

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2018～2021  
課題番号：18K09090  
研究課題名（和文）幹細胞による安全な軟骨再生医療のための脂質分化マーカーの探索とその機能の解明  
  
研究課題名（英文）Search for lipid differentiation markers for safe cartilage regenerative medicine using stem cells and elucidate their functions  
  
研究代表者  
馬場 力哉（BABA, RIKIYA）  
  
北海道大学・医学研究院・客員研究員  
  
研究者番号：40815742  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では未分化iPS細胞表面が特異的糖鎖で被覆されていることに着目し、Aminolysis-SALSA法を応用することで、細胞特異的GSL糖鎖解析を用いた軟骨細胞中に混入する未分化iPS細胞の定量評価法を確立した。糖鎖解析による定量法を用い、iPS細胞の特異的糖鎖を認識し細胞傷害性を有するR-17F抗体の至適使用条件を決定した。iPS細胞と軟骨細胞の共培養にR-17F、二次抗体を添加することで、iPS細胞を検出感度以下まで除去可能であることを明らかにし、さらに抗体処理した共培養細胞をSCID miceに移植し、teratomaが形成されないことを示した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

GSL糖鎖解析による定量法は、フローサイトメトリー等で必要となる事前の蛍光標識等の前処置を必要とせず、また心筋細胞等の組織に対する細胞解離の前処理を必要としない。本定量法はiPS由来生成物の品質管理に有用である可能性がある。

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、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。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the fact that the surface of undifferentiated iPS cells were coated with specific glycoconjugates and GSL glycans, we established a method to detect and quantify undifferentiated iPS cells in chondrocytes using cell-specific GSL-glycan analysis by applying the Aminolysis-SALSA method. Using quantification method by glycan analysis, we could determine the optimal conditions for use of R-17F antibody, which recognizes specific glycans of iPS cells and has cytotoxic activity. Furthermore, we transplanted the antibody-treated co-cultured cells into SCID mice and showed that no teratoma was formed.

研究分野：軟骨再生医療

キーワード：ヒト誘導多能性幹細胞 糖鎖解析

## 1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は組織学的には硝子軟骨と呼ばれ、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。ヒト誘導多能性幹細胞 (**iPS** 細胞) は未分化の状態が無期限に増殖し、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が、克服しなければならない障壁がある。それは **iPS** 細胞の持つ腫瘍性と脱分化である。

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解析から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 **GSL** 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 **GSL** の発現が増加していく (**Liang et al., 2010**)。このように細胞表面の **GSL** 糖鎖は細胞に特異的であり、さらに細胞の運命を決定づけているかのように分化と関連して大きく発現や構造が変化する。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の開発を行ってきた。**EGCase** は、**GSL** より糖鎖を切断する酵素であり、消化することで細胞中の **GSL** より糖鎖を切断し、**glycoblotting** 法により精製し質量分析により細胞中に含まれる **GSL** 糖鎖を網羅的に解析する方法である (**Fujitani et al., 2011**)。近年では、シアリル酸結合様式特異的アミド化法 (**aminolysis-sialic acid linkage-specific alkylamidation: SALSA 法**) を開発し、**glycoblotting** 法と併用することで **GSL** 糖鎖上のシアリル化糖鎖の構造異性体の識別が可能となった (**Hanamatsu et al., 2018**)。

我々は、このような **GSL** 糖鎖の解析手法を用いることで、細胞固有の糖鎖構造を定量化することが可能となり、**NANOG** などの従来の未分化マーカーの検出法と同様に **GSL** 糖鎖の定量解析が細胞の評価法に利用できるのではないかと考えた。さらに **iPS** 細胞に特異的に結合し、濃度依存的な細胞毒性を示す **R-17F** 抗体に着目し (**Matsumoto et al., 2015**)、**GSL** 糖鎖の定量解析が **R-17F** の細胞傷害活性を評価できるのではないかと仮説を立て研究遂行した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) **GSL** 糖鎖解析の手法を用いて、未分化 **iPS** 細胞の新規定量評価法を確立し、さらに同手法を用いて **R-17F** の未分化 **iPS** 細胞に対する細胞傷害活性を評価すること、(2) **GSL** 糖鎖による定量評価法を用い、**R-17F** の至適使用条件を確立することである。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト **iPS** 細胞株 (**606A1**) とヒト軟骨細胞株 (**C28/I2**) それぞれの特異的 **GSL** 糖鎖を **glycoblotting** 法を用いて検出した。

続いて、軟骨細胞に様々な比率で未分化 **iPS** 細胞を混入させ、**GSL**-糖鎖解析を行った。

**R-17F** の効果を評価するために、軟骨細胞に **iPS** 細胞を **10%** の割合で混入させた状態で共培養し、**R-17F** を **200, 300, 500 µg/mL** の濃度で添加し、**36** 時間後に細胞を回収して **GSL** 糖鎖解析を行った。

最後に、軟骨細胞への分化過程で、未分化 **iPS** 細胞を検出できるか評価した。分化の方法は **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

基に行った。まず **iPS-MS C P6** が **MSC** 様の性質を有しているかを **Flow cytometry** を用いて確認し、次に **iPS** 細胞を **iPS-MS C P2**、**4** まで分化させ、**GSL** 糖鎖分析を行った。

- (2) **R-17F** の未分化 **iPS** 細胞に対する細胞傷害性は、**R-17F** の二次抗体を併用することで増強するという報告のもとに (**Matsumoto et al., 2015**)、**R-17F** の至適使用条件を検討した。

まず始めに、二次抗体を添加するタイミングについて検討した。**iPS** 細胞 (**606A1**) と軟骨細胞 (**C28/I2**) を共培養し (**iPS** 細胞播種濃度 = 5%)、共培養 1 日目で **R-17F** を **50  $\mu$ g/mL** の濃度で添加した。二次抗体は **5  $\mu$ 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、**GSL** 糖鎖解析を行った。

次に、二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**) を共培養し (**iPS** 細胞播種濃度 = 5%)、共培養 1 日目で **R-17F** を **100  $\mu$ g/mL** の濃度で添加した。**R-17F** を加えて **24 h** 後に二次抗体を **0-100  $\mu$ 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。

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。**iPS** 細胞 (**606A1**) と軟骨細胞 (**C28/I2**) を共培養し (播種細胞数 = **0.375  $\times$  10<sup>4</sup>**、**0.7125  $\times$  10<sup>5</sup>**、**iPS** 細胞の比率 = 5%)、共培養 1 日目に **R-17F** を **100  $\mu$ 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 日目に全細胞を回収し、**6** 週齢の **scid** マウスの精巣に移植した。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 **1-2** 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、**GSL** 糖鎖解析を行った。

#### 4. 研究成果

- (1) 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** スペクトルを検証した。**iPS** 細胞特異的な **GSL** 糖鎖 (**Gb3**、**LNFP I** 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 LNFP I** 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**、**LNFP I**、**Gb5**、**galactosyl LNFP I**、および **SSEA-4**) を使用して検量線を取得した。**Gb3**、**LNFP I** および **Gb5** の 3 つの検量線は、**iPS** 細胞濃度と糖鎖発現量の間に強い相関 (**R<sup>2</sup> > 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。

- (2) **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 **iPS** コロニーの壊死を確認した。一方、**GSL** 糖鎖解析による、**R-17F** 抗体処理後の残存未分化 **iPS** 細胞の評価では、残存 **iPS** 細胞特異的な糖鎖の相対量は **10%** から約 **4%** まで減少した。

検量線は、**iPSC** 特異的な **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。

- (3) **GSL** 糖鎖解析を用いた、**iPS-MS C** における幹細胞特異的な糖鎖の検出

**iPS-MS C** (**P2**、**P4**) の **GSL**-糖鎖解析では、**iPSC-MS C** の継代を繰り返すと、未分化 **iPS** 細胞特異的な **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。

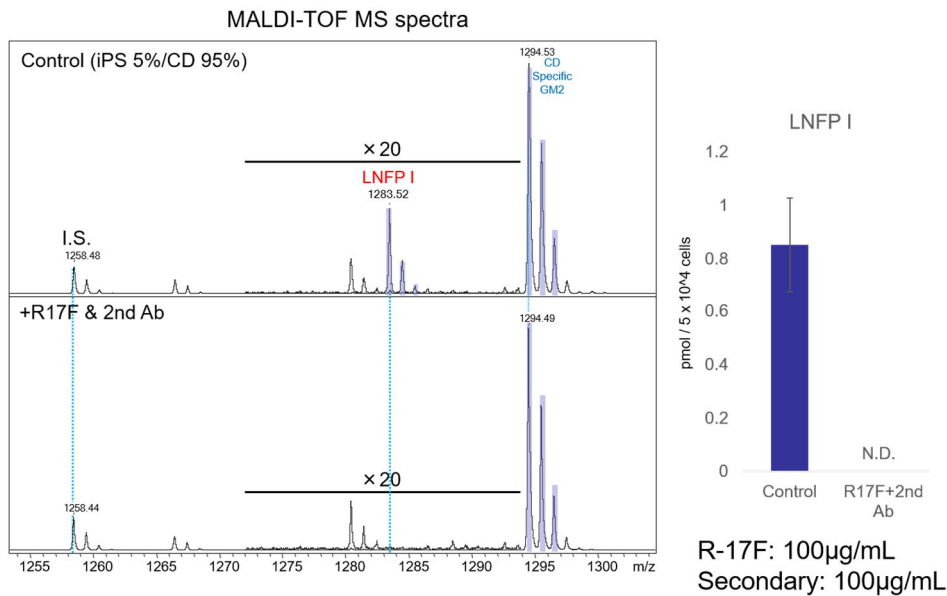
- (4) 共培養細胞に対し、二次抗体を添加する至適濃度の検討

**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。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  $\mu$ g/mL** では **50%**、**40  $\mu$ g/mL** では **17%**、**80  $\mu$ g/mL** では **9%** まで減少した。**2** 次抗体 **100  $\mu$ g/mL** との併用で **iPS** 細胞の完全消失が観察された。

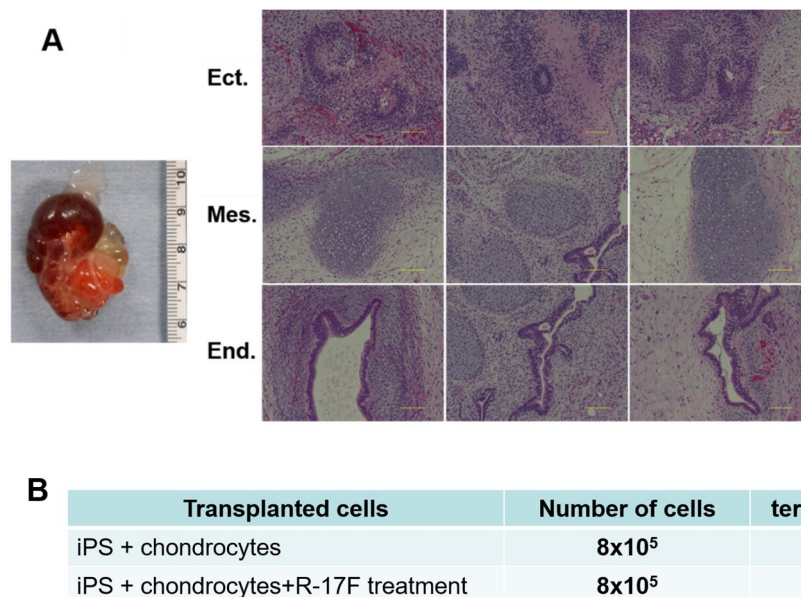
- (5) 二次抗体併用した場合の **R-17F** 抗体処理による **teratoma** の発生抑制効果の検討

抗体処理後 (**R-17F 100  $\mu$ g/mL**、**2** 次抗体 **100  $\mu$ g/mL**) 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 1**)。

マウスに移植した共培養細胞の数は、マウス 1 匹あたり  $8 \times 10^5$  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 2B)。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 2A)。



**Figure 1.** 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



**Figure 2.** **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 µm** **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)。

## 引用文献

- 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.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
- 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.
- 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
- 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.

## 5. 主な発表論文等

### ( 1 ) 1. 著者名

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

### 2. 論文標題

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

### 3. 雑誌名

**International Journal of Molecular Sciences, 21(1) 2019 Dec. doi: 10.3390/ijms21010231.**

### ( 2 ) 1. 著者名

**Xu Liang, Hanamatsu H., Homan K., Onodera T., Miyazaki T., Furukawa J., Hontani K., Tian Y., Baba R., Iwasaki N.**

### 2. 論文標題

**Alterations of Glycosphingolipid Glycans and Chondrogenic Markers during Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Chondrocytes**

### 3. 雑誌名

**Biomolecules. 2020 Dec 1;10(12). doi: 10.3390/biom10121622**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Xu Liang, Hanamatsu Hisatoshi, Homan Kentaro, Onodera Tomohiro, Miyazaki Takuji, Furukawa Jun-ichi, Hontani Kazutoshi, Tian Yuan, Baba Rikiya, Iwasaki Norimasa	4. 巻 10
2. 論文標題 Alterations of Glycosphingolipid Glycans and Chondrogenic Markers during Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Chondrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1622 ~ 1622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom10121622	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyazaki Takuji, Hanamatsu Hisatoshi, Xu Liang, Onodera Tomohiro, Furukawa Jun-ichi, Homan Kentaro, Baba Rikiya, Kawasaki Toshisuke, Iwasaki Norimasa	4. 巻 21
2. 論文標題 Evaluation of Residual Human-Induced Pluripotent Stem Cells in Human Chondrocytes by Cell Type-Specific Glycosphingolipid Glycome Analysis Based on the Aminolysis-SALSA Technique	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 231 ~ 231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21010231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩崎 倫政  (IWASAKI NORIMASA)  (30322803)	北海道大学・医学研究院・教授    (10101)	
研究分担者	小野寺 智洋  (ONODERA TOMOHIRO)  (70547174)	北海道大学・大学病院・講師    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------