

# News Release



2024年5月7日

京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)

大阪大学

## ヘパラン硫酸鎖が付加された次世代型合成細胞外マトリックスを用いて、 高効率な骨格筋幹細胞の誘導を実現

### ポイント

- 広く iPS 細胞の培養などに使用されてきた合成細胞外マトリックス<sup>注1)</sup>であるラミニン E8 フラグメント<sup>注2)</sup>に、ヘパラン硫酸鎖<sup>注3)</sup>が結合した次世代型合成細胞外マトリックスを開発した。
- iPS 細胞の分化誘導に次世代型合成細胞外マトリックスを用いると、沿軸中胚葉<sup>注4)</sup>への分化誘導が強く促進される。
- 沿軸中胚葉への分化誘導効率が上昇した結果、骨格筋幹細胞<sup>注5)</sup>の分化誘導効率も従来の約 2 倍に上昇した。
- そのメカニズムとして、ヘパラン硫酸鎖が培地に含まれる bFGF<sup>注6)</sup>を捕捉して iPS 細胞に効率よくシグナル伝達をすることが明らかとなった。

### 1. 要旨

超明明 元特定研究員(当時: CiRA 臨床応用研究部門、現: 重慶医科大学基礎医学院・教授)、関口清俊 寄附研究部門教授(大阪大学蛋白質研究所)、櫻井英俊 准教授(CiRA 臨床応用研究部門)らの研究グループは、ヘパラン硫酸鎖が結合した次世代型合成細胞外マトリックスを開発し、iPS 細胞の分化誘導に用いることで、高効率に骨格筋幹細胞を分化誘導できることを見出しました。またそのメカニズムとして、ヘパラン硫酸鎖が培地に含まれる塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)を捕捉して iPS 細胞に効率よくシグナル伝達をすることが明らかとなりました。この成果により、iPS 細胞から骨格筋幹細胞への分化誘導を生体由来原材料を用いずに実施可能となり、筋ジストロフィーの再生医療の実現に寄与すると期待されます。

この研究成果は 2024 年 4 月 29 日にドイツ科学誌「*Advanced Science*」にオンライン公開されました。

### 2. 研究の背景

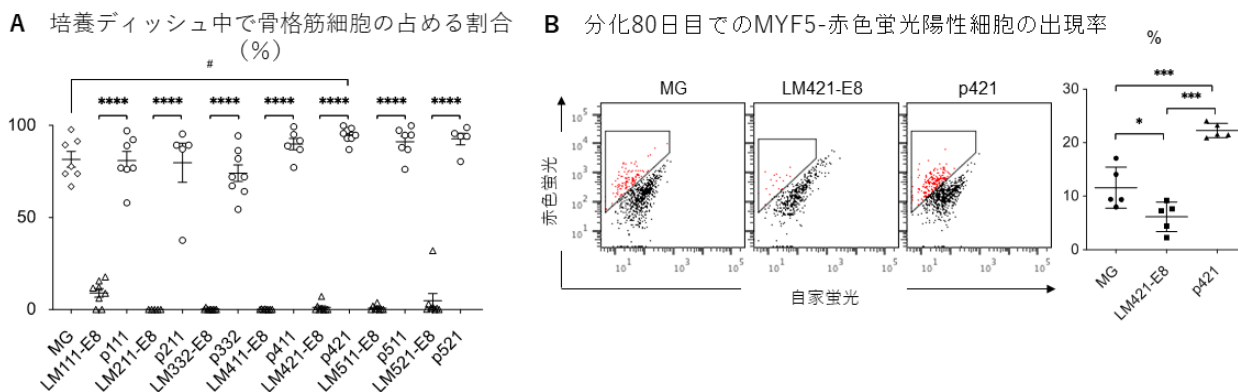
筋ジストロフィーに対する再生医療の研究開発として、櫻井准教授らのグループはこれまでに、ヒト iPS 細胞から高い再生能を持つ骨格筋幹細胞の誘導に成功しています(CiRA ニュース 2020 年 7 月 3 日)。しかしこの報告で用いられた分化誘導方法は、臨床応用を目指すにあたって二つの問題点がありました。一つは誘導効率が低いことであり、実際に移植する量の骨格筋幹細胞を得るために、相当量の細胞を準備する必要があり、製造コストが懸念されます。もう一つは、培養ディッシュのコート剤に生体由来の細胞外マトリックスである「マトリゲル<sup>注7)</sup>」を使用していることであり、人に移植する細胞を製造するため

には、生体材料由来ではなく合成タンパク質を使うことが望まれます。これらの問題点を解決するため、合成細胞外マトリックスの専門家である大阪大学蛋白質研究所の関口寄附研究部門教授との共同研究を開始し、今回の研究グループを形成しました。関口教授らは、これまで基底膜の細胞外マトリックスであるラミニンの細胞接着活性をほぼ 100%保持した組換えラミニン E8 フラグメントを開発し、この組換えフラグメントは iPS 細胞の維持培養などに広く用いられています (CiRA ニュース 2014 年 1 月 8 日)。関口教授らはさらに、マトリゲルの機能を模倣するため、パールカンという細胞外マトリックスのヘパラン硫酸鎖担持ドメインをラミニン E8 フラグメントに連結した「次世代型ラミニン E8 フラグメント」を開発し、今回の研究材料として iPS 細胞から骨格筋幹細胞への分化誘導に応用しました。

### 3. 研究結果

#### 1. 次世代型ラミニン E8 フラグメントは骨格筋幹細胞分化誘導効率を約2倍に高めた

研究グループでは、まず全ての種類のラミニン E8 フラグメントと次世代型ラミニン E8 フラグメントを用いて、骨格筋幹細胞分化誘導を実施し、中間段階の分化 38 日目で骨格筋細胞への分化誘導効率を評価しました (図 1A)。すると従来のラミニン E8 フラグメントでは全て骨格筋細胞への分化が見られないのに対し、次世代型ラミニン E8 フラグメントでは全てがマトリゲル (MG) と同等かそれ以上の骨格筋細胞誘導能を持つことが分かりました (図 1A)。その中でも次世代型ラミニン 421E8 フラグメント (p421) が統計学的有意に誘導効率を上昇させたことから、以降の実験では p421 をラミニン 421E8 フラグメント (LM421-E8) と比較して実験を進めました。骨格筋幹細胞のマーカーである MYF5 遺伝子が発現すると赤色蛍光を発する iPS 細胞を用いて、骨格筋幹細胞への分化誘導を実施し、分化 80 日目で赤色蛍光を発する細胞 (=骨格筋幹細胞) を計測しました。従来法の MG では平均 12%程度の誘導効率、LM421-E8 では平均 6%程度と半減したのに対し、p421 では平均 22%程度の誘導効率に上昇しました (図 1B)。

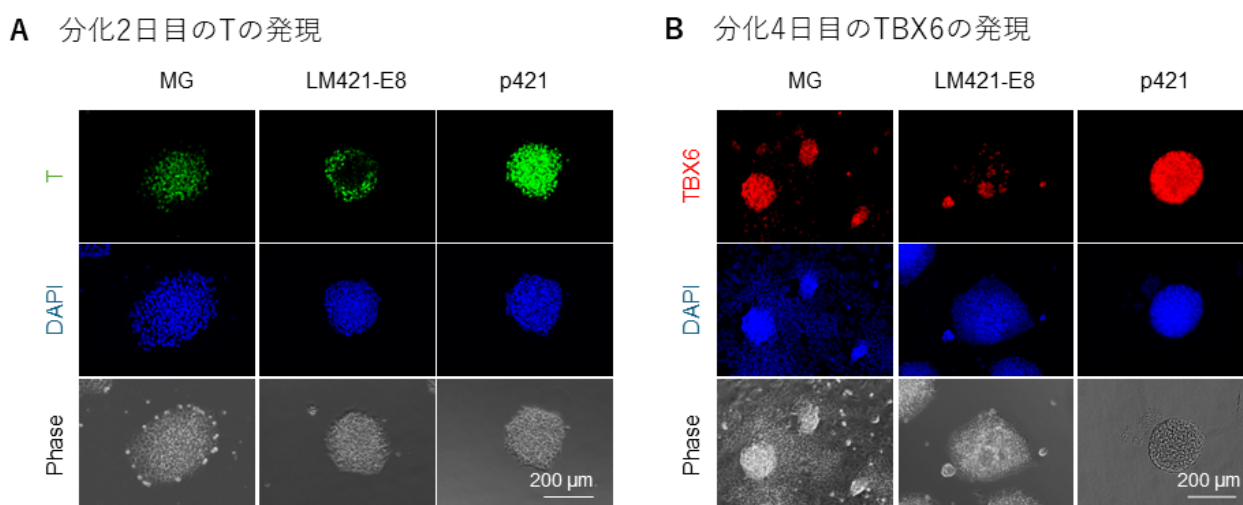


**図 1: 次世代型ラミニン E8 フラグメントを用いた骨格筋幹細胞誘導の従来法との比較**

- A:** 免疫染色法を用いて確認した分化 38 日後の骨格筋細胞の占める面積の割合。従来法の MG では平均 80%の誘導効率であるのに対し、既存のラミニン E8 フラグメントではラミニン 111 からラミニン 521 に至るまで、ほとんど筋細胞へと分化しなかった。一方パールカンのヘパラン硫酸鎖担持ドメインを結合した次世代型ラミニン E8 フラグメントでは、すべてのタイプで 80~90%の誘導効率を誇り、中でも p421 は 95%近くと極めて高い骨格筋分化効率を示した。
- B:** 骨格筋幹細胞の誘導効率の定量結果。骨格筋幹細胞のマーカーである MYF5 の発現に合わせて赤色蛍光が光る iPS 細胞を用いて、骨格筋幹細胞への分化誘導を実施し、分化 80 日目で赤色蛍光の出現率をフローサイトメトリーで解析した。台形で囲まれた赤いドットが骨格筋幹細胞を表す。右図は 5 回の実験の平均値をグラフ化したもの。

## 2. 次世代型ラミニン 421E8 フラグメントは沿軸中胚葉分化誘導を促進する

次に、骨格筋幹細胞誘導効率の上昇が、どの時点で起きているかを検証しました。骨格筋幹細胞誘導の最初のステップは沿軸中胚葉の誘導であるので、初期中胚葉マーカーの BRACHYURY (T) および沿軸中胚葉マーカーの TBX6 の発現を免疫染色で確認しました。分化 2 日目の T の発現は MG では比較的均一に発現しており、LM421-E8 では一部にしか発現していませんでした。p421 では MG に比べて輝度が高く発現していました(図 2A)。分化 4 日目の TBX6 の発現は、MG では球形の細胞塊にはある程度発現しているものの、TBX6 が発現していない細胞がその周囲に広がる傾向が観察されました。LM421-E8 では T と同じく、ごく一部の細胞のみで発現するにとどまりました。一方で p421 では球状の細胞塊のみが特異的に誘導される傾向が確認され、ほとんどすべての細胞が陽性でした(図 2B)。以上より、p421 は分化のもっとも初期において沿軸中胚葉の誘導効率を上昇させていることが明らかとなりました。論文ではさらにその効果を生み出す時期が分化 7 日目までであることを見出しています。



**図 2 : 中胚葉分化誘導の比較**

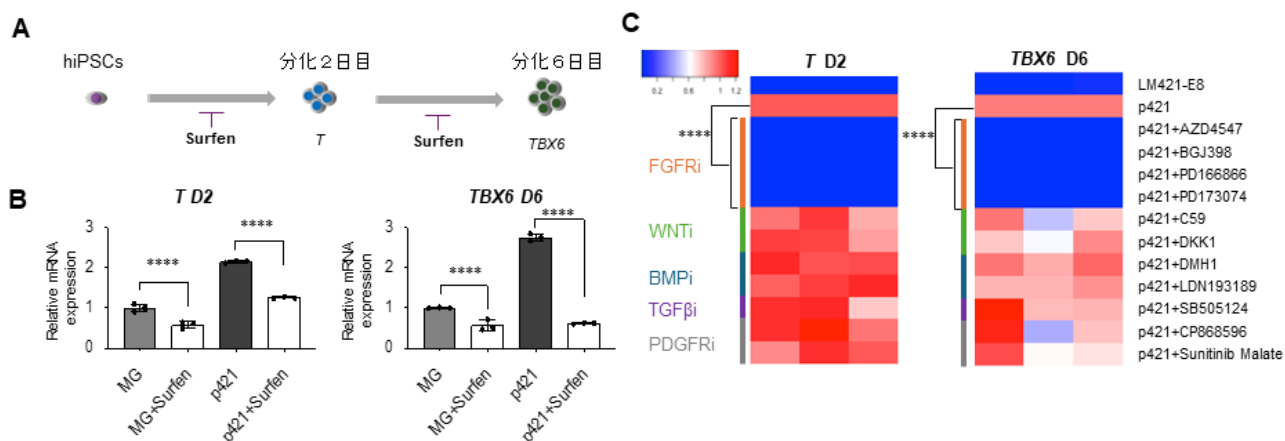
A: 分化 2 日目の T の免疫染色画像。緑が T、青は核染色。

B: 分化 4 日目の TBX6 の免疫染色画像。赤が TBX6、青は核染色。

## 3. p421 による中胚葉分化促進には線維芽細胞成長因子(FGF)シグナリングが重要である

続いて、p421 の持つ中胚葉分化促進効果が、どのようなメカニズムで起きるのかを検証しました。まずヘパラン硫酸の拮抗薬である Surfen を分化誘導の開始時および分化 2 日目から添加すると(図 3A)、MG コート上でも p421 コート上でも中胚葉分化マーカーである T および TBX6 の発現がそれぞれ低下しました(図 3B)。このことから、ヘパラン硫酸が中胚葉分化を促進する機能を持っていることが分かりました。

ヘパラン硫酸鎖は、成長因子と呼ばれるホルモンの一種を捕捉してそのシグナルを細胞に効率よく伝える役割を担っています。そこで、次世代型ラミニン E8 フラグメントがおそらくは何らかの成長因子を捕捉して効果を発揮しているのではないかと仮説を立てました。そこで Surfen 添加と同じタイミングでさまざまな成長因子の阻害剤を添加したところ、FGF 受容体の阻害剤は全て強力に T 発現についても TBX6 発現についても抑制し、中胚葉誘導が阻害されていることが分かりました(図 3C)。これらの結果から、p421 に結合しているヘパラン硫酸鎖により FGF シグナル伝達が FGF 受容体に効率よく伝わることで、中胚葉分化促進効果のメカニズムであることが明らかとなりました。



**図3 : ヘパラン硫酸の持つ中胚葉分化促進効果のメカニズム解析**

- A:** 実験の模式図。分化初日から2日目まで Surfen を添加し T の発現を解析、あるいは分化2日目から6日目まで Surfen を添加し TBX6 の発現を解析した。
- B:** A の実験結果。MG コート上でも p421 コート上でも、Surfen によるヘパラン硫酸の阻害により、2日目での T(左)および6日目での TBX6(右)の発現が抑制される。
- C:** 各種成長因子の阻害剤を添加した実験結果をヒートマップで表した図。FGF 受容体阻害剤 (FGFRi) は、強力に中胚葉分化マーカーの発現を抑制している (赤は発現が高く、青は発現が低い)。

#### 4. 分化誘導開始前に使用している iPS 細胞維持培地中の bFGF が FGF シグナルを伝えていた

3. の結果を受けて、研究グループは悩みました。というのも分化誘導培地には FGF は添加しておらず、どこから FGF シグナルが伝えられているのかが分からなかったからです。しかし、よく考えると、分化誘導開始前に使用している iPS 細胞維持培地である AK02N には 100 ng/ml という比較的高用量の bFGF が添加されており、この bFGF がヘパラン硫酸鎖に捕捉されており、分化誘導開始以後にも作用しているのではないかと仮説を立てました。そこで、まず AK02N に含まれる bFGF の量を段階的に減らした実験をしました (図4A 上段)。すると bFGF の濃度を 5 ng/ml まで減らした際に、分化2日目の T の発現量が大きく低下し (図4A 下段)、やはり分化誘導開始前の bFGF が、その後の中胚葉分化促進効果に影響を与えることが分かりました。つぎに、その効果は FGF 受容体を介するものかどうかを検証するため、3. で使用した成長因子阻害剤を分化誘導1日前から開始時まで添加して、分化2日目の T の発現を解析しました (図4B 上段)。結果は分化誘導後の際と同じく、FGF 受容体阻害剤を阻害した際に強力に T の発現が抑制され、やはり分化誘導開始前に bFGF から FGF シグナルが伝えられていることが重要であることが分かり、そのためにはヘパラン硫酸鎖による bFGF の捕捉が機能しているであろうと考えられました。

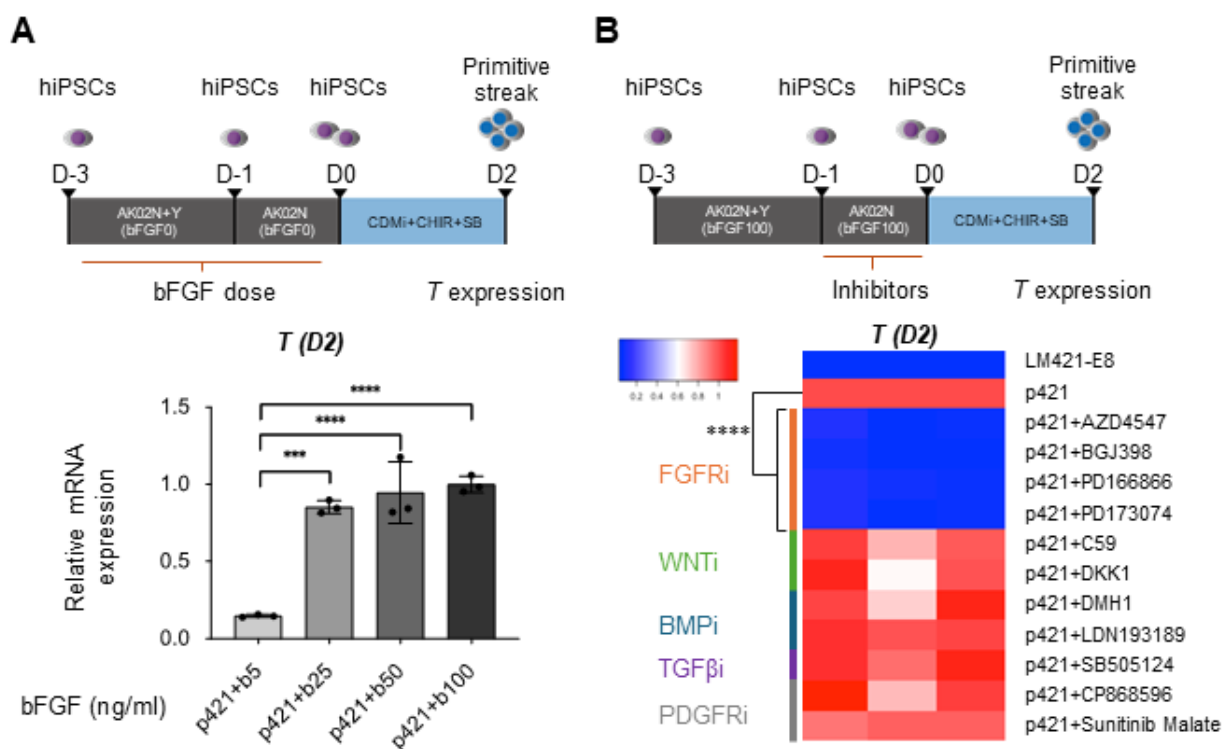


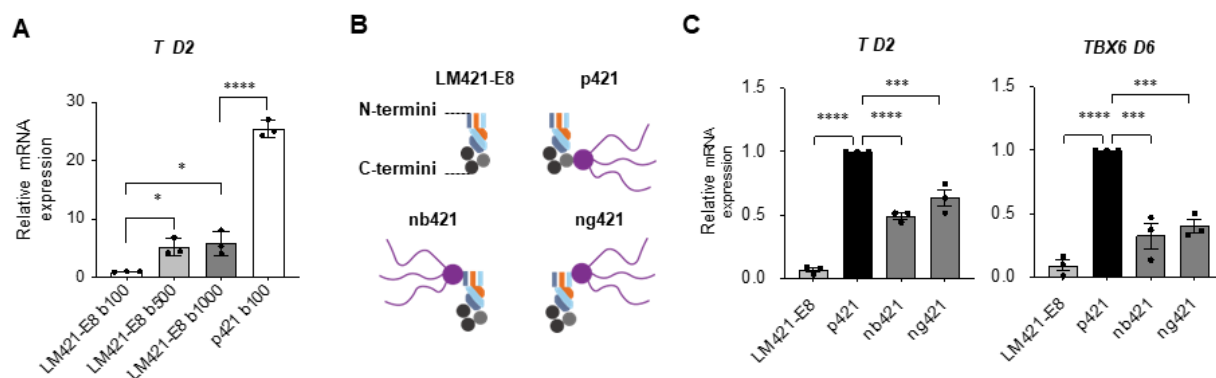
図4 :分化誘導開始前の FGF シグナリングの重要性の検証

A: iPS 細胞維持培地に含まれる bFGF の量を減らした際の、中胚葉誘導効率の変化を見た実験。下段は分化2日目のTの発現解析。bFGF を 5 ng/ml (+b5 と表記)まで減らすと、Tの発現が大きく下がる。

B: 分化誘導1日前から分化誘導開始時まで成長因子阻害剤を添加した際の、中胚葉誘導効率の変化を見た実験。下段は分化2日目のTの発現解析。FGF 受容体阻害剤を添加すると、Tの発現が強力に抑制される。

## 5. FGF シグナルにより高効率に中胚葉分化誘導するには、ヘパラン硫酸鎖が適切な位置にあることが重要

分化誘導開始前の bFGF の添加が重要であることが分かりましたので、では p421 を用いなくても、単純に bFGF を過剰量添加すればヘパラン硫酸鎖を持たない LM421-E8 でも、中胚葉分化促進効果を見出せるのではないかと考え、bFGF の大量添加実験を行いました。LM421-E8 でコートしたプレート上で分化誘導を実施し、分化誘導3日前から開始時まで 100, 500, 1000 ng/ml という大量の bFGF を添加しました。しかし、大量の bFGF 添加により T 発現量は上昇したものの、p421 を用いた条件には遠く及びませんでした(図5A)。やはりヘパラン硫酸鎖が必要であるということが分かったので、次にヘパラン硫酸鎖を結合する位置によって違いがあるのか、どこに付けても効果があるのかを検証しました。通常の p421 ではヘパラン硫酸鎖はラミニン  $\alpha$  鎖の C 末端に連結されていますが、ヘパラン硫酸鎖を  $\beta$  鎖の N 末端あるいは  $\gamma$  鎖の N 末端に連結した次世代型ラミニン E8 フラグメントを作製し(それぞれ nb421 あるいは ng421 と表記)、中胚葉への分化誘導効率を比較検討しました。その結果、C 末端に結合させた通常の p421 が最も効果が高いことが明らかとなりました。C 末端側は、細胞が実際に接着する場でもあり、接着した細胞膜表面に近い位置にヘパラン硫酸鎖が存在することで、効率よく FGF シグナルを伝えられている可能性が示唆されました。



**図5 :ヘパラン硫酸鎖の結合部位の検証**

- A: LM421-E8 コート上で、iPS 細胞維持培地に含まれる bFGF の量を過剰量まで増加させた際の 中胚葉誘導効率の変化を見た実験。分化2日目のTの発現は、通常の bFGF 濃度である 100 ng/ml から 500 ng/ml に増加すると5倍程度増加するが、過剰量と考えられる 1000 ng/ml まで増加させても大きな変化はなく、p421 には及ばない。
- B: LM421-E8 フラグメントと、3種類の次世代型ラミニン E8 フラグメントの模式図。通常の p421 は C 末端側に結合されているが、N 末端側に結合させた nb421t および ng421 を合成した。
- C: 上記フラグメントでコートした際の中胚葉分化誘導効率の比較。T や TBX6 の発現は通常の p421 で最も高く、N 末端側にヘパラン硫酸鎖を結合させたものは、させていない LM421-E8 フラグメントよりは高い発現を呈するが、p421 には及ばない。

#### 4. まとめと展望

本研究では、次世代型ラミニン E8 フラグメントである p421 を用いることで、ヒト iPS 細胞からの骨格筋幹細胞分化誘導効率を上げることに成功しました。これまで用いていたネズミ腫瘍由来の「マトリゲル」は、再生医療の臨床応用には適さないため、ヒト由来の組換えタンパク質である p421 の使用により高効率で骨格筋幹細胞を分化誘導できることは、ヒトに投与可能な骨格筋幹細胞分化誘導プロトコール確立に寄与します。またヘパラン硫酸鎖により初期の中胚葉への誘導分化効率を上昇させることが、最終的な骨格筋幹細胞分化誘導効率を上げることが分かり、今後の分化誘導プロトコールの安定化や改良に役立つ知見を多く得ることができました。

また iPS 細胞由来骨格筋幹細胞は患者さん由来のヒト iPS 細胞を用いることで、病態研究や創薬スクリーニングにも応用可能です(CiRA ニュース 2023 年 1 月 11 日)。効率の良い分化誘導法により筋疾患の病態解明や創薬研究にも貢献することが期待されます。

#### 5. 論文名と著者

##### ○ 論文名

“Heparan Sulfate Chain-conjugated Laminin-E8 Fragments Advance Paraxial Mesodermal Differentiation Followed by High Myogenic Induction from hiPSCs”

DOI: 10.1002/adv.202308306

○ ジャーナル名

*Advanced Science*

○ 著者

Mingming Zhao<sup>1,4\*</sup>, Yukimasa Taniguchi<sup>2</sup>, Chisei Shimono<sup>2</sup>, Tatsuya Jonouchi<sup>1</sup>, Yushen Cheng<sup>3</sup>, Yasuhiro Shimizu<sup>2</sup>, Minas Nalbandian<sup>1</sup>, Takuya Yamamoto<sup>3</sup>, Masato Nakagawa<sup>3</sup>, Kiyotoshi Sekiguchi<sup>2\*</sup>, and Hidetoshi Sakurai<sup>1\*</sup>

\*責任著者

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) 臨床応用研究部門
2. 大阪大学蛋白質研究所 マトリクソーム科学(ニッピ) 寄附研究部門
3. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) 未来生命科学開拓部門
4. 重慶医科大学基礎医学院 メディカルエピジェネティクスセンター

## 6. 本研究への支援

本研究は、以下の支援を受けて実施されました。

- 国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 (AMED) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム (「次世代型マトリックスによる高効率骨格筋幹細胞分化誘導法の開発」, 「再生医療用 iPS 細胞ストック開発拠点」)
- 日本学術振興会 (JSPS) 科研費 (17K13014, 19K20271, 21K08528)
- 文部科学省 (MEXT) 科研費 学術変革領域研究 A (23721401)
- 重慶医科大学プログラム (W0144)

## 7. 用語説明

### 注 1) 細胞外マトリックス

細胞間の隙間を埋める生体高分子(コラーゲンやプロテオグリカン、ラミニンなど)の集合体。骨・軟骨、歯、皮膚などに多く含まれている。細胞の足場となり、細胞の増殖や分化の制御にも関わる。

### 注 2) ラミニン E8 フラグメント

細胞外マトリックスの一つで、基底膜を構成するラミニンの細胞接着活性を保持した組換えタンパク質。iPS 細胞を始め細胞を培養する際に、細胞をディッシュと接着するための成分として広く使われている。

### 注 3) ヘパラン硫酸鎖

細胞表面に存在する糖鎖で、細胞の機能を調節する役割を果たす。特に bFGF (塩基性線維芽細胞成長因子) のシグナル伝達に関与し、iPS 細胞の分化誘導に影響を与える。

### 注 4) 沿軸中胚葉

脊椎動物の個体発生の一時期に現れる細胞集団で、体を支持するような組織(筋肉や骨、軟骨、真皮など)を生み出す。

注 5) 骨格筋幹細胞

骨格筋が損傷したとき、損傷部を修復するために骨格筋系の細胞に分化する幹細胞。

注 6) bFGF

塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor)。多様な作用を持つ小型のタンパク質。細胞の表面にある線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)と結合して効果を発揮する。

注 7) マトリゲル

マウスの肉腫細胞から抽出した細胞外マトリックス。動物由来の様々な成分を含む。