



令和6年2月16日  
東京ミッドタウン八重洲

RINK FESTIVAL 2024 with LINK-J

セッションA: 基幹産業の創出に向けて必要な「公(おおやけ)」の機能

牧野さんのアイデア

# 「評価を制する者が世界を制す」 再生細胞医療の品質評価の最前線

— 再生医療等製品の品質確保と生産性向上のための品質特性探索技術の開発 —

佐藤が追加

佐藤 陽治

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部長

(神奈川県立産業技術総合研究所 次世代ライフサイエンス技術開発プロジェクト 非常勤研究員)

本発表で述べられている見解は発表者の私見であって、国立医薬品食品衛生研究所および厚生労働省ならびに神奈川県立産業技術総合研究所の公式な見解では必ずしもありません。

# 再生医療等製品の実用化での課題



- 有効性と安全性
- 有効性と安全性の確保のための品質のあり方
- 品質を確保するための規格設定・特性解析
- 適切な規格・試験法にもとづく製造工程設計・機械化・自動化
- 確固とした製造工程設計・機械化・自動化による生産性向上
- 生産性向上による収益向上・医療の持続可能性確保

主成分である細胞の特性を知らないと、何を監視・管理すべきか分からない！

# 近代薬理学の出発点の一つ

## 例) モルヒネの単離

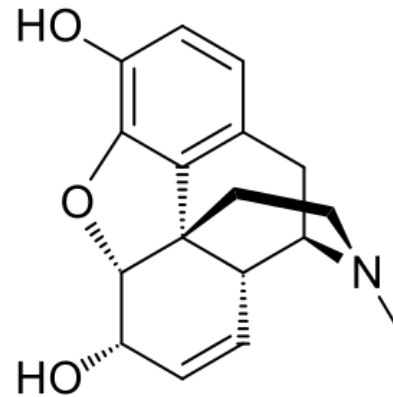
アヘン

人類史上最古の生薬の一つ。  
痛みを和らげ、睡眠を誘発するの薬として、  
歴史を通じて使われ続けてきた。



1806年、ドイツの薬剤師フリードリヒ・ゼル  
チュルナー(Friedrich Sertürner)が、  
アヘンから **モルヒネ** を単離することに成功。

= 薬理学(および毒物学)の出発点の一つ



# 学問としての「再生医学」は今どの段階にあるのか？

多様な化学物質の集合体

「生薬」と「分離科学／分析化学」(⇒「近代薬学」「近代薬理学」)の関係

= 「細胞加工製品」と「????」(⇒「再生医学」)の関係

複雑・多様な細胞の集合体

# 学問としての「再生医学」は今どの段階にあるのか？

多様な化学物質の集合体

「生薬」と「分離科学／分析化学」(⇒「近代薬学」「近代薬理学」)の関係

= 「細胞加工製品」と「????」(⇒「再生医学」)の関係

複雑・多様な細胞の集合体

細胞・細胞集団の不均一性を  
理解するための技術領域

細胞加工製品 = 「細胞集団」の  
「真の有効成分細胞」の同定と、それに基づく「薬理学」は、  
どうすれば成立するのか？

# 細胞集団の「不均一性」を理解するための技術が必要

- 例えば、**総細胞数が100万個**あっても、**そのうち有効性を発揮するのは1万個**しかないという場合もありうる。



- このような**不均一性を「見える化」**することで、**その1万個の細胞がどのような特性を持つのか**を明らかにすれば、**有効性に関連するCQA(重要品質特性)を発見しやすくなる**  
(・・・と期待できる)


# 不均一性を「見える化」する技術

## 事例

*Stem Cells Translational Medicine*, 2023, 12, 379–390  
<https://doi.org/10.1093/stcltm/szad029>  
Advance access publication 2 June 2023  
Original Research

OXFORD

## Single-Cell RNA-Seq Reveals *LRRC75A*-Expressing Cell Population Involved in VEGF Secretion of Multipotent Mesenchymal Stromal/Stem Cells Under Ischemia

Takumi Miura<sup>1,2,‡</sup>, Tsukasa Kouno<sup>3,‡</sup>, Megumi Takano<sup>1</sup>, Takuya Kuroda<sup>1</sup>, Yumiko Yamamoto<sup>3</sup>, Shinji Kusakawa<sup>1</sup>, Masaki Suimye Morioka<sup>3</sup>, Tohru Sugawara<sup>2,4</sup>, Takamasa Hirai<sup>1</sup>, Satoshi Yasuda<sup>1</sup>, Rumi Sawada<sup>1</sup>, Satoko Matsuyama<sup>1,5</sup>, Hideya Kawaji<sup>3,6</sup>, Takeya Kasukawa<sup>3</sup> , Masayoshi Itoh<sup>3</sup>, Akifumi Matsuyama<sup>5</sup>, Jay W. Shin<sup>3,7</sup>, Akihiro Umezawa<sup>2</sup>, Jun Kawai<sup>3,8</sup>, Yoji Sato<sup>\*,1,8,9</sup> 

<sup>1</sup>Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences, Kanagawa, Japan

<sup>2</sup>Center for Regenerative Medicine, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan

<sup>3</sup>RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama, Japan

<sup>4</sup>Biopharmaceutical and Regenerative Sciences, Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, Yokohama, Japan

<sup>5</sup>Center for Reverse TR, Osaka Habikino Medical Center, Osaka Prefectural Hospital Organization, Osaka, Japan

<sup>6</sup>Research Center for Genome & Medical Sciences, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan

<sup>7</sup>Genomic Institute of Singapore, Agency for Science, Technology and Research, Singapore

<sup>8</sup>Life Science Technology Project, Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, Kawasaki, Japan

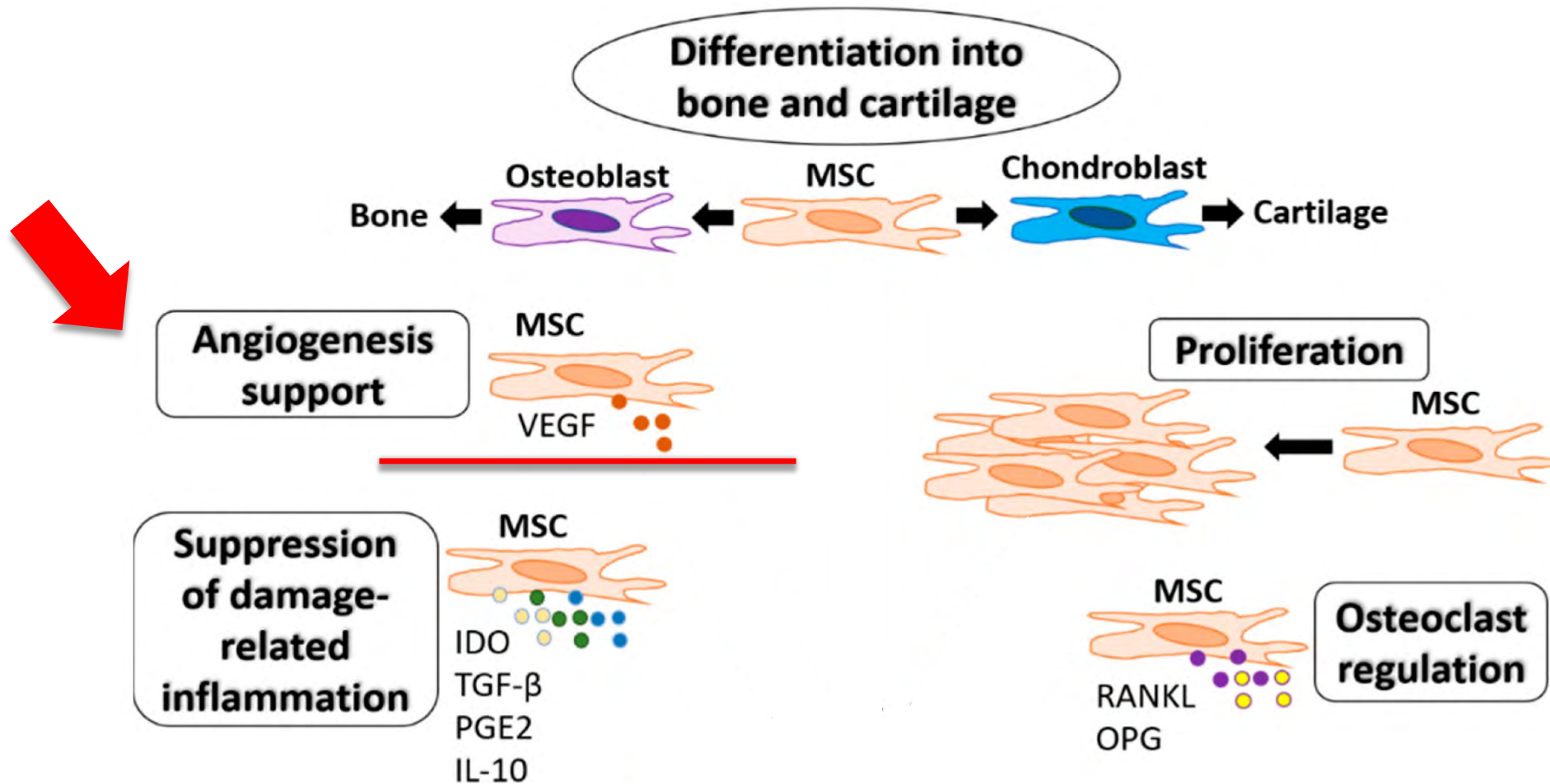
<sup>9</sup>Department of Cellular and Gene Therapy Products, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan

\*Corresponding author: Yoji Sato, PhD, Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki Ward, Kawasaki City, Kanagawa 210-9501, Japan. Email: [yoji@nihs.go.jp](mailto:yoji@nihs.go.jp)

‡Contributed equally.

# MSC(間葉系幹細胞／間葉系間質細胞)の様々な機能

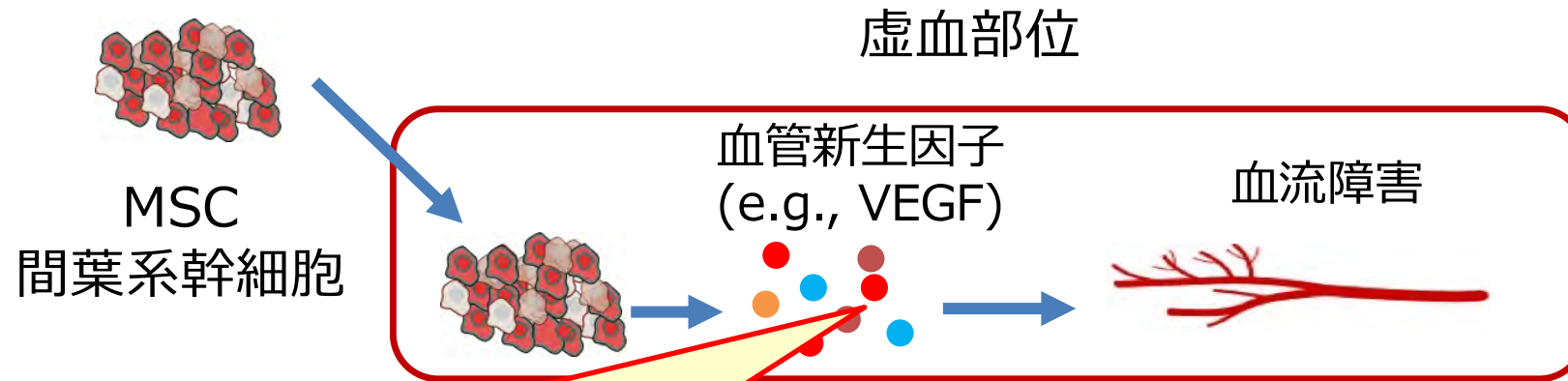
<https://www.mdpi.com/2306-5354/8/5/69> を改変



培養MSCを主成分とする細胞加工製品は、様々な疾患を対象に国内外で多数開発中



# 生着部位の環境（虚血）

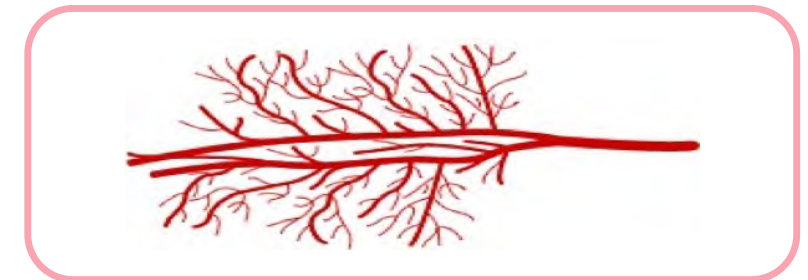


**VEGF** (血管内皮細胞増殖因子;  
vascular endothelial growth factor)

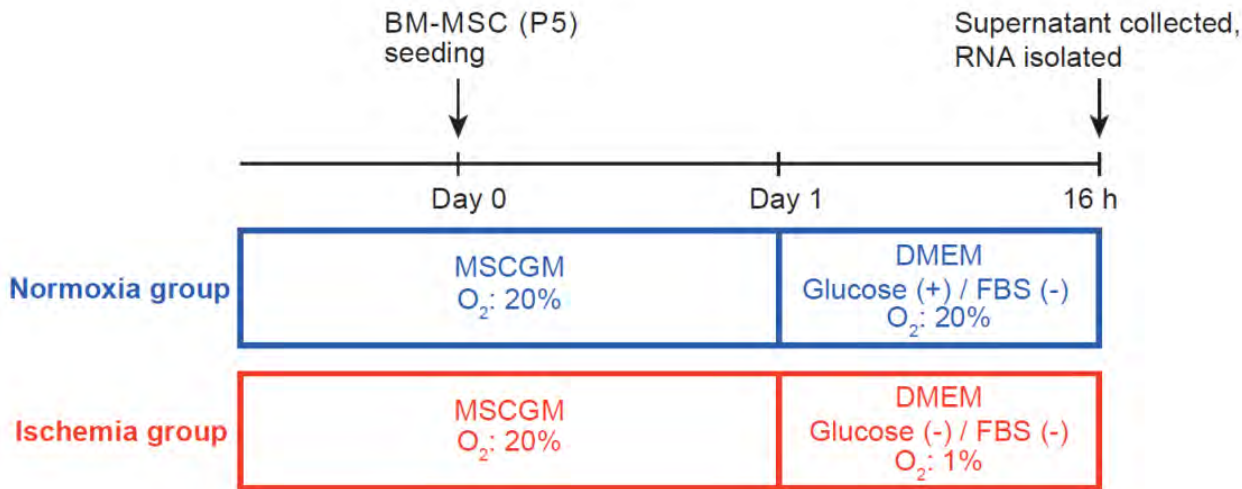
血管新生を促すタンパク質です。VEGFが血管内皮細胞に作用すると、細胞の分裂や遊走、分化などを誘導し、その結果、既存の血管から枝分かれした新たな血管が形成されます（血管新生）。

<https://oncolo.jp/dictionary/vascular-endothelial-growth-factor>

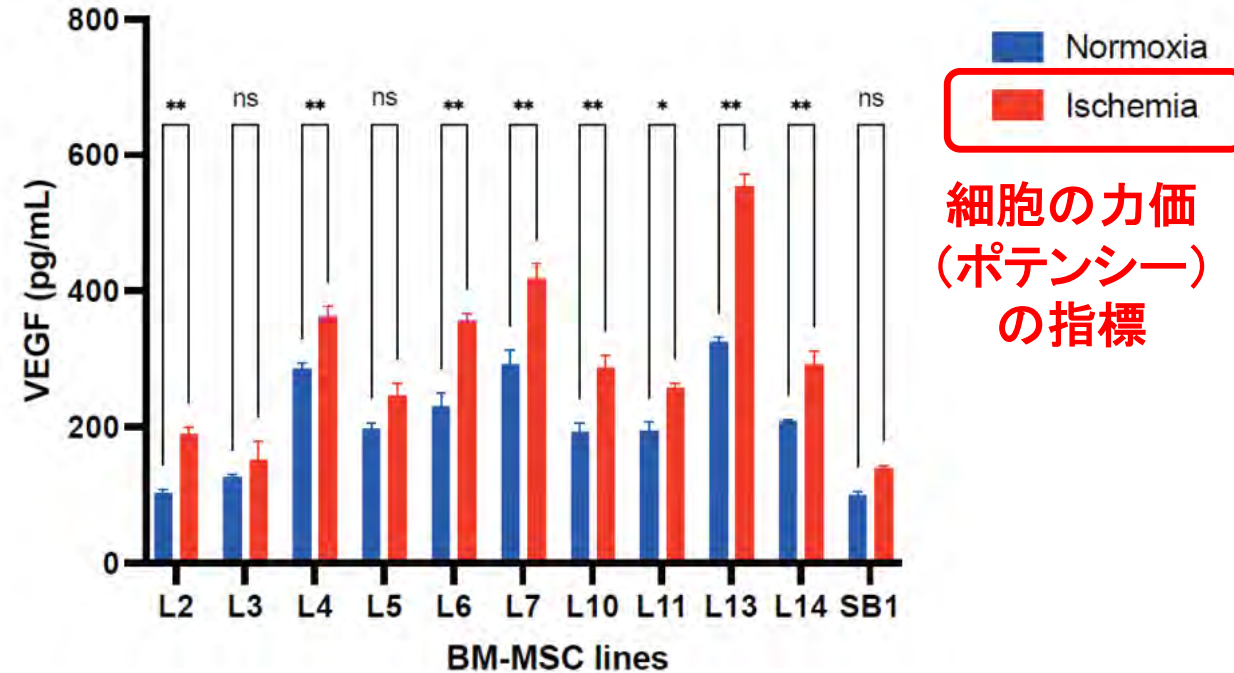
血管新生



## 生着部位の環境を模した実験条件



↑  
低酸素・グルコースなし



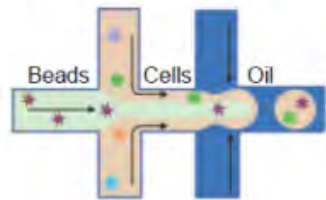
VEGFの分泌は細胞ロット間で大きくばらつく

# シングルセル・トランスクリプトーム解析

通常酸素分圧  
& 通常培地環境下の  
骨髄由来MSCs



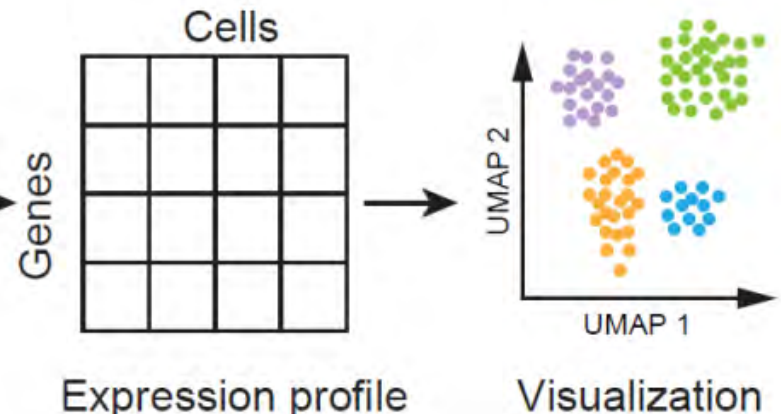
BM-MSCs (P5)



Single cell libraries



Sequencing

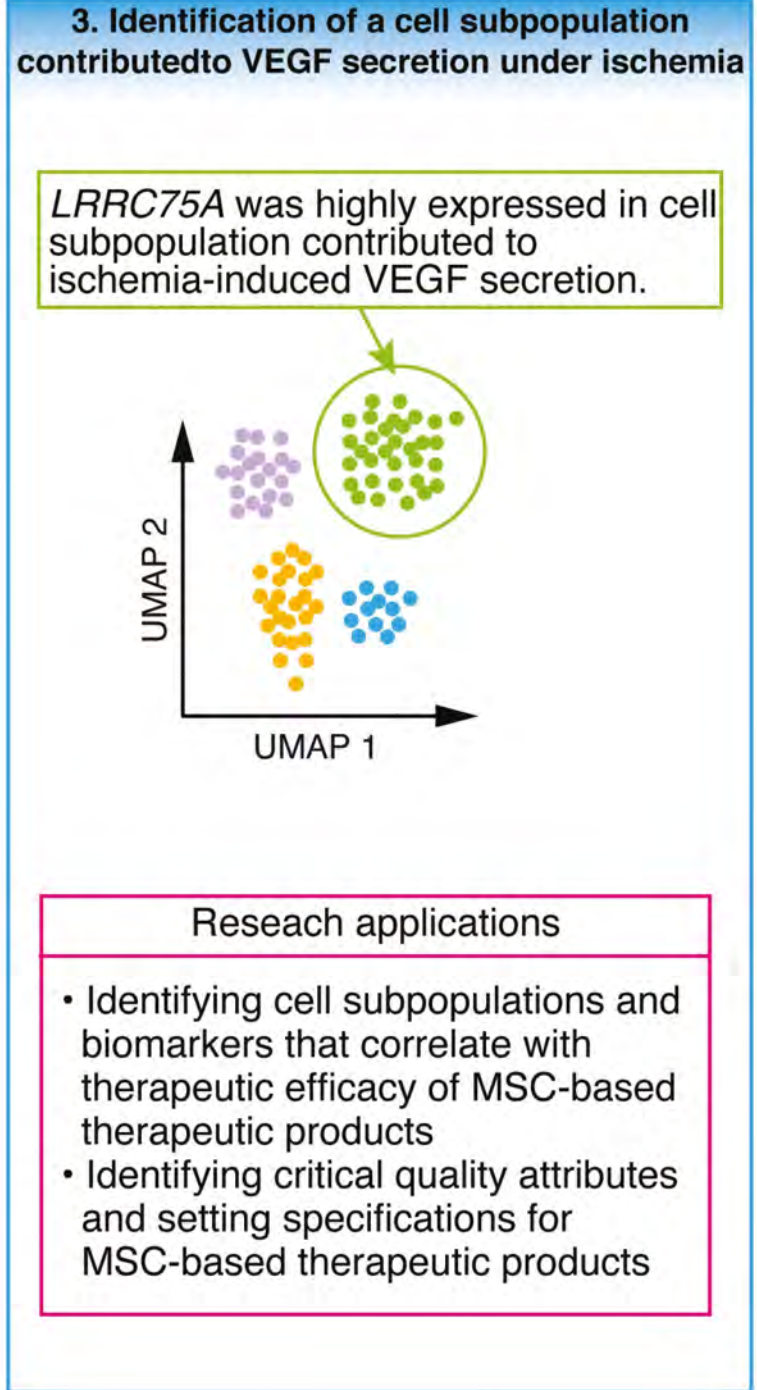
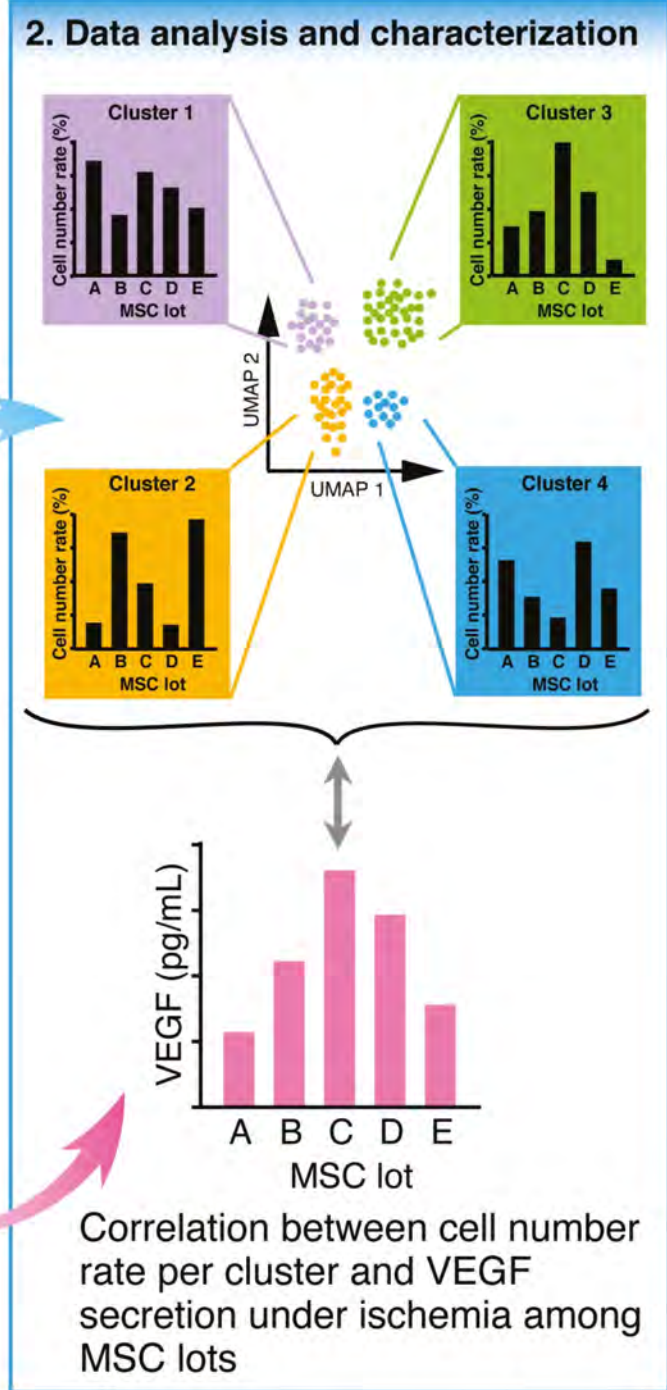
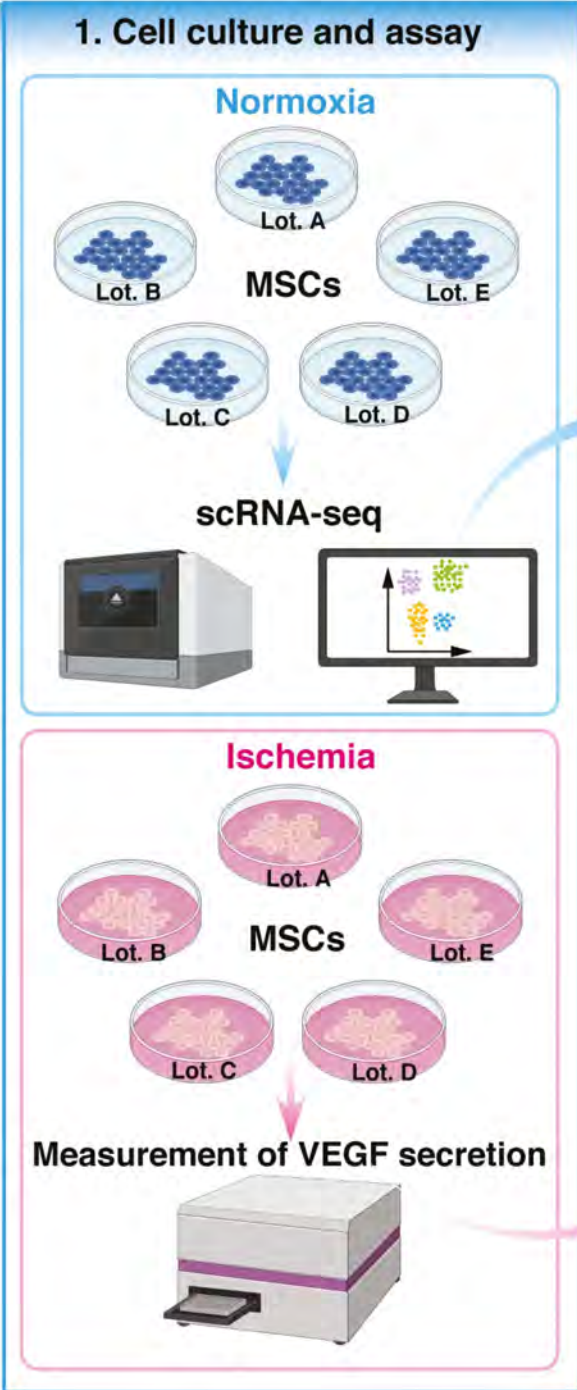


Expression profile

Visualization

11ロット

個々の細胞の遺伝子発現パターンで細胞を分類



# hMSC (ヒト間葉系幹細胞/間葉系間質細胞) の科学

hMSCの母集団 = プラトンの言う「アイデア」としてのhMSC = 『一般的なhMSC』



hMSCs

骨髄由来  
hMSC

脂肪組織由来  
hMSC

臍帯由来  
hMSC

...

骨髄由来hMSC  
11ロット



研究で使した  
特定ロットのhMSC  
(= 特定の検体)

統計学では、検体数が多数であれば

「母集団のばらつき」は「検体のばらつき」で近似できるとされる。

同様に、

「母集団中の細胞の不均一性」は、

「検体に含まれる細胞の平均的な不均一性」に類似していると推定できる。

=各ロット由来のほぼ同数の細胞のデータを全部合せてからクラスタリングすれば、

「検体に含まれる細胞の平均的な不均一性」を明らかにすることができる。

そこから「母集団 hMSC の不均一性」の姿が推定できる。

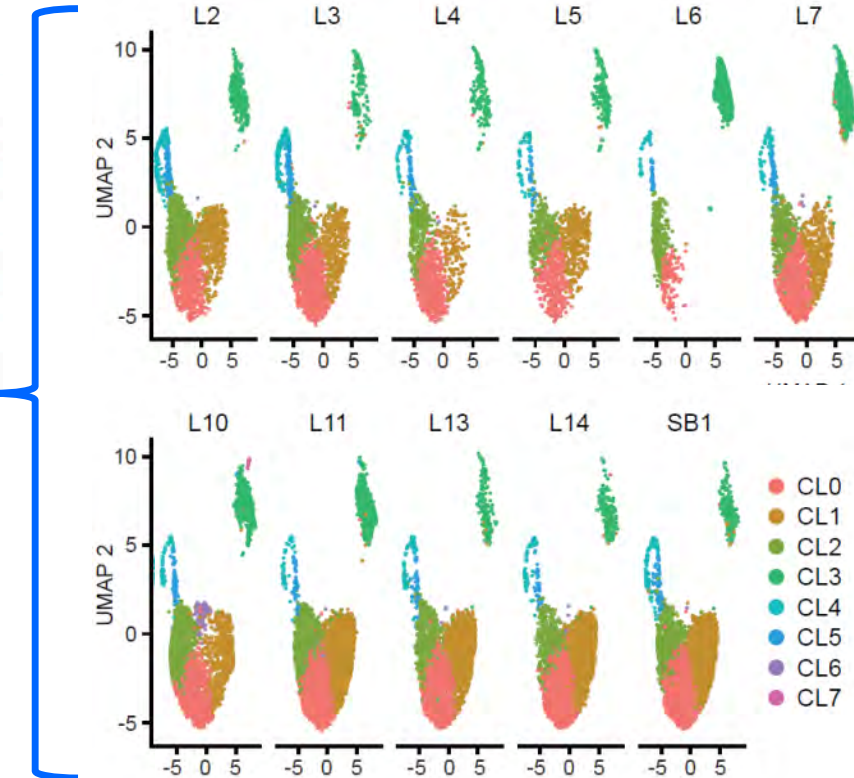
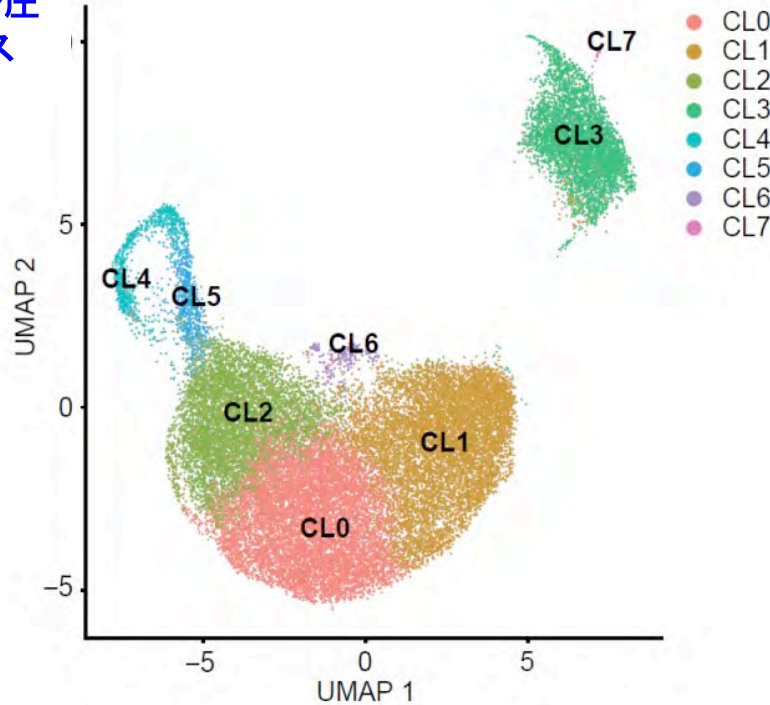
# シングルセル・トランスクリプトーム解析

BM-MSCs  
(P5)  
通常酸素分圧  
グルコース  
(+)



骨髄由来  
hMSC

骨髄由来  
hMSC  
11ロット



各ロット  
において  
各クラスター  
に属する  
細胞の割合  
を計算  
(次頁横軸)

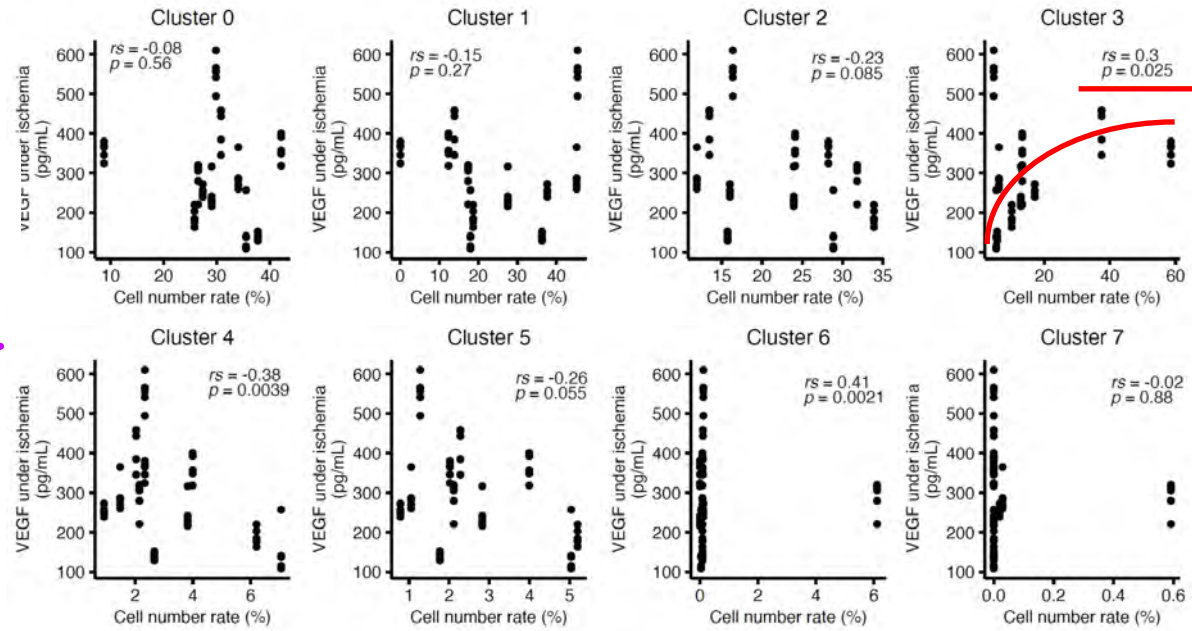
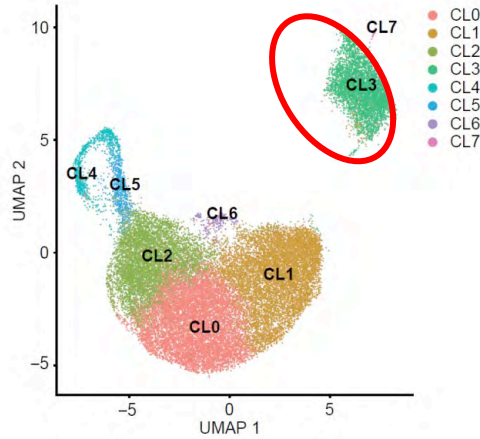
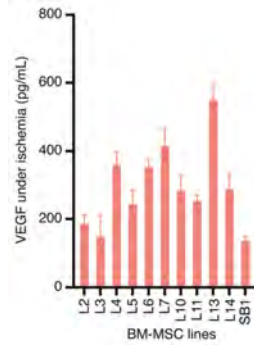
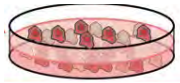
骨髄由来hMSCの母集団は、8個程度の  
クラスターに分類できると推定できる

「各ロットの不均一性」が「母集団の不均一性」  
からどのくらいズレているかが見える

# シングルセル・トランスクリプトーム解析

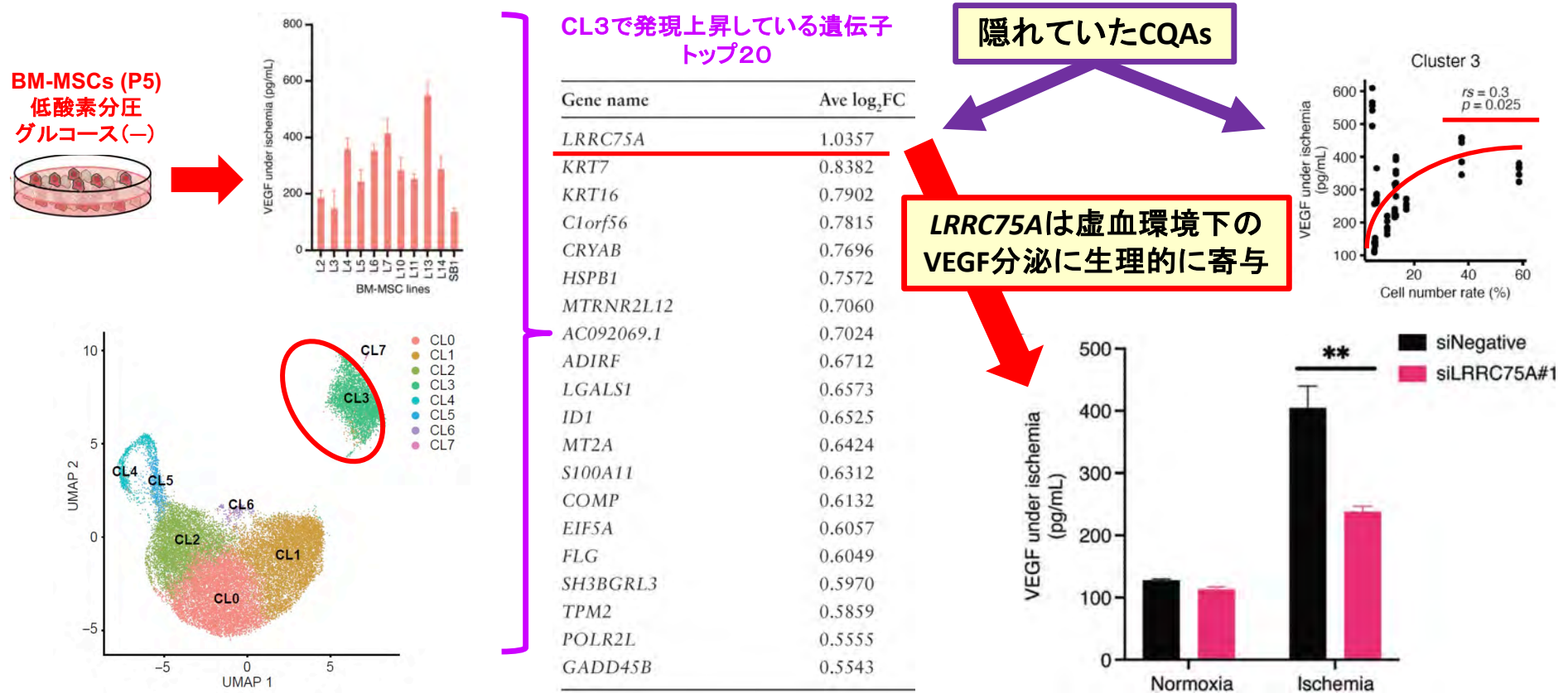
(縦軸)  
虚血条件下での  
VEGF分泌

BM-MSCs (P5)  
低酸素分圧  
グルコース(-)



(横軸)  
各ロット  
における  
各クラスター  
に属する  
細胞の割合

# シングルセル・トランスクリプトーム解析





# hMSC（ヒト間葉系幹細胞／間葉系間質細胞）の科学

## 仮説

CL3で発現する *LRRC75A* は、  
虚血下での *hMSC* からの VEGF の分泌を制御する

*hMSC* の母集団 = プラトンの言う「アイデア」としての *hMSC* = 『一般的な *hMSC*』



*hMSCs*

骨髄由来  
*hMSC*

脂肪組織由来  
*hMSC*

臍帯由来  
*hMSC*

...

骨髄由来 *hMSC*  
11ロット

骨髄由来 *hMSC*  
別の 4ロット



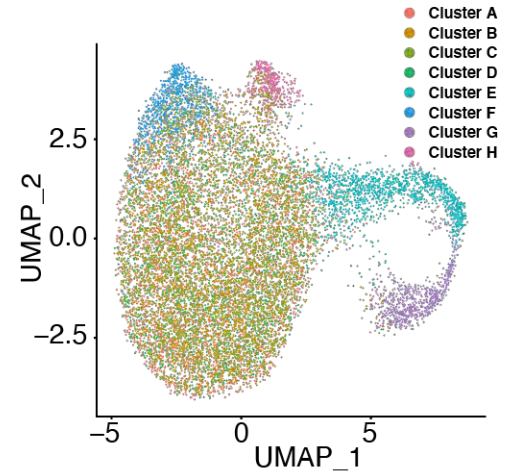
研究で使った  
特定ロットの *hMSC*  
( = 特定の検体 )

↑  
トレーニングセット

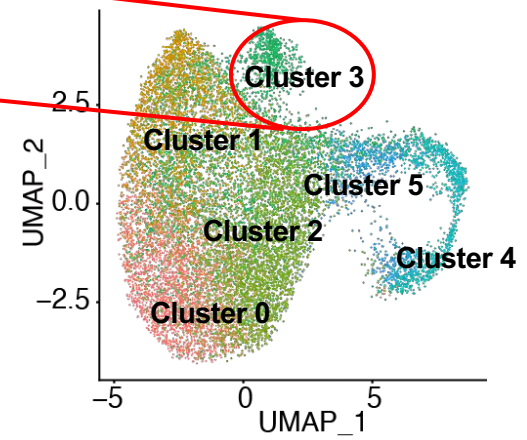
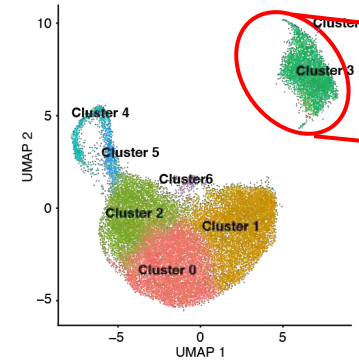
↑  
テストセット

# 別セットの骨髄由来hMSC (BM-MSC) におけるCL3様細胞の同定

scRNA-Seq Analysis for the Test Set  
(4 lines: L15 –L18)

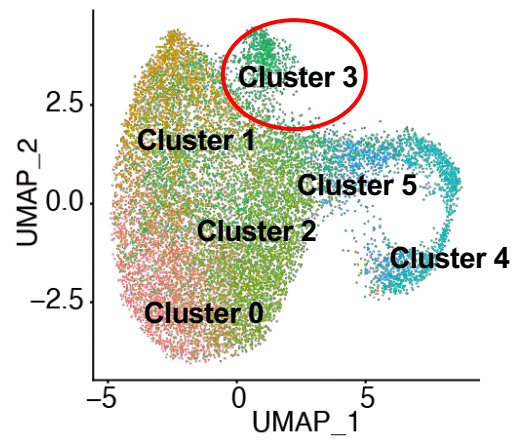


Reference Data Set  
(L2–SB1)

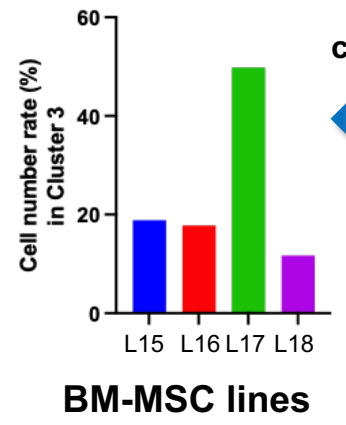


The test set data were merged using *FindTransferAnchors* function with the reference set and identified a CL3-like population.

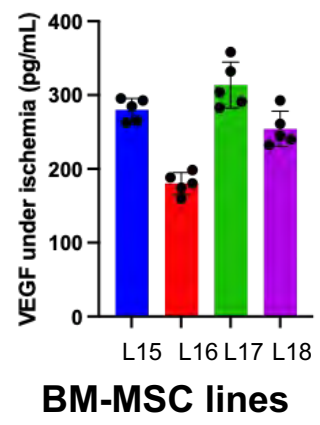
# 別セットの骨髄由来hMSC (BM-MSC) におけるCL3様細胞の同定



% Distribution of Cells in Each Line of the Test Set to CL3

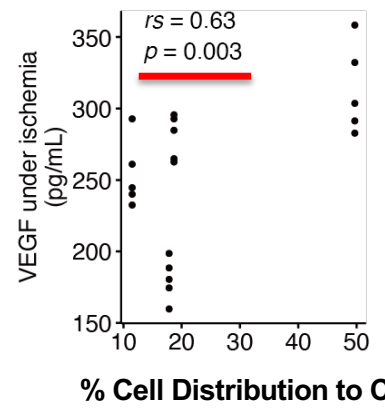


VEGF Production in Each Line (During Ischemia)



correlation

Spearman's Rank Correlation Coefficient (% Cell Distribution vs. VEGF Production During Ischemia)

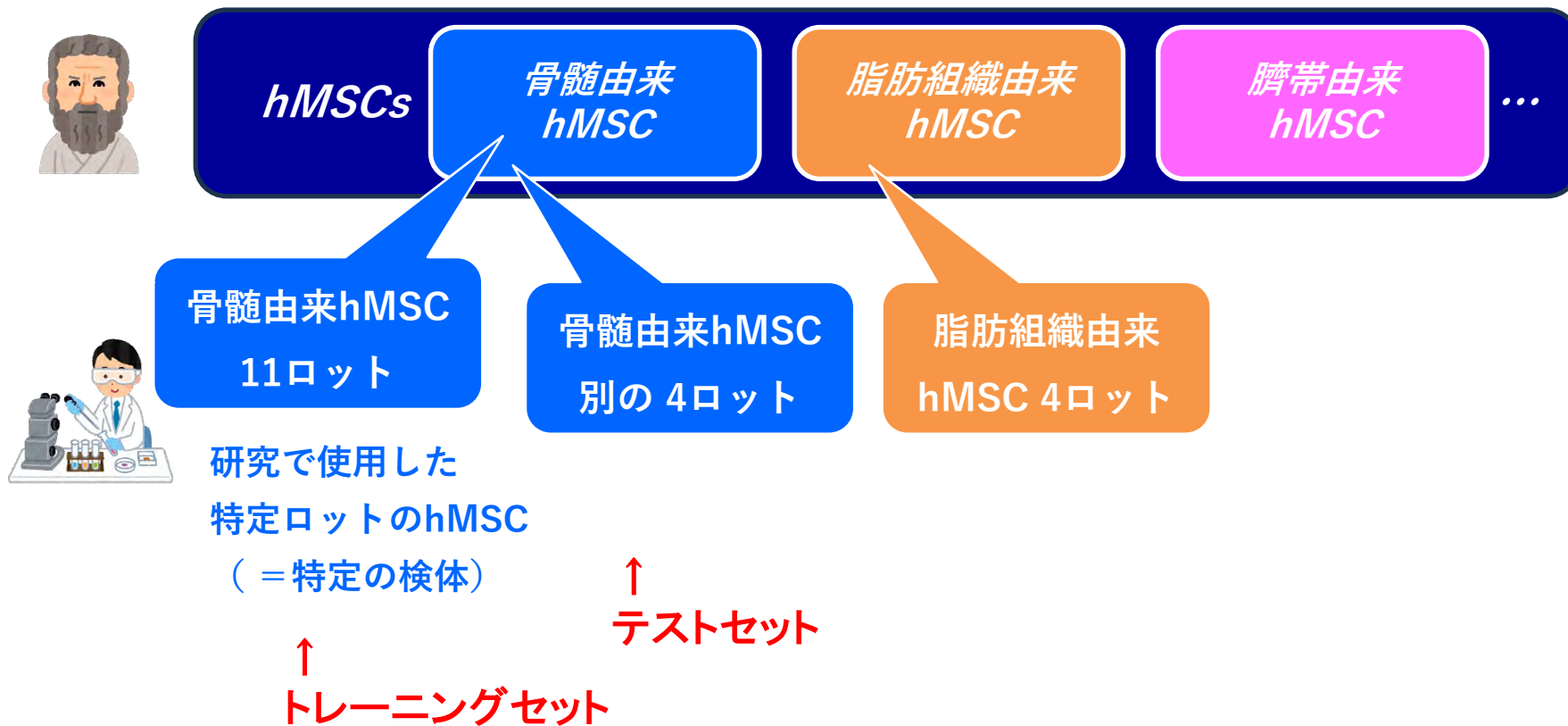


# hMSC（ヒト間葉系幹細胞／間葉系間質細胞）の科学

## 仮説

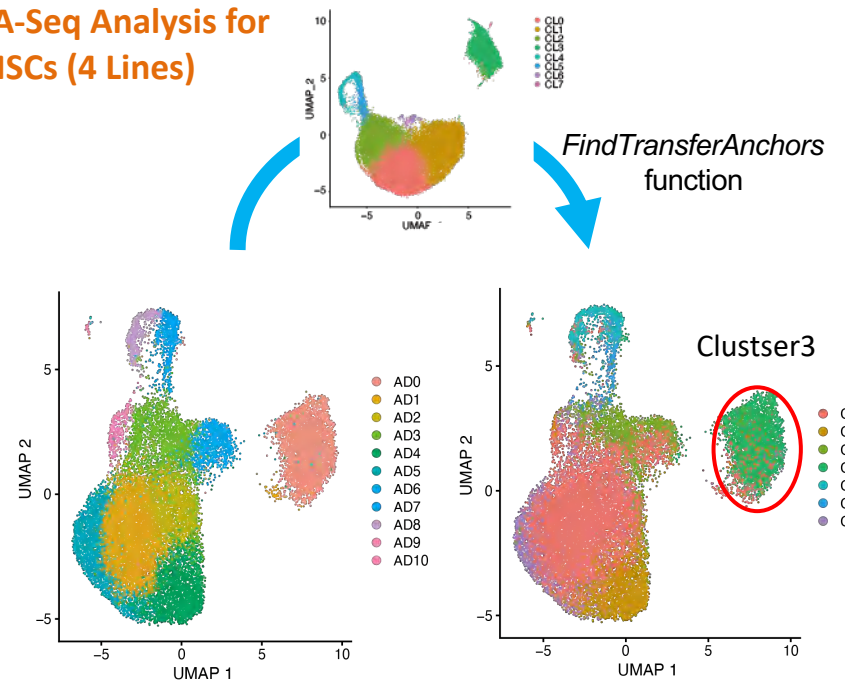
CL3で発現する *LRRC75A* は、  
虚血下での hMSC からの VEGF の分泌を制御する

hMSC の母集団 = プラトンの言う「アイデア」としての hMSC = 『一般的な hMSC』

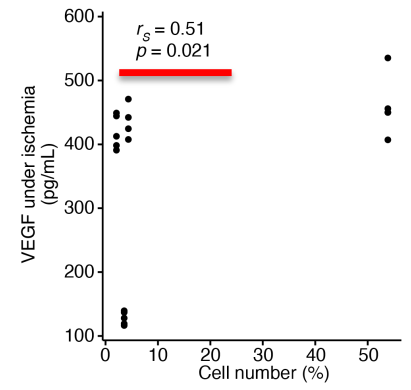


# 脂肪組織由来hMSC (AD-MSC) におけるCL3様細胞

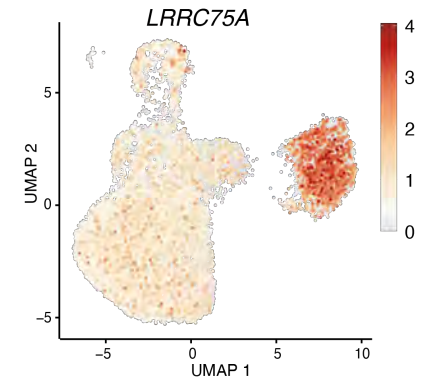
scRNA-Seq Analysis for AD-MSCs (4 Lines)



Spearman's Rank Correlation Coefficient (% Cell Distribution vs. VEGF Production During Ischemia)

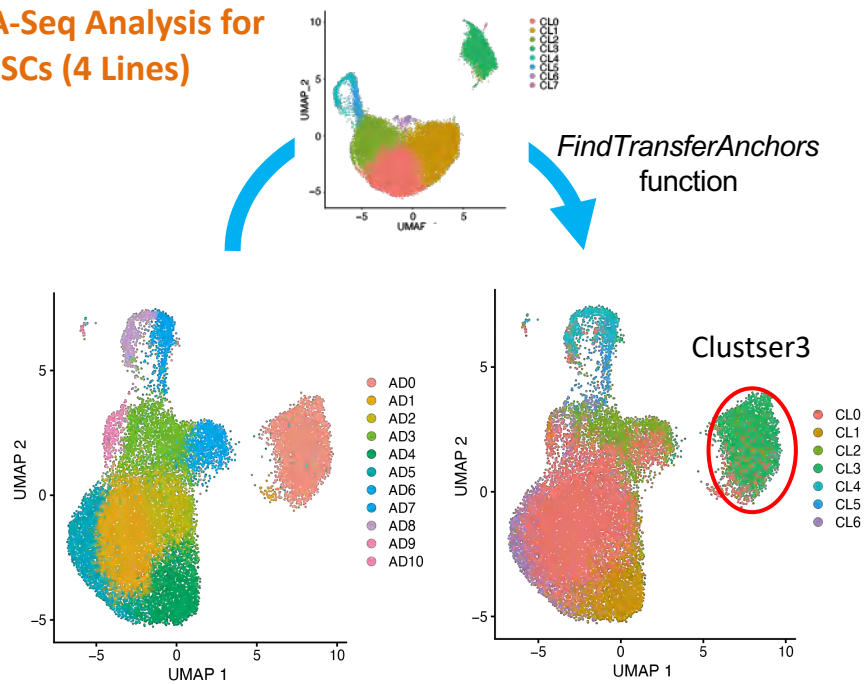


Expression of *LRRC75A* in AD-MSCs

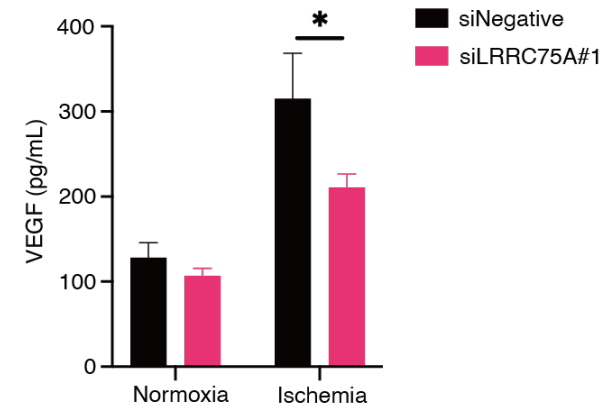


## 脂肪組織由来hMSC (AD-MSC) におけるCL3様細胞

scRNA-Seq Analysis for AD-MSCs (4 Lines)



Suppression of VEGF secretion in AD-MSCs by *LRRC75A* siRNA



In AD-MSCs,

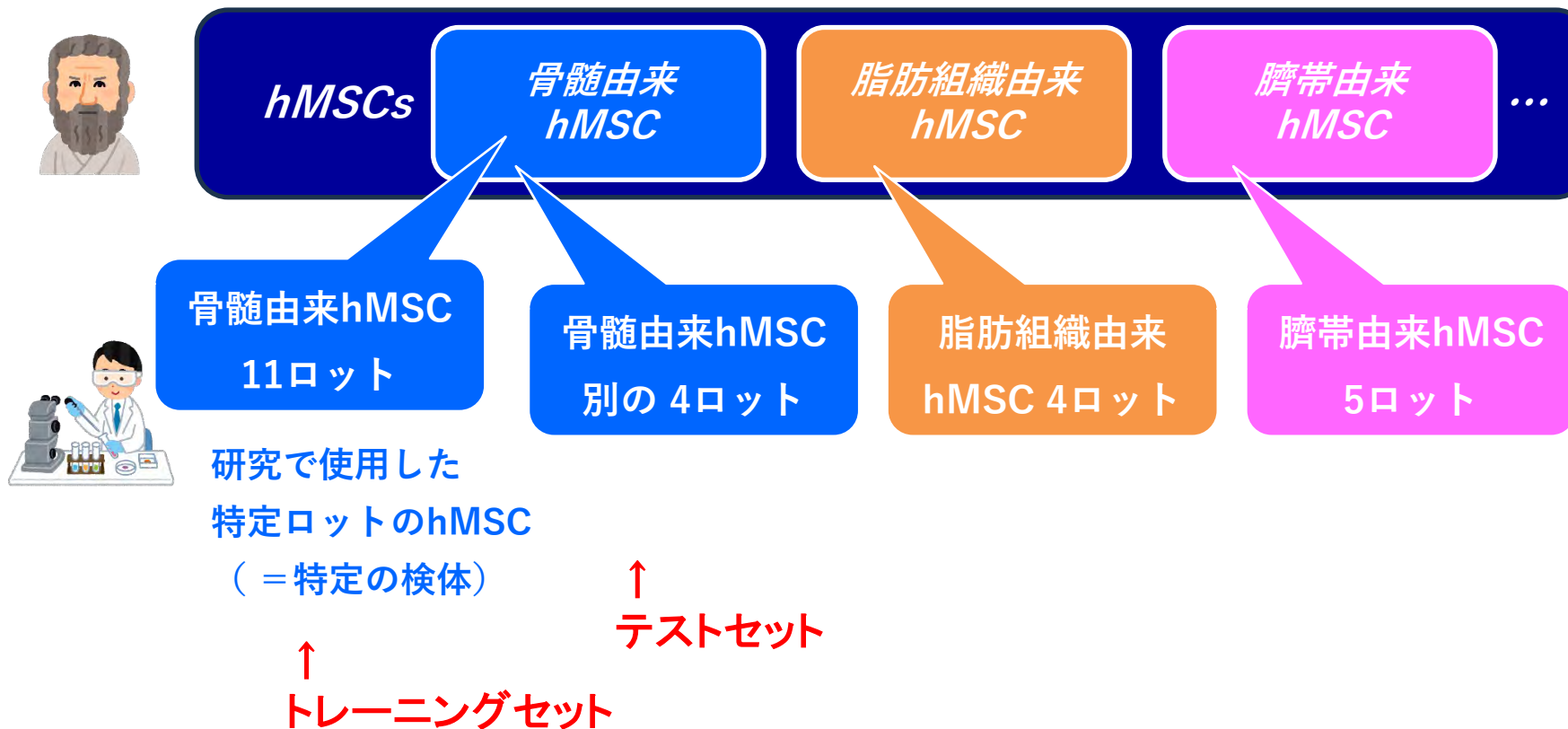
- CL3-like cells contribute to VEGF production under ischemia.
- The expression of *LRRC75A* is high in CL3-like cells.
- KD of *LRRC75A* suppresses the secretion of VEGF.

# hMSC (ヒト間葉系幹細胞/間葉系間質細胞) の科学

## 仮説

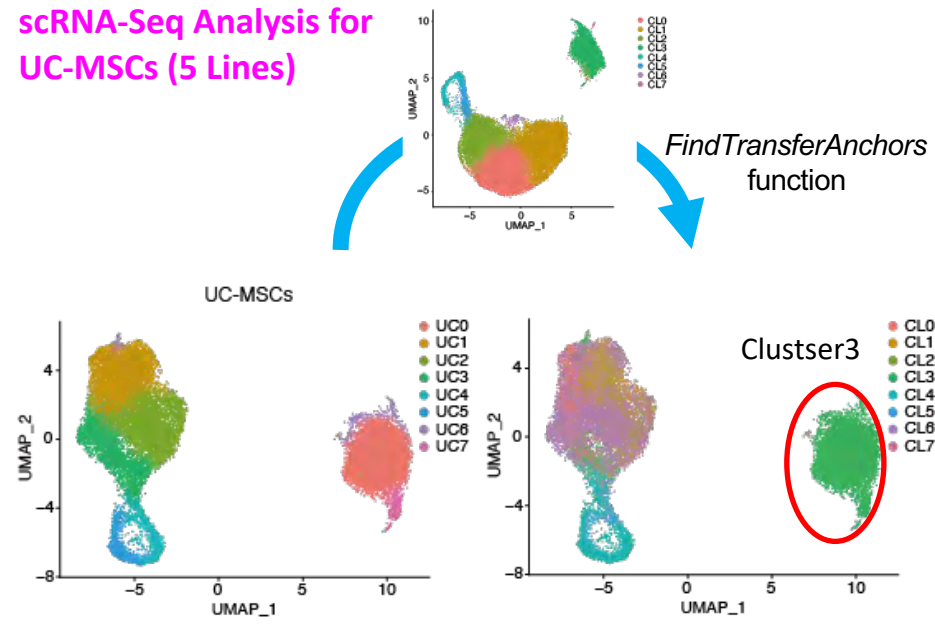
CL3で発現する *LRRC75A* は、  
虚血下での hMSC からの VEGF の分泌を制御する

hMSC の母集団 = プラトンの言う「アイデア」としての hMSC = 『一般的な hMSC』

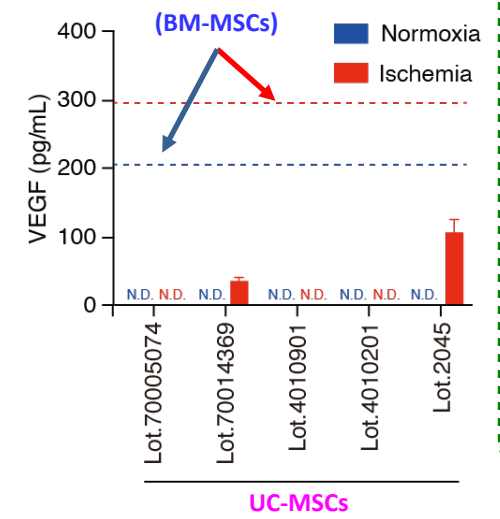


# 臍帯由来hMSC (UC-MSC) におけるCL3様細胞

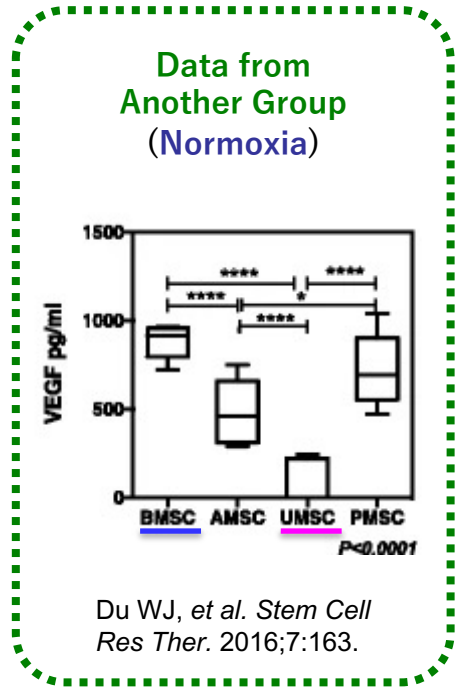
scRNA-Seq Analysis for UC-MSCs (5 Lines)



VEGF Production in Each Line (Normoxia/Ischemia)



Data from Another Group (Normoxia)

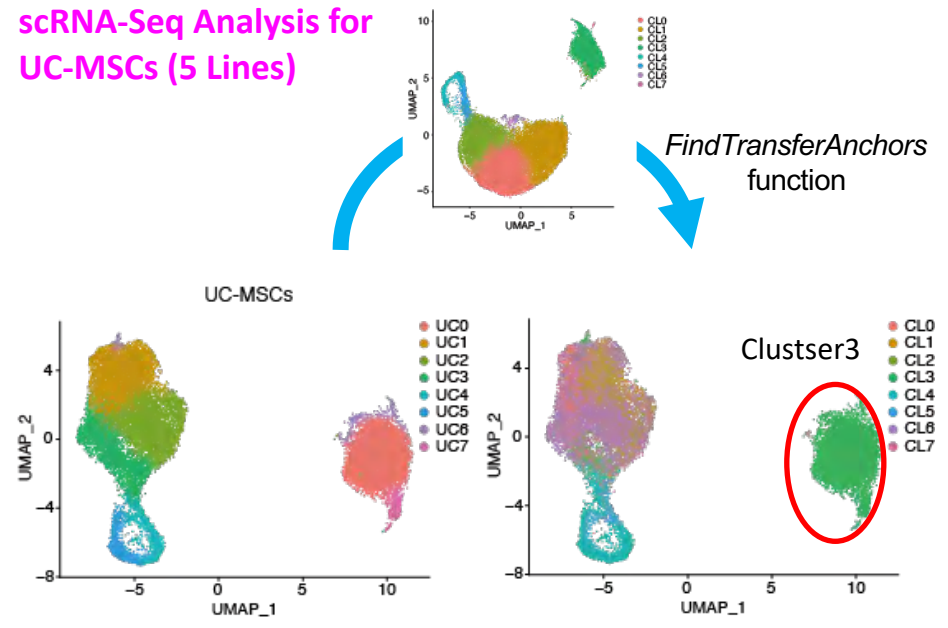


Du WJ, *et al.* *Stem Cell Res Ther.* 2016;7:163.

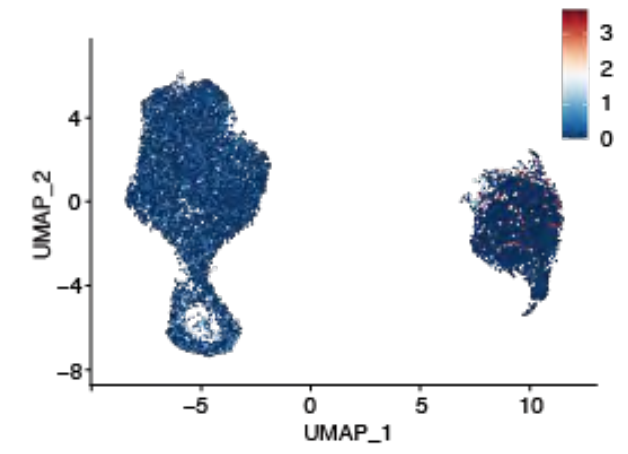


# 臍帯由来hMSC (UC-MSC) におけるCL3様細胞

scRNA-Seq Analysis for UC-MSCs (5 Lines)



Expression of *LRRC75A* in UC-MSCs



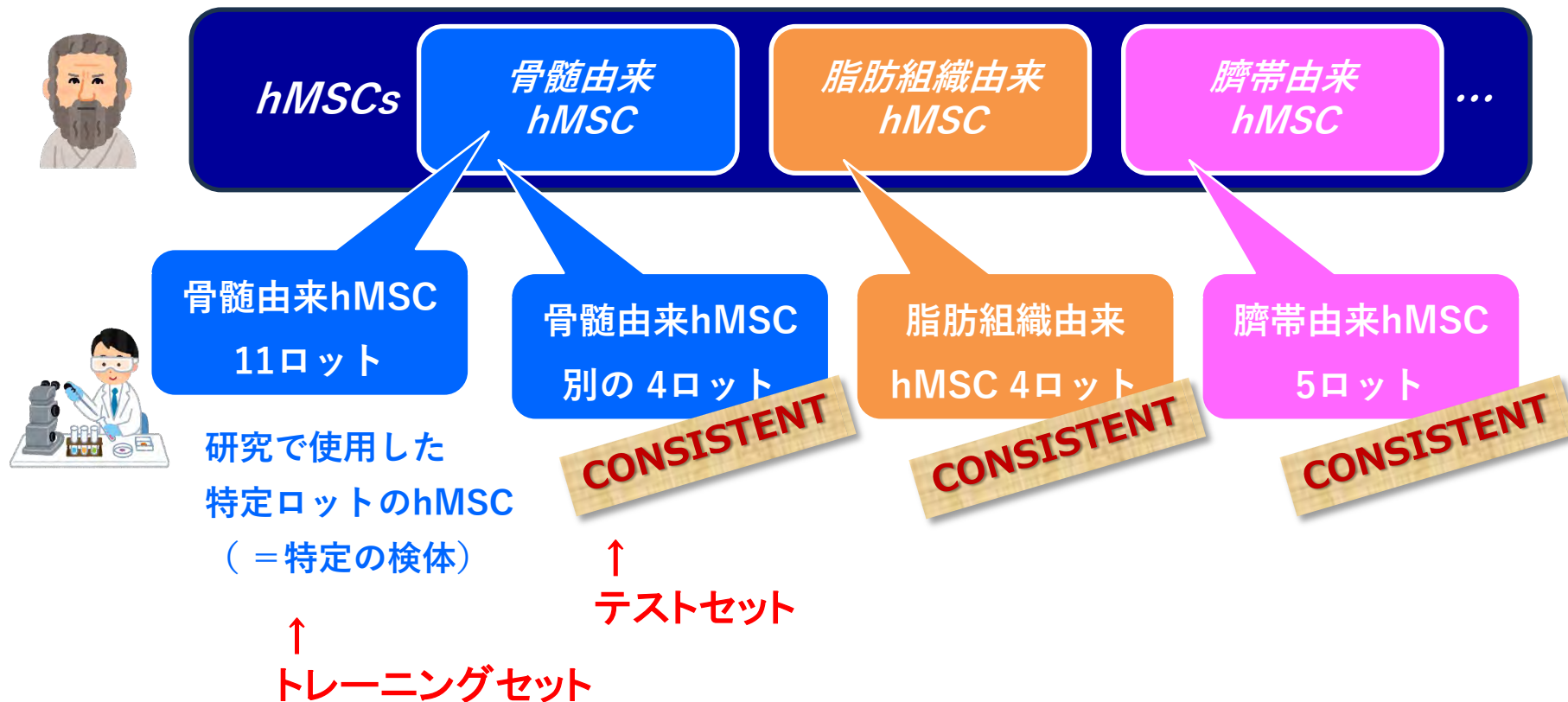
Significantly fewer cells express high levels of *LRRC75A* in CL3-like cells.

# hMSC (ヒト間葉系幹細胞/間葉系間質細胞) の科学

## 仮説

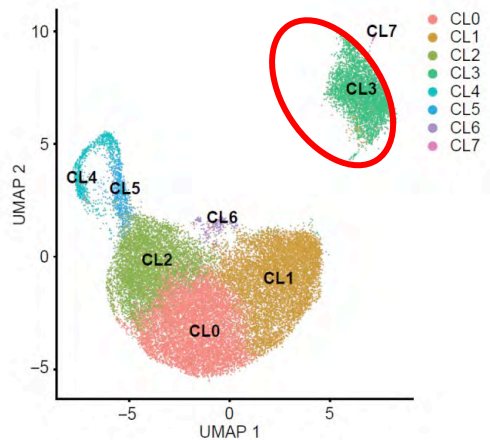
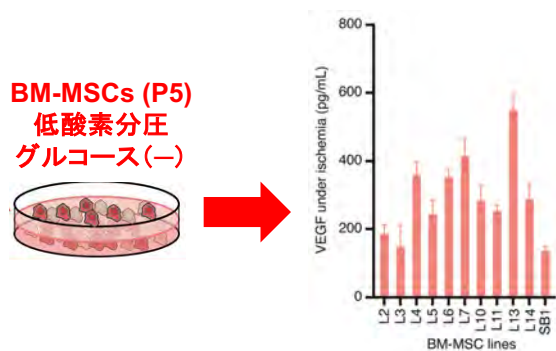
CL3で発現する *LRRC75A* は、  
虚血下での hMSC からの VEGF の分泌を制御する

hMSC の母集団 = プラトンの言う「アイデア」としての hMSC = 『一般的な hMSC』



血管新生・VEGF分泌の再現性を期待するなら、この細胞集団を確保できるように製造する

# シングルセル・トランスクリプトーム解析

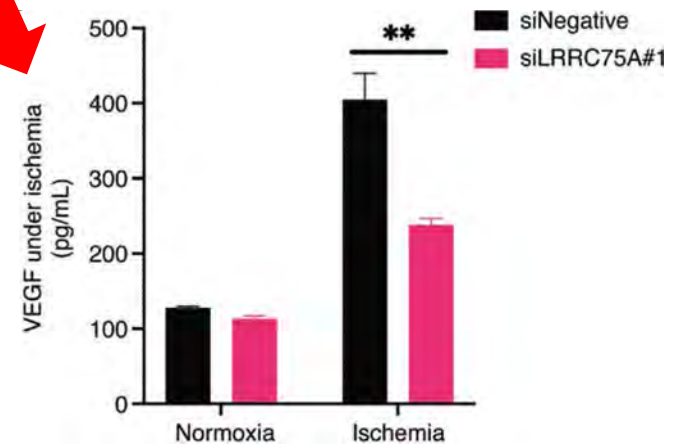
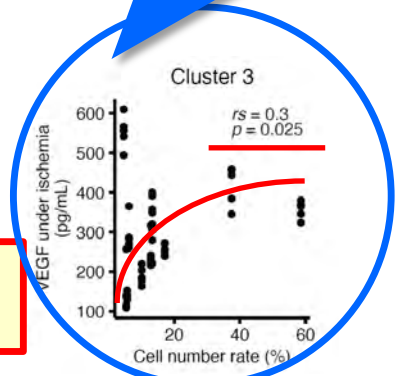


CL3で発現上昇している遺伝子  
トップ20

Gene name	Ave log <sub>2</sub> FC
<u>LRRC75A</u>	1.0357
KRT7	0.8382
KRT16	0.7902
C1orf56	0.7815
CRYAB	0.7696
HSPB1	0.7572
MTRNR2L12	0.7060
AC092069.1	0.7024
ADIRF	0.6712
LGALS1	0.6573
ID1	0.6525
MT2A	0.6424
S100A11	0.6312
COMP	0.6132
EIF5A	0.6057
FLG	0.6049
SH3BGRL3	0.5970
TPM2	0.5859
POLR2L	0.5555
GADD45B	0.5543

隠れていたCQAs

LRRC75Aは虚血環境下のVEGF分泌に生理的に寄与



# 本日の結論

- 細胞加工製品の原料や有効成分である細胞は複雑で不均一であるため、認識しうる品質特性をすべて列挙したとしても、製品の有効性や安全性の再現性を保証するために必要十分な重要品質特性(CQA)をすべて特定・管理することはできない可能性が高い。
- 細胞加工製品の「真の有効成分細胞」の特定、隠れたCQAの採掘・同定、および作用機序の理解には、細胞集団内の不均一性(例:MSCの亜集団)をその効力・有効性にもとづき分類・理解するための科学、言わば、Stem Cell Pharmacotaxonomy「幹細胞薬理分類学」が必要。
- 例えば、各種のトランスクリプトーム解析や画像解析に基づき、力価／有効性と関連する細胞亜集団やバイオマーカーを同定することは、有効な細胞加工製品を再現性高く製造する製法の確立(確固としたCQAに基づく製造設計や規格・in houseの重要管理項目の設定)、およびこれらによる合理的で柔軟な製法変更の実現に役立つと考えられる。
- これらは、知財(新規作用機序・有効成分)や薬価(画期性加算・有用性加算)の獲得にもつながりうる。
- つまり、細胞加工製品の価値向上、品質や供給の安定性・継続性が期待できるということです。



# 原料細胞集団間・細胞加工製品間の不均質性や細胞加工製品内の不均一性の「見える化」、適切な原料細胞・有効成分細胞・作用機序の理解



# Acknowledgements

## Collaborators

Takumi Miura<sup>1,2</sup>, Tsukasa, Kouno<sup>3</sup>, Megumi Takano<sup>1</sup>, Takuya Kuroda<sup>1</sup>, Yumiko Yamamoto<sup>3</sup>, Shinji Kusakawa<sup>1</sup>, Masaki Suimye Morioka<sup>3</sup>, Tohru Sugawara<sup>2,4</sup>, Takamasa Hirai<sup>1</sup>, Satoshi Yasuda<sup>1</sup>, Rumi Sawada<sup>1</sup>, Satoko Matsuyama<sup>1,5</sup>, Hideya Kawaji<sup>3,6</sup>, Takeya Kasukawa<sup>3</sup>, Masayoshi Itoh<sup>3</sup>, Akifumi Matsuyama<sup>5</sup>, Jay W. Shin<sup>3,7</sup>, Akihiro Umezawa<sup>2</sup>, Jun Kawai<sup>3,8</sup>

<sup>1</sup> Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences, Kanagawa, Japan

<sup>2</sup> Center for Regenerative Medicine, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan

<sup>3</sup> RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama, Japan

<sup>4</sup> Biopharmaceutical and Regenerative Sciences, Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, Yokohama, Japan

<sup>5</sup> Center for Reverse TR, Osaka Habikino Medical Center, Osaka Prefectural Hospital Organization, Osaka, Japan

<sup>6</sup> Research Center for Genome & Medical Sciences, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan

<sup>7</sup> Genomic Institute of Singapore, Agency for Science, Technology and Research, Singapore

<sup>8</sup> Life Science Technology Project, Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology (KISTEC), Kawasaki, Japan



**Funded by**



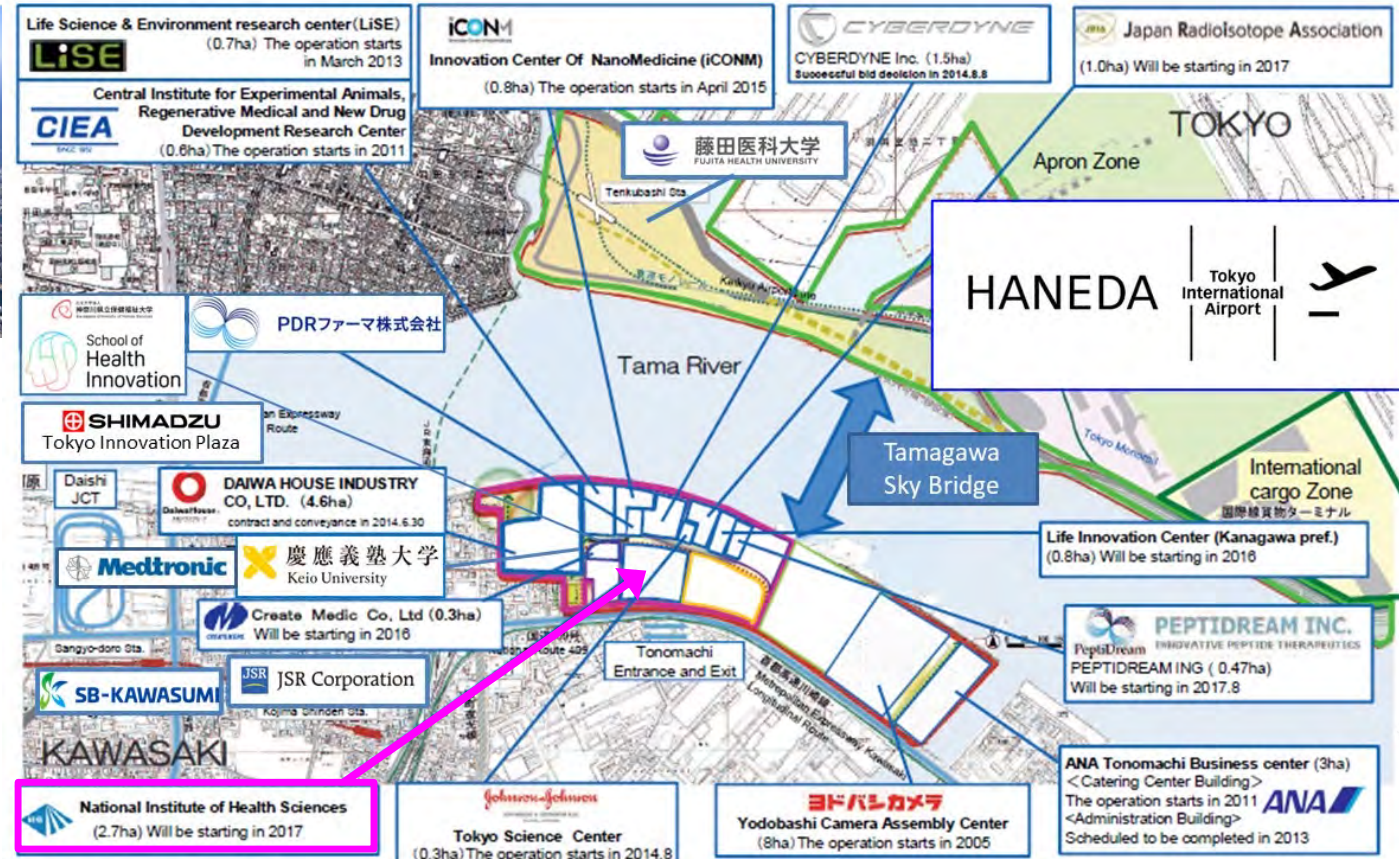
# ご質問があれば・・・



佐藤陽治

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部

E-mail: [yoji@nihs.go.jp](mailto:yoji@nihs.go.jp)



\* <https://www.oag.com/hubfs/air-canada-787.jpg>

\*\* <http://www.city.kawasaki.jp/en/page/0000038680.html> を改変

# 以下、補足資料



特性を理解することがカギなのは、子育てでも人材育成でもモノづくりでも同じ！

## 細胞加工製品の代表的な特性

個々の最終製品の間や

原料細胞／中間製品のロット／バンク間で

品質のばらつき

最終製品中の個々の細胞や

原料／中間製品中の個々の細胞の

形質のばらつき

「原料／製品の不均質性」 and/or 「細胞集団の不均一性」

薬機法 第二十三条の二十六  
「再生医療等製品の条件・期限付き承認」  
の要件の一つ

「申請に係る再生医療等製品が均質でないこと」

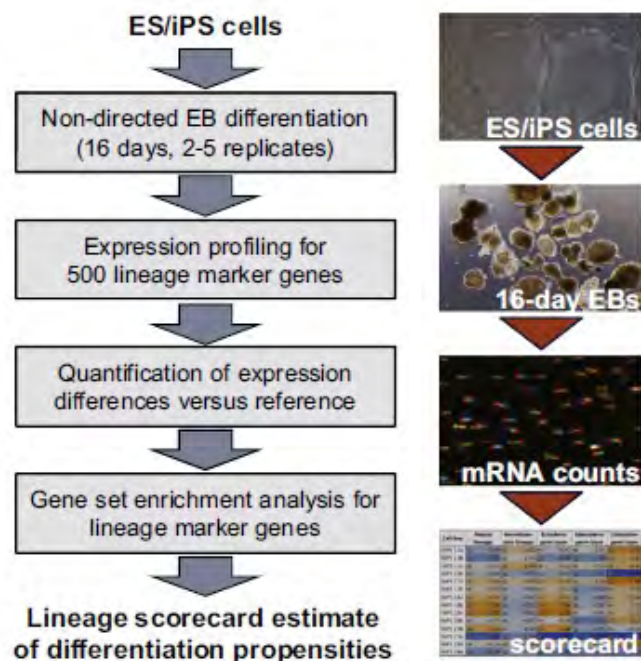
「ヒト細胞加工製品の製造工程の変更に伴う  
同等性／同質性評価に関する指針」(案)

2024年1月24日パブリックコメント募集終了

案件番号: 495230296

# 原料としてのヒトiPS/ES細胞株間における「不均質性」

Bock et al. Cell. 2011;144:439-52



Cell line	Neural lineage	Hematopoietic lineage	Ectoderm germ layer	Mesoderm germ layer	Endoderm germ layer
HUES1	-1.84	-0.30	-1.56	0.06	-0.59
HUES3	-0.29	-0.01	-0.23	-0.07	0.08
HUES6	-0.78	-0.26	-0.51	-0.05	-0.47
HUES8	-0.15	0.69	-0.17	0.68	1.45
HUES9	-0.89	0.31	-0.75	0.51	0.37
HUES28	-1.33	-0.11	-0.91	1.03	-0.07
HUES44	0.70	-0.27	0.52	-0.48	-0.45
HUES45	-0.46	-0.26	-0.49	-0.02	0.65
HUES48	0.83	0.18	0.70	0.24	0.55
HUES49	0.19	0.07	0.03	-0.66	-0.26
HUES53	-0.95	0.65	-1.19	-0.22	-0.20
HUES62	0.25	-0.15	0.15	-0.60	0.24
HUES63	0.62	0.39	0.72	0.34	0.61
HUES64	1.45	-0.07	1.44	-0.56	-0.61
HUES65	0.19	0.02	0.22	0.19	-0.15
HUES66	0.59	-0.67	0.36	-1.22	-0.37
H1	1.54	-0.29	1.21	0.07	-0.56
H9	1.08	0.01	1.10	0.55	-0.16

Cell line	Neural lineage	Hematopoietic lineage	Ectoderm germ layer	Mesoderm germ layer	Endoderm germ layer
hiPS 11a	-0.69	0.18	-0.37	-0.23	0.83
hiPS 11b	-1.17	-0.23	-0.96	-1.03	0.47
hiPS 11c	-0.22	0.40	-0.03	-0.16	0.37
hiPS 15b	-0.48	-0.78	-0.63	-1.11	-2.49
hiPS 17a	0.19	0.05	0.33	0.00	1.16
hiPS 17b	-0.07	-0.48	-0.02	-0.83	0.20
hiPS 18a	0.28	-0.52	0.31	-0.67	0.20
hiPS 18b	0.80	-0.72	0.84	-0.62	0.15
hiPS 18c	0.93	-0.65	1.05	-0.41	0.10
hiPS 20b	-0.37	-0.47	-0.30	-1.16	0.56
hiPS 27b	0.52	-0.50	0.68	-0.71	-0.42
hiPS 27e	-1.61	-1.04	-2.12	-1.82	-3.27
hiPS 29d	-0.25	-0.04	0.00	-0.11	0.83
hiPS 29e	-0.99	-0.60	-1.15	-1.14	-1.08

Differentiation propensity: ■ high ■ medium ■ low

↑ ↗ → ↘ ↓

ヒトiPS/ES細胞株のセル・バンクを「未分化性」や「多能性」のみで品質管理していると、目的とする細胞への分化効率にバラツキが生じやすい

そのまま使えるか？

特定の製品製造用の細胞基材としてのセルバンクでは「目的に適った分化傾向・分化能」を品質として管理する必要がある

「多能性」は確かにあるが、株間で「分化傾向」がさまざま

では、どうしたら「良い原料」を選ぶことができるのか？

# 品質特性指標 バイオマーカー

最終目的細胞に再現性高く、高効率に分化するヒト多能性幹細胞を選抜するための、ヒト多能性幹細胞中の特性指標を探し出し、原料の規格設定に利用

特性指標となる因子の効率的な探索・検証の手法の開発

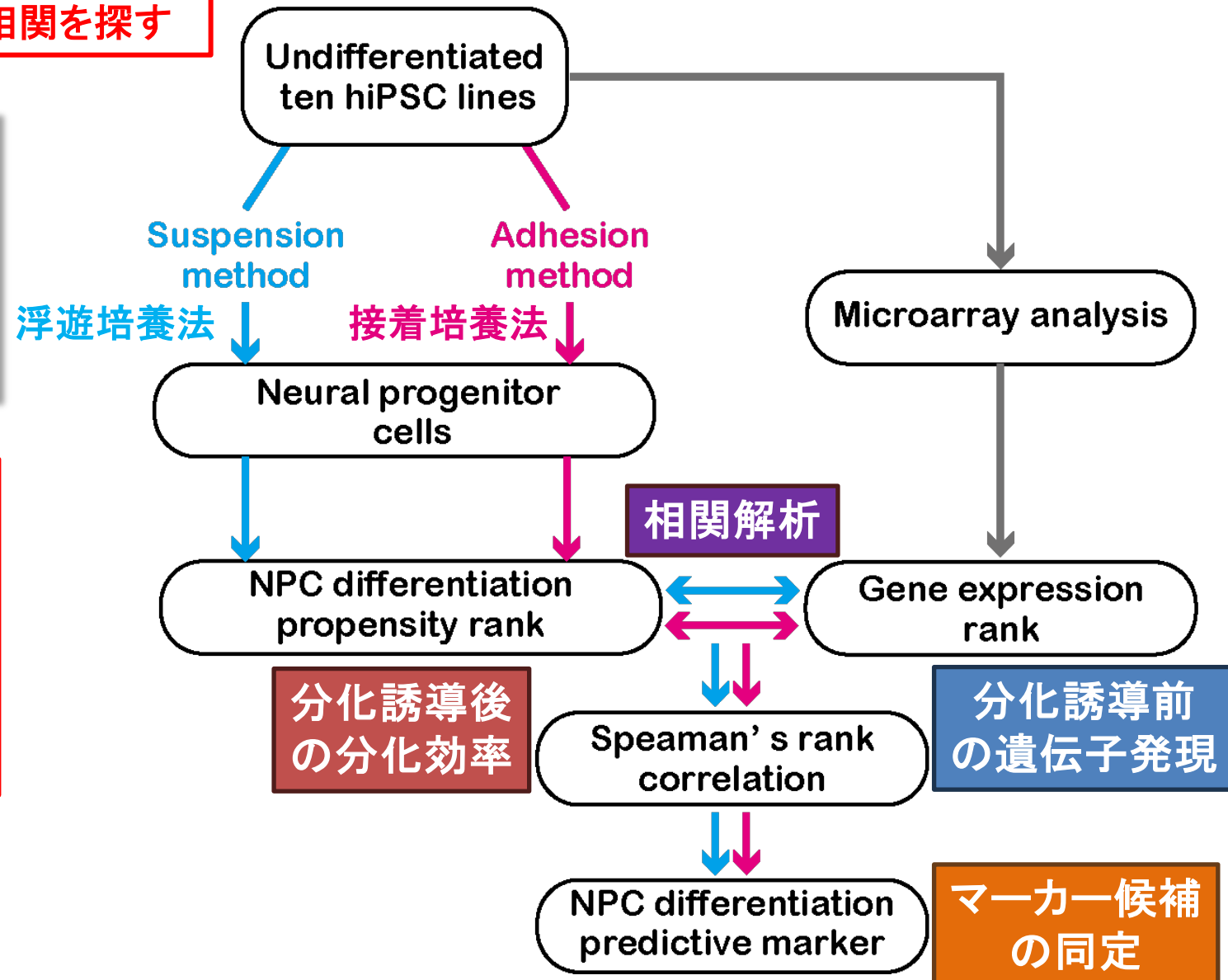
# hiPSCの分化指向性の指標となる因子の探索

複数の分化誘導法  
で共通の相関を探す

「神経幹／前駆細胞への分化傾向」  
を予測するためのiPS細胞  
バイオマーカーの同定

オミクス解析を使って  
有効性・力価関連指標を  
探索する際の課題

＝偽陽性をいかに排除するか？

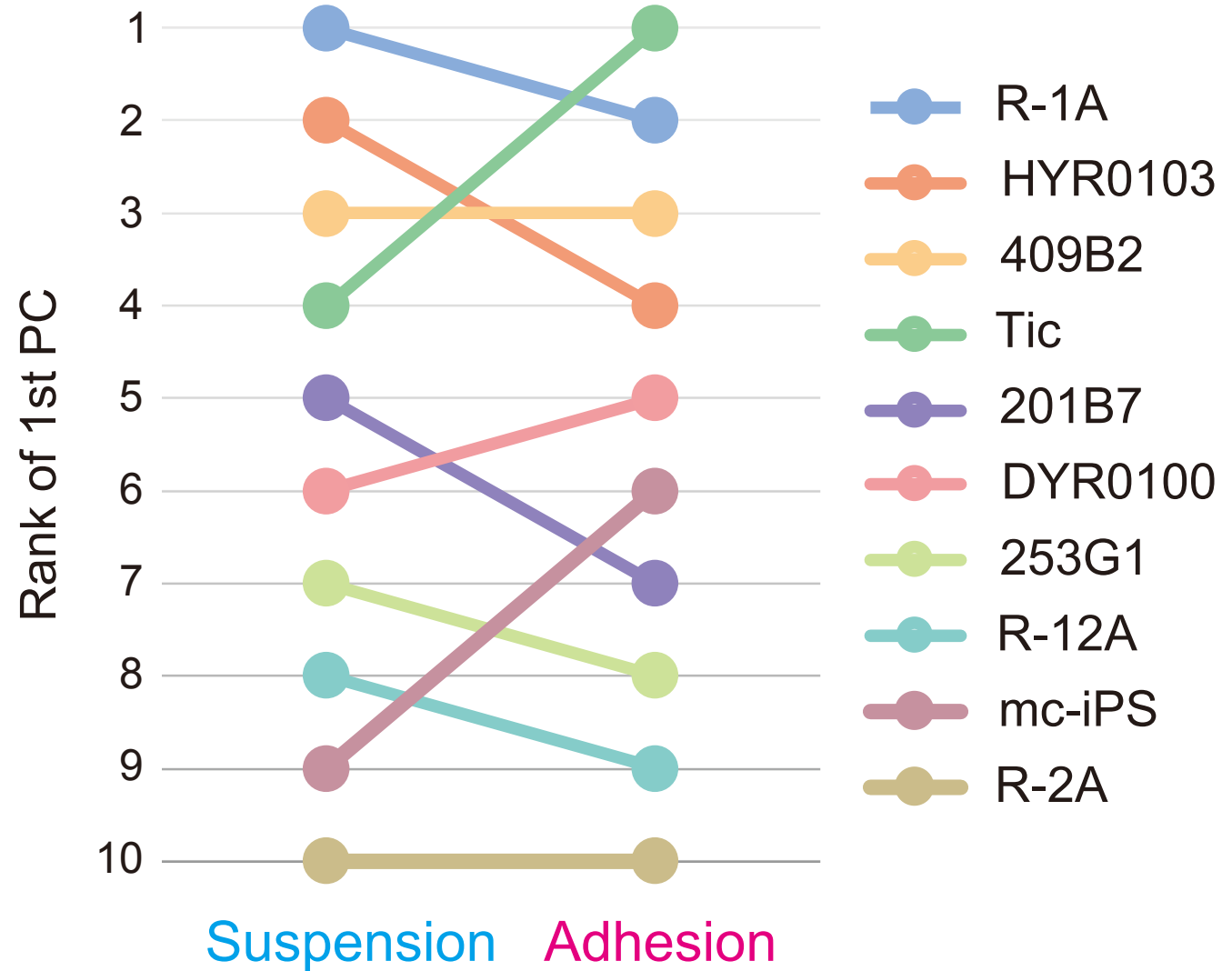


# 10株のhiPSC株のNS/PC分化傾向の順位

第一主成分得点(PC1)

		Differentiation	
		Suspension	Adhesion
Cell line	R-1A	3.33	1.88
	HYR0103	1.85	0.64
	409B2	1.19	0.68
	Tic	-0.26	1.92
	201B7	-0.50	-0.59
	DYR0100	-0.60	0.54
	253G1	-0.83	-1.47
	R-12A	-0.91	-1.58
	mc-iPS	-1.19	0.05
	R-2A	-2.07	-2.06

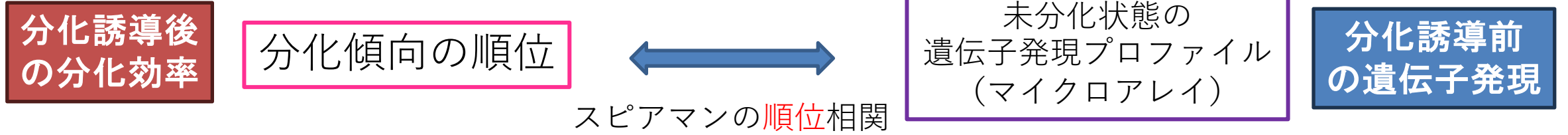
PC1順位 → NPC分化傾向の順位



PAX6, SOX1, NESの遺伝子発現を主成分分析(PCA)を行い第一主成分得点(PC1)を算出し、PC1の高い株をNS/PC分化傾向の高い株と定義した。

# NS/PC分化予測マーカー候補遺伝子の同定

## 分化傾向と相関のある遺伝子の同定

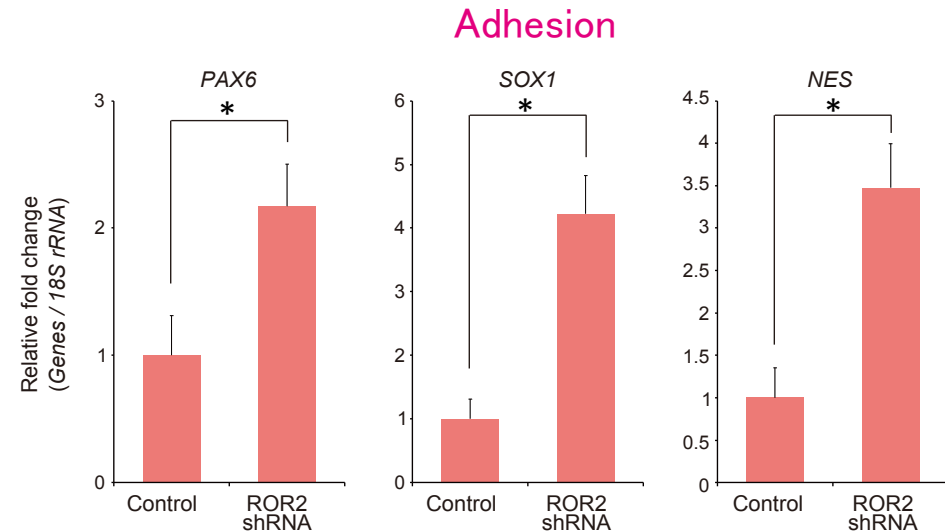
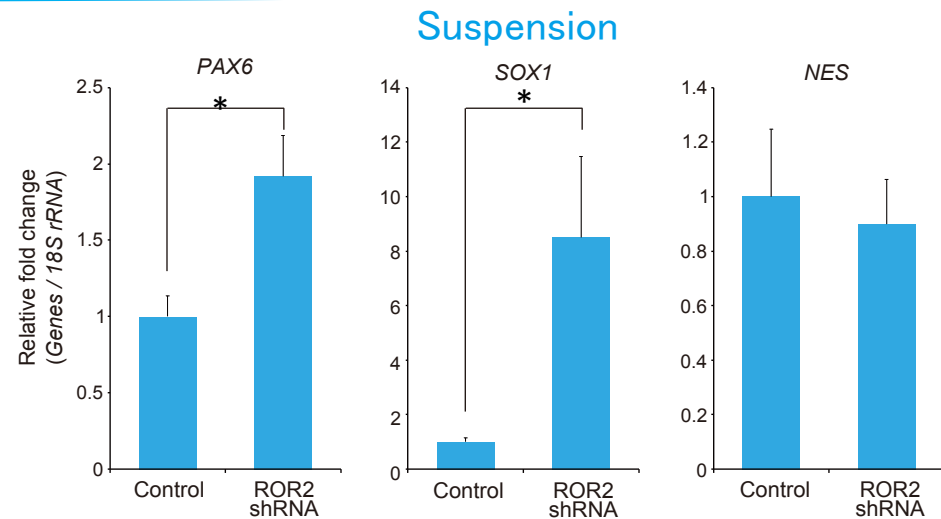
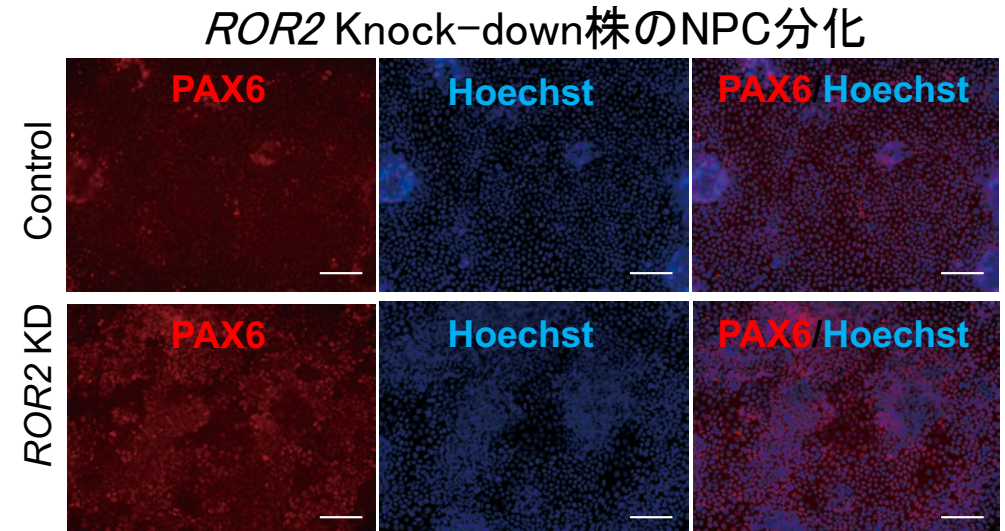
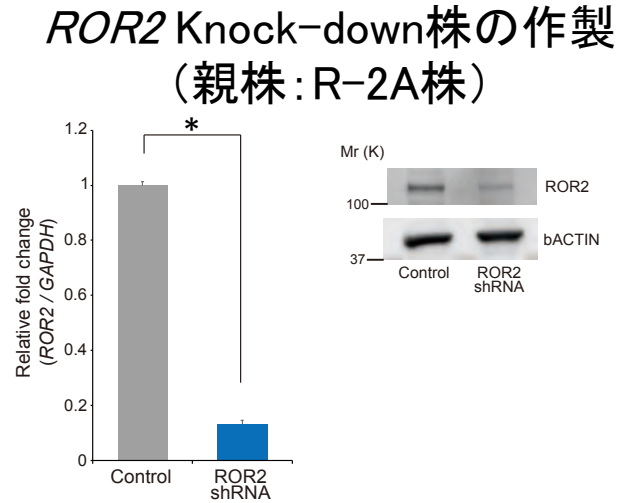
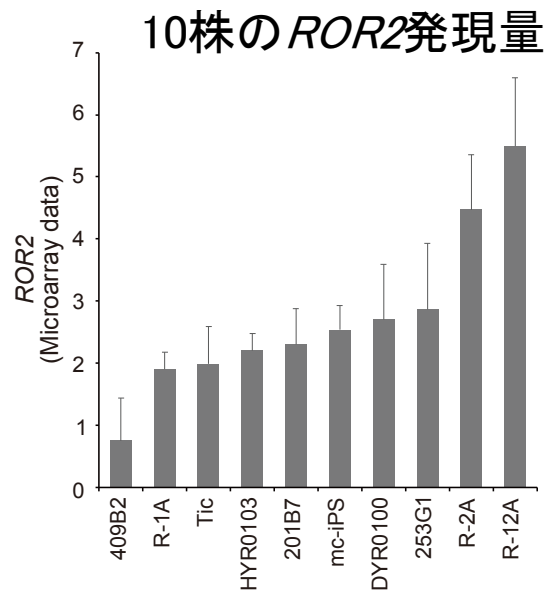


**正相関**：発現が高い株が分化しやすい

**負相関**：発現が低い株が分化しやすい

2種類の分化方法で共通して有意な相関を示した遺伝子を抽出することにより、神経分化予測マーカーとして信頼性の高い遺伝子を選別した。その結果、神経分化と**有意かつ強い負の相関**( $P < 0.01$ )を示す遺伝子 **ROR2**を**神経分化予測マーカー候補**として同定した。ROR2は、Wntシグナル伝達においてWNTの受容体であると報告されている。

# NS/PC分化予測マーカー候補遺伝子ROR2の機能解析




R-2A株を親株にレンチウイルスベクターを用いshRNAを導入し、ROR2 Knock-down株を作製した。ROR2 KD株をNS/PC分化誘導すると、NS/PC分化マーカーが有意に増加した。

# 「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー (神経幹細胞／神経前駆細胞)

**scientific reports**

(2024) 14:690

**NEW!**

 Check for updates

OPEN ***ROR2* expression predicts human induced pluripotent stem cell differentiation into neural stem/progenitor cells and GABAergic neurons**

Takuya Kuroda<sup>1,2</sup>, Satoshi Yasuda<sup>1,2,3</sup>, Satoko Matsuyama<sup>1,4</sup>, Takumi Miura<sup>1,2,5</sup>, Rumi Sawada<sup>1</sup>, Akifumi Matsuyama<sup>4</sup>, Yumiko Yamamoto<sup>6</sup>, Masaki Suimye Morioka<sup>6</sup>, Hideya Kawaji<sup>6,7</sup>, Takeya Kasukawa<sup>6</sup>, Masayoshi Itoh<sup>6</sup>, Hidenori Akutsu<sup>5</sup>, Jun Kawai<sup>2,6</sup> & Yoji Sato<sup>1,2,3,8,9</sup>✉



# 「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー（心筋細胞）

理研プレスリリース

## SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

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

Received: 31 August 2018  
Accepted: 21 February 2019  
Published online: 15 March 2019

Fumiya Ohashi<sup>1,2,3,4</sup>, Shigeru Miyagawa<sup>2</sup>, Satoshi Yasuda<sup>1</sup>, Takumi Miura<sup>1</sup>, Takuya Kuroda<sup>1</sup>, Masayoshi Itoh<sup>5</sup>, Hideya Kawaji<sup>5,6</sup>, Emiko Ito<sup>2</sup>, Shohei Yoshida<sup>2</sup>, Atsuhiko Saito<sup>2</sup>, Tadashi Sameshima<sup>4</sup>, Jun Kawai<sup>5</sup>, Yoshiki Sawa<sup>2</sup> & Yoji Sato<sup>1,3,7,8,9</sup>

Selection of human induced pluripotent stem cell (hiPSC) lines with high cardiac differentiation potential is important for regenerative therapy and drug screening. We aimed to identify biomarkers for predicting cardiac differentiation potential of hiPSC lines by comparing the gene expression profiles of six undifferentiated hiPSC lines with different cardiac differentiation capabilities. We used three platforms of gene expression analysis, namely, cap analysis of gene expression (CAGE), mRNA array, and microRNA array to efficiently screen biomarkers related to cardiac differentiation of hiPSCs. Statistical analysis revealed candidate biomarker genes with significant correlation between the gene expression levels in the undifferentiated hiPSCs and their cardiac differentiation potential. Of the candidate genes, *PF4* was validated as a biomarker expressed in undifferentiated hiPSCs with high potential for cardiac differentiation in 13 additional hiPSC lines. Our observations suggest that *PF4* may be a useful biomarker for selecting hiPSC lines appropriate for the generation of cardiomyocytes.

## 広報活動

Home > 広報活動 > プレスリリース（研究成果）2019 >

報道発表資料

前の記事 一覧へ戻る 次の記事

2019年3月22日  
神奈川県立産業技術総合研究所  
理化学研究所  
医薬品食品衛生研究所

Twitter

### 「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

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、宮川稔特任教授、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应用するためには、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。

# 「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー(外胚葉 vs. 中・内胚葉)



## ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09511-4>

OPEN

## SALL3 expression balance underlies lineage biases in human induced pluripotent stem cell differentiation

Takuya Kuroda<sup>1</sup>, Satoshi Yasuda<sup>1</sup>, Shiori Tachi<sup>1,2</sup>, Satoko Matsuyama<sup>1,3</sup>, Shinji Kusakawa<sup>1</sup>, Keiko Tano<sup>1</sup>, Takumi Miura<sup>1</sup>, Akifumi Matsuyama<sup>3</sup> & Yoji Sato<sup>1,2,4,5</sup>

Clinical applications of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) are expected, but hiPSC lines vary in their differentiation propensity. For efficient selection of hiPSC lines suitable for differentiation into desired cell lineages, here we identify *SALL3* as a marker to predict differentiation propensity. *SALL3* expression in hiPSCs correlates positively with ectoderm differentiation capacity and negatively with mesoderm/endoderm differentiation capacity. Without affecting self-renewal of hiPSCs, *SALL3* knockdown inhibits ectoderm differentiation and conversely enhances mesodermal/endodermal differentiation. Similarly, loss- and gain-of-function studies reveal that *SALL3* inversely regulates the differentiation of hiPSCs into cardiomyocytes and neural cells. Mechanistically, *SALL3* modulates DNMT3B function and DNA methyltransferase activity, and influences gene body methylation of Wnt signaling-related genes in hiPSCs. These findings suggest that *SALL3* switches the differentiation propensity of hiPSCs toward distinct cell lineages by changing the epigenetic profile and serves as a marker for evaluating the hiPSC differentiation propensity.

## プレスリリース

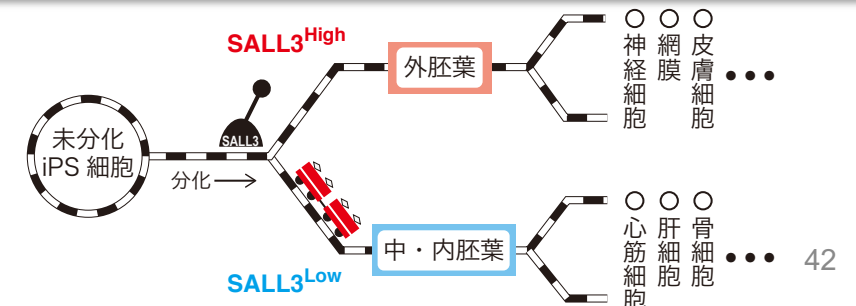
ヒトiPS細胞の分化傾向調節遺伝子SALL3を同一—目的細胞に分化しやすいiPS細胞株を選別可能に—



令和元年5月15日 プレスリリース

国立医薬品食品衛生研究所  
日本医療研究開発機構

国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部の佐藤陽治部長、安田智室長、黒田拓也主任研究官らの研究グループは、藤田医科大学医学部 松山晃文教授との共同研究により、ヒトiPS細胞株の分化傾向を予測するためのマーカー遺伝子としてSALL3を同定しました。ヒトiPS細胞は三胚葉(外胚葉、中胚葉、内胚葉)全ての系譜に分化することのできる能力(多分化能)を持ちますが、細胞株によって各系譜への分化のしやすさ(分化傾向)にバラツキがあることが明らかになっています。そのため、目的とする細胞への分化に適した細胞株を選択することの重要性が注目されています。ヒトiPS細胞において、今回同定したSALL3の未分化状態での発現量を測定することにより、相対的に発現量が高い細胞株は外胚葉に分化しやすく、逆に発現量が低い細胞株は中・内胚葉に分化しやすいことが予測できます。



# 「生きた素材」を使った「ものづくり」

ウイスキー酵母



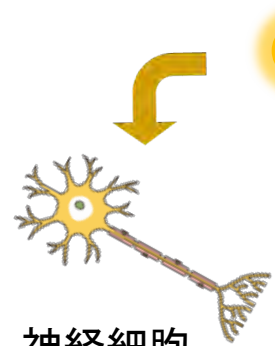
ビール酵母

ワイン酵母

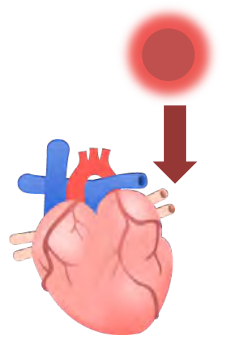


清酒酵母

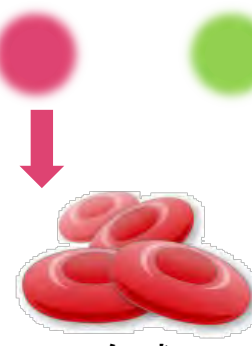
目的に合った酵母(素材)を使い分けることで、各品目で美味しい(高品質な)製品を作ります  
「素材へのこだわり」「至高の素材」「厳選素材」「選び抜かれた素材」



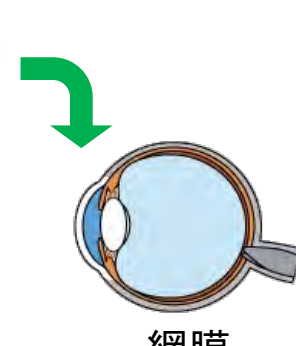
神経細胞



心筋細胞



血球



網膜

「高い再現性で品質の高い最終製品(目的細胞)を製造する」という目的に適った**素材**(例:専用の**細胞株**)  
またはその**規格・重要管理項目**を選択する(**囲い込む**)ことが重要

湘南Health Innovation Park

横浜市立大学

神奈川県庁



理化学研究所



横浜市立大学  
鶴見キャンパス

神奈川県立  
保健福祉大



国立衛研 KISTEC殿町

KISTEC



国立成育医療  
研究センター



慶應義塾日吉キャンパス



慶應義塾新川崎タウンキャンパス

慶應義塾殿町タウンキャンパス



藤田医科大学東京  
先端医療研究セン  
ター



羽田空港