

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25712039

研究課題名(和文) 幹細胞糖鎖の機能解析と再生医療に貢献する新規糖鎖工学技術の開発

研究課題名(英文) Functional analysis of stem cell glycans and development of novel glycan engineering technologies for regenerative medicine

研究代表者

館野 浩章 (Tateno, Hiroaki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号：30450670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS/ES細胞は無限に増殖できる能力(自己複製能)や、心筋細胞や神経細胞など、あらゆる細胞に分化する能力(多能性)を持つ。そのため、ヒトiPS/ES細胞は各種の疾病を根本的に治癒する再生医療のための細胞源として社会的にも大きな期待が寄せられている。研究代表者はこれまでの研究において、ヒトiPS/ES細胞に特異的に反応するrBC2LCNレクチンの発見に至っている。本研究では、本rBC2LCNレクチンのヒトiPS/ES細胞への反応機構やレクチンが認識する糖鎖の機能を明らかにするとともに、rBC2LCNレクチンを用いて未分化細胞を検出、除去するための新たな技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：hiPSCs and hESCs have abilities to proliferate eternally (self-renewal) and differentiate into any cell types such as cardiomyocytes and neurons (pluripotency). Therefore, hiPSCs and hESCs gain a lot of attentions as cell sources for regenerative medicine. I have discovered a hiPSC/hESC-specific lectin called rBC2LCN. In this study, I analyzed the binding mechanisms of rBC2LCN to hiPSCs/hESCs, clarified the functions of glycans recognized by the lectin, and developed technologies to detect and eliminate undifferentiated cells.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 レクチン 幹細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

2010年、世界で初めてのヒトES細胞を用いた第1相臨床試験が米国で急性脊髄損傷に対して始まり、さらに今年、加齢黄斑変性に対するヒトES細胞を用いた臨床試験が実施され、ヒト多能性幹細胞による細胞治療が現実化してきた。更に、山中教授のノーベル賞受賞で注目されている人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、受精胚を使用しないなどの理由から倫理的な障壁が低く、且つ自家組織からも樹立できることから、革新的な細胞源として期待されている。こうした細胞源を再生医療に利用するためには、細胞の品質や安全性を担保するための技術を開発する必要がある。

一方、糖鎖は「細胞の顔」とされ、細胞の性質を鋭敏に反映することから、iPS細胞をはじめとする幹細胞の安全性や有効性の評価に有効である。事実、多能性幹細胞を判別する際の未分化マーカーとして使用されているSSEA3/4抗体やTra-1-60/81抗体はどれも糖鎖を認識している。糖鎖は多能性幹細胞表面も高濃度に覆い、幹細胞間の情報伝達を直接担当する現場分子として働いている。しかしSSEA3/4抗体やTra-1-60/81抗体の糖鎖抗原も含めて、幹細胞表面に特異的に発現する糖鎖構造が、多能性幹細胞の機能発現にどのような役割を担っているのか、についてはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

第3の生命鎖と呼ばれる糖鎖は細胞間相互作用を媒介することにより多くの生命現象に関係している。再生医療のための細胞源として期待される多能性幹細胞(iPS細胞、ES細胞)表面も糖鎖で覆われているが、その構造や機能は十分に理解されていない。研究代表者らは多能性幹細胞の網羅的糖鎖解析の結果、多能性幹細胞に特異的に反応する新規プロブレクチン(rBC2LCN)の発見に至っている。本研究ではrBC2LCNが認識する新規未分化糖鎖マーカーの構造と機能を明らかにするとともに、糖鎖を活用した未分化細胞除去技術を開発する。最終的には多能性幹細胞の未分化維持機構への理解を深め、再生医療実現化に貢献する新規糖鎖工学技術の創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) rBC2LCNが認識する新規未分化糖鎖マーカーの構造解析：rBC2LCNが認識する糖タンパク質リガンドを、rBC2LCN固定化ビーズを用いたレクチンキャッチとウエスタンブロット法で同定した。また液体クロマトグラフィと質量分析計を用いた方法を用いて、rBC2LCNが認識する糖鎖構造を決定した。

(2) rBC2LCNを用いた未分化細胞除去試薬の開発：rBC2LCNと緑膿菌由来毒素の融合タンパク質の発現系を構築し、ヒトiPS細胞やES細胞への殺傷効率を検討した。

(3) rBC2LCNの内在化機構の解析：蛍光顕微鏡や電子顕微鏡を用いてrBC2LCNの局在や内在化機構を解析した。

(4) rBC2LCNが認識する糖タンパク質リガンドの機能解析：rBC2LCNが認識する糖タンパク質リガンドの発現をsiRNAで抑制することによるヒトiPS細胞への影響について調べた。

(5) 非破壊未分化細胞モニタリング技術の開発：rBC2LCNを用いて、培養液を用いて非破壊で未分化細胞を検出するためのELISA法を構築する。

4. 研究成果

(1) rBC2LCNが認識する新規未分化糖鎖マーカーの構造解析：rBC2LCNが認識する糖タンパク質リガンドの1種がポドカリキシンであることを同定した。また、rBC2LCNが認識する糖鎖がHタイプ3含有糖鎖であることを明らかにして、2013年3月19日にプレスリリースするとともにStem Cells Transl Medより論文発表した。

(2) rBC2LCNを用いた未分化細胞除去試薬の開発：rBC2LCNと緑膿菌由来毒素の触媒ドメインの融合タンパク質(rBC2LCN-PE23)を開発した。rBC2LCN-PE23を用いてヒトiPS細胞やヒトES細胞への殺傷条件を最適化した。rBC2LCN-PE23は特許出願(PCT/JP2014/053317(H26/02/13))、2015年4月10日にプレスリリースとともにStem Cell Repより論文発表した。rBC2LCN-PE23は2015年6月に国内試薬メーカーより上市された。

(3) rBC2LCNの内在化機構の解析：蛍光顕微鏡や電子顕微鏡を用いてrBC2LCNの局在や内在化機構を解析した。クラスリン依存、非依存的経路で内在化し、エンドソーム、リソソーム、細胞質へと移行することを明らかにした。現在、論文投稿準備中である。

(4) rBC2LCNが認識する糖タンパク質リガンドの機能解析：rBC2LCNが認識する糖タンパク質リガンドであるポドカリキシンの発現をsiRNAで抑制することにより、ヒトiPS細胞の増殖能への影響について調べた。

(5) 非破壊未分化細胞モニタリング技術の開発：培養液を用いて非破壊で未分化細胞を検出するためのELISA法を構築し、2014年2月17日にプレスリリースするとともに、2件の特許出願(PCT/JP2012/006983(H24/10/31);特願2015-053802(H27/03/17))を行い、Sci Repから論文発表した。本技術は2016年3月に国内試薬メーカーから上市されている。

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 11 件)

1. Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi M, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Asashima M, Hirabayashi J. *Stem Cells Transl Med.* 2013 Apr;2(4):265-73. doi: 10.5966/sctm.2012-0154. Epub 2013 Mar 22.
2. The Cellular Glycome of Human Induced Pluripotent Stem Cells and Their Specific Probe rBC2LCN. Tateno H*, Hirabayashi, J. *TRENDS IN GLYCOSCIENCE AND GLYCOTECHNOLOGY.* 2013 26, 1-35. *Corresponding author
3. A medium hyperglycosylated podocalyxin enables noninvasive and quantitative detection of tumorigenic human pluripotent stem cells. Tateno H*, Onuma Y, Ito Y, Hiemori K, Aiki Y, Shimizu M, Higuchi K, Fukuda M, Warashina M, Honda S, Asashima M, Hirabayashi J. *Sci Rep.* 2014 Feb 12;4:4069. doi: 10.1038/srep04069. *Corresponding author
4. Live-cell imaging of human pluripotent stem cells by a novel lectin probe rBC2LCN. Tateno H*, Onuma Y, Ito Y. *Methods Mol Biol.* 2014;1200:313-8. doi: 10.1007/978-1-4939-1292-6_26. *Corresponding author
5. Development and Applications of the Lectin Microarray. Hirabayashi J, Kuno A, Tateno H. *Top Curr Chem.* 2015 Mar 28. [Epub ahead of print]
6. Elimination of tumorigenic human pluripotent stem cells by a recombinant lectin-toxin fusion protein. Tateno H*, Onuma Y, Ito Y, Minoshima F, Saito S, Shimizu M, Aiki Y, Asashima M, Hirabayashi J. *Stem Cell Reports.* 2015 May 12;4(5):811-20. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.02.016. Epub 2015 Apr 9. *Corresponding author
7. A Novel Probe as Surface Glycan Marker of Pluripotent Stem Cells: Research Outcomes and Application to Regenerative Medicine. Hirabayashi J, Tateno H, Onuma Y, Ito Y. *Adv Healthc Mater.* 2015 Apr 14. doi: 10.1002/adhm.201400837. [Epub ahead of print]"
8. 2-6sialylation is a marker of the differentiation potential of human mesenchymal stem cells. Tateno H*, Saito S, Hiemori K, Kiyoi K, Hasehira K, Toyoda M, Onuma Y, Ito Y, Akutsu H, Hirabayashi J. *Glycobiology.* 2016 Apr 2. pii: cww039. [Epub ahead of print] *Corresponding author
9. Generation of a monoclonal antibody recognizing the CEACAM glycan structure and inhibiting adhesion using cancer tissue-originated spheroid as an antigen. Sato Y, Tateno H, Adachi J, Okuyama H, Endo H, Tomonaga T, Inoue M. *Sci Rep.* 2016 Apr 21;6:24823. doi: 10.1038/srep24823.
10. Identification of the cysteine residue responsible for oxidative inactivation of mouse galectin-2. Tamura M, Sasai A, Ozawa R, Saito M, Yamamoto K, Takeuchi T, Ohtake K, Tateno H, Hirabayashi J, Kobayashi J, Arata Y. *J Biochem.* 2016 Apr 27. pii:

mvw029. [Epub ahead of print]
11. A rationally engineered yeast pyruvyltransferase Pvg1p introduces sialylation-like properties in neo-human-type complex oligosaccharide. Higuchi Y, Yoshinaga S, Yoritsune K, Tateno H, Hirabayashi J, Nakakita S, Kanekiyo M, Kakuta Y, Takegawa K. Sci Rep. 2016 May 19;6:26349. doi: 10.1038/srep26349.

[学会発表](計14件)

2013/5/30

DISCOVERY OF A NOVEL PLURIPOTENCY MARKER BC2LCN USING LECTIN MICROARRAY

館野浩章・小沼泰子・伊藤弓弦・浅島誠・平林淳

日本組織培養学会 第86回大会(つくば)
ポスター発表

2013/6/12

館野浩章・小沼泰子・伊藤弓弦・浅島誠・平林淳

DISCOVERY OF A NOVEL PLURIPOTENCY MARKER BC2LCN USING LECTIN MICROARRAY

ISSCR 11th Annual Meeting (ボストン)
ポスター発表

2013/8/5

館野浩章・小沼泰子・伊藤弓弦・浅島誠・平林淳

新規未分化細胞特異的プローブ・rBC2LCNの標的分子解明と生細胞イメージングへの応用

第32回日本糖質学会(大阪)
口頭発表

2013/9/11

館野浩章・小沼泰子・伊藤弓弦・浅島誠・平林淳ポドカリキシンは新規ヒト iPS/ES 細胞

特異的プローブ rBC2LCN の糖タンパク質リガンドである

第86回日本生化学会(横浜)
口頭発表

2014/3/30

館野浩章

ヒト iPS/ES 細胞特異的レクチンプローブの開発と産業応用

2014年度日本農芸化学会(東京)
依頼講演

2014/8/10

館野浩章

糖鎖レクチン工学による幹細胞評価技術の開発と産業展開

平成26年度(第17回)日本糖質学会(名古屋)
依頼講演

2014/8/11

館野浩章・小沼泰子・伊藤弓弦・平林淳
未分化細胞特異的レクチン BC2LCN の発見と再生医療への応用

平成26年度(第17回)日本糖質学会(名古屋)
依頼講演

2014/11/11

館野浩章・小沼泰子・伊藤弓弦・福田雅和・藁科雅岐・本多進・浅島誠・平林淳

Development of a noninvasive and quantitative detection system of tumorigenic human pluripotent stem cells using cell culture supernatants

5th meeting of Asian Cellular Therapy Organization(大阪)

ポスター発表

2015/3/21

舘野浩章・小沼泰子・伊藤弓弦・福田雅和・
藁科雅岐・本多進・浅島誠・平林淳

培養液を用いた非侵襲的造腫瘍性評価技術
(GlycoStem法)の開発

第14回日本再生医療学会総会パシフィコ(横
浜)

口頭発表

2015/6/24-27

舘野浩章・比江森恵子・鈴木加代・小沼泰子・
伊藤弓弦・平林淳

Development and industrial application of
lectin-based technologies to detect and
eliminate tumorigenic human pluripotent
stem cells for safe cell-based therapy

ISSCR 13th Annual Meeting (スウェーデン)

口頭発表

2015/7/31-8/2

舘野浩章・小沼泰子・伊藤弓弦・浅島誠・平
林淳

薬剤融合型レクチンによる腫瘍原生 ヒト
iPS/ES細胞除去技術の開発

平成27年度(第18回)日本糖質学会(東
京)

2015/9/15-20

舘野浩章・小沼泰子・伊藤弓弦・平林淳

ELIMINATION OF TUMORIGENIC HUMAN
PLURIPOTENT STEM CELLS USING A RECOMBINANT
LECTIN-TOXIN FUSION PROTEIN

23rd International Symposium on
Glycoconjugates (クロアチア)

2016/3/18

舘野浩章・小沼泰子・伊藤弓弦・平林淳

薬剤融合型レクチン(rBC2LCN-PE23)による
ヒト iPS/ES細胞除去技術の開発

第15回日本再生医療学会総会(大阪)

口頭発表

2016/3/19

舘野浩章

培養液を用いた in vitro 造腫瘍性試験の開
発

第15回日本再生医療学会総会依頼講演(大
阪)

ランチョンセミナー(和光純薬工業)

[図書](計3件)

1. Glycoscience: Biology and Medicine.
rBC2LCN, a novel lectin probe for
human pluripotent stem cells. Tateno
H. Springer Japan. 2014, ISBN:
978-4-431-54836-2

2. Sugar Chains. Discovery and
applications of a novel human
pluripotent stem cell-specific lectin
probe rBC2LCN (Chapter 7). Tateno H.
and Hirabayashi, J. 2015 Springer
Japan. ISBN: 978-4-431-55380-9

3. バイオチップの基礎と応用 第3章 高
密度レクチンアレイを用いた細胞評価
技術開発ストラテジーの構築 舘野浩
章 シーエムシー出版 ISBN:
978-4-7813-1079-4

[産業財産権]

出願状況(計3件)

名称: 未分化細胞除去方法

発明者: 舘野浩章、伊藤弓弦、小沼泰子、平
林淳、浅島誠

権利者: 産業技術総合研究所

種類:

番号: PCT/JP2014/053317

出願年月日: H26/02/13

国内外の別: 国内・国外

名称: 幹細胞を検出するための方法及びキッ
ト

発明者: 舘野浩章、藁科雅岐、福田雅和、平
安一成

権利者: 産業技術総合研究所、和光純薬工業

種類:

番号: 特願 2015-053802

出願年月日: H27/03/17

国内外の別: 国内

名称：未分化細胞検出方法及び複合糖質検出方法

発明者：舘野浩章、平林淳、久野敦、伊藤弓弦、小沼泰子、浅島誠、藁科雅紀

権利者：産業技術総合研究所、和光純薬工業種類：

番号：PCT/JP2012/006983

出願年月日：H24/10/31

国内外の別：国内・国外

取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舘野 浩章 (TATEN0, Hiroaki) 国立研究開発法人 産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号：30450670

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：