

論文の内容の要旨

Study of Cell-Surface Markers Specifically Expressed in Pluripotent Embryonic Stem Cells

(未分化細胞特異的に発現する細胞表面タンパク質に関する研究)

石浦研究室所属
印東 厚

背景

胚性幹 (ES) 細胞は自己増殖能と多分化能を合わせ持つ細胞であり、生殖細胞を含む全ての細胞種へと分化することが報告されている。それゆえ ES 細胞は、再生医療などへの応用、さらに臓器形成や分化を *in vitro* で研究するためのユニークなツールとして用いられている。しかし ES 細胞は生理的な機能性細胞への分化制御が未だ不完全であることや分化誘導後も腫瘍を形成するなど安全性・安定性への問題が山積しており、依然として細胞移植を用いた医療への応用にはほど遠い。ES 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞などの幹細胞を利用した医療技術の実現のためには、幹細胞性を制御する分子群を同定し、その作用機構を分子レベルで明らかにすることが重要であり、その解明が待望されている。特に幹細胞は細胞増殖因子やホルモン、細胞外マトリックス、細胞間相互作用などによってその未分化状態や分化方向が大きく左右されることから、細胞外からのシグナル伝達を受容する膜タンパク質の重要性が指摘されている。幹細胞の細胞表面タンパク質が幹細胞を制御する分子機構は、再生医療における分化誘導技術の実用化に必須な知見である。そこで私はマウス ES 細胞を利用して未分化状態において特異的に発現する膜タンパク質をプロテオーム解析によって網羅的に解析してきた。

研究 1

プロテオーム解析において、細胞や組織から溶出したタンパク質混合物はその翻訳後修飾を含めると極めて複雑な組成であるため、そのまま一度に解析することは不可能である。このため電気泳動法によってタンパク質を分離するか、タンパク質をペプチドに消化した後に二次元液体クロマトグラフィ (2D-LC) によって分離することにより単

純化したサンプルを質量分析器で同定することが一般的である。特に数百種から数千種のタンパク質を同時に解析するためにはハイスループットな解析が可能である 2D-LC 法が利用されている。このとき発現量が比較的少ないタンパク質をもらさず検出するためには、発現量が多いタンパク質と明確に分離する必要がある。即ち、膜タンパク質などの比較的希少なタンパク質を同定するためにはペプチドを効果的に分離することが重要である。博士課程において、まず私は 2D-LC によるペプチドの新規分離法の開発を行った。一次元目の LC にはカチオン交換カラム(SCX)が多用されていたが、本研究ではこれまで主に低分子化合物などの分離に用いられていたカラムである両性イオン交換カラム(ZIC-HILIC)に着目し、これらのカラムのペプチド分離能の比較検討を行った。まず、単一ペプチドがどのように溶出するかを調べたところ、ZIC-HILIC による分離では SCX よりペプチドがシャープな溶出ピークに分画される傾向がみられた。さらにモデルタンパク質としてヒト血清アルブミンのトリプシン消化物を両カラムでそれぞれ分画した後に 1D-LC-MS 解析を行ったところ、同定できたペプチド数やシーケンスカバー率が SCX モードに比べ ZIC-HILIC モードでは顕著に改善された。二次元目に逆相カラムを用いた 2D-LC-MS/MS 解析ではさらに著しい改善がみられた。この改善手法を用いてマウス ES 細胞から精製した膜タンパク質のプロテオーム解析を行い、膜タンパク質を 250 種同定することに成功した。

研究 2

未分化幹細胞特異的に発現している膜タンパク質群は幹細胞を制御する分子機構の解明の切り口となることが期待されるだけでなく、ES 細胞や iPS 細胞を用いた再生医療を行う上で有用な細胞表面マーカーとなり得ると考えられる。本研究では研究 1 において述べた 2D-LC 法によって分離する手法、及び二次元電気泳動法によって分離する手法を相補的に行い、マウス ES 細胞の膜タンパク質のプロテオミクス解析を行った。これらの手法によって 300 以上の膜タンパク質を同定した。プロテオミクス解析の結果において未分化状態での発現量が高い膜タンパク質についてウェスタンブロット解析や免疫蛍光染色法などによって候補を絞り込み、重点的に解析を行った。同定した膜タンパク質のうち、特に Slc16a1 はプロテオミクス解析においてマウス ES 細胞の分化過程で大きく減少する膜タンパク質であることがわかったため、LIF 除去によるマウス ES 細胞の分化過程での発現変動を詳細に調べた。Slc16a1 は LIF 除去後 3 日後でその発現が未分化状態時の 10%程度まで減少した。Slc16a1 は ES 細胞の核内に発現する未分化マーカーである Oct-3/4 や Nanog と同様に未分化細胞マーカーになりうることを期待される。さらに、フローサイトメトリー (FACS) 解析によって LIF 依存の分化過

程における発現変動を検証したところ、Slc16a1 の発現減少は既存のマウス ES 細胞表面マーカーである SSEA1 よりも未分化状態に特異的であった。またプロテオミクス解析で未分化細胞特異的に同定された Bsg と Slc16a1 が未分化 ES 細胞の細胞膜において共発現していることが確認された。このようなタンパク質コンプレックスが共同的に多能性の維持に寄与している可能性が示唆された。

研究 3

モデル動物などを用いた実験などから指摘されている再生医療の問題点として、ES 細胞や iPS 細胞などの未分化性を有する細胞を利用した場合、移植後に腫瘍化が起こる危険性があることが報告されている。この原因の一つとして、移植細胞中に未分化細胞が残留している可能性が考えられている。本研究では研究 2 において同定された膜タンパク質群のうち、未分化 ES 細胞において特異的に発現し、細胞表面抗原候補として有効な膜タンパク質のひとつ、EphA2 について詳細な検証を行い、未分化細胞のソーティング技術の開発を目指した。FACS 解析によって LIF 依存の分化過程における EphA2 の発現変動を検証したところ、既知の細胞表面マーカーである SSEA1 や Cripto より明確な発現減少が確認できた。EphA2 はマウス ES 細胞において、未分化状態に特異的な細胞表面マーカーであることが示された。EphA2 の医療分野における利用の可否を検証するため *in vitro* 系で肝臓に分化させた ES 細胞においても検証したところ、分化後 3 週間経ても EphA2 ポジティブ細胞の残留が確認された。この残留した未分化細胞が動物実験での腫瘍化の一因となっていることが示唆された。現在、EphA2 を指標として未分化細胞の除去を行った分化細胞を免疫不全マウスに移植し、腫瘍化のリスクを回避もしくは抑制できるかを経過観察中である。

また、解析した未分化状態特異的に発現している膜タンパク質群はマウス iPS 細胞でも同等かそれ以上の発現が見られ、ES 細胞と iPS 細胞で細胞膜を介する同様の未分化維持機構を持つことが示唆された。さらにこれらの膜タンパク質はヒト ES 細胞や iPS 細胞でも発現していることが確認され、将来の幹細胞移植を用いた医療応用も可能であることが期待される。ES 細胞や iPS 細胞を利用した細胞移植による医療への応用の際には、分化マーカーによるソーティング技術の開発が期待されている。しかし未分化細胞の残留による腫瘍化を回避するためのセーフティネットとして、細胞表面マーカーによる未分化細胞の除去方法は重要な技術となる。EphA2 をマーカーとすることにより既知の SSEA1 や Cripto より有効な分離を行うことができると期待される。