

iPS 細胞分離剤の開発

栗	原	桃 ^{*1}
丸	山	廣 ^{*2}
林	高	浩 ^{*3}
伊	藤 博	之 ^{*3}

Development of Separation Resin for Human Induced Pluripotent Stem Cells and its Application.

Momo KURIHARA
Takahiro MARUYAMA
Masahiro HAYASHI
Hiroyuki ITOH

In regenerative medicine using human iPS cells (hiPSCs), tumor formation caused by undifferentiated cells remaining in hiPSC-derived cell therapy products is an important issue, and to ensure safety, remaining undifferentiated cells must be removed in the manufacturing process of cell therapy products. It is also important to maintain the quality of hiPSCs in order to stably produce cell therapy products derived from hiPSCs. It is known that some hiPSCs spontaneously change their morphology and lose their pluripotency during culture. Such cells are referred to as cells deviated from the undifferentiated state (deviated cells), and their expression of undifferentiated markers is lower than that of hiPSCs. However, a method to selectively remove deviated cells and purify high-quality hiPSCs has not yet been established.

To solve these problems, we focused on BC2LCN lectin, which binds to carbohydrate chains on the surface of hiPSCs, and developed a BC2LCN lectin column in which BC2LCN lectin is immobilized on a carrier. Using a mixture of human mesenchymal stem cells (hMSCs) and hiPSCs as a model for hiPSC-derived cell therapy products, we treated these cell mixtures with BC2LCN lectin columns and found that almost all hiPSCs were removed within 15 minutes, suggesting that the column is very effective for removing hiPSCs in a short time by a simple operation. Furthermore, the results showed that treatment of model cells that deviated from the undifferentiated state with BC2LCN lectin columns, followed by washing with L-fucose-containing buffer and desorption of adsorbed cells on the columns, resulted in higher undifferentiated hiPSCs than those before column treatment, suggesting that this method is also very effective in obtaining high-quality hiPSCs.

Our BC2LCN lectin column is expected to be a useful technology for the production of hiPSCs-derived cell therapy products and high-quality hiPSCs.

1. 背景

* 1 法務・特許部 特許室（本社）
* 2 法務・特許部 特許室（東研）
* 3 ライフサイエンス研究所 バイオマテリアルグループ

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は、体を構成する全ての細胞種へと分化できる多能性を持つことから、「万

能細胞」とも言われ、京都大学の山中伸弥教授らのグループが2006年にマウスiPS細胞¹⁾、2007年にヒトiPS細胞²⁾の樹立に世界で初めて成功した。その後、ヒトiPS細胞の再生医療への応用が期待され、2014年に滲出型加齢黄斑変性の患者に、患者自身のiPS細胞由来網膜色素上皮細胞シートを移植する臨床手術が世界に先駆けて行われた。以降、パーキンソン病、脊椎損傷等、様々な疾患を対象にして、世界中でヒトiPS細胞由来の分化細胞や組織を用いた臨床研究が進められており、今後、iPS細胞由来の細胞や組織を用いた再生医療市場の拡大が予想されている³⁾。

ヒトiPS細胞は全ての細胞種に分化できる能力を有している反面、治療用分化細胞の中に多能性を維持した未分化状態のiPS細胞（未分化iPS細胞）が残存した場合、未分化iPS細胞が移植部位で腫瘍を形成する危険性があることが分かっており、ヒトiPS細胞を用いた再生医療の実用化の大きな課題となっていた⁴⁾。従来技術のフローサイトメトリーを用いて分化細胞と未分化iPS細胞を選別することは可能だが、フローサイトメトリーは処理能力が低いため、大量の細胞を選別するには、長時間を要するというデメリットがある。そのため、大量の分化細胞から未分化iPS細胞を効率的に除去する技術の確立が急務である。

また、大量の治療用分化細胞を得るには、増殖速度の速いヒトiPS細胞を大量に得たのち、目的の細胞に分化させることが一般的であるが⁵⁾、iPS細胞の未分化維持培養において、未分化状態を逸脱した細胞、すなわち、本来のヒトiPS細胞が有する多能性を失った細胞が偶発的に発生することが知られている⁶⁾。ヒトiPS細胞を用いた再生医療の実用化には、多能性を有する高い未分化度を維持した高品質なiPS細胞を大量かつ安定的に提供することが必要であり、近年の培地や培養基質の開発により、未分化状態を逸脱した細胞の発生は抑えられつつあるが、iPS細胞の製造で発生する未分化状態を逸脱した細胞を除去し、高い未分化度を維持した高品質なiPS細胞を精製する技術の確立も必須と考えられている。

そこで我々は、ヒトiPS細胞の表面に特異的に存在する糖鎖に対して選択的に結合するタンパク質であるBC2LCNレクチン⁷⁾を担体に固定化したヒトiPS細胞分離剤を開発し、ヒトiPS細胞由来の分化細胞に残存する未分化iPS細胞の除去（腫瘍形成の抑制）と、ヒトiPS細胞の大量製造における高品質なiPS細胞の精製（多能性が失われたiPS細胞の除去）に有効であることを確認した。

本報告では、iPS細胞分離剤の開発結果として、

安定化BC2LCNレクチンの作製と生産、安定化BC2LCNレクチンが固定化されたiPS細胞分離剤の作製、およびiPS細胞分離剤充填カラム（BC2LCNレクチンカラム）の性能評価について報告する。

なお本開発品は、再生医療に用いる高品質な細胞の製造技術が確立されていないという社会課題に対し、ヒトiPS細胞由来の治療用分化細胞およびヒトiPS細胞の製造において、高品質な細胞を簡便で効率的に製造可能な技術を提供することで、ヒトiPS細胞を用いた再生医療の実用化に貢献することを目指す。

2. 方法

[1] BC2LCNレクチンの分子改良

(1) 生産性が向上した低分子量化BC2LCNレクチンの作製

天然型BC2LCNレクチンは、グラム陰性細菌(*Burkholderia cenocepacia*)が産生するBC2L-Cレクチン(272アミノ酸残基)のN末端ドメインに由来する156アミノ酸残基からなるタンパク質である⁸⁾。我々はBC2LCNレクチンの大腸菌での発現量を向上させるため、天然型BC2LCNレクチンの低分子量化を試みた。具体的には、156アミノ酸残基からなる天然型BC2LCNレクチンのアミノ酸配列のうち、ヒトiPS細胞の表面に存在する糖鎖と結合する部位⁸⁾から離れたC末端領域の29アミノ酸残基を欠失させた低分子量化BC2LCNレクチンをコードする遺伝子を作製したのち、遺伝子組換え発現用プラスミドベクターに挿入し、大腸菌(BL21(DE3)株)を形質転換することで、低分子量化BC2LCNレクチン発現用遺伝子組換え大腸菌を作製した。発現ベクターにはpET-28aを用い、lacプロモーターの下流にシグナルペプチド遺伝子、ポリヒスチジン遺伝子、BC2LCNレクチン遺伝子、固定化用タグ遺伝子の順に挿入した。なお、BC2L-CレクチンおよびBC2LCNレクチンのアミノ酸配列は、例えばNCBIなどの公的データベースで公開されている⁹⁾。

作製した遺伝子組換え大腸菌を培養し、菌体を回収後、界面活性剤や酵素を含む抽出液によるBC2LCNレクチンの抽出と、ニッケルキレートクロマトグラフィー(Merck Millipore製、His・Bind Resin)による精製の各操作を順次行うことにより、低分子量化BC2LCNレクチンを精製した。同様に、同一条件で天然型BC2LCNレクチンを精製したのち、精製収量とヒトiPS細胞表面に存在するHタイプ3型糖鎖に対する結合親和性を比較した¹⁰⁾。Hタイプ3型糖鎖に対

する結合親和性測定は、表面プラズモン共鳴法による分子間相互作用解析装置 (GE ヘルスケア製、Biacore T100) を用いた。

(2) 安定化 BC2LCN レクチンの作製

前記(1)で作製した低分子量化 BC2LCN レクチンの安定性を向上させるため、ランダム遺伝子変異導入による安定化 BC2LCN レクチンの作製を試みた。具体的には、細胞表面に BC2LCN レクチンが結合性を有する L-フコース含有糖鎖が存在する PC-9 細胞¹¹⁾ (ヒト肺腺癌由来細胞、ECACC 株番号:9007、ケー・エー・シーより分譲) への結合性を指標として、低分子量化 BC2LCN レクチンをコードする遺伝子に変異を導入した変異ライブラリーから、85℃での加熱処理後の PC-9 細胞への残存結合活性が向上した BC2LCN レクチン発現株を取得し、安定性向上に効果的な変異を組み合わせることで、さらに安定性が向上した安定化 BC2LCN レクチンをコードする遺伝子を作製した。その後、作製した安定化 BC2LCN レクチン遺伝子を基に、前記(1)と同様の方法により、安定化 BC2LCN レクチンを精製し、変性中点温度測定 (熱安定性の評価) と、H タイプ 3 型糖鎖に対する結合親和性測定を行った¹⁰⁾。変性中点温度測定は、示差走査型熱量計 (マルバーン・パナテリティカル製、MicroCalVP-Capillary DSC) を用いた。

[2] 安定化 BC2LCN レクチンの生産

(1) 生産用遺伝子組換え大腸菌の作製

[1]の(2)で作製した安定化 BC2LCN レクチンをコードする遺伝子配列を遺伝子組換え発現用プラスミドベクターに挿入し、大腸菌 (W3110 株) を形質転換することで、生産用遺伝子組換え大腸菌を作製した¹²⁾。

(2) 大腸菌の高密度培養

病原体の混入などの安全性の観点から、再生医療等製品の製造で使用される培地や細胞培養基材などの製品は、動物由来原料を使用しないことが好ましいとされている¹³⁾。そこで、動物由来原料を含まない当社独自組成の培地を用いた高密度培養法により、10L 培養槽 (エイブル製、BMS-10 型) を用いて[2]の(1)で作製した生産用遺伝子組換え大腸菌を培養した¹²⁾。具体的には、培養液中の溶存酸素濃度により追加培地量を制御する方法で、大腸菌を高密度に増殖させたのち、イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG、富士フイルム和光純薬製) を用いた発現誘導により、安定化 BC2LCN を生産した。

(3) クロマトグラフィーによる精製

培養した大腸菌を回収後、デオキシコール酸などの動物由来原料を含まない当社独自組成の抽出液を用いて大腸菌内に発現した安定化 BC2LCN レクチンを抽出したのち、TOYOPEARL GigaCap[®]CM-650M (東ソー製) を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーにより、安定化 BC2LCN レクチンを精製した¹²⁾。精製した安定化 BC2LCN レクチンの純度を SDS-PAGE とサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) で分析するとともに、リムスカラー KY テストワコー (富士フイルム和光純薬製) を用いて、大腸菌由来の毒素であるエンドトキシン濃度を測定した。

[3] iPS 細胞分離剤および BC2LCN レクチンカラムの作製

TOYOPEARL[®]HW-40EC (東ソー製、粒径 100 ~ 300 μm、排除限界分子量 10,000) を粒径 150 ~ 250 μm に分級したのち、固定化用官能基としてマレイミド基を導入した固定化用ゲルを作製し、中性条件下で安定化 BC2LCN レクチンと反応させることで、iPS 細胞分離剤を作製した¹²⁾。次いで、作製した iPS 細胞分離剤 1mL を当社で設計したポリプロピレン製細胞分離用カラム (プロトラブズ社で作製) に充填し、BC2LCN レクチンカラムを作製した (Fig. 1)。また、安定化 BC2LCN レクチンを固定化していない TOYOPEARL[®]HW-40EC (粒径 150 ~ 250 μm に分級) 1mL を細胞分離用カラムに充填し、性能評価における陰性対照カラムも作製した。

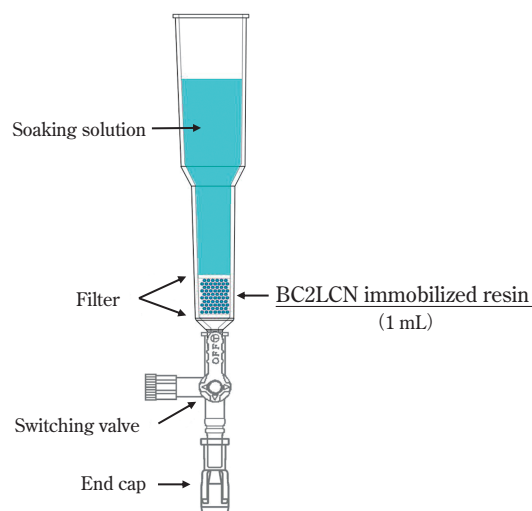


Fig. 1 Image of BC2LCN lectin column

[4] 細胞の調製

(1) ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞 (hiPSC: human induced pluripotent stem cell) の 201B7 株、253G1 株および 1231A3 株 (ライセンス契約と MTA を締結後、京都大学 iPS 細胞研究所より分譲) を、Easy iMatrix-511・silk (ニッピ製) をコートした直径 10 cm の接着培養用ディッシュ (Corning 製) に播種し、37℃、CO₂ 濃度 5% の条件下で培養した。培地として StemFit AK02N (味の素ヘルシーサプライ製) を用いた。培養終了後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-)、富士フイルム和光純薬製) で洗浄し、TrypLE Select / Versene (いずれも Thermo Fisher Scientific 製) の 1:1 (v/v) 混合液に ROCK 阻害剤 Y-27632 (富士フイルム和光純薬製) を添加した細胞剥離液を加えて 37℃ で 5 分間静置した後、新たに培地を加えてピペティングを行い剥離した細胞を回収した。回収した細胞を含む液を遠心分離し上清を除去した後、細胞を Y-27632 含有 MACS 緩衝液 (ミリテニーバイオテック製) に懸濁させて以下の実験に使用した。なお、本報告において特に明記が無い場合は、hiPSC の 201B7 株を使用した。

(2) ヒト間葉系幹細胞の培養

hiPSC から分化誘導した体細胞のモデルとして、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hbMSC: human bone marrow mesenchymal stem cell, 細胞番号: JCRB1133、JCRB 細胞バンクより分譲) を 10 cm ディッシュに播種し、37℃、CO₂ 濃度 5% の条件下で培養した。培地としては 10 vol% のウシ胎児血清 (BioWest 製) を含むダルベッコ・フォークト変法イーグル最小必須培地 (10 vol% FBS / DMEM 培地) を用いた。培養終了後、細胞を PBS (-) で洗浄し、Accutase (PromoCell 製) を加えて 37℃ で 5 分間静置した後、新たに培地を加えてピペティングを行い剥離した細胞を回収した。回収した細胞を含む液を遠心分離し上清を除去した後、細胞を Y-27632 含有 MACS 緩衝液に懸濁させて以下の実験に使用した。

(3) Cell Tracker Orange で染色した hbMSC の調製

[4] の (2) で培養した hbMSC がディッシュ中で 80 ~ 90% まで増殖した段階でディッシュ内の培養液を吸引廃棄し、RPMI-1640 培地 (富士フイルム和光純薬製) で細胞を洗浄した。その後、あらかじめ調製していた Cell Tracker Orange (Thermo Fisher Scientific 製) 含有 RPMI-1640 培地で 20 分間インキュベートした。インキュベート後の細胞を 10 vol% FBS / DMEM 培地で一晩培養し、上記 [4] の (2) と同様に

hbMSC を回収し、以下の実験に使用した。

[5] BC2LCN レクチンカラムを用いた分化細胞中の hiPSC 除去

(1) 細胞のカラム処理

BC2LCN レクチンカラムおよび陰性対照カラムを Y-27632 含有 MACS 緩衝液で平衡化したのち、各カラムに hiPSC 1.0×10^6 cells と Cell Tracker Orange で染色した hbMSC 1.0×10^6 cells を含む細胞混合液を添加した。同カラムに Y-27632 含有 MACS 緩衝液をさらに添加し、カラムより流出した細胞を回収した。

(2) 生細胞数の計測

細胞数計測用の内部標準である、CountBright Absolute Counting Beads (Thermo Fisher Scientific 製) と、細胞生死判定用試薬として 7-AAD (BD Biosciences 製) を用いて、添加細胞と流出細胞の各生細胞数をセルソーター (BD 製、FACS Aria) で計測した。hbMSC は Cell Tracker Orange (励起 / 蛍光 = 541 / 565 nm) で染色されているため、染色されている細胞は hbMSC、染色されていない細胞は hiPSC として判別し、各生細胞数を計測した。

(3) 細胞の未分化マーカー陽性率測定

添加細胞と流出細胞のそれぞれを蛍光標識 BC2LCN (rBC2LCN-635、富士フイルム和光純薬製) と蛍光標識 TRA-1-60 抗体 (R&D Systems 製、Anti-Human TRA-1-60(R) Alexa Fluor 488 Antibody) で染色し、各細胞の BC2LCN および TRA-1-60 の陽性率をセルソーターで解析した。

[6] ddPCR 法による BC2LCN レクチンカラムの hiPSC 除去能評価

BC2LCN レクチンカラムを Y-27632 含有 MACS 緩衝液で平衡化したのち、カラムに、hiPSC 5.0×10^5 cells と hbMSC 5.0×10^5 cells を含む細胞混合液を添加した。同カラムに Y-27632 含有 MACS 緩衝液をさらに添加し、カラムから流出した細胞を回収したのち、RNeasy Mini kit (QIAGEN 製) を用いて、流出した細胞から RNA を抽出した。droplet digital RT-PCR (以下、ddPCR) 法により流出した細胞中の NANOG 遺伝子コピー数を計測し、hiPSC 数および hiPSC 流出率を算出した。ddPCR 法には、試薬として one step RT-ddPCR kit for Probe (Bio-Rad 製) を使用し、装置として QX200 AutoDG Droplet Digital PCR System (Bio-Rad 製) を使用した。

[7] BC2LCN レクチンカラムから流出した細胞の再培養

BC2LCN レクチンカラムを Y-27632 含有 MACS 緩衝液で平衡化したのち、各カラムに hiPSC 5.0×10^5 cells と Cell Tracker Orange で染色済みの hbMSC 5.0×10^5 cells を含む細胞混合液を添加した。同カラムに Y-27632 含有 MACS 緩衝液をさらに添加し、カラムより流出した細胞を回収した。培地として 10 vol% FBS / DMEM 培地を用い、回収した細胞を 10 cm ディッシュに播種して 37℃、CO₂ 濃度 5% の条件下で培養した。同時にカラム処理をしていない Cell Tracker Orange で染色した hbMSC 5×10^5 cells を 10 cm ディッシュ 1 枚に播種して培養し、培養 3 日目に両細胞の画像観察を行い、細胞を回収後、セルソーターを用いて BC2LCN および TRA-1-60 陽性率を測定した。

[8] BC2LCN レクチンカラムを用いた高未分化度 hiPSC の精製

(1) 未分化状態を逸脱したモデル細胞の調製

加熱処理した培地を用いて hiPSC を培養することにより未分化状態を逸脱した細胞を調製した文献¹⁴⁾を参考にして、未分化状態を逸脱したモデル細胞（未分化逸脱モデル細胞）を調製した。hiPSC の 201B7 株を Easy iMatrix-511・silk をコートした 10 cm ディッシュに播種し、37℃、CO₂ 濃度 5% の条件下で培養した。培養 2 日目までの培地には StemFit AK02N を用い、培養 3 日目からは、加熱処理培地（StemFit AK02N の B 液および C 液を 56℃ で 30 分間加熱処理し、加熱処理していない A 液と混合して調製）で培養した。加熱処理培地を用いた培養では、3 日に一度培地交換を行い、7 日目に [4] の (1) と同様の方法により細胞を回収し、未分化逸脱モデル細胞を調製した。

(2) 高未分化度 hiPSC の精製

BC2LCN レクチンカラムを Y-27632 含有 MACS 緩衝液で平衡化したのち、未分化逸脱モデル細胞または [4] の (1) の方法により通常培養した hiPSC を 1.0×10^6 cells 添加した。同カラムに Y-27632 含有 MACS 緩衝液をさらに添加し、カラムより流出した細胞を回収したのち、終濃度が 0.2 M となるよう L-フコース（東京化成工業製）を添加した MACS 緩衝液を添加して、カラムに吸着した細胞を脱着させて回収し、それぞれの生細胞数と未分化マーカー陽性率をセルソーターで解析した。

3. 結果と考察

[1] 生産性が向上した低分子量化 BC2LCN レクチンの作製

100 mL の培地を添加した 500 mL のフラスコを用いて低分子量化 BC2LCN レクチン発現用遺伝子組換え大腸菌を培養し、抽出処理後、ニッケルキレートクロマトグラフィーで精製した結果、精製収量は 475 mg / L-培養液であった。一方、同一条件での天然型 BC2LCN レクチンの精製収量は 162mg / L-培養液であり、低分子量化することにより、大腸菌での生産性が約 3 倍向上することが明らかとなった。また、低分子量化 BC2LCN レクチンの H タイプ 3 型糖鎖に対する結合親和性（解離定数：KD）は 11 nM であり、天然型 BC2LCN レクチンの解離定数（11 nM）と同等であることを確認した。

[2] 安定化 BC2LCN レクチンの作製と機能評価

低分子量化 BC2LCN レクチンをコードする遺伝子を鋳型としてランダム遺伝子変異導入を行い、得られた BC2LCN レクチンの加熱処理後の PC-9 細胞への結合性を指標としたスクリーニングにより安定性が向上した BC2LCN レクチン発現株を取得した。取得したレクチン発現株のアミノ酸配列解析により安定性向上に寄与する 2 ヶ所のアミノ酸置換（低分子量化 BC2LCN レクチンのアミノ酸配列 39 番目のグルタミン残基のロイシン残基への置換、同 72 番目のシステイン残基のグリシン残基への置換）を同定し、これら 2 ヶ所のアミノ酸置換を組み合わせることで、さらに安定性が向上した安定化 BC2LCN レクチンを作製した。前記 [1] と同様の方法により精製した安定化 BC2LCN レクチンの精製収量は 480 mg / L-培養液であり、低分子量化 BC2LCN レクチンとほぼ同等であることを確認した。また、安定化 BC2LCN レクチンの H タイプ 3 型糖鎖に対する解離定数は 3.9 nM であり、低分子量化 BC2LCN レクチンよりも結合性が強いことを確認した。さらに、安定化 BC2LCN レクチンの変性中点温度（Tm）は 94.4℃ であり、天然型 BC2LCN レクチンおよび低分子量化 BC2LCN レクチンよりも変性中点温度が 10℃ 以上向上していることを確認した（Table 1）。

なお、天然型 BC2LCN レクチンの X 線結晶構造解析の結果⁸⁾から、BC2LCN レクチンは 3 量体を形成し、39 番目のグルタミン残基は 3 量体の中心方向に突き出ており、グルタミン残基の窒素原子と酸素原

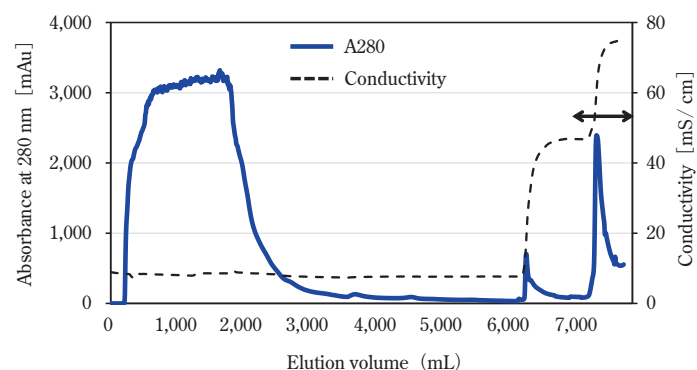


Fig. 2 Chromatogram of stable BC2LCN lectin purification using TOYOPEARL Giga-Cap® CM-650M (Arrow : Collected area of BC2LCN lectin)

Table 1 Properties of each BC2LCN lectin

BC2LCN lectin	Productivity [mg / L-medium]	K _D ^{*1} [nM]	T _m [°C]
Native	162	11	82.3
Low M.W.	475	11	81.9
Stable	480	3.9	94.4

^{*1} Dissociation constant for H-type 3 glycan

子は中心にある水分子との水素結合を介して、3量体BC2LCN レクチンを安定化しているものと推測される。39番目のグルタミン残基がロイシン残基に置換された安定化BC2LCN レクチンでは、この水分子を排除し、同じく中心を向いている41番目のイソロイシン残基との疎水的相互作用が増強された結果、高い熱安定性がもたらされていると推測された。

以上の結果から、天然型BC2LCN レクチンの低分子量化および低分子量化BC2LCN レクチンへのランダム遺伝子変異導入により、生産性と安定性およびHタイプ3型糖鎖への結合性が飛躍的に向上した安定化BC2LCN レクチンを作製することができた。

[3] 安定化BC2LCN レクチンの生産

動物由来原料を含まない当社独自組成の培地3.2 Lを添加した10 L培養槽に、生産用遺伝子組換え大腸菌の前培養液0.3 Lを添加し、溶存酸素濃度のモニタリングにより追加培地量を制御する方法で大腸菌を高密度培養したのち、回収した培養液から遠心分離により培養上清を除去して菌体を回収した。同様に動物由来原料を含まない当社独自組成の抽出液を用いて大腸菌内に発現した安定化BC2LCN レクチンを抽出し、遠心分離による上清の回収とフィルター濾過による清澄化を順次行い、得られたBC2LCN レクチン溶液のpHと電気伝導度を調整後、TOYOPEARL GigaCap® CM-650Mを用いた陽イオン交換クロマ

トグラフィーを行った。陽イオン交換クロマトグラフィーにはクエン酸緩衝液(pH5.0)を用い、異なるNaCl濃度で洗浄および溶出することにより、1段階のカラムクロマトグラフィーで高純度な安定化BC2LCN レクチンを精製した(Fig. 2)。精製した安定化BC2LCN レクチンの収量は2.5g / L-培養液であり、フラスコ培養時よりも5倍以上の生産性を達成した。精製した安定化BC2LCN レクチンの純度を分析した結果、SDS-PAGEで単一バンドであることを確認し(Fig. 3)、SEC分析でも単一ピークであることを確認した。さらに、精製した安定化BC2LCN レクチン溶液中のエンドトキシン濃度を測定した結果、規格値(≤10 EU / mg-protein、EU:エンドトキシン単位)を満たす(0.4 EU / mg-protein)ことを確認した。

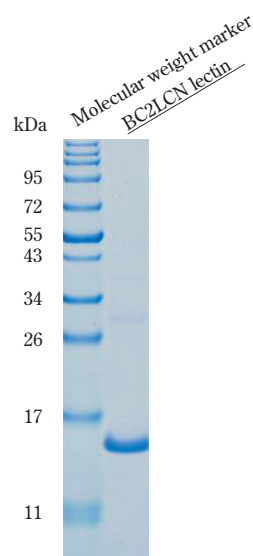


Fig. 3 SDS-PAGE of purified stable BC2LCN lectin

[4] iPS 細胞分離剤および BC2LCN レクチンカラムの作製

(1) カラムを利用した細胞分離

簡便な方法により短時間に大量の hiPSC を処理するため、BC2LCN レクチン固定化担体を充填したカラムを用いた細胞分離法を考案した。具体的には、粒子状担体の間隙に細胞を通過させることにより、担体表面に固定化した BC2LCN レクチンと結合する細胞を担体に吸着させ、BC2LCN レクチンと結合しない細胞を素通りさせる方法である (Fig. 4)。後述するように、本手法により短時間で大量の細胞分離が可能であることから、BC2LCN レクチン以外の細胞結合性リガンドを用いることにより、様々な細胞の大量分離が可能である。

(2) iPS 細胞分離剤の作製

安定化 BC2LCN レクチンの分子量は約 14,000 であることから、安定化 BC2LCN レクチンを担体表面に固定化するため、粒子状担体として排除限界分子量が 10,000 である TOYOPEARL®HW-40EC を選択した。担体の間隙への細胞の目詰まり抑制と、均一な細胞分離を実現するため、HW-40EC を粒径 150 ~ 250 μm に分級したのち、固定化用官能基としてマレイミド基を導入し、中性条件で安定化 BC2LCN レクチンと反応させることで、iPS 細胞分離剤を作製した。

[5] BC2LCN レクチンカラムの作製と基本特性評価

(1) BC2LCN レクチンカラムの作製

小スケールでの細胞分離を想定し、上部に細胞懸濁液および洗浄用緩衝液を添加するリザーバーを有し、出口に三方コックを備えたカラムを設計した。また、

カラムから流出した細胞への分離剤の混入を抑制するため、カラムの下部に目開き 40 μm のフィルターを装着し、iPS 細胞分離剤を充填して BC2LCN レクチンカラムを作製した (Fig. 1)。

(2) BC2LCN レクチンカラムの基本特性評価

2.0×10^6 cells の hiPSC (201B7 株、253G1 株、1231A3 株) をカラムに添加した場合の hiPSC の流出率は、いずれも 2% 以下であり、98% 以上の hiPSC がカラムに吸着することを確認した。さらに、異なる細胞数の hiPSC をカラムに添加し、カラムへの hiPSC の最大吸着量を調べた結果、 1.0×10^7 cells / mL-分離剤であることを確認した。これは、hiPSC 表面に存在する H タイプ 3 型糖鎖に結合する安定化 BC2LCN レクチンが、前記担体に固定化された後も H タイプ 3 型糖鎖に対して結合能を有することを意味している。hiPSC 由来の細胞治療製品の製造では、患者一人当たり 10 ~ 20 億個 ($1.0 \sim 2.0 \times 10^9$ cells) の細胞が必要と試算されているが¹⁵⁾、我々が開発した iPS 細胞分離剤を用いれば、10 億個 (1.0×10^9 cells) の hiPSC を 100 mL の分離剤充填カラムで処理することができる。また、iPS 細胞以外の細胞として K562 細胞 (ヒト慢性骨髄性白血病由来細胞)、RD 細胞 (ヒト胎児横紋筋肉腫由来細胞)、hbMSC をカラムに添加して回収率を調べた結果、これらの細胞はカラムにほとんど吸着せず、作製したカラムは iPS 細胞選択性が高いことを確認した。さらに、カラムの滅菌安定性を調べるため、カラムを 80% エタノール水溶液に一晩浸漬後、流出液中の生菌数とカラムの hiPSC 吸着能を調べた結果、流出液中に生菌は確認されず、iPS 細胞の吸着能も変化しないことを確認した。

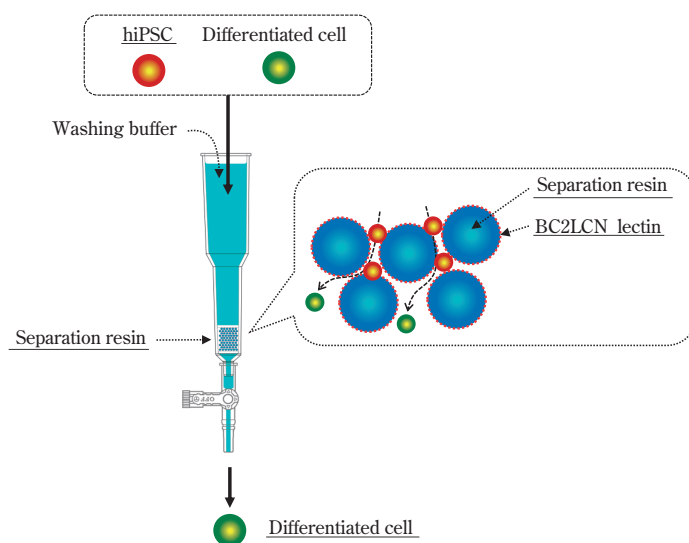


Fig. 4 Image of hiPSC separation using BC2LCN lectin column

[6] 分化細胞中の未分化 hiPSC 除去

hiPSC 由来の細胞治療製品に残存する未分化 hiPSC 除去のモデル実験として、hiPSC 由来の細胞治療製品の代わりに分化細胞である hbMSC を用い、hbMSC と hiPSC とを含む細胞混合液を用いて実験を行った。

BC2LCN レクチンカラムと陰性対照カラムに hiPSC と hbMSC の細胞混合液を添加し、カラムから流出した生細胞数をセルソーターで計測することにより算出した hiPSC および hbMSC の回収率を Fig. 5 に示す。分化細胞である hbMSC の回収率が 93.8%であったのに対して、hiPSC の流出率は 1.5%であり、hiPSC のほとんどはカラムに吸着し、カラムから流出しないことが判明した (Fig. 5)。カラムに添加した細胞と、カラムから流出した細胞の未分化マーカー陽性率を 2 種類の未分化マーカー (BC2LCN, TRA-1-60) を用いて測定した結果も、流出した細胞の陽性率は 1%未満であり hiPSC がほとんど含まれていないことを確

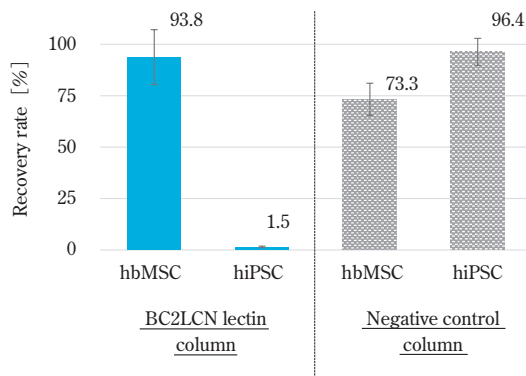


Fig. 5 Recovery rate of unbound hiPSC and hbMSC to BC2LCN lectin column
(Unbound cells : cells passed through from column by MACS buffer washing)

認した (Fig. 6, Fig. 7)。なおカラムから流出した iPSC のマーカー陽性率がカラム添加前の値から著しく減少していることから、カラムから流出する hiPSC は未分化度が低いものであることが示唆される。一方、同じ細胞混合液を陰性対照カラムに添加した場合の hiPSC の流出率は 96.4%であり、BC2LCN レクチンカラムが高選択的に hiPSC を吸着することを確認した。カラムへの細胞混合液の添加から、流出細胞の回収までの一連の操作を 15 分以内で完了したことから、BC2LCN レクチンカラムを用いることにより、分化細胞中に混入した未分化細胞を短時間で高効率に除去できることが明らかとなった。

[7] ddPCR 法による BC2LCN レクチンカラムの hiPSC 除去能評価

BC2LCN レクチンカラムに hiPSC と hbMSC の細胞混合液を添加し、セルソーターよりも検出感度の高い ddPCR 法により、カラムから流出した細胞中の hiPSC の細胞数を計測したのち、hiPSC の流出率を算出した結果、hiPSC の細胞数は 2487 ± 206 個、流出率は $0.50 \pm 0.041\%$ であり、セルソーターにより計測した場合と同等の結果であることを確認した (Table 2)。

[8] カラム処理後の再培養

BC2LCN レクチンカラムに hiPSC と hbMSC の細

Table 2 Detection of hiPSC in unbound cells to BC2LCN lectin column by ddPCR

NANOG copy number per hiPSC	Number of hiPSCs in unbound cells	Unbound hiPSC [%]
13.8 ± 0.27	2487 ± 206	0.50 ± 0.041

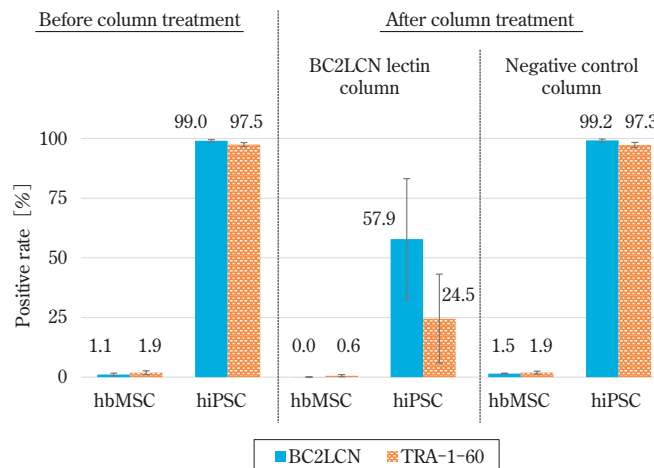


Fig. 6 Positive rate of undifferentiated markers of cells before and after column treatment

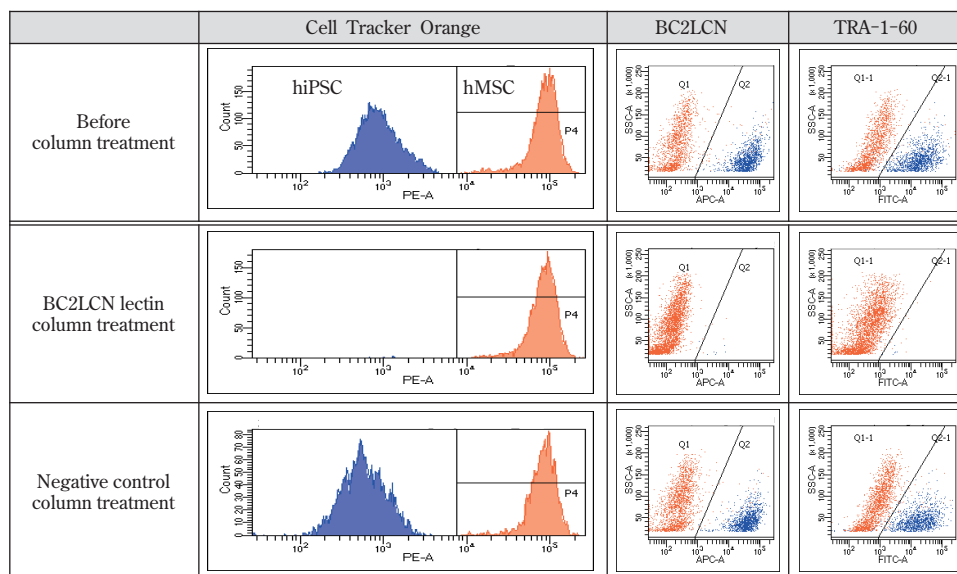


Fig. 7 Flow cytometry of cells before and after column treatment

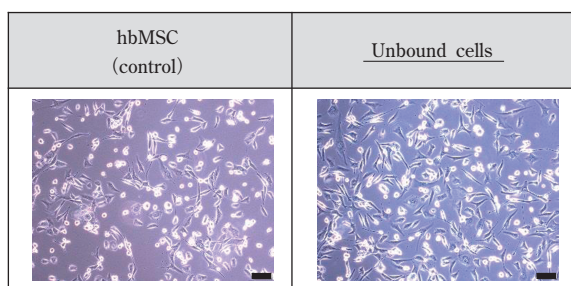


Fig. 8 Morphologies of hbMSC and unbound cells after 3 days in culture (Scale bar : 100 μm)

胞混合液を添加し、カラムから流出した細胞を再培養した結果、通常培養した hbMSC と細胞の形態は変わらず、通常通り培養可能であることを確認した (Fig. 8)。さらに、再培養した細胞の未分化マーカー陽性率を、セルソーターを用いて測定した結果、2 種類の

未分化マーカー陽性率 (BC2LCN, TRA-1-60) はカラム処理する前の hbMSC と同等であり、hiPSC がほとんど混入していないことを確認した (Fig. 9)。従って、細胞混合液中に混在する hiPSC が除去されることで、BC2LCN レクチンカラムから流出した分化細胞が再培養可能であることが明らかとなった。

[9] BC2LCN レクチンカラムを用いた高未分化度 hiPSC の精製

(1) 未分化逸脱モデル細胞の調製

加熱処理した培地 (mTeSR1、STEMCELL Technologies 製) を用いて hiPSC を培養することで未分化状態を逸脱した細胞を調製した文献¹⁴⁾を参考に、加熱処理した培地 (StemFit AK02N) を用いて hiPSC を培養し、未分化逸脱モデル細胞を調製した。なお、参考文献では、加熱処理した培地で hiPSC を

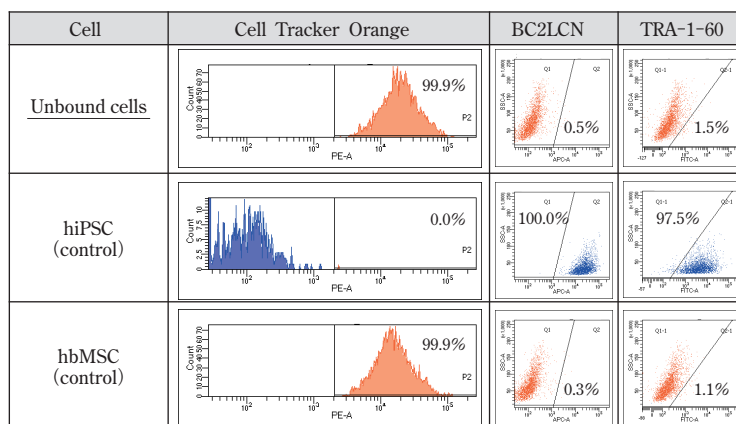


Fig. 9 Flow cytometry of unbound cells after 3 days in culture

培養することにより、BC2LCN や SSEA-4 などの未分化マーカーの発現量が低下し、初期分化マーカーである SSEA-1 を発現することが報告されている。

(2) 未分化逸脱モデル細胞の形態

hiPSC を加熱処理した培地で培養した未分化逸脱モデル細胞の形態は、通常培養した hiPSC とそれほど変わらなかったことから、細胞の形態だけでは、培養した細胞中に未分化状態を逸脱した細胞がどの程度存在しているかは判別できないと考えられた (Fig. 10)。

(3) 未分化逸脱モデル細胞の未分化マーカー発現解析

BC2LCN レクチンカラムで処理する前の未分化逸脱モデル細胞と通常培養した hiPSC の未分化マーカー陽性率を測定したところ、未分化逸脱モデル細胞の陽性率は 90% 以下であり、通常培養した hiPSC と比べて大幅に低下したことが判明した (Fig. 11)。加熱処理した培地を用いて hiPSC を培養しても、細胞形態の

変化はほとんど認められなかったが、未分化マーカー陽性率の低い細胞、すなわち、未分化状態を逸脱した細胞が増加することが確認され、hiPSC を培養する際に、未分化状態を逸脱した細胞が発生する状況を再現することができた。

(4) 高未分化度 hiPSC の精製

BC2LCN レクチンは H タイプ 3 型糖鎖などのフコース含有糖鎖に結合性を有し (Fig. 12)、過剰量の L-フコースの添加により BC2LCN レクチンと糖鎖の結合を解離できる、つまり、BC2LCN レクチンカラムに吸着した hiPSC は、L-フコースを含む緩衝液で洗浄することでカラムから脱着させることができると考えられる。そこで、未分化逸脱モデル細胞と通常培養した hiPSC をそれぞれ BC2LCN レクチンカラムに添加し、MACS 緩衝液を通液してカラムに吸着しない細胞を回収したのち、0.2 M L-フコース含有 MACS 緩衝

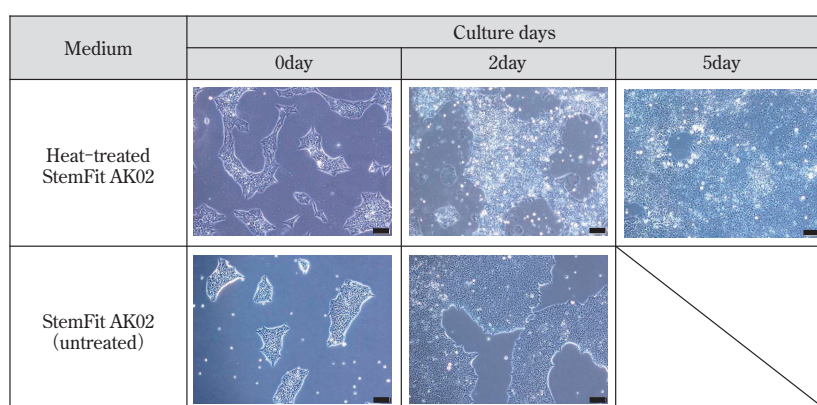


Fig.10 Morphologies of hiPSC cultured in heat-treated medium and non-treated medium (Scale bar : 100 μ m)

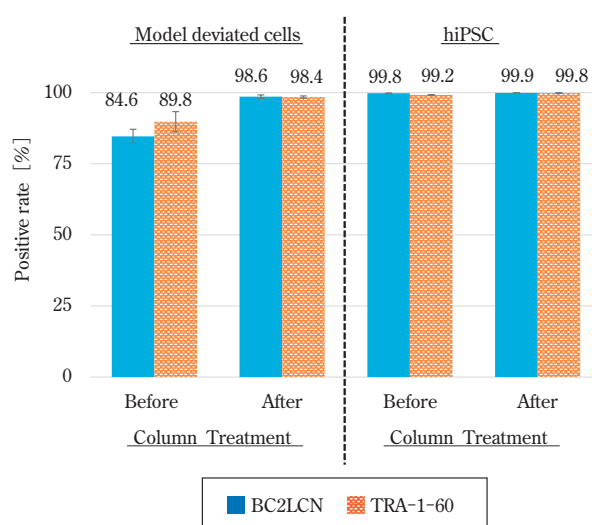


Fig.11 Positive rate of undifferentiated markers in model deviated cells and hiPSC before and after column treatment

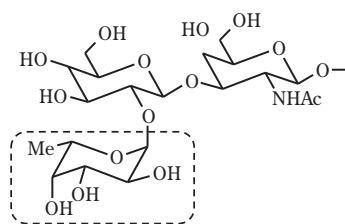


Fig.12 Structure of H-type 3 glycan
(Dotted line : L-fucose)

液で洗浄することにより、カラムに吸着した細胞を脱着させた。L-フコースを含まない MACS 緩衝液による洗浄で流出した細胞 (Unbound cells) と、L-フコース含有緩衝液による再洗浄によりカラムから脱着した細胞 (Desorbed cells) 中の生細胞数をセルソーターにより計測し、算出した各細胞の回収率を Fig. 13 に示した。流出細胞 (Unbound cells) の回収率は未分化逸脱モデル細胞では 1.9%、通常培養した hiPSC では 0.2% となり、また、脱着細胞 (Desorbed cells) の回収率は未分化逸脱モデル細胞では 84.2%、通常培養した hiPSC では 75.4% となった。通常培養した hiPSC は未分化マーカー陽性率が高く、BC2LCN レクチンカラムへの結合が強いため、脱着細胞の回収率が低くなったと考えられるが、MACS 緩衝液中の L-フコース濃度をさらに上げることで、脱着細胞の回収率を上げることができると推測された。

さらに、BC2LCN レクチンカラムで処理後の脱着細胞の未分化マーカー陽性率を測定したところ、通常培養した hiPSC から得られた細胞の陽性率は 99% 以上であり、カラムに添加する前とほとんど変化しなかったが、未分化逸脱モデル細胞から得られた細胞の陽性率は 98% 以上となり、未分化逸脱モデル細胞が

ら未分化度の高い hiPSC を精製できることを確認した (Fig. 11)。以上の結果から、BC2LCN レクチンカラムを用いることにより、hiPSC の製造で発生した未分化状態を逸脱した細胞を除去し、高未分化度を維持した高品質な hiPSC を精製できる可能性を示すことができた。

4. まとめ

以上のように、天然型 BC2LCN レクチンの分子改良により、生産性と安定性が飛躍的に向上した安定化 BC2LCN レクチンを開発するとともに、安定化 BC2LCN レクチン固定化担体を充填した BC2LCN レクチンカラムを開発した。我々が開発した BC2LCN レクチンカラムは、治療用細胞に残存する未分化 hiPSC を簡便な操作により短時間で除去可能であるだけでなく、未分化度が低下した hiPSC から未分化度が高い hiPSC を精製できることから、hiPSC 由来の細胞治療製品および高品質な hiPSC の製造において有用な技術となると期待される。

さらに、我々が開発したカラムを利用した細胞分離技術は、BC2LCN レクチン以外の細胞結合性リガンドを用いることで、他の様々な細胞の分離も可能になることから、治療用細胞製造における分離精製技術の発展に貢献するものと期待される。

5. 謝辞

本開発を進めるにあたり、hiPSC を用いた BC2LCN レクチンカラムの性能評価に関して多くのご助言をいただいた大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻・紀

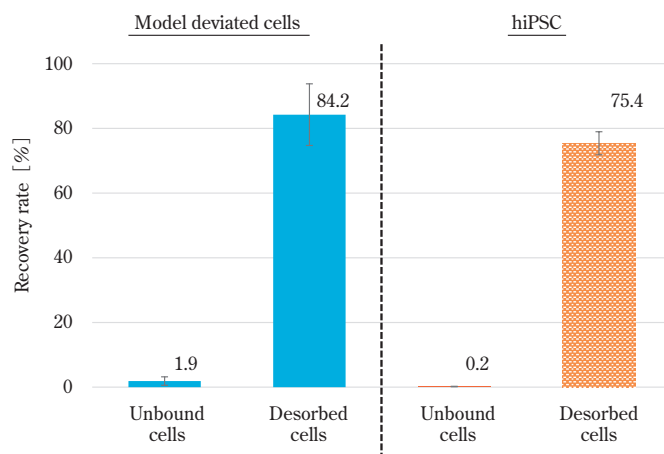


Fig.13 Recovery rate of unbound cells and desorbed cells from BC2LCN lectin column
(Unbound cells : cells passed through from column by MACS buffer washing)
(Desorbed cells : cells desorbed from column by 0.2 M L-fucose containing MACS buffer washing)

ノ岡正博教授ならびに堀口一樹助教（現、大阪大学大学院基礎工学研究科物質創成専攻）に厚く御礼申し上げます。

6. 引用文献

- 1) K. Takahashi and S. Yamanaka, *Cell*, **126**(4), 663 (2006)
- 2) K. Takahashi, et al., *Cell*, **131**(5), 861 (2007)
- 3) 日本医療研究開発機構（AMED）、2019 年度再生医療・遺伝子治療の市場調査（2020）
- 4) Hentze, H. et al., *Stem Cell Res.*, **2**(3), 198 (2009)
- 5) 堀口一樹、生物工学、**97**(11), 663 (2019)
- 6) 金美海、紀ノ岡正博、生物工学、**96**(6), 333 (2018)
- 7) H. Tateno, et al., *J. Biol. Chem.*, **286**(23), 20345 (2011)
- 8) O. Sulak, et al., *Structure*, **18**(1), 59 (2010)
- 9) GenPept URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>
(BC2L-C レクチン登録番号：WP_006490828)
- 10) 特開 2020-025535
- 11) 平谷一人、日本胸部疾患学会雑誌、**29**(9), 1096 (1991)
- 12) 特開 2022-122816
- 13) 佐藤陽治、『再生医療等製品原料基準』のあり方に関する検討 WG 報告書（2014）
- 14) T. Watanabe, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **529**, 575 (2020)
- 15) R. Zweigerdt, *Adv. Biochem. Eng. Biotchnol.*, **114**, 201 (2008)