

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24240076

研究課題名(和文) 再生医療に多面的治療手段を提供する多能性幹細胞プロファイリングの開発研究

研究課題名(英文) Multifaceted profiling of pluripotent stem cells applied in regenerative medicine

研究代表者

佐々木 克典 (SASAKI, Katsunori)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：30170666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,200,000円

研究成果の概要(和文)：多能性幹細胞が有する個性の利用は再生医療を進めていくうえで重要である。このプロジェクトでは、多能性幹細胞6株、脂肪幹細胞、線維芽細胞を用いて未分化状態、分化の初期、中期、後期と分け、その過程で生ずる遺伝子発現を丹念に追跡し、細胞株の個性を明らかにした。その結果、未分化状態ではES細胞群とそれ以外の細胞集団を分ける明白な遺伝子群が存在した。未分化状態での細胞株のクラスターリングは分化過程で維持されず株固有の傾向が表れた。これらのプロファイリングの結果を球面体に描出し三次元的に細胞株の特質を把握できるようにした。今回得た所見及び解析方法は細胞株の個性を解明し、再生医療に応用するために有益である。

研究成果の概要(英文)：Different pluripotent stem cell lines have characteristic differences making each of them unique, which is important in regenerative medicine. We compared the biological and molecular profile of 4 human embryonic stem (ES) cell lines, two human induced pluripotent stem (iPS) cell lines and two control cell types at four stages between undifferentiated to differentiated states, to identify individual characteristics. In the undifferentiated state, a group of genes were identified which differentiate ES cell lines from others. In the differentiated state, however, these gene clusters were not maintained and the individuality of each cell line became prominent, as disclosed by exhaustive gene expression analysis. The individual characteristics of each cell line were portrayed three-dimensionally on a globe. These developments are useful for analyzing the individual characteristics of pluripotent stem cell lines prior to their application in regenerative medicine.

研究分野：ES細胞生物学

キーワード：細胞・組織工学 再生医療

1. 研究開始当初の背景

ヒト ES 細胞、iPS 細胞の研究が盛んになるにつれ、細胞株の“個性”(分化のしやすさ、しにくさ等)の問題があらわになり、細胞の標準化が求められるようになった。しかし、この流れは必ずしも正しいとは言えない。細胞を適切に利用するために、細胞株の性質を様々な視点から解析することは重要であるが、その結果で株のよしあしを決め、限られた細胞のみを使用するのは、多能性幹細胞の持つ良さを封殺するに等しい。個々の細胞の“個性”こそ、多能性幹細胞の特質であり、これをうまく利用するために工夫することが我々に与えられた課題である。例えば、未分化を維持しにくい困った細胞でも、肝細胞になりやすければ、肝疾患の治療の必須アイテムに変貌する。個々の細胞株の“個性”を活かすことが再生医療を最適な条件で展開するための大きな原動力になる。そのためには“個性”を知らなければならない。

このような考えに立ち、本プロジェクトで、申請者らは細胞の“個性”を明かにするためのプロファイリングツールを選択あるいは開発し、それらの応用を試み、得られたデータを基盤にし、多能性幹細胞株の統合的プロファイリングを実施した。

2. 研究の目的

本研究では独自に開発したあるいは導入した技術により多能性幹細胞のそれぞれの細胞株の特質をプロファイリングし、それらを最適な条件で再生医療に応用可能にすることを目的とした。

計画した具体的な研究開発は、以下の2点を中心に行った。

(1) プロファイリングツール開発

未分化から分化への移行を識別する技術開発；分化を特定の方向に進める技術

特定の分化細胞への移行をライブで把握する技術開発

(2) プロファイリング指標を基盤にした総合評価による個々の細胞株のプロファイリングの確立

3. 研究の方法

研究全体において、ヒト ES 細胞 4 株 (H1, khES1,2,3) とヒト iPS 細胞 2 株 (201B7, 253G1) 及び対照として脂肪幹細胞、線維芽細胞を用いた。

(1) 未分化から分化への移行を識別する技術開発

多能性幹細胞コロニーの未分化性を維持するために、KSR を含んだ培地でフィーダー細胞と共培養、4 日以内に網羅的遺伝子解析を行った。

フィーダー細胞をのぞいた長期培養によ

る未分化性からのデリケートな早期の逸脱を把握するために、フィーダー無しで 4 日以上培養し、網羅的遺伝子解析を行った。

網羅的遺伝子解析の情報を基にしながら主成分分析を行い、株の個性を把握した。次にパスウェイ解析を行い、遺伝子発現の相違について検討した。必要に応じて RT-PCR、免疫染色を加えた。

(2) 分化を特定の方向に進める技術開発

多能性幹細胞 6 株、対照として脂肪幹細胞、線維芽細胞を用い、本教室で開発した static suspension culture¹ で胚様体を形成し、三胚葉への分化を誘導した。5 日目に DNA マイクロアレイ解析を実施し、遺伝子パターンのプロファイリングを行い、新たなプロファイリング指標の抽出を試みた。さらに主成分分析を行い、株間の相違の維持、あるいは維持が崩れるか否かを検討した。

(3) 特定の分化細胞への移行をライブで把握する技術開発

これまで教室で開発してきた成長因子 (心筋細胞、肝細胞、神経細胞)、低分子化合物 (臍細胞) を用いた分化誘導法を軸にして、あらたにアンモニアを用いた内胚葉系分化誘導法を確立し、分化誘導を実施した。その後、網羅的遺伝子解析を中心とした解析を行い、分化肝細胞の分化のレベルを評価した。それらの知見を基盤に、必要に応じて、ICG - 細胞分画法、RT-PCR、免疫染色、光計測可視化法などを加えた。

(4) プロファイリング指標を基盤にした総合評価による個々の細胞株のプロファイリングの確立

網羅的遺伝子解析の所見を中心とし、それ以外の所見を補足データとして参考にし、最初に未分化及び分化を象徴するものとして胚様体を選び、8 種類の株間で、パスウェイ解析で遺伝子発現のもっとも大きな差を呈する遺伝子を抽出した。これは主成分分析の第一成分にほぼ相当すると考えてよい。これら遺伝子発現の違いを立体的に可視化表現するために、地球儀上に描くことを試み、遺伝子のアルファベットを国のアルファベットに対応させ、それぞれの国の首都の緯度、経度を X、Y 軸とし、遺伝子発現量の相対的値を凹凸 (Z 軸) とした。次の - の条件で CAD に打ち込みコンピューター画像とした。さらにその一部を立体造形にし、遺伝子の変化の違いを掌で確認できるようにした。

国のアルファベットに遺伝子のアルファベットを対比させた。

アフリカ大陸に未分化マーカーを配置した。

三胚葉マーカーをアフリカ東海岸に対する南アメリカ西海岸に配置した。

分化マーカーをヨーロッパ、アジア、オセ

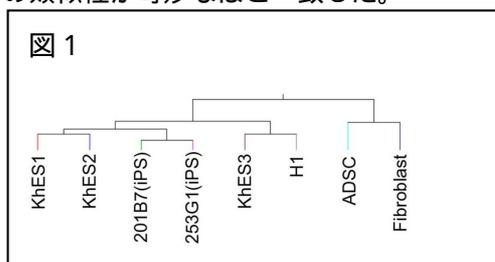
アニア、南北アメリカに配置した。

アルファベットに対応させにくい場合、例外として固有の国を割り当てた。

4. 研究成果

(1) これまでの培養経験から、未分化性に関し、Wisconsin University の H1 株、京都株 khES3 は分化しやすく、khES1 及び 2 は分化しにくい、iPS 細胞は個性が乏しく khES1 に近いという感触を得ていた。

この経験的な感触が遺伝子発現で裏付けられるのかを Heat Map のデータを基にしてクラスタリングしてみた(図1)。感触と株の類似性が奇妙なほど一致した。



しかし、発現差の大きい遺伝子を抽出しグループに分けてみると、次の特徴が明らかになった。ES 細胞群(4株)と iPS 細胞、線維芽細胞、脂肪幹細胞(4株)を分ける遺伝子群 (ARRB1、ANXA3 など)、ES 細胞群と iPS 細胞(6株)と線維芽細胞、脂肪幹細胞(2株)を分ける遺伝子群 (SMPD1、TRADD など)、hES1、2 と iPS 細胞(2株)及び hES3、H1 と線維芽細胞、脂肪幹細胞と iPS 細胞(2株)を分ける遺伝子群 (CYPB6、MMP2 など)を見出すことができた。特に iPS 細胞、線維芽細胞、脂肪幹細胞が ES 細胞群と明らかに異なる近縁の遺伝子を持つことは興味深い。また、株固有の動きをする遺伝子は少なかったが京都株 2 で CXCL1 の強発現は特異的であった。

MEF を抜いたものでは、細胞の変化が著明でないにも関わらず、発現の減少する遺伝子 (Nodal など) や増加する遺伝子が 16 種類ほど識別できるなど予想以上の変化が見られた。これらの遺伝子を制御することで、切れ味のいい分化誘導法が開発できると推測されたが、それでも khES2、H1 株と khES3、253G1 の間に差がみられた。

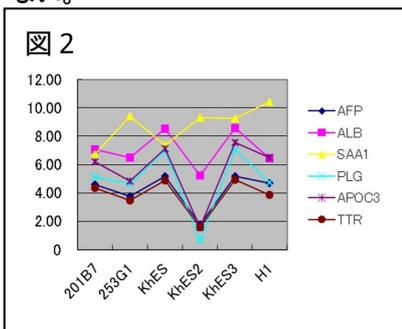
(2) 次にこれ等を三胚葉に分化誘導した場合、それぞれの株が未分化と同じ傾向を維持しながら分化するかを検討してみた。一見類似の傾向が見られるように思えるが、発現量の差の大きいものを抽出していくと、未分化の時に見られたグループ化(クラスタリング)は維持されず、それぞれの株に特有な性質が見え始めた。以下二つの特徴を抽出した。

khES3 と H1 は他の多能性幹細胞に比較し、抽出した遺伝子に関する限り発現が弱い。そ

の中でほかに比較し明らかに上昇したものが GPRC5C など 8 種類だった。一方、khES1、2、iPS 細胞(201B7、253G1)で多くの遺伝子が強く発現しているが、khES3 と H1 の強い分化傾向を考えると、これ等は分化を促進するマーカーというより (khES3 と H1 では発現が弱い) 未分化性を維持するのとは異なり、分化を押さえ込むマーカーあるいは分化に移行するための障壁を乗り越えるために必要な遺伝子だと考えるのが妥当であり、この中から新しい機能を持つ遺伝子を抽出できる可能性があると考えられた。特に 201B7 では顕著であった。

線維芽細胞と脂肪幹細胞はお互いに類似傾向を示した。しかし分化傾向を示し始めた多能性幹細胞との明確な共通性はこの段階では認められなかった。

(3) 分化細胞に関する知見で、今回得たもっとも重要かつ驚くべきことは、アンモニアによる分化誘導に関して、多能性幹細胞 6 株が押しなべて肝細胞マーカー (ALB、TTR など) を強く発現したことである。このことは、強力な分化誘導法を用いれば、株の個性を無視して分化誘導が可能であることを示唆する。しかし、個々のマーカーと株とを対比させてみると、やはり株それぞれにマーカー発現の高低が認められる(図2)。例えばこのグラフから少なくとも khES2 は肝細胞分化誘導には適切でないとい推定できるかもしれない。

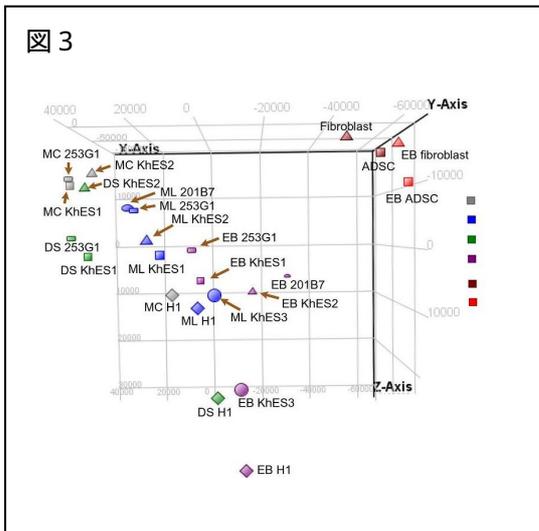


(4) このような遺伝子発現量の差を考慮に入れ、株の相違を 3 種類のコンポーネントを用いた主成分分析で三次元的に表現してみた(図3)。Heat Map の様な二次元でクラスタリングしたものに比較し、近づき方、離れ方の微妙な違いが把握でき、有益な方法であることが理解できる。

この分析の要点は、未分化な状態で可能であったクラスタリング(図1参照)が、分化するにつれて、その傾向(図3の青)が維持されずに、崩れていき、それぞれの株独自の挙動を示すようになることである(図3の紫)。このように、クラスタリングでは見えにくかった傾向が、第 1、2、3 成分を三次元的に抽出した主成分分析で、それぞれの株の違い

を明確に捉えることができる。

しかし、主成分分析では個々の遺伝子の情報が見えてこない。主成分分析の結果と個々の遺伝子の情報をどのように表現するかを考えてみた。



大量の情報を表現する三次元的手法の一つにコンピューターを用いた SOM (spherical self organization map)² という方法が知られている。これは、遺伝子情報などをクラスタリングしたものが、凹凸として球面に描出されるものであり、魅力的な方法ではあるが、しかし、この方法でも、個々の情報まで描き出すことはできない、それらを総和した凹凸、歪みを描出しているからである。

そこで、個々の遺伝子の発現量を球面に配置することでボトムアップ的に遺伝子発現の傾向を描出できないかと考えた。個々の情報と全体の傾向を把握できるからである。地球上に凹凸のある地形が存在するように、地球儀上に遺伝子発現の高低を凹凸として描かせて見た (図 4)。

これ等の図は、南極点から見たものを比較している。1、2、3、3、5、6、7、8 はそれぞれ khES1、2、3、H1、201B7、253G1、脂肪幹細胞、線維芽細胞に対応する。色調の違う遺伝子群を、例えば頂点を結び、山際の稜線のように描いてみると、主成分分析ほどクリアではないが、この方法でもそれぞれの細胞株の全体的な傾向がつかめる。従って、個々の情報と全体の傾向を同時に三次元的に描出できたといえる。

しかし、今回のやり方は、画像上立体的であるとは言え、平面に描出された三次元像であり、決して真の三次元像ではない。更にリアルにする、あるいはあらゆる方向から検討できるようにするために動画にしてみたが、それ以前の画像あるいはそれ以後の画像との連続性が維持しにくいいため、微妙な変化を読み取ることは困難であった。そこで更に一

歩進め、これらを三次元造形としてみた。すなわち、CAD (computer aided design) に落としたデータを 3D プリンターで樹脂造形を作成した (図 5)。これは真実の三次元構造であるがゆえに、デリケートな要求 (わずかな角度での観察など) にも対応できる。このようなものが身近にあれば、膨大な遺伝子データから得られたその細胞株の特性を三次元像としてリアルにイメージが可能で、対象を深く洞察できるようになると考えられる。

図 4

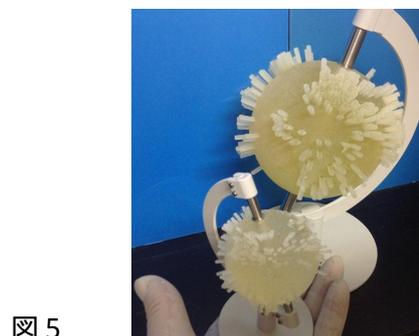
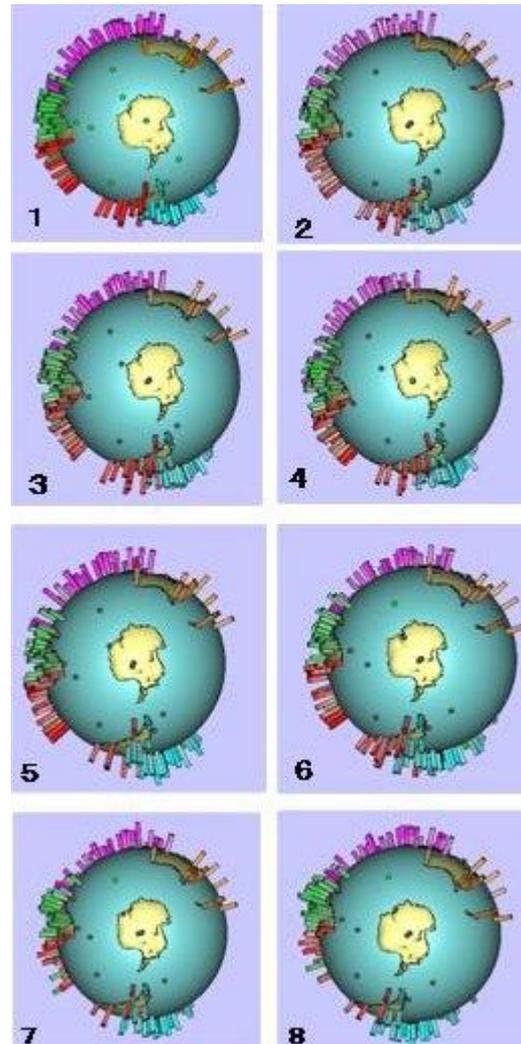


図 5

これまで、膨大な情報を前にして、そして、それらが対象について限りなく様々な特性を象徴しているとわかっていながら、それらを把握できないもどかしさを味わってきた。今回のプロジェクトの根幹を流れるものは、このジレンマに対する一つの解答であり、更に多くの改善が要求されるにしても、研究代表者にとり、手ごたえのある大きな一歩であった。今後この手法は多能性幹細胞の代謝系の解析に加え、がん幹細胞野プロファイリングに展開させる。

参考文献

1. Tissue Cell 41: 79-84, 2009.
2. Computers&Graphics 27:963-976, 2003.

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32件)

Seguchi S, Yue F, Asanuma K, Sasaki K.: Experimental splenosis in the liver and lung spread through the vasculature Cell Tissue Res 360:287-296, 2015 doi.10.1186/scri399 査読有

Gautam M, Fujita D, Kimura K, Ichikawa H, Izawa A, Hirose M, Kashihara T, Yamada M, Takahashi M, Ikeda U, Shiba Y.: Transplantation of adipose tissue-derived stem cells improves cardiac contractile function and electrical stability in a rat myocardial infarction model. J Mol Cell Cardiol 81:139-149, 2015 doi. 0.1016/j.yjmcc. 査読有

Tsuruoka S, Matsumoto H, Koyama K, Akiba E, Yanagisawa T, Cassee FR, Saito N, Usui Y, Kobayashi S, Porter DW, Castranova V, Endo M.: Radical scavenging reaction kinetics with multi-walled carbon nanotubes. Carbon 83:232-239, 2015 査読有

Takahashi Y, Tomotsune D, Takizawa S, Yue F, Nagai M, Yokoyama T, Hirashima K, Sasaki K.: New model for cardiomyocyte sheet transplantation using a virus-cell fusion technique. World Journal of Stem Cells in press 査読有

Sasaki K.: Large-scale generation of differentiated cells to achieve regenerative medicine. Stem Cell Res Ther 5:10-11, 2014 doi.10.1186/scri399 査読有

Mogi A, Takei S, Shimizu H, Miura H, Tomotsune D, Sasaki K.: Fluid dynamic forces created by rotary orbital suspension culture promote cardiomyogenic differentiation of human embryonic stem cells. J Med Biol Eng 32:101-108, 2014. 査読有

Shiba Y, Filice D, Fernandes S, Minami E, Dupras S K, Biber B V, Trinh P, Hirota Y, Gold J D, Viswanathan M, and Laflamme M A.: Electrical Integration of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardio- myocytes in a

Guinea Pig Chronic Infarct Model. J Cardiovasc Pharmacol Ther 19:368-381, 2014 査読有

Shiba Y.: New strategy for the treatment of myocarditis by cell-sheet technology. Circ J 79, 51-52, 2014 doi.10.1253/circj. 査読有

Saito N, Haniu H, Usui Y, Aoki K, Hara K, Takanashi S, Shimizu M, Narita N, Okamoto M, Kobayashi S, Nomura H, Kato H, Nishimura N, Taruta S, Endo M.: Safe clinical use of carbon nanotubes as innovative biomaterials. Chem Rev 114:6040-6079, 2014 doi.10.1021/cr400341h 査読有

Takizawa-Shirasawa S, Yoshie S, Yue F, Mogi A, Yokoyama T, Tomotsune D, Sasaki K.: FGF7 and cell density are required for final differentiation of pancreatic amylase-positive cells from human ES cells. Cell Tissue Res 154:751-759, 2013 査読有

Ichikawa H, Kanoh Y, Shirasawa S, Yokoyama T, Yue F, Tomotsune D, Sasaki K.: Unique kinetics of Oct3/4 microlocalization following dissociation of human embryonic stem cell colonies. Ann Anat 195: 50-56, 2013 査読有

Haniu H, Saito N, Matsuda Y, Tsukahara T, Maruyama K, Usui Y, Aoki K, Takanashi S, Kobayashi S, Nomura H, Okamoto M, Shimizu M, Kato H.: Culture medium type affects endocytosis of multi-walled carbon nanotubes in BEAS-2B cells and subsequent biological response. Toxicol in Vitro 27: 1679-1685, 2013 査読有

Gao C, Gao Q, Li Y, Rahaman MN, Teramoto A, Abe K.: In vitro Evaluation of Electrospun Gelatin-Bioactive Glass Hybrid Scaffolds for Bone Regeneration, Journal of applied polymer science 127:2588-2599, 2013 doi. 10.1002/app.37946 査読有

Tominaga T, Tominaga Y.: A new non-scanning confocal microscopy module for functional voltage-sensitive dye and Ca²⁺ imaging of neuronal circuit activity Journal of Neurophysiology J Neurophysiol 110:553-561, 2013 doi.10.1152/jn.00856. 2012 査読有

Tsuchiya H, Matsunaga T, Aikawa K, Kamada N, Nakamura K, Ichikawa H, Sasaki K, Ohmori S. : Evaluation of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells for detection of CYP1A inducers. Drug Metab Pharmacokin 27:598-604, 2012 査読有

[学会発表](計63件)

岳鳳鳴、古庄知己、平島寛司、松嶋全人、坂井友美、滝澤佐季子、横山忠幸、友常大八郎、佐々木克典：エーラス ダンロス症候群患者特異的 iPS 細胞由来血管平滑筋細胞モデル作成 第14回日本再生医療学会総会 3月19 - 21日、パシフィコ横浜、横浜、2015年

佐々木克典：多能性幹細胞が持つ潜在的可

能性について 長野県職員薬剤師会・長野県
薬剤師会保健行政部会 研修会 5月31
日、東急イン、松本、2014

Yue F, Kosho T, Shirasawa S, Yokoyama T,
Tomotsune D, Sasaki K.: PATIENT SPE-
CIFIC IPS-DERIVED NEURAL MODEL FOR
DD-EDS. The 13th ISSCR Annual Meeting,
Boston, USA, June 12-15, 2013

Tomotsune D, Mogi A, Yue F, Yoshie S,
Masuda S, Sakurai A, Fujita D, Morisaki M,
Takizawa S, Yokoyama T, Sasaki K.:
GLOBAL ANALYSIS OF STABILITY OF
UNDIFFERENTIATED STATE IN HUMAN
PLURIPOTENT STEM CELLS
The 13th ISSCR Annual Meeting, Boston,
USA, June 12-15, 2013

Sasaki K, Tomotsune D, Yue F, Akimi Mogi,
Yoshie S, Masuda S, Takahashi Y, Takizawa-
Shirasawa S, Nagai M, Yokoyama T,
Ichikawa H, Kanoh Y, Sakaki S.:
INTEGRATION AND COLLABORATION
ARE NECESSARY FOR THE ESTABLISH-
MENT OF REGENERATIVE MEDICINE-THE
PROTEUS PROJECT
The 10th ISSCR Annual Meeting, Yokohama,
Japan, June 13-16, 2012

Yue F, Tomotsune D, Ichikawa H, Yoshie S,
Mogi A, Takahashi Y, Masuda S, Shirasawa
S, Yokoyama T, Nagai M, Sasaki K.:
DIFFERENTIATION OF HUMAN IPS INTO
PHOTORECEPTORS INDUCED BY IPS
-DERIVED PIGMENTED CELLS
The 10th ISSCR Annual Meeting, Yokohama,
Japan, June 13-16, 2012

〔図書〕(計2件)

岳鳳鳴、佐々木克典: 第2章第8節 [7]
培養基材と多能性幹細胞培養 392-396 (総
584頁)、最新 動物培養の手法と細胞死・
細胞不良・細胞変異を防止する技術 技術情
報協会、東京、2014。

Yue F, Shirasawa S, Ichikawa H, Yoshie S,
Mogi A, Masuda S, Magai M, Yokohama T,
Tomotsune D, Sasaki K. Regenerative
Medicine and Tissue Engineering. In Tech.
pp.117-139, 2013

〔産業財産権〕

○出願状況(計3件)

名称: シルク複合ナノファイバー及びそ
の製造方法

発明者: 塚田益裕、寺本彰、阿部康次、村島
俊介、村田夏子、

権利者: 国立大学法人信州大学

種類: 特許

番号: 特開 2014-15702

出願年月日: 平成 25年3月7日

国内外の別: 国内

名称: シルク複合ナノファイバー及びその
製造方法、

発明者: 森川英明、宇佐見久尚、山中茂、
阿部康次、寺本彰、伊藤吹夕、岸本祐輝

権利者: 国立大学法人信州大学

種類: 特許

番号: 特開 2013-241713

出願年月日: 平成 24年5月22日

国内外の別: 国内

名称: 細胞増殖抑制剤

発明者: 滝澤佐季子、横山忠幸、佐々木克典

権利者: 株式会社 プルボン

種類: 特許

番号: 特願 2012 109981号

出願年月日: 平成 24年5月11日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/c-hair/i-1kaibo/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 克典 (SASAKI, Katsunori)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号: 30170666

(2)研究分担者

阿部 康次 (ABE, Koji)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号: 00126658

富永 貴志 (TOMINAGA, Takashi)

徳島文理大学・神経科学研究所・准教授

研究者番号: 20344046

岳 鳳鳴 (YUE, Fengming)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号: 20532865

池田 宇一 (IKEDA, Uichi)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号: 30221063

寺本 彰 (TERAMOTO, Akira)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号: 40227525

柴 祐司 (SHIBA, Yuji)

信州大学・医学部附属病院・講師(特定雇用)

研究者番号: 70613503

斎藤 直人 (SAITO, Naoto)

信州大学・学術研究院保健学系・教授

研究者番号: 80283258

友常 大八郎 (TOMOTUNE, Daihachiro)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号: 80283802

(3) 連携研究者

遠藤 守信 (ENDO, Morinobu)

信州大学・先鋭領域研究群カーボン科学研究
所・特別特任教授

研究者番号: 10021015

(4) 研究協力者

吉江 進 (YOSHIE, Susumu)、増田 章子

(MASUDA, Shoko)、横山 忠幸

(YOKOYAMA, Tadayuki)、滝澤 佐希子

(TAKIZAWA, Sakiko)、永井 美佳 (NAGAI,

Mika)