

本件配布先: 産総研(つくば) → 筑波研究学園都市記者会
産総研(東京) → 経済産業記者会、経済産業省ベンクラブ、文部科学記者会、科学記者会

ヒト間葉系幹細胞の分化する能力を評価できる技術を開発

— 簡便・迅速な評価で再生医療への実用化に貢献 —

平成 28 年 3 月 29 日

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

■ ポイント ■

- ・ 分化する能力の高いヒト間葉系幹細胞に対して 4 種類のレクチンが高い反応性を示した
- ・ これらレクチンの反応性でヒト間葉系幹細胞の分化する能力を評価できることを確認
- ・ ヒト間葉系幹細胞の製造過程における品質管理への応用に期待

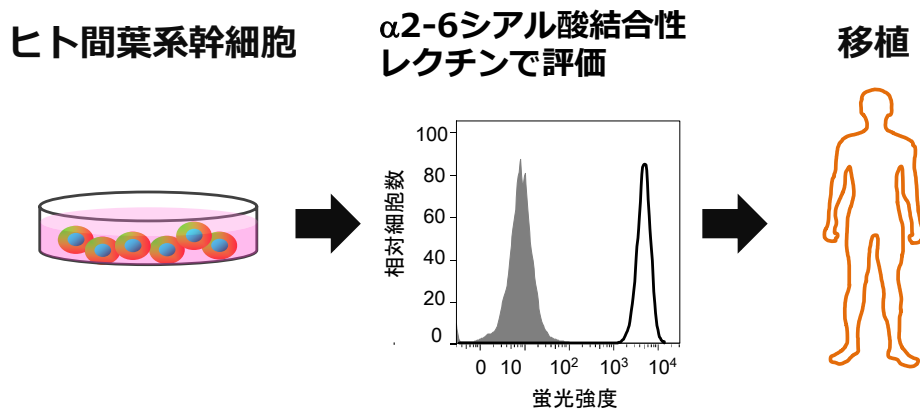
■ 概要 ■

国立研究開発法人 産業技術総合研究所【理事長 中鉢 良治】(以下「産総研」という)創薬基盤研究部門【研究部門長 織田 雅直】館野 浩章 主任研究員、平林 淳 首席研究員、幹細胞工学研究グループ 伊藤 弓弦 研究グループ長、小沼 泰子 主任研究員は、国立研究開発法人 国立成育医療研究センター 阿久津 英憲 部長、地方独立行政法人 東京都健康長寿医療センター 豊田 雅士 研究副部長と共同で、ヒト間葉系幹細胞の分化する能力を簡便・迅速に評価する技術を開発した。和光純薬工業株式会社が 1 年以内に実用化する予定である。

ヒト間葉系幹細胞は自己複製能と分化能を持ち、腫瘍形成の危険性がほとんどないことから、再生医療のための細胞源として注目されている。しかし、ヒト間葉系幹細胞の分化する能力を評価する方法がなく、再生医療に応用する際の課題となっていた。今回開発した技術は、移植前にヒト間葉系幹細胞の治療効果に重要な分化する能力を、ある特定のレクチン($\alpha 2-6$ シアル酸結合性レクチン)を用いて評価できるため、ヒト間葉系幹細胞を用いた再生医療の有効性向上への貢献が期待される。

この成果は、国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構(以下「NEDO」という)、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構(以下「AMED」という)の委託を受けて行われたものであり、この技術の詳細は 2016 年 4 月 2 日(米国東部時間)に米国科学誌 *Glycobiology* にオンライン掲載される。

_____ は【用語の説明】参照



ヒト間葉系幹細胞の分化する能力を評価する技術の概要

本件配布先: 産総研(つくば) → 筑波研究学園都市記者会

産総研(東京) → 経済産業記者会、経済産業省ベンクラブ、文部科学記者会、科学記者会

■ 開発の社会的背景 ■

ヒト間葉系幹細胞は骨髄や脂肪などの中胚葉性組織(間葉)に由来する体性幹細胞の一種であり、骨、軟骨、脂肪などの中胚葉性組織に分化する能力や免疫制御能を持つ。そのためヒト間葉系幹細胞は再生医療のための細胞源として期待されており、すでに臓器移植の合併症である移植片対宿主病などさまざまな疾患について臨床試験が行われている。ヒト間葉系幹細胞を用いた再生医療の臨床応用や産業化が進む一方で、ヒト間葉系幹細胞の品質に関する課題が指摘されている。ヒトから採取した間葉系幹細胞は、体外で増殖・分化させた後に、各種疾患の治療のために移植するが、ヒト間葉系幹細胞は不均一な細胞集団であり、その性質はドナー、培養条件、細胞継代数などで変化する。また、ヒト間葉系幹細胞の分化する能力は、治療効果に大きく影響すると考えられるが、これまで評価する方法がなかった。そのため、ヒト間葉系幹細胞の分化する能力を簡便に評価できる技術の開発が求められている。

■ 研究の経緯 ■

産総研は、細胞表面を高密度に覆う糖鎖を迅速、高感度に解析する技術であるレクチンマイクロアレイを開発してきた。産総研は幹細胞評価基盤技術研究組合で実施しているAMEDからの委託事業(委託元はNEDO(平成26年度)、AMED(平成27年度~))「再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システムの開発/ヒト多能性幹細胞由来の再生医療製品製造システムの開発(心筋・神経・網膜色素上皮・肝細胞)、ヒト間葉系幹細胞由来の再生医療製品製造システムの開発」に参画している。本事業のうち「ヒト間葉系幹細胞由来の再生医療製品製造システムの開発」プロジェクトは、臨床医療現場のニーズを最大限反映したヒト間葉系幹細胞製品を製造・供給するシステムの実現を目指して研究開発を進めている。今回、レクチンマイクロアレイを用いて、ヒト間葉系幹細胞の分化する能力の評価技術の開発に取り組んだ。

■ 研究の内容 ■

レクチンマイクロアレイを用いて各種のヒト間葉系幹細胞を解析した結果、4種類の $\alpha 2-6$ シアル酸結合性レクチン(TJA1、SSA、SNA、rPSL1a)が、分化する能力が高いヒト間葉系幹細胞との反応性が高く、逆に、分化する能力が低い細胞との反応性が低いことが分かった。

ヒト脂肪由来間葉系幹細胞を長期間、継代培養して、継代初期と継代後期の細胞を、分化誘導用の培養液を用いて、骨あるいは脂肪への分化を誘導した後、それぞれアリザリンレッドS(カルシウムに結合する色素)とオイルレッドO(脂肪滴に結合する色素)で染色した結果を図1に示す。骨あるいは脂肪に分化した細胞はいずれも赤色に染色される。継代初期のヒト脂肪由来間葉系幹細胞は、骨あるいは脂肪への分化を誘導した後、赤色に染色されたことから、骨や脂肪に分化する能力を持っていることが分る。一方、継代後期のヒト脂肪由来間葉系幹細胞を骨あるいは脂肪への分化を誘導したところ、いずれも赤色に染色されず、骨や脂肪に分化する能力がないことが分る。

本件配布先：産総研(つくば) → 筑波研究学園都市記者会
 産総研(東京) → 経済産業記者会、経済産業省ベンクラブ、文部科学記者会、科学記者会

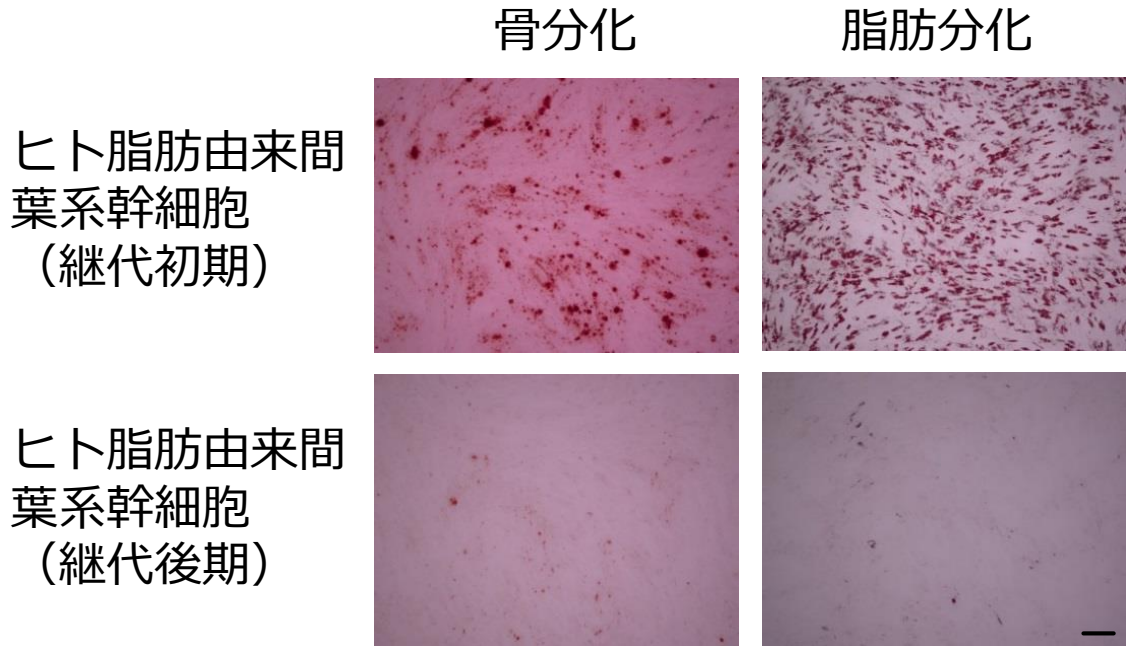


図 1 継代初期・継代後期のヒト脂肪由来間葉系幹細胞の骨・脂肪分化
 骨分化：アリザリンレッド S で染色（骨は赤色で染色）、
 脂肪分化：オイルレッド O で染色（脂肪は赤色で染色）。

次に、分化する能力がある継代初期のヒト脂肪由来間葉系幹細胞と、分化する能力がない継代後期の細胞をレクチンマイクロアレイで解析したところ、4 種類の $\alpha 2-6$ シアル酸結合性レクチン (TJA1、SSA、SNA、rPSL1a) が、継代後期と比べ、継代初期の細胞に高い反応性を示した。これら 4 種類のレクチンを蛍光標識し、フローサイトメーターを用いて、分化する能力がある継代初期のヒト脂肪由来間葉系幹細胞と、分化する能力がない継代後期の細胞に対する反応性を解析した (図 2)。4 種類のレクチンは、分化する能力がない継代後期のヒト脂肪由来間葉系幹細胞と比べ、継代初期の細胞に高い反応性を示し、結果として継代初期の細胞は強く蛍光染色された。

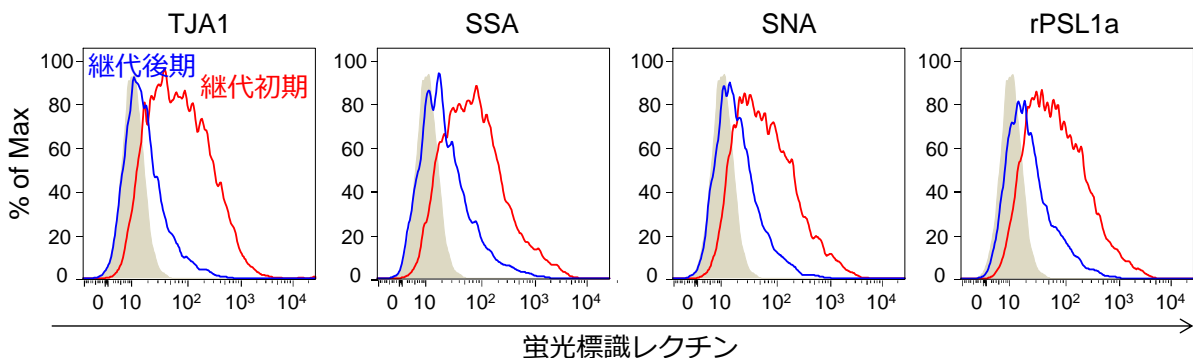


図 2 継代初期・継代後期のヒト脂肪由来間葉系幹細胞と $\alpha 2-6$ シアル酸結合性レクチンの反応性
 グレー：コントロール、青線：継代後期、赤線：継代初期
 X 軸：蛍光強度の相対値、Y 軸：相対細胞数

本件配布先：産総研(つくば) →筑波研究学園都市記者会

産総研(東京) →経済産業記者会、経済産業省ベンクラブ、文部科学記者会、科学記者会

細胞に発現するシアル酸の結合様式を液体クロマトグラフィーで調べたところ、分化する能力がある継代初期のヒト脂肪由来間葉系幹細胞では $\alpha 2-6$ シアル酸を検出できたが、分化する能力がない継代後期の細胞では $\alpha 2-6$ シアル酸をほとんど検出することができなかった。また、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞や軟骨組織由来軟骨細胞でも、継代後期の細胞と比べて、分化する能力が高い継代初期の細胞は、 $\alpha 2-6$ シアル酸結合性レクチンとの反応性が高いことが分かった。一方、分化する能力がほとんどないヒト皮膚繊維芽細胞と $\alpha 2-6$ シアル酸結合性レクチンは反応しなかった。

これらの結果から、ヒト間葉系幹細胞やヒト軟骨細胞などのヒト体性幹細胞の分化する能力を、 $\alpha 2-6$ シアル酸結合性レクチンとの反応性で評価できることが分かった。今回開発した技術により、ヒト間葉系幹細胞の分化する能力を簡便に評価できることから、再生医療に用いるヒト間葉系幹細胞の製造過程における品質管理への応用が期待される。

■ 今後の予定 ■

4種の $\alpha 2-6$ シアル酸結合性レクチンのうち、大腸菌で調製した組換えタンパク質である rPSL1a の蛍光標識体は、ヒト間葉系幹細胞の分化する能力を評価するための試薬として 1 年以内に実用化される予定である。今後は再生医療に用いるさまざまなヒト間葉系幹細胞への適用性を検証し、ヒト間葉系幹細胞を用いた再生医療の実現に貢献していく。

■ 本件問い合わせ先 ■

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 館野 浩章 〒305-8568 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 2
TEL : 029-861-3125 FAX : 029-861-3125
E-mail : h-tateno@aist.go.jp

【取材に関する窓口】

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 企画本部 報道室 佐藤 秀美
〒305-8560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 1

つくば本部・情報技術共同研究棟 8F

TEL : 029-862-6216 FAX : 029-862-6212 E-mail : press-ml@aist.go.jp

本件配布先: 産総研(つくば) →筑波研究学園都市記者会
産総研(東京) →経済産業記者会、経済産業省ベンクラブ、文部科学記者会、科学記者会

【用語の説明】

◆ヒト間葉系幹細胞

骨髄や脂肪などの間葉といわれる組織由来の体性幹細胞の一種。軟骨、骨、脂肪、心筋、神経などへ分化できる。iPS/ES 細胞と共に、再生医療への応用が大きく期待されている。腫瘍形成能がほとんど無いと考えられており、間葉系幹細胞を用いた多くの臨床試験が国内外で進められている。

◆分化

生物の発生過程が進行して、単一である細胞から、さまざまな機能を持った細胞、組織、器官が形成される過程を示す。

◆再生医療

患者の体外で人工的に調製した細胞や組織などを、患者の体内に移植するなど、ケガや病気で損傷した組織や臓器を再生し、失われた人体機能を回復させる医療。

◆レクチン

糖鎖に結合するタンパク質の総称で、ヒトからウイルスまで全ての生物に存在する。1888年にロシアのスティルマークが、ヒマ種子の抽出液がいろいろな動物の血球を凝集することを発見したのが最初。特定の糖鎖に結合することから、古くから糖鎖解析のための試薬として応用されるほか、細胞間の相互作用を媒介することによりさまざまな生命現象に深く関与する機能を持つ。TJA1 (*Trichosanthes japonica* agglutinin 1)、SSA (*Sambucus sieboldiana* agglutinin)、SNA (*Sambucus nigra* agglutinin)、rPSL1a (recombinant *Polyporus squamosus* lectin 1a)はいずれも還元末端の単糖にシアル酸が α 2-6 結合した、 α 2-6 シアル酸に結合する活性をもつレクチンの一種である。

◆体性幹細胞

自分と同じ性質を持つ細胞を作ることができる能力と、別の種類の細胞に分化できる能力を持つ細胞のことで、生体の様々な組織に存在する。間葉系幹細胞は体性幹細胞の一種である。

◆継代

細胞培養において、細胞を培養皿から回収して、新しい培地を含む培養皿に植え継ぐこと。

◆糖鎖

単糖がつながってできた一群の化合物を示す。糖同士だけでなく、タンパク質や脂質などとも複合体を形成し多様な分子を形成する。全ての細胞表面を高濃度に覆い、その構造は由来する生物、組織、細胞により異なることから「細胞の顔」とよばれ、細胞や疾患を判別するための指標(マーカー)として有効である。細胞と細胞の情報伝達を仲介することにより、さまざまな生命現象に関与することが知られている。シアル酸は単糖の一種であり、インフルエンザウイルスの

本件配布先: 産総研(つくば) →筑波研究学園都市記者会 産総研(東京) →経済産業記者会、経済産業省ベンクラブ、文部科学記者会、科学記者会

感染標的として知られている。

◆レクチンマイクロアレイ

異なる糖結合特異性を持つ複数種のレクチンを同一基板（スライドガラスなど）上に固定化したもので、プロテインマイクロアレイの一種。複数種のレクチンの反応パターンから、サンプル中の糖鎖を迅速、高感度にプロファイリングできる。精製された糖鎖や糖タンパク質だけでなく、血清、細胞、組織などの生体試料の解析もできる。がん細胞や幹細胞を識別するための指標（マーカー）の探索に有効である。

◆フローサイトメーター

溶液中に懸濁させた細胞にレーザー光を照射し、それにより生じる回折光や蛍光の強さと波長から、特定の細胞の分布を解析できる装置。