

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：34315

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570171

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞に対する新規単クローン抗体の作成とその機能解析

研究課題名(英文) Generation and functional analysis of monoclonal antibodies raised against human iPS cells

研究代表者

川崎 敏祐 (Kawasaki, Toshisuke)

立命館大学・薬学部・非常勤講師

研究者番号：50025706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：多能性幹細胞研究において汎用されている抗体はヒトiPS/ES細胞ばかりでなく、EC細胞(胎児性がん細胞)をも認識する欠点を持つ。私たちは、本研究によりヒトEC細胞を認識しないヒトiPS/ES細胞マーカー抗体2種の作成に成功した。R-10Gは抗TRA-1-60抗体と同様にケラタン硫酸を認識する抗体であり、これらの糖鎖はムチン様膜糖タンパク質であるポドカリキシン分子上に発現することを明らかにした。R-17Fは、抗SSEA-3抗体と同様に膜脂質を認識する抗体であるが、ヒトiPS/ES細胞特異的な細胞障害活性をもつことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated two hybridomas using a hiPS cell line (Tic) as an antigen. These hybridomas produced antibodies that specifically bound to hiPS/ES cells but exhibited little or no binding to hEC cells. Interestingly, both of these antibodies were found to be carbohydrate-recognizing antibodies of the IgG1 subtype. 1st antibody R-10G recognizes a type of keratan sulfate lacking oversulfated structures expressed on podocalyxin molecules on hiPS/ES cells like anti-TRA-1-60 antibody. 2nd antibody R-17F recognized glycolipids like anti-SSEA-3 antibody, and exhibited a strong cytotoxic effect toward hiPS/ES cells.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：多能性幹細胞 糖鎖認識抗体 ケラタン硫酸 糖脂質 ES細胞 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

糖鎖認識抗体は細胞表面糖鎖の変化を鋭敏に察知するプローブであり、フローサイトメーターや共焦点レーザー顕微鏡などの検出装置と組み合わせ使用することにより、細胞の分化や発生の研究に大きく貢献している。始まったばかりの多能性幹細胞研究領域に於いても有用な糖鎖認識抗体の開発が期待されていた。

2. 研究の目的

当時汎用されていた多能性幹細胞マーカー抗体は、以前に EC 細胞 (胎児性がん細胞) を免疫原として作成されたものが多く、iPS/ES 細胞ばかりでなく EC 細胞も認識する欠点があった。そこで本研究では多能性幹細胞における糖鎖の役割を解明し、また、安全な再生医療の実現に資することを目的として EC 細胞を認識しないヒト iPS/ES 細胞マーカー抗体の開発に着手した。

3. 研究の方法

免疫原としては、ヒト iPS 細胞 Tic (JCRB1331) を用いた。Tic 細胞をマウスの腹腔あるいは皮下に注射した後、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 (P3U1) と PEG 法により細胞融合し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細胞スクリーニングを行った。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 細胞を用いた (表 1)。

表 1. 細胞染色性によるハイブリドーマのスクリーニングの結果

No.	Tic	2102Ep	MRC-5	MEF	No.	Tic	2102Ep	MRC-5	MEF
1	++	+++	±	-	16	+	+	±	±
2	+++	++	+	-	17	++++	±	-	-
3	+	+	-	-	18	++	++	-	-
4	+++	++	-	-	19	+++	+++	-	-
5	++	±	-	-	20	+++	+++	++	±
6	+++	+++	+	-	21	+++	+++	+	±
7	++	++	±	-	22	++	++	-	-
8	+	+++	+	-	23	++	++	++	-
9	+++	+++	-	-	24	+	+	-	-
10	+++	±	-	-	25	+++	+++	+	±
11	+++	+	-	-	26	++++	+++	-	-
12	+	++++	-	-	27	+++	+++	+	-
13	+++	+++	±	±	28	+++	+++	-	-
14	++	+	-	-	29	+++	+++	-	-
15	+	++	-	-					

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ェ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 (図 1)。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。

4. 研究成果

本研究によりヒト EC 細胞を認識しないト

iPS/ES 細胞マーカー抗体 2 種 (R-10G および R-17F) の作成に成功した。

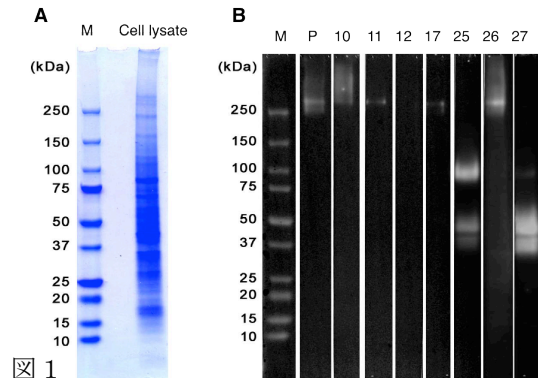


図 1

(1) R-10G はケラタン硫酸を認識する抗体であり、これらの糖鎖はムチン様膜糖タンパク質であるポドカリキシンに発現することを明らかにした (発表論文④)。抗 TRA-1-60 抗体、抗 TRA-1-81 抗体も同様にケラタン硫酸を認識するといわれているが、図 2 に示すに、これらの抗体の細胞染色性は同一ではない。

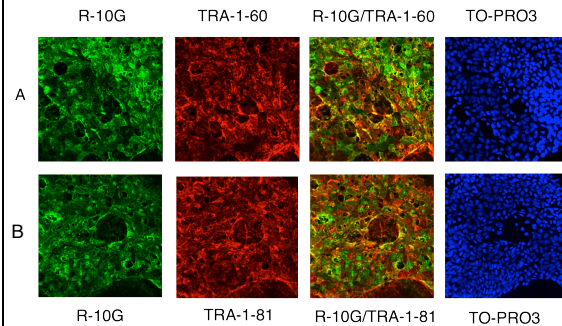


図 2

これらの抗体はほとんどの Tic 細胞に結合する。しかし、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、一部の細胞では両者のエピトープがごく近傍に存在するが、ほとんどの細胞ではどちらかのエピトープが優位に発現している。これらの結果は、従来、同一のコロニーに含まれる未分化多能性幹細胞は均一な細胞集団であると考えられていたが、実は、糖鎖の構造に関してはヘテロな細胞集団であることを示しており興味深い。なお、ケラタン硫酸を認識する抗体としては、すでに、5D4 などの抗体が市販されているが、これらが高硫酸化ケラタン硫酸を認識するのに対して、R-10G は低硫酸化ケラタン硫酸を認識する新規特異性をもつ。さらに、R-10G エピトープは成体組織ではほとんど検出されないが、例外的に脳組織に強く発現することが示されており注目されている。

(2) R-17F はほとんどすべての iPS 細胞の細胞膜全体を強く染色した。エピトープは iPS 細胞の細胞膜上にほぼ普遍的に存在し、細胞をトリプシン処理しても消失しないこと、R 細胞膜の SDS-PAGE ウェスタンブロットではほとんど検出されないことから (表 1

参照)、脂質性物質と推定された。また、細胞を糖脂質合成の阻害剤である D-PDMP 存在下で培養すると、細胞表面での発現が抑制されることから、糖脂質であることが示された。さらに、iPS 細胞の全脂質成分を抽出し、TLC-免疫染色法で解析すると、グロボシドの近辺に明瞭な 1 つのスポットを示した。現在、このスポットの質量分析解析を進めエピトープの化学的同定を進めている。R-17F は大変興味深いことに、ヒト iPS 細胞に対して抗体濃度依存的に強い細胞障害作用を示した。この細胞障害作用は補体非依存的な反応であり、0°C でも 37°C でもほぼ同様に進行し、ごく少量の二次抗体を加えることで著しい増強された。この細胞障害作用は、iPS 細胞に特異的であり、また、他の多能性幹細胞マーカー抗体ではみられず R-17F のみに特徴的な作用である。この R-17F の細胞障害活性は、他のヒト培養細胞に対しては観察されておらず、ヒト iPS に特異的である。この未分化状態の多能性幹細胞に対する特異的な細胞障害活性は、実は、多能性幹細胞を利用した再生医学において重要な意味を持つと考えられている。すなわち、多能性幹細胞の方向性を持った分化のプロセスは未だ十分にはコントロールされておらず、その過程においては分化の度合いの異なる細胞集団が形成され、未分化幹細胞も一部残存する。これらの残存未分化幹細胞はがん細胞に変化することが知られており、これら残存する未分化幹細胞を選択的に除去する方法が求められている。R-17F はこのような期待に応える抗体である可能性が高い (論文投稿中)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① J. O. Makanga, M. Kobayashi, H. Ikeda, A. Christiano, H. Toyoda, M. Yamada, T. Kawasaki, and T. Inazu, Generation of Rat Induced Pluripotent Stem Cells Using a Plasmid Vector and Possible Application of a Keratan Sulfate Glycan Recognizing Antibody in Discriminating Teratoma Formation Phenotypes, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, Vol. 38, 2015, pp. 127-133, DOI: 10.1248/bpb.b14-00697

② M. Nonaka, and T. Kawasaki, Functional assay using lectin gene targeting technologies (over-expression), *Methods Mol Biol.*, 査読無, Vol. 1200, 2014, pp. 389-399, DOI: 10.1007/978-1-4939-1292-6_34

③ M. Nonaka, H. Imaeda, S. Matsumoto, B. Y. Ma, N. Kawasaki, E. Mekata, A. Andoh, Y. Saito, T. Tani, Fujiyama, and T.

Kawasaki, Mannan-binding protein, a C-type serum lectin, recognizes primary colorectal carcinomas through tumor-associated Lewis glycans, *J Immunol.*, 査読有, Vol. 192, No. 3, 2014, pp. 1294-1301, DOI: 10.4049/jimmunol.1203023

④ K. Kawabe, D. Tateyama, H. Toyoda, N. Kawasaki, N. Hashii, H. Nakao, S. Matsumoto, M. Nonaka, H. Matsumura, Y. Hirose, A. Morita, M. Katayama, M. Sakuma, N. Kawasaki, M. Kusuda Furue, and T. Kawasaki, 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*, 査読有, Vol. 23, No. 3, 2013, pp. 322-336, DOI: 10.1093/glycob/cws159

⑤ M. Hirano, B.Y. Ma, N. Kawasaki, S. Oka, T. Kawasaki, Role of interaction of mannan-binding protein with meprins at the initial step of complement activation in ischemia/reperfusion injury to mouse kidney, *Glycobiology*, 査読有, Vol. 22, 2012, pp. 84-95, DOI: 10.1093/glycob/cwr107

[学会発表] (計 9 件)

① T. Kawasaki, H. Nakao, S. Matsumoto, H. Toyoda, K. Kawabata, T. Taki, and N. Kawasaki, Novel Carbohydrate-Recognizing Antibodies for Human iPS/ES Cells, Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research, Nov. 18, 2014, Hawaii, USA

② 川寄敏祐、中尾広美、川端健二、川寄伸子、豊田英尚、ヒト iPS 細胞を特異的に検出する抗糖鎖抗体の開発と性状、第 33 回日本糖質学会年会、2014 年 8 月 10 日、名古屋大学 (愛知県)

③ 川寄敏祐、C-型レクチンと免疫、*Glyco-Immunology 2014*、2014 年 2 月 17 日、東京医科歯科大学 (東京都)

④ 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、新規ヒト iPS/ES マーカーとしての糖認識抗体とその応用、日本生化学会、2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑤ 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、単クローン抗体 R-10G を用いた脳ケラタン硫酸プロテオグリカンの研究、日本糖質学会、2013 年 8 月 6 日、大阪国際交流センター (大阪府)

⑥ T. Kawasaki, Novel Marker Antibodies for Human iPS/ES Cells and their Application, 22nd International Symposium on Glycoconjugates, 2013年6月25日, Dalian, China

⑦ 滝島佑人、川寄敏祐 他6名、新規モノクローナル抗体 R-10G を用いた脳内ケラタン硫酸プロテオグリカンの解析、日本薬学会 近畿支部総会・大会、2012年10月20日、武庫川女子大学（兵庫県）

⑧ 松本尚悟、川寄敏祐 他11名、ヒト iPS 細胞上のケラタン硫酸鎖を認識する新規単クローン抗体の性質、日本糖質学会、2012年9月18日、鹿児島市民文化ホール(鹿児島県)

⑨ T. Kawasaki, K. Kawabe, M. Kusuda-Furue, H. Nakao, S. Matsumoto, M. Nonaka, H. Toyoda, Y. Hirose, N. Kawasaki, N. Kawasaki, A novel marker antibody of human induced Pluripotent Stems (iPS) cells, which recognizes a new type of keratan sulfate, International Carbohydrate Symposium 2012, 2012年7月23日, Madrid, Spain

〔図書〕(計4件)

① T. Kawasaki, N. Kawasaki, H. Nakao, and H. Toyoda, Springer Japan, Glycoscience: Biology and Medicine, Novel Antibody for Keratan Sulfate Expressed on Human iPS/ES Cells, 2014, 総ページ数8

② T. Kawasaki, M. Nonaka, and N. Kawasaki, Springer Japan, Glycoscience: Biology and Medicine, Mannan-Binding Protein (MBP) - Ligand Glycans: A Novel Tissue Marker for Colorectal Carcinomas, 2014, 総ページ数8

③ S. Okuda, H. Nakao, and T. Kawasaki, Springer, Japan, Glycoscience: Biology and Medicine, GlycoEpitope: Database for Carbohydrate Antigen and Antibody, 2014, 総ページ数7

④ 川寄敏祐, 川寄伸子, 中尾広美、松本尚悟、古江-楠田美保、豊田英尚、羊土社、実験医学 増刊 Vol.31 No.10 新規 iPS/ES マーカー抗体とその応用、2013、pp.129-133

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

称：標的細胞障害活性を有する iPS/ES 細胞特異的抗体およびその用途
発明者：川寄敏祐、川寄伸子、古江美保、川端健二
権利者：学校法人立命館、独立行政法人医薬

基盤研究所

種類：特許

番号：特願 2012-280259

出願年月日：2012年12月21日

国内外の別：国内

名称：標的細胞障害活性を有する iPS/ES 細胞特異的抗体およびその用途

発明者：川寄敏祐、川寄伸子、古江美保、川端健二

権利者：学校法人立命館、独立行政法人医薬基盤研究所

種類：特許

番号：PCT/JP2013/084374

出願年月日：2013年12月20日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

GlycoEpitope <http://www.glycoepitope.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川寄 敏祐 (KAWASAKI, Toshisuke)

立命館大学・薬学部・非常勤講師

研究者番号：50025706

(2) 研究分担者

川寄 伸子 (KAWASAKI, Nobuko)

立命館大学・総合科学技術研究機構・教授

研究者番号：70077676