

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02563

研究課題名(和文) iPS創薬・再生医療のための糖鎖分化マーカー探索と分化評価法の開発

研究課題名(英文) Development of evaluation markers for differentiation of iPS cell-derived cells in drug discovery and regenerative medicine

研究代表者

川崎 ナナ (Kawasaki, Nana)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：20186167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞由来神経細胞は、再生医療等への応用が期待されている。本研究では、神経分化細胞の品質管理に役立つ神経分化マーカーの開発に向けて、神経分化関連糖鎖修飾を探索した。ヒトiPS細胞とiPS細胞由来神経細胞のトリプシン消化物から糖ペプチドを濃縮し、LC/MS/MSによる糖ペプチド解析を行った。神経細胞では、BA2と呼ばれるN型糖鎖が増加することが明らかになった。BA2はセマフォリンなど軸索反発作用分子とその受容体、およびニューレキシンなどシナプス接着分子に付加し、神経伝達物質受容体には付加していなかった。今後はBA2の機能を明らかにし、神経分化マーカーとしての有用性を評価する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞由来神経細胞は、再生医療等への応用が期待されている。その実用化に向けて、神経分化細胞の品質管理法の開発は必須である。現行の形態学的手法や電気生理学的手法等には操作性や再現性などに課題があり、簡便で再現性の高い分子マーカーの開発が求められている。糖タンパク質の糖鎖は、組織、成熟、病態によって変化することや、細胞機能と関係していることから、神経分化マーカーとしての利用が期待されてきた。本研究により見出されたBA2糖鎖は神経分化に伴って増加し、軸索伸長関連タンパク質に結合していたことから、神経分化マーカーとして利用できる可能性があり、iPS細胞由来神経細胞の実用化に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：iPS cells-derived neuronal cells are expected to be used for regenerative medicine. For the development of neuronal differentiation marker in quality control, we explored the neuron-associated glycosylation. Glycopeptides were enriched from human iPS cells and iPS cells-derived neuronal cells and analyzed by LC/MS/MS. N-glycan called as BA2 was found to be increased in neuronal cells. BA2 was detected in axon repulsive molecules such as semaphorins and their receptors and in synaptic adhesion molecules such as neuroligins, but not in neurotransmitter receptors. In the future, we plan to investigate the function of BA2 and evaluate its usefulness as a marker of neuronal differentiation.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：iPS細胞 神経細胞 再生医療 糖鎖 分化マーカー LC/MS/MS グライコプロテオミクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞 (iPSC) は、内胚葉、中胚葉、外胚葉の三胚葉への分化能を有し、様々な体性細胞へと分化することが知られている。外胚葉系では、神経幹細胞 (NSC)、神経前駆細胞 (NPC) を経て、様々な神経細胞に分化する。ヒト iPSC 由来神経細胞は、再生医療や創薬研究への応用が期待されている。また、患者から樹立した iPSC は疾病病態モデルの作製、疾患メカニズムの解明、及び治療法の開発につながるものと注目されている。

iPSC 由来神経細胞の応用に向けて、高効率かつ頑健性の高い分化法の開発や細胞製品の品質管理法の開発は肝要である。糖タンパク質の N 型糖鎖付加は主要な翻訳後修飾の一つであり、細胞分化、細胞接着、シグナル伝達など様々な生命現象に関係していることが報告されている。iPSC が神経細胞に分化する過程で変化する糖タンパク質を明らかにすることは、神経分化機構や分化における糖鎖の役割の解明、延いては高効率な神経分化や品質管理法の開発に繋がる可能性がある。しかし、糖鎖の構造は複雑で不均一性が高いことや、ヒト神経モデルの入手が容易でないことから、神経分化における糖鎖の変化や役割についてはあまり理解が進んでいない。

### 2. 研究の目的

本研究では、iPSC の製造や品質管理に役立つ神経分化マーカーの開発につながることを目的として、iPSC の神経分化における糖鎖の変化と糖鎖の役割の解明をめざした。iPSC、NSC、NPC、及び神経細胞 (ドパミン作動性神経細胞: DA) を豊富に含む細胞集団からそれぞれタンパク質を抽出し、親水性相互作用を利用して糖ペプチドを濃縮した。LC/MS/MS によるラベルフリーの網羅的解析を行い、神経分化に伴って変化する N 型糖鎖を抽出した。さらにバイオフィオマティックスを用いてその糖鎖と神経分化との関係を解析することで、神経分化マーカーにつながる糖鎖を明らかにした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト iPSC 由来神経細胞の調製

ヒト iPSC 201B7 株を Dual SMAD 阻害法により NSC、NPC、DA へ分化させた (各細胞  $n=5\sim7$ )<sup>1)</sup>。各細胞の分化状態は形態観察、免疫染色、及びレクチン染色により確認した。意図した DA が含まれていることを、抗チロシンヒドロキシラーゼ、及び抗 FOXA2 抗体を用いた染色により確認した。

#### (2) LC/MS/MS を用いたプロテオームとグライコプロテオームの相対定量

本研究で用いたワークフローを図 1 に示す。各細胞の膜及び細胞質基質からタンパク質を抽出し、トリプシンで消化した。その消化物の一部を LC/MS/MS を用いたプロテオーム解析に供した。残りのトリプシン消化物から、セルロースを用いて糖ペプチドを回収し、その一部を用いて LC/MS/MS によるグライコプロテオーム解析を行った。残りの糖ペプチドは PNGaseF 処理により脱糖鎖ペプチドとし、LC/MS/MS による脱糖鎖プロテオーム解析に供した。MS 装置には Q-Exactive、LC 装置には EASY-nLC1000 を用いた。プロテオーム解析及び脱糖鎖プロテオームの相対定量解析には、Proteome Discoverer 2.4 (検索エンジン: SequestHT) を使用した。タンパク質発現解析ではピーク面積のノーマライゼーション及びスケーリングを行った。グライコプロテオームの相対定量解析には、Proteome Discoverer 2.4 (検索エンジン: Byonic) を使用し、

目視によりヒト N 型糖鎖として不適切なグリコフォームを除外した。遺伝子オントロジーエンリッチメント (GO) 解析及び KEGG パスウェイ解析には DAVID6.8 を用いた。

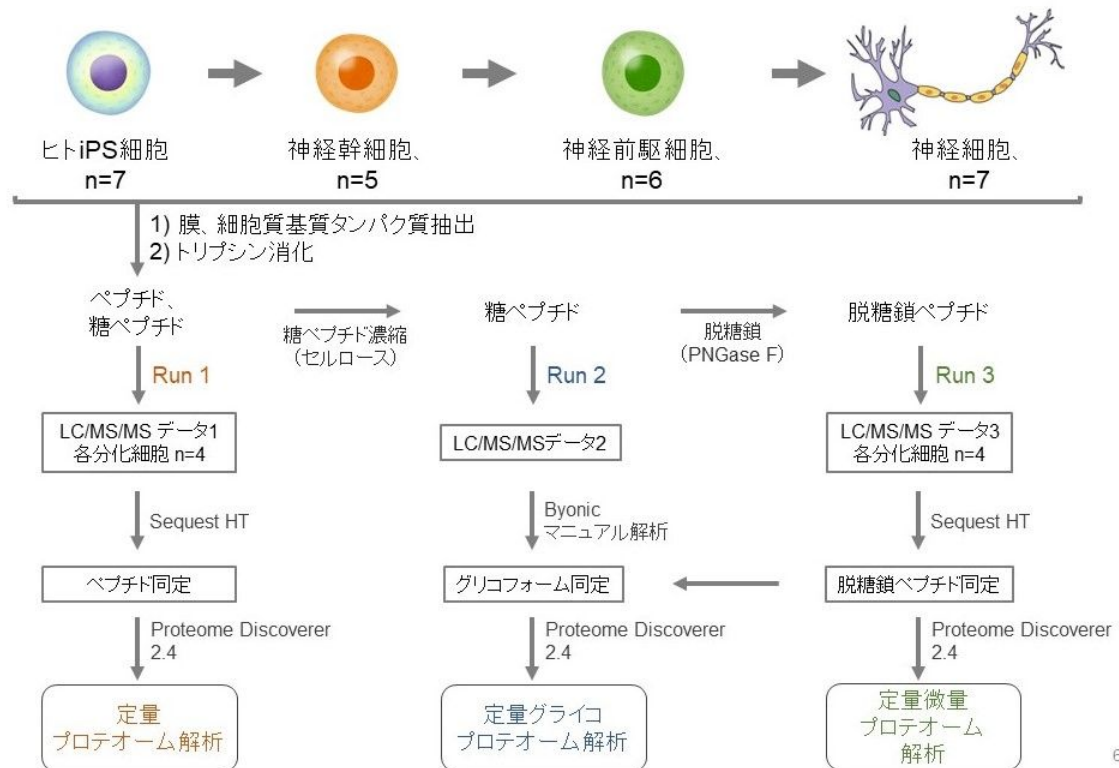


図1 iPSC 神経分化と、LC/MS/MS によるプロテオーム、グリコプロテオーム、及び脱糖鎖プロテオーム相対定量解析のワークフロー

#### 4. 研究成果

##### (1) iPSC 由来神経細胞のプロテオーム相対定量

トリプシン消化物の LC/MS/MS (図 1 Run1) により、13,801 種類のタンパク質が同定された。ヒートマップクラスタリング解析により、DA では他の細胞と比べ、タンパク質プロファイルが大きく変化していることが確認された。分化により iPSC と比較してピーク面積が 2 倍以上 ( $p$  値  $< 0.05$ ) 増加したタンパク質は合計 4,528 種であった。増加タンパク質に対し GO 解析を行ったところ、DA では神経伝達物質分泌、神経発達、シナプス小胞分泌、及び軸索伸長など神経機能に関連するタームが上位にエンリッチされていた。

##### (2) iPSC 由来神経細胞のグリコプロテオーム相対定量

トリプシン消化物の濃縮により得られた糖ペプチドを LC/MS/MS (図 1 Run2) に供した。各細胞において分化によって 2 倍以上増加 ( $p$  値  $< 0.05$ ) し、再現性が確認された (NSC:  $n=3$  以上、NPC:  $n=3$  以上、DA:  $n=4$  以上) グリコフォームを抽出し、そのグリコフォームの糖タンパク質をベン図で可視化した (図 2 右)。NSC と iPSC、及び NPC と iPSC で大きく変化した糖鎖 (グリコフォーム) を調べると、どちらも上位 5 つを高マンノース型が占め、M5、M8、M6、M9、M7 の順番であった。これに対して、DA と iPSC を比較すると、M5、M6 について変化の大きな糖鎖として HexNAc5Hex3Fuc1 (HN5H3F1) 組成を持つ糖鎖が同定されていた (図 2 中央)。HN5H3F1

組成から推定される糖鎖構造として、3 本鎖糖鎖とバイセクト 2 本鎖が考えられた。そこで HN5H3F1 付加が推定された糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを確認したところ、一部のスペクトルにバイセクト GlcNAc 構造を示唆するフラグメントが確認された（図 2 左に一例としてプレキシシン A3 のプロダクトイオンスペクトルを示す）。この糖鎖は長谷らによりマウス脳内で強く発現していることが見出された BA2 と推定され<sup>2)</sup>、神経分化で BA2 糖鎖が増加することは、ヒトとマウスで共通した現象であることが示唆された。同様にコンタクチン 1、2 やプレキシシン A1、B1、B2 などでも BA2 の存在が示唆された。

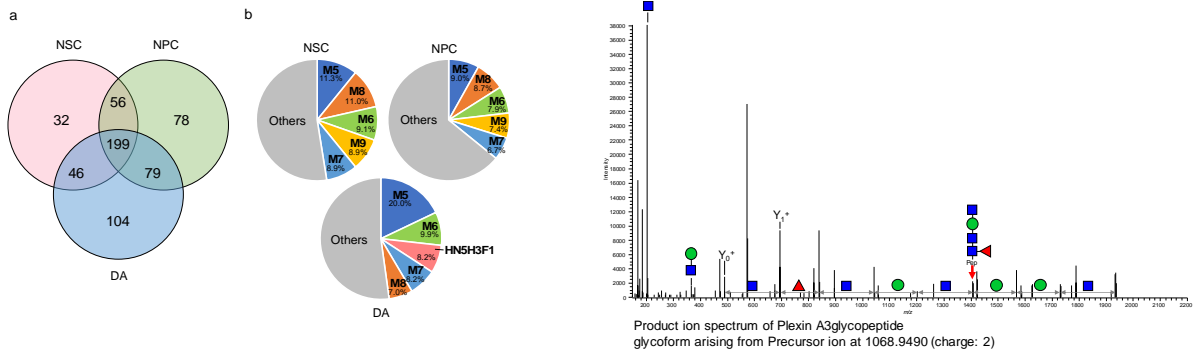


図 2 神経分化に伴う N 型糖鎖の変化

(左) iPSC に比較して各細胞で有意に増加した糖タンパク質の数。(中央) iPSC に比較して各細胞で有意に増加した N 型糖鎖構造。(右) プレキシシン A3 に由来する HexNAc5Hex3Fuc1 結合糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトル。

### (3) HN5H3F1 結合糖タンパク質の解析

HN5H3F1 結合糖タンパク質に対し、GO 解析及びパスウェイ解析を行ったところ、接着分子、及びセマフォリン-プレキシシン伝達経路が上位のタームとしてエンリッチされた（表 1、\*MS/MS より BA2 が示唆されたタンパク質）。接着分子では軸索などに存在する LICAM、コンタクチン 1、2、ポストシナプスに存在するニューレキシシン、及びプレシナプスに存在するニューロリギンなど神経系接着分子が含まれていた。一方、HN5H3F1 非修飾 DA 特異的タンパク質について GO 解析を行ったところ、イオンチャネル型受容体が上位にエンリッチされていた。

つぎに、脱糖鎖プロテオーム解析の結果（図 1 RUN3）を用いて、接着分子、及びセマフォリン-プレキシシン伝達経路の含量変化を調べたところ、DA では NrCAM、LICAM、NEO1、NCAM2 などの神経関連接着分子とともに、プレキシシン A1、A3、A4、C1 が増加していることが確認された。プレキシシン B1、B2 は NSC で、プレキシシン D1 は NPC で増加していた。そこで、プレキシシン類についてグライコプロテオミクスの結果を確認したところ、プレキシシン A2、A4、D1 には高マンノース型糖鎖のみが付加しており、プレキシシン A1、A3、B1、B2、D1 には高マンノース型と複合型が結合し、HN5H3F1 は DA で増加していることが確認された。このことから、HN5H3F1 修飾、おそらく BA2 は神経に特徴的な糖鎖修飾であることが示唆された。

表 1 HN5H3F1 修飾タンパク質 GO 解析結果

ターム	同定数	p 値	遺伝子名
cell adhesion	19	1.50E-12	ATP1B1/L1CAM/THY1/ALCAM/CNTN1*/CNTN2*/ITGAV/LAMB4/NEO1/NCAM1/NCAM2*/NLGN4X/OPCML/PTK7/PTPRF/PTPRS/PCDH17/SEMA4D/SIRPA
homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	10	3.80E-08	FAT3/FAT4/CELSR2/NPTN/PLXNB2/PCDH17/PCDH19/PCDH9/PCDHGB6/SDK1
axon guidance	9	5.90E-07	L1CAM/CNTN2*/NEO1/NCAM1/NRXN1/NRXN3/NFASC*/SEMA6A/SLIT1
semaphorin-plexin signaling pathway	8	1.10E-10	PLXNA3*/PLXNB1/PLXNB2/SEMA4C*/SEMA4D/SEMA4G/SEMA6A/SEMA7A
negative chemotaxis	8	1.40E-10	ITGAV/PLXNA3*/SEMA4C*/SEMA4D/SEMA4G/SEMA6A/SEMA7A/SLIT1
negative regulation of axon extension involved in axon guidance	6	1.00E-07	ADGRL3/DNER/NRXN1/NRXN3*/NRCAM/SDK1
synapse assembly	6	8.10E-06	ADGRL3/DNER/NRXN1/NRXN3*/NRCAM/SDK1
neuron migration	6	1.10E-04	MDGA1/ADGRL3/CNTN2/DNER/NRCAM/SEMA6A
leukocyte migration	6	2.30E-04	ATP1B1/ATP1B3/L1CAM/CXADR/ITGAV/SIRPA
neural crest cell migration	5	5.00E-05	SEMA4C*/SEMA4D/SEMA4G/SEMA6A/SEMA7A

\* bisected GlcNAc のプロダクトイオンが確認された糖タンパク質

以上のように、プロテオーム及びグライコプロテオームの定量的解析より、iPSC の神経分化に伴い、HN5H3F1 組成をもつ糖鎖が増加することが明らかになった。この糖鎖はプロダクトイオンスペクトルより、フコシルバイセクト 2 本鎖であり、脳特異的糖鎖 BA2 であることが示唆された。本糖鎖は主に細胞接着、セマフォリン-プレキシンシグナル伝達関連タンパク質に結合していた。今後、他の株に由来する神経細胞を解析することで、BA2 の増加が神経分化に共通の現象であるか否かを確認したい。また、BA2 のバイセクト GlcNAc 付加に係わる MGAT3 遺伝子をノックダウンしたとき神経分化にどのような影響が生じるかを明らかにすることを通じて、BA2 の神経分化マーカーとしての可能性を明らかにしていきたいと考えている。

#### 参考文献

- 1) S. M. Chambers, et al., Nature Biotechnology, 2009; 27, 275-280
- 2) S. Nakakita, et al., J Electrophoresis, 2004; 48, 1

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yuko Nagai, Hiromi Nakao, Aya Kojima, Yuka Komatsubara, Yuki Ohta, Nana Kawasaki, Nobuko Kawasaki, Hidenao Toyoda, Toshisuke Kawasaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Glycan Epitopes on 201B7 Human Induced Pluripotent Stem Cells using R-10G and R-17F Marker Antibodies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 508
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom11040508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nonaka Motohiro, Matsumoto Shogo, Ma Bruce Yong, Kido Hiroshi, Kawasaki Nana, Kawasaki Nobuko, Kawasaki Toshisuke	4. 巻 10
2. 論文標題 Glycan-Dependent and -Independent Dual Recognition between DC-SIGN and Type II Serine Protease MSP/LTMPRSS13 in Colorectal Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 2687 ~ 2687
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app10082687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Midorikawa Ryosuke, Takakura Daisuke, Morise Jyoji, Wakazono Yoshihiko, Kawasaki Nana, Oka Shogo, Takamiya Kogo	4. 巻 153
2. 論文標題 Monitoring the glycosylation of amino 3 hydroxy 5 methyl 4 isoxazole propionate type glutamate receptors using specific antibodies reveals a novel regulatory mechanism of N glycosylation occupancy by molecular chaperones in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 567 ~ 585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jnc.14964	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 川崎ナナ、内田恵理子、佐藤陽治、田辺光男、宮田直樹	4. 巻 35
2. 論文標題 薬の名前 続：ステムを知れば薬がわかる（第14回）．細胞治療	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharm Tech Japan	6. 最初と最後の頁 1559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川崎ナナ
2. 発表標題 バイオ製品の品質管理戦略構築に向けて
3. 学会等名 次世代アニマルセルインダストリー研究部会 シンポジウム2021-動物細胞を用いた医薬品および再生医療等製品製造・品質管理の潮流 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦澤貴哉、小泉匠、木村一雅、太田悠葵、川崎ナナ
2. 発表標題 データ非依存的MS によるiPS細胞の神経分化に伴う糖鎖合成関連タンパク質の発現解析
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村一雅、小泉匠、浦澤貴哉、太田悠葵、高倉大輔、川崎ナナ
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の神経分化に伴う膜タンパク質のN型糖鎖修飾の変化
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村一雅、小泉匠、太田悠葵、川崎ナナ
2. 発表標題 親水性相互作用濃縮法及びLC-MS/MSを用いたiPS細胞由来神経細胞膜糖タンパク質の同定
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦澤貴哉、小泉匠、木村一雅、太田悠葵、川崎ナナ
2. 発表標題 神経幹細胞分化過程におけるiPS細胞のプロテオームの定量解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦澤貴哉、小泉匠、木村一雅、太田悠葵
2. 発表標題 LC/MS/MSを用いたiPS細胞由来神経分化マーカーの探索
3. 学会等名 第68回日本質量分析学会総合討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村一雅、川崎ナナ
2. 発表標題 LC/MS/MSによる遺伝子組換えヒトラミン-511E8の部位特異的糖鎖解析
3. 学会等名 第68回日本質量分析学会総合討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川崎ナナ
2. 発表標題 LC/MS/MSを用いた糖タンパク質解析と新モダリティ開発への応用
3. 学会等名 GlycoTOKYO2019
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 佐藤僚祐, 太田悠葵, 川崎ナナ
2. 発表標題 LC-MS/MSを用いた大腸がん血清糖タンパク質マーカーの探索
3. 学会等名 GlycoTOKYO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村一雅, 太田悠葵, 小泉匠, 川崎ナナ
2. 発表標題 iPSC由来神経特異的細胞膜糖ペプチド網羅的解析法の開発」
3. 学会等名 GlycoTOKYO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawasaki Toshisuke, Nakao Hiromi, Yamaguchi Tomoko, Kawabata Kenji, Ohta Yuki, Kawasaki Nana, Toyoda Hidenao, Kawasaki Nobuko
2. 発表標題 Characterization of glycan structures of human induced pluripotent stem cells by marker antibodies
3. 学会等名 Glyco25 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾広美, 永井裕子, 山口朋子, 川端健二, 太田悠葵, 川崎ナナ, 豊田英尚, 川寄伸子, 川寄敏祐
2. 発表標題 マーカー抗体よりみたヒトiPS細胞(人工多能性幹細胞)表面糖鎖の性質
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田悠葵、木村一雅、小泉匠、川崎ナナ
2. 発表標題 LC/MS/MSによる人工多能性幹細胞 (iPSC)とiPSC由来神経細胞の詳細特性解析
3. 学会等名 第67回日本質量分析学会総合討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤僚祐、太田悠葵、亀田幸太郎、小泉匠、木村一雅、川崎ナナ
2. 発表標題 糖ペプチドのMS/MSデータの自動解析システムの開発
3. 学会等名 GlycoTokyo2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永井 裕子, 中尾 広美, 川崎 ナナ, 太田 悠葵, 亀田 康太郎, 川寄 伸子, 川寄 敏祐, 豊田 英尚
2. 発表標題 エンド- $\alpha$ -ガラクトシダーゼを用いたヒトiPS細胞由来ポドカリキシンのケラタン硫酸の微量分析
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田悠葵、小泉匠、亀田康太郎、川崎ナナ
2. 発表標題 LC/MS/MSを用いたiPS細胞の神経分化マーカー探索
3. 学会等名 第45回BMSコンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田悠葵、小泉 匠、川崎ナナ
2. 発表標題 LC/MS/MS を用いた神経分化プロテオミクスによる神経分化関連分子マーカー探索
3. 学会等名 Mass Spectrometry and Proteomics 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田悠葵、亀田康太郎、小泉匠、川崎ナナ
2. 発表標題 LC/MS/MSを用いたヒトiPS細胞由来心房性心筋細胞の分化メカニズム解明
3. 学会等名 Mass Spectrometry and Proteomics 2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高倉 大輔  (Takakura Daisuke)  (90760231)	横浜市立大学・生命医科学研究科・特任教員   (22701)	
研究分担者	太田 悠葵  (Ohta Yuki)  (10583453)	横浜市立大学・生命医科学研究科・特任助教   (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------