

Project Theme 糖鎖工学による再生医学新領域の開拓

iPS細胞、ES細胞の活用に寄与する糖鎖

iPS、ES細胞に関わる糖鎖の役割の解明を目指しています。

私たちは、現在世界的に関心を集めているiPS細胞およびES細胞を含むさまざまな細胞の表面糖鎖をターゲットとして糖鎖工学研究を行っています。生体内の細胞表面は糖鎖（糖衣）で覆われており、糖鎖は、タンパク質や脂質といったさまざまな分子と結合することで、細胞間の情報伝達や生理機能の発現に重要な役割を果たしています。糖鎖機能の異常が、癌やアルツハイマー病、糖尿病、筋ジストロフィー、免疫応答疾患といった多くの疾患に関係していることが明らかになっており、糖鎖はDNA、タンパク質と並ぶ生体情報分子として「第3の生命鎖」とも呼ばれています。また糖鎖は、細胞のリプログラミングや分化を測定するマーカーとしても活用されます。ヒトiPS細胞やES細胞の研究に汎用されている抗体の多くは、実は糖鎖を認識していると考えられています。しかし生体内でこれほど重要な働きを担っているにもかかわらず、糖鎖はその構造が非常に複雑なため、十分な機能の解明には至っていません。

タンパク質に結合している糖鎖は、N-結合糖鎖、ムチン型糖鎖、グリコサミノグリカンに大別されています。本プロジェクトでは、iPS細胞やES細胞に関わるグリコサミノグリカンの機能解明に重点を置き、その役割を解き明かそうとしています。iPS細胞やES細胞の表面に発現す

る糖鎖が細胞のリプログラミングや分化に果たす生物学的役割を解析できれば、より効率が高く、安全、簡便な細胞培養ができ、細胞の状態を規格化・標準化することなどが可能になります。またiPS細胞が体細胞から誘導される際の詳しい糖鎖環境を解明することが、遺伝子導入を伴わない安全なiPS細胞を作製する新たな手法確立の一助となるかもしれません。その他にも、未分化のiPS細胞やES細胞が混入することによるテラトーマ（奇形腫）の形成を防ぎ、癌などの病気を予防することにも結びつくことでしょう。糖鎖の構造や機能の解明はiPS細胞、ES細胞の研究・開発を後押しし、再生医療の発展に大きく貢献するはずで

iPS細胞にのみ反応する抗体の作製に成功しました。

2009年4月より一般研究者のヒトiPS細胞購入が可能になったことから、ヒトiPS細胞、ES細胞の研究に役立つ新しい抗体の作製に着手しました。ヒトiPS細胞の培養、継代は一般の細胞に比べても困難です。そこで私たちは、医薬基礎研究所との共同研究により状態の良いヒトiPS細胞を培養し、これを抗原（免疫源）としてマウスを免疫し、新規の単クローン抗体の作製を進めています。

現在ヒトiPS/ES細胞マーカーとして一般的に用いられている抗体はSSEA-4、SSEA-3、TRA-1-60、TRA-1-81などでいずれも糖鎖を認識する

抗原であることがわかっています。ところが、実はこれらは、iPS/ES細胞に特異的な抗体ではありません。これらの抗体は、以前に胚性癌細胞であるEC細胞などを抗原として作製されたものです。その後、あらたな技術開発により使用が可能となったヒトES細胞、ヒトiPS細胞と反応することが分り、その性質を利用しているのです。すなわち、これらの抗体は、iPS/ES/ECの3種の細胞に共通の抗原を認識しているわけです。

では、がん細胞であるEC細胞とは反応せず、ヒトiPS/ES細胞に特異的な抗体を作成することはできないのでしょうか。私たちはこの問題にチャレンジし、最近の画期的な成果として、ヒトiPS/ES細胞に特異的に反応する抗体の作製に成功しました。この抗体をマーカーとして用いれば、最近問題とされているiPS細胞の「質」を確かめることができ、iPS細胞の規格化・標準化が可能になります。このことにより、より効率的で安全性の高いヒトiPS細胞が作製できると考えられます。

ケラタン硫酸を解析する超微量分析法を確立しました。

さらにこの研究過程で、今回新規に得られたヒトiPS/ES特異的な抗体、Tra-1-60、Tra-1-81などの抗体のエピトープ（抗体が認識する部位）が

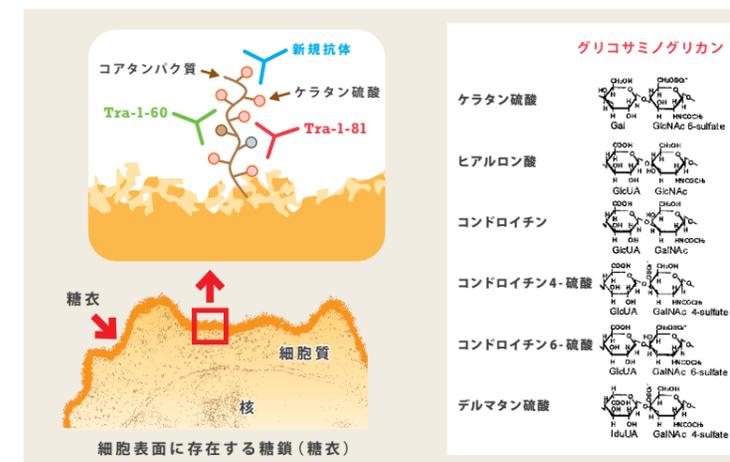
ケラタン硫酸であることがわかってきました。ケラタン硫酸はヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸などと同じグリコサミノグリカンの一種で、動物の角膜や軟骨などに存在します。GalとGlcNAcの2糖の繰り返して構成される硫酸化多糖ですが、タンパク質との結合様式がN-結合型やムチン型、さらにはマンノースを介して結合する新しいタイプのものも発見されており、糖鎖の中でも極めて複雑かつ多様な構造を有しています。そのため有用な分析法が確立されておらず、機能の解析も進んでいないのが現状です。そこで、私たちはケラタン硫酸を解析するための超微量分析法を確立しました。蛍光ポストカラム法で検出できる極めて高感度の試薬を発見したことで、新たな高速液体クロマトグラフィー法を確立することができました。Tra-1-60とTra-1-81は、より詳細な解析結果から、ボドカリキシンというタンパク質に結合したケラタン酸鎖を認識していると考えられるようになりました。こうした知見からも、ケラタン硫酸がiPS細胞やES細胞の分析においてバイオマーカーの一つとして有用であり、iPS細胞、ES細胞研究における新しい発見のカギとなることが期待されます。

今後は、細胞別にケラタン硫酸の糖鎖の微細構造の違いを明らかにし、エピトープとの関係を解き明かしていく予定です。さらに、これまででない特性を示す新規の単クローン抗体の作製も進めていきます。



豊田英尚 教授

Hidenao Toyoda



iPS・ES細胞の研究に役立つ新規抗体

● 参考文献 / 1 The 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters, PAPST1 and 2, contribute to the maintenance and differentiation of mouse embryonic stem cells. PLoS ONE, 4, e8262 (2009) . 2 Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) recognizes a novel ligand, Mac-2-binding protein, characteristically expressed on human colorectal carcinomas. J. Biol. Chem., 286 (25), 22403-22413 (2011), (cover image に採用) . 3 Anti-iPS/ES cell-specific antibody and use thereof. U.S. Provisional Patent Application 61/478, 704, April 25, (2011) . ● 連絡先 / 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(BKC)豊田研究室 電話:(外線)077-561-5738 HP:<http://www.glyco.is.ritsumeai.ac.jp/RCG/> (立命館大学糖鎖工学研究センター)