

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05556

研究課題名(和文) ラマン分光法を用いたiPS細胞及び分化誘導細胞の非破壊、非侵襲評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the method for non-destructive and non-invasive monitoring of iPS cells developing into EPO producing cells using Raman spectroscopy

研究代表者

石垣 美歌 (Ishigaki, Mika)

島根大学・学術研究院農生命科学系・助教

研究者番号：60610871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、iPS細胞がエリスロポエチン産生細胞へ分化する過程の4段階(Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ)に対してラマン分光法により分析し、細胞分化に伴う分子組成変化を同定した。細胞の分化に伴い、分化誘導因子として培養液中に添加したジメチルスルホキシド(DMSO)が細胞に取り込まれる様子が確認された。また、不飽和脂肪酸の濃度も細胞の分化とともに上昇する結果が得られ、分化段階に応じて脂質代謝が変化する様子が確認された。そして、ステージⅡの細胞では、糖タンパク質の濃度が一時的に高くなる結果も示された。

本手法は、iPS細胞の安定的、安全性を担保した細胞培養モニタリング技術への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞を用いた新しい薬の開発や、再生医療応用への関心は非常に高く、夢の再生医療技術として期待される一方、iPS細胞の安全性の担保や、安定した細胞培養技術の確立など、未だ解決すべき多くの課題がある。本研究は、ラマン分光法を用いたiPS細胞、及び分化誘導細胞の非破壊、非侵襲、ラベルフリー評価法の確立を目的として実施した。iPS細胞がエリスロポエチン産生細胞へ分化する過程において、脂質、糖タンパクの代謝変化を捉えた本結果は世界初の結果であり、学術的意義が非常に高いと言える。また、本手法はiPS細胞の安定的、安全性を担保した細胞培養モニタリング技術への応用が期待され、社会的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the process of human induced pluripotent stem cells (iPSCs) into erythropoietin (EPO)-producing cells using Raman spectroscopy and imaging. The fixed cells at four stages of cell differentiation (Phase I, II, III, and IV) were analyzed, and the concentration variations of intracellular molecular compositions with the cell differentiation were examined. Three biomarkers for monitoring the cell differentiation were made clear: the bands due to C-S-C stretching vibrational modes, the concentrations of unsaturated fatty acids with low grade of unsaturation, and the concentrations of glycoproteins. The dynamic changes of these molecular compositions during the course of cell differentiation were successfully visualized by Raman imaging. The results showed application possibilities of Raman spectroscopy and imaging to monitor the cell differentiation and discriminate the cell maturation.

研究分野：分析化学

キーワード：ラマン分光法 iPS細胞 分化誘導過程 エリスロポエチン産生細胞

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞は分化万能性を持ち、無限に増殖する能力を備えていることから、iPS細胞を用いた新しい薬の開発や、再生医療応用への関心は非常に高くなっている。例えば、患者の細胞から作成するiPS細胞を用いての病態解明や、薬の副作用及び治療効果を予め評価し、その人に合った医療を提供するオーダーメイド医療が、次世代医療のカタチになると予想される。また、心不全や加齢黄斑変性などの疾患に対して、iPS細胞から作成した心筋細胞や角膜細胞を移植する治療法が本格始動しつつある。しかし、従来の細胞分析手法を用いてiPS細胞及び分化誘導細胞の質や分化状態を評価するためには、破壊分析や蛍光染色によって遺伝子やタンパク質を分析する必要があり、細胞を生かしたまま評価できないという問題がある。iPS細胞の創薬及び再生医療応用のためには、安全かつ安定的な細胞供給が今後益々必要になると予想されるため、iPS細胞の安全性の評価、及び細胞培養の非破壊的なりアルタイムモニタリング技術の開発が必須であると考えられる。

2. 研究の目的

光学計測の一種であるラマン分光法は、生体から非侵襲的にタンパク質、脂質、核酸などの生体分子情報を非破壊、蛍光フリー、ラベルフリーに取得することができる。そこで本研究では、ラマン分光法を用いたiPS細胞、及び分化誘導細胞の非破壊、非侵襲、ラベルフリー評価法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

ヒトiPS細胞からエリスロポエチン(EPO)産生細胞への分化誘導過程の4段階(I, II, III, IV)において細胞をホルムアルデヒドにより固定し(図1)、ラマンイメージングデータを取得してスペクトル解析を行った。785 nm励起、60倍水深レンズで20 μm四方(1 μmステップ)から取得されたラマンスペクトルを平均化し、測定領域における平均的なラマンスペクトルを比較した。

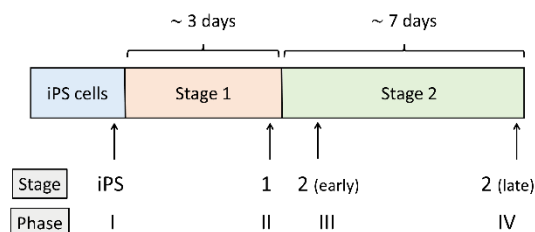


図1: ヒトPSC から EPO 産生細胞への細胞分化の過程。

4. 研究成果

図2aは、4段階の細胞から取得した平均ラマンスペクトルである。タンパク質、脂質、DNS/RNA由来のラマンバンドが明確に確認できる。特に、Phase III, IVでは708, 672 cm<sup>-1</sup>のラマンバンド強度が増大している様子が確認できる。これらのバンドはC-S結合由来のバンドである。こ

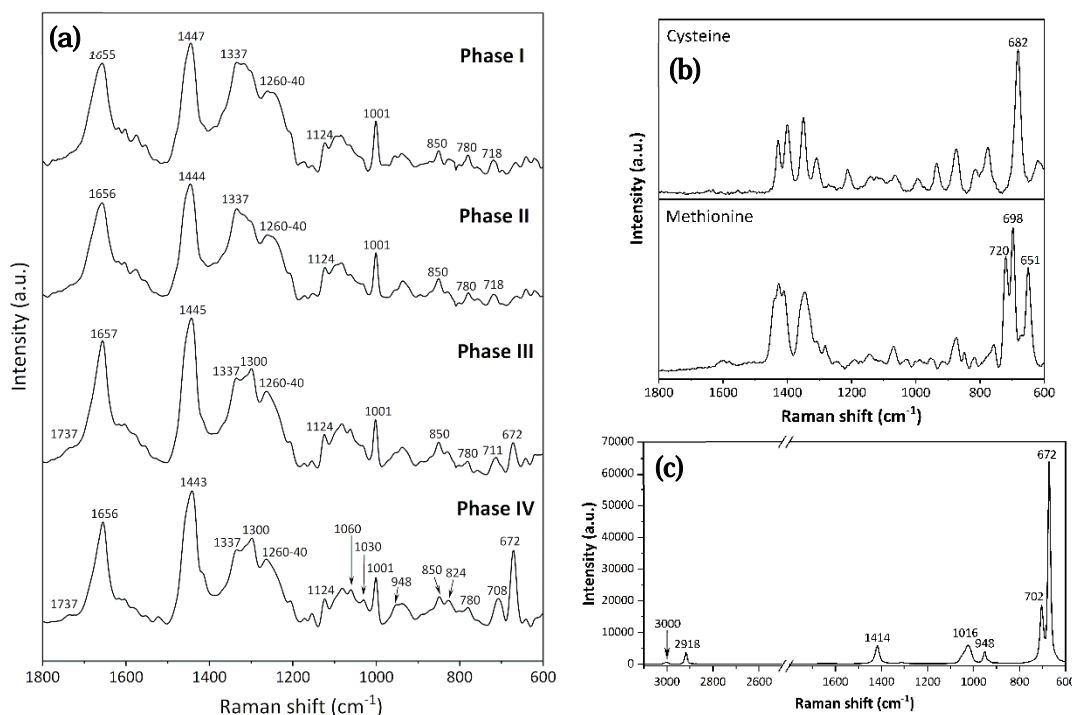


図2: (a) 細胞分化4段階の平均ラマンスペクトル。(b) 含硫アミノ酸、(c) DMSOのラマンスペクトル。

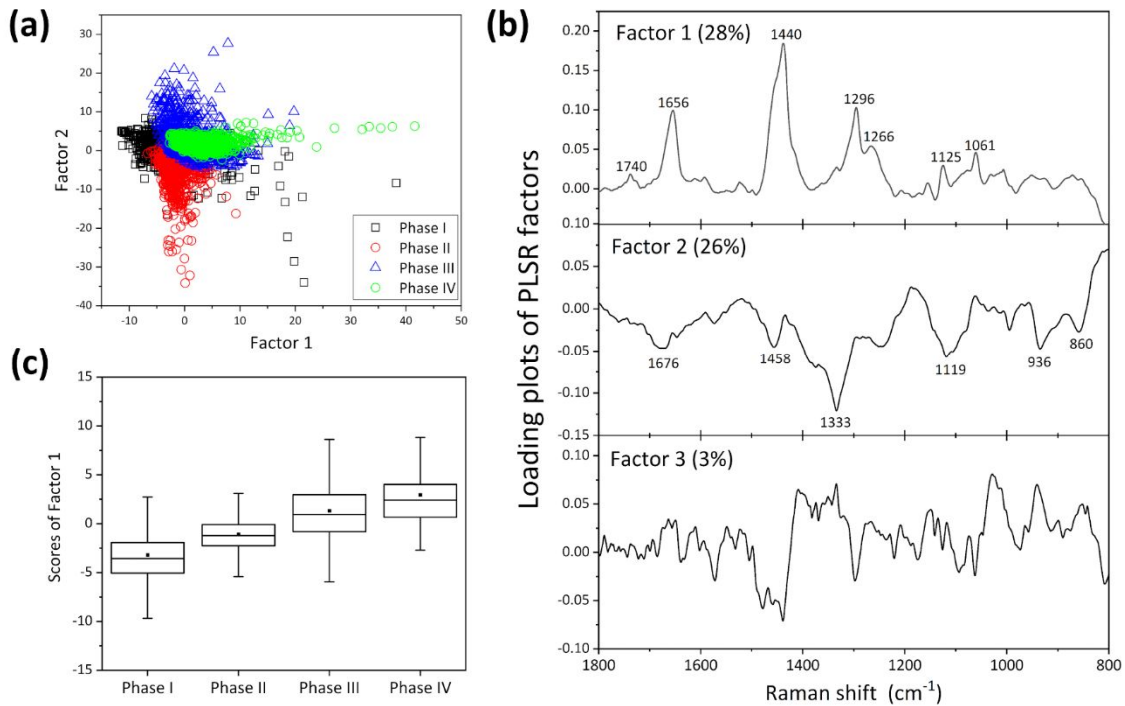


図3：PLS解析の(a)スコアプロット，(b) Factor 1-3 のローディングプロット，(c) Factor 1 のスコアに対する箱ひげ図。

のバンドの由来を同定するため，含硫アミノ酸のシトシン，メチオニン（図 2b）やジメチルスルホキシド（DMSO，図 2c）のラマンスペクトルと比較した。その結果，細胞分化に伴って増強するラマンバンドは，DMSO 由来であることが分かった。DMSO は，細胞分化の誘導因子として Phase II と III の間に培養液に添加した。本結果は，DMSO が細胞内に取り込まれたことを示唆していると考えられる。

次に，1800-800  $\text{cm}^{-1}$  に絞って部分的最小二乗法（PLS）解析を行った。PLS は，データに含まれる濃度情報を定量評価する際に用いられる多変量解析の1つである。ここでは，分化に伴って変化する濃度を人工的に与え，高い精度で検量線モデルが構築できる場合に，その濃度情報と相関するスペクトル成分を導出した。まず，分化に伴って濃度が上昇する成分を抽出するため，濃度情報を(0, 0, 0.5, 1)と与えて PLS 解析を実施した。その結果，Factor 1 が主に濃度情報を反映した成分であり（図 3a, 3c），その成分は不飽和脂肪酸に特徴的なスペクトルパターンを示した（図 3b）。つまり，細胞分化に伴って，不飽和脂肪酸濃度が上昇することが明らかとなった。

さらに，濃度情報(0, 0, 1, 0)として与えて PLS 解析を行った際，高い検量精度を示すモデルを構築できた。Phase III で濃度が高くなる成分のローディングプロット（Factor 1'）は，糖とタンパク質の両方の性質を併せ持つスペクトルパターンを示したことから（図 4），糖タンパク質濃度が Phase III で一時的に高くなることが示唆された。EPO は造血ホルモン（糖タンパク質）であり，EPO の分泌前に原料となる糖タンパク質濃度が高まっている可能性が示された。

これら，細胞分化に伴う分子組成変化として，3種類の物質（DMSO，不飽和脂肪酸，糖タンパク質）が抽出された。これらのラマンバンド強度や，PLS のスコア値を2次元にプロットすると，それぞれの物質のラマンイメージングによって分子組成変化を可視化することができた（図 5）。

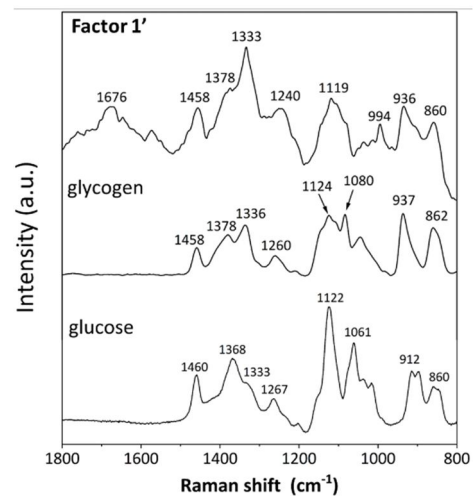


図4：Factor 1'とグリコゲン，グルコースのスペクトル比較。

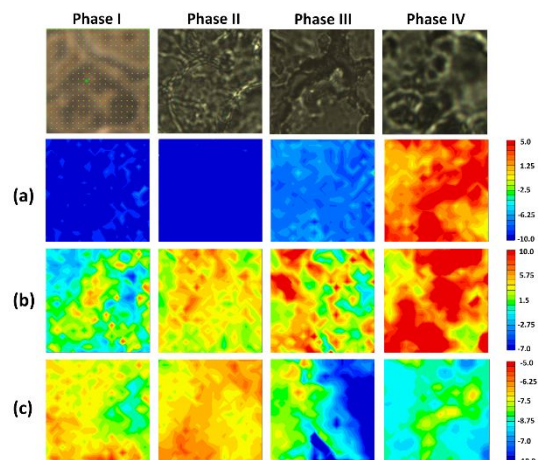


図5：ラマンイメージング。(a)DMSO，(b)不飽和脂肪酸，(c)糖タンパク質。

以上の結果から、iPS細胞からエリスロポエチンへ分化する際の細胞内分子組成の変化をとらえることができ、分化段階に応じて時々刻々と変化する様子を捉えることができた。分化段階に特徴的な分子は、目的とする細胞の成熟度を判別する指標となる可能性がある。本手法は、iPS細胞の安定的、安全性を担保した細胞培養モニタリング技術への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mika Ishigaki, Hirofumi Hitomi, Yukihiro Ozaki, Akira Nishiyama	4. 巻 12
2. 論文標題 Exposing intracellular molecular changes during the differentiation of human-induced pluripotent stem cells into erythropoietin-producing cells using Raman spectroscopy and imaging.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-24725-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mika Ishigaki, Hirofumi Hitomi, Yukihiro Ozaki, Akira Nishiyama
2. 発表標題 Raman imaging grasped the molecular changes during the cell differentiation of human induced pluripotent stem cells into erythropoietin-producing cells
3. 学会等名 SCIX 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西山 成  (Nishiyama Akira)  (10325334)	香川大学・医学部・教授    (16201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------