

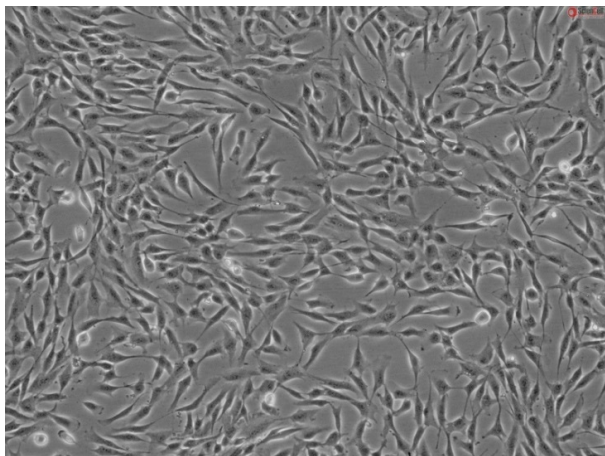
低品質iPS細胞を「検出」し、 光で「除去」する技術

産業技術総合研究所 生命工学領域
細胞分子工学研究部門 多細胞システム制御研究グループ
研究員 渡邊 朋子

2021年9月9日

技術分野の背景 (1): 人工多能性幹細胞 (iPS細胞)

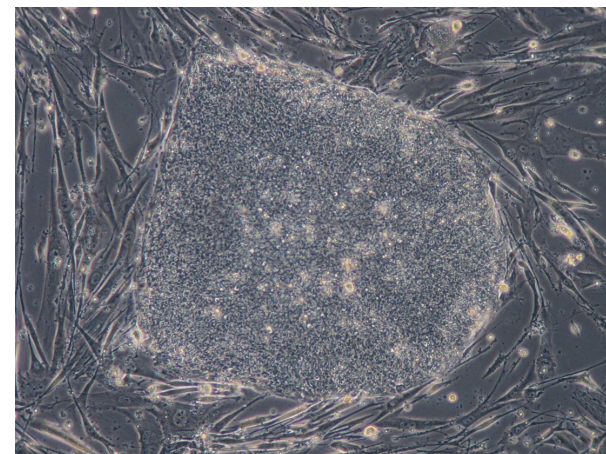
体細胞



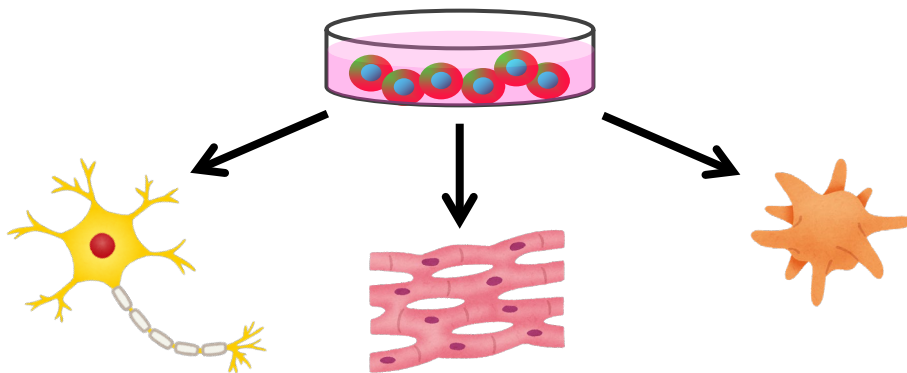
山中 4 因子
(Oct3/4, Sox2,
Klf4, c-Myc)



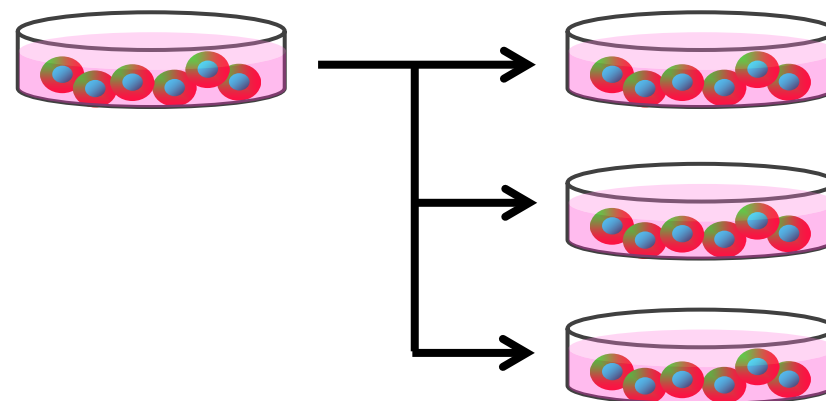
iPS細胞



様々な細胞種に分化する能力
(多能性)

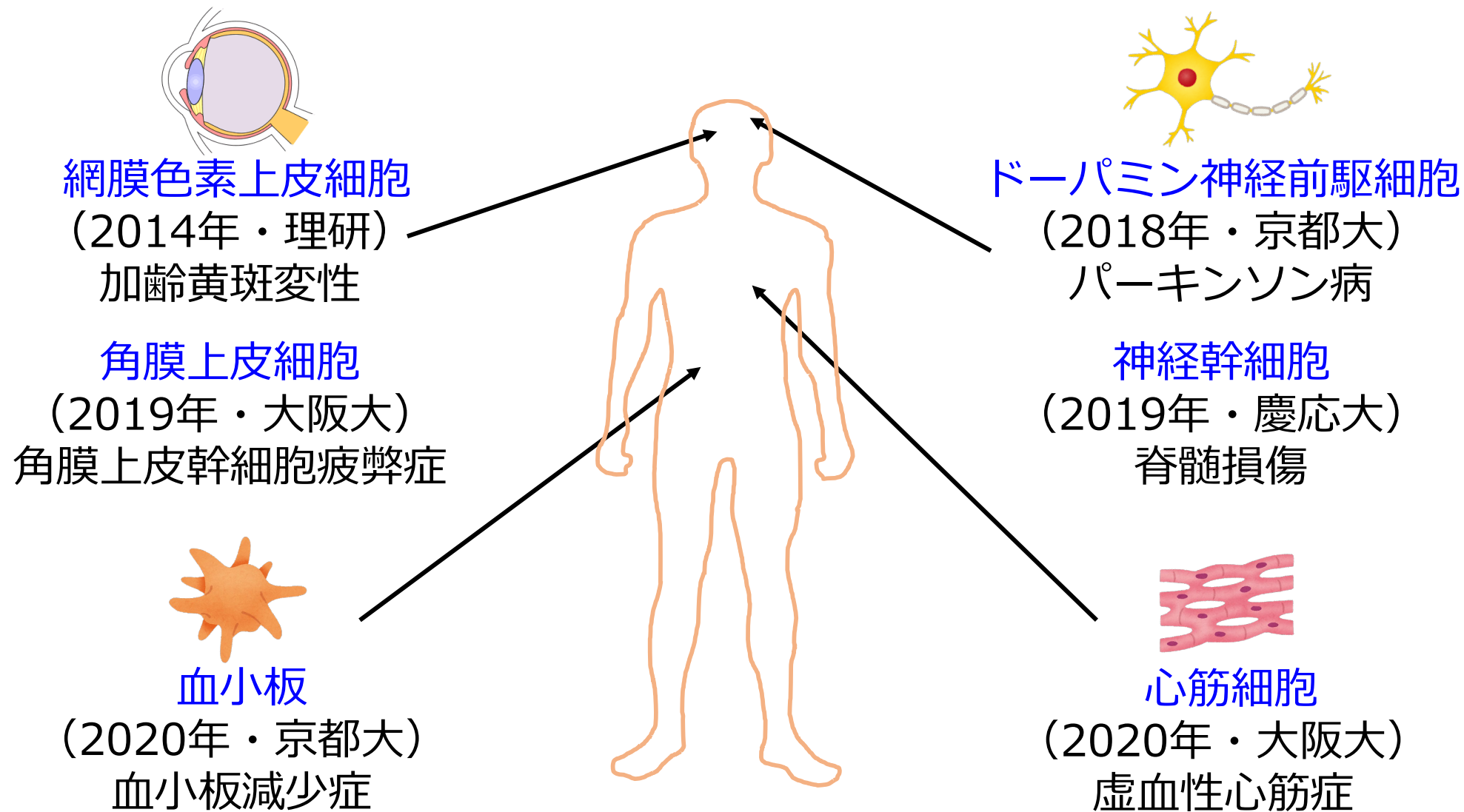


自分と同じ細胞を作る能力
(自己複製能)



iPS細胞は再生医療に用いる細胞源として期待されている

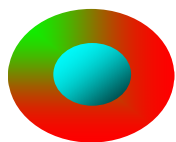
技術分野の背景 (2): iPS細胞を用いた再生医療



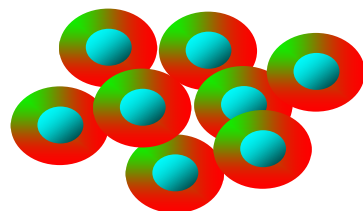
iPS細胞を用いた再生医療の実現に向けて研究が進んでいる

技術分野の背景 (3): iPS細胞の移植までの流れ

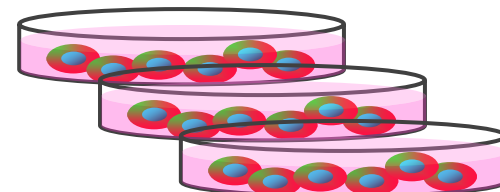
iPS細胞の
樹立



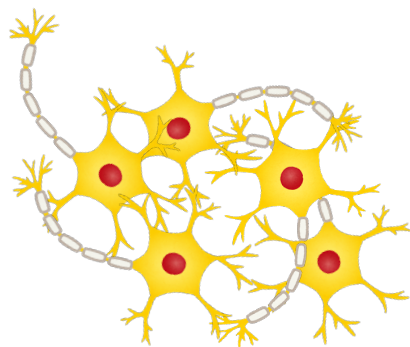
iPS細胞の
培養



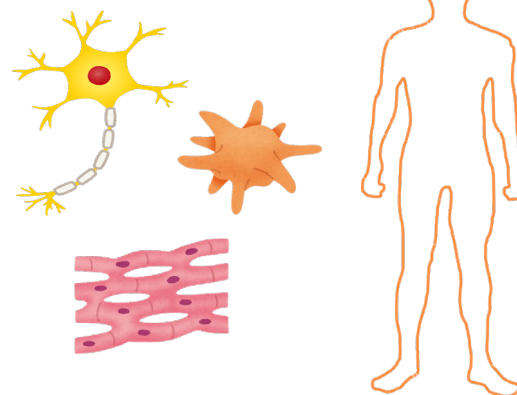
iPS細胞の
拡大培養



分化誘導



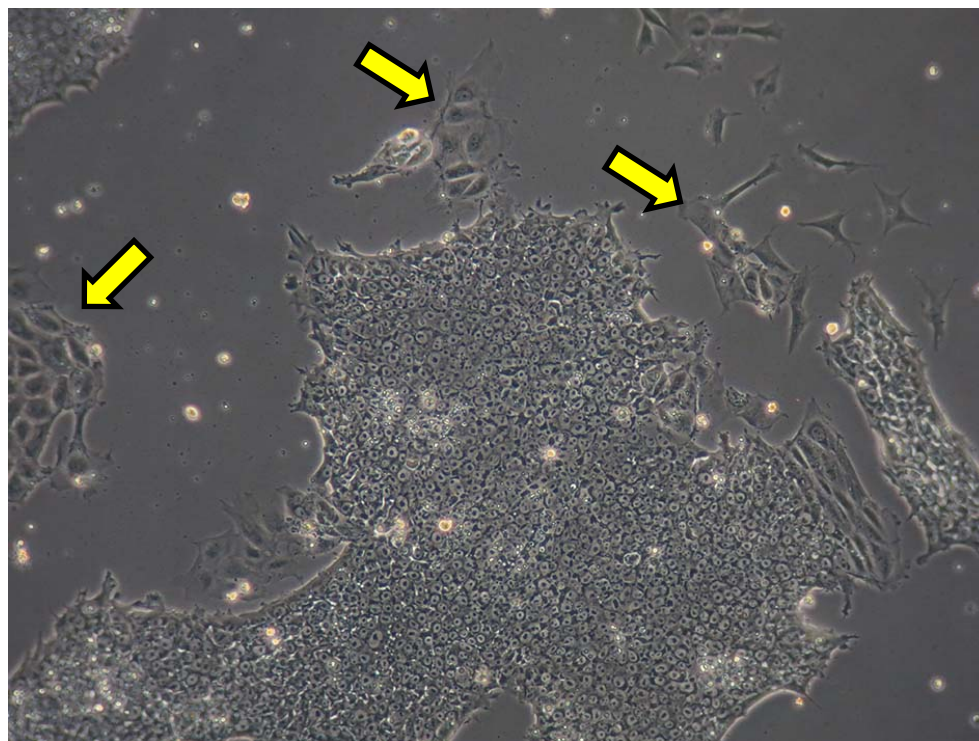
移植



iPS細胞の品質管理技術の開発が求められている

従来技術の課題：品質低下を招く逸脱細胞

- ・ iPS細胞を長期間培養していると扁平でサイズが大きい、多能性を失った「逸脱細胞」が発生することがある
- ・ 逸脱細胞はiPS細胞の品質低下を招くと考えられている



↑ 逸脱細胞

(課題) 逸脱細胞を非破壊検出・除去する技術がなかった

本日はご紹介する技術

1. 逸脱細胞の**非破壊「検出」技術**の開発:
培養上清を用いた逸脱細胞の非破壊検出技術
(Watanabe et al., *Biochem Biophys. Res. Commun*, 2020)
2. 逸脱細胞の**選択的「除去」技術**の開発
iPS細胞集団に混入した逸脱細胞の除去技術
(Watanabe et al., *Biochem Biophys. Res. Commun*, 2021)

本日はご紹介する技術

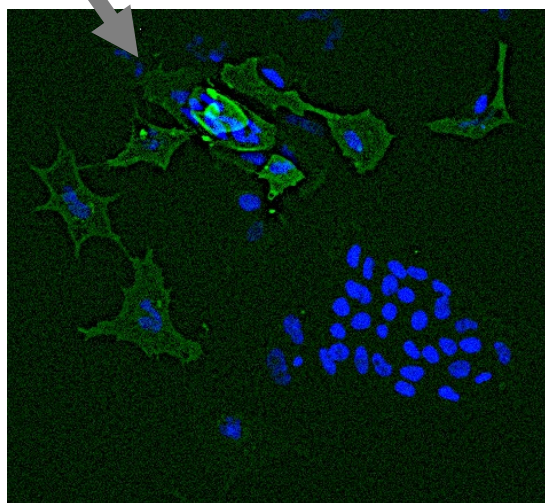
1. 逸脱細胞の**非破壊「検出」技術**の開発:
培養上清を用いた逸脱細胞の非破壊検出技術
(Watanabe *et al.*, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 2020)
2. 逸脱細胞の**選択的「除去」技術**の開発
iPS細胞集団に混入した逸脱細胞の除去技術
(Watanabe *et al.*, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 2021)

新技術の特徴：逸脱細胞の定量評価技術の開発

1. 逸脱細胞は初期分化マーカー
SSEA-1 (Le^x糖鎖) を発現する

(Thomson et al., Science 1998)

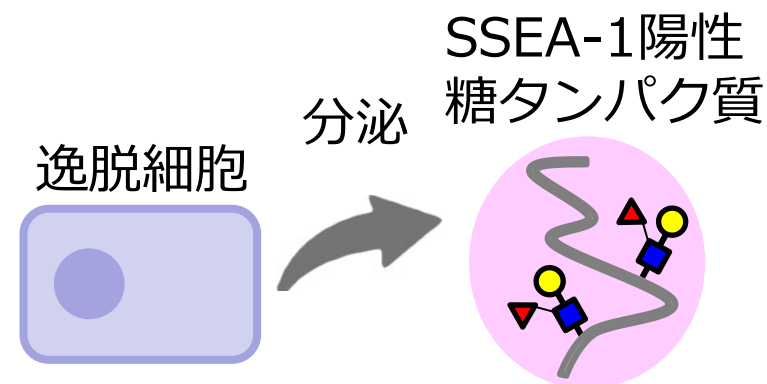
逸脱細胞



青：核
緑：SSEA-1

SSEA-1のキャリアタンパク質
は同定されていない

2. 培養上清中のSSEA-1陽性
糖タンパク質を同定



3. サンドイッチELISAの構築

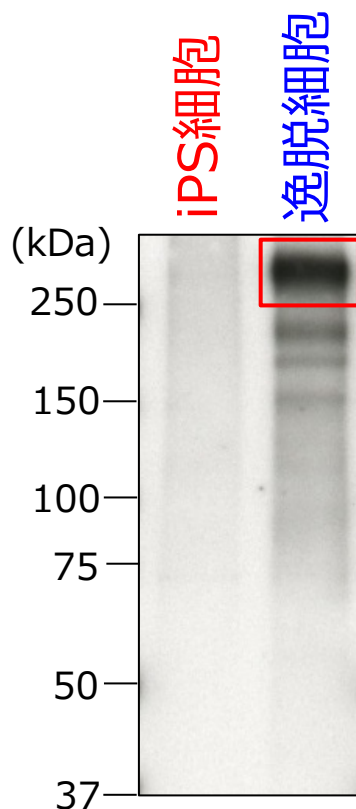


逸脱細胞から分泌されるSSEA-1陽性糖タンパク質を
測定し、逸脱細胞を検出する技術の開発を目指した

技術開発(1): SSEA-1抗体陽性タンパク質の探索

細胞の培養上清から糖タンパク質を
レクチン濃縮してSSEA-1抗体でブロット

Blot:
SSEA-1抗体



LC-MS/ MS解析

Protein name	Molecular Weight ($\times 10^{-3}$)	The number of unique peptide	
		hiPSC	Deviated cell
Fibronectin	263	0	70
Tenascin	241	0	5
Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2	195	0	2
Vimentin	54	2	1
Hornerin	282	3	1
Serum albumin	69	8	1
Dermcidin	11	15	5

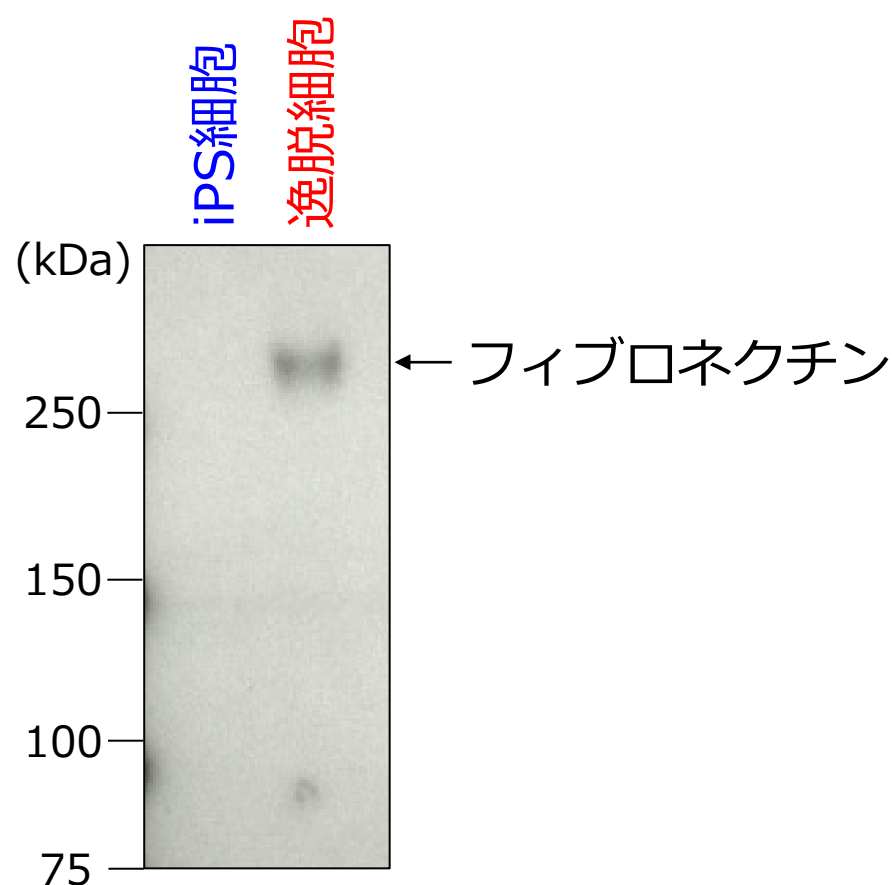
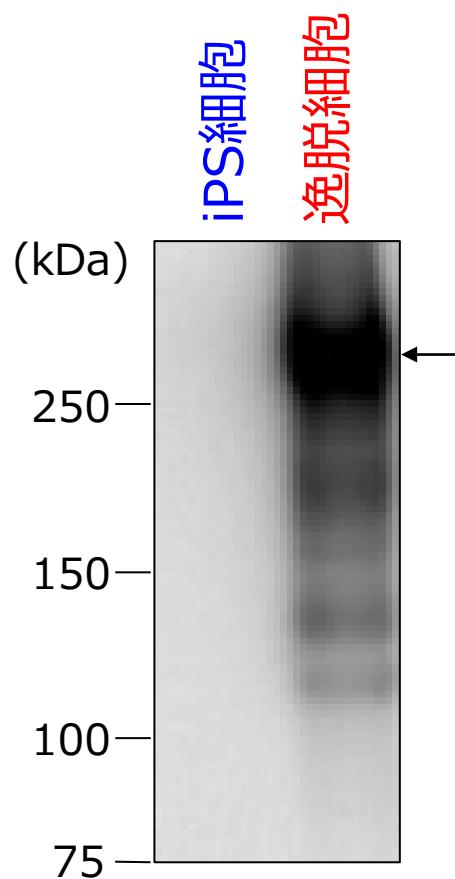
SSEA-1陽性タンパク質候補としてフィブロネクチンが検出

技術開発(2): SSEA-1抗体陽性タンパク質の同定

IP: フィブロネクチン抗体

Blot: フィブロネクチン抗体

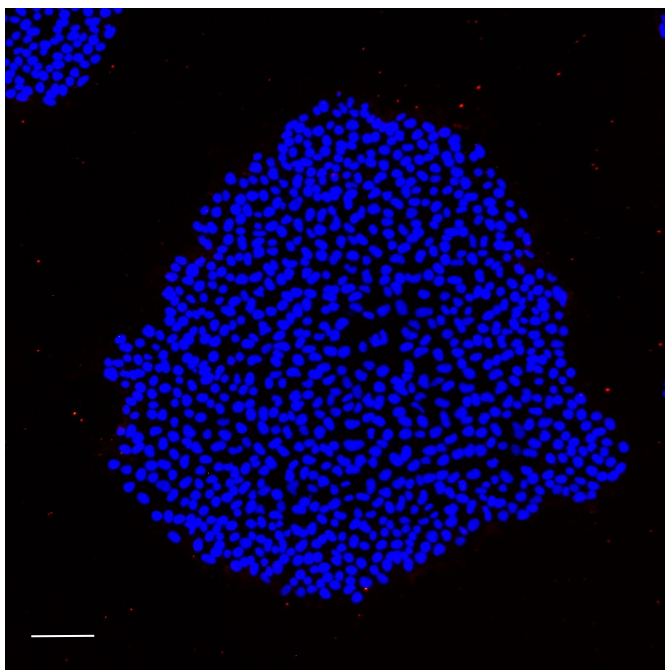
Blot: SSEA-1抗体



フィブロネクチンはSSEA-1のキャリアタンパク質である

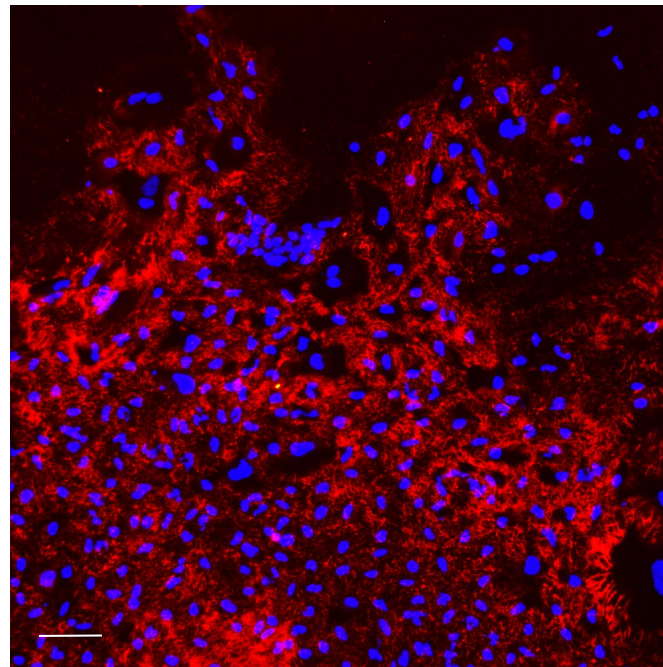
技術開発(3): フィブロネクチンの発現解析

iPS細胞



スケールバー : 100 μm

逸脱細胞



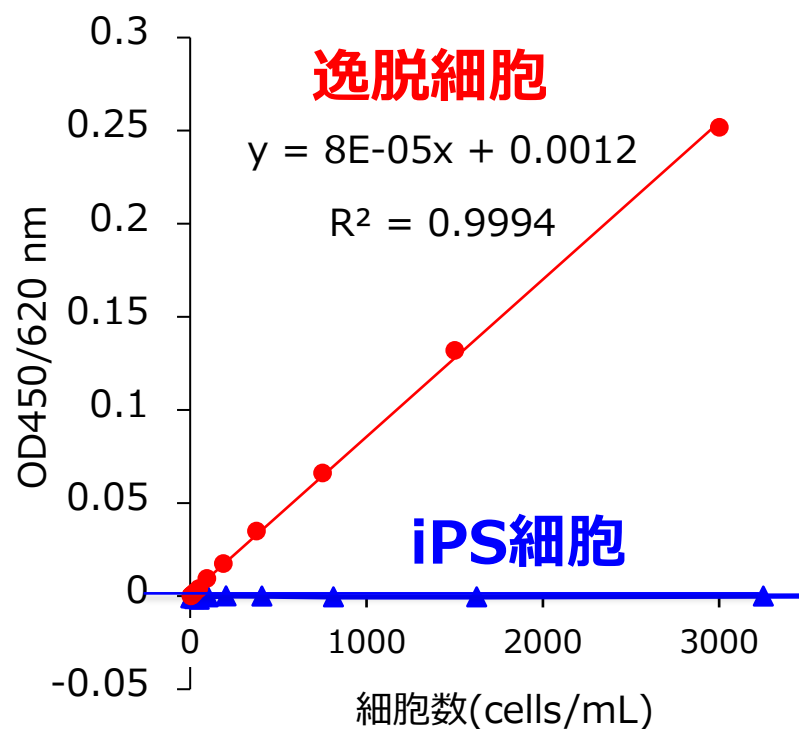
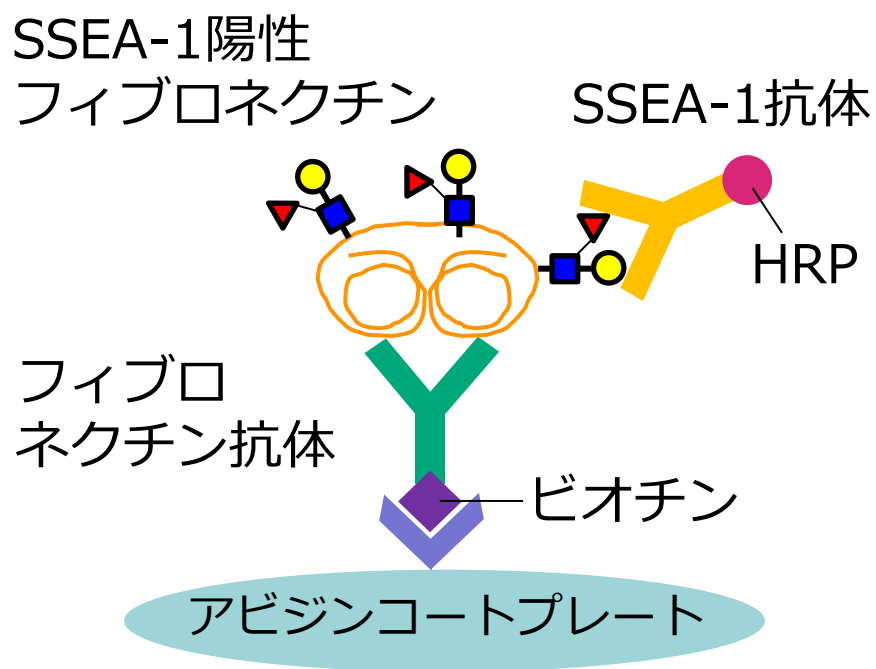
青 : 核
赤 : フィブロネクチン

フィブロネクチンはiPS細胞には発現せず、逸脱細胞に発現

技術開発(4): 逸脱細胞の定量的検出法の開発

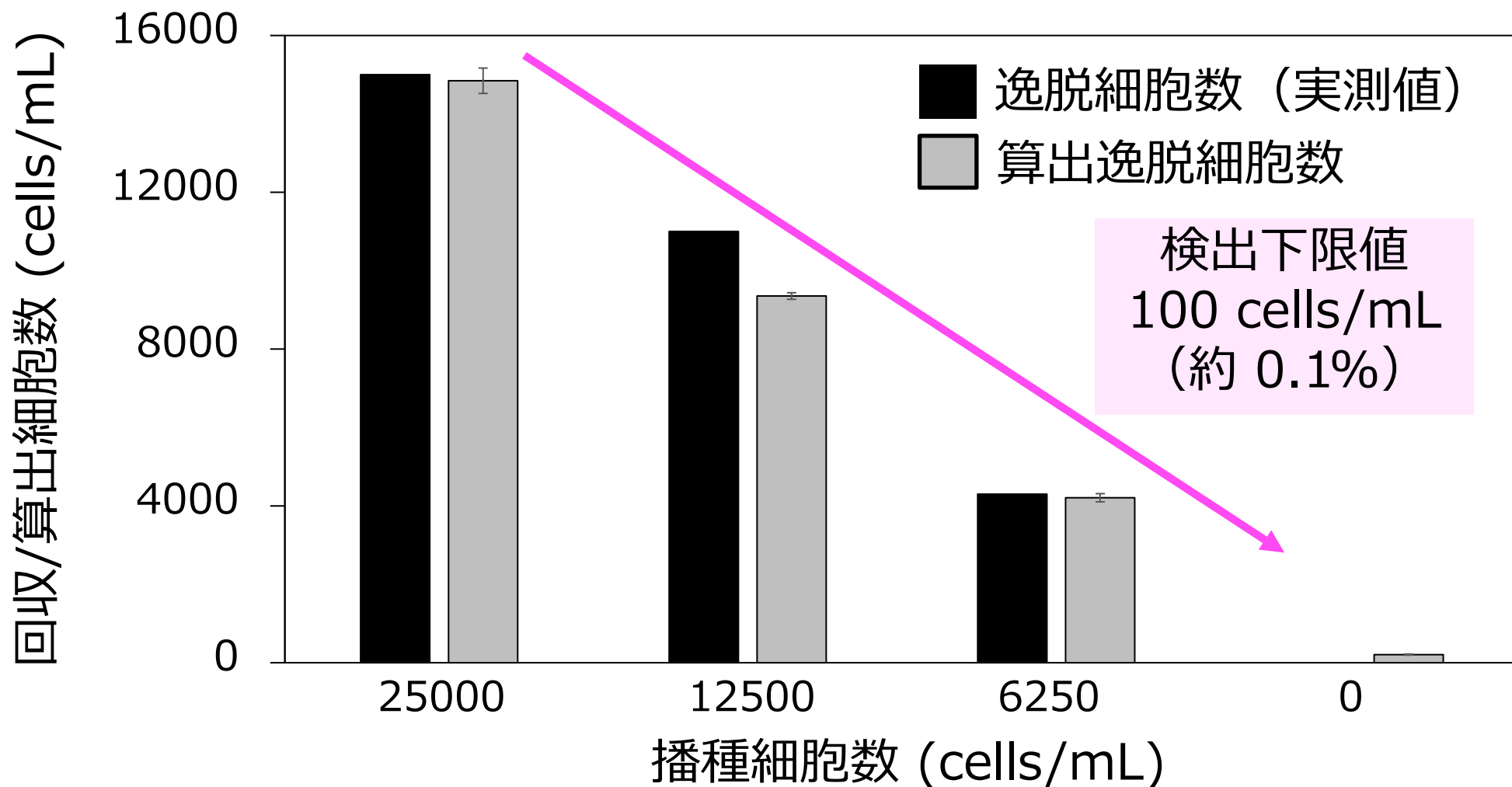
SSEA-1陽性フィブロネクチンを検出するサンドイッチELISA
「FN-SSEA-1 test」を構築

FN-SSEA-1 test



FN-SSEA-1 testは細胞数依存的に逸脱細胞を検出

応用例: FN-SSEA-1 testによる逸脱細胞数計測



FN-SSEA-1 testを用いて逸脱細胞の高感度計測が可能

本日はご紹介する技術

1. 逸脱細胞の非破壊「検出」技術の開発:
培養上清を用いた逸脱細胞の非破壊検出技術

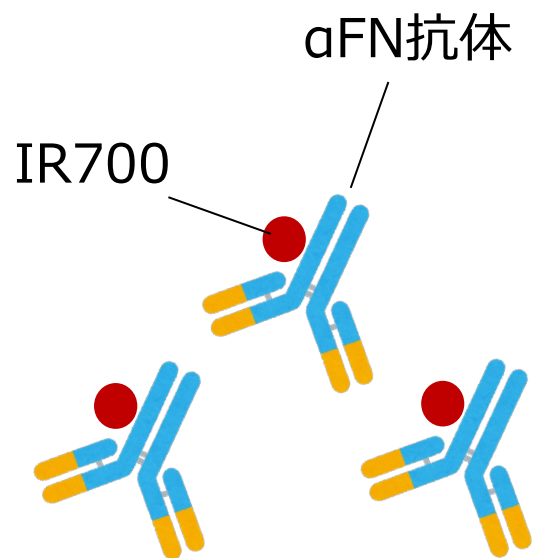
(Watanabe et al., *Biochem Biophys. Res. Commun*, 2020)

2. 逸脱細胞の選択的「除去」技術の開発
iPS細胞集団に混入した逸脱細胞の除去技術

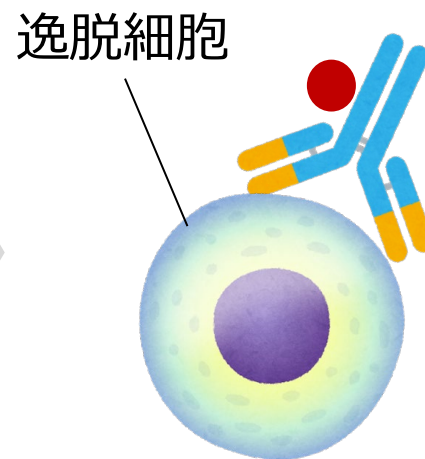
(Watanabe et al., *Biochem Biophys. Res. Commun*, 2021)

新技術の特徴：逸脱細胞を除去する技術を開発

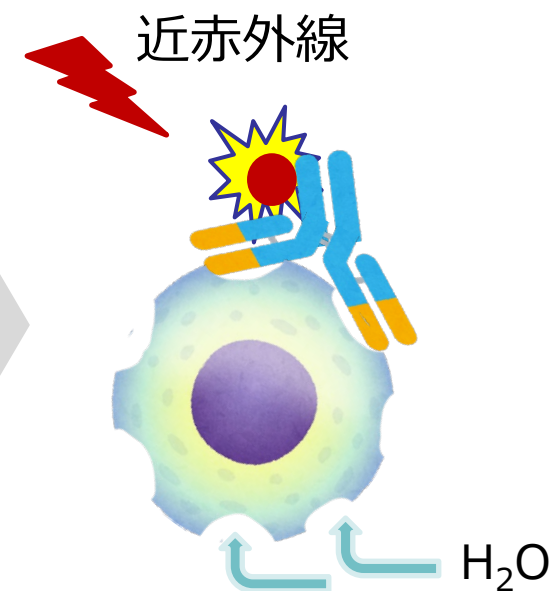
IR700標識フィブロネクチン抗体（ α FN）の作製



逸脱細胞に反応

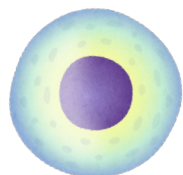


近赤外線照射による細胞破壊

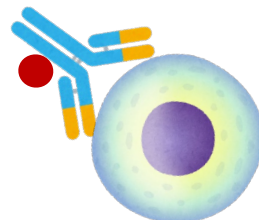
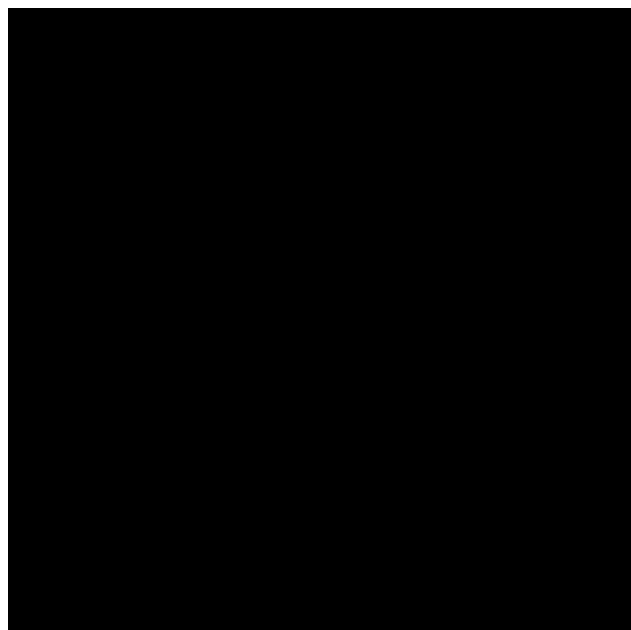


**α FN抗体と近赤外光線照射法を用いて
逸脱細胞を除去する技術の開発を目指した**

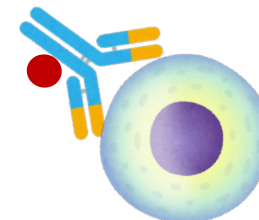
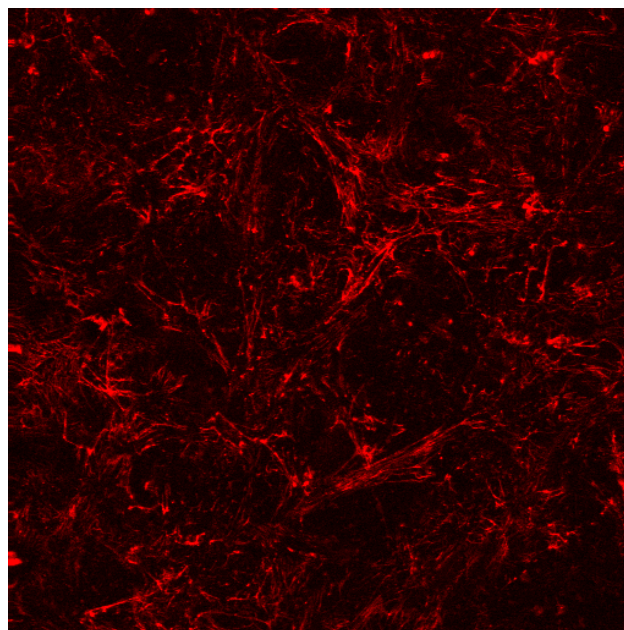
技術開発(1): IR700標識 α FNの結合能の検証



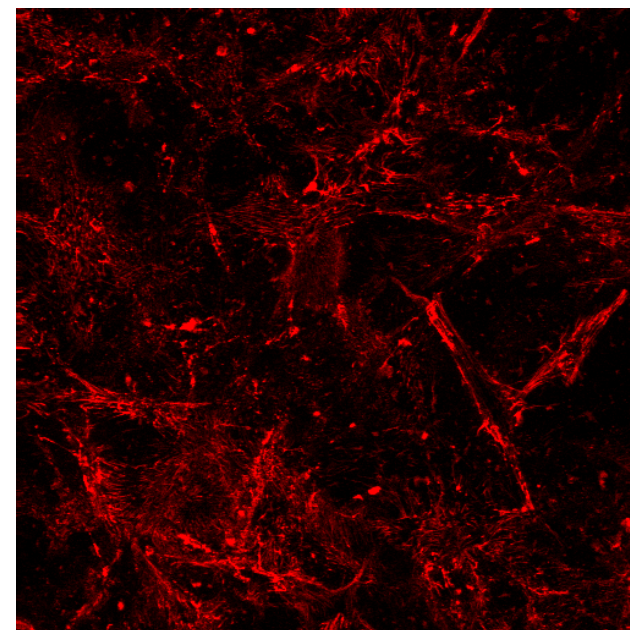
無処理



抗体反応 1時間



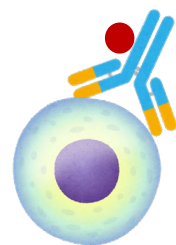
抗体反応 6時間



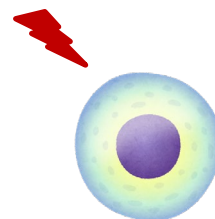
赤 : IR700-FN抗体

α FN抗体を培養上清に添加して 1 時間後には
逸脱細胞表面に結合し、6時間後も細胞表面に局在

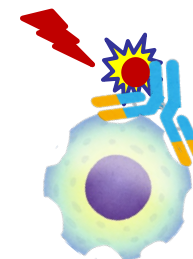
技術開発(2): α FN/近赤外線処理による細胞破壊



IR700- α FN



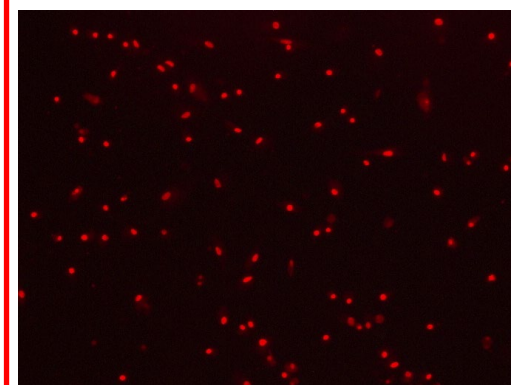
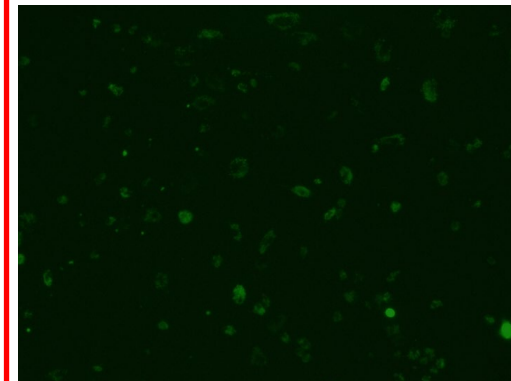
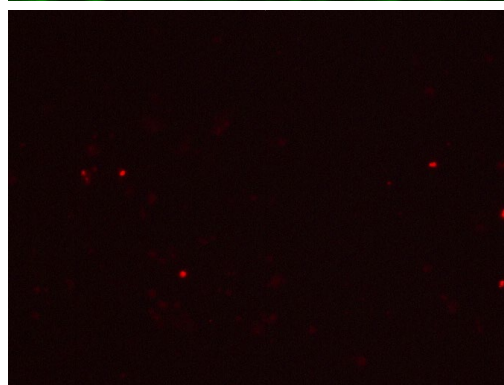
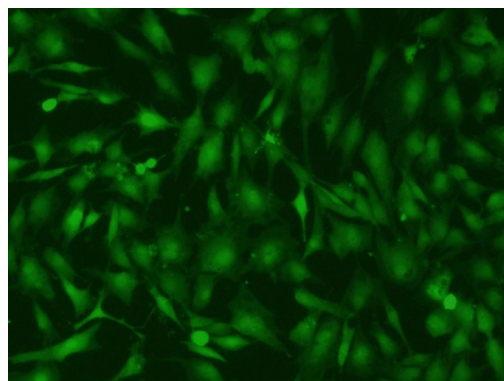
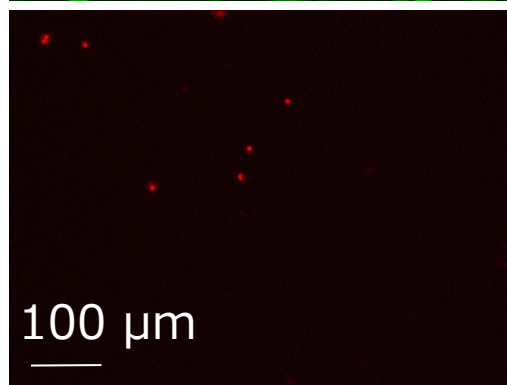
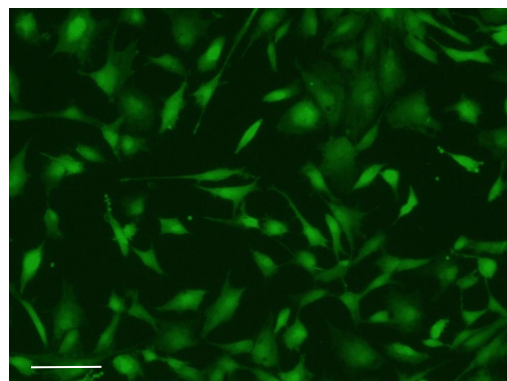
近赤外線照射



α FN/近赤外線照射

生細胞
(Calcein-AM)

死細胞
(EthD-1)

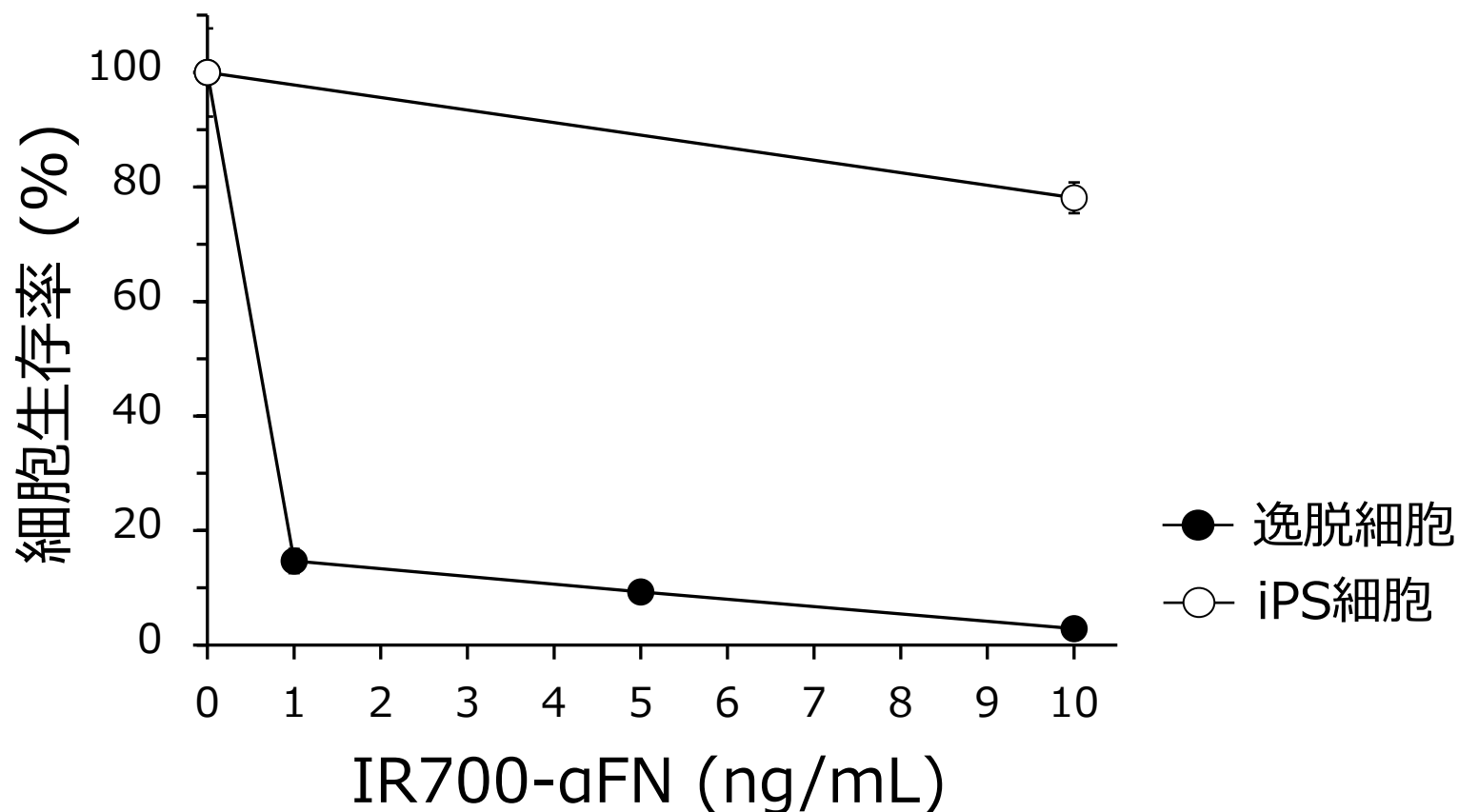
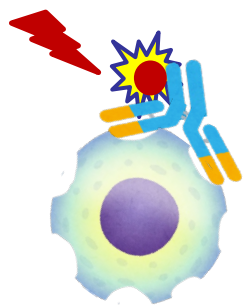


100 μ m

IR700- α FN/近赤外線処理は逸脱細胞の細胞死を誘導

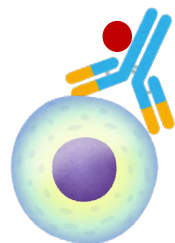
技術開発(3): IR700- α FNの濃度依存性の検討

IR700- α FNを培養上清に添加して1時間後に
近赤外線照射し、24時間後に細胞生存率を定量評価

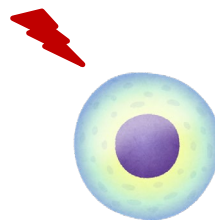


IR700- α FNにより逸脱細胞を選択的に殺傷可能

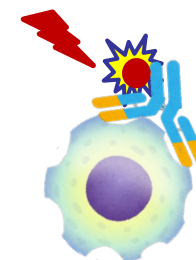
応用例: iPS細胞共培養での逸脱細胞除去(1)



IR700- α FN

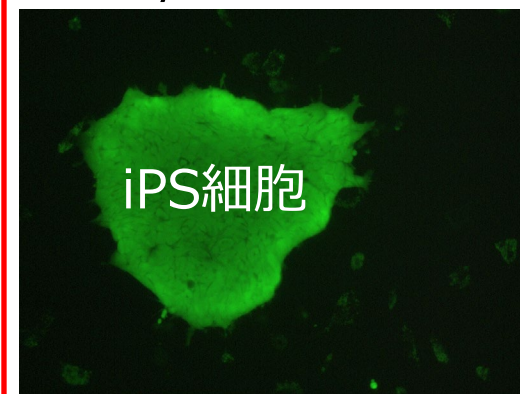
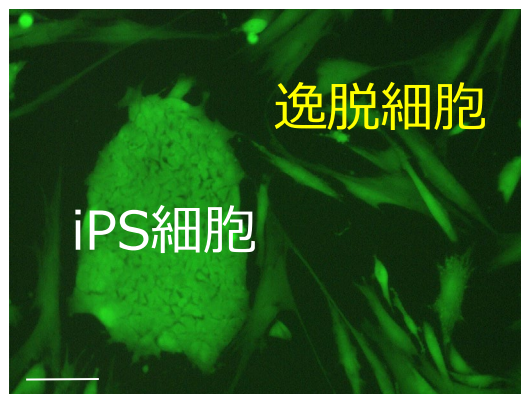


近赤外線照射

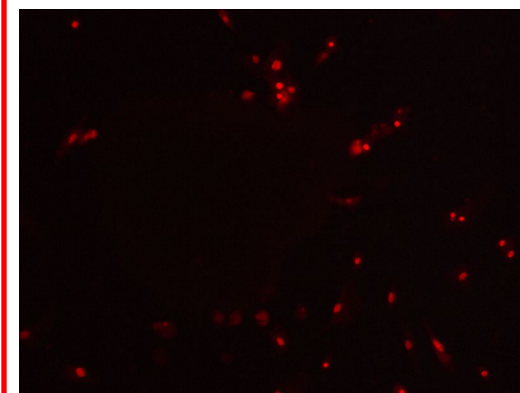
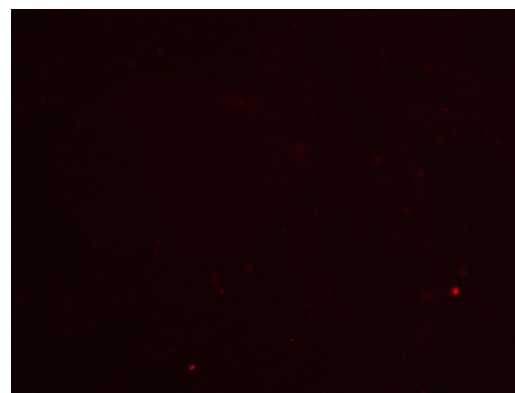
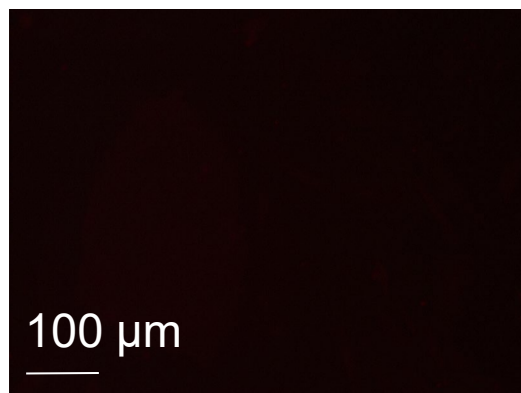


α FN/近赤外線照射

生細胞
(Calcein-AM)



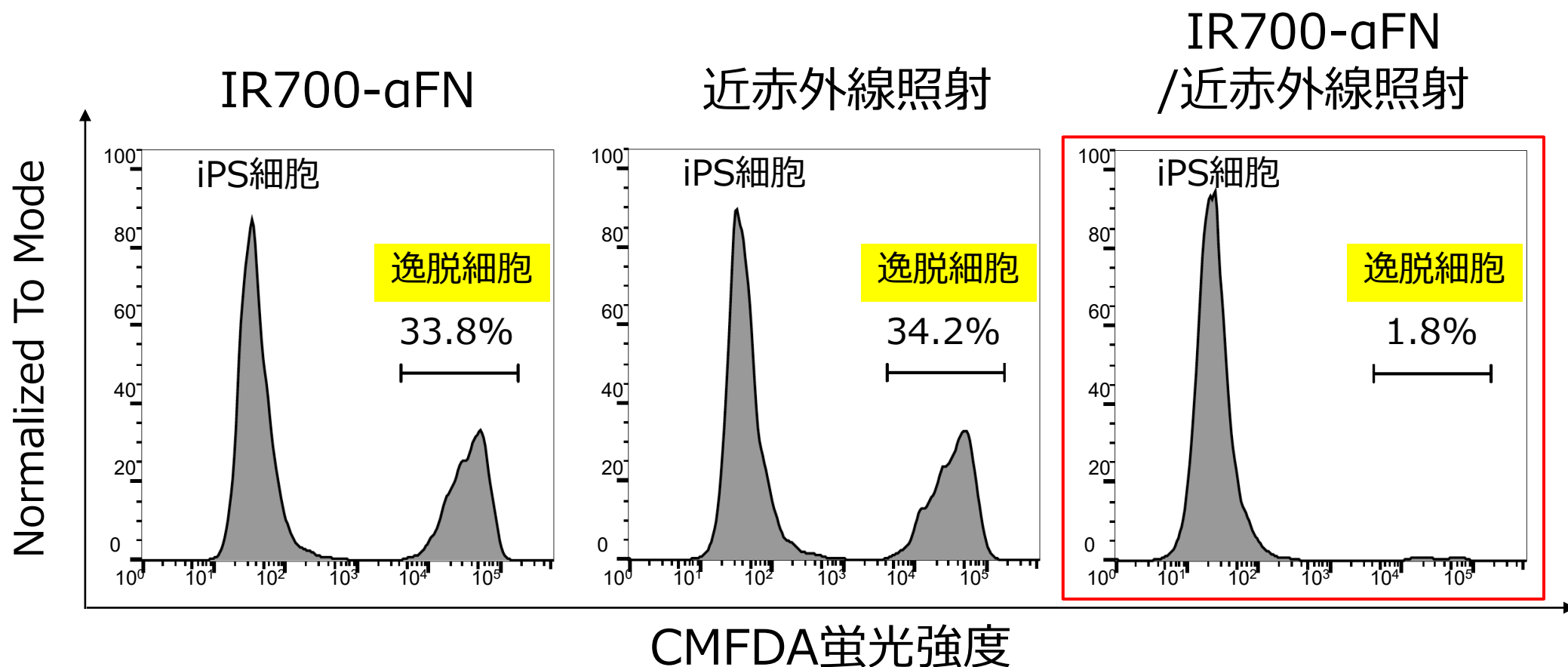
死細胞
(EthD-1)



iPS細胞コロニーは維持され、ほぼ全ての逸脱細胞が死滅

応用例: iPS細胞共培養での逸脱細胞除去(2)

緑蛍光染色をした逸脱細胞と未染色のiPS細胞を共培養し、
抗体/ 近赤外線照射後に、フローサイトメトリーで除去効率を解析



iPS細胞集団に混入した逸脱細胞の選択的な除去が可能

想定される用途

- 再生医療に用いるヒトiPS細胞の品質管理
ヒトiPS細胞に混入した逸脱細胞の検出が可能
- 高純度なヒトiPS細胞の作製
逸脱細胞を除き高純度なiPS細胞の調製が可能
- 高効率なヒトiPS細胞の分化誘導の実現
高純度iPS細胞から高効率な分化誘導が期待

実用化に向けた課題

- 現段階では201B7細胞株のみでの検証実験
→ 今後は他の細胞株での追加検証を検討
- 製品化に向けた詳細なプロトコルの作製
→ あらゆる実験環境での再現性の実証
- 抗体・近赤外線照射の細胞への影響
→ 処理の影響を長期培養で検証する必要性

企業への期待

- 逸脱細胞の検出・除去技術のキット化
（ライセンス契約および共同研究開発可能）
- 再生医療に用いるヒトiPS細胞の品質管理への適用性の検証

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 培養液を用いたヒト多能性幹細胞の品質管理技術
- 出願番号 : PCT/JP2021/023128
- 出願人 : 国立研究開発法人産業技術総合研究所
- 発明者 : 渡邊 朋子、舘野 浩章、回渕 修治、原本 悦和

お問い合わせ先

産業技術総合研究所
知的財産部 技術移転室

T E L 029－862－6158

F A X 029－862－6159

e-mail aist-tlo-ml@aist.go.jp