

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870230

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞の肝細胞分化に特異的な表面タンパク質の同定と新規分化誘導系への応用

研究課題名(英文) Analysis of expression profile of cell surface proteins, and establishment of specific cell adhesive materials for differentiation of human iPS cells into hepatic lineage cells

研究代表者

長岡 正人 (NAGAOKA, Masato)

福井大学・テニユアトラック推進本部・助教

研究者番号：90397050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトiPS細胞の肝細胞への分化過程で発現が変動する細胞表面タンパク質について解析し、新規接着性材料を作製することを目的とした。従来の分化誘導法では、マウス肉腫由来のマトリゲルを接着基質として用いていたが、まずは異種動物由来成分を含まない接着基質の開発を行った。細胞外マトリックスタンパク質であるビトロネクチンの一部とIgGのFcドメインの融合タンパク質(R-Fc)を作製し、安定した分化誘導が可能な接着基質として報告した。また、DNAアレイおよびqPCRにより分化誘導過程の細胞表面タンパク質を網羅的に解析し、分化に伴って増強される数種類の遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：In this study, defined cell-recognizable materials have been developed for the differentiation of human iPS cells into hepatocyte-like cells. In most of protocols reported previously, Matrigel is used as a substrate for cell adhesion during differentiation. Matrigel is derived from mouse sarcoma, and the method using Matrigel is not a defined condition. First, a small fragment of vitronectin containing RGD sequence was fused with Fc domain of IgG (R-Fc) to establish a defined substrate. This protein supported both maintenance of the pluripotent state of iPS cells and differentiation into hepatocyte-like cells. Next, the patterns of cell-surface protein expression during differentiation were analyzed by DNA array and qPCR to design novel cell adhesive materials for differentiated cells, and specific genes were identified, which expression were up-regulated during differentiation of human iPS cells into hepatic lineage cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ヒトiPS細胞 接着基質 バイオマテリアル 分化誘導 肝細胞

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト ES/iPS 細胞から分化誘導した肝細胞は、将来的な移植医療、代謝機能の解明、Maturity onset diabetes of the young (MODY) などの遺伝子疾患の治療法の探索、薬物動態試験など様々な応用が期待されている。これまで報告されている手法では、分化した肝細胞様細胞の最終的な割合は多くても全体の約 80%程度であり、cytochrome P450 (CYP)ファミリーやトランスポーターなど肝細胞特異的な遺伝子群の発現は生体由来肝細胞と比較して非常に低いことが改善すべき点である。また、分化誘導の際の接着基質としてマトリゲルが広く利用されているが、マトリゲルはマウス肉腫由来であるため組成が不明瞭で、さらに病原性物質の感染や免疫原性などが問題とされている。そのため、肝細胞の分化を促進あるいは肝細胞が選択的に接着できる xeno-free の新規接着基質の開発が必要とされていた。

### 2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化誘導法の改善のために、分化過程で特異的に発現が誘導される細胞表面タンパク質に着目し、分化途中の細胞の選択的な接着、前駆細胞の維持と更なる分化誘導が可能な培養系の構築を目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、研究目的の実現のために下記の研究課題について検討を行った。

#### (1) 新規接着基質の利用によるヒト iPS 細胞維持と分化誘導の安定化

ヒト ES/iPS 細胞の維持と肝細胞への分化誘導に広く用いられるマトリゲルの代替として新規接着基質の開発を行った。そのために、細胞外マトリックスの一種であるビトロネクチンの細胞接着に関与する断片とマウス IgG の Fc ドメインとの融合タンパク質を作製し、大腸菌株である Rosetta-gami B (DE3) pLysS 株を用いて産生した。作製した新規融合タンパク質 (R-Fc) 上でヒト iPS 細胞の維持と肝細胞様細胞への分化誘導効率について検討を行った。

#### (2) 分化誘導の各過程で発現している表面タンパク質の同定

ヒト iPS 細胞から肝細胞様細胞への分化誘導を行い (Si-Tayeb et al., Hepatology, 2010)、それぞれの分化過程の細胞 (胚体内胚葉、肝前駆細胞、肝細胞様細胞) で特異的に発現している細胞表面タンパク質の同定を行った。201B6 ヒト iPS 細胞株を用いて肝細胞への分化誘導を行い、各分化段階の細胞から total RNA を回収した。回収した total RNA から cDNA を合成し、PrimerArray Cell

adhesion molecules, PrimerArray Cytokine-cytokine receptor interaction (TaKaRa)を用いて SYBR Green 法による qPCR 解析を行った。また GeneChip Human Gene 2.0 ST Array (Affymetrix)を用いて網羅的な解析も行った。さらに、解析結果から発現に変動が見られた遺伝子について、FAM プローブを用いた qPCR により遺伝子発現の変動を確認した。解析には、3 回の独立した分化誘導実験から回収した total RNA を用いた。また比較として、ヒト成人正常組織由来トータル RNA およびヒト胎児正常組織由来トータル RNA (BioChain) を用いた。タンパク質レベルでの発現を確認するために、分化誘導した細胞を蛍光標識抗体で染色して解析した。

#### (3) 分化過程で特異的に発現しているレセプターに対する固定化リガンドの作製

既報から肝前駆細胞で発現が確認されている EPCAM と DLK1 の cDNA をクローニングし、IgG Fc ドメインの cDNA を組み込んだ発現ベクター (Nagaoka et al., Protein Eng., 2003) に導入した。精製の容易さや純度の高さ、配向固定や共固定が可能であることから、これまでの研究で用いて来た IgG の Fc ドメインとの融合タンパク質を用いた。固定化リガンドの産生は、ヒト胎児腎臓由来細胞株である HEK293 細胞を用いた。

#### (4) 作製した固定化リガンドの機能評価

作製した固定化リガンドを、96-well プレートに添加して吸着固定し、分化段階の細胞 (胚体内胚葉、肝前駆細胞、肝細胞様細胞) および肝癌細胞株である HepG2 細胞を播種し、接着性と分化誘導能について検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 新規接着基質の利用によるヒト iPS 細胞維持と分化誘導の安定化

マトリゲルに代わるヒト iPS 細胞の接着基質はこれまでに多数報告されておいるが、その多くが細胞外マトリックスを用いたものである。その中で、ビトロネクチン (vitronectin: VTN) は比較的 low molecular weight の 1 本鎖のタンパク質であり、組換えタンパク質として産生することが容易である。VTN の N 末端側には細胞接着分子であるインテグリンに認識されるアミノ酸配列 (RGD 配列) を持ち、C 末端側にはヘパリン結合ドメインが存在する。細胞接着には RGD 配列が最小限の認識配列であるため、RGD 配列を含む VTN fragment と Fc ドメインの融合タンパク質を作製し、ヒト iPS 細胞を安定に維持できる培養法として確立した。

RGD 配列のみを含む短いペプチド断片と Fc の融合タンパク質である R-Fc、N 末端と C 末端を除いた断片と Fc の融合タンパク質である NC-Fc を作製した。VTN は比較的 low molecular weight であり糖鎖修飾の影響がほとんどないことから

ら大腸菌 (Rosetta-gami B 株) による発現系を用いた。作製した組換えタンパク質への接着は固定化濃度依存的であり、また RGD 配列を介した接着であることが確認された。さらに、コロニーを形成して増殖する様子が観察された。

作製した VTN と Fc の融合タンパク質上で継代を繰り返したヒト iPS 細胞は未分化な状態を維持できることを確認した。また、R-Fc 上で継代培養したヒト iPS 細胞を SCID マウスの背中の皮下に移植し、14 週間後に組織を摘出したところ、三胚葉由来の組織に分化できることを確認し、R-Fc は未分化性および多能性の維持が可能な接着基質であることが示された。

次に、作製した R-Fc および NC-Fc 上での分化誘導を試みた。全長の VTN 上で分化誘導した場合、分化誘導の過程で細胞が剥がれる現象が観察されており、その理由として、細胞外マトリックスを分解する酵素である matrix metalloproteinase (MMP) の発現が誘導されることが示された。今回作製した R-Fc は MMP 認識配列を含まないため、分化誘導過程での細胞の解離を抑制できることが期待された。

R-Fc および NC-Fc を固定化した表面上でヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導を行ったところ、MMP 認識配列を含む NC-Fc 上では全長の VTN と同様に分化誘導 10 日後にはほとんどの細胞が解離してしまった。それに対して、R-Fc を用いることで安定に分化誘導が可能であることが示された。さらに、肝細胞様細胞への分化誘導を行ったところ、肝細胞特異的な遺伝子発現が確認され、また肝細胞の指標である low-density lipoprotein (LDL) および indocyanine green (ICG) の取り込みが観察できた。さらに、R-Fc 上で分化誘導したヒト iPS 細胞の遺伝子発現パターンは、マトリゲル上で分化誘導したヒト iPS 細胞の発現パターンと類似していることから、マトリゲルに代わる接着基質として利用できることが示された。

以上の結果より、vitronectin の接着ドメインを元に新規に作製した Fc 融合タンパク質である R-Fc は、ヒト iPS 細胞の未分化性・多能性維持から、肝細胞への分化誘導まで利用可能な接着基質であることが示された。

## (2) ヒト iPS 細胞から肝細胞へ分化誘導する細胞表面タンパク質の解析

ヒト iPS 細胞の分化誘導に用いる新規接着基質の開発のために、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化過程で発現が変動する細胞表面タンパク質について解析を行い、新規接着基質としての候補分子の選定を行った。

PrimerArray で解析できる 88 種類の遺伝子の中で、ヒト胎児肝組織およびヒト成人肝組織で発現が高く、分化誘導の 10 日前後から発現が増強するものを選んだ。Cell adhesion molecules では、ITGA4、CD34、SELPLG、CDH5、

CD58、VCAM1 の発現に変化が見られたが、大きな発現の変動は確認されなかった。さらに、変動の見られた遺伝子群は造血系の細胞に強く発現が見られるタンパク質であり、上皮系の肝細胞の選択には不適である可能性が示唆された。また、Cytokine-cytokine receptor interaction においても候補分子を絞ったが、いずれも造血系あるいは多様な細胞で発現が見られるタンパク質であった。発現に変動が見られた細胞接着分子 (ITGA4、CD34、SELPLG、CDH5、CD58、VCAM1) について分化誘導 20 日目の細胞の免疫染色を行ったところ、肝細胞のマーカーである HNF4A と VCAM1 (CD106) の共局在が観察された (図 1)。また、GeneChip を用いた解析の結果を FAM プローブによる qPCR により検証し、発現が増強される細胞表面タンパク質の候補が選別できた。

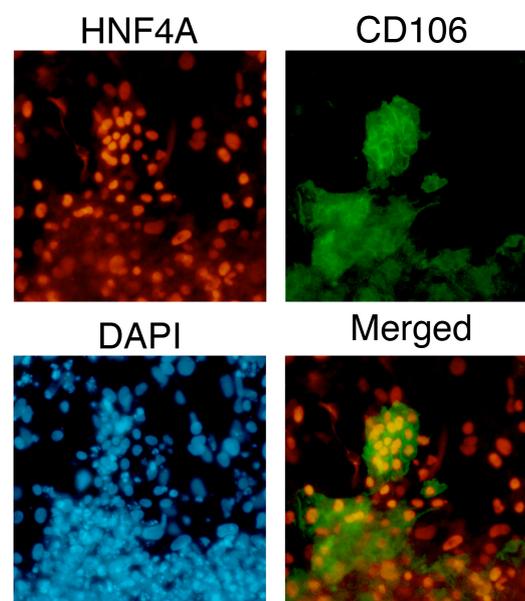


図 1 肝細胞へ分化誘導したヒト iPS 細胞の VCAM1 (CD106) と HNF4A の共局在

## (3) 分化過程で特異的に発現しているレセプターに対する固定化リガンドの作製

細胞表面タンパク質の発現解析の検討と並行して、肝前駆細胞で発現が誘導されることが知られている EPCAM と DLK1 について、接着基質としての応用性を検討した。

ヒト胎児肝組織の total RNA から合成した cDNA を鋳型に、hEPCAM および hDLK1 の細胞外ドメインをクローニングし、変異型マウス IgG1 の Fc ドメイン (Nagaoka M et al., Protein Eng., 2003) を組み込んである哺乳動物細胞発現ベクターに導入した。HEK293T 細胞に導入した後、培養上清から hEPCAM-Fc および hDLK1-Fc を精製した。

## (4) 作製した固定化リガンドの機能評価

作製した hEPCAM-Fc および hDLK1-Fc の接着活性を確認するために、分化誘導 10 日目のヒト iPS 細胞および HepG2 細胞を播種したが、特異的な接着性および細胞増殖は確認さ

れなかった。

EPCAMはホモフィリック、DLK1はホモ/ヘテロフィリックな相互作用を行うことが知られているが、固定化することで認識性が変化した可能性や、相互作用が弱く安定な接着を維持することができない可能性が考えられる。

今後は、作製した hEPCAM-Fc および hDLF1-Fc のより詳細な活性評価を行うとともに、選定した細胞表面タンパク質と相互作用する新規接着基質の作製を進める。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Nagaoka M\*, Kobayashi M, Kawai C, Mallanna SK, Duncan SA. Design of a vitronectin-based recombinant protein as a defined substrate for differentiation of human pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. PLoS ONE. 10: e0136350, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0136350

(\*Corresponding Author: 査読有)

[学会発表] (計 4 件)

① 長岡正人. ヒト iPS 細胞株の違いによる融合タンパク質 E-cad-Fc 上での増殖性の検証. 第 15 回 再生医療学会総会. 大阪国際会議場: 2016 年 3 月 17 日~19 日

② 長岡正人. Fc 融合タンパク質の幹細胞の維持・分化誘導への応用. シンポジウム「細胞認識性バイオマテリアルと生体適合性バイオマテリアル」. CIC センター (東京工業大学田町キャンパス内): 2016 年 2 月 12 日

③ 長岡正人. 細胞認識性 Fc 融合タンパク質の作製と幹細胞培養への応用. 第 4 回 日本バイオマテリアル学会北陸地区若手研究会. 石川ハイテク交流センター: 2015 年 11 月 30 日

④ 長岡正人. 融合タンパク質 E-cad-Fc を用いたヒト iPS 細胞の安定培養法の確立. 第 37 回 バイオマテリアル学会大会. 京都テルサ: 2015 年 11 月 9 日~10 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岡 正人 (NAGAOKA Masato)

福井大学・テニユアトラック推進本部・助教

研究者番号: 90397050