

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791210

研究課題名(和文)糖鎖プロファイリングによる再生医療に対する新規バリデーション・システムの創成

研究課題名(英文) Construction of validation system for regenerative therapy by glycan profiling technology

研究代表者

井上 麻由 (Inoue, Mayu)

独立行政法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：40596920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞による再生医療を安心して行っていくためには、移植する細胞の品質を評価することが必要である。様々な細胞評価法が提示されている中、本研究では細胞表層糖鎖の発現解析プロファイリングによる品質評価を試みた。移植用ソースとして利用される種々のヒト間葉系幹細胞、多能性幹細胞について糖鎖プロファイルの取得を行った結果、幹細胞が有する分科ポテンシャルを反映した特徴的な糖鎖プロファイルがあることがわかった。治療目的に適した細胞の選択をより早く行うことが可能となり今後の臨床での応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The cell surface is covered with various glycoproteins, which play a crucial role in biological function. In this study, I aimed to define the status of somatic stem cells and pluripotent stem cells using glycan profiles. The glycan profiles promises to be of great value of stem cell validation for regenerative therapy, complementing more established methods such as gene expression analysis and epigenetic analysis.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：再生医療 幹細胞 レクチン 糖鎖プロファイリング

1. 研究開始当初の背景

我々の体を構築する個々の細胞が異なる糖鎖生合成のマシナリーを有していることは糖鎖生物学では広く知られている。また各細胞が発生・分化、さらには癌化に伴い顕著に変動することが「グライコーム(糖鎖の総体の意)」の概念で理解されつつある。一方幹細胞移植が具体的な治療法として確立されつつあるが、実験的な治療が日常的な治療法の選択肢となるためには、治療に用いる細胞群について再現性を保証するための「基準」が必要である。再生医療分野において重大な問題となっている ES 細胞を含む各種幹細胞、ならびに分化誘導細胞の治療前における品質評価において、従来の手法に加え「糖鎖プロファイリング」という新しい切り口を導入することで、系統的な有効性評価、安全性確認の迅速、簡便、高信頼性のシステム開発が可能となる。ヒト幹細胞の細胞種・分化度による分別は再生医療における細胞選別に直接応用可能な技術となる。

2. 研究の目的

糖鎖は細胞の種類、分化度、癌化により大きく変化することが知られていることから「細胞の顔」とも称される。幹細胞から目的分化細胞へ分化誘導する際の効率評価、目的外細胞への分化、および癌化等の安全性評価において、幹細胞の糖鎖プロファイリングの取得が必須の役割を担うと期待できるが、当該分野で糖鎖プロファイリングが検証された例は未だ無い。そこで本研究においては、治療に用いる細胞群の品質管理、安全性確認に利用する糖鎖プロファイリングの有効性の確立を行う。本研究を基盤とした革新的技術を核にした再生医療細胞バリデーションシステムのデファクト化を目指す。

3. 研究の方法

(1) 様々な組織由来の間葉系細胞に対して糖鎖プロファイルを実施し、臨床に資する良好な細胞の品質管理のための評価技術となる基盤データを蓄積する。具体的には、初代培養時から一定継代毎の糖鎖プロファイルを実施し、分化特性評価(分化マーカー)やマウスへの移植による有効性評価との相関を明確化するための基盤データの蓄積を行う。

(2) ヒト間葉系細胞ならびに多能性幹細胞(ヒト ES 細胞等)に対して得られた糖鎖データをバイオインフォマティクスによる解析に基づいた細胞のプロファイリングとして検証する。また得られたデータに基づいて、多様な分化能を有する様々な組織由来のヒト間葉系細胞ならびに種々の方向へ分化誘導した多能性幹細胞を評価し、幹細胞から目的細胞への効率性評価、がん化の評価等に資するそれぞれの指標となる基準の抽出を行う。

(3) 再生医療に用いる細胞との前提に立ったヒト間葉系細胞ならびに多能性幹細胞(ヒト ES 細胞・iPS 細胞)を分化誘導して得られる細胞に対して、糖鎖プロファイルならびにバイオインフォマティクスによる解析を実施する。その上で糖鎖による評価を得た細胞をマウスに移植することによって *in vivo* における安全性と有効性について検証する。

4. 研究成果

(1) ヒト間葉系組織由来細胞の糖鎖プロファイリング

国内外の幹細胞を用いた再生医療の臨床研究において最も利用されている細胞ソースは間葉系幹細胞である。間葉系幹細胞は様々な組織から得ることができ、今後も細胞ソースとしての利用拡大が見込まれる一方で、ヘテロな細胞集団故に、その品質評価が難しいとされている。私たちは、これまでに胎児付属物をはじめとした種々の組織から間葉系幹細胞を樹立し、その特性を評価してきた。その中で由来する組織によってその分化特性に特徴的な傾向があることがわかってきた。そこでこれら多様な増殖能/分化能を有する間葉系幹細胞について、ヒト ES 細胞を指標とした糖鎖プロファイリングを行った。その結果(図1)、ES 細胞と間葉系幹細胞ははっきりとしたプロファイリングの違いを認めただけでなく、分化特性の違う間葉系幹細胞が区別されることが明らかとなった。形態的には同様な細胞でも、その分化ポテンシャルが細胞表面の糖鎖構造に反映していることが示唆され、対象疾患に応じた適切な細胞選択を可能とする技術につながることを示された。

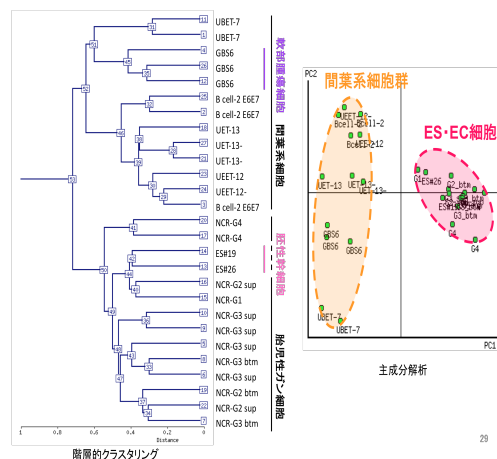
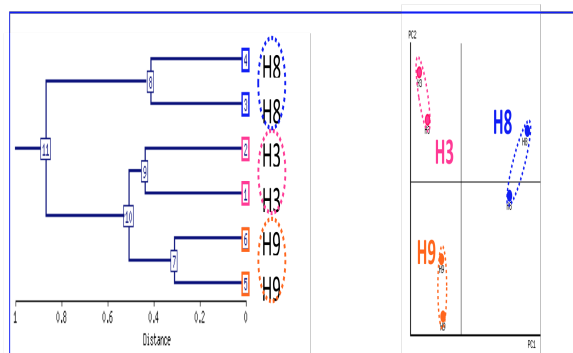


図1 ヒト幹細胞の糖鎖プロファイリング

(2) ヒト ES 細胞の糖鎖プロファイリング

ヒト ES 細胞は、iPS 細胞とともに様々な疾患に対する幹細胞移植医療の細胞ソースとして期待されている。移植においては、目的細胞への分化誘導する過程が入るが、その際に現段階の技術では 100%の誘導効率是不可能であり、目的外の細胞への分化や未分化状態

のまま残存する細胞など生じる。こうした細胞を検知し、除去することが求められる。我々はすでに ES 細胞とそれを胚葉体形成による分化誘導した細胞の糖鎖プロファイリングを実施し、未分化特異的な糖鎖構造を認識するレクチンを抽出することに成功している。一方で、ヒト ES 細胞にも分化指向性があることが指摘されており、どの ES 細胞株を選択するかが、間葉系幹細胞同様重要といえる。そこで(1)での結果を受け、分化指向性の異なる ES 細胞について、その糖鎖プロファイリングについて検討した。その結果(図2)、未分化特性を有しながら、分化特性の異なる3株のES細胞の糖鎖プロファイリングは、それぞれ特徴的なものであった。ヒト ES 細胞の未分化性評価については今回の3ラインはいずれも同様な細胞であるが、分化特性としては外胚葉、中胚葉、内胚葉それぞれの系統の分化誘導を行うとその誘導効率がかかなり異なることがわかっている細胞である。糖鎖プロファイリングによって未分化の状態ではこれらの細胞を見分けることができることが判明したことは、細胞選択を行う上で非常に有用な情報となる。



階層的クラスターリング 主成分解析
図2 分化特性の異なるヒト ES 細胞の糖鎖プロファイリング

今後さらに多くの ES 細胞の糖鎖プロファイリングを取得するとともに、その分化特性と適切に評価してそのデータとリンクさせることで、未分化状態でその細胞の分化特性を予測できる可能性がある。さらには ES 細胞由来分化誘導細胞においても糖鎖プロファイリングを行っていけば、安全性評価のみならず、移植後の有効性をも評価することにつながるかもしれない。

(3) ヒト ES 細胞由来分化誘導細胞の糖鎖プロファイリング
所属機関においてヒト ES 細胞由来肝細胞を用いた先天性肝疾患患者への移植医療の実施に向けた検討が行われている。これまでの結果を踏まえ、臨床プロトコールによるヒト ES 細胞の培養、分化誘導の各過程において、糖鎖プロファイリング技術が応用可能かについて検討を行っている。これまでの結果で

は、培養におけるヒト ES 細胞の品質評価における未分化性を判断する基準糖鎖プロファイリングを取得した。臨床研究にむけ、マスターセルバンク、ワーキングセルバンクを構築し、またフィーダー細胞もロット管理のもと評価基準となる。遺伝子発現解析やエピゲノム解析などと合わせて糖鎖情報は、今後の適切な細胞管理に有用な情報となっていくことが期待される。また分化誘導、移植までの過程における細胞管理についても引き続き検討を加えることで、十分な安全性を担保した移植医療の実現に貢献していくものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) Fukawatase Y, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Umezawa A, et al. Ataxia telangiectasia derived iPSC cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability. *Sci. Rep.* 4:5421, 2014. Doi: 10.1038/srep05421.
- (2) Kami D, Yamazaki-Inoue M, Gojo S, et al. Large-scale cell production of stem cells for clinical application using the automated cell processing machine. *BMC Biotechnol.* 13:102, 2013. Doi: 10.1186/1472-6750-13-102.
- (3) Nishijima Y, Yamazaki-Inoue M, Umezawa A, et al. Glycan profiling of endometrial cancers using lectin microarray. *Genes Cells.* 17: 826-836, 2012. Doi: 10.1111/gtc.12003.

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 西野光一郎、豊田雅士、山崎-井上麻由、阿久津英憲、梅澤明弘. ヒト iPS 細胞の異常メチル化領域の解析. 第7回日本エピジェネティクス研究会年会. 2013.5.30-31. 奈良
- (2) 柴田恵理、山崎-井上麻由、梅澤明弘他. ヒト iPS 細胞の未分化マーカーとなる新規糖鎖の発現解析. 第12回に本再生医療学会総会. 2013.3.21-23.
- (3) 柴田恵理、井上麻由、梅澤明弘他. LS-MS を用いたヒト iPS 細胞に発現する新規糖鎖マーカーの探索. 第11回日本再生医療学会総会. 2012.6.12-14. 横浜.
- (4) Kami D, Yamazaki-Inoue M, Gojo S, et al. Monitoring of the damage to freeze-thawed cells by glycan profiling using a lectin microarray. ISSCR 10th Annual Meeting. 2012.6.13-16. Yokohama.
- (5) Kami D, Yamazaki-Inoue M, Gojo S, et al. Construction of large amounts culture system by an automated cell processing machine for the cell transplantation. ISSCR 10th Annual

Meeting. 2012.6-13-16. Yokohama.

- (6) Shibata E, Yamazaki-Inoue M, Umezawa A, et al. Investigation of glycosphingolipids expressed in human induced pluripotent stem (iPS) cells. International Symposium on Glyco-minded Biology of diseases as a basis of pharmaceutical sciences. 2012.11.30-12.1, Tokyo.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 麻由 (INOUE, Mayu)

独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：40596920

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：