



地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所
国立研究開発法人理化学研究所
国立医薬品食品衛生研究所

平成 31 年 3 月 22 日

参考資料

(文部科学記者会、科学記者会、神奈川県政記者クラブ、川崎記者クラブ 同時送付)

神奈川県ヘルスケア・ニューフロンティアの
先進異分野融合プロジェクト研究立案・推進事業での支援成果が
英国科学雑誌『Scientific Reports』に掲載されました！

「『心筋細胞になりやすい iPS 細胞』をみつけるための目印となる遺伝子を同定」

・概要

神奈川県立産業技術総合研究所 (KISTEC) が神奈川県ヘルスケア・ニューフロンティアの先進異分野融合プロジェクト研究立案・推進事業で支援を行った「再生医療等製品の品質・安全性評価プロジェクト (研究開発代表者：河合 純 理化学研究所 科技ハブ産連本部 予防医療・診断技術開発プログラム 副プログラムディレクター)」の研究成果が、英国科学雑誌『Scientific Reports』に掲載されました。

国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 佐藤 陽治 部長 (大阪大学大学院薬学研究科教授と神奈川県立産業技術総合研究所研究員を兼務)、安田 智 室長、大橋 文哉 研究生 (大阪大学大学院薬学研究科、テルモ株式会社所属) らの研究グループは、大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科 澤 芳樹 教授、宮川 繫 特任教授、理化学研究所科技ハブ産連本部 予防医療・診断技術開発プログラム 河合 純 副プログラムディレクターらと共同で、ヒト iPS 細胞から心筋細胞への『分化しやすさ』を予測することができるマーカー遺伝子として *CXCL4/PF4* を同定しました。

ヒト iPS 細胞から誘導される細胞を再生医療に応用するためには、目的とする細胞に分化しやすい iPS 細胞株を選ぶ必要があります。目的とする細胞に分化しにくい iPS 細胞を選んでしまうと、分化していない iPS 細胞が移植する細胞の中に残りやすくなり、こうした残存した未分化 iPS 細胞が患者さんの体内で腫瘍を形成するリスクが高くなるからです。

本研究では、心筋細胞へ分化しやすい iPS 細胞株と分化しにくい iPS 細胞株の遺伝子発現を理化学研究所が開発した世界唯一の遺伝子解析技術である CAGE 法など、3 つの遺伝子解析手法を用いて網羅的に解析しました。その結果、*CXCL4/PF4* という遺伝子の発現量が心筋細胞への分化しやすさと相関することが明らかとなりました。つまり、*CXCL4/PF4* の発現量を目印にすれば心筋細胞の製造に適した iPS 細胞株を選び出すことができると考えられます。本成果は iPS 細胞株の品質管理方法として心筋再生医療の実用化に貢献することが期待されます。

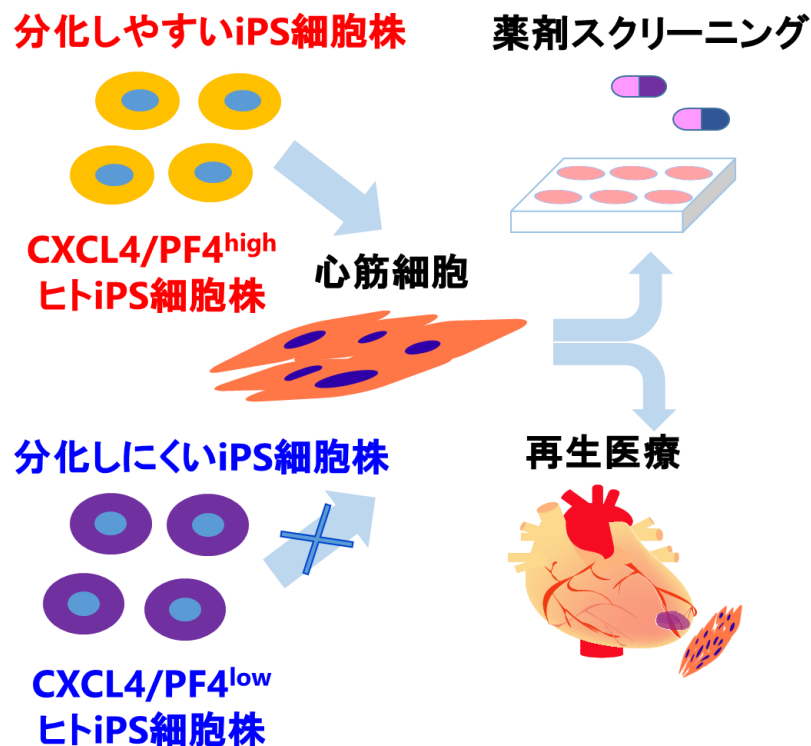


図 1. 本研究の概念図

・ 研究の背景

ヒト iPS 細胞は様々な細胞へ分化しうる多能性を持つことから、再生医療や薬剤スクリーニングへの応用が進みつつあります。一方、iPS 細胞は株の種類により、各組織への分化しやすさが異なることが明らかとなり、目的とする組織に最適な iPS 細胞株を選択する必要があります。大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科の澤 芳樹 教授らのグループは、これまで臨床用 iPS 細胞株から心筋細胞を大量に効率的に分化誘導する技術を確立し、心筋再生医療の実用化に取り組んでおります。国立医薬品食品衛生研究所 佐藤 陽治 部長らは大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科および理化学研究所科技ハブ産連本部 予防医療・診断技術開発プログラムと共同し、心筋細胞の原料となる最適な iPS 細胞株を選ぶための新たな品質管理方法を検討しました。

・ 研究の概要と成果

本研究では、iPS 細胞株の 6 株（トレーニングセット）からそれぞれ心筋細胞へ分化誘導を行うと、株ごとに分化しやすさが異なることが明らかになりました。さらに、分化しやすい iPS 細胞株では分化しにくい iPS 細胞株と比べて、分化誘導後の心筋細胞に残存する未分化 iPS 細胞の割合が少ないことも明らかとなり、iPS 細胞株を選ぶことの重要性が示唆さ

れました (図 2)。

次に、図 3 に iPS 細胞株を選択するためのバイオマーカーの探索フローを示しました。まず、トレーニングセットの iPS 細胞 6 株を心筋細胞へ分化しやすい iPS 細胞株と分化しにくい iPS 細胞株に分類しました。それぞれの iPS 細胞株の「未分化状態における各遺伝子発現量」を CAGE 解析、mRNA アレイ解析、microRNA アレイ解析を行い、バイオマーカー候補遺伝子を抽出しました (図 4)。その後、これらバイオマーカー候補遺伝子を用いて心筋細胞への分化能が判別可能かどうかを、改めて用意した iPS 細胞 13 株 (テストセット) で検証しました。テストセットの iPS 細胞株も分化しやすい iPS 細胞株群と分化しにくい iPS 細胞株の 2 つの群に分けて、バイオマーカー候補遺伝子の発現量を比較した結果、分化しやすいと有意に関連した遺伝子として CXCL4/PF4 があり、バイオマーカーとしての妥当性が示唆されました (図 5)。なお、分化誘導前に CXCL4/PF4 遺伝子の産物である血小板因子 4 (PF4) で iPS 細胞を刺激しておくこと、心筋細胞への分化効率が上昇することも明らかとなり、PF4 が心筋細胞への分化を促進する薬理的作用を持つことも示唆されました。

・意義と展望

本研究成果により、心筋細胞へ分化しやすい iPS 細胞株を用いることで、高効率かつ安全な心筋細胞を製造することに繋がり、心筋再生医療の実現化に向けて貢献することが期待されます。また、本研究で用いた CAGE 解析などの複数の遺伝子解析手法を組み合わせた iPS 細胞のバイオマーカーの探索手法は、他の細胞種を製造する際の原料としての iPS 細胞の品質管理にも応用可能だと考えられ、再生医療の実現化に向けて大きく貢献するものと期待されます。

・特記事項

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題の支援を受けて行ったものです。

事業名：神奈川県 先進異分野融合プロジェクト研究立案・推進事業

研究開発課題名：再生医療等製品の品質・安全性評価プロジェクト

研究開発代表者：河合 純 (理化学研究所 科技ハブ産連本部 予防医療・診断技術開発プログラム 副プログラムディレクター)

研究実施期間：平成 27 年度～平成 31 年度

事業名：国立研究開発法人科学技術振興機構

世界に誇る地域発研究開発・実証拠点 (リサーチコンプレックス) 推進プログラム

リサーチコンプレックス名：世界に誇る社会システムと技術の革新で新産業を創る

Wellbeing Research Campus (中核機関：慶應義塾大学)

・論文

Fumiya Ohashi, Shigeru Miyagawa, Satoshi Yasuda, Takumi Miura, Takuya Kuroda, Masayoshi Itoh, Hideya Kawaji, Emiko Ito, Shohei Yoshida, Atsuhiko Saito, Tadashi Sameshima, Jun Kawai, Yoshiki Sawa, and Yoji Sato.

CXCL4/PF4 is a predictive biomarker of cardiac differentiation potential of human induced pluripotent stem cells.

Scientific Reports volume 9, Article number: 4638 (2019)

URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-40915-w>

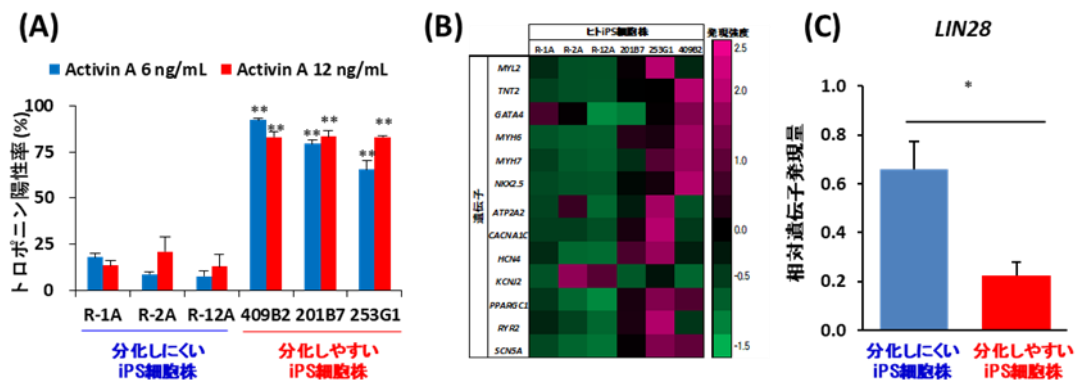


図 2. iPS 細胞株の種類による心筋細胞への分化しやすさの違い

(A) iPS 細胞 6 株が異なるサイトカイン濃度 (青; アクチビン濃度 6ng/mL、赤; 12ng/mL) で心筋細胞へ分化誘導される割合 (トロポニン陽性率) を示しています。分化しやすい iPS 細胞株ではトロポニン陽性率が約 90%でしたが、分化しにくい iPS 細胞株ではトロポニン陽性率が約 10%以下でした。

(B) iPS 細胞 6 株から心筋細胞へと分化誘導した後に、心筋細胞関連遺伝子や成熟関連遺伝子発現量を定量 PCR で測定した結果をもとにヒートマップを示しています。

(C) 分化誘導後の心筋細胞中に未分化マーカー遺伝子である *LIN28* の発現量が分化しにくい iPS 細胞群では分化しやすい iPS 細胞株よりも高いことを示しています。(iPS 細胞株 R-2A の遺伝子発現量を 1 としている。)

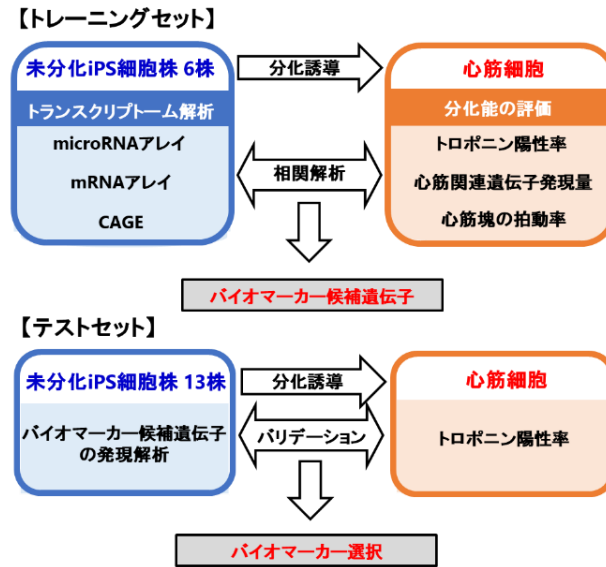


図 3. iPS 細胞株を選択するためのバイオマーカー探索方法

トレーニングセットの iPS 細胞 6 株を同じ分化誘導法で心筋細胞へと分化誘導して心筋細胞へ分化しやすい iPS 細胞株と分化しにくい iPS 細胞株に分類しました。「未分化状態における各遺伝子発現量」を CAGE 解析、mRNA アレイ解析、microRNA アレイ解析を行い、3 つの遺伝子解析手法で分化しやすい iPS 細胞株と分化しにくい iPS 細胞株の間で 2 倍以上発現変動した遺伝子を調べて、バイオマーカー候補遺伝子を抽出しました。その後、テストセット iPS 細胞株 13 株でも同様に心筋細胞への分化誘導効率とバイオマーカー候補遺伝子の相関解析を行ない、最適なバイオマーカーを選択しました。

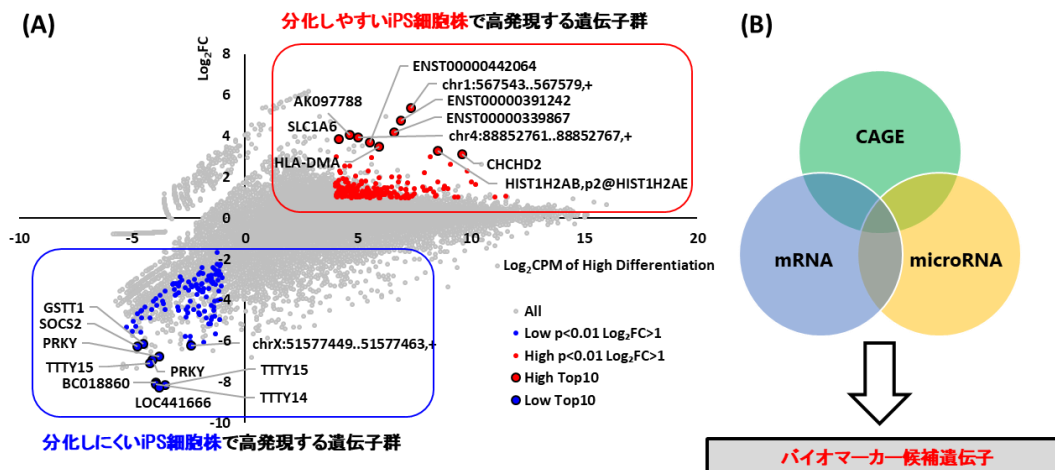


図4. CAGEによる遺伝子発現解析およびバイオマーカー候補遺伝子の選定

(A) mRNA 発現量および転写開始点を網羅的に解析する CAGE 法を用いて、心筋細胞へ分化しやすい iPS 細胞株と分化しにくい iPS 細胞株の「未分化状態における各遺伝子発現量」を網羅的に解析しました。

(B) 分化しやすい iPS 細胞株群と分化しにくい iPS 細胞株群の 2 群間で、未分化 iPS 細胞の CAGE 解析、mRNA アレイ解析、microRNA アレイ解析の遺伝子発現解析結果を比較して、複数の遺伝子解析手法で有意な変化があった遺伝子群や細胞分化に関連する遺伝子を抽出して、分化しやすさを予測できる可能性があるバイオマーカー候補遺伝子を 22 個に絞り込みました。

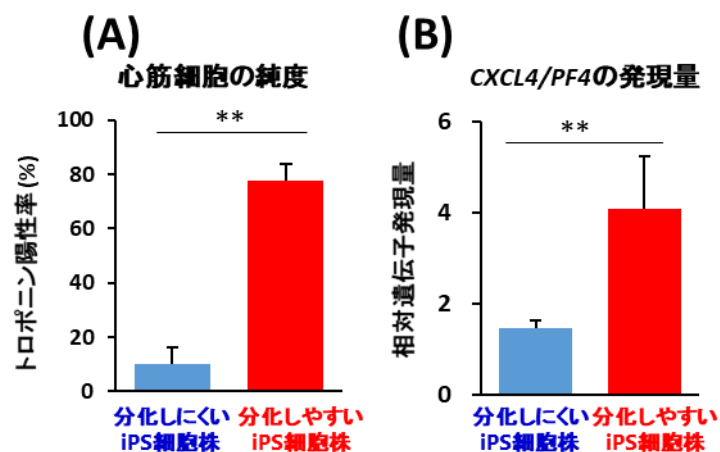


図5. バイオマーカー候補遺伝子のバリデーション

(A) テストセットの iPS 細胞株においても心筋細胞の分化能が異なることを確認しました。

(B) テストセットの分化しやすい iPS 細胞株における *CXCL4/PF4* 発現量は分化しにくい iPS 細胞株と比べて、有意に高いことが分かりました。(iPS 細胞株 PCi-1533 の遺伝子発現量を 1 としている。)

<用語解説>

1. CXCL4/PF4：血小板因子4（PF4）：CXCケモカインファミリーに属するタンパク質。これまで単球の生存を促進して、マクロファージや樹状細胞への分化に関与することが報告されています。
2. CAGE：Cap Analysis of Gene Expressionの略。理研オミックス基盤研究領域が開発した方法で、耐熱性逆転写酵素やmRNAのcap構造を捕捉する技術を組み合わせて、5′末端の塩基配列を決定する実験方法です。この塩基配列を読み取ってゲノム配列と照らし合わせ、どこから転写が始まっているかを調べることができます。遺伝子の転写開始点をゲノムワイドに同定できる世界唯一の解析技術です。
3. バイオマーカー：細胞や生体内の生物学的変化を定量的に把握するための指標です。
4. トランスクリプトーム解析：細胞内のすべての遺伝子発現量を網羅的に解析する手法です。
5. サイトカイン：細胞から分泌されるたんぱく質。周囲の細胞に作用して、細胞の増殖や分化などさまざまな効果を生みます。
6. ケモカイン：細胞を組織へ遊走させるために必要な物質です。
7. バリデーション：妥当性を確認することです。

【本発表資料のお問い合わせ先】

国立医薬品食品衛生研究所

再生・細胞医療製品部

部長 佐藤 陽治

TEL：044-270-6525（直）

FAX：044-270-6526

理化学研究所

広報室 報道担当

TEL：048-467-9272 FAX：048-462-4715

E-mail：ex-press@riken.jp

神奈川県立産業技術総合研究所

研究開発部 地域イノベーション推進グループ（水野・山本）

TEL：044-819-2031 FAX：044-819-2026

E-mail：sks@newkast.or.jp