

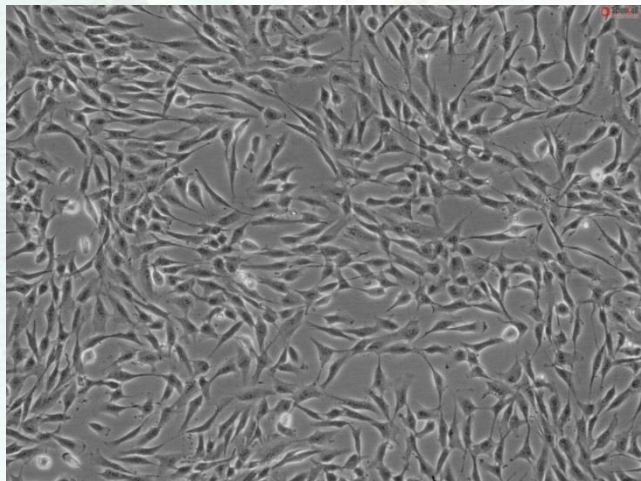
「再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システム開発成果報告会」

レクチンを用いたヒトES/iPS細胞 検出除去技術の開発

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
舘野 浩章

ヒト人工多能性幹細胞 (iPS細胞)

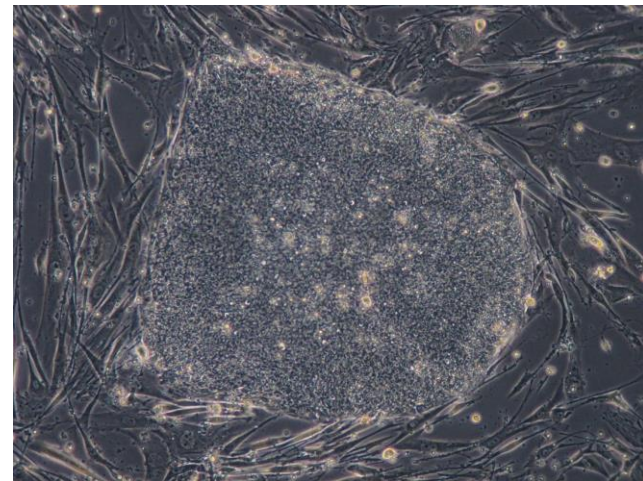
体細胞 (分化)



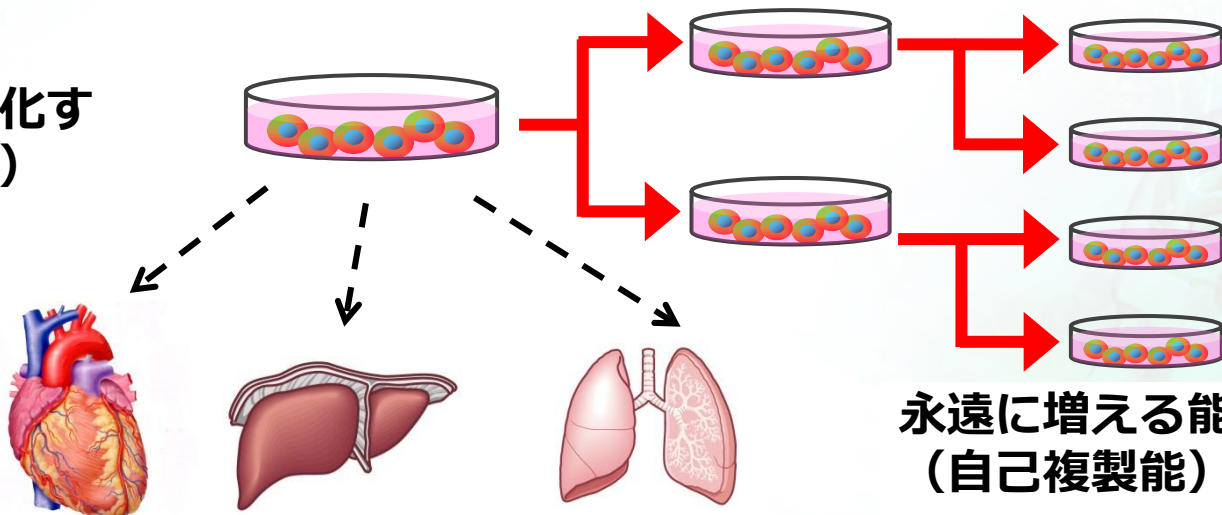
山中 4 因子
(Oct3/4, Sox2,
Klf4, c-Myc)



iPS細胞 (未分化)

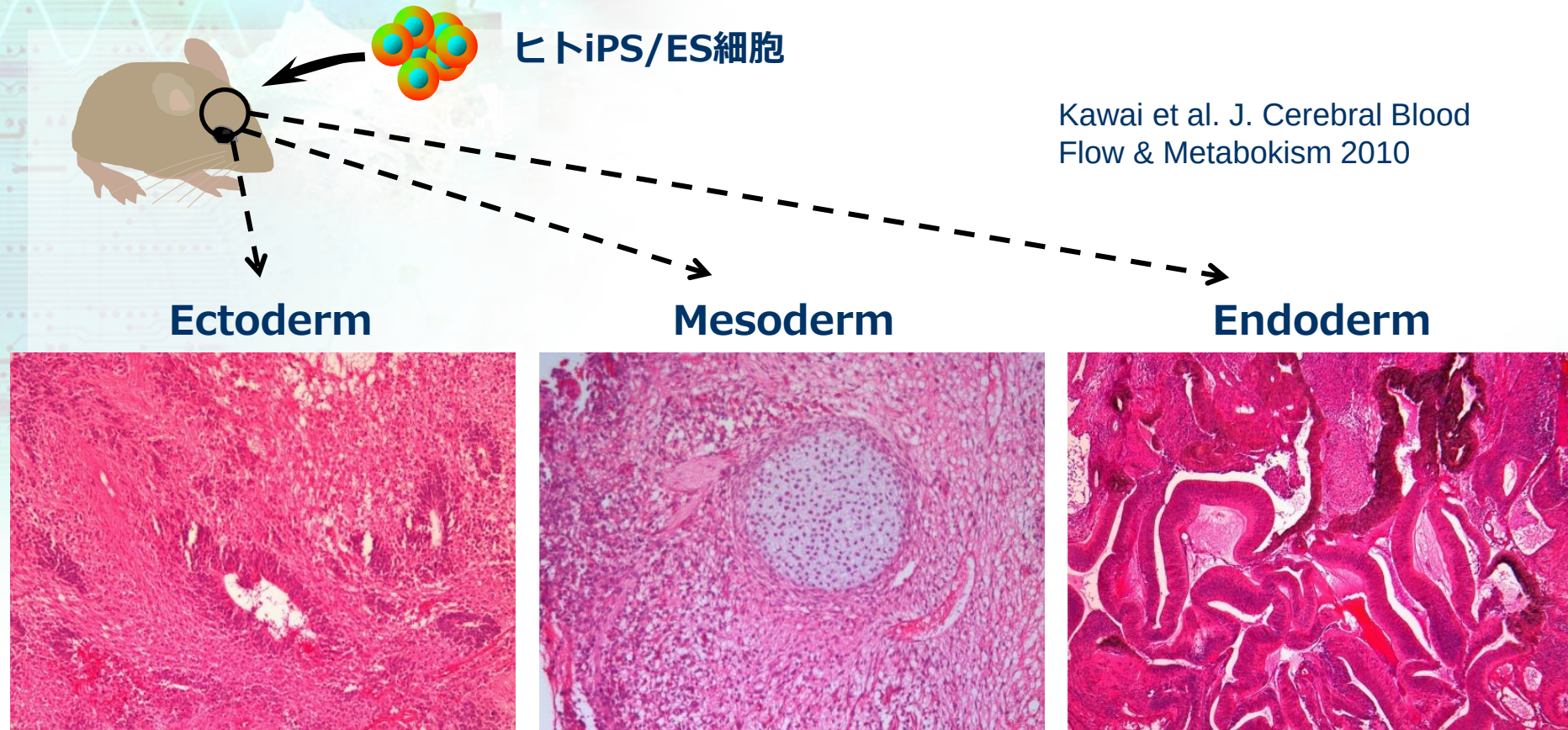


様々な細胞に分化す
る能力 (多能性)



永遠に増える能力
(自己複製能)

ヒトiPS細胞を医療応用する際の最大の課題: **造腫瘍性**



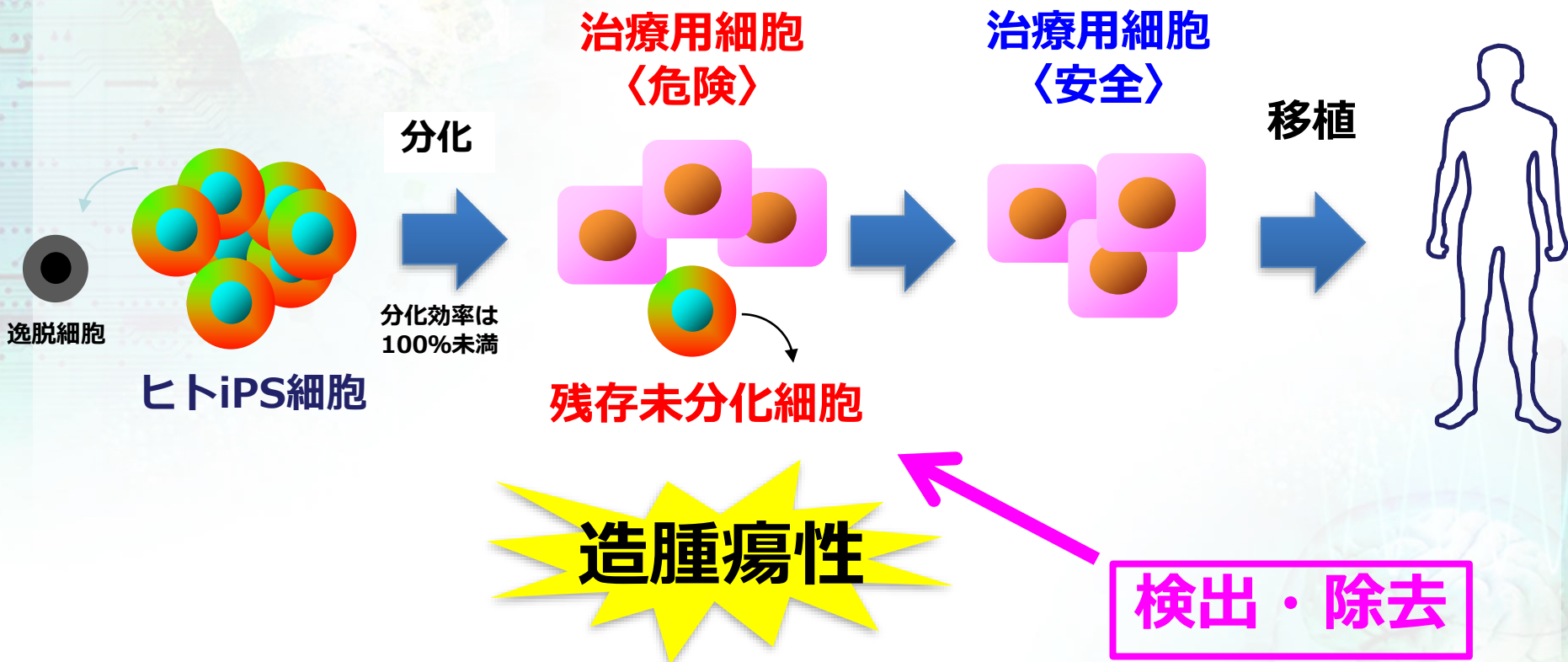
iPS細胞をそのままマウス脳に移植すると、テラトーマ（良性腫瘍）が形成されてしまう

P13-14

3 最終製品の構成要素となる細胞の特性解析

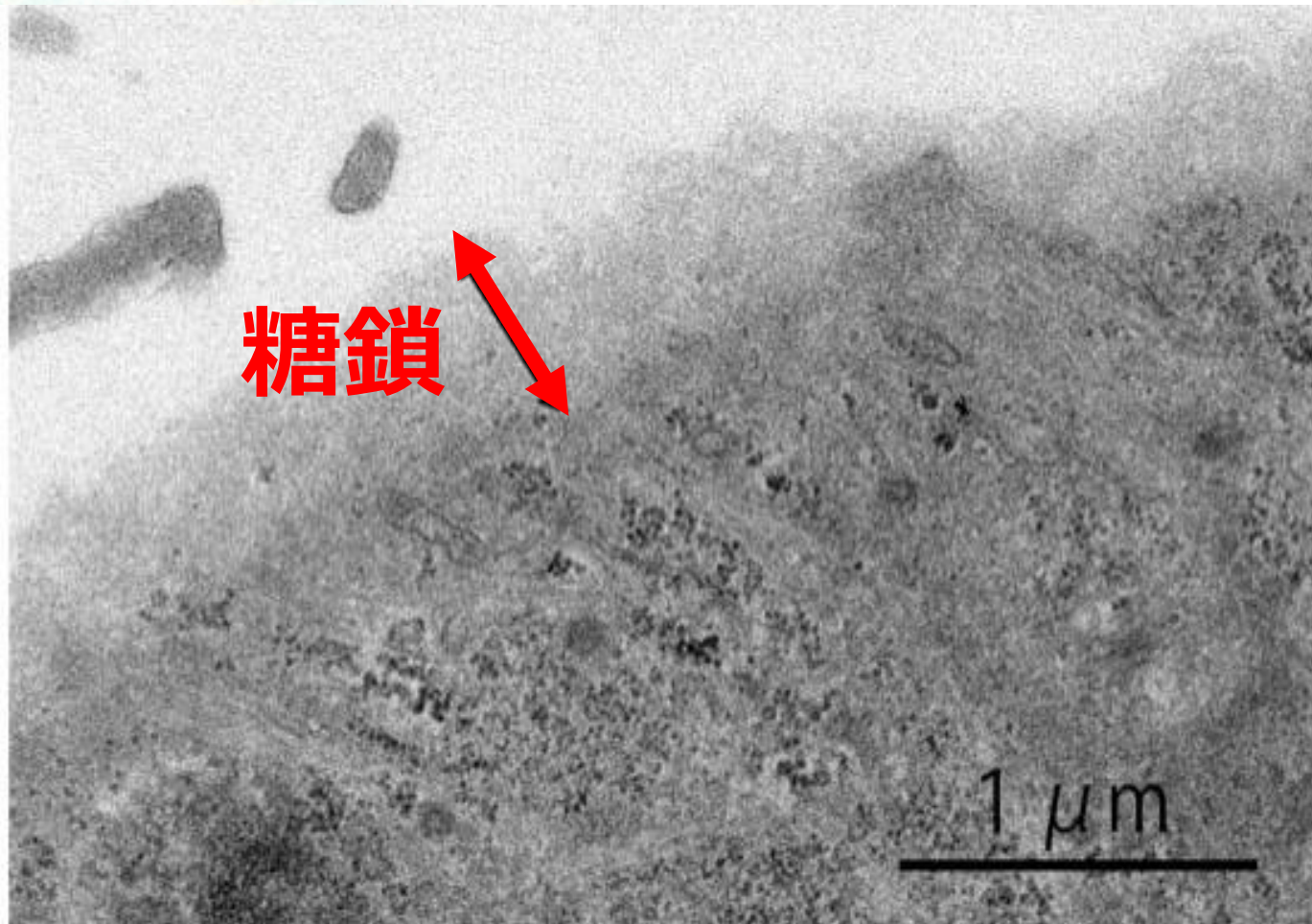
最終製品の構成要素となる細胞については、例えば、未分化細胞の混入や目的外の細胞の混入を規定するための細胞純度をはじめとして、細胞生存率、形態学的特徴、細胞増殖特性、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質、核型、分化能その他適切な遺伝型又は表現型の指標を解析するとともに、必要に応じて機能解析を行うこと。また、培養期間の妥当性及び細胞の安定性を評価するために、予定の培養期間を超えて培養した細胞において目的外の変化がないことを適切な細胞特性指標等を用いて示すこと。これらの検討に際しては、あらかじめ試験的検体を用いた検討によって実施・検証しておくことでも良いが、これらの検討結果から患者由来の細胞に適用する際に選択すべき重要細胞特性指標を明らかにしておくこと。検討に際しては、検体の量的制限や技術的限界もあり、可能な範囲で考慮すればよい。適用後に体内での増殖等を期待する場合には、設定された基準による継代数又は分裂回数で期待された機能を発揮することを明らかにすること。

ヒト多能性幹細胞を検出・除去する技術



iPS細胞表層も糖鎖で覆われている

Electromicroscopic photograph of hiPSCs

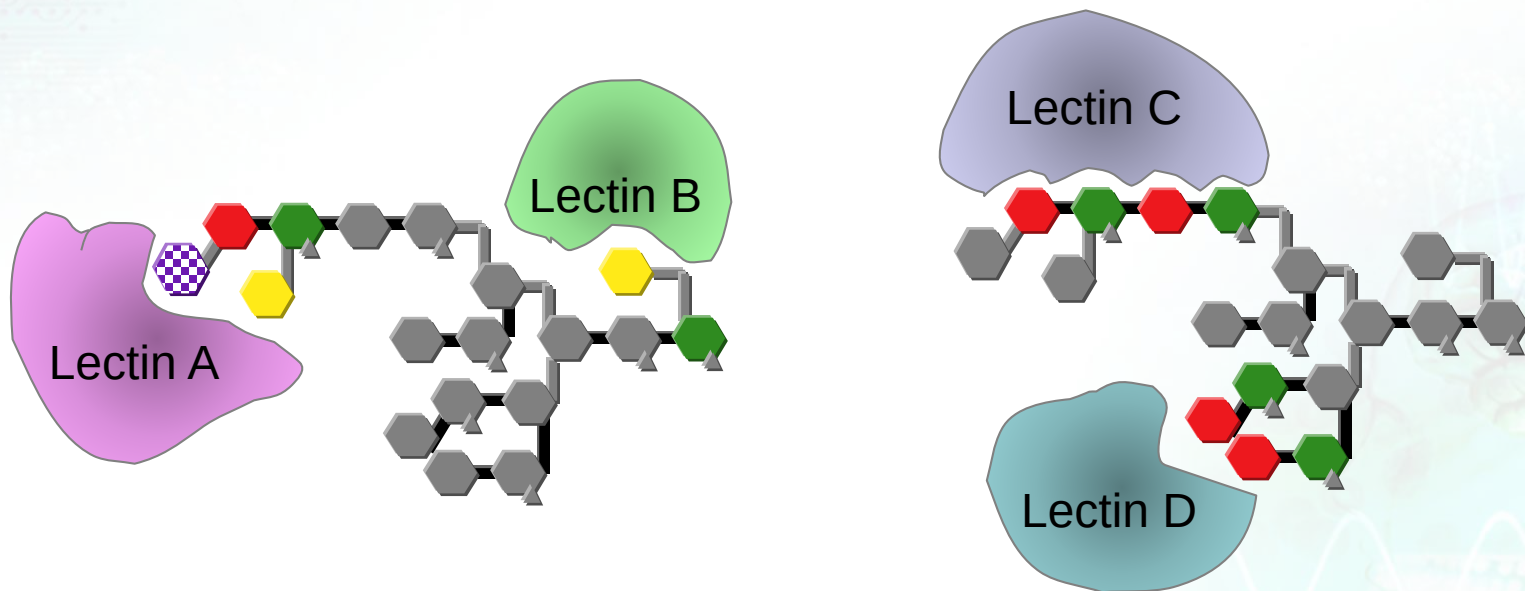


Collaboration with Dr. Yoshihiro Akimoto

Time consuming, laborious, and requires a lot of samples

Concept: Lectinⁿ

A large number of glycans can be classified using a panel of lectins with different glycan-binding specificity

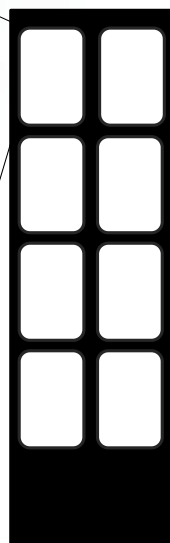


高密度レクチンマイクロアレイ

レクチンマイクロアレイ (~100種のレクチン)



Cy3-BSA (Marker)				
1	●	○	○	○
2	●	○	○	○
3	○	○	○	○
4	●	○	○	○
5	○	○	○	○
6	●	○	○	○
7	○	○	○	○
8	●	○	○	○
9	○	○	○	○
10	●	○	○	○
11	○	○	○	○
12	●	○	○	○
13	○	○	○	○
14	●	○	○	○
15	○	○	○	○
16	●	○	○	○
17	○	○	○	○
18	●	○	○	○
19	○	○	○	○
20	●	○	○	○
21	○	○	○	○
22	●	○	○	○
23	○	○	○	○
24	●	○	○	○



エバネッセント波励起蛍光型 スキャナー

**GlycoStation
 Reader 1200**
 (GlycoTechnica)



Bio-REX Scan 200
 (Rexxam)



**迅速・高感度に様々な種類の生体試料の
 糖鎖プロファイルを取得可能**

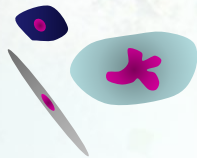
解析した細胞

Cells	Number
MRC5(fetal lung)-derived hiPSCs	12
AM(amnion)-derived hiPSCs	36
UtE(endometrium)-derived hiPSCs	27
PAL(placental artery)-derived hiPSCs	27
Dermal fibroblast-derived hiPSCs	12
hESCs	9
Somatic cells, mouse feeder cells	12
Total	135

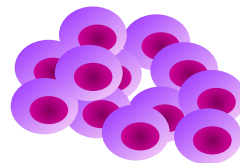


クラスター解析の結果

体細胞
(分化)

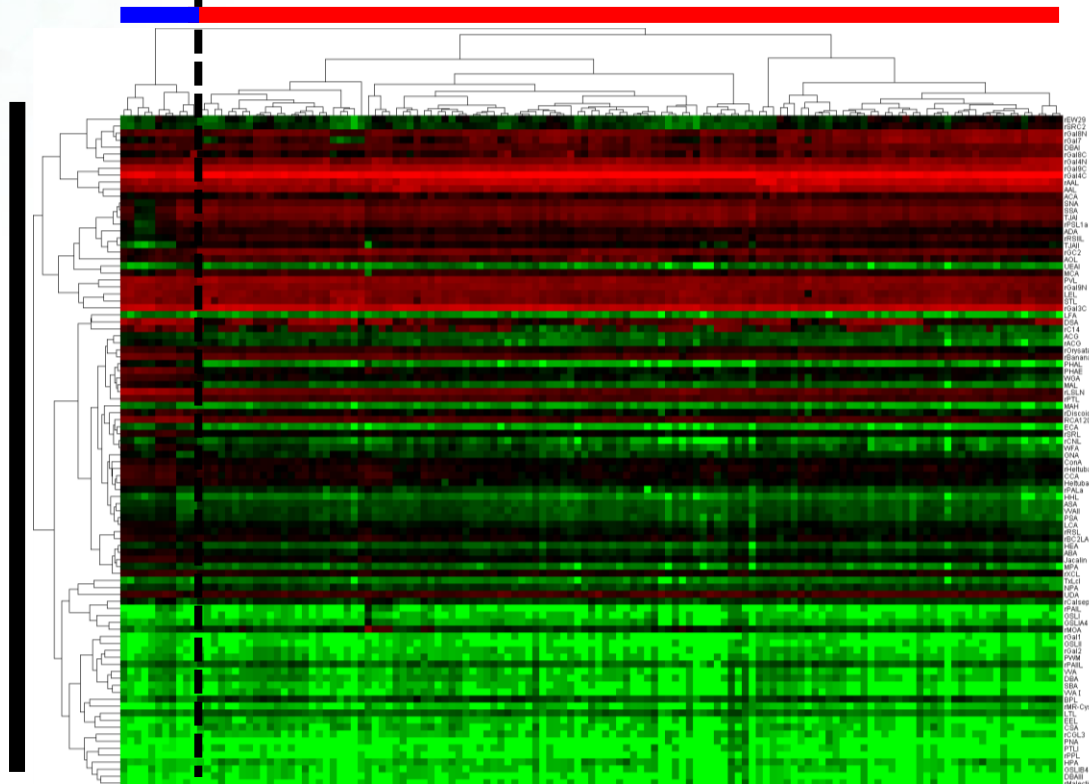


ヒトiPS細胞/ES細胞
(未分化)



細胞表層糖鎖も
リプログラムされる

96 lectins



Tateno et al.
 J Biol Chem
 2011

HPLC/TOF-MSによる定量的糖鎖構造解析

Fibroblasts,
hiPSCs (201B7)



Hydrazinolysis



Re-N-acetylation



Pyridylation



Anion exchange HPLC



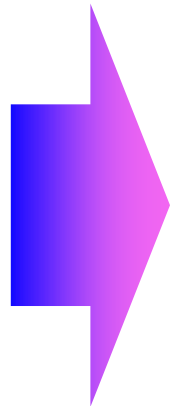
Size-fractionation HPLC



Reverse-phase HPLC

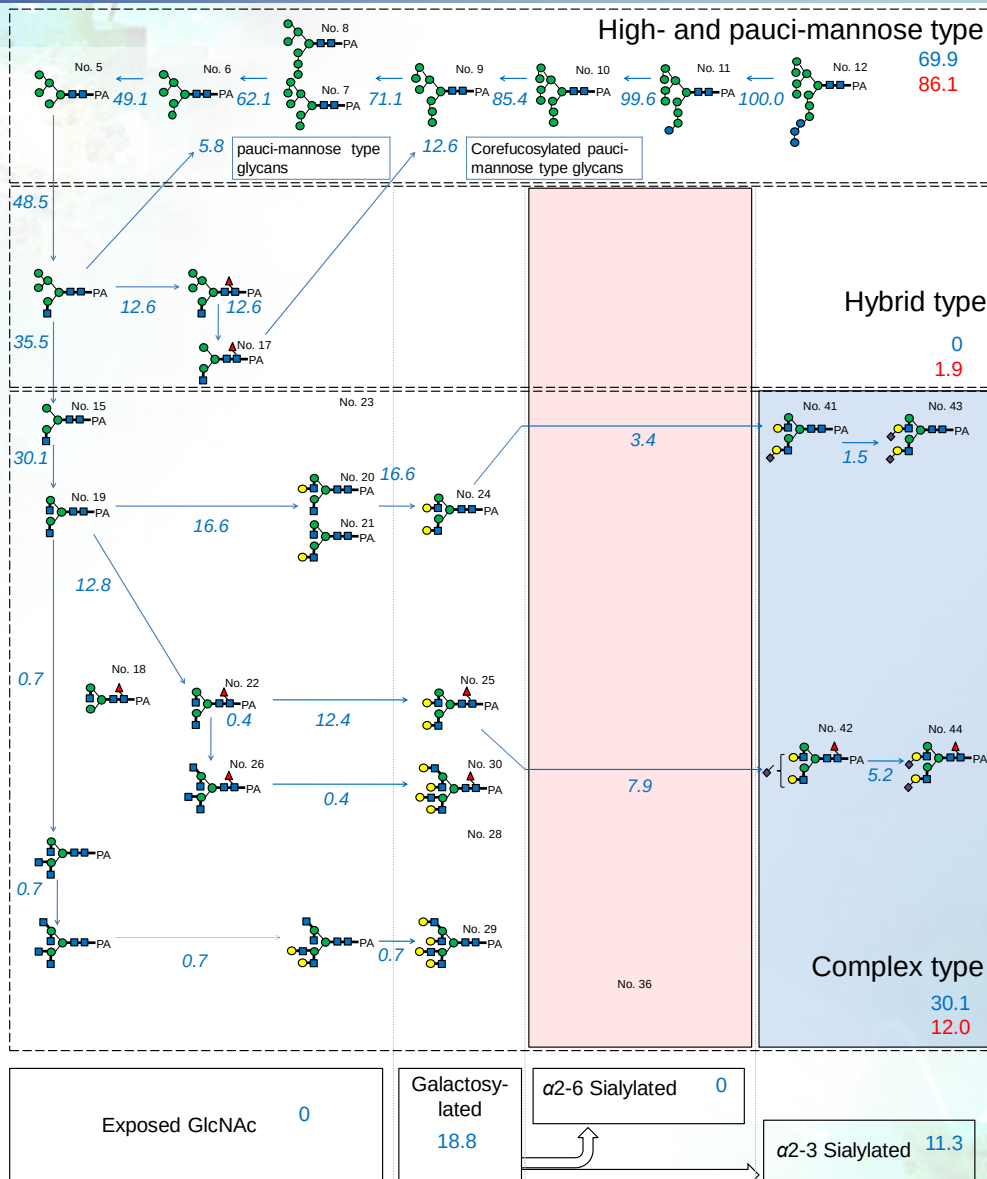


MALDI-TOF-MS

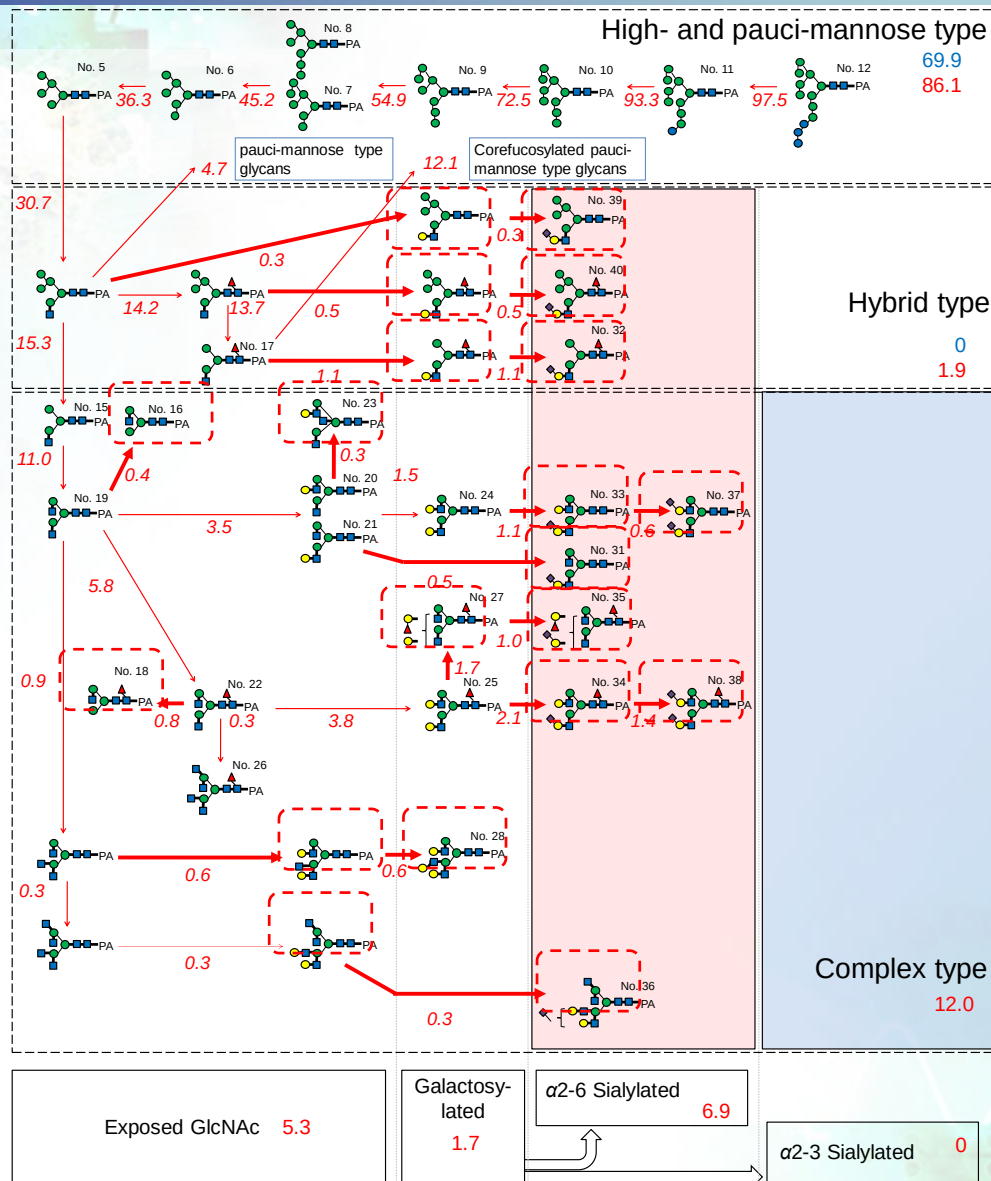


	Fibroblasts	hiPSCs (201B7)
N-glycans	20	37
O-glycans	7	10
Total	27	47

ヒト線維芽細胞のN型糖鎖マップ



ヒトiPS細胞のN型糖鎖マップ



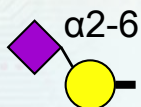
ヒト多能性幹細胞が発現する特徴的な糖鎖

Terminal structure

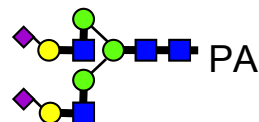
Typical structure

Glycotransferease

Sia

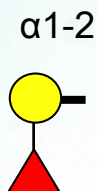


N-glycan

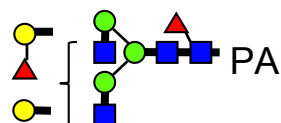


ST6GAL1
ST6GAL2

Fuc

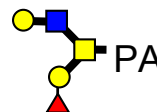


N-glycan

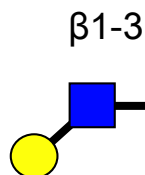


FUT1
FUT2

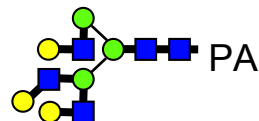
O-glycan



Type1
LacNAc

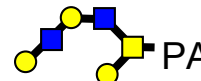


N-glycan



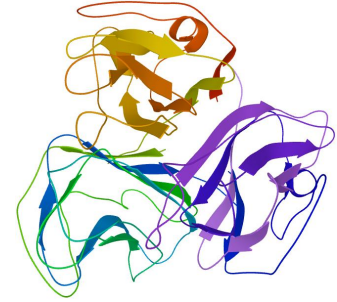
B3GALT5

O-glycan

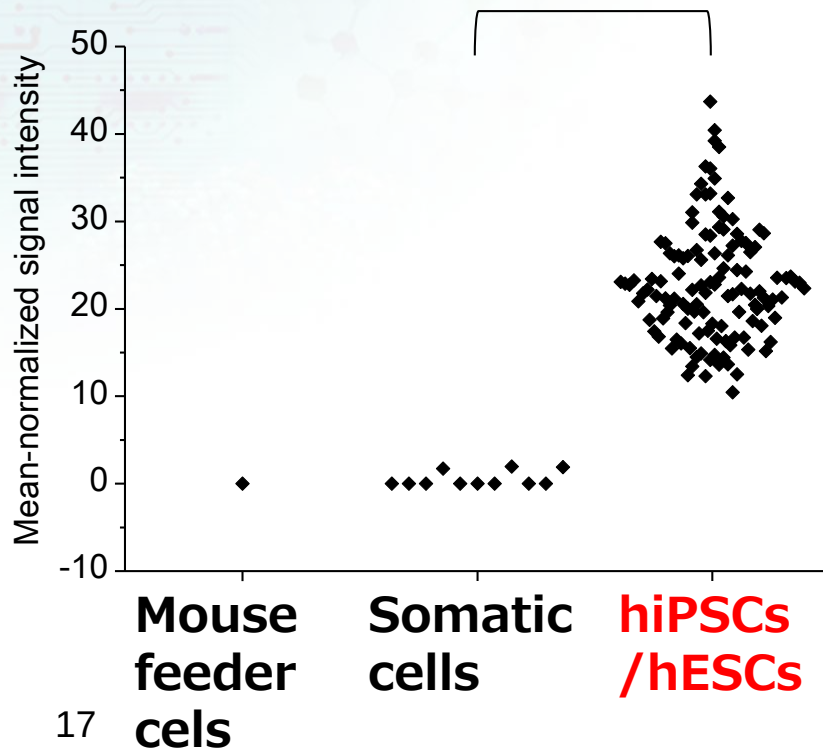


ヒト多能性幹細胞特異的レクチンの発見

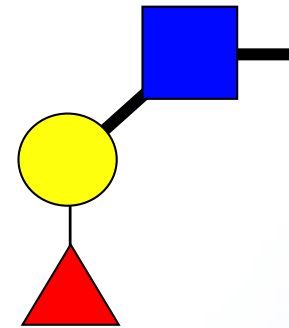
rBC2LCN (*Burkholderia cenocepacia*由来BC2L-C
レクチンのN末端ドメイン)



FWER = 1.92E-19

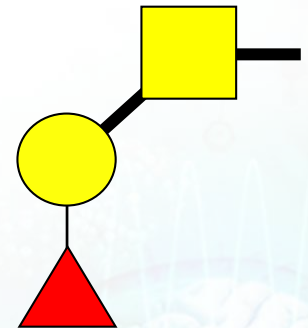


H type1



Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc

H type3



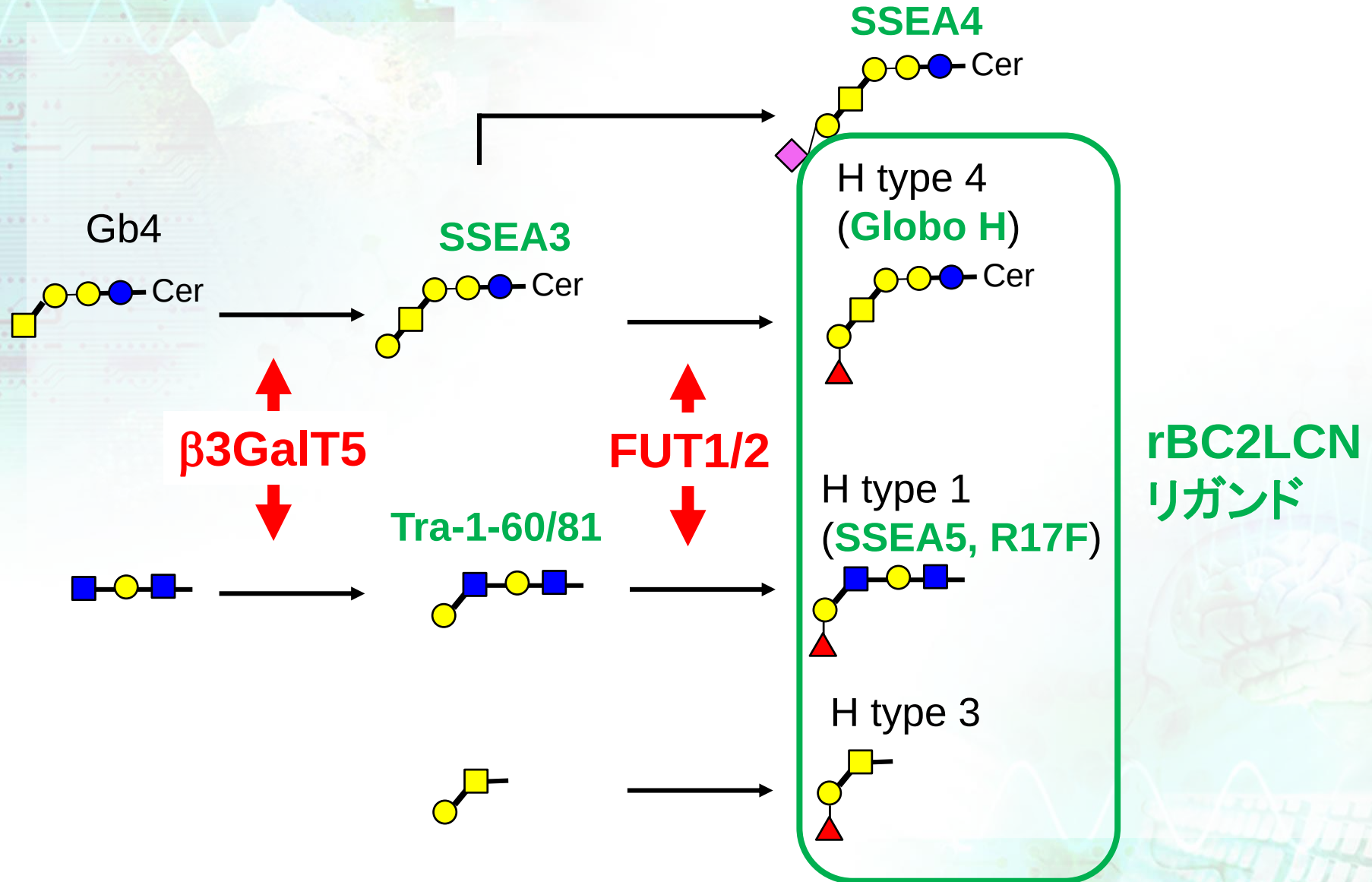
Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc

 **ヒト多能性幹細胞マーカー**

Tateno et al. J Biol Chem 2011

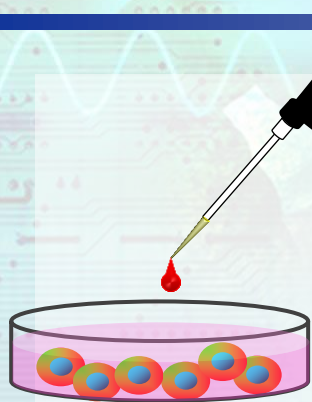
Hasehira et al. Mol Cell Proteomics 2012

rBC2LCNレクチンリガンドは 他の多能性幹細胞マーカーと密接に関係

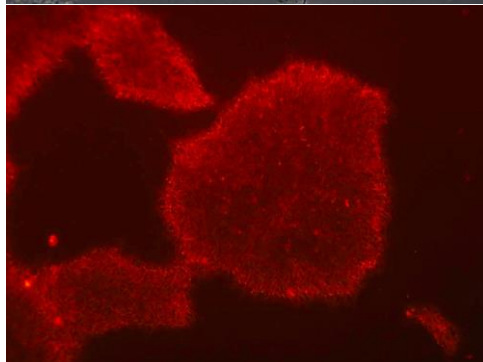
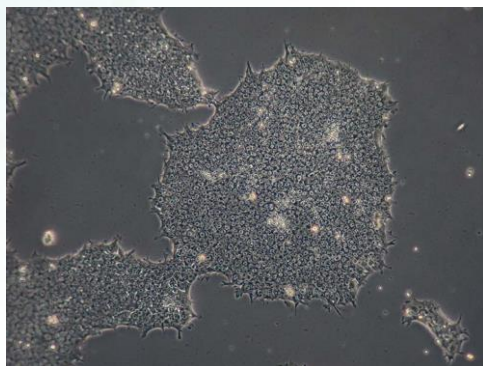


ヒト多能性幹細胞の生染色

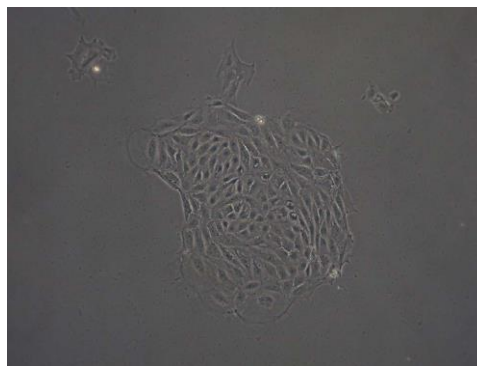
蛍光標識rBC2LCNレクチンを培養液に添加



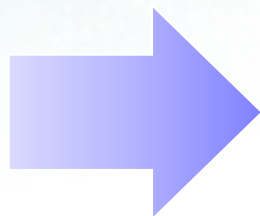
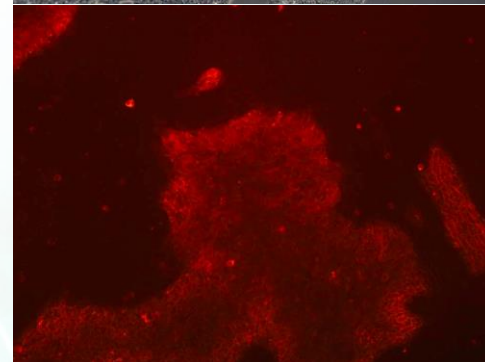
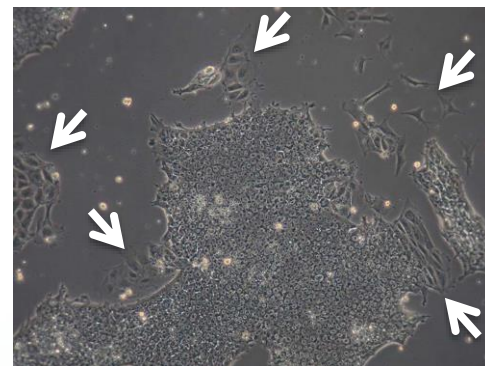
hiPSCs



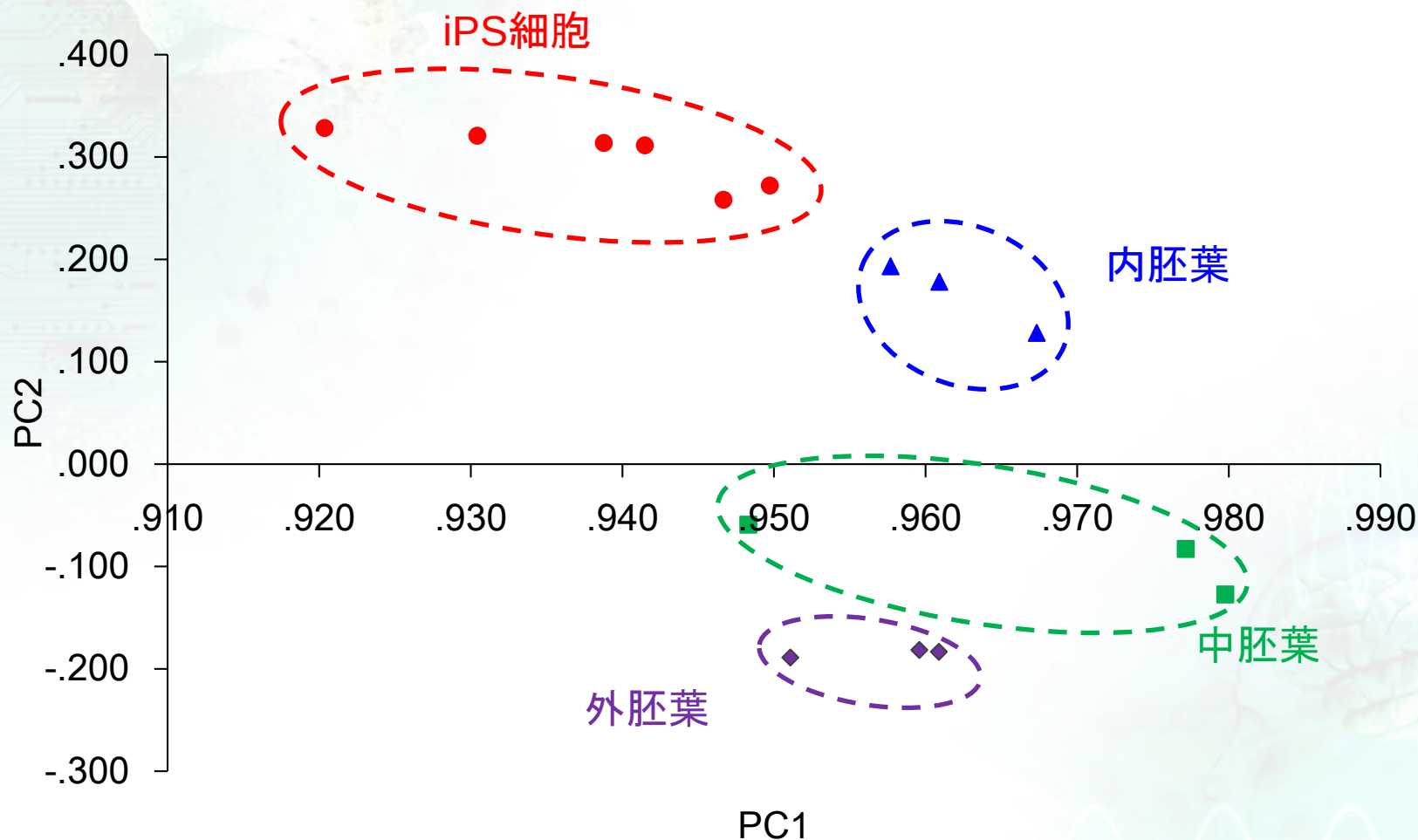
Cells deviated
from hiPSCs



Mixed population

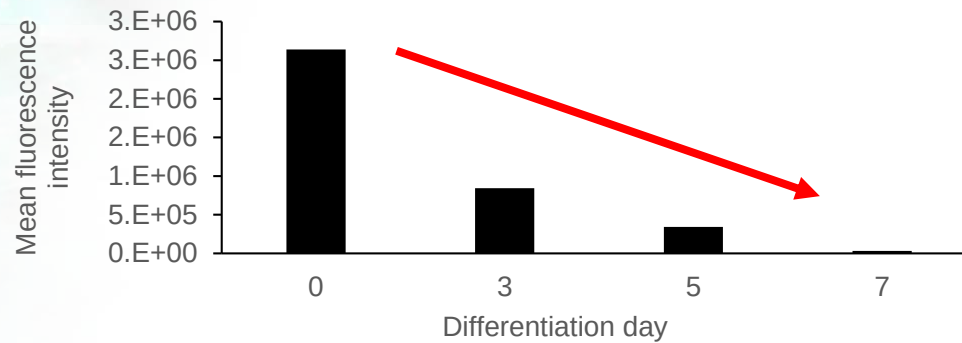


三胚葉への分化に伴い糖鎖プロファイルが変化

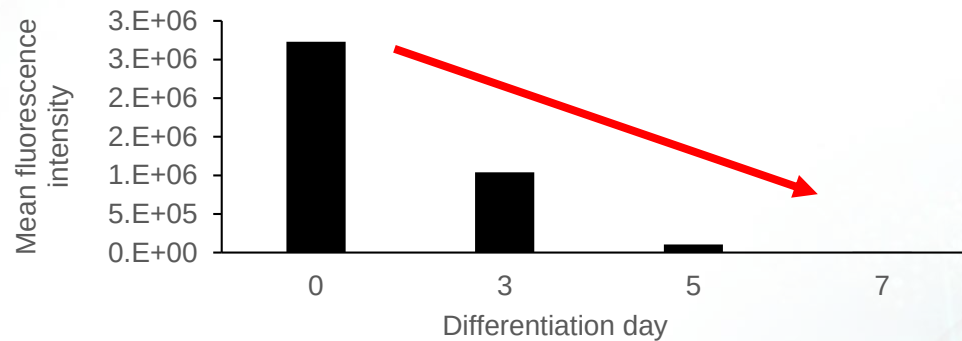


rBC2LCNレクチンの反応性は分化に伴い低下

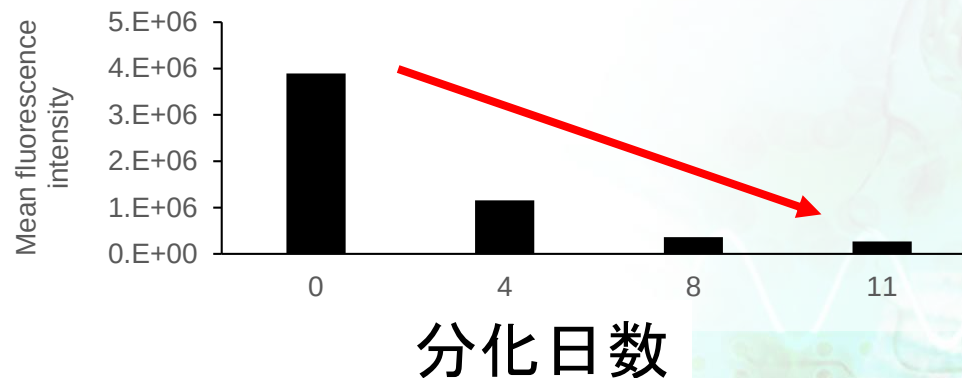
内胚葉分化



中胚葉分化



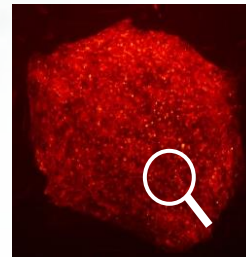
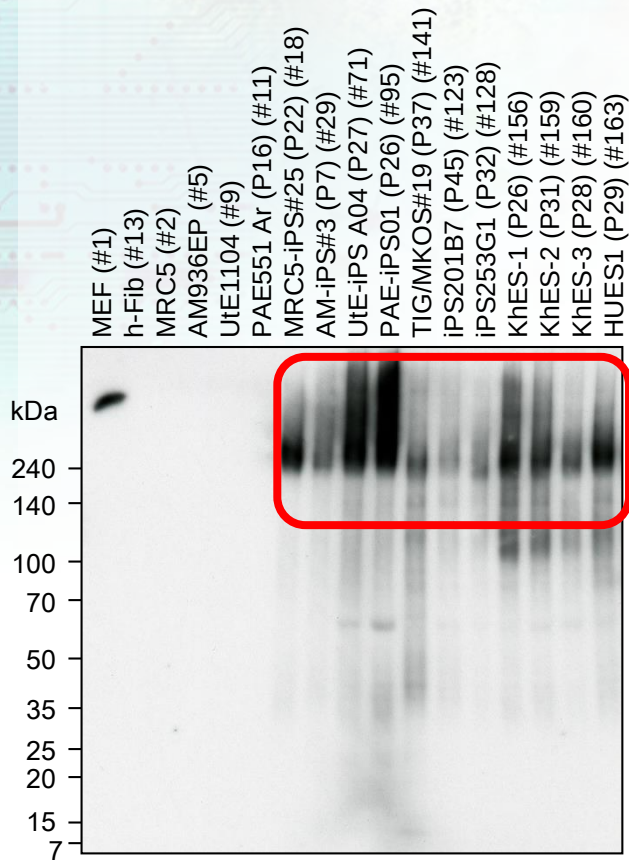
外胚葉分化



rBC2LCNレクチンのヒトiPS細胞への 結合メカニズム

rBC2LCN blot

Somatic cell hiPSC hESC



Enlarge

Podocalyxin

rBC2LCN

Podocalyxin
(membrane protein)

◆ : H type 3
◆ (Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc)

Extracellular

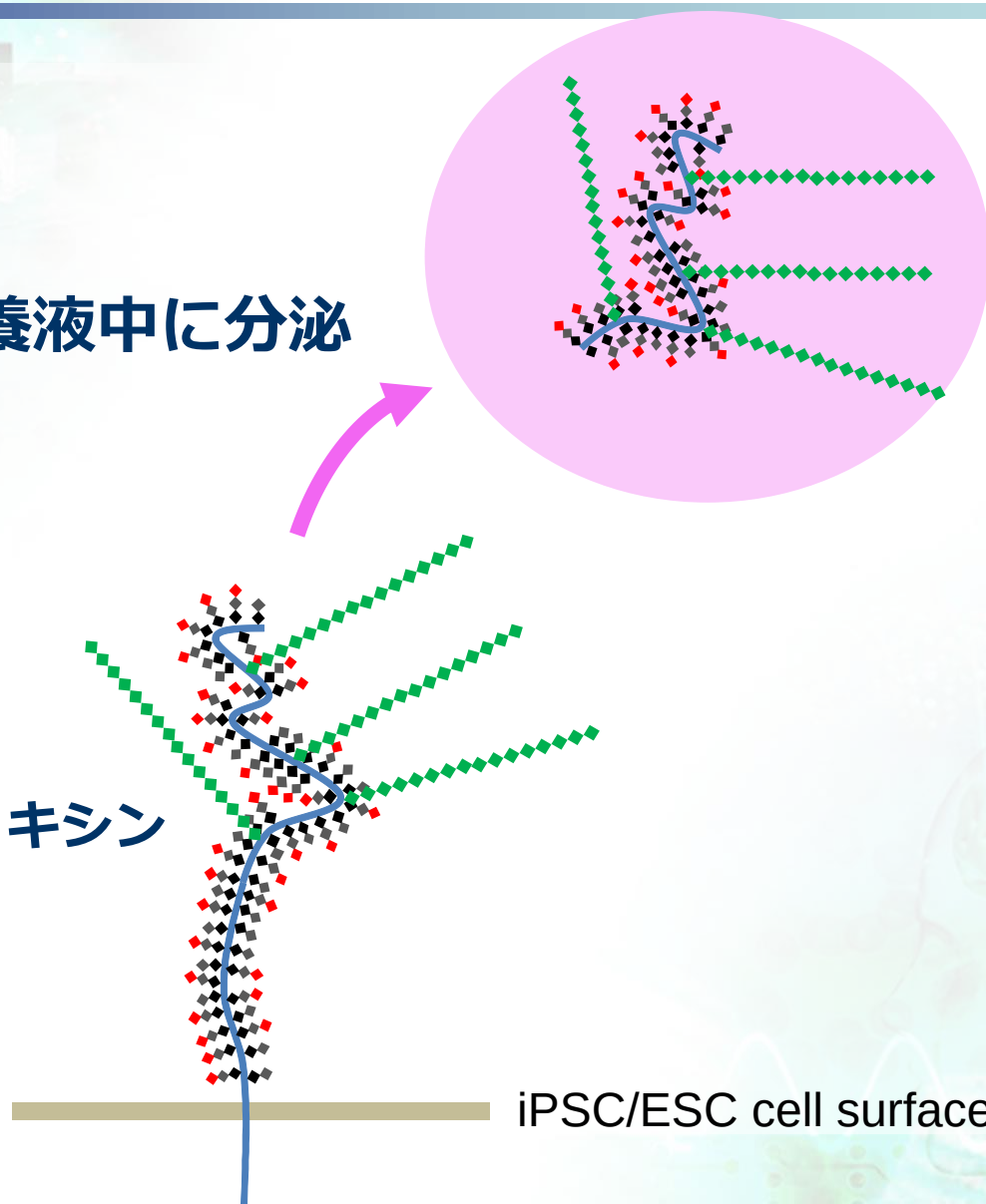
Intracellular

iPSC
surface

rBC2LCN陽性ポドカリキシンは培養液中に分泌される

培養液中に分泌

rBC2LCN陽性ポドカリキシン



iPSC/ESC cell surface

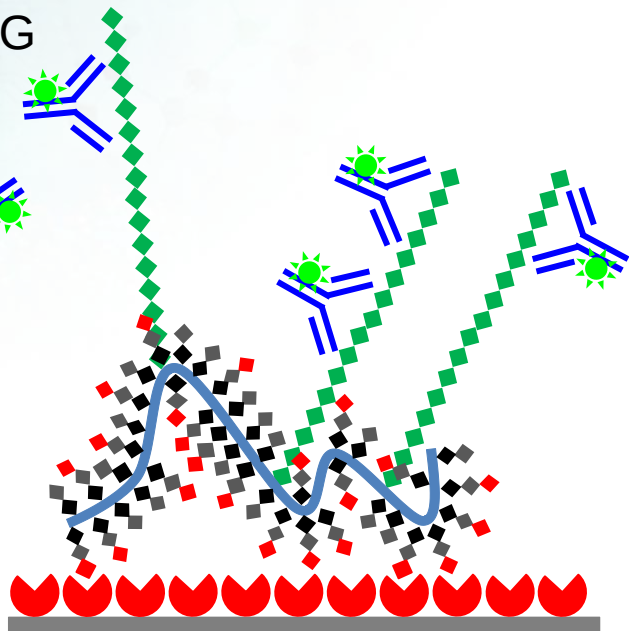
培養液を用いて多能性幹細胞を検出する技術を開発

rBC2LCN-R10Gサンドイッチ アッセイ

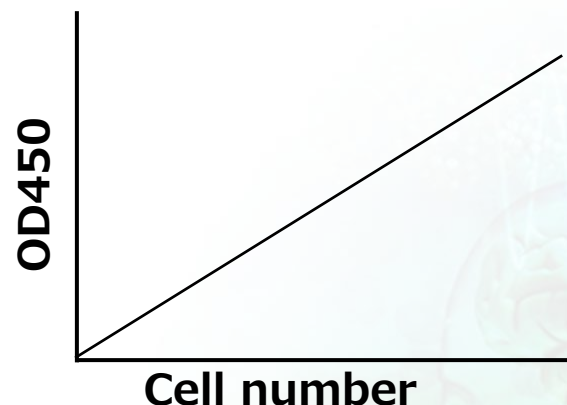
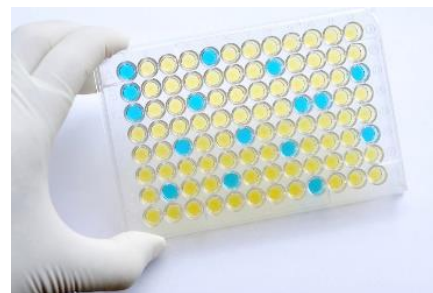
Peroxidase-
labeled R10G
antibody

H type3-
podocalyxin

rBC2LCN



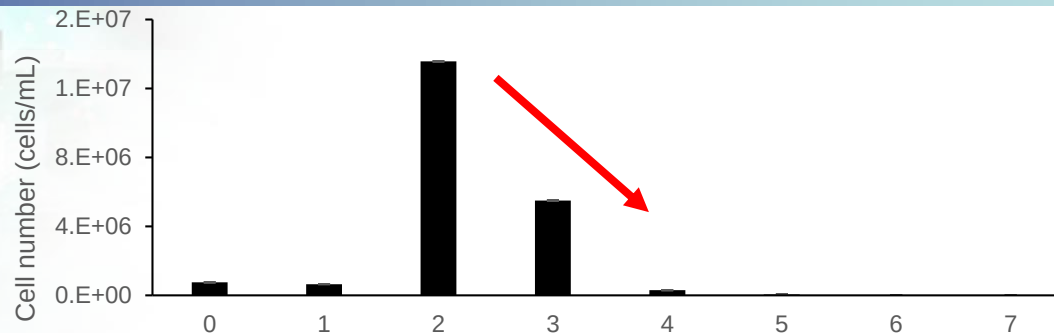
ヒト多能性幹細胞数を測定



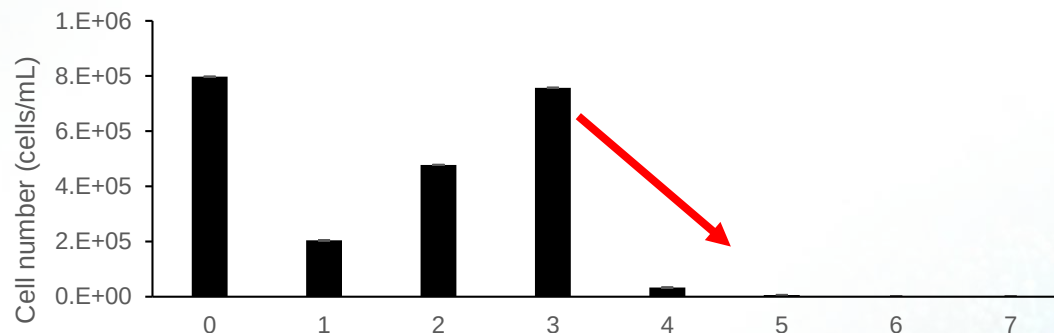
LLOD = 0.0006%の未分化細胞数

三胚葉分化に伴う未分化細胞数のモニタリング

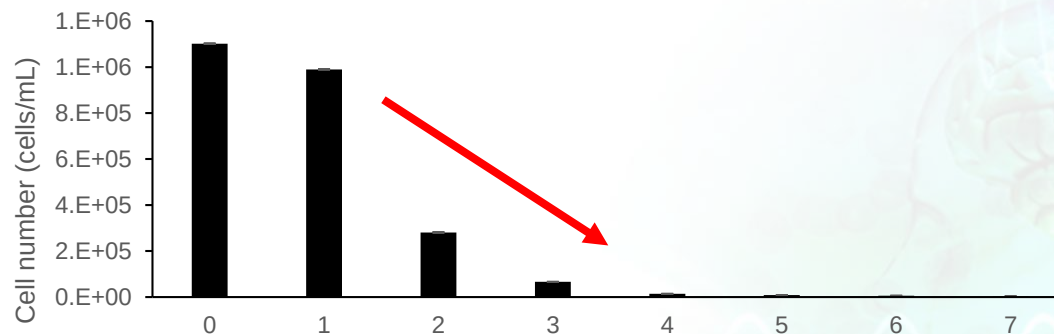
内胚葉



中胚葉



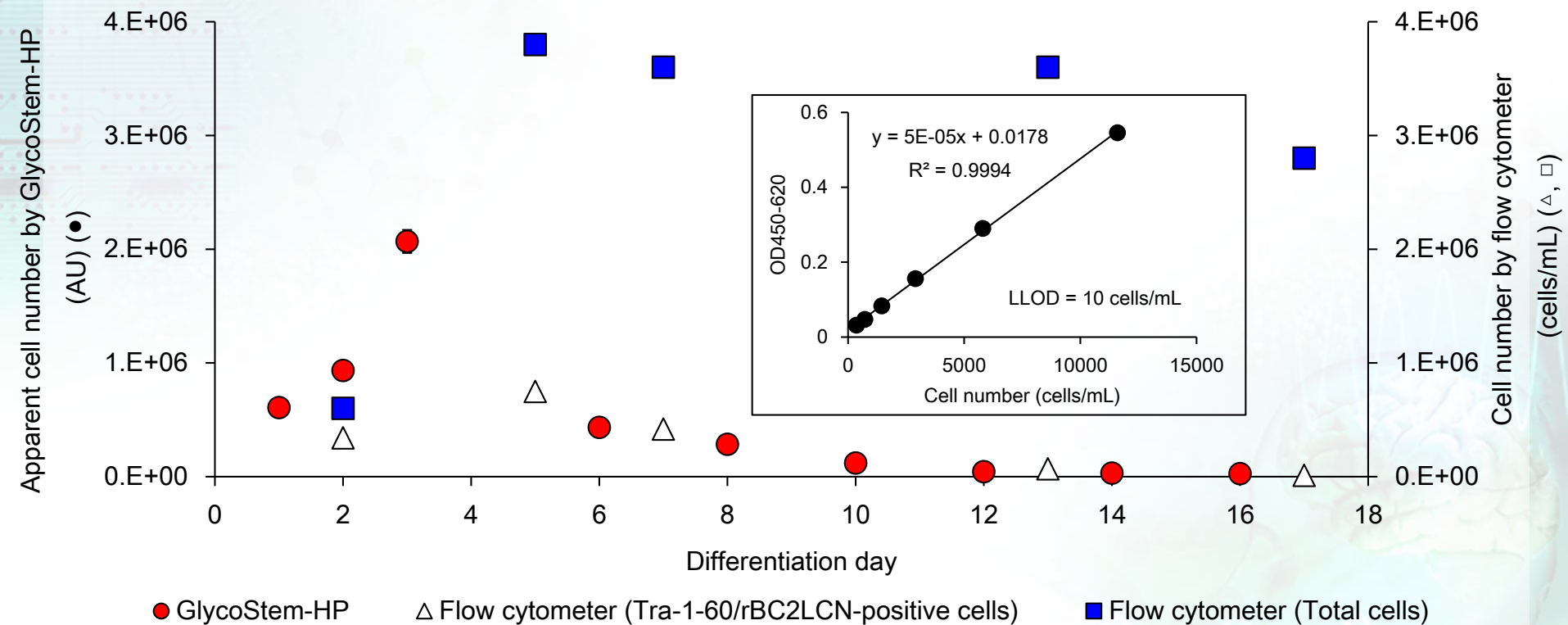
外胚葉



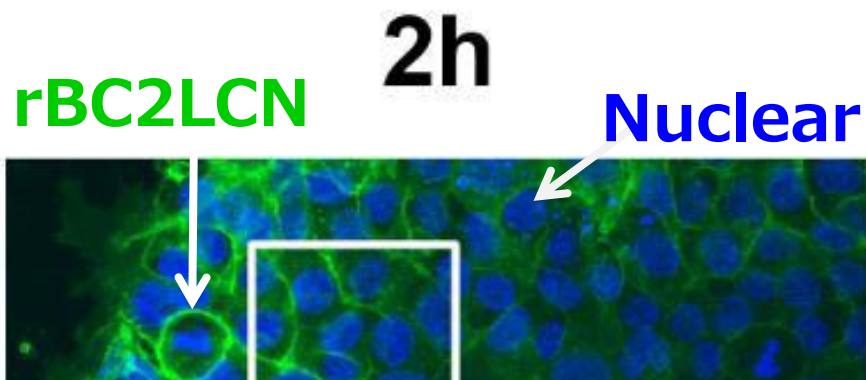
分化日数

iPS細胞の心筋分化過程における未分化 細胞数のモニタリング

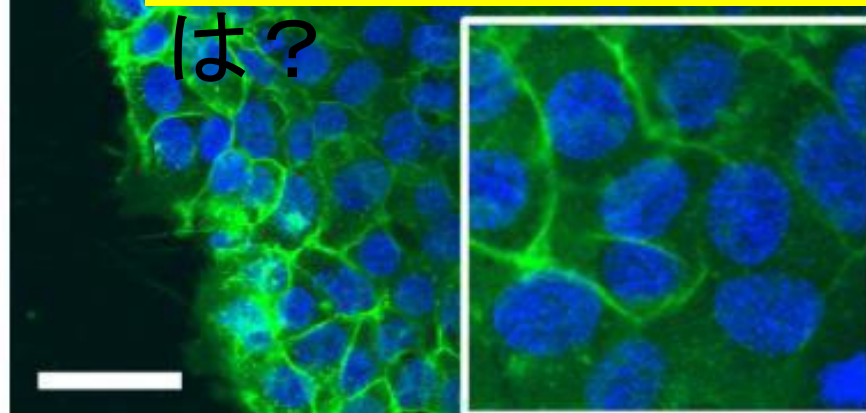
EB formation Mesoderm induction Induction of cardiac progenitors Expansion and maintenance of cardiomyocytes



rBC2LCNレクチンは細胞内に内在化する



rBC2LCNレクチンをヒトiPS細胞内に薬
剤を送達するDDDSとして使用できるの
は？



rBC2LCNレクチン-薬剤複合体の開発

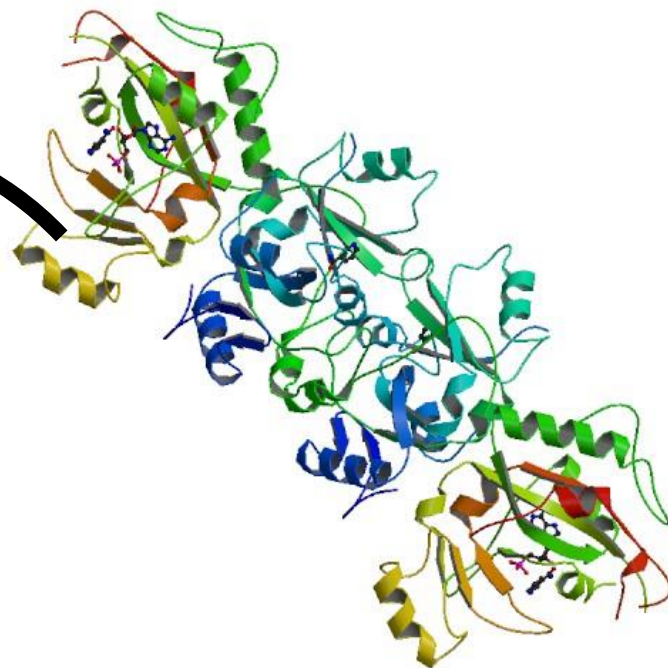
rBC2LCNレクチン

iPSCs/ESCs Targeting

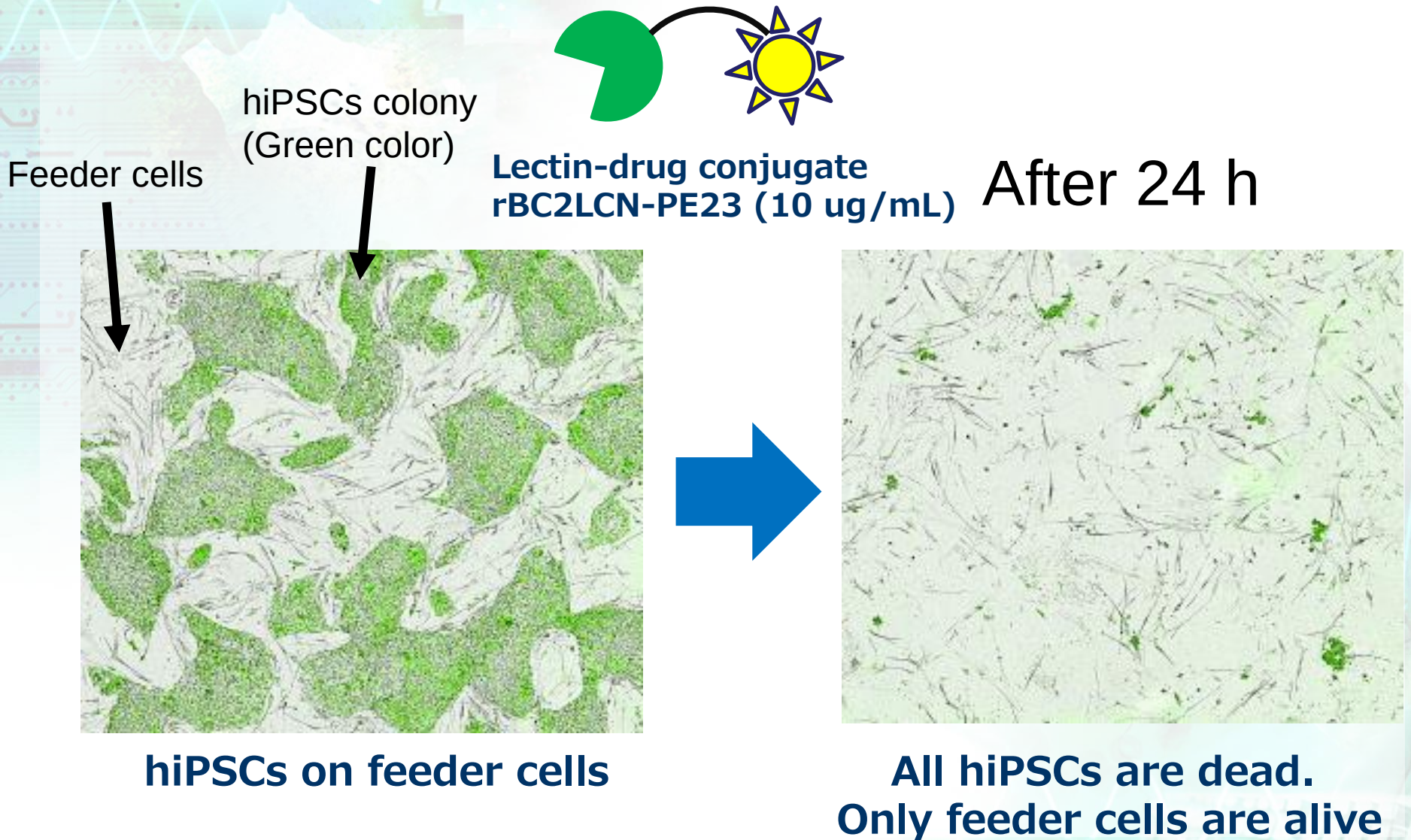


緑膿菌外毒素 (PE23)

Inhibit protein synthesis by
ADP-ribosylation of eEF2

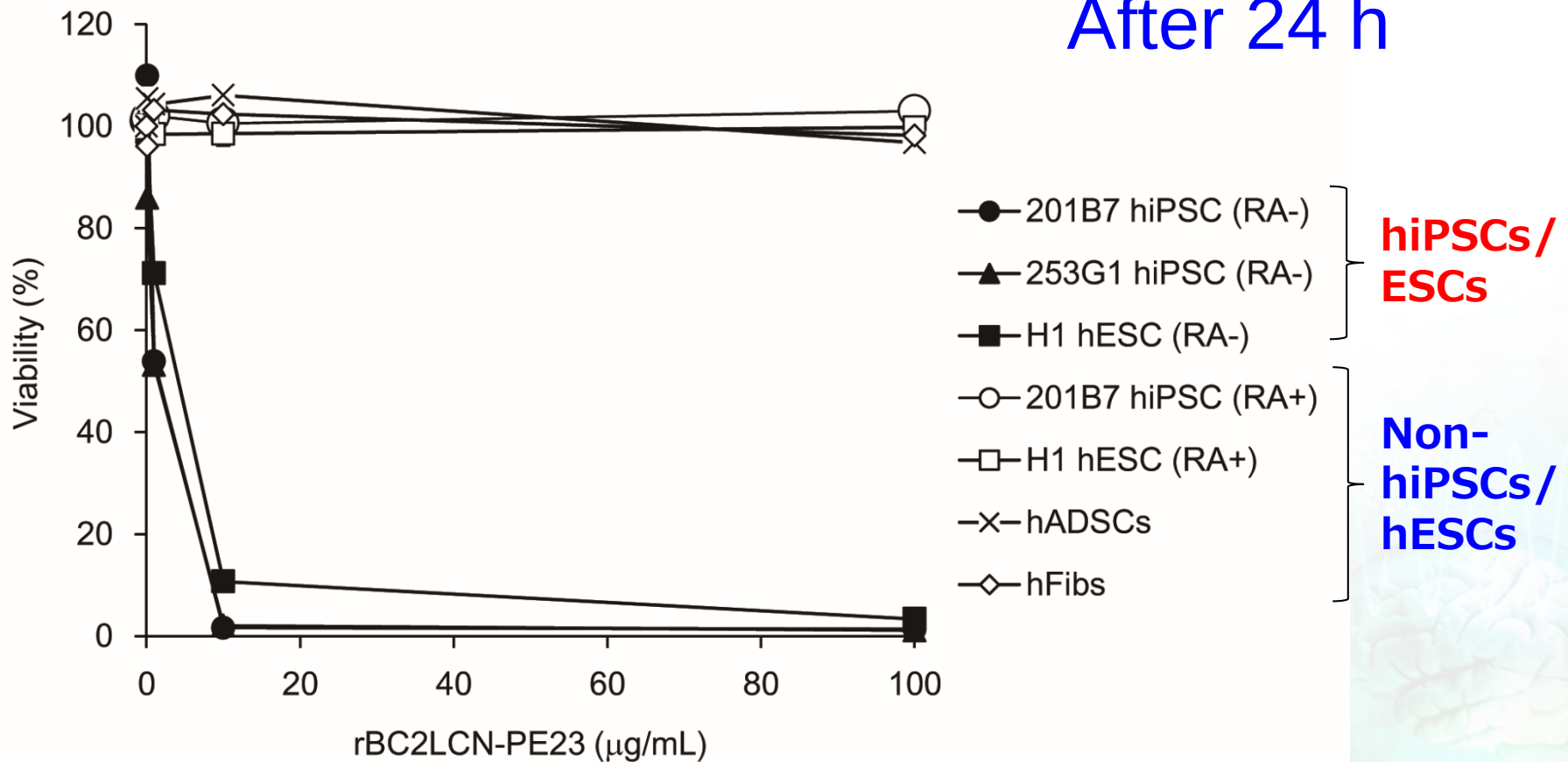


未分化細胞の除去

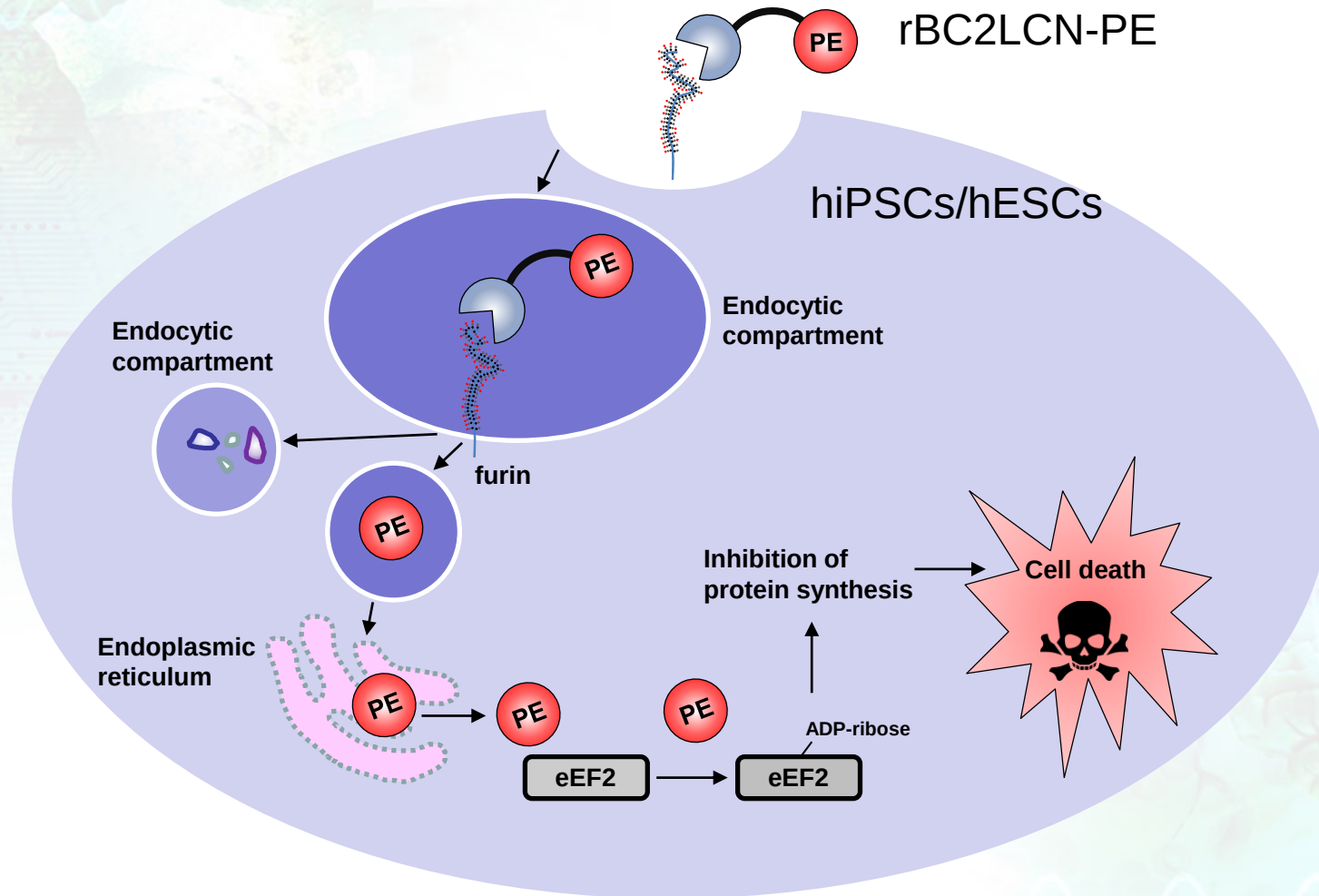


rBC2LCN-PE23の未分化細胞除去効果

After 24 h

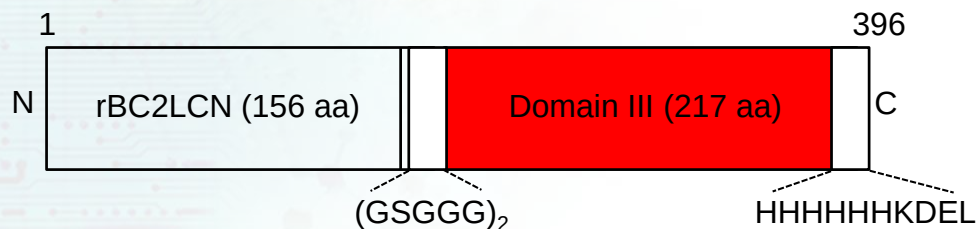


殺傷機構

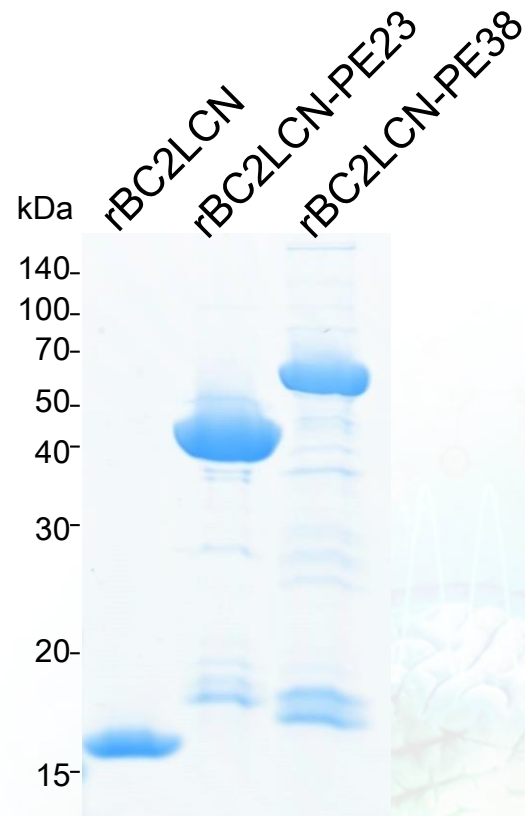
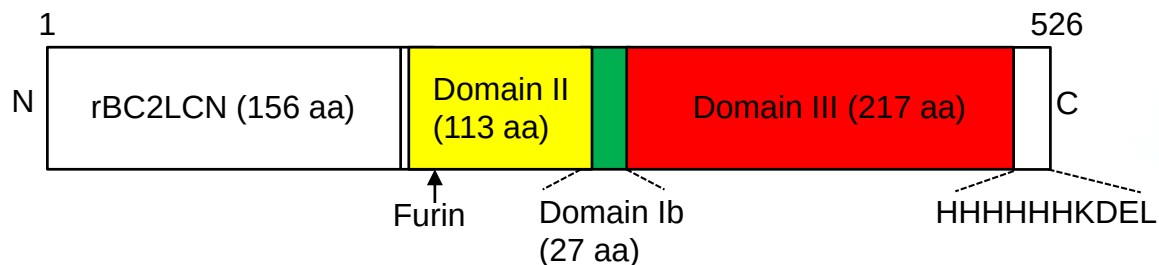


殺傷効果の高い除去剤の開発

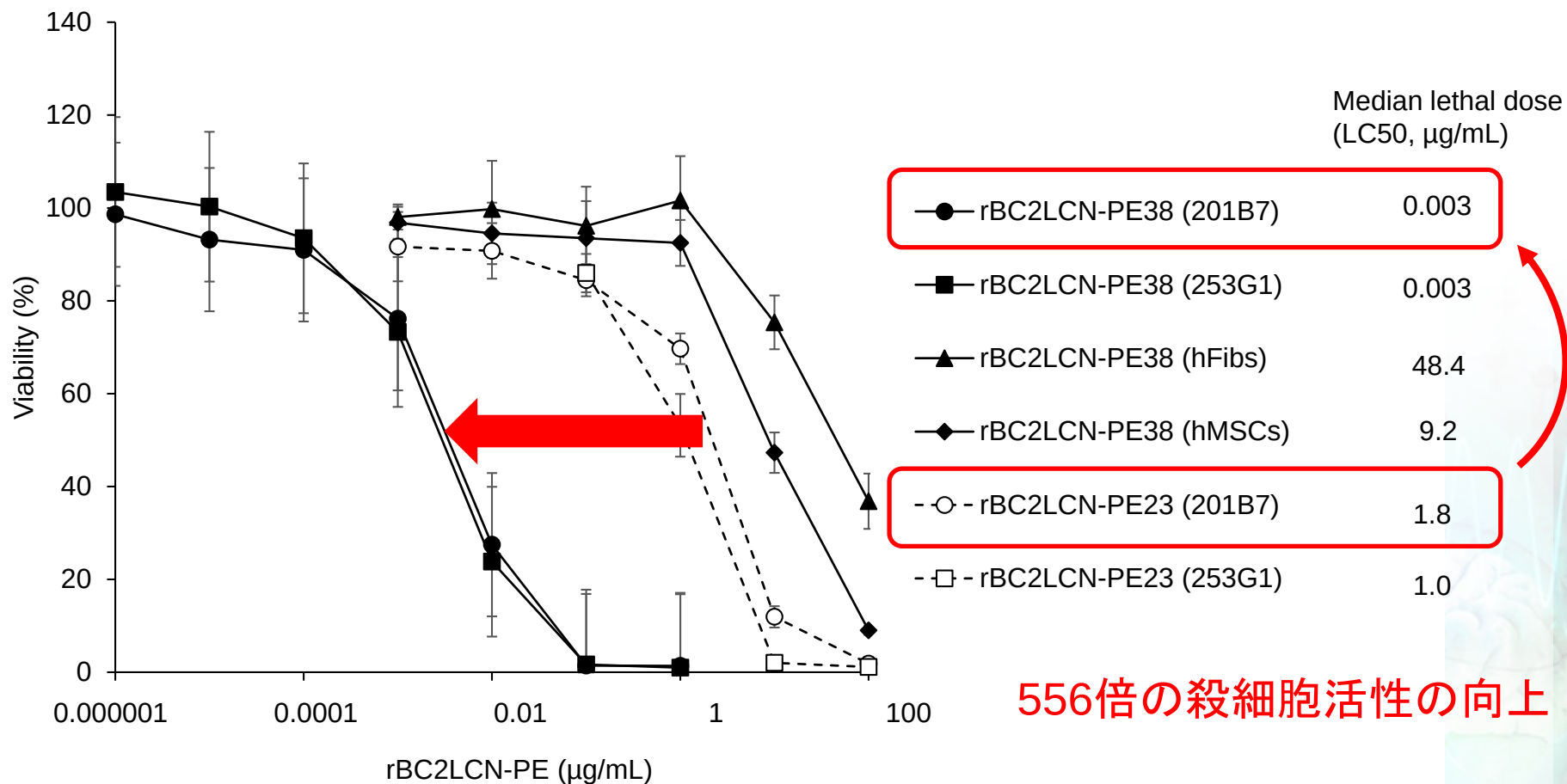
rBC2LCN-PE23



rBC2LCN-PE38



rBC2LCN-PE38による未分化細胞除去効果



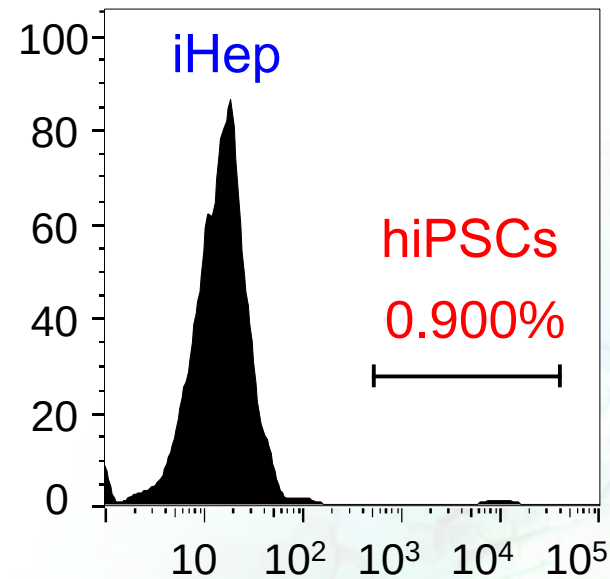
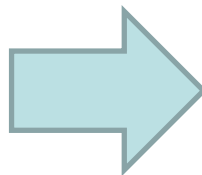
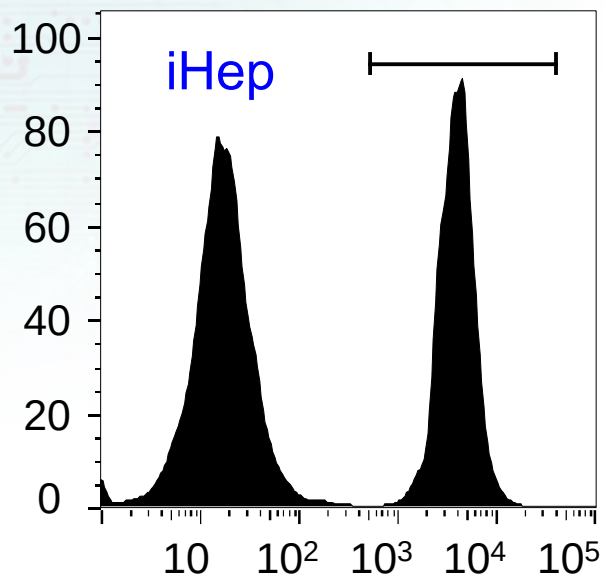
ヒトiPS細胞由来肝細胞に残存する未分化細胞除去

Before treatment

hiPSCs
43.2%

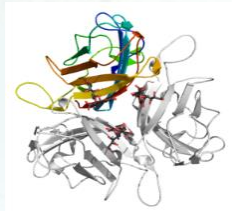


After treatment with
rBC2LCN-PE38 (1 ug/mL)
for 24 h

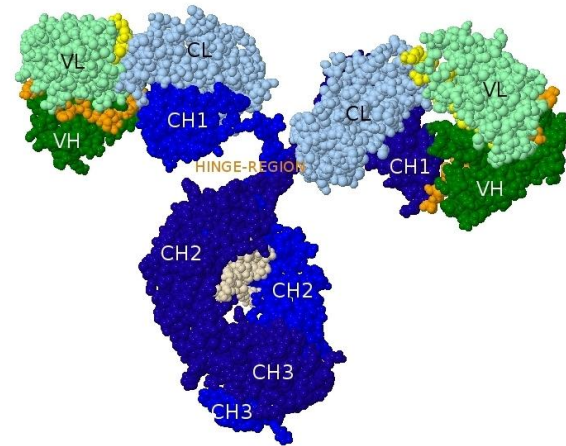


rBC2LCNレクチンの利点

rBC2LCN (16 kDa)



Antibody (150 kDa)



- 1、分子量が小さい（抗体の10分の1）
- 2、高い安定性と溶解性
- 3、大腸菌で大量生産可能(100 mg/L)
- 4、安価
- 5、ヒトES/iPS細胞に高い親和性を示す

rBC2LCN関連原著論文

Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray.

Tateno H, Toyota M, Saito S, Onuma Y, Ito Y, Hiemori K, Fukumura M, Matsushima A, Nakanishi M, Ohnuma K, Akutsu H, Umezawa A, Horimoto K, Hirabayashi J, Asashima M. J Biol Chem. 2011 Jun 10;286(23):20345-53.

2011年
rBC2LCN発見

Structural and quantitative evidence for dynamic glycome shift on production of induced pluripotent stem cells.

Hasehira K, Tateno H, Onuma Y, Ito Y, Asashima M, Hirabayashi J. Mol Cell Proteomics. 2012 Dec;11(12):1913-23 糖鎖リガンド同定

rBC2LCN, a new probe for live cell imaging of human pluripotent stem cells

Onuma Y, Tateno H, Hirabayashi J, Ito Y, Asashima M. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Feb 15;431(3):524-9.

染色試薬

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.

糖タンパク
質リガンド

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.

検出技術

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.

除去技術

Development of a practical sandwich assay to detect human pluripotent stem cells using cell culture media

Tateno H, Hiemori K, Hirayasu K, Sougawa N, Fukuda M, Warashina M, Amano M, Funakoshi T, Sadamura Y, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Shofuda T, Sumida M, Kanemura Y, Nakamura M, Okano H, Onuma Y, Ito Y, Asashima M, Hirabayashi J. Regen Ther. 2017 Jan 26;6:1-8.

検出技術

Engineering of a Potent Recombinant Lectin-Toxin Fusion Protein to Eliminate Human Pluripotent Stem Cells

Tateno H, Saito S. Molecules. 2017 Jul 10;22(7).

除去技術

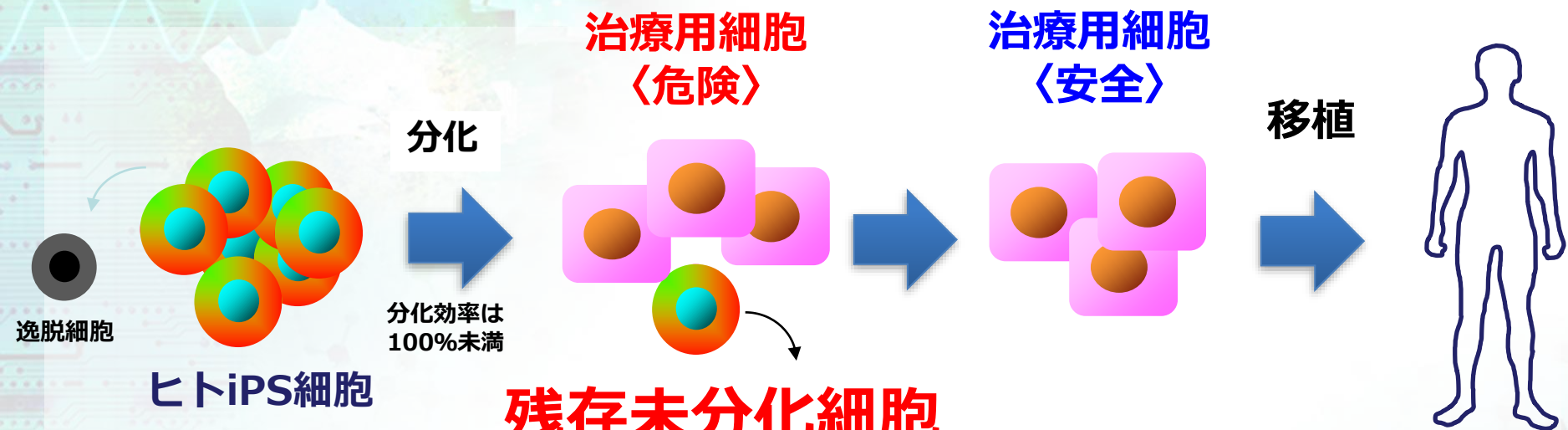
Glycome analysis of extracellular vesicles derived from human induced pluripotent stem cells using lectin microarray

Saito S, Hiemori K, Kiyoi K, Tateno H. Sci Rep. 2018 Mar 5;8(1):3997.

エクソソーム

AMED
成果

富士フィルム和光純薬から製品化



本PJの成果

未分化ヒトES細胞・ヒトiPS細胞検出試薬

rBC2LCN

Wako

- ・ rBC2LCN-PE23
- ・ rBC2LCN-PE23

- ① 検出に追加するのみで染色可能
- ② 細胞固定せずに検出に染色可能 (細胞固定しても染色可能)
- ③ 細胞毒性が低く、染色した状態で培養可能
- ④ 細胞染色・フローサイトメトリーに使用可能
- ⑤ 染色した細胞から剥離可能

Taten

Onuma, Taten et al. BBRC 2012

Wako Life Science

未分化細胞の増殖をモニタリングできます

ヒトES/iPS細胞モニタリングキット

ヒトES/iPS細胞

① 未分化細胞から分化誘導する細胞の増殖を分析することで、未分化細胞の増殖をモニタリングできる

② 培養上清 (250μL) を少量で検出するため、細胞を培養中に消費することなく分析できる

③ 細胞はそのまま培養を継続することが可能

④ rBC2LCNを用いるため、細胞に毒性を及ぼすことがない

⑤ 検出に追加するのみで染色可能

⑥ 細胞固定せずに検出に染色可能 (細胞固定しても染色可能)

⑦ 細胞毒性が低く、染色した状態で培養可能

⑧ 細胞染色・フローサイトメトリーに使用可能

⑨ 染色した細胞から剥離可能

Wako

コード	品名	検出	検量	検出検入価格
299-78301	Human ES/iPS Cell Monitoring Kit	再生医療	960回用	¥96,000

Iateno et al. Regenerative Therapy 2017

Wako Life Science

Undifferentiated human ES/iPS cells Elimination Reagent

rBC2LCN-PE23

① rBC2LCN (AtacSI) has very high specificity to sugar chain which exists on the surface of undifferentiated human ES/iPS cells (hPSCs). In rBC2LCN, a novel undifferentiated marker of hPSCs, rBC2LCN-PE23 is incorporated into the sugar chain of rBC2LCN with a substrate domain of Pseudomonas aeruginosa toxin A. rBC2LCN-PE23 enters in hPSCs, cause the inhibition of protein synthesis, and eliminate hPSCs.

② Selectively eliminate hPSCs which remaining after inducing differentiation

③ Only add to culture medium without disperse

④ Add rBC2LCN-PE23 (final conc. 100ng/mL) to culture medium of human ES cells (2000 cells). After 48 hours in the presence of rBC2LCN-PE23, human ES cells are eliminated in culture medium which rBC2LCN-PE23 was added.

rBC2LCN-PE23	0 μg/mL	0 hr	after 24 hr	after 48 hr
0 μg/mL				
10 μg/mL				

Wako Life Science

さらに再生医療研究に有用になりました！

StemSure® hPSC Remover

① rBC2LCN-PE23の高活性 (数百倍)

② ヒトES/iPS細胞を含む培養液に添加するだけで、培養液中に含まれたヒトES/iPS細胞を簡単に効率よく除去できます。

③ 原料に動物由来物 不含。

StemSure® hPSC Remover

0 μg/mL 0.1 μg/mL

ヒトES細胞

ヒトiPS細胞

除去できた

① ヒトES細胞2000細胞にヒトiPS細胞1000細胞を培養液にStemSure® hPSC Removerを添加し、10分間静置後、0.1μg/mL、0.1μg/mL、0.1μg/mL、0.1μg/mLの濃度で培養液を交換し、48時間培養後、ヒトES細胞は、50%以上除去された。② ヒトES細胞2000細胞にヒトiPS細胞1000細胞を培養液にStemSure® hPSC Removerを添加し、10分間静置後、0.1μg/mL、0.1μg/mL、0.1μg/mL、0.1μg/mLの濃度で培養液を交換し、48時間培養後、ヒトES細胞は、50%以上除去された。

コード	品名	検出	検量	検出検入価格
199-18511	StemSure® hPSC Remover	再生医療	100μL	10,000
199-18513	StemSure® hPSC Remover (rBC2LCN-PE23)	再生医療	100μL	10,000

謝辞

AMED「再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システム開発」
紀ノ岡 正博SPL

幹細胞評価基盤技術研究組合

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

伊藤弓弦、小沼泰子、平林淳、浅島誠、比江森恵子、齊藤佐代子、箕嶋文、清井佳代、村上仁子、鈴木加代

富士フイルム和光純薬工業

定村佳房、天野誠、吉居華子、上村光弘、平安一成、藁科雅岐、本多進、福田雅和

国立成育医療研究センター

梅澤明弘、阿久津英憲

東京都健康長寿医療センター

豊田雅士

大阪大学

澤芳樹、齋藤充弘、寒川延子

慶應義塾大学

岡野英之、中村雅也

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター

金村 米博、正札 智子

杏林大学

秋元 義弘