし解析した。A2GN1 糖鎖 (Neu5Ac2Gal2GlcNAc2 + Man3GlcNAc1) を内部標準 (40 fmol) として加え、iPS 細胞特異的 GSL 糖鎖を定量化した。

1.5 フローサイトメトリーを用いた軟骨細胞に残存する iPS 細胞の検出

従来の検出法として、フローサイトメトリーによる検出法について検討した。iPS 細胞 (606A1)、 1×10^6 個を Cell Tracker Green CMFDA (Tateno et al., 2015) で標識し、C28/I2 (1×10^6 個) と様々な比率 (iPS 含有量=10%、5%、2.5%、1%、0.5%、0.1%) で混合し、フローサイトメトリー (BD FACSCANTO II instrument, BD Biosciences, NJ, USA)

で検出した。得られたデータは Flowjo software (Tree Star, Ashland, USA) を用いて解析した。

1.6 軟骨細胞との共培養条件下での iPS 細胞の GSL 糖鎖解析

iPS 細胞(606A1)と軟骨細胞 (C28/I2) を 80%コンフルエントになるまでそれぞれ培養した。培養した細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄し、iPS 細胞を Versene solution、軟骨細胞を trypsin- ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution を用いて剥離し、それぞれ遠心管に回収し、Countess Automated Cell Counter を用いて細胞数を計算した。次に、iPS 細胞と軟骨細胞を異なる比率で混合した (iPS 細胞含有量=100%、20%、10%、2.5%、1%、0.5%、0% ; 全細胞数=7.5x10⁴)。混合した細胞を 200 g で 3 分間遠心分離し、上清を吸引した。iPS medium (Essential 8) を 500 μL 加えてピペッティングし、vitronectin で coating した 24well plate に播種した。培養 4 日目で 1000 μL の PBS で 4 回洗浄し、セルスクレーパーを用いて細胞を回収した。800 g で 5 分間遠心後、前述のように超音波破碎し、エタノール沈殿によりスフィンゴ糖脂質 (GSL) を含む上清を回収した。ECGase I を添加し、遊離されたインタクトな GSL 糖鎖は、glycoblotting および aminolysis-SALSA 法 (Hanamatsu et al., 2018) を用いて解析した。

2. GSL 糖鎖解析を用いた iPS 細胞に対する R-17F の細胞傷害性の評価

R-17F 抗体は、マウス腹腔内にヒト iPS 細胞を注射して得られた hybridoma の中で、ヒト iPS 細胞に接着し、ヒト EC 細胞に接着しない抗体を分泌する hybridoma を選別することで作製されている。R-17F は未分化 iPS 細胞に発現する糖鎖 LNFP I ((Hex)₃(HexNAc)₁(Fuc)₁) を特異的に認識する抗体で、また iPS 細胞に対して濃度依存性を持って細胞傷害性を示すことがわかっている (Matsumoto et al., 2015)。そこで、私は、iPS 細胞と軟骨細胞との共培養細胞に対して、R-17F 抗体を用いて残存未分化 iPS 細胞の除去について検討した。

2.1 R-17F 抗体の iPS 細胞に対する結合能の評価

まず、免疫組織学的染色を用いて、R-17F の iPS 細胞に対する結合能を評価した。培養した iPS 細胞 (606A1、P4、207B7、P6) を 4%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定し、R-17F (10 μg/mL) を添加して 4 °C で一晩インキュベートした。翌日、二次抗体 (Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse IgG antibody) を加えて (1 μg/mL) インキュ

べートした。標識細胞を蛍光顕微鏡 (BZ-X710、KEYENCE、Osaka、Japan) で観察した。

2.2 R-17F 抗体の iPS 細胞、軟骨細胞に対する影響の評価

次に、iPS 細胞 (606A1)、軟骨細胞 (C28/I2) に対する R-17F 抗体の細胞傷害性を確認した。iPS 細胞を vitronectin で coating したフラスコで 4 日間培養後、PBS で 3 回洗浄し、Versene Solution を加えて colony を解離し回収した。200 g で 3 分遠心後、上澄みを吸引し、 1×10^5 個/100 μ L になるように FACS Buffer (2%FBS および 25 mM 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine) -1-ethanesulfonic acid (HEPES、SIGMA-ALDRICH、St. Louis, USA) を含む PBS) を加えて懸濁した。R-17F (100 μ g/mL) を加えて 4°C で 45 分間インキュベートし、遠心分離による洗浄後、ペレットを 4 μ mol/L Propidium iodide (PI) を含む PBS に再懸濁した。遮光、37°C で 15 分間インキュベートし、遠心分離で洗浄した後、PI 陽性細胞を Flow cytometry (BD FACSCANTO II) を用いて評価した。ヒト軟骨細胞に対する R-17F の効果は、C28I2 を用いて iPS 細胞と同様の方法で Flow cytometry により評価した。得られたデータは、Flowjo software (Tree Star, Ashland, USA) を使用して解析した。

2.3 iPS コロニーに対する R-17F 抗体の細胞傷害性評価

Colony の状態の iPS 細胞に対する R-17F 抗体の細胞傷害性についても評価した。iPS 細胞 (606A1) を vitronectin で coating した 24well プレートで 3 日間培養し、500 μ g/mL の濃度で R-17F 添加した。添加後、12 時間おきに顕微鏡で観察した。

2.4 GSL 糖鎖解析による、共培養条件下での R-17F 抗体の細胞傷害性評価

軟骨細胞と共培養条件下での、iPS 細胞に対する R-17F 抗体の細胞傷害性について糖鎖解析により評価した。iPS 細胞 (606A1) と軟骨細胞 (C28/I2) を vitronectin で coating した 24 ウェルプレートで共培養した (播種細胞数= 0.75×10^4 、 0.75×10^5)。また、検量線を作成するために、iPS 細胞と軟骨細胞を様々な比率で共培養したサンプルも作成した (iPS 含有量==100%、20%、10%、2.5%、1%、0.5%、および 0%)。3 日間培養した後、R-17F を 200, 300, 500 μ g/mL の濃度で iPS 培地に添加し、12 時間おきに顕微鏡を用いて観察した。36 時間後、PBS で洗浄し、全細胞をセルスクレーパーで剥

離し、マイクロチューブに回収した。脂質画分を含む上清をエタノール沈殿により分離し、EGCaseIにより切断された GSL 糖鎖を前述のように glycoblotting 法を用いて解析した。

3. GSL 糖鎖解析を用いた、分化過程での残存する iPS 細胞の検出

3.1 未分化 iPS 細胞から間葉系幹細胞様細胞 (iPS-MSC) への分化方法

次に、分化過程で残存する未分化 iPS 細胞を、糖鎖解析により検出可能かを検討した。当科では iPS 細胞から軟骨細胞へ分化させる方法として、Guzzo らが報告した間葉系幹細胞様細胞 (iPS-MSC) を介して軟骨まで分化させる方法を基に行っている。本研究では、iPS 細胞から iPS-MSC へと分化する過程での iPSC 特異的な糖鎖の変化を評価した。Feeder-free 培地で培養した未分化 iPS colony を Versene solution を加えて 37°C で 5 分間処理し、Essential 8 培地で静かにペッティングして解離させ、細胞をゼラチンで coating したプレートに $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ で播種した。3 日後、培地を DMEM-HG (Gibco)、10%FBS、1% nonessential amino acids、1% penicillin-streptomycin、および 5 ng/mL の human recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) からなる MSC 誘導培地に変更した (Guzzo et al., 2013)。インキュベーターにて 37°C および 5%CO₂ で 80%コンフルエントに増殖させ、0.25%トリプシンを使用して非コート組織培養プレートに継代 (p1-p2) すると、iPS-MSC 様の細胞集団は、均質で線維芽細胞様の形態を獲得した。その後の継代は濃度 1×10^4 細胞/cm² で非コートプレートに播種し、前述の MSC 誘導培地を用いて培養し、passage 6 まで継代した。

3.2 Flow cytometry を用いた、iPS-MSC における MCS マーカーの定量

iPSC-MSC (passage 6) とヒト骨髄間葉系幹細胞 (bone marrow-derived stem cells, hBMSCs) を 80%コンフルエンスになるまで培養した。0.25%トリプシン/EDTA で細胞をはがして回収し、1500 rpm で 5 分間遠心した。上澄みを吸引後、2%FBS と 25mM HEPES を含む PBS 溶液に再懸濁した。細胞懸濁液 (1×10^6 個/100 μL) に PE mouse anti-human CD44、APC mouse anti-human CD73、PerCP-CyTM5.5 mouse anti-human CD105 (BD Biosciences, New Jersey, USA)、negative MSC cocktail (PE CD34, PE CD11b, PE CD19, PE CD45 and PE HLA-DR, BD Biosciences) を加えて暗所で 30 分インキュベート後、サンプルを BD FACSCANTO II 装置 (BD Biosciences) を用いて Flow cytometry を実行した。得られたデータは、FloJo Software (Tree Star, USA.) を用いて解析した。

3.3 qRT-PCR を用いた iPS-MSC の未分化マーカーの検出

Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) にて iPS-MSC (P2、P3、P6) の未分化マーカーを測定した。iPS-MSC、および ヒト骨髄間葉系幹細胞 (bone marrow-derived stem cells, hBMSCs) から TRIzol 試薬 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて全 RNA を抽出し、column cleanup (Qiagen, Hilden, Germany) で精製した。QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて逆転写し、cDNA を合成した。PCR は、SYBR Green I-based RT-PCR Master Mix と Thermal Cycler Dice Real-Time System II (model TP900 ; Takara Bio TaKaRa, Shiga, Japan) を用いて行った。quantitative real-time PCR に使用したプライマーは、Table 1 に記載した。遺伝子発現レベルは *GAPDH* を用いて標準化した。

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>GAPDH</i>	AATTCATGGCACCGTCAAG	AGGGATCTCGCTCCTGGAAG
<i>NANOG</i>	CAGTCTGGACACTGGCTGAA	CTCGCTGATTAGGCTCCAAC
<i>OCT 3/4</i>	TGTA CTCTCGGTCCCTTTC	TCCAGGTTTTCTTTCCCTAGC
<i>SOX 2</i>	TTCACATGTCCCAGCACTACCAGA	TCACATGTGTGAGAGGGGCAGTGTGC

Table 1. 本研究で用いたプライマーの塩基配列

3.4 GSL 糖鎖解析を用いた、iPS-MSC における幹細胞特異的糖鎖の検出

次に、iPS-MSC (P2、4) の GSL 糖鎖分析を解析を行った。上述の方法で iPS 細胞を P2,4 までそれぞれ分化させた。80%コンフルエントになるまで培養後、PBS で 4 回洗浄し、セルスクレーパーを用いて細胞を回収した。800 g で 5 分間遠心分離後、上澄みを吸引した。脂質画分を含む上清をエタノール沈殿により分離し、EGCase I により切断された GSL 糖鎖を前述のように glycoblotting 法を用いて解析した。

4. 2次抗体による R-17F の iPS 細胞特異的細胞障害性の増強効果の検討

4.1 共培養条件下での 2次抗体を添加するタイミングの検討

まず始めに、2次抗体を添加するタイミングについて検討した。R-17F の2次抗体 (Goat Anti-Mouse IgG1-UNLB) は SouthernBiotech 社 (Birmingham, USA) より購入した。iPS 細胞 (606A1) と軟骨細胞 (C28/I2) を vitronectin で coating した 24 ウェルプレートで共培養し (iPS 細胞播種濃度=5%)、共培養 1 日目で R-17F を $50 \mu\text{g/mL}$ の濃度で添加した。2次抗体は $5 \mu\text{g/mL}$ の濃度で R-17F と同時に添加する群と、R-17F 添加後 24 時間後に添加する群で検討した。共培養 4 日目にすべての細胞を回収し、前述の方法を用いて GSL 糖鎖解析を行った。

4.2 共培養細胞に対し、2次抗体を添加する至適濃度の検討

次に、2次抗体の添加する至適濃度について検討した。iPS 細胞 (606A1) と軟骨細胞 (C28/I2) を 24 ウェルプレートで共培養し (iPS 細胞播種濃度=5%)、共培養 1 日目で R-17F を $100 \mu\text{g/mL}$ の濃度で添加した。R-17F を加えて 24 h 後に2次抗体を $0-100 \mu\text{g/mL}$ の濃度で添加し、経時的顕微鏡観察を行った。共培養 4 日目にすべての細胞を回収し、前述のように糖鎖解析を行った。

4.3 2次抗体併用した場合の R-17F 抗体処理による teratoma の発生抑制効果の検討

最後に、事前に R-17F 処理することで、生体内移植後にテラトーマ形成を防ぐことが可能かを検討した。5 週齢の C.B-17/IcrHsd-Prkdc severe combined immunodeficiency (scid)マウスを三協ラボサービス (Hamamatsu, Japam) から購入し、搬入後 1 週間以上の順化期間を設けてから実験に使用した。なお本研究に用いた実験動物は北海道大学動物実験に関する規定および北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に則っておこなった。iPS 細胞 (606A1) と軟骨細胞 (C28/I2) を 24 ウェルプレートで共培養し (播種細胞数= 0.375×10^4 、 0.7125×10^5 、iPS 細胞の比率=5%)、共培養 1 日目に R-17F を $100 \mu\text{g/mL}$ の濃度で iPS 培地に添加した。24 時間後に二次抗体を至適濃度で添加した。共培養 4 日目に全細胞をマイクロチューブに採取し、 200g で 3 分間遠心し、 $20 \mu\text{L}$ の Essential 8 培地を加え、6 週齢の scid マウスの精巣に移植した。1 匹のマウスにつき、3 ウェル分の共培養細胞を移植した。また、コントロールとして、抗体処理を加えていない共培養細胞を移植した。観察期間を 12 週間とし、組織学的にテラトーマ形成を評価した。抗体処理後にマウスに注入した共培養細胞と同一サンプルについて、前述のように GSL 糖鎖解析を行った。

実験結果

iPS 細胞株 (606A1, 201B7) の GSL 糖鎖解析

Figure 1 に示すように、2つの iPS 細胞株 (606A1, 201B7) は非常に類似したプロファイルを示した。また iPS 細胞特異的な GSL 糖鎖 (Lacto-N-fucopentaose I) も両細胞株で高発現していることが確認できた。この結果により、iPS 細胞は異なる細胞株であっても類似した GSL 糖鎖プロファイルを持つことが明らかとなった。

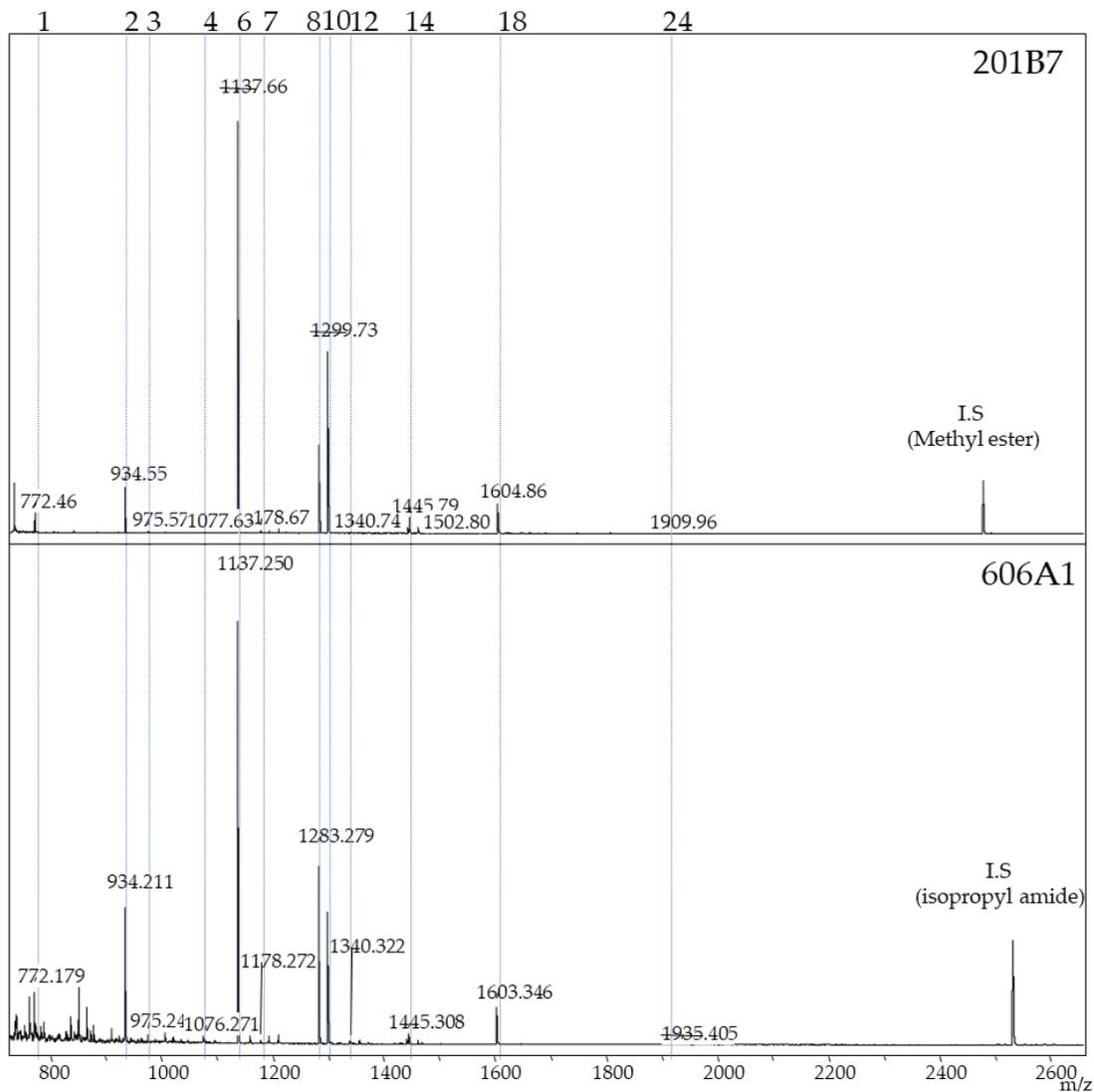


Figure 1. iPS 細胞株 201B7 および 606A1 における GSL 糖鎖の MALDI-TOF MS スペクトルを示す。シグナル番号は、Table 2 に記載されたものに対応する。

No.	Glycan Composition	Class	m/z	Chondrocytes (pmol/5 × 10 ⁴)		iPSCs (pmol/5 × 10 ⁴)		Relative Amount iPSCs
1	(Hex) ₂	Neutral	772.39	0.06	± 0.01	0.22	± 0.02	3.6
2	(Hex) ₃	Neutral	934.47	0.04	± 0.01	0.80	± 0.08	21.2
3	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁	Neutral	975.5	0.19	± 0.04	0.06	± 0.00	0.3
5	(Hex) ₄	Neutral	1096.53	0.00	± 0.00	0.02	± 0.01	INF
6	(Hex) ₃ (HexNAc) ₁	Neutral	1137.56	0.99	± 0.18	2.93	± 0.32	3.0
7	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂	Neutral	1178.59	0.04	± 0.01	0.04	± 0.00	1.1
8	(Hex) ₃ (HexNAc) ₁ (Fuc) ₁	Neutral	1283.63	0.00	± 0.00	1.36	± 0.18	INF
10	(Hex) ₄ (HexNAc) ₁	Neutral	1299.67	0.01	± 0.01	1.15	± 0.13	174.5
12	(Hex) ₃ (HexNAc) ₂	Neutral	1340.67	0.09	± 0.02	0.03	± 0.00	0.3
13	(Hex) ₃ (HexNAc) ₁ (Fuc) ₂	Neutral	1429.7	0.00	± 0.00	0.01	± 0.01	INF
14	(Hex) ₄ (HexNAc) ₁ (Fuc) ₁	Neutral	1445.71	0.00	± 0.00	0.14	± 0.01	INF
16	(Hex) ₅ (HexNAc) ₁	Neutral	1461.71	0.01	± 0.01	0.07	± 0.01	10.5
17	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂	Neutral	1502.72	0.01	± 0.01	0.02	± 0.01	1.5
4	(Hex) ₂ (α2,3NeuAc) ₁	Ganglioside	1076.57	0.04	± 0.01	0.07	± 0.01	1.7
9	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (α2,3NeuAc) ₁	Ganglioside	1279.67	4.25	± 0.87	0.00	± 0.00	0
11	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (α2,6NeuAc) ₁	Ganglioside	1307.7	0.07	± 0.01	0.00	± 0.00	0
15	(Hex) ₃ (HexNAc) ₁ (α2,3NeuAc) ₁	Ganglioside	1441.73	0.27	± 0.05	0.06	± 0.01	0.2
18	(Hex) ₄ (HexNAc) ₁ (α2,3NeuAc) ₁	Ganglioside	1603.78	0.00	± 0.00	0.46	± 0.05	INF
19	(Hex) ₃ (HexNAc) ₂ (α2,3NeuAc) ₁	Ganglioside	1644.81	0.05	± 0.01	0.00	± 0.00	0
20	(Hex) ₃ (HexNAc) ₁ (α2,3NeuAc) ₂	Ganglioside	1745.86	0.01	± 0.01	0.00	± 0.00	0
21	(Hex) ₃ (HexNAc) ₁ (α2,3NeuAc) ₁ (α2,6NeuAc) ₁	Ganglioside	1773.88	0.06	± 0.01	0.00	± 0.00	0
22	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂ (α2,3NeuAc) ₁	Ganglioside	1806.85	0.02	± 0.00	0.00	± 0.00	0
23	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (α2,3NeuAc) ₁	Ganglioside	1847.87	0.01	± 0.01	0.00	± 0.00	0
24	(Hex) ₄ (HexNAc) ₁ (α2,3NeuAc) ₁ (α2,6NeuAc) ₁	Ganglioside	1935.87	0.00	± 0.00	0.03	± 0.00	INF
25	(Hex) ₅ (HexNAc) ₃ (α2,3NeuAc) ₁	Ganglioside	2172	0.02	± 0.01	0.00	± 0.00	0
	Total	-	-	6.25	± 1.20	7.45	± 0.83	1.2

Table 2. 軟骨細胞および iPS 細胞における GSL 糖鎖の組成および定量。

iPS 細胞および軟骨細胞の GSL 糖鎖解析

異なる継代間での GSL 糖鎖の比較では、継代によらず iPS 細胞、軟骨細胞の両者とも極めて類似した GSL 糖鎖プロファイルを示した。以上より、GSL 糖鎖のプロファイルが細胞特異的であり、細胞継代数の違いに影響を受けないことを確認した (Figure 2A,B)。

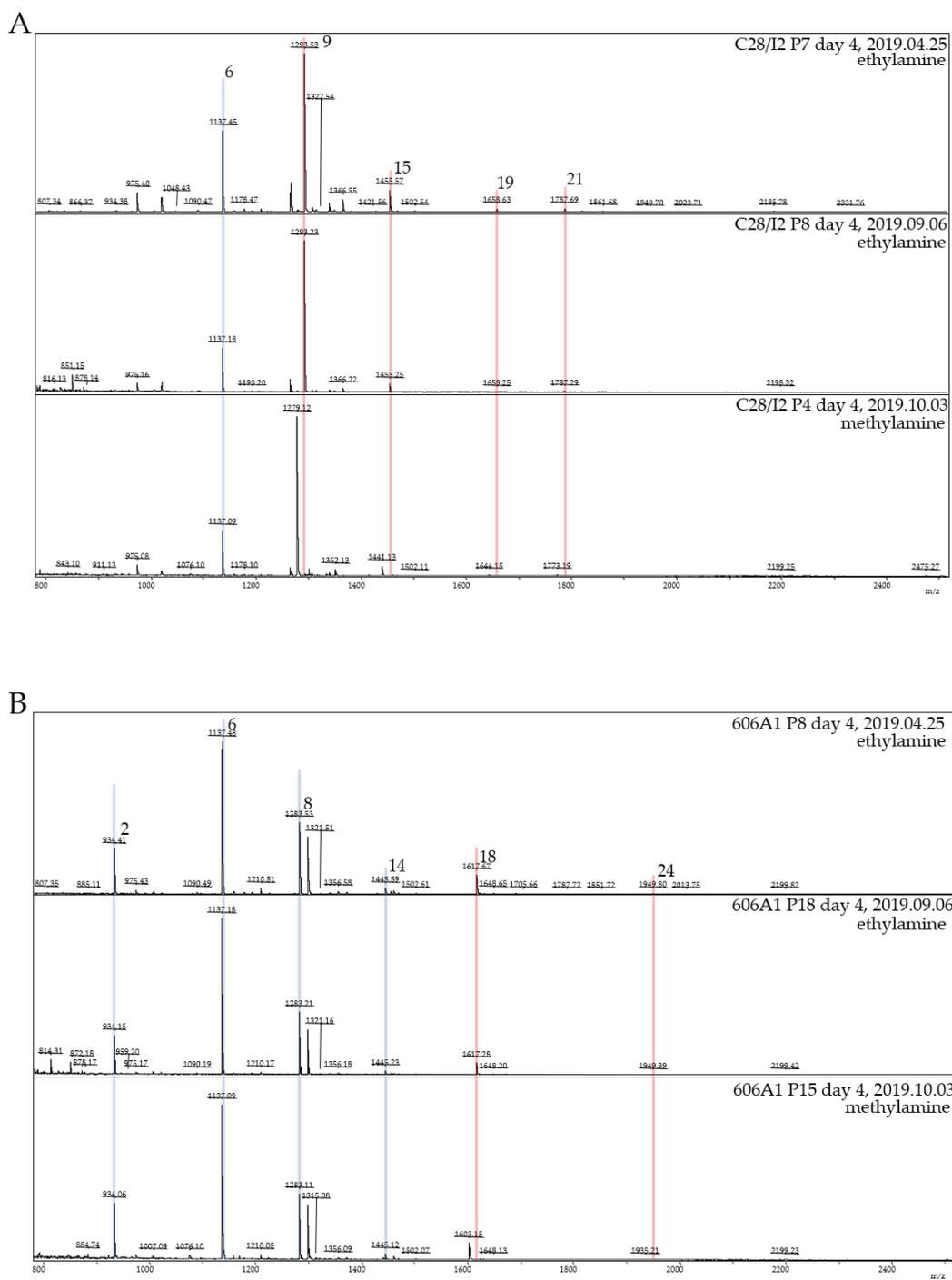


Figure 2. 軟骨細胞株およびiPS細胞由来GSL糖鎖のMALDI-TOF MSスペクトル。軟骨細胞株(C28/I2)およびiPS細胞(606A1)由来のGSL糖鎖は、ethylamineまたはmethylamineのいずれかを用いたaminolysis-SALSA法により調製した。シグナル番号は、Table 2に記載されたものに対応する。

iPS 細胞、軟骨細胞の共存条件下での糖鎖解析

10% iPS 細胞が混入した状態での GSL 糖鎖解析では、Figure 3 A に示すように MALDI-TOF MS 解析において iPS、軟骨細胞から同定された GSL 糖鎖のほとんどは細胞特異的に発現しており、共存条件下でスペクトルは重複していなかった。しかし、軟骨細胞のメチルアミド化 GM2 と iPS 細胞の LNFP I 糖鎖のシグナルが近いこと (3 Da)、軟骨細胞の GM2 と比較して発現量が低い iPS 細胞の LNFP I を定量することが困難であった。そこで、私は aminolysis-SALSA 法を応用することを考えた。aminolysis-SALSA 法は、 α 2,3 結合のシアル酸残基をもつ GSL 糖鎖を、結合様式特異的にアミド化する方法であり、エチルアミンやプロピルアミンなどの各種アミン試薬を用いることで、 α 2,3 結合のシアル酸残基をエチルアミドやプロピルアミド誘導体へと容易に変換できることを報告していた (Hanamatsu et al., 2018)。そこで、本研究では methylamine (MA)、ethylamine (EA) または propylamine (PA) を使用した aminolysis-SALSA によって、 α 2,3 結合のシアル酸残基を持つ GM2 のシグナルをシフトさせることで、iPS 細胞のシアル酸を持たない LNFP I とのシグナルと分離し GSL 糖鎖を定量解析することを計画した。GSL 糖鎖の MALDI-TOF MS スペクトルを Figure 3 B に示す。LNFP I および Gb5 は中性糖鎖であったため、これらのシグナルは、すべてのタイプのアミド化においても移動することなく、 m/z 1283.2 および 1299.2 (右パネル) で観測された。一方で、軟骨細胞由来の GM2 のシグナルは、エチルアミド化、プロピルアミド化することで、メチルアミド化 GM2 (MA; 左パネル) のシグナルよりも右側にシフトしており (EA=14 Da, PA=28 Da)、その結果、エチルアミド化またはプロピルアミド化された GM2 のシグナルと iPS 由来の LNFP I および Gb4 のシグナルは完全に分離されて検出できた。これらの結果をもとに、今後の研究では ethylaminolysis-SALSA 法を用いて軟骨細胞中の残存未分化 iPS 細胞を算出することとした。

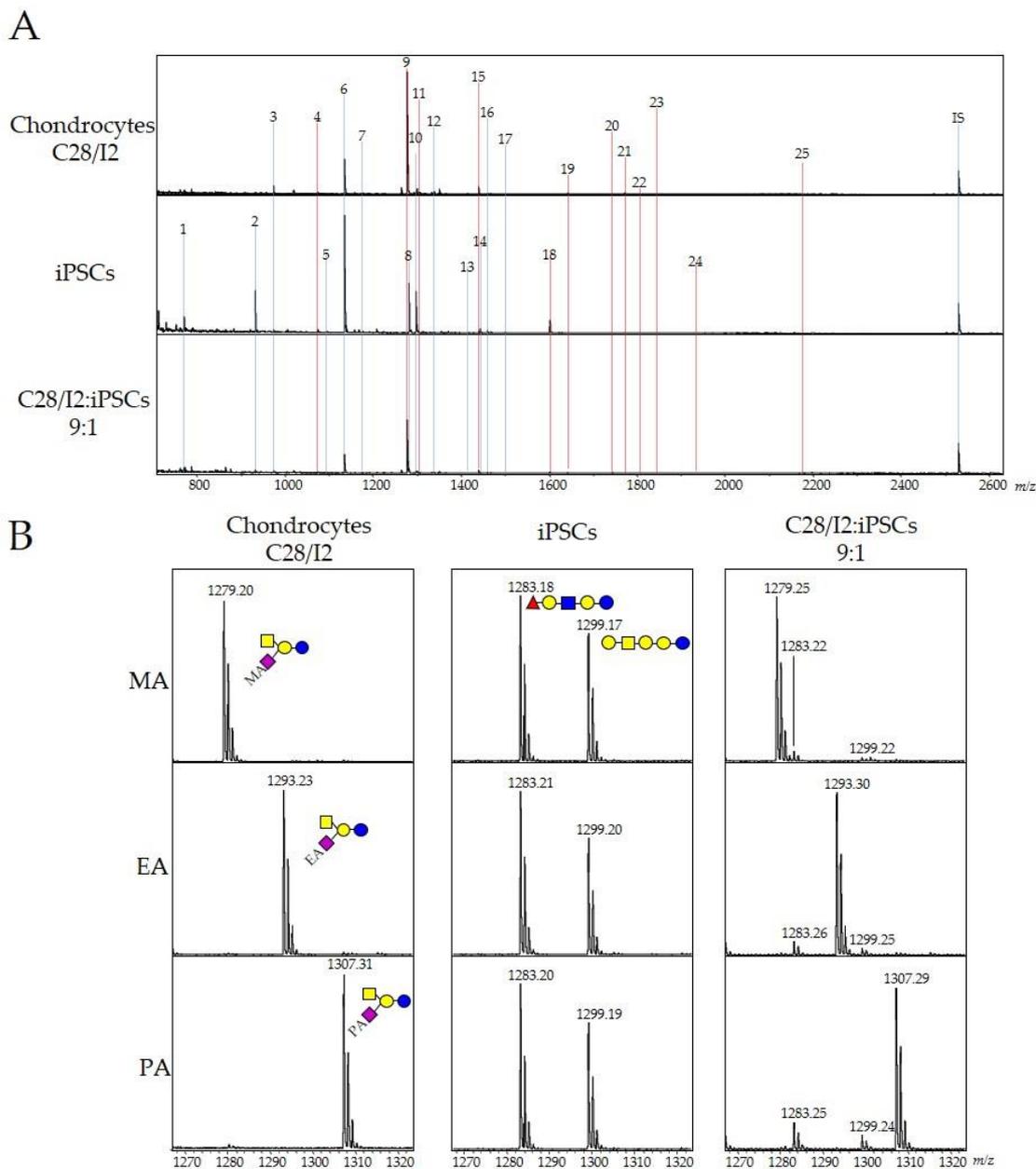


Figure 3. aminolysis-SALSA 法を用いた iPS 細胞、軟骨細胞由来 GSL 糖鎖解析
 A) 軟骨細胞、iPS 細胞、および共存条件下の GSL 糖鎖の MALDI-TOF MS スペクトル。B) 1265-1325 *m/z* の範囲での、aminolysis-SALSA 法を使用して、methylamine (MA)、ethylamine (EA)、または propylamine (PA) で誘導体化した iPS、軟骨細胞由来 GSL 糖鎖の MALDI-TOF MS スペクトル。シグナル番号は、Table 2 に記載されているものに対応。

細胞型特異的 GSL 糖鎖解析によるヒト軟骨細胞中の残存 iPS 細胞の評価

様々な比率で混合した iPS 細胞および軟骨細胞由来の GSL 糖鎖の MALDI-TOF MS スペクトルを Figure 4 に示す。iPS 細胞特異的な GSL 糖鎖 (Gb3、LNFPI および Gb5) は、0.25%までは検出可能であったが、それ以下では検出が困難であった。galactosyl LNFPI は 10 %、SSEA-4 については 2.5%以下では検出できなかった。また、iPS 細胞濃度と iPS 細胞特異的な糖鎖の発現量 (Gb3、LNFPI、Gb5、galactosyl LNFPI、および SSEA-4) を使用して検量線を取得した。Gb3、LNFPI および Gb5 の 3 つの検量線は、Figure 5 に示すように、iPS 細胞濃度と糖鎖発現量の間に関係 (R²>0.97) を示した。また~1000 細胞相当の GSL 糖鎖が良好に検出することができた。

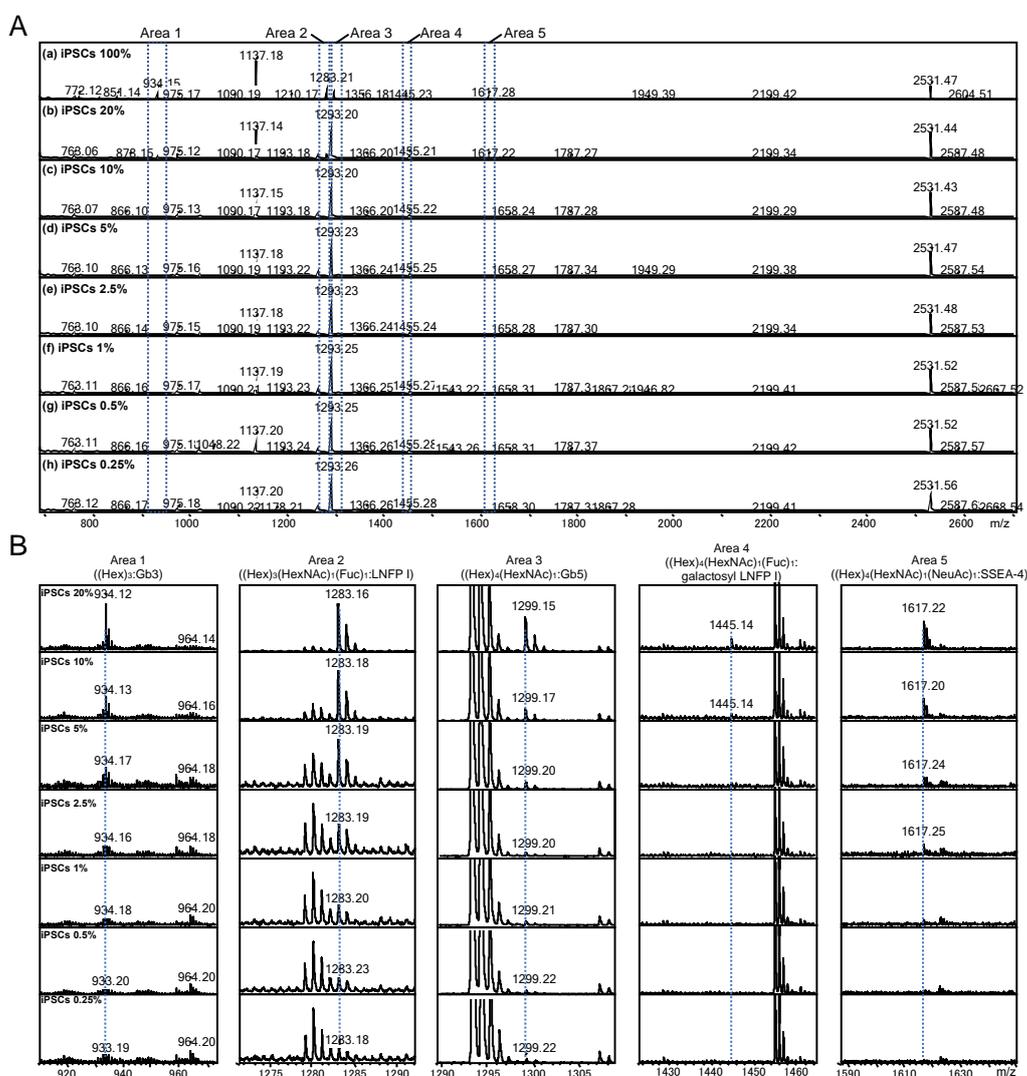


Figure 4. 様々な細胞密度で iPS 細胞が混入した状態での軟骨細胞由来 GSL 糖鎖を示す MALDI-TOF MS スペクトル。A) 様々な iPS 細胞含有条件 (iPSCs 20%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%、および 0.25%) における GSL 糖鎖の MALDI-TOF MS スペクトル。(B) area 1~5 のクローズアップ。

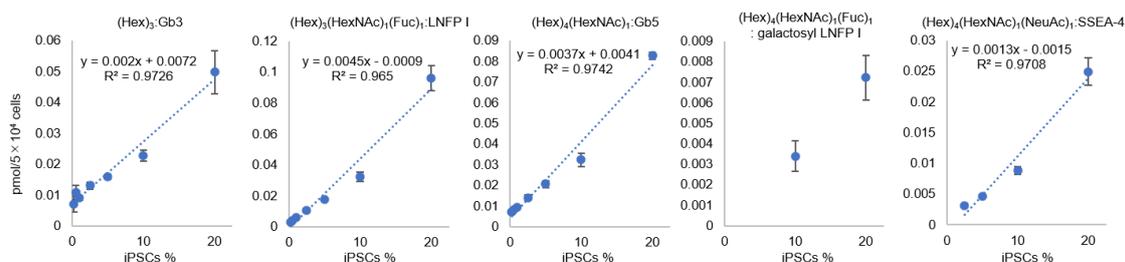


Figure 5. (Hex) 3:Gb3、(Hex) 3 (HexNAc) 1 (Fuc) 1:LNFP I、(Hex) 4 (HexNAc) 1:Gb5、(Hex) 4 (HexNAc) 1 (Fuc) 1: galactosyl LNFP I、および (Hex) 4 (HexNAc) 1 (NeuAc) 1:SSEA-4 を、様々な iPSC 比 (iPSC 含有率=20%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%、および 0.25%) で定量して得られた検量線。エラーバーは 3 回の測定の標準偏差 (SD) を示す。

フローサイトメトリーを用いた軟骨細胞に残存する iPS 細胞の検出

フローサイトメトリーによる検出では、蛍光プローブで標識した残存 iPS 細胞は 1×10^6 個の細胞を用いた場合 0.1% まで検出可能であった (Figure 6)。

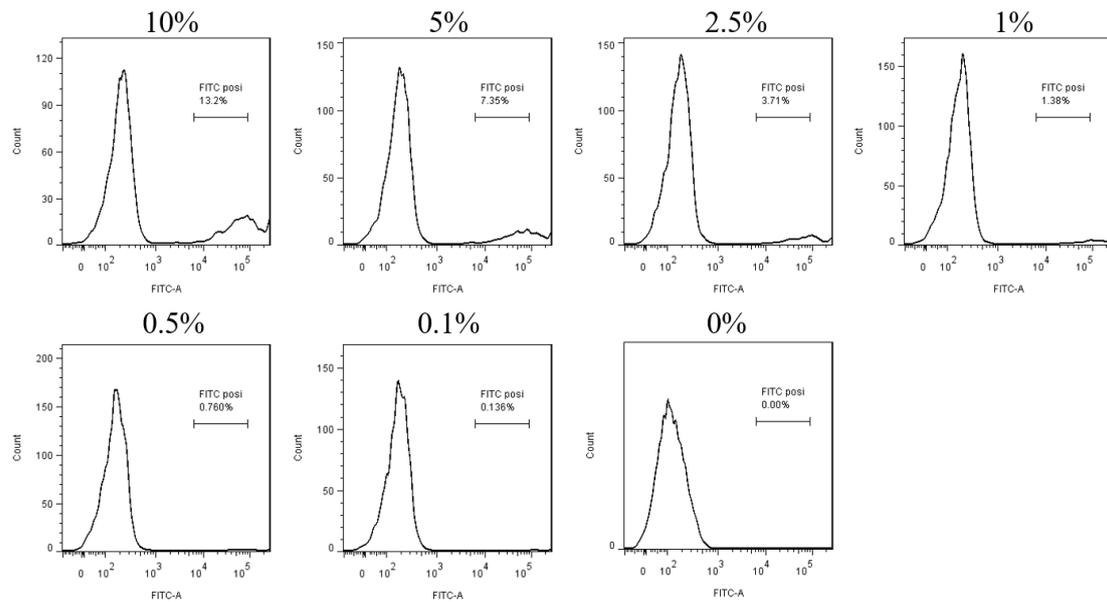


Figure 6. フローサイトメトリーによる軟骨細胞中の残存iPS細胞の検出。Cell Tracker Green CMFDAで標識したiPS細胞(606A1)を、0.1-10%の割合で軟骨細胞と混合し、 1×10^6 個の細胞を用いてフローサイトメトリーで解析した。

軟骨細胞との共培養条件下でのiPS細胞のGSL糖鎖解析

様々な比率での共培養細胞に由来するGSL糖鎖のMALDI-TOF MSスペクトルをFigure 8に示すが、混合した条件と同様に、iPS細胞特異的に発現しているGSL糖鎖のシグナルは、iPS細胞の比率に応じて徐々に減少した。 m/z 934のGb3、 m/z 1283のLNFP I、および m/z 1617のSSEA-4は、1%のiPS細胞を含む共培養細胞から検出可能であった。糖鎖解析では、 5×10^4 個の細胞から、十分なGSL糖鎖プロファイルが得られた(Figure 7A)。また 1×10^4 個以上の細胞があれば、iPS細胞特異的GSL糖鎖であるLNFP Iを検出することが可能であった。また、 5×10^4 個のiPS細胞由来のaoWR標識GSL糖鎖を用いて検出限界を調べたところ、100個の細胞に相当する糖鎖量まで検出することができた(Figure 7B)。

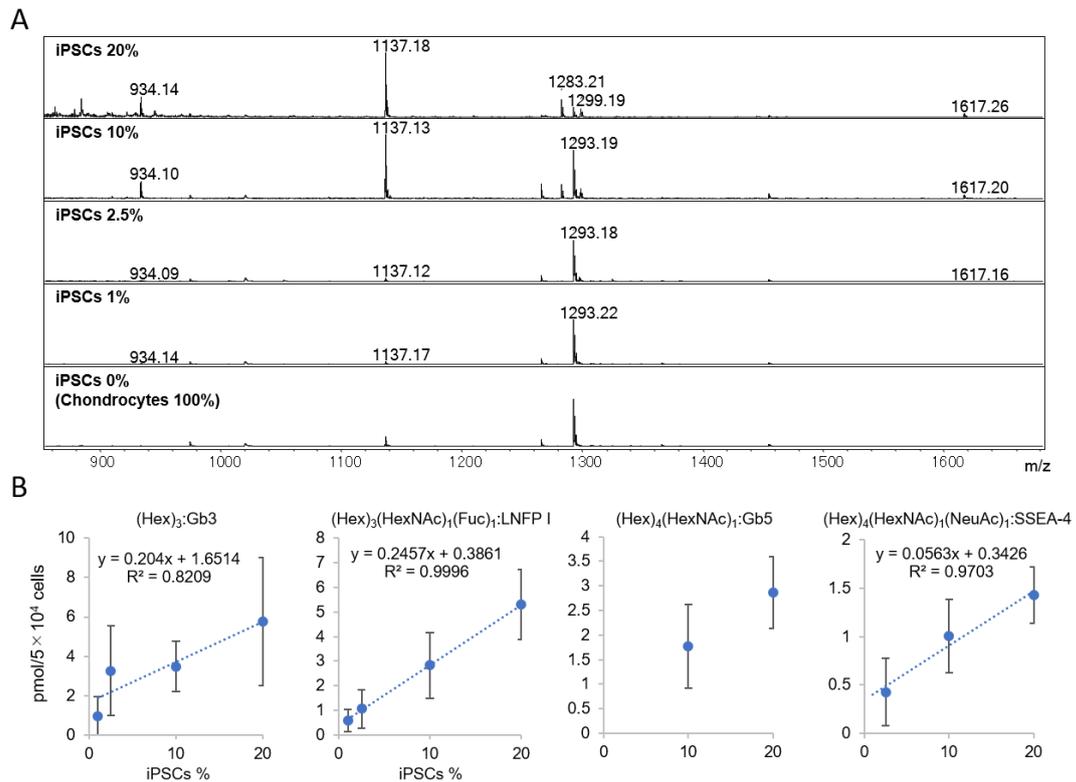


Figure 8. 様々な比率で iPS 細胞と軟骨細胞を共培養条件した際の GSL 糖鎖の MALDI-TOF MS スペクトル。(A) 共培養条件下での軟骨細胞と iPS 細胞由来の GSL 糖鎖の MALDI-TOF MS スペクトル。(B) 様々な比率 (iPSCs 20%、10%、2.5%、および 1%) で共培養した iPS 細胞における (Hex)₃、(Hex)₃(HexNAc)₁(Fuc)₁、(Hex)₄(HexNAc)₁、および (Hex)₄(HexNAc)₁(NeuAc)₁ の検量線。エラーバーは、3 回の測定の標準偏差 (SD) を示す。

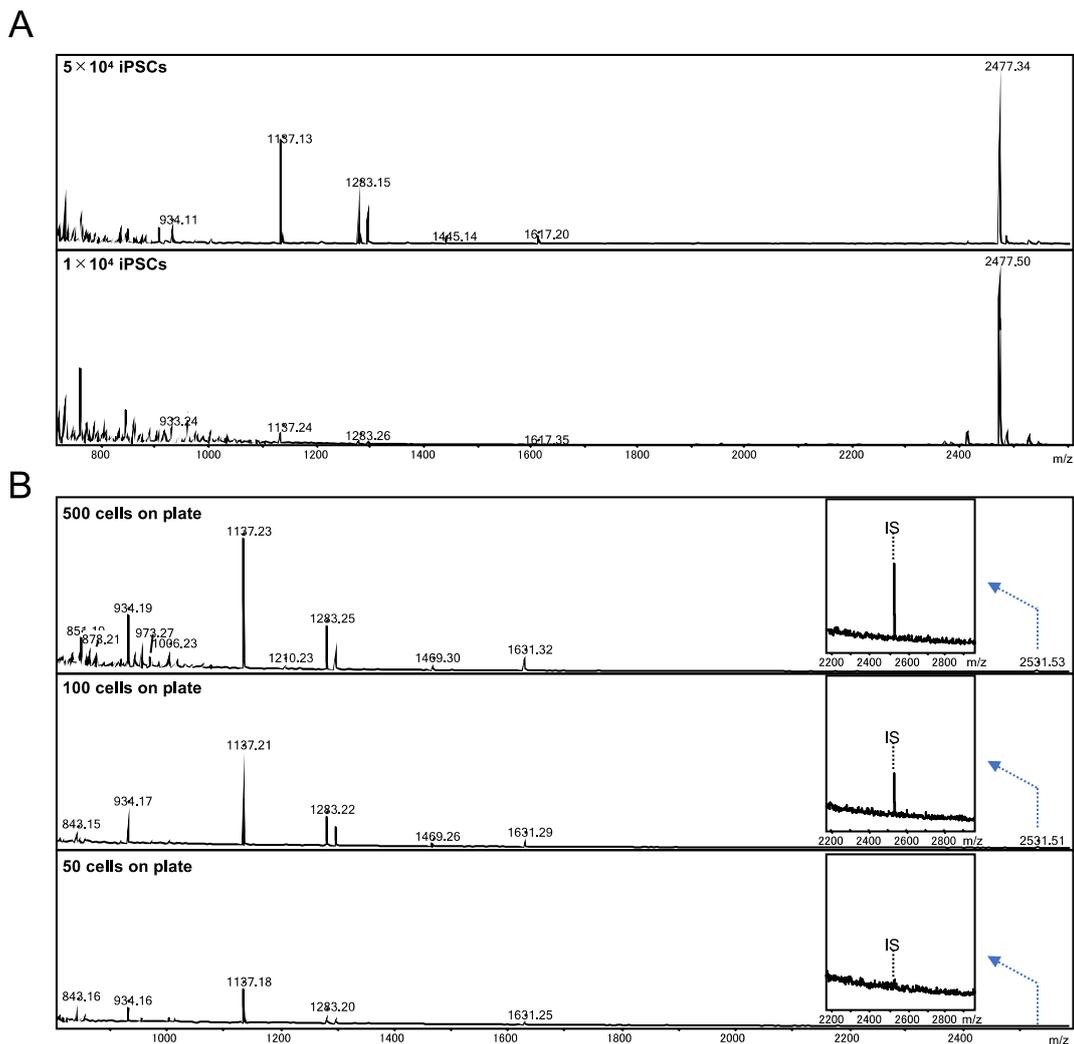


Figure 7. MALDI-TOF MS 解析の検出限界の検討 A) aminolysis-SALSA で調製した 5×10^4 または 1×10^4 個の iPS 細胞の GSL 糖鎖の MALDI-TOF MS スペクトル。外部標準としてのメチルエステル化 A2GN1 のシグナルは、 m/z 2477 で観察された。B) 500 個の iPS 細胞、および MALDI ターゲットプレート上の希釈サンプル (100 および 50 細胞) の MALDI-TOF MS スペクトル。

R-17F 抗体の iPS 細胞に対する結合能の評価

蛍光顕微鏡による観察では、R-17F がすべての iPS コロニーに結合していることを確認した。iPS 細胞株、201B7 では、分化した iPS 細胞が未分化 iPS コロニーを取り

囲むように存在していたが、未分化 iPS コロニーのみが R-17F 陽性であった (Figure 9)。

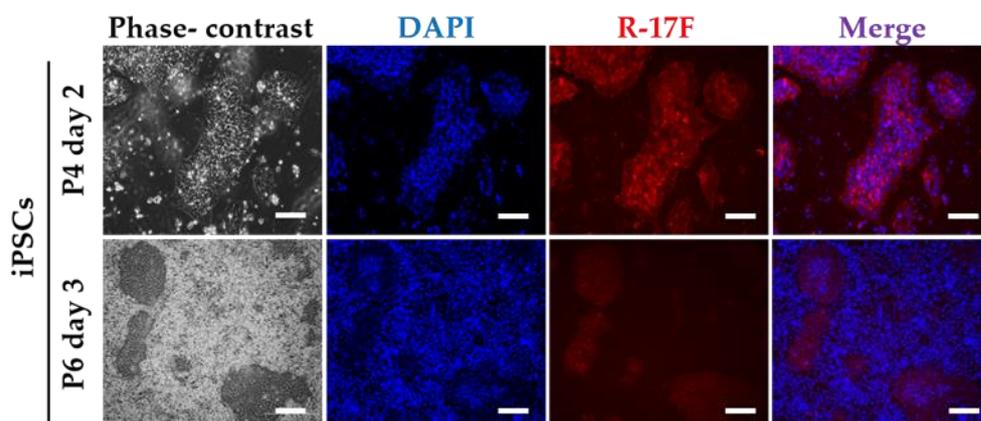


Figure 9. R-17F 抗体の未分化 iPS 細胞への結合能の評価。iPS 細胞株 606A1 (P4、day2) および 201B7 (P6、day3) に R-17F (10 μ g/mL) を添加してインキュベートし、次いで、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI、青) で染色し、二次抗体 (Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse IgG antibody、赤) を加えてインキュベートした。Scale bar=500 μ m。

R-17F 抗体の iPS 細胞、軟骨細胞に対する影響の評価

iPS 細胞に対する R-17F の細胞傷害性の評価では、control の iPS 細胞では PI 陽性の死細胞がわずか 38%であったのに対し、抗体処理により 70%以上の iPS 細胞の死滅を確認した (Figure 10)。一方、軟骨細胞に対する評価では、PI 陽性死細胞は、R-17F 処理群で 15%であり、未処理群 (13%) とほぼ差を認めなかった。本結果により、R-17F の持つ細胞傷害性は未分化 iPS 細胞に特異的であり、軟骨細胞に対しては影響を与えないことがわかった。

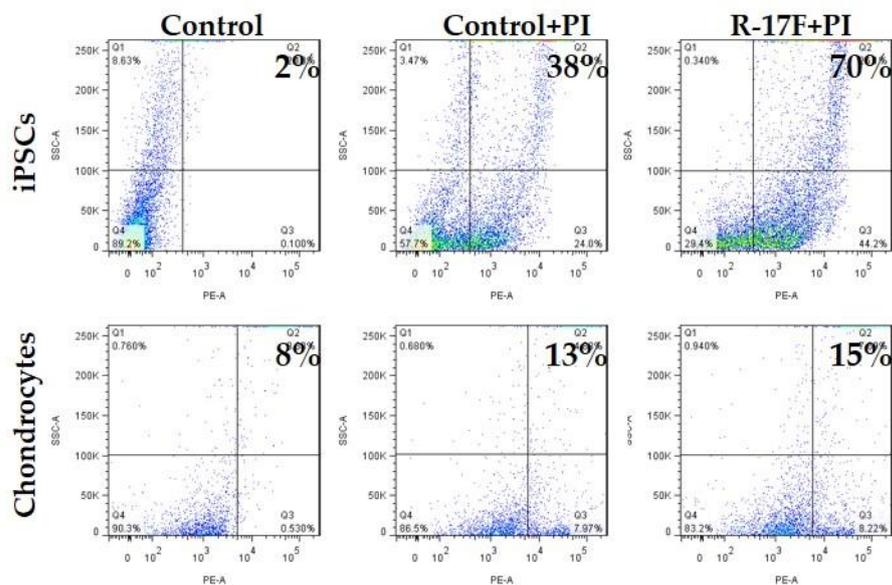


Figure 10. iPSC 細胞および軟骨細胞に対する R-17F の細胞傷害性の評価。iPSC 細胞 (606A1) および軟骨細胞 (C28I2) を R-17F 抗体で処理し、PI で死細胞を染色後、フローサイトメトリーで解析した。

iPSC colony に対する R-17F 抗体の細胞傷害性の確認

コロニー状態の iPSC 細胞に対する R-17F の細胞毒性の評価では、単一状態の iPSC 細胞に比して、抗体が細胞傷害性を発揮するのに時間を要したが、抗体を加えて 24 時間後にコロニーの壊死を顕微鏡で確認した (Figure 11)。

GSL 糖鎖解析による、共培養条件下での R-17F 抗体の細胞傷害性の評価

経時的顕微鏡観察では、R-17F 抗体を添加後 36 時間でほぼすべての iPSC コロニーの壊死を確認した (Figure 12)。

一方、GSL 糖鎖解析による、R-17F 抗体処理後の残存未分化 iPSC 細胞の評価では、残存 iPSC 細胞特異的糖鎖の相対量は 10% から約 4% まで減少した (Figure 13 C)。

検量線は、iPSC 特異的 GSL 糖鎖である LNFP I または (Hex) 3 (HexNAc) 1 に対するシグナルと、軟骨細胞由来のエチルアミド化 GSL 糖鎖 GM2 の比率を用いて作成した (Figure 13 B)。

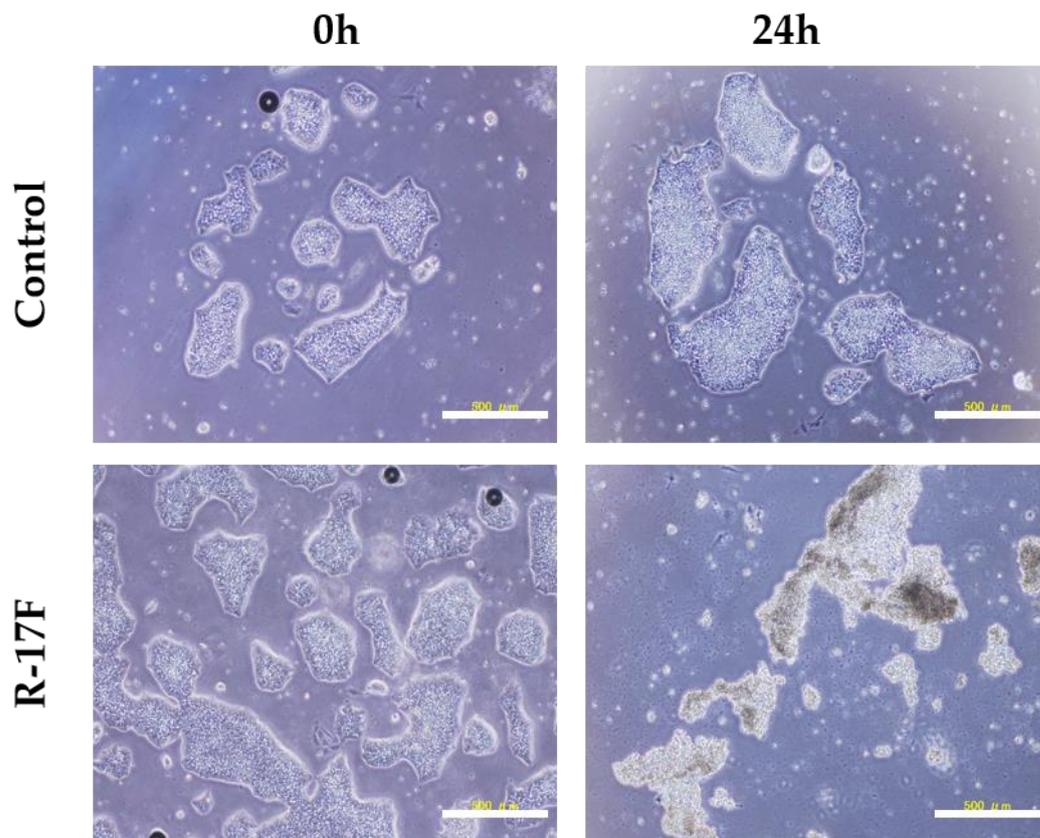


Figure 11. iPS コロニーに対する R-17F の細胞傷害性の評価。R-17F の存在下での iPS コロニーを顕微鏡下に観察した。

Scale bar = 500 μ m

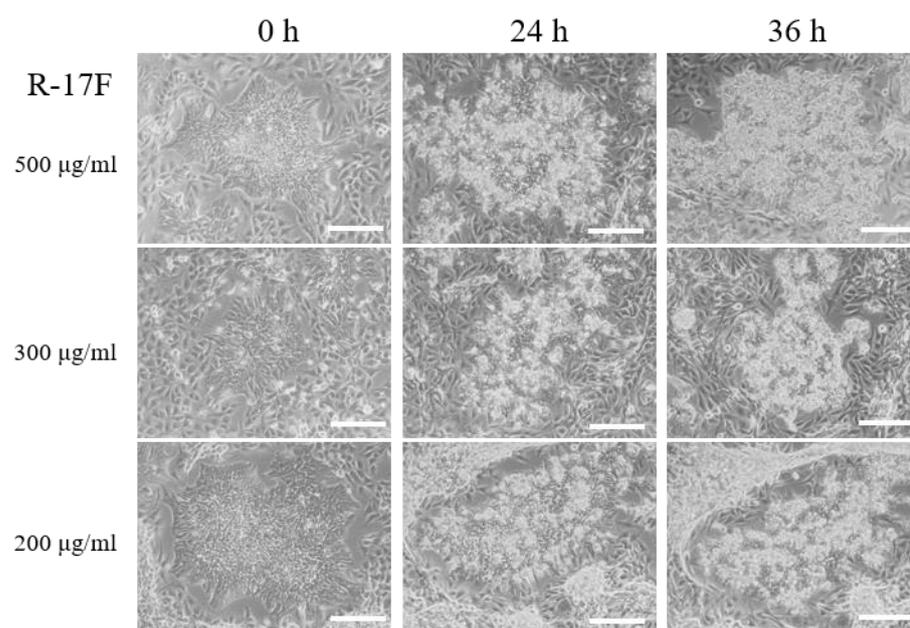


Figure 12. iPS、軟骨細胞共培養条件下に R17-F 抗体添加後、顕微鏡で経時的に観察
Scale bar = 500 μ m

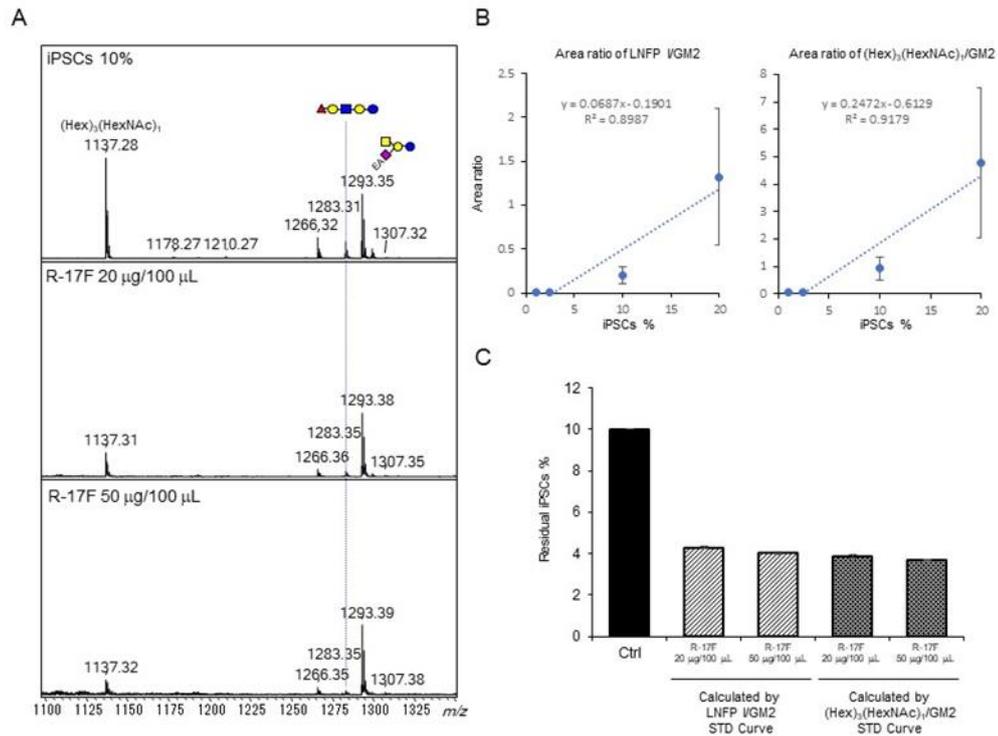


Figure 13. R17-F 抗体で処理した共培養細胞（軟骨細胞、iPS 細胞）由来の GSL 糖鎖の MALDI-TOF MS 分析。A) 共培養細胞 (control) と抗体で処理後の細胞の MALDI-TOF MS スペクトル。B) 異なる iPS 細胞共培養条件 (iPS 含有量=20%、10%、2.5%、および 1%) における LNFP I/GM2 および $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_1/\text{GM2}$ 面積比の検量線。C) 残存する iPS 細胞の評価。残存 iPS 細胞の割合は検量線を用いて算出した。エラーバーは、3 回の測定の標準偏差 (SD) を示す。

Flow cytometry を用いた、iPS-MSC における MCS マーカーの定量

iPS-MSCs (P6) のフローサイトメトリーで解析結果、MSC 陽性マーカーである CD 44, CD 73, CD 105 は 98%以上の割合で陽性となり、また陰性マーカーである CD 34, CD 11b, CD 19, CD 45, HLA-DR はすべて陰性を示した。以上の結果より、iPS-MSC (P6) が MSC 様の性質を有することが確認された (Figure 14)。

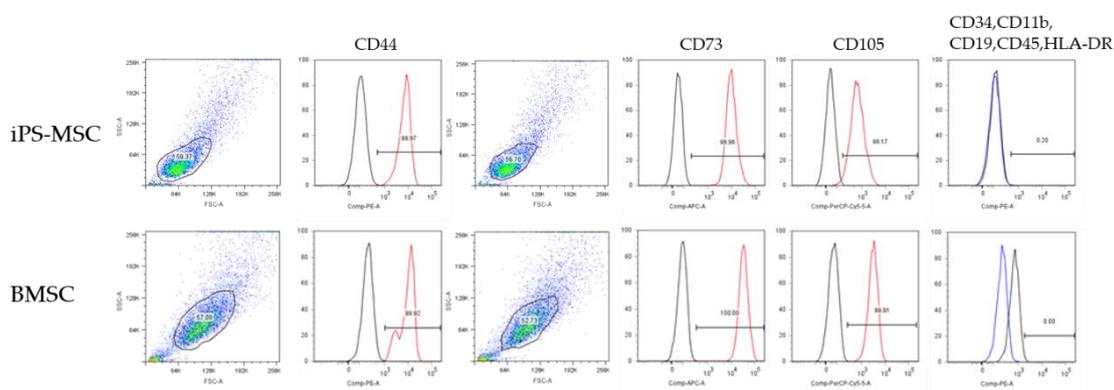


Figure 14. iPS-MSC と BMSC の MSC 陽性マーカーと陰性マーカーのフローサイトメトリー解析。フローサイトメトリーの結果、iPS-MSC P6 では、ほぼ全ての細胞が MSC 陽性マーカー (CD44、73、105) に陽性、MCS 陰性マーカー (CD34、11b、19、45、HLA-DR) に陰性であった。

qRT-PCR を用いた iPS-MSC の未分化マーカーの検出

分化過程での PCR を用いた未分化マーカーの検出では、未分化マーカーである *NANOG*、*OCT3/4*、*SOX2* の P2、P3、P6 での発現している発現量は非常に少なく、P2、P3、P6 間で遺伝子発現に有意な差は認められなかった (Figure 15)。

GSL 糖鎖解析を用いた、iPS-MSC における幹細胞特異的糖鎖の検出

iPS-MSC (P2、P4) の GSL-糖鎖解析では、iPSC-MSC の継代を繰り返すと、未分化 iPS 細胞特異的 GSL 糖鎖である LNFP I の発現が徐々に低下していることが明らかになった (Figure 16)。

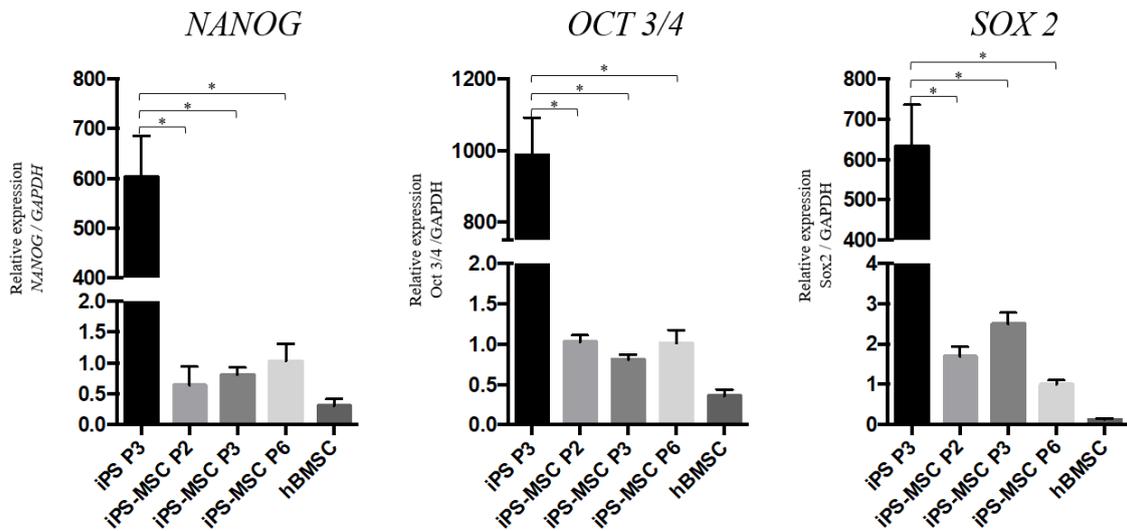


Figure 15. q-PCR による遺伝子発現解析では、iPS-MSC P2、P3、P6 のいずれにおいても、未分化マーカー (*NANOG*、*OCT 3/4*、*SOX 2*) が有意に抑制されていることが示された。ヒト間葉系幹細胞 (hBMCs、Lonza, Basel, Switzerland) を対照として用いた。データは、平均値±SD として示されている。Asterisk は、 $*P < 0.001$ での統計的有意性を示す。

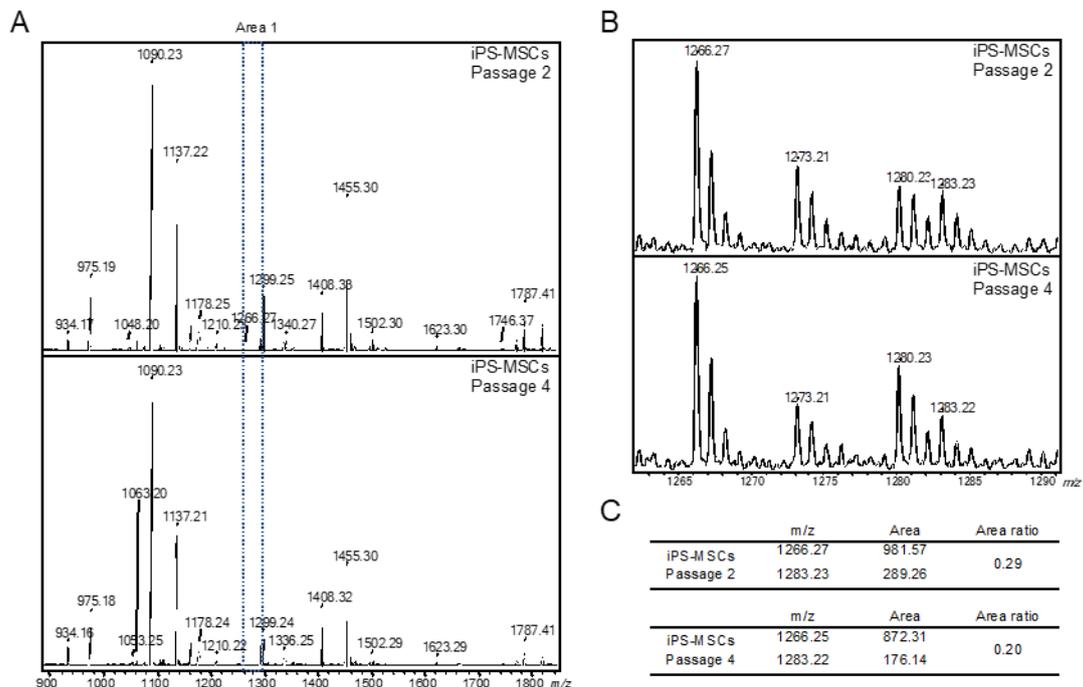


Figure 16. A) passage 2、4 の iPS-MSC における GSL 糖鎖の MALDI-TOF MS スペクトル。B) Area 1 のクローズアップビュー。C) passage 2、4 の iPS-MSC における m/z 1283 および m/z 1266 の面積比。

共培養条件下での 2 次抗体を添加するタイミングの検討

GSL 糖鎖解析の結果、R-17F 抗体単独の場合、iPS 細胞除去効果は約 10%であった (Figure 17)。一方、R-17F と同時に二次抗体を加えた場合、iPS 細胞は約 30%減少し、R-17F 添加後 24 時間後に二次抗体を添加すると約 50%の減少がみられた。以上の結果から、iPS コロニーに対しても、2 次抗体の併用は R-17F の細胞毒性を増強することが明らかとなり、最適な 2 次抗体添加タイミングは、R-17F 添加後 24 時間に決定した。

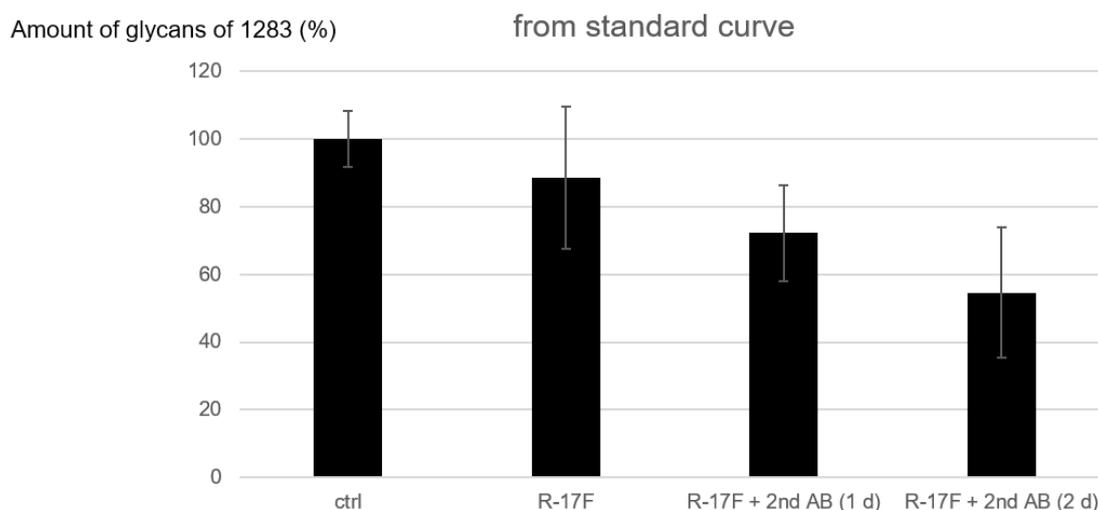


Figure 17. 2 次抗体を併用時の R-17F 処理後の共培養細胞の GSL 糖鎖解析

共培養細胞に対し、2 次抗体を添加する至適濃度の検討

経時的顕微鏡観察では、2 次抗体を 80 μ g/mL 以上で加えた群で iPS コロニーの完全な消失を認めた (Figure 18)。GSL 糖鎖解析による定量評価では、5%濃度で播種した iPS 細胞は回収時には約 23%まで増殖していることが明らかとなり、また 2 次抗体濃度依存性に残存する iPS 細胞の減少を認めた (Figure 19)。抗体未処理群と比較し、残存す

る iPS 細胞は R-17F 抗体単独では 75%、2 次抗体併用 10 μ g/mL では 50%、40 μ g/mL では 17%、80 μ g/mL では 9%まで減少した。2 次抗体 100 μ g/mL との併用で iPS 細胞の完全消失が観察された。

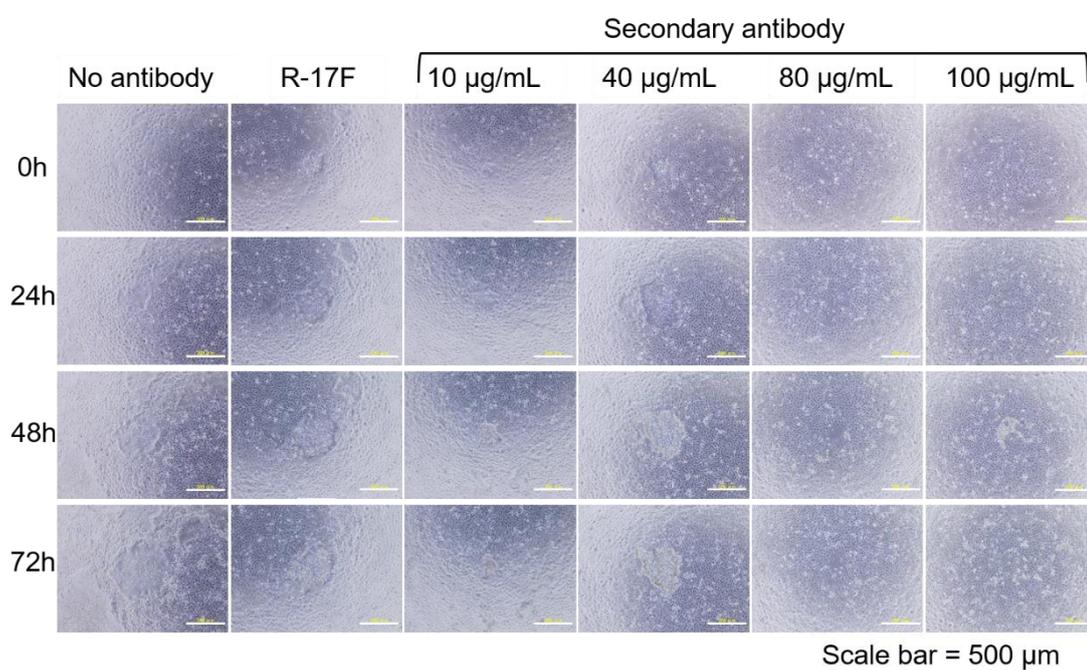


Figure 18. 2 次抗体を 0-100 μ g/mL の濃度で併用した、R-17F 添加後の共培養細胞の経時的顕微鏡観察

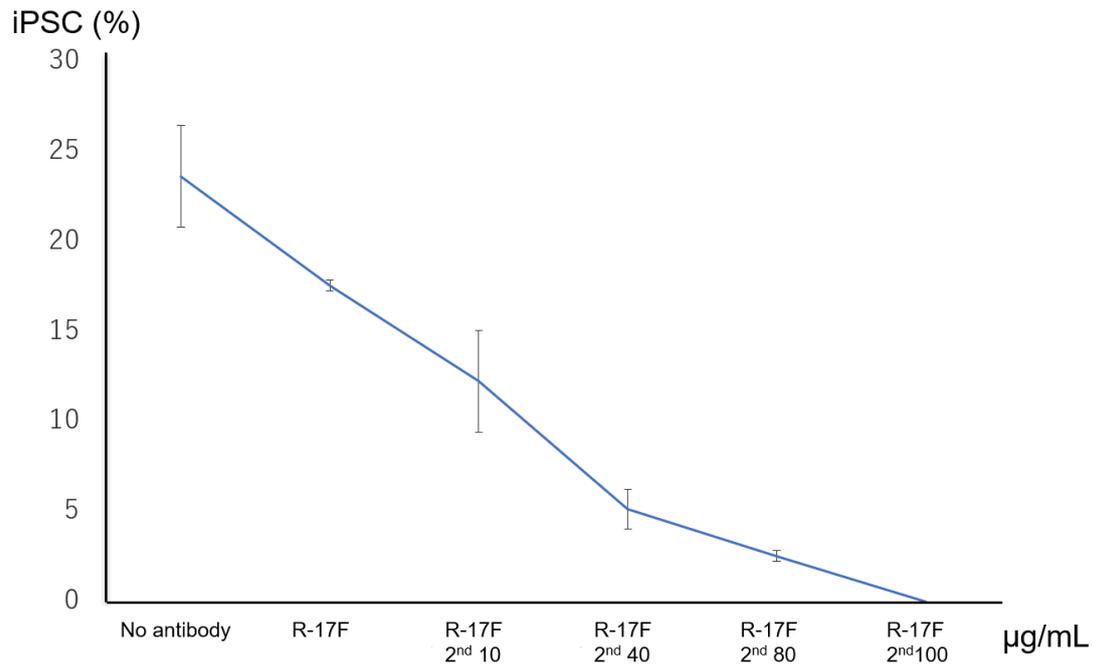


Figure 19 2次抗体を 0-100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で併用した場合の、R-17F 添加後の共培養細胞の GSL 糖鎖解析による定量評価。播種時の iPS、軟骨細胞を様々な比率で混入させ糖鎖解析を行い、作成した検量線をもとに iPSC%を算出した。

2次抗体を添加後の共培養細胞の経時的顕微鏡観察では、control と比較して iPS コロニーに対し、明らかな細胞傷害性は認められなかった (Figure 20A)。GSL-糖鎖解析による定量的評価においては、2次抗体を 100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で添加した群では、iPS 細胞は control と比較し、若干の活性の低下を認めたが、明らかな細胞傷害性は認めなかった (Figure 20B)。

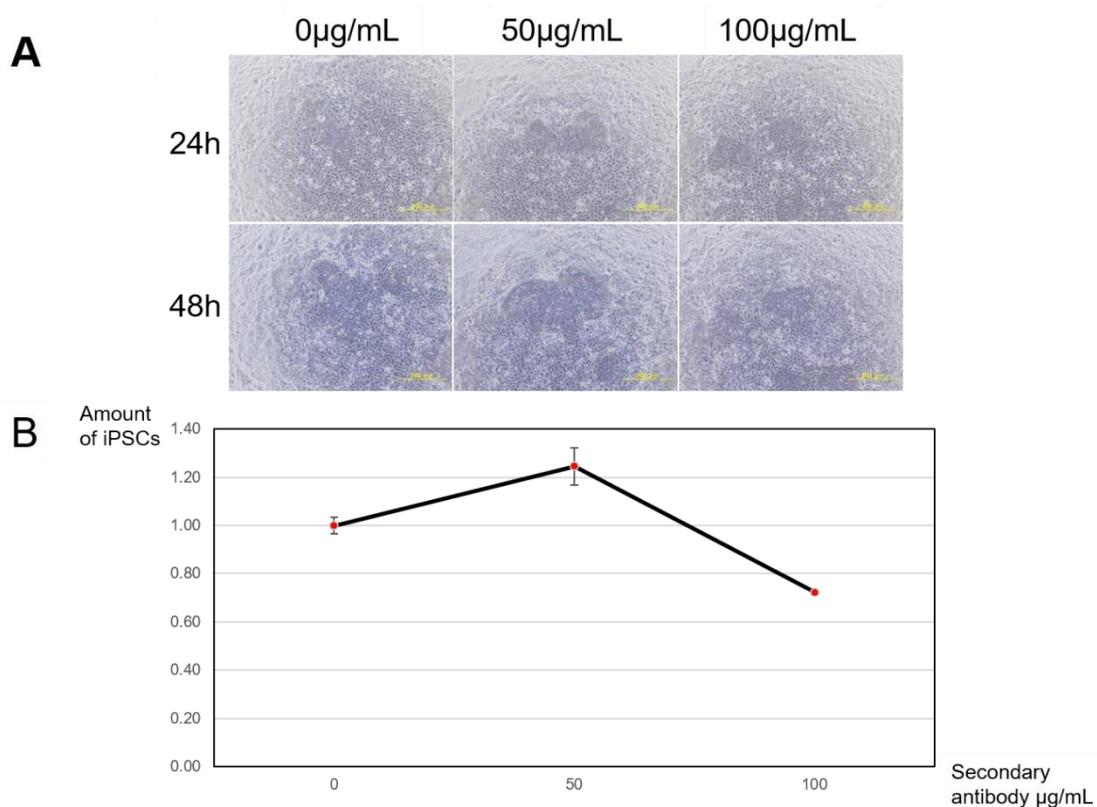


Figure 20. 2次抗体単独でのiPSコロニーに与える影響

A, 2次抗体添加後の経時的顕微鏡観察 Scale bar = 500 μ m **B**, GSL糖鎖解析による定量評価

2次抗体併用した場合のR-17F抗体処理によるteratomaの発生抑制効果の検討

抗体処理後にマウスに移植した共培養細胞と同一サンプルの糖鎖解析を行ったところ、iPS特異的な糖鎖は完全に認められなかった (Figure 21)。マウスに移植した共培養細胞の数は、マウス1匹あたり 8×10^5 個であった。抗体未処理の共培養細胞を移植した群では、5/6 (83%) で腫瘍の発生を認めた (Figure 22B)。一方、R-17F、2次抗体で処理した共培養細胞を移植した群では、腫瘍の発生は認められなかった (0/6)。組織学的評価では、抗体未処理群に発生した腫瘍は、外胚葉、中胚葉、内胚葉由来組織を認め、腫瘍がteratomaであることを確認した (Figure 22A)。

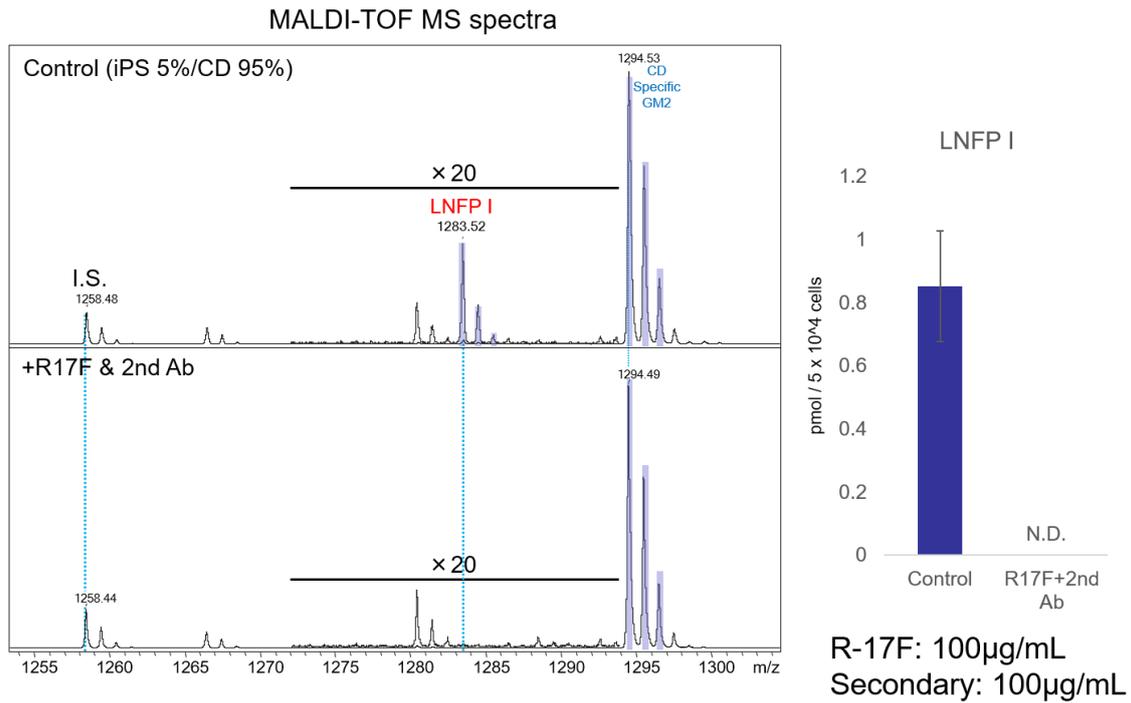
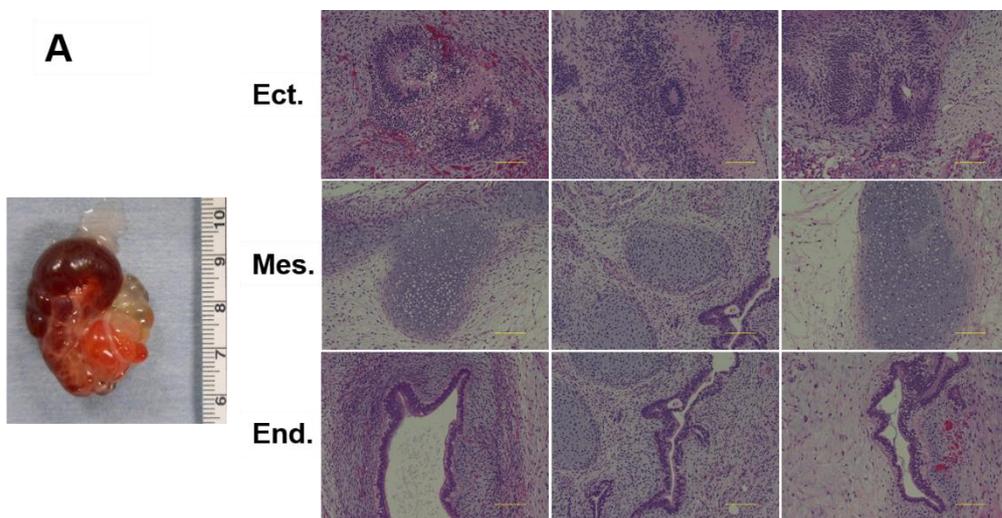


Figure 21. マウスに移植した、抗体処理後の共培養細胞と同一検体における GSL-糖鎖解析



B

Transplanted cells	Number of cells	teratoma
iPS + chondrocytes	8×10^5	5/6
iPS + chondrocytes+R-17F treatment	8×10^5	0/6

Figure 22.A, マウスに移植後に形成された腫瘍の外観、組織像 (Hematoxylin-Eosin 染色) Scale bar = 100 μ m **B,** control では 5/6 で腫瘍形成を認めたのに対し、抗体処理群では腫瘍の発生は認めなかった (0/6)。

考察

Gropp らは、わずか数百個の未分化 iPS 細胞から奇形腫が形成されることを報告しており、iPS 由来の生成物を再生医療で使用する場合、最終生成物には未分化 iPS 細胞が含まれていないことが前提条件である (Gropp et al., 2012)。この問題を克服するために、iPS 細胞への自殺遺伝子の導入 (Cho et al., 2015)、細胞培養条件の変更 (Nagashima et al., 2018)、細胞表面抗原に対する抗体を用いた cell sorting (Tang et al., 2011) など、分化した細胞集団から残存する iPS 細胞を選択的に除去するいくつかの戦略が報告されている。これらの報告の中で、未分化細胞を検出する方法として、蛍光標識法、フローサイトメトリー法、生体内での奇形腫形成を確認する方法などが挙げられている。過去の報告では、抗 TRA-1-60 抗体を用いてフローサイトメトリーにより網膜色素上皮細胞から未分化細胞を検出した (Kuroda et al., 2012) が、検出感度は 0.1%であった。フローサイトメトリーは高感度で有用な方法であるが、細胞表面マーカーに対する抗体で標識された細胞を評価する間接的な方法であるため、偽陰性の可能性がある。また、結果の解析はゲーティングの影響を大きく受ける可能性がある。また、動物実験によるテラトーマ形成の確認は、信頼性が高い検査法ではあるが、費用と時間がかかるという問題がある。

上述したフローサイトメトリーでは、約 5×10^5 個以上の細胞数が計測に必要となるが、細胞表面の GSL 糖鎖に直接着目する我々の方法では、わずか 5×10^4 個の細胞から未分化 iPS 細胞特異的糖鎖を検出することができた。以前の報告によると、奇形腫は 100 個の iPS 細胞から形成されることがある (Gropp et al., 2012)。本研究では、100 個の iPS 細胞から得られた GSL 糖鎖を MALDI-TOF MS によって検出することが可能であった。さらに、iPS 細胞と軟骨細胞を共培養した系からも iPS 細胞特異的な糖鎖の検出が可能であった。感度については、フローサイトメトリーでは 0.1%まで検出可能なのに対し、糖鎖解析では 0.25%が検出限界であり、フローサイトメトリーの方が感度の点で優れていると言えるが、フローサイトメトリーで未分化 iPS 細胞を検出するには、複雑な前処理工程が必要である。1) 酵素消化による細胞の解離、2) 単細胞の固定、3) TRA-1-60、SSEA-5 などの一次抗体による iPS 細胞特異的標識、4) 二次抗体による免疫蛍光標識、という複雑な前処理が必要である。さらに、iPS 細胞から生成した軟骨片が単細胞に解離してしまうという問題がある。一方で GSL 糖鎖解析は、細胞を回収し EGCase で糖鎖を切断した後、その糖鎖を定量解析するという単純な操作でかつ直接的な解析により共培養細胞や軟骨片から未分化な iPSC 特異的 GSL 糖鎖を検出することが可能である。

糖鎖解析のもう一つの利点として、非常に少ない細胞でも解析可能であることだけ

でなく、複数の iPS 特異的 GSL 糖鎖を同時に検出できる点が挙げられる。また、iPS 細胞と軟骨細胞の共培養した系での解析では、aminolysis-SALSA 法を用いて細胞型特異的な糖鎖を識別することが非常に重要である。MA, EA, PA などの様々なアミン類縁体を使用することで、検出したい GSL 糖鎖のピークの重複を回避することも可能である。さらに、glycoblotting-SALSA 法は、一度に多くのサンプルに対し、未分化 iPS 細胞の残存率を測定することができる。

また、本研究では糖鎖解析の手法を用いて、R-17F 抗体の細胞傷害性による未分化 iPS 細胞の除去効果についても評価することができた。その結果、R-17F 抗体により、LNFPI 糖鎖のレベルが 10%から 4%に低下することが確認された。さらに、*NANOG*、*OCT3/4*、*SOX2* などの未分化マーカーの発現が非常に低い iPS-MSC 様細胞 からも、LNFPI 糖鎖が検出されることを確認できた。一般的な未分化マーカー遺伝子と GSL 糖鎖解析を組み合わせることは、残存する未分化 iPS 細胞の評価に有用であると考えられる。

R-17F は iPS 特異的な LNFPI 糖鎖を認識する細胞傷害性抗体であるため、GSL 糖鎖解析により未分化 iPS 細胞の壊死を評価することは理にかなっている。顕微鏡観察ではほとんどすべての iPS 細胞が壊死しているように見えたが、我々の GSL 糖鎖解析では、少数の iPS 細胞が残存していることが示された。以前の研究では、R-17F 抗体を 500 μ g/mL の濃度で使用し、iPS コロニーを部分的に壊死させるのに 3 日を要している (Matsumoto et al., 2015)。我々は単一細胞状態の iPS に対する R-17F の細胞傷害性が 2 次抗体を併用することで増強されるという報告をもとに、GSL 糖鎖解析を用いてコロニー状態の iPS 細胞に対する 2 次抗体の効果を明らかにし、100 μ g/mL の濃度の R-17F 抗体に 2 次抗体を併用することで完全に iPS コロニーの除去することに成功し、*teratoma* の発生を防ぐことができた。*SSEA-5* や *TRA-1-60* など広く使用されている iPS 特異的マーカーを用いた除去方法は、セルソーティングが必要である (Chad et al., 2013)。セルソーティングでは、生成物の活性が低下する可能性があることに加えて、iPS 由来生成物を単細胞に分離する必要があり、軟骨や心筋細胞の細胞シートなどの組織には適用できない。化学阻害剤による除去法は、大量に安定的に供給され、抗原性が少ないため、未分化 iPS 細胞を除去するための有力な候補となる可能性がある。しかし、化学阻害剤による除去法の懸念点の一つとして、分化細胞は基本的に iPS 細胞と同じ代謝系を有しているため、分化細胞に影響を与える可能性が考えられる (Tateno et al., 2015)。R-17F 抗体は iPS 細胞膜表面の糖脂質に結合し、細胞傷害性を発揮することが分かっており、また認識する iPS 特異的糖鎖は分化に伴い速やかに消失することも報告されている (Matsumoto et al., 2015)。本研究では R-17F を添加するだけで未分化 iPS 細胞を除去可能であり、セルソーティングによって起こりうる活性の低下を避けることができた。2 次抗体の細胞傷害性増強効果については、過去の報告に

において R-17F と糖脂質が結合した免疫複合体に 2 次抗体を加えることで、クラスター化が起こり下流の反応が促進されるのではないかと推察しているが (Matsumoto et al., 2015)、その詳細は未だわかっておらず、解明が待たれるところである。近年、Ben-David らは、分化した iPS 細胞には影響を与えない未分化 iPS 細胞特異的阻害剤 "PluriSIns" を用いた除去法を報告している (Ben-David et al., 2013)。本研究で行った R-17F に限らず PluriSIns や除去効果を持つ抗体そして酵素等においても、GSL 糖鎖を直接解析することで未分化 iPS 細胞の残存率を算出でき、細胞傷害性の最適化に用いることができるであろう。

本研究で行った aminolysis-SALSA 法を併用した細胞特異的な GSL 糖鎖解析法の確立は、分化誘導中に残存する未分化 iPS 細胞が除去されているかを評価することができる新規の検出法であり、安全な iPS 細胞を用いた再生医療の実現に貢献できる可能性がある。

総括および結論

- 細胞特異的 GSL 糖鎖解析の手法を用いて、軟骨細胞中に残存する未分化 iPS 細胞の検出、定量化が可能であることを示した。
- GSL 糖鎖の定量解析の手法を用いて、iPS 細胞特異的に細胞傷害性を持つ R-17F 抗体の細胞除去効果を評価可能であることを示した。
- iPS 細胞から MSC へ分化する過程において、漸減していく未分化 iPS 細胞特異的糖鎖をモニタリング可能であることを示した。
- GSL 糖鎖の定量解析の手法を用いて、R-17F に 2 次抗体を併用し、完全に未分化 iPS 細胞を除去可能であることを示した。

本実験によって示した、新規の糖鎖解析の手法を用いた未分化 iPS 細胞の検出、定量化法は、事前の標識や複雑な前処理を必要とせず、細胞を被覆している糖鎖を直接検出することが可能である。さらに、一度に大量のサンプルを検査可能であるため、多くの軟骨片を必要とする軟骨欠損に対する移植前検査にも有用である。未分化 iPS 細胞を除去する方法と、細胞特異的糖鎖解析による検出法の併用により、より安全な iPS 細胞を基盤とする再生医療の発展に寄与することができる可能性がある。

謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究院 専門医学系部門 機能再生医学分野 整形外科学分野博士課程在学中に行った研究をまとめたものです。本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました整形外科学分野教授 岩崎倫政先生に心より感謝いたします。

これまでの研究課程において数々のご指導を賜りました北海道大学医学部機能再生医学講座整形外科学分野講師の小野寺智洋先生、先端的糖鎖臨床生物学分野准教授の古川潤一先生をはじめ、整形外科学分野の諸先生方、研究にご助力頂きました皆様に心よりの感謝を申し上げます。

引用文献

Ben-David, U., Gan, Q.F., Golan-Lev, T., Arora, P., Yanuka, O., Oren, Y.S., Leikin-Frenkel, A., Graf, M., Garippa, R., Boehringer, M., *et al.* (2013). Selective elimination of human pluripotent stem cells by an oleate synthesis inhibitor discovered in a high-throughput screen. *Cell Stem Cell* 12, 167-179.

Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331, 889-895.

Cho, S.J., Kim, S.Y., Jeong, H.C., Cheong, H., Kim, D., Park, S.J., Choi, J.J., Kim, H., Chung, H.M., Moon, S.H., *et al.* (2015). Repair of Ischemic Injury by Pluripotent Stem Cell Based Cell Therapy without Teratoma through Selective Photosensitivity. *Stem Cell Reports* 5, 1067-1080.

Fujitani, N., Takegawa, Y., Ishibashi, Y., Araki, K., Furukawa, J., Mitsutake, S., Igarashi, Y., Ito, M., and Shinohara, Y. (2011). Qualitative and quantitative cellular glycomics of glycosphingolipids based on rhodococcal endoglycosylceramidase-assisted glycan cleavage, glycoblotting-assisted sample preparation, and matrix-assisted laser desorption ionization tandem time-of-flight mass spectrometry analysis. *J Biol Chem* 286, 41669-41679.

Furukawa, J., Sakai, S., Yokota, I., Okada, K., Hanamatsu, H., Kobayashi, T., Yoshida, Y., Higashino, K., Tamura, T., Igarashi, Y., *et al.* (2015). Quantitative GSL-glycome analysis of human whole serum based on an EGCase digestion and glycoblotting method. *J Lipid Res* 56, 2399-2407.

Furukawa, J.I.; Okada, K.; Shinohara, Y., *et al.* (2017) Glycomics of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Glycoconj. J.*, 34, 807–815

Gropp, M., Shilo, V., Vainer, G., Gov, M., Gil, Y., Khaner, H., Matzrafi, L., Idelson, M., Kopolovic, J., Zak, N.B., *et al.* (2012). Standardization of the teratoma assay for analysis of pluripotency of human ES cells and biosafety of their differentiated progeny. *PLoS One* 7, e45532.

Guzzo, R.M., Gibson, J., Xu, R.H., Lee, F.Y., and Drissi, H. (2013). Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondroprogenitor cells. *J Cell Biochem* 114, 480-490.

Hanamatsu, H., Nishikaze, T., Miura, N., Piao, J., Okada, K., Sekiya, S., Iwamoto, S., Sakamoto, N., Tanaka, K., and Furukawa, J.I. (2018). Sialic Acid Linkage Specific Derivatization of Glycosphingolipid Glycans by Ring-Opening Aminolysis of Lactones. *Anal Chem* 90, 13193-13199.

Homan, K., Hanamatsu, H., Furukawa, J.I., Okada, K., Yokota, I., Onodera, T., and Iwasaki, N. (2019). Alteration of the Total Cellular Glycome during Late Differentiation of Chondrocytes. *Int J Mol Sci* 20.

Kawamata, S., Kanemura, H., Sakai, N., Takahashi, M., and Go, M.J. (2015). Design of a Tumorigenicity Test for Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Cell Products. *J Clin Med* 4, 159-171.

Kuroda, T., Yasuda, S., Kusakawa, S., Hirata, N., Kanda, Y., Suzuki, K., Takahashi, M., Nishikawa, S., Kawamata, S., and Sato, Y. (2012). Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One* 7, e37342.

Liang, Y.J., Kuo, H.H., Lin, C.H., Chen, Y.Y., Yang, B.C., Cheng, Y.Y., Yu, A.L., Khoo, K.H., and Yu, J. (2010). Switching of the core structures of glycosphingolipids from globo- and lacto- to ganglio-series upon human embryonic stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 22564-22569.

Matsumoto, S., Nakao, H., Kawabe, K., Nonaka, M., Toyoda, H., Takishima, Y., Kawabata, K., Yamaguchi, T., Furue, M.K., Taki, T., *et al.* (2015). A Cytotoxic Antibody Recognizing Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) on Human Induced Pluripotent Stem (hiPS) Cells. *J Biol Chem* 290, 20071-20085.

Nagashima, T., Shimizu, K., Matsumoto, R., and Honda, H. (2018). Selective Elimination of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Medium with High Concentration of L-Alanine. *Sci Rep* 8, 12427.

- Roberts, S., Menage, J., Sandell, L.J., Evans, E.H., and Richardson, J.B. (2009). Immunohistochemical study of collagen types I and II and procollagen IIA in human cartilage repair tissue following autologous chondrocyte implantation. *Knee* 16, 398-404.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Tang, C., Lee, A.S., Volkmer, J.P., Sahoo, D., Nag, D., Mosley, A.R., Inlay, M.A., Ardehali, R., Chavez, S.L., Pera, R.R., *et al.* (2011). An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells. *Nat Biotechnol* 29, 829-834.
- Tateno, H., Onuma, Y., Ito, Y., Minoshima, F., Saito, S., Shimizu, M., Aiki, Y., Asashima, M., and Hirabayashi, J. (2015). Elimination of tumorigenic human pluripotent stem cells by a recombinant lectin-toxin fusion protein. *Stem Cell Reports* 4, 811-820.
- Yamashita, A., Morioka, M., Yahara, Y., Okada, M., Kobayashi, T., Kuriyama, S., Matsuda, S., and Tsumaki, N. (2015). Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports* 4, 404-418.